Kurkumin, Kuersetin ve Kurkumin-Kuersetin Kombinasyonunun Kronik Myeloid Lösemi Hücreleri ile Normal Mononükleer Hücre Hatlarında Apoptotik Etkilerinin ve Sinyal İleti Yolakları ile İlişkisinin Araştırılması

Program Kodu: 1002

Proje No: 215S184

Proje Yürütücüsü:

Prof. Dr. A. Suha Yalçın

Projede Görev Alan Araştırıcı:

Prof. Dr. Semra Koçtürk

OCAK 2017

İSTANBUL

ÖNSÖZ

TÜBİTAK ARDEB tarafından, 01.07.2015 - 01.03.2016 tarihleri arasında 29.998,00 TL bütçe ile desteklenmiş olan "Kurkumin, Kuersetin ve Kurkumin-Kuersetin Kombinasyonunun Kronik Myeloid Lösemi Hücreleri ile Normal Mononükleer Hücre Hatlarında Apoptotik Etkilerinin ve Sinyal İleti Yolakları ile İlişkisinin Araştırılması" başlıklı projemiz tamamlanmıştır.

Projenin TÜBİTAK tarafından desteklenmesi sayesinde KML hücrelerinde kurkumin-kuersetin kombinasyonundan etkilenen sinyal ileti yolaklarıyla ilgili kapsamlı bir gen ekspresyonu analizi yapılabilmiştir. Projemizde Prof. Dr. A. Suha Yalçın yürütücü, Prof. Dr. Semra Koçtürk araştırıcı olarak yer almışlardır. Ayrıca Dr. Ergül Mutlu Altundağ ile Dr. Ayşe Mine Yılmaz yardımcı araştırıcı olarak projedeki deneyleri başarıyla yürütmüş ve tamamlamışlardır.

Proje ekibi olarak verdiği destekten dolayı TÜBİTAK'a içtenlikle teşekkür ederiz.

İÇİNDEKİLER

1. ÖZET

2. ABSTRACT

3. GİRİŞ 1

4. LİTERATÜR ÖZETİ 2

5. GEREÇ VE YÖNTEM 6

5.1 Hücre hattı temini ve hücre kültürü 6

5.2 Deney grupları 6

5.3 Akım sitometrisi ile apoptoz tayini 7

5.4 Sinyal ileti yolaklarının analizi 7

5.4.1 RNA izolasyonu 8

5.4.2 cDNA sentezi 8

5.4.3 Polimeraz zincir reaksiyonu 9

5.4.4 Sonuçların analizi 9

6. BULGULAR 11

6.1 Normal mononükleer hücre apoptoz sonuçları 11

6.2 RT2 sinyal ileti yolakları gen ekspresyonu 11

6.2.1 TGF- beta yolağı 16

6.2.2 WNT yolağı 17

6.2.3 NF-KB yolağı 18

6.2.4 JACK/STAT yolağı 18

6.2.5 P53 yolağı 19

6.2.6 NOTCH yolağı 19

6.2.7 Hedgehog yolağı 20

6.2.8 PPAR yolağı 20

6.2.9 Oksidatif stres 21

6.2.10 Hipoksi 21

7. TARTIŞMA/SONUÇ 23
7.1 TGF-beta yolağı 23
7.2 WNT yolağı 23
7.3 NF-KB yolağı 24
7.4 JAK/STAT yolağı 24
7.5 P53 yolağı 24
7.6 NOTCH yolağı 25
7.7 Hedgehog yolağı 25
7.8 PPAR yolağı 26
7.9 Oksidatif stres 26
7.10 Hipoksi 26
7.11 Sonuç 27

8. KAYNAKLAR 28

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Gen amplifikasyon eğrisi örnek gösterimi (β-Aktin) 11

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Analizi yapılan yolaklar ve genler 10

Tablo 2. İncelenen genlerin adları ile UniGene ve Gen Bank erişim numaraları 12

Tablo 3. Normal mononükleer hücrelerde farklı sinyal ileti yolakları ile ilişkili genlerin mRNA ekspresyonu üzerine kurkumin, kuersetin ve kombinasyon uygulamasının etkileri 14

Tablo 4. K562 hücrelerinde farklı sinyal ileti yolakları ile ilişkili genlerin mRNA ekspresyonu üzerine kurkumin, kuersetin ve kombinasyon uygulamasının etkileri 15

1. ÖZET

Kurkuminin birçok sinyal yolağını baskılayarak kanser hücre proliferasyonunu, anjiogenezi, metastazı, invazyonu ve inhibe ettiği bilinmektedir. Kurkumin ile kuersetinin birlikte kombinasyonunun kronik myeloid lösemi hücrelerinde apoptotik etkisini arttırdığını gösterdiğimiz tez çalışması bu projenin dayanağını oluşturmuştur. Bu projedeki amacımız RT-PCR array analizi ve kanser hücrelerinde etkin olan yolaklardan oluşmuş bir gen paneli kullanımı ile hangi sinyal ileti yolaklarının etkilendiğini kapsamlı bir şekilde değerlendirmek olarak belirlenmiş, bunun yanısıra normal mononükleer hücre hattı kullanılarak kombinasyonun normal hücreler üzerindeki etkisinin saptanması hedeflenmiştir. Kontrol hücreleri ile paralel olarak gerçekleştirdiğimiz çalışmamızda; kurkumin-kuersetin kombinasyon uygulamasının K562 hücrelerinin büyüme, canlılık ve ilaç direncine katkıda bulunan bir çok gen ekspresyonu üzerinde baskılayıcı etkisi olduğu gözlendi. Bunun yanında, bu hücrelerin proliferasyonunu ve canlılığını sağlayan pek çok genin normal hücrelerde anlamlı değişim oluşturmadığı saptandı. Bulgularımız kurkumin-kuersetin kombinasyonunun özellikle p53, hücre döngüsü ve hücre canlılığı ile ilişkili genler üzerinde etkili olduğunu göstermekte ve önceki verilerimizi desteklemektedir. Elde ettiğimiz sonuçların bu alanda yapılacak yeni araştırmalara ışık tutacağını ve ölüm oranı yüksek bir kanser türü olan kronik myeloid lösemi için etkin tedavi yöntemlerinin oluşturulmasına katkı yapacağını düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler:
Kronik myeloid lösemi (KML), kuersetin, kurkumin, apoptoz, sinyal ileti

2. ABSTRACT

Curcumin is known to suppress multiple signal transduction pathways and inhibit angiogenesis, metastasis, invasion and cancer cell proliferation. In our previous study we have shown that curcumin-quercetin combination had increased apoptotic effects. Our aim in this project was to identify the signal pathways involved in the cancer cells using RT-PCR array anaysis. Additionally we have determined the effect of combination on normal mononuclear cells. In this study, we have determined inhibitory effects of curcumin-quercetin combination on expression of many genes related to cell growth, viability and drug resistance in K562 cells. In addition no significant effect was observed in genes related to proliferation and viability of normal mononuclear cells. Our findings support previous results and Show that curcumin-quercetin combination was effective on genes that were particularly related to p53, cell cycle and cell viability. We believe that our findings will lead to new research in this area and will contribute to the chronic myeloid leukemia treatment protocols.

Keywords:

Chronic myeloid leukemia (CML), quercetin, curcumin, apoptosis, signal transduction

3. GİRİŞ

Kanser tedavisinde ilaç kombinasyon çalışmaları yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu tür çalışmaların hedefi hem sinerjik etki için uygun dozları belirlemek, hem de ilaçların dozunu azaltarak toksisiteyi ortadan kaldırmaktır. Kurkumin zerdeçal (*Curcuma longa*) kaynaklı bir polifenoldür. Kurkuminin çeşitli kanser hücrelerinin proliferasyonunu baskılamasının yanında kanser gelişimiyle ilgili anjiogenez, metastaz ve invazyon gibi olayları da inhibe ettiği bilinmektedir. Ancak kurkuminin biyoyararlanımının düşük olması (< %2) klinik uygulama potansiyelini sınırlamaktadır. Öte yandan, bir başka bitkisel kaynaklı polifenol olan kuersetinin de anti-kanser ve anti-inflamatuvar aktivitelere sahip olduğu çok sayıda araştırıcı tarafından bildirilmiştir.

Projemizin dayanağı olan ön çalışmada kuersetin ile kurkuminin hem tek başlarına, hem de kurkumin-kuersetin kombinasyonu şeklinde kronik myeloid lösemi (K562) hücrelerini apoptoza sürüklediğini göstermiş bulunmaktayız. Bu projede ise, kronik myeloid lösemi hücrelerinde kuersetin ile kurkuminin hücre içi sinyal ileti yolaklarında hangi genlerin ekspresyonlarında değişimlere neden olduğunu ortaya çıkarmayı amaçladık. Elde ettiğimiz sonuçların bu alanda yapılacak yeni araştırmalara ışık tutacağını ve ölüm oranı yüksek bir kanser türü olan kronik myeloid lösemi (KML) için etkin tedavi yöntemlerinin oluşturulmasına katkı yapacağını düşünmekteyiz.

4. LİTERATÜR ÖZETİ

Kanser sağlıklı ve normal yaşamı olan hücrelerde çevresel veya genetik faktörlerin etkisiyle nükleer ya da sitoplazmik onkogenlerin aktifleşmesi, transkripsiyonu düzenleyen sinyal moleküllerinin etkilenmesi, tümör baskılayıcı genlerinin aktivitesinin durdurulması gibi mekanizmalar sonucu kontrol dışı hücre çoğalmasıyla oluşmaktadır.

Kanserler, hematolojik ve solid doku kanserleri olmak üzere iki grup altında incelenirler. Hematolojik kanserlerden lösemide hematopoetik kök hücrelerinin farklılaşma durumuna göre KML (Kronik myeloid lösemi), AML (Akut myeloid lösemi), KLL (Kronik lenfositik lösemi), ALL (Akut lenfositik lösemi) gibi alt gruplar mevcuttur (Pokharel 2012). KML, diferansiyasyonun her basamağındaki myeloid elemanların proliferasyonu (apoptozun azalması ile birlikte) ve adhezif özelliklerinin kaybı ile karakterize klonal bir hematopoetik kök hücre malignitesidir. K562 hücre soyu, ilk kez 1975 yılında Lozzio ve arkadaşları tarafından, KML hastalarının terminal blastik kriz evresinde, plevral sıvılarından izole edilerek hazırlanmış bir lösemik hücre soyudur. Eritroid farklılaşma, oksidatif stres ve glutatyon sisteminin araştırılması ve anti-kanser tedavilerinin geliştirilmesi ile ilgili çalışmalarda sıklıkla tercih edilmektedir (Assaf vd., 2003).

Kanserin tüm dünyada giderek yaygınlaşmakta olduğu bilinmektedir. Kanser tedavisinde kemoterapi, hormon takviyeleri, cerrahi işlemler, radyasyon tedavisi, tamamlayıcı veya alternatif tıp uygulamaları tek başına veya birlikte kullanılmaktadır. Hormon takviyelerine veya alternatif tıp uygulamalarıyla kombinasyon tedavilerine maruz kalan hastalar, ilaç-ilaç etkileşimlerinin ön planda olduğu riskler ile karşı karşıya gelmektedir (Fantini vd., 2015). Son zamanlarda kullanımı giderek yaygınlaşan bitkisel ilaçlar ve ekstreler bir arada kullanıldıklarında terapötik etkiyi artırır (sinerjik etki) ya da azaltırlar (antagonist etki). Bu açıdan, polifenol karışımlarının birlikte kullanıldıklarında yaratacakları etkinin belirlenmesi önemlidir ve belirlenen bu etki sayesinde tedavi edilecek kanser türüne uygun polifenol karışımları geliştirilmiş olacaktır. Kronik myeloid lösemi hücreleri üzerinde yapılan çok sayıda çalışmada yapıları birbirinden farklı polifenolün (kuersetin, kurkumin, kaempferol, galangin, mirisetin, apigenin, akasetin, krisin, luteolin vb.) anti-lösemik etkilerine bakılmış olup polifenollerin farklı kombinasyonları üzerinde çalışmalar yaygınlaşmaktadır (Murtala vd., 2014).

Flavonoidlerin çok farklı biyolojik etkileri vardır. İnsan diyetinde bulunan başlıca flavonoid olan kuersetin (3,3,4,5,7-pentahidroksiflavon) suda eser miktarda çözülebilen flavonoidlerden

olup yenilebilir meyve ve sebzeler dahil bir çok bitkide bulunmaktadır. Kırmızı şarap, greyfurt, soğan, elma, siyah çay ile az miktarda yapraklı yeşil sebzelerde ve fasulyede bulunur (Morand vd., 1998; Hollman vd., 1997). En önemli görevi metabolizmayı hızlandırmaktır. Bağışıklık hücrelerinde histaminin açığa çıkışının engellenmesine yardımcı olur. Antioksidan, antikarsinojenik, anti-inflamatuvar, antiplatelet ve vazodilatatör etkileri de bildirilmiştir (Lamson vd., 2000).

