



T.C.

SIVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**PI3K/AKT/MTOR YOLAK İNHİBİYONU İLE ANTiOKSiDAN
MADDE KOMBİNASYONUNUN
BURKİTT LENFOMA HÜCRE HATTI ÜZERİNDE
ANTiTÜMORAL ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. İbrahim KARADUMAN

UZMANLIK TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

SIVAS

2021



T.C.

SIVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**PI3K/AKT/MTOR YOLAK İNHİBİSYONU İLE ANTİOKSİDAN
MADDE KOMBİNASYONUNUN
BURKİTT LENFOMA HÜCRE HATTI ÜZERİNDE
ANTİTÜMORAL ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. İbrahim KARADUMAN

UZMANLIK TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYELERİ

Doç. Dr. Hatice TERZİ

Dr. Öğr. Üyesi Merve ERGÜL

SIVAS

2021



Tıpta Uzmanlık Tez Yazım Yönergesi, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 10/02/2010 tarih ve 2010/1-2 sayılı kararı ile kabul edilerek yürürlüğe girmiştir. Bu tez bu yönetmelik hükümlerine göre yazılmıştır.

ONAY SAYFASI

“Bu tez, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından İç Hastalıkları Anabilim Dalı’nda uzmanlık tezi olarak kabul edilmiştir.

İmza

Başkan: Doç. Dr. Hatice TERZİ

Üye: Prof. Dr. Mehmet ŞENCAN

Üye: Doç. Dr. Serdal KORKMAZ

Bu tez, tarih ve sayılı Yönetim Kurulu Kararı ile belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Hilmi ATASEVEN

Tıp Fakültesi Dekan Vekili

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmam sırasında ve uzmanlık eğitimim sırasında bilgisi ve tecrübeleriyle hiçbir zaman desteğini esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. Hatice Terzi'ye,

Tez çalıőmam sırasında her türlü akademik ve bilimsel tecrübesiyle yanımda olan diğer danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Merve Ergül'e,

Çalıőmamın ve tezimin yapım aőamasında her zaman destek ve yardımda bulunan değerli arkadaőım Dr. Fatih Yulak'a,

Hayatımın her anında yanımda olan ve maddi manevi hiçbir desteğini esirgemeyen sevgili annem ve babama,

Uzmanlık eğitimim süresince zorlandığım her an yanımda olan, desteğini esirgemeyen eőime ve son yılımda bana neőe kaynağı olan oğluma teőekkürlerimi sunarım.

Dr. İbrahim KARADUMAN

2021

ÖZET

Dr. İbrahim KARADUMAN, İç Hastalıkları A.B.D., Sivas 2021

Burkitt lenfoma agresif bir B hücreli non-Hodgkin lenfoma alt tipidir. Genç erişkin ve çocuklarda görülme sıklığı daha fazla olmakla birlikte yetişkinlerdeki lenfomaların yaklaşık %1-2'sini oluşturur. Yüksek Ki-67 oranlarına sahip olduğu için hem progresyon hızı hem de kemoterapiye duyarlılığı yüksektir. Ancak kemoterapiye dirençli relaps/refrakter gruplarda tedavi başarısı düşmektedir. Bu nedenle, Burkitt lenfoma patogeneziyle ilgili biyolojik yolları hedefleyen yeni ve daha az toksik terapötik ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bizim çalışmamızda ise Burkitt lenfoma patogeneziinde rol oynayan PI3K/AKT/mTOR yolağı inhibitörü ETP 45658 ve Resveratrol'un, Burkitt lenfoma hücre hattı üzerinde antitümoral etkinliğinin saptanması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda Burkitt lenfoma Raji hücre hattı kullanılmıştır. ETP 45658; 50, 25, 12.5, 1, 0.1, 0.01 μ M konsantrasyonlarda tek başına ve Resveratrol 100 μ M ile kombine edilerek hücre hattına uygulanmış sonrasında *in vitro* XTT hücre canlılık testi ile ETP 45658'in ve kombinasyonun Raji hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi değerlendirilmiştir. XTT testinde alınan sonuçlara göre IC₅₀ değeri hesaplanmıştır. Hesaplanan IC₅₀ değeri ile apoptozis ve hücre döngüsü deneyleri flow sitometri yöntemi aracılığı ile çalışılmıştır.

Çalışmamızda Burkitt lenfoma Raji hücreleri üzerine artan konsantrasyonlarda ETP 45658'in tek başına ve kombinasyon uygulanmasının istatistiksel olarak anlamlı bir sitotoksik etkisi olduğu gösterildi. Bu sitotoksik etki kombinasyon tedavisinde daha yüksek olarak bulundu. Hesaplanan IC₅₀ değeri ile yapılan apoptoz deneylerinde ise apoptozu zayıf bir şekilde indüklediği tespit edildi.

Çalışmamızın sonucu olarak; hem ETP 45668 tek başına hem de Resveratrol ile kombinasyonunun Burkitt lenfoma hücre hattı üzerine antitümoral etkinliği olduğu gösterildi. Relaps/refrakter Burkitt lenfomalı hastalarda PI3K/Akt/mTOR yolak inhibitörleri alternatif bir tedavi seçeneği olabilir. Ancak konuyla ilgili daha fazla prelinik ve klinik çalışmaya ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: ETP 45658, Resveratrol, Sitotoksisite, Raji hücreleri, XTT



ABSTRACT

**Dr. İbrahim KARADUMAN, Department of Internal Medicine, Sivas
2021**

Burkitt lymphoma is an aggressive B-cell non-Hodgkin lymphoma subtype. Although its incidence is higher in young adults and children, it constitutes approximately 1-2% of lymphomas in adults. Since it has high Ki-67 ratios, it has a high rate of progression and a high sensitivity to chemotherapy. However, treatment success decreases in chemotherapy-resistant relapse/refractory groups. Therefore, there is a need for new and less toxic therapeutic agents that target biological pathways involved in Burkitt lymphoma pathogenesis. In our study, it was aimed to determine the antitumoral activity of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitor ETP 45658 and Resveratrol, which play a role in the pathogenesis of Burkitt lymphoma, on the Burkitt lymphoma cell line.

Burkitt lymphoma Raji cell line was used in the study. ETP 45658 was applied to the cell line at 50, 25, 12.5, 1, 0.1, 0.01 μ M concentrations alone and in combination with Resveratrol 100 μ M. Afterward, the cytotoxic effect of ETP45658 and the combination on Raji cells was evaluated by *in vitro* XTT cell viability test. The IC₅₀ value was calculated according to the results obtained in the XTT test. Calculated IC₅₀ value and apoptosis and cell cycle experiments were studied by flow cytometry method.

In the study, it was shown that the application of increasing concentrations of ETP 45658 alone and in combination on Burkitt lymphoma Raji cells had a statistically significant cytotoxic effect. This cytotoxic effect was found to be higher in combination therapy. In the apoptosis experiments performed with the calculated IC₅₀ value, it was determined that it induced apoptosis weakly.

In the study, it was shown that the application of increasing concentrations of ETP 45658 alone and in combination on Burkitt lymphoma Raji cells had a statistically significant cytotoxic effect. This cytotoxic effect was found to be higher in

combination therapy. PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitors may be an alternative treatment option in patients with relapsed/refractory Burkitt lymphoma. However, more preclinical and clinical studies on the subject are needed.

Key words: ETP 45658, Resveratrol, Cytotoxicity, Raji cells, XTT



İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
ŞEKİLLER.....	xv
TABLolar	xvi
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Non Hodgkin Lenfomalar	3
2.1.1. Etyoloji.....	5
2.1.2. Epidemiyoloji.....	6
2.1.3. Patofizyoloji	6
2.1.4. Sınıflandırma.....	7
2.2. Burkitt Lenfoma.....	8
2.2.1. Etyoloji.....	9
2.2.2. Epidemiyoloji.....	11
2.2.3. Klinik Özellikler.....	11
2.2.4. Tanı	12
2.2.5. Histopatoloji ve İmmunhistokimya.....	13
2.2.6. Sitogenetik ve Moleküler Patofizyoloji	13

2.2.7. Evreleme	15
2.2.8. Prognoz	17
2.2.9. Tedavi.....	18
2.3. PROTEİN KİNAZ İNHİBİTÖRLERİ	20
2.3.1. PI3K/AKT/mTOR Yolağı.....	21
2.4. Resveratrol	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1. Kanser Hücrelerinin ve Kullanılacak İlaçların Temini	25
3.2. Hücre Kültürü Teknikleri.....	25
3.2.1. Hücre Hattının Açılması	25
3.2.2. Hücrelerin Çoğaltılması	25
3.2.3. Hücrelerin Pasajlanması.....	25
3.3. XTT Hücre Canlılık Testi	26
3.3.1. Raji hücrelerinde İlaçların Tek Başlarına XTT hücre canlılığı değerlendirilmesi.....	26
3.3.2. Raji hücrelerinde İlaç Kombinasyonlarının XTT hücre canlılığı değerlendirilmesi.....	27
3.4. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması.....	27
3.5. Apoptosis ve Hücre Ölümünün Flow Sitometri Yöntemi ile Değerlendirilmesi	28
3.6. Deney Verilerinin İstatiksel Tayini.....	30
4. BULGULAR.....	31
4.1. ETP 45658'in Raji Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisi	31
4.2. Resveratrol'ün Raji Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisi.....	32
4.3. ETP 45658 + Resveratrol Kombinasyonun Raji Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisi	33

4.4. Apoptoz ve Hücre Ölümünün Flow Sitometri Yöntemi ile Değerlendirilmesi	39
5. TARTIŞMA	42
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	49
7.KAYNAKLAR	51



SİMGELER VE KISALTMALAR

4EBP1:	Ökaryotik translasyon başlatıcı faktör 4E bağlı protein 1
AIDS:	Kazanılmış immün yetmezlik sendromu
Akt:	Protein kinaz b
AMPK:	Adenozin Monofosfat Kinaz
AMPRA 1:	Beklin-1 regülatuar aktive edici otofaji protein 1
ATTC:	American Type Cell Collection
BL:	Burkitt lenfoma
BL-IPI:	Burkitt Lenfoma Uluslararası Prognostik İndeks
CAR T:	Kimerik Antijen Reseptör T
CHOP:	Siklofosamid, doksorubisin, sitarabin ve prednol
CÜBAP:	Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
DBBHL:	Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma
DMSO:	Dimetil Sülfoksit
EBNA:	Ebstain Barr Nükleer Antijen
EBV:	Ebstain Barr Virüs
EGFR:	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
FBS:	Fetal Bovine serum
HCV:	Hepatit C Virüs
HIV:	İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü
HTLV-1:	İnsan T lenfosit virüs-1
IC₅₀:	Yarı İnhibitör Konsantrasyon

LKB1:	Karaciğer Kinaz B1
MCL:	Mantle Hücreli Lenfoma
MDR:	Minimal Rezidüel Hastalık
mTOR:	Memeli rapamisin hedefi
mTORC:	Memeli Rapamisin Hedef Kompleksi
NHL:	Non-Hodgkin Lenfoma
NK:	Doğal Öldürücüler
OD:	Optik Dansite
ORR:	Toplam Yanıt Oranı
PDGF:	Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
PDK1:	3 Fosfoinozidit Bağımlı Protein Kinaz 1
PI:	Fosfatidilinositol
PI3K:	Fosfatidilinositol 3 Kinaz
PIP3:	Fosfotidilinozitol 3,4,5 Trifosfat
PTEN:	Fosfataz Tensin Homolog
RTK:	Reseptör tirozin kinazlar
S6K:	Ribozomal S6 kinaz
Th:	T helper
TLR-9:	Tool Like Receptor 9
VEGF:	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VEGFR:	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptör
WHO:	Dünya Sağlık Örgütü
OS:	Ortalama Sağ Kalım

PFS: Hastaliksız Ortalama Sağ Kalım

XTT: 2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)
carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide



ŞEKİLLER

2.1. Burkitt lenfomada tarihçesi	9
2.2. Burkitt lenfoma etyolojisi	11
3.1. XTT'nin formazana dönüşümü	26
3.2. Sağlıklı hücre, apoptotik hücre ve geç apoptotik hücrenin görsel ifadesi.....	28
3.3. Apoptozise gitmemiş veya erken dönem ve geç dönem apoptotik hücrelerin gösterilmesi	29
3.4. Annexin V Hücre Ölümü Protokol Özeti.....	29
4.1. ETP 45658'in Raji Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin 24. Saatte Değerlendirilmesi.....	31
4.2. Resveratrol'ün Raji Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin 24. Saatte Değerlendirilmesi.....	32
4.3. ETP 0.01µM + Resveratrol 10 µM Kombinasyonun Raji Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin 24.saatte değerlendirilmesi.	33
4.4. ETP 0.1µM + Resveratrol 10 µM Kombinasyonun Raji Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin 24.saatte değerlendirilmesi.	34
4.5. ETP 1µM + Resveratrol 10 µM Kombinasyonun Raji Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin 24.saatte değerlendirilmesi.	35
4.6. ETP 10µM + Resveratrol 10 µM Kombinasyonun Raji Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin 24.saatte değerlendirilmesi.	36
4.7. ETP 25µM + Resveratrol 10 µM Kombinasyonun Raji Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin 24.saatte değerlendirilmesi.	37
4.8. ETP 50µM + Resveratrol 10 µM Kombinasyonun Raji Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin 24.saatte değerlendirilmesi.	38
4.9. Kontrol Grubu Apoptoz Profili	39
4.10. Resveratrol 10µM Grubu Apoptoz Profili	39
4.11. ETP 25µM Grubu Apoptoz Profili	40
4.12. ETP 25µM + Resveratrol 10µM Grubu Apoptoz Profili.....	41
4.13 Apoptoz Profillerinin İstatiksel Açıdan Değerlendirilmesi	41

TABLULAR

2.1. NHL alt tipleri	3
2.2. NHL etyoloji	6
2.3. NHL sınıflandırma	8
2.4. Burkitt lenfoma kullanılan evreleme sistemleri	16
2.5. BL-IPI skor	18
2.6. Burkitt lenfoma modern ilk sıra tedavi protokolleri	19
2.7. mTORC1 ve 2 protein komponentleri	21
2.8. mTOR'un kanser patogenezi ile ilişkili substratları	23
2.9. mTOR immunité etkisi	23
3.1. Tek ajan XTT protokolü	27
3.2. XTT kombinasyon protokolü	27

1.GİRİŞ

Maligniteler modern dünyamızda insan yaşamını tehdit eden unsurların başında gelmektedir. Bu nedenle günümüzde malignitelerin tedavisi oldukça önem arz etmektedir. Son dönemde önemi daha da artan hedefe yönelik tedavilerin temelinde; tümör büyümesi ve ilerlemesinde önemli bir etkisi olduğu düşünülen, moleküler yollara müdahale etmek için hazırlanan ilaçlar vardır. Doğru tedavinin ve hedefin belirlenebilmesi için kanser mekanizmasının çok iyi anlaşılması gerekmektedir. Hedefe yönelik tedavi, kanser büyümesi ve gelişimine katkıda bulunan hatalı genleri, proteinleri veya doku ortamını hedef alan bir tedavi türüdür. Birçok kanser türünde reseptör tirozin kinazlar (RTK'lar), sinyal yollarının upregülasyonuna neden olan mutasyonlardan yaygın olarak etkilenmektedir (1).

Fosfatidilinositol (PI)-3-kinaz (PI3K) aracılı yolak, bir dizi hormona ve büyüme faktörüne yanıt veren hücre içi sinyal yolağıdır. Yolağın alt araçları, her ikisi de serin-treonin protein kinazlar olan Akt (protein kinaz b) ve mTOR (memeli rapamisin hedefi kompleksi) hedefini içermektedir. Bu üç bileşen; PI3K, AKT ve mTOR, karmaşık bir şekilde birbirleriyle bağlantılı halindedir ve genellikle tek bir yolun PI3K/AKT/mTOR yolağını oluşturduğu kabul edilmektedir (2). Bu yolağın aktivasyonu; hücre büyümesi, hücre proliferasyonu, hayatta kalma ve artan hücre göçü, düzensiz apoptoz ve onkogeneze gibi hücresel süreçleri modüle etmektedir (3).

Lenfoma, lenfositlerin klonal çoğalmasından kaynaklanan heterojen bir hematolojik malignite grubudur (4). Non-Hodgkin Lenfoma (NHL); lenf düğümleri, kemik iliği, dalak, karaciğer ve gastrointestinal kanal gibi bölgelerdeki lenfoid hücrelerin malign, monoklonal proliferasyonudur. Burkitt lenfoma (BL) 8. kromozom üzerindeki MYC geni translokasyonu ve degranülasyonu ile karakterize agresif seyirli non-Hodgkin lenfoma tipidir. BL; endemik (örn. Afrika'da çocukluk çağında görülen tip), sporadik, kazanılmış immün yetmezlik sendromu (AIDS) ile birlikte ve subendemik form (örn. Brezilya'da görülen tip) şeklinde tanımlanmaktadır (5). Erkek/kadın oranı 3-4:1 arasında değerlendirilmektedir (6).

Kemoterapi, yetişkin BL'da evreden bağımsız majör tedavi şeklidir. Siklofosfamid, doksorubisin, sitarabin ve prednol (CHOP) rejimi yetişkin lenfoma başlangıç tedavisidir (5).

Çalışmamız kapsamında PI3K/AKT/mTOR inhibitörü ETP 45658 ile antioksidan etkili Resveratrol'ün Burkitt lenfoma Raji hücre hattı üzerindeki antiproliferatif etkinliğini ilk defa belirlemeyi ve bu etkinliğe aracılık eden alt mekanizmaların aydınlatılabilmesi için flowsitometri yöntemi ile hücre döngüsü ve apoptozis üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmaktadır.

Verilen bilgiler ışığında PI-3K/mTOR yolağının inhibisyonunun B hücreli lenfoma tedavisinde önemli bir adım olduğu düşünülmektedir. Bu kapsamda öncelikli olarak ETP 45658'in ve Resveratrol'ün sitotoksik etkinlikleri değerlendirilecek, yarı maksimum inhibitör konsantrasyonu IC50 değerleri hesaplanacaktır. Sitotoksik etkinlik değerlendirilmesi IC50 değerleri üzerinden yapılacaktır. Daha sonra olası antiproliferatif aktiviteye aracılık eden alt mekanizmaların aydınlatılabilmesi için flowsitometri yöntemi ile apoptozis indüksiyonu üzerine etkileri araştırılacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Non Hodgkin Lenfomalar

Non-Hodgkin Lenfoma (NHL), B ve T hücrelerinin hem öncülerinden hem de olgun formlarından kaynaklanan lenfoid doku neoplazmalarıdır. NHL, her biri farklı epidemiyoloji, etyoloji, genetik ve klinik özellikleri olan ve bu nedenle farklı tedavi yanıtları olan alt tiplerden oluşmaktadır. Bu alt tipler hastalığın prognozuna göre düşük dereceli ve yüksek dereceli olarak iki gruba ayrılabilir (7). NHL'ların alt tip sınıflaması; matür B hücreli lenfoma, matür NK ve T hücreli lenfomalar olmak üzere 2 gruba ayrılır (8).

