



**Resveratrolün Ph+ Akut Lenfoblastik Lösemide Terapötik
Potansiyeli ve Resveratrol Tarafından Tetiklenen
Apoptozda Seramid Metabolizmasının Rolü**

Program Kodu: 3001

Proje No: 315S248

Proje Yürütücüsü:
Dr. Öğr.Üyesi AYSUN ADAN

Danışman:

Prof. Dr. Yusuf BARAN

Bursiyer:

Osman OĞUZ

AĞUSTOS 2019

ANKARA



ÖNSÖZ

“Resveratrolün Ph+ Akut Lenfoblastik Lösemide Terapötik Potansiyeli ve Resveratrol Tarafından Tetiklenen Apoptozda Seramid Metabolizmasının Rolü” isimli TÜBİTAK tarafından desteklenen projemizde, Philadelphia kromozomu pozitif Akut lenfoblastik lösemi (Ph+ ALL) hücrelerinde resveratrolün olası anti-lösemik rolü özellikle seramid metabolizmasının kritik enzimlerinin hedeflenmesi ve BCR-ABL'nin regülasyonu ile ilişkilendirilerek literatürde ilk defa araştırılmıştır.



İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
ŞEKİL LİSTESİ.....	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	2
3. GEREÇ VE YÖNTEM	12
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	17
4.1 Resveratrol, SPT İnhibitörü (Miriosin), SK İnhibitörü (SKI II), GSS İnhibitörü (PDMP) ve Resveratrolün SKI II, PDMP ve Miriosin ile Kombinasyonunun SD1 ve SUP-B15 Ph+ ALL Hücrelerinin Proliferasyonu Üzerine Etkileri	17
4.2 Resveratrolün SKI II, PDMP ve Miriosin ile Kombinasyonları SD1 ve SUP-B15 Ph+ ALL Hücrelerinin Hücre Döngüsünü Etkilemektedir	28
4.3 Resveratrol ve SKI II, PDMP ve Miriosin ile Kombinasyonları SD1 ve SUP-B15 Ph+ ALL Hücrelerinde Seramid/S1F Dengesini Değiştirerek Apoptozu Düzenlemektedir	34
4.4 Ph+ ALL Hücrelerinde BCR-ABL İfadesinin Resveratrol, SKI II, PDMP, Miriosin ve Resveratrol: İnhibitör Kombinasyonları Tarafından Düzenlenmesi	55
5. SONUÇ	59
Kaynaklar	61

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Hedeflenen seramid metabolizması enzimleri ve kullanılan inhibitörler.....	12
Şekil 2. Resveratrol (a), SKI II (b), PDMP (c) ve Miriosinin (d) SD1 hücreleri üzerindeki zamana ve konsantrasyona bağlı sitotoksik etkileri.....	19
Şekil 3. Resveratrol (a), SKI II (b), PDMP (c) ve Miriosinin (d) SUP-B15 hücreleri üzerindeki zamana ve konsantrasyona bağlı sitotoksik etkileri.....	21
Şekil 4. Resveratrolün SKI II (a), PDMP (b) ve Miriosin (c) ile kombinasyonunun SD1 hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkileri.....	24
Şekil 5. Resveratrolün SKI II (a), PDMP (b) ve Miriosin (c) ile kombinasyonunun SUP-B15 hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkileri.....	26
Şekil 6. SD1 hücrelerinin, resveratrol, SKI II, PDMP, Miriosin, resveratrol:SK inhibitörü (a), resveratrol: GSS inhibitörü (b) ve resveratrol:SPT inhibitörü (c) kombinasyonları ile muamelesi sonucu hücre döngüsü fazlarında görülen değişimler.....	30
Şekil 7. SUB-P15 hücrelerinin, resveratrol, SKI II, PDMP, Miriosin, resveratrol:SK inhibitörü (a), resveratrol: GSS inhibitörü (b) ve resveratrol:SPT inhibitörü (c) kombinasyonları ile muamelesi sonucu hücre döngüsü fazlarında görülen değişimler.....	33
Şekil 8. Resveratrol (a), SKI II, PDMP, Miriosin, resveratrol:SK inhibitörü (b), resveratrol:SPT inhibitörü (c), ve resveratrol: GSS inhibitörü kombinasyonlarının (d) SD1 hücreleri üzerindeki apoptotik etkileri.....	38
Şekil 9. Resveratrol (a), SKI II, PDMP, Miriosin, resveratrol:SK inhibitörü (b), ve resveratrol: GSS inhibitörü (c) ve resveratrol:SPT inhibitörü (d) kombinasyonlarının SUP-B15 hücreleri üzerindeki apoptotik etkileri.....	42
Şekil 10. Resveratrol ile muamele edilen SD1 hücrelerinde SK-1/SK-2 (a), GSS (b) ve SPT (c) ifadesinde meydana gelen değişimler.....	47
Şekil 11. Resveratrol ile muamele edilen SUP-B15 hücrelerinde SK-1/SK-2 (a), GSS (b) ve SPT (c) ifadesinde meydana gelen değişimler.....	49
Şekil 12. Resveratrol, SPT, SK ve GSS inhibitörleri, resveratrol:SPT inhibitörü, resveratrol: SK inhibitörü ve resveratrol:GSS inhibitörü kombinasyonları ile muamele edilen SD1 (a) ve SUP-B15 (b) hücrelerinde sitokrom-c salınımı.....	51
Şekil 13. Resveratrol, SPT, SK ve GSS inhibitörleri, resveratrol:SPT inhibitörü, resveratrol: SK inhibitörü ve resveratrol:GSS inhibitörü kombinasyonları ile muamele edilen SD1 (a, b) ve SUP-B15 (c,d) hücrelerinde aktif Kaspaz-3 ve PARP ifadesinde meydana gelen değişimler.....	55
Şekil 14. Resveratrol, SPT, SK ve GSS inhibitörleri, resveratrol:SPT inhibitörü, resveratrol: SK inhibitörü ve resveratrol:GSS inhibitörü kombinasyonları ile muamele edilen SD1 (a) ve SUP-B15 (b) hücrelerinde BCR-ABL ifadesinde meydana gelen değişimler.....	58



ÖZET

Proje ile resveratrolün, Ph+ ALL hücreleri üzerindeki büyüme inhibe edici etkisinin arkasında yatan mekanizmalar, seramid metabolizmasının hedeflenmesi ve BCR-ABL ifadesindeki değişimler ile ilişkilendirilerek araştırılmıştır. Resveratrol, SK inhibitörü (SKI II), GSS inhibitörü (PDMP), SPT inhibitörü (Miriosin, Myriocin) ve resveratrol: inhibitör kombinasyonlarının *in vitro* olarak Ph+ ALL SD1 ve SUP-B15 hücreleri üzerindeki büyüme durdurucu ve apoptotik etkileri MTT hücre çoğalmas testi, Aneksin-V/PI boyaması, kaspaz-3, PARP ifadelerinin ve sitokrom c salınımının belirlenmesi (western blot) ile, sitostatik etki (hücre döngüsü üzerindeki) ise akım sitometresi (PI boyaması) ile araştırılmıştır. Resveratrol ve sfingolipid metabolizması enzimlerini hedefleyen inhibitör kombinasyonlarının BCR-ABL protein ifadesi üzerine etkisi western blot ile belirlenmiştir. Ayrıca, resveratrolün SPT, SK-1/2, GSS protein ifadeleri üzerindeki etkisi western blot ile belirlenmiştir. Her iki hücre hattında resveratrol ve SKI II ve PDMP ile kombinasyonları hücre büyümesini baskılamış, apoptozu tetiklemiş ve hücre döngüsünü S fazında tutmuştur. Resveratrol:Miriosin kombinasyonu ise hücre büyümesi ve hücre döngüsü üzerinde hücreye özgü etkiler gösterirken apoptozu her iki hücrede tetiklemiştir. Her iki hücre tipinde resveratrol ve kombinasyonları sitokrom-c salınımını, kaspaz-3 kesimini ve PARP kesimini genel olarak arttırmakla beraber hücreye özgü değişimler de saptanmıştır. Resveratrol her iki hücrede SK-1/SK2 ve GSS ifadesini azaltırken SPT ifadesini arttırmıştır. Resveratrol, SKI II ve PDMP BCR-ABL ifadesini azaltırken Miriosin arttırmıştır. Resveratrol: SKI II ve PDMP kombinasyonları BCR-ABL üzerinde artışlara neden olurken Miriosin ile kombinasyon BCR-ABL ifadesini azaltmıştır. Sonuç olarak, resveratrol seramid metabolizmasını ve BCR-ABL ifadesini düzenleyerek Ph+ ALL üzerinde hücre büyümesini baskılamış ve apoptozu tetiklemiştir.

Anahtar Kelimeler: Ph+ ALL, resveratrol, glukosil seramid sentaz, serin palmitoil transferaz, sfingozin kinase



ABSTRACT

In this project, it is aimed to identify potential mechanisms behind resveratrol-mediated growth inhibitory effects in association with targeting of sphingolipid metabolism and regulation of BCR-ABL on Ph⁺ ALL cells. To investigate the effect of treatment with resveratrol combined with the inhibitors of sphingolipid metabolizing enzymes, SK (SKI II), GCS (PDMP) and SPT (Myriocin), on Ph⁺ ALL SD1 and SUP-B15 cell growth inhibition and apoptosis *in vitro*, the cells were incubated with different concentrations of resveratrol and SK, GCS, SPT inhibitors alone and with the combinations of resveratrol and the inhibitors. The cell growth inhibition was evaluated using the MTT assay. Apoptosis was determined using Annexin V/propidium iodide double staining and measuring protein levels of caspase-3, PARP and cytochrome c release by western blot. Cytostatic effects (effects on cell cycle) of each agent alone and combinations were evaluated by PI staining. The effects of resveratrol on BCR-ABL, SPT, SK-1/2 and GCS protein expression, and its combinations on BCR-ABL protein expression were checked by western blot. In both cell lines, resveratrol and its combinations with SKI II and PDMP suppressed cell growth, induced apoptosis and caused cell cycle arrest at the S phase. However, resveratrol: Myriocin combination showed cell type specific effects on the cell growth and cell cycle progression while induced apoptosis in both cell lines. In general, resveratrol and its combinations triggered cytochrome-c release, caspase-3 and PARP cleavage, however, for some cases, there were cell specific responses. Resveratrol suppressed SK-1/2 and GCS protein expression while increased SPT expression. BCR-ABL expression decreased after resveratrol, SKI II and PDMP treatment, however, Myriocin caused increases. Resveratrol: SKI II and PDMP combinations increased BCR-ABL expression while resveratrol: Myriocin combination increased its expression level. In conclusion, resveratrol suppressed cell proliferation and induced apoptosis through targeting sphingolipid metabolism and modulating BCR-ABL expression.

Keywords: Ph + ALL, resveratrol, glucosyl ceramide synthase, serine palmitoyl transferase, sphingosine kinase

1. GİRİŞ

Akut lenfoblastik lösemi (ALL), lenfoblast öncü hücrelerinin aşırı miktarlarda üretilerek, kanda ve kemik iliğinde birikimi sonucu ortaya çıkan hematolojik bir hastalıktır. Çocukluk çağı lösemilerinin en sık görülen tipi ALL olup yetişkin lösemilerinin de yaklaşık %10'unu oluşturmaktadır. ALL, morfolojik, immünofenotipik, sitogenetik ve kromozomal analizlere göre alt tiplere ayrılmaktadır. ALL alt tipleri arasında ölüm oranı en yüksek olanı BCR-ABL proteininin ifade edildiği Philadelphia kromozom pozitif ALL (Ph + ALL)' dir. Philadelphia kromozomunun bulunması ALL için kötü prognozla ilişkilidir. Ph + ALL'nin tedavisinde standart kemoterapiye ek olarak BCR-ABL onkoproteinini hedef alan tirozin kinaz inhibitörleri (TKİ) kullanılmaktadır. Ancak, bu tedavilerle genel sağ kalım sadece birkaç yıl uzatılabilmekte ve tam remisyon sağlanamayarak hastaların yaklaşık %40'ı hayatını kaybetmektedir. Dolayısıyla, Ph+ ALL'de yeni ajanların araştırılması ve yeni hücre içi hedef moleküllerin belirlenmesi oldukça önemlidir.

Resveratrol (3,4',5-trihidroksi-trans-stilben) üzüm başta olmak üzere yer fıstığı ve yaban mersini gibi birçok farklı bitki türünde bulunan doğal bir fitoaleksindir. Literatürde resveratrolün antikarsinojenik potansiyeli ve sorumlu mekanizmaları birçok lösemi ve solid kanser türünde tanımlanmıştır. Ancak, resveratrolün Ph+ ALL tedavisindeki terapötik potansiyelinin ve etki mekanizmasının araştırıldığı herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Biyoaktif sfingolipidler hücrede büyüme, bölünme, metastaz ve apoptoz gibi hücrel işlevlerde önemli roller oynayan ve seramid, sfingozin-1-fosfat (S1F) ve glukozil seramid (GS) gibi önemli üyeleri içeren bir lipid ailesidir. Sfingolipidlerin kontrol ettiği fonksiyonlar, kanserin başlaması, ilerlemesi ve antikanser tedavilerine verilen yanıt ile doğrudan ilişkilidir. *De novo* sentez yolu (serin palmitoil transferaz (SPT) regülasyona tabi tutulan ana enzimdir) ile sentezlenen seramid, sfingolipid metabolizmasının merkezi molekülüdür ve apoptozun tetiklenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Seramidin, sfingozin kinaz (SK) enzimi aracılığı ile S1F'a ve/veya glukozil seramid sentaz enzimi (GSS) tarafından GS'e dönüştürülmesi ise kanser hücrelerinin proliferasyonunu tetiklemektedir. Dolayısıyla, seramid metabolizması (anabolizma/katabolizma) ve bu metabolik yolda görev alan SPT, SK ve GSS gibi enzimlerin regülasyonu terapötik öneme sahip olmaktadır.

Önerilen bu proje ile, resveratrolün Ph+ ALL deki terapötik potansiyeli seramid metabolizmasının hedeflenmesi ve hastalığın oluşumdaki sorumlu molekül olan BCR-ABL'nin regülasyonu ile ilişkilendirilerek araştırılmıştır. Bu proje ile resveratrol: SPT inhibitörü, resveratrol:SK inhibitörü ve resveratrol: GSS inhibitörü kombinasyonlarının Ph + ALL tedavisinde yeni bir yaklaşım olma potansiyelinde araştırılmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Akut lenfoblastik lösemi (ALL), lenfoblast adı verilen olgunlaşmamış öncü beyaz kan hücrelerinin aşırı proliferasyonu sonucu kanda ve kemik iliğinde birikmesiyle karakterize edilen malign bir hematolojik kanser türüdür (Onciu, 2009). ALL, çocukluk çağı kanserleri arasında en çok görüleni olmakla beraber (15 yaşından küçük çocuklarda görülen tüm kanser vakalarının %25'ini oluşturmaktadır) insidansı 2-5 yaşları arasında oldukça artmaktadır (>%90). Bununla beraber, yetişkinlerde görülme oranı daha düşüktür (tüm yetişkin lösemilerinin yaklaşık %9-10'nu oluşturmaktadır) (Bhojwani ve Pui, 2013). Morfolojik ve immünofenotipik analizler ALL'nin genel sınıflandırılmasında kullanılmakta ve temelde B-lenfoblastik lösemi (B-ALL) ve T-lenfoblastik lösemi (T-ALL) olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (McGregor vd., 2012). Dünya sağlık örgütünün (WHO) yaptığı sınıflandırmaya bakıldığında B-ALL'de belirli kromozomal anomalilerin bulunmasına bağlı olarak altgruplar belirlenmektedir (McGregor vd., 2012). Dolayısıyla, morfolojik ve immünofenotipik analizlere ilave olarak sitogenetik analizlerde oldukça önemlidir. ALL'de kromozomal bozuklukların olduğu karyotiplendirme, FISH veya moleküler teknikler kullanılarak saptanmıştır. B-ALL'de görülen kromozomal değişimler arasında hiperdiploidi, hipodiploidi, t(12;21) ve t(9;22) BCR-ABL gibi translokasyonlar bulunmaktadır. T-ALL'deki bozukluklar ise bazı genlerde meydana gelen aktive edici mutasyonlar ve transkripsiyon faktörlerini kodlayan genlerdeki yeniden düzenlemeler ile (rearrangement) karakterize edilmektedir (Mullighan, 2012). ALL'de risk gruplarının saptanması, en uygun tedavi stratejilerinin belirlenmesi açısından önem arz etmektedir. T-ALL, B-ALL ile karşılaştırıldığında genel olarak yüksek risk grubunda bulunmaktadır (McGregor vd., 2012). Ancak, çeşitli kromozomal anomaliler veya genetik değişimlerin saptanması B-ALL'de risk gruplarının oluşturulmasını gündeme getirmiştir. B-ALL'de görülen 4. ve 10. kromozomlardaki trizomiler ve t(12;21) gibi kromozomal bozukluklar iyi prognoz ile seyrederken (Moorman vd., 2010), t(9;22) BCR-ABL ve t(4;11) MLL-AF4 gibi anomaliler kötü prognoz ile ilişkilendirilmektedir (Moorman vd., 2010; Harrison vd., 2010; Aricò vd., 2010).

22. kromozom üzerinde yer alan BCR geni ile 9. kromozom üzerinde yer alan ABL geninin "t(9;22)" adı verilen özel bir translokasyon sonucu bir araya gelmesi ile "Philadelphia (Ph) kromozomu" oluşmaktadır. Ph kromozomu ilk olarak kronik myeloid lösemi (KML) hastalarında (yaklaşık %95'i bu kromozomu taşımaktadır) tanımlanmıştır (de Klein vd., 1982). Ph kromozomu anormal tirozin kinaz aktivitesine sahip BCR-ABL proteinini kodlayan BCR-ABL genine sahiptir ve bu füzyon proteini lösemi oluşumundaki temel moleküldür (Hantschel, 2012). Ph kromozomu KML'ye ek olarak, yetişkin ALL'nin yaklaşık %25'inde ve pediatrik ALL'nin ise %3-4'ünde rastlanmaktadır (Bernt ve Hunger, 2014). ALL hastalarında bu proteinin tespit edilmesi durumunda hastalık Philadelphia kromozomu pozitif ALL (Ph+ ALL)

olarak adlandırılmaktadır. Ph kromozomunun görülme sıklığı yaş ilerledikçe artmakta ve yaşlı ALL hastaların yaklaşık %50'sinde bu kromozomal bozukluğa rastlanmaktadır (Larson, 2006). Ph+ ALL'li hastaların, Ph- ALL ile karşılaştırıldığında, merkezi sinir sistemini tutan hastalıklara yakalanma riskine ve daha kötü bir klinik tabloya sahip oldukları bilinmektedir (Liu-Dumlao vd., 2012). BCR geni üzerindeki kırılma noktasının yerleşimine göre farklı büyüklüklerde BCR-ABL proteinleri meydana gelmektedir. Bu kırılma sonucu, 190 KDa büyüklüğünde meydana gelen BCR-ABL proteini (p190) Ph+ ALL'de sıklıkla görülmekte iken (B-ALL hastalarının üçte ikisinde), 210 KDa ağırlığındaki BCR-ABL (p210) ise Ph+ ALL hastalarının bir kısmında (B-ALL hastalarının 3'te birinde) ve neredeyse tüm KML hastalarında görülmektedir (Kelliher vd., 1991). Sürekli tirozin kinaz aktivitesine sahip olan BCR-ABL; PI3K, RAS, MAPK ve JAK/STAT gibi birçok sinyal yolağını aktive ederek hücrede büyüme ve çoğalmayı tetiklemekte ve apoptozu baskılamaktadır (Naka vd., 2011). Bu yolaklar KML'de etkin olmakla beraber Ph+ ALL'de sıklıkla görülen 190 KDa ağırlığındaki BCR-ABL'ninde bazı yolaklarda görev alan proteinlerle etkileşime geçmek için gerekli bölgeler ve kinaz aktivitesini muhafaza ettiği saptanmıştır (Bernt ve Hunger, 2014). JAK 1-3 ve STAT 1, 3, 5 ve 6'nın p190 tarafından aktive edildiği deneysel olarak ispatlanmıştır (Ilaria ve Van Etten, 1996). Ph + ALL'de rolü olduğu kanıtlanan diğer sinyal yolağı ise PI3K-AKT-MTOR'dür. PI3K'in delesyonu sonucu Ph + ALL'nin mürin modelinde lösemi oluşumunun inhibe edildiği saptanmıştır. Aynı zamanda, PI3K/MTOR inhibitörünün Ph + ALL hastalarında etkili olduğu gösterilmiştir (O'Hare vd., 2005).

ALL'nin tedavisinde çoklu ilaç kemoterapisi uygulanmaktadır. Bu tedavi yaklaşımının en büyük yan etkisi çok fazla ilaç kombinasyonunun kullanımından kaynaklanan toksisitedir ve özellikle yaşlı hastalarda toksik etkiden kaynaklanan problemler oldukça ciddi boyuttadır (Pieters ve Carroll, 2010). B-ALL'nin alt grubu olan Ph + ALL'de ise standart kemoterapi ile iyi sonuç alınamamakta ve diğer genetik ve kromozomal anomaliler ile karşılaştırıldığında kötü prognoz ile seyretmektedir (Milone ve Enrico, 2009). Yoğunlaştırılmış kemoterapi ile yetişkin hastaların % 50-80'inde tam cevap alınmasına rağmen uzun vadede elde edilen sonuç hastalığın nüks etmesi sebebi ile oldukça kötüdür ve genel sağkalım yaklaşık %10'dur (Ohno, 2006). BCR-ABL proteininin kinaz aktivitesini inhibe eden tirozin kinaz inhibitörlerinin (TKİ) geliştirilmesi ve KML'de oldukça iyi sonuçlar alınması TKİ'lerinin Ph + ALL'de de uygulanabilirliğini gündeme getirmiştir (Yanada vd., 2009). İlk geliştirilen TKİ olan imatinibin tek başına uygulandığı faz I ve faz II çalışmalarında, yeni tanı konmuş, relaps görülen veya refraktör Ph + ALL hastalarında tolere edilebilir bir toksisite ve orta ölçekli bir antilösemik etki saptanmasına rağmen imatinibe verilen cevap süreklilik arz etmemektedir (Druker vd., 2001; Ottmann vd., 2002). Ayrıca, hastalarda gelişen TKİ direncide tedavinin önündeki kısıtlayıcı engel olmaya devam etmektedir (Fielding ve Zakout, 2013; Pfeifer vd., 2007). İkinci

jenerasyon TKİ'ü olan dasatinibin, imatinib dirençli veya intoleransı bulunan Ph+ ALL hastalarında kullanımı hali hazırda Food and Drug Administration (FDA) tarafından onaylanmış ve imatinibe göre nispeten daha iyi sonuçlar vermekle beraber mevcut kemoterapi yaklaşımları ile beraber kombine uygulandığı faz çalışmaları devam etmektedir (Liu-Dumlao vd., 2012). Faz çalışmalarından elde edilen sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda hastalığın, özellikle direnç gelişimine neden olan yeni klinik mutasyonlar nedeniyle nüks ediyor olması (relaps) en önemli mortalite sebebinin oluşturmaktadır (Chiaretti ve Foà, 2016). Özellikle, birinci ve ikinci jenerasyon TKİ' lerinin etkisiz kaldığı T315I mutasyonuna sahip hastalarda üçüncü jenerasyon TKİ olan ponatinib önemli gelişmeler göstermesine rağmen kardiyovasküler toksisite gösteriyor olması çözüm bekleyen bir problemdir (Short vd., 2017). Tüm bu nedenlerden dolayı, Ph+ ALL'de tam tedaviye ulaşmak oldukça zordur. Dolayısıyla, yeni ajanların saptanması ve güncel yaklaşımlarla birlikte hedeflenebilecek yeni hücre içi yolakların belirlenmesi ve literatüre kazandırılması oldukça önemlidir.

Sfingolipidler hücre membranının önemli bileşenlerinden olup çoğalma, büyüme, bölünme, yaşlanma, apoptoz, metastaz ve invazyon gibi birçok hücreyel olayda önemli fonksiyon göstermektedirler (Truman vd., 2014). Bu gruba ait, seramid ve S1F gibi moleküller, özellikle kanser metabolizmasında, biyoeftör olarak iş görmekte ve çeşitli sinyal yolakları ile etkileşimleri sonucu hücreyi apoptoza, çoğalmaya veya metastaza yönlendirmektedirler (Ogretmen ve Hannun, 2004). Seramid, sfingolipid metabolizmasının merkezi molekülüdür ve birçok tedavi yaklaşımı sonucunda hücre içinde miktarı artan seramidin apoptoz, yaşlanma, büyümenin durdurulması ve farklılaşma gibi hücreyel etkileri olduğu gösterilmiştir (Truman vd., 2014). Daha önce gerçekleştirilen bir çok çalışmada, kemoterapötik tedaviler sonucu meydana gelen seramidin antiproliferatif ve apoptotik etkiye sahip olduğu dolayısıyla tümör baskılayıcı bir lipid olarak fonksiyon gösterdiği belirlenmiştir (Reynolds vd., 2002; Morad ve Cobat, 2012). Bununla beraber, seramidin farklı enzimler tarafından başka lipid moleküllerine dönüştürülmesi sonucunda hücre içindeki miktarının azaldığı ve bunun bir çok kanser türünde ilaç direncinin gelişmesindeki önemli mekanizmalardan biri olduğu gösterilmiştir (Giussani vd., 2014). Seramid, *de novo* yol izi, salvage (kazanım) yolağı ve/veya sfingomiyelinin (SM) sfingomiyelinazlar tarafından hidrolizlenmesi sonucu oluşmaktadır (Pewzner-Jung vd., 2006; Adan-Gokbulut vd., 2013). Ancak, *de novo* ve sfingomiyelinaz yol izleri şüana kadar en fazla çalışılanlarıdır (Truman vd., 2014).

De novo seramid sentez yolağında rol alan ve regülasyona tabi tutulan anahtar enzimlerden biri serin palmitoil transferaz (SPT)'dir. SPT, *de novo* yolağının ilk basamağında L-serin ve palmitoil Koenzim A'dan 3-keto-sfinganin'in sentezinden sorumludur. Oluşan sfinganin seramid sentaz (SerS) enzimi tarafından dihidro seramide dönüştürülür. Dihidro seramid,

dihidro seramid desaturaz enzimi tarafından seramide çevrilir (Şekil 1) (Adan-Gokbulut vd., 2013; Ponnusamy vd., 2010). Etoposid ile muamele edilen MOLT-4 ALL hücrelerinde SPT aktivitesinin artmasına bağlı olarak hücre içi seramid konsantrasyonunun arttığı ve apoptozun tetiklendiği gösterilmiştir (Perry vd., 2000). SPT'ın farmakolojik inhibitörü (Miriosin) ile muamele edilen T-hücre lösemi ve lenfomasında arsenik trioksit tarafından tetiklenen hücre ölümünün ortadan kaldırıldığı saptanmıştır (Dbaibo vd., 2007). Gustafsson ve arkadaşları (Gustafsson vd., 2009) kannabinoid ile muamele edilen mantle hücreli lenfoma hücrelerinde tetiklenen hücre ölümünün, SPT'ın inhibe edilmesi sonucu baskılandığını göstermiştir. SPT'ın inhibisyonu kannabinoid tarafından arttırılan hücre içi seramid miktarının azalmasına neden olmuştur. BCR-ABL pozitif KML hücrelerinde tirozin kinaz ABL'nin serin palmitoil transferaz uzun zincir 1 (SPTLC1) alt birimini tirozin 164 rezidüsünden fosforilleyerek inaktifleştirdiği ve hücrelerin çoğalmasını indüklediği gösterilmiştir. BCR-ABL'nin imatinib veya siRNA ile susturulması sonucunda bu fosforilasyon ortadan kalkmış ve aktif hale gelen SPTLC1 hücrelerde apoptozu tetiklemiştir (Taouji vd., 2013). Serin palmitoil transferaz uzun zincir 2 (SPTLC2)'nin ifadesinin adenovirus transfeksiyonu ile arttırılması sonucu hepatokarsinom hücrelerinde hücre içi seramid miktarının arttığı ve kaspaz aracılı apoptozun tetiklenerek hücre canlılığın azaldığı saptanmıştır (Maeng vd., 2017). Yeni yayınlanan bir çalışmada, merkel hücreli karsinomda SPT'ın Miriosin ile inhibisyonu sonucu hücre içi seramid konsantrasyonu azalmasına rağmen hücrelerde nekroz, kaspaz-3 ve PARP aktifleşmesi ve AKT^{S473} fosforilasyonunda azalma saptanarak hücrelerin canlılığında inhibisyon görülmüştür. In vivo fare modelinde de, SPT'ın inhibisyonu sonucu tümörde gerileme saptanmıştır (Bhat vd., 2019). Melanoma hücrelerinde ve mürin modelinde yapılan çalışmada SPT'ın Miriosin ile inhibisyonu sonucu hücrelerde G2/M fazı tutulumu görülmüş ve hücre çoğalması baskılanmıştır (Lee vd., 2011; Lee vd., 2012). Bütün bu çalışmalar ışığında SPT inhibisyonunun farklı kanser türlerinde farklı mekanizmalar aracılığı ile hücre çoğalmasını azaltmak veya arttırmak yönünde etki gösterdiği anlaşılmaktadır. Seramid sentezinden, SPT ve SerS enzimleri sorumlu olmakla birlikte SerS ayrıca sfingozinden seramidin yeniden sentezinde (salvage yolağı) sorumludur (Şekil 1) (Gustafsson vd.,2009). Dolayısıyla, SerS hem *de novo* hem de salvage yol izinde rol alırken SPT sadece *de novo* yolağında aktivite gösterdiğinden dolayı bu proje kapsamında hedeflenmiştir.

Seramid bir kere sentezledikten sonra hızlı bir şekilde sfingozin veya GS gibi başka lipidlere dönüştürülür. Oluşan sfingozinin sfingozin kinaz (SK-1 ve SK-2 olmak üzere iki izoformu bulunmaktadır) tarafından S1F'a dönüştürülmesi kanser hücrelerinde seramid tarafından indüklenen apoptozun geri çevrilmesini ve hücrelerin proliferasyonunu sağlamaktadır (Ogretmen ve Hannun, 2004; Pruett vd., 2008). Dolayısıyla, seramid proapoptotik etki gösteren bir molekül iken S1F antiapoptotik ve hücre proliferasyonunu tetikleyen bir

moleküldür. Birçok kanser tipinde seramid ve S1F arasındaki denge hücrenin ölüm yada yaşam arasında karar vermesi açısından önem arz etmektedir (Segui vd., 2006). SK tarafından oluşturulan S1F, S1FR1-5 adı verilen G-protein-bağlı reseptörlere bağlanarak hücrenin büyümesi, çoğalması ve göçünü tetikleyen sinyal yollarını aktive etmektedir (Pyne vd., 2012). SK-1'in çeşitli kanser türlerinde rolünü araştıran bir çok çalışma gerçekleştirilmiştir. Kanser hücrelerinde (mide, akciğer, meme, prostat, kolon ve non-hodkings lenfoma) SK-1 ifadesinin mRNA ve/veya protein düzeyinde arttığı ve bununda hücrelerin büyüme ve çoğalmasını sağladığı bilinmektedir (Vadas vd., 2008; Pyne ve Pyne, 2010). Östrojen reseptör pozitif meme kanseri hastalarında SK-1 ifadesinin artması düşük yaşam oranı ile ilişkili olarak bulunmuştur (Watson vd., 2010). NK (natural killer)-büyük granüllü lenfositik lösemi hastalarında SK-1'in aşırı ifade edildiği ve buna bağlı olarak serumda S1F seviyesinin arttığı belirlenmiştir (LeBlanc vd.,2015). Kronik lenfositik lösemi (KLL) hastalarından alınan KLL hücrelerinde sağlıklı hücreler ile karşılaştırıldığında SK-1 ifadesinin artmış olduğu ve KLL hücrelerinin çoğalmasına ve hastalığın klinik tablosuna katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Almejún vd., 2017). Primer Akut miyeloid lösemi (AML) blastlarında SK-1 seviyesinin arttığı, SK-1 inhibisyonunun AML hücre hatlarında, primer AML blastlarında ve hastalardan izole edilen AML progenitör/kök hücrelerinde kaspaz aracılı apoptozu tetiklediği belirlenmiştir (Powel vd., 2017). Aynı çalışmada, hastalardan elde edilen blastlar ile oluşturulan AML fare modelinde, SK-1 inhibisyonu sonucu SK-1/S1FR2/MCL1 (antiapoptotik Bcl-2 ailesi üyesi) sinyalizasyonunun engellenerek genel sağkalımın arttığı saptanmıştır. SKI-178 inhibitörünün hem SK-1/SK-2'yi hemde mikrotübül dinamiklerini etkileyerek AML hücrelerinde ve fare modelinde apoptozu tetiklediği bilinmektedir (Hengst vd., 2017). SK-1 inhibitörü olan Safingol'un bir yeşilçay polifenolu olan EGCG'nin etkisini sinerjistik olarak apoptozu tetikleyerek arttırdığı gösterilmiştir (Tsukamoto vd., 2017). Yeni yayınlanan bir çalışmada, SK-1'in B-ALL'de terapötik bir hedef olarak değerlendirilebileceği ilk defa gösterilmiştir (Wallington-Beddoe vd., 2019). Bu çalışmada, ALL'de SK-1 ifadesinin arttığı ve SK-1 geninin genetik olarak silinmesi sonucu özellikle BCR-ABL tarafından tetiklenen Ph+ ALL fare modelinde gerileme görüldüğü gösterilmiştir. Diffüz büyük B hücreli lenfomada SK-1'in ifadesinin arttığı ve SK-1 ürünü olan S1F'in S1FR1 aracılı sinyal yolağını aktifleştirerek anjiyogenezi tetiklediği gösterilmiştir (Lupino vd., 2019). Merkel hücreli karsinomda SK-1/2'nin farmakolojik inhibisyonu sonucu hücre içi seramid konsantrasyonu artarken hücrelerde nekroz, kaspaz-3 ve PARP aktifleşmesi ve AKT^{S473} fosforilasyonunda azalma saptanarak hücrelerin canlılığında inhibisyon görülmüştür. In vivo fare modelinde de, SK-1/2'nin inhibisyonu sonucu tümörde gerileme saptanmıştır (Bhat vd., 2019). Öte yandan, SK-1 ifadesinin artmasının tedaviye karşı geliştirilen direnç ile ilişkili olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (Watson vd., 2010; Baran vd., 2007). İmatinib dirençli K562 KML hücrelerinde

SK-1 ve S1F seviyelerinin hassas hücelere göre arttığı belirlenmiştir (Baran vd., 2007). SK-1'in genetik veya farmakolojik inhibitörler kullanılarak hedeflendiği bir çok çalışmada kanser hücrelerinin proliferasyonunun baskılandığı, hücrelerin apoptoza sürüklendiği ve tedaviye karşı geliştirilen direncin kırıldığı gösterilmiştir. SK-1 ifadesinin arttığı belirlenen nilotinib dirençli KML hücrelerinde SK inhibitörü:nilotinib kombinasyonunun sinerjik apoptotik etki gösterdiği ve nilotinib direncinin kırıldığı belirlenmiştir (Camgöz vd., 2013). Kemoterapi dirençli gastrik kanser hücrelerinde ve hasta dokularında SK-1 ifadesinin ve S1F seviyesinin arttığı ve SK-1 inhibitörü ile muamele edilen gastrik kanser hücre hatlarında direncin aşıldığı saptanmıştır (Matula vd., 2015). Ayrıca, SK-1 inhibitörü:sisplatin kombinasyonunun sinerjistik etki gösterdiği belirlenmiştir. Öte yandan, KML'den sorumlu olan BCR-ABL'nin regülasyonunda ve TKİ direncinin gelişiminde, SK-1/S1F/S1FR2 yolağının önemi ve bu yolak aracılığı ile aktiveleştirilen protein fosfataz 2A (PP2A)'nın module edilmesi ile BCR-ABL'nin stabilizasyonunun azaldığı ve ilaç dirençliliğinin ortadan kalktığı literatürde gösterilmiştir (Salas vd., 2011). Paklitaksel dirençli PC3 prostat kanseri hücrelerinde hassas hücreler ile karşılaştırıldığında S1F miktarının arttığı, bu durumda SK-1 ifadesinin artmasıyla ilişkili olduğu saptanmıştır (Aoyama vd., 2017). Etoposid dirençli retinoblastoma hücrelerinde S1F miktarının artarak hücrelerin sağkalımına katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Kakkassery vd., 2019).

