

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**STEROİD'İN HL-60 (İNSAN AKUT MİYELOİD LÖSEMİ)
HÜCRE HATTINDA, APOPTOZ VE FARKLILAŞMA
ÜZERİNDEKİ ETKİSİ**

Ahmet ÖZÇİMEN

**Tıbbi Biyoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA
2005**

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**STEROİD'İN HL-60 (İNSAN AKUT MİYELOİD LÖSEMİ)
HÜCRE HATTINDA, APOPTOZ VE FARKLILAŞMA
ÜZERİNDEKİ ETKİSİ**

Ahmet ÖZÇİMEN

**Tıbbi Biyoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Ahmet KART**

**ANKARA
2005**

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji Programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Serap ERGENE GÖZÜKARA
Mersin Üniversitesi

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ahmet KART
Hacettepe Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Meral ÖZGÜÇ
Hacettepe Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Hayat ERDEM YURTER
Hacettepe Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Mualla ÇETİN
Hacettepe Üniversitesi

ONAY:

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Hakan S. Orer
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Her şeyden önce, bu zamana kadar olan eğitim ve mesleki gelişimimde değerli katkısı olan bütün eğitici ve yol göstericilerime,

Bu tez çalışmasında daha önce kazanmış olduğum ilk teknik bilgileri kendisine her zaman borçlu olduğum ve bana bir altın bilezik kazandıran uzmanlık danışmanım Sheffield Üniversitesi, Kanser Çalışmaları Enstitüsü'nden Dr John LAWRY'e,

Hacettepe Üniversitesi'nde bulunduğum süre içerisinde danışmanlığımı yürüten ve tez yazımım sırasında göstermiş olduğu titizliğinden dolayı Prof. Dr. Ahmet KART'a,

Bu tezin oluşturulmasında ve her aşamasında engin bilgilerini ve desteğini her zaman hissettiğim hocam Sayın Prof. Dr. Gönül HİÇSÖNMEZ'e,

Hücre Kültür çalışmalarının yapılabilmesi için laboratuvarlarını açan ve desteklerini esirgemeyen Pediatrik Hematoloji Ünitesi Başkanı Sayın Prof. Dr. Murat TUNCER'e,

Tez çalışmasının her aşamasında değerli katkıları ve fikirlerini paylaşan, her zaman yakın desteklerini gördüğüm Tez İzleme Komitesi üyeleri Sayın Prof. Dr. Hayat YURTER'e ve Sayın Prof. Dr. Mualla ÇETİN'e,

Tez çalışmasının sonlarında Hücre Kültür odasında oluşan aksaklıktan sonra kendi laboratuvarlarını açan Temel Onkoloji Anabilim Dalı'ndan Sayın Prof. Dr. Dicle Güç ve Akım Sitometrideki katkılarından dolayı Dr Hande Canpınar'a, fotoğrafların alınmasındaki yardımlarından dolayı Uzm Bio. Güneş Esendağlı'ya ve yakın arkadaşlıklarını ve dostluklarını hiçbir zaman esirgemeyen tüm Araştırma Görevlisi, Biyolog ve Tekniker arkadaşlarıma,

Akım Sitometre çalışmalarında değerli katkılarından ve yardımlarından dolayı İbn-i Sina Hastanesi, Hematoloji Bilim Dalı'ndan Dr Klara DALVA, Uzm. Bio. Gülhis AKAR ve Bio. Tarkan ÇEVİRGEN'e,

Materyal sağlanmasındaki katkılarından dolayı Dr. Hamza OKUR'a,

Akım Sitometredeki teknik katkılarından dolayı Sayın Gürsel YETKİN, Selma ŞAR, Özgü KÖSE ve arkadaşlıklarını esirgemeyen tüm Pediatrik Hematoloji ve İmmünoloji Üniteleri'ndeki arkadaşlarıma,

Tez yazımım sırasında gösterdikleri titiz katkılarından dolayı Sayın Prof. Dr. Meral ÖZGÜÇ'e ve Doç. Dr. Duygu UÇKAN'a,

Data toplantılarında değerli görüş ve teknik bilgilerini paylaşan, önerilerini ileten, H.Ü.T.F. Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri, Prof. Dr. Şükriye AYTER, Prof. Dr. Engin YILMAZ, Prof. Dr. Serap EMRE ve Prof. Dr. Pervin DİNÇER'e,

Bu yıllar içinde ve özellikle geçirdiğim rahatsızlıklar sırasında maddi ve manevi varlıklarıyla desteklerini her zaman hissettiğim arkadaşlarım Dr. Çetin KOCAEFE, Dr. Mügen TERZİOĞLU, Dr. Filiz GERÇEKER, Dr. Deniz ÜREN, Dr. Sibel OĞUZKAN, Dr. Didem DAYANGAÇ, Uzm. Bio. Banu PEYNİRCİOĞLU, Uzm. Bio. Burcu BALCI, Bio. Hülya GÜNDEŞLİ, Bio. Gamze BORA ve Bio. Banu TÜREL'e,

Özellikle bu tez çalışmasının istatistiklerinin çıkarılmasındaki yardımlarından dolayı Uzm. Anıl BARAK ve kardeşim S. Çiğdem ÖZÇİMEN'e,

Şekil ve tabloların düzenlenmesindeki katkılarından dolayı ve her zaman yakın dostluğunu hissettiğim arkadaşım Uzm. Bio. Yunus K. TERZİ'ye,

Yakın ilgi ve arkadaşlıklarını her zaman gördüğüm arkadaşlarım, Dr Köksal ÖZGÜL, Dr Serap KOLUKISA, Bio. Ayşe YÜZBAŞIOĞLU, Bio. Nurgün ÖZDEMİR, Selda EROL, Sedef KILIÇ, Tuncay SOMAY, Alev NİŞAN, Şerife DİNLER ve Hakan TÜRKBEN'e,

Uzun yıllardır dostlukları hiç sönmeyen, maddi ve manevi varlıklarıyla bana güç veren arkadaşlarım Dr. Oğuzhan OĞUZ, Yard. Doç. Dr. İbrahim TUĞLU, Doç. Dr. Barbaros ORAL, Dr. Emre YİĞİTBAŞ, Doç. Dr. Kıvanç GÜNGÖR ve Dr Ümit DEMİREL'e,

Doktora yapmama olanak sağlayan TC Mersin Üniversitesi'ne,

Her şeyden önemlisi, bugünlere gelmemizi ve gelişmemizi sağlayan Ulu Önder Mustafa Kemal ATATÜRK'e,

En son olarak ta doğumumdan sonraki tüm gelişim aşamalarında maddi ve manevi destekleri hiç sönmeyen ve her zaman hissedeceğim çok değerli ailem annem Raziye ve rahmetli babam Mehmet ÖZÇİMEN, halam Emine ve eniştem Ziya ENGİN, rahmetli dedem Ömer ve babaannem Seyide ÖZÇİMEN, rahmetli dedem Ali ve anneannem Ayşe GÜLSEREN'e,

Ve burada anmayı unuttuğum yakınlarım, arkadaşlarım ve öğretmenlerime **TEŞEKKÜRÜ** bir borç bilirim.

ÖZET

Ahmet, Ö. Steroid'in HL-60 (insan akut miyeloid lösemi) hücre hattında apoptoz ve farklılaşma üzerindeki etkisi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Programı Doktora Tezi, Ankara 2005. Akut miyeloid lösemi (AML), kemik iliğindeki normal hücrelerin azalmasıyla tanınan lösemi tipidir. Hem çocuk hem de erişkinlerde görülebilen AML, çocukluk çağı lösemilerinin %15'ini oluşturur. Bu olguların %25-30'u 10-15 yaş arasındaki çocuklardır. AML, *French-American-British* (FAB) sınıflandırmasına göre sekiz alt grupta (M0-M7) sınıflandırılmaktadır. AML'nin oluşumunda apoptoz ve farklılaşma mekanizmalarındaki bozukluklar önemli yer tutmaktadır. Tedaviye yönelik çalışmalarda, all-trans retinoik asit (ATRA), vitamin-D türevleri, histon deasetilaz (HDAC) inhibitörleri, arsenik tri-oksit (ATO) ve steroid türevleri gibi ajanlar çok sık kullanılmaktadır. ATRA, AML'nin M3 alt grubuna özel bir farklılaşma yaratırken, vitamin-D ve ATO monositik farklılaşma yaratmaktadır. HDAC inhibitörleri ise farklılaşma tedavilerinde son yıllarda kullanılmaya başlanmış ve çalışmalar devam etmektedir. Ancak, kesin bir tedavi henüz netlik kazanmamıştır. Bu çalışmada, bir steroid türevi olan 6 α -metilprednizolonun, HL-60 (insan akut myeloid lösemi) hücrelerindeki apoptotik ve farklılaşma etkileri araştırıldı. HL-60 hücrelerine sitotoksiste ve apoptozu göstermek için 12, 24 ve 48 saat sürelerde 10⁻⁴ M, 5x10⁻⁴ M ve 10⁻³ M derişimlerde 6 α -metilprednizolon uygulandı. İnkübasyon sonucu sayım ve akım sitometrik incelemelerde, 10⁻³ M derişimde uygulanan metilprednizolonun 48. saatte sitotoksik etkili, 5x10⁻⁴ M derişimdeki metilprednizolonun ise 24. saatte erken apoptozu uyardığı ve 48. saatte geç apoptozu uyardığı bulundu. Daha sonra farklılaşmanın gösterilebilmesi için hücreler 48, 72 ve 96 saat sürelerde 10⁻⁶ M, 10⁻⁵ M ve 10⁻⁴ M 6 α -metilprednizolon ile inkübe edildiler. İnkübasyonun ardından monositik, granülositik ve makrofaj yüzey belirleyicilerinden CD14, CD11-b ve CD15 ile boyanıp akım sitometrede incelendiler. İnceleme sonucunda 10⁻⁵ M ve 10⁻⁴ M derişimdeki 6 α -metilprednizolonun 72. ve 96. saatlerde granülositik farklılaşmayı uyardığı ancak uygulanan bütün derişimlerin bu saatler içinde monositik bir farklılaşma oluşturmadığı gözlenmiştir. Sonuç olarak, 6 α -metilprednizolonun sitotoksiste, apoptoz ve granülositik farklılaşma üzerindeki etkileri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Monositik ve makrofaj farklılaşmasının gösterilebilmesi için HL-60 hücrelerine metilprednizolonun vitamin-D veya retinoik asit gibi bir ajanla verilmesi sinerjistik etki yapabilir. Bulunan bu sonuçlar, gelecekte yapılacak in-vitro apoptoz ve farklılaşma çalışmaları için bir temel oluşturacaktır. Gelecek çalışmalarda, AML'nin diğer alt gruplarından olan K562 (eritrolösemik hücre hattı), NB4 (APL hücre hattı), U937 (miyelomonositik hücre hattı) ve Kasumi-1 (AML-M2 hücre hattı) gibi önemli hücrelerde metilprednizolonun apoptoz, farklılaşma, çoğalma ve sinyal iletimi üzerine etkilerinin *mikroarray* çalışmaları ile incelenmesi yeni tedavi çalışmalarını daha da hızlandırıp, zaman kazanımı sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Akut miyeloid lösemi, metilprenizolon, sitotoksiste, apoptoz, farklılaşma tedavisi, akım sitometre.

Destekleyen Kurum: TÜBİTAK; SBAG-2515 (101S215)

ABSTRACT

Ahmet, Ö. The Effect of steroid on the apoptosis and differentiation in HL-60 (human acute myeloid leukemia) cell line. Hacettepe University Institute of Health Sciences, Ph.D. Thesis in the programme of Medical Biology, Ankara, 2005. Acute myeloid leukemia (AML) is a major type of leukemia which is known about decreasing the normal cells in the bone marrow. It is seen in both children and adult. AML is the 15% range in the childhood leukemia. The 25-30% of these cases is among the children between 10-15 years old. AML is classified in eight subgroups (M0-M7) as a French-American-British (FAB) classification. The defects on apoptosis and differentiation mechanisms are play a major role in occurring AML. In the therapy studies, all-trans retinoic acid (ATRA), vitamin-D analogs, histon deacetylase (HDAC) inhibitors, arsenic tri-oxide (ATO) and steroid analogs are used in frequent. ATRA causes a specific differentiation in AML-M3 sub-group. Vitamin-D and ATO cause monositic differentiation in HL-60 cells. HDAC inhibitors is currently used for AML therapy studies. But all of these agents are not satisfied for the therapy studies yet. In the recent study, the effect of apoptosis and differentiation of 6 α -methylprednisolone, an analog of steroid, on HL-60 cells was investigated. For this purpose, HL-60 cells were cultured with 10⁻⁴-10⁻³ M concentrations of 6 α -methylprednisolone for 12-48 hours. Cytotoxic effects of 6 α -methylprednisolone in these cells were analysed either tyripan blue dye exclusion method or annexin-V FITC by flow cytometric method. The cytotoxic and late apoptotic effects of 6 α -methylprednisolone on HL-60 cells were observed at a concentration of 10⁻³ M and 5x10⁻⁴ M in 48th hours respectively. The effect of early apoptosis were observed at a concentration 5x10⁻⁴ M in 24th and 48th hours. For differentiation assay, HL-60 cells were treated with 6 α -methylprednisolone at a concentration of 10⁻⁶-10⁻⁴ M between 48-96 hours. Following incubation, cells were applied with CD14, CD11-b and CD15 cell surface markers. After analysed by flow cytometry, CD11-b marker expression was increased at a concentration 10⁻⁵ M and 10⁻⁴ M in 72th and 96th hours. Never any significant change was observed on the expression of CD14 marker for these concentrations and times. But in the level of CD15 marker was observed a slight changes. As a result of CD11-b increasing, confirm that 6 α -methylprednisolone differentiate the HL-60 cells to granulocytic form. In order to show synergistic changes on the expresion of monocytic and macrophage marker, HL-60 cells could be applied with 6 α -methylprednisolone and vitamin-D or ATRA together. All of these data will be lead for the future works. In investigating of the apoptotic, differentiation, proliferation and signal transduction effect of 6 α -methylprednisolone on other AML cells such as K562, NB4, U937 and Kasumi-1, will be bring novel approach for the therapy.

Key Words: Acute myeloid leukemia, methyleprednisolone, cytotoxicity, apoptosis, differentiation therapy, flow cytometry.

Supported by TUBITAK, SBAG-2515 (101S215)

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Lösemi ve Tipleri	2
2.1.1. Löseminin Semptomları ve Tanısı	4
2.1.2. Löseminin Tedavisi	5
2.2. Akut Miyeloblastik Lösemi (AML)	6
2.3. Steroidin Mekanizmaları ve Uygulamaları	9
2.4. Apoptoz	12
2.4.1. Apoptoz Mekanizmaları	13
2.4.2. Apoptoz ve Kansere İlişkisi	14
2.4.3. Apoptozun Tespiti	15
2.5. Hücre Farklılaşması	16
2.5.1. Hematopoetik Sistemin Farklılaşması	16
2.5.2. Hücre Yüzey Belirleyicileri	18
2.6. Akım Sitometre	18
2.7. Hücre Kültürü	22

3. GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler	23
3.1.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Kimyasallar	23
3.1.2. İlaç ve Sitotoksosite Deneyinde Kullanılan Kimyasallar	23
3.1.3. Apoptoz Deneyinde Kullanılan Kimyasallar	25
3.1.4. DNA İzolasyonunda Kullanılan Kimyasallar	26
3.1.5. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Kimyasallar	26
3.1.6. Farklılaşma Deneyinde Kullanılan CD Hücre Yüzey Belirleyicileri	26
3.1.7. Wright Boyama Deneyinde Kullanılan Kimyasallar	27
3.1.8. Kullanılan Çözeltilerin İçerikleri	27
3.2. Yöntem	28
3.2.1. Hücre Kültürü	29
3.2.2. İn-vitro toksisite Deneyi	31
3.2.3. Akım Sitometre ile Apoptozun Ölçülmesi	32
3.2.4. DNA Fragmantasyon Deneyi	33
3.2.5. Hücre Yüzey Belirleyicileri Kullanılarak Akım Sitometrede Farklılaşmanın Ölçülmesi	34
3.2.6. Apoptoz ve Farklılaşmanın Morfolojik Değerlendirilmesi	35
3.3. İstatistiksel Analizler	35
4. BULGULAR	36
4.1. Doz/Zaman Bağımlı Metil prednizolonun HL-60 Hücrelerinde Sitotoksosite ve Apoptoz Etkilerinin Araştırılması	36
4.2. Doz/Zaman Bağımlı Metil Prednizolonun HL-60 Hücrelerinde Farklılaşma Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması	47
5. TARTIŞMA	54
SONUÇ VE ÖNERİLER	60
KAYNAKLAR	61
EK	

SİMGELER VE KISALTMALAR

ALL	: Akut Lenfositik Lösemi
AML	: Akut Miyeloid Lösemi
As₂O₃	: Arsenik Tri-Oksit
ATRA	: All Trans Retinoic Acid
CD	: Cluster Differentiation
CEBP-A	: <i>CCAAT</i> / Enhancer Binding Protein-A
DMSO	: Di-Metil Sülfoksit
ERK	: Extracellular signal Regulated Kinase
FITC	: Fluorescent Iso-Thio Cyanate
FLT3	: Fms Like Tyrosine
GM-CSF	: Granulocyte Macrophages Colony Stimulating Factor
HDAC	: Histon De Asetilase Complex
HRE	: Hormone Response Element
KLL	: Kronik Lenfositik Lösemi
KML	: Kronik Miyeloid Lösemi
Jak	: Janus Kinases
MAPK	: Morphogene Activated Phosphorylated Kinases
MDS	:Miyelo Displastik Sendrom
MP	: Metil Prednizolon
PBS	: Phosphate Buffer Saline
PI3K	: Phospho Inositide 3 Kinase
PI	: Propidyum İyodid
RPMI	: Rosswell Park Memorial Institute
Src	: Chicken Raus Sarcoma virus transforming gene
STAT	: Signal Transducer and Activation of Transcription
TBE	: Tyripan Blue Dye Exclusion
YDMP	: Yüksek Doz Metil Prednizolon

ŞEKİLLER

	Sayfa
2.1. Hematolojik malignitelerin patogenezi	3
2.2. Steroidlerin hücresel düzeydeki işlevleri	11
2.3. Akım sitometre cihazının işleyiş şeması	20
3.1. Metilprednizolonun kimyasal tepkimeler ile oluşumu	24
3.2. Neuber-Hemositometrede hücre sayımı	31
3.3. Anneksin V-FITC ile fosfatidil serin ilişkisi	33
4.1. Doz/Zaman bağımlı metilprednizolonun HL-60 hücrelerinde tiripan mavisi ile yüzde canlılık değişimleri	37
4.2. Doz/Zaman bağımlı metilprednizolonun HL-60 hücrelerinde anneksin V ve canlılık değişimleri	38
4.3. Doz/Zaman bağımlı metilprednizolonun HL-60 hücrelerinde anneksin V ile erken apoptoz değişimleri	39
4.4. Doz/Zaman bağımlı metilprednizolonun HL-60 hücrelerinde anneksin V ile geç apoptoz değişimleri	40
4.5. MP ile 12 saat inkübe edilen HL-60 hücrelerinde canlılığın ve apoptozun akım sitometrik olarak değerlendirilmesi	41
4.6. MP ile 24 saat inkübe edilen HL-60 hücrelerinde canlılığın ve apoptozun akım sitometrik olarak değerlendirilmesi	42
4.7. MP ile 48 saat inkübe edilen HL-60 hücrelerinde canlılığın ve apoptozun akım sitometrik olarak değerlendirilmesi	43
4.8. MP ile inkübe edilen hücrelerin <i>Wright</i> boyası ile boyanarak morfolojik değerlendirilmesi	45
4.9. MP uygulanan HL-60 hücrelerinde DNA agaroz jel elektroforezi inceleme sonuçları	46

4.10. Doz/Zaman bağımlı MP uygulanan HL-60 hücrelerinde CD11-b yüzde değişimi	48
4.11. Doz/Zaman bağımlı MP uygulanan HL-60 hücrelerinde CD14 yüzde değişimi	49
4.12. Doz/Zaman bağımlı MP uygulanan HL-60 hücrelerinde CD15 yüzde değişimi	50
4.13. MP ile inkübe edilen hücrelerin <i>Wright</i> boyası ile boyanarak morfolojik değerlendirilmesi	52

TABLULAR

	Sayfa
4.1. Metilprednizolonun HL-60 hücrelerinde sitotoksik etkileri	37
4.2. Metilprednizolonun HL-60 hücrelerinde sitotoksik etkilerinin akım sitometrik değerleri	38
4.3. Metilprednizolonun HL-60 hücrelerinde erken apoptoz etkilerinin akım sitometrik değerleri	39
4.4. Metilprednizolonun HL-60 hücrelerinde geç apoptoz etkilerinin akım sitometrik değerleri	40
4.5. CD11-b hücre yüzey belirleyicisi ile akım sitometrik inceleme sonuçları	48
4.6. CD14 hücre yüzey belirleyicisi ile akım sitometrik inceleme sonuçları	49
4.7. CD15 hücre yüzey belirleyicisi ile akım sitometrik inceleme sonuçları	50

1. GİRİŞ

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi, Pediatrik Hematoloji Ünitesi'nde Akut Miyeloblastik Lösemi (AML) tanısı alan hastalara rutin tedavi başlangıcında bir steroid türevi olan Prednol-L (6 α -Metil Prednisolon 21-Hemi-Süksinat) yüksek doz olarak kullanılmakta ve çok iyi sonuçlar elde edilmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda Prednol-L'nin etkileri primer blast hücrelerinde gösterilmiş olmasına karşın, hücre kültür çalışmaları ile Metil Prednizolon (MP)'un apoptoz ve farklılaşma üzerindeki *in vitro* etkileri bu çalışmada gösterilmek istenmiştir.