Tablo 1:2.1. NHL alt tipleri (8)

Matür B hücreli lenfoma	Matür NK ve T hücreli lenfoma
Kronik lenfositik lösemi ve küçük lenfositik lenfoma	Yetişkin T hücreli lösemi veya lenfoma
Monoklonal B hücreli lenfositoz	Nazal tip ektranodal NK-T hücreli lenfoma
B hücreli prolenfositik lösemi	Enteropati ile ilişkili T hücreli lenfoma
Dalak marjinal bölge lenfoması	Sezary sendromu
Hairy cell lösemi	Primer kutanöz anaplastik büyük hücreli lenfoma
Sınıflandırılmayan splenik B hücreli lenfoma/lösemi	T hücreli prolenfositik lösemi
Splenik diffüz küçük kırmızı pulpalı B hücreli lenfoma	T hücreli büyük granüler lenfositik lösemi
Hairy cell lösemi varyantları	NK+ kronik lenfoplazmositer hastalık
Lenfoplazmasitik lenfoma	Foliküler T hücreli lenfoma
Mukozal lenf dokusu ilişkili ektranodal marjinal zon lenfoma	Agresif NK hücreli lösemi

Nodal marjinal zon lenfoma	EBV+ T hücreli lenfoproliferatif hastalık
Pediyatrik nodal marjinal zon lenfoma	Monomorfik epitelotropik intestinal T hücreli lenfoma
Foliküler lenfoma	Gastrointestinal indolent T hücreli lenfoproliferatif hastalık
İn-situ foliküler neoplazi	Anjiyoimmünoblastik T hücreli lenfoma
Pediyatrik tip foliküler lenfoma	Hepatosplenik T hücreli lenfoma
IRF4+ büyük B hücreli lenfoma	Subkutanöz pannukulit benzeri T hücreli lenfoma
Primer kutanöz folikül merkezli lenfoma	Mukozis fungoides
Mantle cell lenfoma	Primer kutanöz CD30+ T hücreli lenfoproliferatif hastalık
İn-situ mantle cell neoplazi	Lenfomatoid papülozis
Diffüz büyük B hücreli lenfoma	Primer kutanöz $\gamma\delta$ T hücreli lenfoma
T hücre veya hisyitosit zengin büyük B hücreli lenfoma	Primer kutanöz CD8+ agresif epidermotropik sitotoksik T hücreli lenfoma
Merkezi sinir sistemi diffüz büyük B hücreli lenfoma	Primer kutanöz akral CD8+ T hücreli lenfoma
Leg tip primer kutanöz diffüz büyük B hücreli lenfoma	Primer kutanöz CD4+ küçük/orta T hücreli lenfoproliferatif hastalık
EBV+ diffüz büyük B hücreli lenfoma	Periferik T hücreli lenfoma
EBV+ mukokutanöz ülser	Anjiyoimmunoblastik T hücreli lenfoma

Kronik inflamasyon ilişkisi diffüz büyük B hücreli lenfoma	ALK+ anaplastik büyük hücreli lenfoma
Lenfomatoid granülomatozis	ALK- anaplastik büyük hücreli lenfoma
Primer mediastinal(timik) büyük B hücreli lenfoma	İmplant meme dokusu ilişkili anaplastik büyük hücreli lenfoma
İntravasküler büyük B hücreli lenfoma	
ALK+ büyük B hücreli lenfoma	
Plazmablastik lenfoma	
Primer efüzyon lenfoma	
İnsan herpes virüs 8+ büyük B hücreli lenfoma	
Burkitt lenfoma	
11q + burkitt benzeri lenfoma	
BCL2-MYC+/BCL6-MYC+ yüksek dereceli B hücreli lenfoma	
Yüksek dereceli B hücreli lenfoma	
Sınıflandırılmayan B hücreli lenfomalar	

2.1.1. Etyoloji

NHL; enfeksiyonlar, çevresel faktörler, ilaçlar, konjenital immün yetmezlik sendromları ve otoimmün hastalıklar dahil olmak üzere çeşitli faktörlerle ilişkili olabilir (7).

Tablo 2:2.2. NHL etyoloji (9–11)

Etken	İlişkili Lenfoma
Virüs	
EBV	Burkitt Lenfoma
HTLV-1	Yetişkin T hücreli Lenfoma
HCV	Splenik Marjinal Zon Lenfoma ve DBBHL
<i>H. pylori</i>	Maltoma
HIV	Primer Merkezi Sinir Sistemi Lenfoması
İlaç (Fenitoin, Digoksin, Anti-TNF)	NHL
Çevresel Faktörler	NHL
Otoimmün Hastalıklar (Sjögren, Romatoid Artrit, Çölyak)	NHL
Hashimoto tiroidit	Primer Tiroid Lenfoma

2.1.2. Epidemiyoloji

NHL 65-74 yaşları arasında yaygındır ve medyan yaş 67'dir. NHL, 15 yaşın altındaki çocuklarda en sık görülen beşinci pediatrik kanserdir ve çocukluk çağı kanserlerinin yaklaşık %7'sini oluşturur. Amerika Birleşik Devletleri'nde yılda yaklaşık 800 yeni pediatrik NHL tanısı konulur ve insidansı yılda 10-20 vaka/milyondur (7).

2.1.3. Patofizyoloji

NHL patofizyolojisinde, B hücresi, T hücresi veya Natural Killer (NK) hücrelerinde gelişen kromozomal translokasyon ve mutasyon/delesyonlar etkilidir. Proto-onkogenler, kromozomal translokasyonlar sonucu aktive edilirken; tümör baskılayıcı genler, kromozomal delesyon/mutasyonlar sonucu inaktive olur. NHL'da

görülen en sık kromozomal anormallik t(14,18) dir. t(11,14) translokasyonu, hücre turnover düzenleyicisi olan siklin D1'in aşırı ekspresyonu ile sonuçlanır. C-myc(8) ve Ig ağır zincirin (14) translokasyonu olan t(8,14) Burkitt lenfoma ile ilişkilidir. Bcl-2, Bcl-6 anomalileri diffüz büyük B hücreli lenfoma (DBBHL) ile ilişkilidir. Primer merkezi sinir sistemi lenfoması genellikle HIV ilişkilidir (7,12).

2.1.4. Sınıflandırma

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 2008 yılında yayınladığı ve 2016 yılında revize ettiği NHL sınıflandırmasında lenfoid malignitelerin anatomik evrelemesinden ziyade tümör hücrelerinin morfolojik, genetik, immünofenotipik özelliklerine göre sınıflandırılmasını önermiştir (13). Böylece NHL iki gruba ayrılmıştır:

Düşük dereceli: Düşük dereceli NHL'lerin surveyi, hastalık tedavi edilmese bile yıllarla ölçülür ve bu grup NHL'lerin %35-40'ını oluşturur.

Yüksek dereceli: Tedavi edilmeyen yüksek dereceli NHL surveyi aylarla ölçülecek kadar kısadır. Yüksek dereceli NHL'lerin bir kısmı diğerlerinden daha kötü prognoza sahiptir ve bazı kaynaklarda bunlar çok yüksek dereceli lenfomalar diye ayrı bir başlık altında toplanabilir.

Tablo 3:2.3. NHL sınıflandırma

Düşük Dereceli NHL	Yüksek Dereceli NHL
Küçük lenfositik lenfoma / B hücreli kronik lenfositik lösemi	Foliküler lenfoma(grade III)
Lenfoplazmasitik lenfoma (\pm Waldenstrom makroglobulinemisi)	Diffüz büyük B hücreli lenfoma
Plazma hücreli myelom / plazmasitoma	Mantle hücreli lenfoma *
Tüylü hücreli lösemi	Periferik T hücreli lenfoma
Foliküler lenfoma (derece I ve II)	Anaplastik büyük hücreli lenfoma,
Marjinal bölge B hücreli lenfoma	Burkitt lenfoma(çok yüksek dereceli)
Mantle hücreli lenfoma *	Prekürsör B lenfoblastik lösemi / lenfoma
T hücreli large granüler lenfositik lösemi	Yetişkin T hücreli lenfoma / lösemi
Mikozis fungoides	Prekürsör T lenfoblastik lösemi / Lenfoma
T hücreli prolenfositik lösemi	
NK hücreli large granüler lenfositik lösemi	

*Mantle Hücreli Lenfoma klinik olarak indolent veya agresif olarak davranabilir.

2.2. Burkitt Lenfoma

Burkitt lenfoma (BL) hücre ikiye katlanma zamanı 24-48 saat olan agresif B hücreli bir lenfoma grubudur (14). Burkitt lenfoma, lenfoma tarihinde ilklerin lenfomasıdır. C-MYC onkogeninin aşırı üretimine neden olan kromozomal translokasyonla ilişkisinin (15,16) yanı sıra virüsler (EBV) (17) ve HIV enfeksiyonu ile de ilişkisinin kanıtlandığı (18) ilk lenfoma olma özelliğini taşır.

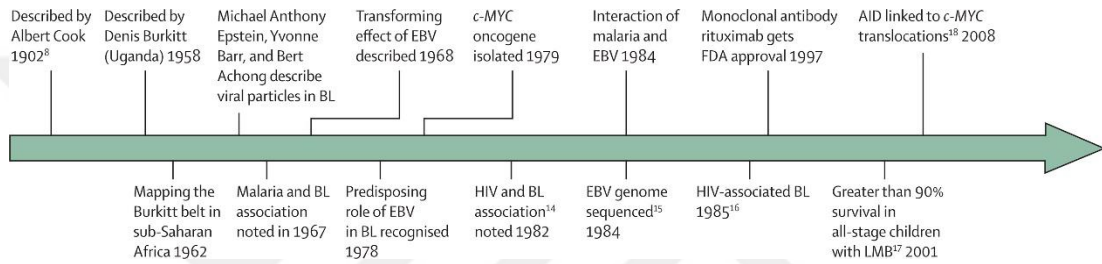
WHO BL'yi üç klinik gruba ayırmaktadır:

Endemik: Malarya ve EBV ilişkili olan BL grubudur.

Sporadik: Endemik ve immunsupresifler dışında normal popülasyonda görülen tiptir.

İmmünsüpresyon ilişkili: HIV enfeksiyonu ve daha az oranda organ transplantasyonu sonrası gelişen tiptir.

Burkitt lenfoma tarihçesine baktığımızda 1902’de Albert Cook tarafından tanımlanmış olmasına rağmen Denis Burkitt’in Uganda’da çocuklarda endemik Burkitt lenfomayı tanımlamasıyla Burkitt ismini almıştır.



Şekil 1:2.1. Burkitt lenfomada tarihçesi (14)

2.2.1. Etyoloji

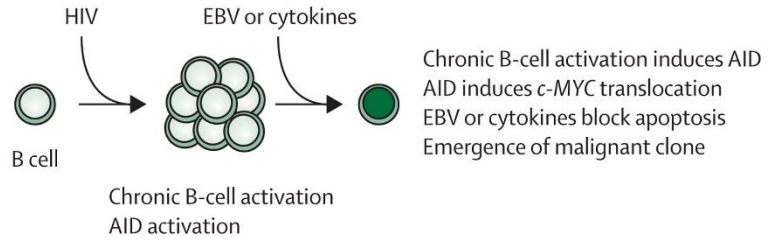
Burkitt lenfomanın EBV ile ilişkisi tam olarak anlaşılammış olmakla birlikte çeşitli hipotezler bulunmaktadır. EBV’nin latent proteini olan EBNA1 proteininin endemik Burkitt lenfomaların tamamına yakınında eksprese edildiği görülmüştür (14). Eksprese edilen EBV proteinlerinden EBNA1 proteini ve BHRF1 proteini, EBER transkriptleri veya epigenetik modifikasyon yoluyla tetiklenen MYC translokasyonu ile hücre apoptozisini engelleyebilir. Aynı zamanda EBV’nin latent transkript faktörlerinden biri olan LPM1, hücrenin proapoptotik BIM proteinini baskılayarak lenfoma hücrelerinin apoptozisini engelleyebilir (19,20). Ayrıca EBV’nin EBNA2 proteinini kodlayan gendeki delesyona bağlı olarak EBNA3A, EBNA3B, EBNA3C proteinlerinin genetik ekspresyonunun arttığı görülmüş (21) ve EBNA3 proteinlerinin de hücre apoptozisini engellediği bulunmuştur (22). Bu bulguların dışında EBV’nin genomik instabilite, telomer disfonksiyonu ve infekte hücrelerde DNA hasarını indüklediği düşünülmektedir (23).

Burkitt lenfomaların B hücre kaynaklı olduğu bilinmektedir ama hangi B hücrelerinden kaynaklandığı konusunda tam bir uzlaşma sağlanamamıştır. Bazı Burkitt lenfomalar erken dönem germinal merkez B hücrelerinden kaynaklanırken bazıları ise EBV'nin latent olarak kaldığı hafıza B hücrelerinden kaynaklanmaktadır (24,25). Özetle EBV pozitif Burkitt lenfomaların hafıza hücrelerinden, EBV negatif Burkitt lenfomaların ise immunglobulin ağır zincirinin variable bölgesindeki somatik mutasyonların sık görüldüğü germinal merkez B hücrelerinden geliştiği öne sürülmektedir (26).

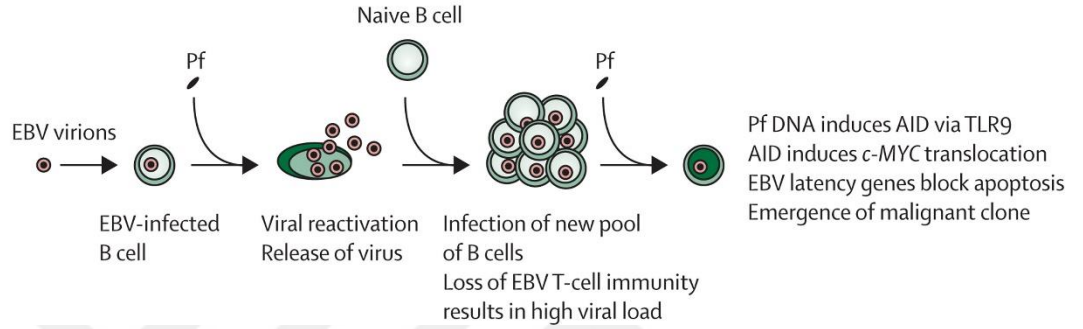
Burkitt lenfoma etyolojisinde yer alan sıtmanın aslında tek başına etkili olmadığı, EBV'nin etkilerini potansiyelize ettiğini söylemek daha doğru bir yaklaşımdır. İlk etki olarak *Plasmodium falciparum*'un sistein zengin interdomain 1 α üzerinden latent EBV enfeksiyonunu reaktif etmesi gösterilebilir (27). Diğer yandan sıtma paraziti toll-like receptor-9 (TLR-9) için bir liganddır (28). TLR-9 ise B hücrelerinde sistidin deaminaz enzimini aktive eder (29,30). Enzim aktivasyonu sonucu immunglobulin-MYC translokasyonu oluşmaktadır (Burkitt lenfoma için karakteristik) (31). MYC translokasyonu normal B hücrelerinde apoptozisi indüklemesine rağmen EBV ile enfekte malign B hücrelerinde ise apoptozisten korunduğu için malign klonların artışına neden olarak Burkitt lenfoma gelişimine zemin hazırlamaktadır.

HIV ile enfekte hastalarda da sıtma ile benzer olarak sistidin deaminaz enzim aktivasyonu olduğu gösterilmiştir (32). Enzim aktivasyonu ile oluşan MYC translokasyonu normal B hücreleri apoptozise uğramasına rağmen HIV enfeksiyonu ile salınan sitokinlerin ve EBV virüsün etkisi ile apoptozisten korunan malign klonların artması ile Burkitt lenfoma gelişimine zemin hazırladığı söylenebilir.

A



B



Şekil 2:2.2. Burkitt lenfoma etyolojisi (14)

2.2.2. Epidemiyoloji

Burkitt lenfoma, non-hodgkin lenfomaların %1-5 ini oluşturur (33). Erkek/kadın oranı ise 3-4:1'dir (6). Erişkinlerde Burkitt lenfoma nadir görülür. Amerika'da insidansı yaklaşık yılda 1200 hastadır. Her yaşta görülebilmemesinin yanı sıra vakaların %59'u 40 yaş üstü kişilerde görülmektedir. Erişkinlerde de etyolojide HIV ve diğer immün bozukluklar bulunmaktadır (33).

2.2.3. Klinik Özellikler

Sporadik Burkitt lenfoma genellikle abdominal (%60-80) tutulum yapar (34). Hastaların geliş semptomları: karın ağrısı, şişkinlik, bulantı, kusma ve gastrointestinal sistem kanamasıdır. Baş boyun bölgesi tutulumunda nazal, orofaringeal, tonsiller lenf nodu tutulumu görülür. Çene tutulumu nadirdir. Hastaların yaklaşık %20'sinde kemik iliği tutulumu görülmekle birlikte kemik iliğini %25'ten fazla blastın infiltre ettiği durum Burkitt lösemi olarak adlandırılır. Burkitt lösemide hastalar kemik ağrısı ile başvurabilir (14).

Endemik Burkitt lenfoma ise sıklıkla çene, periorbital veya abdominal tutulum ile kendini gösterir (35). Hastaların %15 inde klinik prezentasyon ani parapleji ve inkontinanstır. Kemik iliği tutulumu sporadik Burkitt lenfomanın aksine nadirdir (14).

Erişkin Burkitt lenfomanın en sık klinik prezentasyon şekilleri; büyük abdominal kitle, B semptomları, tümör lizis sendromunun laboratuvar bulgularıdır [artmış laktat dehidrogenaz (LDH) ve ürik asit seviyeleri]. Kemik iliği aspirasyonu yapılan hastaların %70'inde tutulum pozitifdir ve tanı anında %40 hastada leptomeningeal tutulum görülür. Birden fazla ektranodal tutulumu olan lenfoma hastalarında Burkitt lenfoma ayırıcı tanıda mutlaka düşünülmelidir. Burkitt lenfomadan şüphelenilen hastalarda erken tanı ve tedavi esastır ve tanıda doku tanısı zorunludur. Tedavi öncesi toraks ve abdomen bilgisayarlı tomografi (BT), kemik iliği aspirasyon biyopsisi, karaciğer ve böbrek fonksiyon testleri ve HIV tarama testi yapılmalıdır. PET-BT'nin Burkitt lenfomada BT'ye üstünlüğünün gösterildiği bir çalışma yoktur. Bu sebeple BT çekilen hastalarda ek PET-CT önerilmemektedir. Antrasiklin tedavide uygulanacaksa eksiksiz bir kardiyolojik muayene yapılmalıdır. Birçok tedavi rejiminde intratekal tedavi önerildiği için tedaviye başlangıcında hasta semptomsuz bile olsa beyin omurilik sıvısı (bos) alınmalı ve saklanmalıdır (33).

2.2.4. Tanı

Burkitt lenfoma tanısı patolojik bir tanıdır ve kesin tanı için doku biyopsisi yapılmalıdır. Eksizyonel biyopsi, ince iğne aspirasyon biyopsisinden daha üstündür ve mümkün olduğu sürece eksizyonel biyopsi tercih edilmelidir. Biyopsi en yakın tutulum gösteren lenf nodundan yapılmalıdır. Yüzeysel lenf nodu bulunamazsa laparoskopik-laparatomik girişimler gerekli olabilir. Burkitt lenfoma ayırıcı tanıda en fazla diffüz büyük B hücreli lenfoma ile karışmakta olup ayırıcı tanıda doku biyopsisi yapılması gerekir (14).

Burkitt lenfoma tanısından şüphelenildiği zaman hastalardan; tam kan sayımı, sedim, üre, elektrolitler, karaciğer fonksiyon testleri, yaygın damar içi pıhtılaşma sendromu paneli, böbrek fonksiyon testleri, LDH, ürik asit çalışılmalıdır. Evreleme ve hastalık prognozunun öngörülmesi için PET-BT/CT gibi bir görüntüleme yöntemi kullanılmalıdır. Ayrıca hastaların semptomu olmasa bile tedavi öncesi bos sıvı örneği alınması önerilmektedir (14).

