

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KÖK HÜCRE BİLİMLERİ ANABİLİM DALI**

**QUERCETİNİN KML KÖK HÜCRELERİ ÜZERİNE
SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN MOLEKÜLER DÜZEYDE
İNCELENMESİ**

**Hazırlayan
Günsu AYDIN**

**Danışman
Prof. Dr. Ali ÜNAL**

Yüksek Lisans Tezi

**Temmuz 2017
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KÖK HÜCRE BİLİMLERİ ANABİLİM DALI**

**QUERCETİNİN KML KÖK HÜCRELERİ ÜZERİNE
SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN MOLEKÜLER DÜZEYDE
İNCELENMESİ**

**Hazırlayan
Günsu AYDIN**

**Danışman
Prof. Dr. Ali ÜNAL**

Yüksek Lisans Tezi

**Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TYL-2015-5806 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

**Temmuz 2017
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Günsu AYDIN



YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Quercetin’in KML Kök Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkilerinin Moleküler Düzeyde İncelenmesi” adlı Yüksek Lisans tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Günsu AYDIN

Danışman

Prof.Dr.Ali ÜNAL

Kök Hücre Bilimleri ABD Başkanı

Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL

Prof. Dr. Ali ÜNAL danışmanlığında **Günsu AYDIN** tarafından hazırlanan “**Quercetin’in KML Kök Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkilerinin Moleküler Düzeyde İncelenmesi**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Kök Hücre Bilimleri** Anabilim Dalında **yüksek lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

06 / 07 / 2017

JÜRİ:

Danışman : Prof. Dr. Ali ÜNAL

(İç Hastalıkları Anabilim Dalı)

Üye : Prof. Dr. Yusuf BARAN

(Abdullah Gül Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü)

Üye : Yrd. Doç. Dr. Gökçen DİNÇ

(Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı)

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim ve öğrenim sürecim boyunca yanımda olan, engin tecrübesini benimle paylaşan ve bana yol gösteren değerli danışmanım Prof. Dr. Ali ÜNAL'a,

Tez konumun belirlenmesi, tezimin laboratuvar çalışması ve hazırlanması sırasında derin bilgi ve becerilerini benimle paylaşan Prof. Dr. Yusuf BARAN ve Arş. Gör. Yağmur KİRAZ'a

Laboratuvarda çalıştığım süre boyunca her türlü desteği ve yardımı alabildiğim Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL ve tüm değerli Erciyes Üniversitesi Betül-Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Merkezi çalışanlarına,

Tezimin flowsitometrik analizlerinin yapılmasında yardımını esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Yavuz KÖKER'e ve flow sitometri laboratuvarında beraber çalışmaktan sonsuz keyif aldığım ve her daim desteklerini gördüğüm, bundan sonraki yaşamımda da yanımda olmalarından mutluluk duyacağım değerli arkadaşlarım Biyolog Esra AKPINAR, Biyolog Huriye ÇELİKZENCİR, Biyolog Demet BOLAT'a,

Hayallerimin her şeyden daha değerli olduğunu öğreten, her türlü konuyu konuşup dertleşebildiğim, beraber gülmeye eğlenebildiğim, bir dönem birlikte çalışmaktan kendimi şanslı addettiğim, bana bir hocadan çok abla gibi yaklaşan biricik hocam Yrd. Doç. Dr. Gökçen DİNÇ'e,

Dostluğun mesafelerle bitmeyeceğini anlamamı sağlayan, dertlerimi her daim sabırla dinleyen can dostum Elif Selin DİKMEN'e,

“Kardeş” tanımının birebir karşılığı olan, varlığı ile yüzümü güldüren kardeşim Süleyman HALICI'ya,

Bana yaşam veren, beni mükemmel değer yargıları ile yetiştiren, tüm hayatım boyunca her konuda tam desteklerini hissettiğim, kendimi geliştirmemi sağlayan, her daim arkamda olan, sonsuz sevgi ve saygı ile bağlı olduğum ailem; canım babam Halil AYDIN'a, canım annem Sakine AYDIN'a sonsuz teşekkürler...

Bu tez çalışmasına maddi destek veren Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (Proje kodu: TYL-2015-5806) teşekkür ederim.

Günsu AYDIN

Kayseri, Temmuz 2017

QUERCETİNİN KML KÖK HÜCRELERİ ÜZERİNE SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN MOLEKÜLER DÜZEYDE İNCELENMESİ

Günsu AYDIN

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi, Temmuz 2017

Danışman: Prof. Dr. Ali ÜNAL

ÖZET

Kronik miyeloid lösemi (KML), transforme olmuş hematopoietik kök hücrenin klonal genişlemesi ile sonuçlanan miyeloproliferatif bozukluktur. KML tedavisinde gelişen dirençliliğin nedenlerinden biri KML kök hücrelerinin (KML-KH) tedavilerden etkilenmemesidir. Bu proje çalışması kapsamında quercetin KML kök hücreleri üzerine sitotoksik ve apoptotik etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

K562 hücre popülasyonundan KML-KH'leri sorting yöntemiyle elde edilmiş ve akım sitometri yöntemiyle ilgili belirteçlere bakılarak bu hücrelerin kök hücre olduğu immünofenotipik karakterizasyonla belirlenmiştir. KML-KH'leri artan dozlarda quercetine maruz bırakılmış ve quercetin hücre çoğalması üzerine etkisi XTT yöntemiyle belirlenmiştir. Quercetin KML-KH'leri üzerine apoptotik etkileri, kaspaz-3 enzim aktivitesi; mitokondri zar potansiyelinde (MZP) meydana gelen değişimler ve Annexin-V yöntemleri ile belirlenmiştir. Akım sitometri yöntemi ile seçilen hücrelerin, %93,2'inin CD38-CD34+ olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar seçilen hücrelerin KML-KH'si olduğunu göstermiştir. Artan dozlarda quercetine (1-40 nM) 48 saat boyunca maruz bırakılan KML-KH'lerinin çoğalma yüzdesinde doza bağımlı bir azalma belirlenmiş ve quercetin IC50 değeri 1,5 nM olarak hesaplanmıştır. Elde edilen XTT hücre proliferasyonu sonuçlarına göre, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 1, 5, 10, ve 20 nM quercetin KML-KH'lerinin proliferasyonunu %37, %72, %90 ve %99 oranında azalttığı hesaplanmıştır. Artan dozlarda quercetin (1-20 nM) uygulanan KML KH'lerinde kontrol grubuna göre doza bağımlı olarak kaspaz-3 enzim aktivitesinde ve MZP bozulunda önemli artışlar belirlenmiştir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, 10 ve 20 nM Quercetine maruz bırakılan KML-KH'lerinin kaspaz-3 enzim aktivitesinde sırasıyla %75 ve %321 artış belirlenirken aynı dozların KML-KH'lerindeki mitokondri

zar potansiyeli bozulunda %86 ve %333 artışlara neden olduğu tespit edilmiştir. Annexin-V analiz sonuçları da quercetin doza bağımlı olarak apoptozu tetiklediğini ve apoptotik hücre popülasyonunda önemli artışlar oluşturduğunu göstermiştir. 5, 10 ve 20 nM quercetine maruz bırakılan KML kök hücrelerindeki hücre ölümlerinde kontrol grubu hücrelerine kıyasla sırasıyla 2.6, 11.2 ve 39.3 kat artış belirlenmiştir. Quercetin KML kök hücreleri üzerine apoptotik ve antiproliferatif etkileri belirlenmiş ve kaspaz-3 enziminin ve mitokondrinin apoptotik hücre ölümlerindeki rolleri ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: Quercetin; kronik miyeloid lösemi kök hücreleri; apoptoz; sitotoksiste.



INVESTIGATION OF THE CYTOTOXIC EFFECTS OF QUERCETIN ON CML STEM CELLS AT THE MOLECULAR LEVEL

Günsu AYDIN

Erciyes University, Graduate School of Health Sciences

Department of Stem Cell Science

M.Sc. Thesis, July 2017

Supervisor: Prof. Dr. Ali ÜNAL

ABSTRACT

Chronic myelogenous leukemia (CML) is a myeloproliferative disorder resulting in a clonal expansion of a transformed multipotent hematopoietic stem cell. One of the main reasons for the resistance developed in CML treatment is that CML stem cells (CML-SC) are not affected by the treatments. In this study, it is aimed to determine the cytotoxic and apoptotic effects of quercetin on chronic myeloid leukemia stem cells that were sorted among K562 cell population.

CML stem cells were obtained by sorting method among K562 cell population and it was confirmed that the cells were the CML-SCs by flow cytometry method with immunophenotypic characterization. CML-SCs were exposed to increasing doses of quercetin and the effects of quercetin on cell proliferation were determined by XTT assay. Apoptotic effects of quercetin on CML-SCs were determined by caspase-3 enzyme activity, changes in loss of mitochondrial membrane potential (MMP), and Annexin-V flow cytometry methods. 93,2% of the cells sorted by flow cytometry were CD34+CD38. These results showed that the selected cells were CML stem cells. There was a decrease in the percentage of cell proliferation of CML-SCs exposed to the increasing doses of quercetin (1-40nM) for 48 hours and IC50 value of quercetin was calculated as 1.5nM. According to the results of XTT cell proliferation assay, there was 37, 72, 90 and 99% decreases in cell proliferation in 1, 5, 10, ve 20 nM quercetin applied cells compared to the control group, respectively. The significant increase in caspase-3 enzyme activity and the loss of mitochondrial membrane potential has been detected in quercetin (1-20nM) exposed CML stem cells compared to control group in a dose dependent manner. There were 75 and 321% increases in caspase-3 enzyme activity; whereas 86 and 333% increase in loss of mitochondrial membrane potential in

10 and 20 nM quercetin applied CML-SCs, respectively. There were increased population of apoptosis in response to increasing doses of quercetin as determined by Annexin-V analysis. 5, 10 and 20 nM quercetin application resulted in 2.6, 11.2, and 39.2 fold increases in the number of dead cells as compared to the control cells, respectively. This study showed for the first time that apoptotic and antiproliferative effects of quercetin on CML stem cells and the roles of caspase-3 and mitochondria in apoptotic cell death.

Key Words: Quercetin; chronic myeloid leukemia stem cells; apoptosis; cytotoxicity.



İÇİNDEKİLER

QUERCETİNİN KML KÖK HÜCRELERİ ÜZERİNE SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN MOLEKÜLER DÜZEYDE İNCELENMESİ

Sayfa

İÇ KAPAK	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI.....	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI.....	iii
KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iv
TEŞEKKÜR	v
ÖZET	vi
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER.....	x
KISALTMALAR.....	xv
TABLO VE GRAFİKLER LİSTESİ.....	xviii
RESİM VE ŞEKİLLER LİSTESİ	xix
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. LÖSEMİ	3
2.2. KRONİK MİYELOİD LÖSEMİ	4
2.2.1. Epidemiyoloji.....	4
2.2.2. Klinik Bulgular.....	5
2.2.3. KML'nin Aşamaları	5
2.2.3.1. Kronik Faz	5
2.2.3.2. Akselere Faz.....	7

2.2.3.3. Blast Fazı.....	7
2.2.4. Moleküler Patogenez	8
2.2.4.1. Philadelphia Kromozomu ve BCR-ABL Füzyon Geni	8
2.2.4.2. BCR-ABL Geni Translokasyon Partnerlerinin Fizyolojik Fonksiyonu ..	10
2.2.4.3. BCR-ABL ile İlişkili Sinyal Yolakları	11
2.2.4.3.1 <i>JAK2/STAT</i> Sinyal Yolağı	12
2.2.4.3.2. <i>PI3K-AKT-mTOR</i> Sinyal Yolağı	13
2.2.4.3.3. <i>MAPK/ERK (RAS/RAF/MEK/ERK)</i> Sinyal Yolağı	13
2.2.5. Laboratuvar Tanısı.....	14
2.2.6. Tedavi	15
2.2.6.1. İmatinib	15
2.2.6.2. Nilotinib (AMN107)	17
2.2.6.3. Dasatinib (BMS-354825)	18
2.2.6.4. Bosutinib	18
2.2.6.5. Ponatinib	19
2.2.6.6. Allojenik Kök Hücre Transplantasyonu	19
2.2.6.7. İnterferon Alfa	19
2.3. KANSER KÖK HÜCRELERİ	19
2.3.1. Lösemi Kök Hücreleri	20
2.3.1.1. Lösemi Kök Hücrelerinin Hücre Yüzey Molekülleri	21
2.3.1.2. Lösemi Kök Hücreleri ile İlişkili Mikroçevre.....	25
2.4. FLAVONOİDLER	25
2.4.1. Flavonoidlerin Kimyası	26
2.4.2. Flavonoidlerin İnsanlardaki Metabolizması	28
2.4.3. Flavonoidlerin Biyolojik Aktiviteleri.....	30

2.4.3.1. Antioksidan Aktivitesi	30
2.4.3.2. Hepatoprotektif Aktivite	32
2.4.3.3. Antibakteriyel Aktivite	32
2.4.3.4. Anti-inflamatuvar Aktivite.....	33
2.4.3.5. Antikanser Aktivitesi	34
2.4.3.6. Antiviral Aktivite.....	35
2.4.4. Quercetin.....	36
2.4.4.1. Quercetin ve Quercetin Türevlerinin Kimyası	37
2.4.4.2. Quercetin'in Metabolizması, Absorpsiyonu ve Kaynakları.....	38
2.4.4.3. Kanser Hücre Biyolojisi Üzerine Quercetin'in Etkisi.....	39
2.4.4.3.1 Hücre Büyümesinin İnhibisyonu	39
2.4.4.3.2. Metastaz İnhibisyonu	40
2.4.4.3.3. Apoptoz İndüksiyonu	40
2.5. APOPTOZ	41
2.5.1. Ekstrinsik Yolak	42
2.5.2. İntrensik Yolak	43
3. GEREÇ VE YÖNTEM	45
3.1. Kullanılan Cihazlar	45
3.2. Kullanılan Sarf Malzemeler.....	45
3.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler	46
3.4. Hücre Kültürü	47
3.4.1. Hücrelerin Pasajlanması	47
3.4.2. Hemasitometre ile Hücre Sayımı	48
3.4.3. Hücrelerin Dondurulması	49
3.4.4. Hücrelerin Çözülmesi	49

3.4.5. Akım Sitometrik Analiz.....	50
3.4.5.1. Hücre Ölümünün Anneksin-V-FITC/Propidyum İyodür ile Belirlenmesi.....	50
3.4.5.2. Hücre Canlılığının DAPI ile belirlenmesi.....	51
3.4.6. Manyetik Partiküller ile Hücre Ayrılması	52
3.4.6.1. CD38-Hücrelerin Ayrılması.....	52
3.4.6.2. CD34+Hücrelerin Ayrılması.....	53
3.4.7. Quercetin'in KML Kök Hücreleri Üzerine Olan Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi.....	54
3.4.7.1. Quercetin'in Hazırlanması.....	54
3.4.8. Quercetin'in KML Kök Hücrelerinde Kaspaz-3 Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi.....	55
3.4.9. Quercetin'in KML Kök Hücrelerinde Mitokondri Zar Potansiyeli Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi.....	56
4. BULGULAR	58
4.1. K562 Hücrelerinin Anneksin-V-FITC ve DAPI ile Canlılıklarının Belirlenmesi.....	58
4.2. CD34+/CD38- KML Kök Hücrelerinin MACS ile Ayrılması	60
4.3. Quercetin'in KML Kök Hücreleri Üzerine olan Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi.....	62
4.4. Quercetin'in KML Kök Hücrelerinde Kaspaz-3 Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi.....	63
4.5. Quercetin'in KML Kök Hücrelerinde Mitokondri Zar Potansiyeli Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi	63

4.6.Quercetin'in KML Kök Hücreleri zerine Apoptotik Etkilerinin Anneksin-V-FITC/Propidyum İyodür Metodu ile Belirlenmesi.....	64
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	66
6. KAYNAKLAR.....	71
ÖZGEÇMİŞ	



KISALTMALAR

ABL	: Abelsan Murine Leukemia (Abelsan Fare Lösemisi)
ADR	: Adriamisin
AKT	: Protein Kinaz B
ALDH	: Aldehid dehidrojenaz
AML	: Akut Miyeloid Lösemi
AML-LKH	: Akut Miyeloid Lösemi Kök Hücresi
AMP	: Adenozin monofosfat
ATP	: Adenozin trifosfat
BCR	: Breakpoint Cluster Region (Kırılma Noktası KümeleneBölgesi)
C3G	: Siyanidin-3-glikozid
CD	: Cluster of differentiation (Farklılaşma Kümesi)
CFU	: Colony Forming Unit (Koloni Oluşturma Birimi)
CLL-1	: C-tipi lektin benzeri molekül-1
DFG	: Aspartat- Fenilefrin-Glisin
dk	: Dakika
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EGFR	: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ERK	: Ekstrasellüler sinyalle düzenlenmiş kinaz
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu
FISH	: Floresans İn situ Hibridizasyon
g	: Relatif santrifüj kuvveti
GAB2	: GRB2-ilişkili bağlanma proteini 2
GBR2	: Büyüme faktörü reseptörüne bağlı protein 2
Gclc	: Glutamat-sistein ligaz katalitik altbirimi
GPI	: Glikosilfosfatidilinositol
HepG2	: İnsan karaciğer kanser hücre hattı
HIV	: İnsan bağışıklık yetmezliği virüsü
HSV	: Herpes simpleks virüsü

IAP	: İntegrin ilişkili protein
Ig	: İmmünglobülin
IL	: İnterlökin
IL3R	: İnterlökin-3 reseptörü
INFα	: İnterferon alfa
JAK	: Janus kinaz
K562	: İnsan kronik miyeloid lösemi hücre hattı
kDa	: Kilodalton
kcal	: Kilokalori
KKH	: Kanser Kök Hücre
KML	: Kronik miyeloid lösemi
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
LKH	: Lösemi Kök Hücresi
LPH	: Laktaz filoridizin hidrolaz
MCF-7	: Meme kanseri hücre hattı
MDR	: Çoklu ilaç direnci
MEK	: Mitojenle aktive protein kinaz
mg	: Miligram
mM	: Milimolar
MMP	: Mitokondriyal membran potansiyeli
MPH	: Multipotent projenitör hücre
m-TOR	: Rapamisinin mekanistik hedefi
NADH	: Nikotinamid adenindinükleotid
NK	: Doğal öldürücü hücre
nM	: Nanomolar
NOD/SCID	: Diyabetik olmayan/ Şiddetli kombine bağışıklık yetmezliği
OPN	: Osteopontin
Ph	: Philadelphia Kromozomu
PI3K	: Fosfatidilinositol 3-kinaz
pKa	: Asitlik sabiti
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RAF	: Serin-tireonin protein kinaz
ROS	: Reaktif oksijen türleri

rpm	: Bir dakikadaki devir sayısı
RT-PZR	: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
SGLT1	: Sodyum-glikoz bağlantılı taşıyıcı-1
SIRP	: Sinyal düzenleyici protein
STAT	: Sinyal Transdüser ve Transkripsiyon Aktivatörleri
Thy-1	: Timus hücre antijeni-1
TIM-3	: T hücre immünglobülin-3
TK	: Tirozin kinaz
TKI	: Tirozin kinaz inhibitörü
TNF	: Tümör nekrozis faktör
V	: Volt
WBC	: Beyaz kan hücresi
µg	: Mikrogram

TABLO VE GRAFİKLER LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1. Kronik Miyeloid Lösemninin Aşamaları.....	7
Tablo 2.2. Flavonoidlerin yapısı	2
Grafik 4.1. Quercetin KML kök hücreleri üzerine sitotoksik etkileri	62
Grafik 4.2. Quercetin KML kök hücrelerinde kaspaz-3 enzim aktivitesi üzerine etkileri.....	63
Grafik 4.3. Quercetin KML kök hücrelerinde mitokondri zar potansiyelinin bozulumu üzerine etkileri.....	64
Grafik 4.4. Quercetin KML kök hücreleri üzerine apoptotik etkileri.....	64

RESİM VE ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Resim 2.1. KML-Kronik fazda, periferik kandaki lökositöz gösteren olgunlaşmamış miyeloid hücreler.....	6
Resim 2.2. KML-Kronik fazda, kemik iliği aspiratındaki blastlar ve promiyelositleri içeren olgunlaşmamış miyeloid hücrelerin spektrumu.....	6
Resim 2.3. Philadelphia (Ph) kromozomu karyotipi	9
Resim 4.1. Kronik miyeloid lösemi hücrelerinin inverted mikroskop görüntüsü.....	58
Resim 4.2. KML kök hücrelerinin inverted mikroskop görüntüsü	60
Şekil 2.1. Philadelphia kromozomunu oluşturan translokasyonun şematik diyagramı	9
Şekil 2.2. ABL ve BCR genlerindeki kırılma noktalarının yerleri ve çeşitli kırılma noktalarından kaynaklanan kimerik mRNA'ların yapısı.....	11
Şekil 2.3. BCR-ABL proteini tarafından regüle edilen ana sinyal yolları	12
Şekil 2.4. BCR-ABL ve imatinibin KML patogenezindeki etki modunun karşılaştırılması.....	16
Şekil 2.5. Kanser gelişim modelleri.....	21
Şekil 2.6. Lösemi kök hücresi yüzey belirteçleri	24
Şekil 2.7. Flavonoidin temel yapısı	26
Şekil 2.8. Flavonoid glikozit (a) ve aglikon (b) flavonoidin yapısı	28
Şekil 2.9. Flavonoid metabolizmasına katılan bölümler.....	29
Şekil 2.10. Flavonoidler (Fl-OH) tarafından ROS (R°)'un uzaklaştırılması (a) ve İz metallerin flavonoidlere bağlanma bölgeleri (b)	31
Şekil 2.11. Quercetin tarafından modüle edilen hücresel süreç	36
Şekil 2.12. Quercetin ve quercetin türevlerinin yapısı	38
Şekil 2.13. Apoptozun iç ve dış sinyal yolları.....	44

Şekil 4.1. K562 hücrelerinin canlılığının Anneksin-V-FITC ile akım sitometrik analizi	59
Şekil 4.2. K562 hücrelerinin canlılığının DAPI ile akım sitometrik analizi.....	59
Şekil 4.3. KML Kök hücrelerinin (CD38-/CD34+) canlılığının DAPI ile akım sitometrik analizi	61
Şekil 4.4. KML Kök hücrelerinin CD38- ve CD34+ oranları.....	61
Şekil 4.5. KML Kök hücre fraksiyonunun saflığının akım sitometrik analizi.....	62
Şekil 4.6. Quercetin'in KML kök hücreleri üzerine apoptotik etkilerinin akım sitometrisi ile gösterimi	65

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kronik miyeloid lösemi (KML), kemik iliğinde miyeloid seri elemanlarının artışıyla karakterize olan klonal bir hematopoetik kök hücre malignitesidir. Tüm erişkin lösemilerin %20'sini oluşturan bu hastalık, bir kromozomal anomaliyle ilişkili gösterilen ilk neoplazidir. Bu anomali, 9. ve 22. kromozomlar arasındaki translokasyon sonucu oluşan Philadelphia (Ph) kromozomudur. Ph kromozomu üzerinde oluşan BCR-ABL1 füzyon geni, hücre içinde birçok yolağı aktive eden bir tirozin kinazı kodlar. KML onkogenezi açıklamada önemli role sahip olan bu yolların üyelerini ve aralarındaki ilişkiyi tanımlama çalışmaları devam etmektedir (1,2).

Kanser kök hücreleri (KKH) tümörün başlangıcından sorumlu olan ve tümör dokusundaki çok sayıda farklılaşmış hücre topluluğunu oluşturan hücrelerdir. Aynı özgü sinyal ileti sistemleri KKH'lerin ve normal kök hücrelerinin kendi-kendini yenileme ve/veya farklılaşmasında fonksiyonel rol oynamaktadırlar. Aralarındaki başlıca fark; KKH'lerde aynı sinyal ileti sistemlerinin düzenlenmesi değişmektedir. Son çalışmalarla KKH'lerin ilaç ve radyasyon tedavisine dirençli oldukları gösterilmiştir (3). Bu nedenle KML tedavisine yönelik olarak yapılacak çalışmaların, kanser hücrelerini değil KKH'lerini hedef alması oldukça önemlidir.

Kanser hastalarına uygulanan mevcut tedavilerin tümü kanser hücrelerini hedef almaktadır. Ancak; KML kanser kök hücrelerini hedef alan etkili bir tedavi henüz geliştirilememiştir. Bu sebeple kanser kök hücrelerini hedefleyen yeni ajanların keşfi ve bunların ileride klinik uygulamaya geçmesi oldukça önemlidir.

Bu çalışma kapsamında quercetin K562 hücre popülasyonundan seçilen KML kök hücreleri üzerine sitotoksik ve apoptotik etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Kronik miyeloid lösemi (KML), klonal bir hematopoetik kök hücre malignitesidir. Kemik iliğinde miyeloid serinin tüm elemanlarında artışla karakterize olan bu hastalık, insanda sabit bir kromozomal anormallik ile ilgisi gösterilen ilk neoplazidir. Hastalığın ilk kez tanımlandığı 1845 yılından yaklaşık bir yüzyıl sonra, 1960 yılında Nowell ve Hungerford tarafından Philadelphia kromozomunun (Ph) ilk kez gösterilmesi ile KML yepyeni bir boyut kazanmıştır (1). 1973 yılında Ph kromozomunun 9. ve 22. kromozomlar arasındaki translokasyondan kaynaklandığı gösterilmiş, 1984 yılında 22. kromozomun kırık noktasındaki Breakpoint Cluster Region (BCR) klonlanmış, 1985 yılında ise BCR-ABL füzyon geni, BCR-ABL kimerik proteini ve bu proteinin tirozin kinaz özelliği tanımlanmıştır (2). İlerleyen yıllarda, şimdiki adıyla “BCR-ABL1” füzyon geninin hayvan deneylerinde KML oluşturduğunu ve bu hastalığın nakledilebilir (transplantable) olduğunu gösterilmesi ile, bu genetik değişikliğin KML hastalığının patogeneziindeki rolü kesinleştirilmiştir (3). 1998 yılında imatinib adı verilen bir molekülün BCR-ABL1 protein ürününü bloke ederek etkilerini tersine çevirdiğinin gösterilmesiyle de KML, moleküler mekanizması üzerinden etkili tedavi geliştirilen ilk hastalıklardan olmuştur (4).

Kanser kök hücre teorisine göre, bunlar kanser hücrelerinin kendi-kendilerini yenileme ve farklılaşma özelliği olan alt gruplarıdır. Yalnız bu iki özelliğe sahip hücreler “Kanser Kök Hücresi” (KKH) olarak adlandırılır. Kanser kök hücresi “kanseri başlatan hücre” olarak da adlandırılmaktadır (5). Son zamanlarda kanser kök hücre hipotezi ile kanserin, tümör dokusunda oluşan kök veya öncü hücrelerden oluştuğu öne sürülmektedir. Kanser kök hücreleri veya kanseri-başlatan hücreler olarak da adlandırılan kanser öncü hücrelerinin, kanserin başlaması, ilerlemesi ve klasik tedavi şekillerine direnç göstermesinden sorumludurlar. Multipotent dokuya özgü, yetişkin kök hücrelerinde ve/veya öncü hücrelerinde ortaya çıkan genetik ve/veya epigenetik değişikliklerin,

“Kanser kök hücreleri” veya “kanseri-başlatan hücreler” olarak da bilinen kanser öncü hücrelerinde tümör oluşumuna öncülük ettiği birçok araştırmacı tarafından gösterilmektedir. Kanser gelişimi esnasında lösemik veya tümörijenik kanser öncü hücrelerinde genetik ve/veya epigenetik değişikliklerin birikimi, çoğunlukla da epitelial-mezenkimal geçiş programı sürecinde tümör hücrelerinin göçen fenotip özelliği kazanmaları, diğer organlara metastaz yapması için invaziv özellik kazanmaları gerektiğini göstermektedir. Tümör gelişimindeki kanser kök hücre modeli, hasta tümör dokusundan izole edilen son derece lösemik veya tümörijenik kanser kök hücrelerinin *in vivo* ve *ex vivo* olarak farklılaşmış kanser hücre kitlesi oluşturduğunu ve bunların lösemi veya tümör oluşumundan sorumlu olduğunun gösterilmesi ile desteklenmektedir (6).

Apoptoz terimi ilk olarak 1972’de JFK Kerr tarafından nekrozdaki farklı olarak gerçekleşen diğer bir ölüm şekli için tanımlanmış ve fizyolojik hücre ölümünü ifade etmektedir. Teorik olarak apoptoz, çeşitli travmatik hücre dışı lezyonlar ya da genetik faktörler ile aktive edilen ve hücrenin kendisi tarafından programlanmış bir mekanizma vasıtasıyla hücre ölümünü kontrol eden aktif bir işlem olup, hücrenin intiharı olarak tanımlanabilir. Apoptozun tetiklenmesi için; sinyal moleküllerini, reseptörleri, enzimleri ve genleri düzenleyen proteinleri içeren bir seri molekülün iş birliği gereklidir (7).

Quercetin, kırmızı şarap, greylift, soğan, elma, siyah çay ve az miktarlarda yapraklı yeşil sebzelerde, fasulyede çeşitli bitki çaylarının içinde bulunan bir flavonoiddir. Quercetin lösemi hücre hatları üzerine antioksidatif ve apoptotik etkileri çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (8).

2.1. LÖSEMİ

Lösemi, normal hücre düzenleme sürecinde değişikliklerin meydana gelmesi ile kemik iliğindeki hematopoietik kök hücrelerin kontrolsüz çoğalması ile sonuçlanan, çocuklarda ve erişkinlerde görülen yaygın bir malignitedir (9). Lösemilerin sıklıkla karşılaşılan dört ana türü vardır; akut miyeloid lösemi, akut lenfoblastik lösemi, kronik miyeloid lösemi ve kronik lenfositik lösemi (10). Bu dört ana lösemi türünün sınıflandırılması hastalığın progresyonu ve hücre tiplerindeki temel farklılıklara göre yapılır. Lösemilerin başlangıçlı akut (ani başlangıçlı) veya kronik (yavaş başlangıçlı) olabilir. Akut lösemide kanser hücreleri hızla çoğalır. Kronik lösemide hastalık yavaş

ilerler ve erken belirtiler çok hafif olabilir. Lösemiler içerdikleri hücre tiplerine göre miyeloid ve lenfositik olarak adlandırılırlar (11).

2.2. KRONİK MİYELOİD LÖSEMİ

Kronik miyeloid lösemi, kemik iliği kök hücrelerinin malign yayılımı ile karakterize edilen bir hematopoetik bozukluktur. KML, Philadelphia kromozomu olarak bilinen bir kromozomal sapma ile ilişkili ilk neoplastik hastalıktır (12).

KML; 1840'lı yıllarda yaygın olarak kabul gören, tüberküloz gibi splenomegaliye neden olan durumlarla açıklanamayan, lökositozla ilişkili masif splenomegali tanısı konulan iki hastada 1845 yılında tanımlandı. Hastalığın patogenezi ile ilgili ilk ipucu 1960 yılında, bu hastalığı taşıyan bireylerde, Nowell ve Hungerford'un insan hücrelerinde mitozu incelemek için geliştirilen yeni tekniklerle, daha sonra Philadelphia (Ph) kromozomu olarak adlandırılan ve 22q olarak tanımlanan kromozomda tutarlı bir kromozomal anomali tespit etmeleriyle ortaya çıktı. 1973'de Rowley, Ph kromozomunun 9. kromozomu da içeren karşılıklı bir translokasyon sonucu oluştuğunu gözlemledi ve anomali t(9;22) (q34;q11) olarak yeniden düzenlendi. 1980'lerde, Ph kromozomunun, şu anda KML'nin kronik fazının ana nedeni olduğuna inanılan BCR-ABL olarak adlandırılan benzersiz bir füzyon geni taşıdığı gösterildi (13).

KML'nin moleküler patogenezin aydınlatılması, diğer hematolojik neoplazilerde moleküler mekanizmaların keşfi ve hedefe yönelik terapötik yaklaşımlar için KML'i bir model haline getirmiştir (12,14).

2.2.1 Epidemiyoloji

KML, her yıl 100.000 kişiden 1 veya 2'sinde görülen nadir bir hastalıktır ve hastalığa sıklıkla yaşlılarda rastlanır. Yaklaşık olarak 65 yaş civarında teşhis koyulur. Hayatta kalma istatistikleri, geniş bir grup insana dayandığından, bireysel bir hastaya ne olacağını tam olarak tahmin etmek için kullanılamazlar; bu nedenle yapılan çoğu epidemiyolojik araştırmalarda yaşlı bireylerin hastalığın insidansının belirlenmesinde yeterli temsil edilemedikleri düşünülmektedir (14).

KML'den erkek bireyler kadın bireylerden daha çok etkilenir. Kadınların erkeklere göre hayatta kalma oranı yüksektir. KML ölüm oranı, 75-84 yaşları arasındaki bireylerde daha yüksektir (15).