Glukozil seramid sentaz (GSS), seramidin glukozil seramid (GS)'e dönüşümünden sorumlu enzimdir (Adan-Gokbulut vd., 2013). Birçok çalışmada, GS'in kanser hücrelerinin büyümesini tetiklediği ve ilaç direncinin kazanılmasında önemli rolü olduğu gösterilmiştir (Li vd., 2000; Lucci vd., 1998). Dolayısıyla, GS, tıpkı S1F gibi seramid ile tamamen zıt fonksiyon gösteren antiapoptotik bir lipiddir. GSS'in farmakolojik inhibitörler ile hedeflenmesi sonucu kanser hücrelerinde çoğalmanın durduğu ve apoptozun tetiklendiği, kemoterapiye karşı kazanılan direncin ise ortadan kalktığı gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada, PDMP (GSS inhibitörü) ile muamele edilen T315I mutasyonuna sahip dirençli KML hücrelerinde TKİ'lerine karşı duyarlılığın arttığı ve GSK-3 yolağının aktif hale gelmesi ile apoptozun tetiklendiği saptanmıştır (Huang vd., 2011). Aktif p53'ye sahip insan glioma hücrelerinde, PDMP muamelesi hücre içi seramid konsantrasyonlarını arttırarak kaspaz yolağını aktiveleştirmiş ve apoptozu tetiklemiştir (Hara vd., 2004). Paklitaksel dirençli PC3 prostat kanseri hücrelerinde hassas hücreler ile karşılaştırıldığında GSS ifadesinin artmasının paklitaksel direnci ile ilişkili olduğu, GSS inhibitörleri (PDMP ve PPMP) ile hücreler muamele edildiğinde hücre içi seramid miktarının arttığı ve dirençli hücrelerin çoğalmasının baskılandığı gösterilmiştir (Aoyama vd., 2017). MCF-7 meme kanseri hücrelerinde GSS geninin ifadesinin arttırılması neticesinde, GS aracılı AKT ve ERK1/2 sinyal yolaklarının aktiveleşerek MDR1 (Multi Drug Resistance Gene 1) ve antiapoptotik proteinlerin ifadesini arttırdığı saptanmıştır (Wegner vd.,

2018). Sorafenib dirençli hepatokarsinoma hücrelerinde GSS ifadesinin arttığı, farmakolojik veya genetik olarak inhibe edilen GSS'in ise hücreleri sorafenibe hassas hale getirdiği bilinmektedir (Stefanovic vd., 2016). Bu çalışmada PDMP ve sorafenib kombinasyonu sonucu sitokrom c salınımının artması ve ATP yetersizliğinin ortaya çıkması sonucu hücre ölümü görülmüştür. Pankreas kanseri hücrelerinde, PDMP'nin MEK/ERK inhibitörü olan AZD-6244'e karşı hücreleri hassaslaştırdığı saptanmıştır (Wang vd., 2015). NK lösemi hücrelerinde C6-seramid nanolipozomları ile birlikte verilen PPMP GSS inhibitörünün sinerjistik olarak hücre içindeki seramid miktarını artırarak mitokondriyal yol izi üzerinden apoptozu tetiklediği bilinmektedir (Watters vd., 2013). PDMP'nin antiapoptotik Bcl-2 protein inhibitörü olan ABT-263 ile kombinasyonunun lösemi hücrelerinde apoptotik lipidler olan seramid ve sfingozin miktarını arttırdığı ve kaspaz-3'ü aktifleştirerek apoptozu tetiklediğini gösterilmiştir (Casson vd., 2013). KLL hücrelerinde hücrelerin proliferasyonunda önemli rol oynayan B hücre reseptörünün (BCR), seramidin GSS'e modifikasyonunu destekleyerek hücrelerin sağ kalımına katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Schwamb vd., 2012). Dasatanib ile muamele edilen Meg-01 KML hücrelerinde GSS ifadesinin azalarak hücrelerin çoğalmasının baskılandığı gösterilmiştir (Gencer vd., 2011). Fludarabin dirençli KLL hücrelerinde hassas MEC-2 KLL hücreleri ile karşılaştırıldığında GSS ifadesinin artması neticesinde hücre içi seramid miktarının azalmasına bağlı olarak apoptozun baskılandığı ve hücre çoğalmasının tetiklendiği ve ayrıca hücrelerin lösemi kök hücresi benzeri özellik kazandığı saptanmıştır (Huang vd., 2018). Bu projede, Ph+ ALL hücrelerinde seramidin S1F veya GS'e dönüştürerek hücre çoğalmasını indükleyebilecek olan SK-1/2 ve GSS enzimleri farmakolojik olarak hedeflenmiştir. Ayrıca, SPT, SK-1/2 ve GSS enzimlerinin inhibisyonu sonucu BCR-ABL'nin ifadesinde meydana gelen olası değişiklikler incelenmiştir.

Terapötik değere sahip çok sayıda biyolojik olarak aktif maddenin bitkilerden elde edildiği bilinmektedir. Resveratrol (3,5,4'-trihidroksi-trans-stilben) üzüm, yer fıstığı ve yaban mersini başta olmak üzere çok sayıda bitki türünde bulunan ve kemopreventif/kemoterapötik özellikleri gösterilmiş olan doğal bir polifenol'dür (Kundu ve Surh, 2008). Resveratrolün, hücre büyümesi, bölünmesi, apoptoz, anjiyogenez ve metastaz gibi hücrel olayları kontrol eden sinyal yollarını modüle ederek karsinogenezin çeşitli safhalarını etkilediği bilinmektedir (Shukla ve Singh, 2011). Resveratrolün tetiklediği apoptoz mekanizmaları kanser türlerinde farklılık göstermekle beraber literatürde çeşitli hematolojik kanser türlerinde detaylı olarak gösterilmiştir (Frazssi ve Tigano, 2012). K562 KML hücrelerinde resveratrolün PI3K/protein kinaz B/mTOR yolağını inhibe ederek, ayrıca kaspaz-3 aktivitesini arttırarak ve siklin D1 ifadesini azaltarak hücre çoğalmasını durdurduğu belirlenmiştir (Sui vd., 2014). Resveratrol ile muamele edilen 232B4 KLL hücrelerinde kaspaz-3 enzim aktivitesinin arttığı ve hücre siklusunun G0/G1 fazında bir tutulma meydan geldiği tarafımızca belirlenmiştir

(Gokbulut vd., 2013). Ayrıca, resveratrolün imatinib hassas ve dirençli K562 KML hücrelerindeki terapötik potansiyeli kaspaz-3 aktivitesinin artışı, mitokondri membranında meydana gelen bozulmalar ve apoptozun tetiklenmesi ile ilişkilendirilmiştir (Can vd., 2012). Adriamisin dirençli HL60 APL hücrelerine resveratrol adriamisin ile beraber verildiği hücrelerde PI3K/Akt/Nrf2 yolağının ve MRP1 ifadesinin azalarak direncin geri çevrildiği gösterilirken (Li vd., 2019), dirençli K562 KML hücrelerinde lizozomal katepsin D salınımının artması sonucu otofajik apoptozun tetiklenerek direncin kırıldığı gösterilmiştir (Zhang vd., 2018). AML hücrelerinde resveratrolün IL-6 tarafından aktif hale getirilen sonik-hedgehog sinyal yolağının inhibe etmesi sonucu hücre canlılığının inhibe olduğu saptanmıştır (Su, vd., 2013). Resveratrolün çeşitli ALL tiplerindeki etki mekanizmalarının araştırıldığı çalışmalar olmakla beraber (Ghorbani vd., 2015; Ge vd., 2013; Zunino ve Storms, 2006) yüksek riskli Ph + ALL tedavisindeki terapötik potansiyelinin ve etki mekanizmasının araştırıldığı çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu çalışmalardan birinde resveratrol B-ALL hücrelerinde PTEN ifadesini arttırmış ve p-AKT and p-ERK1/2 ifadesini azaltarak hücre proliferasyonunu durdurmuştur (Ghorbani vd., 2015). Ge ve arkadaşları (Ge vd., 2013) resveratrol ile muamele edilen T-ALL hücrelerinde p21 ve p27'nin ifadesinin arttığını, siklin A ve D'nin ifadesinin azaldığını ve sonuç olarak G0/G1 fazında tutulma meydana geldiğini göstermişlerdir. Ayrıca, antiapoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinin ifadesi azalırken apoptotik üyelerin ifadesi artmıştır. Yeni yayınlanan bir çalışmada, CCRF-CEM T-ALL hücre hattında resveratrolün artan konsantrasyonlarının ve prednisolon'un YKL-40 geninin ifadesi azaltarak terapötik etki gösterebileceği ifade edilmiştir (Zadi Heydarabad vd., 2019). Aynı grup, resveratrolün T-ALL'de apoptotik Bax gen ifadesini arttırıp anti-apoptotik Bcl-2 gen ifadesini azaltarak apoptozu tetiklediğini ve gen ifadelerindeki bu değişikliğin promoter bölgedeki olabilecek DNA metilasyonundan bağımsız olduğunu göstermişlerdir (Zadi Heydarabad vd., 2018). MOLT-4 T-ALL hücrelerinde ABT-737 (BH3 mimetik) ile birlikte uygulanan resveratrolün sinerjistik etki göstererek DNA hasarını arttırdığı, hücre siklusunda bozulmalara neden olduğu, p53 seviyesini ve Bax/Bcl-2 oranını arttırdığı saptanmıştır (Opydo-Chanek vd., 2017). T-ALL TALL-104 ve B-ALL SUP-B15 hücrelerinde miR-196b ve miR-1290 ifadelerinin arttığı, IGFBP3 (Insulin-like growth factor binding protein 3, lösemi gelişimi ile ters orantılı olduğu bilinmektedir) ifadesinin ise azaldığı gösterilmiştir. Resveratrol muamelesi sonucu miRNA'ların ifadesi azalırken IGFBP3 ifadesini arttırarak etki gösterdiği belirtilmiştir (Zhou vd., 2017). Zunino ve arkadaşları tarafından yüksek riskli t(4;11) B-ALL fare modeli üzerinde yapılan çalışmalarda, *in vitro* çalışmalarının aksine, resveratrolün hücrelerin büyümesini inhibe etmediği ve diyet içinde verilen resveratrolün vinkristine karşı cevabı arttırmadığı, hücrelerin büyümesini inhibe etmediğini göstermişlerdir (Zunino vd., 2012a, 2012b). Lösemi türleri ile karşılaştırıldığında resveratrol solid kanser türlerinde daha yaygın bir şekilde

çalışılmaktadır ve çok sayıda çalışma literatüre kazandırılmıştır. Yuan ve arkadaşları (Yuan vd., 2015) resveratrol ile muamele edilen kolon kanseri hücrelerinde hücre çoğalmasının durdurulduğunu ve apoptozun tetiklendiğini *in vitro* ve *in vivo* modellerde göstermişler ve bunun BMP9/p38 MAPK yolunun aktivasyonu ile ilişkilendirmişlerdir. Temozolamide karşı direnç gösteren malign glioma hücrelerinde resveratrol'un Wnt yolağını baskılayarak hücreleri hassaslaştırdığı Yang ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (Yang vd., 2019). Resveratrolün osteosarkoma kanser kök hücrelerinde JAK2/STAT3 yolağını inhibe ederek paralelinde CD133 kanser kök hücresi yüzey belirteci ifadesini azalttığı gösterilmiştir (Peng ve Jiang, 2018). İnsan meme kanserinde, resveratrol muamelesi sonucu TGF- β 1 aracılı epitel-mezenkimal dönüşümün bloklandığı ve *in vivo* kanser modelinde akciğere metastazın engellendiği gösterilmiştir (Sun vd., 2019). Literatürden de anlaşıldığı üzere resveratrol farklı kanser türlerinde, farklı etki mekanizmaları üzerinden etki gösteren pleiyotropik bir moleküldür.

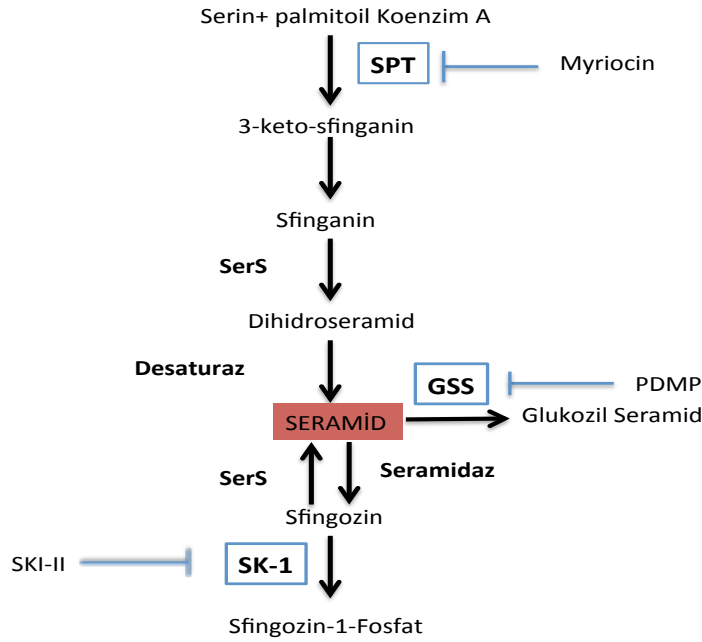
Son yıllarda resveratrolün literatürde gösterilen çok sayıda etki mekanizmasına ilave olarak sfingolipid metabolizmasını düzenleyerekde terapötik potansiyele sahip olabileceğini gösteren birçok veri bulunmaktadır. Resveratrolün seramid miktarını artırarak seramid aracılı apoptozu tetiklediği meme kanserinde gösterilmiştir (Minutolo vd., 2005). Resveratrolün metastatik meme kanseri ve kolon kanseri hücreleri üzerindeki apoptotik etkilerinin *de novo* seramid sentez yolağının aktivasyonu ile olduğu ve SPT'ın inhibe edilmesi sonucu bu etkinin geri döndüğü bilinmektedir (Scarlati vd., 2003; Ulrich vd., 2007). Gastrik kanser hücrelerinde resveratrolün dihidroseramid sentez enziminin aktivitesini azalttığı ve dihidroseramid miktarını artırarak apoptozu tetiklediği saptanmıştır (Shin vd., 2012). MCF-7 meme kanseri hücrelerinde resveratrolün SK-1 aktivitesini inhibe ettiği, dolayısıyla seramid/S1F dengesini seramid yönünde kaydırarak apoptozu tetiklediği belirlenmiştir (Lim vd., 2012). Gastrik kanseri hücrelerinde, resveratrol muamelesi dihidroseramid miktarını artırarak otofajiyi tetiklemektedir (Signorelli vd., 2009). OVCAR-3 ovaryum kanseri hücrelerinde, resveratrol ve seramidin birlikte veya birbiri ardına verilerek kemopreventif veya kemoterapötik ajan olarak kullanılabilirliği gösterilmiştir (Lin vd., 2013). Bu çalışmada hem resveratrol hemde seramidin ERK1/2 yolağını aktive ederek apoptozu tetiklediği belirtilmiştir.

Nazofarenks kanser hücrelerinde, resveratrol SPT aktivitesinin artmasına paralel olarak hücre içinde anormal miktarda seramid birikimine ve endoplazmik retikulum (ER) stresine neden olmuştur. Sonuç olarak, ER ilişkili kaspaz 12 ve apoptotik CHOP aktivasyonu sonucu apoptoz tetiklemiştir (Chow vd., 2014). Wang ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ilk defa resveratrol tarafından indüklenen seramid, B16 melanoma hücrelerinde koruyucu otofajiyi tetikleyerek hücre ölümünden koruduğu gösterilmiştir (Wang vd., 2014). HTC116 kolon kanseri hücrelerinde resveratrol seramid miktarını artırırken S1F seviyesini azaltmıştır

(Mizutani vd., 2016). Son zamanlarda çıkan bir çalışmada, aşırı lipid yüklü statüde (obezite ile bağlantılı risk faktörü) bulunan karaciğer kanseri hücrelerinde resveratrolün sfingolipid metabolizması üzerindeki etkileri gösterilmiş ve kısmen koruyucu etkisi olabileceği belirtilmiştir. Bu çalışmada, resveratrol seramid, sfingozin ve sfinganin ve ilgili *de novo* seramid sentezi yolunda görevli olan enzimlerin ifadelerini arttırmıştır (Charytoniuk vd., 2018).

Bununla beraber, resveratrolün sfingolipid metabolizması ile ilgili etki mekanizmalarının lösemi türlerinde araştırıldığı sadece birkaç çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan birinde, resveratrol muamelesi sonucu HL60 akut promyelositik lösemi (APL) ve K562 KML hücrelerinde SerS genlerinin ifadesinin arttığı, SK-1 ve GSS ifadesinin azaldığı bulunmuştur. Ayrıca, PDMP:resveratrol ve SK-1 inhibitörü:resveratrol kombinasyonlarının hem APL hemde KML'de sinerjistik apoptotik etki gösterdiği saptanmıştır (Çakır vd., 2011; Kartal vd., 2011). Tian ve arkadaşları (Tian vd., 2015) resveratrolün, K562 KML hücrelerinde SK-1 inhibitörü ile birlikte uygulandığında sinerjistik apoptotik bir etki sağladığını göstermişlerdir. K562 KML hücrelerinde resveratrol seramid miktarını ve ASMaz'ın (Asit Seramidaz)'ın transkripsiyonel ifadesini arttırırken S1F seviyesini azaltmıştır (Mizutani vd., 2016).

Literatürden bildiğimiz kadarıyla, resveratrolün Ph+ ALL'de terapötik potansiyelinin araştırıldığı ve seramid metabolizmasında meydana gelen değişimlerin resveratrol aracılı apoptozda olası rolünün incelendiği herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu proje ile, resveratrolün Ph+ ALL hücrelerindeki anti-lösemik etkisinin moleküler sinyal yolları seramid metabolizmasında görev alan anahtar enzimlerin hedeflenmesi ve BCR-ABL ifadesinde meydana gelen değişimlerin saptanması ile ilişkilendirilerek araştırılmıştır. Ayrıca, resveratrolün SK, SPT ve GSS enzimlerinin ifadesi üzerindeki etkisinde incelenmiştir.



Şekil 1: Seramid Metabolizması

Şekil 1. Hedeflenen seramid metabolizması enzimleri ve kullanılan inhibitörler.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Kimyasallar: Resveratrol (Sigma Aldrich), SPT inhibitörü (Miriosin (Myriocin), Cayman Chemical), SK inhibitörü (SKI II, Cayman Chemical) ve GSS inhibitörü (PDMP, Cayman Chemical) için stok solüsyonları üretici firma tarafından belirtildiği üzere dimetilsülfoksit (DMSO) içinde hazırlanmış ve -20°C'de muhafaza edilmiştir. Belirlenen çalışma konsantrasyonları ana stok ve/veya gerekli olduğu durumlarda ana stok kullanılarak hazırlanan ara stoklardan hazırlanmıştır.

Hücre Hatları ve Kültür Koşulları: Çalışmada iki farklı Ph+ ALL (BCR-ABL'i ifade eden) hücre hattı (SD-1 ve SUP-B15) kullanılmıştır. Bu hücreler DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell cultures)'den temin edilmiştir. Hücreler %10-20 fetal dana serumu (FBS) ve %1 penisilin-streptomisin içeren RPMI 1640 (+ L-glutamin, Gibco™) besiyerinde, 37°C sıcaklık ve %5 CO₂ ortamında karbondioksit inkübatöründe üretilmişler ve her 2-3 günde bir pasajlanmışlardır.

MTT Testi: Resveratrol, SPT, SK ve GSS inhibitörlerinin SD-1 ve SUP-B15 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla MTT hücre proliferasyon testi kullanılmıştır (Adan ve Baran, 2015; Adan ve Baran, 2016). Ayrıca yine MTT testi ile resveratrol:SPT inhibitörü, resveratrol:SK inhibitörü ve resveratrol:GSS inhibitörü kombinasyonlarının SD-1 ve SUP-B15 hücreleri üzerindeki büyümeyi baskılayıcı etkileri belirlenmiştir. Bu amaç

doğrultusunda, tripan mavisi ile hücre canlılığı kontrol edildikten ve thoma lamı kullanılarak hücreler sayıldıktan sonra kuyucuk başına SD-1 hücreleri için 10.000, SUP-B15 hücreleri için ise 20.000 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara ekimler yapılmış ve ilgili ajanların artan konsantrasyonları eklenerek 48 ve 72 saat boyunca inkübe edilmiştir. SD-1 ve SUP-B15 hücreleri için uygulanan resveratrol, SK (SKI II), GSS (PDMP) ve SPT (Miriosin) inhibitörleri konsantrasyonları sırayla şu şekildedir: 10-, 20-, 40-, 60-, 80-, 100 μ M; 0.25-, 0.5-, 1-, 2.5-, 5-, 10-, 20 μ M; 0.25-, 0.5-, 1-, 2.5-, 5-, 10-, 20-, 40 μ M ve 1-, 5-, 10-, 20-, 40-, 80-, 100 nM'dir. İnkübasyon sonunda her bir kuyucuğa 20 μ l MTT reaktifi (5 mg/mL, Sigma Aldrich) eklenmiş ve 4 saat, 37°C'de ve %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edilmiştir. 96-kuyucuklu tabaklar 558 x g'de 10 dk santrifüjlenmiş ve oluşan formazan kristalleri 100 μ l DMSO ile çözüldükten sonra, formazan yoğunlukları, spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda okunmuştur. Spektrofotometrik sonuçlara göre hücre çoğalma grafiği oluşturulmuş ve resveratrol için IC₅₀ (hücre büyümesini %50 oranında inhibe eden konsantrasyon), PDMP ve SK inhibitörleri için ise IC₁₀₋₂₀ (hücre büyümesini %10-20 oranında inhibe eden konsantrasyon) hesaplanmıştır. Belirlenen konsantrasyonlarda hücre çoğalmasında Miriosin tek başına çok etki göstermediğinden dolayı her iki hücre hattı içinde Miriosinin 100 nM konsantrasyonu ile çalışmalar yapılmıştır. IC₁₀ konsantrasyonlarının bu enzimlerin inhibe edilmesi için ve seramid birikimini sağlamaları için yeterli olduğu literatürde gösterilmiştir (Baran vd., 2007). Sonuç olarak, ilgili ajanların ve kombinasyonların (resveratrolün artan konsantrasyonları + PDMP veya SK inhibitörlerinin IC₁₀₋₂₀ değerleri, resveratrolün artan konsantrasyonları ve SPT inhibitörü en yüksek konsantrasyon) ilgili hücreler üzerindeki sitotoksik etkileri belirlenmiştir. Kombinasyon deneylerinde SD-1 hücrelerine, resveratrolün 10-, 20-, 40 μ M konsantrasyonları SKI II 2.5 μ M, PDMP 10 μ M ve Miriosinin 100 nM ile birlikte uygulanmıştır. SUP-B15 hücrelerinde ise resveratrolün artan konsantrasyonları (5- ve 10 μ M), SKI II 1.0 μ M, PDMP 1.0 μ M ve Miriosinin 100 nM konsantrasyonları ile kombine edilerek uygulanmıştır. Tüm hücre çoğalması deneylerinde (tekli ve kombinasyon), SD1 ve SUP-B15 hücreleri için birbirinden bağımsız zamanlarda üç farklı hücre proliferasyon testi gerçekleştirilmiştir ve sonuçlar bu üç ayrı setin ortalaması olarak verilmiştir. Birbirinden bağımsız zamanlarda gerçekleştirilen deney setlerinde ise her bir konsantrasyon için üç farklı kuyucukta çalışılmıştır.

Apoptozun Akım Sitometresi ile Aneksin-V/Propidyum İyodür İkili Boyama Yöntemi ile Belirlenmesi: Resveratrol, SPT, SK ve GSS inhibitörleri, resveratrol:SPT inhibitörü, resveratrol: SK inhibitörü ve resveratrol:GSS inhibitörü kombinasyonları ile muamele edilen SD-1 ve SUP-B15 hücrelerinde fosfatidil serinin miktarı ve yerleşimi AneksinV–Propidyum İyodür (PI) (BioVision, Inc.) ikili boyama yöntemi yardımıyla akım sitometrisi ile belirlenmiştir (Adan ve Baran, 2015; Adan ve Baran, 2016). 1×10^6 /2ml hücre belirlenen resveratrol, SPT,

SK ve GSS inhibitörleri, resveratrol:SPT inhibitörü, resveratrol: SK-1 inhibitörü ve resveratrol:GSS inhibitörü kombinasyonları ile 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 652 x g'de 10 dk santrifüjlenerak toplanan hücreler soğuk 1X PBS ile 2 kez yıkanmıştır. Daha sonra 200 µl Anneksin bağlama solüsyonu eklenerek homojenize edilmiştir. Elde edilen hücre süspansiyonunun üzerine 2 µl Anneksin V ve 2 µl propidyum iyodür eklenmiş ve 15 dk oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edilmiştir. Ardından, akım sitometrisinde (BD) ölçümler gerçekleştirilmiştir. SD-1 hücrelerine resveratrol (10-, 20-, 40 µM), SKI II (1-, 2.5- ve 5 µM), PDMP (10-, 20-, 40 µM), Miriosin (40-, 80-, 100 nM) ve resveratrolün 10-, 20-, 40 µM konsantrasyonlarının SKI II 2.5 µM, PDMP 10 µM ve Miriosinin 100 nM ile kombinasyonu uygulanmış ve aneksinV-PI boyaması yapılmıştır. SUP-B15 hücrelerinde ise resveratrolün artan dozları (5-, 10 µM), SKI II 1 µM, PDMP 1 µM, Miriosin 100 nM ile birlikte uygulanmıştır.

Hücre Siklusu Analizi: Resveratrol, SPT, SK ve GSS inhibitörleri, resveratrol:SPT inhibitörü, resveratrol: SK inhibitörü ve resveratrol:GSS inhibitörü kombinasyonları ile muamale edilen SD-1 ve SUP-B15 hücrelerinde hücre döngüsü analizleri akım sitometrisi kullanılarak yapılmıştır (Adan ve Baran, 2015; Adan ve Baran, 2016). 1×10^6 /2ml hücre belirlenen resveratrol, SPT, SK ve GSS inhibitörleri, resveratrol:SPT inhibitörü, resveratrol: SK inhibitörü ve resveratrol:GSS inhibitörü kombinasyonları ile 48 saat inkübe edildikten sonra 260 g'de 10 dk santrifüjlenerak toplanmıştır. Hücre pelletleri 1 ml soğuk PBS ile iki defa yıkanmış ve üzerlerine 4 ml soğuk etanol eklenmiştir. Hücreler en az 24 saat süreyle -20°C dondurucuda bekletilmişlerdir. 260 g'de 10 dk santrifüjlenerak elde edilen hücre pelleti 5 ml soğuk PBS'te homojenize edilmiş ve santrifüjlenmiştir. Pellet 1 ml PBS-Triton X100 içerisinde çözülerek üzerlerine 100 µl RNase-A (200 µg/ml, Sigma Aldrich) eklenmiş ve 30 dk boyunca 37°C 'de inkübe edilmiştir. Ardından 100 µl propidyum iyodür (1mg/ml, Sigma Aldrich) eklenmiş ve oda sıcaklığında 10-15 dk boyunca bekletilmiştir. Hücre döngüsü analizi akım sitometrisi ile gerçekleştirilmiştir. SD-1 hücrelerine resveratrol (20 µM), SKI II (2.5 µM), PDMP (10 µM), Miriosin (100 nM) ve 20 µM resveratrol'ün SKI II 2.5 µM, PDMP 10 µM ve Miriosinin 100 nM ile kombinasyonu uygulanmıştır. SUP-B15 hücrelerinde ise resveratrolün artan dozları (5-, 10 µM), SKI II 1 µM, PDMP 1 µM, Miriosin 100 nM ile birlikte uygulanmıştır.

Western Blot Analizi: Resveratrol, SPT, SK ve GSS inhibitörleri, resveratrol:SPT inhibitörü, resveratrol: SK inhibitörü ve resveratrol:GSS inhibitörü kombinasyonları ile muamele edilen SD-1 ve SUP-B15 hücrelerinde apoptozun moleküler belirteçleri olan kaspaz-3 ve PARP proteinlerinde meydana gelen değişimler western blot ile saptanmıştır (Baran vd., 2007). 4×10^6 SD1 hücresi, 20- ve 40 µM resveratrol, 2.5 µM SKI II, 10 µM PDMP, 100 nM Miriosin, 20 µM resveratrol + 2.5 µM SKI II, 40 µM resveratrol + 10 µM PDMP, 20 µM resveratrol +100 nM Miriosin ile, 4×10^6 SUP-B15 hücresi ise 5- ve 10 µM resveratrol, 1 µM SKI II, 1 µM

PDMP, 100 nM Miriosin, 10 µM resveratrol + 1 µM SKI II, 10 µM resveratrol + 1 µM PDMP, 10 µM resveratrol +100 nM Miriosin ile 48 saat muamele edildikten sonra hücrelerden proteinaz inhibitörü içeren RIPA tamponu (Sigma Aldrich) kullanılarak total protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir ve toplam protein konsantrasyonları (mg/ml) RC DC™ Protein Assay (BioRad) kiti kullanılarak ve kit içeriğinde önerilen protokole bağlı kalınarak hesaplanmıştır.

RİPA tamponu ile protein izolasyon protokolü şu şekildedir:

- Hücreler belirlenen konsantrasyonlardaki resveratrol ve resveratrol:inhibitor konsantrasyonları ile 48 saat muamele edilmiştir.
- Hücreler 15 ml'lik tüplerde toplandıktan sonra 4°C, 3200 x g'de 5 dk santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırmıştır. Hücreler 1X soğuk PBS ile yıkandıktan sonra 4°C, 3200 x g'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Bu işlem iki kez tekrar edilmiştir.
- İkinci yıkamadan sonra pellet üzerine soğuk 150 µl RIPA tamponu eklendikten sonra pipetleme ve vorteks işlemleri yapılmıştır. Ardından 1ml'lik enjektörlerle 10-15 kez çekip bırakma işlemi yapılarak liziz gerçekleştirilmiş ve buzun üzerinde 25-30 dk bekletilmiştir. Bekleme süresinin ardından RIPA buffer içerisinde olan hücreler 4°C, 135 x g'de 15 dk santrifüj edilmiş ve izole edilmiş proteinler -20 veya -80°C' de saklanmıştır.

Her bir hücre grubu için belirlenen ve yukarıda belirtilen konsantrasyonlarda resveratrol, SKI II, PDMP, Miriosin ve resveratrolün ilgili inhibitörler ile kombinasyonları ile muamele sonucu elde edilen toplam proteinden 30 µg örnek olacak şekilde jelle yüklenmiş ve jelde yürüyen proteinler PVDF membrana transfer edilmiştir. Proteinlerin membrana transferinden ve PVDF membranda özgün olmayan bağlanmalar bloke edildikten sonra kaspaz-3, PARP, BCR-ABL ve internal pozitif kontrol olarak Beta Aktin proteinlerine özgü antikolar ile inkübe edilmiş ve sonrasında yıkama aşamaları gerçekleştirilmiştir. Membranların ikincil antikor ve kromojenik substrat ile inkübasyonu sonrasında ise hedeflenen proteinlerin miktarları tespit edilmiştir. Benzer şekilde resveratrol ile muamele edilen SD-1 ve SUP-B15 hücrelerinde SPT, SK-1/2 ve GSS proteinleri bu proteinlere özgü antikolar kullanılarak western blot ile kontrol edilmiştir.

Western Blot Protokolü

- Her bir örnek için 30 µg/40 µl protein, 2X laemni tamponunda (Santa Cruz Biotechnology) 95°C'de 5 dk kaynatılarak denatüre edildikten sonra hedef proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre hazırlanan farklı yoğunluklardaki jellerin kuyucuklarına

yüklenmiştir. Proteinlerin moleküler ağırlığını belirlemek üzere PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific™) kullanılmıştır.

- Jel 100 V'da 80 dk yürütülmüştür ve metanol içinde active edilen PVDF membranlara transfer (Trans-Turbo, BioRad) 25V, 1A, 30 dk' da gerçekleştirilmiştir.
- Membran % 5 yağsız süt tozu veya BSA (Bovin Serum Albumin) içeren 1X TBST (Tris-buffered saline, % 0.1 Tween 20)'te 1 saat oda sıcaklığında bloklanmıştır .
- Kaspaz-3 (Cell Signaling), PARP (Cell Signaling), BCR-ABL (Cell Signaling), SK (Cell Signaling), SPT (Novus Biologicals), GSS (Novus Biologicals) ve internal pozitif kontrol olarak Beta Aktin (Cell Signaling) proteinlerine özgül birincil antikolarlar 1:2000 dilusyon olacak şekilde % 5 yağsız süt tozu ile hazırlanan 1X TBST içerisinde hazırlanmıştır ve membran bir gece +4°C de bekletildikten sonra birincil antikolar ile uyumlu ikincil antikolar (Jackson Immuno Research) 1:10.000 oranında (%5 yağsız süt tozu içeren 1X TBST) uygulanmıştır. Pierce™ ECL Western Blotting Substrate kiti (Thermo Scientific™) kullanılarak görüntüleme yapılmıştır (Bio-Rad, ChemiDoc). İmmünreaktif bantların densitometrik analizleri görüntüleme cihazının kendi programı kullanılarak analizlenmiştir (Bio-Rad, Image Lab™ 3.0).

Sitokrom-c Salınımı: Mitokondri iç membranı ile dış membranı arasında lokalize olan sitokrom c'nin sitozole salınımı apoptozun önemli belirteçlerinden biridir. Sitozoldeki sitokrom-c, Apaf-1 ile kompleks oluşturarak kaspaz-9'u aktif hale getirir. Aktifleşen kaspaz-9 ise kaspaz-3'ü aktifleştirir. Sitokrom-c salınımını saptamak amacıyla, resveratrol, SPT, SK ve GSS inhibitörleri, resveratrol:SPT inhibitörü, resveratrol: SK inhibitörü ve resveratrol:GSS inhibitörü kombinasyonları ile muamele edilen SD-1 ve SUP-B15 hücrelerinden mitokondri açısından zenginleştirilmiş fraksiyonlar elde edilmiştir. Bunun için sitokrom-c salınımı apoptoz kiti kullanılmıştır (BioVision, Inc.). Sitozoldeki sitokrom-c miktarını saptamak için kit içinde bulunan sitokrom-c'ye özgü antikolar kullanılarak western blot yapılmıştır. 10⁷ SD-1 ve SUP-B15 hücresi belirtilen konsantrasyonlarda 48 saat muamele edildikten sonra kitde yer alan metot takip edilerek mitokondriyal sitozolden zenginleştirilmiştir. Hem sitozolik hemde mitokondriyal fraksiyonlardan 15µg/40 µl protein detayları açıklanan western blot yöntemi ile anti-sitokrom-c (1:100) antikoru kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

İstatiksel Analizler: Deneyler, birbirinden bağımsız üç set halinde gerçekleştirilmiştir ve sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. Deneylerin istatiksel analizleri GraphPad Prism 6.0 programı kullanılarak yapılmıştır. MTT deneyinin analizleri için tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA: one way analysis of variance), hücre siklusu analizi ve aneksin-V/PI analizlerinde ise iki-yollu varyans analizi (two-way ANOVA) yapılarak deney setleri karşılaştırılmıştır. P<0.05'ten küçük olması istatiksel olarak anlamlı olarak kabul

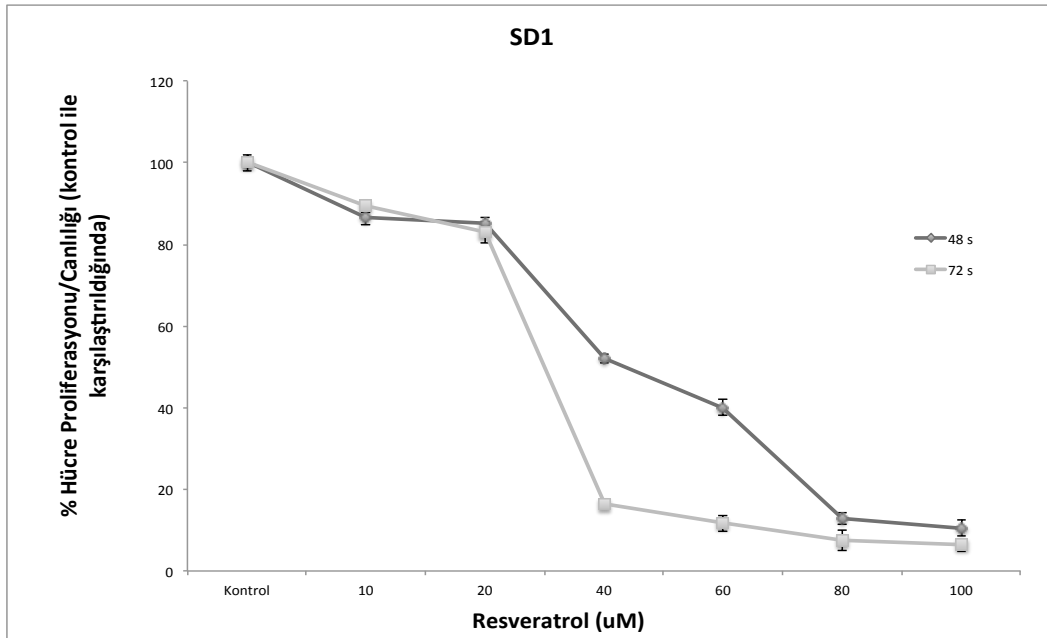
edilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

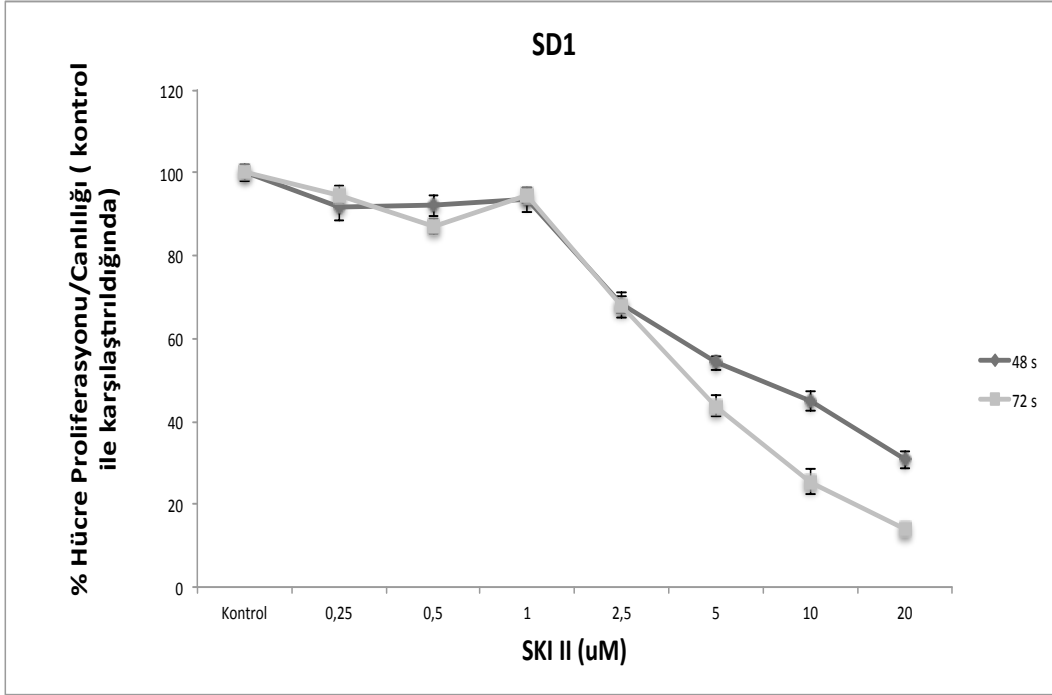
4.1 Resveratrol, SPT İnhibitörü (Miriosin), SK İnhibitörü (SKI II), GSS İnhibitörü (PDMP) ve Resveratrolün SKI II, PDMP ve Miriosin ile Kombinasyonunun SD1 ve SUP-B15 Ph+ ALL Hücrelerinin Proliferasyonu Üzerine Etkileri

Hücre proliferasyon testi sonuçlarına göre resveratrol (Şekil 2a ve 3a), SKI II (Şekil 2b ve 3b) ve PDMP (Şekil 2c ve 3c)'nin zaman ve konsantrasyona bağlı olarak hücreler üzerinde sitotoksik etki gösterdiği görülmektedir. Hücre çoğalma verileri kullanılarak IC_{50} konsantrasyonları SD1 hücreleri için 48 ve 72 saat için sırasıyla 43- ve 37 μ M (Resveratrol, Şekil 2a), 6.6- ve 4.5 μ M (SKI II, Şekil 2b), 36- ve 25 μ M (PDMP, Şekil 2c) olarak hesaplanmıştır. Benzer şekilde SUP-B15 hücreleri için IC_{50} konsantrasyonları 48 ve 72 saat için sırasıyla 37- ve 20 μ M (Resveratrol, Şekil 3a), 4.5- ve 2.3 μ M (SKI II, Şekil 3b), 32- ve 18 μ M (PDMP, Şekil 3c) olarak hesaplanmıştır. Diğer taraftan, Miriosinin hücrelerin çoğalması üzerine zamana ve konsantrasyona bağlı olarak inhibe edicinin az olduğu veya bulunmadığı gösterilmiştir ve IC_{50} değerine ulaşamamıştır (Şekil 2d ve 3d).

