



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



**PI3K İNHİBİTÖRÜ VE PONATİNİB
KOMBİNASYONUNUN KRONİK MYELOİD
LÖSEMİ HÜCRE HATTI ÜZERİNDEKİ
ANTİKANSER ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Çağla YURT

Temel Onkoloji Anabilim Dalı

İzmir
2025

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**PI3K İNHİBİTÖRÜ VE PONATİNİB
KOMBİNASYONUNUN KRONİK MYELOİD
LÖSEMİ HÜCRE HATTI ÜZERİNDEKİ
ANTİKANSER ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Çağla YURT

Prof. Dr. Cumhuri GÜNDÜZ

Temel Onkoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Programı

İzmir
2024

Tez Değerlendirme Kurulu Üyeleri

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Prof.Dr.

(Danışman)

Üye : Prof.Dr.

Üye : Prof.Dr.

Üye : Prof.Dr.

Üye : Prof.Dr.

Yüksek lisans tezinin kabul edildiği tarih:

Önsöz

Yüksek lisans eğitimim bana hem bilimsel hem kişisel anlamda çok şey öğretti. Bana kattığı akademik bilgi ve birikimin yanında zorlandığım şartların üstesinden nasıl kalkacağımı öğretti. Lisans eğitimim boyunca hep hayalini kurduğum bu yüksek lisans eğitimini bitirdiğim için kendimle gurur duyuyorum ama ayrıca bu çalışma, çok sayıda bireyin rehberliği ve desteği olmadan mümkün olmazdı.

Benden yardımını ve desteğini esirgemeyen ailem, arkadaşlarım sayesinde kendimi daha çok geliştirme fırsatı buldum.

Bu yolculuğu daha az yalnız hale getiren bölümdeki arkadaşlarıma destekleri yardımları için özel teşekkürlerimi sunarım.

İzmir, 19.02.2025

Çağla YURT

Özet

PI3K İnhibitörü ve Ponatinib Kombinasyonunun Kronik Miyeloid Lösemi Hücre Hattı Üzerindeki Antikanser Etkilerinin Araştırılması

Kronik miyeloid lösemi (KML) tedavisi için yeni terapötik stratejiler oluşturulması amacıyla yapılan bu araştırmada, KML'nin ayırt edici özelliği olan BCR-ABL'yi inhibe eden ponatinib ve fosfoinozitid 3-kinazları (PI3K'lar) hedef alan sentetik molekül inhibitörü LY294002'nin etkileri incelenmiştir. Ponatinib, diğer tirozin kinaz inhibitörlerinin etkili olmadığı veya BCR-ABL genindeki mutasyonlar nedeniyle oluşan ilaç direncine karşı geliştirilen bir inhibitördür. LY294002 ise çeşitli kanser türlerinde, KML dahil, hücre büyümesi, sağkalımı ve proliferasyonunda önemli rol oynayan PI3K'ları hedef alır. Tez çalışmamızda ilk olarak proliferasyon deneyi ile deneylerde kullanılmak üzere kuyucuk başına düşen optimum hücre sayısı belirlenmiştir. Daha sonrasında her iki etken maddenin tekli uygulamalarının sitotoksik etkisi CCK-8 deneyi ile tespit edilmiştir. Elde edilen IC50 değerlerine göre kombinasyon uygulaması yapılmıştır. Ponatinibin IC50 değeri K562 hücre hattında 108,6 nM (48. saat) ve LY294002'nin IC50 değeri 45,88 µM (48. saat) olarak belirlenmiştir. Ponatinib ve LY294002'nin kombinasyon halinde uygulandığında hücre apoptozu üzerindeki etkisi, kontrol grubuna ve tek başına kullanımlarına kıyasla apoptozu daha fazla indüklediği ve hücre proliferasyonunu daha fazla inhibe ettiği tespit edilmiştir. CFSE proliferasyon deneyinde bu kombinasyonun sinerjik bir etki yarattığı ve hücre proliferasyonunda en büyük azalmayı sağladığı belirlenmiştir.

Bu tez, KML hücrelerinin büyümesini ve hayatta kalmasını engellemede ponatinib ve LY294002'nin kombinasyonunun etkili olabileceğini ve kronik miyeloid lösemi tedavisi için yeni terapötik stratejiler geliştirilmesine katkı sağlayabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler; LY294002, Ponatinib, Kronik Miyeloid Lösemi

Abstract

Investigation of the Anticancer Effects of the Combination of PI3K Inhibitor and Ponatinib on the Chronic Myeloid Leukemia Cell Lines

This study, designed to develop new therapeutic strategies for the a cure of chronic myeloid leukemia (CML), evaluated the effects of ponatinib, which inhibits BCR-ABL, the hallmark of CML, and LY294002, a synthetic molecule that inhibits phosphoinositide 3-kinases (PI3Ks). Ponatinib is an inhibitor being developed against drug resistance due to mutations in the BCR-ABL gene or in cases where other tyrosine kinase inhibitors are not effective. LY294002 targets PI3Ks, which are critical for cell growth, survival and proliferation in various cancers, including CML. In our dissertation study, we first determined the optimal number of cells per well used in experiments using a proliferation assay. The cytotoxic effect of single doses of both compounds was then demonstrated by the CCK-8 assay. The combination assay was performed according to the IC₅₀ values obtained. The IC₅₀ value of ponatinib was 108.6 nM (48th hour) and the IC₅₀ value of LY294002 was 45.88 μM (48th hour) in the K562 cell model. The combination effect of ponatinib and LY294002 on cell apoptosis was more efficient in inducing apoptosis and inhibiting cell proliferation than the control group and when used individually. In the CFSE proliferation assay, this combination was found to have a synergistic effect and provided the highest reduction in cell proliferation.

These thesis demonstrate that the combination of ponatinib and LY294002 can efficiently inhibit the growth and survival of CML cells and could contribute to the development of new therapeutic strategies for the treatment of CML.

Keywords; LY294002, Ponatinib, Chronic Myeloid Leukemia

İçindekiler

Önsöz	II
Özet.....	III
Abstract.....	IV
İçindekiler	V
Tablolar Dizini.....	VII
Şekiller Dizini.....	VIII
Grafikler Dizini	IX
Kısaltma Listesi	X
1. Giriş	1
1.1. Araştırmanın Problemi.....	1
1.2. Araştırmanın Sorusu.....	1
1.3. Araştırmanın Hipotezleri	2
1.4. Araştırmanın Varsayımları.....	2
1.5. Araştırmanın Sınırlılıkları	2
1.6. Araştırmanın Amacı	2
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kronik Miyeloid Lösemi (KML).....	3
2.2. Epidemiyoloji.....	5
2.3. Etiyoloji	5
2.4. KML'nin Moleküler Patogenezi	5
2.5. Klinik Karakteristik.....	6
2.5.1. Kronik Faz	6
2.5.2. Akseler Faz.....	6
2.5.3. Blastik Faz.....	7
2.6. Ponatinib	7
2.7. PI3K İnhibitörü LY294002	8
3. Gereç ve Yöntem	10
3.1. Araştırma Evreni ve Örneklem	10
3.2. Araştırmanın Değişkenleri	10
3.3. Araştırmanın Yeri ve Zamanı.....	10
3.4. Veri Toplama Araçları ve Uygulamaları	10

3.5. Veri Analizi	10
3.6. Araştırma Etiği.....	11
3.7. Hücre Kültürü	11
3.7.1. Dondurulan Hücrelerin Çözdürülmesi	12
3.7.2. Hücre Canlılığının Kontrol Edilmesi.....	13
3.7.3. Hücre Pasaj İşlemleri.....	14
3.7.4. Hücrelerin Dondurulması İşlemi	15
3.8. PI3K İnhibitörü (LY294002) Etken Maddesinin Hazırlanması	15
3.9. Ponatinib'in Hazırlanması	16
3.10. Hücre Proliferasyon Deneyi	17
3.11. CFSE Proliferasyon Deneyi.....	18
3.12. Sitotoksikite Deneyi (CCK-8).....	19
3.13. Apoptoz Deneyi (Annexin V-FITC).....	21
4. BULGULAR	23
4.1. Proliferasyon Deneyi ile Uygun Hücre Konsantrasyonunun Saptanması	23
4.2. LY294002 Ajanının Hücre Hattı Üzerindeki Sitotoksik Etkisi.....	23
4.3. Ponatinib'in K562 Hücre Hattı Üzerindeki Sitotoksik Etkisi.....	24
4.4. Ponatinib ve LY294002 Etken Maddelerinin ve Ponatinib+LY294002 Kombinasyonunun K562 Hücre Hattı Üzerinde Apoptotik Etkilerinin Değerlendirilmesi	25
4.5. Ponatinib ve LY294002 Etken Maddelerinin ve Ponatinib+LY294002 Kombinasyonunun K562 Hücre Hattı Üzerinde Hücre Proliferasyonu Etkilerinin Değerlendirilmesi	28
5. Tartışma	31
6. Sonuç ve Öneriler	36
7. Kaynaklar	37
8. Teşekkür.....	41
9. Özgeçmiş	42

Tablolar Dizini

Tablo 1: K562 Hücre Hattının Karakteristiği (ATCC, 2024)	12
Tablo 2: Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan medyum ve takviyelerin adları ve oranları	12
Tablo 3: PI3K İnhibitörünün (LY294002) Özellikleri	15
Tablo 4: Ponatinib'in özellikleri (Selleckchem, 2024)	16
Tablo 5: Hücre Proliferasyon Deneyi Plak Düzeni	18
Tablo 6: Hücrelere verilen etken maddelerin konsantrasyonları	20
Tablo 7 : K562 hücre hattında, kontrol ve deney gruplarının apoptoz ve hayatta kalma oranları	27



Şekiller Dizini

Şekil 1 : t(9:22) translokasyonu ve KML fenotipinin ortaya çıkışı.....	4
Şekil 2: Ponatinibin Kimyasal Yapısı (O'Hare ve ark., 2009).	8
Şekil 3: K562 hücre hattının mikroskop altında görüntüleri (ATCC, 2024).	11
Şekil 4: LY294002'nin Kimyasal Yapısı (Selleckchem, 2024).....	16
Şekil 5: Ponatinibin Kimyasal Yapısı (Selleckchem, 2024)	16
Şekil 6: (Thermo Scientific) Multiskan FC Mikroplaka Okuyucu	17



Grafikler Dizini

Grafik1: K562 hücreleri üzerindeki LY294002'nin doza ve zamana bağlı canlılık grafiği	24
Grafik 2: K562 hücreleri üzerindeki Ponatinib'in doza ve zamana bağlı canlılık grafiği	25
Grafik 3: K562 Hücrelerinde Ponatinib ve LY294002'nin tekli ve kombinasyonunun apoptoz grafiği	26
Grafik 4: Deney gruplarının kontrole göre apoptoz kat değişimi	27
Grafik 5: K562 hücre hattında CFSE etiketli Kolşisin ve Kontrol eğrisi.....	28
Grafik 6: K562 hücre hattında CFSE etiketli LY294002 ve Ponatinib eğrisi.....	29
Grafik 7: K562 hücre hattında CFSE etiketli Kombinasyon + Kontrol + Kolşisin eğrisi	30



Kısaltma Listesi

PI3K	: Fosfoinozid 3-kinaz
KML	: Kronik Miyeloid Lösemi
ALL	: Akut Lenfoblastik Lösemi
AML	: Akut Miyeloid Lösemi
KLL	: Kronik Lenfositik Lösemi
AP	: Akseler Faz
BP	: Blastik Faz
Ph	: Philadelphia kromozomu
TKI	: Tirozin kinaz inhibitörü
ATP	: Adenozin trifosfat
MAPK	: Mitojen-aktive protein kinaz
AKT	: Protein kinaz B
TGF- β	: Transforming growth factor beta
ATCC	: Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
IC50	: Yarı maksimum inhibitör konsantrasyonu
FITC	: Flüoresin izosiyanat
PI	: Propidyum iyodür
IMDM	: Iscove'nin Modifiye Dulbecco'su Ortamı
FBS	: Fetal sığır serumu
DMSO	: Dimetil sülfoksit

CO ₂	: Karbon dioksit
°C	: Santigrat derece
dk	: Dakika
mL	: Mililitre
µL	: Mikrolitre
nm	: Nanometre
nM	: Nanomolar
µM	: Mikromolar
CCK8	: Hücre Sayım Kiti-8
CFSE	: Karboksi fluorescein suksinimidil ester
dPBS	: Dulbecco'nun fosfat tamponlu tuzu
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
WST	: Su çözümlü tetrazolyum tuzları
MST	: Medyan sağkalım süresi
XTT	: 2,3-Bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfenil)-2H-tetrazolium-5-karboksanilid

1. Giriş

1.1. Araştırmanın Problemi

Dünya geneline ve ülkemize bakıldığında en yüksek ikinci ölüm oranına sahip hastalık kanserdir. Hastalar için kanser türüne göre tedavi planları yapılmakta ve yeni tedavi yöntemleri geliştirilmeye devam edilmektedir. Kanser hücrelerinin tedavi sürecinde kazandığı ilaç direnci, miyeloid lösemi için geliştirilen alternatif yöntemleri etkinliğini kısıtlamaktadır. PI3K (Fosfoinozimid 3-kinaz) sinyal yolu, kemik iliğinden kaynaklanan bir kanser türü olan Kronik Miyeloid Lösemide (KML) çok önemli bir rol oynar. LY294002, PI3K sinyal yolunda yer alan enzimler olan fosfoinozimid 3-kinazların (PI3K'lar) güçlü bir inhibitördür.

Tirozin kinaz inhibitörü Ponatinib, kronik miyeloid lösemide lösemi hücrelerinin büyümesine neden olan BCR-ABL proteinini hedef alır.

Tirozin kinaz inhibitörleri gibi lösemi hücrelerinin büyümesinde rol oynayan sinyal yollarını hedef alan tedavilerin varlığına rağmen, ilaç direnci KML tedavisinde önemli bir engel olmaya devam etmektedir.

Bu nedenle, Ponatinib ve LY294002 etken maddelerinin kombinasyon uygulaması kronik miyeloid lösemi hücrelerinin büyümesini, çoğalmasını engellemeyi ve olası yeni tedavilerin geliştirilmesi için yapılacak olan araştırmalara yardımcı olacağını düşünmekteyiz.

KML'li hastaların tedavi sonuçlarını iyileştirmek için kombinasyon tedavileri gibi yeni terapötik stratejilerin araştırılmasına ihtiyaç vardır.

1.2. Araştırmanın Sorusu

Hedefe yönelik tedavi için kullanılan Ponatinib ve PI3K inhibitörü etken maddelerinin eşzamanlı uygulanarak KML hücre hattında oluşturabilecek antikanser etkilerin incelenmesi hedeflenmiştir. Ponatinib ve LY294002 etken maddelerinin kronik miyeloid lösemi üzerine etkilerini araştıran çeşitli çalışmalar mevcuttur. Güncel literatüre bakıldığında Ponatinib ve LY294002 etken maddelerinin kombinasyon çalışması bulunmamaktadır. Bu iki etken maddenin etkileşimlerinin potansiyelini, lösemi hücresinin sağkalımını ve proliferasyon üzerindeki etkilerini ve ayrıca önemli sinyal yollarını inhibe etme potansiyelleri araştırılacaktır.