Bu çalışmada, AML hücrelerinde değişik dozlardaki metilprednizolon'un apoptoz ve farklılaşma üzerindeki etkisi *in-vitro* yöntemlerle test edilmiştir. AML'nin özdeşi (*counterpart*) hücre hattı olarak HL-60 hücreleri kullanılmıştır. HL-60 hücreleri, AML'nin M3 sınıfında yer alan Akut Promiyelositik Lösemi (APL) tipi hücreler olması, hücre kültür çalışmalarında hızlı çoğalması ve deneysel hematoloji çalışmalarında çok tercih edilen bir hücre hattı olması nedeniyle *in vitro* çalışmalar için seçilmiştir.

Bu çalışmada amaç; MP'nin HL60 hücrelerinde, sitotoksosite, apoptoz, farklılaşma üzerindeki *in-vitro* etkilerinin araştırılmasıdır. Böylece bundan sonraki *in-vitro* çalışmalarda kullanılacak dozlar ve süreler belirlenmiş olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Lösemi ve Tipleri

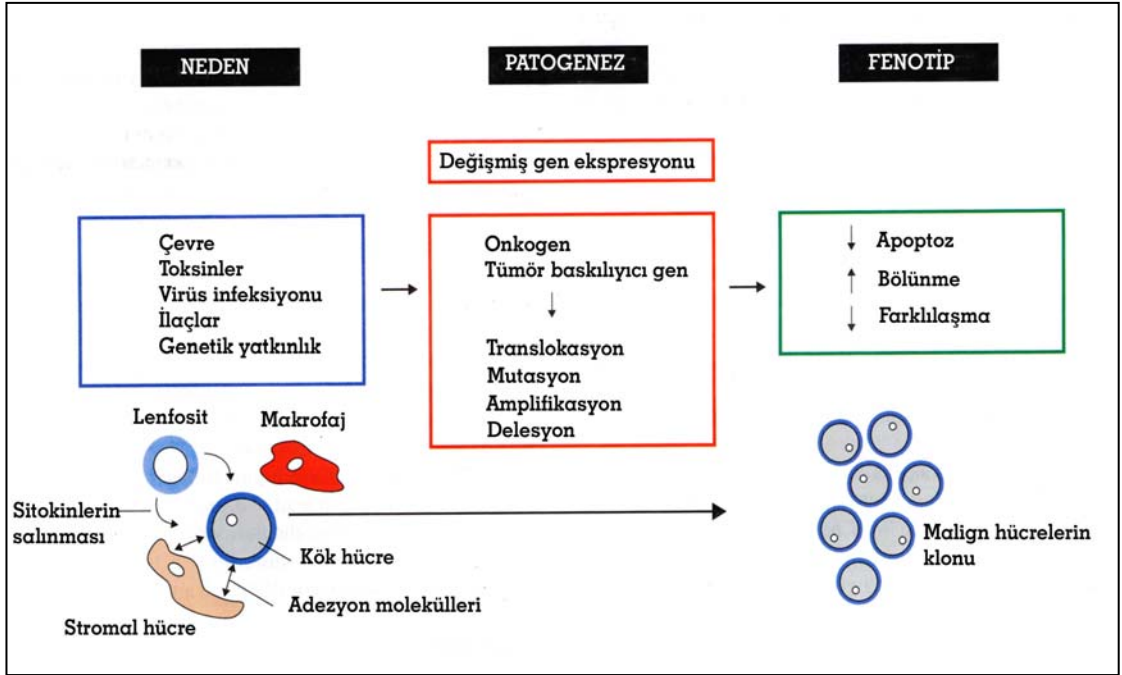
Kanser, hücre ölüm programı bozulmuş, kontrolsüz bölünen hücrelerin aşırı çoğalması sonucu oluşan neoplastik bir hastalıktır. Kanser kelime anlamı olarak Yunancada “*canceros*” yani yengeç anlamındadır. Kanser oluşumu, genetik değişimleri, proto-onkogen aktivasyonunu, tümör baskılayıcı gen inaktivasyonunu içeren çoklu bir süreçtir (1). Kanseri kötü huylu yapan iki özelliği vardır. Birincisi; kanser hücrelerinin komşu dokuları işgal etmesi ve ikincisi; vücuttaki diğer organlara yayılmasıdır ki en kötü olanı da budur ve metastaz olarak adlandırılır.

Paleopatoloji bulgularına göre kanser ile ilgili ilk kanıtlar tarih öncesi devirlere kadar dayanmaktadır. Günümüzden 100.000.000 yıl önce yaşamış olan dinazorların fosillerinde osteojenik sarkomalara rastlanmıştır (2). Aynı şekilde bunlardan birkaç milyon yıl sonra yaşamış olan monosaruslarda osteomalara işaret edilmektedir. Pleistosen’de yaşayanların fosillerinde pelvik kemiklerinde de osteosarkomların olduğu gözlenmiştir (3).

Eski Mısır papirüslerinde insan meme kanserlerine ilişkin bilgiler vardır (4). Bilim adamları kanseri ilk kez 19. yüzyılda sınıflamaya başlamışlardır. Günümüzde, enfeksiyonlar, kimyasal ve fiziksel ajanlar ve genetik yatkınlık insan kanserlerinin önemli nedenleri arasında yer almaktadır (4).

Lösemi, Yunancada “*Beyaz Kan*” anlamında kullanılan, lökosit adı verilen hücrelerin kanseridir. Aynı zamanda bu olgunlaşmamış şekilli kan hücrelerinin kötü huylu bir hastalığı olarak da bilinir (5). Lösemiler ya da kan kanserleri en sık görülen on tip kanser arasında yer alır. Lösemide, çok sayıda lökosit kemik iliğindeki kök hücrelerden yapılır, ancak olgunlaşamazlar (Şekil 2.1) (6). Bu olgunlaşmayan hücreler normal işlevlerini göremezler. Kemik iliğinde başlayan kanser, kana, lenf

nodlarına, dalağa, karaciğere, merkezi sinir sistemine, testis ve diğer organlara yayılır (6,7).



Şekil 2.1. Hematolojik Malignitelerin Patogenezi (6).

Lösemiler kendi içinde akut (hızlı ilerleyen) ve kronik (yavaş ilerleyen) olmak üzere iki ana sınıfta incelenirler. Etkilenen lökosit tipine göre ise miyeloid ve lenfoid olarak da sınıflandırılabilirler. Lösemnin dört önemli tipi vardır (7).

1. Akut Lenfositik Lösemi (ALL): En sık çocukluk çağında görülen lösemi tipidir. 65 yaşın üzerindeki erişkinleri de etkilemektedir.
2. Kronik Lenfositik Lösemi (KLL): Genellikle 55 yaş ve üzeri erişkinleri etkiler. Zaman zaman genç erişkinlerde de hastalık görülür. Çocukluk çağında neredeyse hiç görülmez.
3. Akut Miyelositik Lösemi (AML): Hem çocuklar hem de erişkinlerde görülür. Bu lösemi tipi bazen akut non-lenfositik lösemi (ANLL) olarak da adlandırılır. Sekiz farklı alt grubu (M0-M7) vardır.

4. Kronik Miyelositik Lösemi (KML): Çoğunlukla erişkinlerde görülmesine rağmen, nadir olarak çocukları da etkiler.

2.1.1. Löseminin Semptomları ve Tanısı

Lösemi durumunda, kemik iliği lösemik blastlar ürettiğinden eritrosit, trombosit, lökosit gibi sağlıklı kemik iliği elemanları yeterince üretilemez. Bu yüzden anemiye bağlı solukluk, zayıflık ve bitkinlik, trombositlerin azalmasıyla (<50.000/ μ l) çürükler ve kanamalar ortaya çıkar. Blastlar işlevsel olarak anormal olduklarından hastalar enfeksiyonlara açıktır (8).

Bütün kan hücreleri gibi lösemik hücreler de vücutta dolaşırlar. Lösemik blastların sayısına ve bulunduğu yere bağlı olarak hastalar farklı belirtiler gösterebilir. Akut lösemide, belirtiler hızlı ve ağırdır. Anormal hücreler beyin (Merkezi Sinir Sistemi) veya omurilikte toplanırsa hastalık baş ağrısı, kusma, konvüzyon, kas kontrolünün zayıflığı ve kasılmalar ile, testislerde toplanırsa şişme ile kendini belli eder. Genel olarak lösemik hücreler toplandıkları yere bağlı olarak, buldukları doku ve organları etkilerler. Bazı hastalarda, deri ve gözde şişme, sindirim sistemi, solunum sistemi, boşaltım sistemi ve diğer sistemlerde işlev bozuklukları görülebilir. Ayrıca trombositopeniye bağlı kanamalar da olabilir (6-10).

Lösemide yaygın görülen semptomlar (10):

- Anemi sonucu oluşan yorgunluk, uyuşukluk ve solgunluk
- Lökosit işlevlerinin bozulması sonucu oluşan sıklıkla ve uzun süreli tekrarlayan şiddetli enfeksiyonlar
- Trombosit azalması sonucu kendiliğinden kanama ve sıklaşan morarmalar
- Deri altında oluşan peteşi olarak adlandırılan kırmızı noktalar
- Kanamalı ve şişmiş diş etleri
- Gece terlemeleri
- Kemik ve eklem ağrıları

- İştah ve kilo kaybı
- Şişmiş ve hassaslaşmış lenf bezleri
- Karaciğer ve dalak büyümesi

Lösemi tanısında, mikroskopik inceleme en önemli yöntemdir. Periferik kan yayması lösemiye belirleyebilir fakat tipini belirlemede yetersizdir. Kemik iliği aspirasyon materyali yayması, akım sitometre ile immünofenotipleme, detaylı sitokimyasal boyamalar ve mikroskopik inceleme, sitogenetik ve moleküler analiz, lösemi tipini belirlemede etkin tanı yöntemleridir (8).

2.1.2. Löseminin Tedavisi

Löseminin tedavisi hastalığın şiddetine, lösemik hücrelerin özelliklerine, alt tipine, daha önce alınan tedavilere, hastanın yaşına, semptomlarına bağlı olarak değişiklik gösterir ve kompleks bir tedavi protokolü gerektirir (8-10).

Akut lösemilerde kemoterapi ilk tedavi tercihidir ve hastanın durumuna bağlı olarak radyoterapi eklenebilir. Günümüzde AML vakalarında remisyon indüksiyonu ve konsolidasyonu takiben hematopoetik kök hücre nakli ile tedavi şansı artmaktadır (8-10).

Genel olarak çocukluk dönemi ALL'lerde uzun süreli iyileşme oranı %70-80 iken, erişkin ALL'lerde bu oran ancak %40-45 dolayındadır. Eski yıllarda AML'lerde, uzun süreli yaşam oranı ise yaklaşık %20 dir. Yüksek doz kemoterapi, kemik iliği transplantasyonu, uzun süreli yaşam oranını en fazla %50-70'e çıkarsa da ortalama %40-50 dolaylarında bir iyileşme şansı vardır. KML'lerde, yalnızca allojenik kemik iliği nakli ile iyileşme mümkündür. KLL'lerde ise, tam bir iyileşme sağlanamaz (8-10).

Kemoterapi, kanserli hücrelerin büyümesini ve bölünmesini durduran sitotoksik ilaçlar ile yapılan bir tedavidir. Damar ve ağız yoluyla verildiklerinden

normal hücrelerin büyümeleri ve bölünmeleri üzerinde de etkilidirler (8-10). AML'de uygulanan tedavi protokolü çok kısa bir sürede yüksek dozda olmasına rağmen ALL'de uzun süreli kemoterapi gerekir. Birçok kemoterapi protokolünde, remisyonun indüklenmesini takiben *konsolidasyon* tedavileri ile anti-lösemik yanıt güçlendirilmekte ve daha sonra idame tedavisi ile kemoterapi sürdürülmektedir.

2.2. Akut Miyeloblastik Lösemi (AML)

Akut miyeloblastik lösemi (AML), dört önemli lösemi tipinden biri olup kemik iliğindeki normal hücrelerin azalmasıyla tanınır. Kemik iliğindeki blast hücreleri % 30 oranını aştığında lösemi tanısı konulmaktadır ve hastalığın şiddeti blast oranı ile doğru orantılıdır. Hastalık tedavi edilmezse, tanıyı takiben birkaç hafta ya da birkaç ay içinde ölümlü sonuçlanmaktadır. Bu ciddi ölümcül hastalığın bir çoğu henüz bilinmeyen nedenlerden kaynaklandığı, özellikle 1945'te Japonya'da Hiroshima ve Nagasaki'ye atom bombasının atılmasından yıllar sonra sayısal artış gösterdiği gözlenmiştir. Radyoterapi alan kanser hastalarında da remisyonun yıllar sonra lösemi gelişmesi de, radyasyonun lösemi etiyolojisinde önemli bir etken olduğunu ortaya çıkarmıştır. Kimyasal ajanlardan benzen ve bazı anti-kanser ilaçları da AML gelişiminde etkilidir. Virüslerin bazı hayvanlarda lösemiye yol açtığı ve ayrıca bazı onkojenik virüslerin (*Herpesvirus, Human T-cell Lymphoma Virus type-I gibi*) sitoplazmik kinazları fosforile ederek STAT (*Signal Transducer and Activation of Transcription*) sinyal yolu üzerinden onkojenik aktivasyon yolu ile, insan hematopoetik hücrelerinde farklılaşmayı engelleyerek AML'ye neden olduğunu doğrulayan bilgiler mevcuttur (11-14).

AML çocukluk çağı lösemilerinin yaklaşık %15'ini oluşturur. Bu olguların %25-30'u 10-15 yaş arasındaki çocuklardır. Ayrıca, “*Down Sendromu, Bloom Sendromu, Ataxia Telangiectasia, Nörofibromatosis, Klinefelter Sendromu, Turner Sendromu ve Xeroderma Pigmentosum*” gibi kromozomal bozukluklarla seyreden hastalıklarda da AML riski yüksektir. FAB (French American British Association) sınıflandırmasına göre AML M0-M7 olmak üzere sekiz alt grupta toplanır (14-17).

FAB Sınıflandırmasına Göre AML:

M0: Akut miyeloblastik lösemi (minimal farklılaşmış)

M1: Akut miyeloblastik lösemi (farklılaşma yok)

M2: Akut miyeloblastik lösemi (farklılaşma oluşmuş)

M3: Akut promiyelositik lösemi (2 alt tipi vardır)

APL : Hipergranüler akut promiyelositik lösemi

APL-V (M3V) : Mikrogranüler akut promiyelositik lösemi

M4: Akut miyelomonositik lösemi

AML-M4Eo : Artmış eozinofili ile seyreden AMMoL

M5: Akut monositik lösemi

M5a : Akut monoblastik lösemi (hafif farklılaşmış)

M5b : Akut monositik lösemi (farklılaşmış)

M6: Eritrolösemi

M7: Akut megakaryoblastik lösemi

AML'de genetik bulgular, özelleşmiş alt tiplerinde görülen kromozomal değişikliklere dayanır. En çok görülen kromozomal değişiklikler, M3 tipi olan promiyelositik lösemi (PML)'ye özgü olan t(15;17) translokasyonu, M2 tipinde görülen t(8;21) translokasyonu, eozinofili ile karakterize M4 tipinde inv(16) inversiyonu, M5a tipindeki t(8;16) translokasyonudur. Resiprokal translokasyonlar sonucu oluşan kırılma noktalarının analizinde yeni füzyon gen transkript ürünlerinin varlığı ortaya çıkarılmıştır(7).

AML'nin en belirgin moleküler mekanizmaları arasında DNA aktivasyonunu etkileyen özel mutasyonlar ve gen amplifikasyonları yer almaktadır. Hematopoetik hücrelerde, bölünme, ölüm, farklılaşma, hücre döngüsü kontrol noktaları ve tamir gibi kompleks sistemlerdeki dengeler bozulunca AML ortaya çıkmaktadır. Özellikle farklılaşmada kritik öneme sahip AML-1 ve c-myc gibi genler bu mekanizmalar ile etkilenmektedir (6-7, 10, 16-17).

AML öncüsü olan, miyeloproliferatif bozukluklarda ya da miyelodisplastik sendrom (MDS)'da etkili olan trizomi 8, tipik bir translokasyon yada inversiyonla oluşur. Trizomi 8 apoptozu düzenleyen genlerin ekspresyonunu azaltmakta, lösemik kemik iliğinde yapısal (konstitüsyonel) mozaizm meydana getirmektedir. Trizomik klonlar *malign* populasyonların çoğalmasına yol açmaktadır. AML alt gruplarında tetrozomi 8 ile ilişkili ilk basamak trizomi 8 dir (18).

Lösemilerde yapılan moleküler çalışmalar, nadir olmasına karşın AML'lerde bir kromozomal bölgenin üç ve daha fazla kopyasının olabileceğini ortaya çıkarmıştır. Bu bölgeler, lökomojenik etkisi güçlü onkogenlerin aktivasyonu ile artmaktadır. En çok "*homogeneously staining region*" (hsr) ve "*double minutes*" (dmin) olarak adlandırılan ekstrakromozomal elementlerin bulunduğu bölgelerde amplifikasyonlar gözlenir. Kromozomal bantlarda iki amplikon (8q24 ve 11q23) gösterilmiştir. Bunlar, c-myc onkogenini bulunduran 8q24'de Dmin ve 11q23 bölgesinde ise MLL geni amplifikasyonlarıdır (18).

FLT3 (*fms-like tyrosine*) reseptör geni *internal tandem duplikasyonları* (ITD) ve mutasyonları AML'de en sık görülen moleküler değişikliklerdir (19-22). AML'li hastaların %20'sinde FLT3 geninin internal tandem duplikasyonu bulunmakta ve kötü prognoza işaret etmektedir (23-26).

Yaklaşık her üç AML hastasının ikisinde KIT geni mutant olarak bulunmaktadır. AML hastalarının 1/3'ünde ise çeşitli tipte delesyon ve insersiyon mutasyonları bildirilmiştir (27).

AML hastalarının %15'inde WT-1 (*Willms' Tumor-1*)'in kötü prognozla ilişkili mutasyonları bulunur. Bu mutasyonlar sıklıkla heterozigot yapıdadır ve WT1'in DNA'ya bağlanmasını engelleyerek genin normal aktivitesini baskılar (28).

CEBP-A geni, *CCAAT/ enhancer binding protein-a* (C/EBPa)'yı kodlar ve tümör baskılayıcı ve proliferasyon inhibitör olarak bilinen bir transkripsiyon

faktörüdür (28-29). Hematopoetik hücrelerin farklılaşması sırasında artış gösterir fakat AML1-ETO ya da BCR-ABL translokasyonları durumunda bu genin ekspresyonu azalır. AML vakalarının %7'sinde bu gende mutasyon bulunmaktadır ve karyotipik anomalilere neden olur. CEBP-A ekspresyonunda azalmaya neden olan AML1-ETO translokasyonlu vakalarda bu gende mutasyon saptanmamıştır (30).

AML1'in RunX bölgesinde bulunan yanlış anlamlı bir mutasyondan dolayı DNA bağlanma ve transaktivasyonun engellenmesi sonucu, AML-M₀ fenotipi gözlenmektedir. Bu mutasyon sonucu, olgunlaşmadan sonlanmış proteinler inaktif hale gelir (31-35).

Bazı genetik hastalıklarda AML ve Miyelo Displastik Sendrom (MDS)'a yatkınlık sözkonusudur. Örneğin, Down sendromlular, monozomi-7'li Fanconi anemi hastaları, i(7q)'lu Scwachman sendromlular bu grupta sayılabilir (10).

2.3. Steroidin Mekanizması ve Uygulamaları

Steroid kolesterol kökenli bir hormondur. Bu sınıf içerisinde pregnenolon, progesteron, aldosteron, testosteron, estradiol, kortizol gibi özellikle memeliler için önemli türevleri bulundurur (36).