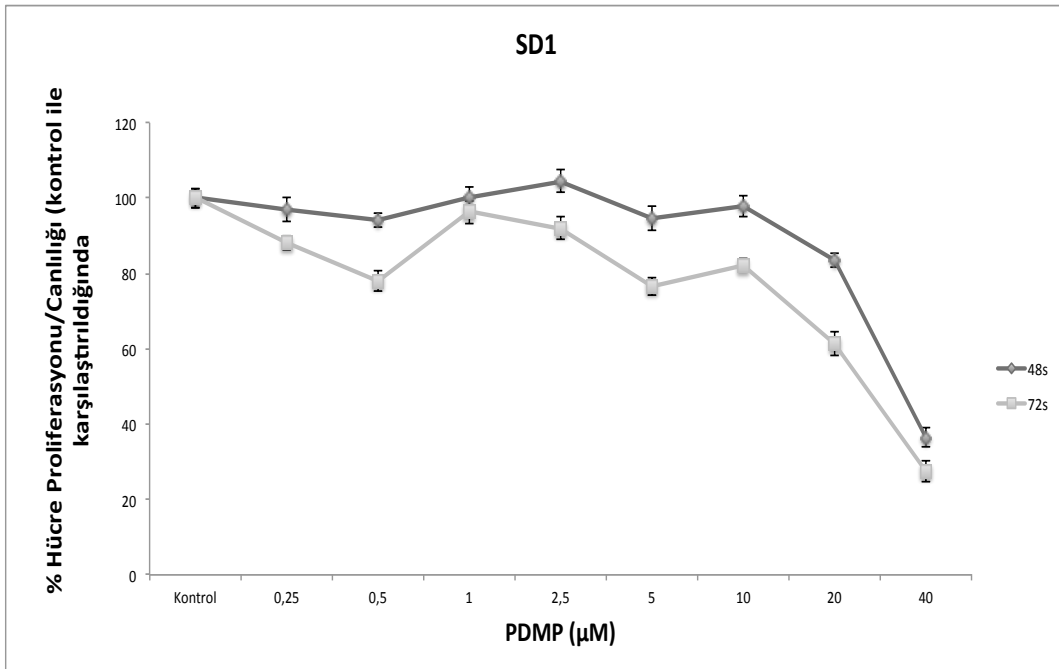
a)



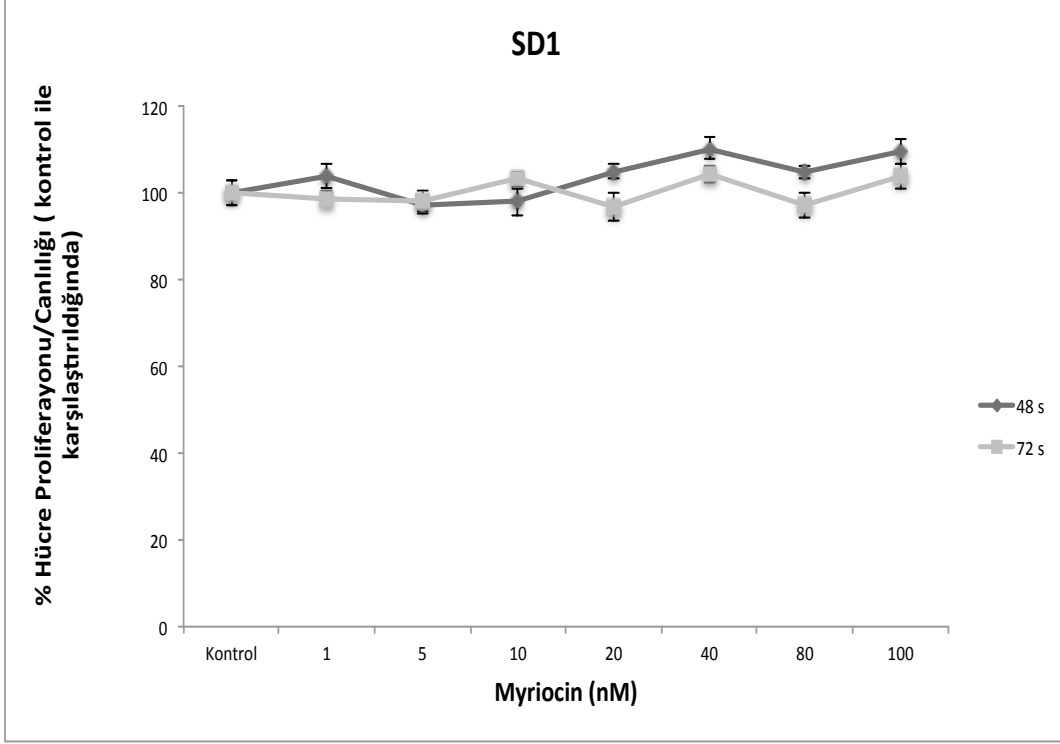
b)



c)

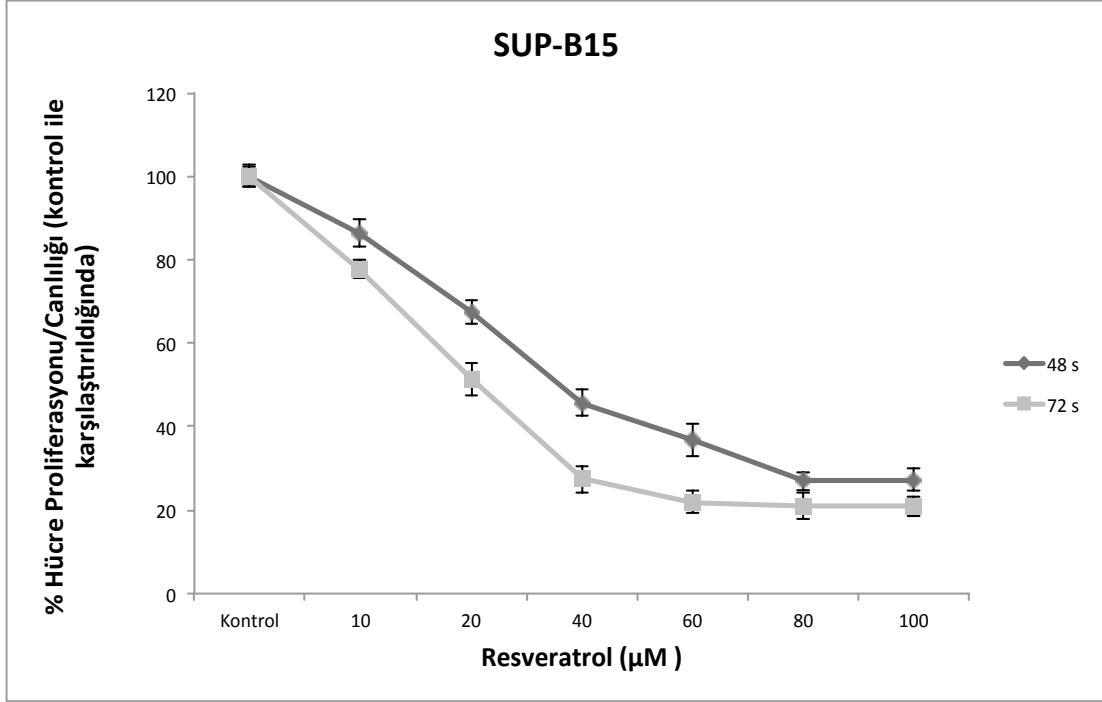


d)

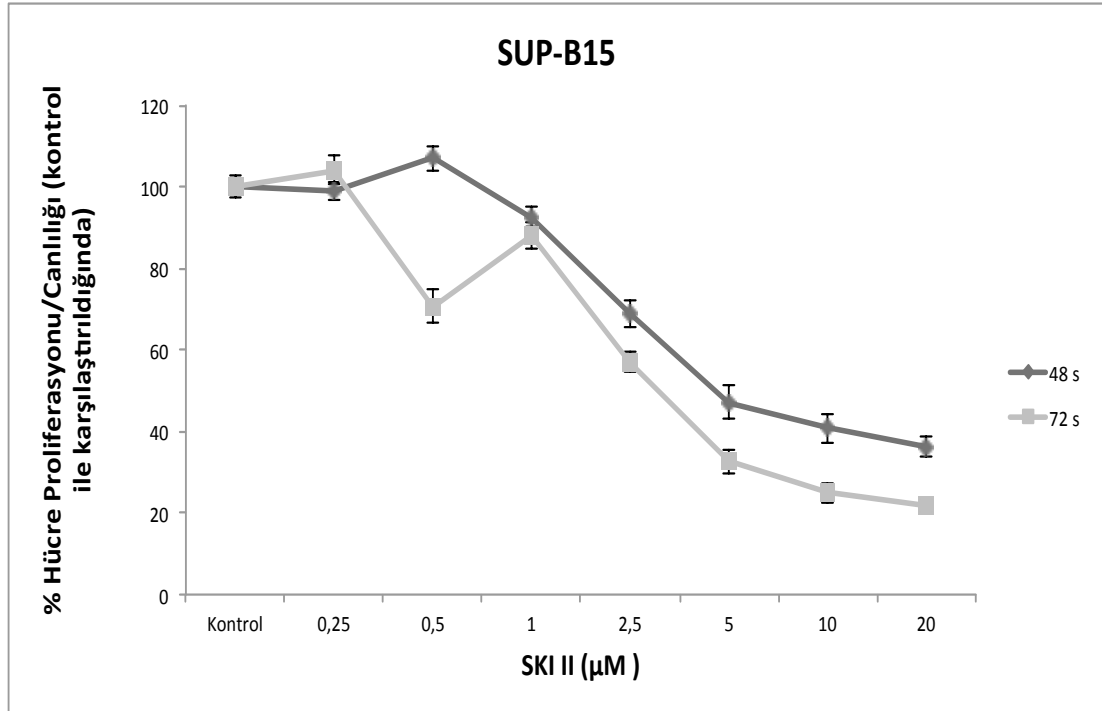


Şekil 2. Resveratrol (a), SKI II (b), PDMP (c) ve Miriosinin (d) SD1 hücreleri üzerindeki zamana ve konsantrasyona bağlı sitotoksik etkileri. Birbirinden bağımsız 3 farklı deney setinden alınan sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir.

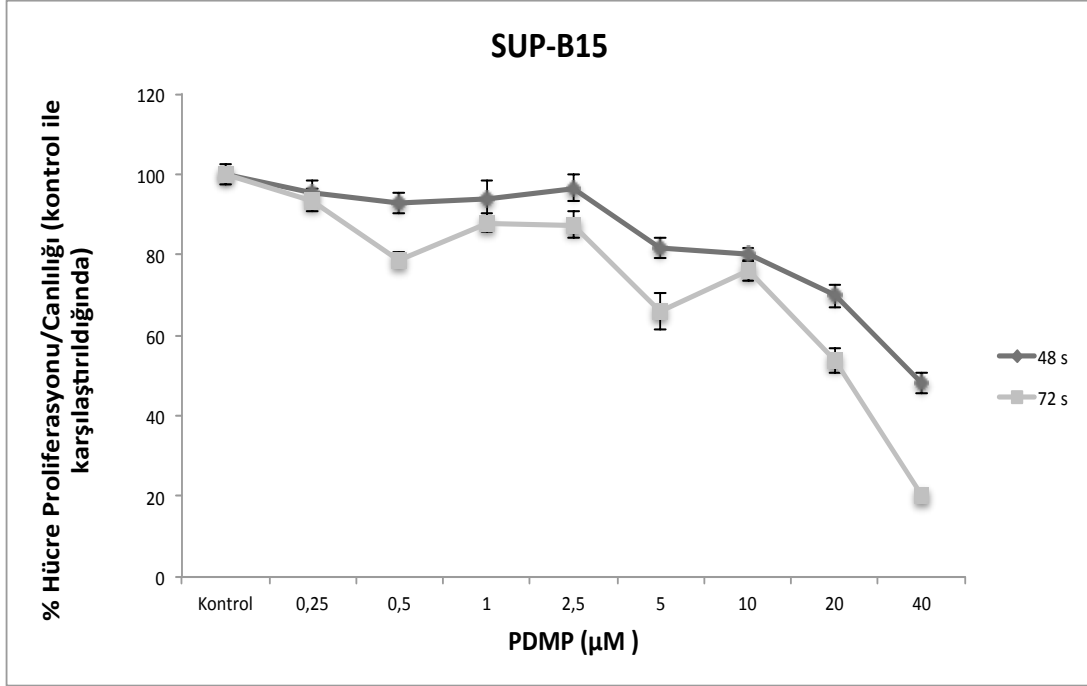
a)



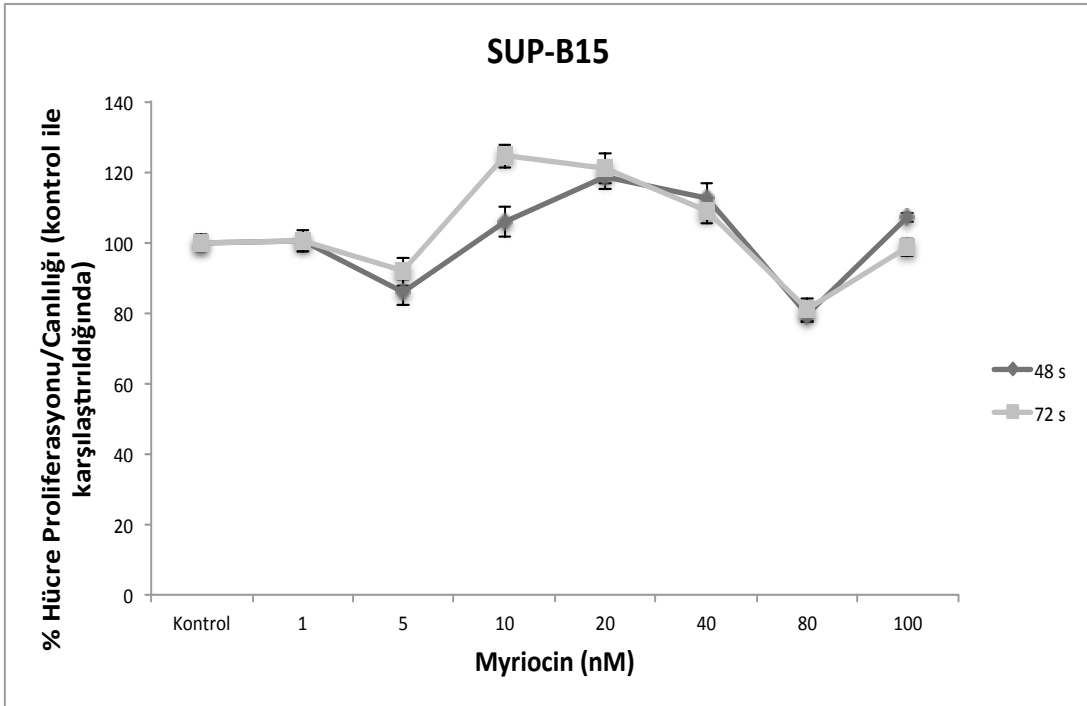
b)



c)



d)



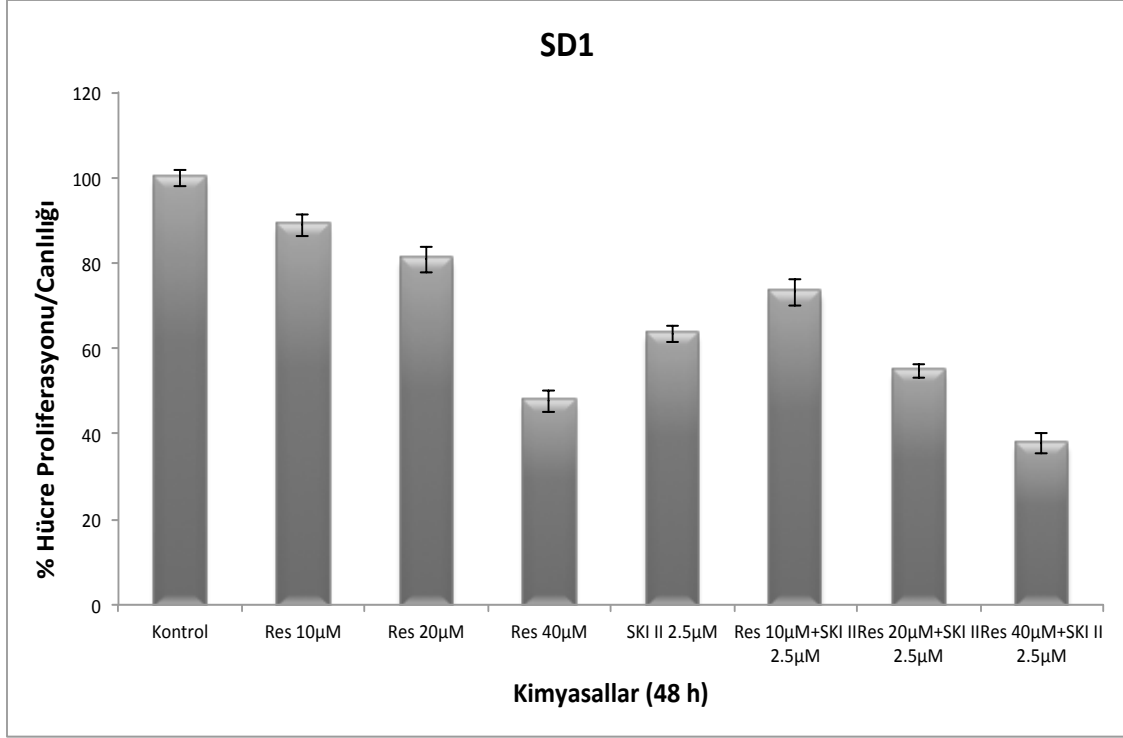
Şekil 3. Resveratrol (a), SKI II (b), PDMP (c) ve Miriosinin (d) SUP-B15 hücreleri üzerindeki zamana ve konsantrasyona bağlı sitotoksik etkileri. Birbirinden bağımsız 3 farklı deney setinden alınan sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir.

Resveratrolün birçok solid kanser tipinde ve lösemi türlerinde hücre çoğalmasını baskılayıcı etkileri olduğu ve bu etkilerin hücre tipine bağlı olarak farklı mekanizmalar üzerinden ortaya çıktığı literatürde gösterilmiştir (Athar vd., 2009). Kanser türlerinde, resveratrolün hücreler üzerindeki *in vitro* etki konsantrasyonlarına bakıldığında farklılıklar görülmekle beraber, yine hücre tipine bağlı olarak projede de bulunduğu üzere (IC_{50} değerleri SD1 hücresi için $43 \mu M$ (Şekil 2a), SUP-B15 için $37 \mu M$ (Şekil 3a) olarak hesaplanmıştır) $40 \mu M$ altında ve/veya üzerindeki konsantrasyonlarda etkilerinin saptandığı çalışmalar mevcuttur. Örneğin, APL hücrelerinde resveratrolün antiproliferatif etkisi $12.5-100 \mu M$ konsantrasyonları arasında araştırılmış ve 48 saatlik muamele sonucu IC_{50} 'nin $30 \mu M$ civarı olduğu saptanmıştır ve $50 \mu M$ resveratrolün apoptozu tetiklediği gösterilmiştir (Fan, vd., 2018). Bir diğer çalışmada ise, 24 saat $50-$ ve $100 \mu M$ resveratrol ile muamele edilen K562 KML hücrelerinde hücre çoğalmasının baskılandığı gösterilmiştir (Mizutani vd., 2016). Dolayısıyla, Ph+ ALL hücrelerinde resveratrolün hücre çoğalmasını inhibe ettiği konsantrasyonlar literatürle uyumludur. Benzer şekilde, hem SD1 hemde SUP-B15 hücreleri için sfingolipid metabolizmasının anahtar enzimlerini hedefleyen inhibitörlerin konsantrasyonlarında literatürle uyumluluk göstermektedir. K562 KML ve HL60 APL hücreleri üzerinde SK inhibitörü ve GSS inhibitörünün (PDMP) hücre proliferasyonu üzerine etkisi $1-100 \mu M$ aralıklarında çalışılmıştır (Kartal vd., 2011; Çakır vd., 2011) ve hücreler üzerinde hücre çoğalmasını durdurucu etkileri hücre proliferasyon/canlılık testleri ile gösterilmiştir.

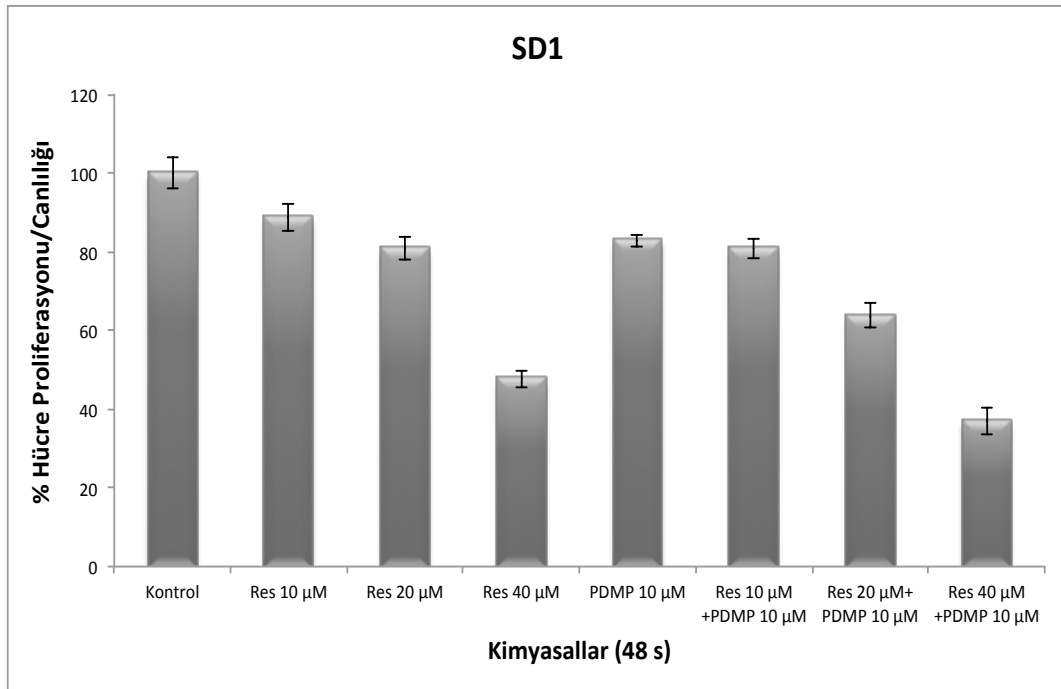
Resveratrol ve sfingolipid metabolizmasını hedefleyen inhibitörlerin her iki hücre hattı üzerindeki hücre çoğalmasını baskılayıcı etkileri ayrı ayrı zamana ve doza bağımlı olarak belirlendikten sonra kombinasyon çalışmalarına geçilmiştir. Kombinasyon çalışmasının amacı, özellikle SK ve GSS enzimlerinin inhibe edilmesi sonucu hücre içinde artması beklenen ve apoptotik olduğu bilinen seramidin resveratrolün sitotoksik etkisini artırıp arttırmayacağını görebilmektir. Resveratrolün artan konsantrasyonlarının ($10-$, $20-$, $40 \mu M$), SKI II $2.5 \mu M$ ile kombinasyonu sonucu, hücrelerin çoğalma yüzdeleri sırasıyla %73, %54 ve %37'ye düşmüştür. Resveratrolün tek başına bu dozlardaki hücre çoğalmasına etkisi sırasıyla %88, % 80 ve % 47'dir. Bu sonuçlar incelendiğinde, resveratrolün $10-$, $20-$ ve $40 \mu M$ konsantrasyonlarının $2.5 \mu M$ SKI II ile kombinasyonunun hücrelerin çoğalması üzerine etkili olduğu görülmektedir (Şekil 4a). Benzer şekilde resveratrolün artan konsantrasyonlarının ($10-$, $20-$, $40 \mu M$), $10 \mu M$ PDMP ile kombinasyonu sonucu, hücre proliferasyonunun bütün kombinasyonlarda azaldığı olduğu görülmektedir (hücre canlılığı kombinasyonlar için sırasıyla %80, %63 ve %37'ye düşmüştür) (Şekil 4b). Diğer taraftan resveratrolün artan konsantrasyonlarının ($10-$, $20-$, $40 \mu M$), 100 nM Miriosin ile kombinasyonu sonucu elde edilen hücre çoğalma verilerinden resveratrol $10-$, $20-$ ve $40 \mu M$

+ 100 nM Miriosin kombinasyonlarının hücre çoğalmasını resveratrolün tekli konsantrasyonlarına göre önemli ölçüde azalttığı görülmektedir (Şekil 4c). Resveratrolün artan konsantrasyonlarının (10-, 20-, 40 μ M), 100 nM Miriosin ile kombinasyonu sonucu, hücrelerin çoğalma yüzdeleri sırasıyla %70, %49 ve %30'a düşmüştür.

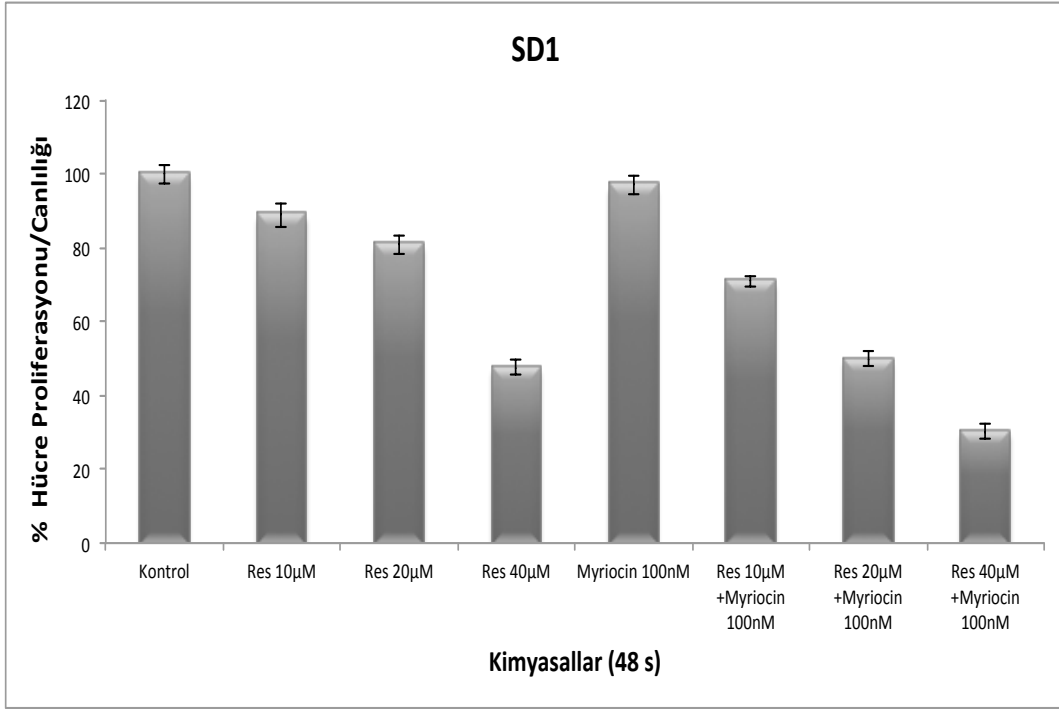
a)



b)



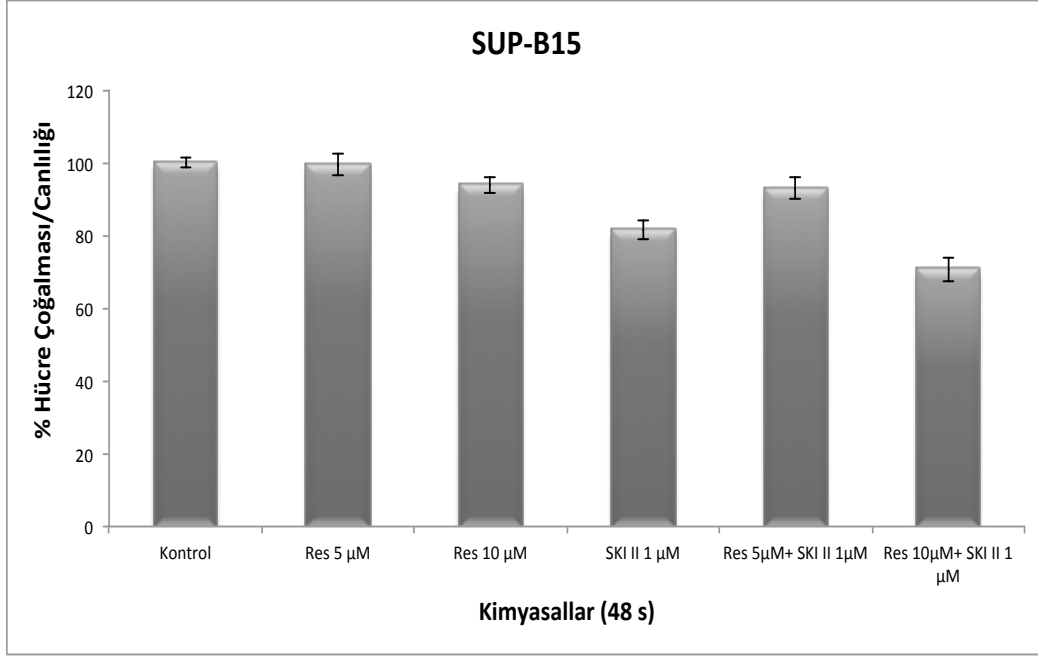
c)



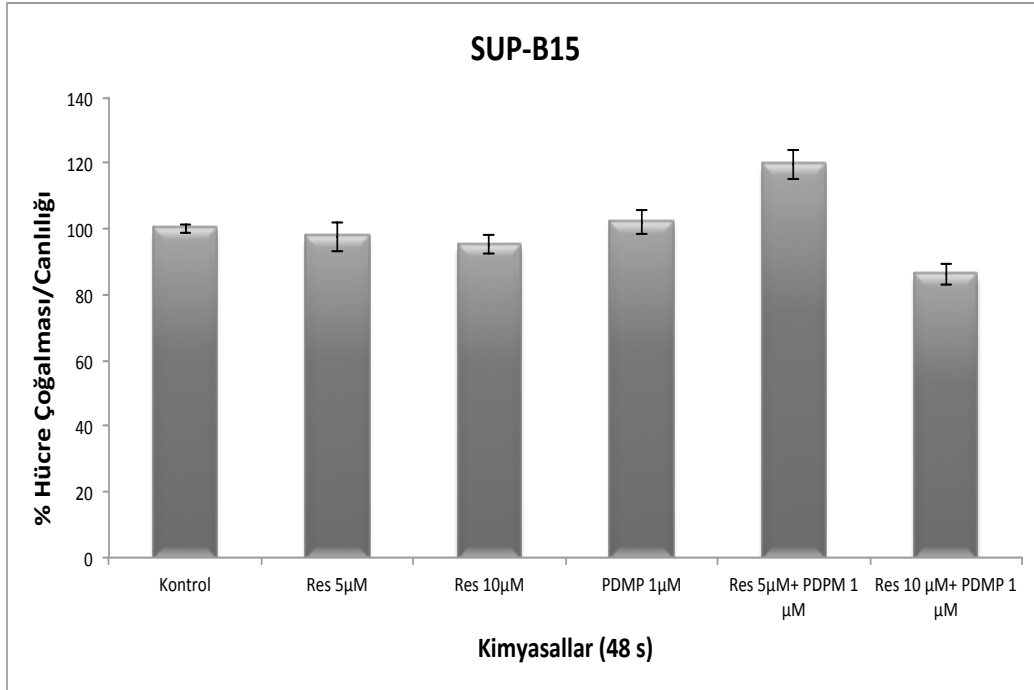
Şekil 4. Resveratrolün SKI II (a), PDMP (b) ve Miriosin (c) ile kombinasyonunun SD1 hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkileri. Birbirinden bağımsız 3 farklı deney setinden alınan sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir.

SUP-B15 hücrelerinde ise resveratrolün artan konsantrasyonlarının (5- ve 10 μ M), SKI II 1.0 μ M ile kombinasyonu sonucu, hücrelerin çoğalma yüzdeleri sırasıyla %92 ve %70'e düşmüştür. Resveratrolün tek başına bu dozlardaki hücre çoğalmasına etkisi sırasıyla %99 ve % 93'tür. 1.0 μ M SKI II ile muamele sonucu hücrelerin çoğalması %81 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar incelendiğinde, özellikle 10 μ M resveratrolün 1.0 μ M SKI II ile kombinasyonunun hücrelerin çoğalması üzerine etkili olduğu görülmektedir (Şekil 5a). Benzer şekilde resveratrolün artan konsantrasyonlarının (5-ve 10 μ M), 1 μ M PDMP ile kombinasyonu sonucu, hücre proliferasyonunu en fazla etkileyen kombinasyonun resveratrol 10 μ M ve PDMP 1 μ M olduğu görülmektedir (Şekil 5b). Diğer taraftan resveratrolün artan konsantrasyonlarının (5- ve 10 μ M), 100 nM Miriosin ile kombinasyonu sonucu elde edilen hücre çoğalma verilerinden kombinasyonların hücre çoğalmasını resveratrolün tekli konsantrasyonuna göre çok fazla etkilemediği görülmektedir (Şekil 5c).

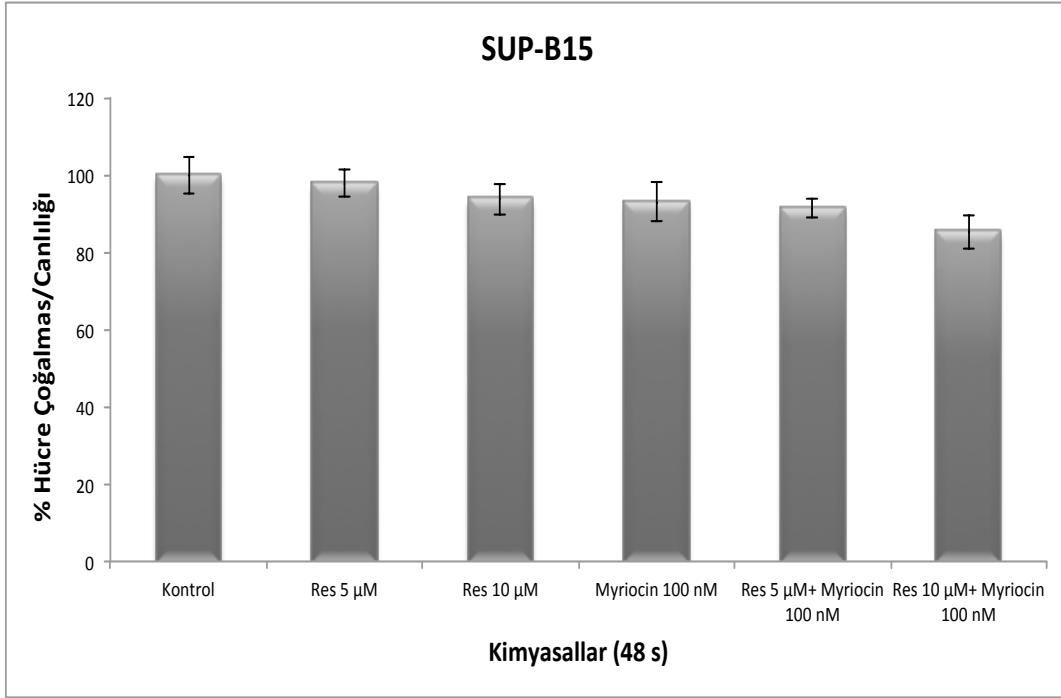
a)



b)



c)



Şekil 5. Resveratrolün SKI II (a), PDMP (b) ve Miriosin (c) ile kombinasyonunun SUP-B15 hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkileri. Birbirinden bağımsız 3 farklı deney setinden alınan sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir.