Kuersetin kaynaklı anti-kanser etki mekanizmaları şunlardır:

- mutant p53 protein ekspresyonunu baskılama
- hücrelerin G1 fazında tutulması
- tirozin kinaz inhibisyonu
- östrojen reseptörüne bağlanma
- ras proteinlerinin ekspresyonunun baskılanması
- birçok kanser hücre hattında (meme, lösemi, lenfoma, kolon kanseri, pankreas, prostat) ısı şok proteinleri yapımının baskılanması

Birçok çalışmada kuersetinin önemli oranda büyümeyi baskıladığı tespit edilmiştir. Normal hücrelerle karşılaştırıldığında kanser hücrelerinin temel özelliği sürekli bir oksidatif stres durumunda olmalarıdır. Bu yüzden kanser hücrelerinde reaktif oksijen türleri (ROT) seviyesi normal hücrelerden daha yüksektir. Reaktif oksijen türleri onkogenlerin aktivasyonu ve p53'ün kaybı sonucu sürekli oluşmaktadır. ROT hücre göçünün ve invazyonun yanı sıra hücre büyümesi ile proliferasyonu da uyarabilir. Yüksek ROT seviyeleri kanser hücrelerinde hücresel canlılığı korumakta, ancak ROT seviyelerinin aşırı yükselmesi de kanser hücrelerini yok etmektedir. Kuersetin uygulandığında semikinonlar ve kinonlar aracılığıyla hücre içerisinde pro-oksidan etki oluşur. Bu bileşikler glutatyon ile reaksiyona girerek azalmasına neden olur (Gibellini vd., 2010).

Kang ve Liang (1997) tarafından, kuersetin'in 10 ve 80 µM'lik dozlarda HL-60 hücrelerini doz bağımlı olarak engellediği gösterilmiştir. Ayrıca HL-60 hücrelerinde membran tirozin protein kinazı (TPK) ve sitosolik bir protein kinaz C (PKC) aktivitesini bir ölçüde inhibe ettiği bulunmuştur. Tüm bu bilgiler göz önüne alındığında kuersetinin lösemi hücrelerinde etkilediği sinyal yolaklarının ayrıntılı bir biçimde belirlenmesi önem kazanmaktadır. Csokay ve arkadaşları (1997), K562 insan lösemi hücrelerinde kuersetinin antiproliferatif etkisini ve kuersetin kaynaklı apoptozu bildirdiler. Kuersetinin, lösemi hücrelerinde apoptozun uyarılmasının yanı sıra hücre büyümesi, proliferasyonu ve hücre döngüsü üzerine etkileri

bulunmaktadır. Bu sayede kanser önleyici, yeni bir ajan olarak kemoterapide kullanılmasının faydalı olabileceği düşünülmektedir.

Polifenollerin antioksidan etkilerinin yanısıra pro-oksidan etkilerinin de olduğu gösterilmiştir (Murzakhmetova 2008). Örneğin kuersetinin kendi hidroksil grupları sayesinde hücre içinde süperoksit radikali oluşturduğu, malign hücrelerde proliferasyonu inhibe ettiği ve apoptoza sürüklediği gösterilmiştir (Sakao vd., 2009). Kuersetinin birçok genin ekspresyonu üzerine etkisi olduğu ve nörodejenerasyon, kalp-damar hastalıkları, kanser gibi hastalıklara karşı koruyucu etki gösterdiği de rapor edilmiştir (Bischoff 2008).

Öte yandan, halk arasında çeşitli inflamatuar koşullar ve diğer hastalıkların tedavisi için kurkumin içeren bir baharat olan zerdeçal yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Hindistan ve Çin tıp sisteminde yüzyıllardan beri denenmiş ve iyileştirici özellikleri kanıtlanmıştır (Ammon ve Wahl 1991).

Epidemiyolojik gözlemlerin yetersizliğine rağmen, zerdeçal tüketiminin bazı kanser türlerinin riskini azalttığı bilinmektedir. Zerdeçalın koruyucu biyolojik etkilerinin başlıca bileşeni olan kurkuminden kaynaklandığı düşünülmektedir. Kurkuminin anti-inflamatuar (Holder 1978), antioksidan (Sharma 1976; Toda 1985), yara iyileştirici (Sidhu 1998), antikanser (Kuttan 1985) ve antimikrobiyal (Negi 1999) aktivite gibi geniş bir farmakolojik kapasiteye sahip olduğu bilinmektedir. Yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar tümör ilerlemesi, anjiogenez ve tümör büyümesi gibi üç evrede de kanseri engellediğini göstermiştir. Kurkuminin önemli bir özelliği Asya ülkelerinde yüzyıllardan beri kullanılmasına rağmen herhangi bir toksik etkisinin tespit edilmemiş olmasıdır (Ammon ve Wahl 1991). Günümüzde kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ilaçların toksik etkileri ve yüksek maliyetinden dolayı bu dezavantajları barındırmayan tedavi yaklaşımları için araştırmalar yoğun bir şekilde sürmektedir.

Projemize kaynak oluşturan ve Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (SAG-C-DRP-120613-0248) olarak desteklenen çalışmanın verilerine göre, K562 hücrelerine kuersetin ve kurkuminin farklı dozlarda uygulanması hücre canlılığını azaltmaktadır (Mutlu Altundağ 2016). Bu verilerle, kuersetin ve kurkumin için Calcusyn (Biosoft) programıyla doz-etki eğrisi çizilerek sinerjik etkiyi gösteren kombine dozlar belirlenmiştir. Kuersetin ve kurkumin için IC50 değerleri sırasıyla 84.02 µM ve 21.43 µM olarak bulunmuştur. Calcusyn programı (Chou 1991) ile yapılan değerlendirmede de kuersetin ve kurkumin için kombinasyon IC50 değerleri sırasıyla 11.39 µM ve 2.84 µM olarak ve bu değerler kullanılarak

48 saat sonrası apoptoz düzeyleri ölçülmüştür. Kuersetin ve kurkuminin IC_{50} dozları 7 kat azalırken belirgin bir apoptoz artışı gözlenmiştir (Mutlu Altundağ 2016).

Son yıllarda kurkuminin kansere karşı tedavi edici bir potansiyeli olduğu ve anti-inflamatuar bir ajan olarak kullanılabileceği vurgulanmaktadır. Kurkuminin tümor proliferasyonu, metastazı ve transformasyonu üzerine etki yaptığı da gösterilmiştir. Bu etkiler çeşitli transkripsiyon faktörleri, büyüme faktörleri, inflamatuar sitokinler, kinazlar ve diğer enzimlerin düzenlenmesi yoluyla gerçekleşmektedir. Birçok tümör hücresinin büyümesini baskıladığı ve karsinogenezde rol alan birçok transkripsiyon faktörünün ekspresyonunu baskıladığı da gözlemlenmiştir (Mukhopadhyay 2002). Baskılanan başlıca proteinler nükleer faktör kappa β (NF-κB), aktivatör protein 1 (AP-1), Nrf-2 gibi transkripsiyon faktörleridir (Aggarwal 2003). Kurkuminin antikanser etkisi ile ilgili moleküler hedefleri konu alan çalışmalar da vardır (Reuter 2008; Strimpakos ve Sharma 2008). Bu çalışmalarda, akut myeloid lösemi (AML) hücrelerinde MDR1 ve WT1 gen ekspresyonunu inhibe edici etkisinin olduğu (Anuchapreeda 2006) ve insan monositik lösemi (THP-1) hücrelerinde MAPK / AP1 yollarının aktivasyonunu sağlayarak apoptoza neden olduğu gösterilmiştir (Chu-Wen 2012).

Önceki çalışmamızdan elde edilen veriler her iki polifenolün kombinasyonu ile K562 hücrelerinde apoptozun tetiklendiğini göstermektedir. Bu proje ile hem apoptotik etkinin hangi sinyal ileti yolakları aracılığı ile oluştuğunun saptanması hem de polifenollerin kullandıkları yolakların farklı olup olmadığının belirlenmesi hedeflenmiştir. Polifenollerin etkilediği sinyal ileti yolakları ile ilgili literatür bilgileri incelendiğinde her polifenolün farklı kanser hücrelerinde farklı yolakları etkilediği ve/veya birbiri ile çapraz etkileşimde olduğu görülmektedir. Bu nedenle çalışmamızda sıklıkla etkilenen sinyal ileti yolaklarının gen ekspresyonunun incelenmesini sağlayan "*Human Signal Transduction Pathway Finder - RT^2 PCR Array"* sistemi kullanılarak kanser ve stres ile ilişkili 10 sinyal yolağını kapsayan hedef genlerin ekspresyonları araştırılmıştır.

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1 Hücre Hattı Temini ve Hücre Kültürü

Normal mononükleer hücre (NMH) hattı (ATCC® PCS-800-013™) ve kronik myeloid lösemi hücre (KML) hattı (ATCC, CCL-243) ticari olarak temin edildi. Hücreler %10 FBS, 2mM L-glutamin, 100 U/mL penisilin, 100 µg/ml streptomisin içeren RPMI-1640 besiyerinde 37°C'de %5 CO_2 içeren ortamda çoğaltıldı.

5.2 Deney Grupları

1. KML kontrol grubu (KML-K): KML hücrelerine polifenol içermeyen çözücü ortam ilave edildi.
2. KML kuersetin grubu (KML-Q): KML hücrelerine önceki çalışmalarımızdan elde edilen verilere göre IC_{50} (84.02 µM) dozunda kuersetin uygulandı, 48 saat inkübe edildi.
3. KML kurkumin grubu (KML-C): KML hücrelerine önceki çalışmalarımız sonucunda elde edilen verilere göre IC_{50} (21.43 µM) dozunda kurkumin uygulandı,48 saat inkübe edildi.
4. KML kombinasyon grubu (KML-Q+C): KML hücre hatlarına önceki çalışmalarımız sonucunda elde edilen verilere göre kuersetin (11.39 µM) ve kurkumin (2.84 µM) birlikte uygulandı, 48 saat inkübe edildi.
5. NMH kontrol grubu (NMH-K): Normal mononükleer hücrelere polifenol içermeyen çözücü ortam ilave edildi.
6. NMH kuersetin grubu (NMH-Q): Normal mononükleer hücrelere önceki çalışmalarımız sonucunda elde edilen verilere göre IC_{50} (84.02 µM) dozunda kuersetin uygulandı, 48 saat inkübe edildi.
7. NMH kurkumin grubu (NMH-C): Normal mononükleer hücrelere önceki çalışmalarımız sonucunda elde edilen verilere göre IC_{50} (21.43 µM) dozunda kurkumin uygulandı, 48 saat inkübe edildi.
8. NMH kombinasyon grubu (NMH-Q+C): Normal mononükleer hücrelere önceki çalışmalarımız sonucunda elde edilen verilere göre kuersetin (11.39 µM) ve kurkumin (2.84 µM) birlikte uygulandı, 48 saat inkübe edildi.

5.3 Akım Sitometrisi ile Apoptoz Tayini

Normal mononükleer hücre hattı hücreleri 6 kuyucuklu plaklara ekildikten sonra belirlenen dozlarda ajanlar ile muamele edilen hücreler FACS tüplerine toplandı, 2 kez soğuk PBS ile yıkandı; 1 x binding buffer ile sayısı 1.10^6 /ml olacak şekilde resüspanse edilerek 5µl Annexin V, 5µl PI eklendikten sonra oda ısısında karanlıkta inkübe edildi. Daha sonra hücreler akım sitometrisinde analiz edildi. Canlı, erken apoptoz, geç apoptoz ve nekrotik hücre oranları sayısal olarak belirlendi, her doz 3 tekrarlı yapıldı.

5.4 Sinyal İleti Yolaklarının Analizi

Kuersetin ile kurkuminin ayrı ayrı ve birlikte kullanımının, KML ve NMH hatlarında farklı sinyal ileti yolaklarındaki gen ifade düzeylerine etkilerini saptamak için, mRNA ekspresyonları qRT-PCR (*Quantitative* Real Time-Polymerase Chain Reaction) yöntemi ile kantite edildi. Bu amaçla, 6 kuyucuklu plaklardaki hücreler ajanlarla muamele edildikten 48 saat sonra total RNA örnek hazırlama reaktifi (iScript™, BioRad) ile izole edildi. RNA konsantrasyonu ve saflığı NanoDrop™ cihazının yardımıyla belirlendi. Elde edilen RNA'lardan cDNA sentezi de kit (iScript™, BioRad) kullanılarak gerçekleştirildi. cDNA sentezi için 2 µg toplam RNA ve 1 µl oligo (dT) primeri karıştırıldıktan sonra, son hacim 11 µl olacak şekilde RNAaz içermeyen su ile tamamlandı. Bu karışım 70 ºC'de 5 dakika inkübe edildikten sonra, üzerine 4 µl 5X reaksiyon tamponu (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 250 mM KCl, 20 mM $MgCl_2$ ve 50 mM DDT) ve 2 µl dNTP karışımı eklendi. Beş dakika süreyle, 37°C'de inkübasyondan sonra 50 ünite Revers Transkriptaz eklenerek son hacim 20 µl tamamlandı. Sentezlenen cDNA'lar, kantitatif RT^2-PCR yapmak üzere -20°C'de muhafaza edildi.

Deney gruplarından elde edilen cDNA'lar -20°C de soğuk zincir ile Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya anabilim dalına ulaştırıldı ve DEÜ alt yapısında bulunan CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) kullanılarak analiz edildi. Elde edilen veriler sistem içinde bulunan program aracılığı ile değerlendirildi. Gen ekspresyonlarındaki değişim spesifik mRNA ekspresyonlarının house-keeping genlerinin (ACTB-beta aktin, B2M-beta 2 mikroglobülin, GUSB-glukoronidaz beta, HPRT1-hipoksantinfosforiboziltransferaz-1, PGK-fosfogliserat kinaz, PPIA-peptidilprolil izomeraz A) mRNA ekspresyonuna oranlanmasıyla bulundu.