2.2.5. Histopatoloji ve İmmunhistokimya

Burkitt lenfoma, çok yüksek proliferasyon oranına sahip monomorfik orta büyüklükte (12 μ) hücrelerin oluşturduğu agresif seyirli bir lenfoma türüdür. Sitoplazması bazofiliktir ve yüksek proliferasyon indeksine sahiptir. Yüksek proliferasyona bağlı olarak artan apoptozis sonucu oluşan atık hücreler makrofajlarca fagosite edildiğinden mikroskop altında yıldızlı gökyüzü görünümü olarak tanımlanan spesifik bir görüntü oluşturur. Burkitt lenfomanın sitolojideki karakteristik özellikleri; güçlü bazofilik sitoplazma (bol poliribozomlar nedeniyle), lipid dolu sitoplazmik veziküller ve ölü hücreleri fagosite etmiş makrofajlardır. Ayrıca tanısında önemli olan diffüz büyük B hücreli lenfomanın aksine çekirdek kontürleri yuvarlak ve düzdür (5,14,36–38).

Burkitt lenfoma olgun B hücrelerinden köken alır ama aktif B hücrelerinden ziyade daha çok germinal merkez B hücrelerinin boyanma özelliklerini taşırlar (39,40). B hücrelerinin ihtiva ettiği; yüzeyel Ig M, CD19, CD20, CD79a ve PAX5 pozitiftir (5). Germinal merkez B hücrelerine spesifik BCL-6 ve CD10 da pozitiftir. Ayrıca plazma hücrelerine spesifik CD38 de pozitiftir ama BCL-2 negatiftir. Bu nedenle BCL-2 pozitif Burkitt lenfomalarda double hit/triple hit lenfoma ayırımı için mutlaka MYC, Bcl-2, Bcl-6 istenmelidir (6).

EBV RNA in situ hibritizasyon ; endemik Burkitt lenfomaların %95'inde, HIV ilişkili Burkitt lenfomaların %30-40'ında, sporadik Burkitt lenfomaların ise %20'sinde pozitiftir (6).

2.2.6. Sitogenetik ve Moleküler Patofizyoloji

Burkitt lenfomanın sitogenetik olarak c-myc protein transkripsiyon faktörü olan MYC gen ekspresyonunda gelişen değişiklikler ile yakın ilişkide olduğu bulunmuş ve MYC geninin Burkitt lenfomadan sorumlu olduğu değerlendirilmiştir. MYC geni kromozom 8q24 üzerindedir ve c-myc proteini üzerinden hücrelerin proliferasyonunu, diferansiyasyonunu ve apoptozisini düzenler. MYC onkogeninin translokasyonları lenfoma etyopatogenezinde geniş yer tutar (41). Bazı otörlere göre c-Myc overekspresyonu, b hücre proliferasyonuna bağlı olarak BL'deki ikiye katlanma hızınının (Kİ 67) yüksekliğinden sorumlu tutulmuştur (24-48 saat) (42).

Burkitt lenfomada 8.kromozom translokasyonları çok sıktır ve 3 farklı lokalizasyona transloke olabilir; bunlardan en sık olanı 14q32 kromozomdaki Ig ağır zinciri ile olan t(8,14) translokasyonudur ve %80 oranında görülür. Kromozom 2p12'deki kappa hafif zincir ile olan t(2,8) translokasyonu %15 oranında görülür. Kromozom 22q11'deki lambda hafif zincir ile olan t(8,22) translokasyonu ise %5 oranında görülür (43). Bu translokasyonlardan her biri farklı kırılma noktalarından MYC genini etkiler. t(8,14) sentromik bölgede etkili iken; t(2,8) ve t(8,22) ise telomerik bölgede kırılma noktaları oluşturur ve her bir translokasyonun kırılma noktalarındaki farklılıklar BL alt tiplerinin farklılıkları ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür (14). Bu hipotezin doğru olduğu varsayılırsa, farklı alt tiplerde farklı mekanizmalarla hasarın olduğu düşünülebilir ve bu da subtiplerin etyolojik farklılıklarının açıklanması için yol gösterici olabilir.

MYC gen aşırı ekspresyonu normal b hücrelerinde p-53 yolu ile apoptozisi indükler ama lenfomalı hücrelerde p-53 yolu tümör süpresör geni TP53 üzerinden apoptozisi inhibe eder (14). Ayrıca p-53 bağımsız olarak antiapoptotik Bcl-2 antagonisti BIM proteininin downregülasyonu ile de apoptosiz inhibisyonu yapabilir (44).

Lenfomalardaki gen ekspresyon profillerinin oluşturulmasına kadar bütün BL'lerde MYC gen translokasyonun olduğu düşünülüyordu fakat gen profili çıkarıldıktan sonra MYC translokasyonu olmayan fakat genetik profili BL'ye benzeyen farklı BL varyantları tanımlandı (45). Bu varyantlarda tekrarlayan 11q aberasyonları saptanmış olup 2016 WHO sınıflandırmasına girmiştir (46).

Yeni nesil sekans çalışmaları, BL'de yeni somatik mutasyonlar tanımlamıştır. Bunlardan bazıları şunlardır;

-Endemik BL'de, Ig ağır zincir, Ig kappa ve Ig lambda'da klonal yeniden düzenlemeler sonucu oluşan klonal heterojeniteler ile tümör gelişimine etkisi (47).

-Sporadik BL'de, DNA bağlayıcı protein ailesi üyesi ID3 ve ID3'ün negatif regülatörü olduğu transkripsiyon faktör TCF3 üzerinden hücre siklusunu ve b hücre differansiyonunu etkileyerek tümör gelişimine etkisi (48).

Myc gen ekspresyonunun sinerjistik etki gösterdiği diğer bir protein ise PI3K artışıdır. PI3K-MYC koaktivasyonu, germinal merkez b hücrelerinin hücre döngüsünde anahtar rol oynayan siklin D3'teki mutasyonları stabilize ederler (49). Yani PI3K veya siklin D3 inhibisyonu BL'de malign hücreleri öldürebilir (48).

PI3K-MYC koaktivasyonun BL etyolojisini araştırmak için yapılan RNA sekans analizi çalışmaları göstermiştir ki PI3K sinyali, TCF3 transkripsiyon faktörü ve TCF3 negatif regülatörü olan İD3'de somatik mutasyonlara neden olmaktadır (48,50). ID3 mutasyonları, TCF3 mutasyonlarından daha sık (%68 vs %11) görülmektedir. Her iki mutasyonun da germinal merkez b hücre proliferasyonunda disregülasyona neden olarak BL gelişiminde etkili oldukları düşünülmektedir (51,52).

Özetle MYC-PI3K ilişkisi BL'nin tanı, tedavi ve prognozu açısından değerli bilgiler verebilecek bir koaktivasyon gibi durmaktadır.

2.2.7. Evreleme

Burkitt lenfomalı erişkin hastaların evrelemede Murphy ve Ann-Arbor evreleme sistemi kullanılabilir. Ann-Arbor evreleme sistemi hastanın semptomlarının (B semptomları olan; 38,5°C'nin üstünde ateş, 6 ay önceki vücut kitlesinin %10'undan fazlasının kaybı veya gece terlemeleri) açıklanmasında daha üstün iken Murphy sistemi ise hastalığın ektranodal tutulumunu (kemik iliği, merkezi sinir sistemi) yansıtmada daha üstündür ve bu özellikleri ile cerrahi bir evreleme olarak sayılabilir. BL'nin tedavisinde ise cerrahinin yeri olmadığı için günümüzde Ann-Arbor sistemi daha fazla klinik tarafından kullanılmaktadır (5,36)

Tablo 4:2.4. Burkitt lenfoma kullanılan evreleme sistemleri (5)

EVRE	Ann-Arbor	Murphy
EVRE 1	Tek bölge nodal veya ektranodal tutulum	Mediasten ve batın hariç tek bölge nodal veya ektranodal tutulum
EVRE 2	Diyaframın tek tarafında iki veya daha fazla nodal bölgede tutulum veya diyaframın tek tarafında ektranodal tutulum(Evre 2E)	Diyaframın tek tarafında iki veya daha fazla nodal bölgede tutulum
EVRE 2R		Cerrahi müdahale ile tamamen çıkarılabilecek abdominal kitle
EVRE 3	Diyaframın iki tarafında iki veya daha fazla nodal bölgede tutulum, dalak tutulumu (Evre 3S), ektranodal tutulum (Evre 3E)	Diyaframın iki tarafında iki veya daha fazla nodal bölgede tutulum, primer intratorasik kitle, spinal veya parasipinal kitle, yayılmış batın içi kitle
EVRE 3A		Cerrahi müdahale ile tamamen çıkarılamayacak

		abdominal kitle
EVRE 3B		İntraabdominal birden çok organ tutulumu
EVRE 4	Bir veya daha fazla ektranodal bölgenin Diffüz ya da dissemine tutulumu, diyaframın her iki tarafında ektranodal tutulum	Kemik iliği veya merkezi sinir sistem tutulumu

2.2.8. Prognoz

Burkitt lenfomada prognozu temelde belirleyen öğeler; klinik/histolojik evre, sınırlı/yayılmış hastalık ve yaştır (53). Genç hastalarda prognoz daha iyi olmasının bir nedeni de yoğun kemoterapiyi daha iyi tolere edebilmeleri olabilir (5). Diğer kötü prognostik faktörler ise; siklofosamid/prednol/vinkristin tedavisine kötü yanıt, merkezi sinir sisteminin tutulumu, serum LDH değerinin normalin iki katından yüksek olması, 13q kaybı, 7q kazanımı veya kompleks sitogenetik anomaliler (6), ID3/CCND3 çift vuru mutasyonu, 18q21 mutasyonları, CD4 sayısının az olması ve tedavi sonrası 6 ay içinde relaps olması sayılabilir (5). Minimal rezidüel hastalık (MDR) da kötü prognostik faktörlerdendir. MDR PET-CT ile tanımlanabileceği gibi PCR'da MYC/IgH füzyonunun saptanması ile de tanımlanabilir (54).

Burkitt lenfomada kullanılabilecek bir diğer prognoz belirleme parametresi ise Burkitt lenfoma uluslararası prognostik indeksidir (BL-IPI). BL-IPI her biri 1 puan alan 4 parametreden oluşur ve bunlar: >40 yaş, ECOG \geq 2, LDH > normalin 3 katı, merkezi sinir sistem tutulumudur (55).

Tablo 5:2.5. BL-IPI skor (55)

BL-IPI skor	Risk
0	Düşük risk: 3 yıllık ortalama sağkalım %96, progresyonsuz sağkalım %92
1	Orta risk: 3 yıllık ortalama sağkalım 76, progresyonsuz sağkalım %72
≥ 2	Yüksek risk: 3 yıllık ortalama sağkalım %59, progresyonsuz sağkalım %52

2.2.9. Tedavi

BL tedavi prensiplerinde; yüksek doz alkilleyici ajanların kullanımı, sık aralıklarla kemoterapi verilmesi ve merkezi sinir sistemi profilaksisi için yüksek doz sistemik kemoterapi/intratekal tedavi veya ikisinin birlikte kullanılması yer alır (37). Ayırıcı tanıda sıklıkla karışan diffüz büyük B hücreli lenfomanın aksine BL tedavisinde CHOP rejimi yetersizdir ve hiçbir klinik prezentasyonda radyasyon tedavisinin yeri yoktur (26).

BL tedavisi ile ilgili çalışmalar genellikle çocuk ve adölesan yaş grubu için yapılmıştır ve yetişkinlerde tedavi rejimlerini karşılaştıran kontrollü çalışmalar yetersizdir (6).

Anti-CD20 antikorlarının BL rejimlerine eklenmesi ile 60 yaş altı erişkinlerde 3 yıllık sağ kalım %90'a yaklaşmıştır (56,57). Yetişkinlerde, Hiper-CVAD rejimine eklenen rituksimab tek başına Hyper-CVAD ile karşılaştırıldığında ek toksisite olmaksızın 5 yıllık toplam sağ kalım (OS) ve hastalıksız sağ kalım (PFS) oranları sırasıyla %60 ve %50'den %70 ve %70'e yükselmiş (58).

Anti-CD20 antikorlarının eklendiği modern tedavi rejimlerinin birbirine üstünlüğünü gösteren kanıtlanmış bir çalışma olmayıp modern rejimler Tablo 2'de kısaca özetlenmiştir.

Tablo 6:2.6. Burkitt lenfoma modern ilk sıra tedavi protokolleri

Rejim	Ana Özellik	Kür sayısı	Sınırlayıcı
R-CODOX-M/IVA (59–61)	BL için geliştirilen ilk yoğun rejim, yüksek doz MTX bazlı	4	Miyelosupresyon, mukozit, enfeksiyonlar, hastaların %20'si yüksek doz mtx tolere edemiyor
R-HYPER-CVAD(56–58)	Hiperfraksiyone siklofosamid, yüksek doz sitarabin/mtx	8	Miyelosupresyon, mukozit, yüksek doz sitarabine bağlı enfeksiyonlar (3 g/m ²)
R-NHL 2002(62,63)	Çoklu ilaç rejimi	4-6	Toksisite >55 yıl
R-LMB(64–66)	Yoğun doz ve yüksek doz mtx	3-8	Myelosüpresyon, mukozit, enfeksiyon
DA-EPOCH-R/SC-EPOCH-RR(67)	Doz ayarlı kemoterapi 24 saatlik infüzyon	4-6	Tedaviye cevap veren hasta sayısı az

Spesifik hasta gruplarından olan HIV/immün yetmezlik ilişkili BL'de de tedavi rejimleri sporadik BL ile benzerdir. Farklı olarak genelde anti-retroviral tedavi ile eş zamanlı kemoterapi rejimleri verilir (46). Bu konuda iki farklı çalışma yapılmış olup; CODOX/M-IVAC modifiye versiyonu ve DA-EPOCH-R rejimlerinin HIV ilişkili BL'de kullanılması daha akıllıca olabilir (67,68).

BL'de ilk remisyonda otolog kök hücre naklinin rolü ilk olarak HOVON grubu tarafından değerlendirilmiştir. Küçük bir hasta grubu ile yapılmış yine benzer bir diğer çalışmanın verileri ile değerlendirildiğinde otolog kök hücre naklinin yüksek yoğunluklu indüksiyon tedavisinden üstünlüğü kanıtlanmamıştır. Otolog kök hücre nakli ile düşük doz indüksiyon tedavisi verilir. BL'nin yüksek ki-67 oranı olup düşük doz indüksiyon tedavisi verildiğinde bu hastalarda tedavi yetersizliğine bağlı olarak

relaps daha sık görülmektedir. Özetle otolog kök hücre naklinin BL tedavisinde kullanımını önerilmemektedir (69,70).

Relaps/refrakter BL tedavisine baktığımızda ise prognozu çok kötüdür ve kurtarma rejimlerinin genellikle mortalite üzerine etkisi olmamaktadır. Bu nedenle relaps/refrakter BL'de otolog kök hücre nakli bir tedavi seçeneği olabilir mi diye düşünülmüştür (71). Otolog kök hücre nakli yapılan hastaların retrospektif bir analizinde OS oranları kemosensitif hastalık grubunda %37, kemoterapi dirençli grupta ise %7 gelmiştir (72). Otolog kök hücre nakline uygun olmayan veya otolog kök hücre nakli sonrasında nüks eden vakalarda allojenik kök hücre nakli düşünülebilir. Bir çalışmaya göre allojenik kök hücre nakli sonrası 5 yıllık PFS %27 ve tedaviye bağlı morbidite yüksek bulunmuştur (73).

BL'nin genomik yapısının aydınlatılması sonrası etyopatogenezinde yol oynayan PI3K inhibitörleri, CDK6 inhibitörleri ve MYC inhibitörleri relaps/refrakter BL tedavisinde umut verici olabilir. Ayrıca relaps/refrakter BL'nin akut lenfoblastik lösemi (ALL) ile biyobenzerliği düşünüldüğünde ALL tedavisinde onay almış kimerik antijen reseptör T hücreleri (CAR T hücreleri) de tedavide teorik olarak başarılı olabilecek bir ajanlardandır. CARPALL çalışması ise CD19(+) BL gibi malignitelere CD19(+) kimerik antijen reseptör T hücrelerinin değerlendirildiği faz 1 klinik çalışma sonuçlarının da takip edilmesi gereklidir (71).

MYC transkripsiyon düzenleyici proteinlerden bromodomain ve BET proteinler, BL tedavisinde teorik olarak kullanılabilir (74).

2.3. PROTEİN KİNAZ İNHİBİTÖRLERİ

Protein kinaz inhibitörleri hücre büyümesi, anjiyogenez, apoptozun önlenmesi gibi birçok işlevi olan; hücre içi sinyal yollarını hücre yüzey reseptörü düzeyinde veya hücre içi sinyal yolağı düzeyinde inhibe eden ilaçlardır. Ligand-reseptör birleşimi olan iki protein kinaz reseptörü genellikle birbiri ile dimerizasyon yapar ve hücre içi sinyal yolağını aktive eder. Sinyal yolağını aktive ettiği fonksiyonlar hücrede gerçekleşir. Günümüzde bazı kanser hücrelerinde bu yolların aşırı eksprese olduğu görülmüş ve bu yolları kontrol eden ilaçlar kemoterapiye ek olarak kanser tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır.

2.3.1. PI3K/AKT/mTOR Yolağı

Vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü (VEGFR), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) reseptörü, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ve c-Met gibi tirozin kinaz reseptörü salgılayan kanser hücrelerinde hücre içi sinyal yolağı olarak sıklıkla PI3K/AKT/mTOR'un kullanıldığı gösterilmiştir (75). PI3K/AKT sinyal yolağı downstream efektörleri olup bu efektörler ile birçok sinyal yolağını aktive etmektedir. Bu efektörlerden birisi de rapamisin protein kompleksinin memelilerdeki hedefi mTOR'dur (76). Bir serin/treonin kinaz olan mTOR aktivasyonu ile hücre bölünmesinde görev alan hücre içi ve hücre dışı moleküllerin aktivasyonu gerçekleşmekte ve böylece hem hücre içi hem de hücre dışı moleküller kompleks bir şekilde hücrenin çoğalmasını ve hayatta kalmasını sağlamaktadır (77).

Yolağı moleküler düzeyde bakacak olursak; PI3K 3 alt grubu vardır (78). Hücre zarındaki tirozin kinaz reseptörünün uyarılması ile PI3K1, fosfotidilinozitol 3,4,5 trifosfata (PIP3) dönüşür. PIP3, plestrin benzeri alan içeren AKT ve 3 fosfoinozitol bağımlı protein kinaz 1 (PDK1) gibi proteinleri hücre zarına toplar. Böylece PDK1 AKT'yi aktive eder (79,80). AKT mTORC1 ve mTORC2'yi fosforilleyerek aktive eder ve aktive olan mTORC2 de AKT'yi fosforilleyerek AKT aktivasyonunu artırır (81).

mTOR aktivitesinin 3 temel düzenleyicisi: tirozin kinaz reseptörleri, PI3K/AKT yolağı ve mTOR inhibisyonunda görevli olan fosfat tensin homolog (PTEN), adenosin monofosfat kinaz (AMPK), tüberoskleroz kompleks 1 ve 2 (TSC1 ve TSC2)'dir (78). Bu 3 temel düzenleyici dışında; oksidatif stres, amino asit düzeyleri, büyüme faktörleri, oksijen ve ATP de mTOR yolağı üzerine etkilidir. Ayrıca son zamanlarda karaciğer kinaz b1 (LKB1)'in aktif rol oynadığı LKB1/AMPK/mTOR yolağının negatif mTOR regülasyonundan sorumlu yolak olduğu bulunmuştur (82).

mTOR hücrelerde mTOR kompleks 1 (mTORC1) ve mTOR kompleks 2 (mTORC2) şeklinde 2 multiprotein kompleks olarak yer alır ve mTOR bu komplekslerin katalizinden sorumlu proteindir (83).