2.2.2. Klinik Bulgular

KML, hematopoietik kök hücrelerin malign klonal bir bozukluğudur ve sadece miyeloid hücrelerde değil aynı zamanda periferik kan ve kemik iliğindeki eritroid hücrelerinde ve trombositlerde artışla sonuçlanır. Hastalığa ait klinik bulgular aşağıda belirtildiği gibidir (16):

1. Hipermetabolizma ile ilişkili semptomlar (kilo kaybı, halsizlik, anoreksiya, gece terlemeleri vb.)
2. Splenomegali neredeyse her zaman görülür ve çoğunlukla masiftir. Bazı hastalarda splenik genişleme önemli derecede rahatsızlık, ağrı veya hazımsızlığa neden olur.
3. Anemi, nefes darlığı, taşikardi ve solgunluk görülebilir.
4. Anormal platelet fonksiyonları nedeni ile morluk, burun kanaması, menoraji ve hemoraji görülebilir.
5. Hiperürisemiye bağlı gut ve böbrek yetmezliği sorunları oluşabilir.
6. Nadir görülen semptomlar görme bozukluğu ve priapizmdir.
7. Olguların %50'si rutin kan taraması ile teşhis edilir.

2.2.3. KML'nin Aşamaları

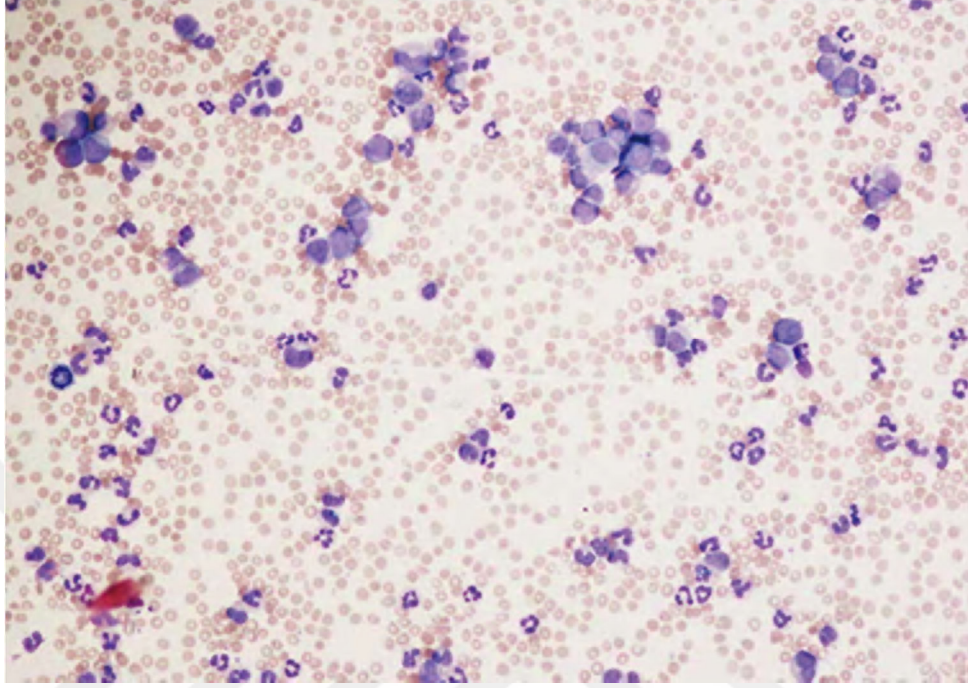
Kronik miyeloid lösemi kronik faz, akselere faz ve blastik faz olarak adlandırılan üç faz içerir (17). Hastalığa genel olarak kronik fazda tanı konmaktadır (18).

2.2.3.1. Kronik Faz

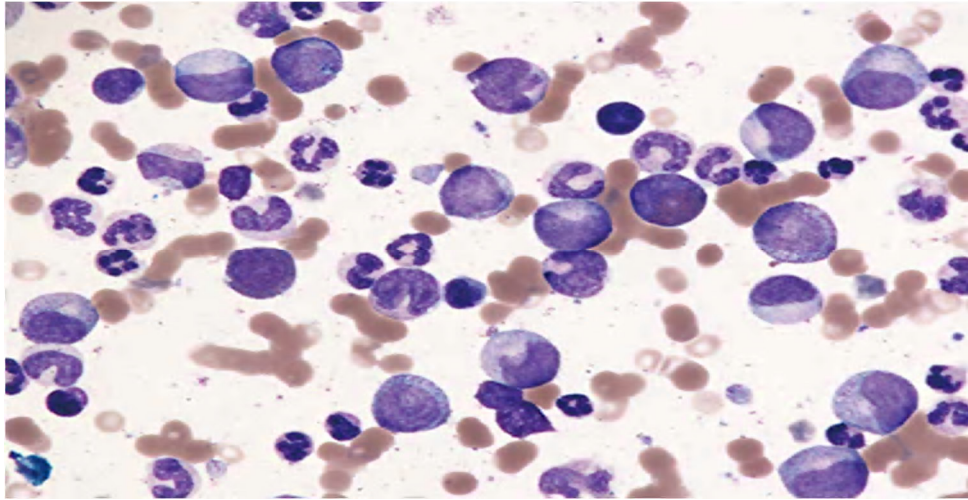
KML'de ilk evre kronik faz olarak adlandırılır. Bu evrede kan ve / veya kemik iliğinde (Resim 2.1) normalden fazla sayıda beyaz kan hücresi vardır. Olgunlaşmamış beyaz kan hücreleri (blast hücreleri) kan ve / veya kemik iliği hücrelerinin %10'dan azını oluştururlar. Bu, her 100 hücreden 10'unun (veya daha azının) blast olduğunu gösterir (Resim 2.2) (19).

KML çoğunlukla kronik fazda herhangi bir semptoma neden olmaz; ancak halsizlik veya kaburgaların sol tarafında dolgunluk hissi gibi hafif semptomlara neden olabilir. Kan hücrelerinde çok fazla değişiklik olmadığından, vücut hala enfeksiyonlarla karşı savaşabilir durumdadır (19).

Bu fazda, kanser yavaş ilerler. Akselere faza geçiş aylar hatta yıllar alabilir. Diğer fazlara kıyasla, kronik fazda, tedaviye daha iyi yanıt verilme eğilimi vardır (19).



Resim 2.1. KML-Kronik fazda, periferik kandaki lökositöz gösteren olgunlaşmamış miyeloid hücreler (Wright-Giemsa boyası, $\times 4$) (20).



Resim 2.2. KML-Kronik fazda, kemik iliği aspiratındaki blastlar ve promiyelositleri içeren olgunlaşmamış miyeloid hücrelerin spektrumu (Wright-Giemsa boyası, $\times 20$) (20).

2.2.3.2. Akselere Faz

KML'nin ikinci fazı akselere faz olarak adlandırılır. Bu fazda kan veya kemik iliğindeki blast hücrelerin sayısı normalden daha fazladır. Beyaz kan hücrelerinin (WBC) sayısı da bu fazda yüksektir. Kanda yüksek oranda bazofiller ve düşük oranda trombositler bulunabilir; ayrıca yeni kromozom değişiklikleri gözlenebilir (19).

Bu fazda lösemi hücreleri (KML hücreleri) daha hızlı büyürler ve semptomlar oluşur. Bu semptomlar; ateş, kilo kaybı, iştahsızlık ve dalak büyümesidir (19).

2.2.3.3. Blast Fazı

KML'de üçüncü ve final fazı blast krizi olarak da adlandırılan fazdır. Blast fazına gelindiğinde hayatı tehdit oluşabilir. Bu fazda blast hücrelerin kandaki ve / veya kemik iliğindeki sayısı çok yüksektir; ayrıca blast hücreler diğer doku ve hücrelere de yayılım gösterirler. Enfeksiyon, kanama, karın ve kemik ağrıları gibi şiddetli semptomlar oluşur. Bu fazda lösemi hücreleri daha anormal hale gelir. KML'nin blast fazı AML blast fazı ile benzer özellikler gösterir (19).

KML'nin üç fazının kriterleri Dünya Sağlık Örgütü ve MD Anderson Kanseri Merkezi tarafından tanımlanmıştır (Tablo 2.1) (20).

Tablo 2.1. Kronik Miyeloid Löseminin Aşamaları (20).

Faz	Kriter
Kronik Faz	Akselere veya Blast fazdaki kriterlerin hiçbiri mevcut değil
Akselere Faz MD Anderson Kanseri Merkezi ve Avrupa LeukemiaNet Kriterleri	Periferik kan veya kemik iliğinde \geq % 15 ve < % 30 blast Periferik kanda veya kemik iliğinde \geq % 30 kombine blast ve promiyelosit Periferik kandaki \geq % 20 bazofili Terapiyle ilgili olmayan trombositler ($\leq 100 \times 10^9 / L$) Sitogenetik klonal evrim
DSÖ kriterleri	Periferik kan veya kemik iliğinde % 10 -% 19 blast Periferik kanda \geq % 20 bazofili Terapiyle ilgili olmayan kalıcı trombositopeni ($<100 \times 10^9 / L$)

	Tedaviye yanıt vermeyen kalıcı trombositoz (> 1,000 x 10 ⁹ / L) Dalak boyutunun ve tedaviye yanıt vermeyen beyaz kan hücre sayısının artması Sitogenetik klonal evrim
Blast Fazı MD Anderson Kanser Merkezi ve Avrupa LeukemiaNet Kriterleri	Periferik kanda veya kemik iliğinde \geq % 30 blast Dalak dışında ekstramedüller blast proliferasyonu
DSÖ kriterleri	Periferik kan veya kemik iliğinde \geq % 20 blast Dalak dışında ekstramedüller blast proliferasyonu, kemik iliği biyopsisinde geniş blast kümeleri

2.2.4. Moleküler Patogenez

2.2.4.1. Philadelphia Kromozomu ve BCR-ABL Füzyon Geni

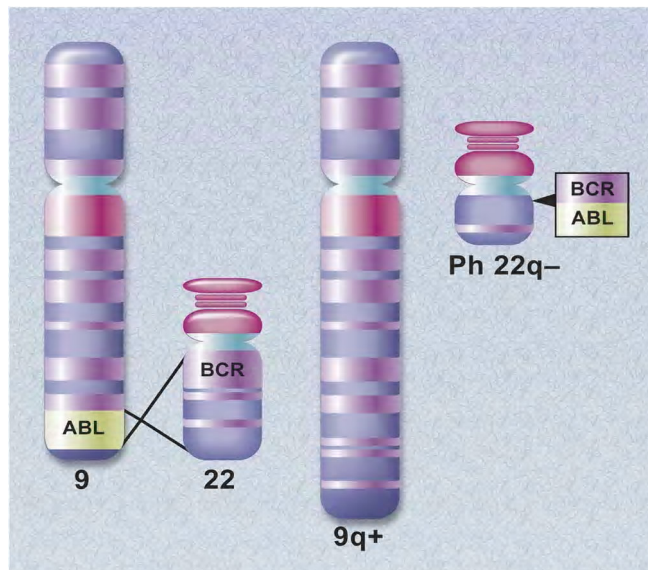
Deneysel tedaviden rasyonel olarak tasarlanmış tedaviye geçmek bir hastalığın moleküler patogenezinin kesin bir şekilde anlaşılmasını gerektirir. KML'nin moleküler patogenezinin çözülmesi Amerikan Hematoloji Derneği'nin kurulmasından kısa süre olmuştur (21).

1960'da Philadelphia'da çalışan Peter Nowell ve David Hungerford, akrosentrik bir kromozomda oluşan delesyon sonucu, KML'li hastalarda tutarlı bir kromozomal anomali tanımladı (22). Bu, spesifik bir malignite ile bağlantılı kromozom anomalisinin ilk örneği idi. Kromozomal bantlama teknikleri geliştikçe kromozom anormalliğinin 22. kromozomun kısalmasından kaynaklandığı anlaşıldı. Daha sonra 1973'te Dr Janet Rowley, Philadelphia (Ph) kromozomu (Resim 2.3) olarak adlandırılan kromozomun, 9. ve 22. kromozomların uzun kolları arasındaki dengeli resiprokal translokasyon sonucu oluştuğunu belirledi (22).



Resim 2.3. Philadelphia (Ph) kromozomu karyotipi (23)

Kromozomal anomali analizi araştırmacılara, (9; 22) kromozomal translokasyonun moleküler sonuçlarını kesin bir şekilde belirlemelerine izin vermiştir. 1980'lerde Ph kromozomunun, 9. Kromozomun q34 bandına yerleşik ABL (**A**Belsan murine Leukemia) geninin, 22. Kromozomun q11 bandındaki BCR (**B**reakpoint **C**luster **R**egion) genine t(9:22) resiprokal translokasyonu sonucu, BCR-ABL füzyon geninin oluşumu ile ortaya çıktığı ispatlanmıştır (şekil 2.1) (24,25). Translokasyon sonucu oluşan füzyon geni BCR-ABL'nin lökemojenitesi 1990'da David Baltimore'un laboratuvarında alışan George Daley ve Richard van Etten tarafından doğrulanmıştır. Bu araştırmacılar, hayvan modellerinde BCR-ABL'yi eksprese ettirmiş ve BCR-ABL'nin lösemiye başlattığını, böylece BCR-ABL'nin lökemik bir onkojen olduğunu göstermişlerdir (26,27).



şekil 2.1. Philadelphia kromozomunu oluşturan translokasyonun şematik diyagramı(21)

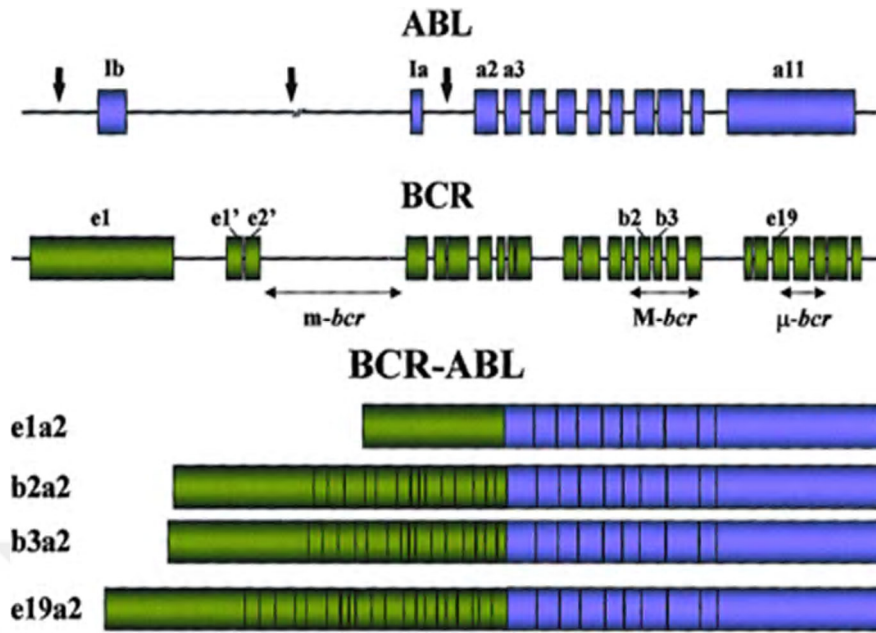
2.2.4.2. BCR-ABL Geni Translokasyon Partnerlerinin Fizyolojik Fonksiyonu

ABL geni, Abelsan murine Leukemia virüs tarafından taşınan *v-abl* onkogeninin insandaki eşdeğeri ve bir nonreseptör tirozin kinaz kodlar (28). Hastaların %10'unda Ph kromozomu dışında ilaveten iki farklı kromozomu kapsayan kompleks translokasyonlar görülür; t(5;12) (q33;p13) TEL-PDGFRB ve t(8;13) (p11;q12) ZNF198-FGFR1'dir. Her iki translokasyonun oluşturduğu füzyon proteinlerinin bir kısmı reseptör tirozin kinaz kodlar ve bu translokasyonlar BCR-ABL onkoproteini tarafından aktive edilen yollara benzeyen sinyal iletim yollarını aktive ederek KML gelişmesine neden olurlar (29,30-32).

ABL, 145 kDa ağırlığında bir non-reseptör tirozin kinazdır (29). Hücre içerisinde hem sitoplazmada hem de çekirdekte yer alan ABL, iki kompartıman ile etkileşim içerisinde ve integrin sinyal yolları sayesinde hücrel çevre hakkında bilgi aktarımında görev alır (29,31-33). Normalde ABL proteini, çeşitli hücre içi ve hücre dışı sinyallere göre hareket ederek, hücre döngüsünü, programlı hücre ölümlerini, hücrenin büyüme ve çoğalmasını ve ayrıca hücrelerin stres ortamına verdiği yanıtı kontrol eder (29,30,31).

BCR, 160 kDa ağırlığında çoklu modüler alanlar içeren bir sinyal proteinidir (29). ABL geninin aksine BCR geni üzerindeki kırılmalar farklı noktalarda oluşabilir (32,33). Kırılma noktasının ABL'de sabit, BCR'de değişken olması; ABL geninin sağlıklı hücreleri değişime uğratarak kanser hücresine dönüşümünü sağladığını, BCR geninin ise hastalığın fenotipini etkilediğini göstermektedir (29,33,36).

Yeni oluşan bu kimerik gen KML'de lösemik fenotipin gelişmesinden sorumlu BCR-ABL proteini kodlar. BCR-ABL proteini (Şekil 2.2), hücrede büyüme, çoğalma, farklılaşma, maturasyon ve apoptoz ile ilgili pek çok sinyal yolağının devamlı aktivasyonunu sağlamakta, normal hücre siklusunun kontrolünün bozulmasına neden olmakta ve hücrelerin malign dönüşümüne yol açmaktadır (29,32). Bu durum anormal kendini yenileme ve farklılaşma yeteneklerinin ve apoptoza direnç gelişiminin kazanılması nedeni ile Ph pozitif hücre klonunun hayatta kalmasına ve çoğalmasına neden olmaktadır (27,29,33,36).



Şekil 2.2. ABL ve BCR genlerindeki kırılma noktalarının yerleri ve çeşitli kırılma noktalarından kaynaklanan kimerik mRNA'ların yapısı (32).

2.2.4.3. BCR-ABL ile İlişkili Sinyal Yolakları

KML'de moleküler patogenezin tanımlanmasından sonra, BCR-ABL tirozin kinaz (TK) aktivitesinden etkilenen sinyal yollarının tanımlanması ile BCR-ABL'nin moleküler etki mekanizması anlaşılmaya çalışılmıştır (Şekil 2.3). KML'yi karakterize eden spesifik patolojik problemlerin belirlenmesi amacıyla çeşitli sinyal yolları araştırılmış ve BCR-ABL'nin birçok substratı ve bağlayıcı partnerleri tanımlanmıştır (37). Bu problemler arasında, masif miyeloid hücre sayılarında artışa yol açan hematopoetik kök hücre veya progenitör hücrelerin sayısının artması ve bu hücrelerde apoptozun azalması; miyeloid progenitörlerin kemik iliği stromasına yapışmasından kaynaklanan bir bozukluktan olduğu düşünülen olgunlaşmamış miyeloid hücrelerin kan dolaşımına erken katılması ve hastalığın ilerlemesi ile sonuçlanan genetik istikrarsızlık gösterilebilir (37).

BCR-ABL'nin transformasyon aktivitesi, hücre proliferasyonunun sürekliliğine katkıda bulunan, farklılaşmayı engelleyen ve hücre ölümüne direnci arttıran yapıcı TK aktivitesinden kaynaklanmaktadır. BCR-ABL'nin kinaz hiperaktivitesi, sinyal yollarının aktivasyonuna ve hücresel proseslerin düzenlenmesine neden olur. Bu yollarının çoğu, KML ve ALL fare modellerinde gösterilmiştir (38).

BCR-ABL-pozitif hücrelerde BCR-ABL stabilitesini ve onkojenik sinyalleri kontrol ettiğini ortaya koymaktadır (54,55). Buna karşılık, JAK2'nin inhibisyonu fosforillenmiş Y177 (p-Y177) miktarını azaltır, ancak BCR-ABL düzeyini düşürmez, bu da JAK2 inhibisyonu ile BCR-ABL'deki azalmanın Y177'nin fosforilasyonundan ayrı bir olay olduğunu ortaya koymaktadır (56). KML-KF modelinde JAK2 yokluğunun, artan sayıda WBC ve şiddetli splenomegali ile hastalık gelişimini önemli ölçüde hızlandırdığı, bunun da JAK2'nin KML ilerlemesini inhibe ettiği düşünülmektedir (57).

p-STAT3 düzeyi, imatinib tedavisine dirençli KML hastalarında, tedaviye yanıt veren hastalardan daha yüksektir. BCR-ABL STAT3'ün transkripsiyonunu JAK1 / 2 ve mitojenle aktive edilmiş protein kinazı (MEK) fosforilleyerek düzenler (57,58). STAT3 ve STAT5 a/b, KML hücrelerinin sağ kalımı ve büyümesinin sürdürülmesi için gereklidir (55). Ayrıca STAT5, hücre döngüsü ilerlemesi ve lenfoid lösemik hücrelerin hayatta kalması için de gereklidir; ancak STAT5, normal hematopoez için gerekli değildir ki bu onu Ph-pozitif lösemide iyi bir terapötik hedef yapmaktadır (55).

2.2.4.3.2. PI3K-AKT-mTOR Sinyal Yolağı

PI3K-AKT-mTOR sinyal yolağı KML de önemli olan diğer bir sinyal yolağıdır. BCR-ABL-pozitif c-kit pozitif HKH'leri aktive edebilmektedir (58). BCR-ABL, PI3K-AKT-mTOR yolağı ile KML hücrelerinin proliferasyonunu artırmak için Skp2 ekspresyonunu indükler. Bu arada, BCR-ABL proteini glikoz metabolizmasını artırır ve özellikle KML hücrelerinde PI3K-AKT-mTOR tarafından regüle edilen mitokondriyal elektron taşıma zincirlerini aktive eder (59). PI3K'nın inhibisyonu, p210 BCR-ABL ile transforme olmuş hücrelerde, özellikle de apoptozda TKI-arttırıcı sitotoksik etkiler ile sinerji gösterir. Birlikte ele alındığında, bu bulgular, PI3K-AKT-mTOR yolağının BCR-ABL aracılı lökomojenezde önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir (60).

2.2.4.3.3. MAPK/ERK (RAS/RAF/MEK/ERK) Sinyal Yolağı

RAS / RAF / MEK / ERK yolağı, hücre yüzeyi reseptörlerinden sinyalleri nükleer transkripsiyon faktörlerine ileten merkezi bir sinyal iletim yolağıdır (61). BCR-ABL pozitif lösemi hücrelerinde RAS / RAF / MEK / ERK yolağının aktivasyonu kontrolsüz çoğalmaya neden olur (62). BCR-ABL BCR'nin kısmi fosforilasyonuna bağlı olarak GRB2 / GRB2-ilişkili bağlanma proteini 2 (GAB2)'nin fosforilasyonu ile RAS'ı aktive ederek proliferatif sinyalleri dönüştürür (63). RAS sinyalleşmesinin bozulması,

farelerde BCR-ABL ile indüklenen KML benzeri lösemnin gelişimini hafifletir, ancak mutant RAS'a sahip BCR-ABL-pozitif farelerin çoğunda pro-B-ALL geliştirir. Bu, RAS'ın KML'de BCR-ABL patogeneğinde önemli bir role sahip olduğunu ancak B-ALL patogeneğinde kritik bir önemi olmadığını göstermektedir (64).

MEK/ERK'nin bloke edilmesi, gefitinib veya imatinib'e dirençli BCR-ABL eksprese eden hücrelerde, histon deasetilaz inhibitörlerinin sitotoksitesini yükseltir ve eritroid farklılaşmasına yol açar (65). BCR-ABL; ayrıca RAS ile ilgili RAP1 proteininin bir efektör molekülü ve MEK / ERK / ERK-1 sinyal yolağının güçlü bir aktivatörü olan B-RAF kinazı aktive eder (66). RAP1 aktivasyonunun inhibisyonu, ERK-1'in BCR-ABL ile indüklenen aktivasyonunu inhibe eder (67).

Lösemik mikro ortam, lösemik hücre proliferasyonunu ve sağkalımını desteklemede rol oynar. BCR-ABL kinazın aktivitesine ek olarak, KML kök hücrelerin sağkalımı, hematopoietik nişin sürekliliğine de bağlıdır (68). Kök hücre nişinin bir bileşeni olan Osteopontin (OPN), BCR-ABL ifade eden hücrelerde aşırı eksprese edilir (69). BCR-ABL, muhtemelen RAS / RAF / MEK / ERK yolağı vasıtasıyla, BCR-ABL'nin lösemik kök hücreleri için mikro ortamı koruduğu belirtilen RAS, RAF-1 ve MAPK'yi içeren bir sinyal kaskadını aktive ederek OPN'nin aşırı ekspresyonunu indükler (70).

2.2.5. Laboratuvar Tanısı

Tipik KML tanısı basittir. Kalıcı açıklanamayan lökositoz (veya bazen trombositoz) oluşumuyla, Ph kromozom anomalisi t (9; 22) (q34; q11) varlığı ile, rutin sitogenetik çalışmalarla veya Ph ile ilişkili moleküler BCR-ABL anomalilerin flüoresan in situ hibridizasyon (FISH) ile veya moleküler araştırmalarla belirtilmesi ile tanı konulur (71-73).

FISH analizi, BCR ve ABL genlerine özgü geniş genomik problemlerin kolokalizasyonu üzerine kuruludur. Eş zamanlı olarak yapılan kemik iliğinin ve kan örneklerinin FISH analizi ile karşılaştırılması, yüksek uyum gösterir. FISH çalışmaları, kullanılan problemlere bağlı olarak %1-10 arasında yalancı pozitiflik gösterebilir (71).

Ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) BCR ve ABL arasındaki bağlantı bölgesini amplifiye eder. Minimal rezidüel hastalığın tespiti için son derecede duyarlıdır. PZR testi; BCR-ABL transkriptinin varlığı hakkında bilgi sağlar ya da BCR-ABL miktarını belirler. Kalitatif PZR (QPZR), KML tanısında yararlıdır; Kantitatif

PZR, hastalığın izlenmesi için idealdir. Eş zamanlı periferik kan ve kemik iliği QPZR çalışmaları yüksek düzeyde bir uyum gösterir. PZR ile yalancı-pozitif ve yalancı-negatif sonuçlar ortaya çıkabilir. Yalancı negatif sonuçlar, kalitesiz RNA'dan veya reaksiyonun başarısızlığından kaynaklanabilir. Yalancı pozitif sonuçlar kontaminasyondan kaynaklanabilir. Test prosedürlerine, numunenin tutulmasına ve laboratuvar tecrübesine bağlı olarak, bazı numunelerde 0.5-1 log farkı oluşabilir (71-73).

Ph kromozomu genelde tek anormallik olarak metafazların %100'ünde bulunur. Hastaların%10 ile 15'inde ek olarak, trizomi 8, izokromozom 17, 22q veya çift Ph'den ek materyal kaybının dahil olduğu kromozom değişiklikleri (klonal evrim) vardır (71-73).

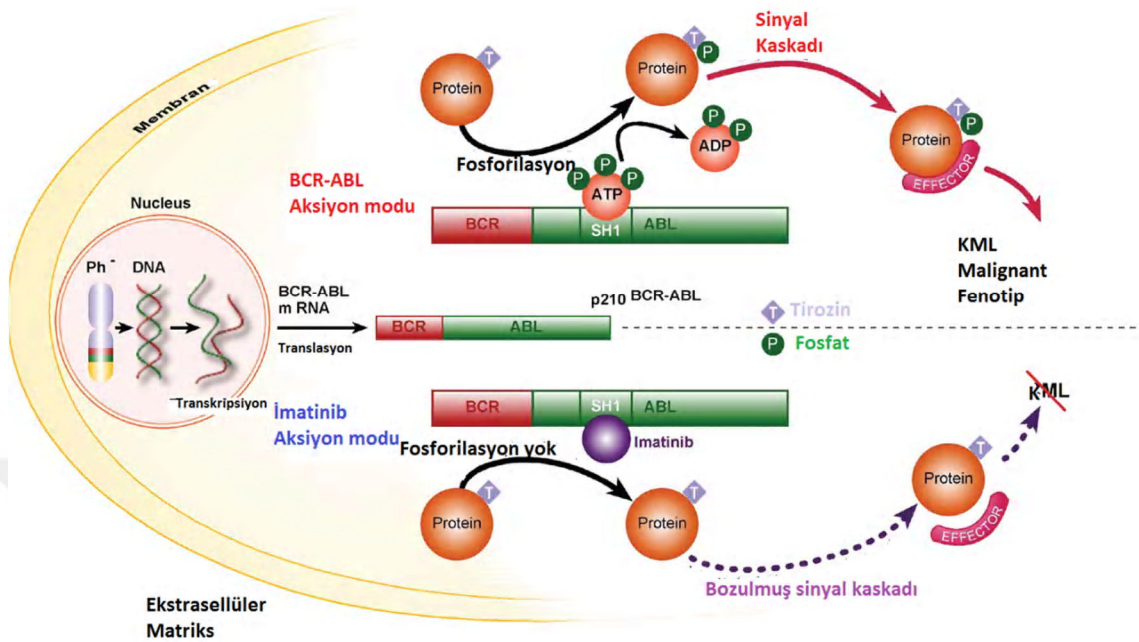
Hastaların %5-8'inde tipik bir t (9; 22); basit (22.kromozom ve 9. kromozom dışındaki bir kromozomun dahil olduğu) veya kompleks (9.kromozom ve 22. kromozoma ek olarak bir veya daha fazla kromozomu içeren) olabilen varyant translokasyonlara sahiptir. Ph varyantlarına sahip hastalar, Ph-pozitif KML'ye benzer şekilde terapiye yanıt verirler (71-73).

2.2.6. Tedavi

2.2.6.1. İmatinib

BCR-ABL proteini, KML tedavisi için ideal bir ilaç hedefidir. Lösemi hücrelerine özgü olan BCR-ABL proteini, yüksek seviyelerde eksprese edilir ve SH1 bölgesindeki tirozin kinaz aktivitesi, KML'yi uyarabilmek için esas özelliktir. Onkojenik transformasyondan sorumlu SH1 bölgesi KML ile mücadelede son derece önemli bir hedefdir (74).

Dizayn edilen en başarılı sentetik ATP inhibitörü, Mayıs 2001'de Amerika Birleşik Devletleri'nde FDA tarafından onaylanmış imatinib mesilat (STI 571, Gleevec, Novartis, İsviçre)tır ve daha sonra Kasım 2001'de İngiltere'de EMEA tarafından KML tedavisinde kullanılması için onaylanmıştır (32,75). Bu ilacın tanıtımı dramatik bir şekilde KML tedavisindeki uygulamaları değiştirmiştir (76). İmatinib, hastalığın tüm evrelerinde, Ph+ KML yetişkin hastaların birinci basamak tedavisi için kullanılmakta olup, KML tedavisinde altın standart olarak kabul edilmektedir (77,78).



Şekil 2.4. BCR-ABL ve imatinibin KML patogenezindeki etki modunun karşılaştırılması (79)

İmatinib, 2-fenilaminopirimidin'in bir türevidir. Tip II protein kinaz inhibitörü sınıfında yer alır ve tirozin kinazların aktivitesini azaltır (Şekil 2.4). Tirozin kinazlar ATP'den fosforu koparıp tirozin amino asidine transfer eden enzimlerdir ve hücre büyümesi, proliferasyonu, apoptozisi ve hücre içi uyarı iletiminde önemli rol oynarlar. İnsan vücudunda birçok tirozin kinaz enzimi vardır fakat imatinibin spesifik olduğu tirozin kinaz bölgesi ABL, c-kit ve PDGF-R bağlı tirozin kinazlarda mevcuttur. İmatinib özellikle BCR-ABL tirozin kinaz aktivitesini azaltır. BCR-ABL bağlı tirozin kinazın aktivasyon bölgesinde Asp-Phe-Gly (DFG D: aspartat, F: fenilefrin, G: glisin) konformasyonu önemli rol oynar. DFG bölgesinin bulunduğu yer itibariyle ATP bağlanma bölgesine çok yakındır. Enzimin aktif hali "DFG-in" konformasyonunda, enzimin inaktif hali ise "DFG-out" konformasyonundadır. Tip I protein kinaz inhibitörlerin aksine, imatinib hem ATP bağlanma bölgesine hem "DFG-out" konformasyonunda oluşan hidrofobik bölgeye bağlanır ve enzimin inaktif konformasyonda "donmasına" (freezing) neden olur. İmatinib, enzimin inaktif formuna bağlanma özelliğine sahiptir. Bunun için iki teori mevcuttur (i) aktivasyon halkasının fosforilasyonu dinamiktir ve geçici olarak defosforile olunca imatinib enzime bağlanır

ve kinaz aktivitesini azaltır; (ii) imatinib yeni sentezlenen bcr-abl kinaza bağlanır ve fosforilasyon ile modifikasyona fırsat vermeden aktif hale geçmesini engeller (80).