1.3. Araştırmanın Hipotezleri

Çalışmamızda, ponatinib ve LY294002 tek başlarına ve birlikte kullanıldıklarında K562 hücre hattı üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkileri belirlenecektir. Hipotezimiz, ponatinib ve LY294002 etken maddelerinin K562 hücre hattında hücre proliferasyonu azaltacağı ve apoptotik etkiyi arttıracığı yönündedir.

1.4. Araştırmanın Varsayımları

Çalışmamızda Ponatinib ve PI3K inhibitörünün tekli ve kombinasyon halinde uygulandıklarında K562 kronik miyeloid lösemi hücre hattı üzerindeki kombinasyon uygulamasının tekli uygulamalara kıyasla terapötik etkinliğin artmasına ve potansiyel olarak ilaç direnci mekanizmalarının üstesinden gelinmesine yol açacağı düşünölmektedir.

1.5. Araştırmanın Sınırlılıkları

Ponatinib'in kronik miyeloid lösemi üzerindeki güçlü etkinliğine rağmen ilaç direnci KML tedavisinde önemli bir zorluk olmaya devam etmektedir. Aynı şekilde zamanla kullanılacak olan PI3K inhibitörüne karşı da ilaç direnci oluşabilir. Kombinasyon uygulaması direnç mekanizmalarını geciktirebilir veya üstesinden gelebilir, ancak bu yaklaşımın uzun vadeli etkinliği daha fazla araştırma gerektirmektedir.

1.6. Araştırmanın Amacı

Tez çalışmasında amaç, ponatinib ve LY294002'nin kombine edilmesinin kronik miyeloid lösemi hücre hattı üzerindeki antikanser etkilerini araştırmaktır. Bu kombinasyon çalışmasında hücre sağkalım oranının azalması ve hücre proliferasyonu inhibisyonu amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kronik Miyeloid Lösemi (KML)

Dünya popülasyonunu en çok etkileyen malign hastalıklardan biri olan lösemi, kan kanseri olarak tanımlanır (Tebbi, 2021). Lösemi hem miyeloid hem de lenfoid öncüllere yol açabilen kemik iliğindeki hematopoietik kök hücrelerin malign transformasyonu ve anormal hücrelerin kontrolsüz çoğalması nedeniyle oluşur (America).

Kemik iliğinin normal işlevini engelleyerek yerini alır ve sağlıklı kan hücresi üretiminin kaybına yol açar. Anormal kan hücrelerinin artmasıyla birlikte lösemi hastalarında yorgunluk, ateş, eklem ağrısı, kilo kaybı ve kolayca morarma ve kanama belirtileri gözlenmeye başlar (Davis, Viera, & Mead, 2014).

Lösemi oluşan anormal hücrelerin çoğalma hızına göre iki ana gruba ayrılır: akut veya kronik. Köken hücresine göre ise miyeloid veya lenfoid olarak gruplandırılır (America). Lösemi türleri, lenfoid ve miyeloid soyların yanı sıra aynı zamanda hastalığın hızına göre ise akut ve kronik olarak geniş bir sınıflamaya tabi tutulmaktadır (Whiteley, Price, Cantelli, & Sipkins, 2021). Akut lösemiler, köken aldıkları hücre türüne göre geniş bir sınıflamaya tabi tutulmakta olup, akut lenfoblastik lösemi (ALL) ve akut miyeloblastik lösemi (AML) olarak iki ana kategoriye ayrılır. Ayrıca, kronik lösemiler Kronik Miyeloid Lösemi (KML) ve Kronik Lenfositik Lösemi (KLL) olarak kendi gruplarına ayrılmaktadır (Shroff ve ark., 2019).

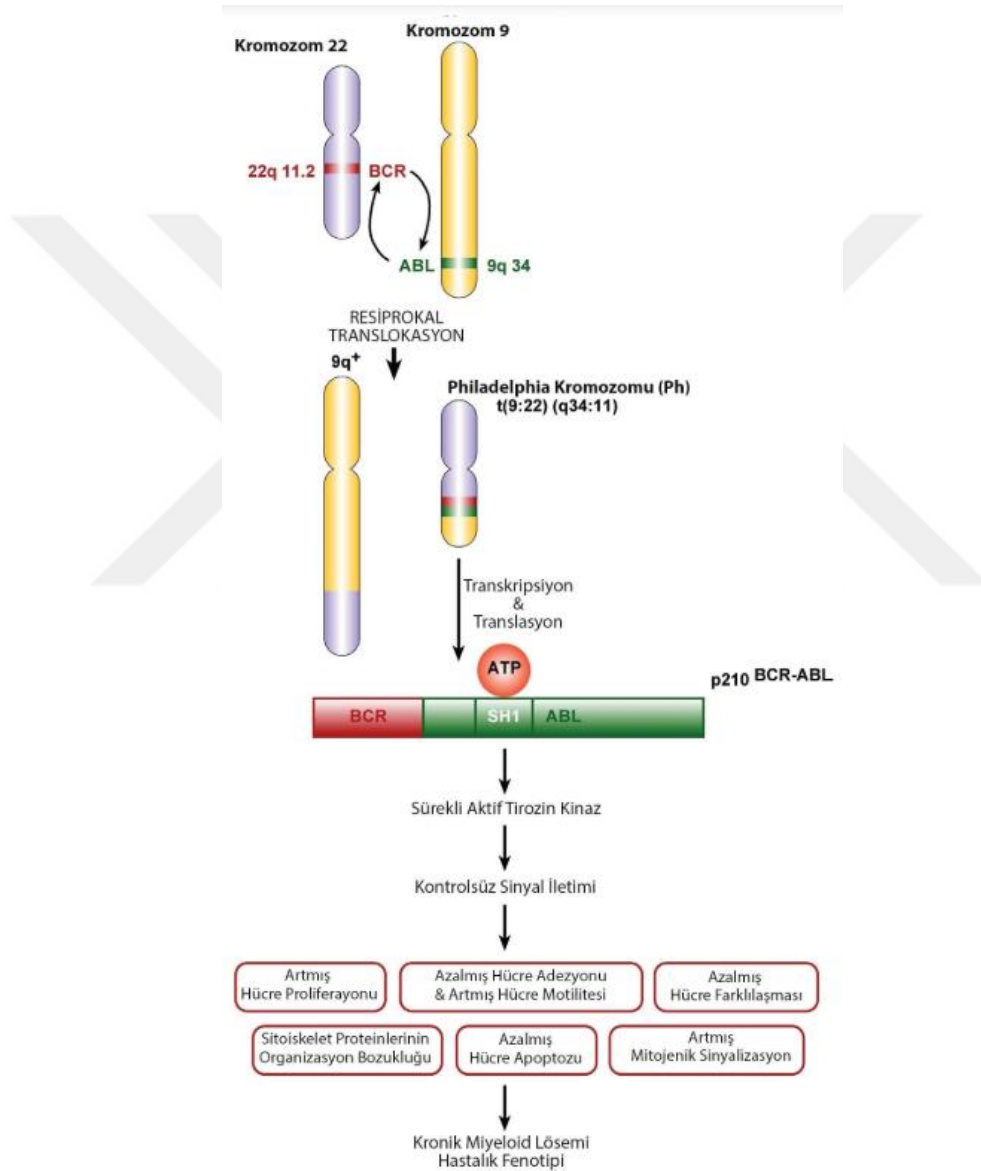
Akut miyeloblastik lösemide kemik iliği çok sayıda olgunlaşmamış blastlar tarafından karakterize olur ve blastların aşırı proliferasyonu hastalığın hızlı ilerlemesine yol açar. Akut lenfoblastik lösemi ise olgunlaşmamış lenfoid hücrelerin aşırı proliferasyonu ile ortaya çıkar.

Akut lösemilerin aksine kronik lösemiler, KLL ve KML daha yavaş ilerler ancak olgunlaşmamış blastlar yerine olgunlaşmış hücrelerin aşırı proliferasyonu daha çok gözlenir (America) (Shroff ve ark., 2019). Kronik Miyeloid Lösemi (KML), hematopoetik kök hücrenin neoplastik transformasyonu sonucu oluşan klonal bir hastalık olarak karakterize edilmektedir (Bonifacio, Stagno, Scaffidi, Krampera, & Di Raimondo, 2019).

Kronik miyeloid lösemi için moleküler bir belirteç olan Philadelphia kromozomu, 9.kromozom ve 22. kromozom arasında gerçekleşen resiprokal translokasyon sonucu oluşur (Nowell & Hungerford, 2004).

Kromozom 9’ da yerleşik Abelson1 (ABL1) proto-onkogeni geni ve kromozom 22’ de “Breaking Point Cluster” (BCR) geninin birleşimi, BCR-ABL1 füzyon genini ortaya çıkarır (Bonifacio ve ark., 2019)

BCR-ABL1 füzyon geni, t(9:22) translokasyonu sonucu oluşur ve hücrelerin kontrolsüz çoğalmasını ve apoptoza direncini indükleyen yapısal açıdan aktif bir tirozin kinaz aktivitesine sahip bir BCR-ABL1 onkoproteinini kodlar (Izzo ve ark., 2015; Kang ve ark., 2016).



Şekil 1 : t(9:22) translokasyonu ve KML fenotipinin ortaya çıkışı (Frazer, Irvine, & McMullin, 2007).

BCR-ABL1, terapötik yaklaşım için bir hedeftir ve KML tedavisinde devrim yaratan BCR-ABL1 tirozin kinaz inhibitörlerinin geliştirilmesine olanak sağlamıştır (Anindita, Marnolia, Putra, Haikal, & Tambunan, 2018).

2.2. Epidemiyoloji

Kronik Miyeloid Lösemi (KML), 100.000 yetişkin başına 1-2 vaka görülme sıklığına sahip miyeloproliferatif bir neoplazmdir (Jabbour & Kantarjian, 2022). Yetişkin lösemi olgularının %15- %20'sini oluşturur ve çocuklarda daha nadir görülür ve ortalama tanı yaşı 56 ve 60 olduğu belirlenmiştir (Höglund, Sandin, & Simonsson, 2015). İnsidans oranları yaşla birlikte yükselir ve en yüksek insidans ileri yaş gruplarında daha çok görülmektedir (Rohrbacher & Hasford, 2013). Bildirilen vakalarda KML erkeklerde kadınlardan daha sık görülür (Höglund ve ark., 2015).

Son çalışmalar, KML hastalarının 70 yaş üstü hastalarda göreceli sağkalım oranının düştüğünü göstermektedir (Hu ve ark., 2021).

2.3. Etiyoloji

KML'nin etiyojisi öncelikle Philadelphia kromozomuna varlığı ile ilişkilendirilir ve buna ek olarak çevresel faktörler ve genetik varyantlar da KML'nin gelişimine katkıda bulunan faktörler olarak görülmüştür fakat KML'nin ailesel yatkınlığı nadirdir (Padmavathi, Banik, Roy, Monisha, & Kunnumakkara, 2017) (Aitken ve ark., 2021). Akut radyasyona maruz kalma haricinde, KML'nin etiyojisi bilinmemektedir (Szymańska & Park, 2019).

Ayrıca KML'de hastalığın gelişiminden hangi moleküler mekanizmaların sorumlu olduğu ve henüz tam olarak aydınlatılmamıştır (Chandran ve ark., 2019).

2.4. KML'nin Moleküler Patogenezi

Kronik Miyeloid Lösemi'nin moleküler patogenezi öncelikli olarak Philadelphia kromozomu olarak bilinen dengeli resiprokal translokasyon t(9;22) sonucu oluşan BCR-ABL1 füzyon geninin varlığına dayanmaktadır (Shanmuganathan, Chereda, & Melo, 2021). Bu füzyon geninin kodladığı onkoprotein hastalığın gelişiminden ve ilerlemesinden sorumludur (Tan ve ark., 2021).

Ek olarak KML hücrelerinin malign transformasyonunu ve kontrolsüz hücre proliferasyonunu indükler (Peng ve ark., 2021).

2.5. Klinik Karakteristik

KML sırasıyla üç farklı safhadan geçerek ilerler: Kronik faz, akseler faz ve son olarak blast fazı. KML'nin klinik belirtileri trombositoz, trombositopeni, hepatomegali, splenomegali ve dolaşımda olgunlaşmamış granülositlerin varlığı olarak sıralanır. Hastalık ilk olarak kronik faz ile ortaya çıkar. Ardından akseler (hızlandırılmış) faz izler ve son olarak ölümcül patlama fazı olarak blastik faz gelir.

KML'nin semptomları evrelerine bağlı olarak ortaya çıkar. Özellikle hiperlökositoz tüm evrelerde görülebilir (Rinaldi & Winston, 2023).

2.5.1. Kronik Faz

KML hastalarının çoğu, kronik fazda belirti göstermez ve lökositozu gösteren rutin tam kan sayımı ile saptanabilir. KML, kronik fazda çoğunlukla anemi ve splenomegali ile ilişkili semptomlarla ortaya çıkar. Kronik faz çoğunlukla KML'de olgun miyeloid hücrelerin klonal genişlemesi ile başlar (Bonifacio ve ark., 2019). Kronik fazda hastalar genellikle tirozin kinaz inhibitör tedavilerine cevap verirler. Tedavi olmazsa akseler faza ve blast fazına ilerleyebilir.

KML hastalarının yaklaşık %90'ı kronik fazdayken teşhis edilir (Braun, Eide, & Druker, 2020). Hastaların %90'ından fazlası kronik fazda teşhis edilirken, küçük bir kısmı akselere ve blastik fazlara ilerler (Al-Ameri, Cherry, Al-Kali, & Ferrajoli, 2010).

KML vakalarının %90'dan fazlasında teşhis sırasında kronik fazda bulunduran Philadelphia kromozomunu içerir (Alshurafa ve ark., 2023). Kronik faz periferik kan ve kemik iliğindeki lökositoz ve bazofil varlığı ile de tanımlanır (Hart & Linden, 2014). Kronik faz periferik kanda veya kemik iliğinde %10'dan az miyeloid blast olarak tanımlanırken, akseler faz ve blastik faz sırasıyla %10-19 ve %20'den fazla blast olarak tanımlanmıştır (Ahmed ve ark., 2009).

Miyeloid hücrelerinin artışı ile karakterize olan kronik faz, birkaç yıl sürebilir ancak hücreler normal fonksiyon kapasitelerini korur. Bu fazdaki klinik bulgular genelde hafif geçer ve çoğu KML'li hasta bu evrede asemptomatiktir. Büyük bir çoğunluğu rutin bir kan tahlili ile teşhis edilir (Soverini, Mancini, Bavaro, Cavo, & Martinelli, 2018).