Son yıllarda resveratrolün terapötik potansiyelinin altında yatan mekanizmalardan birinin sfingolipid metabolizmasının modülasyonu ile ilgili olduğunu gösteren birçok çalışma bulunmaktadır. Resveratrolün seramid miktarını artırarak seramid aracılı apoptozu tetiklediği meme kanserinde gösterilmiştir (Minutolo vd., 2005). Resveratrolün metastatik meme kanseri ve kolon kanseri hücreleri üzerindeki apoptotik etkilerinin *de novo* seramid sentez yolağının aktivasyonu ile olduğu ve SPT'ın inhibe edilmesi sonucu bu etkinin geri döndüğü gösterilmiştir (Scarlatti vd., 2003; Ulrich vd., 2007). Bununla beraber, resveratrolün sfingolipid metabolizması ile ilgili etki mekanizmalarının lösemi türlerinde araştırıldığı sadece birkaç çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan birinde, resveratrol muamelesi sonucu HL60 APL ve K562 KML hücrelerinde SerS genlerinin ifadesinin arttığı, SK-1 ve GSS ifadesinin azaldığı bulunmuştur (Kartal vd., 2011; Çakır vd., 2011). Ayrıca, lösemiler dahil diğer birçok kanser türünde resveratrolün genellikle kombinasyon yaklaşımları ile birlikte etki mekanizmaları araştırılmaktadır. Örneğin, PDMP:resveratrol ve SK-1 inhibitörü:resveratrol kombinasyonlarının hem APL hemde KML'de sinerjistik antiproliferatif etki gösterdiği saptanmıştır (Kartal vd., 2011; Çakır vd., 2011). Benzer şekilde, resveratrolün belirlenen konsantrasyonlarının SK ve GSS inhibitörlerinin ilgili konsantrasyonları ile kombine edilerek SD1 ve SUP-B15 hücrelerine verilmesinden sonra hücrelerin proliferasyonunu baskıladığı

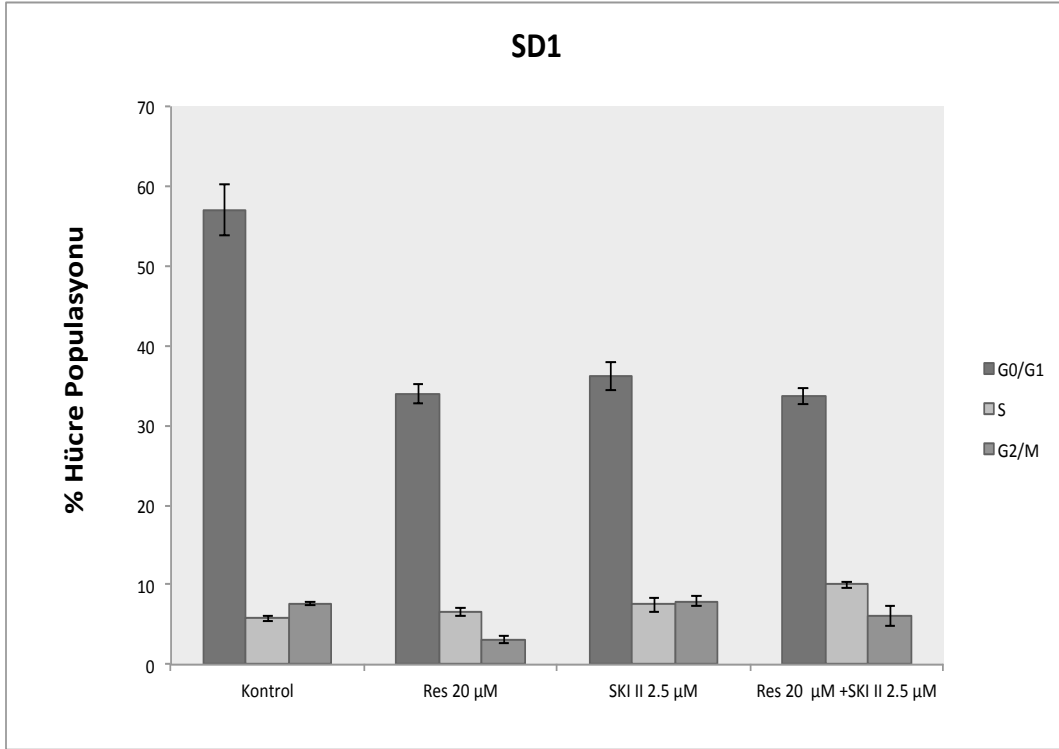
gösterilmiştir (Şekil 4a ve 4b, Şekil 5a ve 5b). Seramid, hücre çoğalmasını baskılayıcı ve apoptozu tetikleyici özellikler gösterirken, seramidin SK ve GSS enzimleri tarafından sırasıyla S1F ve GSS dönüştürülmesi ise hücreler üzerinde hücre çoğalmasını destekleyici ve apoptozu engelleyici etkiler göstermektedir (Ogretmen ve Hannun, 2004). Kombinasyon sonuçlarından da anlaşılacağı üzere, resveratrol ile birlikte hücrelere uygulanan SK ve GSS enzim inhibitörlerinin, seramidin S1F ve GSS'e dönüşümünü engelleyerek hücre içi seramid miktarını arttırdığı ve buna bağlı olarak hücre çoğalmasını baskıladığı şeklinde yorumlanmaktadır. Resveratrol ile birlikte kombinasyon halinde verilen bir diğer inhibitör ise SPT'ı hedef alan Miriosindir. Miriosin sfingolipid metabolizmasının anahtar enzimlerinden biri olan ve *de novo* seramid sentezinden sorumlu olan SPT'ı inhibe ederek apoptozu tetiklediği bilinen seramid miktarını azaltmaktadır (Ponnusamy vd., 2010). Hücre çoğalma grafiklerine bakıldığında (Şekil 3d ve Şekil 4d), Miriosin varlığında hücrelerin proliferasyonu azalmamakta yada çok az değişim göstermektedir. Ancak, Miriosinin resveratrolün belirli konsantrasyonları ile kombinasyon halinde verilmesi sonucu özellikle SD1 hücrelerinde hücre çoğalması baskılanmaktadır (Şekil 4c). SUP-B15 hücrelerinde ise hücre çoğalması özellikle resveratrol 10 μ M + 100 nM Miriosin varlığında %10 azalmaktadır (Şekil 5c). Bu sonuç, Miriosinin resveratrol ile birlikte verildiğinde hücre içindeki seramid miktarını değiştirmeye ilave olarak farklı bir mekanizma üzerinden etki göstererek de hücre büyümesini inhibe ettiğini düşündürmektedir. Örneğin, akciğer kanseri hücrelerinde hücre ölüm reseptörlerini aktifleştirerek Miriosinin hücre büyümesini doza bağımlı olarak inhibe ettiği gösterilmiştir. Miriosinin kemoterapi ilaçları ile (sisplatin ve dosetaksel) kombinasyonu sinerjistik olarak hücre büyümesini inhibe etmiştir (Choi vd., 2014). Resveratrol ve kombinasyonlarının hücre çoğalması üzerindeki tartışılan etkilerinin mekanizmasını anlayabilmek amacıyla hücre döngüsü ve apoptoz analizleri gerçekleştirilmiştir.

Proje öneri formunda bahsedildiği üzere belirlenen kombinasyonların sinerjik, antagonistik veya additif etkileri Calcsyn programı kullanılarak belirlenememiştir. Bunun nedeni, ilgili programda veya Compusyn gibi türevlerinde kombinasyonda yer alan ajanların her ikisinde belirli oranlarda artan molar konsantrasyonlarına ihtiyaç duyulmasıdır. Dolayısıyla, projeyi tasarlarken resveratrolün artan konsantrasyonlarına karşılık inhibitörlerin sabitlenmiş konsantrasyonlarıyla çalışmayı özellikle moleküler çalışmalar için uygun gördük ve literatürdede bu şekilde birçok kombinasyon çalışması mevcuttur (Mirzapur vd., 2018; Opydo-Chanek vd., 2017; Zhu vd., 2016).

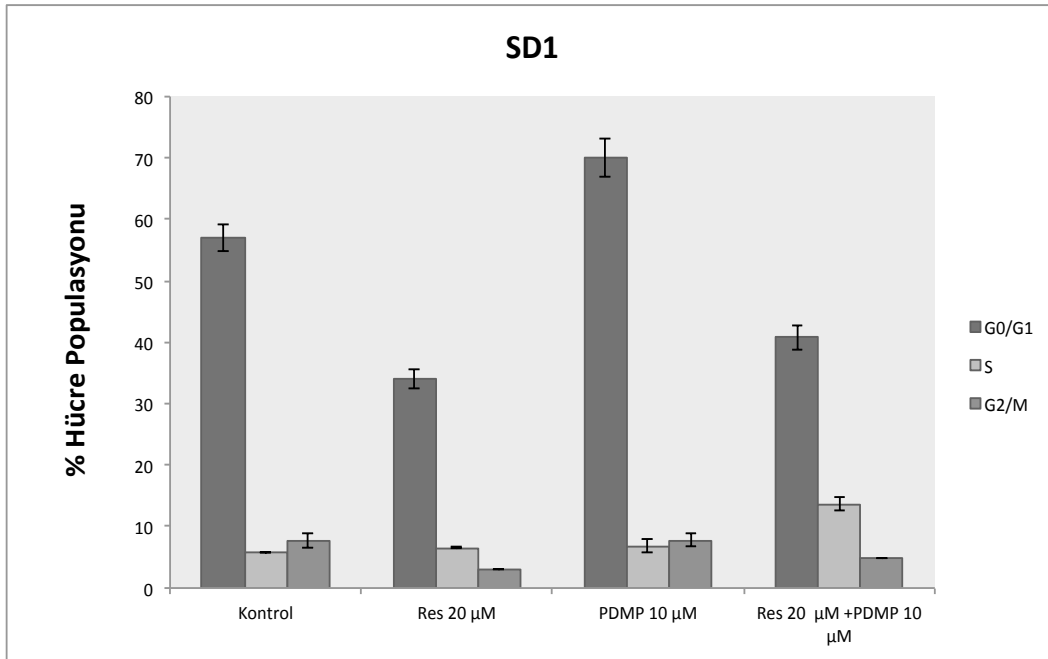
4.2 Resveratrolün SKI II, PDMP ve Miriosin ile Kombinasyonları SD1 ve SUP-B15 Ph+ ALL Hücrelerinin Hücre Döngüsünü Etkilemektedir

SD1 hücrelerinin resveratrol, SKI II, PDMP ve Miriosin ile kombinasyonlarının hücre çoğalması üzerindeki etkilerini belirlemek için gerçekleştirilen MTT testinde, Şekil 4'de görüldüğü üzere 20 µM resveratrol'ün inhibitörlerin ilgili konsantrasyonları ile en fazla etki gösterdiği görülmüştür. Dolayısıyla, bu kombinasyonlar için hücre döngüsü analizi gerçekleştirilmiştir. SD1 hücrelerinin 20 µM resveratrol ile muamele edilmesi sonucu, kontrol hücreleri ile kıyaslandığında G0/G1 fazındaki hücre popülasyonu yüzdelerinde azalmalar saptanırken, S fazındaki hücre popülasyon yüzdesinde artışlar saptanmıştır. G0/G1 fazındaki hücre popülasyonu yüzdeleri kontrol ve 20 µM resveratrol için sırasıyla; %57.03 ve %33.9 iken, S fazındaki hücre popülasyon yüzdeleri %5.7 ve % 6.5'dir (Şekil 6a). 2.5 µM SKI II muamelesi, hücrelerin G0/G1 fazındaki yüzdelerini (%36,1) kontrol (%57.3) ile karşılaştırıldığında azaltırken, S (%7.5) ve çok az bir şekilde G2/M (%7.9) fazındaki popülasyon yüzdelerini kontrol ile karşılaştırıldığında (S: %5.7 ve G2/M: %7.6) arttırmıştır. 20 µM resveratrolün 2.5 µM SKI II ile kombinasyonu sonucu G0/G1 fazındaki hücre popülasyon yüzdesi %33.6 olarak saptanmıştır. Diğer taraftan, 20 µM resveratrol + 2.5 µM SKI II kombinasyonu sonucu hücre popülasyon yüzdeleri S fazında %10 olarak saptanmıştır ve 20 µM resveratrol ile karşılaştırıldığında artmaktadır. Dolayısıyla, kombinasyon muamelesi SD1 hücrelerinin S fazında tutulmasına neden olmaktadır (Şekil 6a). Bu sonuç, Şekil 4a'da gösterilen ve açıklanan sonucu desteklemektedir. 20 µM resveratrol + 10 µM PDMP kombinasyonu sonucu, S fazında bir değişim görülmektedir. Bu kombinasyon için hücre popülasyon yüzdesi %13.7 olarak belirlenmiştir (Kontrol: %5.7, 20 µM resveratrol: %6.5, PDMP 10 µM: %6.8) (Şekil 6b). Dolayısıyla, kombinasyon muamelesi sonucu hücre döngüsünün S fazında bir tutulma söz konusudur. Bu sonuçlar hücre çoğalma verilerini (Şekil 4b) desteklemektedir ve 20 µM resveratrol + 10 µM PDMP kombinasyonu hücrelerin çoğalmalarını en etkili şekilde azaltmaktadır. Şekil 6c'de gösterildiği üzere 20 µM resveratrol ile muamele edilen SD1 hücrelerinin G0/G1, S ve G2/M fazlarındaki dağılımları sırasıyla %33.9, %6.5, ve % 3.1'dir. Kontrol hücreleri için ise sırasıyla %57.03, %5.7 ve %7.6'dır. 100 nM Miriosin muamelesi sonucu hücrelerin G0/G1, S ve G2/M fazlarındaki dağılımları sırasıyla %70, %6.5 ve %3.2'dir. 20 µM resveratrol + 100 nM Miriosin kombinasyonları için hücrelerin G0/G1, S ve G2/M fazlarındaki dağılımları sırasıyla %46, %9.3, ve %4.7'dir. Bu sonuçlardan yola çıkarak, 20 µM resveratrol + 100 nM Miriosin kombinasyonunun hücre döngüsü üzerinde S fazında etkili olduğu görülmektedir.

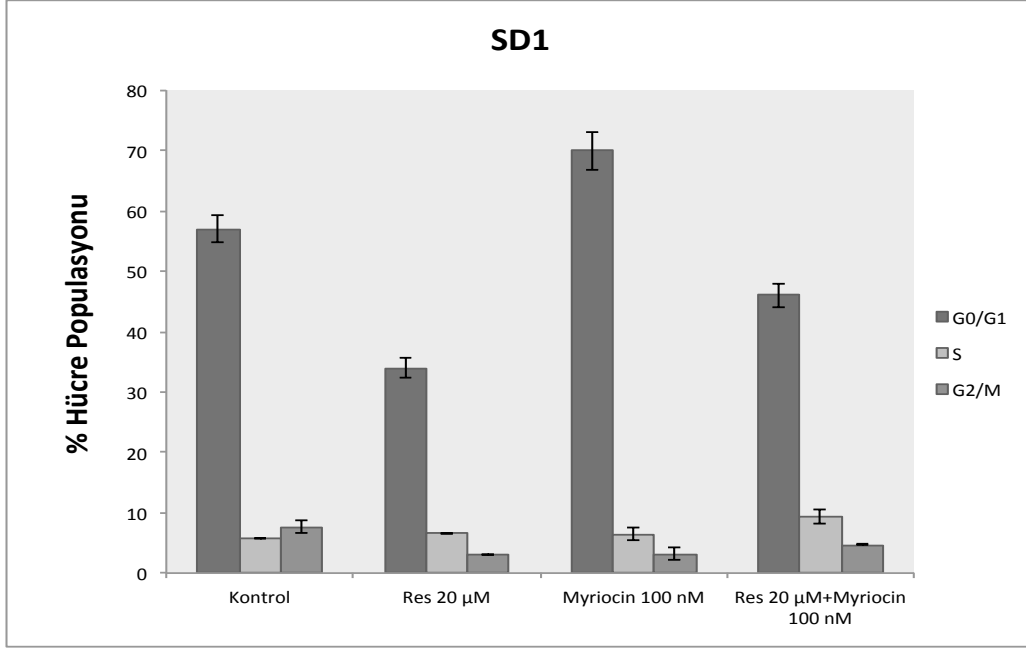
a)



b)



c)



Şekil 6. SD1 hücrelerinin, Resveratrol, SKI II, PDMP, Miriosin, Resveratrol:SK-1 İnhibitörü (a), Resveratrol: GSS inhibitörü (b) ve Resveratrol:SPT İnhibitörü (c) kombinasyonları ile muamelesi sonucu hücre döngüsü fazlarında görülen değişimler. SD1 hücreleri için birbirinden bağımsız üç hücre döngüsü analizi gerçekleştirilmiştir ve alınan sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir.

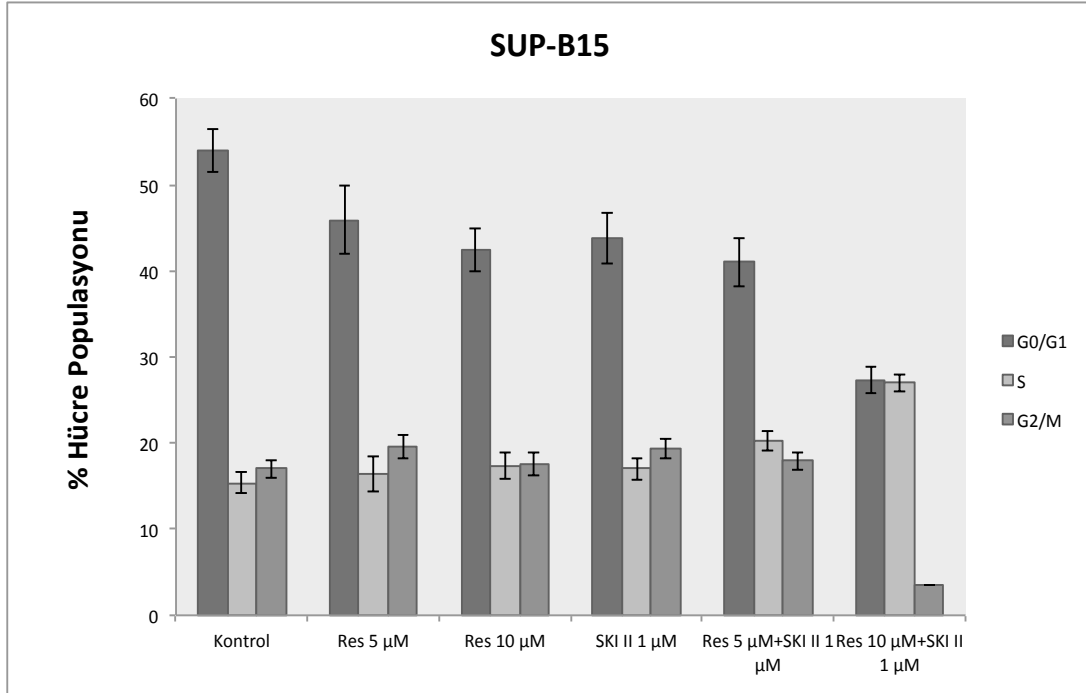
SUP-B15 hücrelerinin 5- ve 10 μ M resveratrol ile muamele edilmesi sonucu, kontrol hücreleri ile kıyaslandığında G0/G1 fazındaki hücre populasyonu yüzdelerinde azalmalar saptanırken, S fazındaki hücre populasyon yüzdesinde artışlar saptanmıştır. G0/G1 fazındaki hücre populasyonu yüzdeleri kontrol, 5- ve 10 μ M resveratrol için sırasıyla; %53.95, %45.9 ve %42.4 iken, S fazındaki hücre populasyon yüzdeleri %15.4, %16.35 ve % 17.35'tir (Şekil 7a). 1 μ M SKI II muamelesi, hücrelerin G0/G1 fazındaki yüzdelerini (%43,8) kontrol (%53.95) ile karşılaştırıldığında azaltırken, S (%17) ve G2/M (%19.3) fazındaki populasyon yüzdeleri kontrol ile karşılaştırıldığında (S:%15.4 ve G2/M: %17) arttırmıştır. 5- ve 10 μ M resveratrolün 1 μ M SKI II ile kombinasyonu sonucu ise sinerjistik olarak G0/G1 fazındaki hücre populasyon yüzdeleri sırasıyla %41 ve %27.3'e düşmüştür (resveratrolün tekli konsantrasyonları ile karşılaştırıldığında). G2/M fazındaki hücre populasyon yüzdeleri 5- ve 10 μ M resveratrol + 1 μ M SKI II kombinasyonu için sırasıyla %17.9 ve %3.5 olarak saptanmıştır (5- ve 10 μ M resveratrol için G2/M fazındaki hücre populasyonu yüzdeleri sırasıyla %19.6 ve %17.55'tir). Diğer taraftan, 5- ve 10 μ M resveratrol + 1 μ M SKI II kombinasyonu sonucu hücre populasyon yüzdeleri S fazında (sırasıyla %20.3 ve %27), resveratrolün tekli

kombinasyonları ile karşılaştırıldığında artmaktadır. Dolayısıyla, kombinasyon muameleleri SUP-B15 hücre popülasyonunun yüzdeleri G0/G1 ve G2/M fazlarında azaltırken, hücrelerin S fazında tutulmalarına neden olmakta ve en etkili kombinasyon 10 µM resveratrol + 1 µM SKI II olarak görülmektedir (Şekil 7a). Bu sonuç, Şekil 5a'de gösterilen ve açıklanan sonucu desteklemektedir.

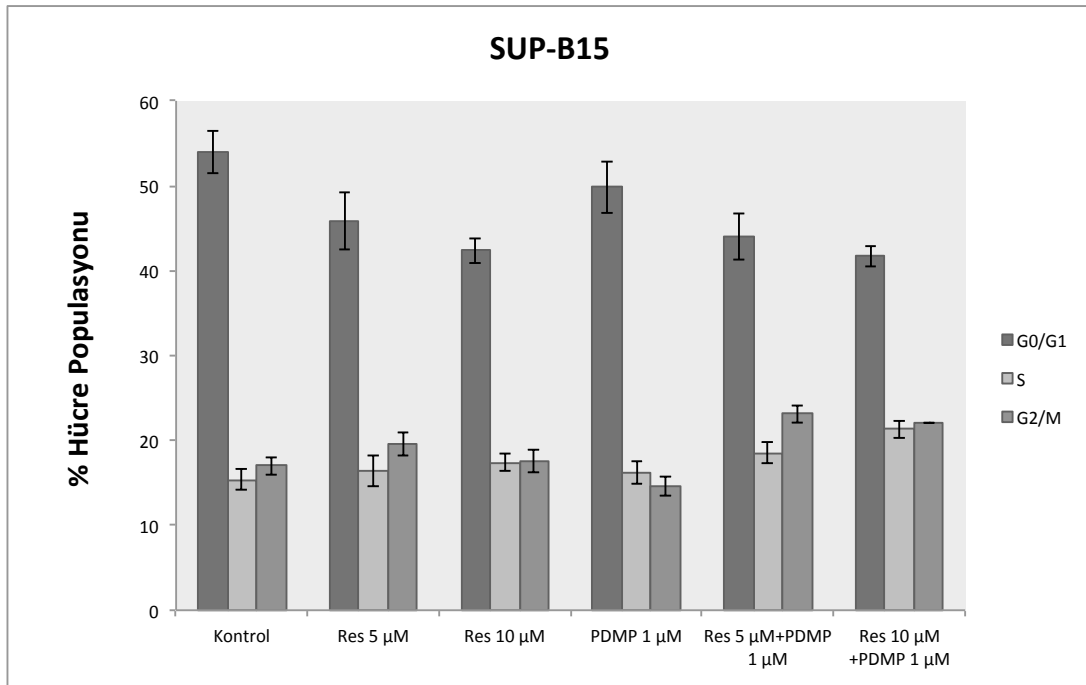
5- ve 10 µM resveratrol + 1 µM PDMP kombinasyonu sonucu, hücrelerin G0/G1 fazındaki yüzdeleri sırasıyla %44 ve %39.7 ye düşmüştür (Kontrol: %53.95, 5 µM resveratrol: %45.9, 10 µM resveratrol: %42.4, PDMP 1 µM: %49.8). S fazında ise 5- ve 10 µM resveratrol + 1 µM PDMP kombinasyonları için hücre popülasyon yüzdeleri sırasıyla %18.5 ve %21.3 olarak belirlenmiştir (Kontrol: %15.4, 5 µM resveratrol: %16.35, 10 µM resveratrol: %17.35, PDMP 1 µM: %16.2) (Şekil 7b). Dolayısıyla, kombinasyon muameleleri sonucu hücre döngüsünün S fazında bir tutulma söz konusudur. Bu sonuçlar hücre çoğalma verilerini (Şekil 5b) desteklemektedir ve 10 µM resveratrol+ 1 µM PDMP kombinasyonu hücrelerin çoğalmalarını en etkili şekilde azaltmaktadır. Bu sonuçlardan yola çıkarak, resveratrolün SKI II ve PDMP ile kombinasyonlarının hücreleri, hücre döngüsünün S fazında tutarak ve DNA sentezini engelleyerek hücre çoğalmasını baskıladıkları düşünülmektedir.

Şekil 7a'da gösterildiği ve yukarıda açıklandığı üzere 5- ve 10 µM resveratrol ile muamele edilen SUP-B15 hücrelerinin G0/G1, S ve G2/M fazlarındaki dağılımları sırasıyla %45.9, %16.35, %19.6 ve %42.4, %17.35 ve % 17.55'tir. Kontrol hücreleri için ise sırasıyla %53.95, %15.4 ve %17'dir. 100 nM Miriosin muamelesi sonucu hücrelerin G0/G1, S ve G2/M fazlarındaki dağılımları sırasıyla %49.5, %12.7 ve %22.4'dür. Miriosin, kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında G2/M fazında bir tutulmaya sebep oluyor görülürken, G0/G1 ve S fazlarında hücre popülasyon yüzdeleri azalmalar mevcuttur. 5- ve 10 µM resveratrol + 100 nM Miriosin kombinasyonları için hücrelerin G0/G1, S ve G2/M fazlarındaki dağılımları sırasıyla %44.1, %12.2, %19.1 ve %38.3, %14, %20.4'tür (Şekil 7c). Her iki kombinasyon için hücre popülasyonu yüzdeleri G0/G1 fazında azalmaktadır. Bu sonuçlardan yola çıkarak, 5- ve 10 µM resveratrol + 100 nM Miriosin kombinasyonunun hücre döngüsü üzerinde etkili olmadığı görülmektedir. Hücre çoğalma verilerinde de görüldüğü üzere (Şekil 5c) hücre döngüsü analizinde bu sonucu desteklemektedir.

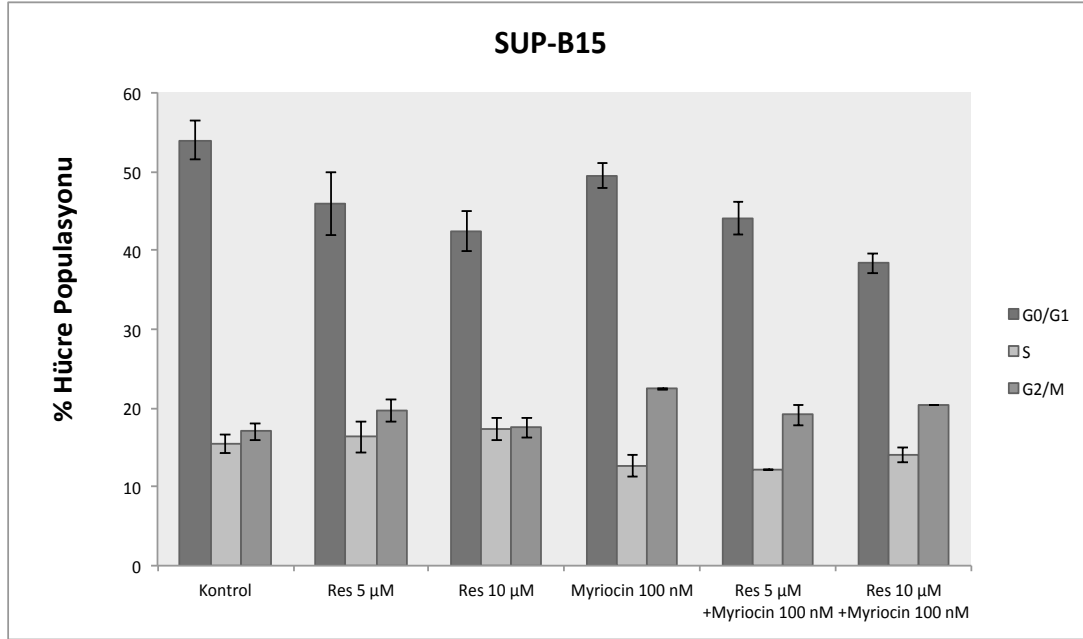
a)



b)



c)



Şekil 7. SUP-B15 hücrelerinin, Resveratrol, SKI II, PDMP, Miriosin, Resveratrol:SK-1 İnhibitörü (a), Resveratrol: GSS inhibitörü (b) ve Resveratrol:SPT İnhibitörü (c) kombinasyonları ile muamelesi sonucu hücre döngüsü fazlarında görülen değişimler. SUP-B15 hücreleri için birbirinden bağımsız üç hücre döngüsü analizi gerçekleştirilmiştir ve alınan sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir.

Resveratrol, inhibitörler ve resveratrol:inhibitör kombinasyonların SD1 ve SUP-B15 hücrelerinde hücre çoğalmasını baskılanmasının nedeni hücre döngüsü analizleri sonuçları ile ilişkilendirilebilir. SD1 ve SUP-B15 hücreleri için verilen hücre döngüsü analizleri sonuçlarından yola çıkarak, resveratrolün SKI II ve PDMP ile kombinasyonlarının hücreleri, hücre döngüsünün S fazında tutarak, DNA sentezini engelleyerek hücre çoğalmasını baskıladıkları düşünülmektedir (Şekil 6a, 6b ve 7a, 7b). Resveratrolün tek başına ve/veya farklı kombinasyon çalışmalarında ve farklı kanser türlerinde hücre döngüsü üzerindeki etkileri literatürde de gösterilmektedir. Ge ve arkadaşları (Ge vd., 2013) resveratrol ile muamele edilen T-ALL hücrelerinde p21 ve p27'nin ifadesinin arttığını, siklin A ve D'nin ifadesinin azaldığını ve sonuç olarak G0/G1 fazında tutulma meydana geldiğini göstermişlerdir. İnsan kolorektal kanser hücrelerinde resveratrol hücre döngüsünün S fazında tutuluma neden olmakla beraber resveratrolün 5-fluorourasil ile kombinasyonu S fazı tutulumunu dahada arttırmıştır (Chung vd., 2018). OCM2 AML hücrelerinde resveratrol hücreleri S fazında tutmuştur (Estrov vd., 2003). Doğal öldürücü hücreli (Natural Killer (NK) cell) lenfoma hücrelerinde resveratrol G0/G1 fazında hücreleri tutarak proliferasyonlarını baskılamıştır (Quoc Trung vd., 2013). B-ALL SUP-B15 hücrelerinde 75 µM resveratrol

muamelesi sonucu hücrelerin S fazında tutulduğu ve proliferasyonun baskılandığı gösterilmiştir (Zhou vd., 2017). SUP-B15 hücrelerinde Miriosin kombinasyonlarının hücre döngüsü üzerinde çok fazla etkili olmadığı (Şekil 7c) görülmekte ve hücre proliferasyonu sonuçlarını desteklemektedir (Şekil 5c). SD1 hücrelerinde Miriosin kombinasyonu ise hücreleri S fazında tutarak (Şekil 6c) hücre çoğalmasını sonuçlarını destekler niteliktedir (Şekil 4c). Bununla beraber, resveratrolün Ph+ ALL modelinde ve sfingolipid metabolizmasının hedeflenmesi ile birlikte hücre döngüsü üzerinde nasıl bir etki gösterdiği ilk defa bu proje ile gösterilmiştir.

4.3 Resveratrol ve SKI II, PDMP ve Miriosin ile Kombinasyonları SD1 ve SUP-B15 Ph+ ALL Hücrelerinde Seramid/S1F Dengesini Değiştirerek Apoptozu Düzenlemektedir

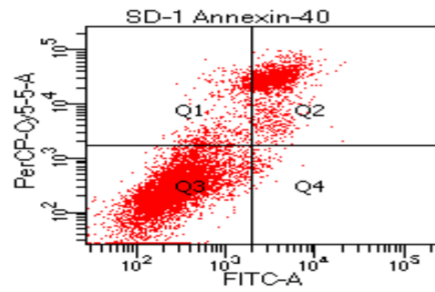
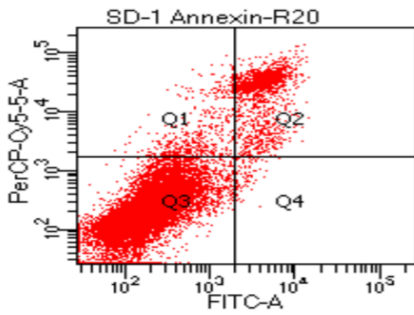
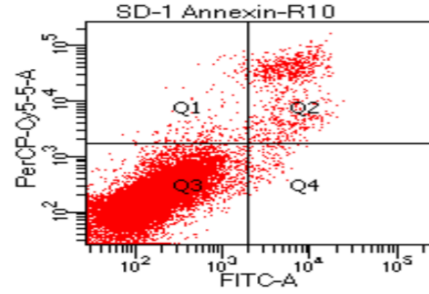
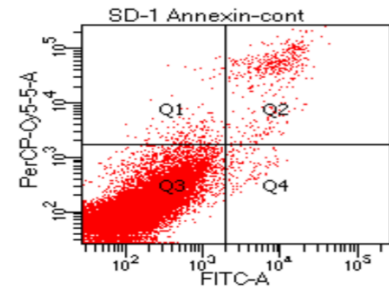
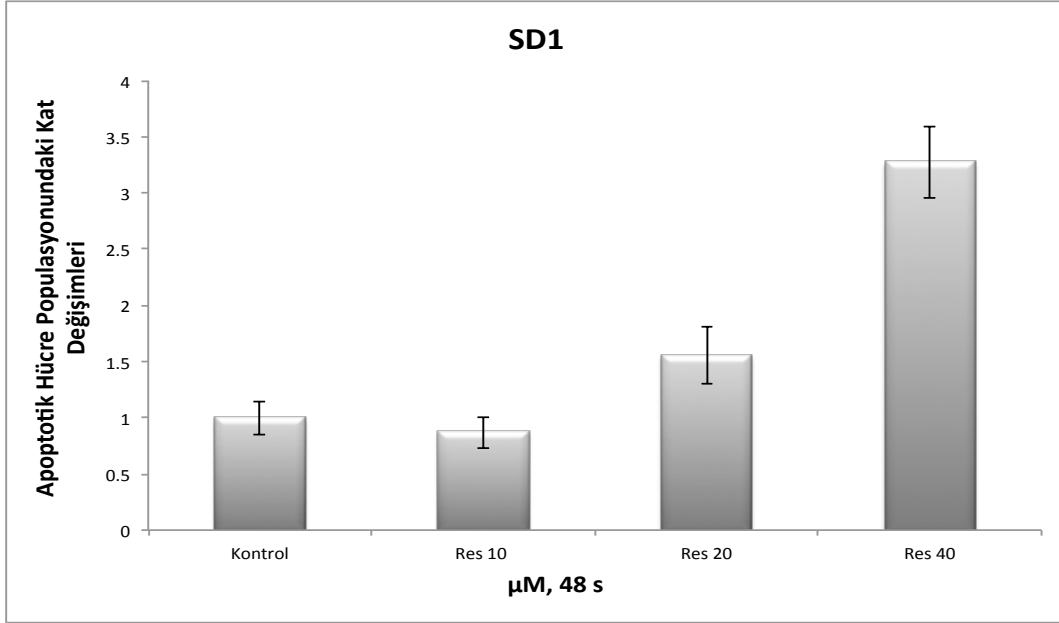
10-, 20- ve 40 μ M resveratrol ile muamele edilen SD1 hücrelerinde, muamele edilmeyen kontrol hücrelerine kıyasla apoptotik hücre ölümlerinde özellikle 20- ve 40 μ M resveratrol muamelesi sonucu sırasıyla 1.5 ve 3.3 kat artışlar saptanmıştır. 10 μ M resveratrolün ise kontrol ile kıyasladığında apoptozu tetiklemediği saptanmıştır (Şekil 8a).