Kronik faz KML tedavisinde imatinib INF α 'ya kıyasla daha üstün ve sürdürülebilir bir yanıt üretir. Bir Faz III klinik araştırması olan IRIS (İnterferon ve STI571'in Uluslararası Randomize Çalışması), imatinib ve yeni tanı konan KML'li hastaların tedavisinde kullanılan konvansiyonel ilaçların kullanımını karşılaştıran çalışmadır. Konvansiyonel ilaçlar, interferon monoterapiden daha iyi sitogenetik yanıt ve sağkalım oranları sergileyen rekombinant INF α ve düşük doz sitarabindir. Bu araştırmanın sonuçları, tolere edilebilirlik açısından hematolojik ve sitogenetik yanıtların ve hızlandırılmış veya blast fazlı KML'ye ilerleme olasılığının imatinib ile üstün sonuçlar verdiğini ortaya koymuştur (81-83).

Imatinib, hastaların çoğunda sürekli bir sitogenetik yanıt üretir ve klinik olarak iyi tolere edilir. Klinisyenler halihazırda tüm yeni teşhis edilen hastalara imatinib tedavisi önermektedir. Ancak, imatinib tatmin edici bir şekilde yanıt veremediği zaman, diğer tedaviler uygulanır (82).

2.2.6.2. Nilotinib (AMN107)

İmatinibe karşı hücrelerde direnç gelişmesinin ardından, imatinibin yapısı değiştirilerek Nilotinib (Novartis) geliştirilmiştir. Her ikisi de ABL kinaz bölgesinin aktif olmayan bir konformasyonuna bağlandığı ve bir ATP inhibitörü olarak işlev görmektedir. İmatinibden farklı olarak nilotinib, ilaç etkinliğini ve duyarlılığını arttırmak için BCR-ABL proteinine daha sıkı bağlanabilme özelliğine sahiptir (84-86). Çoğu BCR-ABL mutanı, nilotinib için 20 kat daha duyarlıdır. Bu kuralın istisnası, mutant T315I'dir. Ayrıca, ABL proteinine üstün topografik uyumu ile, nilotinibin imatinibten daha güçlü olduğu ispatlanmıştır (87,88).

Nilotinib ile yapılan Faz I klinik çalışmalarında, imatinibe dirençli hastalarda, hematolojik cevap oranı, kronik evrede %92, akselere evrede %75, blast evrede %39 olarak bulunmuştur. Sitogenetik yanıtlar sırasıyla %35, %55 ve %27 dir. Nilotinib için faz II çalışmaları devam etmektedir (89).

2.2.6.3. Dasatinib (BMS-354825)

Dasatinib (Bristol-Myers Squibb), birincil Src inhibitörü olan wild-type BCR-ABL'yi ve en dirençli imatinib mutasyonlarını inhibe eden bir ilaçtır (84).

Src, hücrel adezyon, motilite ve büyüme de dahil olmak üzere hücre sinyallerinde çok fazla rol oynayan bir reseptör olmayan tirozin kinazdır. Src'nin kinaz bölgesi ile fosforilatlama kapasitesine sahip birçok substrat, hücre içi sinyal kaskadlarının bir bölümünü oluşturur (90,91). Src'nin düzenlenmemiş etkinliği, kolon ve meme kanseri gibi neoplastik hücrelerde zaten fark edilmiştir. Bu özellikleri ve aktivitesi nedeniyle Src, ilaç geliştirmede hedef olarak görülmüştür (90).

Dasatinib, bir çift Src / ABL kinaz inhibitörüdür. Çeşitli şekillerde imatinibden farklıdır. İmatinibin aksine dasatinib, BCR-ABL'nin inaktif ve aktif formlarına bağlanabilir. Dolayısıyla, dasatinib aktif olmayan konformasyonda mevcut olan ABL ve Src kinaz arasında daha yapısal olarak korunmuş bir alana bağlanabilir (92). Dasatinib BCR-ABL'nin farklı konformasyonlarına bağlanma konusunda daha esnektir ve BCR-ABL'nin çoklu konformasyonlarını tanıyabilmektedir (93). Dasatinib şimdiye kadarki en güçlü ABL kinaz inhibitörü olmasına rağmen, en bilinen değildir, hedef profili diğer Src ailesi üyelerini de içine alacak şekilde genişlemektedir (94).

Faz I klinik araştırmalar, nilotinibe benzer şekilde, dasatinibin de T315I mutasyonlarının üstesinden gelemediğini göstermiştir. Dasatinib, kronik faz, akselere faz ve blast fazdaki KML'de %92, %45, %35'lik sitogenetik yanıt oluşturduğunu göstermiştir (95,96).

2.2.6.4. Bosutinib

Bosutinib (Pfizer) üçüncü basamak tirozin kinaz inhibitörüdür ve başlangıçta imatinibe dirençli veya toleranslı olmayan hastalarda çalışılmıştır. Bosutinib, T315I haricinde imatinib direnci kazandırdığı bilinen mutasyonların çoğunda aktivitesini sürdürmektedir. Hastaların imatinibe dirençli olup olmamasından bağımsız olarak etki gösterir. Belirtilen en yaygın toksisiteleri ishal, mide bulantısı, kusma ve döküntüdür. Diğer önemli advers olayları miyelosupresyon ve karaciğer fonksiyon testi anomalileridir (97).

2.2.6.5. Ponatinib

T315I mutasyonu varlığında KML'ye karşı aktif rol oynadığı düşünülen ilk bileşik olan Ponatinib üçüncü nesil TKI'dir (98). BCR-ABL'nin inhibisyonunda imatinibden 500 kat daha güçlü olduğu düşünülmektedir (99). Ponatinib, T315I mutasyonu bir hasta için diğer TKI'lerin endike olmadığı durumlarda tercih edilen ajan olarak düşünülmelidir. Şu anda, bu mutasyona karşı faaliyet gösteren başka hiçbir TKI bulunmamaktadır. Ponatinib kullanımı ile trombotik olayların ortaya çıkması riski ciddi olmakla birlikte, hastalık kontrolü için uygulanabilir seçeneklerin az olması nedeniyle T315I mutasyonlu hastalarda kullanılabilir (100).

2.2.6.6. Allojenik Kök Hücre Transplantasyonu

Allojenik kök hücre transplantasyonu genellikle hastalığın akselere fazında ve blast fazında uygulanırken, tirozin kinaz inhibitörlerinin bulunması ile kronik fazdaki KML hastalarında bu yöntemin uygulanmasında düşüş gözlenmiştir. Ancak en az iki TKI uygulanmış hastalarda veya ponatinib tedavisi almış T315I mutasyonuna sahip hastalarda yanıt alınamaması durumunda kronik fazdaki KML'de terapötik olarak uygulanabilmektedir (101).

2.2.6.7. İnterferon Alfa

İnterferon alfa (INF α), antiviral ve antiproliferatif özelliklere sahip biyolojik kökenli bir glikoproteindir. KML'de, INF α , özellikle sitogenetik yanıt veren kişilerde sağkalımı uzatır. Kemoterapiyle kombine edilerek hastaların %35-55'inde sitogenetik bir yanıt oluşturabilir. INF α , 1980'lerin başında KML'nin tedavisinde kullanılan ilk etkili terapi yöntemidir ve imatinibin gelmesinden sonra terapötik strateji değişene kadar, KML hastalarına uygulanmaya devam edilmiştir (102). Bu terapi zamanla yerini yeni geliştirilen ilaçlara bırakmıştır (103).

2.3. KANSER KÖK HÜCRELERİ

Kanser kök hücre (KKH)'leri kendi kendilerini yenileyebilen, pluripotent kapasiteye sahip, ölümsüz, tümör başlatıcı hücrelerdir (104). KKH'leri, lösemi ve çeşitli solid kanserler de dahil olmak üzere birçok malignitede tanımlanmıştır. Olağanüstü karakteristikleri nedeniyle KKH'lerin tümörün başlaması, gelişimi, metastazı ve nüks etmesinin temelini oluşturdukları düşünülmektedir. Bruce ve arkadaşları, 1963 yılında

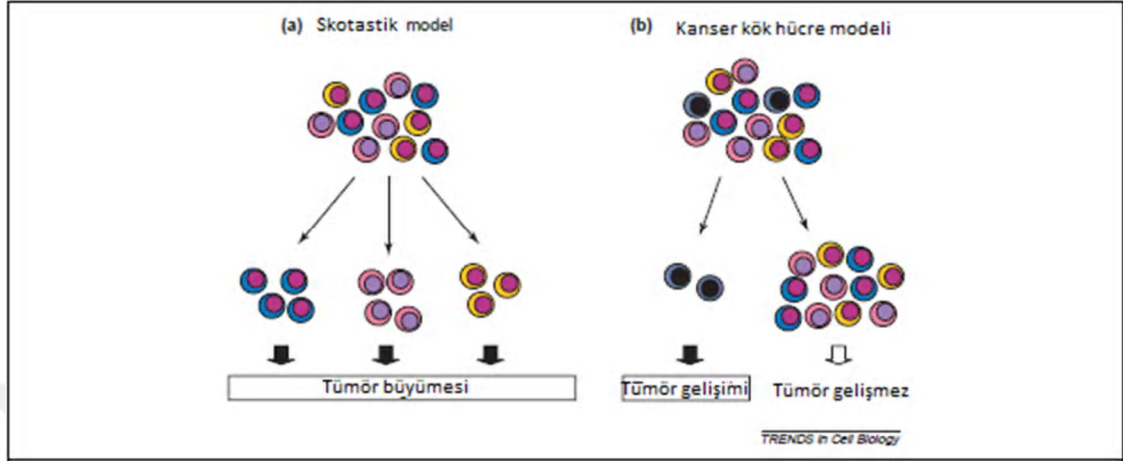
lenfoma hücrelerinin yalnızca %1-4'ünün *in vitro* koloniler oluşturabildiğini veya fare dalağında karsinom başlatabildiğini gözlemlemiştir (105). Bununla birlikte, KKH'lerin varlığını ispatlayan ilk güçlü kanıtın 1997'de Bonnet ve Dick tarafından elde edildiği bilinmektedir (106). Çalışmalarında, AML hastalarından elde ettikleri CD34 + CD38- hücrelerinin, NOD/SCID farelerinde hematopoietik malignansi başlatabildiklerini göstermişlerdir. Daha da önemlisi, bu hücre popülasyonunun kendi kendini yenilenme, çoğalma ve farklılaşma becerisine sahip olduklarını bulmuşlardır (106). Solid kanserlerdeki KKH'lere ait ilk çalışma, 2003 yılında, Al-Haji ve arkadaşları tarafından göğüs kanserinde KKH'lerin varlığının gösterilmesiyle olmuştur (107). Günümüzde KKH'leri, akciğer kanseri (108), kolon kanseri (109), prostat kanseri (110), yumurtalık kanseri (111), beyin kanseri (112) ve melanom (113) dahil olmak üzere geniş bir solid tümör spektrumunda keşfedilmiştir.

2.3.1. Lösemi Kök Hücreleri

1997'de Bonnet ve Dick tarafından, AML hastalarından elde edilen CD34 + CD38- hücrelerinin hematopoetik malignansiyi başlattıklarının gösterilmesiyle ve bu hücrelere lösemi başlatan hücreler ya da lösemi kök hücreleri (LKH) veya kanser kök hücreleri (KKH) denilmiştir (114, 115, 116). Bu hücre popülasyonu kendi kendini yenileme, çoğalma ve farklılaşma kapasitelerine sahiptir. Yapılan çalışmalar LKH'lerin klinik açıdan anlamlı olduğunu göstermiştir; bu da lösemide LKH'leri hedef alan tedavilerin sağkalım sonuçlarını iyileştireceğini göstermiştir (117).

AML'de ve diğer kanser tiplerinde gözlenen fonksiyonel heterojenliği açıklamak için kanser kök hücrelerinin proliferasyonu açıklamak adına iki tane model önerilmiştir (2,16). Skotastik model, hücre popülasyonundaki herbir hücrenin kendi kendini yenileme ve farklılaşma süreçlerinin rasgele ortaya çıktığını ve bu sürecin olasılıklarla yönetildiğini varsaymaktadır. Buna göre, her tümör hücresi, düşük fakat eşit derecede proliferere olma ihtimaline ve dolayısıyla kök hücre gibi davranma potansiyeline sahip olacaktır. Bu modellemede en önemlisi, yalnızca kendi kendini yenileme kapasitesini koruyan hücreler neoplastik büyümeyi sürdürme kabiliyetine sahiptirler. Aksine, kök hücre modeli, bir tümör içindeki, her biri kendi kendini yenileme ve çoğalma kapasitesine sahip olan, farklı hücre sınıflarının varlığını önermektedir. Sonuç olarak, sadece tümör içindeki küçük bir tanımlanabilir alt küme, sürekli olarak tümör

büyümesini başlatma ve tümörü oluşturan hücre türlerini çoğaltma kapasitesine sahip olacaktır.



Şekil 2.5. Kanser gelişim modelleri (118)

Her iki model (Şekil 2.5) de bir tümör içindeki sınırlı sayıda hücrenin tümör büyümesini başlatacağını öngörse de altta yatan biyolojik ilkeleri çok farklıdır. Stokastik teoriye göre, bir tümör içindeki hücreler nispeten homojendir ve tüm hücrelerde malignitenin gelişimine ve ilerlemesine yol açan genetik değişiklikler etkindir. Bu nedenle, tümör başlangıcını anlamak için yapılan araştırmaların yanı sıra tümörün ortadan kaldırılmasına yönelik terapiler, toplu hücre popülasyonuna yönlendirilmelidir. Ancak kök hücre modeli, nadiren tümör başlatan hücrelerin biyolojik ve işlevsel açıdan farklı olduğunu öne sürer. Tümör yolakları, toplu hücrelere kıyasla bu hücrelerde farklı şekilde çalışabilir; bu nedenle, araştırmalar, hastalığın nüksetmesini etkili bir şekilde engelleyecek hedef kanser tedavilerinin geliştirilmesini sağlamak için böyle KKH'lerine odaklanmalıdır. Kök hücre modeli in vivo tümör büyümesini başlatma kapasitesine sahip tümör kök hücrelerinin prospektif olarak tespit edilebileceğini ve toplu tümörden saflaştırılabileceğini öngörürken stokastik model, tümör başlatan aktivitenin her zaman her hücre fraksiyonunda görüleceğini ve zenginleşemeyeceğini öngörür (118).

2.3.1.1. Lösemi Kök Hücrelerinin Hücre Yüzey Molekülleri

1990'lı yıllarda, içinde John Dick'in de bulunduğu grubunun yürüttüğü öncü çalışmalar AML-LKH modelini; AML'yi nadir bir LKH alt grubu tarafından başlatılan ve devam eden hiyerarşik bir hastalık olarak tanımlamıştır (Şekil 2.6). İmmatür CD34+CD38- lösemi hücrelerinin, subletal olarak ışınlanmış immünyetmezlik gösteren farelere

verildiklerinde, farelerde lösemiye başlatmakla kalmadıklarını, aynı zamanda ikinci ve üçüncü nesil farelere de nakledilebildikleri gözlenmiştir. Buna karşılık, daha olgun CD34+CD38+ lösemi blast hücrelerinin aynı koşullar altında uygulandığında farelerde hastalığı başlatamadıkları görülmüştür. LKH'lerin CD34+CD38- hücrelerde bulunma olasılığı tahminen milyonda birdir, dolayısıyla LKH'leri, normal immatür hematopoietik hücrelerle benzer hücre yüzey reseptörlerini içeren, çok nadir bir lösemi hücresi popülasyonunu temsil eder (119,120).

Thy-1 olarak da bilinen CD90, hücre sağkalımını, proliferasyonunu, sadhezyonu ve sitokinlere yanıt oluşturmayı kontrol eden çoklu sinyal yollarını düzenleyen, 25-37 kDa ağırlığında küçük bir glikosilfosfatidilinositol (GPI) bağlı proteindir (121). İlk çalışmalardan biri, AML'deki blastların çoğunluğunun CD90'ı ifade etmediğini göstermiştir ve CD34+CD90- hücrelerin sırasıyla, lösemik klonojenik hücreleri (CFU) üreterek ve diyabetik olmayan şiddetli kombine bağışıklık yetmezliği (NOD/SCID) olan farelerde engraftman oluşturarak hastalığı *in vivo* ve *in vitro* olarak devam ettirebilme yeteneklerinin olduğunu göstermiştir (122). Bununla birlikte, LKH belirteci olarak CD90'ın kullanımını gösteren herhangi bir çalışma mevcut değildir. Ancak, ikincil AML (%40) gösteren ve 60 yaşın üzerindeki (%24) hastalarda (yüksek riskli AML grubunda) CD90 ekspresyonu yüksek oranda saptanmıştır (123). Ayrıca, CD90, hepatoselüler karsinom (124), özofageal kanser (125) ve yüksek dereceli gliomların kanser kök hücresi (KKH) belirteci olarak tanımlanmıştır (126).

Bir tip I zar proteini olan CD96, immünoglobulin süper ailesine aittir. CD96, immün yanıtın antijen sunumunda aktive edilmiş T ve NK hücrelerinin adhezyonunda rol oynar. CD96, CD34+CD38- AML hücrelerinin çoğunluğunda eksprese edilir ve bunun tersi de geçerlidir [20]. Buna karşılık, CD96, normal HKH ile zenginleştirilmiş popülasyondaki hücrelerde (Lin (-) CD34 (+) CD38 (-) CD90 (+)) de hafifçe eksprese edilir. Terapötik açıdan bakıldığında, otolog kök hücre transplantasyonundan önce AML-LKH'lerini seçici olarak ortadan kaldırmak için CD96 spesifik monoklonal antikoru kullanılabilir (127).

CD123, interlökin 3 reseptörü alfa (IL-3Ra) olarak da bilinmektedir. IL3R, ligand bağlanması ve IL-3 aktivitesi için gerekli olan alfa birimi ve beta biriminden oluşan bir heterodimerik sitokin reseptörüdür (128). IL-3, hematopoietik hücrelerin proliferasyon, büyüme ve farklılaşmasını kontrol eden belirgin sitokinlerden biridir (129). Potansiyel

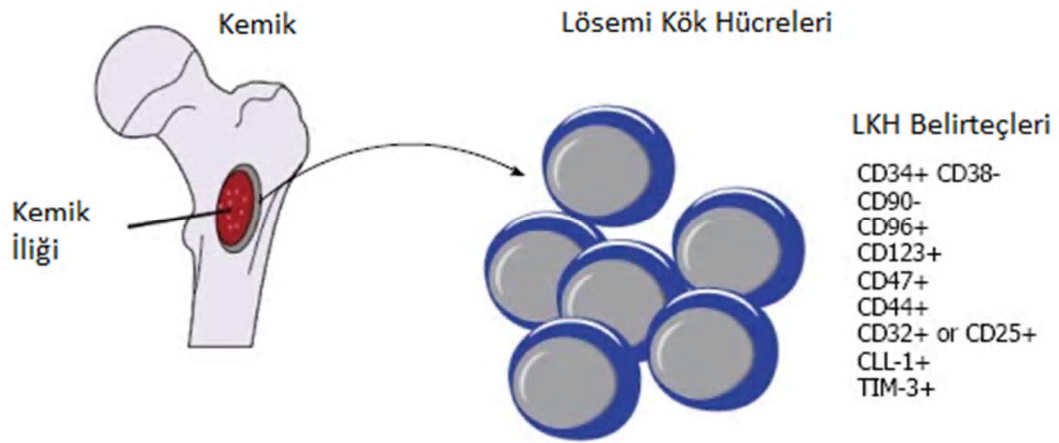
LKH belirteçleri olan diğer tüm hücre yüzey antiijenleriyle karşılaştırıldığında, CD123 üzerindeki çalışmalar çok daha fazla ayrıntıyla araştırılmıştır (128). Jordan ve meslektaşları, CD123'ün AML hastalarından elde edilen CD34+CD38- hücrelerinde anormal derecede eksprese edildiğini; ancak sağlıklı bireylerden alınan CD34+CD38- hücrelerinde saptanmadığını bildirmiştir. Dahası, AML hastalarından izole edilmiş CD34+CD123+ hücrelerinin, NOD/SCID farelerinde lösemi oluşturabildiklerini ve çoğalma yeteneğine sahip olduklarını göstermişlerdir (130). Bu sonuç fonksiyonel olarak CD123'ü bir LKH belirteci olarak doğrulamıştır (131).

CD47, integrin ilişkili protein, IAP olarak da bilinir. Ig süper ailesinin üyelerinden biridir (132). CD47, trombospondin-1'in (TSP-1) C-terminal hücre bağlanma alanı ve sinyal düzenleyici protein alfa (SIRP α)nın ekstrasellüler bölgesi için bir ligand reseptördür (133). CD47, insan hücrelerinde eksprese edilir ve bağışıklık ve anjiyojenik cevaplar da dahil olmak üzere birçok temel hücresel sürece dahil olur (132). Majeti ve arkadaşları ilk önce akım sitometresi ve mikroarray gen ekspresyon analiziyle, HKH ve multipotent progenitör hücrelere (MPH) kıyasla, AML LKH'de CD47'nin daha yüksek oranda ekspresyonunu keşfettiler (134,135). Artan CD47 ekspresyonu ile malignensi arasındaki ilişki toplam 664 AML hastası ve 3 sağlıklı bireyle yapılan çalışma ile doğrulanmıştır (134). SIRP α , makrofajlar ve dendritik hücreler gibi fagositik hücrelerde sentezlenir ve inhibitör reseptör görevi görür. AML-LKH'lerinde CD47'nin upregülasyonu, CD47'nin inhibe edici ligand SIRP α ile etkileşimi yoluyla fagositik hücrelerin saldırısından kendilerini korumaları birkaç çalışma ile kanıtlanmıştır (136,137).

CD44, esas olarak hiyalüronik asit (HA) için bir reseptör gibi etki gösteren bir transmembran glikoprotein ailesine aittir; ancak aynı zamanda osteopontin, kolajenler, matris metaloproteinazlar (MMP'ler) vb. dahil olmak üzere diğer reseptörlere de bağlanır (139). Hyaluronan, ekstrasellüler matriksin ana bileşenlerinden biridir (140). CD44'ün başlıca fonksiyonu, HA ve diğer reseptörlere bağlanarak hücre-hücre adezyonunu ve hücre-matris etkileşimini düzenlemektir (141). Hematopoezde CD44'ün rolü, özellikle hematopoietik kök/ progenitör hücrelerin; hücre göçü, proliferasyonu, farklılaşması, sağkalımı ve kemik iliği homolojisini içermektedir (142). CD44'ün normal ve lösemik CD34+ erken hematopoetik hücrelerde eksprese edildiği bilinmektedir (143). CD44 ve CD123'ün, CD34+CD38- AML hücrelerinde birlikte

eksprese olması, CD44'ün LKH için potansiyel bir belirteç adayı olduğunu göstermektedir (144).

CD32, makrofajlar, nötrofiller ve doğa öldürücü hücreler üzerinde eksprese edilen immunoglobulin Fc reseptör ailesinin bir üyesidir (145). CD32, immunoglobulin gama (Ig γ) 'nın Fc bölgesine bağlanır, fagositozu başlatır ve bağışıklık immun komplekslerin temizlenmesini gerçekleştirir (145). CD25, interlökin 2 (IL2) reseptör alfa (IL2RA) olarak da bilinir (146). IL-2, hücre proliferasyonunu, farklılaşmasını, sağkalımı ve apoptozu düzenler (147). CD32 ve CD25'in kemoterapiye dirençli insan AML-LKH'lerinde aşırı eksprese olduğu keşfedilmiştir. Normal CD34+CD38-CD133+ HKH'ler, CD32 veya CD25 ekspresyonu için negatiftir (148).



Şekil 2.6. Lösemi kök hücresi yüzey belirteçleri (149)

C-tipi lektin benzeri molekül-1 (CLL-1) tip II transmembran reseptör ailesinin bir üyesidir. CLL-1 başlangıçta AML hücrelerinin yeni bir yüzey belirteci olarak akım sitometrisi ile birlikte faj görüntüleme teknolojisi kullanılarak tanımlanmıştır (150). Daha ileri çalışmalar, CLL-1'in AML hastalarının %87'sinde CD34+CD38- hücrelerinde eksprese edildiğini, ancak normal HKH'lerde eksprese edilmediğini ortaya koymuştur (151).

T hücre immunoglobulin-3 (TIM-3), müsin domaini içeren molekül (TIM) süper ailesine aittir ve T hücresinin bir üyesidir (152). TIM-3, CD4+Th1, CD8+ sitotoksik T hücrelerinde, monosit / makrofajlarda, dendritik hücrelerde ve mast hücrelerinde ifade edilir. TIM-3 T hücre yanıtında ve konjenital bağışıklığın düzenlenmesinde önemli bir

rol oynamaktadır (152,153). TIM-3'ün AML hücrelerinin CD34+CD38- fraksiyonunda sentezlendiği; ancak normal CD34+CD38- HKH'lerde bulunmadığı gösterilmiştir (154).

Aldehid dehidrojenaz (ALDH) gen süper ailesi, 19 fonksiyonel gen ve üç psödogenen oluşur. ALDH, çok çeşitli endojen ve ekzojen aldehit substratlarını okside eder, böylece olumsuz aldehitlerin büyük bir kısmı hücrelere detoks yapar. ALDH, kemik iliği ve bağırsak gibi çeşitli dokulardaki primitif kök hücrelerde yüksek oranda eksprese edilir (155). HKH'ler yüksek düzeyde ALDH aktivitesine sahiptir (156). Xenograft transplantasyon deneyleri, ALDH+ hücrelerinin LKH'ler için zenginleştirilmiş olduğunu göstermiştir (157,158).

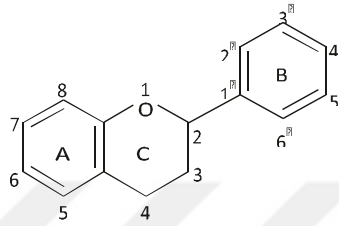
2.3.1.2. Lösemi Kök Hücreleri ile İlişkili Mikroçevre

Normal koşullar altında HKH'ler, işlevleri ve onarımları için kritik olan kemik iliği nişi ile etkileşim içindedirler (159). Kemik iliği nişinin yeniden şekillendirilmesi yaygın olarak kan malignitelerinde görülür. Lösemik hücrelerin büyümesinin normal hematopoietik progenitör hücrelerin kemik iliği nişlerini bozduğuna ve kendileri için uygun bir mikro çevre yarattığına dair kanıtlar bulunmaktadır (160). Bu mikro ortamda LKH'ler, hücre yapışmayla başlatılan sitokinler, kemokinler ve hücre içi sinyaller aracılığıyla kemik iliği stromal hücreleriyle iletişim kurabilmektedir (161, 162). Bu sinyaller LKHlerin kendi kendilerini yenileme, sessiz kalmalarını sürdürme ve apoptozu önleme yeteneklerini etkiler. Buna ek olarak, kemik iliği nişi, LKH'lerin siklusunu düzenleyen iki farklı mikro-çevre (osteoblastik niş ve damar nişi) sağlar (162,163). Bu nedenle, LKH'ler ile mikro ortamları arasındaki etkileşimlerin engellenmesi, LKH homeostazını bozmak ve normal hematopoezi geri kazandırmak için umut verici bir strateji oluşturmaktadır.

2.4. FLAVONOİDLER

Flavonoidler, benzo- γ -piron yapısına sahip olan (Şekil 2.7) ve çoğunlukla bitkilerde bulunan polifenolik bileşiklerin büyük bir grubundan oluşur. Fenilpropanoid yolağı ile sentezlenirler. Mevcut veriler, flavonoidleri içeren doğal fenolik bileşiklerin sekonder metabolitlerinin, farmakolojik aktivitelerin çeşitliliğinden sorumlu olduğunu göstermektedir (164, 165). Flavonoidler hidroksillenmiş fenolik maddelerdir ve bitkiler tarafından mikrobiyal enfeksiyonlara cevap olarak sentezlenirler (166). Flavonoidlerin faaliyetleri kimyasal yapılarına bağlıdır. Flavonoidlerin kimyasal yapısı ise; yapısal

sınıflarına, hidrosilasyon derecelerine, diğere substitüsyon ve konjüstasyon reaksiyonlarına ve polimerizasyon derecelerine bağılıdır (167). Flavonoidlerdeki fonksiyonel hidrosil grupları, serbest radikalleri uzaklaştıarak ve / veya metal iyonlarını bağılayarak (şelasyon) antioksidan etki gösterirler (168,169). Metal iyonların şelasyonu, hedef biyomoleküllere zarar veren radikal oluşumun önlenmesinde kritik role sahiptir (170, 171).



Şekil 2.7. Flavonoidin temel yapısı (172)

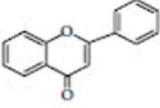
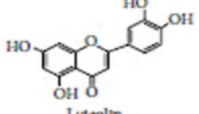
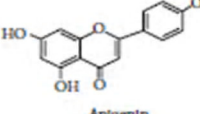
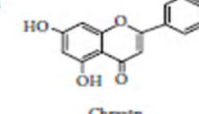
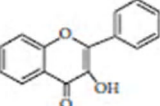
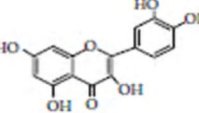
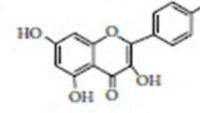
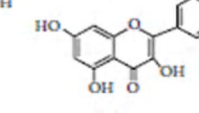
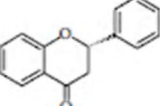
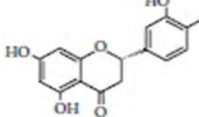
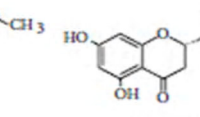
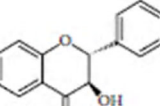
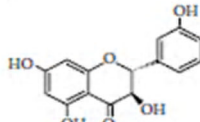
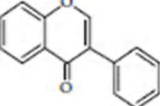
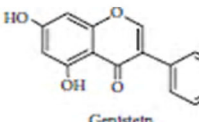
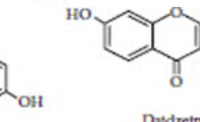
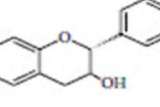
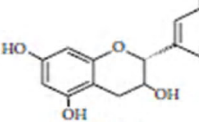
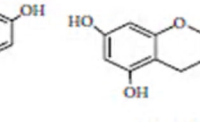
Flavonoidlerin diyet bileşeni olarak hem *in vivo* hem de *in vitro* sistemlerde, yüksek antioksidan kapasiteleri nedeniyle, sağık geliştirici özelliklere sahip oldukları düşünölmektedir (173,174). Ayrıca, flavonoidlerin insanda koruyucu enzim sistemlerini indökleme yetenekleri de vardır. Birçok çalışma, flavonoidlerin birçok enfeksiyöz (bakteriyel ve viral hastalıklar) ve kardiyovasküler hastalıklar, kanser ve diğere yaşa bağılı hastalıklar gibi dejeneratif hastalıklara karşı koruyucu etkileri olduğunu ileri sürmektedir (165, 172-174). Flavonoidler, farklı abiyotik ve biyotik strese maruz kalan bitki dokularında sekonder antioksidan savunma sistemi olarak da işlev görürler. Flavonoidler, mezofil hücrelerinin çekirdeğinde ve ROS üretim merkezlerinde bulunur. Ayrıca, oksin gibi bitkilerdeki büyüme faktörlerini de düzenlerler (175). Çeşitli bakterilerde ve mantarlarda flavonoid üretimi için biyosentetik genler bulunmaktadır (176).

2.4.1. Flavonoidlerin Kimyası

Flavonoidler, fenolik yapıları değışken olan ve bitkilerde bulunan bir grup doğal bileşiklerdir. İlk olarak 1930'da portakaldan yeni bir madde izole edilmesiyle keşfedilmiştir; ancak o dönemde yeni bir vitamin sınıfına üye olduğu düşünölmüştür ve P vitamini olarak adlandırılmıştır. Daha sonra bu maddenin bir flavonoid olduğu anlaşılmıştır ve günümüze kadar 9000'den fazla çeşit flavonoid tanımlanmıştır (177).