Tablo 7:2.7. mTORC1 ve 2 protein komponentleri (84)

mTORC1	mTORC2
mTOR	mTOR
GbL (mLST8)	GbL
Deptor	Deptor
Raptor	Rictor
PRAS40	mSIN1
	Protor-1

mTORC1 de Raptor, mTOR substratlarını toplayarak aktivasyonundan sorumludur. PRAS40 ve Deptor, mTORC1'in negatif feedback düzenleyicileridir ve kompleksi inhibe ederler (84–87). mTORC1'in hücrelerde genel olarak protein lipid glukoz nükleotid metabolizmasını mitokondriyal biyogenez üzerinden regüle ettiği bulunmuştur. Bu nedenle mTORC1 hücrelerde anabolik aktivitede rol oynar (88).

mTORC2 de Rictor, mSIN1 ve GbL molekülleri kompleksi stabilize eder (89,90). Deptor mTORC2 de kompleksi inhibe etmektedir (84). mTORC2 glukoz ve lipid metabolizmasını insülin sinyal yolağı üzerinden regüle etmektedir (91). Ayrıca mTOR inhibitörleri ile mTORC1 inhibisyonu yapıldığında mTORC2 sinyal yolağının bu inhibisyondan etkilenmediği görülmüştür (92).

mTOR, hücre içinde birçok moleküler yolağı aktive ederek çeşitli fonksiyonlarda görev alır. Kanser gelişiminde etkili olduğunu düşündüğümüz moleküler substratlar Tablo 1'de kısaca özetlenmiştir. Bu substratlar sayesinde kanser hücreleri yayılma ve çoğalmalarından sorumlu olan proteinlerin veya bu proteinlerin mRNA'larının translasyonu ile yayılım yapmaktadır. Ayrıca kanser hücreleri otofagozom oluşumunun engellenmesi ile ölümsüz kanser hücreleri oluşmaktadır.

Tablo 8:2.8. mTOR'un kanser patogenezi ile ilişkili substratları (93).

Ribozomal S6 kinaz (S6K)	Ribozomlarda ribozomal protein S6'yı fosforilleyerek protein translasyonunu başlatır.
Ökaryotik translasyon başlatıcı faktör 4E bağlı protein 1 (4EBP1)	mRNA translasyonunu başlatır.
Beklin-1 regülatuar aktive edici otofaji protein 1 (AMPRA 1)	Nonkordine-51 benzeri kinaz 1/Otofaji ilişkili gen'in (ULK1/ATG1) hücre membranına bağlanmasını önleyerek otofagozom oluşumunu inhibe eder.

Kanser patogenezinde immun sistemin önemi düşünüldüğünde mTOR yolağının etkileri Tablo 9'da özetlenmiştir.

Tablo 9:2.9. mTOR immunité etkisi (93)

TH1	mTORC1 ile etkinliği ve sayısı artar
TH2	mTORC2 ile etkinliği artar
TH17	mTORC1 ile etkinliği ve sayısı artar
Regülatuar T hücre	mTORC1 ile etkinliği ve sayısı azalır
Cd8+ hafıza T hücre	mTORC1 ile etkinliği azalır
B hücre	mTOR ile sayısı ve lipopolisakkaride yanıtı artar
Makrofaj	M1 den M2 ye differansiyasyonu artar
Nötrofil	mTOR ile kemotaksis, kemokinezis, il-8 e verilen yanıt artar

2.4. Resveratrol

Resveratrol, polifenolik yapıda olup kırmızı şarap, üzüm ve yer fıstığı gibi doğal ürünlerde bulunan bir antioksidandır (94). Resveratrol, PI3K/Akt/mTOR yolağını her üç basamakta da inhibe etmektedir. Bu inhibisyonları; PI3K üzerine direkt inhibitör etki, PTEN artışına bağlı Akt inhibisyonu, TSC1/TSC2 üzerinden mTOR inhibisyonu olarak özetlenebilir (95). Bu nedenle etyopatogenezinde PI3K/Akt/mTOR olan tümör hücreleri üzerine sitotoksik etki gösterdiği teorik olarak kanıtlanmıştır ve bu yolağı inhibe eden ilaçların etkilerini potansiyelize ettiği düşünülmektedir.

Ayrıca Resveratrol'ün 150-200 μ M ve üstü dozlarda 72.saatten sonra apoptozu indüklediğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (96).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kanser Hücrelerinin ve Kullanılacak İlaçların Temini

Çalışmada ATTC (American Type Cell Collection)'den temin edilen Burkitt lenfoma Raji hücre hattı kullanılmıştır. Hücrelere ETP 45658 ile antioksidan etkili Resveratrol isimli moleküller uygulanmıştır. Çalışmamızın yapılabilmesi için Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 19.08.2021 tarihli 2021-08/10 karar no'lu onayı alınmıştır. Ayrıca çalışmamız Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (CÜBAP) tarafından T-2021-917 no'lu proje olarak desteklenmiştir.

3.2. Hücre Kültürü Teknikleri

3.2.1. Hücre Hattının Açılması

Azot buharında saklanan hücreler çözünene kadar 37°C'lik su banyosunda tutuldu. Kriyo tüp içerisinde eriyen fetal bovine serum (FBS)-hücre karışımı, 15 ml'lik falkon tüpe aktarıldı ve hacmi 12 ml'ye kadar medium ile tamamlandı. Falkon tüpler 900 rpm dönüş hızında 5 dakika santrifüj edilerek hücreler dibe çöktürüldü, daha sonra dimetil sülfoksit (DMSO) içeren süpernatant hücrelerden uzaklaştırıldı. Pellet halindeki hücreler, hücre kültürü mediumu ileyeniden süspanse edilerek flask içerisine aktarıldı.

3.2.2. Hücrelerin Çoğaltılması

Raji (CCL-86) hücreleri steril koşullar altında 37°C ve %5 CO₂'li Bilser Laminair Flow Kabin içerisinde, 25 cm²'lik flasklarda, %1 penisilin-streptomisin ve %10 fetal sığır serumu içeren RPMI-1640 hücre kültür besisi yerinde çoğaltıldı. Hücreler %80 yoğunluğa ulaştıklarında pasaj yapıldı ve üçüncü pasajın ardından çalışmalara başlandı.

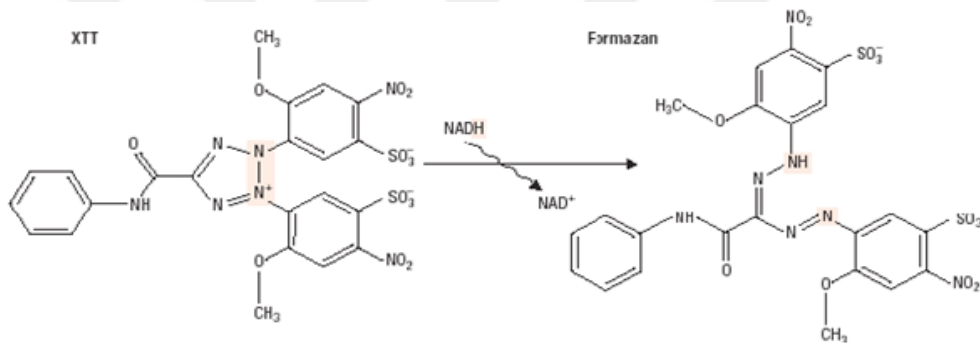
3.2.3. Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler 3x10⁵/flask olacak şekilde flasklara ekilmelerinin ardından her 24-48 saatte bir mediumları değiştirildi. Hücreler uygun sayıya ulaştıklarında pipet tabancası yardımı ile 50 ml'lik falkonlara konuldu ve 900 rpm hızında 5 dakika kadar santrifüj

edilerek hücrelerin pellet halinde dibe çökmeleri sağlandı. Hücrelerin üzerine uygun miktarda hücre karışımı eklenerek hücre süspansiyonunun yeniden oluşması sağlandı. Bu yoğun hücre konsantrasyonu yine her bir flask içinde 3×10^5 olacak şekilde yeniden dağıtıldı, besi yerleri uygun miktarda olacak şekilde tamamlandı.

3.3. XTT Hücre Canlılık Testi

ETP 45658, Resveratrol'ün Raji hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi XTT (2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide) testi ile araştırıldı. Yöntem, metabolik olarak aktif olan hücrelerin bir tetrazolyum tuzu olan XTT'yi turuncu formazan bileşenlerine indirgemeleri prensibine dayanmaktadır (Şekil 3).



Şekil 3:3.1. XTT'nin formazana dönüşümü

Oluşan boya suda çözünebilir özellikte olmakla birlikte boya yoğunluğu bir spektrofotometre yardımıyla verilen dalga boylarında okutulabilmektedir. Boya yoğunluğu (turuncu renk), metabolik olarak aktif hücrelerin sayısı ile orantılıdır.

3.3.1. Raji hücrelerinde İlaçların Tek Başlarına XTT hücre canlılığı değerlendirilmesi

Sitotoksitesite için öncelikle her kuyuda 10×10^3 hücre olacak şekilde hücre alımı steril 96 kuyucuklu mikro plakaya ekilecek ve ETP 45658 ile resveratrol tek başlarına artan konsantrasyonlarda hücreler üzerine uygulanıp 24 saat inkübasyon gerçekleştirilecektir. 24 saatin sonunda her bir kuyucuğa 50 μ l XTT solüsyonu eklenerek CO_2 'li etüvde 4 saat inkübe edilecektir. İnkübasyon süresi sonunda optik dansite (O.D.) değeri mikropilaka okuyucuda 450 nm'de okunarak, kontrol grubunun hücre canlılık oranı %100 olarak kabul edilip % hücre canlılık = (Konsantrasyon O.D.

/ Kontrol O.D.) X 100 formülünden yararlanarak yarı inhibitör konsantrasyon (IC_{50}) değeri hesaplanacaktır. Elde edilen IC_{50} değerleri üzerinden kombinasyon ve apoptozis çalışmaları yürütülecektir.

Tablo 10:3.1. Tek ajan XTT protokolü

Raji	1	2	3	4	5	6
A	Kontrol	Kontrol	Kontrol	Kontrol	Kontrol	Kontrol
B	ETP 50 μ M	ETP 25 μ M	ETP 10 μ M	ETP 1 μ M	ETP 0.1 μ M	ETP 0.01 μ M
C	ETP 50 μ M	ETP 25 μ M	ETP 10 μ M	ETP 1 μ M	ETP 0.1 μ M	ETP 0.01 μ M
D	ETP 50 μ M	ETP 25 μ M	ETP 10 μ M	ETP 1 μ M	ETP 0.1 μ M	ETP 0.01 μ M
E	RSV 100 μ M	RSV 50 μ M	RSV 25 μ M	RSV 10 μ M	RSV 1 μ M	RSV 0.1 μ M
F	RSV 100 μ M	RSV 50 μ M	RSV 25 μ M	RSV 10 μ M	RSV 1 μ M	RSV 0.1 μ M
G	RSV 100 μ M	RSV 50 μ M	RSV 25 μ M	RSV 10 μ M	RSV 1 μ M	RSV 0.1 μ M

Tablo 11:3.2. XTT kombinasyon protokolü

Raji	1	2	3	4	5	6	7
A	Kontrol	ETP 50 μ M + RSV 100 μ M	ETP 25 μ M + RSV 50 μ M	ETP 10 μ M + RSV 25 μ M	ETP 1 μ M + RSV 10 μ M	ETP 0.1 μ M + RSV 1 μ M	ETP 0.01 μ M + RSV 0.1 μ M
B	Kontrol	ETP 50 μ M + RSV 100 μ M	ETP 25 μ M + RSV 50 μ M	ETP 10 μ M + RSV 25 μ M	ETP 1 μ M + RSV 10 μ M	ETP 0.1 μ M + RSV 1 μ M	ETP 0.01 μ M + RSV 0.1 μ M
C	Kontrol	ETP 50 μ M + RSV 100 μ M	ETP 25 μ M + RSV 50 μ M	ETP 10 μ M + RSV 25 μ M	ETP 1 μ M + RSV 10 μ M	ETP 0.1 μ M + RSV 1 μ M	ETP 0.01 μ M + RSV 0.1 μ M

3.3.2. Raji hücrelerinde İlaç Kombinasyonlarının XTT hücre canlılığı değerlendirilmesi

Sitotoksosite için öncelikle her kuyuda 10×10^3 hücre olacak şekilde hücre alınıp steril 96 kuyucuklu mikro plakaya ekildi ve ETP 45658 ile Resveratrol tek başlarına eklenerek CO_2 'li etüvde 4 saat inkübe edildikten sonra XTT testi uygulandı.

3.4. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması

Süspansiyon halde flaskta yer alan hücreler santrifüj tüpünde toplanarak 800 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellete %90 FBS ve %10 DMSO içeren karışımdan 1 ml eklendi ve falkon tüpü buz içerisine oturtuldu. Kullanılacak soğuğa dayanıklı saklama tüpleri (cryo tüp) de buza oturtularak soğumaları sağlandı. Tüp içerisindeki tek hücre süspansiyonundan

DMSO'lu serumlu medyum içerisine alınan hücreler cryo tüpüne damla damla eklendi. Saklama tüpü 1 gece -20°C 'de, 1 gece de -70°C 'de bekletildikten sonra sıvı azot buharına alındı. Tüm bu uygulamalar tüpteki son konsantrasyon 2.5×10^5 hücre/ml olacak şekilde yapıldı.

3.5. Apoptozis ve Hücre Ölümünün Flow Sitometri Yöntemi ile Değerlendirilmesi

Apoptozis ya da diğer bir ismi ile programlanmış hücre ölümü, hücre büyümesinde ve çoğalmasında oldukça aktif bir düzenleyici mekanizmadır. Hücreler spesifik sinyal indüksiyonlarına hücre için belli sinyal yollarının aktivasyonu yolu ile yanıt verirler ve bu da hücrede karakteristik fizyolojik değişikliklerin meydana gelmesine neden olur. Bu değişikliklerin arasında fosfatidil serin rezidülerinin hücre içerisine bakıyor olmaları gerekirken hücre dışına bakar şekilde eksternalize olmaları, bazı spesifik proteinlerin yarıklanma mekanizması ile deaktive edilmesi, nükleer kromatinin fragmanlarına ayrılması ve son aşamada membran bütünlüğünün kaybolması gibi durumlar yer almaktadır. Annexin V, fosfatidil serin rezidülerine yüksek afinitesi olan kalsiyum bağımlı ve fosfolipitlere bağlanan bir proteindir. Apoptozisin erken evrelerinde fosfatidil serin rezidüleri dış membranın dış yüzeyine transloke olmakta böylece annexin V boyası ile boyanabilmektedirler (Şekil 4).



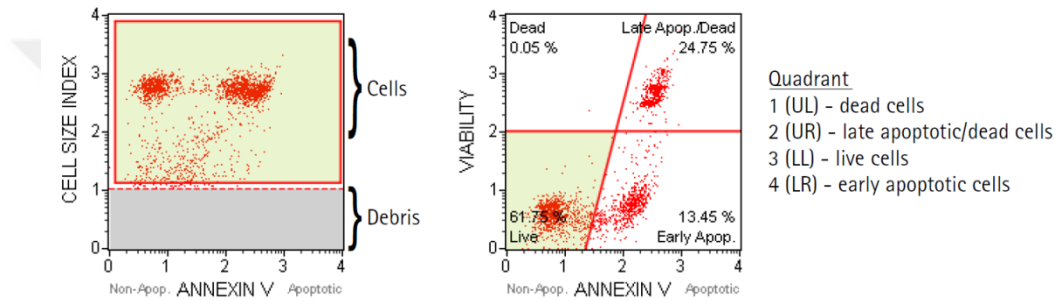
Şekil 4:3.2. Sağlıklı hücre, apoptotik hücre ve geç apoptotik hücrenin görsel ifadesi.

Şekilde apoptoza giden hücrede fosfatidil serin rezidülerinin hücre membranının dış yüzeyine eksternalize olmaları ve annexin V boyasının bu rezidülere bağlanması görülmektedir.

Çalışmamızda apoptozis ve hücre ölümünün tespit edilmesi için MuseTM Hücre Analiz Sistemi ve bu sistem ile uyumlu şekilde etkinlik gösteren MuseTM Annexin V & Hücre ölüm kiti kullanılacaktır. Bu kit Annexin V boyası ile apoptotik hücrelerin fosfatidil serin rezidülerini boyadığı gibi aynı zamanda 7-ADD

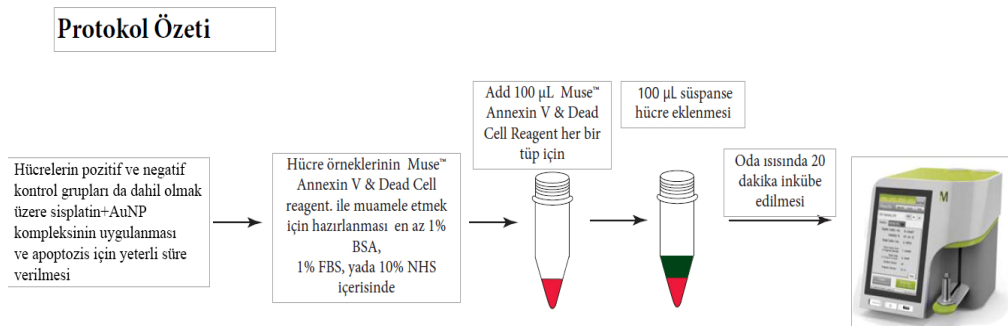
boyası ile hücre membranının yapısal bütünlüğünü değerlendirmektedir. Böylece bu kit sayesinde 4 çeşit hücre popülasyonu tespit edilebilmektedir (Şekil 5).

1. Apoptozise gitmemiş hücreler: Annexin V (-) ve 7-ADD (-)
2. Erken dönem apoptotik hücreler: Annexin V (+) ve 7-ADD (-)
3. Geç dönem apoptotik hücreler: Annexin V (+) ve 7-ADD (+)
4. Nükleer debrisler: Annexin V (-) ve 7-ADD (+)



Şekil 5:3.3. Apoptozise gitmemiş veya erken dönem ve geç dönem apoptotik hücrelerin gösterilmesi

Protokol, kültür içindeki erken apoptotik hücrelerin direkt olarak tespit edilmesi esasında dayanmaktadır. Optimal sonuç için hücrelerin final konsantrasyonu 2×10^4 - 1×10^5 hücre/kuyucuk (ya da 1×10^5 ila 5×10^5 hücre/mL) olacak şekilde ayarlandı. Hücreler, ilaçların uygulanmasından yaklaşık olarak 20 dakika sonra cihaza okutuldu (Şekil 6).