SKI II'nin artan konsantrasyonları (1-, 2.5- ve 5 μ M) ile muamele edilen SD1 hücrelerinde muamele edilmemiş kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında apoptotik hücre popülasyonundaki artış 2.5 ve 5 μ M SKI II için sırasıyla 1.05 ve 1.2 kattır. Resveratrolün artan konsantrasyonlarının (10-, 20- ve 40 μ M) 2.5 μ M SKI II ile kombinasyonu sonucu apoptotik hücre popülasyonundaki artış ise sırasıyla 1.19, 1.88 ve 3.4 olarak saptanmıştır (Şekil 8b). Sonuç olarak, resveratrolün artan konsantrasyonlarının SKI II inhibitörünün varlığında apoptozu tetikleme potansiyelinin arttığı ve bunun nedeninde sfingolipid metabolizmasında görevli olan ve apoptotik seramid'in antiapoptotik S1F dönüşümünü katalizleyen SK-1/SK-2 enziminin inhibe edilmesi kaynaklı seramid birikiminde kaynaklandığı şeklinde açıklanabilir. SD1 hücreleri Miriosinin artan konsantrasyonları (40-, 80-, ve 100 nM) ile muamele edildiğinde apoptotik hücre popülasyonunda muamele edilmeyen kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında bir azalma söz konusudur. Benzer şekilde resveratrolün artan konsantrasyonlarının (10-, 20- ve 40 μ M) 100 nM Miriosin ile olan kombinasyonu sonucunda da resveratrolün ilgili dozları ile karşılaştırıldığında apoptozda bir azalma söz konusudur (Şekil 8c). Miriosin *de novo* seramid sentez yolağının ilk basamağındaki SPT enzimini inhibe ederek seramid oluşumunu engellediğinden dolayı apoptozda azalma saptanması resveratrolün hücre ölümünü seramid oluşumunu tetikleyerek gösterdiğini düşündürmektedir.

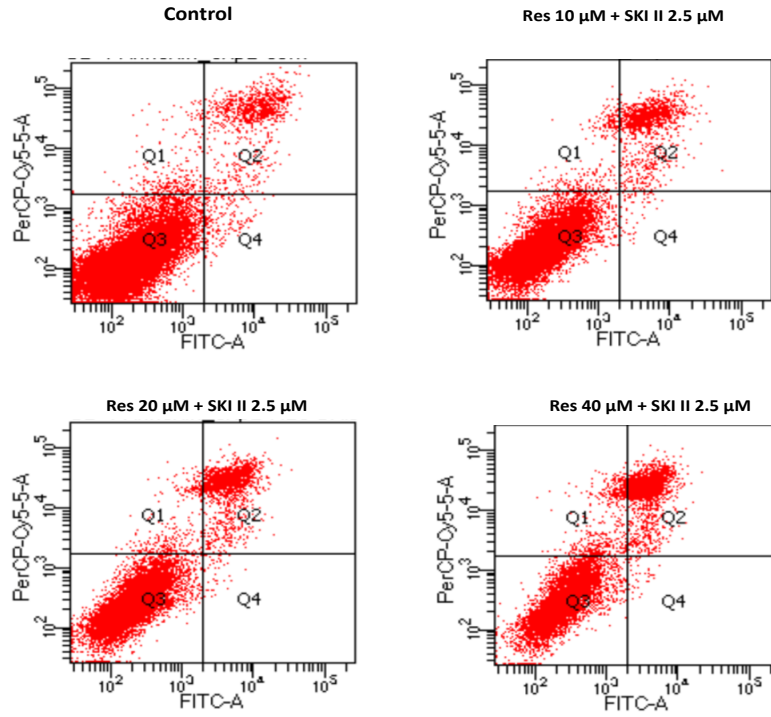
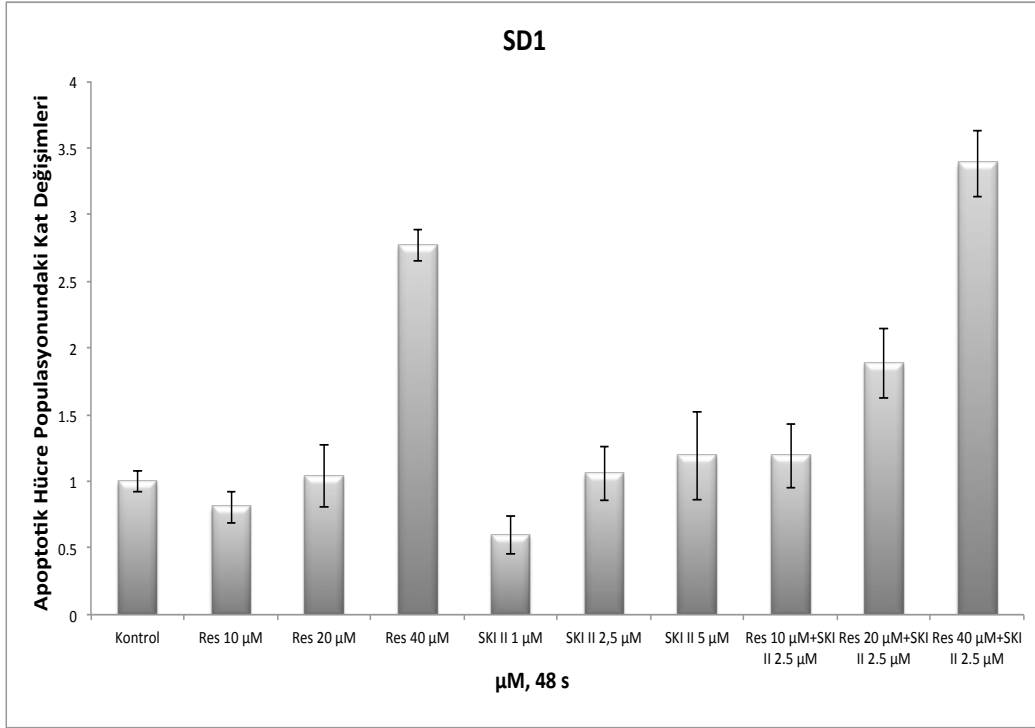
PDMP'nin artan konsantrasyonları (10-, 20-, ve 40 μ M) konsantrasyonları ile 48 saat boyunca muamele edilen SD1 hücrelerinde kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında apoptotik hücre popülasyonunda sırasıyla 1.19, 1.25 ve 1.35 katlık artışlar olmuştur (Şekil 8d).

Resveratrolün artan konsantrasyonlarının (10-, 20- ve 40 μ M) 10 μ M PDMP ile kombinasyonu sonucu apoptotik hücre popülasyonundaki artış ise sırasıyla, 1.3, 1.6 ve 2.5'tir. Bunun nedeninin de sfingolipid metabolizmasında görevli olan ve apoptotik seramid'in antiapoptotik glukozil seramid'e dönüşümünü katalizleyen GSS enziminin inhibe edilmesi kaynaklı seramid birikimi olduğu düşünülmektedir.

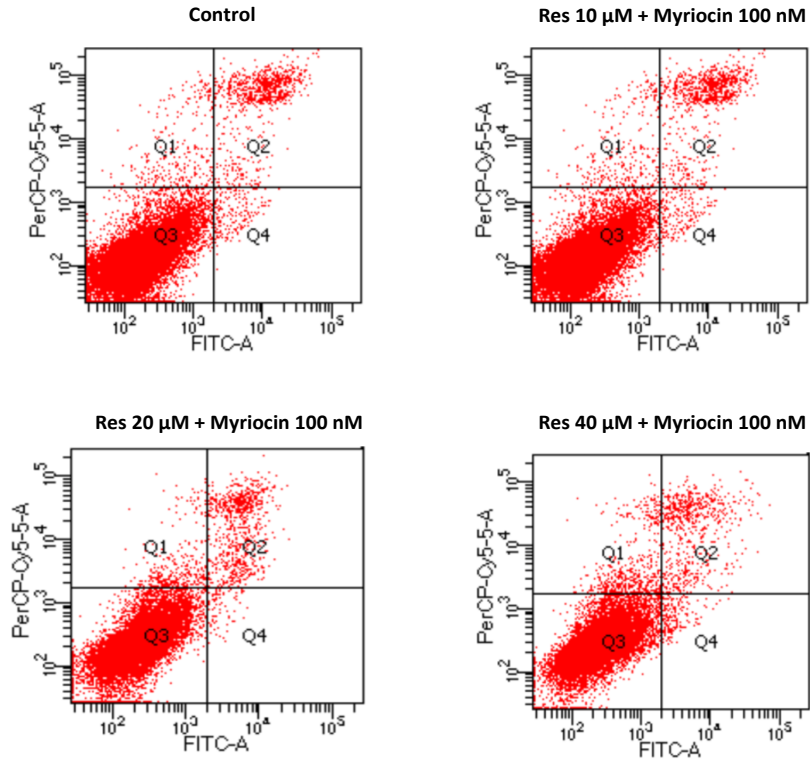
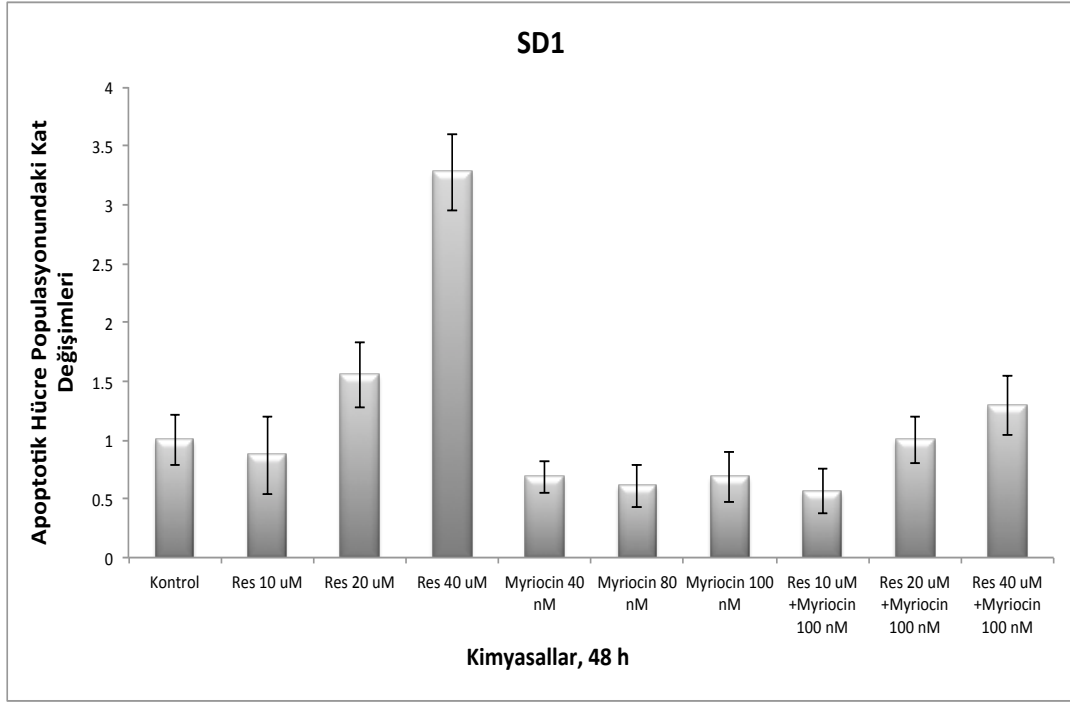
a)



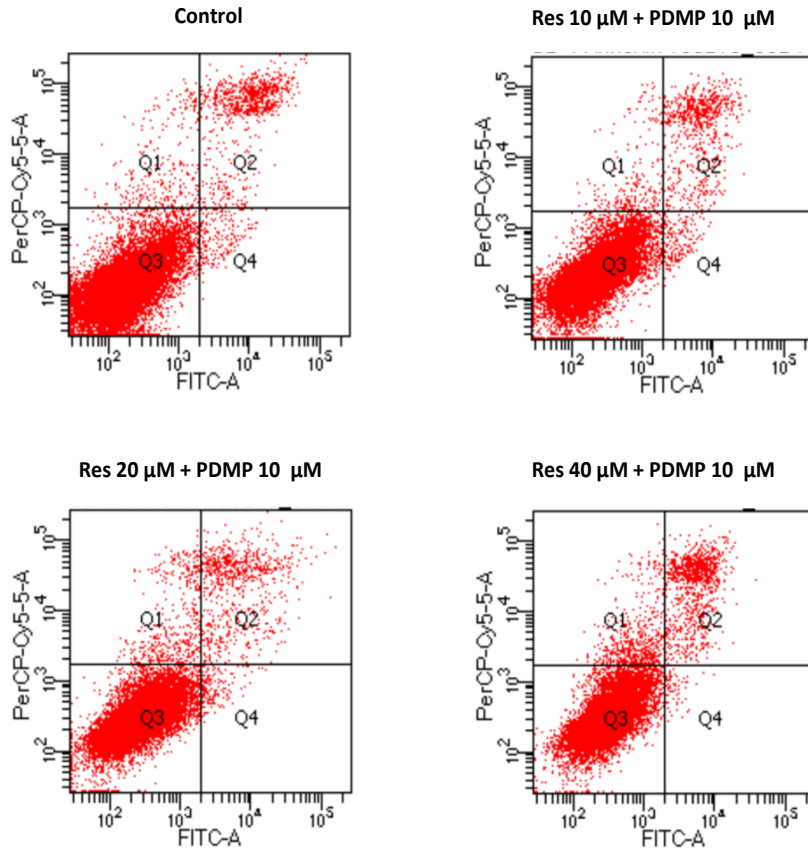
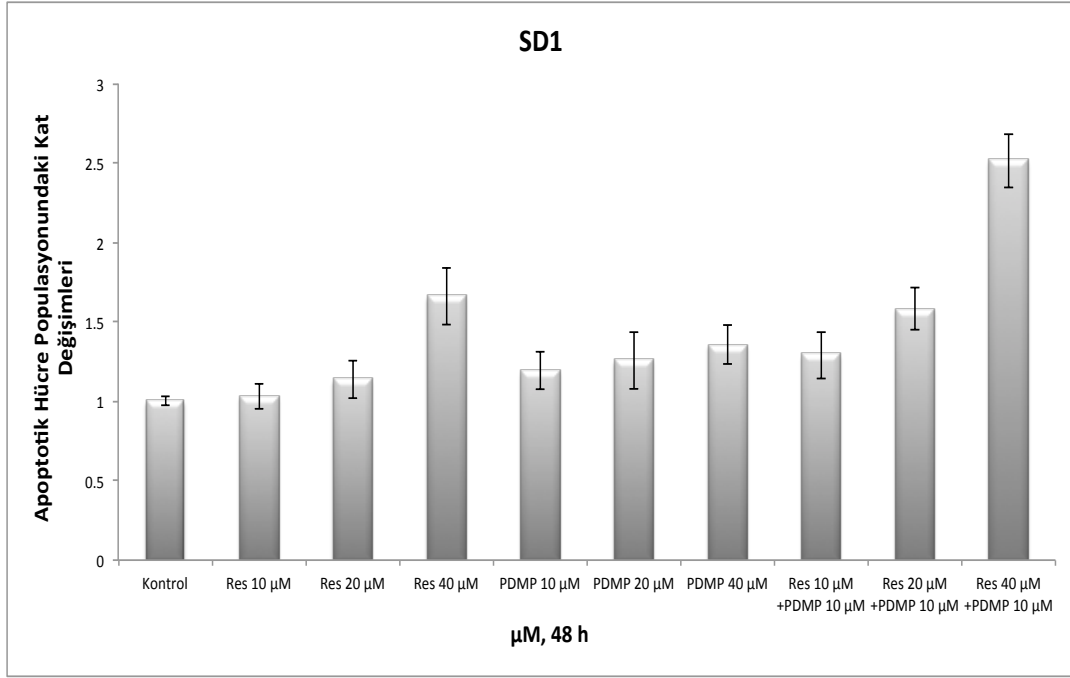
b)



c)



d)



Şekil 8. Resveratrol (a), SKI II, PDMP, Miriosin, Resveratrol:SK-1 inhibitörü (b), Resveratrol:SPT inhibitörü (c), ve Resveratrol: GSS inhibitörü kombinasyonlarının (d) SD1

hücreleri üzerindeki apoptotik etkileri. SD1 hücreleri için birbirinden bağımsız üç apoptoz testi gerçekleştirilmiştir ve alınan sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. **Q4** kadranında yerleşen hücreler AneksinV-pozitif/PI negatif, erken apoptotik popülasyonu, **Q2** kadranında yerleşen hücreler ise AneksinV-pozitif/PI pozitif geç apoptotik popülasyonu göstermektedir. Verilen akım sitometresi histogramları 3 bağımsız deneyden birini temsil etmektedir.

5-ve 10 μ M resveratrol ile muamele edilen SUP-B15 hücrelerinde, muamele edilmeyen kontrol hücrelerine kıyasla apoptotik hücre ölümlerinde sırasıyla 1.15 ve 2.0 kat artışlar saptanmıştır (Şekil 9a).

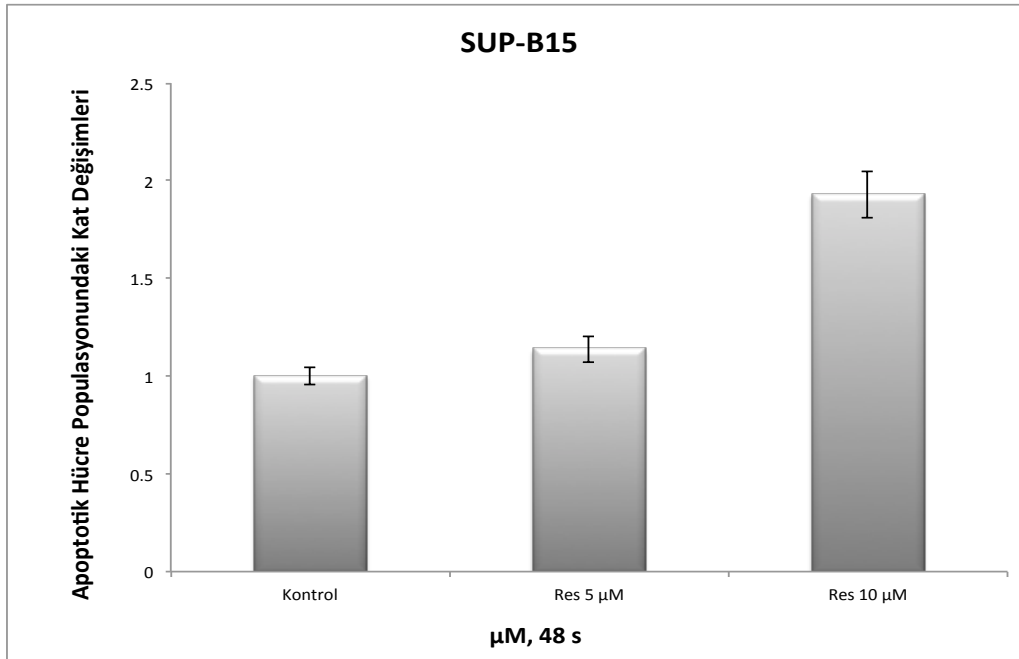
SKI II'nin 1 μ M konsantrasyonu ile muamele edilen SUP-B15 hücrelerinde muamele edilmemiş kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında apoptotik hücre popülasyonundaki artış 3.6 kattır. Resveratrolün artan konsantrasyonlarının (5- ve 10 μ M) 1.0 μ M SKI II ile kombinasyonu sonucu apoptotik hücre popülasyonundaki değişime bakıldığında resveratrol 10 μ M + SKI II 1.0 μ M kombinasyonunun apoptotik hücre popülasyonunu, kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 5.6 kat arttırdığı ve 10 μ M resveratrol ile karşılaştırıldığında ise yaklaşık 3.0 kat arttırdığı saptanmıştır (Şekil 9b). Sonuç olarak, 10 μ M resveratrolün SKI II inhibitörünün varlığında apoptozu tetikleme potansiyelinin arttığı ve bunun nedenininde sfingolipid metabolizmasında görevli olan ve apoptotik seramid'in antiapoptotik sfingozin-1-fosfata dönüşümünü katalizleyen SK enziminin inhibe edilmesi kaynaklı hücre içi seramid miktarının artması ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

PDMP'nin 1 μ M konsantrasyonu ile 48 saat boyunca muamele edilen SUP-B15 hücrelerinde kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında apoptotik hücre popülasyonunda 1.7 katlık artış olmuştur Resveratrolün artan konsantrasyonlarının (5- ve 10 μ M) 1.0 μ M PDMP ile kombinasyonu sonucu apoptotik hücre popülasyonundaki değişime bakıldığında, resveratrol 10 μ M + PDMP 1.0 μ M kombinasyonunun apoptotik hücre popülasyonunu arttırdığı (kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 2.5 kat arttırdığı ve 10 μ M resveratrol ile karşılaştırıldığında ise yaklaşık 1.5 kat arttırdığı) saptanmıştır (Şekil 9c). Bunun nedenininde sfingolipid metabolizmasında görevli olan ve apoptotik seramid'in antiapoptotik GS'e dönüşümünü katalizleyen GSS enziminin inhibe edilmesi sonucu hücre içi seramid birikiminin artmasıdır.

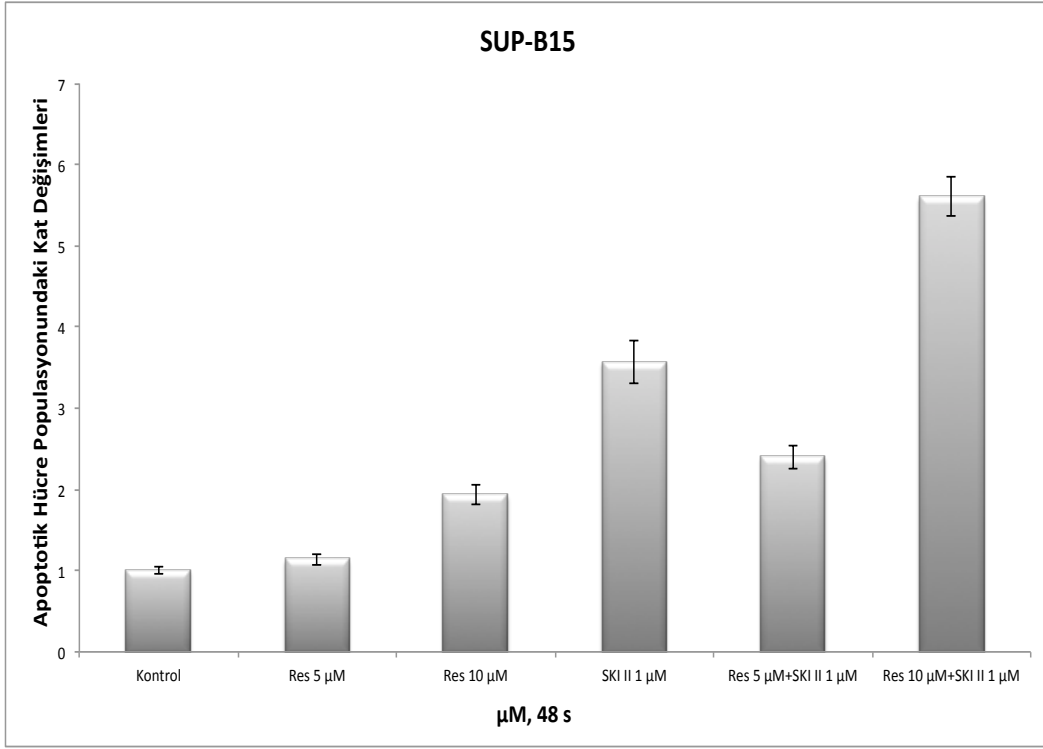
Sonuçlarda da açıklandığı üzere 10 μ M resveratrolün SKI II ve PDMP ile kombinasyonları hücre çoğalmasını baskımlarken (Şekil 5a ve 5b) aynı zamanda apoptozu arttırdığı (Şekil 9b ve 9c) görülmektedir. Hücre çoğalma verileri ile apoptoz sonuçlarının birbirini desteklemektedir.

SUP-B15 hücreleri 100 nM Miriosin ile muamele edildiğinde apoptotik hücre popülasyonunda muamele edilmeyen kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında bir azalma söz konusudur. Benzer şekilde, 5- ve 10 μM resveratrolün 100 nM Miriosin ile olan kombinasyonu sonucunda resveratrolün ilgili dozları ile karşılaştırıldığında apoptotik hücre popülasyonlarında azalmalar söz konusudur (Şekil 9d). Miriosin *de novo* seramid sentez yolağının ilk basamağındaki SPT enzimini inhibe ederek seramid oluşumunu engellediğinden dolayı, hücre içindeki apoptotik seramid miktarında bir azalma olduğu bu durumda apoptotik hücre popülasyonunda azalmaya neden olduğu sonuçlardan anlaşılmaktadır. Dolayısıyla, bu sonuçlar resveratrolün hücre ölümünü seramid oluşumunu tetikleyerek gösterdiği şeklinde yorumlanabilir.

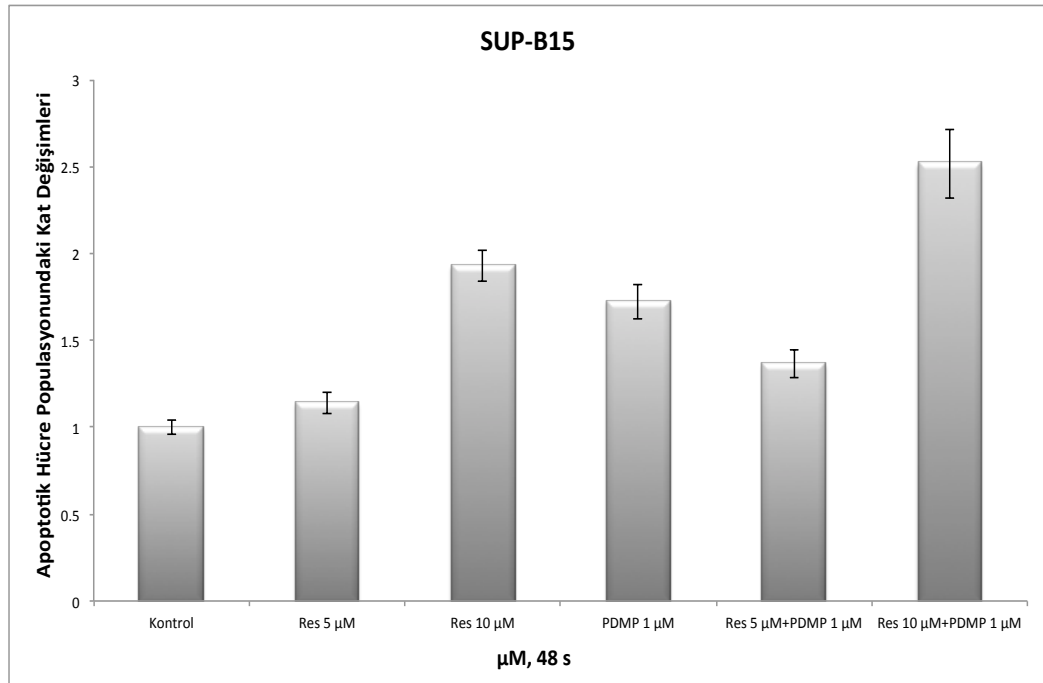
a)



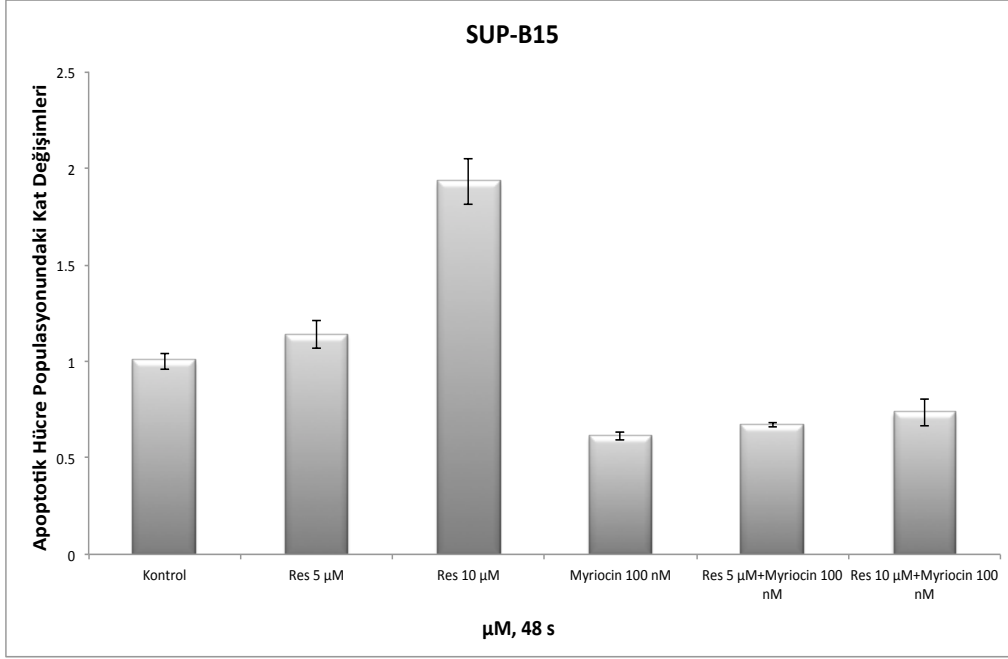
b)



c)



d)



Şekil 9. Resveratrol (a), SKI II, PDMP, Miriosin, Resveratrol:SK inhibitörü (b), ve Resveratrol: GSS inhibitörü (c) ve Resveratrol:SPT inhibitörü (d) kombinasyonlarının SUP-B15 hücreleri üzerindeki apoptotik etkileri. SUP-B15 hücreleri için birbirinden bağımsız üç apoptoz testi gerçekleştirilmiştir ve alınan sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. **Q4** kadranında yerleşen hücreler AneksinV-pozitif/PI negatif, erken apoptotik populasyonu, **Q2** kadranında yerleşen hücreler ise AneksinV-pozitif/PI pozitif geç apoptotik populasyonu göstermektedir. Verilen akım sitometresi histogramları 3 bağımsız deneyden birini temsil etmektedir.

SD1 ve SUP-B15 hücrelerinde resveratrolün artan konsantrasyonlarının hücrelerde apoptozu tetiklediği saptanmıştır (Şekil 8a ve 9a). Resveratrolün solid kanser türlerinde ve hematolojik kanserlerde çok farklı mekanizmalar üzerinden apoptozu tetiklediği literatürde gösterilmiştir. Artan konsantrasyonlarda resveratrol ile muamele edilen K562 KML hücrelerinde, apoptotik hücre populasyonlarının arttığı AneksinV-pozitif/PI boyaması ile saptanmıştır (Wang vd., 2015). Bu çalışmada resveratrolün mitokondri membran potansiyelinde (MMP) artışa sebep olarak sitokrom c'nin sitozole salınımını arttırdığı, kaspaz-3 ve PARP'ı aktifleştirdiği ve Bax/Bcl-2 oranını arttırdığı gösterilmiştir. 2017 yılında yayınlanan bir çalışmada T-ALL TALL-104 ve B-ALL SUP-B15 hücrelerinde 75 µM resveratrol muamelesi sonucu kaspaz-3 aktifleşmesi sonucu apoptozun tetiklendiği gösterilmiştir (Zhou vd., 2017). Bu çalışma, Ph+ ALL hücrelerinde elde edilen sonuçları destekler niteliktedir. T-ALL hücrelerinde 200 µM resveratrol muamelesi sonucu antiapoptotik Bcl-2 ailesi (Mcl-1 ve Bcl-2) üyelerinin ifadesi

azalırken apoptotik üyelerin (Bax, Bim, Bad) ve kesilmiş kaspaz-3'ün ifadesi artmıştır (Ge vd., 2013). Doğal öldürücü hücreli (Natural Killer (NK) cell) lenfomada resveratrol kaspaz-3'ü aktiveştirerek, STAT3 asetilasyonunu ve STAT3 hedef proteinleri olan antiapoptotik Mcl-1, Bcl-10 ve survivin ifadesini azaltarak hücrelerde apoptozu tetiklemiştir (Quoc Trung vd., 2013).

Resveratrolün lösemi ve solid kanser türlerinde bahsedilen terapötik potansiyelinin arkasında yatan etki mekanizmalarının yanısıra sfingolipid metabolizmasının çeşitli basamaklarının regülasyonu ile ilişkili olarak etki gösterdiği son yıllarda üzerinde çalışılan alanlardan biridir. Şekil 8b ve 9b'de gösterildiği üzere SD1 ve SUP-B15 hücrelerinde resveratrol tarafından tetiklenen apoptoz, apoptotik seramidin antiapoptotik S1F'a dönüştürülmesinden sorumlu olan SK-1/SK-2'in inhibe edilmesi ile birlikte artmıştır. Bu sonuç, resveratrolün Ph+ ALL'deki etki mekanizmasının hücre içi seramid miktarını arttırmak suretiyle gösterdiği şeklinde yorumlanabilir. Benzer şekilde GSS'in inhibisyonunda hücre içi seramid miktarının artmasına ve resveratrolün apoptotik etkisinin sinerjistik olarak artırılmasına neden olmuştur (Şekil 8d ve 9c). Elde edilen sonuçlar Ph+ ALL modeli için literatürde bir ilktir. Resveratrolün Ph+ ALL SUP-B15 hücrelerindeki etkisi 2017 (Zhou vd., 2017) yılında gösterilmiş olsada sfingolipid metabolizmasının hedeflenmesi ile birlikte ortaya çıkan etki mekanizması daha önce gösterilmemiştir. Resveratrolün sfingolipid metabolizması üzerinden çeşitli kanser türlerinde nasıl etkiler gösterdiğini açıklayan çalışmalar sınırlıda olsa mevcuttur. Gastrik kanseri hücrelerinin resveratrol ve dimetilsfingozin (SK inhibitörü) ile birlikte muamele edilmesi sonucu resveratrolün sitotoksik ve apoptotik etkisi artmıştır (Shin vd., 2012). PDMP:resveratrol ve SK inhibitörü:resveratrol kombinasyonlarının hem APL hemde KML'de MMP'de değişimlere ve kaspaz-3 enzim aktivitesinde artışlara neden olarak sinerjistik apoptotik etki gösterdiği saptanmıştır (Çakır vd., 2011; Kartal vd., 2011). Şekil 8c ve 9d'den anlaşılacağı üzere *de novo* seramid sentezinin ilk basamağını katalizleyen SPT'ın Miriosin ile inhibe edilmesi sonucu resveratrol varlığında tetiklenen apoptoz önemli ölçüde azalmıştır. Elde edilen bu sonuç literatürle uyumluluk göstermektedir. Metastatik meme kanseri hücrelerinde resveratrolün SPT inhibitörleri olan Miriosin ve L-sikloserin ile birlikte verilmesi hücrelerde resveratrolün tek başına tetiklediği apoptozu geri çevirmiş ve PARP kesimini azaltmış veya ortadan kaldırmıştır (Scarlatti vd., 2003). Nazofarenks kanser hücrelerinde resveratrol ile birlikte Miriosin ve/veya L-sikloserin verilmesi sonucu apoptoz baskılanarak resveratrolün etkisi geri çevrilmiştir (Chow vd., 2014).