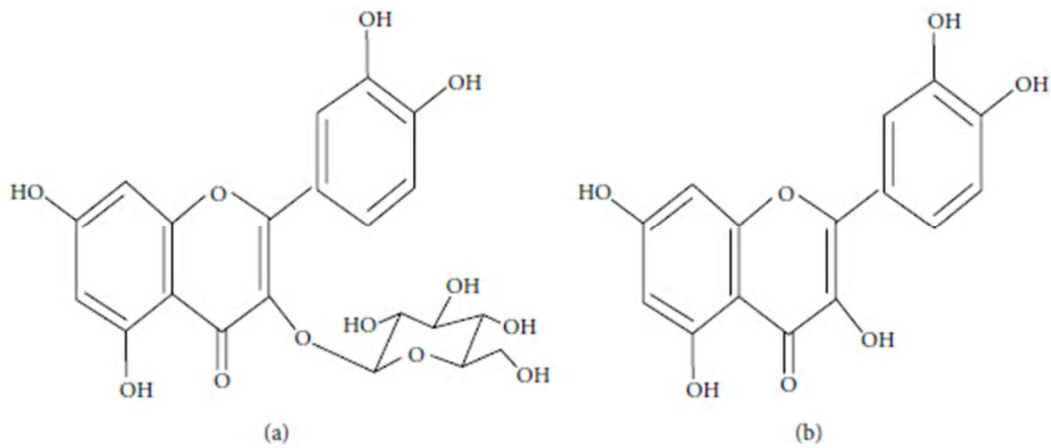
Kimyasal olarak flavonoidler, bir heterosiklik piran halkası (C) ile bağlanmış iki benzen halkasına (A ve B) sahip on beş karbonlu iskeletten oluşurlar. Flavonlar (flavon, apigenin ve luteolin), flavonoller (quercetin, kaempferol, myisetin ve fisetin), flavanonlar (flavanon, hesperetin ve naringenin) gibi çeşitli sınıflara ayrılırlar. Flavonoid sınıfları oksidasyon seviyelerine ve C halkasının taşıdığı süstitüentlere göre farklılık gösterirken; bir sınıf içindeki bileşikler A ve B halkalarının taşıdığı süstitüentlere farklılık gösterir (177).

Tablo 2.2. Flavonoidlerin yapısı (172)

Flavonoid Grubu	Yapı	Örnekler
Flavon		 Luteolin  Apigenin  Chrysin
Flavonol		 Quercetin  Kaempferol  Galangin
Flavanon		 Hesperetin  Naringenin
Flavanonol		 Taxifolin
Isoflavon		 Genistein  Daidzein
Flavan-3-ol		 Catechin  Epicatechin

Flavonoidler, aglikonlar, glikozitler ve metillenmiş türevlerinden oluşur. Temel flavonoid yapısı aglikondur. Benzen halkasıyla kondanse olan altı üyeli halka, bir apiron (flavonoller ve flavonlar) veya bunun dihidrotürevi (flavonoller ve flavanonlar) dir. Benzenoid süstitüentin konumu, flavonoidleri; flavonoidlere (2.pozisyon) ve izoflavonoidlere (3.pozisyon) böler. Flavonoller, flavanonlardan, 3.pozisyonadaki

hidroksil grubuna ve bir C2-C3'teki çift bağa göre farklılık göstermektedirler. Flavonoidler genellikle 3, 5, 7, 2, 3', 4' ve 5' konumlarından hidroksillenir. Alkol grubunun metil eterleri ve asetil esterlerinin doğada bulunduğu bilinmektedir. Glikozitler oluştuğunda, glikozidik bağ normal olarak 3. veya 7. pozisyonlarında bulunur ve karbonhidrat L-ramnoz, D-glikoz, glükorkamnoz, galaktoz veya arabinoz olabilir (178).



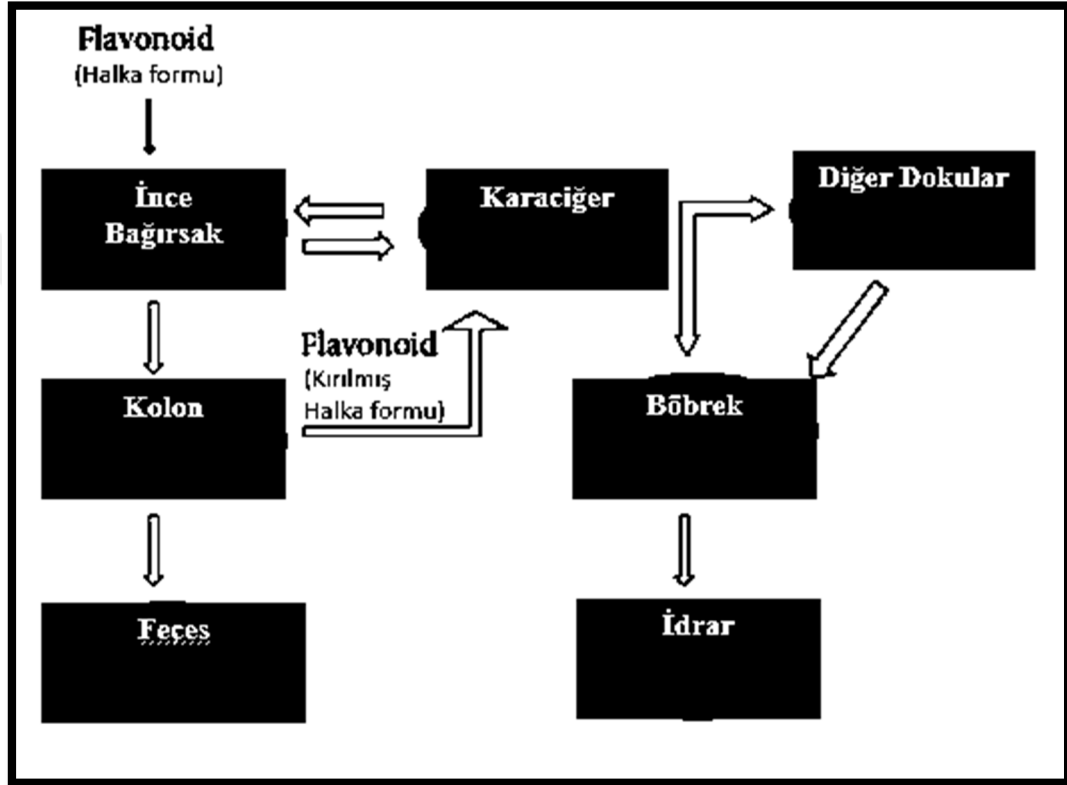
Şekil 2.8. Flavonoid glikozit (a) ve aglikon (b) flavonoidin yapısı (172)

2.4.2. Flavonoidlerin İnsanlardaki Metabolizması

Gıdalardan alınan diyet flavonoidlerinin emilimi, moleküler büyüklükleri, konfigürasyonları, lipofiliklikleri, çözünürlükleri ve pKa gibi fizikokimyasal özelliklerine bağlıdır. Flavonoidler incebağırsaktan absorbe edilirler veya absorbe olmadan önce kolona giderler. Bu durum, flavonoidin yapısına; glikozid veya aglikon formunda olmasına bağlıdır. Kateşinler hariç çoğu flavonoid, şekerlere b-glikozitler olarak bağlanan bitkilerde mevcuttur. Aglikon formundaki flavonoidler incebağırsak tarafından kolaylıkla absorbe edilirken, flavonoid glikozitlerin absorpsiyon için aglikon formuna dönüştürülmeleri gerekir (179).

Quercetin gibi hidrofilik flavonoid glikozitler, ince bağırsakta sodyum-glikoz bağlantılı taşıyıcılar (SGLT1) ile taşınırlar (179). Alternatif olarak, flavonoid glikozitlerin, ince bağırsağın fırça kenarlı membranının dışında bulunan bir β -glukozidaz olan laktaz filoridizin hidrolaz (LPH) tarafından hidrolize edildiği düşünülmektedir (Şekil 2.8). Hidrolizin ardından, serbestleştirilmiş aglikon ince bağırsakta emilir (180). Bu LPH enziminin substrat özgülüğü, flavonoid glikozitlere (glikozit, galaktozit, arabinozit,

ksilozit ve ramnosit) göre değişir (181). Bu enzimler için substrat olmayan glikozitler, flavonoid glikozitleri bakterilerin hidrolize edebildiği kolona doğru taşınırlar, aynı zamanda serbest bırakılmış flavonoid aglikonlar degrade olurlar (182). Kolonun absorpsiyon kapasitesi ince bağırsağinkinden çok daha düşük olduğu için, glikosidler önemli derecede absorbe olmazlar (182).



Şekil 2.9. Flavonoid metabolizmasına katılan bölümler (172)

Absorpsiyondan sonra, flavonoidler glukuronidasyon, sülfasyon veya metilasyon ile karaciğere konjuge edilir veya daha küçük fenolik bileşiklere metabolize olur (183). Bu konjugasyon reaksiyonları nedeniyle, kateşinler haricinde plazmada veya idrarda serbest flavonoid aglikonlar bulunamaz (184). Besin kaynağına bağlı olarak, bazı flavonoidlerin biyoyararlanımı belirgin şekilde farklıdır; örneğin, soğanda bulunan quercetin'in emilimi elma ya da çayda bulunan quercetin'in emiliminden dört kat daha fazladır (185). Bağırsaktan safra ile salgılanan ve ince bağırsaktan absorbe edilemeyen flavonoidler, bağırsaklardaki mikroflora ile degrade olurken, aynı zamanda burada flavonoidlerin halka yapıları da parçalanmaktadır. Oligomerik flavonoidler midede asidik koşulların etkisi altındaki monomere ve dimerlere hidrolize olabilir. Bakteriler tarafından parçalanmış daha büyük moleküller kolona ulaşır. Flavonoid glikozitlerin şeker kısmı,

biyoyararlanımın önemli bir belirleyicisidir. Flavonoidlerin tüm alt sınıfları arasında izoflavonlar en yüksek biyoyararlanımı gösterir (186). Yeşil çay tüketildikten sonra, plazma ve idrardaki yüksek seviyede bulunur ve aynı anda flavonoid içeriği hızla emilir. Flavonoidler sindirildikten hemen sonra sistemik dolaşıma girerler ve plazma antioksidan seviyesinde önemli bir artışa neden olurlar (187).

2.4.3. Flavonoidlerin Biyolojik Aktiviteleri

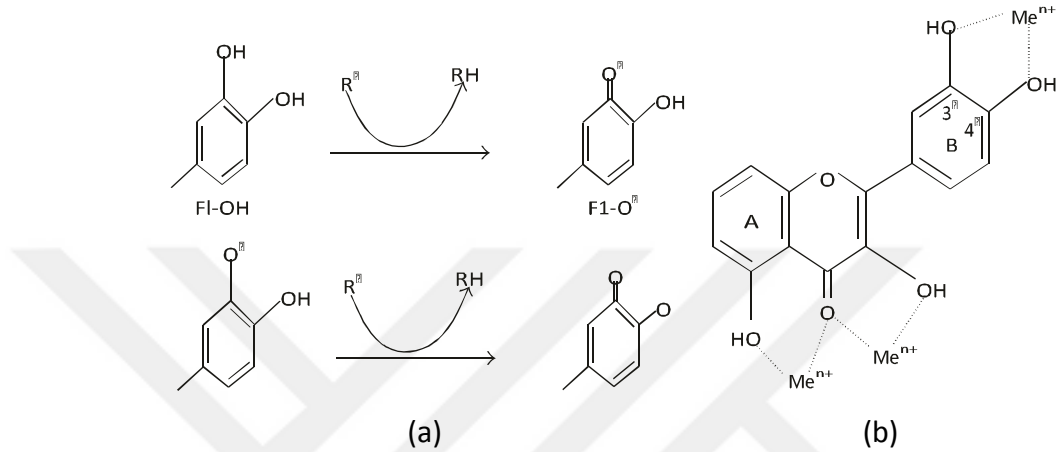
2.4.3.1. Antioksidan Aktivitesi

Flavonoidlerin birçok biyokimyasal özelliği vardır; ancak hemen hemen her gruptaki flavonoidlerin en çok bilinen özellikleri, antioksidan aktivitelerinin olmasıdır. Flavonoidlerin antioksidan aktiviteleri fonksiyonel gruplarının nükleer yapıları ile ilgili düzenlenişlerine bağlıdır. Konfigürasyon, süstitüsyon ve hidroksil gruplarının toplam sayısı; radikallerin uzaklaştırılması ve metal iyonlarının şelasyonu gibi flavonoidlerin sahip olduğu çeşitli antioksidan aktivite mekanizmalarını büyük ölçüde etkiler (167,188). B halkası hidroksil konfigürasyonu, hidrojeni ve bir elektronu hidroksil, peroksil ve peroksinitrite gönderdiği için ROS ve RNS'nin uzaklaştırılmasının en önemli belirleyicisidir, ROS ve RNS'i stabilize eder ve nispeten kararlı bir flavonoid radikali meydana getirir (189).

Flavonoidlerin antioksidan aktivite mekanizmaları; enzimlerin inhibisyonu veya serbest radikal üretiminde rol oynayan eser elementlerin şelasyonu ile ROS oluşumunun supresyonu, ROS'un uzaklaştırılması ve antioksidan savunmalarının artırılması veya korunması sayılabilir (190,191). Flavonoidler, ROS üretiminde görev alan, mikrozomal monooksijenaz, glutatyon S-transferaz, mitokondriyal süksinoksidaz, NADH oksidaz gibi enzimleri inhibe eder.

Lipid peroksidasyonu oksidatif stresin ortak bir sonucudur. Flavonoid, çeşitli mekanizmalarla lipidleri oksidatif hasara karşı korur (168, 192). Serbest metal iyonları, yüksek ölçüde reaktif hidroksil radikali üreterek hidrojen peroksitin indirgenmesi ile ROS oluşumunu artırır. Düşük seviyedeki redoks potansiyellerinden ötürü flavonoidler (Fl-OH) termodinamik olarak süperoksit, peroksil, alkoksil ve hidroksil gibi yüksek oksitleyici serbest radikalleri (2.13-1.0 V aralığındaki redoks potansiyellerini) hidrojen atomu vererek azaltabilirler. Metal iyonlarını (demir, bakır vb.) şelatlama kapasiteleri nedeniyle de flavonoidler serbest radikal oluşumunu engeller (191, 192). Quercetin

özellikle demir şelatlayıcı ve demir dengeleyici özellikleri ile bilinir. İz metaller, farklı flavonoid yapı halkalarının belirli konumlarına bağlanır (Şekil 2.9) (193).



Şekil 2.10. Flavonoidler (Fl-OH) tarafından ROS (R°)'un uzaklaştırılması (a) ve İz metallerin flavonoidlere bağlanma bölgeleri (b) (172)

B halkasındaki 3', 4'-katekol yapısı, lipit peroksidasyonunun inhibisyonunu artırır. Flavonoidlerin bu özelliği onları peroksil, süperoksit ve peroksinitrit radikallerinin en etkili temizleyicileri yapmaktadır (167). Epikateşin ve rutin, güçlü radikal temizleyicilerdir ve *in vitro* lipit peroksidasyon inhibitörleridir (194). Katekol grubuna sahip olan flavonoidlerin B halkasında oksidasyon nedeniyle güçlü tutucular olan oldukça kararlı bir ortozemikuinon radikali oluşur. Katekol sisteminden yoksun oksidasyona sahip flavonlar, kararsız radikallerin oluşumuna neden olarak zayıf radikal temizleme potansiyeli sergiler (195). 4-okso fonksiyonu ile konjugasyonda doymamış 2-3 bağı olan flavonoidlerin, antioksidan özelliklerinin bir veya ikisinden yoksun flavonoidlerden daha güçlü antioksidanlar olduğunu gösterir. A ve B halkaları arasındaki konjugasyon, flavonoid radikalinde kararlılık sağlayan aromatik nukleusun rezonans etkisine izin verir. Flavonoidlerle serbest radikal temizliği, elementlerin varlığı ile güçlendirilir (196).

Heterosiklik flavonoid, aromatik halkalar ve serbest bir 3-OH varlığı arasında konjugasyona izin vererek antioksidan aktiviteye katkıda bulunur (197). Genellikle

flavonoidlerin hidroksil gruplarının O-metilasyonu, radikal temizleme kapasitesini düşürür (196).

Flavonoid (flavonoid glikozitler) içindeki oluşum, pozisyon, yapı ve toplam şeker parçalarının sayısı, antioksidan aktivitede önemli rol oynamaktadır. Aglikonlar, kendilerine karşılık gelen glikozitlerden daha güçlü antioksidandır (198). Glikozitler genellikle aglikonlardan zayıf antioksidanlar olmalarına rağmen, biyoyararlanımları bazen bir glikoz kısmı ile artırılır. Diyetle, flavonoid glikozidik kısımlar çoğunlukla 3- veya 7- pozisyonda meydana gelir (199). Artan polimerizasyon derecesi prosiyanidinlerin çeşitli radikal türlerine karşı etkinliğini artırır. Prosiyanidin dimerleri ve trimerleri, daha etkili etanomik flavonoidler olup süperoksit anyonudurlar. Tetramerler, trimerlere kıyasla peroksinitrit ve süperoksit aracılı oksidasyona karşı daha fazla etkinlik gösterirken; heptamerler ve heksamerler, trimerler ve tetramerlere kıyasla daha fazla süperoksit temizleme özelliği sergiler (200).

2.4.3.2. Hepatoprotektif Aktivite

Flavonoidlerin hepatoprotektif aktiviteleri kateşin, apigenin, quercetin, naringenin, rutin ve venoruton gibi çeşitli flavonoidler bildirilmiştir (201). Diyabet gibi farklı kronik hastalıklar hepatik klinik bulguların gelişimine neden olabilir. Diyabetik farelerin karaciğerlerinde glutamat-sistein ligaz katalitik altbirimi (Gclc) ekspresyonu, glutatyon ve ROS düzeylerinin azaldığı bildirilmiştir. Gclc ekspresyonundaki artış, hepatik ROS düzeylerinde ve proapoptotik sinyallemede azalmaya neden olur. Ayrıca, C3G tedavisi hepatik lipid peroksidasyonunu düşürür, proinflamatuvar sitokinlerin salımını engeller ve hepatik steatoz gelişimine karşı korur (202).

Çeşitli klinik araştırmalar, tokluk hissi, iştahsızlık, bulantı ve karın ağrısı gibi hepatobiliyer disfonksiyon ve sindirim şikayetlerinin tedavisinde flavonoidlerin etkinliğini ve güvenilirliğini göstermiştir. *Equisetum arvense*'den izole edilen flavonoidlerin yanı sıra, hirustrin ve avikularinin de HepG2 hücrelerinde kimyasal olarak uyarılan hepatotoksisiteye karşı koruma sağladığı bildirilmiştir (203, 204).

2.4.3.3. Antibakteriyel Aktivite

Flavonoidlerin, mikrobiyal enfeksiyona cevap olarak bitkiler tarafından sentezlendiği bilinmektedir; bu nedenle *in vitro* ortamda çeşitli mikroorganizmalara karşı etkili antimikrobik maddeler olduklarını bulunması şaşırtıcı olmamıştır. Farklı türlerden

flavonoid açısından zengin bitki özütlerinin antibakteriyel etkinliğe sahip olduğu bildirilmiştir (204,205). Apigenin, galangin, flavon ve flavonol glikositleri, izoflavonlar, flavanonlar ve kalkbonlar gibi çeşitli flavonoidlerin güçlü antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (206).

Antibakteriyel flavonoidler, belirli bir etki alanı yerine birden çok hücrenel hedefe sahip olabilir. Bunların moleküler etkilerinden biri, hidrojen bağlama ve hidrofobik etkilerle kovalent bağ oluşumu gibi spesifik olmayan kuvvetler vasıtasıyla proteinlerle kompleks oluşturmaktır. Dolayısıyla, antimikrobiyal eylem şekilleri, mikrobiyal adezinleri, enzimleri, hücre membran taşıma proteinlerini inaktive etme yetenekleri ile ilişkili olabilir. Lipofilik flavonoidler mikrobiyal membranları da bozabilir (207-209).

2.4.3.4. Anti-inflamatuvar Aktivite

İnflamasyon, doku hasarına, mikrobik patojen enfeksiyonuna ve kimyasal tahrişe yanıt olarak oluşan normal bir biyolojik süreçtir. İnflamasyon, bağışıklık hücrelerinin kan damarlarından göçü ve hasar bölgesinde mediatörlerin serbest bırakılması ile başlatılır. Bu işlemi, yabancı patojeni ortadan kaldırmak ve yaralı dokuları onarmak için inflamatuvar hücrelerin toplanması, ROS, RNS ve proinflamatuvar sitokinler salınması izler. Genel olarak, normal inflamasyon hızlıdır ve kendi kendini sınırlar; ancak anormal çözünürlük ve uzun süren inflamasyon çeşitli kronik hastalıklara neden olur (210).

Bağışıklık sistemi diyet, farmakolojik maddeler, çevresel kirleticiler ve doğal olarak oluşan gıda kimyasalları ile değiştirilebilir. Flavonoidlerin belirli üyeleri bağışıklık sisteminin ve inflamatuvar hücrelerin işlevini önemli ölçüde etkiler (211). Hesperidin, apigenin, luteolin ve Quercetin gibi birtakım flavonoidlerin anti-inflamatuvar ve analjezik etkilere sahip olduğu bilinmektedir. Flavonoidler, inflamasyon sürecini özellikle tirozin ve serin-treonin protein kinazlarının üretilmesine kritik olarak dahil olan enzim sistemlerinin işlevini düzenleyerek etkileyebilir (212,213). Kinazların inhibisyonu, enzimler üzerindeki katalitik bölgelerdeki ATP ile flavonoidlerin rekabetçi bir şekilde bağlanmasından kaynaklanmaktadır. Bu enzimler, sinyal iletiminde ve bağışıklık sisteminin hücrelerini içeren hücre aktivasyon süreçlerinde yer alırlar. Flavonoidlerin, büyük miktarda nitrik oksit, prostanoidler, lökotrienler ve bu gibi inflamatuvar sürecin diğer araçlarını üretmekten sorumlu indüklenbilir nitrik oksit

sentaz, siklooksijenaz ve lipooksijenazın izoformlarının ekspresyonunu engelleyebildiği bilinmektedir (214). Flavonoidler, hücre aktivasyonunda yer alan fosfodiesterazları da inhibe eder. Flavonoidin antinflamatuar etkisinin büyük kısmı, dolaşımdaki lökositlerin yaralanma alanlarına yapışmasına aracılık eden protein sitokinlerinin biyosentezi üzerinedir. Bazı flavonoidler, güçlü proinflamatuar sinyal molekülleri olan bir grup prostaglandin üretiminin güçlü inhibitörleridir (215).

Quercetin, *in vitro* olarak uyarılmış IgG, IgM ve IgA izotiplerinin immünoglobülin sekresyonunu inhibe ettiği bulunmuştur (216). 1-10 mM konsantrasyondaki çeşitli flavonoidlerin, platelet yapışmasını, toplanmasını ve salınımını önemli ölçüde inhibe ettiği bildirilmiştir (216). Flavonoidin trombositlere etkisi, araşidonik asit metabolizmasının karbon monoksit ile inhibisyonuyla ilişkilidir (217). Alternatif olarak, bazı flavonoidler, siklik AMP fosfodiesterazın güçlü önleyicileridir ve bu, kısmen trombosit işlevini inhibe etme kabiliyetlerini açıklayabilir (217).

2.4.3.5. Antikanser Aktivitesi

Diyet faktörleri, kanserlerin önlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Flavonoid içeren meyve ve sebzeler, kimyasal kanser önleme ajanları olarak bilinmektedir (218). Flavonol quercetin, iki önemli kaynağı olan soğan ve / veya elma tüketimi, prostat, akciğer, karın ve göğüs kanseri insidansı ile ters orantılıdır. Buna ek olarak, şarap tüketiminin de akciğer, endometriyum, özofagus, mide ve kolon kanseri gelişme riskini düşürdüğü görülmektedir (219).

Flavonoidlerin antikanserojenik etki mekanizmaları aşağıdaki gibidir (220):

1. Mutant p53 proteininin down-regülasyonu,
2. Hücre döngüsü durdurulması,
3. Tirozin kinaz inhibisyonu,
4. Isı şok proteinlerinin inhibisyonu,
5. Östrojen reseptör bağlama kapasitesi,
6. Ras proteinlerinin ekspresyonunun inhibisyonu.

p53 mutasyonları, insanlarda oluşan kanser türlerinde görülen en yaygın genetik anomaliler arasındadır. p53 ekspresyonunun inhibisyonu, kanser hücrelerini, hücre

döngüsünün G2-M fazında tutmaya neden olur. Flavonoidlerin, mutant p53 proteininin ekspresyonunu insan meme kanseri hücre hatlarında neredeyse saptanamayan düzeylere indirgediği bulunmuştur (221). Tirozin kinazlar, büyüme faktörü sinyallerinin nukleusa transdüksiyonunda yer alan hücre zarı içerisinde veya yakınında bulunan bir protein ailesidir. Tirozin kinazların ekspresyonunun hücredeki düzenleyici büyüme kontrolünü geçersiz kılarak bu enzimlerin onkogeneze yer aldıkları düşünülmektedir. Tirozin kinaz aktivitesini inhibe eden ilaçların, konvansiyonel kemoterapi ile sitotoksik yan etki görülmeden olası tümör önleyici ajanlar olduğu düşünülmektedir. Quercetin, insanda faz I denemesinde test edilen ilk tirozin kinaz önleyici bileşiktir (222). Isı şok proteinleri mutant p53 ile bir kompleks oluşturur ve bu da tümör hücrelerinin hücre döngüsünün durdurulmasını sağlar. Isı şok proteinleri, aynı zamanda, farklı vücut stresleri altındaki kanser hücrelerinin hayatta kalmasını sağlar. Flavonoidlerin, meme kanseri, lösemi ve kolon kanseri de dahil olmak üzere birçok habis hücre hattında ısı şok proteinlerinin üretimini inhibe ettiği bilinmektedir (221).

Quercetin'in proliferasyon yapan lenfoid hücrelerde hücre döngüsünü durdurduğu bilinmektedir. Antineoplastik aktivitesine ek olarak, quercetin, *in vitro* olarak çeşitli malign tümör hücre hatları üzerinde büyümeyi önleyici etkiler yapmaktadır. Bunlara P388 lösemi hücreleri, mide kanseri hücreleri (HGC-27, NUGC-2, NKN-7 ve MKN-28), kolon kanseri hücreleri (COLON 320 DM), insan göğüs kanseri hücreleri, insan skuamöz ve gliosarkom hücreleri ve yumurtalık kanser hücreleri örnek verilebilir (221). İnsan meme kanseri hücrelerinde artmış sinyal iletiminin, antiproliferatif bir ajan olan quercetin tarafından belirgin bir şekilde azaltıldığı deneysel olarak kanıtlanmıştır (223).

2.4.3.6. Antiviral Aktivite

Doğal bileşikler, kullanılabilirlikleri ve bilinen az yan etkileri nedeniyle yeni antiviral ilaçların keşfi ve geliştirilmesi için önemli bir kaynaktır. 1940'lardan beri doğal olarak oluşan antiviral aktiviteye sahip flavonoidler bilinmektedir ve çeşitli flavonoidlerin antiviral aktivitesi hakkında birçok çalışma mevcuttur. Antiviral bileşiklerle ilgili çalışmaların çoğu, virüslerin yaşam döngüsü ile ilişkili çeşitli enzimlerin inhibisyonu etrafında dönmektedir. Flavonoidler ile enzim inhibitör aktivitesi arasındaki yapı fonksiyonu ilişkisi gözlemlenmiştir (224). HIV-1, HIV2 ve benzer immün yetmezlik virüsü enfeksiyonlarının selektif inhibisyonunda flavan-3-ol'ün flavonlar ve flavononlardan daha etkili olduğunu göstermiştir (224). *Scutellaria baicalensis*

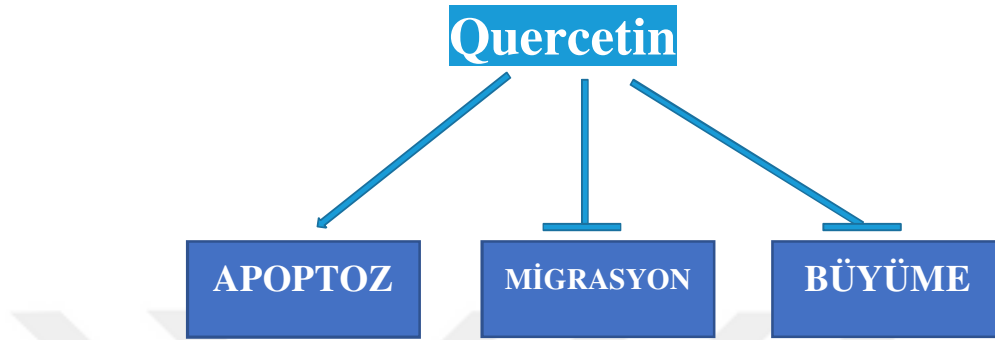
(Lamiaceae) 'den izole edilen bir flavonoid olan baikalin, HIV-1 enfeksiyonunu ve replikasyonunu inhibe eder. Baikalin, robustaflavon ve hinokiflavon gibi diğer flavonoidlerin HIV-1 revers transkriptazını inhibe ettiği de gösterilmiştir (225). Katekinlerin HIV-1'in DNA polimerazlarını inhibe ettiği de bilinmektedir. Dimetil gardenin A ve robinetin gibi flavonoidlerin HIV-1 proteinazı inhibe ettiği bilinmektedir (225). Krisin, akasetin ve apigenin flavonoidlerinin muhtemelen viral transkripsiyonun inhibisyonunu içeren yeni bir mekanizma yoluyla HIV-1 aktivasyonunu önlediği bildirilmiştir (226).

Flavonların ve flavonollerin çeşitli kombinasyonlarının sinerjizm sergilediği gösterilmiştir. Kampferol ve luteolin, herpes simpleks virüsüne (HSV) karşı sinerjik etki göstermektedir. Quercetin, 5-etil-2-dioksiüridin ve asiklovirin HSV ve psödorabies enfeksiyonuna karşı etkilerini güçlendirdiği bildirilmiştir (225). Çalışmalar flavonollerin herpes simpleks virüsüne karşı flavonlardan daha aktif olduğunu göstermiştir (225).

Quercetin, hesperetin, naringin ve daidzeinin DENV-2 (dengue virüs tip-2) enfeksiyonu ve replikasyon siklusunun farklı evrelerinde antidengue virus özellikleri incelenmiş ve quercetin Vero hücrelerinde DENV-2'ye karşı en etkili flavonoid olduğu bulunmuştur (227). Dihidroquercetin, dihidrofisetin, lökosiyanidin, pelargonidin klorit ve kateşin gibi birçok flavonoid HSV, respiratuvar sinsitiyal virüs, poliovirus ve Sindbis virüsü gibi çeşitli virüs türlerine karşı aktivite gösterir (228).

2.4.4. Quercetin

Quercetin, diyetle alınan flavonoidler arasındadır ve çeşitli terapötik özelliklere sahip yeni bir tıbbi biyomolekül olarak giderek ilgi çekmektedir (229). Meyve ve sebze içeren günlük genel bir diyetle, quercetin, alkoller ve şekerlere bağlı konjüge izoformlar olarak bulunur (230). Bu izoformlar gastrointestinal sistemde hidrolize olurlar ve absorbe edilirler; quercetin aglikon ve diğer türevlerine metabolize olur (231). Bilinen flavonoidler arasında quercetin, güçlü reaktif oksijen türlerini yok etme kabiliyeti nedeniyle iyi bir antioksidan aktiviteye sahip olduğu bilinir (232,233). Ayrıca quercetin hücre sinyal yollarını düzenleyerek mutasyona uğramış hücrelerde apoptozu arttırdığı ve böylece kanser gelişiminin inhibisyonuna neden olduğu bildirilmiştir (234,235).