Steroid reseptörleri hücre zarı, sitoplazma ve çekirdekte bulunurlar. Çoğunlukla çekirdekte bulunan reseptörler, çekirdek içi reseptörler alt sınıfındadırlar. Steroidin bilinen mekanizması çekirdek içi sinyal olarak görev yapması ve gen ekspresyonunu sağlamasıdır. Steroid hormon yokluğunda, reseptörler bir kompleks içinde birbirlerine yapışırlar. Bu yapıya "*aporesptör kompleks*" denir ve aynı zamanda bu kompleks "*Heat shock protein*" (*Hsp*) olarak bilinen *şaperone* proteinlerini de içerir. Hsp'ler, proteinlerin katlanmasına yardımcı olarak, reseptörün aktivitesi için gereklidirler. Proteinlerin sinyal dizisi gelen sinyali çekirdek içerisine gönderir. Steroid reseptörleri, translokasyon domainleri kaybolduğunda gen ekspresyonu üzerinde baskılayıcı bir etkiye sahip olduğundan

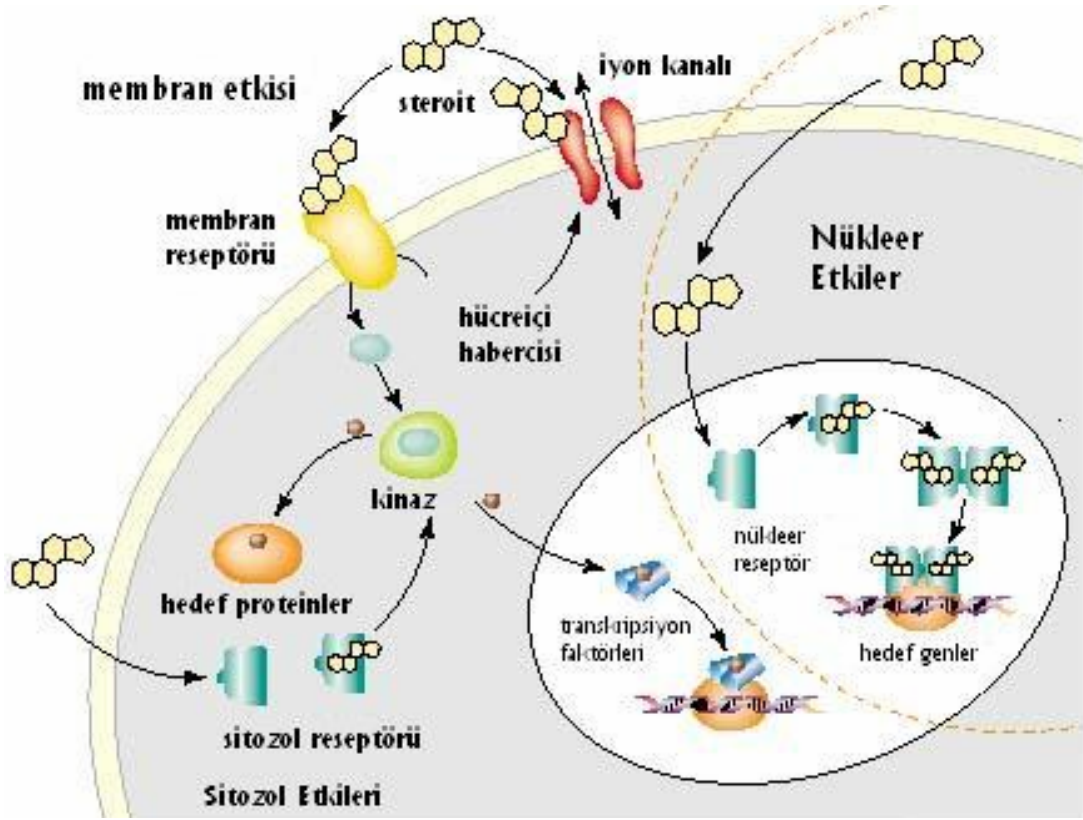
transkripsiyon aktive olamaz. Steroid reseptör aktivitesi, N-terminal uçlarındaki serin rezidülerinin fosforlanması ile artar (diğer sinyal iletim yollarının örneğin, büyüme faktörlerinin sonucu olarak). Bu davranış “*crosstalk*” olarak adlandırılır (37).

1984 yılına kadar steroid hormon reseptörlerinin yalnızca sitoplazmada olduğu düşünülüyordu ve “*İki Adım*” hipotezi geçerliydi (38). Schrader ve diğ.(39), steroid hormonlarına ait reseptörlerin çekirdekte olduklarını ortaya koymuştur. Bu reseptörler, hormona bağlı olmadıkları zaman, çekirdekteki bileşenlerine düşük bir ilgiyle bağlı durumda bulunmaktadır. Hormonla bağlandığında ise, bu ilgi artmakta ve kromatin üzerindeki özel bölgeler etkilenerek histon asetilasyonu gerçekleşmektedir. Böylece DNA aktivasyonu (gen ekspresyonu) sağlanmaktadır. Sonuçta yeni proteinler sentezlenmekte ve bunlar da hormona özgül hücrel tepkileri oluşturmaktadır (39). Steroid ve tiroid hormon reseptörlerinin yapıları benzerdir. Bundan dolayı bu reseptörler ortak bir reseptör ailesine aittir (40). Her iki reseptörün de bir hormon bağlanma ve bir DNA bağlanma bölgeleri vardır. Hormon-reseptör kompleksi, hedef DNA üzerinde özgül motif bulunduran *promoter* olarak adlandırılan hormona duyarlı bölgeye bağlandığında, gen ekspresyonunun aktivasyonu sağlanır (39-40).

Steroid hormon reseptörlerinin DNA’ya bağlanan bölgeleri sisteyince zengin, “Çinko-Parmak” yapısındadır. Bölgede iki yerde sisteinler, çinko atomuna tetrahedral biçimde bağlanarak “parmak” olarak adlandırılan iki çıkıntı oluştururlar. Bu çıkıntılardan birincisi daha hidrofilik olup, az sayıda bazik amino asit içerir. İkinci çıkıntı ise, oldukça baziktir ve çok sayıda lizin ve arjinin amino asiti taşır. Bu bölgelerin yapısı bozulacak olursa reseptör DNA’ya bağlanamaz. DNA’ya bağlanan bölgenin böylesine korunmuş olmasına karşın, amino ucu değiştirilmiş olan mutant reseptörler hormonu bağlayabilseler bile normal aktivite gösteremezler (39-40).

Steroid fonksiyonları hücre zarı, sitoplazma ve çekirdek olacak şekilde üç farklı hücrel düzeyde etki göstermektedir (Şekil 2.2). Membran hedefli steroid reseptörleri, çekirdek reseptör benzeri olup buna karşın klasik steroid

reseptörlerinden farklı olarak ligand ve voltaj aktive edici iyon kanallarında bulunan reseptörlerdir. Bu reseptörlerin aktivasyonu ile sinyal tetiklenerek farklı protein kinazların aktivasyonu sağlanmaktadır. Sitoplazma hedefli reseptörler “*translocating*” reseptörlerdir ve bunlar *Src-PI3K-Akt/Src-Ras-ERK* sinyal iletim yollarının aktivasyonunda önemlidirler. Çekirdek reseptörleri ise, DNA üzerindeki “*hormone response elements*” (*HRE*) ya da transkripsiyon faktörleri ile kompleks oluşturarak doğrudan gen ekspresyonu üzerinde etkili olurlar (41).



Şekil 2.2. Steroidlerin hücresel düzeydeki işlevleri (41).

Hacettepe Üniversitesi Pediatrik Hematoloji Ünitesi'nde, 1988 yılından beri devam eden klinik çalışmalarda yüksek doz metilprednizolon (20-30 mg/kg/gün) tedavisinin önemli antilösemik etkisi yanında, APL (M3) ve diğer AML alt gruplarında (AML-M1, -M2, -M4, -M6 ve -M7) lösemik hücreyi *in vivo* olarak farklılaştırdığı ve apoptotik hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir (42-50). Ayrıca yüksek doz steroid, CD34+ hücre artışını da uyarmaktadır (51-53). Bundan

başka yüksek doz steroidin, AML kemoterapi protokollerine ilavesi ile AML’li çocukların remisyona giriş yüzdesi arttığı gibi remisyonda kalış sürelerinin uzadığı da rapor edilmiştir (46, 53-54).

Metilprednizolon (MP)’un, in-vitro düşük (10^{-6} M) ve yüksek (10^{-3} M) derişimlerinde insan miyeloid lösemi hücrelerinde farklılaşma ve apoptotik hücre ölümüne yol açtığı gösterilmiştir (55). Ancak yüksek doz MP (10^{-3} M)’nin, in-vitro çalışmalarda daha fazla farklılaşma ve apoptotik hücreye neden olduğunun gösterilmesi yüksek dozun klinik etkisine işaret etmektedir (55).

Steroid dışında uygulanan klinik çalışmalarda ise, *ATRA* (56-62), *ATO* (63-64), *Vitamin-D₃* (65-68), *Vincristin* (69), *Pycnogenol* (70), *5’-aza cytidine*(71-72) ve *HDAC inhibitörleri* (73-74) bildirilmektedir.

2.4. Apoptoz

Yunancada “*yaprak dökümü*”, “*ayrı düşme*” ya da “*sonbahar*” gibi anlamlara gelen apoptoz ile ilgili ilk bilgiler, Kerr tarafından 1971’de *Journal of Pathology*’de *Shrinkage Necrosis* başlıklı makalesiyle sağlanmıştır (75). Yaşayan her hücre yaşam ve ölüm için programlanmıştır. Bu olay genetik bir program içinde işler. Yaşlanan, işlevlerini yitiren, gelişmesi bozulan, fazla üretilen ve DNA’sında hasar taşıyan hücreler, güvenli bir şekilde yok edilirler. (76). Hücreler ölüme giderken genelde iki yoldan birini kullanırlar. Hasar verici ajanlarla öldürülürler ya da intihara indüklenirler. Hasar nedeniyle ölen hücreler, mekanik hasarlar veya toksik ajanlar nedeniyle ölürler. Plazma membranları iyon ve su geçiş kontrolünü yitirdiğinden hücreler şişerler. Hücre içerikleri değiştiğinden dolayı çevre dokularda inflamasyon oluşur (77).

İntiharla ölen hücrelerde büzülme, hücre yüzeylerinde baloncuk benzeri yapılar, kromatin degradasyonu, parçalanmış membran yapıları, fosfatidil serinlerin membran yüzeyine çıkması, apoptotik cisimcikler olarak adlandırılan hücre

elamanlarının oluşması gibi olaylar meydana gelir. Makrofaj ve dendritik hücrelerin üzerindeki reseptörler aracılığıyla bu hücre parçaları yok edilir. Fagositik hücreler aynı zamanda inflamasyonu inhibe eden sitokinleri de salgılayıp çevre dokuların enflamasyonunu da ortadan kaldırır. Önce lökale daha sonra sistemik giden bu olay “*Programlı Hücre Ölümü*”(apoptoz) olarak adlandırılır (77 ve 78).

Apoptozun iki nedeni vardır:

1. Doğru gelişim için; Örneğin, tadpollerin kuyruklarını apoptozla kaybederek arka ayakların metamorfozu, fötüsteki el ve ayak parmakları arasındaki dokuların apoptozla yok olması, menstruasyon başlangıcında uterus iç duvarının atılması, kastrasyon sonucu prostat atrofisi, beyinde nöronlar arası haberleşme için fazlalık hücrelerin eliminasyonu apoptozla olur.
2. Organizmayı tehdit eden yabancı ajanları bulunduran hücrelerin yok edilmesi için; Örneğin, virüslerle enfekte hücreler, otoimmün hastalıklara yol açan immün sistem hücreleri, DNA hasarlı hücreler, kanser hücreleri apoptozla yok olurlar.

2.4.1. Apoptoz Mekanizmaları

Pozitif ve negatif sinyaller arasındaki dengenin bozulması hücrelerin apoptoza gitmesine neden olur. Pozitif sinyaller hücrelerin yaşamı için gerekli olan büyüme faktörleri, sitokinler gibi moleküllerdir. Negatif sinyaller ise kimyasal ve fiziksel etkilere maruz kaldıklarında hücrelerin salgıladığı TNF ve Fas-Ligand gibi ölümü aktive edici moleküllerdir (77).

Hücrelerin ölümü seçmesinde iki farklı tetikleyici mekanizma rol oynar:

Apoptozda hücre içi sinyallerle tetiklenme: Sağlıklı hücrelerin mitokondri dış zarlarında *Bcl-2* eksprese edilir ve *Apaf-1* (*apoptotic protease activating factor*) molekülüne bağlanır. Hücre içinde bir hasar oluştuğunda *Bcl-2*, *Apaf-1* molekülünü

serbest bırakır. Bcl-2 ile ilişkili bir protein olan *Bax*, mitokondri membranlarından girer ve *sitokrom c'nin* salınımı sağlar. *Sitokrom c* nin salınımı ve *Apaf-1*'in *Kaspaz-9* molekülü ile bağlanmasıyla sitoplazmada bir “*Apoptozom Kompleksi*” oluşur ve bu iş için ATP enerjisi harcanır. Kaspaz-9, bir düzine kaspaz ailesinden biridir. Kaspazların hepsi bir çeşit proteazdır. Adlarını da, proteinleri *kasmeleri* (*cleavage-C*) ve yapılarında *aspartik asit* (asp) taşımalarından dolayı almışlardır. Kaspaz-9 proteinleri keser ve diğer kaspazları aktive eder. Kaspazların ard arda aktive olmalarıyla diğer proteolitik aktiviteye sahip yolaklar da aktive olacağından, sitoplazmik proteinler ve kromozomal DNA yıkılır. Daha sonra bu hücre artıkları ve apoptotik hücreler fagositozla ortamdan uzaklaştırılır (79-80).

Apoptozda hücre dışı sinyallerle tetiklenme (Ölüm Reseptör Yolu): Fas ve TNF reseptörleri hücre yüzeylerindeki zar içi proteinlerdir. Fas-Ligand ve TNF gibi ölüm aktivatörlerinin bağlanması ile sinyal sitoplazmaya iletilir ve kaspaz 8 aktive olur. Aynı kaspaz-9 gibi kaspaz-8 de diğer yolakları aktive ederek hücrelerin fagositozunu sağlar (81-83). Ölüm reseptör yolunda görevli olan diğer bir faktör de mitokondri içmembran boşluklarında yer alan bir protein olan apoptoz indükleyici faktör (AIF) dır. AIF, hücre ölüm sinyallerini aldığımda mitokondriden salınır. Çekirdeğe göç eder ve DNA'ya bağlanarak DNA'nın yıkımı ve dolayısıyla hücrenin parçalanıp ölmesine neden olur (79-80).

2.4.2. Apoptoz ve Kanser İlişkisi

Apoptoz ve kanser arasında ters orantılı bir ilişki vardır. Apoptoz kanser hücrelerinin zararına ve organizmanın yararına çalışır. Bir hücrenin DNA'sında oluşan hasar, tamir mekanizmaları ile düzeltilemezse, bu hücre güvenli bir şekilde genetik kontrol mekanizmalarının öncülüğünde yok edilir (84-85). Fakat, genetik kontrol mekanizmalarını oluşturan proteinlerde (özellikle *p53*, *Rb* gibi hücrelerin tamir ve ölüm programlarını yöneten) bir hasar sözkonusu ise, hücre apoptoza gidemez ve hasarlı bir şekilde bölünür. Aşırı bölünen bu hücreler neoplazik oluşumun başlangıcını tetikler ve kanser başlar. Kanser hücreleri, apoptoz karşıtı

olan *bcl-2*, *c-myc* gibi sağkalım genlerini aşırı derecede eksprese ederek ölümden sorumlu genleri baskırlar (86-88). *Survivin* ve *bcl-2* proteinlerinin aşırı ekspresyonları tümör prognozu ile ilişkilendirilmiştir. *Survivin*'in aşırı ekspresyon düzeyleri nöroblastom ve kolon kanserlerinde ileri evre ve kötü prognozla ilişkilidir (89). Bazı B hücre lösemileri ve lenfomaları, prostat tümörleri ve nöroblastomlarda Bcl-2 proteinini aşırı düzeyde eksprese ederler. Alınması gereken ölüm sinyalleri de böylece önlenir. Çoğunlukla Bcl-2 geni immunoglobulinin ağır zincir bölgesinin enhancer kısmına birleşir ve t(14;18) translokasyonunu meydana getirir (77 ve 90).

Melanoma hücreleri de *Apaf-1* geninin ekspresyonunu inhibe ederek apoptozdan kaçarlara (91). Akciğer ve kolon kanser hücreleri ortama çok fazla Fas-liganda bağlanan çözünür “*decoy*” moleküller salgılar ve Fas-ligandın Fas proteinine bağlanması engellenmiş olur. Böylece, sitotoksik T-hücreleri kanser hücrelerini öldüremezler (77 ve 92). AML hücrelerinde *bcl-2* proteini *c-myc* ile birlikte aşırı artar ve apoptoz oluşumunu önleyerek aşırı hücre çoğalmasını tetikler. Aşırı *bcl-2* artışı kemoterapiye de direnç göstermekte, lösemik hücrelerin ölümünü engellemektedir (93-94).

Steroid, glukortikoid (GC) reseptörleri aracılığıyla çekirdek içine girerek ölüm ve farklılaşma mekanizmalarını düzenleyen genlerin aktivasyonunda rol almaktadır. Özellikle bu mekanizmaların düzenlenmesinde calcineurinin anahtar bir rol oynadığı bildirilmiştir (63).

2.4.3. Apoptozun Tespiti

Mikroskopik İnceleme : Apoptozun morfolojik değerlendirilmesi açısından, hücreler değişik sitoplazmik ve çekirdek boyaları ile boyanıp ışık, flöresan veya elektron mikroskop yöntemleriyle incelenir.

Akım Sitometrik Analiz: Flöresan antikorlar ile işaretlenen apoptotik hücrelerdeki flöresanın elektronik bir lazer okuyucu sistem ile yakalanarak

değerlendirilmesidir. Akım sitometre ile apoptotik hücrede hipodiploit pik ve anneksin gibi boyalarla işaretleme yapılarak apoptoz ölçülebilmektedir.

DNA elektroforezi ile Tespit: Apoptotik hücrelerden elde edilen DNA'nın jel elektroforezinde 25 Volt dirençte 3 saat yürütülmesi sonucu oluşan 300-50 bç veya 180 bç arasında değişik bölgelerinden kırılmış parçalara ayrılmış bandlarının UV altında görüntülenmesidir.

2.5. Hücre Farklılaşması

Farklılaşma, hücrenin bir formdan, yapı ve işlevsel özelliklerini değiştirerek daha özel bir forma dönüşümüdür (95). Bu olay canlılığın başlangıcı ile başlar ve canlılığın yararına veya zararına olacak şekilde devam eder (96). Canlıların gelişim basamaklarında devamlı bir farklılaşma görülür ve bu işlemler farklılaşma genlerinin durumuna göre oluşurlar (97-98). Farklılaşma genleri en az iki tip gen seti tarafından kontrol edilirler. *Farklılaşmayı baskılayan genler ve tümörü baskılayan genler* ki bunlar birbirleriyle zıt fonksiyonludurlar. Örneğin, farklılaşmayı baskılayan genlerin aktif durumda olması ve tümörü baskılayan genlerin inaktif durumda olması, farklılaşma geninin ekspresyonunu azaltır ve tümör oluşumunu uyarır (98). Tümör hücreleri, farklılaşma genlerinde mutasyon yoksa, uygun ajanlarla terminal farklılaşmaya indüklenebilirler. Fakat bu genlerde bir mutasyon varsa terminal farklılaşmaya direnç kazanarak aşırı çoğalmaya giderler (97-98).

2.5.1. Hematopoetik Sistemin Farklılaşması

Hematopoez, kemik iliğinde bulunan öncül kök hücrenin çok basamaklı yollar ile fonksiyonel kan hücrelerine kadar farklılaşmasını sağlayan karmaşık bir işlemdir. Bu olay, çeşitli transkripsiyon faktörlerinin ekspresyon düzeyleri, büyüme faktörleri ve reseptörleri, sitokinler, enzimler ve henüz aydınlatılmamış moleküller arasındaki ilişkileri düzenleyen kontrollü bir işlemdir (99).

Hematopoetik hücrelerin farklılaşmasında transkripsiyon faktörlerinin ve bunlarla ilintili olarak sinyal iletim yollarının önemi büyüktür. Çok karmaşık

olarak görünseler de son derece düzenli çalışırlar. Bu yolaklarda bir sapma olması malignitelere neden olur. AML'de, WT1, AML1/ETO, C-myc, MLL/ELL, CBP/p300, C-myc önemli olan belli başlı transkripsiyon faktörleridir. WT1 geni, lösemik hücrelerde onkogen olarak rol oynamaktadır. Bir çok AML hastasının rölaps durumunda aşırı artmış görülür (96 ve 99). AML1/ETO, kromozom 21q22 de yer alan AML1 geninin mutasyonları sonucu oluşan bir füzyon proteindir ve her iki akut lösemide de normal farklılaşmayı baskılamaktadır (100-101). Cmyb, AML'de ekspresyonu arttığında lösemi oluşumunda önemli rol oynamaktadır. SiklinA1 hücre döngüsünün düzenlenmesinde, hücre çoğalmasında ve farklılaşma basamaklarında etkilidir (100-101). MLL/ELL, kromozom 19p13.1 üzerindeki ELL geni ile kromozom 11q23 MLL geninin translokasyonu ile oluşan bir füzyon proteindir ve lösemik fenotipin oluşmasında rol oynamaktadır (100-101). CBP/p300, bir çok hücrenin farklılaşmasında ve sinyal ileti yolaklarında önemli rol oynamaktadır. Her ikisi de tümör baskılayıcı proteindir. Bu iki gendeki değişimler lösemik oluşumları tetiklemektedir (100-102). C-myc, aşırı eksprese olduğunda hücre çoğalmasıyla ve farklılaşmanın engellenmesi ile ilişkilidir. Onkojenik potansiyele sahiptir. Kromozomal translokasyon, retroviral insersiyon ya da gen amplifikasyonu ile aktive olmaktadır. Hücre çoğalması ve lösemi gelişiminde rol oynar (100-101). Kan hücrelerinin farklılaşmasında çok karmaşık yolaklar olsa da iki yolak çok önemlidir. Bunlar: Ras –MAPK ve Jak-Stat yolaklarıdır.

Ras-MAPK yolağı: Bu yolak, hematopoetik hücrelerde, yaşamsal, çoğalma ve farklılaşmada sitokin sinyallerinin iletiminde önemli bir işleve sahiptir. GTP bağlı Ras'ın aktif formu birçok alt sinyal yolaklarında hedef proteine bağlanır. Birçok reseptör, Ras efektorü olarak bilinir. PI₃-Kinaz, P120 Ras-GAP, serin/treonin-kinaz ve Raf önemli reseptörlerdendir. Raf, GTP bağlı Ras'ın aktif formuna bağlanır ve sitoplazmadan hücre zarına gider. Sitokin reseptörlerinin varlığında Jak-2 ve src-kinaz ailesinin bir üyesi Raf'ın tirozin fosforilasyonunu sağlayarak MAPK'ları aktive eder. MAP-Kinaz ERK'leri aktive eder, ERK'ler çekirdeğe girer ve hedef genlerin aktivasyonunu sağlar (103 ve 104).

Jak-Stat yolağı: Stat ve jak faktörleri bu yolağın önemli molekülleridir. Bazı sitokin reseptörleri tirozin kinazları aktive ederler. Tirozin kinaz aktivasyonu ile Jak molekülleri sitokin reseptörleri ile birleşerek Stat moleküllerini fosforile ederler.