Sfingolipid metabolizmasının anahtar enzimlerinin resveratrol tarafından tetiklenen hücre büyümesi inhibisyonunda ve apoptozdaki rolünü anlamak amacıyla resveratrol varlığında SK-1, SK-2, GSS ve SPT enzimlerinin protein düzeyindeki ifadeleri incelenmiştir. Bu amaçla,

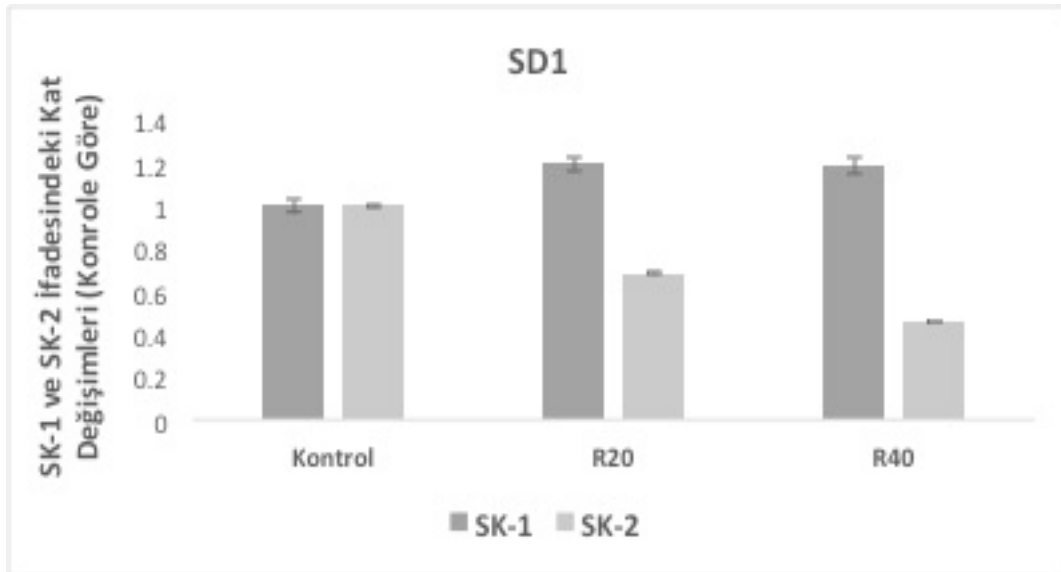
resveratrolün artan dozları ile 48 saat boyunca muamele edilen SD1 (20- ve 40 μ M) ve SUP-B15 (5- ve 10 μ M) hücrelerinden detayları Gereç ve Yöntemler kısmında açıklandığı şekilde total protein izolasyonu gerçekleştirilerek SK-1, SK-2, GSS ve SPT enzimlerinin ifadesindeki değişimler belirlenmiştir. SD1 hücrelerinde resveratrolün artan konsantrasyonlarının SK-1 ifadesi üzerinde anlamlı bir değişime neden olmadığı ancak SK-2 üzerinde kontrol ile karşılaştırıldığında sırasıyla 0.32 ve 0.54 katlık azalmalara neden olduğu saptanmıştır (Şekil 10a). SUP-B15 hücrelerinde ise 5- ve 10 μ M resveratrol hem SK-1 (sırasıyla 0.6 ve 0.75 katlık) hemde SK-2 (sırasıyla 0.65 ve 0.69 katlık) ifadesinde kontrol ile karşılaştırıldığında azalmalara neden olmuştur (Şekil 11a). Apoptotik sfingozinin antiapoptotik SF1'a dönüşümünden sorumlu olan SK enziminin iki izoformu bulunmaktadır (SK-1 ve SK-2). SK-1'in rolü birçok kanser türünde literatür kısmında tartışıldığı üzere araştırılmıştır. Bir çalışmada, SD1 sonuçları ile uyumlu olacak şekilde resveratrol ile muamele edilen K562 KML hücrelerinde total SK-1 ifadesinde bir değişiklik saptanmamışken SK-1'in membrandan sitoplazmaya translokasyonunun arttığı, aktivitesinin baskılandığı ve SK-1 ürünü olan S1F'in miktarının azaldığı gösterilmiş ve hücrelerin büyümeleri baskılanmıştır (Tian vd., 2015). Son yıllarda, SK-2'nin çeşitli kanser türlerinde ifadesinin arttığı ve neoplastik transformasyona, tümör oluşumuna ve gelişimine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Evangelisti vd., 2016). Farmakolojik veya genetik olarak inhibisyonunun ise kanser hücrelerinde çeşitli mekanizmalar üzerinden büyüme inhibisyonuna neden olduğu bilinmektedir. Örneğin, koloniyokarsinom hücrelerinde SK-2 ifadesinin arttığı ve spesifik inhibitör (ABC294640) ile muamele sonucu hücrelerin proliferasyonunun baskılandığı ve kaspaz bağımlı apoptozun tetiklendiği gösterilmiştir (Ding vd., 2017). SK-2'nin onkojenik Myc ifadesini arttırarak ALL gelişimini desteklediği ve genetik/farmakolojik olarak inhibe edilmesinin ise ALL gelişimini yavaşlattığı bilinmektedir (Wallington-Beddoe vd., 2014). Projede, resveratrol SD1 ve SUP-B15 hücrelerinde SK-1/SK-2'yi inhibe etmek suretiyle antiapoptotik S1F oluşumunu engellemiş, hücrelerin büyümesini inhibe etmiş ve apoptozu tetiklemiştir. Resveratrolün SK-2 üzerinde nasıl bir etki gösterdiği literatürde ilk defa Ph+ ALL 'de bu proje ile gösterilmiştir.

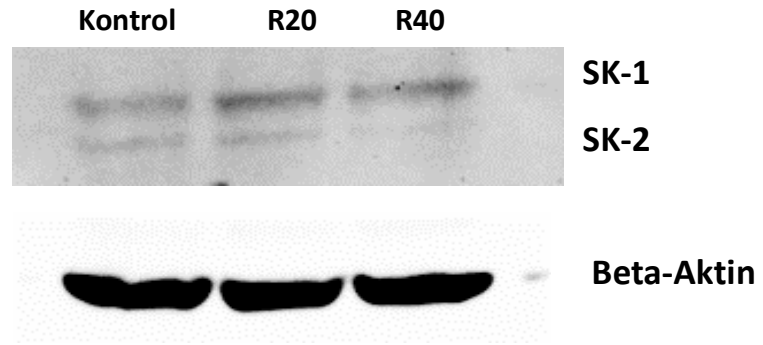
20- ve 40 μ M resveratrol SD1 hücrelerinde GSS ifadesini kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı şekilde (sırasıyla 0.7 ve 0.8 kat) azaltmıştır (Şekil 10b). SUP-B15 hücrelerinde ise 10 μ M resveratrol GSS ifadesini kontrol ile karşılaştırıldığında 0.32 kat azaltmıştır (**Şekil 11b**). Elde edilen bu sonuç, resveratrolün antiapoptotik GS sentezinden sorumlu enzimi inhibe ederek hücrelerin büyümesini inhibe ettiğini ve apoptozu tetiklendiğini göstermektedir. Literatürde, resveratrolün GSS üzerindeki etkisini gösteren fazla çalışma bulunmamakla beraber elde edilen sonuçlar özellikle K562 KML ve HL60 APL'de elde edilen sonuçlar ile tutarlıdır (Çakır vd., 2011; Kartal vd., 2011). Bu çalışmalarda resveratrol muamelesi sonucu

SK-1 ve GSS genlerinin ifadesinin azaldığı gerçek zamanlı PZR ile gösterilmiş olup protein seviyesinde nasıl bir değişim izlendiği belirtilmemiştir. Hücre proliferasyon ve apoptoz sonuçlarında da açıklandığı üzere resveratrolün SK inhibitörü (SKI II) ve GSS inhibitörü (PDMP) ile kombinasyonlarında SD1 ve SUP-B15 hücrelerinde resveratrol ile karşılaştırıldığında sinerjistik etki göstererek hücre çoğalmasını inhibe etmiş ve apoptozu arttırmıştır (Şekil 4, 5, 8 ve 9) ve bu sonuçlar resveratrolün Ph + ALL'deki terapötik potansiyelinin altındaki nedenin sfingolipid metabolizmasının anahtar enzimlerinin düzenlenmesiyle ilişkili olduğunu göstermektedir.

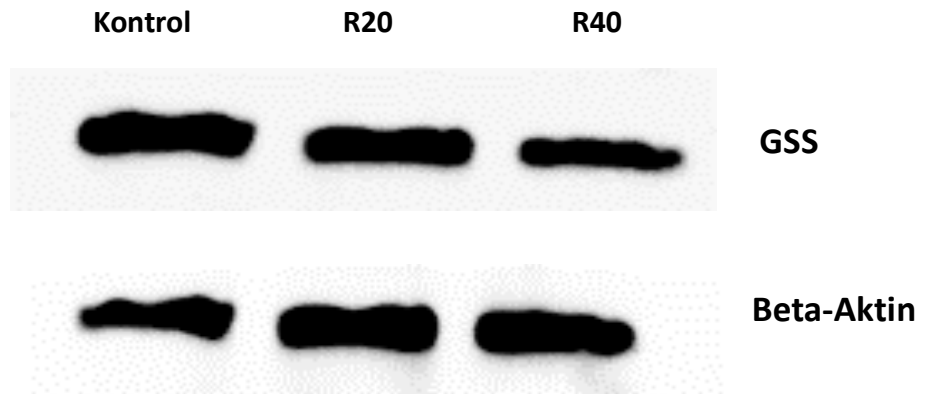
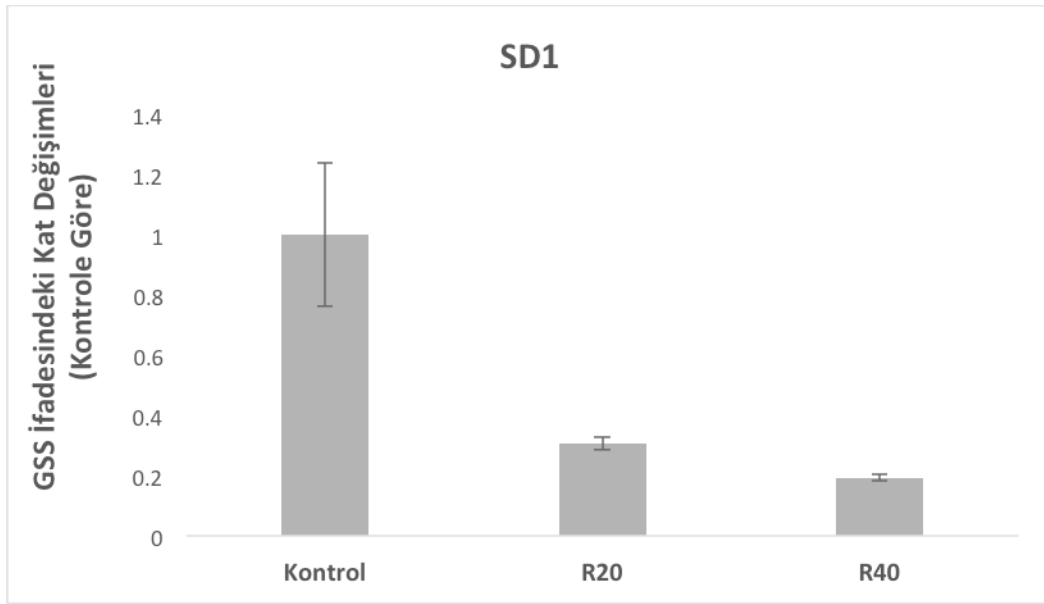
Resveratrolün artan konsantrasyonlarının (20- ve 40 μ M) SPT ifadesini üzerindeki etkisi incelendiğinde ise sırasıyla 2.2 ve 2.3 katlık artışlar saptanmıştır (Şekil 10c). SUP-B15 hücrelerinde ise 10 μ M resveratrol 0.38 katlık bir artışa neden olmuştur (Şekil 11c). SPT *de novo* seramid sentezinin ilk basamağını katalizleyen enzimdir (Şekil 1) ve resveratrol tarafından ifadesinin artırılıyor olması resveratrolün hücre içi seramid miktarını artırarak hücre ölümünü tetiklediğini göstermektedir. Resveratrolün metastatik meme kanseri, kolon kanseri ve nazofarenks kanser hücreleri üzerindeki apoptotik etkilerinin *de novo* seramid sentez yolağının aktivasyonu ile olduğu ve SPT'in inhibe edilmesi sonucu bu etkinin geri döndüğü bilinmektedir (Scarlati vd., 2003; Ulrich vd., 2007; Chow vd., 2014). Benzer sonuçlar SD1 ve SUP-B15 hücrelerinde resveratrolün SPT inhibitörü (Miriosin) ile kombinasyonlarında da saptanmıştır ve resveratrol aracılı apoptoz baskılanmıştır (Şekil 8 ve 9). Elde edilen sonuç Ph+ ALL hücrelerinde ilk defa olmak üzere literatür ile tutarlılık göstermektedir.

a)

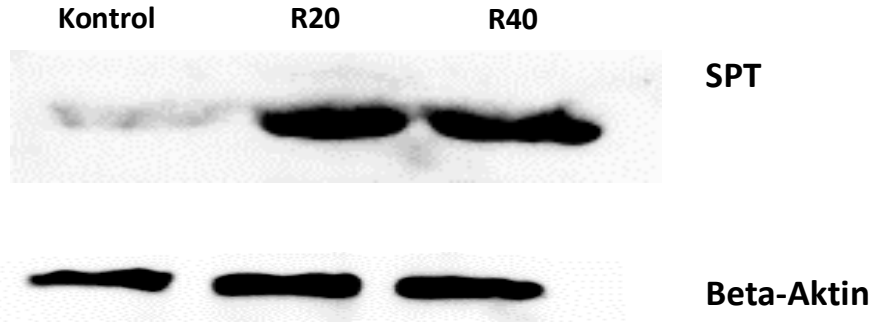
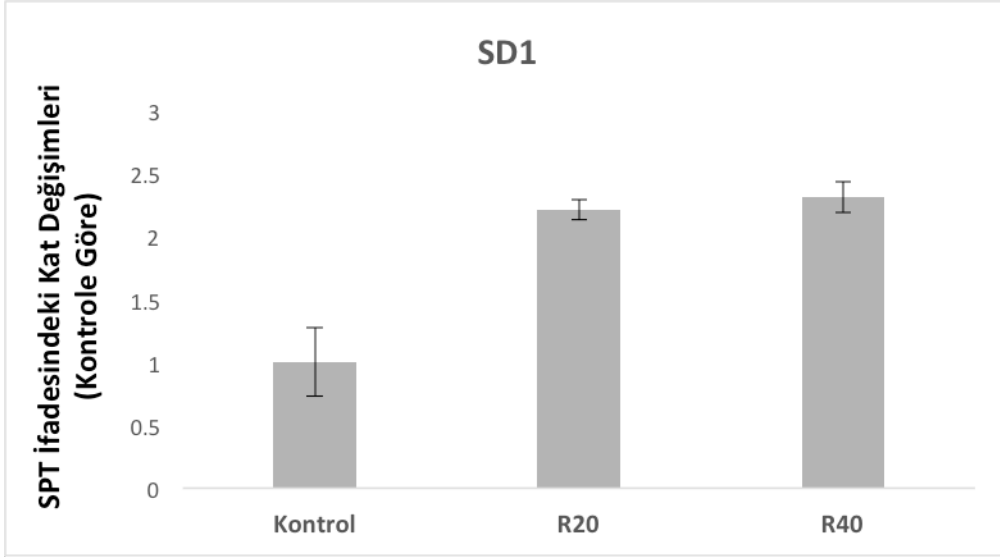




b)

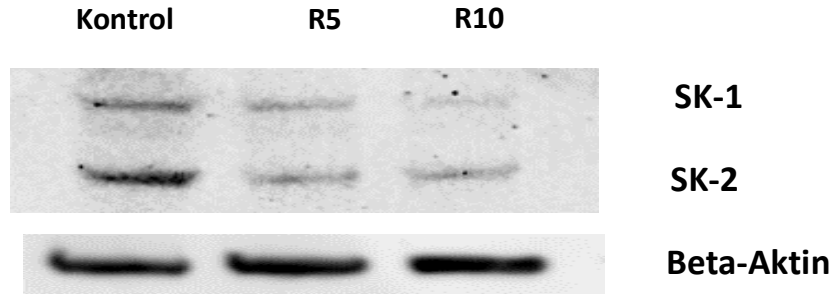
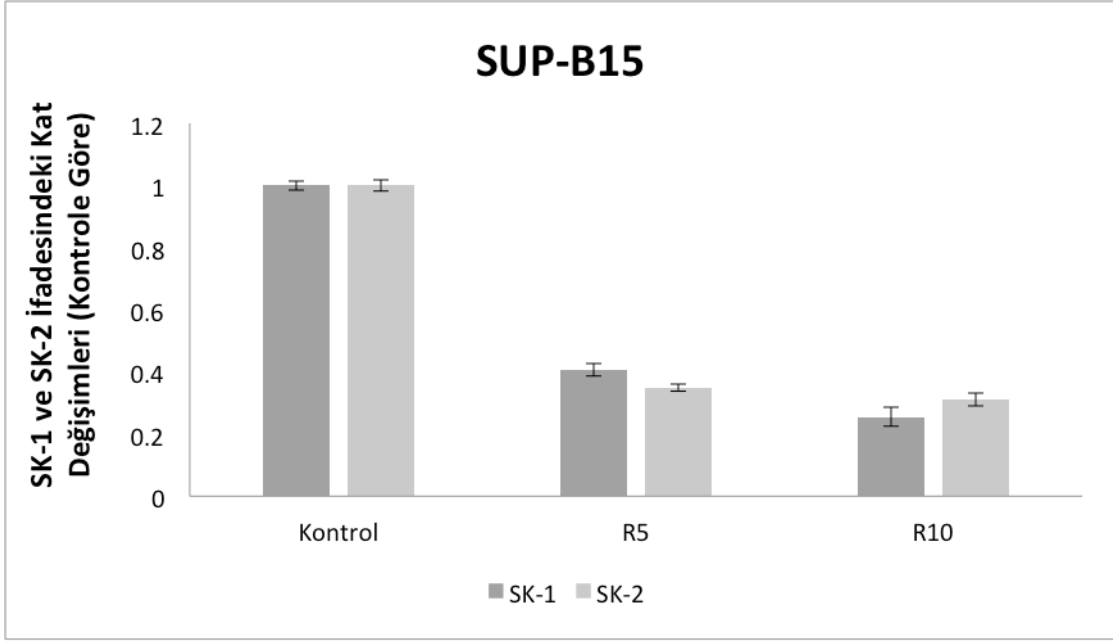


c)

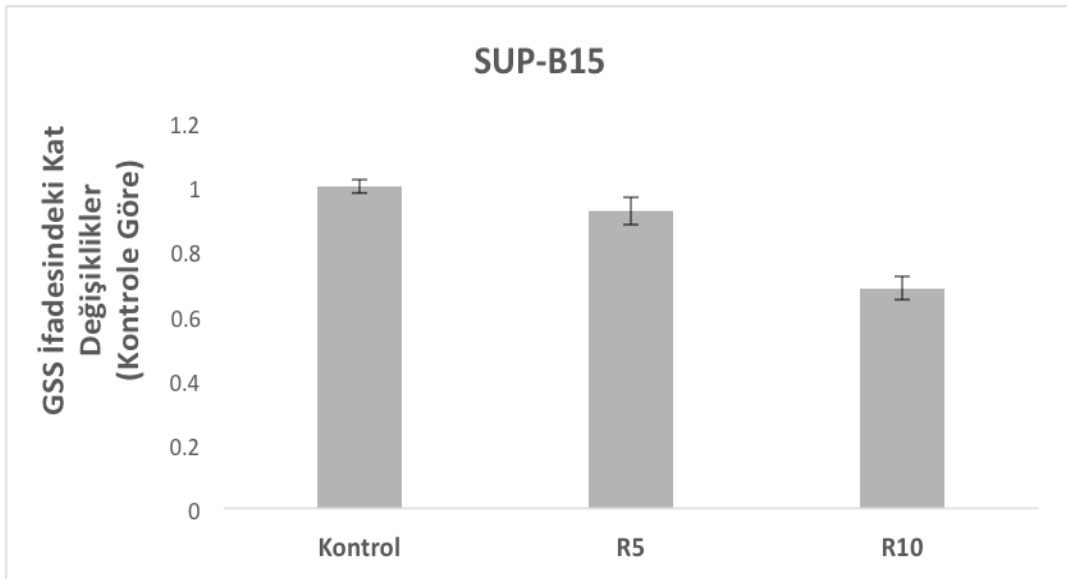


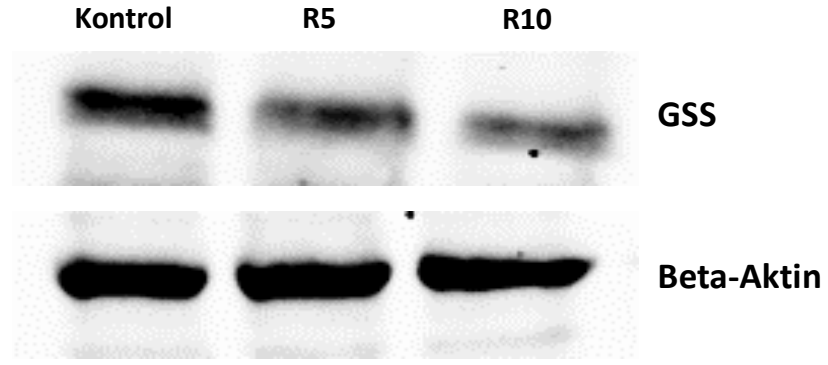
Şekil 10. Resveratrol ile muamele edilen SD1 Hücrelerinde SK-1/SK-2 (a), GSS (b) ve SPT (c) ifadesinde meydana gelen değişimler. Beta-Aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. Deney setleri iki kez tekrarlanmıştır ve her bir set için temsili western blot şekli kullanılmıştır. Birbirinden bağımsız 2 farklı deney setinden alınan sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. Herbir grubun protein ifadesi kendi Beta-Aktinlerine normalize edilmiştir ve grafikler kontrol değeri 1 kabul edilerek ve kontrole oranlanarak analizlenmiştir.

a)

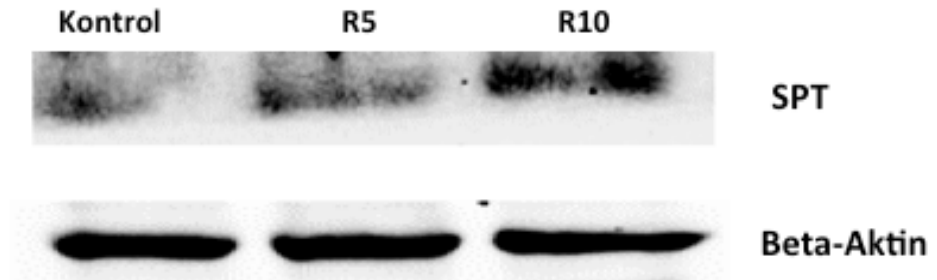
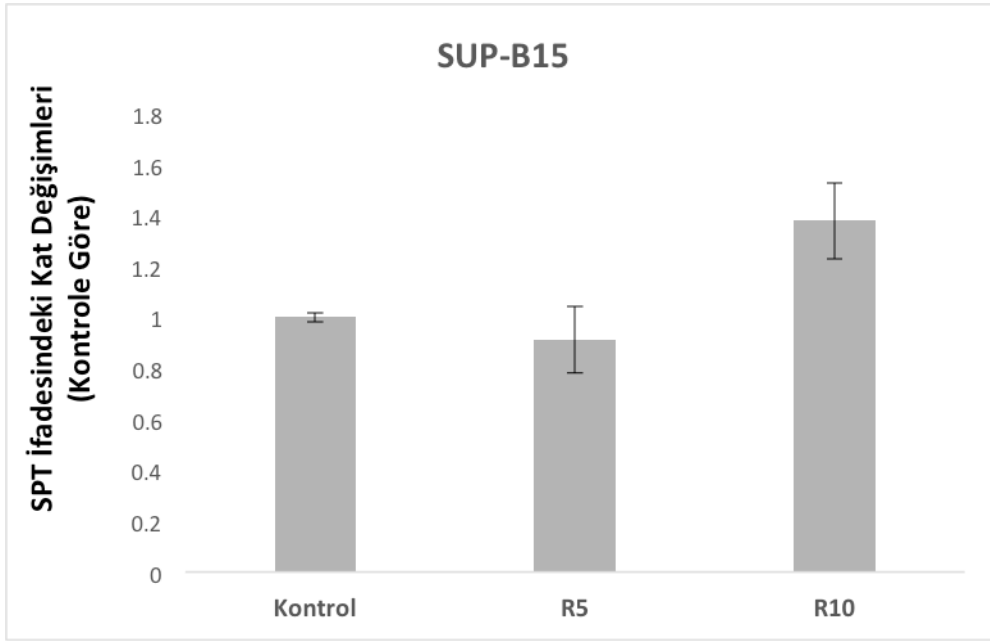


b)





c)

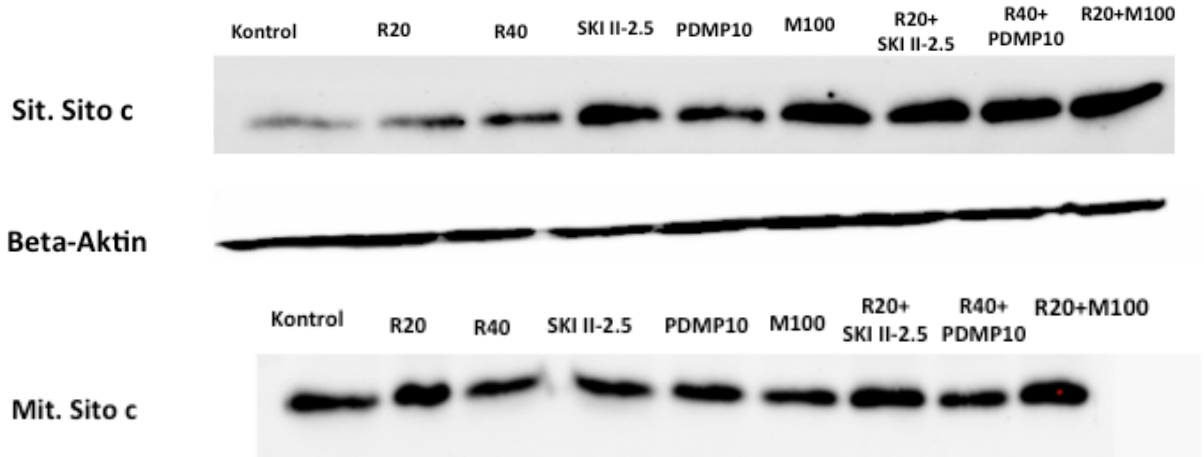


Şekil 11. Resveratrol ile muamele edilen SUP-B15 Hücrelerinde SK-1/SK-2 (a), GSS (b) ve SPT (c) ifadesinde meydana gelen değişimler. Beta-Aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. Deney setleri iki kez tekrarlanmıştır ve her bir set için temsili western blot şekli kullanılmıştır. Birbirinden bağımsız 2 farklı deney setinden alınan sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. Herbir grubun protein ifadesi kendi Beta-Aktinlerine normalize edilmiştir ve grafikler kontrol değeri 1 kabul edilerek ve kontrole oranlanarak analizlenmiştir.

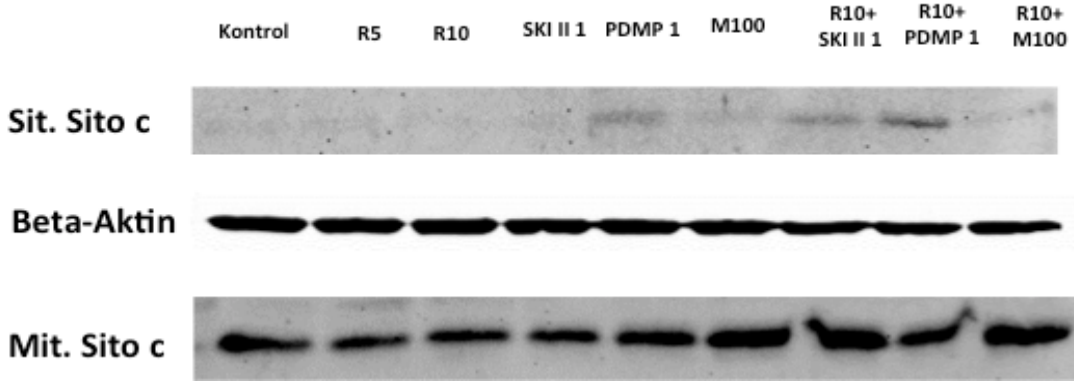
Resveratrol ve sfingolipid metabolizması enzim inhibitörleri kombinasyonlarının apoptozu nasıl düzenlediğini moleküler düzeyde anlamak amacıyla sitokrom c salınımı, kaspaz-3 ve PARP kesimi Ph + ALL hücrelerinde western blot ile gösterilmiştir. Mitokondri iç membranı ile dış membranı arasında lokalize olan sitokrom c'nin sitozole salınımı intrinsik apoptozun önemli belirteçlerinden biridir. Sitozoldeki sitokrom-c, Apaf-1 ile kompleks oluşturarak kaspaz-9'u aktif hale getirir. Aktifleşen kaspaz-9 ise kaspaz-3'ü aktifleştirir ve kaspaz-3 ise hedef proteinlerinden biri olan PARP kesimine neden olarak intrinsik apoptozu tetikler. SD1 ve SUP-B15 hücrelerinden resveratrol, inhibitörler ve resveratrol:inhibitör kombinasyonları ile muamelesi öncesi ve sonrası sitosolik ve mitokondriyal fraksiyonlar Gereç ve Yöntemler bölümünde açıklandığı üzere toplanmış ve western blot analizi ile sitokrom-c'nin sitozole salınımı incelenmiştir. SD1 hücrelerinde kontrol ile karşılaştırıldığında sitoplasmik sitokrom-c salınımında resveratrol'ün artan konsantrasyonlarında (20- ve 40 μ M) sırasıyla 0.37 ve 0.70 katlık artışlar saptanmıştır ve literatürle uyumludur. Nazofarenks kanseri, retinoblastoma VE gastrik kanseri hücrelerinde resveratrol muamelesi sonucu sitosolik sitokrom-c miktarı kontrole göre artmıştır (Huang vd., 2011; Sareen vd., 2006; Yang vd., 2018). 2.5 μ M SKI II, 10 μ M PDMP, 100 nM Miriosin ise sırasıyla 5.2, 2.6 ve 6.6 katlık artışlar göstermiştir. 20 μ M resveratrolün 2.5 μ M SKI II ve 100 nM Miriosin ile kombinasyonu sonucu ise 6.0 ve 7.5'lik artışlar saptanmıştır. 40 μ M resveratrolün 10 μ M PDMP ile kombinasyonu sonucu 7.8 katlık bir artış görülmüştür (Şekil 12a). SUP-B15 hücrelerinde ise 1 μ M SKI II, 1 μ M PDMP ve 100 nM Miriosin kontrole göre sitokrom-c salınımında sırasıyla 1.2, 2.7 ve 1.5 katlık artışlar oluşturmuştur. 5- ve 10 μ M resveratrol anlamlı bir değişiklik göstermezken 10 μ M resveratrolün 1 μ M SKI II ve 1 μ M PDMP ile kombinasyonları sırasıyla 4.3 ve 3.6 katlık artışlar göstermiştir. 10 μ M resveratrol ve 100 nM Miriosin kombinasyonu ise 1.2 katlık bir artış göstermekle beraber sadece Miriosin ile karşılatırıldığında 0.2 katlık bir azalmaya sebep olmuştur (Şekil 12b). Elde edilen sonuçlar resveratrol'ün SKI II ve PDMP ile kombinasyonlarının sitokrom c salınımını sinerjistik olarak arttırdığını göstermektedir ve bu sonuçlar apoptoz sonuçlarını destekler görülmektedir. SKI II ve PDMP inhibisyonu sonucu hücre içindeki apoptotik seramid miktarının artıyor olması ve aynı zamanda resveratrolün SK ve GSS üzerindeki inhibe edici etkisi ile seramid birikimine katkıda bulunması böyle bir sinerjinin görülmesini desteklemektedir. Miriosin kombinasyonları sonucu elde edilen veriler sitokrom c salınımını göstermekle beraber apoptoz verilerinde elde edilen baskılanmayı açıklayamamaktadır. Miriosinin tek başına veya kombinasyonlarda sitokrom-c salınımını tetikleyici olması literatürde sınırlı sayıda çalışmada açıklanmıştır. Örneğin, UV ile muamele edilen HeLa hücrelerinde gerçekleşen sitokrom-c salınımının Miriosin muamelesi sonucu (*de novo* seramid üretiminin baskılanması ve seramid miktarı azalmış olmasına rağmen) engellenmesi beklenirken sitokrom-c salınımı artmış ve sadece Miriosin muamelesinde de

salınım saptanmıştır (Dai vd., 2004). Ancak, bu çalışmada apoptoz engellenmemiştir. Dolayısıyla, Ph + ALL'de resveratrolün Miriosin ile kombinasyonunun apoptozu baskılama mekanizmasının sitokrom-c salınımından bağımsız bir mekanizma ile gerçekleşebileceği şeklinde yorumlanabilir.

a)



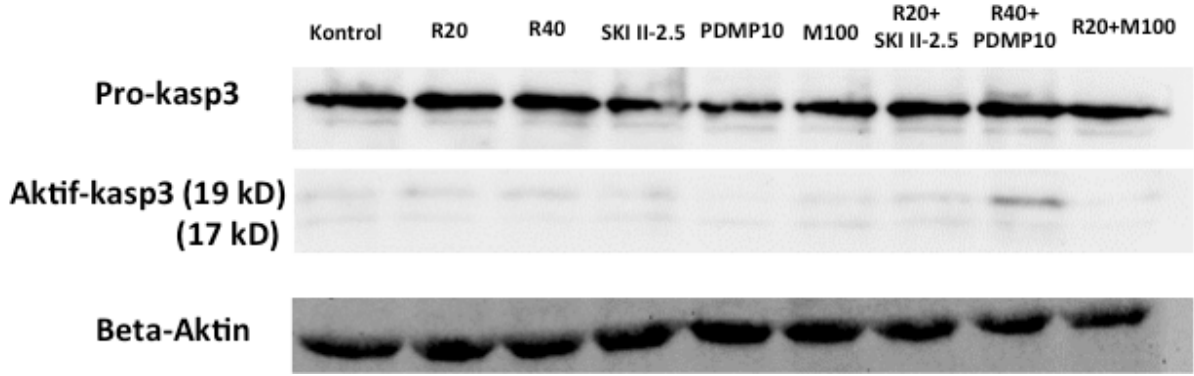
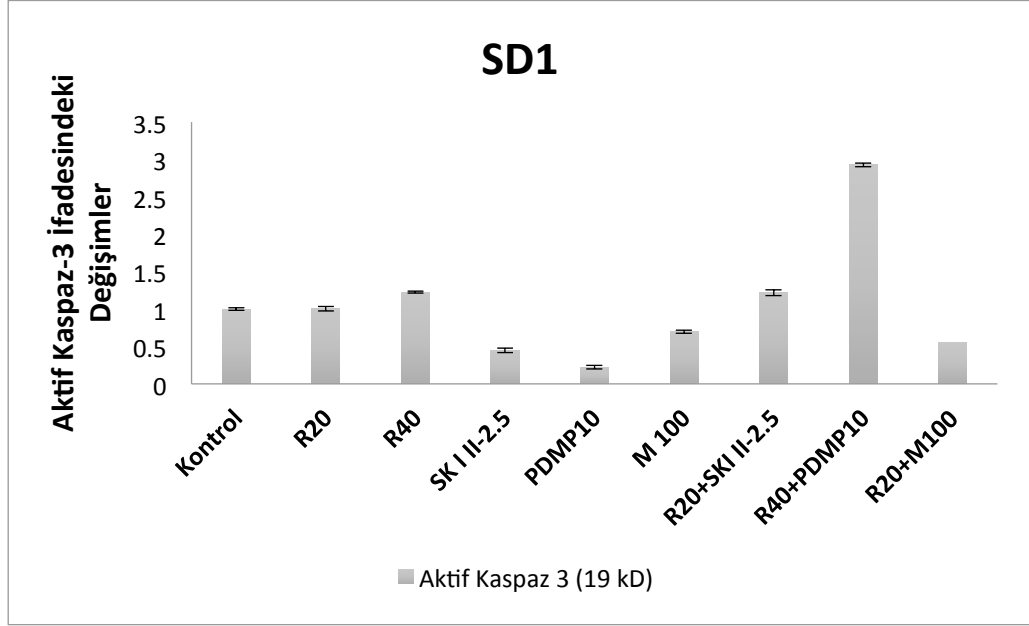
b)



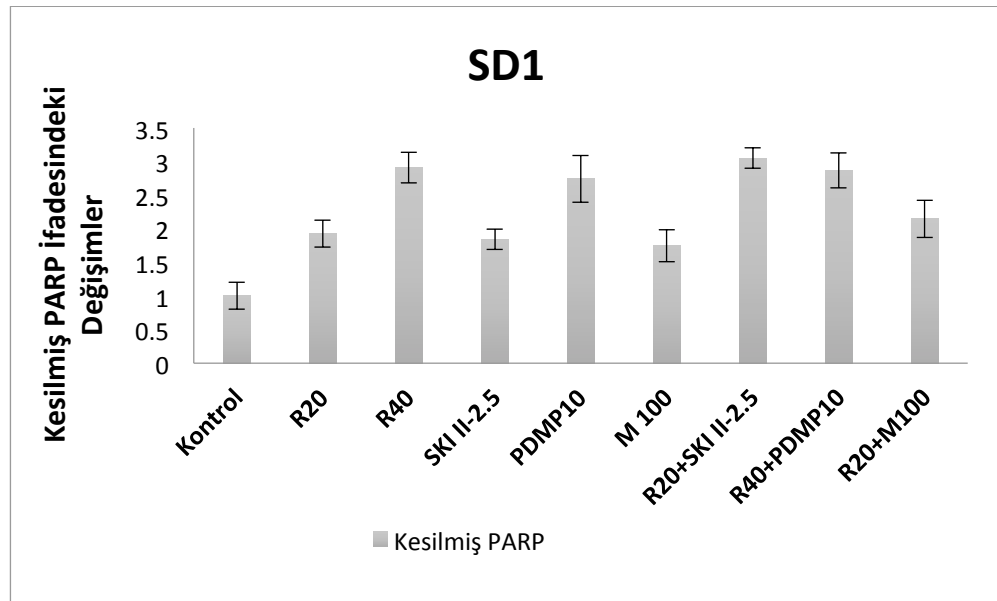
Şekil 12. Resveratrol, SPT, SK ve GSS inhibitörleri, resveratrol:SPT inhibitörü, resveratrol:SK inhibitörü ve resveratrol:GSS inhibitörü kombinasyonları ile muamele edilen SD-1 (a) ve SUP-B15 (b) hücrelerinde sitokrom-c salınımı. Beta-Aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. Deney setleri iki kez tekrarlanmıştır ve her bir set için temsili western blot şekli kullanılmıştır. Birbirinden bağımsız 2 farklı deney setinden alınan sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. Herbir grubun sitoplazmik sitokrom-c salınımı kendi Beta-Aktinlerine normalize edilmiştir ve grafikler kontrol değeri 1 kabul edilerek ve kontrole oranlanarak çizilmiştir.