Şekil 6:3.4. Annexin V Hücre Ölümü Protokol Özeti

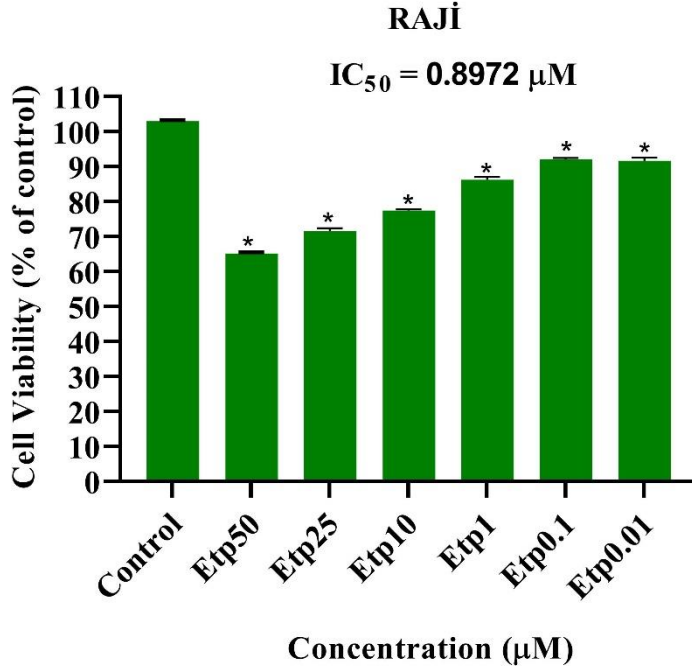
3.6. Deney Verilerinin İstatiksel Tayini

Elde edilecek verilerin istatistiksel değerlendirilmesi SPSS paket programı dâhilinde, normal dağılım gösteren veriler için tek yönlü ANOVA Varyans Analizi Testi ile ve normal dağılım göstermeyen veriler için ise non-parametrik testler olan Kruskal-Wallis ve Mann-Whitney U testi uygulanarak yapıldı. Sonuçlardan $p < 0.05$ olan değerler anlamlı kabul edildi.



4. BULGULAR

4.1. ETP 45658'in Raji Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisi

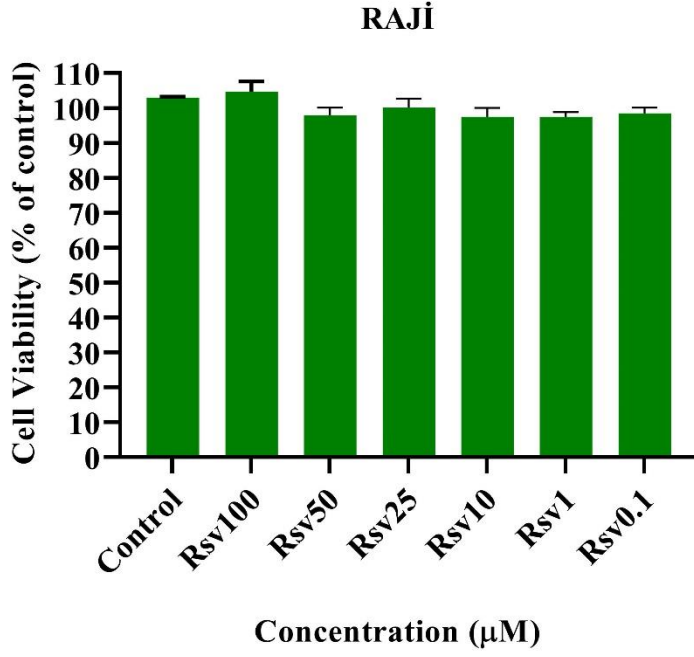


Şekil 7:4.1. ETP 45658'in Raji Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin 24. Saatte Değerlendirilmesi

* Kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklı ($p < 0.01$).

ETP 45658'in 50, 25, 10, 1, 0.1, 0.01 µM konsantrasyonları Raji hücreleri üzerine uygulandı. Bu dozlarda meydana gelen sitotoksik etki kolorimetrik XTT yöntemi ile 3 defa 24.saatte değerlendirildi. ETP 0.01 µM dozunda hücre canlılığı (HC) %90,1-93,1 arasında bulundu. ETP 0.1 µM dozunda HC %91,1-92,5 arasında bulundu. ETP 1 µM dozunda HC %85,04-87,9 arasında bulundu. ETP 10 µM dozunda HC %76,7-77,9 arasında bulundu. ETP 25 µM dozunda HC %70,2-73 arasında bulundu. ETP 50 µM dozunda HC %64,6-65,7 arasında bulundu ve bütün ETP dozlarında anlamlı sitotoksik etki ($p < 0.01$) gözlemlendi. Sitotoksik etkinin doz bağımlı olduğu ve artan konsantrasyonlarda daha güçlü olduğu tespit edildi ve ETP 45658'in tek ajan IC₅₀ değeri 0,8972 µM olarak hesaplandı.

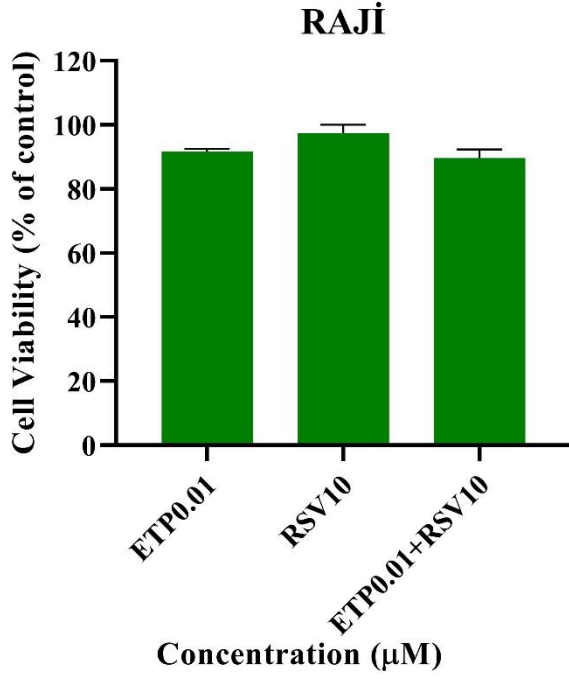
4.2. Resveratrol'ün Raji Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisi



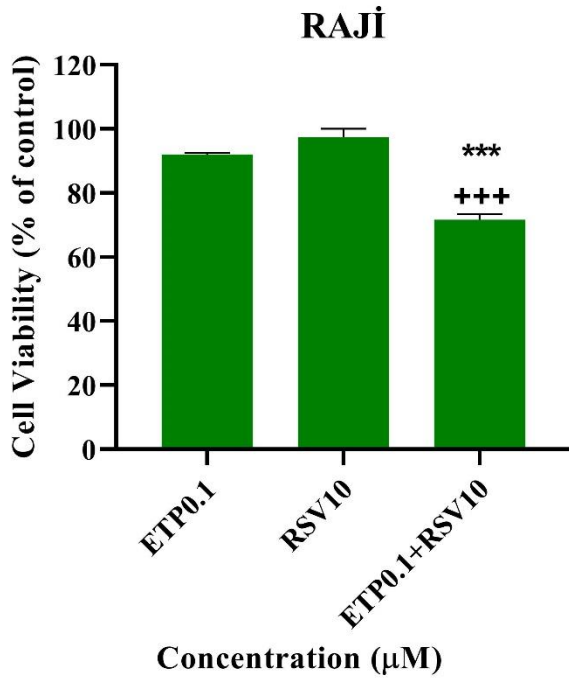
Şekil 8:4.2. Resveratrol'ün Raji Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin 24. Saatte Değerlendirilmesi

Resveratrol 0.1-100 µM arasında artan dozlarda tek ajan olarak Raji hücre hatlarına uygulandı. 24 saat sonra kontrole göre hücre canlılığında Resveratrol doz bağımsız anlamlı fark saptanamadı.

4.3. ETP 45658 + Resveratrol Kombinasyonun Raji Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisi



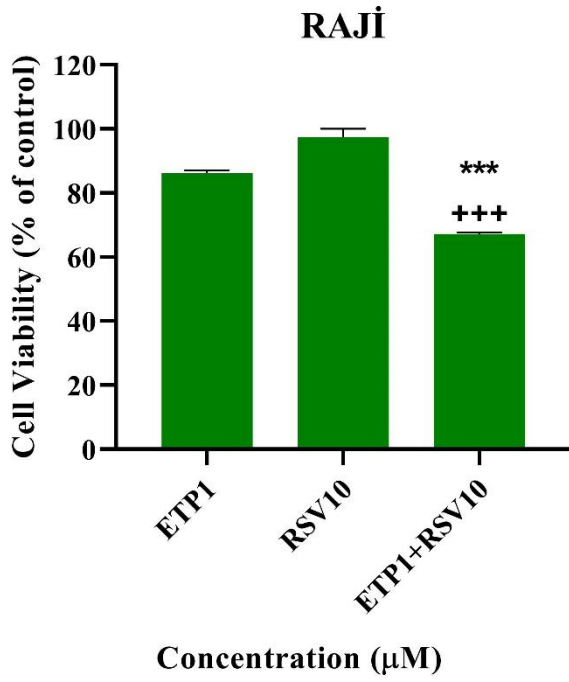
Şekil 9:4.3. ETP 0.01 μM + Resveratrol 10 μM Kombinasyonun Raji Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin 24.saatte değerlendirilmesi.



Şekil 10:4.4. ETP 0.1 μM + Resveratrol 10 μM Kombinasyonun Raji Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin 24.saatte değerlendirilmesi.

*** ETP 0.1 μM ile karşılaştırıldığında ETP 0.1 μM + Resveratrol 10 μM kombinasyonu istatistiksel açıdan anlamlı ($p < 0.01$).

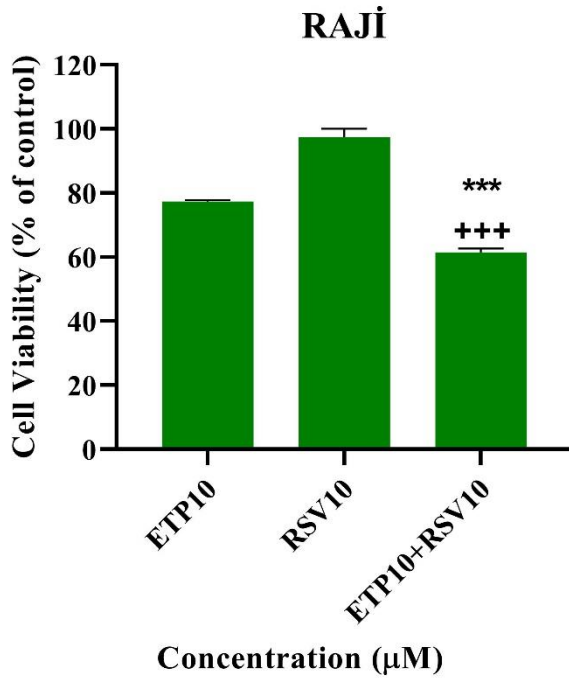
+++ Resveratrol 10 μM ile karşılaştırıldığında ETP 0.1 μM + Resveratrol 10 μM kombinasyonu istatistiksel açıdan anlamlı ($p < 0.01$).



Şekil 11:4.5. ETP 1 μM + Resveratrol 10 μM Kombinasyonun Raji Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin 24.saatte değerlendirilmesi.

*** ETP 1 μM ile karşılaştırıldığında ETP 1 μM + Resveratrol 10 μM kombinasyonu istatistiksel açıdan anlamlı ($p < 0.01$).

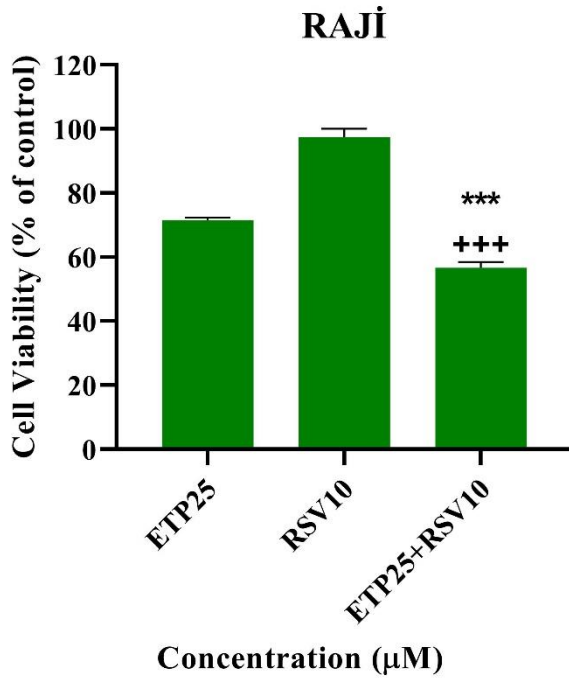
+++ Resveratrol 10 μM ile karşılaştırıldığında ETP 1 μM + Resveratrol 10 μM kombinasyonu istatistiksel açıdan anlamlı ($p < 0.01$).



Şekil 12:4.6. ETP 10 μM + Resveratrol 10 μM Kombinasyonun Raji Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin 24.saatte değerlendirilmesi.

*** ETP 10 μM ile karşılaştırıldığında ETP 10 μM + Resveratrol 10 μM kombinasyonu istatistiksel açıdan anlamlı ($p < 0.01$).

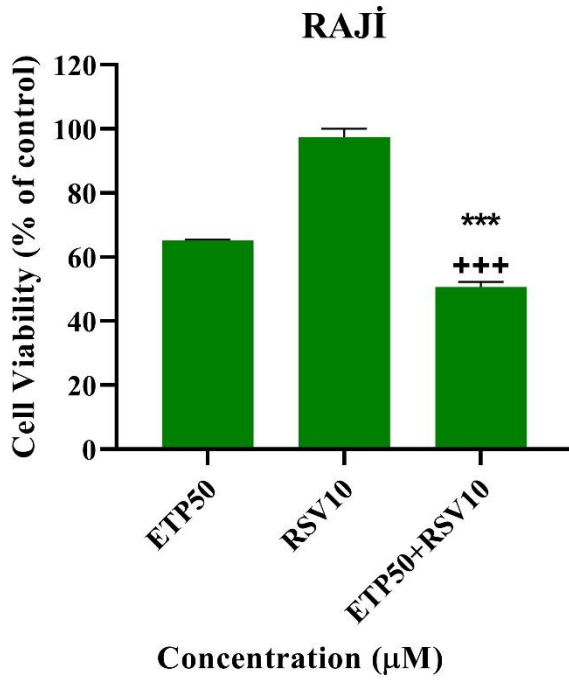
+++ Resveratrol 10 μM ile karşılaştırıldığında ETP 10 μM + Resveratrol 10 μM kombinasyonu istatistiksel açıdan anlamlı ($p < 0.01$).



Şekil 13:4.7. ETP 25 μM + Resveratrol 10 μM Kombinasyonun Raji Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin 24.saatte değerlendirilmesi.

*** ETP 25 μM ile karşılaştırıldığında ETP 25 μM + Resveratrol 10 μM kombinasyonu istatistiksel açıdan anlamlı ($p < 0.01$).

+++ Resveratrol 10 μM ile karşılaştırıldığında ETP 25 μM + Resveratrol 10 μM kombinasyonu istatistiksel açıdan anlamlı ($p < 0.01$).



Şekil 14:4.8. ETP 50 μM + Resveratrol 10 μM Kombinasyonun Raji Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin 24.saatte değerlendirilmesi.

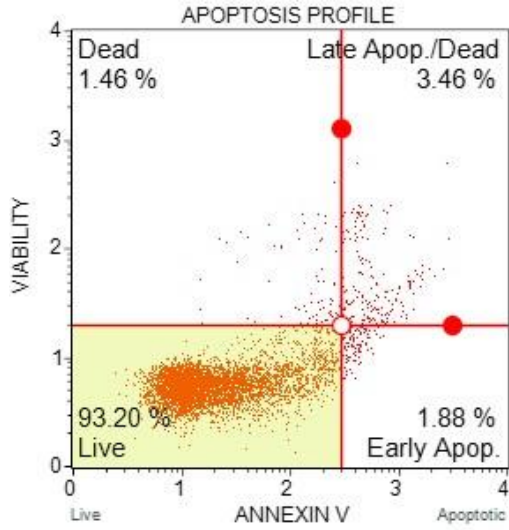
*** ETP 50 μM ile karşılaştırıldığında ETP 50 μM + Resveratrol 10 μM kombinasyonu istatistiksel açıdan anlamlı ($p < 0.01$).

+++ Resveratrol 10 μM ile karşılaştırıldığında ETP 50 μM + Resveratrol 10 μM kombinasyonu istatistiksel açıdan anlamlı ($p < 0.01$).

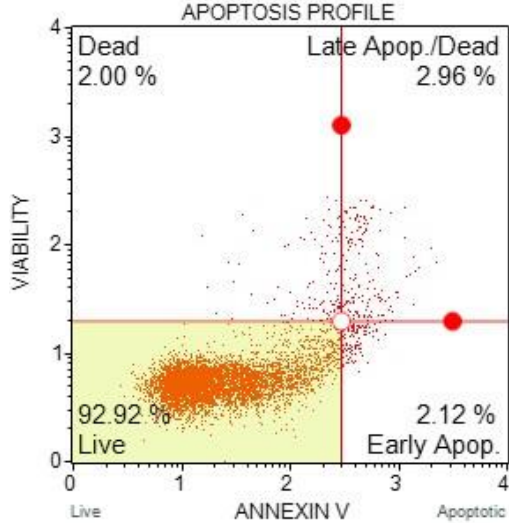
ETP 45658'in 50, 25, 10, 1, 0.1, 0.01 μM konsantrasyonları 10 μM Resveratrol ile kombine edilerek Raji hücreleri üzerine uygulandı. Bu dozlarda meydana gelen sitotoksik etki kolorimetrik XTT yöntemi ile 3 defa 24.saatte değerlendirildi. ETP 0.01 μM kombinasyonunda HC %89,6-87,1 arasında bulundu. ETP 0.1 μM kombinasyonunda HC %72,4-69,7 arasında bulundu. ETP 1 μM kombinasyonunda HC %67,1-66,6 arasında bulundu. ETP 10 μM kombinasyonunda HC %62,8-60,6 arasında bulundu. ETP 25 μM kombinasyonunda HC %58,7-55,4 arasında bulundu. ETP 50 μM kombinasyonunda HC %51-48,8 arasında bulundu ve ETP 0.01 μM ile ETP 0.01 μM + Resveratrol10 μM kombinasyonu hariç diğer bütün kombinasyon dozlarında tek başına ETP ile kıyaslandığında anlamlı sitotoksik etki ($p < 0.01$) gözlemlendi. Sitotoksik etkinin doz bağımlı olduğu ve artan konsantrasyonlarda daha

güçlü olduğu tespit edildi ve ETP 45658'in kombinasyon IC_{50} değeri $0,1722 \mu M$ olarak hesaplandı.