Fosforile olan Statlar çoğunlukla dimer oluşturarak çekirdeğe yönelir ve özgül DNA bölgelerine bağlanarak farklılaşmayla ilgili genlerin aktivasyonunu sağlarlar (103, 105-106).

Steroid lösemik hücrelerin farklılaşmasını sağlarken glukokortikoid reseptörlerinin etkisiyle, serin/treonin fosfataz olarak bilinen PP1 ve PP2A proteinlerini fosfarilliyerek sinyal iletimini sağlamaktadır. Böylece farklılaşma mekanizmasındaki genlerin düzenlenmesini sağlamaktadır (63).

2.5.2. Hücre Yüzey Belirleyicileri

Hücreler yüzeylerindeki glikoprotein yapıdaki reseptörler sayesinde birbirlerinden ayırt edilmektedirler. Monoklonal antikorların gelişmesiyle, hücre yüzey molekülleri antijen olarak tanımlanmakta ve farklı tipteki hücrelerin ayırımı yapılabilmektedir. Hücre yüzeyindeki bu antijenik yapılar CD (*Cluster of Differentiation*) farklılaşma kümeleri olarak adlandırılmaktadır. Sayıları günümüzde 250 ye ulaşan CD yüzey antijenlerinin, lösemi ve lenfoma immunfenotiplemesinde, hematolojik tümörlerin belirlenmesinde, otoimmün hastalıkların tanısında ve kemoterapötik gözlemlene aşamalarında kullanılmasında bir çok yararları bulunmaktadır (107-108).

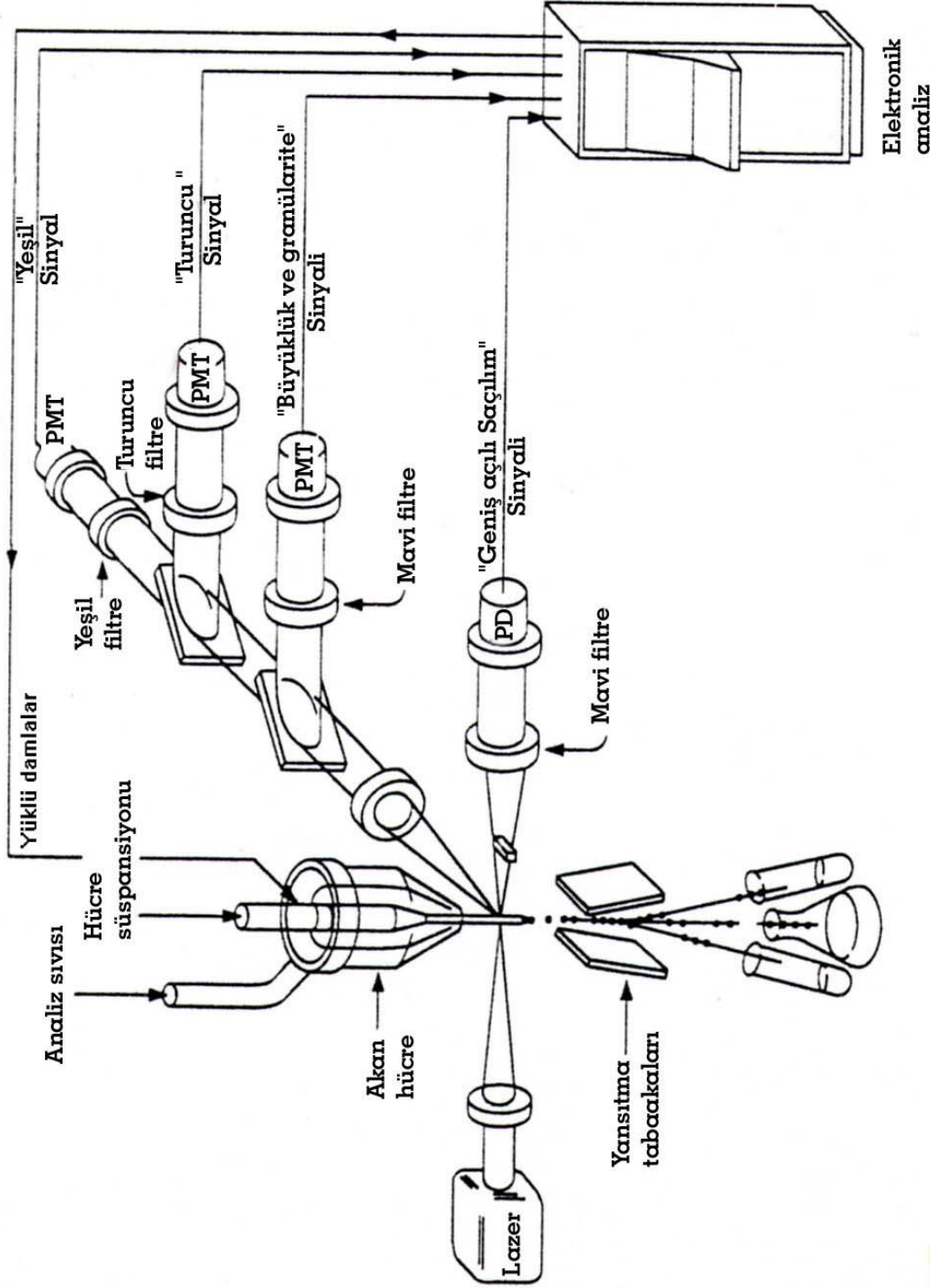
2.6. Akım Sitometre

Akım sitometre, bir kanalda hareket eden çok sayıda hücrenin büyüklük, granül içeriğini ve aldığı flöresan yoğunluğunu çok hızlı bir şekilde nitel ve nicel olarak ölçen elektronik bir sistemdir (109). Hücreler akım sitometrede ölçüm öncesi flöresan işaretli moleküller ile boyanırlar ve “Fosfat Tampon Çözeltisi” (PBS) gibi bir sıvı içerisinde cihaza okutulur. Bu flöresan moleküller lazer ışını absorbe ederek uzun dalga boyunda ışın saçarlar. Saçılan ışınlar değişik ayna ve filtre sistemlerinin yardımıyla detektörlerle toplanır ve optik sinyaller alınır. Bu optik sinyaller

elektronik sinyallere dönüştürülerek bilgisayara aktarılır ve değişik hücrelerin sayısal analizi yapılır (110).

Akım sitometre ile ilgili ilk bilgiler, 1934’de Kanada Montreal’den Andrew Moldavan tarafından geliştirilen ilkel bir cihaza dayanır(110). Los Alamos laboratuvarlarından Mack Fulwyler, 1949’da eritrositleri ayırarak ilk hücre ayırıcı (*sorter*) cihazını, geliştirdi (110). 1969’da Dittrich ve Göhde, hücrelerin flöresan yoğunluklarının histogramlarını geliştirdiler. 1975’de ise yaptıkları çalışmalardan dolayı Nobel alan Kohler ve Milstein’in akım sitometreden ayrı olarak monoklonal antikor teknolojisini geliştirmeleri, hücrelere özel monoklonal antikorların akım sitometrede kullanımını ve hızlı gelişimini sağladı. Günümüzde ise elektronik ve flöresan teknolojisindeki gelişmelerle, masa üstü akım sitometreler ve *Sorting* yapan iki ana tip akım sitometre cihazı geliştirildi (110-112).

Akım sitometre, akım sistemi, lazer ışık kaynakları, optik, elektronik ve bilgisayar sistemi olmak üzere dört bileşenden oluşur. Akım sistemi, örnek sıvının “*hidrodinamik odaklama*” ilkesine göre aktığı sistemdir. Bu sistem ile hücreler akım odası denilen ana kısma gelirler ve burada lazer ışını ile karşılaşır. Lazerler tek renkli ışık kaynaklarıdır. Akım sitometrede en çok kullanılan lazer ışık kaynağı “*Argon ion lazer*” dir. Bunlar, 488 nm dalga boyunda ışın yayar ve birçok florokrom tarafından emilir. Optik filtreler, belirli dalga boyundaki ışınların geçmesini sağlarken, belirli dalga boyunun altındaki ya da üstündekilerin geçmesini engellerler. *Dichroic filtre* ve *Band-pass filtre* olmak üzere iki tip filtre vardır. *Dichroic filtreler*, kısa dalga boyundaki ışınları ayırıp, uygun *dedektöre* gönderirken, daha uzun dalga boyundakilerin geçmesine izin verirler. *Band-pass filtreler*, spesifik dalga boyundaki ışınların geçmesini sağlarlar. Elektronik sistemde, her hücreden saçılan ışınların sinyalleri elektronik voltaj atımlarına çevrilir ve her sinyalin yükseklik, alan, genişlik boyutları depo edilen dijital sinyallere dönüştürülür. Bilgisayar sisteminde, optik ve elektronik sistemce saçılan ışınlar ve flöresan, elektrik sinyallere çevrilir ve bu bilgi dijital bilgiye çevrilerek bilgisayarda analiz edilmek üzere depolanır (110-113).



Şekil 2.3. Akım Sitometre cihazının işleyiş şeması (110).

Günümüzde, akım sitometre birçok tıp alanında rutin olarak kullanılmaktadır. Hematolojide, lösemi-lenfoma immünofenotiplemesinde, hematopoetik progenitor hücre analizinde, DNA-hücre döngüsü analizinde, hücre yüzey belirleyicisi analizinde, apoptozun ve nekrozun belirlenmesinde, proliferasyon belirleyici analizinde kullanılır (111-113).

2.7. Hücre Kültürü

Hücre kültürü, bir organ veya dokudan alınan belirli bir grup hücrenin, uygun fizikokimyasal ve biyolojik işlemler sonucu *in-vitro* koşullarda üretilmesi tekniğidir. Hücre kültürü ile ilgili çalışmalar 1907 yılında Ross Harrison'un kurbağa embriyolarında yapmış olduğu çalışmalara dayanır (114). İlerleyen yıllarda uygun kültür besi ortamlarının geliştirilmesi ve besi ortamının içine antibiyotik eklenmesi kontaminasyon sorununu çözmüş ve bu teknolojinin, hastalıkların patogenezinin araştırılmasında, ilaç denemelerinin ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde birinci basamak çalışma içine girmesinin yolunu açmıştır (114). Günümüzde yapılan biyomedikal araştırmalarda primer kültür ya da hücre hattı olarak, çalışmaların ilk fazını oluşturur. Primer kültürler sınırlı pasaj kapasitesinden dolayı fazla uzun yaşatılamazlar ancak, hücre hatlarının sınırsız pasaj yeteneğine sahip olduklarından dolayı çok uzun süre (hatta sonsuz) kullanma avantajı vardır (114). Hücre hatları bir organ veya dokuya özgül hücrelerin kuvvetli bir virus antijeninin promoteri ile immortalizasyon işlemlerinden geçtikten sonra oluşan ve sürekli bölünme yeteneği olan ölümsüz hücrelerdir (114).

Hücre hatları genel olarak süspansiyon ve monolayer kültürler olarak iki grupta toplanırlar. Süspansiyon kültürler daha çok kan ve kemik iliği gibi yumuşak doku tümörlerinin hücre hatlarını oluştururlar ve bu hücreler, içinde buldukları kaba yapışmazlar. Monolayer kültürler ise fibroblast, epitel, sinir doku gibi tümörlerin hücre hatlarıdır ve içinde buldukları kaba yapışlırlar (114).

Hücreler geldikleri kökene göre farklı zamanlarda bölünürler. Bundan dolayı kültür besi ortamı, beslenme, üreme ve yaşam ortamı gibi şartlar hücreden hücreye değişiklik gösterir(114).

HL-60 Hücre Hattı (ATCC): Ulusal Kanser Enstitüsü'nden Steven J. Collins ve ekibi 1977 yılında ilk kez Beyaz ırktan, 36 yaşındaki AML hastası bir kadının periferik beyaz kan hücrelerinden HL-60 hücre hatlarını geliştirdiler. Bu hücre hattı insan miyeloid lösemik hücrelerinin ilk uzun süreli pasajlanabilir süspansiyon hücre kültürüdür, *malign* hücrelerin özelliklerini gösterir ve onkogenleri eksprese eder (115). Kültür içindeki hücreler oval ve yuvarlak görünümlüdürler, nadiren *pseudopod* bulundurduklarından heterojendirler. Büyüklükleri 9-25 µm arasında değişir. Geniş bir çekirdeğe sahip olmasına rağmen nadiren de olsa 2-4 çekirdekli, net kromatin görünümlü yapısı vardır. Sitoplazmaları azurofilik granüllerden dolayı bazofilik yapıya sahiptir. In-vivo granüositlerin bir özelliği olan PAS (Periodik Asit-Schiff) ve asit fosfataz ile pozitif boyanırlar ama netrofilik granüosit ve monositlerin özelliği olan alkalın fosfataz ve α-Naftol AS-D asetat (nonspesifik) esterazları eksprese etmezler (115)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada, insan akut miyeloblastik lösemiye özgül, Amerikan Doku Kültür Koleksiyonu (ATCC)'ndan sağlanan HL-60 hücre hattı kullanıldı. Bu hücrelere belirli dozlarda uygulanan steroid öncesi ve sonrası, sitotoksiteyi göstermek için “*Tyripan Blue Exclusion*” yöntemi ile canlılık deneyi, erken ve geç apoptozisi göstermek için *Annexin-V FITC* (Fleuroscein Iso-Thio Cyanate) kiti ile boyama ve farklılaşmayı göstermek için AML panelinde önemli olan monositik ve granülositik hücre yüzey belirleyicileri (CD11b, CD14, ve CD15) ile akım sitometrik çalışmalar yapıldı.

3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler

3.1.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Kimyasallar

RPMI-1640 hücre besi yeri ortamı (Sigma R-8758)

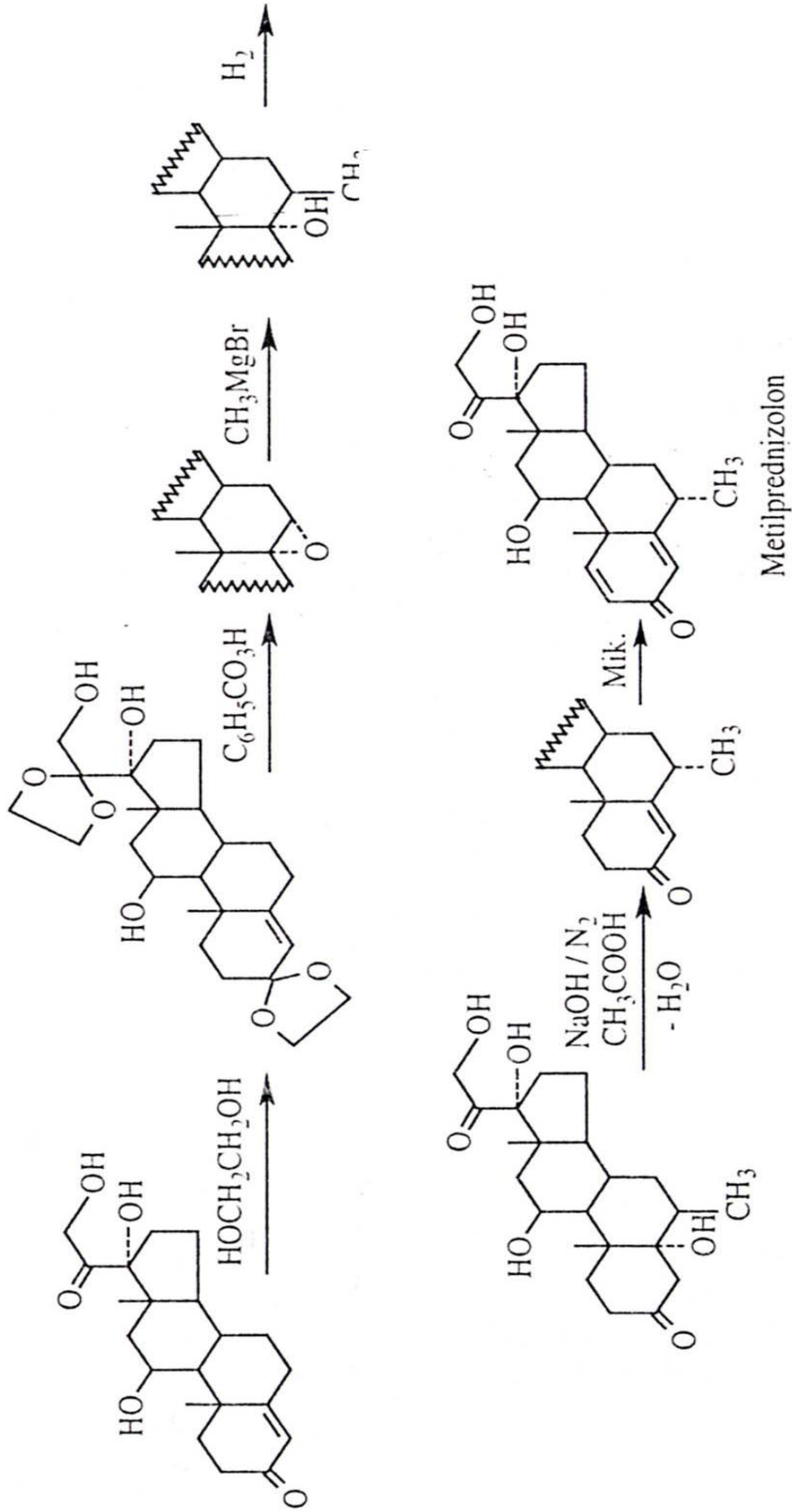
Fötal dana serumu (BIOCHROM AG S0113)

L-Glutamin (BIOCHROM AG 25030-032)

Penisilin/Streptomisin (10.000U/10.000 µg/ml) (BIOCHROM AG A2213)

3.1.2. İlaç ve Sitotoksite Deneyinde Kullanılan Kimyasallar

Metilprednizolon (*6α-Metil-11β,17α,21-trihidroksipregna-1,4-dien-3,20-dion*): Metilprednizolon doğrudan doğruya ve asetat esteri halinde kullanılan bir ilaçtır. Hiroksikortizondan başlanarak elde edilir. Reaksiyonun ilk aşamasında perbenzoik asitle 5,6-epoksit yapısı oluşturulup, metilmagnezyum bromür katımı ile 6 numaralı konuma metil grubu bağlanır. Daha sonra asitli ortamda, ısı karşısında bu grubun epimerizasyonu ile β konumuna dönüşmesi ve su çıkışı ile de 4-5 çifte bağının oluşması sağlanır. Sentezin son aşamasında *Septomyxa affinis* ile enzimatik dehidrojenasyon yapılarak 1-2 çifte bağı oluşturulur. Tedavide doğrudan doğruya ve asetil esteri halinde kullanılır. Asetil esteri, asetik anhidrit ya da pridinli ortamda asetil klorür ile açillenerek hazırlanır (116).



Şekil 3.1. Metilprednizolonun kimyasal tepkimeler ile oluşumu (116).

Metilprednizolonun etkisi prednizolona benzer; ancak antiinflamatuvar etkisi biraz daha yüksek, sodyum tutma özelliği biraz daha azdır. Çeşitli enflamasyonlu ve allerjik hastalıkların tedavisinde kullanılır (116).

6 α -Metilprednisolon (Sigma M-0639)

Kimyasal Formülü: C₂₂H₃₀O₅

Moleküler Ağırlık: 374.5gr

HL60 hücrelerine uygulanan ilaç derişimlerinin hazırlanışı:

10⁻³M için: 0.375 mg/1ml (Ara stok)

10⁻²M için: 3.75 mg/1ml (Ara stok)

10⁻¹M için: 37.5 mg/1ml (Stok)

Di Metil Sülfoksit (DMSO) (Sigma D2650)

Tiripan Mavi Boyası (Appli Chem A0668, 0025)

3.1.3. Apoptoz Deneyinde Kullanılan Kimyasallar

Anneksin-V FITC Apoptoz Tespit Kiti I (BD Pharmingen 556547)

Kit İçeriği: Anneksin-V FITC

Bağlanma Çözeltisi (10x)

Propidyum İyodid

PBS Tablet (AMRESCO E404-100 TABS)

3.1.4. DNA izolasyonunda Kullanılan Kimyasallar

EZ-RNA kit (Biological Industries 20-400-100)

Kit İçeriği: A:Denatürasyon çözeltisi

B:Ekstraksiyon ve Faz Ayrıştırması çözeltisi

Etanol (Merck)

%75 lik Etanol

0.1 M Sodyum Sitrat

8 mM Sodyum Hidroksit

1 M HEPES (Sigma H0887)

3.1.5. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Kimyasallar

Agaroz (Sigma A4718)

Etidiyum Bromür (Sigma E 8751)

Yükleme Boyası

Tris-EDTA-Asetat (TEA)

50 bp DNA ladder (Fermentas SM0371)

3.1.6. Farklılaşma Deneyinde Kullanılan CD Hücre YüzeyBelirleyicileri

Mouse antiHuman IgG1 FITC (BD-Pharmingen Cat No: 550616)

Mouse antiHuman IgG2a PE (BD-Pharmingen Cat No: 553457)

Mouse antiHuman CD11b PI (BD-Pharmingen Cat No: 552850)

Mouse antiHuman IgG1 PE (BD-Pharmingen Cat No: 555388)

Mouse antiHuman CD15 FITC (BD-Pharmingen Cat No: 332778)

Mouse antiHuman IgM FITC (BD-Pharmingen Cat No: 550883)

Mouse antiHuman CD14 (BD-Pharmingen Cat No: 553739)

Mouse antiHuman IgG2a FITC (BD-Pharmingen Cat No: 553456)

3.1.7. *Wright* Boyama Deneyinde Kullanılan Kimyasallar

Wright Boyası (Sigma W.0625)

Metanol (Merck K 3226 1308.330)

Gliserin (Sigma G 2289)

3.1.8. Kullanılan Çözeltilerin İçerikleri

Phosphate Buffer Saline (PBS) (pH 7.4): NaCl (Carlo Erba):140 mM

KCl (Carlo Eba) : 3 mM

KH₂PO₄ (Merck) : 0.9 mM

NaHPO₄ (Merck) : 6.4 mM

Hücre Dondurma Vasatı: RPMI-1640: %70

FBS: %20

DMSO: %10

Tiripan Mavi Boyası: %0.4'lük Tripan Mavisi (PBS ile sulandırılmış)

Tris-EDTA-Asetat (TEA) (pH:8.0) : Tris bazı (Merck): 2 M

Na₂EDTA (Merck): 0.5 M

Glasiyel asetik asit (Merck):

1.14 ml

Jel Yükleme Boyası: Gliserol (Merck) : 5.5 ml

1xTEA tamponu (Merck) : 5.5 ml

Orange G boya (Merck): 0.01 gr

Etidyum bromür: 10 mg/ml distile su

Moleküler ağırlık belirleyicisi: Gene Ruler™ 50 bp DNA Ladder
(1031, 900, 800, 700, 600, 500,
400, 300, 250, 200, 150, 100, 50
baz çifti)

0.1 M Sodyum Sitrat (%10 etanol içinde) : Tri sodyum sitrat : 3.57gr
Etanol : 10 ml
Distile su ile 100 ml'ye
tamamlanır.

%75 lik Etanol (100 ml lik çözelti için): 75 ml Saf Etanol
25 ml distile su

Wright Boyası: 1 gr *Wright* Boyası (Sigma W.0625)
395 ml Metanol (Merck K 3226 1308.330)
1ml Gliserin (Sigma)
Filtre kağıdı ile süzülüp bir gün bekletildikten
sonra kullanıma hazır hale getiriliyor.