5.4.1 RNA izolasyonu

- Hücreler inkübasyon süresi dolduğunda tripsinize edilerek toplandı ve 1 x 10^6 hücre/ml olacak şekilde PBS ile resüspanse edildi. Maksimum 1 x 10^5 hücre olacak şekilde ayrı bir mikrosantrifüj tüpüne ayrıldı.
- Hücreler 2,000 x g, +4°C de santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre pelletine zarar vermeksizin 5 µL'den fazla PBS kalıntısı bırakılmamasına özen gösterildi.
- Bu aşamadan sonra her bir örnek için (pellet) RNA stabilizasyonunu ve genomik DNA'nın uzaklaştırılmasını sağlayan ve örneklerden RNA saflaştırma aşamasını ortadan kaldıran RT-qPCR örnek hazırlama reaktifi (iScript™, Bio-Rad) ile tüm örnekler RT-qPCR analizine hazır hale getirildi.
- Bu amaçla örnek hazırlama reaktifi her bir pellet üzerine 100 µl olarak eklendi ve örnekler orta ayarda (6-10) 30 saniye vortekslendi.
- Elde edilen RNA izolasyonu sağlanmış ve genomik DNA'sı uzaklaştırılmış örnekler 15,000 x g de 2 dakikada santrifüj edildi ve süpernatantlar pellete bulaştırılmadan dikkatlice toplandı.
- Süpernatant buz üzerine alınarak reverse-transkripsiyon reaksiyonuna devam edildi.

5.4.2 cDNA sentezi

- RT-PCR için reverse transkripsiyon süper karışımı (iScript™, Bio-Rad) kullanılarak elde edilen RNA örnekleri üreticinin talimatlarına göre cDNA sentez işlemi gerçekleştirildi. Aşağıda sıralanan reaktifler kullanılarak cDNA sentez reaksiyonu karışımı oluşturuldu. cDNA sentezinin kontrolü, β-aktin *house-keeping* geni ile gerçek zamanlı PCR ile gerçekleştirildi.

Kullanılan reaktifler ve hacimleri

5x iScript reverse transcription supermix	4 µL
RNA template (1 µg-1 pg total RNA)	5 µL
DNaz/RNaz içermeyen dH_2O	10 µL
Reverse transcriptase	1 µL
Total hacim	20 µL

5.4.3 Polimeraz zincir reaksiyonu

- Forward ve Reverse Primerlerin hazırlanışı: Liyofilize olarak elimize ulaşan gen seti primerleri üreticinin talimatlarına göre 40 µL nükleaz içermeyen su ile çözüldüğünde 10 µM stok elde edildi. 10 µL primer + 90 µL nükleaz bulunmayan su kullanılarak 1 µM konsantrasyonda bir plate olarak hazırlandı. Günlük kullanımda +4 °C'de sonrası için -20 °C'de saklandı.
- Reaksiyon Karışımı Hazırlığı:

Bileşen		Son Konsantrasyon
SYBR® Green Supermix (2 x)	5 µL	1 x
Forward ve reverse primerler	1 µL	250-500 nm
Template (cDNA)	Değişken	cDNA: 100 ng -100 fg genomik DNA: 50 ng -5 pg
Nükleaz içermeyen H_2O	Değişken	-
Toplam hacim	10 µL	

- Termal Döngü Programı:
  Polimeraz aktivasyonu ve DNA denatürasyonu için 95°C'de 3 dk,
  Amplifikasyon aşamasında ön denatürasyon işlemi için 95°C'de 10 s,
  Annealing/Uzama + Plak Okunması için 58°C'de 45 s
  Döngü sayısı 45 olarak belirlendi. Erime Eğrisi analizi için de 65°C - 95°C aralığında 0.5°C'lik sıcaklık değişim bilgileri cihazda kayıtlı programa yüklenerek işlemler gerçekleştirildi.

5.4.4 Sonuçların analizi

- Her bir örneğe ait hedef genin gen ekspresyonu, eşlenik *house-keeping* (ACTB-beta aktin, B2M-beta 2 mikroglobülin, GUSB-glukuronidaz beta, HPRT1-hipoksantinfosforiboziltransferaz-1, PGK-fosfogliserat kinaz, PPIA-peptidilprolil izomeraz A) gen ekspresyonuna oranlanarak normalize edildi ve $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile de "Rölatif Kantitasyon" işlemi gerçekleştirildi.
- Hesaplamalar aşağıdaki eşitliklere göre yapıldı.
  ΔC_t kontrol = kontrol grubuna ait hedef genin C_t değeri – kontrol grubuna ait house-keeping genin C_t değeri

ΔC_t örnek = örnek grubuna ait hedef genin C_t değeri – örnek grubuna ait house-keeping genin C_t değeri

Rölatif hedef gen ekspresyonu: $2^{-(\Delta Ct\ \text{örnek}-\ \Delta Ct\ \text{kontrol})} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$

Tablo 1. Analizi yapılan yolaklar ve genler

TGFß	ATF4, CDKN1B (p27KIP1), EMP1, GADD45B, HERPUD1, IFRD1, MYC, TNFSF10 (TRAIL).
WNT	AXIN2, CCND1, CCND2, DAB2, FOSL1 (FRA-1), MMP7 (Matrilysin), MYC, PPARD, WISP1.
NFκB	BCL2A1 (Bfl-1/A1), BCL2L1 (BCL-X), BIRC3 (c-IAP1), CCL5 (RANTES), CSF1 (MCSF), ICAM1, IFNG, STAT1, TNF.
JAK/STAT	JAK1, 2 / STAT1: IRF1. STAT3: BCL2L1 (BCL-X), CCND1, CEBPD, LRG1, MCL1, SOCS3. STAT5: BCL2L1 (BCL-X), CCND1, SOCS3. JAK1, 3 / STAT6: FCER2, GATA3.
P53	BAX, BBC3, BTG2, CDKN1A (p21CIP1/WAF1), EGFR, FAS (TNFRSF6), GADD45A, PCNA, RB1.
Notch	HES1, HES5, HEY1, HEY2, HEYL, ID1, JAG1, LFNG, NOTCH1.
Hedgehog	BCL2, BMP2, BMP4, PTCH1, WNT1, WNT2B, WNT3A, WNT5A, WNT6.
PPAR	ACSL3, ACSL4, ACSL5, CPT2, FABP1, OLR1, SLC27A4, SORBS1.
Oksidatif stres	FTH1, GCLC, GCLM, GSR, HMOX1, NQO1, SQSTM1, TXN, TXNRD1.
Hipoksi	ADM, ARNT, CA9, EPO, HMOX1, LDHA, SERPINE1 (PAI-1), SLC2A1, VEGFA.

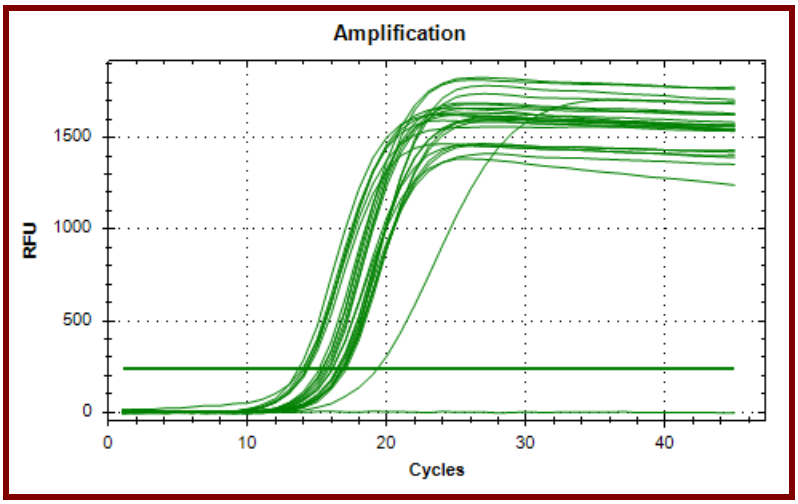
6. BULGULAR

6.1 Normal Mononükleer Hücre Apoptoz Sonuçları

Önceki çalışmamızda K562 hücreleri kullanılarak gerçekleştirilen apoptoz deneylerinde kullandığımız kuersetin, kurkumin ve kombinasyon dozlarının, normal mononükleer hücreler üzerindeki etkilerini gözlemlemek üzere; K562 gruplarına uygulanan dozlarda kuersetin, kurkumin ve her iki polifenolün kombinasyonları verilerek, aynı zaman sürecindeki etkileri incelenmiştir. Normal mononükleer hücre kontrol grubunda yüzde apoptoz değeri 0.21 ± 0.05 olarak bulunmuştur. Aynı hücrelerde sadece kuersetin uygulanan grupta bu değer 47.64 ± 5.31 olarak belirlenmiştir. Sadece kurkumin uygulanan grupta ise yüzde apoptoz değeri ortalama 14.64 ± 1.89 olarak bulunmuştur. Her iki polifenolün birlikte uygulandığı grup olan kombinasyon grubunda yüzde apoptoz değeri ortalama 2.54 ± 1.13 olarak belirlenmiş, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Elde edilen sonuçlar normal mononükleer hücre kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, hem kuersetin uygulanan grupta hem de kurkumin uygulanan grupta apoptozun anlamlı olarak arttığı ($p<0.0001$)gözlenmiştir. Kontrol grubu ile kombinasyon grubu karşılaştırıldığında ise aralarında anlamlı bir fark ($p>0.005$) görülmemiştir.

6.2 RT2 Sinyal İleti Yolakları Gen Ekspresyonu

cDNA sentezinin Kontrolü**:** β-Aktin genine ait primer setinin kullanılması sonucu örneklerimizin cDNA sentezinin yeterli oranda gerçekleşip gerçekleşmediği kontrol edildi. Döngü sayısı 25'in altında belirlendiğinden örnek genleri ile *house-keeping* genler arasında karşılaştırma yapılabilecek düzeyde cDNA elde edildiği saptandı.



Şekil 1. Gen amplifikasyon eğrisi örnek gösterimi (β-Aktin).

Kronik myeloid lösemi ve normal mononükleer hücre sinyal ileti yolaklarına ait gen ekspresyonlarının incelendiği çalışmamızda, genlerin her iki hücre için eşik döngü (cycle

threshold, C_t) değerleri belirlendikten sonra her bir gen için sırasıyla ortalama C_t, ortalama ΔC_t, 2^(ortalama ΔC_t), kat değişim ve kat düzenlenme değerleri hesaplanmıştır. Bu değerler aynı hücrelerin kontrol grupları ile karşılaştırılmıştır. Kat değişim (fold-change) değerleri ile kat düzenlenme (fold regulation) değerleri için, kontrol grubu ile normalizasyon sonrasında $p < 0.05$ olan değerler anlamlı kabul edilmiştir. Kat düzenlenme değeri >2 ise genin ekspresyonun arttığı, kat düzenlenme değeri <-2 ise genin ekspresyonun düştüğü ifade edilmektedir. Kat düzenlenme değeri -2'den büyük +2'den küçük olduğu durumlarda gen ekspresyonu değişimi gözlenmemiştir. İncelenen genlerin bilgileri ve elde ettiğimiz sonuçlar Tablo 2, Tablo 3 ve Tablo 4'de verilmektedir. Ayrıca elde edilen sonuçların farklı yolaklardaki genlere göre değerlendirilmesi yapılmıştır.