2.5.2. Akseler Faz

Akseler faz genellikle kronik ve blast fazı arasında bir ara faz olarak tanımlanır. Dünya Sağlık Örgütü'nün kriterlerine göre periferik kan ve kemik iliği hücrelerinin %10-%19'u blast

hücrelerinden oluşur. Periferik kanda %20 oranında bazofil hücreleri mevcuttur (How, Venkataraman, & Hobbs, 2021).

2.5.3. Blastik Faz

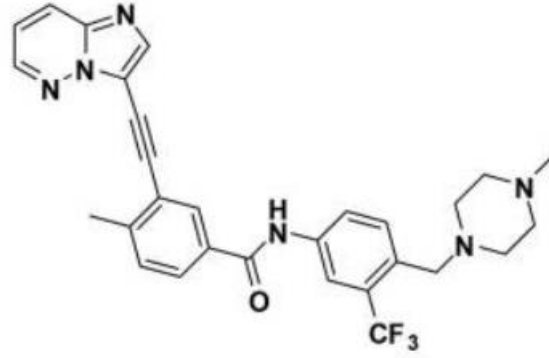
Blast krizi olarak da bilinen blastik faz, KML'nin akut lösemiye geçişini ifade etmektedir (Naeim, 2012). KML'nin son aşamasını oluşturan blastik fazda olan bir hasta her zaman farkedilemez ve hasta kanındaki olgunlaşmamış hücre sayısının yoğunluğu çok yüksektir bu sebeple hastalar bu fazda tedaviye daha az yanıt verir. Blastik fazda hastanın sağkalım oranı aylar ile hesaplanır. Kronik fazın blastik faza geçişi, Ph kromozomuyla birlikte sitogenetik defektlerin çoğalması ve ilaç direncinin artmasının olasılığı karakterize eder (Soverini ve ark., 2018).

Dünya Sağlık Örgütü'nün kriterlerine göre periferik kan ve kemik iliği hücrelerinin en az %20'si veya daha fazlasını blastlar oluşturur. Ekstramedüller blast proliferasyonunun varlığı bu evrede gözlenir (How ve ark., 2021).

2.6. Ponatinib

Ponatinib (Iclusig, ARIAD Pharmaceuticals-Incyte Co.), philadelphia kromozomu pozitif lösemilerin tedavisinde kullanılan ve T315I mutasyonuna karşı direncin aşılabilmesi için tasarlanan üçüncü nesil bir tirozin kinaz inhibitörüdür (Breccia ve ark., 2017) (Narayanan, Pollyea, Gutman, & Jimeno, 2013).

Ponatinib, 3-(imidazo[1,2-b]piridazin-3-iletinil)-4-metilbenzoik asidin karboksi grubunun 4-[(4-metilpiperazin-1-il)metil]-3-(triflorometil)anilin anilino grubu ile elde edilen bir benzamid yapıda moleküldür (NCBI, 2024).



Şekil 2: Ponatinibin Kimyasal Yapısı (O'Hare ve ark., 2009).

İmatinib, dasatinib ve nilotinib gibi ajanlar da KML üzerinde etkili ilaçlardır ancak bazı BCR-ABL mutasyonlarına karşı dirençlidirler. KML tedavisinde ve üstelik diğer TKI'lerin etkili olmadığı ya da BCR-ABL füzyon genindeki mutasyonlardan dolayı dirence sebep olduğu koşullarda kullanılan bir tirozin kinaz inhibitörüdür. Bu kemoterapötik ajanın en önemli özelliği kullanılan diğer TKI'lerin birçoğuna dirençli olduğu bilinen T315I mutasyonu da içinde olmak üzere BCR-ABL geninin mutasyona uğramış şekillerine karşı geniş aktivite spektrumuna sahip olmasıdır. Ponatinib, ABL kinazın ATP-bağlayıcı bölgesini hedef alır (Vivek Kumar Singh ve ark., 2017).

2.7. PI3K İnhibitörü LY294002

Kanserin tedavisinin bulunması için PI3K inhibitörleri kapsamlı bir araştırma alanıdır. PI3K sinyal yolağı, hücre sağkalımı, apoptoz, hücre büyümesi gibi çeşitli fonksiyonlar için kritik bir noktadır. Bu nedenle farklı sinyal yolak inhibitörleriyle kombinasyon tedavilerinde göz önünde bulundurabilecek sonuçlar ortaya çıkmıştır (Duncan, Shay, & Teng, 2020). Bu sinyal yolağının inhibe edilmesi, kanser hücrelerinin sağkalımında ve proliferasyonunda önemlidir sonuç olarak terapötik bir hedef haline gelir.

Önce PI3K-Akt'ın spesifik bir inhibitörü olduğu belirtilen LY294002, daha sonraki araştırmalarda diğer birkaç molekül de inhibe ettiği bildirilmiştir. Süspansiyon ve doku hücreleri de dahil olmak üzere çeşitli hücre modellerinin proliferasyonunun engellenmesinde önemli rol oynar (Duff, Kavege, Baquier, & Hu, 2021). Çoğu zaman bir fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K) inhibitörü olarak kullanılan LY294002, çeşitli hücre sinyal yollarını etkiler. PI3K-Akt sinyal yolağına ek olarak MAPK sinyal moleküllerini baskıladığı ayrıca TGF- β sinyal yolu aracılığıyla hücrelerin proliferasyonunu inhibe ettiği ve bazı kemoterapötik ajanların kanser

hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini artırarak hücre sağkalımını azalttığı belirtilmiştir (Duff ve ark., 2021) (Xu ve ark., 2019) (Badinloo & Esmaceli-Mahani, 2014). Ayrıca LY294002 kemoterapötik ajanı, miyeloid lösemi hücrelerinin proliferasyonunu inhibe eder ve apoptozu indükler (Hao, Ji, Liu, Zhang, & Gong, 2022).

LY294002 PI3K/AKT yolunu inhibe ederek anti-apoptotik proteinlerin aşağı regülasyonuna ve pro-apoptotik proteinlerin yukarı regülasyonuna yol açarak sonuçta kanser hücrelerinde apoptozu indükler (Yang, Huang, Zou, & Ma, 2017).



3. Gereç ve Yöntem

3.1. Araştırma Evreni ve Örneklem

Tezimizde, kronik miyeloid lösemi kanserini çeşitli mekanizmalarla hedefleyen ponatinib ve LY294002 ajanlarının kombinasyonunun sitotoksik ve apoptotik etkileri incelendi.

3.2. Araştırmanın Değişkenleri

Ponatinib ve LY294002 kombinasyonunun kronik miyeloid lösemi hücre hattı üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkileri bağımlı değişkenler olarak değerlendirildi. 24, 48 ve 72 saatlik farklı zaman dilimleri, bu sürelerde uygulanacak ponatinibin konsantrasyonu ile LY294002'nin konsantrasyonu bağımsız değişkenler olarak ele alındı.

3.3. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Çalışma, 15.06.2023-15.05.2024 tarihleri arasında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na ait Hücre Kültürü Laboratuvarı ve Moleküler Analiz Laboratuvarı'nda yürütüldü.

3.4. Veri Toplama Araçları ve Uygulamaları

Çalışmamızda kronik miyeloid lösemi hücre hattı kullanıldı ve ponatinib ile LY294002 kemoterapötik ajanlar etken madde olarak değerlendirildi.

3.5. Veri Analizi

Sitotoksosite deneylerinden elde edilen absorbans verileri ile % hücre canlılığı ve % sitotoksosite değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\% \text{ Sitotoksosite} = 100 - \left[\frac{\text{Etken madde uygulanmış kuyucuklardaki hücre canlılığı ortalaması}}{\text{Kontrol(etken madde uygulanmayan)kuyucuklardaki hücre canlılığı ortalaması}} \right] \times 100$$

Hücre proliferasyonunda %50 azalmaya yol açan inhibitör konsantrasyonu (IC50 değeri), CalcuSyn v.2.0 yazılımı kullanılarak hesaplandı. Zaman ve konsantrasyona bağlı doz-etki değerleri ve kontrol-deney eğrileri için sitotoksosite grafikleri Graphpad Prism 9.5 programı ile oluşturuldu. Deney ve kontrol grupları arasındaki istatistiksel farklılıklar, Graphpad Prism 9.5

programında tek yönlü ANOVA ve ardından Dunnett's t-testi ile analiz edildi ve $p < 0.05$ değerleri anlamlı kabul edildi.

Etken maddelerin K562 hücrelerinde apoptotik etkisi, Annexin V-FITC yöntemi kullanılarak belirlendi. Sonuçlar, BD Accuri C6 akış sitometri cihazı ve yazılımı ile değerlendirildi. Hücrelerin apoptoza uğrayıp uğramadığı ve apoptoza giren hücrelerin hangi düzeyde etkilendiği ölçüldü ve deneyler, her biri üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

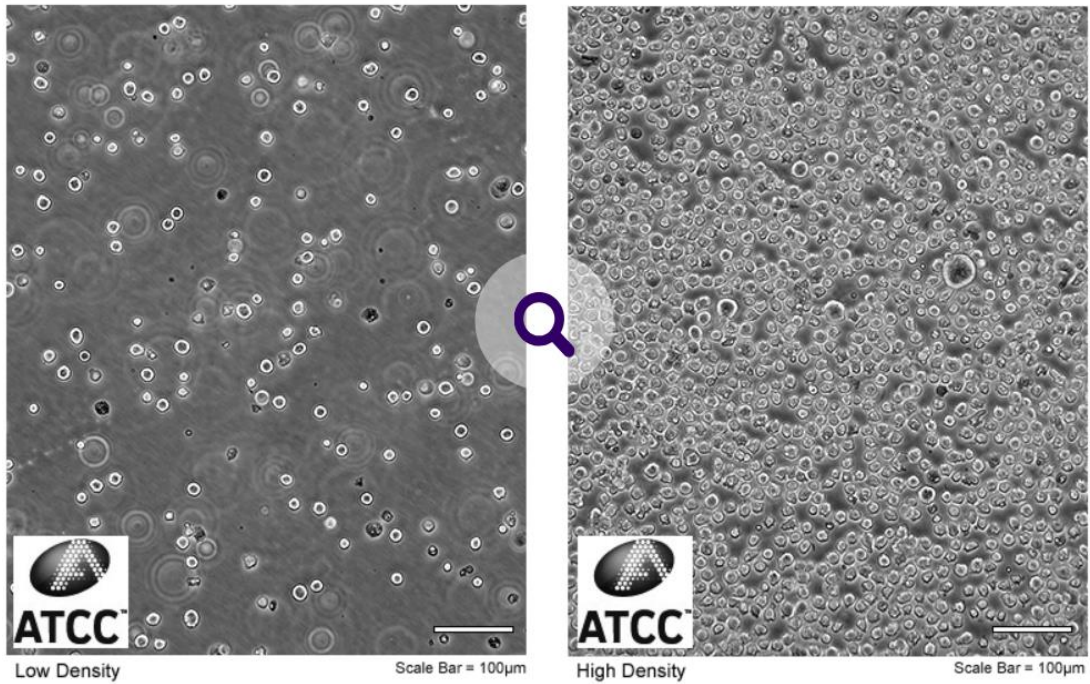
3.6. Araştırma Etiği

Bu çalışma, K562 kronik miyeloid lösemi hücre hattı kullanılarak in vitro ortamda yapılacağından etik kurul onayı gerekmemektedir.

3.7. Hücre Kültürü

Tez çalışmamızda kullanılan K562 kronik miyeloid lösemi hücre hattı, Ege Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndan sağlanmıştır.

ATCC Number: **CCL-243**™
Designation: **K-562**



Şekil 3: K562 hücre hattının mikroskop altında görüntüleri (ATCC, 2024).

Tablo 1: K562 Hücre Hattının Karakteristiği (ATCC, 2024)

Organizma	<i>Homo sapiens</i>
Morfoloji	Lenfoblast
Hastalık	Kronik Miyeloid Lösemi (KML)
Büyüme Özelliği	Süspansiyon

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan medyum ve takviyeler, Iscove's Modified Dulbecco's Medyum (IMDM) (ATCC 30-2005), Fetal Bovine Serum (FBS) (Biological Industries Cat. No: 04-127-1A), Penisilin/Streptomisin (Biological Industries Cat. No: 03-031-1B), L-Glutamin (Biological Industries Cat. No: 03-020-1B), Ege Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilmiştir.

Hücre kültüründe, 25 cm² ve 75 cm² filtreli kapaklı flasklara K562 hücre hattı aseptik koşullar altında ekilmiş ve 37°C, %95 nem ve %5 CO₂ özelliklerine sahip etüvlerde kontaminasyondan uzak bir şekilde inkübe edilmiştir. Hücrelerin medyum değişimi, pasajlama, dondurma ve çözme işlemleri laminar akım kabininde steril koşullarda yapıldı. Hücrelerin sayı ve canlılık durumları inverted ve ışık mikroskopları ile takip edildi. Çalışmamızda kullandığımız hücrelerin medyum ve medyuma eklenen takviyelerin oranları aşağıdaki tabloda belirtilmiştir:

Tablo 2: Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan medyum ve takviyelerin adları ve oranları

Hücre Hattı	Kullanılan Medyum	L- Glutamin	FBS	Penisilin/Streptomisin
K562	IMDM	%1	%10	%1

3.7.1. Dondurulan Hücrelerin Çözdürülmesi

Tez çalışmasında kullanılan hücre hattı, Ege Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda - 86°C'de saklanmıştır. Hücrelerin çözülmüş olduğu aşamada aşağıdaki prosedür izlenmiştir:

- Kriyotüplerdeki hücreler, -86°C'dan -20°C'ye aktarıldı.
- Yaklaşık 3-4 ml yeni ortam, 15 ml'lik falkon tüplere eklendi.
- Alınan yeni ortam, 20°C'den çıkarılan donmuş hücrelerin bulunduğu kriyotüpteki hücrelerin üzerine eklenmiş ve pipetaj yapılarak çözülme işlemi gerçekleştirildi.
- Hızlı bir şekilde çözülen hücreler, yeni ortam içeren 15 ml'lik falkonlara aktarıldı.
- Hücrelerin bulunduğu falkonlar, santrifüj cihazında 500 g'de 5 dakika boyunca dengeli bir şekilde santrifüj edildi.
- Santrifüj işlemi sonrasında hücrelerin pellet kısmı oluşmuş, DMSO (Dimetil Sülfoksit), FBS ve ortam içeren sıvı ise süpernatant kısmında birikmiştir. Bu adımda, süpernatant uzaklaştırıldı.
- DMSO'nun mümkün olduğunca uzaklaştırılabilmesi için hücre pelletine ortam eklendi ardından santrifüj işlemi tekrarlandı.
- Santrifüjden sonra, süpernatant uzaklaştırıldı ve hücrelerin yer aldığı pellet, 1 ml serum içeren ortam ile tekrar süspansiyon haline getirildi.
- Hücrelerin canlılığı, 50 µl hücre solüsyonu ve 50 µl tripan blue boya ile kontrol edildi.
- Canlılıkları kontrol edilen hücreler, 25 cm²'lik flasklara yaklaşık 5 ml serum içeren ortam eklenerek ekildi, 75 cm²'lik flasklara ise yaklaşık 10-15 ml serumlu ortam ilave edilerek aktarıldı.
- Hücreler, 37°C sabit sıcaklıkta , %95 nem, %5 CO₂ bulunan etüvlerde inkübe edildi.