3.2. Yöntem

Bu araştırmada kullanılan yöntemler aşağıda sıralanmıştır.

- 10^{-3} M- 10^{-6} M derişimler arasında metilprednizolon uygulaması yapılması için HL-60 hücreleri laboratuvar şartlarında çoğaltıldı.
- Metilprednizolonun sitotoksik etkisi için *Tripan mavisi boyama* yöntemi kullanılarak HL60 hücrelerinin canlılık testi yapıldı.
- HL-60 hücrelerinin apoptozu göstermek için, *anneksin V boyama* tekniği kullanıldı.
- HL-60 hücrelerinde metilprednizolonun monositik ve granülositik farklılaşma üzerindeki etkisini test etmek için, farklılaşmaya özgül CD

hücre yüzeyi belirleyicileri (CD11b, CD14 ve CD15) kullanılarak akım sitometrede inceleme çalışmaları yapıldı.

- HL60 hücrelerinin apoptoz ve farklılaşmasının morfolojik gösterimi için *Wright* boyama yapıldı.
- HL-60 hücrelerine steroid uygulamasının, farklılaşma ve apoptozis üzerine etkilerini gösteren verilerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi için iki veya daha fazla grubun karşılaştırılmasına yarayan *Kolmogrov Smirnov* ve *Kruskal Wallis* Non-Parametrik Testleri kullanıldı.

3.2.1. Hücre Kültürü

Bu araştırmada kullanılan HL-60 hücreleri hücre kültüründe çoğaltılarak laboratuvar şartlarımıza uyumu sağlandı. Çalışma öncesi yapılan etkin ve toksik olmayan dozun belirlenmesi sonucunda bu hücreler üzerine metilprednisolonun, sitotoksite ve apoptoz için 10^{-4} M, 5×10^{-4} M ve 10^{-3} M, farklılaşma için 10^{-6} M, 10^{-5} M ve 10^{-4} M derişimleri uygulandı. Bu ilacın apoptozis ve farklılaşma üzerindeki etkileri akım sitometri cihazında değerlendirilerek analiz edildi.

Hücrelerin Besiyeri Ortamı:

RPMI-1640 besi yeri ortamı	100ml
Fötal dana serumu	15%
Penisilin	10.000U/ml
Streptomisin	10mg/ml
Amfoterisin-B	0.025mg/ml
L-Glutamin	0.3g/L (1%)

Hücrelerin Fiziksel Ortam Şartları:

Sıcaklık	37°C
pH	7.0-7.4
CO ₂ %	5%

Hücrelerin Bölünme ve Pasaj Zamanları:

HL-60 : 36-48 saatte bir hücre bölünmesi, 1:3 pasaj 2 günde bir,

Üreme Ortamı:

T3 (25ml) ve T4 (75ml) ortam kapları,

4, 6 ve 24 kuyucuklu ortam kapları

9cm² plastik petri kapları

Dondurma Koşulları:

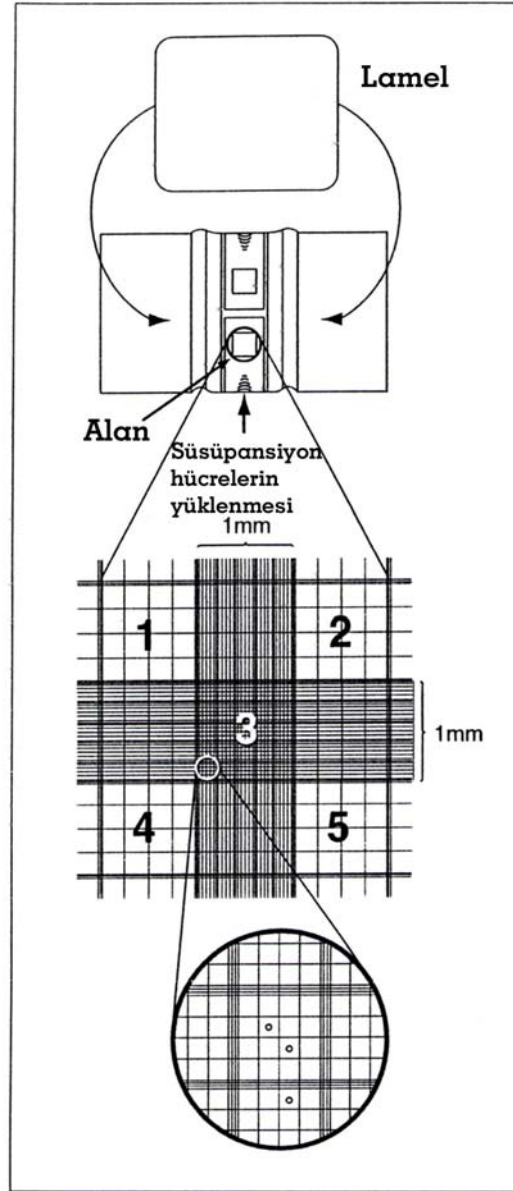
Dondurma besi yeri ortamı (DMSO:10%, Media:70%, FBS:20%) içerisindeki hücreler ilk 24 saat *Mr Frosty* adlı kademeli soğutma kabında ısı dakikada 1°C düşürülerek -80°C ye kadar soğutuldu ve sürekli olarak -196°C likit nitrojen tankında saklandı.

Çözme Koşulları:

Hücreler -196°C'den alınıp 37°C'de çözüldükten sonra, DMSO'yu uzaklaştırmak için taze vasat/PBS ile seyreltilip 1000 rpm de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra tekrar taze besi yeri ortamı ile yıkanarak, aynı koşullarda santrifüj edildikten sonra beslenme koşullarını içeren RPMI-1640 besiyeri (15% FCS, 0.3gr/L L-Glutamin, 1% Penicillin-Streptomycin) ile seyreltilip, kültür kaplarına aktarılarak, etüve konuldu.

Hücrelerin Sayımı:

Hücreler 1:1 oranında taze besi yeri ortamı/PBS ile seyreltildikten sonra Neuber-hemositometreye alındı. Hemositometredeki dört karedeki hücreler sayılıp ortalaması alındıktan sonra çıkan sayı Dilüsyon Etkeni x 10⁴ ile çarpılıp 1 ml deki hücre sayısı (hücre/ml) bulundu (*Şekil 3.2*).



Şekil 3.2. Neuber-Hemositometrede hücre sayımı (117).

3.2.2. İn-vitro Sitotoksosite Deneyi

Tiripan Mavisi İle Ölü Hücre Sayım Yöntemi: 1×10^5 hücre/1ml olacak şekilde 24 kuyucuklu kaplara metilprednizolon değişik dilüsyonlarda (10^{-4} M, 5×10^{-4} M ve 10^{-3} M) eklenerek 12, 24 ve 48 saatlik sürelerdeki toksisite Tiripan mavisi boyası ile belirlendi. İnkübasyon sonrası hücreler 1:1 oranında (hücre süspansiyonu:tripan mavi boyası) seyreltildiler ve *Neuber Lamı*'nda ışık

mikroskopunda sayıldılar. Tripkan mavisini alan hücreler ölü olduğundan, maviye boyanmış ve boyanmamış hücrelerin sayımı ile sitotoksosite belirlendi. Çıkan sayı (dilüsyon faktörü $\times 10^4$) ile çarpılıp ölü ve canlı hücrelerin yüzde değerleri bulundu.

Ölü hücrelerin yüzdesi: Tiripkan mavisini alan hücreler/Tüm hücreler $\times 100$

Akım Sitometrede PI İle Boyanan Ölü Hücrelerin Analizi: 10^5 - 10^6 hücre/ml (HL-60) soğuk kültür besi yeri ortamı ile yıkanıp, çökeltinin üstündeki sıvı atıldıktan sonra geriye kalan çökelti “Bağlanma Çözeltisi” ile seyreltilip soğuk kültür besi yeri ortamı ile tekrar seyreltiltiler. Tüpler buz üzerinde tutuldu. 490 μ l hücre süspansiyonuna 5 μ l kullanıma hazır Annexin-V FITC çözeltisi ve 5 μ l Propidyum İyodid eklendi. Bu çözelti hafifçe karıştırıldı. Tüpler buz üzerinde 15-20 dakika karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyondan sonra hücrelerin üzerine 400 μ l buz üzerinde bulunan bağlanma çözeltisi eklendi karıştırıldı. Hücre örnekleri “Coulter” Akım Sitometre’de analiz edildiler. PI ile boyanan hücreler ölü hücreleri göstermektedir.

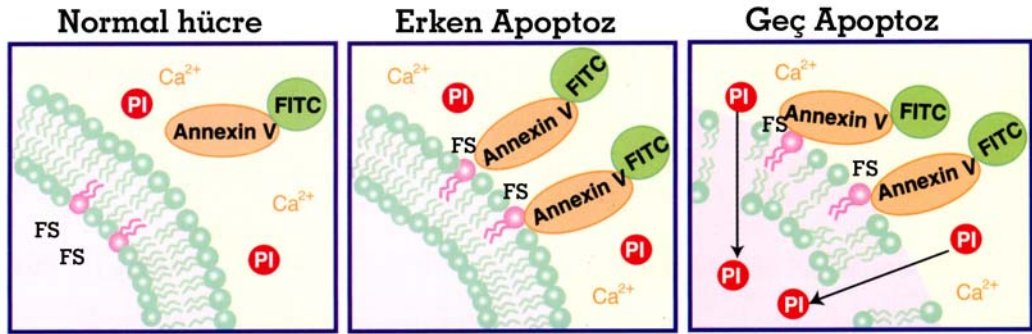
3.2.3. Akım Sitometre ile Apoptozun Ölçülmesi

Apoptozun ölçülmesinde akım sitometre kullanımının iki temel amacı vardır:

1. Hücre ölümünde rol oynayan moleküler ve işlevsel mekanizmaların aydınlatılması,
2. Ölü hücrelerin miktarının tayini, apoptoz ve nekroz ile oluşan ölümlerin ayırt edilebilmesi (118).

Annexin-V Boyama: Annexin V FITC, apoptoza gitmekte olan hücreleri ayırt eder. Apoptozun erken evrelerinde, hücrelerin zar yapısı bozulmaya başlar. Hücre zarı iç kısmında bulunan fosfatidil serinler, zar dışına çıkarlar. Ortamda Ca^{+2} varlığında annexin V, fosfatidil serin ile bağlanır. Annexin V’in fosfatidil serine yüksek ilgisi vardır. Propidyum iyodid ise canlılık için standart bir akım sitometre probudur. Canlı hücreleri ölü hücrelerden ayırır. Hücre zarı korunmuş canlı hücreler

propidyum iyodidi geçiremezler. Zar yapıları bozulduğunda propidyum iyodid, hücre içine kolayca girer ve DNA ya bağlanır. Hücreler annexin V-FITC ve propidyum iyodid ile negatif boyanırsa, bu onların sağlıklı olduklarını işaret eder. Annexin V-FITC pozitif, propidyum iyodid negatif boyanan hücreler, erken apoptoza gitmekte olduklarını göstermektedirler. Hücreler, hem anneksin V-FITC hem de propidyum iyodid pozitif boyanırsa, geç apoptoza ya da nekroza gitmektedirler (*Şekil 3.3*).



Şekil 3.3. AnnexinV-FITC ile Fosfatidil Serin ilişkisi (119).

10^5 - 10^6 hücre/ml (HL-60) soğuk kültür besiyeri ortamı ile yıkanıp, üstteki sıvı atıldıktan sonra geriye kalan çökelti, bağlanma çözeltisi ile seyreltilip soğuk kültür besiyeri ortamı ile tekrar seyreltildiler. Tüpler buz üzerinde tutuldu. 490 µl hücre süspansiyonuna 5 µl kullanıma hazır *Annexin-V FITC* ve 5 µl *Propidium Iodide* eklendi. Bu solüsyon hafifçe karıştırıldı. Tüpler buz üzerinde 15-20 dakika karanlıkta inkübe edildi. Hücre örnekleri Coulter Akım Sitometre cihazında analiz edildiler.

3.2.4. DNA Fragmantasyonu Deneyi

EZ-RNA kiti ile DNA İzolasyonu: $1-5 \times 10^6$ hücre üzerine 0.5 ml A çözeltisi eklenerek, 5 dakika oda ısısında tutuldu. Üzerine 0.5 ml B çözeltisi eklendi. Kuvvetli çalkalama (15 saniye) yapıldı ve 10 dakika oda ısısında tutuldu. +4° de, 12.000xg de 15 dakika santrifüj edildi. Üstteki berrak sıvı faz RNA için ayrıldıktan sonra, aradaki

organik faz ve alttaki fenol-kloroform fazı 0.3 ml saf etanol ile karıştırıldı. Oda ısısında 3 dakika santrifüj edildikten sonra +4° de, 2.000xg de 5 dakika santrifüj edildi. Fenol/Etanol süpernatanı atıldı. Proteinleri uzaklaştırmak için DNA çökeltisi, içinde %10 etanol olan 0.1 M sodyum sitrat ile 2 kez yıkandı. İnkübasyon oda ısısında, ara sıra karıştırılarak 30 dakika yapıldı. +4°C de, 2.000xg de 5 dakika santrifüj yapıldıktan sonra DNA çökeltisi 1.5 ml %75 lik etanol ile sulandırıldı. Oda ısısında 15-20 dakika ara sıra karıştırılarak inkübe edildi. +4°C de, 2.000xg de 5 dakika santrifüj işlemi sonrası etanol uzaklaştırıldı ve DNA peleti 5 dakika havada kurutuldu. DNA 8 mM sodyum hidroksit ile çözüldü.

%1.5 luk Agaroz Jel Elektroforezi: Elde edilen DNA'nın 40 µl si, %1.5'luk agaroz jelde 25 Volt akımda 3 saat süreyle yürütüldü. UV ışığı altında değerlendirildikten sonra KODAK-X filmi ile görüntülendi.

3.2.5. Hücre Yüzey Belirleyicileri Kullanılarak Akım Sitometrede Farklılaşmanın Ölçülmesi

Akım sitometrik olarak hücre yüzey farklılaşma belirleyicilerinden CD11b, CD14 ve CD15 kullanılarak farklılaşma testleri yapıldı. Hücre kültürlerine, 48, 72 ve 96 saat sürelerle 10^{-6} M, 10^{-5} M ve 10^{-4} M derişimlerde Metil Prednisolon (MP) uygulaması yapıldı ve inkübasyonun ardından hücreler toplanıp 1500 rpm de 10 dakika santrifüj edildiler. Üst sıvı atıldıktan ve çökelti iki kez PBS ile yıkandıktan sonra hücrelerin farklılaşma yüzey belirleyicileri için Becton Dickinson monoklonal antikorları kullanılarak hücreler işaretlendiler. Hücrelerin boyanmasında ikili boyama deney yöntemi kullanıldı. Her örnek için iki örnek tüpü kullanıldı. İkili boyama deneyi için: 1. tüpteki hücreler izotipik kontrolleri olan Mouse anti human IgG2a-FITC/Mouse anti human IgM FITC ve Mouse anti human IgG1-PE ile, 2. tüpteki hücreler ise Mouse anti human CD14 FITC/Mouse anti human CD15 FITC ve Mouse anti human CD11-b PE antikorları ile işaretlendiler.

Her tüpe 5×10^5 hücre konuldu. Üzerlerine 10 ar µl önce FITC li sonra PE li antikorları konuldu. Elle hafif mix edildikten sonra karanlıkta oda ısısında 20 dakika inkübe edildiler. İnkübasyon işlemini takiben, non-spesifik bağlanmaları

uzaklaştırmak için 2 ml PBS ile yıkayıp 1050 rpm de 5 dakika santrifüj edildiler. Pelet 1 ml PBS ile seyreltikten sonra, Akım Sitometrede analiz edildi.

Klinikte yüksek doz metil prednizolonun farklılaşma üzerindeki etkileri 4 ve 7 günlerde görüldüğü için ayrıca 120, 144 ve 168 saatlerde de incelemeler yapılmış ve bulgular anlamlı bulunmamıştır (Ek).

3.2.6. Apoptoz ve Farklılaşmanın Morfolojik Değerlendirilmesi

Sitospin Lamlarının Hazırlanması: 2×10^5 hücre yıkayıp sayıldıktan sonra 200 μ l PBS ile sulandırılıp sitosipin için hazırlanan lamlara 500 rpm de 2 dakika çevirilerek tespit edildiler. Hafif kurutulduktan sonra *Wright* boyası ile boyamaya hazır hale getirildiler.

Wright Boyaması: Lamların üzeri Wright çözeltisi ile kaplanıp 5 dakika bekletildi. Daha sonra çeşme suyu ile yıkandı ve kurutuldu. Normal ışık mikroskopunda incelendi.

3.3. İstatistiksel Analizler

Tüm deneyler üç kez tekrarlandı. Ortalamaları alındıktan sonra (+) ve (-) standart sapmaları alındı. İstatistiksel analizler Kolmogrov Smirnov ve *Kruskal Wallis* testleri ile belirlendi.

Kolmogrov-Smirnov istatistiksel testi, iki farklı deney setinin farklılığının önemi için kullanılan non-parametrik bir testtir (120).

Kruskal Wallis istatistiksel testi, Kruskal Wallis tek yönlü varyans analizi olarak da adlandırılır. Birbirinden bağımsız örnekler için kullanılır ve non-parametrik bir testtir. İki ve daha fazla grubun ordinal ve normal olmayan değişkenleri arasındaki farklılıkları karşılaştırmak için kullanılır (121). Bu test aynı zamanda büyüklüğü oldukça küçük ve normal görünmeyen gruplar için de uygulanır (122).

4. BULGULAR

Bu çalışmada, HL-60 insan akut promiyelositik lösemi hücre hattında 6 α -metil prednizolonun sitotoksik, apoptotik ve farklılaşma üzerindeki etkileri, doz ve zaman bağımlı olarak araştırıldı. MP'nin, 48. saatte geç apoptotik ve sitotoksik etkileri, 12. ve 24. saatlerde erken ve geç apoptotik etkileri gösterildi. Apoptoz etkileri *DNA-Laddering* yöntemiyle de gösterildi. MP'nin yüksek dozunun erken saatlerde apoptotik, ileri saatlerde ise sitotoksik olduğu bulundu.

Ayrıca, MP'nin ileri saatlerde farklılaşmaya etkileri için CD11b, CD14 ve CD15 hücre yüzey belirleyicilerinin akım sitometre cihazında analizi yapıldı. Yüksek doz MP'nin HL-60 hücrelerini 72. ve 96. saatlerde granülositik farklılaşmaya yönlendirdiği ancak monositik farklılaşmaya yönlendirmediği sonucuna varıldı.