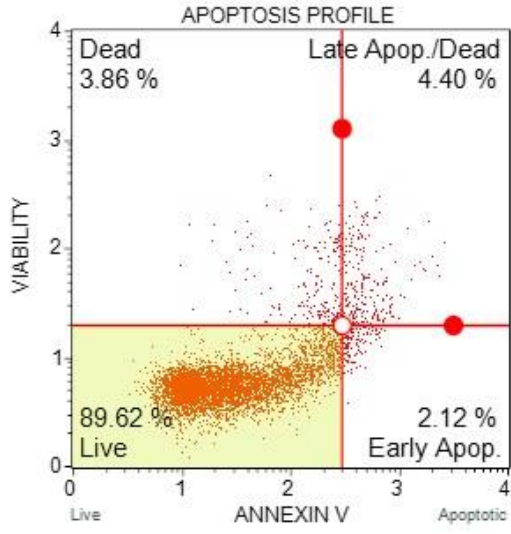
4.4. Apoptoz ve Hücre Ölümünün Flow Sitometri Yöntemi ile Değerlendirilmesi



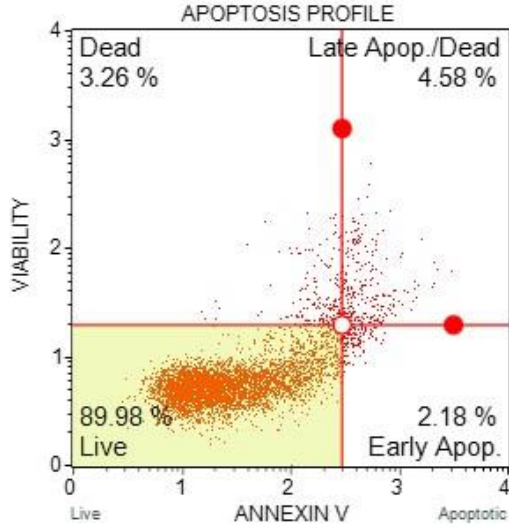
Şekil 15:4.9. Kontrol Grubu Apoptoz Profili



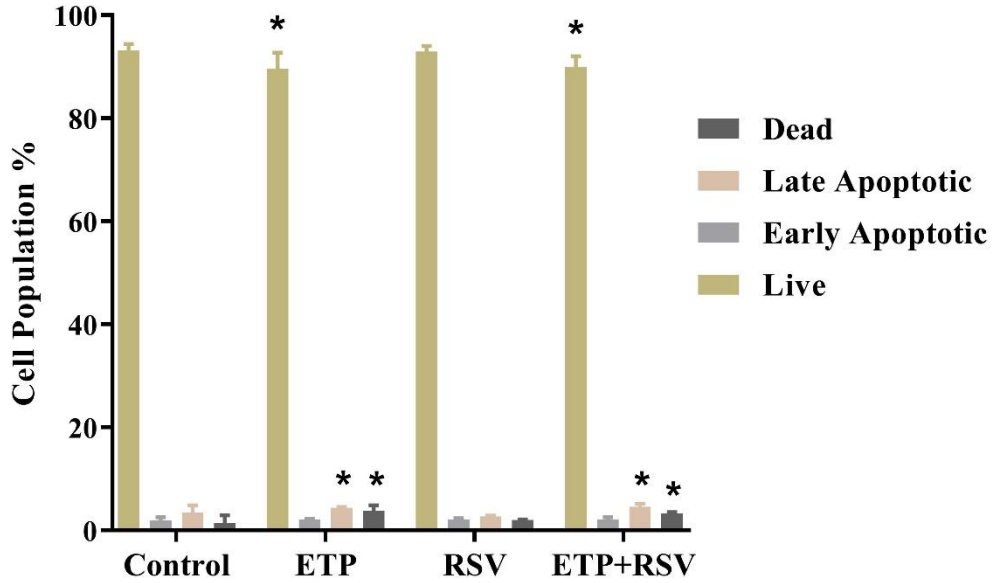
Şekil 16:4.10. Resveratrol $10\mu M$ Grubu Apoptoz Profili



Şekil 17:4.11. ETP 25 μ M Grubu Apoptoz Profili



Şekil 18:4.12. ETP 25 μ M + Resveratrol 10 μ M Grubu Apoptoz Profili



Şekil 19:4.13 Apoptoz Profillerinin İstatistiksel Açından Değerlendirilmesi

* Kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan zayıf anlamlı ($p < 0.05$)

Apoptoz yöntemi olarak 24. saatte Annexin V ile boyanan hücrelerin flow sitometri yöntemi ile gösterilmesi kullanıldı. Kontrol grubunda geç apoptoz oranı %3,46 olarak belirlendi ve diğer sonuçlar bu sonuca göre değerlendirildi. Propodyum iyodür kullanılmadığı için otofaji değerlendirilmesi yapılamadı bu yüzden ölüm ve erken apoptoz verileri kullanılmadı. Resveratrol 10 μ M dozunda geç apoptoz %2,96 olarak bulundu ve istatistiksel olarak anlamsız kabul edildi. ETP 25 μ M dozunda geç apoptoz %4,40 olarak bulundu ve istatistiksel açıdan zayıf anlamlı kabul edildi ($p < 0.05$). ETP

25µM + Resveratrol 10µM grubunda geç apoptoz %4,58 olarak bulundu ve kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan zayıf anlamlı ($p < 0.05$) olsa da ETP 25µM grubu ile kıyaslandığında istatistiksel açıdan anlamsız olarak bulundu.

5. TARTIŞMA

PI3K/Akt/mTOR yolağı kanser hücresinin büyümesi, farklılaşması, hayatta kalması ve metastazında etkili bir yolaktır. mTOR sinyal yolağına etkili ilaçların kanser hücrelerinde; apoptoz, mitoz bölünmeyi durdurma (hücre döngüsü ölümü), sinyal transdüksiyon inhibisyonu gibi kanıtlanmış etkilerinin yanı sıra gen transkripsiyonuna etki ettiği ve epigenetik etkilerinin de olduğu düşünülmektedir (97).

Lenfoid ve myeloid hücrelerin normal gelişimi ve fonksiyonunun sürdürülmesinde mTOR sinyal yolağının kritik bir rol oynadığı gösterilmiş olup yolağın hiperaktif olduğu durumlarda da hematolojik hastalıklar geliştiği için mTOR inhibitörlerinin hematolojik hastalıklardan korunma ve tedavisinde etkili olduğunu düşünülerek neredeyse bütün hematolojik hastalık alt gruplarında mTOR inhibitörleri ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmıştır. NHL'larda yapılmış çalışmalara daha detaylı bakacak olursak;

Relaps mantle hücreli lenfoma (MCL)'da tek ajan mTOR inhibitörleri ile yapılmış literatürde iki adet faz 2 çalışma vardır. Bu çalışmalarda mTOR inhibitörleri ile MCL için karakteristik olan t(11,14) sonucu gelişen siklin D1 mRNA over ekspresyonunun engellenip engellenemeyeceği araştırılmıştır. İlk çalışmada relaps/refrakter MCL'li 34 hastaya temsirolimus 250 mg haftalık tek doz olarak uygulanmış, 6 siklus sonra ilaç devamı açısından değerlendirilip 12 siklus ile çalışma bitirilmiş. Sonuç olarak 34 hastanın 13'ünde yanıt alınmış olup bunlardan 1 tanesi tam yanıt, 12 tanesi kısmi yanıt olmak üzere toplam yanıt oranı (ORR) %38 bulunmuş. Relaps MCL'de tek ajan temsirolimusun antitümör aktivitesi olduğu gösterilmiştir (98). Yapılan diğer çalışmada ise 27 relaps MCL'li hastaya haftalık 25 mg temsirolimus (düşük doz) verilmiş ve önceki çalışma gibi 12 haftada sonlandırılmış. 1'i tam yanıt, 10 tanesi kısmi yanıt olmak üzere toplamda 11 hastada yanıt alınmış.

ORR %41 bulunmuş. Sonuç olarak 25 mg temsirolimusun 250 mg ile karşılaştırıldığında tedavi yanıtının değişmediği ama yan etki sıklığında azalma olduğu görülmüştür (99).

Relaps/refrakter MCL'de temsirolimusun 3 farklı kemoterapi protokolü ile kombinasyonunun karşılaştırıldığı faz 1b çalışmada ise temsirolimus 10 mg, 15 mg, 25 mg dozlarından biri kemoterapi protokollerinin 2., 8. ve 15. günlerinde verilerek toplam 6 siklus planlanmış. 3 farklı kemoterapi kolunda toplam 41 hasta üzerinde denenmiş. R-CHOP-T kolunda toplam 10 hastanın 2'si tam yanıt olmak üzere ORR %40, R-FC-T kolunda 14 hastanın 3'ü tam yanıt olmak üzere ORR %43, R-DHA-T kolundaki 17 hastanın 6'sı tam yanıt olmak üzere ORR %47 bulunmuştur (100). Sonuç olarak, temsirolimusun R-CHOP ile kombinasyon halinde 15 mg D1, 8 ve 15'lik planlanmış bir doz kullanılması mümkündür. T3 denemesi, hematolojik toksisite nedeniyle R-FC veya R-DHA ile kombine temsirolimus doz seviyesini bulamadı. Tüm kollarda, CR'ye ulaşan hastaları bildiriyoruz. Temsirolimusun kombinasyon halinde kullanımı, R/R MCL'de hala ilgi çekicidir ve özellikle ibrutinib başarısız hastalarda daha fazla araştırılmayı hak etmektedir. Kemoimmünoterapi ile kombine temsirolimus kullanımının yüksek oranda toksisite ile ilişkili olduğu, R-CHOP-T kolu haricindeki diğer kollarda toksisite nedeniyle maksimum tolere edilebilen doza ulaşamamışlar. Relaps/refrakter MCL'li hastalarda kesinlikle etkin olduğu kanısına varmışlardır (100).

Relaps/refrakter NHL'lı 39 hastanın olduğu başka bir faz 2 çalışmada ise temsirolimus ile proteozom inhibitörü bortezomib kombinasyonunun etkinliği karşılaştırılmıştır. Çalışma şekli olarak bortezomib (1,6 mg/m²) 1., 8., 15. ve 22. günlerde 25mg temsirolimus intravenöz 1., 8., 15., 22. ve 29. günlerde uygulanmış ve 35 günde 1 siklüs tamamlandığı varsayılmış. İki siklusun sonunda tedaviye yanıt değerlendirilmiştir. Tedaviye yanıt karşılaştırıldığında 3 hastada tam yanıt, 9 hastada parsiyel yanıt olmak üzere toplam 12 hastada yanıt alınmış ve ORR %31 olarak bulunmuştur (101). Çalışma sonucunda, bu kombinasyonun relaps/refrakter NHL'lı hastalarda yönetilebilir toksisite ile etkin şekilde kullanılabileceği kanısına varmışlardır (101).

Relaps/refrakter marjinal zon lenfomalı hastalarla yapılan bir diğ er faz 2 çalışmada ise everolimus 10 mg 1-28 gün oral yoldan verilmiş ve 6 siklus sonrası yanıt değerlendirilmiş. 24 kişilik hasta grubunda çalışmanın sonunda 1 hastada tam yanıt, 5 hastada kısmı yanıt olmak üzere toplam 6 hastada yanıt alınmış. ORR %25 olarak bulunmuştur (102). Çalışma sonucunda ortaya çıkan yan etkilerin, düşük gradeli bir lenfoma subtipi olan marjinal zon lenfoma için çok fazla olduğu, everolimusun daha düşük dozlarda başka ajanlarla kombine edilebileceği sonucuna varmışlardır (102).

MCL dışı NHL'larda temsirolimus ile yapılan bir başka faz 2 çalışmada ise hastalar Grup A-B-C olmak üzere 3 gruba bölünmüşlerdir. Grup A (diffüz büyük B hücreli lenfoma):32 hasta, Grup B (foliküler lenfoma):39 hasta, Grup C (diğ er NHL türleri):18 hasta olmak üzere toplam 89 hastaya tek ajan 25 mg intravenöz temsirolimusun haftalık tedavi olarak verilmiş ve 28 günlük sikluslar planlanmıştır. Çalışmanın sonunda ise Grup A'da 4 hastada tam yanıt, 5 hastada kısmi yanıt olmak üzere toplam 9 hastada yanıt alınmış. ORR %28,1, median PFS 2,6 ay bulunmuş. Grup B'de 10 hastada tam yanıt, 11 hastada kısmi yanıt olmak üzere toplam 21 hastada yanıt alınmış. ORR %53,8, median PFS 12,7 ay bulunmuş. Grup C'de ise sadece 2 hastada kısmi yanıt alınmış olup ORR %11,1 olarak bulunmuştur (103). Sonuç olarak diffüz büyük B hücreli lenfoma ve folliküler lenfomada tek ajan temsirolimusa iyi yanıtlar alınmıştır. Ancak PFS folliküler lenfomada daha uzun süre olarak saptanmıştır. Foliküler lenfomada temsirolimus etkinliğinin daha fazla bulunması temsirolimusun germinal merkezden ziyade foliküler merkezden gelişen lenfomalarda daha etkin olabileceği sorusunu akıllara getirmiştir. Fakat bunun ilaç etkisi mi, grup etkisi mi olduğu veya tutarlılık olup olmadığı açısından daha fazla klinik deneye ihtiyaç vardır (103).

Şimdiye kadar bahsetmiş olduğumuz literatürdeki faz 2 çalışmalara baktığımızda tek başına everolimusun ve temsirolimusun NHL'larda çok etkin bir tedavi seçeneği olmadığını görüyoruz. Bunun nedenlerine bakacak olursak; çalışmaların relaps/refrakter grupta yapıyor olması, tek ajan uygulanıyor olması, mTORC1 inhibisyonu sağlamasına rağmen mTORC2'yi inhibe etmediği ve mTORC2'nin PI3K/Akt/mTOR yolağı üzerinde pozitif feedback etkisinden dolayı yolağın inhibisyonunun sınırlı kalması olabilir.

BL'ye baktığımızda ise PI3K/Akt/mTOR yolağı ilişkisinin gösterildiği hasta bazlı çalışmalar literatürde olmayıp kök hücre ve hayvan deneyleri vardır.

Omipalisibin (PI3K ve mTOR dual inhibitörü) Raji ve Raji 4RH (kemoterapi ve rituximab dirençli) BL hücre hatlarında 24-72 saat maruziyeti ile yapılan bir hücre kültür çalışmasında; omipalisibin doz ve zaman bağımlı olarak sitotoksik etkisinin arttığı 48.saat IC₅₀ değeri Raji hattında 1.2 µM, Raji 4RH hattında 0.02 µM olarak bulunmuştur. Omipalisib 0.2 µM dozunda apopitozu indüklemek için kullanıldığında ise Raji hücre hattı için apopitoz %40,7 bulunmasına rağmen Raji 4RH hattında %4,4 olarak bulunmuştur. Ayrıca hücre döngüsü kiti ile tüm hücre hatları G1 fazında durmasına rağmen Raji 4RH hattında G2/M fazında daha fazla hücre görülmüştür (104). Sonuç olarak omipalisib BL hücre hatlarında sitotoksik etki göstermekle birlikte kemoterapi dirençli hatlarda apopitozu indükleyemediği görülmüştür. Bu durum PI3K/Akt/mTOR yolağının BL için potansiyel bir tedavi yolağı olabileceğini desteklemektedir.

NVP-BEZ235 (PI3K ve mTOR dual inhibitörü) Raji BL hücre hattında 1, 10, 50, 100, 500, 1000 nmol/l konsantrasyonlarında 24-48-72 saat BL proliferasyon inhibisyonuna bakılmış ve inhibisyonun hem doz hem de zaman bağımlı olarak arttığı tespit edilmiş. Ayrıca hücre döngüsünde hücrelerin artan dozlarda daha fazla olmak üzere G0/G1 fazında durduğu saptanmıştır. Apopitoz üzerine etkisi değerlendirildiğinde ise kontrol grubunda %11 olan geç apopitoz oranı, 100 nmol/l konsantrasyonda 48. Saatte %14'e, 72. Saatte %18'e çıkmış ve geç apopitozda anlamlı fark saptanmamıştır (105).

ETP 45658 bir PI3K inhibitörü olup literatürde BL üzerine yapılmış klinik veya prelinik bir çalışma yoktur ama BL'de başka bir PI3K inhibitörü olan idelalisib ile ilgili bir çalışma vardır.

İdelalisib çalışması bir prelinik aktivite çalışması olup çalışma dizaynı olarak BL'da PI3K/Akt/mTOR yolağının etkinliğinin değerlendirilmesi için, kemoresistif ve kemorezistan BL hücre hatlarında (Raji, Raji 2R, Raji 4HR, Daudi, Ramos) pan-Akt inhibitörü (MK-2206) ve PI3K delta inhibitörü (idelalisib) kullanılmıştır. Çalışmanın başlangıcında BL hücrelerinde artmış Akt aktivasyonunu gösterilmek için western blot yöntemi ile fosforilize Akt düzeyine bakılmış ve Raji 2R'de en fazla olmak üzere

kemorezistans ve kemosenitif BL hücre hatlarında fosforilize Akt ekspresyonunun arttığı görülmüş ve MK-2206 maruziyeti sonrası sitotoksik etki değerlendirilmiştir. Hücre hatlarının 48. saat IC₅₀ değerleri Raji 16.6 µM, Raji 2R 7 µM, Raji 4HR 10.9 µM, Ramos 12.8 µM, Daudi 12 µM olarak bulunmuştur. Daha sonra MK-2206, doksorubisin ve deksametazon ile kombine edilmiş ve iki kombinasyonda da sitotoksik etki artmıştır. Apoptoz indüksiyonu, ölçüm yöntemi olarak western blot PARP yarıklanması ölçülerek değerlendirilmiş olup tek ajan MK-2206 uygulanan hücre hatlarının hiçbirinde anlamlı sonuç çıkmamıştır. Kombinasyon tedavilerinde ise sadece doksorubisin ile Raji ve Ramos hücre hattında anlamlı sonuç çıkmıştır. Daha sonra aynı protokol PI3K delta inhibitörü olan idelalisib ile tasarlanmıştır. IC₅₀ değerleri; Raji 63 µM, Raji 4RH 321 µM, Ramos 85 µM, Daudi 16 µM olarak bulunmuştur ve doz bağımlı olarak sitotoksik etkinliğinin arttığı görülmüştür. Bizim de kullanmış olduğumuz apoptoz indüksiyonu tespit etme yöntemi olan annexin v ile değerlendirilen idelalisib deksametazon kombinasyonunun, Daudi ve Ramos hücre hattında apoptozu indüklediği görülse de Raji ve Raji 4RH de apoptozu indüklemediği bulunmuştur (106).

ETP 45658 ile benzer bir şekilde PI3K inhibe eden idelalisib'in NHL'de yapılan klinik çalışmalarına detaylı bir şekilde bakacak olursak; yeni nesil PI3K inhibitörlerinin NHL tedavisinde neden önemli bir yer tuttuğu hakkında daha iyi bir fikir edinebiliriz ve gelecek tedavi seçenekleri için önemini kavrayabiliriz.

Relaps/refrakter MCL'li 39 hasta ile yapılan faz 1 çalışmada idelalisib 50-350 mg günlük dozlarda oral olarak hastalara verilmiş ve ORR %40 bulunmuş (107). Çalışma sonucunda idelalisibin kabul edilebilir güvenlik profili ile relaps/refrakter MCL'li hastalarda kullanılabileceği, ancak farklı ilaçlarla kombinasyon çalışmalarının yapılması gerektiği kanısına varılmıştır (107).

Relaps indolent B hücreli NHL'li 64 hastaya oral 50-350 mg günlük dozlarda verilen bir diğer faz 1 çalışmada ise ORR %47 olarak bulunmuştur (108). Çalışmada relaps indolen NHL'li hastalarda median yanıt süresinin 18,4 ay, median PFS'in 7,6 ay olarak bulunmuş. Elde edilen bulgularla relaps indolen NHL'li hastalarda idelalisibin güvenle kullanılabileceği sonucuna varılmıştır (108).

Relaps/refrakter kronik lenfositik lösemili (KLL) 54 hasta ile yapılan bir diğer faz 1 çalışmada ise yine 50-350 mg/gün (oral) dozlarda uygulanan idelalisib sonrası ORR %72 bulunmuş ve hem tedavi edilmemiş hem de relaps/refrakter KLL hastalarında etkin şekilde kullanılabilceği sonucuna varmışlardır (109).