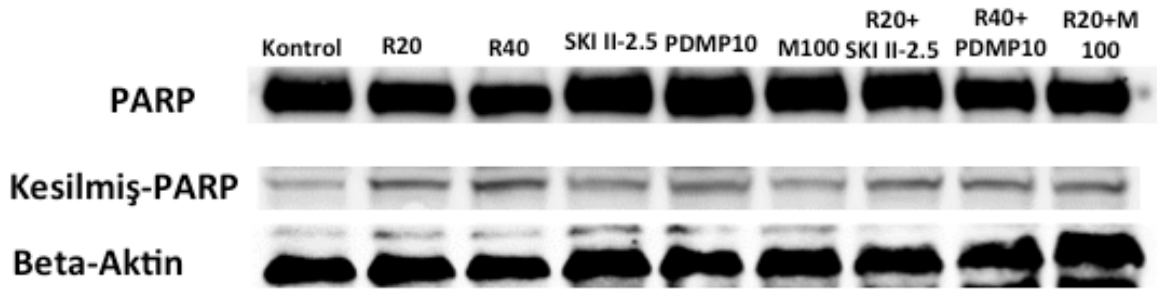
SD1 (Şekil 13a ve 13b) ve SUP-B15 (Şekil 13c ve 13d) hücrelerinde sitokrom-c salınımı ile birlikte intrinsik apoptoz yolağında rol olan kaspaz-3 aktifleşmesi ve aktif kaspaz-3 substratı olan PARP kesimi western blot yöntemi ile araştırılmıştır. Şekil 13a ve 13b'de gösterildiği üzere resveratrolün artan konsantrasyonları kontrol ile karşılaştırıldığında aktif kaspaz-3 ve aktif PARP ifadesini arttırmıştır. SD1 hücrelerinde 20 μ M resveratrolün 2.5 μ M SKI II ve 40 μ M resveratrolün 10 μ M PDMP ile kombinasyonları neticesinde aktif kaspaz-3 ifadesinde sırasıyla 1.22 kat ve 2.4 kat artış gözlemlenirken aktif PARP ifadesindeki değişimler ise sırasıyla 1.6 kat artış ve aynı seviyede olacak şekilde gözlemlenmiştir (resveratrolün ilgili dozları ile karşılaştırıldığında). 20 μ M resveratrolün 100 nM Miriosin ile kombinasyonu ise aktif kaspaz-3 ve PARP ifadesinde sırasıyla 0.55 katlık bir azalma ve 1.23 katlık bir artma meydana getirmiştir. SUP-B15 hücrelerinde de resveratrolün artan konsantrasyonları kontrol ile karşılaştırıldığında kaspaz-3 ve PARP kesimini arttırmıştır (Şekil 13c ve d). 10 μ M resveratrolün 1 μ M SKI II ve 1 μ M PDMP ile kombinasyonu resveratrolün tekli dozu ile karşılaştırıldığında aktif kaspaz ifadesinde sırasıyla 0.23 kat artış ve 0.15 kat azalma meydana getirirken PARP kesiminde sırasıyla 0.4 ve 1.67 kat arttırmıştır. 10 μ M resveratrolün 100 nM Miriosin ile kombinasyonu ise aktif kaspaz-3 ifadesinde ve PARP kesiminde sırasıyla 0.47 katlık bir azalmaya ve 1.25 kat artışa neden olmuştur. SD1 ve SUP-B15 hücrelerinde resveratrolün artan konsantrasyonları kaspaz-3 ve PARP kesimini arttırarak intrinsik yolak üzerinden apoptozu tetiklediklerini göstermektedir. Bu sonuç, iki hücre hattı içinde sitokrom-c salınımı ile tutarlılık göstermektedir (Şekil 12a ve b). Birçok kanser türünde de gösterildiği üzere resveratrolün yaygın etki mekanizmalarından biri intrinsic yolak üzerinden apoptozu tetiklemesidir. Örneğin, kolorektal kanser hücrelerinde resveratrol kaspaz-3 ve PARP kesimini arttırmıştır (Liu vd., 2019). K562 KML hücrelerinde resveratrol muamelesi sonucu mitokondri aracılı apoptozun tetiklendiği kaspaz-3 ve PARP kesimi ile gösterilmiştir (Wang vd., 2015). Resveratrolün SKI II ile kombinasyonunda sinerjistik etki göstererek kaspaz-3'ü aktifleştirmiş ve PARP kesimini arttırmıştır. Dolayısıyla, bu kombinasyonda mitokondriyal yolak üzerinden etki göstermektedir. Ancak, SUP-B15 hücrelerinde resveratrol:PDMP ve her iki hücrede resveratrol:Miriosin kombinasyonları kaspaz-3 bağımsız bir PARP kesimine sebep olarak ve sitokrom-c salınımını indükleyerek hücre ölümüne neden oluyor görülmektedir. Sitokrom-c salınımının intrinsik apoptoz yolağında kaspaz-3 aktivasyonundan bağımsız olarak mitokondriyal süperoksit gibi serbest radikallerin üretimini tetikleyerek ve ATP üretimini baskılayarak hücre ölümüne neden olduğu bilinmektedir (Kögel ve Prehn, 2010-2013). PARP kesiminin arkasında ise kaspaz-3 dışında kaspaz-1 ve -7, kalpainler, katepsinler, granzimler, matriks metalloproteinazlar gibi birçok hücre proteaz olduğu bilinmektedir ve apoptoz sürecinde rol almaktadır (Chaitanya vd., 2010).

a)

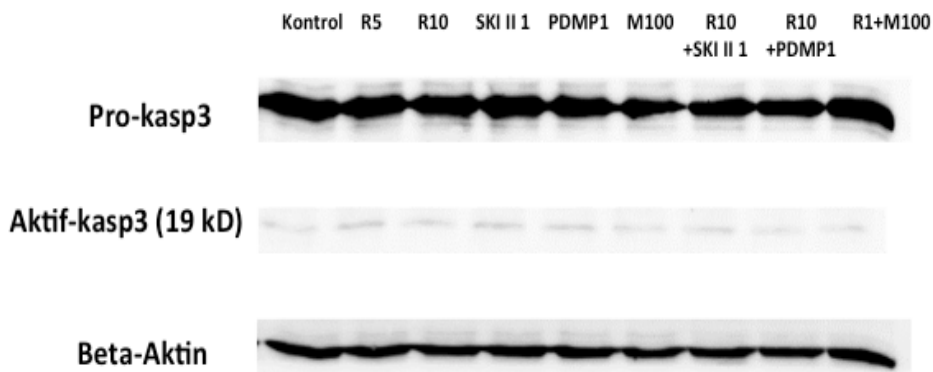
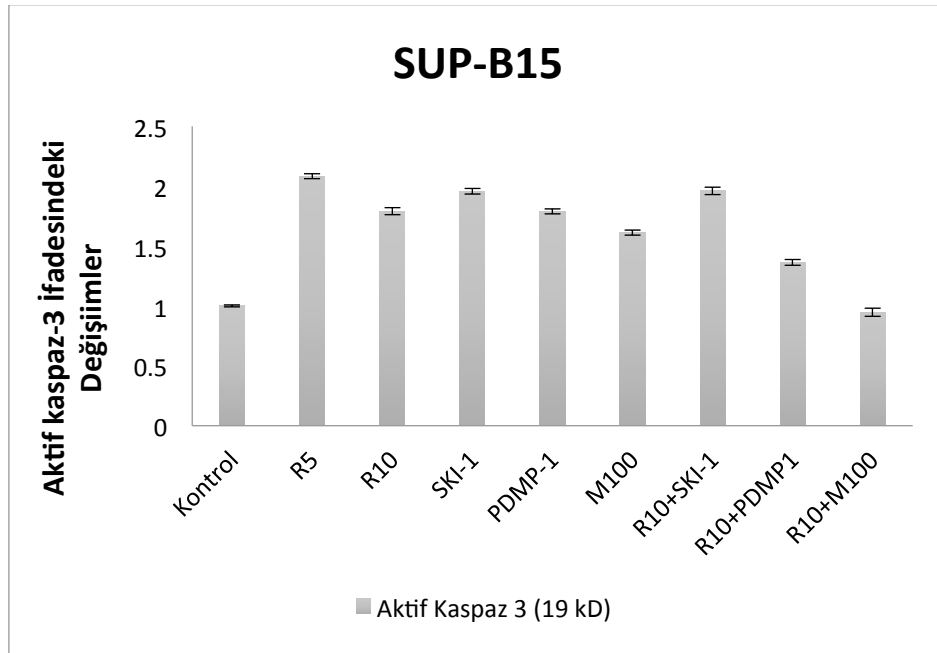


b)

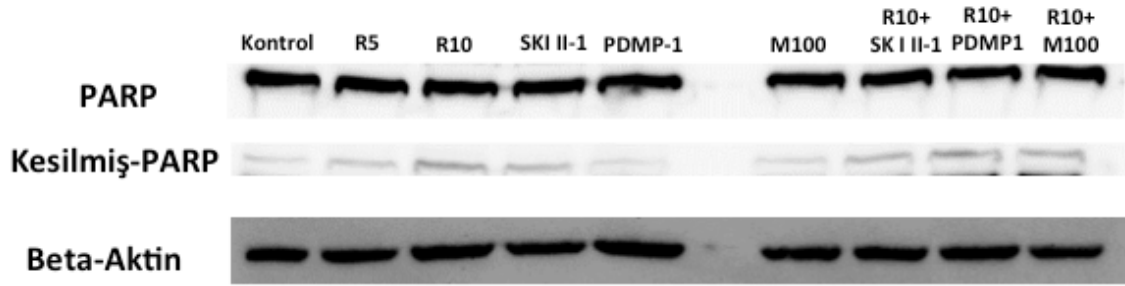
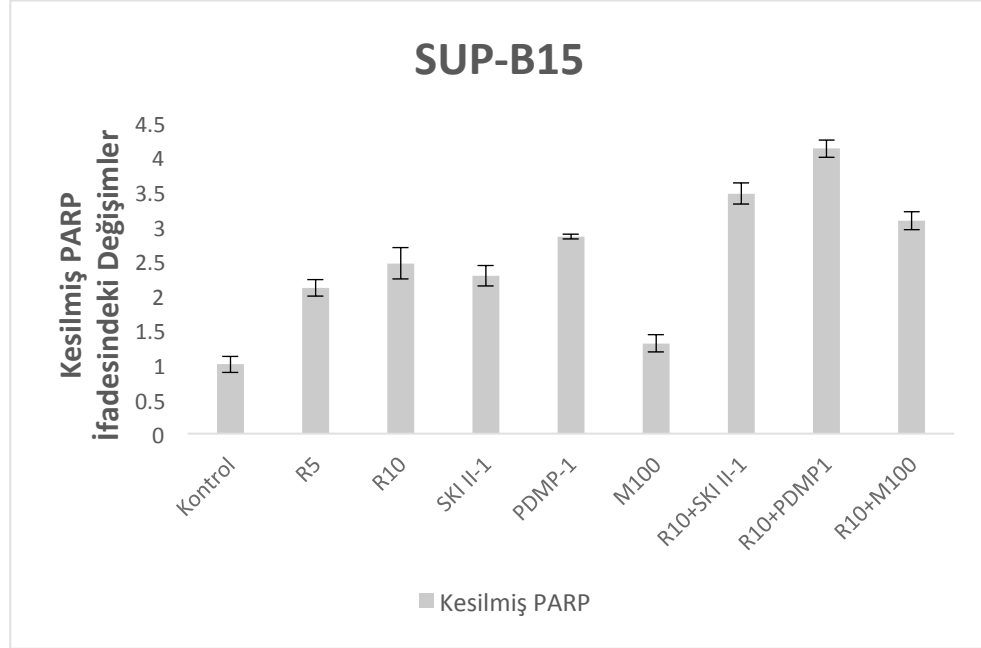




c)



d)



Şekil 13. Resveratrol, SPT, SK ve GSS inhibitörleri, resveratrol:SPT inhibitörü, resveratrol:SK inhibitörü ve resveratrol:GSS inhibitörü kombinasyonları ile muamele edilen SD-1 (a, b) ve SUP-B15 (c,d) hücrelerinde aktif kaspaz-3 ve PARP ifadesinde meydana gelen değişimler. Beta-Aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. Deney setleri iki kez tekrarlanmıştır ve her bir set için temsili western blot şekli kullanılmıştır. Birbirinden bağımsız 2 farklı deney setinden alınan sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. Herbir grubun kesilmiş kaspaz-3 ve PARP'İ kendi Beta-Aktinlerine normalize edilmiştir ve grafikler kontrol değeri 1 kabul edilerek ve kontrole oranlanarak çizilmiştir.

4.4 Ph⁺ ALL Hücrelerinde BCR-ABL İfadesinin Resveratrol, SKI II, PDMP, Miriosin ve Resveratrol: İnhibitör Kombinasyonları Tarafından Düzenlenmesi

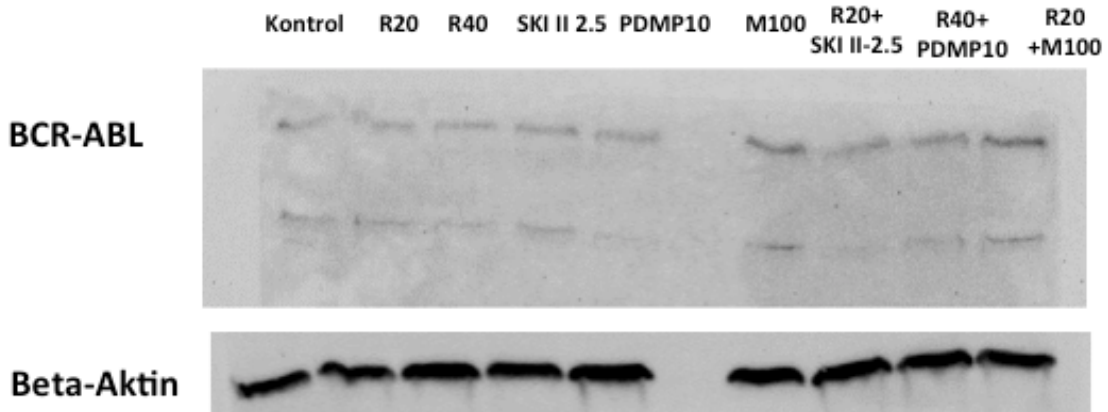
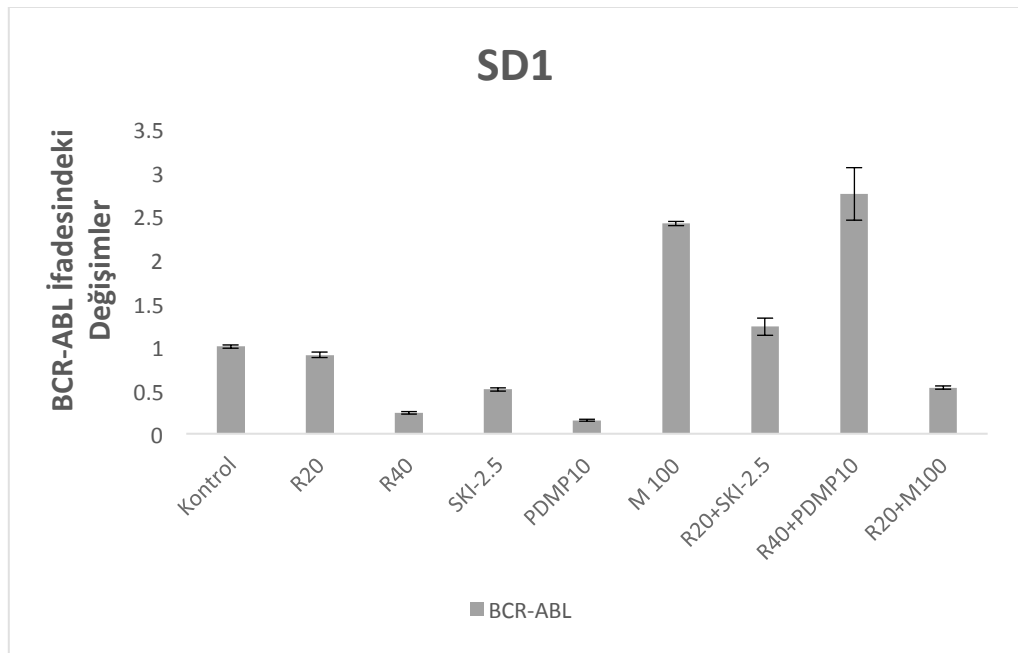
Ph⁺ ALL oluşumundaki temel onkoprotein olan BCR-ABL'nin ifadesinde meydana gelebilecek olan değişimleri anlayabilmek amacıyla SD1 (Şekil 14a) ve SUP-B15 (Şekil 14b)

hücreleri resveratrol, sfingolipid metabolizması enzim inhibitörleri ve resveratrol: inhibitör kombinasyonları ile muamele edilmiş ve total protein izolasyonunu takiben western blot gerçekleştirilmiştir. Şekil 14a ve b'de görüldüğü üzere artan resveratrol konsantrasyonları (SD1: 20- ve 40 μM ; SUP-B15: 5- ve 10 μM) kontrole göre BCR-ABL seviyesini sırasıyla SD1 için 0.1 ve 0.8 kat, SUP-B15 için 0.25 ve 0.5 kat azaltmıştır. SUP-B15 için 1 μM SKI II ve 1 μM PDMP sırasıyla 0.48 ve 0.37 katlık azalma oluştururken Miriosin 1.5 katlık bir artma meydana getirmiştir. Benzer şekilde, SD1 hücrelerinde 2.5 μM ve 10 μM PDMP sırasıyla 0.5 ve 0.9 katlık azalma oluştururken Miriosin 2.4 katlık bir artma meydana getirmiştir. SKI II ve PDMP'nin tek başına antiapoptotik ürünler olan S1F ve GSS miktarını azaltıyor ve apoptotik seramid birikimini tetikliyor olması BCR-ABL seviyesindeki azalma ile ilişkilendirilebilir. Diğer taraftan, Miriosin tek başına BCR-ABL ifadesini arttırmaktadır. Seramid miktarını azaltması göz önünde bulundurulduğunda Miriosin ile SPT inhibisyonu BCR-ABL üzerindeki artış üzerinden hücrelerin büyümesine katkıda bulunabilir. Sfmngolipid metabolizması enzim ve ürünlerinin BCR-ABL pozitif bazı hematolojik kanserlerdeki rolleri bilinmekle beraber proje ile ilk defa Ph+ ALL'deki olası etkileride açıklanmaktadır. Örneğin, BCR-ABL pozitif K562 ve LAMA84 KML hücrelerinde tirozin kinaz ABL'nin serin palmitoil transferaz uzun zincir 1 (SPTLC1) alt birimini tirozin 164 rezidüsünden fosforilleyerek inaktifleştirdiği ve hücrelerin çoğalmasını indüklediği gösterilmiştir (Taouji vd., 2013). Bu projede ise Miriosin ile SPT inhibisyonu kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında apoptozu baskılamış (Şekil 8c ve 9d) ve BCR-ABL ifadesini arttırmıştır (Şekil 14a ve b). KML hücrelerindeki mekanizmayı destekler şekilde BCR-ABL ve SPT arasında karşılıklı bir etkilenmenin olduğu Ph+ ALL'de ilk defa gösterilmiştir. Bir diğer çalışmada ise SK-1/S1F/S1FR2 sinyal yolağının BCR-ABL stabilitesini arttırarak KML'de tirozin kinaz inhibitörlerine karşı direnç kazanılmasına ve hücre sağ kalımına katkı sağladığı gösterilmiştir (Salas vd., 2011). KML hücrelerinde BCR-ABL'in MAPK, PI3K ve JAK2 gibi sinyal yolları aracılığı ile SK-1 ifadesini ve aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir (Li vd., 2007). Yeni yayınlanan bir çalışmada, BCR-ABL geni, SK-1 geni ortadan kaldırılmış farelerden elde edilen B hücre progenitörlerine aktarılmış ve BCR-ABL ilişkili tümör gelişiminin azaldığı saptanmıştır. Ancak, SK-1 ve BCR-ABL arasındaki ilişki gösterilmemiştir (Wallington-Beddoe vd., 2019). Projede ise SK inhibisyonu sonucu BCR-ABL ifadesinin azalması bu çalışmayı destekler niteliktedir. GSS ve BCR-ABL arasındaki ilişki herhangi bir kanser türünde bilinmemektedir. Bu çalışma ile ilk defa GSS inhibisyonu sonucu BCR-ABL'nin baskılandığı ve hücrelerin büyümesinin inhibe olduğu gösterilmiştir.

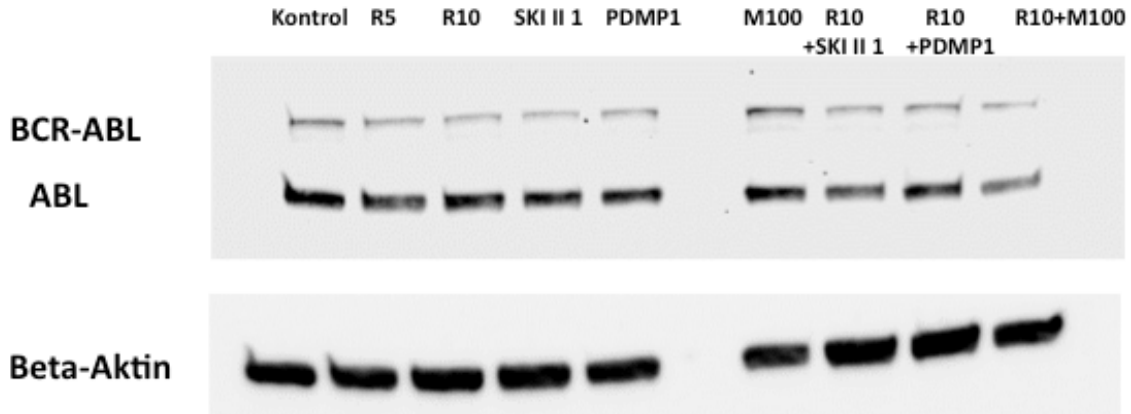
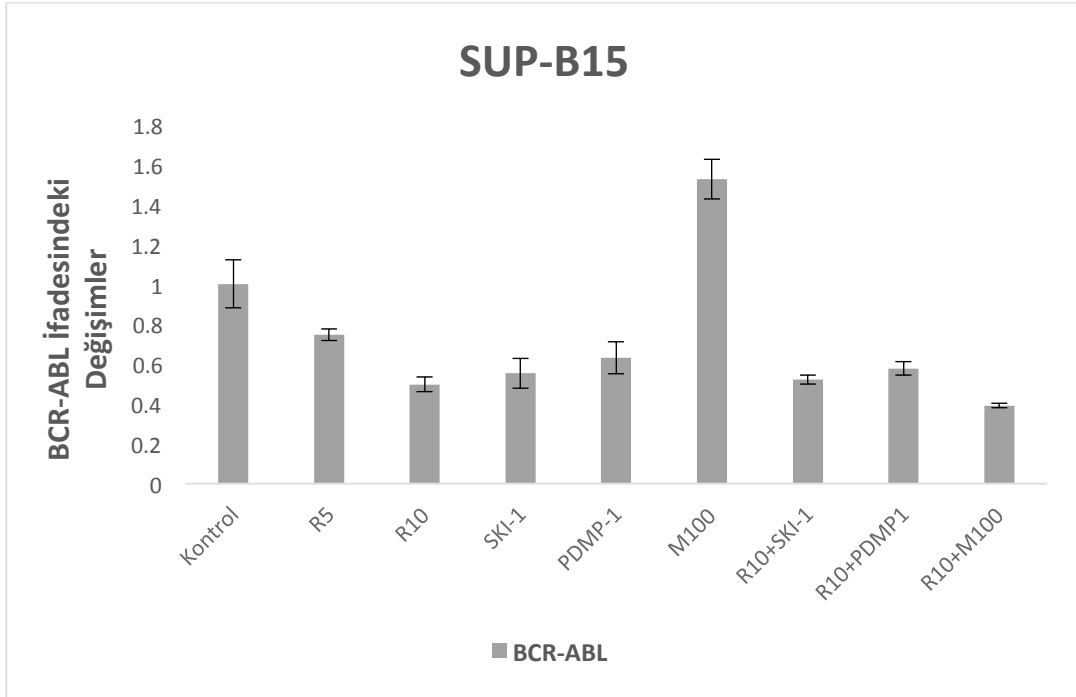
Resveratrol'ün SKI II ve PDMP ile kombinasyonu beklenenin aksine BCR-ABL seviyesinde her iki hücre tipinde artışlara neden olurken Miriosin kombinasyonu azalma meydana getirmiştir. SD1 ve SUP-B15 hücrelerinde resveratrol, SKI II ve PDMP tek başına BCR-ABL

ifadesini azaltarak hücrelerin büyümesini ihhabe ederken resveratrolün SKI II ve PDMP kombinasyonları BCR-ABL üzerinden beklenen etkiyi göstermiyor görünmektedir. Resveratrol ve Miriosin kombinasyonu ise her iki hücre tipinde BCR-ABL seviyesini azaltarak terapotik etki göstermektedir. Resveratrolün SPT'ı tek başına aktifleştirmesi (Şekil 10c ve 11c) ve Miriosin muamelesi sonucu SPT'in bloklanması resveratrol tarafından oluşturulan etkiyi geriye çevirememiştir. Dolayısıyla, kombinasyon çalışmalarında BCR-ABL ifadesinin düzenlenmesinde *de novo* seramid sentez yolağının veya S1F ve GSS yolağının etkili olmadığı görülmektedir.

a)



b)



Şekil 14. Resveratrol, SPT, SK ve GSS inhibitörleri, resveratrol:SPT inhibitörü, resveratrol:SK inhibitörü ve resveratrol:GSS inhibitörü kombinasyonları ile muamele edilen SD-1 (a) ve SUP-B15 (B) hücrelerinde BCR-ABL ifadesinde meydana gelen değişimler. Beta-Aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. Deney setleri iki kez tekrarlanmıştır ve her bir set için temsili western blot şekli kullanılmıştır. Birbirinden bağımsız 2 farklı deney setinden alınan sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. Herbir grubun BCR-ABL'si kendi Beta-Aktinlerine normalize edilmiştir ve grafikler kontrol değeri 1 kabul edilerek ve kontrole oranlanarak çizilmiştir.

5. SONUÇ

Resveratrol tarafından tetiklenen antilösemik etkinin moleküler sinyal yolları seramid metabolizmasının anahtar enzimleri olan SK, GSS ve SPT'ın hedeflenmesi ve hastalığın oluşumundaki temel onkoprotein olan BCR-ABL ifadesinde meydana gelen değişimlerin belirlenmesi yolu ile ilişkilendirilerek araştırılmış ve bunun için iki farklı Ph + ALL hücre hattı (SD1 ve SUP-B15) üzerinde çalışılmıştır.

Resveratrolün terapötik etkisi Ph+ ALL'de literatürde ilk defa detaylı bir şekilde araştırılmış ve Ph+ ALL'yi temsil eden her iki hücre hattında hücre çoğalmasını hücreleri hücre döngüsünü S fazında tutarak ve apoptozu indükleyerek gerçekleştirmiştir. Apoptozun temelinde yatan mekanizma sitokrom-c salınımının artmasına paralel olarak kaspaz-3 aktifleşmesi ve PARP kesimi olarak saptanmıştır. Resveratrol her iki hücre hattında BCR-ABL ifadesinde azalmalara neden olarak hastalığın temel etkeni olan BCR-ABL aracılı hücre büyümesi ve apoptozdan kaçışı engellemektedir. Ayrıca, sfingolipid metabolizmasının merkez molekülü olan apoptotik seramidin *de novo* yolak ile sentezinden sorumlu SPT ve seramidin antiapoptotik S1F ve GSS'e dönüşümünden sorumlu SK ve GSS enzimlerinin protein ifadeleri resveratrol muamelesi sonucu Ph+ ALL'de değişime uğramıştır. Resveratrol SK ve GSS ifadesini azaltırken SPT ifadesini arttırmıştır. Dolayısıyla, resveratrolün sfingolipid metabolizmasını düzenleyerek de hücre büyümesini baskıladığı bulunmuştur. Resveratrol ile birlikte sfingolipid metabolizmasının hedeflenmesi ve kombinasyon tedavisi yaklaşımlarının potansiyeli projede aydınlatılan diğer bir hedefdir. Resveratrolün özellikle SKI II ile kombinasyonu hücreleri S fazında tutarken intrinsik yolak üzerinden apoptozu tetiklemektedir. Sitokrom-c salınımına eşlik edecek şekilde kaspaz-3 aktifleşmesi ve PARP kesimi aracılığıyla apoptoz tetiklenmiştir. Resveratrol ile PDMP kombinasyonunda ise iki hücre farklı cevaplar vermekle beraber özellikle SUP-B15 hücrelerinde kaspaz-3 bağımsız PARP kesimi ve sitokrom-c salınımı tespit edilmiştir. Resveratrol ile beraber SPT'ın hedeflenmesi ise kaspaz-3 bağımsız PARP kesimi ve sitokrom-c salınımı üzerinden etki göstermekle beraber resveratrolün apoptotik etkisini geriye çevirmemiştir. Resveratrol: SKI II ve PDMP kombinasyon çalışmalarının BCR-ABL ifadesinde beklenen etkisinin olmadığı ancak Miriosin kombinasyonunun BCR-ABL ifadesini azalttığı saptanmıştır.

Proje ile ilk defa Ph+ ALL'de resveratrolün terapötik potansiyelinin olduğu ve bu etkinin altında yatan mekanizmalar aydınlatılmış olmakla beraber sfingolipid metabolizmasının hedeflenmesi ile birlikte kombinasyon stratejilerinde olası etkileri tanımlanmıştır. Ph + ALL modelinden özellikle sfingolipid metabolizmasının hedeflendiği çalışmalar literatürde

sadece bir tanedir ve 2019 yılında yayınlanan bu çalışmada (Wallington-Beddoe vd., 2019) ALL'de SK-1 ifadesinin arttığı ve SK-1 geninin genetik olarak silinmesi sonucu BCR-ABL tarafından tetiklenen Ph+ ALL fare modelinde gerileme görüldüğü gösterilmiştir. Projede de benzer ve tutarlı şekilde Ph + ALL hücrelerinde SK inhibisyonu sonucu BCR-ABL'nin ifadesi azalmıştır. Bunun yanısıra literatürde ilk defa GSS ve SPT inhibisyonu sonucu BCR-ABL ifadesinde meydana gelen değişimler saptanmıştır.

Projeden elde edilen bu veriler sayesinde özellikle sfingolipid metabolizması üzerine yoğunlaşan ve tetiklenen sinyal yollarının (örneğin SK/S1F/S1FR) Ph ALL'deki rolünün araştırılacağı projeler düşünülmektedir. Projede elde edilen sonuçlar neticesinde özellikle resveratrolün kaspaz-3 bağımsız ancak PARP kesiminin ve sitokrom-c salınımının elde edildiği resveratrol:Miriosin kombinasyon çalışmalarında detaylı mekanizmanın belirlenmesi açısından endoplazmik stres, lizozomal bozulma gibi nedenlerle ortaya çıkabilecek olan hücre ölümlerinde araştırılması gibi yeni projelerde düşünülmektedir. Ayrıca, resveratrol, sfingolipid metabolizması enzim inhibitörleri ve kombinasyonlarının hücre döngüsü üzerinde oluşturdukları tutulumların moleküler düzeyde siklinler, siklin bağımlı kinazlar gibi hücre döngüsü düzenleyicilerinin araştırılması ile aydınlatılması planlanmaktadır.

Sonuç olarak, hem resveratrolün tek başına hemde sfingolipid metabolizmasının hedeflenmesi ile beraber Ph+ ALL'de antilösemik etkiyi farklı mekanizmalar üzerinden gerçekleştirdiği proje ile gösterilmiştir. Özellikle *in vivo* fare modeli çalışmaları ve/veya nanopartikül tasarımları ile birlikte hedefli terapiye uygulanabileceği projelerde halihazırda tasarlanmaktadır.

Kaynaklar

Adan-Gokbulut, A., Kartal-Yandim, M., Iskender, G., Baran, Y. 2013. "Novel agents targeting bioactive sphingolipids for the treatment of cancer", *Curr Med Chem*, 20, 108-22.

Adan, A., Baran, Y. 2015. "The pleiotropic effects of fisetin and hesperetin on human acute promyelocytic leukemia cells are mediated through apoptosis, cell cycle arrest, and alterations in signaling networks", *Tumor Biology*, 36,8973-84.

Adan, A., Baran, Y. 2016. "Fisetin and hesperetin induced apoptosis and cell cycle arrest in chronic myeloid leukemia cells accompanied by modulation of cellular signaling", *Tumor Biology*,37,5781-95.

Almejún, M.B., Borge, M., Colado, A., Elías, E.E., Podaza, E., Risnik, D., De Brasi, C.D., Stanganelli, C., Slavutsky, I., Cabrejo, M., Fernández-Grecco, H., Bezares, R.F., Cranco, S., Burgos, RÁ., Sánchez-Ávalos, J.C., Oppezzo, P., Giordano, M., Gamberale, R. 2017. "Sphingosine kinase 1 participates in the activation, proliferation and survival of chronic lymphocytic leukemia cells", *Haematologica*, 102,e257-e260.

Aoyama, Y., Sobue, S., Mizutani, N., Inoue, C., Kawamoto, Y., Nishizawa, Y., Ichihara, M., Kyogashima, M., Suzuki, M., Nozawa, Y., Murate, T. 2017. "Modulation of the sphingolipid rheostat is involved in paclitaxel resistance of the human prostate cancer cell line PC3-PR", *Biochem Biophys Res Commun*, 486,551-557.

Aricò, M., Valsecchi, M.G., Camitta, B., Schrappe, M., Chessells, J., Baruchel, A., Gaynon, P., Silverman, L., Janka-Schaub, G., Kamps, W., Pui, C.H., Masera, G. 2000. Outcome of treatment in children with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*, 342, 998-1006.

Athar, M., Back, J.H., Kopelovich, L., Bickers, D.R., Kim, A.L. 2009. "Multiple molecular targets of resveratrol: Anti-carcinogenic mechanisms", *Arch Biochem Biophys*, 486,95-102.

Baran, Y., Salas, A., Senkal, C.E., Gunduz, U., Bielawski, J., Obeid, L.M., Ogretmen, B. 2007. "Alterations of ceramide/sphingosine 1-phosphate rheostat involved in the regulation of resistance to imatinib-induced apoptosis in K562 human chronic myeloid leukemia cells", *J Biol Chem*, 282,10922-34. Eski 42

Bernt, K.M., Hunger, S.P. 2014. "Current concepts in pediatric Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia", *Front Oncol*, 25,1-21.

Bhat, V.K., Bernhart, E., Plastira, I., Fan, K., Ghaffari-Tabrizi-Wizsy, N., Wadsack, C., Rechberger, G., Eichmann, T., Asslaber, M., Spassova, I., Verhaegen, M.E., Malle, E., Becker, J.C., Sattler, W. 2019. "Pharmacological Inhibition of Serine Palmitoyl Transferase and Sphingosine Kinase-1/-2 Inhibits Merkel Cell Carcinoma Cell Proliferation", *J Invest Dermatol*, 139,807-817.

Bhojwani, D., Pui, C.H. 2013. " Relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia", *Lancet Onco*, 14, e205-17.

Cakir, Z., Saydam, G., Sahin, F., Baran, Y. 2011. " The roles of bioactive sphingolipids in resveratrol-induced apoptosis in HL60: acute myeloid leukemia cells", *J Cancer Res Clin Oncol*, 137,279-86.

Camgoz, A., Gencer, E.B., Ural, A.U., Baran, Y. 2013. " Mechanisms responsible for nilotinib resistance in human chronic myeloid leukemia cells and reversal of resistance", *Leuk Lymphoma*, 54,1279-87.

Can, G., Cakir, Z., Kartal, M., Gunduz, U., Baran, Y. 2012. " Apoptotic effects of resveratrol, a grape polyphenol, on imatinib-sensitive and resistant K562 chronic myeloid leukemia cells", *Anticancer Res*, 32, 2673-8.

Casson, L., Howell, L., Mathews, L.A., Ferrer, M., Southall, N., Guha, R., Keller, J.M., Thomas, C., Siskind, L.J., Beverly, L.J. 2013. " Inhibition of ceramide metabolism sensitizes human leukemia cells to inhibition of BCL2-like proteins", *PLoS One*, 8,e54525.

Chaitanya, G.V., Alexander, J.S., Babu, P.P. 2010." PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration", *Cell Commun Signal*, 8: 31.

Charytoniuk, T., Harasim-Symbor, E., Polak, A., Drygalski, K., Berk, K., Chabowski, A., Konstantynowicz-Nowicka, K. 2019. " Influence of Resveratrol on Sphingolipid Metabolism in Hepatocellular Carcinoma Cells in Lipid Overload State", *Anticancer Agents Med Chem.*, 19(1):121-129.

Chiaretti, S., Foà, R. 2016. " How has the management of Ph⁺ acute lymphoblastic leukemia (ALL) changed over the years. *Rinsho Ketsueki*, 57, 2038-2048.

Choi, K.E., Jung, Y.S., Kim, D.H., Song, J.K., Kim, J.Y., Jung, Y.Y., Eum, S.Y., Kim, J.H., Yoon, N.Y., Yoo, H.S., Han, S.B., Hong, J.T. 2014. " Miriosin induces apoptotic lung cancer cell death via activation of DR4 pathway", *Arch Pharm Res*, 37,501-11.

Chow, S.E., Kao, C.H., Liu, Y.T.A., Cheng, M.L., Yang, Y.W., Huang, Y.K., Hsu, C.C., Wang, J.S. 2014. "Resveratrol induced ER expansion and ER caspase-mediated apoptosis in human nasopharyngeal carcinoma cells", *Apoptosis*, 19, 527–541.