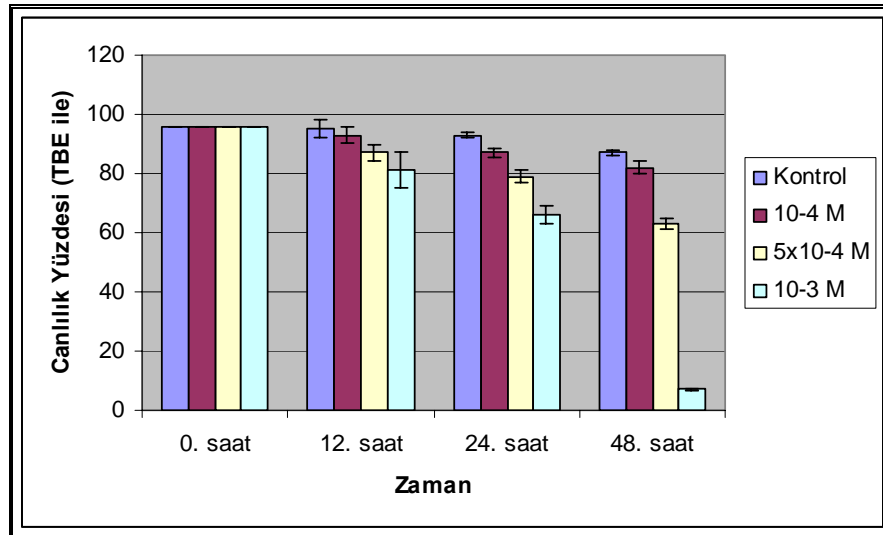
4.1. Metil Prednizolonun HL-60 Hücrelerinde Doz/Zaman Bağımlı Olarak Sitotoksisite ve Apoptoz Etkilerinin Araştırılması

Akut promiyelositik lösemi hücre (HL60)'leri, %10 FBS içeren RPMI-1640 besiyerinde, 37°C, %5 CO₂ ve %95 nem içeren etüvde kültür edildi. 6 α -metilprednizolonun, 12, 24 ve 48 saatlerdeki sitotoksik ve apoptotik etkilerini araştırmak için hücreler, 24 kuyucuklu kültür kaplarında, 10⁻⁴, 5x10⁻⁴ ve 10⁻³ molar derişimlerdeki 6 α -metil prednizolon ile inkübe edildiler. İnkübasyon bitiminde hücreler CBC cihazında sayılıp, 1:1 oranında tiripan mavisi ile boyanıp Neuber lamında sayılarak canlılık yüzde değişimleri tespit edildi (**Tablo 4.1 ve Şekil 4.1**). Daha sonra annexin-V FITC ile boyanarak akım sitometrede canlılığı, erken ve geç apoptotik etkileri (**Tablo 4.2, 4.3, 4.4, ve Şekil 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6 ve 4.7**) değerlendirildi. MP'nun 5x10⁻⁴ M ve 10⁻³ M derişimlerinin 12. ve 24. saatlerde erken apoptoz, 10⁻³ molar derişiminin 48. saatte geç apoptoz ve sitotoksik etkisi gözlemlendi. Hücreler ayrıca, 500 rpm de 2 dakika çevrilerek lam üzerine tespit edildikten sonra, *Wright* boyası ile 5 dakika boyanıp morfolojik olarak ışık mikroskopunda değerlendirildiler (**Şekil 4.8**). Işık mikroskopunda, 10⁻³ molar derişimde MP uygulanan hücrelerde hücre ve çekirdek zarlarındaki bozulmalar gözlemlendi.

Tablo 4.1. Metil prednizolonun HL-60 hücrelerinde sitotoksik etkileri.

HÜCRELER SAYIM	CBC (X10 ⁶ /ML)	TBE (X10 ⁶ /ML)	% CANLILIK
0. saat	1.0	1.0	96±0.0
Kontrol/12	1.0	1.0	95±3.0
10 ⁻⁴ /12	1.0	1.0	93±2.5
5x10 ⁻⁴ /12	1.0	1.0	87±3.0
10 ⁻³ /12	0.8	0.8	81±6.0
Kontrol/24	1.0	1.0	93±1.0
10 ⁻⁴ /24	1.0	1.0	87±1.5
5x10 ⁻⁴ /24	0.9	0.9	79±2.0
10 ⁻³ /24	0.5	0.5	66±3.0
Kontrol/48	1.4	1.6	87±1.0
10 ⁻⁴ /48	1.2	1.3	82±2.0
5x10 ⁻⁴ /48	1.1	1.1	63±2.0
10 ⁻³ /48	0.6	0.7	7±1.0*

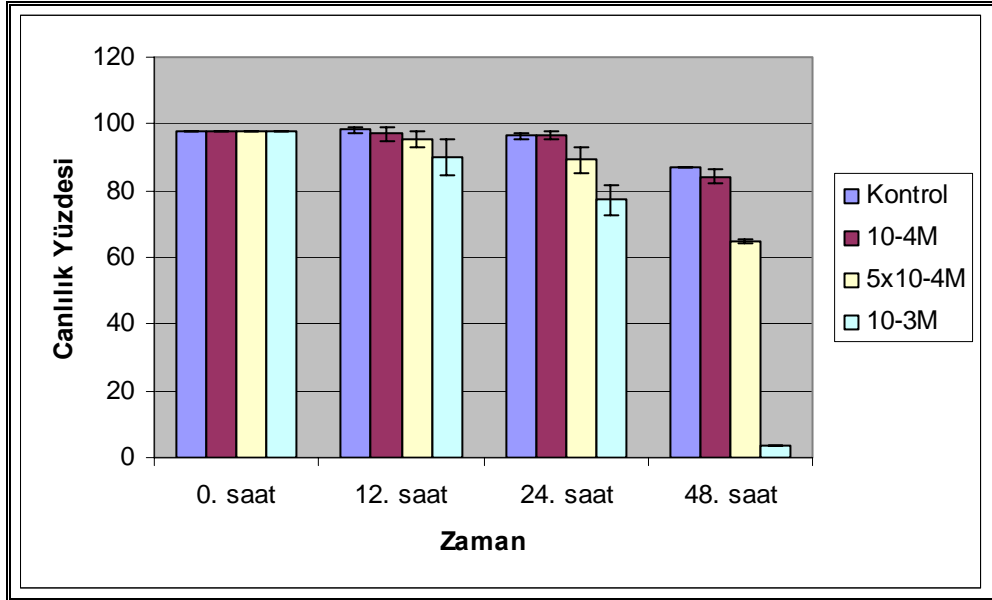
*p<0.05

**Şekil 4.1.** Doz/zaman bağımlı metil prednizolonun HL-60 hücrelerinde tripan mavisi ile yüzde canlılık değişimleri. Kontrole göre karşılaştırıldığında 24 (p:0.025) ve 48. (p:0.015) saatte anlamlı fark vardır.

Tablo 4.2. Metil prednizolonun HL-60 hücrelerinde sitotoksik etkilerinin akım sitometrik değerleri.

ZAMAN/DOZ	KONTROL	10^{-4} M	5×10^{-4} M	10^{-3} M
0. saat	98±0.0	98±0.0	98±0.0	98±0.0
12. saat	98.1±0.85	96.9±1.9	95.3±2.255	90.1±5.15
24. saat	96.4±0.95	96.5±1.35	89.1±3.45	77.1±4.05
48. saat	87.2±0.0	84.1±1.5	64.7±0.55	3.5±0.0*

*p<0.05

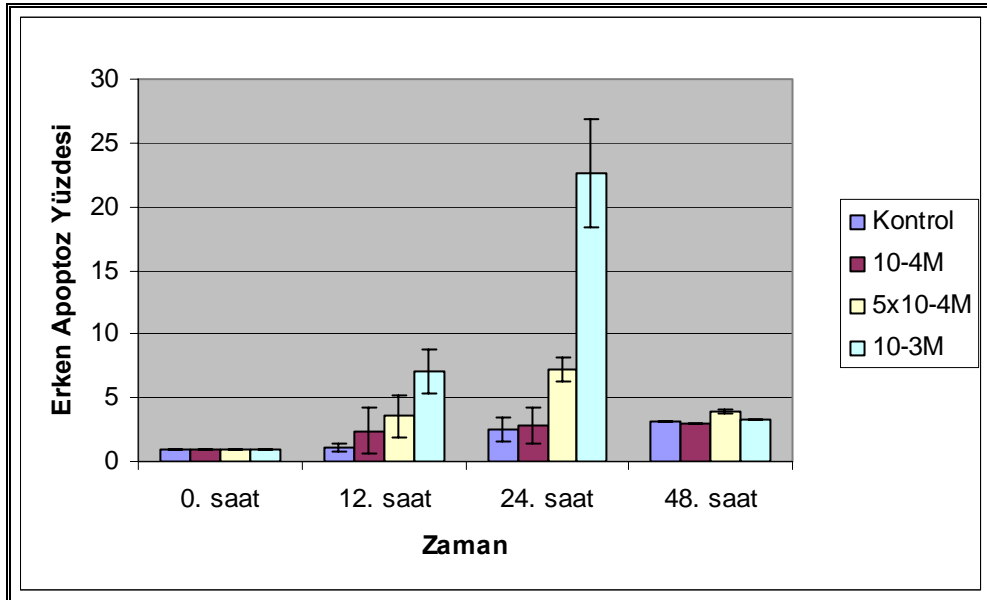


Şekil 4.2. Doz/zaman bağımlı metil prednizolonun HL-60 hücrelerinde annexin-V ve canlılık değişimleri. Kontrole göre karşılaştırıldığında 24 (p:0.025) ve 48 (p:0.015) saatlerde anlamlı fark vardır.

Tablo 4.3. Metil prednizolonun HL-60 hücrelerinde erken apoptoz etkilerinin akım sitometrik değerleri.

ZAMAN/DOZ	KONTROL	10^{-4} M	5×10^{-4} M	10^{-3} M
0. saat	1.0±0.0	1.0±0.0	1.0±0.0	1.0±0.0
12. saat	1.16±0.32	2.39±1.80	3.57±1.65	7.09±1.77*
24. saat	2.52±0.87	2.79±1.45	7.23±0.89*	22.6±4.24*
48. saat	3.2±0.0	3.0±0.0	4.0±0.21	3.3±0.0

*p<0.05

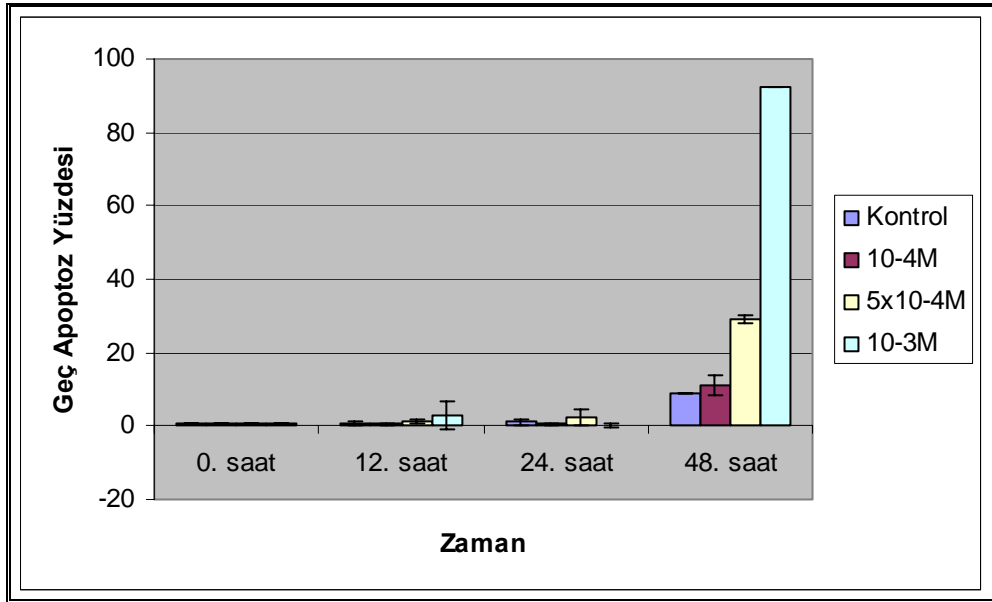


Şekil 4.3. Doz/zaman bağımlı metil prednizolonun HL-60 hücrelerinde annexin-V ile erken apoptoz değişimleri. Kontrole göre karşılaştırıldığında 12 (p:0.033) ve 24 (p:0.025) saatlerde anlamlı bir fark vardır.

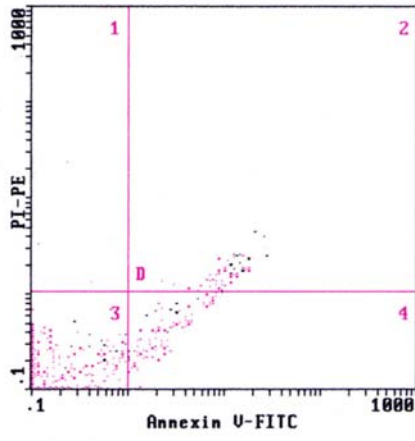
Tablo 4.4. Metil prednizolonun HL-60 hücrelerinde geç apoptoz etkilerinin akım sitometrik değerleri.

ZAMAN/DOZ	KONTROL	10^{-4} M	5×10^{-4} M	10^{-3} M
0. saat	1.0±0.0	1.0±0.0	1.0±0.0	1.0±0.0
12. saat	0.69±0.48	0.63±0.22	1.1±0.63	2.75±3.33
24. saat	1.08±0.7	0.66±0.28	2.36±1.9	0.22±0.3
48. saat	8.8±0.0	11.05±1.85	29.1±0.7	92.5±0.0*

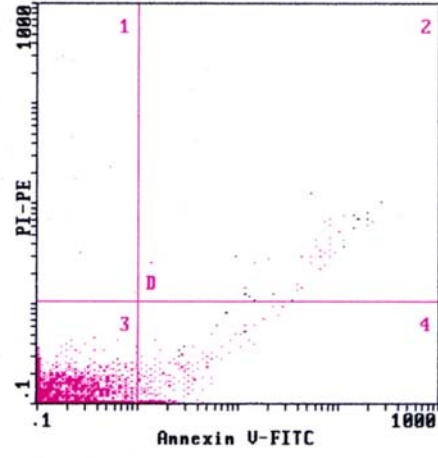
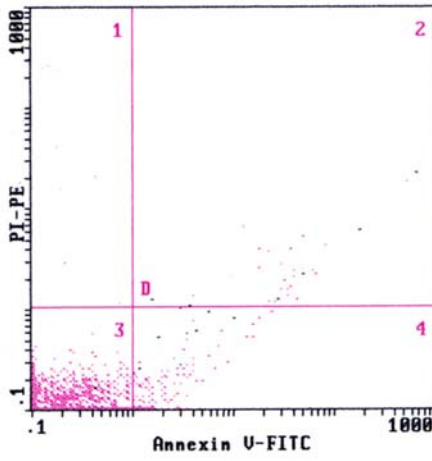
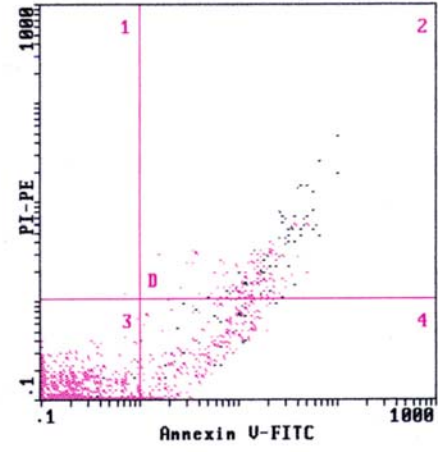
*p<0.05



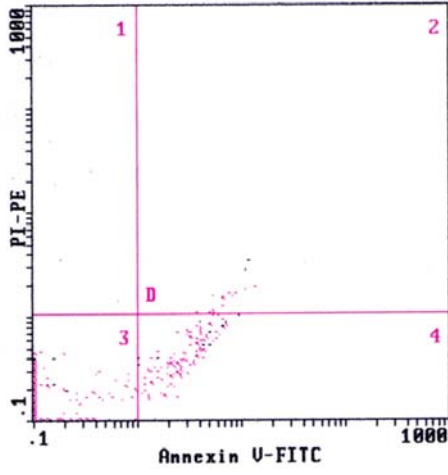
Şekil 4. 4. Doz/zaman bağımlı metil prednizolonun HL-60 hücrelerinde annexin-V ile geç apoptoz değişimleri. Kontrole göre karşılaştırıldığında 48 saatte (p:0.015) anlamlı bir fark vardır.



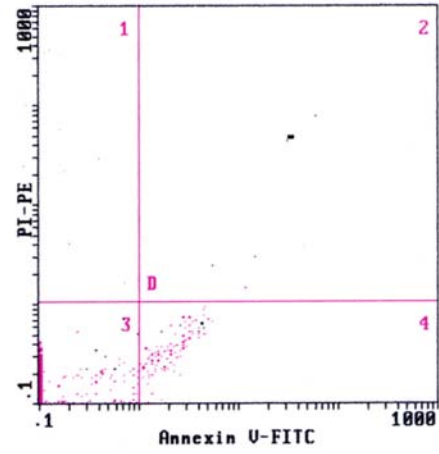
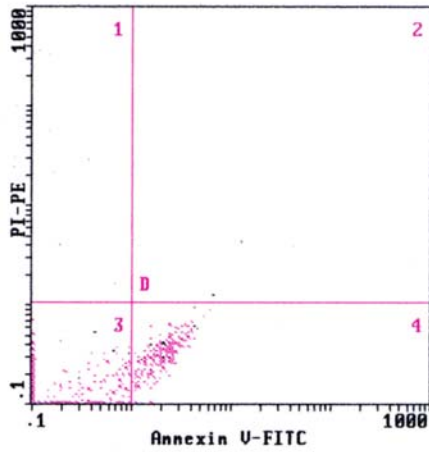
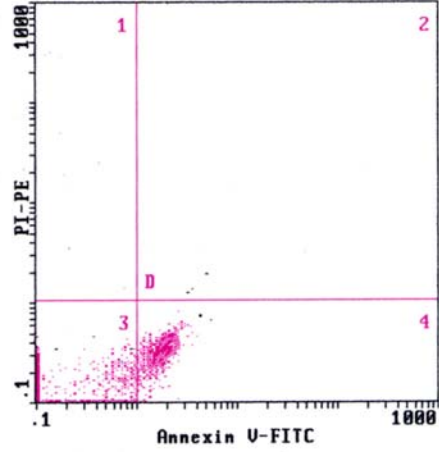
A) Kontrol/12 saat

B) 10^{-4} /12 saatC) 5×10^{-4} /12 saatD) 10^{-3} /12 saat

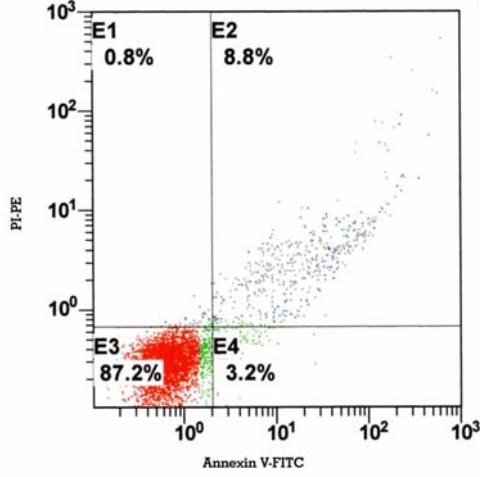
Şekil 4.5. MP ile 12 saat inkübe edilen HL-60 hücrelerinde canlılığın ve apoptozun akım sitometrik olarak değerlendirilmesi A) Kontrol B) 10^{-4} , C) 5×10^{-4} ve D) 10^{-3} molar derişimlerdeki annexin-V ve canlılık oranları. Kontrole göre karşılaştırıldığında Anneksin V-FITC (2 ve 4 nolu alanlar) ile boyanan hücrelerin yoğunluğunda artış görülmektedir.



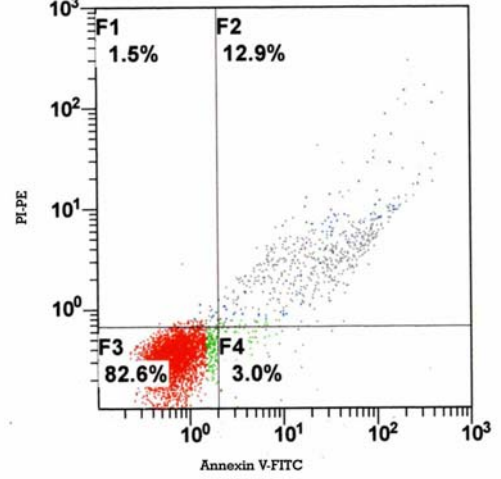
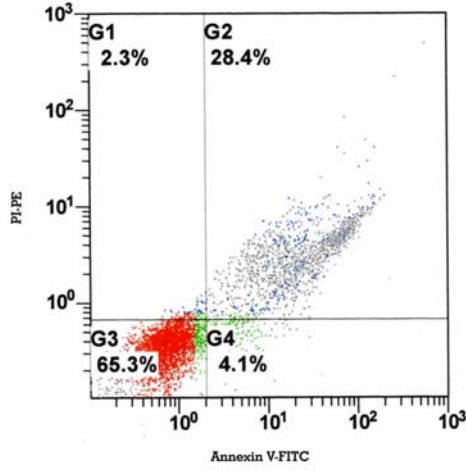
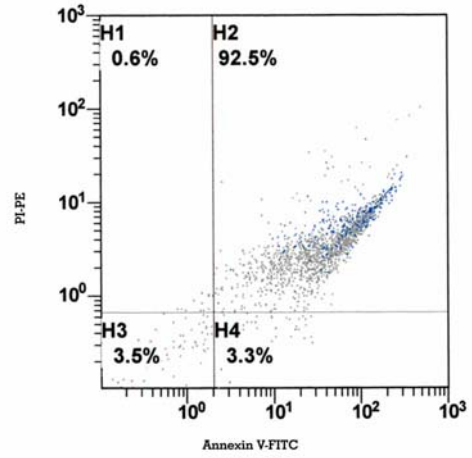
A) Kontrol/24 saat

B) 10^{-4} /24 saatC) 5×10^{-4} /24 saatD) 10^{-3} /24 saat

Şekil 4.6. MP ile 24 saat inkübe edilen HL-60 hücrelerinde canlılığın ve apoptozun akım sitometrik olarak değerlendirilmesi A) Kontrol B) 10^{-4} , C) 5×10^{-4} ve D) 10^{-3} molar derişimlerdeki annexin-V ve canlılık oranları. Kontrole göre karşılaştırıldığında Anneksin V-FITC (2 ve 4 nolu alanlar) ile boyanan hücrelerin yoğunluğunda artış görülmektedir.