Tablo 2 İncelenen genlerin adları ile UniGene ve Gen Bank erişim numaraları

Gen	**Genin Açık Adı**	**UniGene**	**GenBank**
ACSL4	Acyl-CoA Synthetase Long-Chain Family Member-4	Hs.268785	NM_004458.2
ADM	Adrenomedullin	Hs.441047	NM_001124.1
AKT1	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	Hs.525622	NM_001014432.1
ARNT	Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator	Hs.632446	NM_178427.2
ATF4	Activating Transcription Factor 4	Hs.496487	NM_182810.1
BAX	BCL2-associated X protein	Hs.624291	NM-138761.3
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	Hs.150749	NM_000633.2
BMP2	Bone Morphogenetic Protein 2	Hs.73853	NM_001200.2
BMP4	Bone Morphogenetic Protein 4	Hs.68879	NM_130850.2
BTG2	BTG Family Member 2	Hs.519162	NM_006763.2
CASP9	Caspase 9	Hs.329502	NM_001229.2
CCL5	C-C Motif Chemokine Ligand 5	Hs.514821	NM_002985.2
CCND1	Cyclin D1	Hs.523852	NM_053056.2
CCND2	Cyclin D2	Hs.376071	NM_001759.3
CDKN1A	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A	Hs.370771	NM_078467.1
CDKN1B	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1B	Hs.238990	NM_004064.3
CEBPD	CCAAT/Enhancer Binding Protein Delta	Hs.440829	NM_005195.3
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor	Hs.488293	NM_005228.3
EMP1	Epithelial Membrane Protein 1	Hs.719042	NM_001423.2
EPO	Erythropoietin	Hs.2303	NM_000799.2
FAS	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)	Hs.244139	NM_000043.3
FOSL	FOS like antigen	Hs.283565	NM_005438.3
FTH1	Ferritin, Heavy Polypeptide 1	Hs.524910	NM_002032.2
GADD45A	Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	Hs.80409	NM_001924.2
GCLC	Glutamate-Cysteine Ligase Catalytic Subunit	Hs.654465	NM_001498.2

GSR	Glutathione reductase	Hs.271510	NM_000637.2
HES1	Hes Family BHLH Transcription Factor 1	Hs.250666	NM_005524.3
HEYL	Hes Related Family BHLH Transcription Factor With YRPW Motif-Like	Hs.472566	NM_014571.3
HMOX1	Heme Oxygenase 1	Hs.517581	NM_002133.1
ICAM1	Intercellular Adhesion Molecule 1	Hs.643447	NM_00201.2
ID1	Inhibitor Of DNA Binding 1, HLH Protein	Hs.504609	NM_002165.2
IFNG	Interferon, Gamma	Hs.856	NM.000619.1
IRF1	Interferon Regulatory Factor 1	Hs.436061	NM.002198.2
LDHA	Lactate Dehydrogenase A	Hs.2795	NM_005566.3
LFNG	LFNG O-Fucosylpeptide 3-Beta-N-Acetylglucosaminyltransferase	Hs.159142	NM_001166355.1
MMP7	Matrix Metallopeptidase 7	Hs.2256	NM_002423.3
NOTCH1	Notch1	Hs.495473	NM_017617.3
NQO1	NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1	Hs.406515	NM_000903.2
OLR1	Oxidized low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1	Hs.412484	NM_002543.3
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen	Hs.147433	NM_182649.1
PPARD	Peroxisome proliferator-activated receptor delta	Hs.696032	NM_001171819.1
PTCH1	Patched 1	Hs.494538	NM_000264.3
RB1	Retinoblastoma 1	Hs.408528	NM_000321.2
SLC2A1	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1	Hs.473721	NM_006516.2
SERPINE1	Serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1	Hs.414795	NM_000602.2
SORBS1	Sorbin and SH3 domain containing 1	Hs.38621	NM_024991.1
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1	Hs.743244	NM_139266.2
TNF	Tumor necrosis factor	Hs.241570	NM_000594.2
TNFSF10	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	Hs.478275	NM_003810.2
TXN	Thioredoxin	Hs.435136	NM_003329.2
TXNRD1	Thioredoxin reductase 1	Hs.654922	NM_182729.1
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	Hs.73793	NM_001171623.1
WISP1	WNT1 inducible signaling pathway protein 1	Hs.492974	NM_003882.2
WNT3A	Wingless-type MMTV integration site family, member 3A	Hs.336930	NM_033131.2
WNT5A	Wingless-type MMTV integration site family, member 5A	Hs.643085	NM_003392.3
WNT6	Wingless-type MMTV integration site family, member 6	Hs29764	NM_006522.3

Tablo 3. Normal mononükleer hücrelerde farklı sinyal ileti yolakları ile ilişkili genlerin mRNA ekspresyonu üzerine kurkumin, kuersetin ve kombinasyon uygulamasının etkileri

	C_t Değeri				Düzenlenme (kat)		
	Kontrol	Kuersetin	Kurkumin	Kombinasyon	Kuersetin	Kurkumin	Kombinasyon
ACSL4	31,82	33,23	32,06	30,27	-1,3605	1,4412	2,9508*
ADM	28,73	29,16	29,36	29,27	1,4616	1,1113	-1,4395
AKT1	27,48	29,64	29,59	27,60	-2,2697*	-2,5218*	-1,0759
ARNT	27,91	29,04	28,91	28,82	-1,1102	-1,1710	-1,8689
ATF4	25,98	26,69	26,07	25,95	1,2037	1,6083	1,0337
BAX	35,00	34,69	35,00	35,00	2,4410*	1,7118	1,0077
BCL2	29,32	30,39	28,58	30,11	-1,0650	2,8591*	-1,7158
BMP2	34,09	34,70	33,69	34,60	1,2871	2,2536*	-1,4099
BMP4	35,00	35,00	34,77	35,00	1,9645	2,0031*	1,0077
BTG2	26,21	27,36	27,08	26,24	-1,1231	-1,0652	-1,0132
CASP9	35,00	35,00	35,00	34,47	1,9645	1,7118	1,4585
CCL5	24,53	25,97	25,34	24,49	-1,3763	-1,0242	1,0385
CCND1	35,00	35,00	32,04	33,74	1,9645	13,3511*	2,4079*
CCND2	28,70	31,91	30,53	29,95	-4,7212*	-2,0865*	-2,3656*
CDKN1A	31,86	31,75	32,30	32,01	2,1202*	1,2575	-1,1049
CDKN1B	28,85	28,43	30,41	29,96	2,6284*	-1,7185	-2,1345*
CEBPD	27,73	29,85	28,96	27,66	-2,2076*	-1,3703	1,0627
EMP1	31,06	31,58	31,18	30,39	1,3668	1,5752	1,5997
EPO	35,00	35,00	35,00	35,00	1,9645	1,7118	1,0077
FAS	30,65	31,21	29,87	30,69	1,3325	2,9395*	-1,0202
FOSL	33,44	34,53	33,21	32,96	-1,0811	2,0124*	1,4072
FTH1	17,95	20,00	17,97	17,37	-2,1079*	1,6961	1,5134
GADD45A	25,43	24,54	25,29	25,01	3,6322*	1,8819	1,3452
GCLC	30,07	29,83	31,05	29,85	2,3201*	-1,1496	1,1737
GSR	29,81	28,41	29,07	30,83	5,1964*	2,8723*	-2,0077*
HES1	35,00	29,97	35,00	33,82	64,037*	1,7118	2,278*
HEYL	35,00	31,52	33,58	35,00	21,9706*	4,5807*	1,0077
HMOX1	26,48	29,68	27,59	27,72	-4,6778*	-1,2609	-2,3493*
ICAM1	31,06	28,72	30,50	31,88	9,9234*	2,5237*	-1,7519
ID1	28,88	28,97	28,84	28,40	1,8457	1,7519	1,4023
IFNG	31,2	32,39	29,51	33,90	-1,1668	5,4979*	-6,4631*
IRF1	28,22	28,68	29,58	29,22	1,4282	-1,4960	-1,9801
LDHA	24,69	27,12	25,53	24,30	-2,7495*	-1,0457	1,1496
LFNG	35,00	35,00	33,49	33,51	1,9645	4,8868*	2,8241*
MCL1	27,62	28,73	28,41	27,63	-1,0937	-1,0054	1,0008
MMP7	31,77	31,19	33,06	28,74	2,9468*	-1,4284	8,2503*
MYC	35,00	35,00	35,00	32,24	1,9645	1,7118	6,8106*
NOTCH1	29,27	28,98	29,41	28,60	2,4019*	1,5535	1,6127
NQO1	29,69	29,22	28,61	28,87	2,7211*	3,6189*	1,7749
OLR1	24,92	27,64	27,28	24,81	-4,1387*	-3,6921*	-1,1373
PCNA	23,46	26,38	23,82	23,36	-3,8704*	1,3277	1,0801
PPARD	34,74	35,00	34,39	34,06	1,6405	2,1894*	1,6164
PTCH1	29,02	29,55	29,18	29,47	1,3605	1,5392	-1,3524
RB1	26,69	28,65	27,27	26,47	-1,9896	1,1399	1,1710
SLC2A1	30,62	30,25	28,59	35,00	2,5476*	7,0074*	-20,6617*
SERPINE1	31,78	31,60	33,70	32,17	2,2256*	-2,2106*	-1,2943
SOCS3	28,90	29,64	30,03	29,44	1,1735	-1,2785	-1,4395
SORBS1	35,00	33,40	35,00	35,00	5,9690*	1,7118	1,0077
STAT1	22,90	24,88	25,10	23,12	-2,0058*	-2,6965*	-1,1585
TNF	28,53	29,55	28,78	28,89	-1,0347	1,4428	-1,2736
TNFSF10	25,51	27,39	27,33	25,20	-1,8736	-2,0673*	1,2464
TXN	27,80	29,31	28,48	27,59	-1,4565	1,0636	1,1656

TXNRD1	20,13	24,49	19,65	19,38	-10,5013*	2,3821*	1,6909
VEGFA	34,51	30,93	33,26	33,28	23,5475*	4,0809*	2,3693*
WISP1	33,57	31,62	33,01	32,98	7,5728*	2,5208*	1,5099
WNT3A	34,82	33,67	35,00	33,66	4,3495*	1,5111	2,2467*
WNT5A	29,85	30,76	30,93	28,20	1,0407	-1,2378	3,1553*
WNT6	35,00	33,72	33,06	35,00	4,7706*	6,5533*	1,0077
ACTB	21,68	22,77	22,34	21,92	-1,0861	1,0809	-1,1706
B2M	17,75	19,56	18,88	17,83	-1,7849	-1,2785	-1,0453
GUSB	25,34	25,53	26,22	25,10	1,7181	-1,0776	1,1874
HPRT1	25,08	25,20	25,86	24,87	1,8035	-1,0077	1,1629
PGK	25,46	26,73	26,04	25,55	-1,2304	1,1425	-1,0562
PPIA	21,85	23,21	22,46	21,96	-1,2991	1,1242	-1,0685

* işaretli genlerde kontrol grubuna kıyasla anlamlı artış veya baskılanma vardır ($p<0.05$).

Tablo 4. Kronik myeloid lösemi hücrelerinde farklı sinyal ileti yolakları ile ilişkili genlerin mRNA ekspresyonu üzerine kurkumin, kuersetin ve kombinasyon uygulamasının etkileri

	C_t Değeri				**Düzenlenme (kat)**		
	Kontrol	Kuersetin	Kurkumin	Kombinasyon	Kuersetin	Kurkumin	Kombinasyon
ACSL4	33,36	33,95	35,00	35,00	-2,0039*	-2,2824*	-3,0396*
ADM	35,00	34,73	35,00	35,00	-1,1066	1,3655	1,0253
AKT1	28,04	28,06	29,77	32,55	-1,3484	-2,4293*	-21,643*
ARNT	28,51	27,71	30,35	32,84	1,3079	-2,6157*	-19,6604*
ATF4	25,96	23,21	26,68	26,01	5,0416*	-1,2063	-1,0097
BAX	35,00	35,00	35,00	35,00	-1,3312	1,3655	1,1670
BCL2	29,14	28,98	31,37	30,00	-1,1874	-3,4277*	-1,7702
BMP2	28,45	27,19	30,42	28,08	1,7928	-2,8723*	1,3205
BMP4	31,04	32,76	32,73	35,00	-4,3856*	-2,3629*	-15,1778*
BTG2	27,94	25,86	29,58	23,47	3,1760*	-2,2824*	18,8450*
CASP9	35,00	29,80	35,00	35,00	27,6120*	1,3655	1,0253
CCL5	29,38	28,54	35,00	30,25	1,3446	-36,0157*	-1,7825
CCND1	28,88	26,69	31,18	28,64	3,4197*	-3,6231*	1,2081
CCND2	30,67	29,91	33,07	30,11	1,2677	-3,8787*	1,5064
CDKN1A	33,14	33,71	34,35	28,61	-1,9672	-1,6941	23,6884*
CDKN1B	31,57	27,59	29,24	28,91	11,9082*	6,8659*	6,5105*
CEBPD	35,00	34,21	35,00	33,49	1,2988	1,3655	2,9270*
EMP1	33,47	32,44	33,93	34,13	1,5428	-1,0050	-1,5375
EPO	28,16	27,12	28,70	26,94	1,5428	-1,0648	2,3858*
FAS	33,35	34,92	34,02	29,40	-3,9617*	-1,1625	15,8101*
FOSL	27,52	26,11	29,68	27,06	1,9962	-3,2842*	1,4055
FTH1	23,75	21,37	24,34	26,33	3,8921*	-1,1049	-5,8586*
GADD45A	24,09	24,78	24,90	24,34	-2,1526*	-1,2795	-1,1598
GCLC	30,35	29,34	32,19	29,28	1,5093	-2,6279*	2,1576*
GSR	33,76	34,22	34,12	33,57	-1,8375	1,0578	1,1629
HES1	32,13	30,02	30,93	28,03	3,2503*	3,1371*	17,5830*
HEYL	28,63	26,61	31,45	29,17	4,0108*	-5,1954*	-1,4180
EMP1	33,47	32,44	33,93	34,13	1,5428	-1,0050	-1,5375
HMOX1	28,19	27,62	29,23	28,45	1,1126	-1,5058	-1,1679
ICAM1	27,67	26,43	29,43	30,37	1,7702	-2,4804*	-6,3667*
ID1	25,38	25,94	28,72	28,31	-1,9672	-7,4499*	-7,4499*