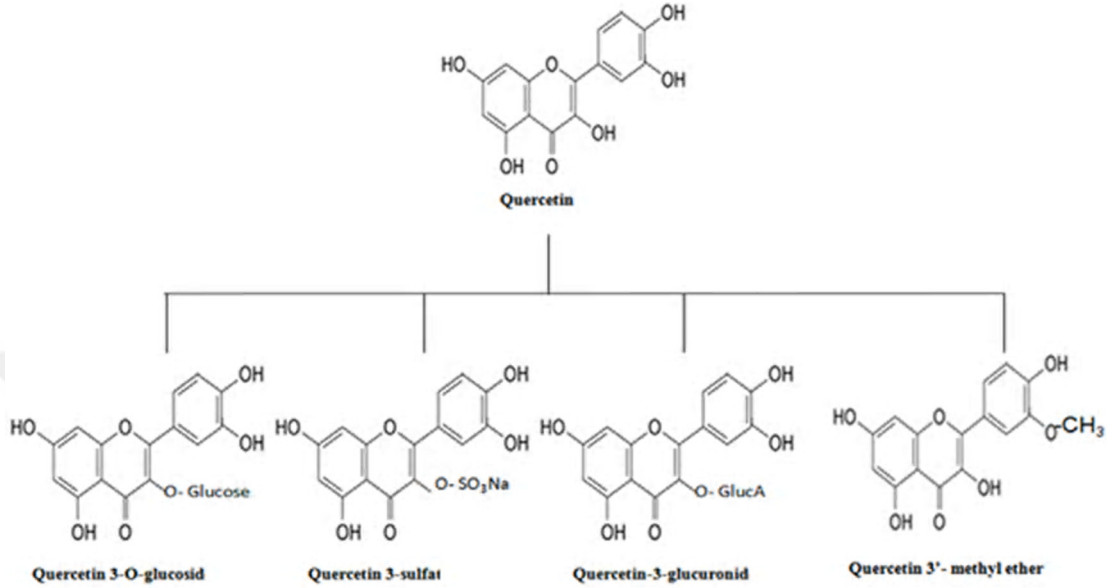


Şekil 2.11. Quercetin tarafından modüle edilen hücresel süreç

2.4.4.1. Quercetin ve Quercetin Türevlerinin Kimyası

Quercetin (3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon), doğal olarak oluşan bir flavonoid olup, bir flavon türevidir (2-fenilkromen-4-on). Biyolojik faaliyetlerinden ve türevlerinin çeşitlendirmesinden sorumlu beş hidroksil grubu içerir (Şekil 2.12). Flavonoidler genellikle piron ya da piron halkalarıyla bağlanmış iki benzen halkasından oluşur. Buna ek olarak, quercetin molekülünün yapısal analizi, 0 ila 5.33 kkal / mol aralığında Gibbs enerjisine sahip 12 konformasyonunun varlığını göstermiştir. Ayrıca quercetin intramoleküler H-bağına sahiptir ve bu bağ, quercetin biyolojik bulunabilirliğini ve taşınmasını etkiler ve aynı zamanda metallerle güçlü karmaşık bağlar oluşturabilme yeteneği sağlar (236). Bu H-bağlarının ikisi karbonil grupları arasında, diğeri ise hidroksil grupları arasındadır. Doğal olarak meydana gelen quercetin, bir oksin transport inhibitörü olarak görev yapar ve bitki embriyolarının çift taraflı büyümesini engeller. Quercetin en yaygın türevleri glikozitler ve eterlerdir. Quercetin O-glikozitler, C-3 karbon hidroksil grubunda O-glikosidik bağlar içerir. Ayrıca, *Ageratina calophylla*'da, glikozilasyon bölgesinde C-6 karbonu olan bir C-glikozid quercetin formu bulunmuştur (237). Kırmızı alga *Acanthophora spicifera* ve üzümde (*Vitis vinefera*) tanımlanan quercetin bir diğeri nadir türevi, quercetin C-3'te bir glikosidik bağlantı vasıtasıyla a-L-fukopiranozil parçasına bağlandığı quercetin 3-O- α -L-fukopiranosittir. Dahası, quercetin glikozitlerin türevleri ayrıca şeker kısımlarına ek olarak açıl ve kükürt sübstitüentleri içerebilir. Quercetin hidroksil gruplarına eter

bağları vasıtasıyla alkoller eklenmesi ile quercetin'in eter formları oluşur. Quercetin, lipofilik olmasına rağmen, quercetin türevleri glikozilasyonu, hidrofilikliğı artırabilirler ve moleküllerin bitkinin tüm bölümlerine taşınmasını sağlarlar (238).



Şekil 2.12. Quercetin ve quercetin türevlerinin yapısı (239)

Yapılan çalışmalar, A halkasında hidroksil grubunun ve B halkasında bir katekol grubunun varlığı ile nitelendirilen quercetin'in antioksidan özelliklerini tanımladı. Bu özellik, quercetin'in vücutta bulunan serbest oksijen türlerini hidrojen veya elektron aktararak veya metal iyonlarını şelatlayarak ortadan kaldırmasını ve böylelikle enzimatik aktiviteleri inhibe etmesini sağlar. Reaktif oksijen türlerinin bu şekilde temizlenmesi iltihaplanmayı azaltır ve hücreleri, sigara ya da aşırı egzersiz nedeniyle oluşan oksidatif strese karşı korur. Quercetin, düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (LDL) oksidasyonunu ve lipid zarı hasarını önleyen, lipid peroksidasyonunun iyi bilinen bir inhibitörüdür. İnsan hücre zarları ve LDL, oksidasyonun zararlı etkilerinden koruyan α - tokoferol (birincil oksidan) içerir. Bu nedenle flavonoidler, hidrojen atomunu bu α - tokoferil radikale bağlayarak lipoproteinlerin oksidasyonunu yavaşlatabilir. Buna ek olarak, aynı zamanda glutatyon seviyesini yükseltir ve serbest radikal oluşumunu engellerler. Quercetin'in antioksidan ve serbest radikal temizleyici özellikleri, potansiyel terapötik geniş çaplı çalışmalarda kullanılabileceğini göstermektedir (239).

2.4.4.2. Quercetin'in Metabolizması, Absorbsiyonu ve Kaynakları

Quercetin esas olarak bitkilerin yenilebilir kısımlarında glikozitler halinde bulunur. Çilek, çay yaprakları, soğan, brokoli ve diğer meyveler ve yapraklı sebzeler de dahil olmak üzere çeşitli bitkilerde bulunur; ancak çoğunlukla *Sophora japonica* L.'den ekstrakte edilir. Ayrıca, kırmızı şarap, siyah çay ve diğer meyve suları da zengin quercetin kaynakları olarak düşünülmektedir (239). Flavonoidlerin, flavonlar, flavanonlar, flavonoller, kateşinler, antosiyaninler ve biflavanları içeren ortalama günlük tüketimi yaklaşık 1 g / gün (quercetin eşdeğerleri) dür. Quercetin açısından zengin meyveleri ve sebzeleri, tüketenler, bir bileşen olarak yaklaşık 200-500 mg / gün quercetin almış olurlar (51). Öte yandan, Japonya ve Avustralya gibi bazı ülkelerde, <5 mg- 40 mg / gün kadar düşük ortalama alımlar da bildirilmektedir (240).

Quercetin'in terapötik etkinliği, oral uygulama ile absorbe edilen, farmakolojik olarak aktif ilaç miktarı biyoyararlanım olarak tanımlanabilir. Quercetin alımını takiben bağırsak bakterileri, glikosidaz aktivitesi gösterirler ve aglikon formundaki quercetin'in salınması için gerekli olan şekeri β -glikozidaz türevlerinden hidrolize ederler. Quercetin aglikon, pasif difüzyon veya organik anyon taşıyan polipeptit (OATP) aracılı absorpsiyonla, mideden veya ince bağırsaktan emilir. Emilen quercetin aglikon daha sonra 3'-metil eter, quercetin 3-O- β -D-glukuronid (Q3GA) ve quercetin-3'-sülfat gibi insan plazmasında farmakolojik olarak aktif O-metil, glukuronid veya sülfat gibi diğer türevlerine dönüştürülür. Quercetin zengin gıdaların alınması, plazmada quercetin türevlerinin konsantrasyonunu mikromolar seviyelere kadar artırır ve quercetin karaciğer ve diğer organlarda metabolize olur (241).

Vücuttaki quercetin metabolizması süreci oldukça hızlıdır ve dolayısıyla aktif quercetin molekülünün dolaşım süresi ve biyoyararlanımı da sınırlıdır. Bu hızlı metabolik işlemden ötürü, quercetin'in *in vitro* gözlemlenen farmakolojik etkisi *in vivo* olarak çok farklı değildir. Ayrıca, quercetin, sudaki çözünürlüğü (yaklaşık 1 ug / mL) düşüktür ve bu da terapötik potansiyelini daha da etkiler. Ek olarak, quercetin'in gastrik ve bağırsak sıvısındaki çözünürlüğünün sırasıyla 5.5 μ g / mL ve 28.9 μ g / mL olduğu rapor edilmiştir (242).

2.4.4.3. Kanser Hücresi Biyolojisi Üzerine Quercetin'in Etkisi

2.4.4.3.1. Hücre Büyümesinin İnhibisyonu

Quercetin'in kanser türlerine karşı hem *in vitro* hem de *in vivo* antiproliferatif etkileri olduğu bilinmektedir. *In vitro* çalışmalar L1210 ve P-388 lösemi hücre hatları, meme kanseri hücreleri, kolon kanseri hücreleri COLON20DM, yumurtalık kanseri hücreleri OVCA 433, karaciğer kanser hücreleri HepG2, epidermoid kanser hücreleri A431 ve gastrik kanser hücreleri üzerine quercetin'in büyümeyi durdurucu etkisinin olduğunu göstermiştir (239). *In vivo*, oral olarak uygulanan quercetin'in pankreas kanseri hücreleri üzerine antiproliferatif etkisi olduğu gözlenmiştir. Quercetin'in etki ettiği incelenen sinyal yollarının bazıları PI3K / Akt, Her-2 / neu, Wnt / β -katenin ve EGFR'dir (236). Quercetin tedavisi ile PI3K / Akt yolunun baskılanması, meme kanseri hücresi HCC1937, SkBr3 hücreleri, karaciğer kanseri hücresi HepG2 ve HL-60 lösemi hücresi gibi hücre hatlarında gösterilmiştir (239). PI3K / Akt yolunu baskılamasının yanı sıra, quercetin, meme kanseri hücrelerinde insan epidermal büyüme faktörü reseptör 2'yi (Her-2 / neu) downregüle edebilir. SW-480 kolon kanseri hücrelerinde quercetin ile düzenlenen Wnt / beta-katenin sinyal yolağının, antitümör etkisi sergilediği gösterilmiştir. Proliferasyon için sinyal yollarını modüle etmenin yanı sıra, quercetin'in büyüme inhibisyonuna yol açabilen normal hücre döngüsü ilerlemesine müdahil olduğu bilinmektedir (242).

2.4.4.3.2. Metastaz İnhibisyonu

Kansere karşı en büyük tehlike, kanserin metastaz yoluyla vücudun bir organından veya bir parçasından diğerine yayılmasıdır. Metastaz, karşılaştıkları çeşitli hücre veya dokulardaki hücre dışı matris proteinlerinin parçalanmasından sorumlu olan matris metalloproteinaz (MMP) enzimlerinin üretimi ile ilgilidir. Bunlar dört tipe ayrılır: stromelisinler, jelatinazlar, kollajenazlar ve membran tipi MMP'lerdir (243). Çalışmalar, MMP'lerin, MMP-9 ve MMP-2 gibi kanser hücrelerinin metastazı için gerekli olduğunu bildirmiştir. Bu nedenle, kanser hücrelerinde MMP'lerin bastırılması metastaz şansını azaltabilir ve kanser tedavisinde yararlı bir araç olabilir. Quercetin'in MMP salınımını inhibe etme potansiyeli çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir. 12-O-tetradekanoil fenol-13-asetat (TPA) ile işleminden geçirilmiş MCF-7 hücrelerinde quercetin'in MMP-9'un aktivasyonunu ve göçünü bastırarak meme kanseri hücrelerinin metastazını önleyebildiğini tespit edilmiştir. Quercetin ayrıca, JB6 P+ fare epidermal hücrelerinde MMP-9'un tümör nekroz faktörü (TNF)- α 'nın upregülasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (244). Quercetin, MMP-9 ile birlikte A431 epidermoid kanser

hücrelerinde ve MiaPaCa-2 pankreatik kanser hücrelerinde MMP-2 salınımını da azaltmıştır.

2.4.4.3.3. Apoptoz İndüksiyonu

Apoptoz çeşitli fizyolojik süreçlerde kritik bir rol oynayan programlanmış hücre ölümüdür (239). Spesifik gen aktiviteleri, hücre apoptozundan sorumlu olduğu bilinen kompleks sinyal yollarını düzenler. Apoptotik sinyalleşmenin düzensizleştirilmesi, kanser ilerlemesine neden olabilen apoptotik kusurlarla sonuçlanır. Kanser tedavisinde en büyük sorun, kanser hücrelerinin kemoterapötik ajanlara direncinin olmasıdır. Bu nedenle, etkin kanser tedavisi için apoptotik sinyal yollarının düzenlenmesini quercetin gibi kemoterapötik ajanlar aracılığıyla kavrayabilmek gerekir. Apoptozdan sorumlu iki yol olabilir: intrinsik (mitokondriyum aracılı) veya ekstrinsik (diğer hücrelerden alınan sinyaller vasıtasıyla). Çalışmalar, quercetin'in hem ekstrinsik hem de intrinsik faktörleri düzenleyerek çeşitli kanser hücrelerinde apoptozu indüklediğini ortaya koymuştur. MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde quercetin'in Bax (pro-apoptotik protein) sentezini artırma eğilimi gösterdiğini ve Bcl-2 sentezini azalttığını göstermiştir. AMP ile aktive protein kinaz (AMPK) aracılı apoptozun indüksiyonu ile birlikte p53'e bağımlı apoptotik hücre ölümü, HT-29 kolon kanseri hücre hattında gözlenmiştir. Aynı zamanda quercetin'in, ERalpha-negatif meme kanseri hücrelerinde p53'e bağımlı apoptotik hücre ölümüne neden olduğunu gösterilmiştir (239).

2.5. APOPTOZ

Apoptoz terimi, hücre ölümünün morfolojik olarak farklı bir biçimini tanımlamak için 1972'de Kerr, Wyllie ve Currie tarafından bir makalede ilk kez kullanılmıştır (245,246).

Apoptoz hücrelerin gelişmesi ve yaşlanması sırasında normal olarak, dokulardaki hücre popülasyonlarını korumak için homeostatik bir mekanizma olarak gerçekleşir. Apoptoz, bağışıklık reaksiyonlarında olduğu gibi hücreler hastalıktan veya zararlı ajanlar tarafından hasar gördüğü zaman savunma mekanizması olarak da görülür (247).

Işık ve elektron mikroskopisi, apoptoz sırasında ortaya çıkan çeşitli morfolojik değişiklikleri tespit etmiştir. Apoptozun erken süreci boyunca, hücre büzülmesi ve piknozis, ışık mikroskopisi ile görülebilir (245). Hücrenin büzülmesi ile hücrelerin boyutu küçülür, sitoplazma yoğun hale gelir ve organeller sıkıca paketlenir. Piknozis kromatin yoğunlaşmasının bir sonucudur ve bu apoptozun en karakteristik özelliğidir.

Hematoksilin ve eozin boyama ile yapılan histolojik incelemede, apoptoz tek tek hücreler veya küçük hücre kümeleri içerir. Apoptotik hücre, koyu eozinofilik sitoplazma ve yoğun mor nükleer kromatin fragmanları bulunan yuvarlak veya oval bir kitle olarak görülür.

Plazma zarının patlamasının ardından karyoheksis ve "tomurcuklanma" adı verilen bir süreç boyunca hücre parçalarının apoptotik cisimlere ayrılması meydana gelir. Apoptotik cisimler, nükleer fragmanın bulunduğu veya bulunmadığı sıkıca paketlenmiş organellerin bulunduğu sitoplazmadan oluşur. Organel bütünlük muhafaza edilmekte ve tüm organeller sağlam bir plazma membranı içine alınmaktadır. Bu cisimler daha sonra makrofajlar, parankimal hücreler veya neoplastik hücreler tarafından fagosite edilir ve fagolizozomlar içinde bozunur (247).

2.5.1. Ekstrinsik (Dış) Yolak

Apoptozu başlatan dış sinyal yolları, transmembran reseptör aracılı etkileşimleri içerir (Şekil 2.13). Bunlar, TNF reseptör gen süper ailesinin üyesi olan ölüm reseptörleridir. Bugüne kadar en iyi tanımlanmış ligandlar ve bunlara karşılık gelen ölüm reseptörleri FasL / FasR, TNF-a / TNFR1, Apo3L / DR3, Apo2L / DR4 ve Apo2L / DR5'dir (247).

Apoptozun ekstrinsik fazını tanımlayan olayların dizilimi, FasL / FasR ve TNF- α / TNFR1 modelleriyle en iyi şekilde karakterize edilir. Bu modellerde reseptörlerin kümelenmesi ve homolog trimerik ligand ile bağlanması vardır. Fas ligandının Fas reseptörüne bağlanması, adaptör proteinin FADD'a bağlanmasına ve TNF ligandının TNF reseptörüne bağlanmasına yol açar ve TRADD bağdaştırıcı proteininin birleştirilmesi sağlanır. FADD, ölüm efektör bölgesinin dimerizasyonu yoluyla prokaspaz-8 ile ilişkilendirilir. Bu noktada, ölüme neden olan bir sinyalleme kompleksi oluşur ve bunun sonucunda prokaspaz-8'in otomatik katalitik aktivasyonu meydana gelir (247).

Kaspaz-8 aktive edildiğinde, apoptoz tetiklenir. Ölümle resmedilen apoptoz, c-FLIP adı verilen, FADD'a ve kaspaz-8'e bağlanarak ve onları etkisiz hale getiren bir protein ile inhibe edilebilir (247). Potansiyel apoptoz düzenlenmesinin başka bir noktası, Toso adı verilen, kaspaz-8 işleminin inhibisyonu yoluyla T hücrelerinde Fas kaynaklı apoptozu bloke ettiği gösterilen bir proteini içerir (248).

2.5.2. İntrensik (İç) Yolak

Apoptozu başlatan intrinsik sinyal yolları, hücre içindeki hedeflere doğrudan etki eden, hücre içi sinyaller üreten, reseptör aracılı olmayan çeşitli uyarılar dizisini içerir. İç sinyal yolağını başlatan uyarılar, pozitif veya negatif bir şekilde hareket edebilen hücre içi sinyaller üretirler. Negatif sinyaller, bazı ölüm faktörlerinin, hormonların ve sitokinlerin yokluğunu içerir ve bu da ölüm programlarının bastırılmamasına ve dolayısıyla apoptozu tetiklemesine neden olabilir. Başka bir deyişle, faktörlerin geri çekilmesi, apoptotik supresyonun kaybedilmesi ve daha sonra apoptozun aktive edilmesi söz konusudur. Pozitif şekilde hareket eden diğer uyarılar radyasyon, toksinler, hipoksi, hipertermi, viral enfeksiyonlar ve serbest radikallerdir; ancak bunlarla sınırlı değildir (247).

Tüm bu uyarılar, mitokondriyal membranda porların açılmasına, mitokondriyal transmembran potansiyelinin kaybedilmesine ve intermembran boşluğundan normalde salıverilmiş pro-apoptotik proteinlerin iki ana grubunun serbest bırakılmasına neden olan iç mitokondriyal membrandaki değişikliklere neden olur. Pro-apoptotik proteinlerin birinci grubu; sitokrom c, Smac / DIABLO ve serin proteaz HtrA2 / Omi'den oluşur. Bu proteinler kaspaz bağımlı mitokondriyal yolağı aktive eder. Sitokrom c, bir "apoptozom" oluşturan Apaf-1'i ve prokaspaz-9'u bağlar ve aktive eder (249).

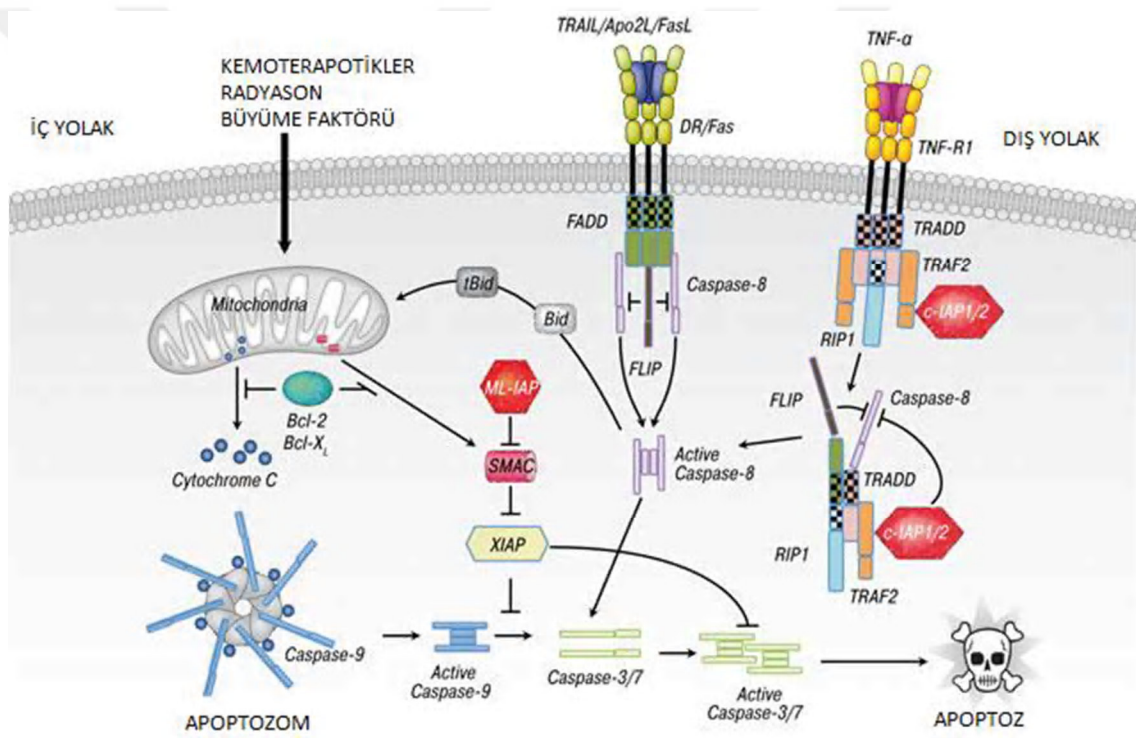
Prokaspaz-9'un aktive olması, kaspaz-9 aktivasyonuna yol açar. Smac / DIABLO ve HtrA2 / Omi'nin apoptoz inhibitör proteinlerinin aktivitesini inhibe ederek apoptozu teşvik ettiği bildirilmiştir (250).

Apoptoz sırasında pro-apoptotik proteinlerin ikinci grubu, AIF, endonükleaz G ve CAD, mitokondriyumdan salınır. AIF, nükleusa transloke olur ve DNA'nın parçalanmasına ve çevresel nükleer kromatin yoğunlaşmasına neden olur. Nükleer kromatin yoğunlaşmasının bu erken şekli "evre I" olarak adlandırılır (247).

Endonükleaz G aynı zamanda nükleusa transloke olarak oligonükleozomal DNA fragmanları üretmek üzere nükleer kromatini parçalamaktadır. AIF ve endonükleaz G'nin her ikisi de kaspazdan bağımsız bir şekilde çalışırlar. CAD, daha sonra mitokondriyumdan salınır ve kaspaz-3 ile bölünmeden sonra oligonükleozomal DNA parçalanmasına ve daha belirgin ve gelişmiş bir kromatin yoğunlaşmasına yol açan

çekirdeğe transloke olur. Daha sonra ve daha belirgin olan bu kromatin yoğunlaşmasına "evre II" denir (247).

Bu apoptotik mitokondriyal olayların kontrolü ve düzenlenmesi, Bcl-2 familyası proteinlerinin üyeleri vasıtasıyla meydana gelmektedir. Tümör süpresör protein p53, proteinlerin Bcl-2 ailesinin regülasyonunda kritik bir role sahiptir. Proteinlerin Bcl-2 ailesi mitokondriyal membran geçirgenliğini yönetir ve pro-apoptotik veya antiapoptotik olabilir. Bazı anti-apoptotik proteinler arasında Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w, BAG bulunur ve bazı pro-apoptotik proteinler arasında Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik ve Blk yer alır.



Şekil 2.13. Apoptozun iç ve dış sinyal yolları (251)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez projesinin hücre kültürü aşamaları Erciyes Üniversitesi Betül-Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Merkezi'nde; immunfenotiplendirme analizleri Erciyes Üniversitesi Mehmet Kemal DEDEMAN Hematoloji-Onkoloji Hastanesi flow-sitometri laboratuvarında gerçekleştirildi. Sitotoksite analizleri Abdullah Gül Üniversitesi Yaşam ve Doğa Bilimleri Fakültesi Hücre Kültürü (Kanser Araştırma) Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

3.1.Kullanılan Cihazlar

CO₂ İnkübatörü (Panasonic, MCO-170AICUVH)

Santrifüj (Hettich Zentrifugen, Rotina 380 R)

Laminar hava akışlı kabin (ADS)

Inverted Mikroskop (Leica)

4 °C Buzdolabı (Siemens)

-20 °C Dondurucu (Panasonic)

-80 °C Dondurucu (Panasonic)

Akım Sitometri Cihazı (Beckman Coulter, Inc.)

MACS manyetik hücre ayırıcı (Miltenyi Biotec)

Vorteks (Heidolph)

Pipetör (Gilson)

pH metre (Mettler Toledo)

3.2. Kullanılan Sarf Malzemeler

Steril pipetler (NEST)

Filtreli kapaklı 25 cm² Flask (Greiner, 690175)

Filtreli kapaklı 75 cm² Flask (Greiner, 658175)

96 kuyucuklu pleyt (NEST, 701011)

6 kuyucuklu pleyt (NEST, 703011)

Pipet uçları (İsolab)

15 ml vida kapaklı konik tüp (Falkon) (NEST, 601051)

50 ml vida kapaklı konik tüp (Falkon) (NEST, 602051)

1,5 ml mikrosantrifüj tüpleri (Greiner, 616201)

2 ml Kriyovial (NEST, 607101)

Clinmacs MS kolonu (MACS, 130-091-506)

Mr. Frosty™ hücre dondurma konteyneri (Thermo-Scientific, 5100-0001)

0.30 µm şırınga filtresi (Merck, PHWP02500)

3.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

RPMI-1640 Hücre Besiyeri Ortamı (Gibco, 21875-034)

Fetal Dana Serumu (Gibco, 10270)

Penisilin / Streptomisin (Gibco, 15140-122)

DMSO (Sigma Aldrich, 276855)

Steril DPBS (Ca⁺² ve Mg⁺² içermeyen) (Gibco, 14190-094)

EDTA (Sigma Aldrich, E9884)

Anneksin-V-FITC Kiti (ROCHE, 11 858 777 001)

DAPI (Beckman Coulter, B30437)

CD34 (Beckman Coulter, A21691)

CD38 (Beckman Coulter, A86049)

İzoFlow (Beckman Coulter, 41116015)

JC-1 Mitokondriyal Membran Potansiyel Test Kiti (CAYMAN,10009172)

Hücre Proliferasyon Kiti (XTT) (ROCHE, 11465015001)

Kaspaz-3 Kolorimetrik Enzim Kiti (BioVision Research Products, K106)

Quercetin (SIGMA ALDRICH, Q4951-100G)

CD38 MikroBead Kiti (MACS, 130-092-271)

Direkt CD34 Projenitör Hücre İzolasyon Kiti (MACS, 130-046-705)

BSA Stok Solüsyonu (MACS, 130-091-376)

3.4. Hücre Kültürü

Kanser hücre hatları, laboratuvar çalışmalarında ve in vitro kanser araştırmalarında model olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Kanser hücre hattı kullanımının avantajı sınırlı koşullarda bile sınırsız çoğalabilme yeteneğinde olmalarıdır. Ayrıca, yüksek derecede homojenite gösterirler ve donmuş stoklardan kolaylıkla kullanılabilir hale getirilebilirler.

KML kök hücreleri ise kronik miyeloid lösemi hücrelerinin yaklaşık 1/10.000 kadarı olan küçük bir alt popülasyonudur (CD34+/CD38- hücreleri) ve hematopoietik malignensileri başlatabilirler.

Süspansiyon kültür özelliği gösteren K562 ve CD34+/CD38- lösemik kök hücreleri kültür kabına yapışma göstermezler. Süspansiyon halde bulunan kültür içindeki hücreler oval ve yuvarlak görünümlüdürler.

Bu çalışmada CD34+/CD38- KML kök hücrelerini elde etmek amacıyla Amerikan Hücre Kültür Koleksiyonu (ATCC, Manassas, VA, ABD) firmasından, donmuş hücre hattı olarak satın alınan K562 (ATCC® CCL-243™) hücre hattı kullanıldı.

3.4.1. Hücrelerin Pasajlanması

Hücrelerin (K562 ve CD34+/CD38- KML Kök Hücreleri) pasajlanabilmesi için hücrelerin %90 konfluense ulaşmaları beklenildi. Hücreler, 25 cm² ve 75 cm²'lik hücre kültür flasklarında çoğaltıldı ve tüm işlemler, biyogüvenlik sınıf 2 kabin içerisinde gerçekleştirildi. Kültürler günlük olarak kontrol edildi, besiyerinin rengi ve morfolojisi ile hücrelerin yoğunluğu gözlemlendi.

1. Hücre süspansiyonu 50 ml falkon tüpe alındı.

2. 350xg'de 5 dk santrifüj edildi.
3. Santrifüjden sonra süpernatant atıldı.
4. Hücre pelletini serumdan arındırmak için 2 kere 1X DPBS ile yıkama yapıldı.
5. 350xg'de 5 dk santrifüj edildi.
6. Hücre pelleti %10 FBS, %1 penisillin/streptomisin içeren RPMI-1640 besiyeri ile resüspanse edildi.
7. Thoma lamında sayım yapıldı; eşit miktarda hücre iki tane flaska transfer edildi.
8. Her iki flaskın üzerine hücre süspansiyonu hacmi kadar yeni besiyeri eklendi.
9. Pasajın ardından hücre morfolojisi inverted mikroskopta incelendi.
10. Flasklar 37 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatöre konuldu.

3.4.2. Hemositometre ile Hücre Sayımı

Hücre süspansiyonu tripan mavisi gibi bir canlılık boyası ile seyreltiğinde, canlı hücreler boyayı metabolize edip hücre dışına attıklarından beyaz, küçük ve yuvarlak olarak görünürler. Ölü hücreler ise membranları boyaya geçirgen olduğundan büyük ve koyu mavi hale gelirler. Bu özellikler doğrultusunda hücreler, Thoma lamı ve inverted mikroskop kullanılarak canlılık ve çoğalma yönünden değerlendirildi.

1. Hücreler 1X DPBS içinde hazırlanmış %0,5 tripan mavisi ile 1:1 (v/v) oranında karıştırılarak 1 dakika bekletildi.
2. Hazırlanan karışım lam üzerindeki uygun bölgelere 10µl tripan mavisi ile 10µl hücre olacak şekilde uygulandı.
3. Ardından hücreler inverted mikroskop altında sayıldı ve kültürün bir milimetresindeki canlı hücre sayısı aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{Canlı hücre sayısı/ml} = N \times 10^4 \times 2$$

N=lam üzerindeki sayma alanındaki hücre sayısı

3.4.3. Hücrelerin Dondurulması

Daha ileri çalışmalar için gerekli olabileceği düşünüldüğünden ve hücrelerin canlılığının devam etmesi ve hücre hatlarının devamlılığının korunması amacı ile elde edilen CD34+/CD38- KML kök hücrelerinin yarısı ilk pasajlamada donduruldu.

1. Flasktaki dondurulmak istenen hücrelerin tamamı 50 ml'lik falkon tüp içine alındı.
- 2) Daha sonra 350xg'de 5 dk santrifüj edildi.
- 3) Süpernatant atıldıktan sonra pellet, 5 ml 1X DPBS ile resüspanse edildi.
- 4) Tekrar 350xg'de 5 dk santrifüj edildi.
- 5) Santrifüj devam ederken kriyovialler Mr. Frosty hücre dondurma konteyneri içine konuldu.
- 6) Santrifüjden sonra süpernatant atıldı, falkon buz üzerine alındı.
- 7) Pellet, %70 FBS, %20 RPMI-1640 ve %10 DMSO içeren hücre dondurma mediumu ile resüspanse edildi.
- 8) Hücre süspansiyonundan 1,5 ml her bir kriyovial içine alındı ve 2 saat -20°C'de, bir gece -80°C'de bekletildikten sonra -196°C'deki azot tankına uzun süre saklanmak üzere aktarıldı.

3.4.4. Hücrelerin Çözülmesi

Daha önce dondurulmuş olan her iki hücre hattının bulunduğu (K562 ve CD34+/CD38- KML kök hücreleri) kriyoviyaller 37 °C'deki su banyosunda, kriyovial içinde küçük bir buz parçası kalacak şekilde çözüldü.

- 2) Kriyoviyalin içindeki hücre süspansiyonu besiyeri içeren falkon tüpe yavaşça aktarıldı.
- 3) Falkon tüp, 350xg'de 10 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı.
- 4) Pellete 1 ml medyum eklenerek hücrelerin iyice çözünmeleri sağlandıktan sonra üzerine besiyeri eklenerek daha önce tarif edildiği gibi hazırlanan RPMI-1640 besiyerinde flaska alınarak tekrar çoğaltıldı.

3.4.5. Akım Sitometrik Analiz

Bu çalışmada akım sitometrik analiz ile, K562 ve CD34+/CD38- KML kök hücrelerinin Anneksin-V-FITC ve DAPI ile canlılıklarının ve apoptozun belirlenmesinin yanı sıra; CD34+/CD38- KML kök hücrelerinin izolasyondan sonra immunfenotiplendirmesi yapıldı.

3.4.5.1. Hücre Ölümünün Anneksin-V-FITC / Propidyum İyodür ile Belirlenmesi

Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde membran lipidlerinden biri olan fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Eğer hücre apoptoza giderse normalde iç yüzde yerleşmiş olan PS molekülleri hücre zarının dış yüzüne transloke olurlar. Bu yer değiştirme hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı apoptotik hücre ölümünün erken dönemlerinde meydana gelir. AnneksinV, hücrenin dış yüzeyine transloke olan fosfatidilserine bağlanabilen bir protein olduğu için, floresan bir madde (örn. FITC) ile işaretlenerek apoptotik hücre görünür hale getirilebilir.