3.7.2. Hücre Canlılığının Kontrol Edilmesi

Hücre canlılığının kontrol edilmesi sürecinde aşağıdaki adımlar izlenmiştir:

- Hücrelerin inkübe edildiği ortam, 15 ml'lik falkon tüplere eklendi.
- Flaskta hücre bırakmamak adına hücrelere 1 ml serumsuz ortam eklendi ve yıkama işlemi gerçekleştirildi.
- Flasklarda bulunan ortam ve hücrelerin hepsi 15 ml'lik falkonlara aktarıldı.
- 15 ml'lik falkonlara, santrifüj cihazında 500 g'de 5 dakika boyunca santrifüj yapıldı.

- Santrifüj bitiminde, ortamı içeren süpernatant kısmı bu aşamada uzaklaştırıldı ve hücre pelleti 1 ml serumlu ortam ile çözdürüldü.
- 50 µl tripan blue boyası ve 50 µl hücre solüsyonu, Neubauer lamında ışık mikroskopuyla 4 × 4'lük karelerden oluşan dört farklı alandaki hücreler sayıldı. Ortalamaları alındı ve dilüsyon faktörü ile çarpılarak 1 ml'deki hücre sayısı hesaplandı.
- Canlılık yüzdesini hesaplamak amacıyla, canlı hücre sayısının toplam hücre sayısına oranı alınarak 100 ile çarpıldı.

3.7.3. Hücre Pasaj İşlemleri

İnkübe edilen hücreler, %95 nem, %5 CO₂ ve 37°C sabit sıcaklıkta tutulan etüvlerde optimal koşullarda yetiştirilir. Hücreler, hücre hatlarının ikiye katlanma süresine göre çoğalır ve bu süreç dikkatle izlenir. Hücreler, büyüdükleri flask yüzeyinin %80'ini kapladığında, yüzeyden kaldırılarak bölünmeleri gerekmektedir. Bu işlem, hücre pasajlama olarak bilinir ve deney kurulumu öncesinde de gerçekleştirilir. Hücre pasajlama işlemi bu adımlar izlenir:

- Flasktaki hücrelerin bulunduğu serumlu ortam, 15 ml'lik falkon tüplere eklendi.
- Hücrelerin flask yüzeyinden ayrılıp ayrılmadıkları inverted mikroskopta kontrol edildi.
- Kontrol sonrasında 15 ml'lik falkonlar santrifüj cihazında 500 g'de 5 dakika boyunca santrifüj yapıldı.
- Santrifüjün ardından süpernatant kısmı uzaklaştırıldı ve hücre pelleti yeterli miktarda serumlu ortam ile çözdürülüp 2 eşit flaska bölünerek hücreler ekildi.
- Hücrelerin canlılığı kontrol edilip sayısı belirlenmek üzere, 50 µl hücre ve 50 µl tripan blue boyası karıştırıldı ve böylece hücrelerin sayısı belirlendi.
- Canlılıkları ve sayıları kontrol edilen hücreler ikiye bölünerek 25 cm²'lik flaslara yaklaşık 5 ml serum içeren ortam, 75 cm²'lik flaslara ise yaklaşık 10-15 ml serum içeren ortam eklenerek ekildi.
- Flaslara ekilen hücreler 37°C sabit sıcaklıkta, %95 nemde ve %5 CO₂ 'ye sahip etüvlerde inkübe edilmeye bırakıldı.

Daha sonra, takip eden günlerde de hücrelerin durumu inverted mikroskop kullanılarak düzenli olarak kontrol edildi.

3.7.4. Hücrelerin Dondurulması İşlemi

Hücrelerin sayısı deneylerde kullanılacak optimal seviyeye ulaştığında hem hücreleri korumak hem de daha sonra deneylerde kullanabilmek adına hücreler kriyoprotektanlar kullanılarak dondurulabilmektedir. Hücrelerin dondurulması prosedüründe aşağıdaki adımlar yapılmıştır:

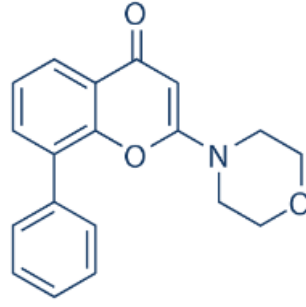
- Hücrelerin inkübe edildiği serumlu ortam, steril 15 ml'lik falkon tüplerine eklendi ve 500 g'de 5 dk. santrifüj yapıldı.
- Santrifüjden sonra, süpernatant kısmı uzaklaştırıldı ve hücre pelleti üzerine 100 µL DMSO (Dimetil Sülfoksit) ve 900 µL FBS içeren kriyoprotektan solüsyonu eklenerek hızlıca çözündürülüp kriyotüplere alındı.
- 1:9 oranında DMSO:FBS içeren hücreler -86°C'de saklandı.

3.8. PI3K İnhibitörü (LY294002) Etken Maddesinin Hazırlanması

Moleküler ağırlığı 307,34 g/mol LY294002 (Selleckchem, Cat No.S1105) maddesi, ana stok konsantrasyonu 10 mM olacak biçimde hassas terazide 5 mg tartılarak 1600 µl DMSO (Dimetilsülfoksit) içerisinde çözülmüştür. PI3K inhibitörünün ana stok solüsyonu -20 °C'de muhafaza edildi. Ara stoklar ise deney öncesi hazırlık aşamasında uygun medyumlarla seyreltilerek taze olarak hazırlandı.

Tablo 3: PI3K İnhibitörünün (LY294002) Özellikleri

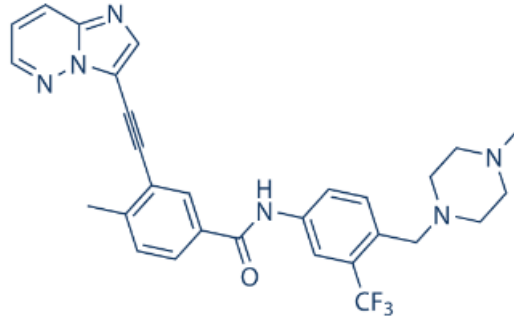
LY294002	
Formül	2-(4-Morfolinil)-8-fenil-4H-1-benzopiran-4-on
Moleküler Formül	C ₁₉ H ₁₇ NO ₃
Moleküler Ağırlığı	307,34 g/mol



Şekil 4: LY294002'nin Kimyasal Yapısı (Selleckchem, 2024)

3.9. Ponatinib'in Hazırlanması

Tez çalışmamız için moleküler ağırlığı 532.56 g/mol ponatinib (Selleckchem, Cat No. S1490) etken maddesi Ege Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndan sağlandı.



Şekil 5: Ponatinibin Kimyasal Yapısı (Selleckchem, 2024)

Tablo 4: Ponatinib'in özellikleri (Selleckchem, 2024)

Ponatinib	
Formül	3-(2-imidazo[1,2-b]piridazin-3-iletinil)-4-metil-N-[4-((2,2,3,3,5,5,6,6-oktadeuterio-4-metilpiperazin-1-il)metil)-3-(triflorometil)fenil]benzamid
Moleküler Formül	C ₂₉ H ₂₇ F ₃ N ₆ O
Moleküler Ağırlığı	532.56 g/mol

3.10. Hücre Proliferasyon Deneyi

Sitotoksisite deneyini kurmadan önce optimum hücre sayısının bir n proliferasyon deneyi ile bulunması, sitotoksisite deneyinin hücre canlılığındaki farklılıkları tespit etmek için uygun bir aralığa sahip olmasını kolaylaştırır.  tekrarlı olacak şekilde 96'lık well plate proliferasyon deneyi yapıldı.

Deneyde K562 hücre hattı,  tekrarlı olarak ve her kuyuda 100 µL serumlu ortam bulunacak şekilde, seri dilüsyon yapılarak 96 kuyucuklu platelere ekildi. Hücreler 24, 48, 72 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi tamamlandığında, karanlık bir ortamda kuyucuklara 10 µl olacak şekilde CCK-8 solüsyonu eklendi. Deney süresi tamamlandığında, 450 nm dalga boyunda ve 620 nm referans aralığında mikropılaka okuyucu (Multiskan FC, Thermo) aracılığıyla absorbands değerleri analiz edildi.



şekil 6: (Thermo Scientific) Multiskan FC Mikropılaka Okuyucu

Tablo 5: Hücre Proliferasyon Deneyi Plak Düzeni

100.000/100 µL hücre	100.000/100 µL hücre	100.000/100 µL hücre
50.000/100 µL hücre	50.000/100 µL hücre	50.000/100 µL hücre
25.000/100 µL hücre	25.000/100 µL hücre	25.000/100 µL hücre
12.500/100 µL hücre	12.500/100 µL hücre	12.500/100 µL hücre
6.250/100 µL hücre	6.250/100 µL hücre	6.250/100 µL hücre
3.125/100 µL hücre	3.125/100 µL hücre	3.125/100 µL hücre
1.562/100 µL hücre	1.562/100 µL hücre	1.562/100 µL hücre
781/100 µL hücre	781/100 µL hücre	781/100 µL hücre

3.11. CFSE Proliferasyon Deneyi

CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester), hücre proliferasyonunu izlemek için kullanılan bir boyadır. Bu boya, hücre zarından kolayca geçebilen bir karboksifloresan süksinimidil esterdir. Hücre içine girdikten sonra floresan grubu, esteraz enzimlerinin etkisiyle asetatlarına ayrılır ve bu süreçte floresan ışığa ortaya çıkar. Ancak bu ayrışma sonucunda, boyanın hücre zarından geçme yeteneği kaybolur.

CFSE, hücre içindeki proteinlerin amin gruplarına bağlanabilir. Bu bağlanma sayesinde, hücre bölündükçe CFSE boyası da yavru hücrelere aktarılır (Alan, 2019).

Deney protokolü aşağıdaki gibidir:

- Flasktaki hücreler 50 mL'lik falkonlara aktarıldı ve 130 g.'de 7 dk santrifüj edildi.
- Santrifüjün ardından süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet 1X dPBS ile çözdürüldü. Ardından tekrar 130 g.'de 7 dk santrifüj yapıldı.
- dPBS ile yıkama işlemi 1 kez daha tekrar edildi ve hücreler sayıldı.
- mL'de 10×10^6 hücre olacak şekilde 1X dPBS ile hücreler çözdürüldü ve CFSE boyası eklendi.

- CFSE boyası eklenen hücre solüsyonu kuvvetlice vortekslendi ve 37 °C su banyosunda 15 dk inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyondan sonra hücre solüsyonunun üzerine 9 mL 1xdPBS daha eklendi ve iyice homojenize edildi.
- Daha sonra 130 g.'de 7 dakika santrifüj yapıldı ve santrifüjden sonra süpernatant uzaklaştırıldı.
- Hücre pelleti, 10 mL %10 FBS içeren ortamla çözdürüldü ve tekrar 130 g.'de 7 dakika santrifüj yapıldı.
- Santrifüjden sonra %10 FBS içeren ortamla 6'lık well platelere kontrol ve deney grubu olacak şekilde ekildi.
- Ekimden sonra 0,24,48 ve 72 saat boyunca BD Accuri C6 Flow cihazı ve cihaza ait yazılım ile sonuçlar elde edildi.

3.12. Sitotoksisite Deneyi (CCK-8)

Etkin maddelerin KML hücre hattında neden olduğu sitotoksik etkilerini saptamak için “Cell Counting Kit 8 (CCK-8)” kullanıldı. CCK-8 kiti, sitotoksisiteyi ve hücre çoğalmasını belirlemek için yaygın olarak kullanılan bir deneydir.

Kitin çalışma prensibi [2-(2-metoksi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolyum, monosodyum tuzunun (WST-8) canlı hücrelerden gelen dehidrojenazlar tarafından suda çözünür bir formazan boyasına indirgenmesine dayanır. WST-8'in formazan boyasına indirgenmesi sarı renkli boyanın ortaya çıkması ile sonuçlanır. Bu renk değişiminin yoğunluğu mikropilaya okuyucuda, 450 nm dalga boyunda ve 650 nm referans aralığında tespit edildi. XTT,MTS, MTT veya WST-1 gibi diğer tetrazolyum tuzlarının tespit hassasiyeti WST-8'den daha düşüktür.

- Üç tekrarlı ve 96'lık platelerin her birine kuyucuğuna 50 µl ortam içerisinde proliferasyon deneyinde belirlenen hücre sayıları ekildi.
- Hücrelere belirlenen dozlarda ilaç uygulamaları yapıldı.

Tablo 6: Hücrelere verilen etken maddelerin konsantrasyonları

Ponatinib	LY294002
1000 nM	100 µM
500 nM	50 µM
250 nM	25 µM
125 nM	12,5 µM
62,5 nM	6,25 µM
31,25 nM	3,125 µM
15,625 nM	1,562 µM

- Her bir inkübasyon süresi 24, 48 ve 72 saate tamamlandığında kontrol grubu hariç her bir kuyucuğa karanlık ortamda 10 µl CCK-8 solüsyonu verildi.
- Deney süresi tamamlandığında plateler 450 nm dalga boyunda ve 620 nm referans aralığında mikropłaka okuyucu (Multiskan FC, Thermo) aracılığıyla absorbans değerleri ölçüldü.
- Etken maddelerin farklı dozlarda uygulanmasından sonra elde edilen sonuçlar, CalcuSyn programı kullanılarak zaman ve doza bağı IC50 değerlerini hesaplamak için kullanıldı.
- Belirlenen IC50 değerlerinin (1,2 ve ½, ¾, 3/2) belirli katlardaki oranları, hücrelere etken maddelerin kombinasyon dozları verildi.
- Etken maddelerin kombinasyon uygulamalarının ardından, sitotoksisite protokolü uygulandı ve 24., 48. ve 72. saatlerde plaklara karanlık ortamda 10 µl CCK-8 solüsyonu eklendi.

- Multiscan mikropılaka okuyucuda absorbands değerleri ölçüldü.
- Elde edilen absorbands değerleri kullanılarak %sitotoksisite değerleri , %hücre canlılığı hesaplandı.