IFNG	27,07	26,48	29,17	28,67	1,1255	-3,1468*	-2,9702*
IRF1	28,87	27,23	28,21	28,79	2,3412*	2,1526*	1,0838
LDHA	23,63	23,67	24,34	27,25	-1,3655	-1,1938	-11,9634*
LFNG	28,22	26,97	32,67	29,07	1,7825	-16,0432*	-1,7620
MCL1	28,12	25,46	30,66	28,35	4,7477	-4,2960	-1,1465
MMP7	30,19	31,92	35,00	30,81	-4,4263*	-20,5902*	1,5024
MYC	27,29	25,83	27,83	28,55	2,0665*	1,2829	-2,3412*
NOTCH1	29,94	28,08	34,82	31,01	2,7205*	-21,5143*	-2,0428*
NQO1	29,06	25,46	28,02	28,92	9,0875*	2,8176*	1,1272
OLR1	29,00	28,22	32,11	29,15	1,2899	-6,3374*	-1,0846
PCNA	26,02	25,76	31,91	29,19	-1,1181	-43,5788*	-8,8085*
PPARD	33,32	33,77	33,13	34,66	-1,8248	1,5559	-2,4775*
PTCH1	27,82	26,30	35,00	29,03	2,1493*	-106,1940*	-2,2510*
RB1	29,75	28,01	30,09	29,54	2,5150*	1,0826	1,1887
SLC2A1	27,25	27,46	27,93	29,55	-1,5398	-1,1665	-4,8028*
SERPINE1	32,24	27,90	31,40	31,53	15,2481*	2,4443*	1,6850
SOCS3	31,31	27,21	30,05	29,91	12,9112	3,2703	2,7059
SORBS1	28,86	27,19	28,82	29,80	2,3793*	1,4055	-1,8754
STAT1	26,76	26,71	28,94	29,15	-1,2800	-3,3109*	-5,0884*
TNF	27,05	26,18	31,28	29,28	1,3681	-13,7900*	-4,5913*
TNFSF10	28,69	26,45	28,68	30,11	3,5485*	1,3750	-2,6097*
TXN	28,88	28,40	31,06	30,29	1,0477	-3,3262*	-2,5857*
TXNRD1	21,20	21,59	21,16	21,18	-1,7364	1,4072	1,0397
VEGFA	29,04	30,36	30,97	30,66	-3,3237*	-2,7906*	-2,9978*
WISP1	25,60	26,83	30,75	29,90	-3,1155*	-26,0021*	-19,1670*
WNT3A	31,43	28,86	35,00	30,36	4,4606*	-8,7274*	2,1452*
WNT5A	28,67	28,97	32,13	30,47	-1,6390	-8,0587*	-3,3961*
WNT6	31,91	32,03	33,06	31,04	-1,4467	-1,6251	1,8740
ACTB	21,80	20,97	22,04	22,17	1,3323	1,1576	-1,2633
B2M	22,46	23,02	23,24	22,59	-1,9672	-1,2560	-1,0697
GUSB	28,55	27,50	30,15	29,32	1,5517	-2,2123	-1,16631
HPRT1	24,98	24,97	25,09	24,26	-1,3251	1,2697	1,6889
PGK	27,34	26,10	26,89	27,04	1,7743	1,8610	1,2594
PPIA	19,78	19,86	20,21	19,74	-1,4072	1,0159	1,0566

* işaretli genlerde kontrol grubuna kıyasla anlamlı artış veya baskılanma vardır ($p<0.05$).

6.2.1 TGF-beta yolağı

Bu sinyal yolağında AKT-1, ATF4, CDNK1B, EMP1, MYC ve TNFSF10 gen ekspresyonlarına bakılmıştır.

NMH: Genlerden 2'sinde pozitif yönde düzenlenme, 4'ünde negatif yönde düzenlenme tespit edilmiştir.

- CDKN1B geni kuersetin uygulanan grupta (2,6284-kat) artmıştır.
- MYC geni kombinasyon grubunda (6,8106-kat) artmıştır.
- AKT1 geninde kuersetin grubunda (-2,2697-kat), kurkumin grubunda ise (-2,5218-kat) azalma gözlenmiştir.
- CDKN1B gen ekspresyonunda kombinasyon uygulanan grupta (-2,1345-kat) azalma tespit edilmiştir.
- TNFSF10 gen ekspresyonu kurkumin grubunda (-2,0673-kat) azalmıştır.

KML: Genlerden 5'inde pozitif yönde düzenleme, 4'ünde negatif yönde düzenlenme tespit edilmiştir.

- ATF4 geni kuersetin uygulanan grupta (5,0416-kat) artmıştır.
- CDKN1B gen ekspresyonu uygulama yapılan tüm gruplarda (kuersetin: 11,0982-kat, kurkumin: 6,8659-kat, kombinasyon: 6,5105-kat) artmıştır.
- TNFSF10 geni kuersetin uygulanan grupta (3,5485-kat) artmıştır.
- AKT1 geni kurkumin uygulanan grupta (-2,4293-kat) ve kombinasyon grubunda (-21,643-kat) azalmıştır.
- MYC geni kombinasyon grubunda (-2,3412-kat) azalmıştır.
- TNFSF10 geni kombinasyon grubunda (-2,6097-kat) azalmıştır.

6.2.2 WNT yolağı

Bu sinyal yolağında CCND1, CCND2, FOSL, MMP7, MYC, PPARD, WISP1 gen ekspresyonları incelenmiştir.

NMH: Genlerden 9'unda ekspresyonun pozitif yönde, 3'ünde negatif yönde düzenlendiği tespit edilmiştir.

- CCND1 geninde kurkumin (13,3511-kat) ve kombinasyon (2,4079-kat) gruplarında pozitif yönde ekspresyon artışı görülmüştür.
- FOSL geninde curcumin grubunda (2,0124-kat) artış gözlenmiştir.
- MMP7 gen ekspresyonunda kuersetin uygulanan grupta (2,9468-kat), kombinasyon grubunda (8,2503-kat) artış tespit edilmiştir.
- MYC geni incelendiğinde ise kombinasyon grubunda (6,8106-kat) pozitif düzenlenme belirlenmiştir.
- PPARD gen ekspresyonu kurkumin uygulanan grupta (2,1894-kat) pozitif yönde bir düzenlenmeye uğramıştır.
- WISP1 gen ekspresyonları kuersetin uygulanan grupta (7,5728-kat), kurkumin uygulanan grupta (2,5208-kat) artmış olarak tespit edilmiştir.
- CCND2 geninde negatif düzenlenme tespit edilmiş ve değerler kuersetin grubunda (-4,7212-kat), kurkumin grubunda (-2,0865-kat) ve kombinasyon grubunda (-2,3656-kat) olarak bulunmuştur.

KML: Genlerden 9'unun ekspresyonunda negatif yönde düzenlenme tespit edilmiştir.

- Kurkumin grubunda CCND1 gen ekspresyonu (-3,6231-kat), CCND2 gen ekspresyonu (-3,8787-kat) azalmıştır.
- FOSL geni kurkumin grubunda (-3,2842-kat) azalmıştır.
- MMP7 gen ekspresyonu kuersetin grubunda (-4,4263-kat) ve kurkumin grubunda (-20,5902-kat) azalmıştır.
- PPARD ekspresyonu kombinasyon grubunda (-2,4775-kat) azalmıştır.
- WIPS gen ekspresyonunda tüm gruplarda azalma gözlenmiştir. Değerler sırasıyla kuersetin grubunda -3,1155-kat, kurkumin grubunda -26,0021-kat ve kombinasyon grubunda -19,1670-kat olarak belirlenmiştir.

6.2.3 NF-KB yolağı

NF-KB sinyal yolağında CCL5, ICAM1, IFNG, STAT1, TNF genlerinin düzenlenmeleri incelenmiştir.

NMH: Genlerden 3'ünde pozitif 3'ünde ise negatif yönde düzenlenme tespit edilmiştir.

- ICAM1 geni ekspresyonlarında pozitif yönde artış tespit edilmiş, kuersetin grubunda (9,9234-kat) ve kurkumin grubunda (2,5237-kat) artmıştır.
- IFNG geni kurkumin uygulanan grupta (5,4979-kat) artmış, kombinasyon grubunda (-6,4631-kat) azalmıştır.
- STAT1 geni kursetin uygulanan grupta (-2,0058-kat), kurkumin uygulanan grupta ise (-2,6965-kat) negatif yönde düzenlenmiştir.

KML: Genlerden 9'unun ekspresyonunda negatif yönde düzenlenme tespit edilmiştir.

- CCL5 gen ekspresyonu kurkumin grubunda (-36,0157-kat) azalmıştır.
- ICAM1 ekspresyonu kurkumin grubunda (-2,4804-kat), kombinasyon grubunda (-6,3667-kat) azalmıştır.
- IFNG ekspresyonu kurkumin grubunda (-3,1468-kat), kombinasyon grubunda (-2,9701-kat) azalmıştır.
- STAT1 ekspresyonu kurkumin grubunda (-3,3109-kat), kombinasyon grubunda (-5,0884-kat) azalmıştır.
- TNF ekspresyonu kurkumin grubunda (-13,7900-kat), kombinasyon grubunda (-4,5913-kat) azalmıştır.

6.2.4 JACK/STAT yolağı

JACK/STAT yolağında IRF1, CCND1, CEBPD, MCL1 ve SOCS3 genleri incelenmiştir.

NMH: Genlerden 2'si pozitif yönde düzenlenirken, 1 gende negatif yönde düzenlenme tespit edilmiştir.

- CCND1 geni pozitif düzenlenmiş, kurkumin uygulanan grupta (13,3511-kat) ve kombinasyon grubunda (2,4079-kat) artış göstermiştir.
- CEBPD geni negatif yönde düzenlenmiş, kuersetin uygulanan grupta (-2,2076-kat) azalma tespit edilmiştir.

KML: Genlerden 7'sinin ekspresyonunda pozitif, 2'sinde negatif yönde düzenlenme tespit edilmiştir.

- CEBPD ekspresyonu kombinasyon grubunda (2,9270-kat) artmıştır.
- IRF1 ekspresyonu kuersetin grubunda (2,3412-kat) ve kurkumin grubunda (2,1526-kat) artmıştır.
- MCL1 ekspresyonu kuersetin grubunda (4,7477-kat) artmıştır.
- SOCS3 ekspresyonu kuersetin grubunda (12,9112-kat), kurkumin grubunda (3,2703-kat) ve kombinasyon grubunda (2,7059-kat) artmıştır.
- CCND1 ekspresyonu kurkumin grubunda (-3,6231-kat) azalmıştır.
- MCL1 ekspresyonu kurkumin grubunda (-4,2690-kat) azalmıştır.

6.2.5 P53 yolağı

P53 yolağında BAX, BTG2, CDKN1A, FAS, GADD45A, PCNA, RB1 genleri incelenmiştir.

NMH: Genlerden 4‘ü pozitif yönde düzenlenme gösterirken, 1’i negatif yönde düzenlenmiştir.

- BAX geni kuersetin uygulanan grupta (2,4410-kat) artmıştır.
- FAS gen ekspresyonu kurkumin uygulanan grupta (2,9395-kat) artmıştır.
- CDKN1A geni kuersetin uygulanan grupta (2,1202-kat) pozitif yönde düzenlenmiştir.
- GADD45A ekspresyonu kuersetin uygulanan grupta (3,6322-kat) artmıştır.
- PCNA geninde kuersetin uygulanan grupta (-3,8704-kat) negatif yönde düzenlenme gözlenmiştir.

KML: Genlerden 4’ünün ekspresyonunda pozitif, 5’inin ekspresyonunda negatif yönde düzenlenme tespit edilmiştir.

- BTG2 ekspresyonu kombinasyonda (18,8450-kat) artmıştır.
- CDKN1A ekspresyonu kombinasyonda (23,6884-kat) artmıştır.
- FAS gen ekspresyonu kombinasyonda (15,8101-kat) artmıştır.
- RB1 ekspresyonu kuersetin grubunda (2,5150-kat) artmıştır.
- BTG2 gen ekspresyonu kurkumin grubunda (-2,2824-kat) azalmıştır.
- FAS gen ekspresyonu kuersetin grubunda (-3,9617-kat) azalmıştır.
- GADD45A ekspresyonu kuersetin grubunda (-2,1526-kat) azalmıştır.
- PCNA ekspresyonu kuersetin grubunda (-43,5788-kat) ve kombinasyon grubunda (-8,8085-kat) azalmıştır.

6.2.6 NOTCH yolağı

NOTCH yolağında HES1, HEYL, ID1, LFNG ve NOTCH1 genleri incelenmiştir.

NMH: Genlerden 7’sinin pozitif yönde düzenlendiği tespit edilmiştir.

- BAX geni kuersetin uygulanan grupta (2,4410-kat) artmıştır.
- HES1 gen ekspresyonu kuersetin grubunda (64,037-kat), kombinasyon grubunda (2,2780-kat) artış göstermiştir.
- HEY1 gen ekspresyonu kuersetin uygulanan grupta (21,9706-kat) artarken, kurkumin uygulanan grupta (4,5807-kat) artmıştır.
- LFNG gen ekspresyonu kurkumin uygulanan grupta (4,8868-kat) ve kombinasyon grubunda (2,8241-kat) artış yönünde düzenlenmiştir.
- Bu hücre hattında incelenen genlerde negatif yönde bir düzenlenmeye rastlanmamıştır.

KML: Genlerden 2’sinin ekspresyonunda pozitif, 6’sının ekspresyonunda negatif yönde düzenlenme tespit edilmiştir.

- HES1 gen ekspresyonu kombinasyon grubunda (17,5830-kat) artmıştır.
- HEYL ekspresyonu kuersetin grubunda (4,0108-kat) artmıştır.
- HEYL ekspresyonu kurkumin grubunda (-5,1954-kat) azalmıştır.
- ID1 ekspresyonu kurkumin grubunda (-7,4499-kat) ve kombinasyonda (-7,4499-kat) azalmıştır.
- LFNG ekspresyonu kurkumin grubunda (-16,0432-kat) azalmıştır.

- NOTCH1 ekspresyonu kurkumin grubunda (-21,5143-kat) ve kombinasyon grubunda (-2,0428-kat) azalmıştır.