İdelalisib 150 mg oral tedavi verilen indolent B hücreli NHL'li 125 hastanın katıldığı bir diğer faz 2 çalışmada ise ORR %56 olarak bulunmuştur (110). Gopal ve arkadaşları, idelalisibin, PI3Kδ yolunu hedeflediği ve daha önce tedavi görmüş indolent NHL'li hastalarda oral monoterapi olarak idelalisibin etkili ve güvenli bir seçenek olabileceğini vurgulamışlardır (110).

İdelalisib'in ve PI3K'ların NHL'lerin tedavisinde ne kadar umut verici olduğunu gösteren çalışma ise relaps/refrakter KLL'li 220 hastada yapılmış olan bir faz 3 çalışmadır. Çalışma dizaynı olarak randomize çift kör olarak iki gruba bölünmüş; bir gruba rituximab ve 150 mg idelalisib verilmiş, diğer gruba rituximab ve plasebo verilmiş. Tüm yanıtla bakıldığında idelalisib kolunda ORR %81, plasebo kolunda ise ORR %13 bulunmuş ve tüm yanıtlar parsiyel yanıt olarak bulunmuş (111). Bu faz 3 çalışmasının sonuçlarının bu kadar olumlu olması nedeniyle PI3K delta ve pan-PI3K inhibitörü olan birçok ilacın çeşitli ilaçlarla kombine edildiği NHL'lerde elliye yakın faz 1-3 çalışma devam etmekte olup bu çalışmaların hiçbirinde ETP 45658'in BL özelinde etkinliği araştırılmamıştır. Bu nedenle bizim çalışmamızın bu yönü ile literatüre katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

Resveratrol'ün PI3K/Akt/mTOR yolağı inhibisyonu ile kanser tedavisinde kombinasyon rejimlerinde kullanılmasına ilişkin literatürde mesane kanseri ile yapılan bir çalışma olup Resveratrol'ün kombinasyonda etkili olduğu bulunmuştur (95). Bizim çalışmamızda da Resveratrol'ün, ETP 45658'in BL hücreleri üzerine olan sitotoksik etkisini güçlendirmiş olup, sinerjistik etki ile hem yan etki profilini azaltıp hem de etkinliğini artıran bir molekül olarak kombinasyon tedavilerinde alternatif bir ajan olarak kullanılabilceği gösterilmiştir. Apoptoz üzerine ise anlamlı bir etki yapmamış olup bunun Resveratrol dozu ve apoptoz ölçüm zamanımızın 24 saat gibi kısa bir sürede olması nedeniyle olabileceği düşünülmektedir.

Literatüre bakıldığında genel anlamda sonuçlar bizim çalışmamıza paralel olacak şekilde PI3K/Akt/mTOR yolağı inhibitörlerinin BL hücre hatlarının tamamında

sitotoksik etki gösterdiği ve bu sitotoksik etkinin doz ve zaman bağımlı olarak arttığı görülmüştür. Ayrıca literatürde yine apopitoz indüksiyonunda kullanılan farklı yöntemler ile yüksek doz tek ajan yolak inhibitörlerinin bazı hücre hatlarında apopitozu indüklediği bulunmuş olsa da bazı hatlarda ise apopitoz indüksiyonunda istatistiksel açıdan anlamsız bulunmuştur. Bizim çalışmamızda da apopitoz indüksiyonu açısından hem ETP hem de ETP + Resveratrol kombinasyonu kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan zayıf anlamlı bulundu.

Litaratürde daha önce BL hücre hattında çalışılmamış bir antioksidan olan Resveratrol'ün ETP 45658 ile kombinasyonun sitotoksik etkiyi artırır mı diye yaptığımız çalışmada, literatürdeki diğer malign hücrelerle yapılan Resveratrol'ün PI3K/Akt/mTOR yolağının etkinliğini artırdığı çalışmalarla paralel bir şekilde anlamlı olarak bulunmuştur. Fakat kombinasyon tedavisinin tek başına ETP ile kıyaslandığında apopitoz indüksiyonu üzerine olan etkisi istatistiksel açıdan maalesef anlamsız bulunmuştur. Çalışmamızın daha etkili olabilmesi için farklı hücre hatlarında, farklı yöntemlerle deneylerin yapılması ve ileri ki süreçte *in vivo* yöntemlerle desteklenmesi gerekmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. ETP 45668'in hem tek ajan hem de Resveratrol ile kombinasyonu Burkitt lenfoma hücre hattı üzerinde 24. saatte bile tüm konsantrasyonlarda anlamlı istatistiksel sonuç verecek kadar güçlü bir sitotoksik etkinliğe sahip olup bu sitotoksik etkinlik doz bağımlı olarak artmaktadır.
2. ETP 45658'in hem tek ajan hem de Resveratrol kombinasyonu ile apopitozu indüklemiştir. Fakat istatistiksel olarak zayıf anlamlı sonuç bulunmuştur. Bunun nedeni ilacın potensini göstermek amacıyla apopitoz değerlendirilmesinin 24 saat gibi erken bir zamanda yapılması, mevcut ilaç kombinasyonunun sitotoksik etkisinin apopitoz dışı (ferroptoz, piropitoz, otofaji vb.) bir mekanizma ile olabileceği veya literatürde de benzer çalışmalarda olduğu gibi iki farklı apopitoz belirtecinin aynı çalışmada farklı sonuçlar vermesi olabileceği düşünülmektedir. Bu konuda ek çalışmalar yapılması gerekmektedir.
3. Güçlü sitotoksik etkisinin yanı sıra görece daha düşük apopitoz etkisi ile PI3K inhibitörlerinin sitotoksik etkisinin sadece apopitoz üzerinden olmaması hipotezi ileri araştırmalarla kanıtlanırsa; bu moleküller relaps/refrakter lenfomalar gibi kemoterapi dirençli grupların tedavisinde tedavi seçeneği haline gelebilir.
4. PI3K/Akt/mTOR yolak inhibitörleri kendi içinde değerlendirildiğinde; mTOR inhibisyonu yapan grubun sadece mTORC1 kompleksini inhibe etmesi ve mTORC2 kompleksini inhibe etmemesinin doğal sonucu olarak mTORC2 kompleksinin pozitif feedback ile PI3K/Akt/mTOR yolağını aktive edip bu moleküllerin etki gücünü azaltmaktadır. Bu nedenle PI3K (ETP 45648 gibi) inhibitörlerinin temsirolimus/omlivalisib gibi mTOR inhibitörlerine üstün

olduğu literatürdeki temsirolimus/omlivalisib vs idelalisib klinik çalışmalarını kıyasladığımızda anlaşılmaktadır. Bu nedenle PI3K inhibitörlerinin üzerine çalışma yapılması daha akılcı olacaktır.

5. PI3K inhibitörleri, farklı alt gruplara karşı inhibisyon sağlayan moleküller olup ileri çalışmalar ile kanser hücrelerinde hangi alt grubun aktif olduğu belirlenir ve bu alt gruba spesifik inhibitör molekül kullanılırsa, mevcut molekülün yan etki potansiyeli azaltılarak daha etkin bir tedavi sağlanabilir.
6. Resveratrol gibi PI3K/Akt/mTOR yolağını inhibe eden antioksidanların kombinasyon tedavilerinde kullanımını hem yan etki potansiyelini azaltmakta hem de tedavinin etkisini artırarak tedavi başarısını pozitif yönde etkilemektedir. Bu nedenle lenfoma gibi malign hastalıkların tedavisinde tek ajan yerine kombinasyon tedavileri tercih edilmesi daha akılcıdır.
7. PI3K/Akt/mTOR yolak inhibitörlerinin etki mekanizması ile kemoterapi rejimlerinin etki mekanizmasının farklı olması nedeni ile kemoterapi dirençli lenfomaların tedavisinde iki ilacın kombinasyonu, tedavi şansını artırmaktadır. İlk basamak tedavide olmasa bile sonraki basamaklarda kemoterapi rejimlerine protein kinaz inhibitörleri/immunoterapi ajanları gibi moleküllerin eklenmesinin tedavi başarı oranını arttıracığı düşünülmektedir. Elbette bu konuda daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.
8. Çalışmamızda çıkan sonuçlar, literatür ile birlikte değerlendirildiğinde göstermiştir ki özellikle relaps/refrakter BL ve intensif kemoterapileri tolere edemeyecek hastalar için hem tek ajan ETP 45658'in hem de ETP 45658/Resveratrol kombinasyonunun yeni bir tedavi seçeneği olma potansiyelini bulunmaktadır. Bu moleküllerin hastalar üzerinde etkinliğinin, yan etki profilinin ve sağ kalıma olan etkisinin değerlendirilmesi açısından daha fazla klinik çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

7.KAYNAKLAR

1. Rosenberg SA, Niglio SA, Salehomoum N, Chan JLK, Jeong BS, Wen Y, et al. Targeting glutamatergic signaling and the PI3 kinase pathway to halt melanoma progression. *Transl Oncol* [Internet]. 2015;8(1):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tranon.2014.11.001>
2. Porta C, Paglino C, Mosca A. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer. *Front Oncol*. 2014;4 APR(April):1–11.
3. Markman B, Atzori F, Pérez-García J, Tabernero J, Baselga J. Status of PI3K inhibition and biomarker development in cancer therapeutics. *Ann Oncol*. 2009;21(4):683–91.
4. Lee SE, Kang SY, Yoo HY, Kim SJ, Kim WS, Ko YH. Clonal relationships in recurrent B-cell lymphomas. *Oncotarget*. 2016;7(11):12359–71.
5. Graham BS, Lynch DT. Cancer, Burkitt Lymphoma [Internet]. StatPearls. StatPearls Publishing; 2019 [cited 2021 Oct 18]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538148/>
6. Dozzo M, Carobolante F, Donisi PM, Scattolin A, Maino E, Sancetta R, et al. Burkitt lymphoma in adolescents and young adults: management challenges. *Adolesc Health Med Ther*. 2016;Volume 8:11–29.
7. Binder AF, Brody JD. Non-hodgkin lymphoma. In: *Oncology* [Internet]. StatPearls Publishing; 2019 [cited 2021 Oct 19]. p. 342–53. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559328/>
8. Armitage JO, Gascoyne RD, Lunning MA, Cavalli F. Non-Hodgkin lymphoma. *Lancet* [Internet]. 2017;390(10091):298–310. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32407-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32407-2)
9. Zhang Y, Sanjose S De, Bracci PM, Morton LM, Wang R, Brennan P, et al. Personal use of hair dye and the risk of certain subtypes of non-Hodgkin lymphoma. *Am J Epidemiol*. 2008;167(11):1321–31.

10. Eriksson M, Hardell L, Carlberg M, Åkerman M. Pesticide exposure as risk factor for non-Hodgkin lymphoma including histopathological subgroup analysis. *Int J Cancer*. 2008;123(7):1657–63.
11. Anderson LA, Gadalla S, Morton LM, Landgren O, Warren JL, Berndt SI, et al. NIH Public Access. 2010;125(2):398–405.
12. Jiang L, Li N. B-cell non-Hodgkin lymphoma: importance of angiogenesis and antiangiogenic therapy. *Angiogenesis* [Internet]. 2020;23(4):515–29. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10456-020-09729-7>
13. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* [Internet]. 2016 May 19 [cited 2021 Oct 19];127(20):2375. Available from: </pmc/articles/PMC4874220/>
14. Molyneux EM, Rochford R, Griffin B, Newton R, Jackson G, Menon G, et al. Burkitt's lymphoma. *Lancet*. 2012;379(9822):1234–44.
15. Zech L, Haglund U, Nilsson K, Klein G. Characteristic chromosomal abnormalities in biopsies and lymphoid-cell lines from patients with burkitt and non-burkitt lymphomas. *Int J Cancer* [Internet]. 1976 Jan 15 [cited 2021 Oct 20];17(1):47–56. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ijc.2910170108>
16. Manolov G, Manolova Y. Marker band in one chromosome 14 from burkitt lymphomas. *Nature* [Internet]. 1972 [cited 2021 Oct 20];237(5349):33–4. Available from: <https://www.nature.com/articles/237033a0>
17. Epstein MA, Achong BG, Barr YM. VIRUS PARTICLES IN CULTURED LYMPHOBLASTS FROM BURKITT'S LYMPHOMA. *Lancet*. 1964 Mar 28;283(7335):702–3.
18. Schulz TF, Boshoff CH, Weiss RA. HIV series HIV infection and neoplasia. *Lancet*. 1996;348:587–91.
19. Rowe M, Kelly GL, Bell AI, Rickinson AB. Burkitt's lymphoma: The Rosetta

- Stone deciphering Epstein-Barr virus biology. *Semin Cancer Biol.* 2009;19(6):377–88.
20. Paschos K, Smith P, Anderton E, Middeldorp JM, White RE, Allday MJ. Epstein-Barr virus latency in B cells leads to epigenetic repression and CpG methylation of the tumour suppressor gene Bim. *PLoS Pathog.* 2009;5(6).
 21. Kelly G, Bell A, Rickinson A. Epstein-Barr virus-associated Burkitt lymphomagenesis selects for downregulation of the nuclear antigen EBNA2. *Nat Med [Internet].* 2002 Oct 1 [cited 2021 Oct 20];8(10):1098–104. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12219084/>
 22. Kelly GL, Milner AE, Tierney RJ, Croom-Carter DSG, Altmann M, Hammerschmidt W, et al. Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 2 (EBNA2) Gene Deletion Is Consistently Linked with EBNA3A, -3B, and -3C Expression in Burkitt's Lymphoma Cells and with Increased Resistance to Apoptosis. *J Virol [Internet].* 2005 Aug 15 [cited 2021 Oct 20];79(16):10709–17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16051863/>
 23. Kamranvar SA, Gruhne B, Szeles A, Masucci MG. Epstein-Barr virus promotes genomic instability in Burkitt's lymphoma. *Oncogene.* 2007;26(35):5115–23.
 24. Thorley-Lawson DA, Gross A. Persistence of the Epstein–Barr Virus and the Origins of Associated Lymphomas. *N Engl J Med [Internet].* 2004 Mar 25 [cited 2021 Oct 20];350(13):1328–37. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15044644/>
 25. Küppers R. B cells under influence: Transformation of B cells by Epstein-Barr virus [Internet]. Vol. 3, *Nature Reviews Immunology.* Nature Publishing Group; 2003 [cited 2021 Oct 20]. p. 801–12. Available from: <https://www.nature.com/articles/nri1201>
 26. Bellan C, Lazzi S, Hummel M, Palumbo N, De Santi M, Amato T, et al. Immunoglobulin gene analysis reveals 2 distinct cells of origin for EBV-positive and EBV-negative Burkitt lymphomas. *Blood [Internet].*

- 2005;106(3):1031–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2005-01-0168>
27. Donati D, Zhang LP, Chen Q, Chêne A, Flick K, Nyström M, et al. Identification of a polyclonal B-cell activator in *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun*. 2004;72(9):5412–8.
 28. Parroche P, Lauw FN, Goutagny N, Latz E, Monks BG, Visintin A, et al. Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(6):1919–24.
 29. Kumsiri R, Potup P, Chotivanich K, Petmitr S, Kalambaheti T, Maneerat Y. Blood stage plasmodium falciparum antigens induce T cell independent immunoglobulin production via B cell activation factor of the TNF family (BAFF) pathway. *Acta Trop*. 2010 Dec;116(3):217–26.
 30. Capolunghi F, Cascioli S, Giorda E, Rosado MM, Plebani A, Auriti C, et al. CpG Drives Human Transitional B Cells to Terminal Differentiation and Production of Natural Antibodies. *J Immunol*. 2008;180(2):800–8.
 31. Ramiro AR, Jankovic M, Callen E, Difilippantonio S, Chen HT, McBride KM, et al. Role of genomic instability and p53 in AID-induced c-myc-Igh translocations. *Nature* [Internet]. 2006 Mar 2 [cited 2021 Oct 20];440(7080):105–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16400328/>
 32. Epeldegui M, Breen EC, Hung YP, Boscardin WJ, Detels R, Martínez-Maza O. Elevated expression of activation induced cytidine deaminase in peripheral blood mononuclear cells precedes AIDS-NHL diagnosis. *AIDS* [Internet]. 2007 Nov [cited 2021 Oct 20];21(17):2265–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18090274/>
 33. Linch DC. Burkitt lymphoma in adults. *Br J Haematol*. 2012;156(6):693–703.
 34. Mbulaiteye SM, Biggar RJ, Bhatia K, Linet MS, Devesa SS. Sporadic childhood Burkitt lymphoma incidence in the United States during 1992–2005.

- Pediatr Blood Cancer. 2009 Sep;53(3):366–70.
35. Hesselting P, Molyneux E, Kamiza S, Israels T, Broadhead R. Endemic Burkitt lymphoma: A 28-day treatment schedule with cyclophosphamide and intrathecal methotrexate. *Ann Trop Paediatr*. 2009;29(1):29–34.
 36. Sandlund JT. Burkitt lymphoma: Staging and response evaluation. *Br J Haematol*. 2012;156(6):761–5.
 37. Perkins AS, Friedberg JW. Burkitt lymphoma in adults. [Internet]. Vol. 2008, Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program. American Society of Hematology; 2008 [cited 2021 Oct 21]. p. 341–8. Available from: http://ashpublications.org/hematology/article-pdf/2008/1/341/786582/341_348ash.pdf
 38. Fujita S, Buziba N, Kumatori A, Senba M, Yamaguchi A, Toriyama K. Early Stage of Epstein-Barr Virus Lytic Infection Leading to the “Starry Sky” Pattern Formation in Endemic Burkitt Lymphoma. *Arch Pathol Lab Med*. 2004 May 1;128(5):549–52.
 39. Brady G, MacArthur GJ, Farrell PJ. Epstein-Barr virus and Burkitt lymphoma. *Postgrad Med J*. 2008;84(993):372–7.
 40. Nakamura N, Nakamine H, Tamaru J ichi, Nakamura S, Yoshino T, Ohshima K, et al. The distinction between Burkitt lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma with c-myc rearrangement. *Mod Pathol*. 2002;15(7):771–6.
 41. Kalisz K, Alessandrino F, Beck R, Smith D, Kikano E, Ramaiya NH, et al. An update on Burkitt lymphoma: a review of pathogenesis and multimodality imaging assessment of disease presentation, treatment response, and recurrence. *Insights Imaging*. 2019;10(1):1–16.
 42. Schmitz R, Ceribelli M, Pittaluga S, Wright G, Staudt LM. Oncogenic mechanisms in Burkitt lymphoma. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2014 Feb 1 [cited 2021 Oct 22];4(2):a014282. Available from: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/content/4/2/a014282.full>

43. Dunleavy K, Little RF, Wilson WH. Update on Burkitt Lymphoma [Internet]. Vol. 30, Hematology/Oncology Clinics of North America. Hematol Oncol Clin North Am; 2016 [cited 2021 Oct 22]. p. 1333–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27888884/>
44. Egle A, Harris AW, Bouillet P, Cory S. Bim is a suppressor of Myc-induced mouse B cell leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(16):6164–9.
45. Salaverria I, Martin-Guerrero I, Wagener R, Kreuz M, Kohler CW, Richter J, et al. A recurrent 11q aberration pattern characterizes a subset of MYC-negative high-grade B-cell lymphomas resembling Burkitt lymphoma. Blood. 2014;123(8):1187–98.
46. Casulo C, Friedberg JW. Burkitt lymphoma- a rare but challenging lymphoma. Vol. 31, Best Practice and Research: Clinical Haematology. Baillière Tindall; 2018. p. 279–84.
47. Lombardo KA, Coffey DG, Morales AJ, Carlson CS, Towler AMH, Gerdt SE, et al. High-throughput sequencing of the B-cell receptor in African Burkitt lymphoma reveals clues to pathogenesis. Blood Adv [Internet]. 2017;1(9):535–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1182/bloodadvances.2016000794>
48. Schmitz R, Young RM, Ceribelli M, Jhavar S, Xiao W, Zhang M, et al. Burkitt lymphoma pathogenesis and therapeutic targets from structural and functional genomics. Nat 2012 4907418 [Internet]. 2012 Aug 12 [cited 2021 Oct 22];490(7418):116–20. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature11378>
49. Peled JU, Yu JJ, Venkatesh J, Bi E, Ding BB, Krupski-Downs M, et al. Requirement for cyclin D3 in germinal center formation and function. Cell Res [Internet]. 2010 Jun [cited 2021 Oct 22];20(6):631–46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20404856/>
50. Sander S, Calado DP, Srinivasan L, Köchert K, Zhang B, Rosolowski M, et al. Synergy between PI3K Signaling and MYC in Burkitt Lymphomagenesis.