3.13. Apoptoz Deneyi (Annexin V-FITC)

Apoptoz, dokulardaki hücre popülasyonunu korumak ve homeostatik dengeyi sağlamak için fizyolojik olarak meydana gelir. Apoptoz için sinyal alan bir hücrede birçok değişim meydana gelir. Bu değişimlerin en belirgin olanı, normal hücrelerde hücre membranında iç yüzeyinde bulunan fosfatidilserin moleküllerinin hücre membranının dış yüzeyine çıkmasıdır. Bu transloke süreci, membran bütünlüğünün normal kaldığı apoptotik hücre ölümünün erken safhalarında gerçekleşir. Bu safha, erken apoptoz olarak adlandırılır. Annexin-V, hücrenin dış yüzeyine çıkan fosfatidilserine yüksek affinitesi olduğundan dolayı, FITC (floresan izotiyosiyanat) ile işaretlenebilir ve böylece apoptotik hücre görünür hale gelmiş olur. Apoptoz ve diğer hücre ölümü biçimlerini incelemek için akış sitometrisi sıklıkla kullanılır. Annexin-V ve FITC kompleksinin hücre yüzeyine çıkan fosfatidilserine bağlanma oranı, akış sitometri cihazı ile tespit edilebilmektedir. Apoptotik hücreler gibi nekrotik hücrelerde de Annexin-V bağlanması görülebilir. Bu karışıklığı önlemek için ikinci bir boya için propidyum iyodür eklenmektedir. PI, sağlam bir plazma zarına sahip olan canlı veya erken apoptotik hücreleri boyamaz (Rieger, 2011). Propidyum iyodür kırmızı ışığa yaparken FITC yeşil ışığa yapar.

Bu şekilde apoptotik ve nekrotik hücreler floresan mikroskopla ayırt edilebilir.

Apoptotik hücreleri incelemek için kullanılan Annexin V/PI protokolüne göre;

- Erken apoptotik → FITC Annexin V pozitif, PI negatif
- Canlı hücreler → FITC Annexin V negatif, PI negatif
- Geç apoptotik hücreler → FITC Annexin V pozitif, PI pozitif
- Nekrotik Hücreler → PI pozitifdir.

Ponatinib ve LY294002'nin K562 hücre hattı üzerinde apoptotik etkilerini belirlemek için Annexin V-FITC metodu ile apoptoz deneyi yapıldı. Tez çalışmamızda ponatinib ve LY294002'nin K562 hücrelerinde 48. saat IC50 etkisi ve kombinasyon dozları kullanılarak hücrelerin apoptoz seviyeleri belirlenmiştir.

Annexin V-FITC protokolüne göre apoptoz aşamasında aşağıdaki adımlar izlenmiştir;

- Hücreler adherent olmadığından yıkama işlemi yapılmadan inkübe edildiği ortam aseptik koşullar altında uzaklaştırıldı.
- Hücreler toplanarak 15 ml'lik falkon tüplerine alındı ve 100 g'de 7 dakika santrifüj yapıldı.
- Hücreler 6 kuyucuklu plakalara, kuyucuk başına 25×10^4 hücre ve 2 ml ortam eklenerek yerleştirildi.
- Kuyucuktaki total hacim 3 ml olacak şekilde etken maddeler 1'er ml hazırlanıp hücrelerin üzerine eklendi.
- Hücre ekim işleminden sonra etüvde 48 saat inkübe edildi.
- İnkübasyon süresi tamamlandığında hücreler 2000 rpm'de 5 dk santrifüje koyuldu.
- Hücre pelletini bileşenlerden uzaklaştırmak için 1 ml soğuk PBS ile muamele edildi ve santrifüje işlemi tekrarlandı.
- Ardından hücreler 500 µl 1x Binding Buffer içinde süspansiyon haline getirildi.
- Hücreler eppendorfa aktarıldı ve 5 µl FITC Annexin V , 5 µl Propidium İyodür eklendi. Işıksız ortamda 15 dk inkübe edildi.
- İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra karanlıkta BD Accuri C6 Cflow v1.0.264.15 yazılımı ile analiz edildi.

4. BULGULAR

4.1. Proliferasyon Deneyi ile Uygun Hücre Konsantrasyonunun Saptanması

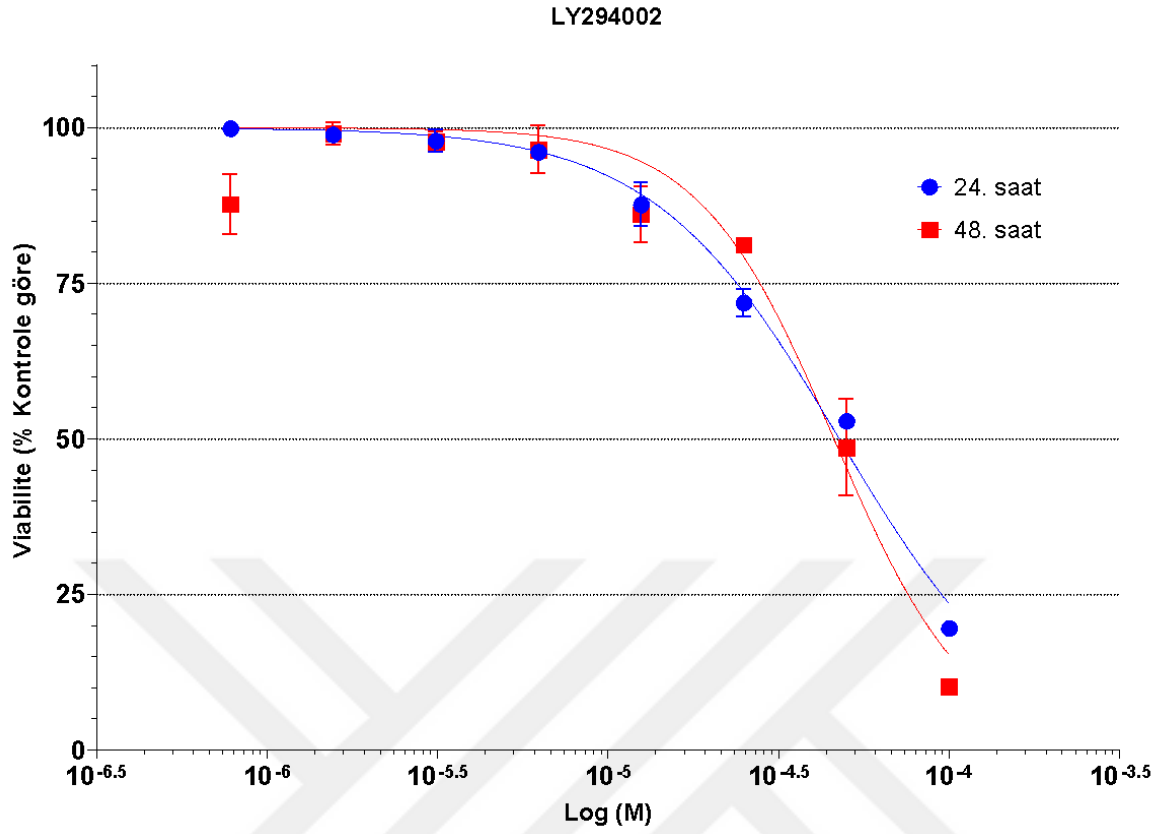
K562 hücre hattının daha sonraki deneylerde kullanılacak için en uygun hücre konsantrasyonunu belirlemek amacıyla proliferasyon deneyi kuruldu. Deney planı, ilk kuyucuğa 1×10^5 hücre ekilmesiyle başladı. İlk kuyucuktan başlayarak ardışık dilüsyonlar yapıldı ve sonunda her bir kuyucukta $100 \mu\text{L}$ hücre solüsyonu olacak şekilde 96 kuyucuklu plaklara hücreler eklendi. Ardından, 96 kuyucuklu plaklar 96 saat boyunca inkübatörde inkübe edildi.

96. saatte deney sonlandırıldı ve kuyucuklara $10 \mu\text{L}$ CCK8 solüsyonu eklendi. Plaklar Multiskan FC (Thermo) mikroparka okuyucusunda shake yapıldıktan sonra absorbans değerleri ölçüldü. K562 hücre hattı için kuyucuk başına uygun hücre sayısı 25×10^3 olarak belirlendi.

4.2. LY294002 Ajanının Hücre Hattı Üzerindeki Sitotoksik Etkisi

LY294002'nin K562 kronik miyeloid lösemi hücre hattında IC50 değerini belirlemek için CCK8 yöntemi kullanıldı. 72 saat sonunda IC50 değeri bulundu. Hiçbir etken madde ile muamele edilmeyen hücreler kontrol olarak değerlendirildi. K562 için kuyucuk başına 25×10^3 hücre ekildi ve 3'lü tekrar olacak şekilde $100-1,56 \mu\text{M}$ dilüsyon oranlarına maruz bırakıldı. 24., 48., ve 72. saatlerdeki sitotoksikite değerleri CCK8 yöntemi ile değerlendirildi.

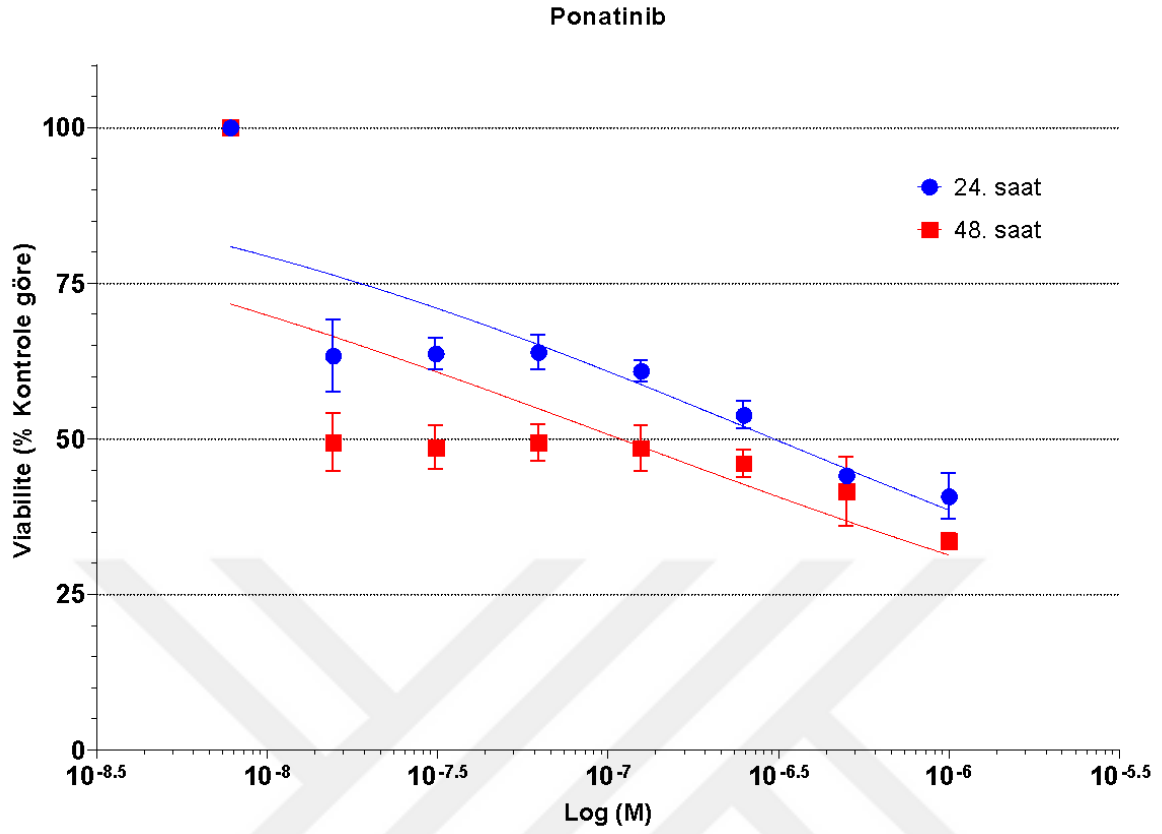
Bu hücre hattının 48.saat için IC50 dozu $45,88 \mu\text{M}$ belirlendi ve bundan sonraki yapılacak deneyler için bu doz uygulandı.



Grafik1: K562 hücreleri üzerindeki LY294002'nin doza ve zamana bağlı canlılık grafiği

4.3. Ponatinib'in K562 Hücre Hattı Üzerindeki Sitotoksik Etkisi

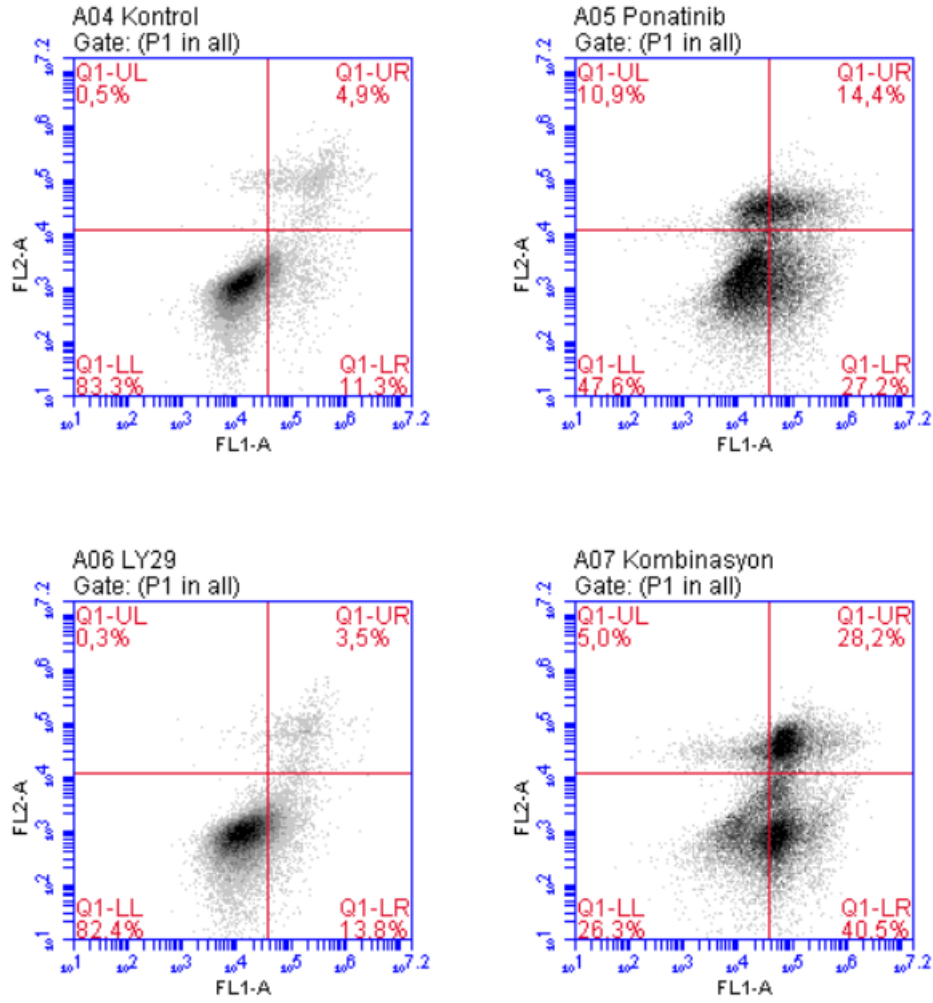
K562 kronik miyeloid lösemi hücre hattı için 25×10^3 sayıda hücre üçlü tekrarlar olacak şekilde belirtilen dilüsyon oranlarına maruz bırakıldı. K562 hücre hattı için 48 saatlik IC50 değeri 108,6 μM saptandı ve sonraki deneylerde bu doz uygulandı.