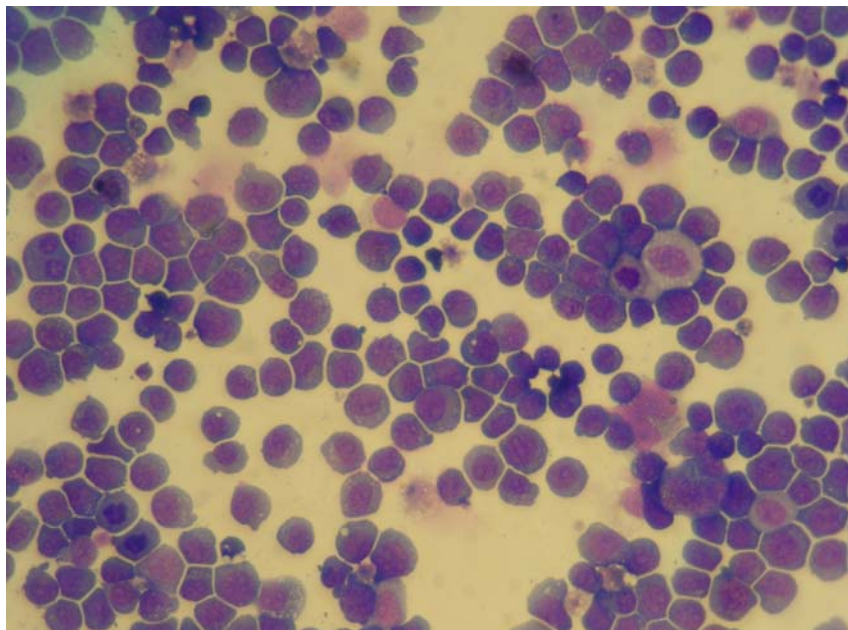


A) Kontrol/48 saat

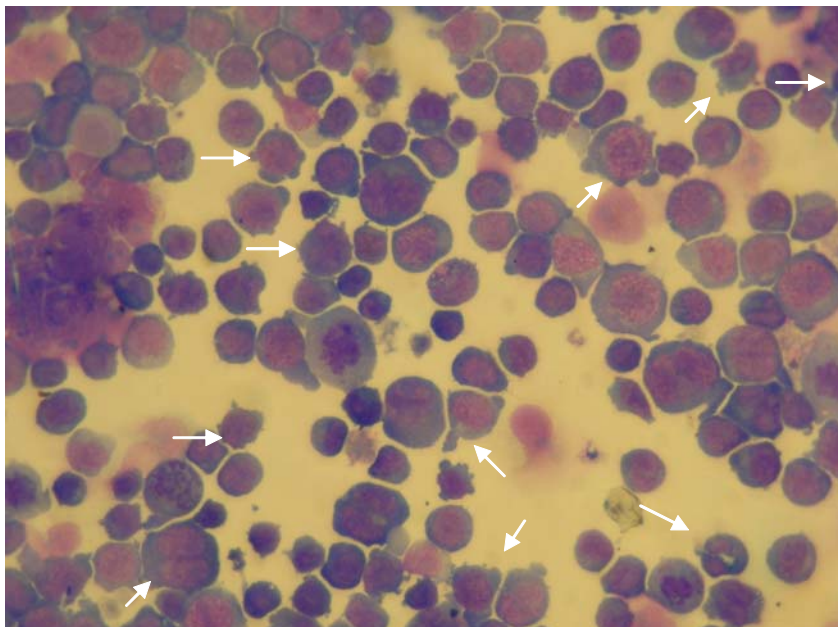
B) 10^{-4} M/48 saatC) 5×10^{-4} M/48 saatD) 10^{-3} M/48 saat

Şekil 4.7. MP ile 48 saat inkübe edilen HL-60 hücrelerinde canlılığın ve apoptozun akım sitometrik olarak değerlendirilmesi A) Kontrol B) 10^{-4} , C) 5×10^{-4} ve D) 10^{-3} molar derişimlerdeki annexin-V ve canlılık oranları. Kontrole göre karşılaştırıldığında Annexin V-FITC (2 ve 4 nolu alanlar) ile boyanan hücrelerin yoğunluğunda artış görülmektedir. Özellikle PI (1 ve 2 nolu alanlar) ile boyanan hücreler artmış durumdadır.

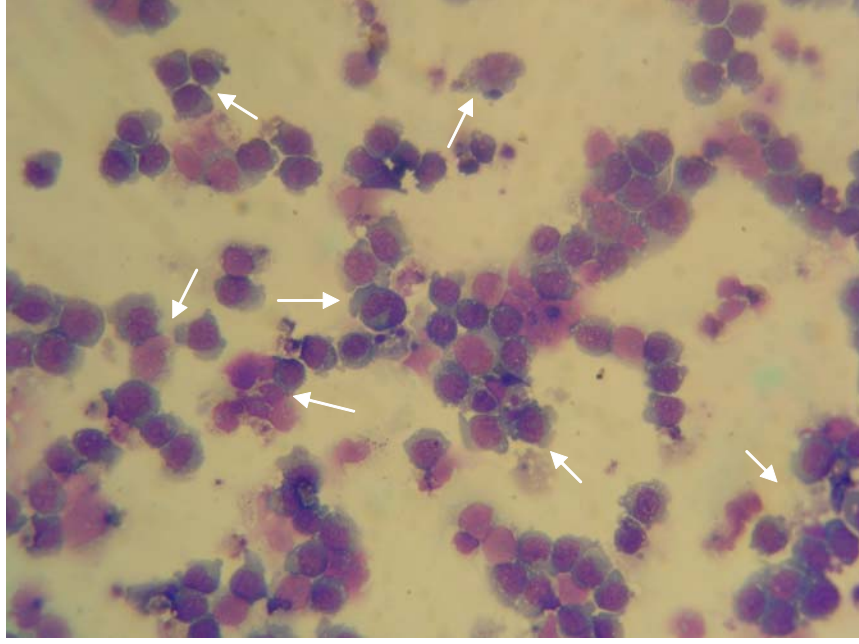
A)



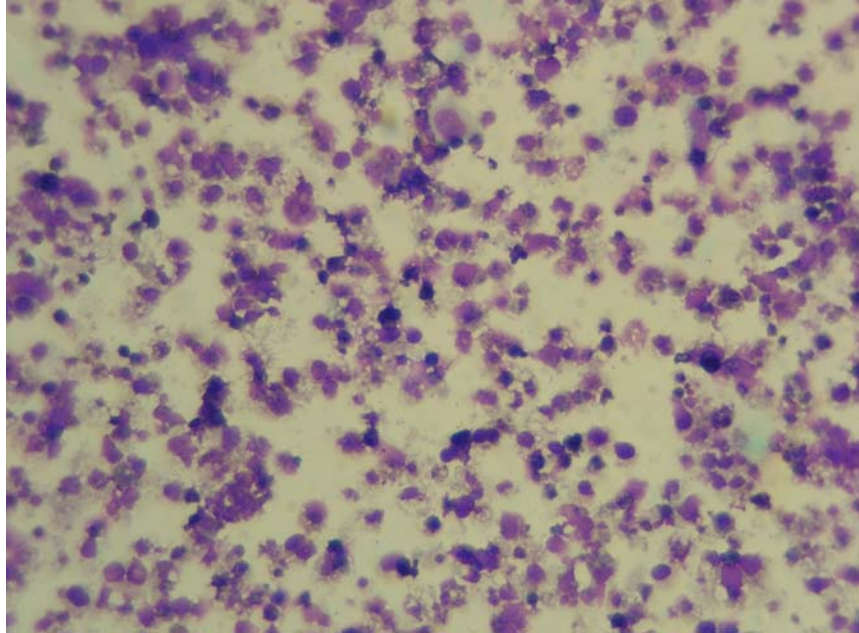
B)



C)

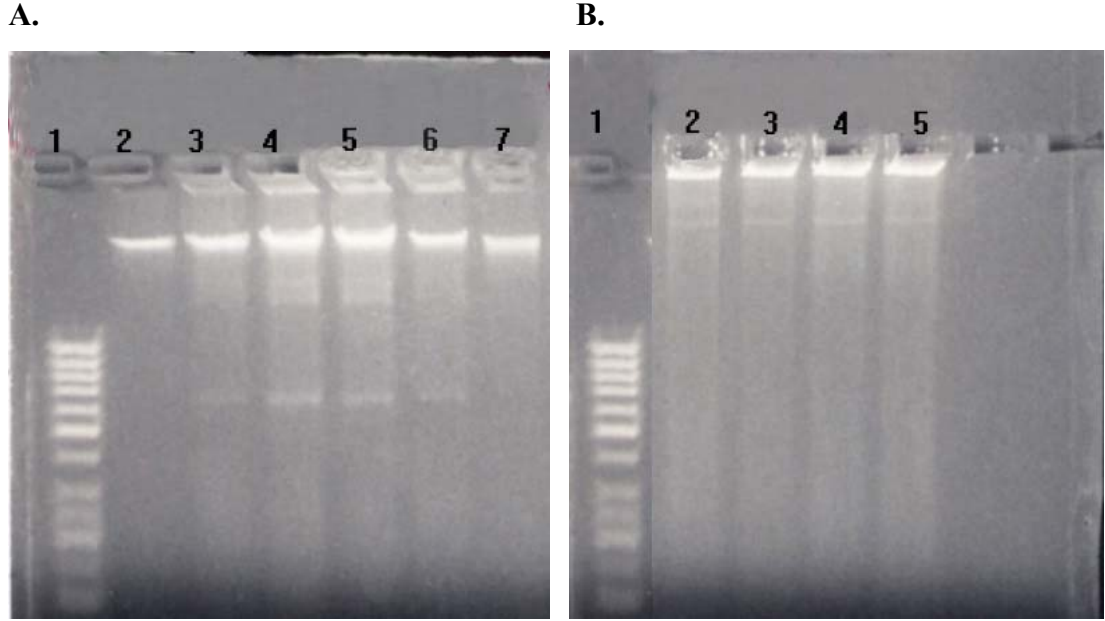


D)



Şekil 4.8. MP ile inkübe edilen hücrelerin *Wright* boyası ile boyanarak morfolojik değerlendirilmesi A) Kontrol/24 saat, B) 10^{-3} M/24 saat: erken apoptozdaki hücreler, C) 5×10^{-4} M/48saat: geç apoptozdaki hücreler, D) 10^{-3} /48 saat: nekrozdaki hücreler görülmektedir.

MP uygulanan (48 ve 96 saat) HL-60 hücrelerinden elde edilen DNA'nın %1.5'lük agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi sonucu 48. saatteki DNA'ların parçalı bandlar oluşturduğu, 96 saatteki DNA'ların ise smear görüntüsü oluşturduğu gözlenmiştir (*Şekil 4.9*).



Şekil 4. 9. MP uygulanan HL60 hücrelerinde DNA agaroz jel inceleme sonuçları: **A)** 48 saat, Kuyu 1: 50 bç M, Kuyu 2: B/48, Kuyu 3: Kontrol/48, Kuyu 4: $10^{-6}/48$, Kuyu 5: $10^{-5}/48$, Kuyu 6: $10^{-4}/48$, Kuyu 7: $10^{-3}/48$ **B)** 96 saat, Kuyu 1: 50 bç M, Kuyu 2: Kontrol/96, Kuyu 3: $10^{-6}/96$, Kuyu 4: $10^{-5}/96$, Kuyu 5: $10^{-4}/96$.

Doz ve zamana bağlı olarak metilprednizolon uygulanan HL60 hücrelerinin canlılık ve apoptoz sonuçları Kruskal Wallis (K-W) istatistik programına göre değerlendirildi. K-W tek yönlü varyans analizine göre, canlılığın incelenmesinde 12. saatte anlamlı bir fark ($p:0.064$) bulunamamıştır ancak 24. saatte ($p:0.025$) ve 48. saatte ($p:0.015$) anlamlı bir fark vardır. 24 saat ve 48 saat deneylerin kontrole göre ikili karşılaştırmalarında bütün gruplar arasında anlamlı bir fark vardır.

K-W tek yönlü varyans analizine göre, erken apoptoz incelendiğinde 12. saatte (p:0.033) ve 24. saatte (p:0.025) molar gruplar arasında fark vardır ancak 48. saatte (p:0.387) önemli bir fark bulunmamaktadır. İkili karşılaştırmalarda ise, 12. saat ve 24. saat kontrole göre 5×10^{-4} M ve 10^{-3} M derişimler arasında fark gözlenmektedir.

K-W tek yönlü varyans analizine göre, geç apoptoz incelendiğinde, 12. saat (p:0.760) ve 24. saatte (p:0.192) hiç fark görülmezken, 48. saatte (p:0.015) oldukça anlamlı bir fark görülmektedir. 48. saatin kontrole göre ikili karşılaştırılmalarında bütün gruplar arasında oldukça önemli bir fark vardır.

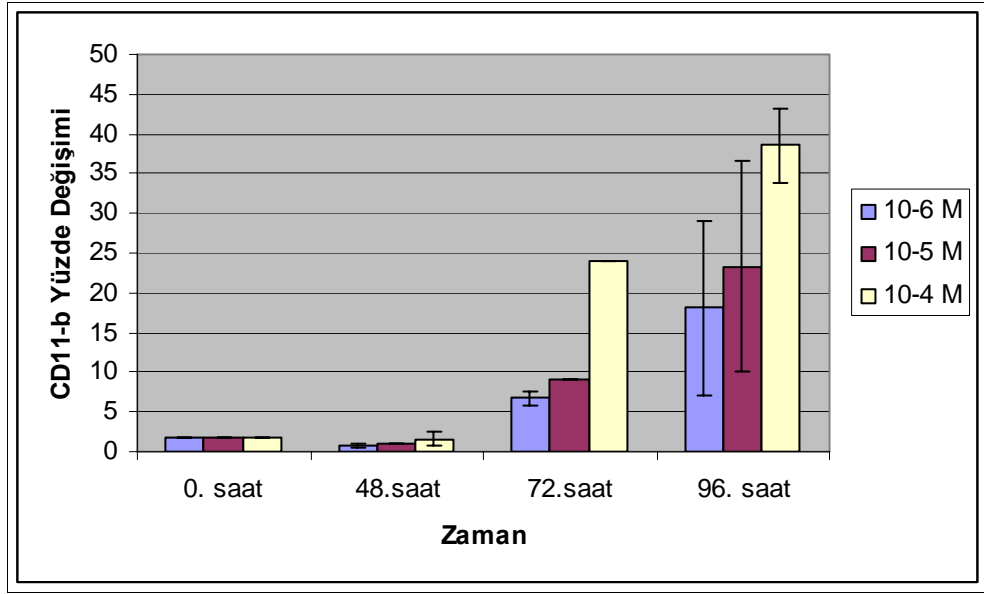
4.2. Metil Prednizolonun HL-60 hücrelerinde Doz/Zaman Bağımlı Olarak Farklılaşma Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması

Akut promiyelositik lösemi hücre (HL60)'leri, %10 FBS içeren RPMI-1640 besiyerinde, 37°C, %5 CO₂ ve %95 nem içeren etüvde kültür edildi. 6α-metil prednizolonun, 48, 72 ve 96 saatlerdeki farklılaşma etkilerini araştırmak için hücreler, 24 kuyucuklu kültür kaplarında, 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4} molar derişimlerdeki 6α-metil prednizolon ile inkübe edildiler. İnkübasyon bitiminde hücrelerin canlılığı, 1:1 oranında tiripan mavisi ile boyanıp Neuber lamında sayılarak canlılık oranları % 70-90 arasında bulundu ve ardından monositik ve granülositik hücre yüzey molekülleri olan CD11b, CD14 ve CD15 monoklonal antikorları ile boyanarak akım sitometrede (**Tablo 4.5, 4.6, 4.7, ve Şekil 4.9, 4.10, 4.11**) analiz edildiler. MP'nun 10^{-4} molar derişimi 72 ve 96 saatte HL-60 hücrelerini granülositik farklılaşmaya yönlendirdiği gözlemlendi. Hücreler ayrıca, 500 rpm de 2 dakika çevrilerek lam üzerine tespit edildikten sonra, *Wright* boyası ile 5 dakika boyanıp morfolojik olarak ışık mikroskopunda değerlendirildiler. Işık mikroskopunda, 10^{-4} molar derişimde MP uygulanan hücrelerde morfolojik olarak farklılaşma gözlemlendi (**Şekil 4.12**).

Tablo 4.5: CD11b hücre yüzey belirleyicisi ile akım sitometrik inceleme sonuçları.

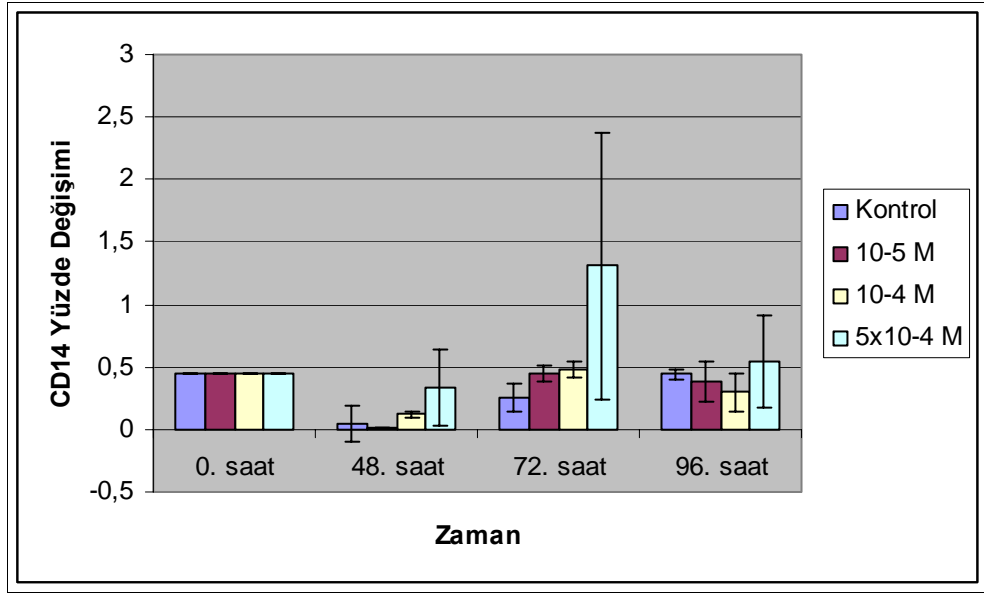
	0. SAAT	48. SAAT	72. SAAT	96. SAAT
10^{-6} M	1.80±0.0	0.85±0.26	6.80±0.9	18.1±11.0
10^{-5} M	1.80±0.0	1.06±0.03	9.0±0.0	23.33±13.24*
10^{-4} M	1.80±0.0	1.64±0.8	23.97±2.85*	38.57±4.7*

*K-S>0.20

**Şekil 4.10.** Doz/ Zaman bağımlı MP uygulanan HL60 hücrelerinde CD11b yüzde değişimi. Kontrole göre karşılaştırıldığında 72 saatte (K-S:0.27) ve 96 saatte (K-S:0.44) anlamlı fark vardır.

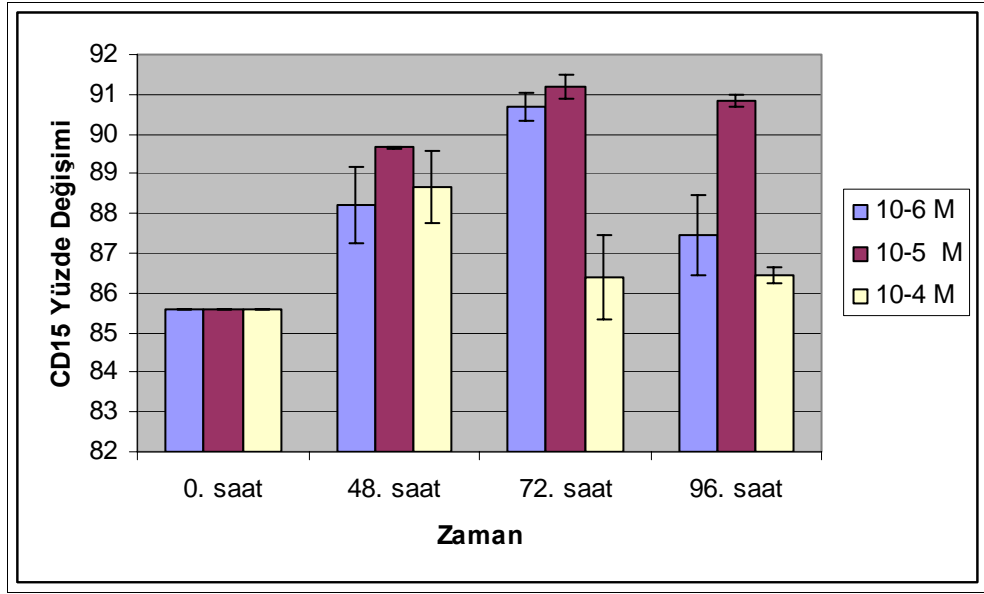
Tablo 4.6: CD14 hücre yüzey belirleyicisi ile akım sitometrik inceleme sonuçları.

	0. SAAT	48. SAAT	72. SAAT	96. SAAT
10^{-5} M	0.045±0.0	0.015±0.0	0.445±0.065	0.385±0.165
10^{-4} M	0.045±0.0	0.125±0.025	0.475±0.065	0.295±0.145
5×10^{-4} M	0.045±0.0	0.335±0.305	1.31±1.07	0.55±0.37

**Şekil 4.11.** Doz/Zaman bağımlı MP uygulanan HL60 hücrelerinde CD14 yüzde değişimi. Kontrole göre karşılaştırıldığında anlamlı bir fark görülmemektedir.