Anneksin-V-FITC kompleksinin K562 ve KML kök hücrelerinin yüzeyindeki fosfatidilserine bağlanma oranı flow sitometri ile ölçüldü. Nekrotik hücrelerin yüzeylerinde de Anneksin-V bağlanması görülebildiği için ikinci boya olarak propidyum iyodür eklendi, akım sitometri cihazı kullanılarak sonuçlar değerlendirildi.

Anneksin-V Boyama Solüsyonunun Hazırlanması:

2 µl Anneksin-V-FITC ve 100 µl inkübasyon solüsyonu eklendi; vortekslendi. 2 µl PI eklendi.

1. Cihazın kompenzasyon ayarlarını yapabilmek için bir tane kontrol tüpü hazırlandı, örnek tüpü ile aynı işlemler uygulandı (monoklonal antikor eklenmesi hariç).
2. Test tüplerine 1×10^6 hücre konuldu.
3. Tüpler 2000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.
4. Süpernatant atıldı, pellet 2 kere 1X DPBS ile yıkandı.
5. Santrifüjden sonra süpernatant atıldı, pellet 500 µl izoFlow ile resüspanse edildi.

6. Örnek tüpüne 5 µl CD34-PC7 monoklonal antikorunu, 3 µl CD38-APC monoklonal antikorunu 100 µl Anneksin-V boyama solüsyonu eklendi, vortekslendi. Kontrol tüpüne monoklonal antikor ve Anneksin-V boyama solüsyonu konulmadı.

7. Her iki tüp de 20 dk oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildi.

8. Önce kontrol tüpü akım sitometri cihazından ~ 300 hücre/sn hızda örnek geçirilerek okutuldu; elde edilen değerlere göre cihazın kompenzasyon ayarları yapıldı. Daha sonra örnek tüpündeki ~ 50.000 hücre cihazdan geçirilerek okuma yapıldı. Hücrelerin boyutu, granülitesi ve floresans ışımaları ölçüldü; canlı ve apoptotik hücre yüzdeleri belirlendi.

3.4.5.2. Hücre Canlılığının DAPI ile Belirlenmesi

4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), çift iplikli DNA'ya bağlanan ve DNA molekülündeki küçük olukta bulunan AT kümeleri ile ilişkili görünen, mavi floresan veren bir nükleik asit boyasıdır. DAPI, 358 nm'de maksimum uyarım ve 461 nm'de maksimum bir emisyonu sahiptir. DNA ile bağlandığında yaklaşık 20 kat fazla flüoresans verir. DAPI'nin spektral özellikleri, ultraviyole veya mor renkli bir lazerle donatılmış bir akım sitometre cihazında, onu hücre canlılığını saptamaya çok uygun hale getirir. DAPI geçirimsiz bir DNA boyasıdır; bu nedenle canlı hücrelerin plazma membranlarından büyük oranda geçemez. Önerilen koşullar altında, ölü hücreler, mor renkli bir lazerle uyarıldığında 425-475 nm dalga boyu aralığında tespit edildiğinde parlak bir flüoresans verirler.

K562 hücrelerinden kök hücre izolasyonu yapılmadan önce hücrelerin canlılıklarını belirlemek amacıyla ile DAPI ile boyama yapıldı ve sonuçlar akım sitometri cihazında değerlendirildi.

1. Cihazın kompenzasyon ayarlarını yapabilmek için bir tane kontrol tüpü hazırlandı, örnek tüpü ile aynı işlemler uygulandı (monoklonal antikor eklenmesi hariç).

2. Test tüplerine 1×10^6 hücre konuldu.

3. Tüpler 2000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.

4. Süpernatant atıldı, pellet 2 kere 1X DPBS ile yıkandı.

5. Santrifüjden sonra süpernatant atıldı, pellet 500 µl izoFlow ile resüspanse edildi.

6. Örnek tüpüne 5 µl CD34-PC7 monoklonal antikorunu, 3 µl CD38-APC monoklonal antikorunu ve 1 µl DAPI eklendi, vortekslendi. Kontrol tüpüne monoklonal antikor ve Anneksin-V boyama solüsyonu konulmadı.

7. Her iki tüp de 10 dk oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildi.

8. Önce kontrol tüpü akım sitometri cihazından ~ 300 hücre/sn hızda örnek geçirilerek okutuldu; elde edilen değerlere göre cihazın kompenzasyon ayarları yapıldı. Daha sonra örnek tüpündeki ~ 100.000 hücre cihazdan geçirilerek okuma yapıldı. Hücrelerin boyutu, granülitesi ve floresans ışımaları ölçüldü; canlı ve apoptotik hücre yüzdeleri belirlendi.

3.4.6. Manyetik Partiküller ile Hücre Ayrılması

MACS (Manyetik ile aktive edilmiş hücre ayırımı) yöntemi (Resim 3.1) ile CD34+/CD38- KML kök hücreleri izole edildi. K562 hücre hattından sırasıyla ‘‘CD38 MikroBead’’ ve ‘‘CD34 MikroBead’’ kitleri kullanılarak CD38-/CD34- ve CD38-/CD34+ hücre fraksiyonları elde edildi. Önce negatif seçim ile CD38- hücreler elde edildi; daha sonra pozitif seçimle CD34+ hücreler elde edilerek CD34+/CD38- KML kök hücre subpopülasyonu elde edildi. Yöntem üretici firmanın belirttiği şekilde uygulandı.

3.4.6.1. CD38- Hücrelerin Ayrılması

K562 hücre hattı kullanılarak ‘‘CD38 MikroBead’’ kit kullanılarak CD38 negatif hücre ayırımı gerçekleştirilmiştir (Resim 3.2).

MACS Tampon Çözeltilsinin Hazırlanması:

MACS BSA Stok solüsyonu 1:20 oranında dilüe edildi. 2,5 ml BSA stok solüsyonu, 47,5 ml 1X DPBS ve 200 µl 0,5M EDTA karıştırıldı. Ph metrede ölçüm yapıldı, solüsyon Ph 7.45 olarak saptandı. Hazırlanan solüsyon 0.30 µm’lik şırınga filtresinden geçirildi.

1. Tüm işlemler laminar akışlı biyogüvenlik seviye 2 kabin içerisinde gerçekleştirildi.

2. Log fazındaki 1×10^7 K562 lösemi hücresi kullanıldı.

3. Hücre süspansiyonu 300xg’de 10 dk santrifüj edildi, süpernatant atıldı.

4. 80 µl MACS tampon çözelti ile pellet resüspanse edildi.
5. 1×10^7 hücre için 20 µl CD38-Biotin antikoruna eklendi, pipetaj yapıldı.
6. 10 dk $+4^\circ\text{C}$ 'de inkübe edildi.
7. 2 ml MACS tampon çözeltisi eklenerek hücreler yıkandı. $300 \times g$ 'de 10dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
8. Pellet 80 µl MACS tampon çözelti ile resüspanse edilip 1×10^7 hücre için 20 µl Antibiotin MicroBeads eklendi.
9. Pipetaj yapıp, 15 dk $+4^\circ\text{C}$ 'de inkübe edildi.
10. 2 ml MACS tampon çözeltisi eklenerek hücreler yıkandı. $300 \times g$ 'de 10dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
11. Pellet 500 µl MACS tampon çözelti ile resüspanse edildi.
12. Kolondan 1 ml MACS tampon çözeltisi geçirildi.
13. Hücre süspansiyonu kolondan geçirildi. Bu aşamada işaretlenmemiş hücreler (CD38-) kolona tutunmadan akıp 15 ml'lik falkona toplandı.
14. 3 kere 500 µl MACS tampon çözelti ile kolon yıkandı. Bu aşamada elde edilen CD38- hücreler CD34+ hücreleri seçmek üzere ayrıldı.
15. Kolon içinde manyetik alanda tutulu bulunan CD38+ hücreler kolon üzerine takılan piston yardımı ile basınç uygulanarak kolondan aşağı itildi.

3.4.6.2. CD34+ Hücrelerin Ayrılması

CD38- hücreler ayrıldıktan sonra "CD34 MikroBead" kiti kullanılarak pozitif seçimle KML kök hücreleri elde edildi.

1. CD38- hücre süspansiyonu $300 \times g$ 'de 10dk santrifüj edildi, süpernatant atıldı.
2. 300 µl MACS tampon çözelti ile pellet resüspanse edildi.
3. 100 µl FcR Blocking Reagent eklendi.
4. 100 µl CD34 MicroBeads eklendi, iyice karıştırıldı.
5. 30 dk 4°C 'de inkübe edildi.

6. 7 ml MACS tampon çözelti ile hücreler yıkandı ve 300xg'de 10dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
7. 500 µl MACS tampon çözelti ile pellet resüspanse edildi.
8. Kolondan 1 ml MACS tampon çözelti geçirildi.
9. Hücre süspansiyonu kolona uygulandı ve işaretlenmemiş CD34-/CD38- hücreler kolondan akararak 15 ml'lik falkon tüpe toplandı.
3. 3 kere 500 µl MACS tampon çözeltisi ile kolon yıkandı.
4. Kolonda manyetik alanda bulunan CD34+/CD38- hücreler kolon üzerine takılan piston yardımıyla basınçla kolondan alındı.
5. Elde edilen hücreler 25 cm²'lik flaska konuldu. Üzerlerine besiyeri eklenerek daha sonra immünofenotiplendirme yapmak için inkübatöre kaldırıldı.

3.4.7. Quercetin'in KML Kök Hücreleri Üzerine olan Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi

Tetrazolyum tuzları, histokimyasal lokalizasyon çalışmaları ve hücre biyolojisi deneylerinde tespit reaktifleri olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. XTT, normalde renksiz veya hafif sarı halde bulunan bir bileşiktir; hücresel efektörler ile redüklendiğinde parlak turuncu renk verir. İkinci nesil bir tetrazolyum boya olan XTT, hücre proliferasyonu, sitotoksisite ve apoptoz testlerinde etkili bir şekilde kullanılmaktadır.

Quercetin'in KML kök hücreleri üzerine olan sitotoksik etkisi, XTT hücre proliferasyon testi ile belirlendi.

3.4.7.1. Quercetin'in Hazırlanması

Quercetin DMSO içinde çözülerek 500 mM'lık bir stok hazırlandı. Bu stok 0.3 µM filtreden geçirildi. Daha sonra 500 mM'lık stoktan 500µM'lık ikinci bir stok hazırlandı. Bu stok RPMI-1640 besiyeri ile sulandırıldı. Hücrelere uygulanacak quercetin konsantrasyonları uygulanırken ikinci stok kullanıldı.

1. KML kök hücreleri 96-kuyucuklu pleytin her bir kuyucuğunda 100 µl besiyerinde 10.000 hücre olacak şekilde ekildi.

2. Hücrelerin üzerine 100'er μ l'lik hacimlerde artan konsantrasyonlarda (1-40 nM) quercetin eklendi.
3. 37 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde 48 saat boyunca inkübe edildi.
4. İnkübasyon sonunda her bir kuyucuğa 20 μ l XTT reaktifi eklendi ve 4 saat inkübe edildi.
5. 96-kuyucuklu pleytde oluşan formazan yoğunlukları, spektrofotometrede dalga boyu 450 nm'ye ayarlanarak ölçüldü.
6. Elde edilen absorbans değerlerine göre hücre canlılık grafiği oluşturuldu.
7. Quercetin KML kök hücrelerinin %50'sini öldürdüğü konsantrasyonu (IC50 değeri) hesaplandı.

3.4.8. Quercetin KML Kök Hücrelerinde Kaspaz-3 Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

ICE ailesindeki proteazların / kaspazların aktivasyonu, memeli hücrelerinde apoptozu başlatır. Kaspaz-3 / CPP32 Kolorimetrik Test Kiti, DEVD sekansını tanımlayan kaspaz aktivitesini test etmek için basit ve kullanışlı bir yöntem sağlar. Test, etiketli alt katman DEVD-pNA'dan ayrıldıktan sonra kromofor p-nitroanilini (pNA) spektrofotometrik tespitine dayanmaktadır. pNA ışık emisyonu, bir spektrofotometre veya bir mikrotiter plak okuyucu kullanılarak 400 veya 405 nm'de nicelendirilebilir. Bir apoptotik numunedeki pNA absorpsiyonunun bir kontrolle karşılaştırılması, CPP32 aktivitesindeki kat artışının belirlenmesine izin verir.

Artan dozlarda (1-20nM) quercetine maruz bırakılan KML kök hücrelerinin kaspaz-3 enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler, kaspaz-3 kolorimetrik enzim kiti ile belirlendi.

1. KML kök hücreleri 6 kuyucuklu pleytin her bir kuyucuğunda 2 ml besiyerinde 1×10^6 hücre olacak şekilde ekildi.
2. Hücrelerin üzerine artan konsantrasyonlarda quercetin (1-20nM) eklendi.
3. 37 °C'de %5 CO₂'li inkübatörde 48 saat boyunca inkübe edildi.
4. Hücreler ayrı ayrı falkon tüplere konuldu ve 1000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi, süpernatant atıldı.

5. Hücre pelleti 50 µl önceden soğutulmuş hücre lizis tamponu ile resüspanse edildi ve 10 dk buzda inkübe edildi.
6. 10.000 rpm'de 1 dk santrifüjden sonra ve süpernatant (sitozolik ekstrakt) temiz bir deney tüpüne konularak üzerine 200 µl hücre lizis tamponu eklendi.
7. Her bir örnek için ikişer kuyucuk olmak üzere, 96 kuyucuklu pleyte 50 µl örnek, 50 µl reaksiyon solüsyonu ve 5 µl DEVD-pNA konduktan sonra 2 saat 37 °C'de %5 CO₂'li inkübatörde bekletildi.
8. İnkübasyon sonunda spektrofotometrede 405 nm dalga boyu altında ölçüm yapıldı. Her bir örnek için ölçülen bu değerler, toplam protein miktarlarına oranlanarak kaspaz-3 enzim aktivitesindeki değişimler belirlendi.

3.4.9. Quercetin'in KML Kök Hücrelerinde Mitokondri Zar Potansiyeli Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi:

Mitokondriyal zar potansiyeli ($\Delta\psi_M$), hücre sağlığının bir göstergesi olarak kullanılan mitokondriyal fonksiyonun önemli bir parametresidir. JC-1, lipofilik ve kationik bir boya olup seçici olarak mitokondriye girebilir ve membran potansiyeli arttıkça rengi yeşil renkten kırmızıya dönüşür. Yüksek mitokondriyal zar potansiyeli ($\Delta\psi_M$) olan sağlıklı hücrelerde, JC-1 kendiliğinden yoğun kırmızı flüoresansı olan ve J-agregatları olarak bilinen kompleksleri oluşturur. Öte yandan, düşük mitokondriyal zar potansiyeli ($\Delta\psi_M$) olan apoptotik veya sağlıklı hücrelerde, JC-1 monomerik formda kalır ve sadece yeşil flüoresan gösterir.

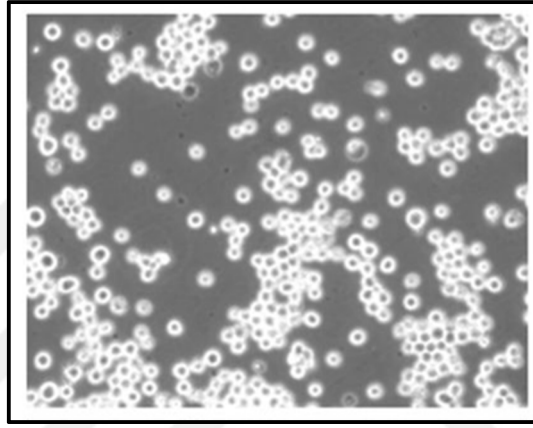
Artan dozlarda (1-20nM) quercetine maruz bırakılan KML kök hücrelerinin mitokondri zar potansiyelinde gerçekleşen değişimler, JC-1 mitokondri zar potansiyeli ölçüm kiti ile belirlendi.

1. KML kök hücreleri 6 kuyucuklu pleytin her bir kuyucuğunda 2 ml besiyerinde 1×10^6 hücre olacak şekilde ekildi ve hücreler artan konsantrasyonlarda (1-20nM) quercetin ile muamele edildi.
2. 37 °C'de %5 CO₂'li inkübatörde 48 saat boyunca inkübe edildi.
3. İnkübasyon süresi tamamlandığında hücreler toplanarak ayrı ayrı falkon tüplerine alındı ve 1000 rpm'de 10 dk boyunca santrifüj edildi, süpernatant atıldı.

4. Hücre pelleti 300 µl besiyeri ile resüspanse edildi.
5. Hücrelerin üzerine 30 µl JC-1 boyası eklendi.
6. 37 °C'de %5 CO₂'li inkübatörde 30 dk bekletildi.
7. Süre sonunda, hücreler 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant atılarak hücre pelleti 200 µl test tampon solüsyonu ile resüspanse edildi.
8. Hücreler 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant atılarak hücre pelleti 320 µl test tampon solüsyonu ile resüspanse edildi.
9. 96-kuyucuklu siyah pleyte her bir örnekten 100'er µl olacak şekilde üçlü olarak ekim yapıldı
10. Hücrelerin 485/560 (yeşil/kırmızı floresanda verdiği dalga boyu) verdikleri değerler oranlanarak mitokondri zar potansiyelindeki değişimler belirlendi.

4. BULGULAR

K562 hücre hattından manyetik partiküller ile hücre ayrımı (MACS) ile KML kök hücre ayrımı yapılmadan önce hücreler çözdürülüp pasajlandı (Resim 4.1).



Resim 4.1. Kronik miyeloid lösemi (K562) hücrelerinin inverted mikroskop görüntüsü (Büyütme: 10X).

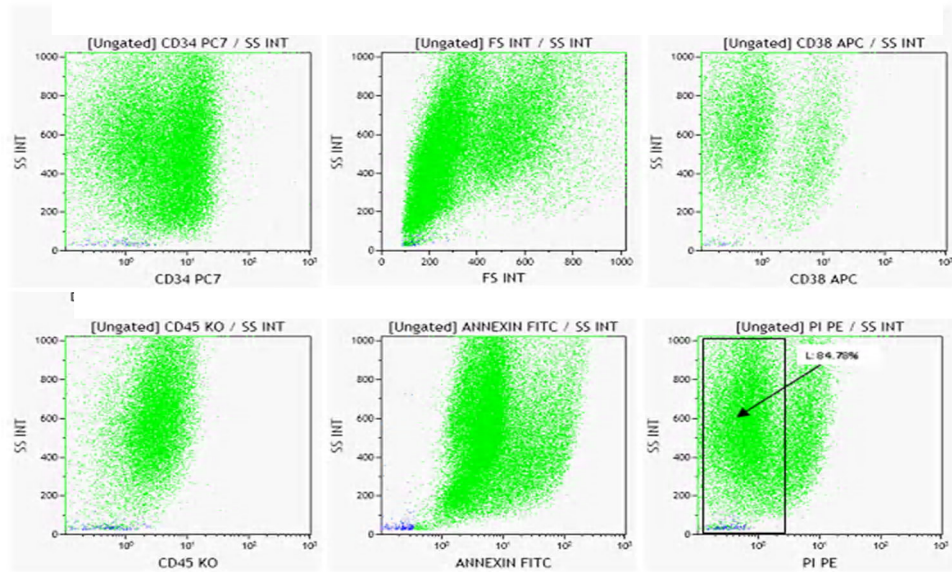
4.1. K562 Hücrelerinin Anneksin-V-FITC ve DAPI ile Canlılıklarının Belirlenmesi

Hücre canlılığını belirlemede Anneksin-V-FITC ve DAPI boya ları kullanıldı.

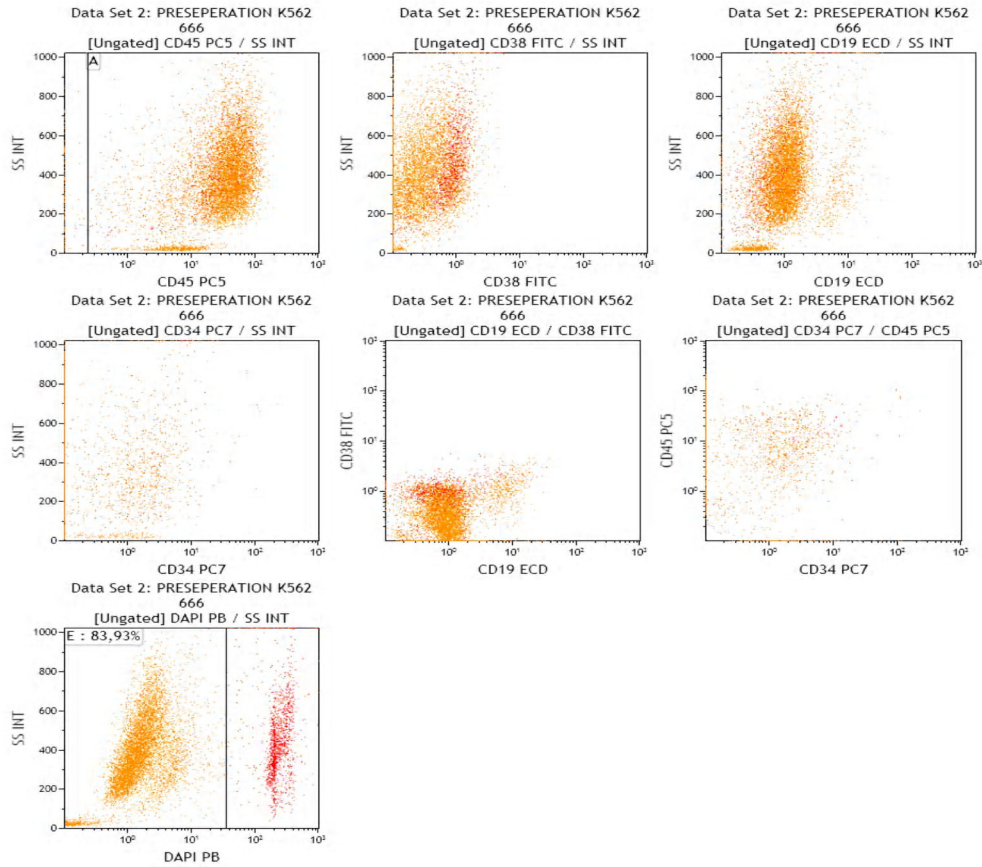
Önce kontrol tüpü akım sitometri cihazından ~ 300 hücre/sn hızda örnek geçirilerek okutuldu; elde edilen değerlere göre cihazın kompenzasyon ayarları yapıldı. Daha sonra örnek tüpündeki ~ 50.000 hücre cihazdan geçirilerek okuma yapıldı.

Anneksin-V-FITC ile yapılan boyamada akım sitometri sonuçlarına göre K562 hücrelerinin canlılığı %84,78 bulundu. Hücrelerin %90 konfluense ulaşması için beklenildi (Şekil 4.1).

Yeterli yoğunluğa ulaşan K562 hücrelerinden KML kök hücrelerinin ayrımı yapılmadan hemen önce hücrelerin DAPI ile canlılıkları kontrol edildi ve hücre canlılığı %83,93 olarak belirlendi (Şekil 4.2).



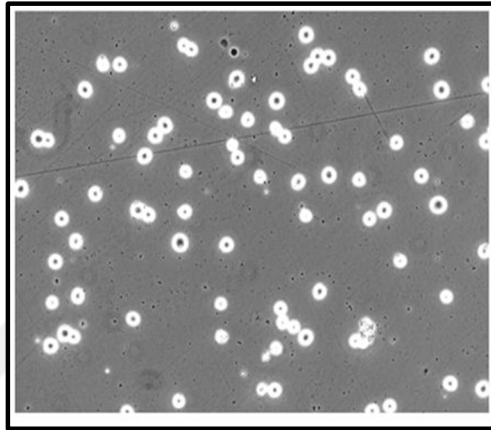
Şekil 4.1. K562 hücrelerinin canlılığının Anneksin-V-FITC ile akım sitometrik analizi



Şekil 4.2. K562 hücrelerinin canlılığının DAPI ile akım sitometrik analizi

4.2. CD34+/CD38- KML Kök Hücrelerinin MACS ile Ayrılması

K562 hücre hattından MACS yöntemiyle CD34+CD38- hücre fraksiyonları ayrıldı (Resim 4.2). İşlem sonunda ayrılan hücre fraksiyonlarının saflığı akım sitometrik analiz ile kontrol edildi.



Resim 4.2. KML Kök hücrelerinin (CD38-/CD34+) inverted mikroskop görüntüsü (Büyütme: 10X).

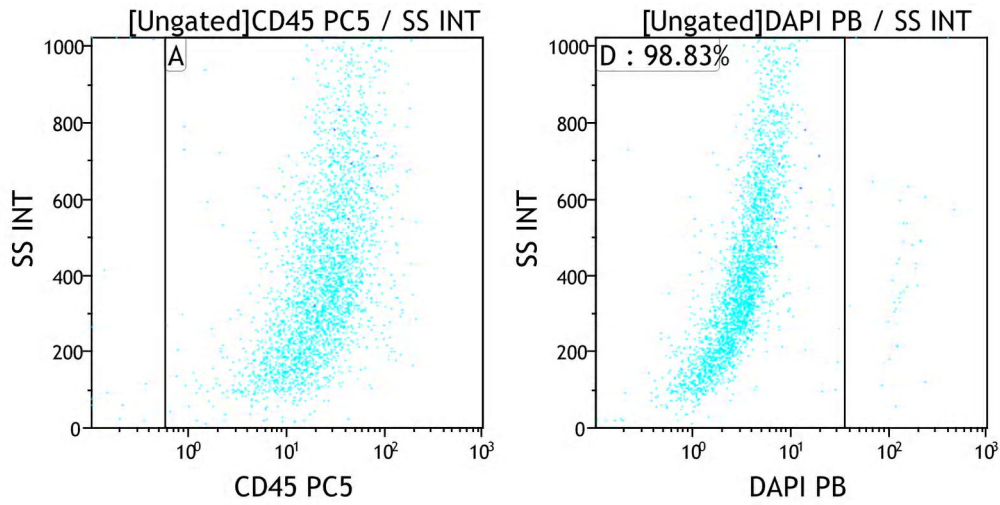
Dar açılı ışık saçılımı (FSC) ile 90° açıyla ışık saçılım (SSC) parametresi kullanılarak oluşturulan görüntüde hücre boyutu ve granülitesi belirlendi.

CD34-PC7'in ışıma verdiği FL4 SSC kullanılarak oluşturulan dot blotta granüliteye bağlı hücrelerin CD34 ekspresyonu değerlendirildi. İzotipik kontrol ile eşik değerinin üzerindeki flüoresans ışımaları CD34+ hücreler kabul edildi. Bu hücrelerin üzerinde işaretleme yapılarak hücrelerin yüzde olarak ne kadarının CD34 eksprese ettiği belirlendi. Aynı şekilde eşik değerinin altında kalan hücreler CD34- hücreler olarak belirlendi.

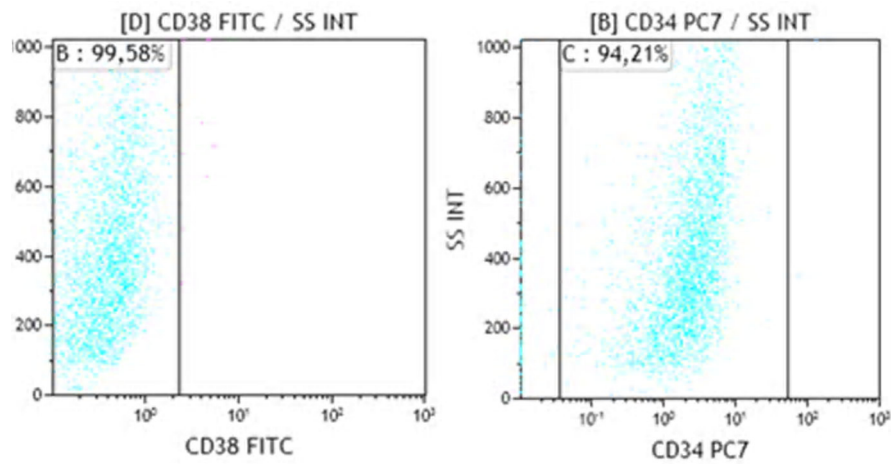
CD38-FITC'nin ışıma verdiği FL1'e karşı SSC kullanılarak oluşturulan dot blotta granüliteye bağlı hücrelerin CD38 ekspresyonu değerlendirildi. İzotipik kontrol ile eşik değerinin altındaki flüoresans ışımaları CD38- hücreler kabul edildi. Bu hücrelerin üzerinde işaretleme yapılarak hücrelerin yüzde olarak ne kadarının CD38 eksprese etmediği belirlendi. Aynı şekilde eşik değerinin üstünde kalan hücreler CD38+ hücreler olarak belirlendi.

Üçüncü dot blot da görüntünün aynısı oluşturuldu; fakat farklı olarak görüntüye CD38- hücreler tanıtılarak (kapılanarak) CD38- hücrelerdeki CD34 ekspresyonu yüzde olarak kaydedildi.

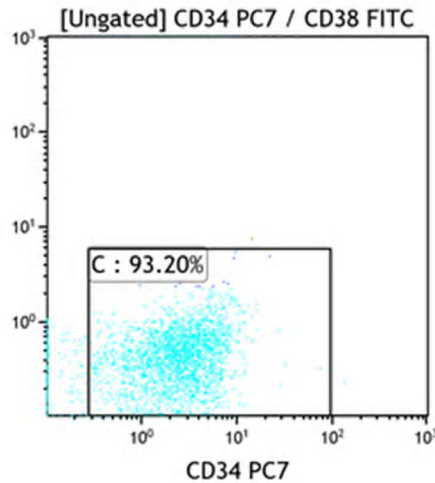
Elde edilen veriler, seçilen hücrelerin %98,83'nün canlı olduğunu (Şekil 4.3) ve bu canlı hücrelerin %99,58'inin CD38- iken %94,21'inin CD34+ olduğu gösterdi (Şekil 4.4). Hücre popülasyonunun %93,20'inin CD38-/CD34+ yüzey belirteçlerine sahip olan KML kök hücreleri olduğu belirlendi (Şekil 4.5).



Şekil 4.3. KML Kök hücrelerinin (CD38-/CD34+) canlılığının DAPI ile akım sitometrik analizi



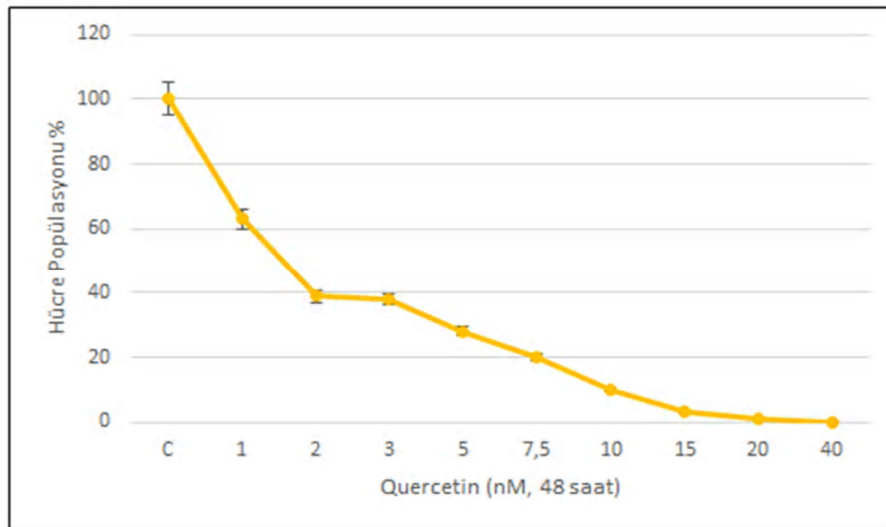
Şekil 4.4. KML Kök hücrelerinin CD38- ve CD34+ oranları



Şekil 4.5. KML Kök hücre fraksiyonunun saflığının akım sitometrik analizi

4.3. Quercetin'in KML Kök Hücreleri Üzerine olan Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi

Quercetin'in sitotoksik etkilerini belirlemek amacı ile XTT testi yapıldı. Artan dozlarda quercetine (1-40 nM) 48 saat boyunca maruz bırakılan KML kök hücrelerinin çoğalma yüzdesinde doza bağımlı bir azalma belirlendi ve quercetin'in IC50 değeri 1,5 nM olarak hesaplandı. Elde edilen XTT hücre proliferasyonu sonuçlarına göre, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; 1,5, 10, ve 20 nM quercetin'in KML kök hücrelerinin proliferasyonunu sırasıyla %37, %72, %90 ve %99 oranında azalttığı hesaplandı (Grafik 4.1)

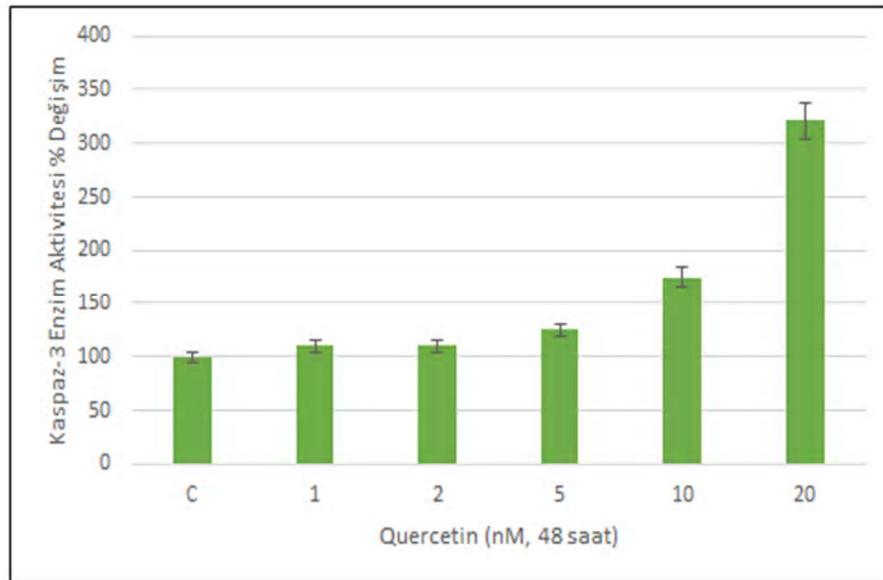


Grafik 4.1. Quercetin'in KML kök hücreleri üzerine sitotoksik etkileri

4.4. Quercetin'in KML Kök Hücrelerinde Kaspaz-3 Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

Quercetine maruz bırakılan KML kök hücrelerinin kaspaz-3 enzim aktivitesinde meydana getirdiği değişimler, kaspaz-3 kolorimetrik enzim kiti ile belirlendi.