Chung, S.S., Dutta, P., Austin, D., Wang, P., Awad, A., Vadgama, J.V. 2018. "Combination of resveratrol and 5-fluorouracil enhanced anti-telomerase activity and apoptosis by inhibiting STAT3 and Akt signaling pathways in human colorectal cancer cells", *Oncotarget*. 9,32943-32957.

Dai, Q., Liu, J., Chen, J., Durrant, D., McIntyre, T.M., Lee, R.M. 2004. "Mitochondrial ceramide increases in UV-irradiated HeLa cells and is mainly derived from hydrolysis of sphingomyelin", *Oncogene*, 23,3650-8.

Dbaiibo, G.S., Kfoury, Y., Darwiche, N., Panjarian, S., Kozhaya, L., Nasr, R., Abdallah, M., Hermine, O., El-Sabban, M., de Thé, H., Bazarbachi, A. 2007. "Arsenic trioxide induces accumulation of cytotoxic levels of ceramide in acute promyelocytic leukemia and adult T-cell leukemia/lymphoma cells through de novo ceramide synthesis and inhibition of glucosylceramide synthase activity", *Haematologica*, 92,753-62.

de Klein, A., van Kessel, A.G., Grosveld, G., Bartram, C.R., Hagemeijer, A., Bootsma, D., Spurr, N.K., Heisterkamp, N., Groffen, J., Stephenson, J.R. 1982. "A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia" *Nature*, 300, 765–7.

Ding, X., Chaiteerakij, R., Moser, C.D., Shaleh, H., Boakye, J., Chen, G., Ndzengue, A., Li, Y., Zhou, Y., Huang, S., Sinicrope, F.A., Zou, X., Thomas, M.B., Smith, C.D., Roberts, L.R. 2016. "Antitumor effect of the novel sphingosine kinase 2 inhibitor ABC294640 is enhanced by inhibition of autophagy and by sorafenib in human cholangiocarcinoma cells", *Oncotarget*, 7, 20080-92.

Druker, B.J., Sawyers, C.L., Kantarjian, H., Resta, D.J., Reese, S.F., Ford, J.M., Capdeville, R., Talpaz, M. 2001. "Activity of a specific inhibitor of the BCR–ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome", *N Engl J Med*, 344, 1038-42.

Estrov, Z., Shishodia, S., Faderl, S., Harris, D., Van, Q., Kantarjian, H.M., Talpaz, M., Aggarwal, B.B. 2003. "Resveratrol blocks interleukin-1beta-induced activation of the nuclear transcription factor NF-kappaB, inhibits proliferation, causes S-phase arrest, and induces apoptosis of acute myeloid leukemia cells", *Blood*, 102,987-95.

Evangelisti, C., Evangelisti, C., Buontempo, F., Lonetti, A., Orsini, E., Chiarini, F., Barata, J.T., Pyne, S., Pyne, N.J., Martelli, A.M. 2016. "Therapeutic potential of targeting sphingosine kinases and sphingosine 1-phosphate in hematological malignancies", *Leukemia*, 30,2142-2151.

Fan, Y., Chiu, J.F., Liu, J., Deng, Y., Xu, C., Zhang, J., Li, G. 2018. "Resveratrol induces autophagy-dependent apoptosis in HL-60 cells. *BMC Cancer*,18,581.

Fielding, A.K., Zakout, G.A. 2013. "Treatment of Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia", *Curr Hematol Malig Rep*, 8, 98-108.

Frazzi, R., Tigano, M. 2012. " The multiple mechanisms of cell death triggered by resveratrol in lymphoma and leukemia", *Int J Mol Sci*, 15, 4977-93.

Ge, J., Liu, Y., Li, Q., Guo, X., Gu, L., Ma, Z.G., Zhu, Y.P. 2013. " Resveratrol induces apoptosis and autophagy in T-cell acute lymphoblastic leukemia cells by inhibiting Akt/mTOR and activating p38-MAPK", *Biomed Environ Sci*, 26, 902-11.

Gencer, EB, Ural, AU, Avcu, F, Baran, Y. 2011. " A novel mechanism of dasatinib-induced apoptosis in chronic myeloid leukemia; ceramide synthase and ceramide clearance genes", *Ann Hematol*, 90,1265-75.

Ghorbani, A., Zand, H., Jeddi-Tehrani, M., Koohdani, F., Shidfar, F., Keshavarz, S.A. 2015. " PTEN over-expression by resveratrol in acute lymphoblastic leukemia cells along with suppression of AKT/PKB and ERK1/2 in genotoxic stress", *J Nat Med*, 69,507-12.

Giussani, P., Tringali, C., Riboni, L., Viani, P., Venerando, B. 2014. "Sphingolipids: key regulators of apoptosis and pivotal players in cancer drug resistance", *Int J Mol Sci*, 15, 4356-92.

Gokbulut, A.A., Apohan, E., Baran, Y. 2013. "Resveratrol and quercetin-induced apoptosis of human 232B4 chronic lymphocytic leukemia cells by activation of caspase-3 and cell cycle arrest, *Hematology*, 18,144-50.

Gustafsson, K., Sander, B., Bielawski, J., Hannun, Y.A., Flygare, J. 2009. " Potentiation of cannabinoid-induced cytotoxicity in mantle cell lymphoma through modulation of ceramide metabolism", *Mol Cancer Res*, 7,1086-98.

Hantschel, O. 2012. "Structure, regulation, signaling, and targeting of abl kinases in cancer", *Genes Cancer*, 3,436-46.

Hara, S., Nakashima, S., Kiyono, T., Sawada, M., Yoshimura, S., Iwama, T., Sakai, N. 2004. "Ceramide triggers caspase activation during gamma-radiation- induced apoptosis of human glioma cells lacking functional p53", *Oncol. Rep.* 12, 119-123.

Harrison, C.J., Haas, O., Harbott, J., Biondi, A., Stanulla, M., Trka, J., Izraeli, S. 2010. "Detection of prognostically relevant genetic abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: recommendations from the Biology and Diagnosis Committee of the International Berlin-Frankfurt-Münster study group", *Br J Haematol*, 151, 132–142.

Hengst, J.A., Dick, T.E., Sharma, A., Doi, K., Hegde, S., Tan, S.F., Geffert, L.M., Fox, T.E., Sharma, A.K., Desai, D., Amin, S., Kester, M., Loughran, T.P., Paulson, R.F., Claxton, D.F., Wang, H.G., Yun, J.K. 2017. "SKI-178: A Multitargeted Inhibitor of Sphingosine Kinase and Microtubule Dynamics Demonstrating Therapeutic Efficacy in Acute Myeloid Leukemia Models", *Cancer Transl Med*, 3,109-121.

Huang, C., Tu, Y., Freter, C.E. 2018. " Fludarabine-resistance associates with ceramide metabolism and leukemia stem cell development in chronic lymphocytic leukemia", *Oncotarget*, 9,33124-33137.

Huang, T.T., Lin, H.C., Chen, C.C., Lu, C.C., Wei, C.F., Wu, T.S., Liu, F.G., Lai, H.C. 2011. " Resveratrol induces apoptosis of human nasopharyngeal carcinoma cells via activation of multiple apoptotic pathways", *J Cell Physiol*, 226,720-8.

Huang, W.C., Tsai, C.C., Chen, C.L., Chen, T.Y., Chen, Y.P., Lin, Y.S., Lu, P.J., Lin, C.M., Wang, S.H., Tsao, C.W., Wang, C.Y., Cheng, Y.L., Hsieh, C.Y., Tseng, P.C., Lin, C.F. 2011. "Glucosylceramide synthase inhibitor PDMP sensitizes chronic myeloid leukemia T315I mutant to Bcr-Abl inhibitor and cooperatively induces glycogen synthase kinase-3-regulated apoptosis", *FASEB J*, 25, 3661-3673.

Ilaria, R.L. Jr., Van Etten, R.A. 1996. "P210 and P190(BCR/ABL) induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members" *J Biol Chem*, 271, 31704–10.

Kakkassery, V., Skosyrski, S., Lüth, A., Kleuser, B., van der Giet, M., Tate, R., Reinhard, J., Faissner, A., Joachim, S.C., Kociok, N. 2019. " Etoposide Upregulates Survival Favoring Sphingosine-1-Phosphate in Etoposide-Resistant Retinoblastoma Cells", *Pathol Oncol Res*, 25,391-399.

- Kartal, M., Saydam, G., Sahin, F., Baran, Y. 2011. "Resveratrol triggers apoptosis through regulating ceramide metabolizing genes in human K562 chronic myeloid leukemia cells", *Nutr. Cancer*, 63, 637-644.
- Kelliher, M., Knott, A., McLaughlin, J., Witte, O.N., Rosenberg, N. 1991."Differences in oncogenic potency but not target cell specificity distinguish the two forms of the BCR/ABL oncogene. *Mol Cell Biol*, 11, 4710-6.
- Kögel, D., Prehn, J.H.H. 2010-2013. Caspase- independent cell death mechanisms. Madame curie bioscience database. Austin (TX). Landes Bioscience.
- Kundu, J.K., Surh, Y.J. 2008. "Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol: mechanistic perspectives", *Cancer Lett*, 269,243-61.
- Larson, R.A. 2006. "Management of acute lymphoblastic leukemia in older patients", *Semin Hematol*, 43,126–33.
- LeBlanc, F.R., Liu, X., Hengst, J., Fox, T., Calvert, V., Petricoin, E.F., Yun, J., Feith, D.J., Loughran, T.P. Jr. 2015. " Sphingosine kinase inhibitors decrease viability and induce cell death in natural killer-large granular lymphocyte leukemia", *Cancer Biol Ther*, 16,1830-40.
- Lee, Y.S., Choi, K.M., Choi, M.H., Ji, S.Y., Lee, S., Sin, D.M., Oh, K.W., Lee, Y.M., Hong, J.T., Yun, Y.P., Yoo, H.S. 2011. " Serine palmitoyltransferase inhibitor Miriosin induces growth inhibition of B16F10 melanoma cells through G(2) /M phase arrest", *Cell Prolif*, 44,320-9.
- Lee, Y.S., Choi, K.M., Lee, S., Sin, D.M., Lim, Y., Lee, Y.M., Hong, J.T., Yun, Y.P., Yoo, H.S. 2012. " Miriosin, a serine palmitoyltransferase inhibitor, suppresses tumor growth in a murine melanoma model by inhibiting de novo sphingolipid synthesis", *Cancer Biol Ther*,13,92-100.
- Li, R., Manela, J., Kong, Y., Ladisch, S. 2000. "Cellular gangliosides promote growth factor-induced proliferation of fibroblasts", *J. Biol. Chem*, 275, 34213–34223.
- Li, Y., Guo, Y., Feng, Z., Bergan, R., Li, B., Qin, Y., Zhao, L., Zhang, Z., Shi, M. 2019. " Involvement of the PI3K/Akt/Nrf2 Signaling Pathway in Resveratrol-Mediated Reversal of Drug Resistance in HL-60/ADR Cells", *Nutr Cancer*, 29,1-12.
- Li, Q.F., Huang, W.R., Duan, H.F., Wang, H., Wu, C.T., Wang, L.S. 2007. " Sphingosine kinase-1 mediates BCR/ABL- induced upregulation of Mcl-1 in chronic myeloid leukemia cells", *Oncogene*, 26,7904-8.

Lim, K.G., Gray, A.I., Pyne, S., Pyne, N.J. 2012. "Resveratrol dimers are novel sphingosine kinase 1 inhibitors and affect sphingosine kinase 1 expression and cancer cell growth and survival", *Br J Pharmacol*, 166,1605–1616.

Lin, H.Y., Delmas, D., Vang, O., Hsieh, T.C., Lin, S., Cheng, G.Y., Chiang, H.L., Chen, C.E., Tang, H.Y., Crawford, D.R., et al. 2013. "Mechanisms of ceramide-induced COX-2-dependent apoptosis in human ovarian cancer OVCAR-3 cells partially overlapped with resveratrol", *J. Cell. Biochem*,114,1940-1954.

Liu-Dumlao, T., Kantarjian, H., Thomas, D.A., O'Brien, S., Ravandi, F. 2012. "Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia: current treatment options", *Curr Oncol Rep*, 14, 387-94.

Liu, Z., Wu, X., Lv, J., Sun, H., Zhou, F. 2019. "Resveratrol induces p53 in colorectal cancer through SET7/9", *Oncol Lett*. 2019 Apr;17(4):3783-3789.

Lucci, A., Cho, W.I., Han, T.Y., Giuliano, A.E., Morton, D.L., Cabot, M.C. 1998. "Glucosylceramide: a marker for multiple drug resistant cancers", *Anticancer Res*, 18, 475-480.

Lupino, L., Perry, T., Margielewska, S., Hollows, R., Ibrahim, M., Care, M., Allegood, J., Tooze, R., Sabbadini, R., Reynolds, G., Bicknell, R., Rudzki, Z., Lin Hock, Y., Zanetto, U., Wei, W., Simmons, W., Spiegel, S., Woodman, C.B.J., Rowe, M., Vrzalikova, K., Murray, P.G. 2019. "Sphingosine-1-phosphate signalling drives an angiogenic transcriptional programme in diffuse large B cell lymphoma", *Leukemia*, 2019, doi: 10.1038/s41375-019-0478-9.

Maeng, H.J., Song, J.H., Kim, G.T., Song, Y.J., Lee, K., Kim, J.Y., Park, T.S. 2017. "Celecoxib-mediated activation of endoplasmic reticulum stress induces de novo ceramide biosynthesis and apoptosis in hepatoma HepG2 cells mobilization", *BMB Rep*, 50,144-149.

Matula, K., Collie-Duguid, E., Murray, G., Parikh, K., Grabsch, H., Tan, P., Lalwani, S., Garau, R., Ong, Y., Bain, G., Smith, A.D., Urquhart, G., Bielawski, J., Finnegan, M., Petty, R. 2015. "Regulation of cellular sphingosine-1-phosphate by sphingosine kinase 1 and sphingosine-1-phosphate lyase determines chemotherapy resistance in gastroesophageal cancer", *BMC Cancer*, 2015,15:762.

McGregor, S., McNeer, J., Gurbuxani, S. 2012. "Beyond the 2008 World Health Organization classification: the role of the hematopathology laboratory in the diagnosis and management of acute lymphoblastic leukemia", *Semin Diagn Pathol*, 29, 2-11.

Milone, J.H., Enrico, A. 2009. "Treatment of Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia", *Leuk Lymphoma*, 2:9-15.

Minutolo, F., Sala, G., Bagnacani, A., Bertini, S., Carboni, I., Placanica, G., Prota, G., Rapposelli, S., Sacchi, N., Macchia, M., Ghidoni, R. 2005. "Synthesis of a resveratrol analogue with high ceramide-mediated proapoptotic activity on human breast cancer cells", *J Med Chem*, 48, 6783–6786.

Mirzapur, P., Khazaei, M.R., Moradi, M.T., Khazaei, M. 2018. " Apoptosis induction in human breast cancer cell lines by synergic effect of raloxifene and resveratrol through increasing proapoptotic genes", *Life Sci*, 15, 205:45-53

Mizutani, N., Omori, Y., Kawamoto, Y, Sobue,S., Ichihara, M., Suzuki, M., Kyogashima, M., Nakamura, M., Tamiya-Koizumi, K., Nozawa, Y., et al. 2016. " Resveratrol-induced transcriptional up-regulation of ASMase (SMPD1) of human leukemia and cancer cells", *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 470, 851-856.

Moorman, A.V., Ensor, H.M., Richards, S.M., Chilton, L., Schwab, C., Kinsey, S.E., Vora, A., Mitchell, C.D., Harrison, C.J. 2010. "Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: results from the UK Medical Research Council ALL97/99 randomised trial", *Lancet Oncol*. 11, 429-438.

Morad, S.A., Cabot, M.C. 2012. "Ceramide-orchestrated signalling in cancer cells", *Nat. Rev. Cancer*, 13, 51-65.

Mullighan, C.G. 2012. "The molecular genetic makeup of acute lymphoblastic leukemia", *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2012, 389-96.

Naka, K., Hoshii, T., Tadokoro, Y., Hirao, A. 2011. " Molecular pathology of tumor-initiating cells: lessons from Philadelphia chromosome-positive leukemia", *Pathol Int*, 61, 501-8.

O'Hare, T., Walters, D.K., Stoffregen, E.P., Jia, T., Manley, P.W., Mestan, J., Cowan-Jacob, S.W., Lee, F.Y., Heinrich, M.C., Deininger, M.W., Druker, B.J. 2005. "In vitro activity of Bcr-Abl inhibitors AMN107 and BMS-354825 against clinically relevant imatinib-resistant Abl kinase domain mutants" *Cancer Res*, 65, 4500–5.

Ogretmen, B., Hannun, Y.A. 2004."Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment". *Nat Rev Cancer*, 8, 604-16. Eksi 25

Ohno, R., Japan Adult Leukemia Study Group. 2006. "Treatment of Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia with imatinib in combination with chemotherapy", *Curr Hematol Malig Rep*, 1, 180-7.

Onciu, M. 2009. "Acute lymphoblastic leukemia", *Hematol Oncol Clin North Am*, 23,655-74.

Opydo-Chanek, M., Rak, A., Cierniak, A., Mazur, L. 2017. "Combination of ABT-737 and resveratrol enhances DNA damage and apoptosis in human T-cell acute lymphoblastic leukemia MOLT-4 cells", *Toxicol In Vitro*, 42,38-46.

Ottmann, O.G., Druker, B.J., Sawyers, C.L., Goldman, J.M., Reiffers, J., Silver, R.T., Tura, S., Fischer, T., Deininger, M.W., Schiffer, C.A., Baccarani, M., Gratwohl, A., Hochhaus, A., Hoelzer, D., Fernandes-Reese, S., Gathmann, I., Capdeville, R., O'Brien, S.G. 2002. "A phase 2 study of imatinib in patients with relapsed or refractory Philadelphia chromosome-positive acute lymphoid leukemias", *Blood*, 100,1965–71.

Peng, L., Jiang, D. 2018. "Resveratrol eliminates cancer stem cells of osteosarcoma by STAT3 pathway inhibition", *PLoS One*, 13, e0205918.

Perry, D.K., Carton, J., Shah, A.K., Meredith, F., Uhlinger, D.J., Hannun, Y.A. 2000. "Serine palmitoyltransferase regulates de novo ceramide generation during etoposide-induced apoptosis", *J Biol Chem*, 275, 9078-84.

Pewzner-Jung, Y., Ben-Dor, S., Futerman, A.H. 2006. "When do Lasses (longevity assurance genes) become CerS (ceramide synthases)? Insights into the regulation of ceramide synthesis", *J Biol Chem*, 281, 25001i25005.

Pfeifer, H., Wassmann, B., Pavlova, A., Wunderle, L., Oldenburg, J., Binckebanck, A., Lange, T., Hochhaus, A., Wystub, S., Brück, P., Hoelzer, D., Ottmann, O.G. 2007. "Kinase domain mutations of BCR-ABL frequently precede imatinib based therapy and give rise to relapse in patients with de novo Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph+ ALL)", *Blood*, 110,727–34.

Pieters, R., Carroll, W.L. 2010. "Biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia", *Hematol Oncol Clin North Am*, 24,1-18.

Ponnusamy, S., Meyers-Needham, M., Senkal, C.E., Saddoughi, S.A., Sentelle, D., Selvam, S.P., Salas, A., Ogretmen, B. 2010. "Sphingolipids and cancer: ceramide and sphingosine-1-phosphate in the regulation of cell death and drug resistance", *Future Oncol*, 6,1603-24.

Powell, J.A., Lewis, A.C., Zhu, W., Toubia, J., Pitman, M.R., Wallington-Beddoe, C.T., Moretti, P.A., Iarossi, D., Samaraweera, S.E., Cummings, N., Ramshaw, H.S., Thomas, D., Wei, A.H., Lopez, A.F., D'Andrea, R.J., Lewis, I.D., Pitson, S.M. 2017. "Targeting sphingosine kinase 1 induces MCL1-dependent cell death in acute myeloid leukemia", *Blood*, 129, 771-782.

Pruett, S.T., Bushnev, A., Hagedorn, K., Adiga, M., Haynes, C.A., Sullards, M.C., Liotta, D.C., Merrill, A.H. Jr. 2008. "Biodiversity of sphingoid bases ("sphingosines") and related amino alcohols", *J Lipid Res*, 49, 1621-1639.

Pyne, N.J., Pyne, S. 2010. "Sphingosine 1 phosphate and cancer", *Nat. Rev. Cancer*, 10, 489-503.

Pyne, N.J., Tonelli, F., Lim, K.G., Long, J.S., Edwards, J., Pyne, S. 2012. "Sphingosine 1-phosphate signalling in cancer", *Biochem Soc Trans*, 40, 94-100.

Quoc Trung, L., Espinoza, J.L., Takami, A., Nakao, S. 2013. "Resveratrol induces cell cycle arrest and apoptosis in malignant NK cells via JAK2/STAT3 pathway inhibition", *PLoS One*, 8, e55183.

Reynolds, C.P., Maurer, B.J. Kolesnick, R.N. 2002. "Ceramide synthesis and metabolism as a target for cancer therapy", *Cancer Lett*, 206, 169-180.

Salas, A., Ponnusamy, S., Senkal, C.E., Meyers-Needham, M., Selvam, S.P., Saddoughi, S.A., Apohan, E., Sentelle, R.D., Smith, C., Gault, C.R., Obeid, L.M., El-Shewy, H.M., Oaks, J., Santhanam, R., Marcucci, G., Baran, Y., Mahajan, S., Fernandes, D., Stuart, R., Perrotti, D., Ogretmen, B. 2011. "Sphingosine kinase-1 and sphingosine 1-phosphate receptor 2 mediate Bcr-Abl1 stability and drug resistance by modulation of protein phosphatase 2A", *Blood*, 117, 5941-52.

Sareen, D., van Ginkel, P.R., Takach, J.C., Mohiuddin, A., Darjatmoko, S.R., Albert, D.M., Polans, A.S. 2006. "Mitochondria as the primary target of resveratrol-induced apoptosis in human retinoblastomacells", *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47, 3708-16.

Scarlatti, F., Sala, G., Somenzi, G., Signorelli, P., Sacchi, N., Ghidoni, R. 2003. "Resveratrol induces growth inhibition and apoptosis in metastatic breast cancer cells via de novo ceramide signaling", *FASEB J*, 17, 2339-2341.

Schwamb, J., Feldhaus, V., Baumann, M., Patz, M., Brodesser, S., Brinker, R., Claasen, J., Pallasch, C.P., Hallek, M., Wendtner, C.M., Frenzel, L.P. 2012. "B-cell receptor triggers

drug sensitivity of primary CLL cells by controlling glucosylation of ceramides”, *Blood*, 120,3978-85.

Segui, B., Andrieu-Abadie, N., Jaffrezou, J.P., Benoist, H., Levade, T. 2006. “Sphingolipids as modulators of cancer cell death: potential therapeutic targets”, *Biochim Biophys Acta*, 1758, 2104–20.

Shin KO, Park NY, Seo CH et al. 2012. “Inhibition of sphingolipid metabolism enhances resveratrol chemotherapy in human gastric cancer cells”, *Biomol Ther (Seoul)*, 20, 470–476.

Short NJ, Kantarjian H, Jabbour E, Ravandi F. 2017. “Which tyrosine kinase inhibitor should we use to treat Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia?”, *Best Pract Res Clin Haemato*, 30,193-200.

Shukla, Y., Singh, R. 2011. “Resveratrol and cellular mechanisms of cancer prevention”, *Ann N Y Acad Sci*, 1215,1-8.

Signorelli, P., Munoz-Olaya, J.M., Gagliostro, V., Casas, J., Ghidoni, R., Fabriàs, G. 2009. “Dihydroceramide intracellular increase in response to resveratrol treatment mediates autophagy in gastric cancer cells”, *Cancer Lett*, 282, 238–243.

Stefanovic, M., Tutusaus, A., Martinez-Nieto, G.A., Bárcena, C., de Gregorio, E., Moutinho, C., Barbero-Camps, E., Villanueva, A., Colell, A., Marí, M., García-Ruiz, C., Fernandez-Checa, J.C., Morales, A. 2016. “ Targeting glucosylceramide synthase upregulation reverts sorafenib resistance in experimental hepatocellular carcinoma”, *Oncotarget*,7,8253-67.

Su, Y.C., Li, S.C., Wu, Y.C., Wang, L.M., Clifford Chao, K.S., Liao, H.F. 2013. “ Resveratrol Downregulates Interleukin-6-Stimulated Sonic Hedgehog Signaling in Human Acute Myeloid Leukemia”, *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 547430.

Sui, T., Ma, L., Bai, X., Li, Q., Xu, X. 2014. “ Resveratrol inhibits the phosphatidylinositide 3-kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin signaling pathway in the human chronic myeloid leukemia K562 cell line”, *Oncol Lett*, 7, 2093-2098.

Sun, Y., Zhou, Q.M., Lu, Y.Y., Zhang, H., Chen, Q.L., Zhao, M., Su, S.B. 2019. “ Resveratrol Inhibits the Migration and Metastasis of MDA-MB-231 Human Breast Cancer by Reversing TGF- β 1-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition”, *Molecules*, 24, 1131.

Taouji, S., Higa, A., Delom, F., Palcy, S., Mahon, F.X., Pasquet, J.M., Bossé, R., Ségui, B., Chevet, E. 2013. “Phosphorylation of serine palmitoyltransferase long chain-1 (SPTLC1) on tyrosine 164 inhibits its activity and promotes cell survival”, *J Biol Chem*. 288,17190-201.

- Tian, H., Yu, Z. 2015. "Resveratrol induces apoptosis of leukemia cell line K562 by modulation of sphingosine kinase-1 pathway", *Int J Clin Exp Pathol*, 8, 2755-62.
- Truman, J.P., Garcia-Barros, M., Obeid, L.M., and Hannun, Y.A. 2014. "Evolving concepts in cancer therapy through targeting sphingolipid metabolism", *Biochim. Biophys. Acta*, 1841, 1174-1188.
- Tsukamoto, S., Kumazoe, M., Huang, Y., Lesnick, C., Kay, N.E., Shanafelt, T.D., Tachibana, H. 2017. "SphK1 inhibitor potentiates the anti-cancer effect of EGCG on leukaemia cells", *Br J Haematol*, 178, 155-158.
- Ulrich, S., Huwiler, A., Loitsch, S., Schmidt, H., Stein, J.M. 2007. "De novo ceramide biosynthesis is associated with resveratrol-induced inhibition of ornithine decarboxylase activity", *Biochem Pharmacol*, 74, 281-9.
- Vadas, M., Xia, P., McCaughan, G., Gamble, J. 2008. "The role of sphingosine kinase-1 in cancer: oncogene or non-oncogene addiction. *Biochim. Biophys. Acta*, 1781, 442-447.
- Wallington-Beddoe, C.T., Powell, J.A., Tong, D., Pitson, S.M., Bradstock, K.F., Bendall, L.J. 2014. "Sphingosine kinase 2 promotes acute lymphoblastic leukemia by enhancing MYC expression", *Cancer Res*, 74, 2803-2815.
- Wallington-Beddoe, C.T., Xie, V., Tong, D., Powell, J.A., Lewis, A.C., Davies, L., Pitson, S.M., Bradstock, K.F., Bendall, L.J. 2019. "Identification of sphingosine kinase 1 as a therapeutic target in B-lineage acute lymphoblastic leukaemia", *Br J Haematol*, 184, 443-447.
- Wang, B., Liu, J., Gong, Z. 2015. "Resveratrol induces apoptosis in K562 cells via the regulation of mitochondrial signaling pathways", *Int J Clin Exp Med*, 8, 16926-16933.
- Wang, M., Yu, T., Zhu, C., Sun, H., Qiu, Y., Zhu, X., Li, J. 2014. "Resveratrol triggers protective autophagy through the ceramide/Akt/mTOR pathway in melanoma B16 cells", *Nutr. Cancer*, 66, 435-440.
- Wang, T., Wei, J., Wang, N., Ma, J.L., Hui, P.P. 2015. "The glucosylceramide synthase inhibitor PDMP sensitizes pancreatic cancer cells to MEK/ERK inhibitor AZD-6244", *Biochem Biophys Res Commun*, 456, 821-6.
- Watson, C., Long, J.S., Orange, C., Tannahill, C.L., Mallon, E., McGlynn, L.M., Pyne, S., Pyne, N.J. and Edwards, J. 2010. "High expression of sphingosine 1-phosphate receptors, S1P1 and S1P3, sphingosine kinase 1, and extracellular signal-regulated kinase-1/2 is associated with development of tamoxifen resistance in estrogen receptor-positive breast cancer patients. *Am. J. Pathol*, 177, 2205-2215.

Watters, R.J., Fox, T.E., Tan, S.F., Shanmugavelandy, S., Choby, J.E., Broeg, K., Liao, J., Kester, M., Cabot, M.C., Loughran, T.P., Liu, X. 2013. "Targeting glucosylceramide synthase synergizes with C6-ceramide nanoliposomes to induce apoptosis in natural killer cell leukemia", *Leuk Lymphoma*, 54,1288-96.

Wegner, M.S., Schömel, N., Gruber, L., Örtel, S.B., Kjellberg, M.A., Mattjus, P., Kurz, J., Trautmann, S., Peng, B., Wegner, M., Kaulich, M, Ahrends, R., Geisslinger, G., Grösch, S. 2018. "UDP-glucose ceramide glucosyltransferase activates AKT, promoted proliferation, and doxorubicin resistance in breast cancer cells", *Cell Mol Life Sci*,75,3393-3410.

Yanada, M., Ohno, R., Naoe, T. 2009. "Recent advances in the treatment of Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia", *Int J Hematol*, 89, 3-13.

Yang, H.C., Wang, J.Y., Bu, X.Y., Yang, B., Wang, B.Q., Hu, S., Yan, Z.Y., Gao, Y.S., Han, S.Y., Qu, M.Q. 2019. "Resveratrol restores sensitivity of glioma cells to temozolamide through inhibiting the activation of Wnt signaling pathway", *J Cell Physiol*, 234,6783-6800.

Yang, Y., Huang, X., Chen, S., Ma, G., Zhu, M., Yan, F., Yu, J. 2018."Resveratrol induced apoptosis in human gastric carcinoma SGC-7901 cells via activation of mitochondrial pathway", *Asia Pac J Clin Oncol*, 14,e317-e324.

Yuan, S.X., Wang, D.X., Wu, Q.X., Ren, C.M., Li, Y., Chen, Q.Z., Zeng, Y.H., Shao, Y., Yang, J.Q., Bai, Y., Zhang, P., Yu, Y., Wu, K., Sun, W.J., He, B.C. 2016. "BMP9/p38 MAPK is essential for the antiproliferative effect of resveratrol on human colon cancer", *Onc Rep*, 35,939-47.

Zadi Heydarabad, M., Baharaghdam, S., Azimi, A., Mohammadi, H., Eivazi Ziaei, J., Yazdanpanah, B., Zak, M.S., Farahani, M.E., Dohrabbour, A., Partash, N., Talebi, M. 2019. "The role of tumor suppressor of resveratrol and prednisolone by downregulation of YKL-40 expression in CCRF-CEM cell line", *J Cell Biochem*,120,3773-3779.

Zadi Heydarabad, M., Vatanmakanian, M., Abdolalizadeh, J., Mohammadi, H., Azimi, A., Mousavi Ardehaie, R., Movasaghpour A., Farshdousti Hagh, M. 2018. "Apoptotic effect of resveratrol on human T-ALL cell line CCRF-CEM is unlikely exerted through alteration of BAX and BCL2 promoter methylation", *J Cell Biochem*,119,10033-10040.

Zhang, Z., Liu, Z., Chen, J., Yi, J., Cheng, J., Dun, W., Wei, H. 2018. "Resveratrol induces autophagic apoptosis via the lysosomal cathepsin D pathway in human drug-resistant K562/ADM leukemia cells", *Exp Ther Med*. 15,3012-3019.

Zhou, W., Wang, S., Ying, Y., Zhou, R., Mao, P.. 2017. " miR-196b/miR-1290 participate in the antitumor effect of resveratrol via regulation of IGFBP3 expression in acute lymphoblastic leukemia", *Oncol Rep*, 37,1075-1083.

Zhu, M., Zhang, Q., Wang, X., Kang, L., Yang, Y., Liu, Y., Yang, L., Li, J., Yang, L., Liu, J., Li, Y., Zu, L., Shen, Y., Qi, Z. 2016. " Metformin potentiates anti-tumor effect of resveratrol on pancreatic cancer by down-regulation of VEGF-B signaling pathway", *Oncotarget*, 7,84190-84200.

Zunino, S.J., Storms, D.H. 2006. " Resveratrol-induced apoptosis is enhanced in acute lymphoblastic leukemia cells by modulation of the mitochondrial permeability transition pore", *Cancer Lett*, 240, 123-34.

Zunino, S.J., Storms, D.H., Newman, J.W., Pedersen, T.L., Keen, C.L., Ducore, J.M. 2012. " Resveratrol given intraperitoneally does not inhibit the growth of high-risk t(4;11) acute lymphoblastic leukemia cells in a NOD/SCID mouse model", *Int J Oncol*, 40,1277-84.

Zunino, S.J., Storms, D.H., Newman, J.W., Pedersen, T.L., Keen, C.L., Ducore, J.M. 2012. " Dietary resveratrol does not delay engraftment, sensitize to vincristine or inhibit growth of high-risk acute lymphoblastic leukemia cells in NOD/SCID mice", , *Int J Oncol*, 41,2207-12.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Dr. Öğr. Üyesi AYSUN ADAN
Proje No:	315S248
Proje Başlığı:	Resveratrol'ün Ph+ Akut Lenfoblastik Lösemide Terapötik Potansiyeli Ve Resveratrol Tarafından Tetiklenen Apoptozda Seramid Metabolizmasının Rolü
Proje Türü:	3001 - Başlangıç AR-GE
Proje Süresi:	24
Araştırmacılar:	
Danışmanlar:	YUSUF BARAN
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	KAYSERİ ABDULLAH GÜL Ü. YAŞAM VE DOĞA BİLİMLERİ F.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/08/2016 - 01/07/2019
Onaylanan Bütçe:	101000.0
Harcanan Bütçe:	87313.34
Öz:	<p>Proje ile resveratrol'ün, Ph+ ALL hücreleri üzerindeki büyümeyi inhibe edici etkisinin arkasında yatan mekanizmalar, seramid metabolizmasının hedeflenmesi ve BCR-ABL ifadesindeki değişimler ile ilişkilendirilerek araştırılmıştır. Resveratrol, SK inhibitörü (SKI II), GSS inhibitörü (PDMP), SPT inhibitörü (myriocin) ve resveratrol: inhibitör kombinasyonlarının in vitro olarak Ph+ ALL SD1 ve SUP-B15 hücreleri üzerindeki büyümeyi durdurucu ve apoptotik etkileri MTT hücre çoğalması testi, Aneksin-V/PI boyaması, kaspaz-3, PARP ifadelerinin ve sitokrom c salınımının belirlenmesi (western blot) ile, sitostatik etki (hücre döngüsü üzerindeki) ise akım sitometresi (PI boyaması) ile araştırılmıştır. Resveratrol ve sfingolipid metabolizması enzimlerini hedefleyen inhibitör kombinasyonlarının BCR-ABL protein ifadesi üzerine etkisi western blot ile belirlenmiştir. Ayrıca, resveratrol'ün SPT, SK-1/2, GSS protein ifadeleri üzerindeki etkisi western blot ile belirlenmiştir. Her iki hücre hattında resveratrol ve resveratrol'ün SKI II ve PDMP ile kombinasyonları hücre büyümesini baskılamış, apoptozu tetiklemiş ve hücre döngüsünü S fazında tutmuştur. Resveratrol:myriocin kombinasyonu ise hücre büyümesi ve hücre döngüsü üzerinde hücreye özgü etkiler gösterirken apoptozu her iki hücrede tetiklemiştir. Her iki hücre tipinde resveratrol ve kombinasyonları sitokrom-c salınımını, kaspaz-3 kesimini ve PARP kesimini genel olarak arttırmakla beraber hücreye özgü değişimler de saptanmıştır. Resveratrol her iki hücrede SK-1/SK2 ve GSS ifadesini azaltırken SPT ifadesini arttırmıştır. Resveratrol, SKI II ve PDMP BCR-ABL ifadesini azaltırken myriocin arttırmıştır. Resveratrol: SKI II ve PDMP kombinasyonları BCR-ABL üzerinde artışlara neden olurken myriocin ile kombinasyon BCR-ABL ifadesini azaltmıştır. Sonuç olarak, resveratrol seramid metabolizmasını ve BCR-ABL ifadesini düzenleyerek Ph+ ALL üzerinde hücre büyümesini baskılamış ve apoptozu tetiklemiştir.</p>
Anahtar Kelimeler:	Ph+ ALL, resveratrol, glukosil seramid sentaz, serin palmitoil transferaz, sfingozin kinase
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Evet
Projeden Yapılan Yayınlar:	1- Synergistic Cytotoxic Effects of Resveratrol in Combination with Ceramide Metabolizing Enzymes in Ph + Acute Lymphoblastic Leukemia (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Sözlü Sunum), 2- Ph+ Akut Lenfoblastik Lösemi'de Resveratrol Tarafından İndüklenen Büyüme İnhibisyonunda Seramid Metabolizmasının Rolü (Bildiri - Ulusal Bildiri - Sözlü Sunum),