6.2.7 Hedgehog yolağı

Hedgehog yolağında BCL2, BMP2, BMP4, PTCH1, WNT3A, WNT5A,WNT6 genleri incelenmiştir.

NMH: Genlerden 8‘inin ekspresyonu pozitif yönde düzenlenmiştir.

- BCL2 gen ekspresyonu kurkumin uygulanan grupta (2,8591-kat) artmıştır.
- BMP2 gen ekspresyonu kurkumin uygulanan grupta (2,2536-kat) artmıştır.
- BMP4 gen ekspresyonu kurkumin uygulanan grupta (2,0031-kat) artmıştır.
- WNT3A gen ekspresyonunun kuersetin grubunda (4,3495-kat) ve kombinasyon grubunda (2,2467-kat) arttığı gözlenmiştir.
- WNT5A gen ekspresyonu kombinasyon grubunda (3,1553-kat) artmıştır.
- WNT6 gen ekspresyonunda kuersetin grubunda (4,7706-kat) ve kurkumin grubunda (6,5533-kat) artış tespit edilmiştir.

KML: Genlerden 2’sinin ekspresyonunda pozitif, 10‘unda negatif yönde düzenlenme tespit edilmiştir.

- PTCH1 geni kuersetin grubunda (2,1493-kat) artmıştır.
- WNT3A gen ekspresyonu kuersetin grubunda (4,4606-kat) artmıştır.
- BCL2 gen ekspresyonu kurkumin grubunda (-3,4277-kat) azalmıştır.
- BMP2 geni kurkumin grubunda (-2,8723-kat) azalmıştır.
- BMP4 gen ekspresyonu kuersetin grubunda (-4,3856-kat), kurkumin grubunda (-2,3629-kat) ve kombinasyon grubunda (-15,1778-kat) azalmıştır.
- PTCH1 gen ekspresyonu kurkumin grubunda (-106,1940-kat) ve kombinasyon grubunda (-2,2510-kat) azalmıştır.
- WNT3A geni kurkumin grubunda (-8,7274-kat) azalmıştır.
- WNT5A gen ekspresyonu kurkumin grubunda (-8,0587-kat) ve kombinasyon grubunda (-3,3961-kat) azalmıştır.

6.2.8 PPAR yolağı

PPAR yolağında ACSL4, OLR1 ve SORBS1 genleri incelenmiştir.

NMH: Genlerden 2‘sinde pozitif yönde, 2’sinde negatif yönde düzenlenme tespit edilmiştir.

- ACSL4 gen ekspresyonu kombinasyon grubunda (2,9508-kat) pozitif yönde düzenlenmiştir.
- SORBS1 gen ekspresyonunun kuersetin uygulanan grupta (5,9690-kat) arttığı gözlenmiştir.
- OLR1 gen ekspresyonu kuersetin grubunda (-4,1387-kat), kurkumin grubunda (-3,6921-kat) azalmıştır.

KML: Genlerden 1’inde pozitif, 4’ünde negatif yönde düzenlenme tespit edilmiştir.

- SORBS1 geni kuersetin grubunda (2,3793-kat) artmıştır.

- ACSL4 gen ekspresyonları kuersetin grubunda (-2,0039-kat), kurkumin grubunda (-2,2824-kat) ve kombinasyon grubunda (-3,0396-kat) azalmıştır.
- OLR1 gen ekspresyonu kurkumin grubunda (-6,3374-kat) azalmıştır.

6.2.9 Oksidatif stres

Oksidatif stres ile ilgili olarak FTH1, GCLC, GSR, HMOX1, NQO1, TXN, TXNRD1 genleri incelenmiştir.

NMH: Genlerden 6'sında pozitif yönde, 5'inde negatif yönde düzenlenme tespit edilmiştir.

- GCLC gen ekspresyonunda kuersetin uygulanan grupta (2,3201-kat) artış gözlenmiştir.
- GSR gen ekspresyonunda kuersetin grubunda (5,1964-kat) ve kurkumin grubunda (2,8723-kat) artış gözlenmiştir.
- NQO1 gen ekspresyonunda kuersetin grubunda (2,7211-kat) ve kurkumin grubunda (3,6189-kat) artış tespit edilmiştir.
- TXNRD1 gen ekspresyonu kurkumin uygulanan grupta (2,3821-kat) artmıştır.
- FTH1 gen ekspresyonu kuersetin grubunda (-2,1079-kat) azalmıştır.
- GSR gen ekspresyonunda kombinasyon grubunda (-2,0077-kat) azalma görülmüştür.
- HMOX1 gen ekspresyonunda kuarsetin grubunda (-4,6778-kat) ve kombinasyon grubunda (-2,3493-kat) negatif düzenlenme tespit edilmiştir.
- TXNRD1 gen ekspresyonun Ayrıca kuersetin grubunda (-10,5013-kat) azaldığı gözlenmiştir.

KML: Genlerden 3'ünün ekspresyonunda pozitif, 4'ünün ekspresyonunda negatif yönde düzenlenme tespit edilmiştir.

- GCLC gen ekspresyonu kombinasyon grubunda (2,1576-kat) artmıştır.
- NQO1 ekspresyonu kuersetin grubunda (9,0875-kat) ve kurkumin grubunda (2,8176-kat) artmıştır.
- FTH1 ekspresyonu kombinasyon grubunda (-5,8586-kat) azalmıştır.
- GCLC ekspresyonu kurkumin grubunda (-2,6279-kat) azalmıştır.
- TXN gen ekspresyonu kurkumin grubunda (-3,3262-kat) ve kombinasyon grubunda (-2,5857-kat) azalmıştır.

6.2.10 Hipoksi

Hipoksi ile ilgili olarak ADM, ARNT, CA9, EPO, HMOX1, LDHA, SERPINE1, SLC2A1 ve VEGFA genleri incelenmiştir.

NMH: Genlerden 6'sında pozitif yönde, 5'inde negatif yönde düzenlenme tespit edilmiştir.

- SLC2A1 gen ekspresyonu kuersetin grubunda (2,5476-kat), kurkumin grubunda (7,0074-kat) artmıştır.
- VEGFA gen ekspresyonu kuersetin grubunda (23,5475-kat), kurkumin grubunda (4,0809-kat) ve kombinasyon grubunda (2,3693-kat) artmıştır.
- SERPINE1 geni kuersetin grubunda (2,2256-kat) artmıştır.
- HMOX1 geni kuersetin grubunda (-4,6778-kat), kombinasyon grubunda ise (-2,3493-kat) azalmıştır.

- LDHA gen ekspresyonu kuersetin grubunda (-2,7495-kat) azalmıştır.
- SLC2A1 geni kombinasyon grubunda (20,6617-kat) azalmıştır.
- SERPINE1 geni kurkumin grubunda (-2,2106-kat) azalmıştır.

KML: Genlerden 3'ünün ekspresyonunda pozitif, 7'sinin ekspresyonunda negatif yönde düzenlenme tespit edilmiştir.

- CAS9 gen ekspresyonu kuersetin grubunda (27,6120-kat) artmıştır.
- EPO gen ekspresyonu kombinasyon grubunda (2,3858-kat) artmıştır.
- SERPINE1 ekspresyonu kuersetin grubunda (15,2481-kat) artmıştır.
- ARNT geni kurkumin grubunda (-2,6157-kat), kombinasyon grubunda ise (-19,6604-kat) azalmıştır.
- LDHA ekspresyonu kombinasyon grubunda (-11,9634-kat) azalmıştır.
- SLC2A1 ekspresyonu kombinasyon grubunda (-4,8028-kat) azalmıştır.
- VEGFA ekspresyonunda kontrol grubunda (-3,3237-kat), kurkumin grubunda (-2,7906-kat) ve kombinasyon grubunda (-2,9978-kat) azalma gözlenmiştir.

7. TARTIŞMA/SONUÇ

Kronik myeloid lösemi tirozin kinaz aktivitesinin sürekliliğinden sorumlu olan BCR-ABL onkogeni ile karakterize bir miyeloproliferatif hastalık olarak tanımlanmaktadır. Tedavisinde tirozin kinaz inhibitörlerinin kullanımı önerilmekle birlikte, sıklıkla görülen tedaviye yeterli yanıt alınamadığı veya tedavi direnci gelişmesi durumunda, yeni alternatif tedavi yaklaşımları için araştırmalar sürmektedir. Lösemi hücrelerinde BCR-ABL1 pek çok sinyal yolağını (TGF-beta, Ras/MAPK, STAT, JNK/SAPK, Wnt, Hedgehog, PI3K, NF-kB ve Myc) aktive edebilmektedir. Ancak, henüz bunlardan hangi yolağın daha etkin olduğuna dair bir fikir birliği oluşmamıştır (Hsieh ve Van Etten 2014). Küçük molekül ağırlıklı inhibitörler, peptidler veya antikorlar ile TGF-beta yolağının hedeflenmesi kronik myeloid lösemi tedavisinde oldukça popüler bir tedavi yaklaşımıdır (Akhurst ve Hata 2012). Önceki çalışmamızda, kuersetin-kurkumin kombinasyonunun K562 hücrelerini apoptoza sürüklemekte iki maddenin tekli uygulamalarından daha etkin olduğunu gösteren veriler elde edilmiştir (Mutlu Altundağ 2016). Bu çalışmamızda, kuersetin-kurkumin kombinasyonunun kronik myeloid lösemi hücrelerinde, hücre proliferasyonu, hücre siklusu ve hücre ölümü ilişkili sinyal yolaklarındaki bazı gen ekspresyonları incelenmiştir.

7.1 TGF-beta Yolağı

KML hücrelerinde hücre canlılığından sorumlu Akt gen ekspresyonu baskılanmıştır. Bütün hematolojik malignitelerde ekspresyon artışı görülen ve kötü prognozdan sorumlu Myc gen ekspresyonu da kombinasyon uygulanan grupta azalmıştır. Kuersetin, kurkumin ve kombinasyon uygulamalarının hücre döngüsünün negatif regülatörü olan CDKN1B gen ekspresyonunu KML hücrelerinde arttırması Akt ve Myc gen ekspresyon değişimlerinden elde edilen verileri desteklemektedir. Elde edilen bulgular kuersetin, kurkumin ve kombinasyonlarının, TGF-beta sinyal yolağının etkilediği ve hücre canlılığından sorumlu olan bazı genlerin ekspresyonlarında etkili olduğunu göstermiştir.

7.2 WNT Yolağı

Kurkumin ve kuersetinin tekli uygulamaları kronik myeloid lösemi hücrelerinin proliferasyonunu ve apoptozdan kaçısını destekleyen CCND1 (Siklin D1) ve CCND2 (Siklin D2), FosL ve MMP7 ekspresyonlarını anlamlı düzeyde baskılarken, kombinasyon uygulaması PPARD ve WISP gen ekspresyonlarının anlamlı baskılanmasını sağlamıştır. PPARD ve WISP1 pek çok kanser hücresinde ekspresyonu artan ve hücre çoğalması ve büyümesi ile ilişkili genlerdir. Bu nedenle de önemli hedef olarak görülmektedir. Zhang vd. (2015) yaptıkları bir çalışmada WISP1 baskılanması ile Jurkat hücrelerinde hücre

döngüsünün G1 fazında tutuklandığını, apoptozun arttığını, MMP'ın azaldığını, ayrıca reaktif oksijen türlerinin arttığını saptamış olup önemli bir hedef olabileceğini ileri sürmektedir. Bulgularımız KML hücrelerinde kuersetin, kurkumin ve özellikle de kombinasyonun WISP1'in baskılanmasında oldukça etkin olduğunu göstermektedir.

7.3 NF-KB Yolağı

Yapılan çalışmalar BCR-ABL1 eksprese eden myeloid lösemilerde NF-kB yolağının aktive olduğunu göstermektedir (Ersvaer vd. 2007; Gasparini vd. 2014; Kagoya vd. 2014). Çalışmamızda kombinasyon uygulaması ICAM1, IFNG, STAT1,TNF gibi hücrelerin proliferasyonu ile pozitif korelasyon gösteren genlerin ekspresyonlarının anlamlı düzeyde baskılanmasını sağlamıştır.

7.4 JAK/STAT Yolağı

Kuersetin ve kurkumin kombinasyonu JAK/STAT yolağı ile ilişkili genler arasında sadece CEBPD ve SOC3 gen ekspresyonlarında değişime neden olmuştur. CEBPD apoptoz ve hücre proliferasyonunun regülasyonunda rol almaktadır (Gery vd. 2005). Lösemi hücrelerinin pek çoğunda, SOC3'ün anahtar rolü oynadığı fosforile-STAT3'ün aktive olduğu ve pek çok anti-apoptotik genin ekspresyonu aktive ettiği öngörülmektedir (Teramo vd. 2013). Çalışmamızda uyguladığımız kombinasyon özellikle lösemi hücrelerinde hücre proliferasyonu regülasyonu ile anti-apoptotik gen ekspresyonunda etkin olan gen ekspresyonlarının anlamlı düzeyde baskılanmasını sağlamıştır.