Artan dozlarda quercetin (1-20 nM) uygulanan KML kök hücrelerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 1, 2 ve 5 nM quercetine maruz bırakılan KML kök hücrelerinin kaspaz-3 enzim aktivitesinde kayda değer bir artış gözlenmezken; 10 ve 20 nM quercetine maruz bırakılan KML kök hücrelerinin kaspaz-3 enzim aktivitesinde sırasıyla %75 ve %321 artış belirlendi (Grafik 4.2).



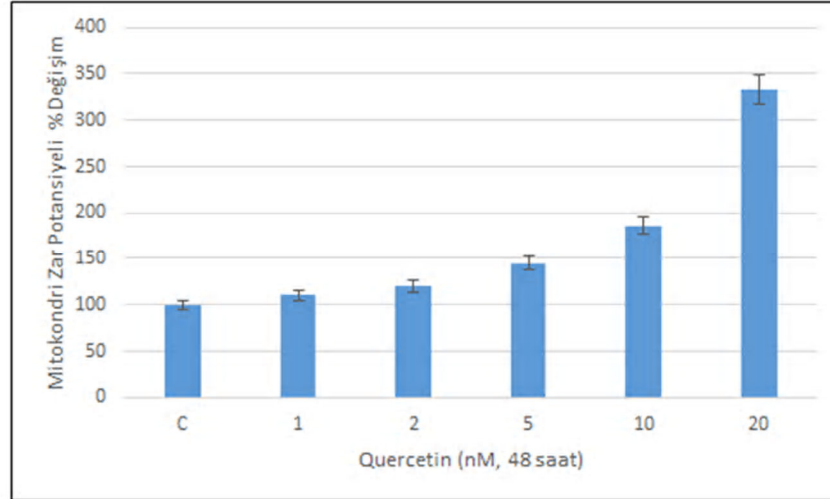
Grafik 4.2. Quercetin'in KML kök hücrelerinde kaspaz-3 enzim aktivitesi üzerine etkileri

4.5. Quercetin'in KML Kök Hücrelerinde Mitokondri Zar Potansiyeli Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

KML kök hücrelerinin mitokondri zar potansiyelinde gerçekleşen değişimler, JC-1 mitokondri zar potansiyeli ölçüm kiti ile belirlendi.

Artan dozlarda quercetin (1-20 nM) uygulanan KML kök hücrelerinde kontrol grubuna göre doza bağımlı olarak mitokondri zar potansiyelini önemli oranda bozduğu tespit edildi. Kaspaz-3 enzim aktivitesi ile elde edilen sonuçlara benzer şekilde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 10 ve 20 nM quercetine maruz bırakılan KML kök

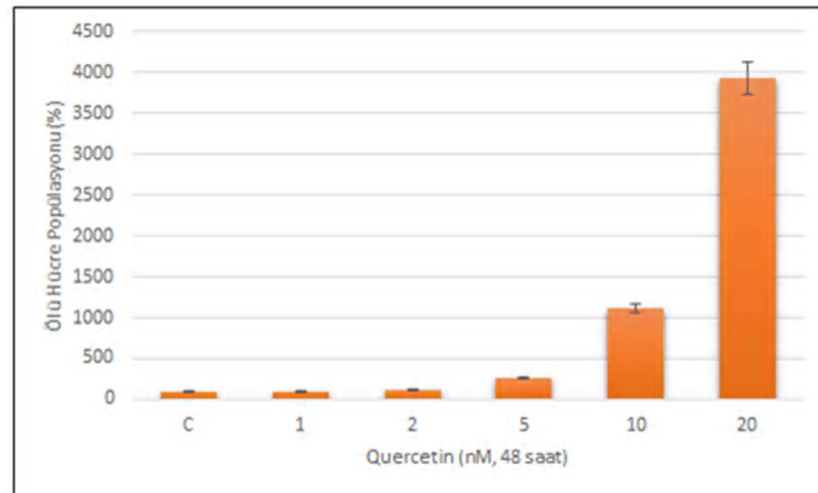
hücrelerindeki mitokondri zarı potansiyeli bozulunda %86 ve %333 artışlara neden olduğu belirlendi (Grafik 4.3).



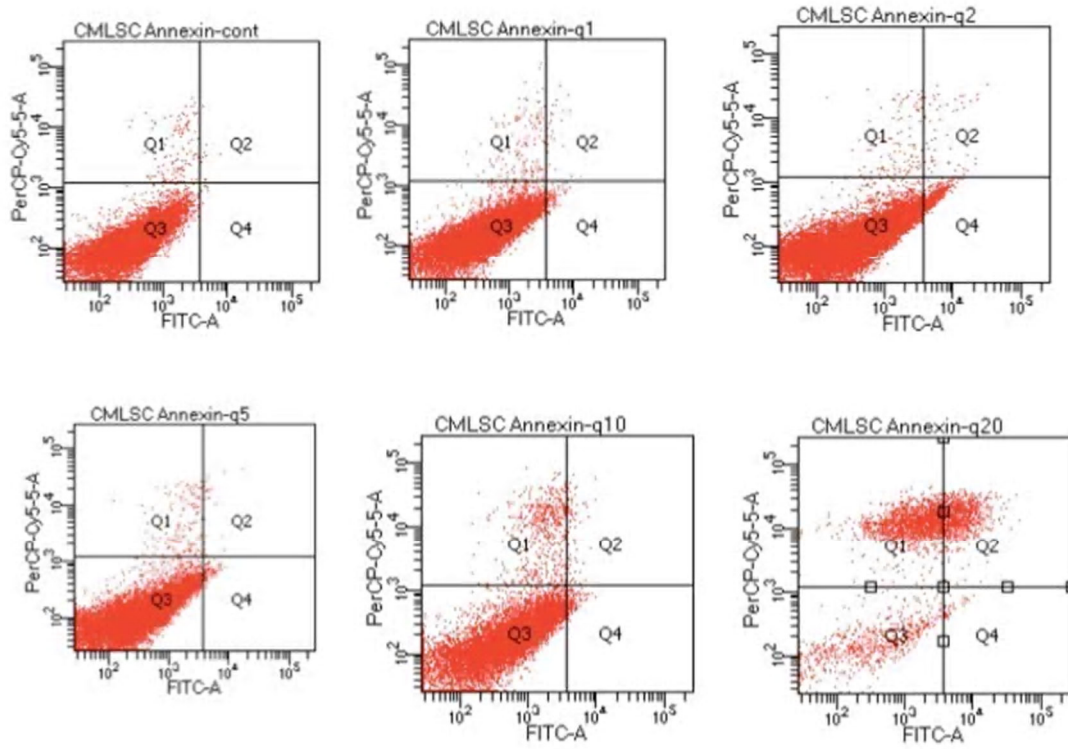
Grafik 4.3. Quercetin KML kök hücrelerinde mitokondri zar potansiyelinin bozulumu üzerine etkileri

4.6. Quercetin'in KML Kök Hücreleri Üzerine Apoptotik Etkilerinin Anneksin-V-FITC / Propidyum İyodür ile Belirlenmesi

Anexin-V analiz sonuçları quercetin'in doza bağımlı olarak apoptozu tetiklediği ve quercetin'in apoptotik hücre ölümünde önemli artışlar oluşturduğu gösterildi (Şekil 4.6). 5, 10 ve 20 nM quercetine maruz bırakılan KML kök hücrelerindeki hücre ölümlerinde kontrol grubu hücrelerine kıyasla sırasıyla 2.6, 11.2 ve 39.3 kat artış belirlendi (Grafik 4.4).



Grafik 4.4. Quercetin'in KML kök hücreleri üzerine apoptotik etkileri



Şekil 4.6. Quercetin'in KML kök hücreleri üzerine apoptotik etkilerinin akım sitometrisi ile gösterimi

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Dünya genelinde kanser yüksek ölüm oranına sahip bir hastalık olarak tanınmakta olup, mevcut veriler şimdiye kadar göğüs, kolorektal, prostat, karaciğer ve akciğer kanserleri de dahil olmak üzere bilinen 100'den fazla kanser çeşidi tanımlamıştır. Lösemi, normal hücre düzenlenme sürecinde değişikliklerin meydana gelmesi ile kemik iliğindeki hematopoietik kök hücrelerin kontrolsüz çoğalması ile sonuçlanan, çocuklarda ve erişkinlerde görülen yaygın bir malignitedir (9). Kronik miyeloid lösemi, kemik iliği kök hücrelerinin malign yayılımı ile karakterize edilen bir hematopoetik bozukluktur (12). KML, her yıl 100.000 kişiden 1 veya 2'sinde, çoğunlukla yaşlılarda görülür ve moleküler düzeyde, BCR / ABL füzyon geninin oluşumuna yol açan, 9. ve 22. kromozomlar arasındaki translokasyon sonucu ortaya çıkan Philadelphia kromozomu (Ph) ile karakterize edilir.

KML tedavisinde, radyoterapi keşfedilene kadar arsenik kullanılmış; 1960'larda, bunun yerinin bisulfan ve hidroksiüre almıştır. 1980'lere gelindiğinde tedavide bu ajanların yerini allojenik kök hücre transplantasyonu almış; yine aynı yıllarda transplantasyon için uygun olmayan hastalar interferon alfa ile tedavi edilmiştir. KML'nin moleküler mekanizmalarının anlaşılması, tirozin kinaz inhibitörlerinin gelişmesine neden olmuştur. TKİ ile tedavi hastaların hayatta kalma oranlarını arttırmakla kalmayıp, ilacın yan etkileri azaltmıştır.

İlk geliştirilen TKİ, Bcr-abl proteinini hedefleyen imatinib mesilat (Glivec veya Gleevec veya STI571) idi. KML hücrelerinde, imatinib mesilat, ATP'yi taklit eder ve BCR-ABL'nin tirozin kinaz alanına bağlanmasını önleyerek etki gösterir. Ancak son dönemlerde yapılan çalışmalar, akselere veya blast evrelerindeki hastaların imatinibe direnç gösterebileceğini göstermiştir (4). Bu sorunu çözmek için dasatinib, nilotinib ve

bosutinib gibi ikinci nesil TKI'leri geliştirilmiştir.

İlaç direnci, kanser hücrelerinin ve dokularının kanser önleyici ajanlara karşı duyarsızlığı olarak bilinir. Bir hücre ilaca direnç fenotipi gösterdiğinde, aynı zamanda kimyasal ve yapısal olarak farklı antikanser ajanlara karşı da direnç gösterebilir. Klinik sonuçlar, tirozin kinaz inhibitörlerinin başarısının, KML hastalarında direnç gelişiminin KML tedavisinde en büyük sorun olarak bildirildiğini gösterdi. Kanserde çoklu ilaç direncine katkıda bulunan farklı BCR-ABL bağımlı ve bağımsız mekanizmalar vardır. Bu mekanizmalar arasında, BCR-ABL'nin TKI bağlanma alanındaki mutasyonlar, BCR-ABL'nin aşırı ekspresyonu, ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcıları, anormal seramid metabolizması, apoptozun inhibisyonu, belirli miRNA'ların ekspresyon düzeylerinde değişiklikler ve kanser kök hücrelerinin varlığı bulunmaktadır (29).

KKH'lerin varlığı ilk olarak lösemilerde ve miyelomalarda gösterildi. Hematopoietik kök hücrelerden ayrılan saflaştırılmış lösemik kök hücrelerin bir kısmının yeni tümörejenik doku oluşturabileceği bildirilmiştir (105). Lösemik kök hücrelerin ilk karakterizasyonu AML'de bildirilmiş; CD34+CD38- hücreleri AML hastalarından izole edilip NOD/SCID farelere enjekte edildiğinde, farelerde lösemik blastlara rastlanmış ve AMLbaşlatıldığı gözlenmiştir (105,106). Tedavi sürecinde karşılaşılan başlıca sorunlar, KKH'lerinden kaynaklandığı düşünülen tümör nüksleri ve ilaç direncidir. KKH'leri esas olarak tümörün başlatılması, bakımı, anjiyojenezi, metastazi, ilaç direnci ve hastalığın tekrarından sorumludur. CD34+ lösemi kök hücrelerinin imatinib ve dasatinib'e karşı duyarlı olmadığı ve bu nedenle bu uygulamaların doğrudan apoptozu uyarmak için lösemik kök hücreleri hedeflemediği sürece etkisiz olacağı belgelenmiştir (114-118).

Potansiyel ilaçlar KKH'leri yerine kanser hücrelerini hedef aldığından, ilaç direnci tedavi sırasında ana problem olmaya devam etmektedir. KKH'leri tarafından yeni kanser hücrelerinin üretimini önlemek ve direncin tersine dönmesini yenmek için son çalışmalar KKH'lerini hedeflemeye odaklanmıştır. İmatinib ve diğer TKI'leri, uzun vadede hastalığın nüksetmesine bağlı olarak KKH'ler üzerinde etkili olmamaktadır (53). Kanser kök hücrelerini normal kök hücrelerden ayırt etmek, tedavinin başarısı için önemli bir noktadır.

Kanserin nüks etmesini önlemek için yeni ajanların bulunması ve bu ajanların KKH'lerine etkilerini görmek amacıyla; KKH'lerinin yeterli sayıda eldesi gereklidir ve

öncelikli olarak yüksek verimle çalışan ayırma sistemlerine ihtiyaç vardır. Hücre ayırmada FACS ve MACS sistemlerinin kullanımı son yıllarda artmıştır. Bunun en önemli nedeni uygulamanın kolay ve hızlı olması ve ilgili hücre seçimi ve saflaştırma sonrası elde edilen hücrelerin canlı olmasıdır. KML-KH için yapılan karakterizasyon çalışmaları diğer lösemi kök hücrelerinde olduğu gibi CD34+/CD38- yüzey belirteçlerini içerdiklerini göstermiştir. Bu çalışmada KML-KH'leri, K562'den manyetik partiküller kullanılarak (MACS yöntemi) izole edildi. İzolasyonun ardından yapılan akım sitometrik analiz CD38-CD34+ hücre popülasyonunun %93,2 oranında olduğunu ve hücre canlılığının %98,83 olduğunu gösterdi.

Yeni terapötik yaklaşımların aşamalı olarak geliştirilmesine bakılmaksızın, etkili kanser tedavilerine ihtiyaç duyulmaktadır. Son zamanlarda, meyve ve sebzeler açısından zengin bir diyetin çeşitli kanser türlerinin riskini azalttığı gözlemlenmiştir. Bu nedenle, yeni terapötik ilaçların araştırılmasında, çeşitli araştırmalar meyve ve sebzelerden elde edilen, fitokimyasallar gibi doğal bileşiklerin anti kanser potansiyelini araştırmaya başlanmıştır. Belirlenen bu flavanoidlerin çeşitli hücresel prosesleri modüle ederek ve kanser progresyonu ve metastazı engelleyerek anti kanser aktiviteleri olduğu gösterilmiştir (217-221).

Büyük bir flavonol olan quercetin, antioksidan, anti-inflamatuar, anti-kanser ve anti-diyabetik etkinlikler de dahil olmak üzere birçok biyolojik etkiyi sergiler (220). Quercetin, lösemi HL-60, SW-480 kolon kanseri, 4T1 fare meme kanseri 21 ve A431 epidermoid tümör hücreleri gibi farklı kanser hücre hatlarına karşı apoptotik etkilere sahip olduğu bildirilmiştir. Fitoöstrojenlerin anti-proliferatif etkisini değerlendirirken, quercetin K562 ve MDR K562/ADR hücre büyümesini özellikle inhibe ettiği bulunmuştur. K562 hücrelerine 72 saat boyunca 9.2 mg/ml'lik bir konsantrasyonda quercetin uygulandığında, apoptozu indüklediği ve KML hücrelerinde BCR-ABL düzeylerini düşürdüğü bulunmuştur. Quercetin ve ADR kombinasyonu MDR K562/ADR hücrelerinde test edilmiştir. Kombine tedavi, kaspaz-3 ve kaspaz-8'in aktivasyonunu ve mitokondriyal membran potansiyelinin (M_{ZP}) arttırdığı kaydedilmiştir. Quercetin ve ADR kombinasyonu MDR K562/ADR hücrelerinde test edildiğinde, Bcl-2, Bcl-xl'yi düşürdüğü ve p-c-Jun-N terminal kinazı ve p-p38 mitojen ile aktive edilmiş protein kinazı (p-p38-MAPK) güçlendirdiği bulunmuştur. Quercetin KML hücrelerinde MDR'yi tersine çevirdiği bulunmuştur. KML hücrelerinde MDR'yi

tersine çeviren Bcl-2, TNF ekspresyonunu azaltmıştır. Ayrıca, KML hücrelerinde Hsp70 düzeylerini de inhibe etmiştir. Quercetin, telomeraz enzimini inhibe ederek apoptozu indüklemiştir (251).

Bu çalışmamızda artan dozlarda quercetine (1-40 nM) 48 saat boyunca maruz bırakılan KML-KH'lerinin çoğalma yüzdesinde doza bağımlı bir azalma belirlendi ve quercetin'in IC50 değeri 1,5 nM olarak hesaplandı. Elde edilen XTT hücre proliferasyonu sonuçlarına göre, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 1, 5, 10, ve 20 nM quercetin'in KML-KH'lerinin proliferasyonunu %37, %72, %90 ve %99 oranında azalttığı hesaplandı. Ayrıca artan dozlarda quercetin (1-20 nM) uygulanan KML KH'lerinde kontrol grubuna göre doza bağımlı olarak kaspaz-3 enzim aktivitesinde ve MZP bozulunda önemli artışlar belirlendi. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, 10 ve 20 nM Quercetine maruz bırakılan KML-KH'lerinin kaspaz-3 enzim aktivitesinde sırasıyla %75 ve %321 artış belirlenirken aynı dozların KML-KH'lerindeki mitokondri zar potansiyeli bozulunda %86 ve %333 artışlara neden olduğu tespit edildi. Ancak Quercetin'in KML-KH üzerine apoptotik etkisinin instrinsik yolak üzerinden değerlendirilmesi yapılmamıştır.

Moleküler genetik kusurların anlaşılması ve tümörlerde kompleks sinyal yollarının düzenlenmesi, özellikle de apoptozun düzenlenmesi kanserin tedavisinde önemlidir. İçsel ve dışsal apoptotik yollar ve p53, proteozom / ubikuitin sistemi, NFaB ve PI3K / Akt yolları gibi diğer sinyalleme modülatörleri hakkındaki bilgilerimiz, tek başına etkili olup olmadığını gösteren birçok yeni ajanların keşfedilmesine yol açmıştır. Ajanlar veya konvansiyonel sitotoksik terapi veya radyasyon ile kombinasyon halinde uygulanabilir. Farklı tümör tiplerinde apoptozu kontrol eden farklı sinyal yollarını daha iyi anlamak, yeni hedeflenen ajanların keşfedilmesine ve hedeflenen tümöre spesifik moleküler kusurlara dayanan klinik araştırmaların tasarlanmasına yardımcı olacaktır.

Quercetin'in, farmasötiklerde kullanımı, zayıf biyoyararlanımı, hidrofobik yapısı ve düşük kararlılığı nedeniyle halen sınırlıdır. Ayrıca, quercetin, gastrointestinal sistemde yüksek seviyelerde enzimatik parçalanma eğilimi gösterir ve vücutta dolaşım süresi düşüktür (198). Bazı çalışmalar, klinik faz çalışmalarında yüksek dozda quercetin'in toksik etkilerini bildirmiştir. Aksine, Harwood ve ark. *in vitro* davranışına kıyasla quercetin'in *in vivo* olarak toksik olmadığını bildirmişlerdir (251). Bu belirsizlikler, tedavilerde terapötik molekül olarak uygulanmadan önce quercetin için daha gelişmiş

toksosite ve güvenlik analizi için bir ihtiyaç yaratmaktadır. Bu nedenle artmış biyoyararlanım, uzun süreli stabilite, uzun süreli dolaşım süresi ve düşük dozlarda toksik etkilerin azaltılması ile modifiye edilmiş quercetin formlarının geliştirilmesi önerilmektedir.

Sonuç olarak, Quercetin KML KH'leri üzerine apoptotik ve antiproliferatif etkileri belirlenmiş ve kaspaz-3 enziminin ve mitokondrinin apoptotik hücre ölümlerindeki rolleri ortaya konmuştur.



6. KAYNAKLAR

1. Rabinowitz I, Larson RS. Lippincott (11 th ed), Williams & Wilkins, 2006: 2235-2258.
2. Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. Science 1960; 132: 1497.
3. Pellicano F, Simara P, Sinclair A, Helgason GV, Copland M, Grant S, Holyoake TL. The MEK inhibitor PD184352 enhances BMS-214662-induced apoptosis in CD34+ CML stem/progenitor cells. Leukemia 2011; 25: 1159-1167.
4. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. N Engl J Med 2001; 344: 1031-1037.
5. Cho RW, Clarke MF. Recent advances in cancer stem cells. Curr Opin Genet Dev 2008; 18: 48-53.
6. Mimeault M, Hauke R, Mehta PP, et al. Recent advances in cancer stem/progenitor cell research: therapeutic implications for overcoming resistance to the most aggressive cancers. J Cell Mol Med 2007; 11: 981-1011.
7. Altunkaynak BZ, Özbek E. Programlanmış hücre ölümü: apoptoz nedir? Tıp Araştırmaları Dergisi 2008; 6: 93-104.
8. Melzig MF, Loose R, Schonherr G. Effect of flavonoids on daunomycin-induced toxicity in cultivated endothelial cells. Pharmazie 1997; 52: 779-793.
9. Davis AS, Viera AJ, Mead MD. Leukemia: an overview for primary care. Am Fam Physician 2014; 89: 731-738.

10. Cancer Treatment Centers of America. (2017). Types of Leukemia. <http://cancercenter.com/leukemia/types.html> (15 Haziran 2017).
11. Healthline.(2017).Leukemia. <http://www.healthline.com/health/leukemia#overview1.html> (15 Haziran 2017).
12. Melo JV1, Hughes TP, Apperley JF. Chronic miyeloid leukemia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2003; 132-152.
13. Goldman JM, Melo JV. Chronic miyeloid leukemia Advances in biology and new approaches to treatment. N Engl J Med 2003; 349: 1451-1464.
14. Hehlmann R1, Hochhaus A, Baccarani M. Chronic miyeloid leukaemia. Lancet 2007; 370: 342-350.
15. National Cancer Institute (2017). Cancer Stat Facts: Chronic Miyeloid Leukemia (CML). <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/cmyle.html> (18 Haziran 2017).
16. Hoffbrand V, Moss PAH, Pettit JE. Essential Haematology (5 th ed), Wiley-Blackwell, 2006: 174-181.
17. Koca E, Haznedaroglu İC. Imatinib mesylate and the management of chronic myeloid leukemia (CML). Turk J Haematol 2005; 22: 161-172.
18. Haznedaroğlu İC. Kronik miyeloid lösemi. Türkiye Klinikleri J Int MedSci 2007; 3: 56-61.
19. National Comprehensive Cancer Network (2017). Chronic Myelogenous Leukemia. <http://nccn.org/patients/guidelines/cml.html> (18 Haziran 2017).
20. Granatowicz A, Piatek CI, Moschiano E, et al. An Overview and Update of Chronic Miyeloid Leukemia for Primary Care Physicians. Korean J Fam Med 2015; 36: 197-202.
21. Druker BJ. Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML. Blood 2008; 112: 4808-4817.
22. Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. Science 1960; 132: 1497.

23. Al-Achkar W1, Wafa A, Moassass F, et al. A unique cytogenetic abnormality, t(2;7)(p13.1;p21.3), in a Philadelphia-positive chronic myeloid leukemia. *Oncol Lett* 2012; 4: 209-212.
24. Collins SJ, Kubonishi I, Miyoshi I, et al. Altered transcription of the c-abl oncogene in K-562 and other chronic myelogenous leukemia cells. *Science* 1984; 225: 72-74.
25. Gale RP, Canaani E. An 8-kilobase abl RNA transcript in chronic myelogenous leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; 81: 5648-5652.
26. Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science* 1990; 247: 824-830.
27. Heisterkamp N, Jenster G, Ten Hoeve J, et al. Acute leukaemia in bcr/abl transgenic mice. *Nature* 1990; 344: 251-253.
28. Abelson HT, Rabstein LS. Lymphosarcoma: virus-induced thymic-independent disease in mice. *Cancer Res* 1970; 30: 2213-2222.
29. Ünlü M, Kiraz Y, Kacı FN, et al. Multidrug resistance in chronic myeloid leukemia *Turk J Biol* 2014; 38: 806-816.
30. Ren R. Mechanisms of BCR–ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nature Reviews* 2005; 5: 172-183.
31. Chen Y, Peng C, Li D, et al. Molecular and cellular bases of chronic myeloid leukemia. *Protein Cell*. 2010; 1:124-132.
32. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 2000; 96: 3343-3356.
33. Di Bacco A, Keeshan K, McKenna SL, et al. Molecular abnormalities in chronic myeloid leukemia: deregulation of cell growth and apoptosis. *Oncologist* 2000; 5: 405-415.
34. Zheng X, Güller S, Beissert T, et al. BCR and its mutants, the reciprocal t(9;22)-associated ABL/BCR fusion proteins, differentially regulate the cytoskeleton and cell motility. *BMC Cancer* 2006; 6: 262.

35. Quintas-Cardama A, Cortes J. Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood* 2009; 113: 1619-1630.
36. Kurosu T, Wu N, Oshikawa G, et al. Enhancement of imatinib-induced apoptosis of BCR/ABL-expressing cells by nutlin-3 through synergistic activation of the mitochondrial apoptotic pathway. *Apoptosis* 2010; 15: 608-620.
37. Kang ZJ1, Liu YF, Xu LZ, et al. The Philadelphia chromosome in leukemogenesis. *Chin J Cancer* 2016; 35: 48-55.
38. Sattler M, Griffin JD. Molecular mechanisms of transformation by the BCR-ABL oncogene. *Semin Hematol* 2003; 40: 4-10.
39. Hess G, Bunjes D, Siegert W, et al. Sustained complete molecular remissions after treatment with imatinib-mesylate in patients with failure after allogeneic stem cell transplantation for chronic myelogenous leukemia: results of a prospective phase II open-label multicenter study. *J Clin Oncol* 2005; 23: 7583-7593.
40. Bornhäuser M, Kroger N, Schwerdtfeger R, et al. Allogeneic haematopoietic cell transplantation for chronic myelogenous leukaemia in the era of imatinib: a retrospective multicentre study. *Eur J Haematol* 2006; 76: 9-17.
41. Hehlmann R, Berger U, Aul C, et al. The German competence network "acute and chronic leukemias". *Leukemia* 2004; 18: 665-669.
42. Talpaz M, Shah NP, Kantarjian H, et al. Dasatinib in imatinib-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med* 2006; 354: 2531-2541.
43. Kantarjian H, Giles F, Wunderle L, et al. Nilotinib in Imatinib-Resistant CML and Philadelphia Chromosome-Positive ALL. *N Engl J Med* 2006; 354: 2542-2551.
44. Weisberg E, Manley PW, Breitenstein W, et al. Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl. *Cancer Cell* 2005; 7: 129-141.
45. Shah NP, Tran C, Lee FY, et al. Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor. *Science* 2004; 305: 399-401.
46. Young MA, Shah NP, Chao LH, et al. Structure of the kinase domain of an imatinib-resistant Abl mutant in complex with the Aurora kinase inhibitor VX-680. *Cancer Res* 2006; 66: 1007-1014.

47. Carter TA, Wodicka LM, Shah NP, et al. Inhibition of drug-resistant mutants of ABL, KIT, and EGF receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 11011-11016.
48. Hasford J, Pfeiffermann M, Shepherd P, et al. The impact of the combination of baseline risk group and cytogenetic response on the survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon alpha. *Haematologica* 2005; 90: 335-340.
49. Marin D, Kaeda JS, Andreasson C, et al. Phase I/II trial of adding semisynthetic homoharringtonine in chronic myeloid leukemia patients who have achieved partial or complete cytogenetic response on imatinib. *Cancer* 2005; 103: 1850-1855.
50. Reichert A, Heisterkamp N, Daley GQ, et al. Treatment of Bcr/Abl-positive acute lymphoblastic leukemia in P190 transgenic mice with the farnesyl transferase inhibitor SCH66336. *Blood* 2001; 97: 1399-1403.
52. Hoover RR, Mahon FX, Melo JV, et al. Overcoming STI571 resistance with the farnesyl transferase inhibitor SCH66336. *Blood* 2002; 100: 1068-1071.
53. La Rosee P, Johnson K, Corbin AS, et al. In vitro efficiency of combined treatment depends on the underlying mechanism of resistance in imatinib-resistant Bcr-Abl-positive cell lines. *Blood* 2004; 103: 208-215.
54. Lissauer. Zwei Fälle von Leucaemie. *Berl Klin Wschr* 1865; 2: 403-404.
55. Kantarjian HM, O'Brien S, Cortes J, et al. Results of decitabine (5-aza-2'-deoxycytidine) therapy in 130 patients with chronic myelogenous leukemia. *Cancer* 2003; 98: 522-528.
56. Marin D, Kaeda JS, Andreasson C, et al. Phase I/II trial of adding semisynthetic homoharringtonine in chronic myeloid leukemia patients who have achieved partial or complete cytogenetic response on imatinib. *Cancer* 2005; 103: 1850-1855.

57. Dengler J, Von Bubnoff N, Decker T, et al. Combination of imatinib with rapamycin or RAD001 acts synergistically only in Bcr-Abl-positive cells with moderate resistance to imatinib. *Leukemia* 2005; 19: 1835–1838.
58. Burchert A, Wölfl S, Schmidt M, et al. Interferon-alpha, but not the ABL-kinase inhibitor imatinib (STI571), induces expression of myeloblastin and a specific T-cell response in chronic myeloid leukemia. *Blood* 2003; 101: 259–264.
59. Biernaux C, Loos M, Sels A, et al. Detection of major bcr-abl gene expression at a very low level in blood cells of some healthy individuals. *Blood* 1995; 88: 3118–3122.
60. Bose S, Deininger M, Gora-Tybor J, et al. The presence of typical and atypical BCR-ABL fusion genes in leukocytes of normal individuals: biologic significance and implications for the assessment of minimal residual disease. *Blood* 1998; 92: 3362–3367.
61. Steelman LS, Pohnert SC, Shelton JG, et al. JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3 K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia* 2004; 18: 189–218.
62. Jin A, Kurosu T, Tsuji K, et al. BCR/ABL and IL3 activate Rap1 to stimulate the B-Raf/MEK/Erk and Akt signaling pathways and to regulate proliferation, apoptosis, and adhesion. *Oncogene* 2006; 25: 4332–4340.
63. Mizuchi D, Kurosu T, Kida A, et al. BCR/ABL activates Rap1 and B-Raf to stimulate the MEK/Erk signaling pathway in hematopoietic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 326: 645–651.
64. Mandanas RA, Leibowitz DS, Gharehbaghi K, et al. Role of p21 RAS in p210 bcr-abl transformation of murine myeloid cells. *Blood* 1993; 82: 1838–1847.
65. Baum KJ, Ren R. Effect of Ras inhibition in hematopoiesis and BCR/ABL leukemogenesis. *J Hematol Oncol* 2008; 1: 5.
66. Brozik A, Casey NP, Hegedus C, et al. Reduction of Bcr-Abl function leads to erythroid differentiation of K562 cells via downregulation of ERK. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1090: 344–354.