Grafik 2: K562 hücreleri üzerindeki Ponatinib'in doza ve zamana bağlı canlılık grafiği

4.4. Ponatinib ve LY294002 Etkin Maddelerinin ve Ponatinib+LY294002 Kombinasyonunun K562 Hücre Hattı Üzerinde Apoptotik Etkilerinin Değerlendirilmesi

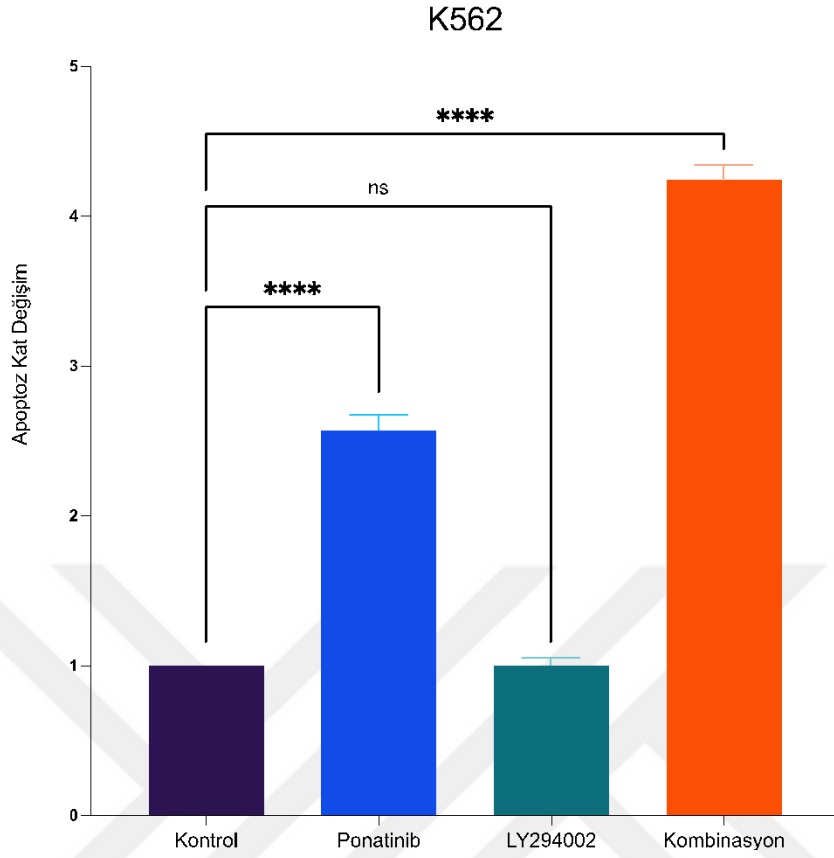
Sitotoksosite deneylerinden sonra apoptoz deneyi için Annexin V-FITC yöntemi kullanıldı. Etkin madde uygulanmayan hücre grubu kontrol grubu olarak dikkate alındı. Deney için K562 hücre hattı 6'lık well platelere ekildi. Ponatinib için 108,6 nM, LY294002 için 45,88 µM IC50 değerleri ile tekli ve kombinasyon dozları uygulanmıştır. 48 saatlik sürenin ardından toplanan örnekler, BD Accuri akım sitometrisi cihazıyla analiz edilmiştir.



Grafik 3: K562 Hücrelerinde Ponatinib ve LY294002'nin tekli ve kombinasyonunun apoptoz grafiği

Apoptoz sonuçları incelendiğinde, kontrol grubu olarak etken madde uygulanmayan grup seçildi. Bu grupta canlılık oranı %83,3, apoptoz oranı ise %16,2 olarak belirlendi. Yalnızca Ponatinib uygulanan K562 hücrelerinde canlılık oranı %47,6; apoptoz oranı ise %41,6 olarak bulundu. LY294002 uygulanan K562 hücrelerinde canlılık oranı %82,4; apoptoz oranı %17,3 olarak tespit edildi. Ponatinib+LY294002 kombinasyon uygulamasında hücre canlılık oranı %26,3; apoptoz oranı ise %68,7 olarak bulundu.

Elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda kombinasyon uygulamasının, kontrol grubuna ve etken maddelerin tek başına kullanımına kıyasla apoptozu daha fazla indüklediği tespit edildi. Bu sonuçlar, kombinasyon uygulamasının apoptozu artırmada tek başına uygulamalardan daha etkilediği olduğunu göstermektedir.



Grafik 4: Deney gruplarının kontrole göre apoptoz kat değişimi

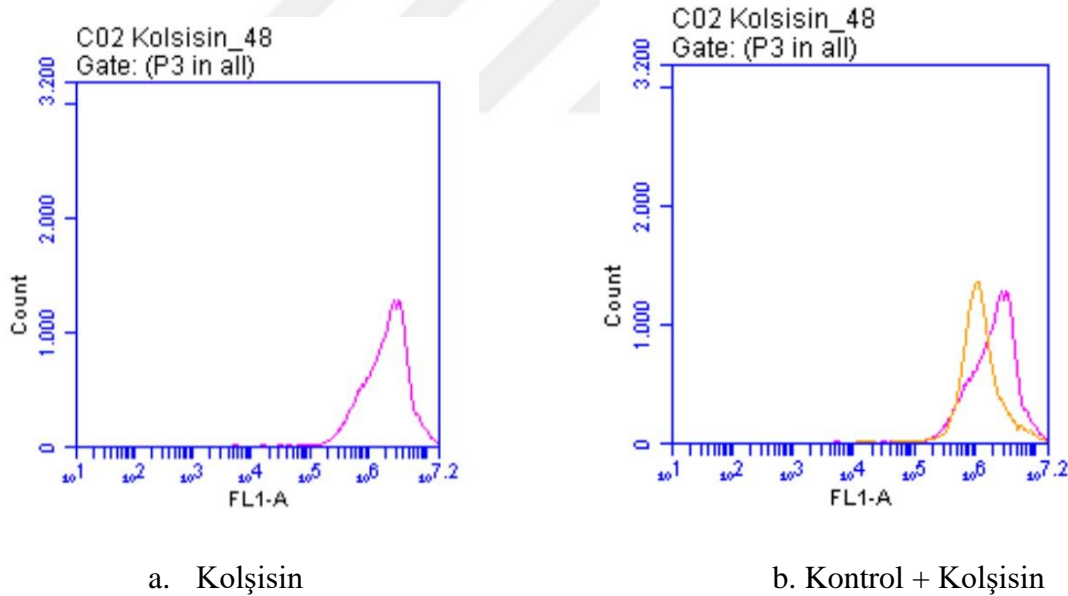
Tablo 7 : K562 hücre hattında, kontrol ve deney gruplarının apoptoz ve hayatta kalma oranları

	Apoptoz (Kat Değişim Oranları)
Kontrol	1
Ponatinib	2,57
LY294002	1,05
Kombinasyon	4,24

4.5. Ponatinib ve LY294002 Etken Maddelerinin ve Ponatinib+LY294002 Kombinasyonunun K562 Hücre Hattı Üzerinde Hücre Proliferasyonu Etkilerinin Değerlendirilmesi

Deney 6'lık well platede yapıldı. Birinci kuyucuk kontrol grubu, ikinci kuyucuk kolşisin, üçüncü kuyucuk ponatinib, dördüncü kuyucuk LY294002 ve beşinci kuyucuk kombinasyon olarak kabul edildi.

CFSE proliferasyon deneyinde kolşisin, hücrelerin bölünmesini durdurarak hücre proliferasyonunu inhibe etmek ve CFSE boyasının hücrelerdeki seyrelmesini engellemek için kullanıldı. Bu, deneyde hücre proliferasyonunu analiz etmek ve uygulamaların hücre bölünmesi üzerindeki etkilerini değerlendirmek için önem taşır. Kolşisin ile muamele edilen hücreler, yüksek CFSE fluoresan yoğunluğu gösterir, bu da hücrelerin bölünemediğini ve proliferasyonun durduğunu gösterir. Bu sayede, hücre proliferasyonunu inhibe eden diğer uygulamaların etkinliği daha doğru bir şekilde ölçülebilir ve karşılaştırılabilir.



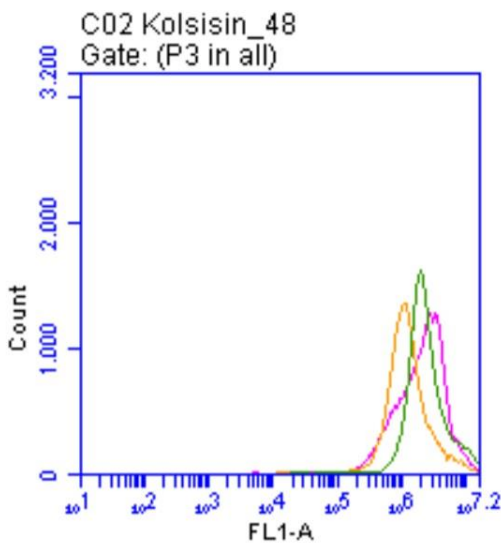
Grafik 5: K562 hücre hattında CFSE etiketli Kolşisin ve Kontrol eğrisi

- Kolşisin (pembe) eğrisi
- Kontrol (turuncu) ve Kolşisin (pembe) eğrisi

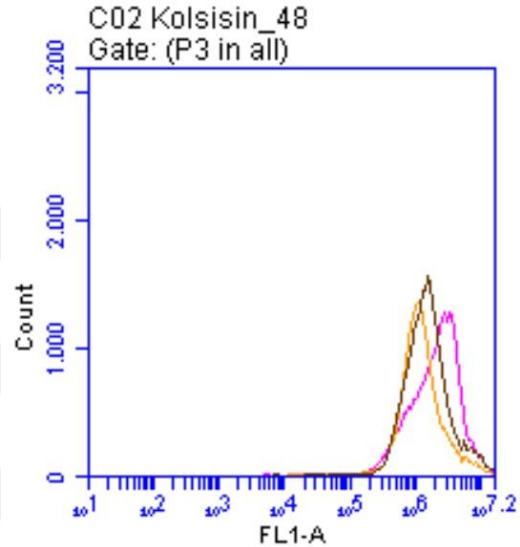
Kontrol grubu, turuncu eğriyi temsil etmektedir. Kolşisin ise pembe eğri olarak görülür.

LY294002 (yeşil eğri) ayrıca sağa doğru kaymasıyla gösterilen çoğalmayı azaltır. Bu, LY294002'nin hücre bölünmesini engellemede etkili olduğunu göstermektedir.

CFSE proliferasyon deneyinde, en soldaki tepeler en yüksek proliferasyon oranlarını gösterir. Kontrol grubu (turuncu eğri) en yüksek proliferasyon oranını temsil eder. Kolşisin (pembe eğri) hücre proliferasyonunu inhibe ettiği için en sağda yer alır. Kolşisin hücre bölünmesini durdurmak amacıyla kullanıldığı için kontrol grubu en soldadır.



c. LY294002 + Kontrol + Kolşisin



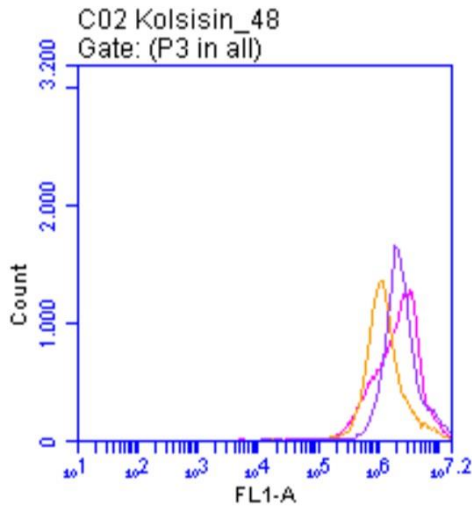
d. Ponatinib + Kontrol + Kolşisin

Grafik 6: K562 hücre hattında CFSE etiketli LY294002 ve Ponatinib eğrisi

c. LY294002 (yeşil) eğrisi

d. Ponatinib (siyah) eğrisi

Kolşisin sağa doğru kaymasıyla daha azalmış proliferasyonu gösterir. LY294002 (yeşil eğri) aynı şekilde sağa doğru kayarak LY294002, doza bağlı olarak çoğalmanın azaldığını göstermektedir. Ponatinib (siyah eğri) dozuna bağlı olarak proliferasyonun azaldığını gösteren sağa doğru bir kayma gösterir.



Grafik 7: K562 hücre hattında CFSE etiketli Kombinasyon + Kontrol + Kolşisin eğrisi

Kombinasyon tedavisi (mor eğri) en uzak sağa kaymaya sahiptir ve hücre proliferasyonunda en büyük azalmayı gösterir. Bu, CFSE deneyinde kombinasyon uygulamasının potansiyel bir sinerjik etkiye sahip olduğunu ve hücre bölünmesini engellemeye onu tekli uygulamalardan daha etkili olduğunu gösterir.

5. Tartışma

KML, Ph kromozomu ve BCR-ABL füzyon geninin varlığı ile karakterize olduğundan bu özelliği onu diğer lösemi türlerinden ayırır (Arora, Kaur, & Nand, 2022) (Kralj ve ark., 2013).

Tirozin kinaz inhibitörlerinin geliştirilmesi, KML'nin tedavi stratejilerini iyi ölçüde iyileştirmiş ve BCR-ABL1 TKI'lerini kanser araştırmaları ve tedavisi için bir model haline getirmiştir (Kralj ve ark., 2013). TKI'lerin kullanıma girmesi, ölüm oranlarında azalma ve 8 yıllık genel sağkalım oranının %89 olmasıyla sonuçlanmıştır (Rohrbacher & Hasford, 2018).

KML tedavisinde imatinib, dasatinib ve nilotinib gibi tirozin kinaz inhibitörlerinin temelini oluşturmaktadır ancak ileri fazlarda TKI'lere karşı oluşan ilaç direnci önemli bir zorluk olmaya devam etmektedir bu yüzden alternatif yeni tedavi stratejilerinin araştırılmasına ihtiyaç vardır (Vivek K Singh & Coumar, 2019). Bu tez, bir PI3K inhibitörünün ve üçüncü nesil bir TKI olan Ponatinib ile kombinasyonunun KML hücre hatları üzerindeki potansiyel antikanser etkilerini araştırmayı amaçlamaktadır.

Ponatinib, kronik miyeloid lösemi tedavisinde kullanılan kemoterapötik bir ajandır. Fosfoinozid 3-kinaz (PI3K) inhibitörü olan LY294002 ise sentetik bir kimyasal bileşiktir.

Çalışmamızda kronik miyeloid lösemi hücre hatlarından K562 hücre hattı kullanılmıştır.