7.5 P53 Yolağı

Kombinasyon uygulaması BTG2, CDKN1A, FAS gen ekspresyonlarında anlamlı düzeyde artışa, PCNA gen ekspresyonunda anlamlı düzeyde azalışa neden olmuştur. BTG2 hücre döngüsünü kontrol eden genler arasında bulunmaktadır ve p53 tarafından regüle edilmektedir. Ancak kanser hücrelerinde hücre döngüsünün regülasyonunun bozulmasında rol alabilmektedir (Prevot vd. 2000). CDKN1A, siklin bağımlı kinaz inhibitörünün lösemi hücrelerinde ekspresyonunun azaldığı ve proliferasyonu desteklediği bilinmektedir (Watanabe vd. 2010). Kombinasyon uygulaması CDKN1A gen ekspresyonunun artışını sağlamıştır. Bunun yanı sıra, KML'de görülen ve kısa yaşam süresi ile ilişkilendirilen yüksek PCNA gen ekspresyonu kombinasyon uygulaması ile anlamlı düzeyde artmıştır. Son olarak hücre yüzeyinden apoptoz tetiklenmesini sağlayan FAS gen ekspresyonunun kombinasyon

uygulamasında anlamlı düzeyde artmış olması önceki çalışmamızda belirled iğimiz kombinasyon uygulaması ile artan apoptozu desteklemektedir.

7.6 NOTCH Yolağı

Kombinasyon uygulaması HES1, ID1 ve NOTCH1 gen ekspresyonlarında anlamlı düzeyde değişikliğe yol açmıştır. Bu yolak pek çok hücre tipinde hücre proliferasyonu ve diferansiyasyonu ile ilişkilidir ancak myeloid malignitelerde hem anti-tümöral hem de pro-tümöral rolünün olabileceği bildirilmektedir (Kato vd. 2015). Çalışmamızda kontrol grubundaki ekspresyonu düşük olan HES1 geninin kombinasyon uygulaması ile anlamlı düzeyde arttığı saptanmıştır. ID1 proteini hücre proliferasyonu ve canlılığı ile ilişkidir, pek çok benign ve malign tümörlerde yüksek ekspresyonu görülmektedir. Özellikle hematopoetik malignansilerde myeloid proliferatif hastalığın ilerlemesine katkıda bulunduğu belirtilmektedir (Wang vd. 2015). Kombinasyon uygulamasının KML hücrelerinde yüksek düzeyde bulunan ID1 gen ekspresyonunu anlamlı düzeyde baskıladığı saptanmıştır. NOTCH1, NOTCH yolağında görev alan ve hücre membranında bulunan transmembran proteinlerden biridir ve pek çok hematolojik malignanside hücre proliferasyonu/differensiasyonu ile ilişkili hücre içi sinyal yolaklarını etkilemektedir. Kombinasyon uygulaması NOTCH1 gen ekspresyonunu anlamlı düzeyde baskılamıştır.

7.7 Hedgehog Yolağı

Kombinasyon uygulamasının KML hücrelerinde BMP4, PTCH1 ve WNT5A gen ekspresyonlarında kontrole göre değişim oluşturduğu saptanmıştır. Son yıllardaki çalışmalarda BMP (bone morphogenetic protein) yolağının KML hastalarında normal donörlerden farklı düzeyde eksprese edildiği, osteoblast diferansiyasyonunda rol oynadığı ve baskılanmasının tedavide önemli bir hedef olabileceği belirtilmektedir (Toofan vd. 2014). Çalışmamızda kombinasyon uygulaması KML hücrelerinde ekspresyonu yüksek olan BMP4 gen ekspresyonunu anlamlı düzeyde baskılamıştır. İmatinib tedavisine direnç gösteren KML hastalarında PTCH1 ekspresyon düzeyinin önemli olduğu ve tedaviye yanıtın öngörülmesinde önemli bir belirteç olabileceği önerilmektedir (Alonso-Dominguez vd. 2015). Ayrıca, Hedgehog ligandının membrana bağlanmasının ardından, nükleusa sinyal ileti kaskadında yer alan PITCH1 ve WNT5 gen ekspresyonlarını kombinasyon uygulamasının anlamlı düzeyde azalttığı saptanmıştır.

7.8 PPAR Yolağı

Kombinasyon uygulaması ACSL4 geninde anlamlı değişim oluşturmuştur. ACSL4 endoplazmik retikulum stres ile indüklenen ve lipid metabolizmasında yer alan bir enzimin genidir. Literatürde solid tümörlerin bazılarında ekspresyonunun anlamlı artış, bazılarında ise azalış gösterdiği belirtilmekte ve hastaların yaşam süresini belirleyici olabileceği savunulmaktadır. (Chen vd. 2016). Ancak, KML hücreleri ile ilişkili bir veri literatürde bulunmamaktadır. Çalışmamızda KML hücrelerine kombinasyon uygulaması ACSL4 gen ekspresyonunu anlamlı düzeyde baskılamıştır.

7.9 Oksidatif Stres

Kombinasyon uygulaması GCLC, FTH1 ve TXN gen ekspresyonlarında anlamlı değişim oluşturmuştur. Hücrenin oksidatif strese karşı savunmasını sağlayan bir antioksidan olan glutatyonun, kanser hücrelerinde kemoterapi direnci için önemli bir regülatör olduğu kabul edilmektedir. Glutatyon sentezi, Glutamat sistein ligaz (GCL), GSH sentaz ve GSH redüktaz enzimleri ile sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. Bu enzimlerin tümü NRF2 transkripsiyon faktörü tarafından regüle edilmektedir. KML hücrelerine özgü bilgi bulunmamasına karşın akut myeloid lösemi hücrelerinde GSH metabolizması ilişkili pek çok enzimin yüksek düzeyde bulunduğu, GCLC ve glutatyon peroksidaz genlerinin *in vitro* knock-down edilmesinin lösemi hücrelerinin büyümesini engellediği belirtilmektedir (Pei vd. 2013). Bu nedenle, glutatyon metabolizması ile ilişkili genlerin baskılanmasının lösemi hücrelerinin büyümesini engelleyici olabileceği savunulmaktadır. Çalışmamızda kombinasyon uygulamasının GCLC gen ekspresyonunu arttırdığı, FTH1 ve TXN gen ekspresyonlarını baskıladığı belirlenmiştir. FTH1 ve TXN ekspresyon artışı çeşitli solid tümör tiplerinde belirlenmesine karşın lösemi hücrelerinde bu genlerin terapötik önemleri hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır. Bununla birlikte KML hücrelerinin oksidatif strese direncinin artmasını sağlayan bu genlerin baskılanması ile oksidatif strese dirençlerinin azalmasının tedaviye destek olabileceğini öngörmekteyiz.

7.10 Hipoksi

Kombinasyon grubunda ARNT, LDHA, SLC2A1, ve VEGFA ekspresyonlarında değişim belirlenmiştir. Kanser hücrelerinde Warburg etkisi ile aktive olan Myc, Ras, ve Akt genleri ve baskılanan tümör baskılayıcı genler sonucunda glukozun laktata dönüşümünün regülasyonu bozulmaktadır (Dang ve Semenza 1999; Hsu ve Sabatini 2008). Tümör hücrelerinin hipoksik koşullara adaptasyonu genellikle HIF-1 artışı ile karakterizedir. HIF1 hipoksi adaptasyonunda önemli bir transkripsiyon faktörü olmasının yanı sıra Laktat dehidrogenaz A (LDHA) enzim

geninin ekspresyonunu arttırmaktadır (Semenza vd. 1996). Tümör hücreleri için LDHA ekspresyonun baskılanmasının önemli olacağı belirtilmektedir (Le vd. 2010). KML hücrelerine kombinasyon uygulaması LDHA gen ekspresyonunu anlamlı düzeyde baskılamıştır. SLC2A1 KML hücrelerindeki ilaç direncinden sorumlu olduğu belirtilen yüzey glikoproteinini kodlayan genlerden biridir (Sun vd. 2014). Bunun yanı sıra, SLCA1'in glukoz transportunu kolaylaştırdığı malignant tümörlerde ekspresyonunun arttığı ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (Ramani vd. 2013). Çalışmamızda kombinasyon uygulaması SLCA1 gen ekspresyonunu anlamlı düzeyde baskılamıştır. Anjiogenez pek çok sitokin ve hücresel reseptörün indüklenmesini sağlayan oldukça kompleks bir süreçtir. VEGF ilk kez solid tümörlerde tanımlanmasına rağmen hematolojik malignitelerin patojenezi ile de ilişkili olduğu savunulmaktadır (Yancopoulos vd. 2000). VEGF'ün lösemik hücrelerin canlılığını ve büyümesini arttırdığı belirtilmektedir (Dias vd. 2001). Çalışmamızda KML hücrelerine uygulanan kombinasyonun VEGF gen ekspresyonunu anlamlı düzeyde baskıladığı saptanmıştır.

7.11 Sonuç

Kontrol hücreleri ile paralel olarak gerçekleştirdiğimiz çalışmamızda; kurkumin, kuersetin ve bu iki maddenin sinerjik etki gösterdikleri konsantrasyonlardaki kombinasyon uygulamasının KML hücrelerinin büyüme, canlılık ve ilaç direncine katkıda bulunan bir çok gen ekspresyonu üzerinde baskılayıcı etkisi olduğu gözlenmiştir. Bunun yanında, KML hücrelerinin proliferasyonu ve canlılığını sağlayan pek çok genin normal hücrelerde anlamlı değişim oluşturmadığı saptanmıştır. Ancak hemen belirtmeliyiz ki; elde edilen veriler maddelerin belirlenen dozlarında hücrelere 48 saat uygulamasını yansıtmaktadır. Henüz etkilenen genler ile ilişkili protein ekspresyonlarının incelenmemiş olması nedeni ile kesin bir yorum yapmak mümkün olmamakla birlikte, bulgularımız kurkumin-kuersetin kombinasyonunun özellikle p53, hücre döngüsü ve hücre canlılığı ile ilişkili genler üzerinde etkili olduğunu göstermekte ve önceki çalışmamızdan elde ettiğimiz verileri desteklemektedir. Bundan sonraki araştırmalarımızda kombinasyonun en etkin olduğu yolak/yolaklar üzerine yoğunlaştırarak gen ve protein düzeyindeki ekspresyonların paralel incelenmesini gerçekleştirmeyi hedefleyeceğiz. Böylelikle kurkumin-kuersetin kombinasyonunun KML'de alternatif bir tedavi yaklaşımı olma olasılığının değerlendirilebileceğini düşünmekteyiz.

8. KAYNAKLAR

Aggarwal, B.B., Kumar, A., Bharti, A.C. 2003. “Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies”, Anticancer Research, 23, 363-98.

Akhurst, R.J., Hata, A. 2012. “Targeting the TGF-beta signalling pathway in disease”, Nature Reviews Drug Discovery, 11, 790–811.

Alonso-Dominguez, J.M., Grinfeld, J., Alikian, M., Marin, D., Reid, A., Daghistani, M., Hedgley, C., O’Brien, S., Clark, R.E., Apperley, J., Foroni, L., Gerrard, G. 2015. “PTCH1 expression at diagnosis predicts imatinib failure in chronic myeloid leukaemia patients in chronic phase”, American Journal of Hematology, 90, 20–26.

Ammon, H.P.T., Wahl, M.A. 1991. “Pharmacology of Curcuma longa’’, Planta Medica, 57, 1–7.

Anuchapreeda, S., Limtrakul, P., Thanarattanakorn, P., Sittipreechacharn, S., Chanarat, P. 2006. “Inhibitory effect of curcumin on WT1 gene expression in patient leukemic cells”, Archives of Pharmacal Research, 29, 80-87.

Anuchapreeda, S., Thanarattanakorn, P., Sittipreechacharn, S., Tima, S., Chanarat, P., Limtrakul, P. 2006. “Inhibitory effect of curcumin on MDR1 gene expression in patient leukemic cells’’, Archives of Pharmacal Research 29, 866-873.

Assaf, Y. A., Domiano, A.E., Zotta, E., Ibarra, C., Kotsias, B. A. 2003. “CFTR in K562 leukemic cells’’, American Journal of Physiology-Cell Physiology, 285, 480-488.

Bischoff, S.C. 2008. “Quercetin: potentials in the prevention and therapy of disease’’, Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care, 11, 733-740.

Chen, W.-C., Wang, C.-Y., Hung, Y.-H., Weng, T.-Y., Yen, M.-C., Lai, M.-D. 2016. “Systematic analysis of gene expression alterations and clinical outcomes for long-chain acyl-coenzyme A synthetase family in cancer”, PLoS ONE, 11(5): e0155660. doi:10.1371/journal.pone.0155660

Chou, J. 1991. “Quantitation of synergism and antagonism of two or more drugs by computerized analysis. In Synergism and Antagonism in Chemotherapy’’ (Chou, T.-C. and Rideout, D.C., eds.) 223-244, Academic Press, San Diego.

Chu-Wen, Y., Chi-Lun, C., Hsin-Chen, L., Chin-Wen, C., Jia-Ping, P., Wen-Chin, Y. 2012. “Curcumin induces the apoptosis of human monocytic leukemia THP-1 cells via the activation of JNK/ERK Pathways’’, BMC Complementary and Alternative Medicine, 12:22.

Csokay, B., Prajda, N., Weber, G., Olah, E. 1997. “Molecular mechanisms in the antiproliferative action of quercetin’’, Life Sciences, 60, 2157–2163.

Dang C.V., Semenza G.L. 1999. “Oncogenic alterations of metabolism”, Trends in Biochemical Sciences, 24, 68–72.

Dias, S., Hattori, K., Heissig, B., Zhu, Z., Wu, Y., Witte, L., et al. 2001. “Inhibition of both paracrine and autocrine VEGF/VEGFR-2 signaling pathways is essential to

induce long-term remission of xenotransplanted human leukemias", Proceedings of National Academy of Sciences USA, 98, 10857 – 10862.