67. Ozaki K, Kosugi M, Baba N, et al. Blockade of the ERK or PI3 K-Akt signaling pathway enhances the cytotoxicity of histone deacetylase inhibitors in tumor cells resistant to gefitinib or imatinib. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 391: 1610–1615.
68. Basak P, Chatterjee S, Das P, et al. Leukemic stromal hematopoietic microenvironment negatively regulates the normal hematopoiesis in mouse model of leukemia. *Chin J Cancer* 2010; 29: 969–979.
69. Hickey FB, England K, Cotter TG. Bcr-Abl regulates osteopontin transcription via Ras, PI-3 K, aPKC, Raf-1, and MEK. *J Leukoc Biol* 2005; 78: 289–300.
70. Asmussen J, Lasater EA, Tajon C, et al. MEK-dependent negative feedback underlies BCR-ABL-mediated oncogene addiction. *Cancer Discov* 2014; 4: 200–215.
71. Jabbour E, Cortes JE, Kantarjian HM. Molecular monitoring in chronic myeloid leukemia: response to tyrosine kinase inhibitors and prognostic implications. *Cancer* 2008; 112: 2112–2118.
72. Kantarjian H, Schiffer C, Jones D, et al. Monitoring the response and course of chronic myeloid leukemia in the modern era of BCRABL tyrosine kinase inhibitors: practical advice on the use and interpretation of monitoring methods. *Blood* 2008; 111: 1774–1780.
73. Schoch C, Schnittger S, Bursch S, et al. Comparison of chromosome banding analysis, interphase-and hypermetaphase-FISH, qualitative and quantitative PCR for diagnosis and for follow-up in chronic myeloid leukemia: a study on 350 cases. *Leukemia* 2002; 16: 53.
74. Druker BJ, O'Brien SG, Cortes J, et al. Chronic myelogenous leukemia. *Hematology* 2002; 1: 111-135.
75. Druker BJ, Moshe T, Resta DJ, et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *New Engl J Med* 2001; 344: 1031-1037.

76. Deininger MW, McCreevey L, Willis S, et al. Detection of ABL kinase domain mutations with denaturing high-performance liquid chromatography. *Leukemia* 2004; 1: 6471
77. Guilhot F. Indications for imatinib mesylate therapy and clinical management. *Oncologist* 2004; 9: 271.
78. Peggs K, Mackinnon S. Imatinib mesylate-the new gold standard for treatment of chronic myeloid leukemia. *New Engl J Med* 2003; 341: 4-50.
79. Frazer R, Irvine AE, McMullin MF. Chronic Myeloid Leukaemia in The 21st Century. *Ulster Med J* 2007; 76: 8-17.
80. Tuğlu MM, Melli M. İmatinib: Etki Mekanizması ve Direnç Gelişirme Mekanizmaları. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası* 2012; 65: 77-82.
81. O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *New Engl J Med* 2003; 34: 994-1004.
82. Stone RM. Optimizing treatment of chronic myeloid leukemia: a rational approach. *Oncologist* 2004; 9: 259-270.
83. Merx K, Muller MC, Kreil S, et al. Early reduction of BCR-ABL mRNA transcript levels predicts cytogenetic response in chronic phase CML patients treated with imatinib after failure of interferon alpha. *Leukemia* 2002; 16: 1579-1573.
84. Druker BJ. Circumventing resistance to Kinase-inhibitor therapy. *New Engl J Med* 2006; 354: 2594-2596.
85. O'Hare T, Corbin A, Druker BJ. Targeted CML therapy: controlling resistance, seeking cure. *Curr Opin Genet Dev* 2006; 16: 92-99.
86. O'Hare T, Walters DK, Deiniger MW, et al. AMN107: tightening the grip of imatinib. *Cancer Cell* 2005; 7: 117-119.
87. Weisenberg E, Manley P, Cowan-Jacob S, et al. AMN107 (nilotinib): a novel and selective inhibitor of BCR-ABL. *Brit J Canc* 2006; 94: 1765-1769.

88. Kantarjian HM, Giles F, Wunderle L, et al. Nilotinib in imatinib resistant CML and Philadelphia chromosome positive ALL. *New Engl J Med* 2006; 354: 2542-2551.
89. Manley P, Cowan-Jacob S, Mestan J. Advances in the structural biology, design and clinical development of BCR-ABL kinase inhibitors for the treatment of chronic myeloid leukemia. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1754: 3-13.
90. Frame MC. Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1602: 114-130.
91. Schlessinger J. Cell signalling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2000; 103: 211-225.
92. Shah NP, Tran C, Lee FY, et al. Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor. *Science* 2004; 305: 399-401.
93. Walz C, Sattler M. Novel targeted therapies to overcome imatinib mesylate resistance in chronic myeloid leukemia (CML). *Crit Rev Oncol Hematol* 2006; 57: 145-164.
94. Martinelli S, Soverini S, Rosti G, et al. Dual tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2005; 19:1729.
95. Talpaz M, Shah NP, Kantarjian HM, et al. Dasatinib in imatinib resistant Philadelphia chromosome positive leukemias. *New Engl J Med* 2006; 354: 2531-2541.
96. Hampton T. Looking beyond imatinib-next line of targeted drugs for CML shows promise. *JAMA* 2006; 295: 369-370.
97. Cortes JE, Kantarjian HM, Brummendorf TH, et al. Safety and efficacy of bosutinib (SKI-606) in chronic phase Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia patients with resistance or intolerance to imatinib. *Blood* 2011; 118: 4567-4576.

98. O'Hare T, Shakespeare WC, Zhu X, et al. AP24534, a pan-BCR-ABL inhibitor for chronic myeloid leukemia, potently inhibits the T315I mutant and overcomes mutation-based resistance. *Cancer Cell* 2009; 16: 401–412.
99. Zhou T, Commodore L, Huang WS, et al. Structural mechanism of the pan-BCR-ABL inhibitor ponatinib (AP24534): lessons for overcoming kinase inhibitor resistance. *Chem Biol Drug Des* 2011; 77: 1–11.
100. Cortes JE, Kim DW, Pinilla-Ibarz J, et al. A phase 2 trial of ponatinib in Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med* 2013; 369: 1783–1796.
101. Jabbour E, Cortes J, Santos FP, et al. Results of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for chronic myelogenous leukemia patients who failed tyrosine kinase inhibitors after developing BCR-ABL1 kinase domain mutations. *Blood* 2011; 117: 3641–3647.
102. Melo JV, Hughes TP, Apperley JF. Chronic myeloid leukemia. *Hematology* 2003; 17: 132-152.
103. Tsao AS, Kantarjian H, Talpaz M. STI-571 in chronic myelogenous leukaemia. *Br J Haematol* 2002; 119: 15-24.
104. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414: 105–111.
105. Bruce WR, Van Der Gaag H. A quantitative assay for the number of murine lymphoma cells capable of proliferation in vivo. *Nature* 1963; 199: 79–80.
106. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997; 3: 730–737.
107. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 3983–3988.
108. Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, et al. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell* 2005; 121: 823–835.
109. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, et al. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 2007; 445: 106–110.

110. Collins AT, Berry PA, Hyde C, et al. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* 2005; 65: 10946–10951.
111. Szotek PP, Pieretti-Vanmarcke R, Masiakos PT, et al. Ovarian cancer side population defines cells with stem cell-like characteristics and Mullerian Inhibiting Substance responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 11154–11159.
112. Piccirillo SGM, Reynolds BA, Zanetti N, et al. Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells. *Nature* 2006; 444: 761–765.
113. Fang D, Nguyen TK, Leishear K, et al. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res* 2005; 65: 9328–9337.
114. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 1994; 367: 645–648.
115. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997; 3: 730–737.
116. Bhatia M, Wang JC, Kapp U, et al. Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94: 5320–5325.
117. Eppert K, Takenaka K, Lechman ER, et al. Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia. *Nat Med* 2011; 17: 1086–1093.
118. Chen K, Huang YH, Chen JL. Understanding and targeting cancer stem cells: therapeutic implications and challenges. *Acta Pharmacol Sin* 2013; 34: 732–740.
119. Van Rhenen A, Feller N, Kelder A, et al. High stem cell frequency in acute myeloid leukemia at diagnosis predicts high minimal residual disease and poor survival. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 6520–6527.
120. Witte KE, Ahlers J, Schäfer I, et al. High proportion of leukemic stem cells at diagnosis is correlated with unfavorable prognosis in childhood acute myeloid leukemia. *Pediatr Hematol Oncol* 2011; 28: 91–99.

121. 14. Rege TA, Hagood JS. Thy-1, a versatile modulator of signaling affecting cellular adhesion, proliferation, survival, and cytokine/growth factor responses. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1763: 991–999.
122. Blair A, Hogg DE, Ailles LE, et al. Lack of expression of Thy-1 (CD90) on acute myeloid leukemia cells with long-term proliferative ability in vitro and in vivo. *Blood* 1997; 89: 3104–3112.
123. Buccisano F, Rossi FM, Venditti A, et al. CD90/Thy-1 is preferentially expressed on blast cells of high risk acute myeloid leukaemias. *Br J Haematol* 2004; 125: 203–212.
124. Yang ZF, Ho DW, Ng MN, et al. Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer. *Cancer Cell* 2008; 13: 153–166.
125. Tang KH, Dai YD, Tong M, et al. A CD90(+) tumor-initiating cell population with an aggressive signature and metastatic capacity in esophageal cancer. *Cancer Res* 2013; 73: 2322–2332.
126. He J, Liu Y, Zhu T, et al. CD90 is identified as a candidate marker for cancer stem cells in primary high-grade gliomas using tissue microarrays. *Mol Cell Proteomics* 2012; 11: M111.010744.
127. Staudinger M, Humpe A, Gramatzki M. Strategies for purging CD96(+) stem cells in vitro and in vivo: New avenues for autologous stem cell transplantation in acute myeloid leukemia. *Oncoimmunology* 2013; 2: e24500.
128. Testa U, Pelosi E, Frankel A. CD 123 is a membrane biomarker and a therapeutic target in hematologic malignancies. *Biomark Res* 2014; 2: 4.
129. Thomas D, Vadas M, Lopez A. Regulation of haematopoiesis by growth factors emerging insights and therapies. *Expert Opin Biol Ther.* 2004; 4: 869–879.
130. Jordan CT, Upchurch D, Szilvassy SJ, et al. The interleukin-3 receptor alpha chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells. *Leukemia* 2000; 14: 1777–1784.

131. Guzman ML, Neering SJ, Upchurch D, et al. Nuclear factor-kappaB is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells. *Blood* 2001; 98: 2301–2307.
132. Sick E, Jeanne A, Schneider C, et al. CD47 update: a multifaceted actor in the tumour microenvironment of potential therapeutic interest. *Br J Pharmacol* 2012; 167: 1415–1430.
133. Barclay AN. Signal regulatory protein alpha (SIRPalpha)/CD47 interaction and function. *Curr Opin Immunol* 2009; 21: 47–52.
134. Majeti R, Chao MP, Alizadeh AA, et al. CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. *Cell* 2009; 138: 286–299.
135. Majeti R, Becker MW, Tian Q, et al. Dysregulated gene expression networks in human acute myelogenous leukemia stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 3396–3401.
136. Oldenburg PA, Zheleznyak A, Fang YF, et al. Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science* 2000; 288: 2051–2054.
137. Jaiswal S, Jamieson CH, Pang WW, et al. CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis. *Cell* 2009; 138: 271–285.
138. Misra S, Heldin P, Hascall VC, et al. Hyaluronan-CD44 interactions as potential targets for cancer therapy. *FEBS J* 2011; 278: 1429–1443.
139. Hertweck MK, Erdfelder F, Kreuzer KA. CD44 in hematological neoplasias. *Ann Hematol* 2011; 90: 493–508.
140. Liesveld JL, Dipersio JF, Abboud CN. Integrins and adhesive receptors in normal and leukemic CD34+ progenitor cells: potential regulatory checkpoints for cellular traffic. *Leuk Lymphoma* 1994; 14:19–28.
141. Florian S, Sonneck K, Hauswirth AW, et al. Detection of molecular targets on the surface of CD34+/CD38-- stem cells in various myeloid malignancies. *Leuk Lymphoma* 2006; 47: 207–222.

142. Morel PA, Ernst LK, Metes D. Functional CD32 molecules on human NK cells. *Leuk Lymphoma* 1999; 35: 47–56.
143. Driesen J, Popov A, Schultze JL. CD25 as an immune regulatory molecule expressed on myeloid dendritic cells. *Immunobiology* 2008; 213: 849–858.
144. Mahmud SA, Manlove LS, Farrar MA. Interleukin-2 and STAT5 in regulatory T cell development and function. *JAKSTAT* 2013; 2: e23154.
145. Saito Y, Kitamura H, Hijikata A, et al. Identification of therapeutic targets for quiescent, chemotherapy-resistant human leukemia stem cells. *Sci Transl Med* 2010; 2: 17ra9.
146. Bakker AB, Van Den Oudenrijn S, Bakker AQ, et al. C-type lectin-like molecule-1: a novel myeloid cell surface marker associated with acute myeloid leukemia. *Cancer Res* 2004; 64: 8443–8450.
147. Van Rhenen A, Van Dongen GA, Kelder A, et al. The novel AML stem cell associated antigen CLL-1 aids in discrimination between normal and leukemic stem cells. *Blood* 2007; 110: 2659–2666.
148. Zhao X, Singh S, Pardoux C, et al. Targeting C-type lectin-like molecule-1 for antibody-mediated immunotherapy in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2010; 95: 71–78.
149. Zhou J, Chng WJ. Identification and targeting leukemia stem cells: The path to the cure for acute myeloid leukemia. *World J Stem Cells* 2014 26; 6: 473-484.
150. Zhang H, Luo J, Li Y, et al. Characterization of high-affinity peptides and their feasibility for use in nanotherapeutics targeting leukemia stem cells. *Nanomedicine* 2012; 8: 1116–1124.
151. Zhu C, Anderson AC, Kuchroo VK. TIM-3 and its regulatory role in immune responses. *Curr Top Microbiol Immunol* 2011; 350: 1–15.
152. Han G, Chen G, Shen B, et al. Tim-3: an activation marker and activation limiter of innate immune cells. *Front Immunol* 2013; 4: 449.

153. Kikushige Y, Shima T, Takayanagi S, et al. TIM-3 is a promising target to selectively kill acute myeloid leukemia stem cells. *Cell Stem Cell* 2010; 7: 708–717.
154. Jan M, Chao MP, Cha AC, et al. Prospective separation of normal and leukemic stem cells based on differential expression of TIM3, a human acute myeloid leukemia stem cell marker. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 5009–5014.
155. Jones RJ, Barber JP, Vala MS, et al. Assessment of aldehyde dehydrogenase in viable cells. *Blood* 1995; 85: 2742–2746.
156. Kastan MB, Schlaffer E, Russo JE, et al. Direct demonstration of elevated aldehyde dehydrogenase in human hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1990; 75: 1947–1950.
157. Pearce DJ, Taussig D, Simpson C, et al. Characterization of cells with a high aldehyde dehydrogenase activity from cord blood and acute myeloid leukemia samples. *Stem Cells* 2005; 23: 752–760.
158. Cheung AM, Wan TS, Leung JC, et al. Aldehyde dehydrogenase activity in leukemic blasts defines a subgroup of acute myeloid leukemia with adverse prognosis and superior NOD/SCID engrafting potential. *Leukemia* 2007; 21: 1423–1430.
159. Colmone A, Amorim M, Pontier AL, et al. Leukemic cells create bone marrow niches that disrupt the behavior of normal hematopoietic progenitor cells. *Science* 2008; 322: 1861–1865.
160. Roboz GJ, Guzman M. Acute myeloid leukemia stem cells: seek and destroy. *Expert Rev Hematol* 2009; 2: 663–672.
161. Konopleva MY, Jordan CT. Leukemia stem cells and microenvironment: biology and therapeutic targeting. *J Clin Oncol* 2011; 29: 591–599.
162. Perry JM, Li L. Disrupting the stem cell niche: good seeds in bad soil. *Cell* 2007; 129: 1045–1047.
163. Zhang J, Niu C, Ye L, et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 2003; 425: 836–841.

164. Mahomoodally MF, Gurib-Fakim A, Subratty AH. Antimicrobial activities and phytochemical profiles of endemic medicinal plants of Mauritius. *Pharmaceutical Biology* 2005; 43: 237–242.
165. Pandey AK. Anti-staphylococcal activity of a pan-tropical aggressive and obnoxious weed *Parthenium hysterophorus*: an in vitro study. *National Academy Science Letters* 2007; 30: 383–386.
166. Dixon RA, Dey PM, Lamb CJ. Phytoalexins: enzymology and molecular biology. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* 1983; 55: 1–136.
167. Kelly EH, Anthony RT, Dennis JB. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2002; 13: 572–584.
168. Kumar S, Mishra A, Pandey AK. Antioxidant mediated protective effect of *Parthenium hysterophorus* against oxidative damage using in vitro models. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2013; 13: 120.
169. Kumar S, Pandey AK. Phenolic content, reducing power and membrane protective activities of *Solanum xanthocarpum* root extracts. *Vegetos* 2013; 26: 301–307.
170. Leopoldini M, Russo N, Chiodo S, et al. Iron chelation by the powerful antioxidant flavonoid quercetin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006; 54: 6343–6351.
171. Kumar S, Gupta A, Pandey AK. *Calotropis procera* root extract has capability to combat free radical mediated damage. *ISRN Pharmacology* 2013; 2013: 8.
172. Kumar S, Pandey AK. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. 2013; 2013:16
173. Cook NC, Samman S. Review: flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *Journal of Nutritional Biochemistry* 1996; 7: 66–76.
174. Rice-Evans CA, Miller NJ, Bolwell PG, et al. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research* 1995; 22: 375–383.

175. Agati G, Azzarello E, Pollastri S, et al. Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant Science* 2012; 196: 67–76.
176. Du F, Zhang F, Chen F et al. Advances in microbial heterologous production of flavonoids. *African Journal of Microbiology Research* 2011; 5: 2566–2574.
177. Middleton E. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1998; 439: 175-182.
178. Middleton E. The flavonoids. *Trends in Pharmacological Sciences* 1984; 5: 335-338.
179. Hollman PCH, Buijsman MNCP, Van Gameren Y, et al. The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Radical Research* 1999; 31: 569-573.
180. Day AJ, Canada FJ, Diaz JC, et al. Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Letters* 2000; 468: 166-170.
181. Walle T. Serial review: flavonoids and isoflavones (phytoestrogens: absorption, metabolism, and bioactivity): absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine* 2004; 36: 829-837.
182. Scheline RR. Metabolism of foreign compounds by gastrointestinal microorganisms. *Pharmacological Reviews* 1973; 25: 451-532.
183. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews* 1998; 56: 317-333.
184. Hollman PCH. Absorption, bioavailability and metabolism of flavonoids. *Pharmaceutical Biology* 2004; 42: 74–83.
185. Hollman PCH, van Trijp JMP, Buysman MNCP et al. Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Letters* 1997; 418: 152–156.
186. Spencer JE, Chaudry F, Pannala AS, et al. Decomposition of cocoa procyanidins in the gastric milieu. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2000; 272: 236–241.

187. Benzie IFF, Szeto YT, Strain JJ, et al. Consumption of green tea causes rapid increase in plasma antioxidant power in humans. *Nutrition and Cancer* 1999; 34: 83-87.
188. Pandey AK, Mishra AK, Mishra A. Antifungal and antioxidative potential of oil and extracts derived from leaves of Indian spice plant *Cinnamomum tamala*. *Cellular and Molecular Biology* 2012; 142-147.
189. Cao G, Sofic E, Prior RL. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine* 1997; 22: 749-760.
190. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press 1998; 136-147.
191. Mishra A, Kumar S, Pandey AK. Scientific validation of the medicinal efficacy of *Tinospora cordifolia*. *The Scientific World Journal* 2013; 2013: 8.
192. Kumar S, Pandey AK. Antioxidant, lipo-protective and antibacterial activities of phytoconstituents present in *Solanum xanthocarpum* root. *International Review of Biophysical Chemistry* 2012; 3: 42-47.
193. Mishra A, Sharma AK, Kumar S, et al. *Bauhinia variegata* leaf extracts exhibit considerable antibacterial, antioxidant and anticancer activities. *BioMed Research International* 2013; 2013: 915436.
194. Van A, Van den Berg SABE, Tromp DJMNJL, et al. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine* 1996; 20: 331-342.
195. Kerry NL, Abbey M. Red wine and fractionated phenolic compounds prepared from red wine inhibit low density lipoprotein oxidation in vitro. *Atherosclerosis* 1997; 135: 93-102.
196. Sekher Pannala A, Chan TS, O'Brien PJ, et al. Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001; 282: 1161-1168.

197. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine* 1996; 20: 933–956.
198. Bors W, Heller W, Michel C, et al. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods in Enzymology* 1990; 186: 343–355.
199. Hollman PC, Bijlsman MN, Van Gameren Y, et al. The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Radical Research* 1999; 31: 569–573.
200. Vennat B, Bos MA, Pourrat A, et al. Procyanidins from tormentil: fractionation and study of the anti-radical activity towards superoxide anion. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 1994; 17: 1613–1615.
201. Tapas AR, Sakarkar DM, Kakde RB. Flavonoids as nutraceuticals: a review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 2008; 7: 1089–1099.
202. Zhu W, Jia Q, Wang Y, et al. Theanthocyanin cyanidin-3-O- β -glucoside, a flavonoid, increases hepatic glutathione synthesis and protects hepatocytes against reactive oxygen species during hyperglycemia: involvement of a cAMP/PKA-dependent signaling pathway. *Free Radical Biology and Medicine* 2012; 52: 314–327.
203. Spencer JPE, Vauzour D, Rendeiro C. Flavonoids and cognition: the molecular mechanisms underlying their behavioural effects. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2009; 492: 1–9.
204. Kim SM, Kang K, Jho EH, et al. Hepatoprotective effect of flavonoid glycosides from *Lespedeza cuneata* against oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide. *Phytotherapy Research* 2011; 25: 1011–1017.
205. Mishra A, Kumar S, Bhargava A, et al. Studies on invitro antioxidant and anti-staphylococcal activities of some important medicinal plants. *Cellular and Molecular Biology* 2011; 57: 16–25.

206. Pandey AK, Mishra AK, Mishra A, et al. Therapeutic potential of *C. zeylanicum* extracts: an antifungal and antioxidant perspective. *International Journal of Biological and Medical Research* 2010; 1: 228–233.
207. Cushnie TPT, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2005; 26, 343–356.
208. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 1999; 12: 564–582.
209. Mishra AK, Mishra A, Kehri HK, et al. Inhibitory activity of Indian spice plant *Cinnamomum zeylanicum* extracts against *Alternaria solani* and *Curvularia lunata*, the pathogenic dematiaceous moulds. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2009; 8: 9.
210. Pan MH, Lai CS, Ho CT. Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. *Food and Function* 2000; 1: 15–31.
211. Middleton E, Kandaswami C. Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. *Biochemical Pharmacology* 1992; 43:1167–1179.
212. Nishizuka Y. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* 1988; 334: 661–665.
213. Hunter T. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling *Cell* 1995; 80: 225–236.
214. Tunon MJ, Garcia-Mediavilla MV, Sanchez-Campos S, et al. Potential of flavonoids as antiinflammatory agents: modulation of pro-inflammatory gene expression and signal transduction pathways. *Current Drug Metabolism* 2009; 10: 256–271.
215. Manthey JA. Biological properties of flavonoids pertaining to inflammation. *Microcirculation* 2000; 37: 29-34.
216. Cumella JC, Faden H, Middleton F. Selective activity of plant flavonoids on neutrophil chemiluminescence (CL). *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1987; 77: 131.

217. Beretz A, Cazenave JP. The effect of flavonoids on bloodvessel wall interactions. *Plant Flavonoids in Biology and Medicine II: Biochemical, Cellular and Medicinal Properties*, 1988: 187: 8.
218. Corvazier, Maclouf J. Interference of some flavonoids and non-steroidal anti-inflammatory drugs with oxidative metabolism of arachidonic acid by human platelets and neutrophils. *Biochimica et Biophysica Acta* 1985; 835: 315– 321.
219. Koen B, Ruth V, Guido V, et al. Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity. *Journal of Biological Chemistry* 2005; 280: 5636–5645.
220. Duthie GG, Duthie SJ, Kyle JAM. Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. *Nutrition Research Reviews* 2000; 13: 79-106.
221. Davis WL, Matthew SB. Antioxidants and cancer III: quercetin. *Alternative Medicine Review* 2000; 5: 196– 208.
222. Ferry DR, Smith A, Malkhandi J. Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for in vivo tyrosine kinase inhibition. *Clinical Cancer Research* 1996; 2: 659–668.
223. Singhal RL, Yeh YA, Prajda N, et al. Quercetin down-regulates signal transduction in human breast carcinoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1995; 208: 425–431.
224. Gerdin B, Srenso E. Inhibitory effect of the flavonoid on increased microvascular permeability induced by various agents in rat skin. *International Journal of Microcirculation. Clinical and Experimental* 1983; 2: 39–46.
225. Cushnie TPT, and Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2005; 26: 343-356.
226. Critchfield JW, Butera ST, Folks TM. Inhibition of HIV activation in latently infected cells by flavonoid compounds. *AIDS Research and Human Retroviruses* 1996; 12: 39– 46.

227. Zandi K, Teoh BT, Sam SS, et al. Antiviral activity of four types of bioflavonoid against dengue virus type-2. *Virology Journal* 2011; 8: 560
228. Gerdin B, Srenso E. Inhibitory effect of the flavonoid on increased microvascular permeability induced by various agents in rat skin. *International Journal of Microcirculation* 1983; 2: 39–46.
229. Formica JV, Regelson W. Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol* 1995; 33: 1061–1080.
230. Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. *Sci World J* 2013; 2013.
231. Moon JH, Tsushida T, Nakahara K, et al. Identification of quercetin 3-O- β -D-glucuronide as an antioxidative metabolite in rat plasma after oral administration of quercetin. *Free Radic Biol Med* 2001; 30: 1274–1285.
232. Bors W, Michel C, Saran M. Flavonoid antioxidants: Rate constants for reactions with oxygen radicals. *Methods Enzymol* 1994; 234: 420–442.
233. Prior RL. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *Am J Clin Nutr* 2003; 78: 570–578.
234. Erkoç S, Erkoç F, Keskin N. Theoretical investigation of quercetin and its radical isomers. *J Mol Struct THEOCHEM* 2003; 631: 141–146.
235. Kampa M, Hatzoglou A, Notas G, et al. Wine antioxidant polyphenols inhibit the proliferation of human prostate cancer cell lines. *Nutr Cancer* 2000; 37: 223–233.
236. Morand C, Crespy V, Manach C, et al. Plasma metabolites of quercetin and their antioxidant properties. *Am. J. Physiol* 1998; 275: 212–219.
237. Cornard JP, Dangleterre L, Lapouge C. Computational and spectroscopic characterization of the molecular and electronic structure of the Pb(II)-quercetin complex. *J Phys Chem A* 2005; 109: 10044–10051.
238. Williams CA; Grayer RJ. Anthocyanins and other flavonoids. *Nat Prod Rep* 2004; 21: 539–573.

239. Nam JS, Sharma AR, Nguyen LT, et al. Application of Bioactive Quercetin in Oncotherapy: From Nutrition to Nanomedicine. *Molecules* 2016; 21: E108.
240. Jackson MJ. The assessment of bioavailability of micronutrients: Introduction. *Eur J Clin Nutr* 1997; 51: 1–2.
241. Tamura G, Gold C, Ferro-Luzzi A, et al. Fecalase: A model for activation of dietary glycosides to mutagens by intestinal flora. *Proc Natl Acad Sci* 1980; 77: 4961–4965.
242. Crespy V, Morand C, Besson C, et al. Quercetin, but not its glycosides, is absorbed from the rat stomach. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 618–621.
243. Lowe SW, Lin AW. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 2000; 21: 485–495.
244. Chien SY, Wu YC, Chung JG, et al. Quercetin-induced apoptosis acts through mitochondrial- and caspase-3-dependent pathways in human breast cancer MDA-MB-231 cells. *Hum Exp Toxicol* 2009; 28: 493–503.
245. Kerr JF. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology* 2002; 182: 471–474.
246. Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994; 73: 2013–2026.
247. Susan E. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* 2007; 35: 495–516.
248. Hitoshi Y, Lorens J, Kitada SI, et al. Toso, a cell surface, specific regulator of Fas-induced apoptosis in T cells. *Immunity* 1998; 8: 461–471.
249. Schuler M, Green DR. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem Soc Trans* 2001; 29: 684.
250. Schwartz LM, Smith SW, Jones ME, et al. Do all programmed cell deaths occur via apoptosis? *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 980–984.
251. Khajapeer KV, Baskaran R. Natural Products for Treatment of Chronic Myeloid Leukemia. *Intech* 2016; 8-1.

QUERCETİNİN KML KÖK HÜCRELERİ ÜZERİNE SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN MOLEKÜLER DÜZEYDE İNCELENMESİ

ORIJINALLIK RAPORU

%8

BENZERLİK ENDEKSİ

%8

İNTERNET
KAYNAKLARI

%3

YAYINLAR

%

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

dergipark.ulakbim.gov.tr

İnternet Kaynağı

%2

2

onkder.org

İnternet Kaynağı

%2

3

angora.baskent.edu.tr

İnternet Kaynağı

%1

4

acikerisim.deu.edu.tr

İnternet Kaynağı

%1

5

docplayer.biz.tr

İnternet Kaynağı

%1

6

pt.scribd.com

İnternet Kaynağı

<%1

7

thd.org.tr

İnternet Kaynağı

<%1

8

www.egetipdergisi.com.tr

İnternet Kaynağı

<%1

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER:

Adı, Soyadı: Günsu AYDIN

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 8 Nisan 1991, İstanbul

Medeni Durumu: Bekâr

Tel: +90 352 437 93 00

Fax: +90 352 437 93 01

email: gunsuaydinn@gmail.com

Yazışma Adresi: Erciyes Üniversitesi BSL2/BSL3/ABSL3 Laboratuvarları

Talas/KAYSERİ

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	EÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2017
Lisans	İÜ Fen Fakültesi Biyoloji	2013
Lise	Atatürk Anadolu Lisesi, İstanbul	2009

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2013	EÜ Flowsitometri Laboratuvarı	Öğrenci Personel
2015	EÜ GENKÖK	Öğrenci Personel

YABANCI DİL

İngilizce

YAYINLAR

- Özçoban Ö. ,Aydın G., Ünal A., "Tümör Hücreleri ile Uyarılmış Periferik Kan Mononükleer Hücrelerden Dendritik Hücre Üretilmesi (Tümör Aşısı Üretilmesi)", 1.Uluslararası Katılımlı Kök Hücre Ve Hücresel Tedaviler Kongresi, KOCAELİ, TÜRKİYE, 20-23 Mart 2014, pp.37-37

2. Birekul A. , Özçoban Ö., Ünal A., Turak E., Pala Ç. , Kaynar L., Keklik M., Eser B., Çetin M. , Aydın G., "Hematolojik Maligniteli Ve Solid Tm.Lü Hastalarda Kök Hücre Mobilizasyonunda, Plerixafor'Un (Mozobil) Etkinliği", Deneysel Hematoloji Kongresi&EBMT Highlight, NEVŞEHİR, TÜRKİYE, 18-20 Nisan 2014, pp.38-38
3. Ünal A., Birekul A., Özçoban Ö., Pala Ç., Turak E., Kaynar L., Aydın G., Keklik M., Şıvgın S., Eser B., Çetin M. , "Primary Myelofibrosis Successfully Treated With Alpha Beta Depleted Full Match Allogeneic Stem Cell Transplantation After Reduced İntensity Conditioning", Deneysel Hematoloji Kongresi&EBMT Highlight, NEVŞEHİR, TÜRKİYE, 18-20 Nisan 2014, pp.27-27
4. Aycan Gundogdu, Huseyin Kilic, Aysegul Ulu Kilic, Gunsu Aydin, Emine Alp, "Epidemiology of nosocomial bloodstream infections in Turkish pediatric patients: a 1-year retrospective study", The 7th Eurasia Congress of Infectious Diseases, Tbilisi, Georgia, 30 September- 3 October 2015, pp.161-161
5. Gündoğdu A., Kiliç H., Ulu Kiliç A., Aydın G., Alp Meşe E., "Epidemiological features of nosocomial bloodstream infections in pediatric patients", Klimik Dergisi, vol.29, pp.29-35