Yinghua Geng ve ark. 2021 yılında gerçekleştirdikleri bir çalışmaya göre LY294002 ve ABT199'un K562, HL60 ve KG1a hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini CCK-8 testi kullanarak değerlendirmişlerdir. K562 hücrelerinde LY294002'nin 48 saatte IC50 değeri 1.433 µM, ABT199'un IC50 değeri 22.498 nM olarak bulunmuştur. Bu sebeple 48 saate takiben LY294002 için <1,433 µM ve ABT199 için <22,498 nM kombinasyonu ölçütü olarak dikkate alınmış ve 48 saatlik süre sonunda 18,222 nM ABT199 ve 0,97 µM LY294002 kombinasyonu, K562 hücrelerinde ilaç kombinasyonunun optimal konsantrasyonu olarak kabul edilmiştir.

K562 hücrelerinde LY294002'nin ABT199 ile kombinasyonu, IC50 değerleri göz önüne alındığında hücre canlılığını azaltmada önemli bir etkinlik gösterir. Tek başına kullanılan iki etken maddenin kombinasyonu tek kullanıma kıyasla apoptotik aktiviteye yol açar (Geng ve ark., 2021).

ABT199'un daha düşük IC50 değeri, daha güçlü bir sitotoksik etkiye sahip olduğunu gösterirken, LY294002 ile kombinasyonu, tedavi stratejilerinde sinerji yaratma potansiyeli taşır.

2022 yılında HAO Yanmei ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada K562 hücrelerinde LY294002 ve Matrin kombinasyonunun sitotoksik etkilerini CCK-8 kullanarak değerlendirmişlerdir. LY294002, hücelere 10 µmol/L konsantrasyonunda, matrin ise tekli uygulamasında ve LY294002 ile kombinasyonunda 0,4 g/L konsantrasyonda uygulanmıştır.

Matrinin hem tek başına hem de LY294002 ile kombinasyon halinde kullanımı K562 hücrelerinin çoğalmasını zamana ve konsantrasyona bağlı şekilde inhibe etmiştir. Tekli matrin muamelesi ile karşılaştırıldığında, LY294002 ile kombine uygulamasının hücrelerde daha net morfolojik değişikliklere yol açtığı gözlenmiştir (Hao ve ark., 2022).

2013 yılında Marzieh Badinloo ve Saeed Esmaceli-Mahani'nin yaptığı bir çalışmada üç farklı malign hücre hattı kullanarak PI3K inhibitörü LY294002'nin sitotoksik etkileri incelenmiştir. Bu çalışmada vinkristin, etopozid ve doksorubisinin LY294002 ile kombine tedavisi SK-OV-3 MDA-MB-468 ve A549 hücre hatlarında değerlendirilmiştir. Etopozid, vinkristin ve doksorubisinin sitotoksik aktiviteleri MTT testi ile belirlenmiştir. Ardından LY294002'nin bu ajanlarla kombinasyon uygulamasının etkileri değerlendirilmiştir. (Badinloo & Esmaceli-Mahani, 2014).

SK-OV-3 hücre hattında Vinkristin ile 10 µm dozunda LY294002 kullanılması toksisiteyi artırmıştır. Doksorubisin 0.01, 0.1 ve 1 µg/mL dozlarında hücre büyümesini %32, %51 ve %60 oranında inhibe etmiştir. LY294002 ile kombinasyonunda bu oranlar sırasıyla %45, %78 ve %85'e yükselmiştir. Etoposid tekli uygulamasında daha düşük dozlarda (0,001 ve 0,01 µg/mL) etkisiz olmuştur. Ancak LY294002 ile birleştirildiğinde 0,1 ve 1 µg/mL'de etkileri güçlendirmiştir. MDA-MB-468 hücre hattında artan dozlarda (0.001, 0.01, 0.1 ve 1 µg/mL) etoposid ile muamelesi hücre büyümesini inhibisyon oranlarını sırasıyla %10, %22, %43 ve %64'ten %13, %35, %71 ve %89'a çıkarmıştır. Doksorubisinin MDA-MB-468'de LY294002 ile kullanılması inhibisyon oranlarını sırasıyla %18, %25, %52 ve %67'den %24, %39, %77 ve %80'e artmıştır. A549 hücrelerinde 0.001, 0.001, 0.1 ve 1 µg/mL etoposidin tek başına kullanımına kıyasla LY294002 ile kombinasyonu hücre canlılığını sırasıyla %9, 17, 47 ve 54'ten %22, 40, 81 ve 87'ye çıkarabilmiştir. Yine A549 hücrelerinde 10 µm LY294002'nin 0,1 ve 1 µg/mL doksorubisininin birlikte kullanılması inhibisyonu sırasıyla %53'ten %67'ye ve %62'den %80'ne yükseltmiştir. A549 hücrelerinde LY294002'nin yalnızca 1 µm vinkristin ile birlikte kullanıldığı zaman etkisi %76'dan %88'e yükselmiştir (Badinloo & Esmaceli-Mahani, 2014).

Huicong Yang ve arkadaşlarının 2017 yılında yayınladığı bir çalışmada PHI (fenilhekzil izotiyosiyanat) ve PI3K inhibitörü LY294002 kullanarak AML hücre hattı HL-60 hücrelerinde hücre canlılığı MTT deneyi ile değerlendirilmiş, hücre apoptozu akış sitometrisi aracılığıyla ölçülmüştür. LY294002 ve PHI'nin hücre apoptozu üzerindeki etkisi HL-60 hücrelerinde tek başına kullanılmalarına kıyasla her biri 20 µmol/l'de 72 saat süre ile kombinasyonu %52,7±4,51 apoptozise yol açtığı gözlemlenmiştir. Her iki etken maddenin HL-60 hücrelerinde tek başına kullanılması karşılaştırıldığında LY294002 (%12,4±1,52) ve PHI (%15,4±3,48) kombinasyonu daha yüksek apoptozise yol açmıştır. PHI, eşdeğer konsantrasyonlarda apoptozu indüklemeye LY294002'den daha güçlü görünmektedir. Bu çalışmanın sonuçları, LY294002 ve PHI'nin HL-60 hücrelerinde hücre canlılığını inhibe edebildiğini ve hücre apoptozunu indükleyebildiğini saptamıştır (Yang ve ark., 2017).

Çalışmamızda ise kontrol grubunda canlılık %83,3 ve apoptoz oranı %16,2 bulunmuştur.

K562 hücrelerinde 45,88 µM'deki LY294002 %82,4 canlılık ve %17,3 apoptozisile sonuçlanmakta olup, 108.66 nM ponatinib ile birlikte hücre canlılığını önemli ölçüde azaltır (%26) ve yüksek oranda apoptozise neden olur (%68), bu da güçlü bir etkinlik gösterir.

K562 hücreleri için, LY294002'nin ponatinib ile birleştirilmesi, ponatinibin güçlü apoptotik etkisinden ve LY294002'nin PI3K yolağı inhibisyonundan yararlanılarak terapötik etkinliği artırdığını düşünmekteyiz.

2009 yılında Qing Wu ve meslektaşlarının yayınladığı çalışmada K562 hücrelerinde Wortmanninin farklı konsantrasyonlarda (3.125–100 nmol/L) 72 saat süreyle muamelesi ile hücre canlılığını değerlendirmek için MTT testi kullanılmıştır. K562 hücrelerinin proliferasyonunu zaman ve doza bağımlı bir şekilde wortmannin tarafından inhibe edilmiştir. 24 saatlik IC50 değeri 25 nmol/L iken, 48 saatlik sürede 12.5 nmol/L ve 72 saatlik sürede 6.25 nmol/L olarak bulunmuştur. Bu, hücrelerin daha uzun süre wortmannin ile maruz kaldıkça proliferasyonlarının daha etkili bir şekilde inhibe edildiğini göstermektedir (Wu, Chen, Cui, & Cheng, 2009).

Wortmannin'in düşük IC50 değerleri, onun güçlü bir sitotoksik etkisi olduğunu ve düşük konsantrasyonlarda bile etkili olabileceğini ortaya koymaktadır. LY294002, ABT199 ve Matrin gibi diğer maddelerle karşılaştırıldığında, wortmanninin daha düşük dozlarda etkili olduğu görülmektedir.

Tez çalışmamızda LY294002'nin daha uzun bir süre boyunca ve çok daha yüksek bir dozda etkili olması, onun hücre proliferasyonunu inhibe etme ve apoptozu indüklemeye yeteneğinin wortmannin'e göre daha yavaş olduğunu ve çok daha yüksek konsantrasyonlar gerektirdiğini düşündürmektedir.

LY294002'nin IC50 değeri K562 hücrelerinde Damiano ve meslektaşları tarafından yapılan çalışmada 24 saatte 1,9 μM (Ciarcia ve ark., 2013), Jorgensen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise 72. Saatte 25 μM saptanmıştır (Jørgensen ve ark., 2005).

Farklı bir çalışmada, Chen ve ekibi idelalisibin, K562 hücrelerinin çoğalmasını konsantrasyona bağlı olarak durdurduğunu ve 48. saatte IC50 değerinin 71,4 μM olduğunu tespit etmiştir. (Chen ve ark., 2016).

Güçlü bir pan-sınıf I PI3K inhibitörü olan ZSTK474'ün 48. Saatte K562 hücrelerinde IC50 değeri 4,69 μM olarak belirlenmiştir (Zhou ve ark., 2016).

ZSTK474, K562 hücre hattında hücre proliferasyonunu inhibe etme açısından LY294002'ye göre çok daha güçlü ve etkili bir inhibitördür. ZSTK474'ün IC50 değeri 4,69 $\mu\text{mol/L}$ iken, LY294002'ninki 45,88 $\mu\text{mol/L}$ 'dir.

Yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında, tez çalışmamızda LY294002'nin IC50 değerleri, önceki çalışmalara kıyasla oldukça yüksektir. K562 hücrelerinde PI3K inhibitörü LY294002'nin IC50 dozları, 24. saatte 47,55 μM , 48. saatte 45,88 μM olarak belirlenmiştir. Bu durum, hücre hattı farklılıkları, deneysel koşullar veya kullanılan etken maddelerin saflığı gibi çeşitli faktörlerden kaynaklanabilir. Ponatinibin K562 hücrelerinde 24. Saatte 306,4 nM, 48. Saatte IC50 108,6 nM olarak belirlenmiştir.

LY294002'nin daha yüksek IC50 değerleri, bu inhibitörün K562 hücrelerinde daha az etkili olduğunu, buna karşın ZSTK474 ve ponatinibin daha düşük IC50 değerleri ile daha güçlü inhibitörler olduğunu göstermektedir.

Çeşitli tirozin kinaz inhibitörlerinin K562 hücreleri üzerindeki etkileri farklılık arz etmektedir.

Okabe ve ekibinin K562 hücreleri üzerinde gerçekleştirdikleri araştırmalarda, 500 nM imatinib kullanımıyla %80, 1 nM ponatinib kullanımıyla ise %78 oranında büyüme inhibisyonu tespit edilmiştir (Okabe, Tauchi, Tanaka, Sakuta, & Ohyashiki, 2016).

Çalışmamızda, kontrol grubunda canlılık oranı %83,3, apoptoz oranı ise %16,2 olarak belirlenmiştir. K562 hücrelerine 108,6 nM ponatinib uygulandığında apoptoz oranı %41,6,

canlılık oranı ise %47,6 olarak bulunmuştur. 45,88 µM LY294002 tekli uygulaması ise K562 hücrelerinde %82,4 canlılık ve %17,3 apoptoz oranı sağlamıştır.

Çalışmada, kontrol grubuna kıyasla hem ponatinib hem de LY294002'nin tekli uygulamalarının ve özellikle bu iki maddenin kombinasyonunun K562 hücrelerinde apoptoz oranını artırdığı gözlemlenmiştir.

Bu sonuçlar, ponatinibin K562 hücrelerinde apoptozu önemli ölçüde artırma potansiyelini gösterirken, LY294002'nin etkisinin daha sınırlı olduğunu ancak kombinasyon halinde etkisinin önemli derecede arttığını ortaya koymaktadır.

Ayrıca CFSE proliferasyon deneyinde ponatinib ve LY294002 etken maddesinin hücre proliferasyonunun inhibe edilmesinde anlamlı bir etkiye sebep olduğunu; kombinasyon uygulamasının ise hücre proliferasyonunda en önemli azalmayı gösterdiği ve bunun da LY294002 ile ponatinib arasında CFSE deneyinde sinerjik bir etki yarattığını düşündürmektedir.

Dolayısıyla, ponatinib ve LY294002 kombinasyonu, K562 hücrelerinde apoptozu artırmak için sinerjik bir etkiye sahip olabilir ve bu da tedavi stratejilerinde dikkate alınması gereken bir bulgudur. Bu kombinasyon tedavisi, özellikle daha dirençli kanser hücrelerinin yok edilmesinde potansiyel bir yaklaşım olarak değerlendirilebilir.

6. Sonuç ve Öneriler

Ponatinib ve LY294002 kemoterapötik ajanının K562 kronik miyeloid hücre hattında antikanser etkileri araştırılmıştır. Deneyler, 24., 48. ve 72. saatlerde yapılmış olup, en düşük IC50 dozu 48. saatte belirlenmiştir. Tez çalışmamızda K562 hücre hattında LY294002'nin IC50 değeri 48. saatte 45,88 μ M olarak saptanmıştır. Ponatinib için IC50 değeri 108,6 nM olarak belirlenmiştir. Apoptoz deneyinde etken maddelerin IC50 değerleri ve kombinasyonu uygulanmıştır. LY294002 ve ponatinib, CFSE deneyinde; kombinasyon, kontrole göre ve tekli etken madde uygulaması ile kıyaslandığında proliferasyon hızını azaltmış göstermektedir.

Apoptozda da; kombinasyon, kontrole göre ve tekli etken madde uygulamasına kıyasla K562 hücre hattında apoptozu indüklemiştir.

Elde ettiğimiz sonuçların ileride yapılacak olan çalışmalara BCR-ABL1 tirozin kinazını inhibe etmeye yönelik hedefli yaklaşımlara katkı ve devam eden araştırmalara ön veri sağlayacağı düşünülmektedir.

Tezimizin sonuçları, ponatinib ve LY294002'nin hem tek hem de kombinasyon halinde etkinliği hakkında önemli veriler sağlayarak in vitro çalışmalar için önemlidir. Bu sonuçlar, daha etkili ve çok hedefli kanser tedavileri geliştirmek için temel sağlayacaktır.