- Cancer Cell [Internet]. 2012 Aug 14 [cited 2021 Oct 22];22(2):167–79.
Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22897848/>
51. Lin YC, Jhunjhunwala S, Benner C, Heinz S, Welinder E, Mansson R, et al. A global network of transcription factors, involving E2A, EBF1 and Foxo1, that orchestrates B cell fate. *Nat Immunol* [Internet]. 2010 Jul [cited 2021 Oct 22];11(7):635–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20543837/>
 52. Kwon K, Hutter C, Sun Q, Bilic I, Cobaleda C, Malin S, et al. Instructive Role of the Transcription Factor E2A in Early B Lymphopoiesis and Germinal Center B Cell Development. *Immunity* [Internet]. 2008 Jun 13 [cited 2021 Oct 22];28(6):751–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18538592/>
 53. Cairo M, Krailo M, Morse M, Hutchinson R, Harris R, Kjeldsberg C, et al. Long-term follow-up of short intensive multiagent chemotherapy without high-dose methotrexate (‘Orange’) in children with advanced non-lymphoblastic non-Hodgkin’s lymphoma: a Children’s Cancer Group Report. *Leuk* 2002 164 [Internet]. 2002 Apr 16 [cited 2021 Oct 21];16(4):594–600. Available from: <https://www.nature.com/articles/2402402>
 54. Shiramizu B, Goldman S, Smith L, Agsalda-Garcia M, Galardy P, Perkins SL, et al. Impact of persistent minimal residual disease post-consolidation therapy in children and adolescents with advanced Burkitt leukaemia: a Children’s Oncology Group Pilot Study Report. *Br J Haematol* [Internet]. 2015 [cited 2021 Oct 21];170(3):367–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25858645/>
 55. Olszewski AJ, Jakobsen LH, Collins GP, Cwynarski K, Bachanova V, Blum KA, et al. Burkitt Lymphoma International Prognostic Index. *J Clin Oncol* [Internet]. 2021 Apr 1 [cited 2021 Oct 21];39(10):1129–38. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33502927/>
 56. Thomas DA, Faderl S, O’Brien S, Bueso-Ramos C, Cortes J, Garcia-Manero

- G, et al. Chemoimmunotherapy with hyper-CVAD plus rituximab for the treatment of adult Burkitt and Burkitt-type lymphoma or acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* [Internet]. 2006 Apr 1 [cited 2021 Oct 21];106(7):1569–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16502413/>
57. Hong J, Kim SJ, Ahn JS, Song MK, Kim YR, Lee HS, et al. Treatment outcomes of rituximab plus hyper-CVAD in Korean patients with sporadic Burkitt or Burkitt-like lymphoma: Results of a multicenter analysis. *Cancer Res Treat* [Internet]. 2015 [cited 2021 Oct 21];47(2):173–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25544581/>
58. Jain P, Kantarjian HM, Cortes JE, Jabbour EJ, Faderl SH, Wierda WG, et al. Long Term Follow-Up Of De Novo Or Minimally Treated Burkitt Lymphoma/Leukemia (BL/B-ALL) After Frontline Therapy Per The Hyper-CVAD Regimen With Or Without Rituximab: 20-Year Cumulative Experience. *Blood*. 2013 Nov 15;122(21):3917–3917.
59. Mead GM, Barrans SL, Qian W, Walewski J, Radford JA, Wolf M, et al. A prospective clinicopathologic study of dose-modified CODOX-M/IVAC in patients with sporadic Burkitt lymphoma defined using cytogenetic and immunophenotypic criteria (MRCNCRI LY10 trial). *Blood* [Internet]. 2008 Sep 15 [cited 2021 Oct 21];112(6):2248–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18612102/>
60. Barnes JA, LaCasce AS, Feng Y, Toomey CE, Neuberg D, Michaelson JS, et al. Evaluation of the addition of rituximab to CODOX-M/IVAC for Burkitt's lymphoma: A retrospective analysis. *Ann Oncol* [Internet]. 2011 Aug 1 [cited 2021 Oct 21];22(8):1859–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21339382/>
61. Corazzelli G, Frigeri F, Russo F, Frairia C, Arcamone M, Esposito G, et al. RD-CODOX-M/IVAC with rituximab and intrathecal liposomal cytarabine in adult Burkitt lymphoma and “unclassifiable” highly aggressive B-cell lymphoma. *Br J Haematol* [Internet]. 2012 Jan [cited 2021 Oct 21];156(2):234–44. Available from:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22098541/>

62. Tauro S, Cochrane L, Lauritzsen GF, Baker L, Delabie J, Roberts C, et al. Dose-intensified treatment of Burkitt lymphoma and B-cell lymphoma unclassifiable, (with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma) in young adults (<50 years): A comparison of two adapted BFM protocols. *Am J Hematol*. 2010;85(4):261–3.
63. Smeland S, Blystad AK, Kvaløy SO, Ikonomou IM, Delabie J, Kvalheim G, et al. Treatment of Burkitt's/Burkitt-like lymphoma in adolescents and adults: a 20-year experience from the norwegian radium hospital with the use of three successive regimens [Internet]. Vol. 15, *Annals of Oncology*. Ann Oncol; 2004 [cited 2021 Oct 21]. p. 1072–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15205201/>
64. Diviné M, Casassus P, Koscielny S, Bosq J, Sebban C, Le Maignan C, et al. Burkitt lymphoma in adults: A prospective study of 72 patients treated with an adapted pediatric LMB protocol. *Ann Oncol* [Internet]. 2005 [cited 2021 Oct 21];16(12):1928–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16284057/>
65. Ribrag V, Koscielny S, Bosq J, Leguay T, Casasnovas O, Fornecker LM, et al. Rituximab and dose-dense chemotherapy for adults with Burkitt's lymphoma: a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet* [Internet]. 2016 Jun 11 [cited 2021 Oct 21];387(10036):2402–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27080498/>
66. Choi MK, Jun HJ, Lee SY, Kim KH, Lim DH, Kim K, et al. Treatment outcome of adult patients with Burkitt lymphoma: Results using the LMB protocol in Korea. *Ann Hematol* [Internet]. 2009 [cited 2021 Oct 21];88(11):1099–106. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19288103/>
67. Dunleavy K, Pittaluga S, Shovlin M, Steinberg SM, Cole D, Grant C, et al. Low-Intensity Therapy in Adults with Burkitt's Lymphoma. *N Engl J Med*

- [Internet]. 2013 Nov 14 [cited 2021 Oct 21];369(20):1915–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24224624/>
68. Noy A, Lee JY, Cesarman E, Ambinder R, Baiocchi R, Reid E, et al. AMC 048: Modified CODOX-M/IVAC-rituximab is safe and effective for HIV-associated Burkitt lymphoma. *Blood* [Internet]. 2015;126(2):160–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2015-01-623900>
 69. van Imhoff GW, van der Holt B, MacKenzie MA, Ossenkoppele GJ, Wijermans PW, Kramer MHH, et al. Short intensive sequential therapy followed by autologous stem cell transplantation in adult Burkitt, Burkitt-like and lymphoblastic lymphoma. *Leuk* 2005 196 [Internet]. 2005 Mar 31 [cited 2021 Oct 22];19(6):945–52. Available from: <https://www.nature.com/articles/2403733>
 70. Song KW, Barnett MJ, Gascoyne RD, Horsman DE, Forrest DL, Hogge DE, et al. Haematopoietic stem cell transplantation as primary therapy of sporadic adult Burkitt lymphoma. *Br J Haematol*. 2006 Jun;133(6):634–7.
 71. Saleh K, Michot J-M, Camara-Clayette V, Vassetsky Y, Ribrag V. Burkitt and Burkitt-Like Lymphomas: a Systematic Review. *Curr Oncol Reports* 2020 224 [Internet]. 2020 Mar 6 [cited 2021 Oct 25];22(4):1–9. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11912-020-0898-8>
 72. Sweetenham JW, Pearce R, Taghipour G, Biais D, Gisselbrecht C, Goldstone AH. Adult Burkitt's and Burkitt-like non-Hodgkin's lymphoma - Outcome for patients treated with high-dose therapy and autologous stem-cell transplantation in first remission or at relapse: Results from the European group for blood and marrow transplantation. *J Clin Oncol* [Internet]. 1996 [cited 2021 Oct 25];14(9):2465–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8823324/>
 73. Maramattom L V., Hari PN, Burns LJ, Carreras J, Arcese W, Cairo MS, et al. Autologous and Allogeneic Transplantation for Burkitt Lymphoma Outcomes and Changes in Utilization: A Report from the Center for International Blood

- and Marrow Transplant Research. *Biol Blood Marrow Transplant* [Internet]. 2013 Feb [cited 2021 Oct 25];19(2):173–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23200705/>
74. Delmore JE, Issa GC, Lemieux ME, Rahl PB, Shi J, Jacobs HM, et al. BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. *Cell* [Internet]. 2011;146(6):904–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.017>
75. Faivre S, Kroemer G, Raymond E. Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents [Internet]. Vol. 5, *Nature Reviews Drug Discovery*. Nature Publishing Group; 2006 [cited 2021 Nov 20]. p. 671–88. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrd2062>
76. Wang Y, Mikhailova M, Bose S, Pan CX, White RWDV, Ghosh PM. Regulation of androgen receptor transcriptional activity by rapamycin in prostate cancer cell proliferation and survival. *Oncogene* [Internet]. 2008 Nov 27 [cited 2021 Nov 20];27(56):7106–17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18776922/>
77. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci* [Internet]. 2009 Oct 15 [cited 2021 Nov 20];122(20):3589–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19812304/>
78. Perl A. Activation of mTOR (mechanistic target of rapamycin) in rheumatic diseases [Internet]. Vol. 12, *Nature Reviews Rheumatology*. Nat Rev Rheumatol; 2016 [cited 2021 Nov 20]. p. 169–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26698023/>
79. Vanhaesebroeck B, Stephens L, Hawkins P. PI3K signalling: the path to discovery and understanding. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2012 Mar [cited 2021 Nov 20];13(3):195–203. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22358332/>
80. Lamming DW, Ye L, Katajisto P, Goncalves MD, Saitoh M, Stevens DM, et al. Rapamycin-induced insulin resistance is mediated by mTORC2 loss and

- uncoupled from longevity. *Science* (80-) [Internet]. 2012 Mar 30 [cited 2021 Nov 20];335(6076):1638–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22461615/>
81. Yang G, Murashige DS, Humphrey SJ, James DE. A Positive Feedback Loop between Akt and mTORC2 via SIN1 Phosphorylation. *Cell Rep* [Internet]. 2015 [cited 2021 Nov 20];12(6):937–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26235620/>
82. Yee KWL, Zeng Z, Konopleva M, Verstovsek S, Ravandi F, Ferrajoli A, et al. Phase I/II study of the mammalian target of rapamycin inhibitor everolimus (RAD001) in patients with relapsed or refractory hematologic malignancies. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2006 Sep 1 [cited 2021 Nov 20];12(17):5165–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16951235/>
83. Lightfoot YL, Blanco LP, Kaplan MJ. Metabolic abnormalities and oxidative stress in lupus. *Curr Opin Rheumatol* [Internet]. 2017 Sep 1 [cited 2021 Nov 20];29(5):442–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28639951/>
84. Peterson TR, Laplante M, Thoreen CC, Sancak Y, Kang SA, Kuehl WM, et al. DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell* [Internet]. 2009 May 29 [cited 2021 Nov 20];137(5):873–86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19446321/>
85. Hara K, Maruki Y, Long X, Yoshino K ichi, Oshiro N, Hidayat S, et al. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* [Internet]. 2002 Jul 26 [cited 2021 Nov 20];110(2):177–89. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12150926/>
86. Haar E Vander, Lee S il, Bandhakavi S, Griffin TJ, Kim DH. Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2007 Mar [cited 2021 Nov 20];9(3):316–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17277771/>
87. Sancak Y, Thoreen CC, Peterson TR, Lindquist RA, Kang SA, Spooner E, et

- al. PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol Cell* [Internet]. 2007 Mar 23 [cited 2021 Nov 20];25(6):903–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17386266/>
88. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* [Internet]. 2012 Apr 13 [cited 2021 Nov 21];149(2):274–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22500797/>
89. Frias MA, Thoreen CC, Jaffe JD, Schroder W, Sculley T, Carr SA, et al. mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s. *Curr Biol* [Internet]. 2006 Sep 19 [cited 2021 Nov 20];16(18):1865–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16919458/>
90. Guertin DA, Stevens DM, Thoreen CC, Burds AA, Kalaany NY, Moffat J, et al. Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. *Dev Cell* [Internet]. 2006 Dec [cited 2021 Nov 20];11(6):859–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17141160/>
91. Pearce LR, Sommer EM, Sakamoto K, Wullschleger S, Alessi DR. Protor-1 is required for efficient mTORC2-mediated activation of SGK1 in the kidney. *Biochem J* [Internet]. 2011 May 15 [cited 2021 Nov 21];436(1):169–79. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21413931/>
92. Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF, et al. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell* [Internet]. 2006 Apr 21 [cited 2021 Nov 21];22(2):159–68. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16603397/>
93. Gümüş ZZ, Soypaçacı Z, Akar S. mTOR pathway and its role in rheumatologic diseases. *Ulus Romatoloji Derg*. 2019;11(2):132–56.
94. Biesalski HK. Polyphenols and inflammation: basic interactions. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* [Internet]. 2007 Nov [cited 2021 Nov 23];10(6):724–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18089954/>

95. Khan K, Quispe C, Javed Z, Iqbal MJ, Sadia H, Raza S, et al. Resveratrol, curcumin, paclitaxel and miRNAs mediated regulation of PI3K/Akt/mTOR pathway: go four better to treat bladder cancer. *Cancer Cell Int* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2021 Nov 23];20(1). Available from: [/pmc/articles/PMC7685642/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34111111/)
96. Wu ML, Li H, Yu LJ, Chen XY, Kong QY, Song X, et al. Short-term resveratrol exposure causes in vitro and in vivo growth inhibition and apoptosis of bladder cancer cells. *PLoS One* [Internet]. 2014 Feb 25 [cited 2021 Nov 23];9(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24587049/>
97. Feng Y, Chen X, Cassady K, Zou Z, Yang S, Wang Z, et al. The Role of mTOR Inhibitors in Hematologic Disease: From Bench to Bedside. *Front Oncol*. 2021 Jan 8;10:3043.
98. Witzig TE, Geyer SM, Ghobrial I, Inwards DJ, Fonseca R, Kurtin P, et al. Phase II trial of single-agent temsirolimus (CCI-779) for relapsed mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2005 Sep 21;23(23):5347–56.
99. Ansell SM, Inwards DJ, Jr KMR, Flynn J, Morton RF, Jr DFM, et al. NIH Public Access. 2013;113(3):3–11.
100. Tessoulin B, Bouabdallah K, Burroni B, Lamy T, Gressin R, Cartron G, et al. Safety and efficacy of temsirolimus in combination with three different immuno-chemotherapy regimens in relapse and refractory mantle cell lymphoma, final results of the T3 phase IB trial of the LYSA. *Ann Hematol*. 2020;99(8):1771–8.
101. Fenske TS, Shah NM, Kim KM, Saha S, Zhang C, Baim AE, et al. A phase 2 study of weekly temsirolimus and bortezomib for relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma: A Wisconsin Oncology Network study. *Cancer* [Internet]. 2015 Oct 1 [cited 2021 Nov 21];121(19):3465–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26079295/>
102. Conconi A, Raderer M, Franceschetti S, Devizzi L, Ferreri AJM, Magagnoli

- M, et al. Clinical activity of everolimus in relapsed/refractory marginal zone B-cell lymphomas: Results of a phase II study of the International Extranodal Lymphoma Study Group. *Br J Haematol*. 2014;166(1):69–76.
103. Smith SM, Van Besien K, Karrison T, Dancey J, McLaughlin P, Younes A, et al. Temsirolimus has activity in non-mantle cell non-Hodgkin's lymphoma subtypes: The University of Chicago phase II consortium. *J Clin Oncol*. 2010;28(31):4740–6.
104. Ippolito T, Mavis C, Gu J, Hernandez-Ilizaliturri FJ, Barth MJ. Omipalisib (GSK458), a Dual an-PI3K/mTOR Inhibitor, Exhibits in Vitro and In Vivo activity in Chemotherapy-Sensitive and -Resistant Models of Burkitt Lymphoma. *Blood*. 2018 Nov 29;132(Supplement 1):2951–2951.
105. Li C, Xin P, Xiao H, Zheng Y, Huang Y, Zhu X. The dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 inhibits proliferation and induces apoptosis of burkitt lymphoma cells. *Cancer Cell Int* [Internet]. 2015 Jun 24 [cited 2021 Nov 21];15(1):1–9. Available from: <https://cancer-ci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12935-015-0213-1>
106. Bhatti M, Ippolito T, Mavis C, Gu J, Cairo MS, Lim MS, et al. Pre-clinical activity of targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in Burkitt lymphoma. *Oncotarget* [Internet]. 2018 Apr 24 [cited 2021 Nov 21];9(31):21820–30. Available from: [/pmc/articles/PMC5955151/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30455151/)
107. Kahl BS, Spurgeon SE, Furman RR, Flinn IW, Coutre SE, Brown JR, et al. A phase 1 study of the PI3K δ inhibitor idelalisib in patients with relapsed/refractory mantle cell lymphoma (MCL). *Blood* [Internet]. 2014 May 29 [cited 2021 Nov 23];123(22):3398–405. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24615778/>
108. Flinn IW, Kahl BS, Leonard JP, Furman RR, Brown JR, Byrd JC, et al. Idelalisib, a selective inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase- δ , as therapy for previously treated indolent non-Hodgkin lymphoma. *Blood* [Internet]. 2014 May 29 [cited 2021 Nov 23];123(22):3406–13. Available from:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24615776/>

109. Brown JR, Byrd JC, Coutre SE, Benson DM, Flinn IW, Wagner-Johnston ND, et al. Idelalisib, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase p110 δ , for relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood* [Internet]. 2014 May 29 [cited 2021 Nov 23];123(22):3390–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24615777/>
110. Gopal AK, Kahl BS, de Vos S, Wagner-Johnston ND, Schuster SJ, Jurczak WJ, et al. PI3K δ inhibition by idelalisib in patients with relapsed indolent lymphoma. *N Engl J Med* [Internet]. 2014 Mar 13 [cited 2021 Nov 23];370(11):1008–18. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24450858/>
111. Furman RR, Sharman JP, Coutre SE, Cheson BD, Pagel JM, Hillmen P, et al. Idelalisib and Rituximab in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* [Internet]. 2014 Mar 13 [cited 2021 Nov 23];370(11):997. Available from: </pmc/articles/PMC4161365/>