Ersvaer, E., Skavland, J., Ulvestad, E., Tore, B., Gjertsen, O., Bruserud O. 2007. "Effects of interferon gamma on native human acute myelogenous leukaemia cells", Cancer Immunology & Immunotherapy , 56, 13–24.

Fantini, M., Benvenuto, M., Masuelli, L., Frajese, GV., Tresoldi, I., Modesti A., Bei, R. 2015. "In vitro and in vivo antitumoral effects of combinations of polyphenols or polyphenols and anticancer drugs: perspectives on cancer treatment'', International Journal of Molecular Science, 24, 9236-9282.

Gasparini, C., Celeghini, C., Monasta, L., Zauli, G. 2014. "NF-κB pathways in hematological malignancies", Cell and Molecular Life Sciences, 71, 2083-2102.

Gery, S., Tanosaki, S., Hofmann, W.K., Koppel, A., Koeffler, H.P. 2005. "C/EBPdelta expression in a BCR-ABL-positive cell line induces growth arrest and myeloid differentiation", Oncogene, 24, 1589–1597.

Gibellini, L., Pinti, M., Nasi, M., De Biasi, S., Roat, R., Bertoncelli, L., Cossarizza, A. 2010. "Interfering with ROS metabolism in cancer cells: the potential role of quercetin'', Cancer, 2, 1288–1311.

Holder, G., Plummer, J. & Ryan, A. 1978. ''The metabolism and excretion of curcumin (1,7-Bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl-1,6-heptadiene- 3,5-dione) in the rat'', Xenobiotica, 8, 761-768.

Hollman, P.C., van Trijp, J.M., Buysman, M.N, van der Gaag, M.S., Mengelers, M.J., de Vries, J.H., Katan, M.B. 1997. "Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man'', FEBS Letters, 24, 152-156.

Hsieh M.-Y., Van Etten R.A. 2014. "IKK-dependent activation of NF-κB contributes to myeloid and lymphoid leukemogenesis by BCR-ABL1", Blood, 123, 2401–2411.

Hsu, P.P., Sabatini, D.M. 2008. "Cancer cell metabolism: Warburg and beyond", Cell, 134, 703–707.

Kagoya, Y., Yoshimi, A., Kataoka, K., Nakagawa, M., Kumano,K., Arai, S., Kobayashi, H., Saito, T., Iwakura, Y., Kurokawa, M. 2014. "Positive feedback between NF-κB and TNF-α promotes leukemia-initiating cell capacity", Journal of Clinical Investigation, 124, 528-542.

Kang, T., Liang, N. 1997. "Studies on the inhibitory effects of quercetin on the growth of HL-60 leukemia cells'', Biochemical Pharmacology, 54, 1013-1018.

Kato, T., Sakata-Yanagimoto, M., Nishikii, H., Ueno, M., Miyake, Y., Yokoyama, Y., Asabe, Y., Kamada, Y., Muto, H., Obara, N., Suzukawa, K., Hasegawa, Y., Kitabayashi, I., Uchida, K., Hirao, A., Yagita, A., Kageyama, R., Chiba, S. 2015. "Hes1 suppresses acute myeloid leukemia development through FLT3 repression", Leukemia, 29, 576–585.

Kuttan, R., Bhanumathy, P., Nirmala, K., George, M.C. 1985. "Potential anticancer activity of turmeric (Curcuma longa)'', Cancer Letters, 129, 197–202.

Lamson, D.W., MS, N.D., Brignall, M.S. 2000. “Antioxidants and Cancer III: Quercetin’’, Alternative Medicine Review, 5, 196-208.

Le, A., Cooper, C.R., Gouw, A.M., Dinavahi, R., Maitra, A., Deck, L.M., Royer, R.E., Vander Jagt, D.L., Semenza, G.L., Dang, C.V. 2010. “Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression”, Proceedings of National Academy of Sciences USA, 107, 2037–2042.

Lozzio, C.B., Lozzio B.B. 1975. “Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome’’, Blood, 45, 321-334.

Morand, C., Crespy, V., Manach, C., Besson, C., Demigne, C., Remesy, C. 1998. “Plasma metabolites of quercetin and their antioxidant properties’’, American Journal of Physiology, 275, 212–219.

Mukhopadhyay, A., Banerjee, S., Stafford, L. J., Xia, C., Liu, M., Aggarwal, B.B. 2002. “Curcumin-induced suppression of cell proliferation correlates with down-regulation of cyclin D1 expression and CDK4-mediated retinoblastoma protein phosphorylation’’, Oncogene, 21, 8852-8861.

Murtala, B.A., Wan, Z.A., Siti, A.S., Boon, S.A. 2014. “Polyphenols as key players for the antileukaemic effects of propolis’’, Evidence Based Complementary and Alternative Medicine, 2014, Article ID 371730, 11 pages.

Murzakhmetova, M., Moldakarimov, S., Tancheva, L., Abarova, S., Serkedjieva, J. 2008. “Antioxidant and prooxidant properties of a polyphenol-rich extract from Geranium sanguineum L. *in vitro* and *in vivo*’’, Phytotherapy Research, 22, 746-751.

Mutlu Altundağ, E. 2016. “Kronik myeloid lösemi hücrelerinde (K562) apoptotik süreç ve reaktif oksijen türleri arasındaki ilişkinin araştırılması”, Doktora Tezi, İstanbul.

Negi, P.S., Jayaprakasha, G.K., Jagan Mohan Rao, L., Sakariah, K.K., 1999. “Antibacterial activity of turmeric oil: a byproduct from curcumin manufacture’’, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47, 4297-4300.

Pei, S., Minhajuddin, M., Callahan, K.P. et al. 2013. “Targeting aberrant glutathione metabolism to eradicate human acute myelogenous leukemia cells,” Journal of Biological Chemistry, 288, 33542–33558.

Pokharel, M. 2012. “Leukemia: A review article’’, International Journal of Advanced Research in Pharmaceutical and Bio Sciences, 2, 397-407.

Prevot, D., Voeltzel, T., Birot, A.-M., Morel, A.-P., Rostan, M.-C., Magaud, J.-P., and Corbo, L. 2000. “The Leukemia-associated Protein Btg1 and the p53-regulated Protein Btg2 Interact with the Homeoprotein Hoxb9 and Enhance Its Transcriptional Activation”, Journal of Biological Chemistry, 275, 147–153.

Ramani, P., Headford, A., May, M.T. 2013. “GLUT1 protein expression correlates with unfavourable histologic category and high risk in patients with neuroblastic tumours”, Virchows Archives, 462, 203−209.

Reuter, S., Eifes, S., Dicato, M., Aggarwal, B.B., Diederich, M. 2008. “Modulation of antiapoptotic and survival pathways by curcumin as a strategy to induce apoptosis in cancer cells’’, Biochemical Pharmacology, 76, 1340-1351.

Sakao, K., Fujii, M., Hou, D.X. 2009. “Clarification of the Role of Quercetin Hydroxyl Groups in Superoxide Generation and Cell Apoptosis by Chemical Modification’’, Bioscience Biotechnology Biochemistry, 73, 2048-2053.

Semenza GL, et al. 1996. “Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1”, Journal of Biological Chemistry, 271, 32529–32537.

Sharma, O.P. 1976. “Antioxidant activity of curcumin and related compounds’’, Biochemical Pharmacology, 25, 1811–1812.

Sidhu, G.S., Singh, A.K., Thaloor, D., Banaudha, K.K., Patnaik, G.K., Srimal, R.C., Maheshwari, R.K. 1998. “Enhancement of wound healing by curcumin in animals’’, Wound Repair and Regeneration 6, 167–177.

Strimpakos, A.S., Sharma, R.A. 2008. “Curcumin: preventive and therapeutic properties in laboratory studies and clinical trials’’, Antioxidants and Redox Signaling, 10, 511-545.

Sun Z., S., Dong, J., Zhang, S., Hu, Z., Cheng,K., Li, K., Xu, B., Ye, M., Nie, Y., Fan, D., Zou, H. 2014. “Identification of chemoresistance-related cell-surface glycoproteins in leukemia cells and functional validation of candidate glycoproteins”, Journal of Proteome Research, 13, 1593−1601.

Teramo, A., Gattazzo, C., Passeri, F., Lico, A., Tasca, G., Cabrelle, A., Martini, V., Frezzato, F., Trimarco, V., Ave, E., Boscaro, E., Piazza, F., Facco, M., Trentin, L., Semenzato, G., Zambello, R. 2013. “Intrinsic and extrinsic mechanisms contribute to maintain the JAK/STAT pathway aberrantly activated in T-type large granular lymphocyte leukemia”, Blood, 121, 3843-3854.

Toda, S., Miyase, T., Arichi, H., Tanizawa, H., Takino, Y. 1985. “Natural antioxidants. III. Antioxidative components isolated from rhizome of Curcuma longa L’’, Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 33, 1725–1728.

Toofan, P., Irvine, D., Hopcroft, L., Copland, M., Wheadon, H. 2014. “The role of the bone morphogenetic proteins in leukaemic stem cell persistence”, Biochemical Society Transactions, 42, 809-815.

Wang, L., Man, N., Sun, X.-J., Tan, Y., Garcia-Cao, M., Liu, F., Hatlen, M., Xu, H., Huang, G., Mattlin, M., Mehta, A., Rampersaud, E., Benezra, R., Nimer, S.D. 2015. “Regulation of AKT signaling by Id1 controls t(8;21) leukemia initiation and progression”, Blood, 126, 640-650.

Watanabe,M., Nakahata, S., Hamasaki, M., Saito, Y., Kawano, Y., Hidaka, T., Yamashita, K., Umeki, K., Taki, T., Taniwaki, M., Okayama, A., Morishita, K. 2010. “Downregulation of CDKN1A in adult T-Cell leukemia/lymphoma despite overexpression of CDKN1A in human T-lymphotropic virus 1-infected cell lines”, Journal of Virology, 2010, 6966–6977.

Yancopoulos, G.D., Davis, S., Gale, N.W., Rudge, J.S., Wiegand, S.J., Holash, J. 2000. “Vascular-specific growth factors and blood vessel formation”, Nature, 407, 242-248.

Zhang, X., Chen, X., Liu, J., Dong, X., Jin, Y., Tian, Y., Xue, Y., Chen, L., Chang, Y., Liu, Y., Wang, J. 2015. “Knockdown of WISP1 inhibit proliferation and induce apoptosis in ALL Jurkat cells”, International Journal of Clinical and Experimental Pathology, 8, 15489-15496.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Prof. Dr. AHMET SUHA YALÇIN
Proje No:	215S184
Proje Başlığı:	Kurkumin, Kuersetin Ve Kurkumin-Kuersetin Kombinasyonunun Kronik Myeloid Lösemi Hücreleri Ile Normal Mononükleer Hücre Hatlarında Apoptotik Etkilerinin Ve Sinyal İleti Yolakları Ile İlişkisinin Araştırılması
Proje Türü:	1002 - Hızlı Destek
Proje Süresi:	12
Araştırmacılar:	AYŞE SEMRA KOÇTÜRK
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	MARMARA Ü. TIP F. TEMEL TIP BİLİMLERİ B. (İNGİLİZCE) BİYOKİMYA ABD.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/12/2015 - 01/12/2016
Onaylanan Bütçe:	29980.0
Harcanan Bütçe:	29807.0
Öz:	Kurkuminin birçok sinyal yolağını baskılayarak kanser hücre proliferasyonunu, anjiogenezi, metastazı, invazyonu ve inhibe ettiği bilinmektedir. Kurkumin ile kuersetinin birlikte kombinasyonunun kronik myeloid lösemi hücrelerinde apoptotik etkisini arttırdığını gösterdiğimiz tez çalışması bu projenin dayanağını oluşturmuştur. Bu projedeki amacımız RT-PCR array analizi ve kanser hücrelerinde etkin olan yolaklardan oluşmuş bir gen paneli kullanımı ile hangi sinyal ileti yolaklarının etkilendiğini kapsamlı bir şekilde değerlendirmek olarak belirlenmiş, bunun yanısıra normal mononükleer hücre hattı kullanılarak kombinasyonun normal hücreler üzerindeki etkisinin saptanması hedeflenmiştir. Kontrol hücreleri ile paralel olarak gerçekleştirdiğimiz çalışmamızda; kurkumin-kuersetin kombinasyon uygulamasının K562 hücrelerinin büyüme, canlılık ve ilaç direncine katkıda bulunan bir çok gen ekspresyonu üzerinde baskılayıcı etkisi olduğu gözlendi. Bunun yanında, bu hücrelerin proliferasyonunu ve canlılığını sağlayan pek çok genin normal hücrelerde anlamlı değişim oluşturmadığı saptandı. Bulgularımız kurkumin-kuersetin kombinasyonunun özellikle p53, hücre döngüsü ve hücre canlılığı ile ilişkili genler üzerinde etkili olduğunu göstermekte ve önceki verilerimizi desteklemektedir. Elde ettiğimiz sonuçların bu alanda yapılacak yeni araştırmalara ışık tutacağını ve ölüm oranı yüksek bir kanser türü olan kronik myeloid lösemi için etkin tedavi yöntemlerinin oluşturulmasına katkı yapacağını düşünmekteyiz.
Anahtar Kelimeler:	Kronik myeloid lösemi (KML), kuersetin, kurkumin, apoptoz, sinyal ileti
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır

TÜBİTAK