7. Kaynaklar

- Ahmed, R., Naqi, N., Hussain, I., Khattak, B. K., Nadeem, M., & Iqbal, J. (2009). Presentating phases of chronic myeloid leukaemia. *J Coll Physicians Surg Pak*, 19(8), 469-472.
- Aitken, M. J., Benton, C. B., Issa, G. C., Sasaki, K., Yilmaz, M., & Short, N. J. (2021). Two cases of possible familial chronic myeloid leukemia in a family with extensive history of cancer. *Acta haematologica*, 144(5), 585-590.
- Al-Ameri, A., Cherry, M., Al-Kali, A., & Ferrajoli, A. (2010). The Role of Monoclonal Antibodies in the Management of Leukemia. *Pharmaceuticals*, 3(10), 3258-3274.
- Alan, N. (2019). *Florlu Schiff bazlarının pankreas kanseri hücre hatları üzerine antiproliferatif etkisinin cfse boyama metodu ile belirlenmesi/Determining of antiproliferative effects of flourinated Schiff bases on pancreatic cancer cell lines by using cfse staining methods.*
- Alshurafa, A., Ekeibed, Y., Akiki, S., Alzeyara, M., Nawaz, Z., & Yassin, M. A. (2023). Spontaneous Remission in a Patient with Chronic Myeloid Leukemia: A Case Report. *Case Reports in Oncology*, 16(1), 1073-1079.
- America, S. P. Sumitomo Pharma Presents New Clinical Data on DSP-5336 at the European Hematology Association 2024 Congress.
- Anindita, S., Marnolia, A., Putra, H. H., Haikal, M. C., & Tambunan, U. S. F. (2018). *Novel inhibitors of T315I mutant BCR-ABL1 tyrosine kinase for chronic myeloid leukemia disease through fragment-based drug design.* Paper presented at the Bioinformatics Research and Applications: 14th International Symposium, ISBRA 2018, Beijing, China, June 8-11, 2018, Proceedings 14.
- Arora, T., Kaur, M., & Nand, P. (2022). Deep Learning Methods for Chronic Myeloid Leukaemia Diagnosis. *Trends and Advancements of Image Processing and its Applications*, 145-163.
- Badinloo, M., & Esmaceli-Mahani, S. (2014). Phosphatidylinositol 3-kinases inhibitor LY 294002 potentiates the cytotoxic effects of doxorubicin, vincristine, and etoposide in a panel of cancer cell lines. *Fundamental & clinical pharmacology*, 28(4), 414-422.
- Bonifacio, M., Stagno, F., Scaffidi, L., Krampera, M., & Di Raimondo, F. (2019). Management of chronic myeloid leukemia in advanced phase. *Frontiers in oncology*, 9, 1132.
- Braun, T. P., Eide, C. A., & Druker, B. J. (2020). Response and resistance to BCR-ABL1-targeted therapies. *Cancer cell*, 37(4), 530-542.
- Breccia, M., Pregno, P., Spallarossa, P., Arboscello, E., Ciceri, F., Giorgi, M., . . . Ottolini, S. (2017). Identification, prevention and management of cardiovascular risk in chronic myeloid leukaemia patients candidate to ponatinib: an expert opinion. *Annals of hematology*, 96, 549-558.
- Chandran, R. K., Geetha, N., Sakthivel, K. M., Kumar, R. S., Krishna, K. M. N. J., & Sreedharan, H. (2019). Differential gene expression changes and their implication on the disease progression in patients with chronic myeloid leukemia. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 77, 51-60.
- Chen, Y., Zhou, Q., Zhang, L., Wang, R., Jin, M., Qiu, Y., & Kong, D. (2016). Idelalisib induces G1 arrest and apoptosis in chronic myeloid leukemia K562 cells. *Oncology Reports*, 36(6), 3643-3650.
- Ciarcia, R., Damiano, S., Montagnaro, S., Pagnini, U., Ruocco, A., Caparrotti, G., . . . Rizzolio, F. (2013). Combined effects of PI3K and SRC kinase inhibitors with imatinib on intracellular calcium levels, autophagy, and apoptosis in CML-PBL cells. *Cell Cycle*, 12(17), 2839-2848.

- Davis, A. S., Viera, A. J., & Mead, M. D. (2014). Leukemia: an overview for primary care. *American family physician*, 89(9), 731-738.
- Duff, A., Kavege, L., Baquier, J., & Hu, T. (2021). A PI3K inhibitor-induced growth inhibition of cancer cells is linked to MEK-ERK pathway. *Anti-Cancer Drugs*, 32(5), 517-525.
- Duncan, L., Shay, C., & Teng, Y. (2020). PI3K isoform-selective inhibitors in cancer. *Single-Cell Sequencing and Methylation: Methods and Clinical Applications*, 165-173.
- Frazer, R., Irvine, A. E., & McMullin, M. F. (2007). Chronic myeloid leukaemia in the 21st century. *The Ulster medical journal*, 76(1), 8.
- Geng, Y., Wu, W., Zhou, L., Li, J., Geng, Y., & Yang, Y. (2021). Synergistic effects of LY294002 and ABT199 on the cell cycle in K562, HL60 and KG1a cells. *Oncology Reports*, 45(6), 1-9.
- Hao, Y., Ji, J., Liu, C., Zhang, N., & Gong, Y. (2022). Effects of matrine combined with LY294002 on proliferation, apoptosis and cell cycle of human myeloid leukemia K562 cells. *Nan Fang yi ke da xue xue bao= Journal of Southern Medical University*, 42(11), 1739-1746.
- Hart, M., & Linden, M. A. (2014). Chronic myelogenous leukemia morphology and immunophenotype. In *Chronic Myeloid Leukemia: From Daily Management to Complicated Issues* (pp. 23-33): Nova Science Publishers, Inc.
- How, J., Venkataraman, V., & Hobbs, G. S. (2021). Blast and accelerated phase CML: room for improvement. *Hematology*, 2021(1), 122-128.
- Höglund, M., Sandin, F., & Simonsson, B. (2015). Epidemiology of chronic myeloid leukaemia: an update. *Annals of hematology*, 94, 241-247.
- Hu, Y., Li, Q., Hou, M., Peng, J., Yang, X., & Xu, S. (2021). Magnitude and temporal trend of the chronic myeloid leukemia: on the basis of the global burden of disease study 2019. *JCO global oncology*, 7, 1429-1441.
- Izzo, B., Accetta, R., Caruso, S., De Angelis, B., Del Prete, C., Errichiello, S., . . . Quintarelli, C. (2015). Molecular monitoring in chronic myeloid leukemia (CML). *BIOCHIMICA CLINICA*, 39(2), 94-99.
- Jabbour, E., & Kantarjian, H. (2022). Chronic myeloid leukemia: 2022 update on diagnosis, therapy, and monitoring. *American journal of hematology*, 97(9), 1236-1256.
- Jørgensen, H., Allan, E., Graham, S., Godden, J., Richmond, L., Elliott, M., . . . Holyoake, T. (2005). Lonafarnib reduces the resistance of primitive quiescent CML cells to imatinib mesylate in vitro. *Leukemia*, 19(7), 1184-1191.
- Kang, Z.-J., Liu, Y.-F., Xu, L.-Z., Long, Z.-J., Huang, D., Yang, Y., . . . Yan, J.-S. (2016). The Philadelphia chromosome in leukemogenesis. *Chinese journal of cancer*, 35, 1-15.
- Kralj, E., Žakelj, S., Trontelj, J., Pajič, T., Zupan, I. P., Černelč, P., . . . Kristl, A. (2013). Monitoring of imatinib targeted delivery in human leukocytes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 50(1), 123-129.
- Naeim, F. (2012). *Atlas of hematopathology: morphology, immunophenotype, cytogenetics, and molecular approaches*: Academic press.
- Narayanan, V., Pollyea, D., Gutman, J., & Jimeno, A. (2013). Ponatinib for the treatment of chronic myeloid leukemia and Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Drugs of Today (Barcelona, Spain: 1998)*, 49(4), 261-269.
- Nowell, P., & Hungerford, D. (2004). A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Landmarks in medical genetics: classic papers with commentaries*, 132(51), 103.
- O'Hare, T., Shakespeare, W. C., Zhu, X., Eide, C. A., Rivera, V. M., Wang, F., . . . Xu, Q. (2009). AP24534, a pan-BCR-ABL inhibitor for chronic myeloid leukemia, potently

- inhibits the T315I mutant and overcomes mutation-based resistance. *Cancer cell*, 16(5), 401-412.
- Okabe, S., Tauchi, T., Tanaka, Y., Sakuta, J., & Ohyashiki, K. (2016). Combination therapy with copanlisib and ABL tyrosine kinase inhibitors against Philadelphia chromosome-positive resistant cells. *Oncotarget*, 7(33), 53116.
- Padmavathi, G., Banik, K., Roy, N. K., Monisha, J., & Kunnumakkara, A. B. (2017). Role of BCR-ABL Fusion Kinase in the Development of Leukemia. In *Fusion Genes and Cancer* (pp. 111-127): World Scientific.
- Peng, Y., Huang, Z., Zhou, F., Wang, T., Mou, K., & Feng, W. (2021). Effect of HSP90AB1 and CC domain interaction on Bcr-Abl protein cytoplasm localization and function in chronic myeloid leukemia cells. *Cell Communication and Signaling*, 19(1), 71.
- Rinaldi, I., & Winston, K. (2023). Chronic myeloid leukemia, from pathophysiology to treatment-free remission: a narrative literature review. *Journal of Blood Medicine*, 261-277.
- Rohrbacher, M., & Hasford, J. (2013). Etiology and epidemiology of chronic myeloid leukemia. *Neoplastic Diseases of the Blood*, 11-17.
- Rohrbacher, M., & Hasford, J. (2018). Epidemiology and etiology of chronic myeloid leukemia. *Neoplastic Diseases of the Blood*, 9-17.
- Shanmuganathan, N., Chereda, B., & Melo, J. V. (2021). The Biology and Pathogenesis of Chronic Myeloid Leukaemia. In *Chronic Myeloid Leukemia* (pp. 17-36): Springer.
- Shroff, G. S., Truong, M. T., Carter, B. W., Benveniste, M. F., Kanagal-Shamanna, R., Rauch, G., . . . Wu, C. C. (2019). Leukemic involvement in the thorax. *Radiographics*, 39(1), 44-61.
- Singh, V. K., Chang, H.-H., Kuo, C.-C., Shiao, H.-Y., Hsieh, H.-P., & Coumar, M. S. (2017). Drug repurposing for chronic myeloid leukemia: in silico and in vitro investigation of DrugBank database for allosteric Bcr-Abl inhibitors. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 35(8), 1833-1848.
- Singh, V. K., & Coumar, M. S. (2019). Chronic myeloid leukemia: existing therapeutic options and strategies to overcome drug resistance. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 19(4), 333-345.
- Soverini, S., Mancini, M., Bavaro, L., Cavo, M., & Martinelli, G. (2018). Chronic myeloid leukemia: the paradigm of targeting oncogenic tyrosine kinase signaling and counteracting resistance for successful cancer therapy. *Molecular cancer*, 17, 1-15.
- Szymańska, K., & Park, S. (2019). Chronic Myelogenous Leukemia: Pathology, Genetics, Diagnosis, and Treatment.
- Tan, Y., Huang, Z., Wang, X., Dai, H., Jiang, G., & Feng, W. (2021). A novel fusion circular RNA F-circBA1 derived from the BCR-ABL fusion gene displayed an oncogenic role in chronic myeloid leukemia cells. *Bioengineered*, 12(1), 4816-4827.
- Tebbi, C. K. (2021). Etiology of acute leukemia: A review. *Cancers*, 13(9), 2256.
- Whiteley, A. E., Price, T. T., Cantelli, G., & Sipkins, D. A. (2021). Leukaemia: a model metastatic disease. *Nature reviews cancer*, 21(7), 461-475.
- Wu, Q., Chen, Y., Cui, G., & Cheng, Y. (2009). Wortmannin inhibits K562 leukemic cells by regulating PI3k/Akt channel in vitro. *Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]*, 29, 451-456.
- Xu, W.-h., Liang, D.-y., Wang, Q., Shen, J., Liu, Q.-H., & Peng, Y.-B. (2019). Knockdown of KDM2A inhibits proliferation associated with TGF- β expression in HEK293T cell. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 456, 95-104.

- Yang, H., Huang, Y., Zou, Y., & Ma, X. (2017). Synergistic effects of phenylhexyl isothiocyanate and LY294002 on the PI3K/Akt signaling pathway in HL-60 cells. *Oncology Letters*, 14(3), 3043-3050.
- Zhou, Q., Chen, Y., Chen, X., Zhao, W., Zhong, Y., Wang, R., . . . Kong, D. (2016). In vitro antileukemia activity of ZSTK474 on K562 and multidrug resistant K562/A02 cells. *International Journal of Biological Sciences*, 12(6), 631.



8. Teşekkür

Yüksek lisans sürecimde eşsiz rehberliğini, uzmanlığını benimle paylaşan, destekleyici geri bildirimlerini ve her türlü desteğini esirgemeyen saygıdeğer danışanım Sn. Prof. Dr. Cumhuri GÜNDÜZ'e

Bilgi ve desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım Doç. Dr. Çığır BİRAY AVCI'ya, Sn. Doç. Dr. Nur SELVİ GÜNEL'e, Sn. Doç. Dr. Zuhale EROĞLU'na, Sn. Doç. Dr. Buket KOSOVA'ya, Sn. Doç. Dr. Vildan BOZOK ÇETİNTAŞ'a, Sn. Doç. Dr. Burçin TEZCANLI KAYMAZ'a, Sn. Doç. Dr. Aslı TETİK VARDARLI'ya, Sn. Doç. Dr. Sunde YILMAZ SÜSLÜER'e,

Yüksek lisans eğitimimde her türlü yardımına koşan, beni asla yalnız bırakmayan fedakar arkadaşım Ayşe ÇEKİN'e, eğitimimin en başında bana her şeyi öğreten Zeynep ÖZİLERİ'ye dünyanın bir ucunda kendine yeni bir sayfa açan ama desteğini asla eksik hissetmediğim en çok sevdiğim bilim insanı İbrahim Halil ÇİTÇİ'ye, her zaman beni dinleyen birlikte çok eğlendiğim arkadaşlarım İrem KARACAN'a, Gaye HAMARAT'a, Kutay BULUT'a

Dünyanın neresinde olursam olayım her zaman yanımda olan en yakın arkadaşım Merve ARSLAN'a

Sonsuz sevgisi ve desteği ile beni ayakta tutan annem Türkan SAĞLAM'a, bana her zaman her türlü desteği sağlamaya çalışan babam Yüksel SAĞLAM'a, dünyanın en iyi ablasına sahip olduğum için ablam Tuğçe SAĞLAM YILMAZ'a ve bana bir ağabey olduğu için eşi Tolga YILMAZ'a, sadece varlığı ile bile beni mutlu edebilen canım kardeşim Semih SAĞLAM'a

En son olarak kendime bile güvenmediğim zamanlarda bile asla bana inanmaktan vazgeçmeyen ve sevgisi, güveni, desteği ile dünyanın en iyi eşine sahip olduğum için Mert Musa YURT'a
Sonsuz teşekkürler...

İzmir, 19.02.2025

Çağla YURT

9. Özgeçmiş

Lisans eğitimini 2016-2020 yıllarında Trakya Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik bölümünde tamamladı. Yüksek lisans eğitimini 2022-2024 yıllarında Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı'nda sürdürdü.

İleri seviyede İngilizce, başlangıç seviyesinde Hollandaca bilmektedir.