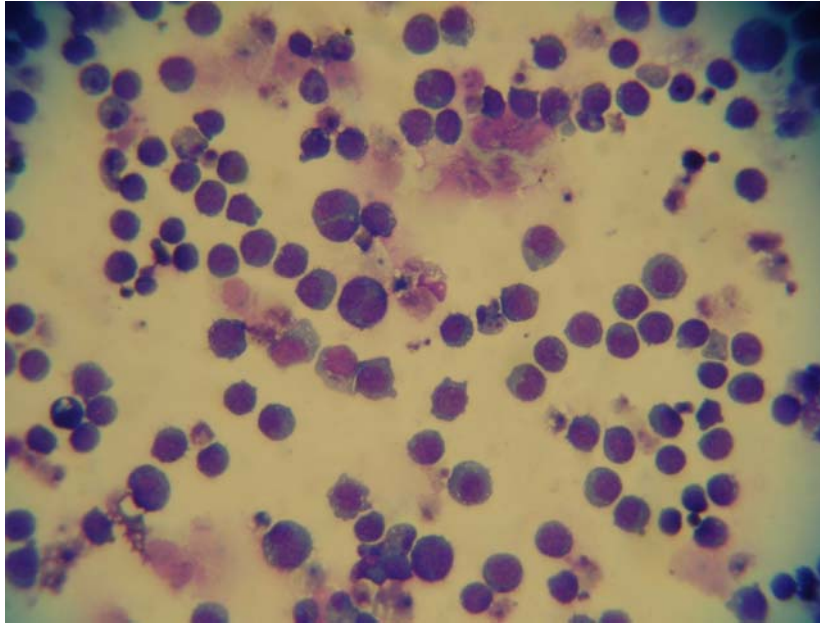
Tablo 4.7: CD15 hücre yüzey belirleyicisi ile akım sitometrik inceleme sonuçları.

	0. SAAT	48. SAAT	72. SAAT	96. SAAT
10^{-6} M	85.59±0.0	88.2±0.95	90.68±0.37	87.44±1.02
10^{-5} M	85.59±0.0	89.67±0.02	91.19±0.28	90.82±0.15
10^{-4} M	85.59±0.0	88.66±0.9	86.4±1.07	86.45±0.2

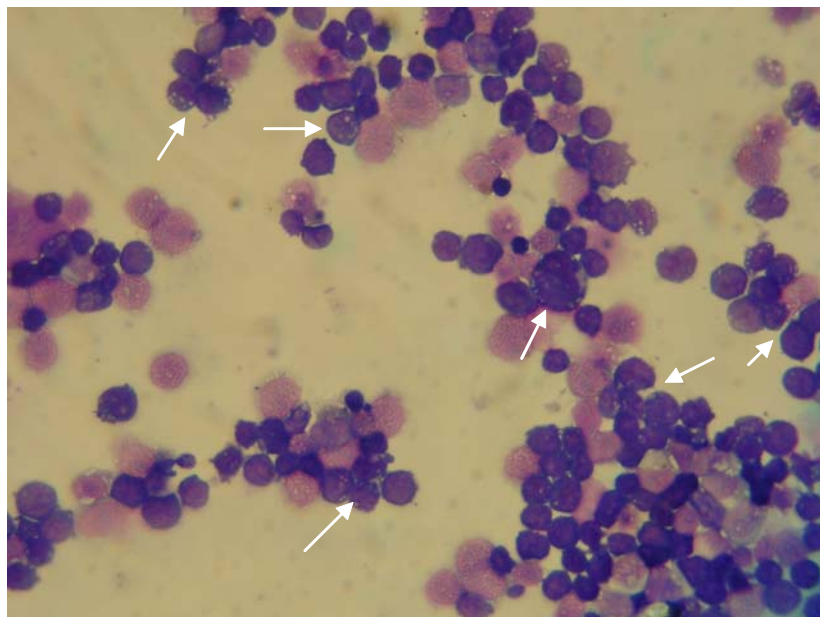


Şekil 4.12. Doz/Zaman bağımlı MP uygulanan HL60 hücrelerinde CD15 yüzde değişimi. Kontrole göre karşılaştırıldığında bütün doz ve saat uygulamalarında anlamlı bir fark görülmemektedir.

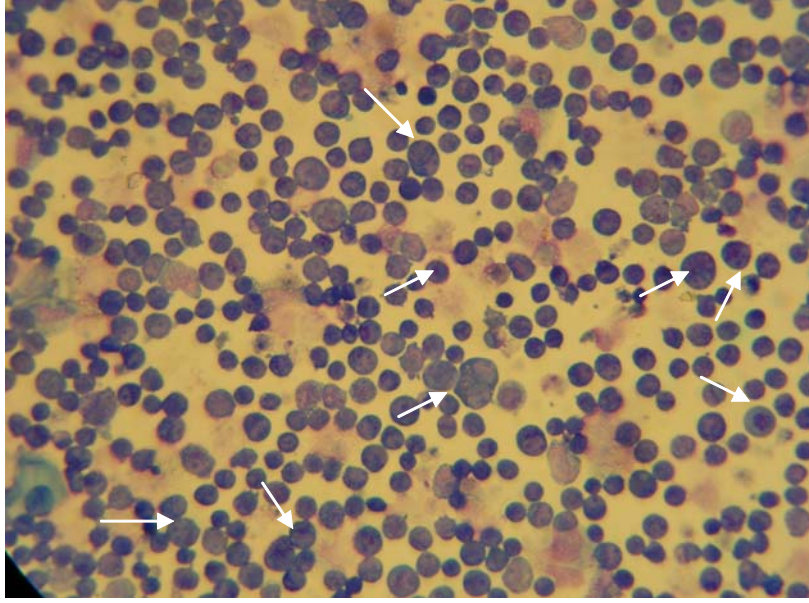
A)



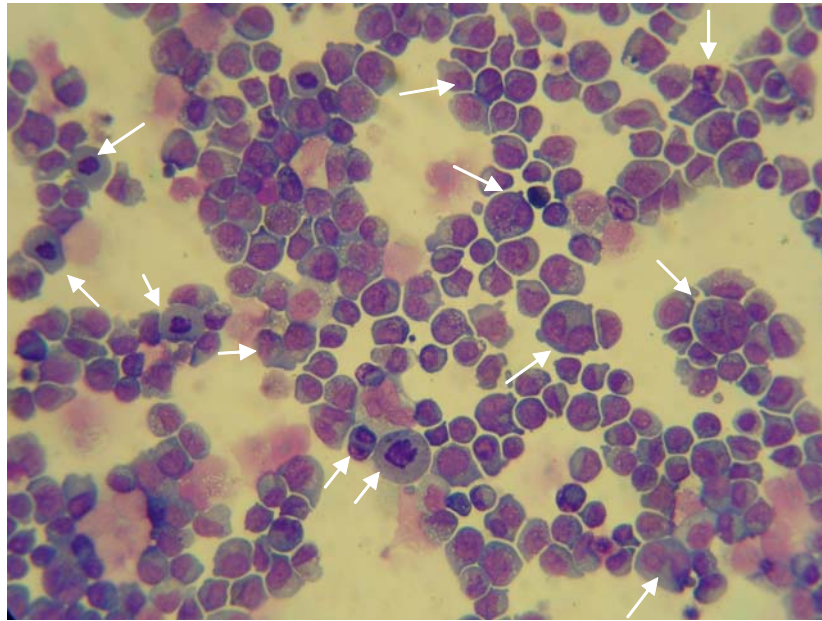
B)



C)



D)



Şekil 4.13. MP ile inkübe edilen hücrelerin *Wright* boyası ile boyanarak morfolojik değerlendirilmesi A) Kontrol/72. saat, B) 10^{-4} M/72 saat, C) 10^{-5} M/96 saat, D) 10^{-4} /96 saat M. Okla işaretli hücreler farklılaşmayı göstermektedir.

Farklılaşmanın sonuçları akım sitometri cihazının *Kolmogrov-Smirnov* istatistik programında incelendi.

Granülositik farklılaşma belirleyicisi olan CD11-b incelendiğinde, 48. saatte *Kolmogrov-Smirnov* (K-S) değerlerinde bir değişiklik görülmemekte, 72. saatte 10^{-4} M derişimde K-S değeri:0.27 anlamlı bir farklılaşma görülmektedir. 96. saatte 10^{-5} M derişimde K-S değeri:0.52 ve 10^{-4} M derişimde K-S değeri:0.44 oldukça anlamlı bir fark bulunmaktadır. Bu bağlamda, 72. ve 96. saatlerde 10^{-4} M ve 10^{-5} M derişimlerde MP uygulanan HL60 hücrelerinde granülositik farklılaşma görülmektedir.

Monositik farklılaşma belirleyicisi olan CD14 incelendiğinde, MP derişimi beş kat artırılmasına rağmen hiçbir derişimde anlamlı bir fark bulunamadığından, HL60 hücrelerinde monositik farklılaşma görülmemiştir.

Diğer bir hücre yüzey belirleyicisi olan CD15, HL60 hücrelerinin doğası gereği yüksek ekspresyon göstermektedir. Kontrole göre bütün doz ve inkübasyon zamanları karşılaştırıldığında çok az bir değişiklik görülse de, anlamlı bir artış olmadığından K-S değeri:<0.20'dir.

Klinikte YDMP'nin farklılaşmaya yol açıcı etkisi 4-7 gün arasında görüldüğü için, MP'nin HL-60 hücrelerindeki etkileri 120, 144 ve 168 saatlerde incelendi. Ancak anlamlı derişimler gözlenmedi (Ek).

Sonuç olarak metilprednizolonun bu çalışmada kullanılan dozlarının, HL-60 hücrelerinde granülositik farklılaşmayı uyardığı, monositik farklılaşma üzerine etkili olmadığı saptanmıştır.

5. TARTIŞMA

Akut miyeloblastik lösemi, kemik iliğindeki normal hücrelerin azalmasıyla tanınan dört önemli lösemi tipinden biridir. Kemik iliğindeki blast hücreleri %30 oranını aştığında hastalık ortaya çıkmaktadır. Hem çocuk hem de erişkinlerde görülen AML, çocukluk çağı lösemilerinin %15'ini oluşturur. Bu olguların %25-30'u 10-15 yaş arasındaki çocuklardır. AML, FAB sınıflandırmasına göre sekiz alt grupta (M0-M7) sınıflandırılmaktadır (10-17). AML'nin oluşumunda farklılaşma ve apoptoz mekanizmalarındaki bozukluklar önemli yer tutmaktadır. Tedavinin çözümünde ise bu mekanizmalar üzerinde etkili olan *all-trans* retinoik asit (ATRA), arsenik tri oksit (ATO), vitamin-D türevleri, histon deasetilaz (HDAC) inhibitörleri, vincristin, piknojenol ve steroid türevleri gibi ilaçlar kullanılmaktadır. Özellikle steroid grubundan olan yüksek dozlarda uygulanan 6 α -metilprednizolon 21-hemisüksinatın antilösemik etkisi daha önce yapılan ex-vivo çalışmalarda gösterilmiştir. Yapılan ex-vivo çalışmada AML'nin M1, M2, M3 ve M7 grubundan olan hastaların blast hücreleri kültür edilip, 48 saate kadar olan apoptotik etkileri elektron mikroskopunda gösterilmiştir (55).

Bu çalışmada, bir steroid türevi olan 6 α -metilprednizolonun (MP) AML hücre hattında, sitotoksikite, apoptoz ve farklılaşma üzerindeki in-vitro etkilerinin araştırılması amaçlandı. Bu amaçtan hareketle, AML'nin M3 alt grubunu temsil eden ve in-vitro kültür çalışmalarında en çok kullanılan HL-60 (insan akut promiyelositik lösemi) hücre hattının kullanılması uygun görüldü. MP uygulanan HL-60 hücrelerinde apoptoz ve sitotoksiteyi araştırmak için anneksin V-FITC ve farklılaşmayı araştırmak için ise CD "*cluster differentiation*" (farklılaşma kümeleri) olarak bilinen hücre yüzey antijenleri kullanılarak akım sitometre cihazında inceleme çalışmaları yapıldı.

Yüksek doz glukokortikoid'in lösemi ve lenfomalarda etkili olduğunu gösteren (123-124) öncü klinik çalışmalardan sonra, steroid hormonları (deksametazon ve prednizolon)'nın miyeloid farklılaşmasında önemli olduğunu

gösteren ilk deneysel çalışmalar 30 yıl öncesine, Lotem ve Sachs'ın fareler üzerinde yaptıkları çalışmalara dayanmaktadır (123). Lotem ve Sachs ilk kez steroid hormon türevlerinin farklılaşmada önemli olabileceğini vurgulamışlardır. Bu iki araştırmacı, fare miyeloid lösemi hücrelerine deksametazon uygulayarak, bu hücrelerin makrofaj ve granüositlere dönüşebileceğini göstermişlerdir. Yapılan bu ilk çalışmalardan sonra lösemik hücrelerin farklılaşma tedavisinde steroid hormon türevlerinin uyarıcı bir ajan olarak bulunması araştırmacıların steroidlere olan ilgisini artırmıştır. Japonya'dan Honma ve diğ. (125)'de normal ve lösemik farklılaşma çalışmalarında hidrokortizon, dekzametazon ve prednizolon gibi steroid hormon türevlerini kullanmışlardır. Ülkemizde ise ilk kez üniversitemizde, Pediatrik Hematoloji Ünitesi'nde Hiçsönmez ve diğ. (42-53) tarafından 1988 yılında başlatılan AML'de yüksek doz metilprednizolon tedavisi çalışmalarından halen iyi yanıt alınmakta ve çalışmalar sürdürülmektedir.

Özbek ve diğ. (55)'nin yaptığı ex-vivo çalışmalara göre, Metilprednizolon (MP)'un düşük (10^{-6} M) ve yüksek (10^{-3} M) derişimlerde insan miyeloid lösemi hücrelerinde farklılaşma ve apoptotik hücre ölümüne yol açtığı bildirilmektedir. Ancak yüksek doz MP (10^{-3} M)'nun daha fazla farklılaşma ve apoptotik hücreye neden olduğunun gösterilmesi yüksek dozun klinik etkisine işaret etmektedir.

Yapılan bu çalışmada, Özbek ve diğ.(55)'nin çalışmasından farklı olarak, AML'nin M3 grubunda yer alan HL-60 hücrelerine 10^{-4} M, 5×10^{-4} M ve 10^{-3} M derişimlerde 6 α -metilprednizolon 21-hemisüksinat yerine 6 α -metilprednizolon 12, 24 ve 48 saatlerde uygulandı. Hücre sayımları hem CBC tam kan sayım cihazı hem de tripan mavisi canlılık testi ile yapıldı. Her iki yöntem ile yapılan sayım sonuçları birbiriyle uyumaktadır. Başlangıç saatindeki HL-60 hücrelerinin canlılığı TBE testi ile % 96 iken, aneksin V-FITC ile akım sitometrede değerlendirilen canlı alan % 98 olarak bulundu. Sonuçlar Tablo 4. 1 ve 4. 2 de de görüldüğü gibi, doz ve inkübasyon zaman artışı ile birlikte, canlılık yüzdeleri doğru orantılı olarak azalmaktadır. Aneksin-V FITC ile akım sitometrede, 12, 24 ve 48 saat MP ile inkübe edilen hücreler değerlendirildiğinde, 12. saatte 10^{-3} M derişimde (**Tablo 4. 3**) ve 24 saatte 5×10^{-4} - 10^{-3} M derişimlerde (**Tablo 4.3**) kontrole göre oldukça belirgin bir erken

apoptoz, 48. saatte 5×10^{-4} - 10^{-3} M derişimlerde (**Tablo 4.4**) geç apoptoz ve nekroz izlenmiştir. Bu sonuçlar göstermiştir ki, MP dozu ne kadar yüksek ise apoptoz o kadar erken görülmüştür. Bu da YDMP tedavisinin AML'li ve ekstramedüller tutulumu (göz, cilt vb.) olan çocuklarda kitlenin 3-7 gün gibi kısa sürede gerilemesinin apoptoz ile olduğunu düşündürmektedir. Özbek ve diğ. (55)'nin sayımlarına göre 24. saatte 10^{-3} molar derişim uygulanan hasta kemik iliğinden alınan AML-M1 hücrelerinde % 23-74, AML-M2 hücrelerinde % 6 ve AML-M3 hücrelerinde ise % 3 apoptoz tespit edilmiştir. Buradan da görülmektedir ki, metilprednizolonun apoptotik etkisi, doz ve uygulama saatleri yanı sıra AML alt gruplarına göre de değişiklik göstermektedir.

Anneksin V-FITC çalışmasından farklı olarak hücreler *Wright* boyası ile boyanıp görüntülendiğinde, 24. saatte 10^{-3} molar derişimde apoptotik cisimcikler, 48. saatte 5×10^{-4} - 10^{-3} M derişimlerde hem apoptotik cisimcikler hem de hücrelerin parçalandıkları gözlemlendi. Buradan hareketle MP'nin 10^{-3} M derişimlerinin 24. saatte apoptotik ve 48. saatte sitotoksik olduğu sonucuna varıldı.

Ayrıca 48 saat ve 96 saat uygulama yapılan hücrelerden DNA elde edilerek, %1.5'lük agaroz jel elektroforezi yapıldı. Bütün derişimlerde 48 saat inkübe edilen hücrelerin DNA'sının parçalara ayrıldığı ve 96 saat inkübe edilen hücrelerin DNA'sının smear oluşturduğu gözlemlendi (**Şekil 4.9**).

Yapılan bu çalışmada apoptotik etki 12 ve 24 saat gibi daha erken saatlerde görülmesine rağmen Omay ve diğ. (127)'nin yaptığı çalışmada, HL-60 hücrelerine 10^{-4} M derişim uygulanan MP'nin 72. saatte apoptotik etki gösterdiği bildirilmektedir. Bu çalışmayla çelişen bulgunun farkı yaptıkları deney yönteminde ortaya çıkmaktadır. Omay ve diğ.'nin çalışmasında hücre kültürleri, başlangıç saatinde 2×10^6 hücre/ml olarak kurulmuş ve gün aşırı besleme koşulları göz önüne alındığında hücrelerin apoptoza girmesi geç saatlerde gözlenmiş olabilir. Oysa yapılan bu çalışmada HL-60 hücrelerinin 36-48 saatte bir bölünmesi ve beslenme koşulu göz önüne alındığından dolayı, deney sonuna kadar besleme yapmadan daha

az sayıda (1×10^6 hücre/ml olarak) hücre ile deney seti başlatılmıştır. Ayrıca Omay ve diğ.'nin çalışmasında, HL-60 hücreleri akridin oranj/etidiyum bromür (AO/EB) ile boyanıp, immun flerösan mikroskopta görüntülenmiş ve yine 72. saatte apoptotik cisimcikler tespit edilmiştir.

Bu çalışmada farklılaşmayı göstermek için, yine HL60 hücrelerine 48, 72 ve 96 saat gibi ileri zamanlarda 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4} molar derişimlerde MP uygulandı. Çalışmanın başlangıcında hücrelerin tripan mavisi ile canlılık sayımları yapıldı ve canlılık oranları % 70-90 arasında bulundu. 5×10^{-4} M derişimde MP uygulanan hücrelerin canlılık yüzdeleri % 50 ye düştüğünden, çalışma 10^{-6} - 10^{-4} M derişimler arasında sınırlandırılmıştır. Ancak, monositik farklılaşma gösterilebilir kuşkusıyla CD14 hücre yüzey belirleyicisi için MP dozu beş kat artırılarak 5×10^{-4} M derişime çıkılmıştır Hücreler 48, 72 ve 96 saatlik inkübasyon sonunda granülositik ve monositik farklılaşmayı göstermek için CD11b, CD14 ve CD15 hücre yüzey belirleyicileri kullanılarak akım sitometride incelendiler.

Akım sitometrik inceleme sonuçlarına göre CD11-b düzeyinde (**Tablo 4.5**), 10^{-4} M derişim uygulamasında 72. saatte, 10^{-5} ve 10^{-4} M derişim uygulamalarında 72. ve 96. saatlerde belirgin bir artış gözlenmiştir. Buradan hareketle, MP'nin HL-60 hücrelerini granülositik olarak farklılaştırdığı sonucuna varılmıştır. Yüksel ve diğ. (63)'nin HL-60 hücrelerine 10^{-6} M arsenik tri-oksit ile birlikte 10^{-4} M metilprednizolon uygulamasına göre; 72. saatte % 60 ve 96. saatte % 80 oranında CD11-b artışı metilprednizolonun sinerjistik bir etki gösterdiğine işaret etmektedir.

Monositik farklılaşmayı incelemek için CD14 hücre yüzey belirleyicisi ile yapılan başlangıç çalışmalarında (**Tablo 4.6**), bütün saat ve doz uygulamalarında herhangi bir belirgin fark bulunamadığından ve MP'nin HL-60 hücrelerinde monositik farklılaşmayı sağlayamadığı sonucuna varılmıştır.

HL-60 hücrelerinin pozitif hücre yüzey belirleyicisi olan CD15 inceleme sonuçlarında (**Tablo 4.7**) da önemli bir değişiklik gözlemlenememiştir. Zaten, HL-60

hücreleri doğası gereği CD15 hücre yüzey belirleyicisini yüksek düzeyde eksprese etmektedir. Bu bulgularda da başlangıç saatindeki CD15 düzeyi %85'den, 72. ve 96 saat 10^{-5} M derişimde ancak %91'e ulaşmıştır.

Hücre yüzey belirleyici analizlerinden ayrıca, 10^{-6} - 10^{-4} M derişimde MP uygulanan HL-60 hücreleri *Wright* boyası ile boyandıktan sonra mikroskopik görüntüleri elde edildi. Bu görüntüleri göre de 72 saat 10^{-4} M derişim MP uygulanan hücrelerde ve 96 saat 10^{-5} M ve 10^{-4} M derişim MP uygulanan hücrelerde granüositik farklılaşmış hücreler tespit edildi. Bu sonuçlar, yüksek doz MP ile daha erken farklılaşmanın başladığına dikkati çekmektedir.

Farklılaşma sonuçları *Kolmogrov-Smirnov* istatistiksel incelenmesine göre değerlendirildiğinde de granüositik hücre yüzey belirleyicisi olan CD11-b'nin anlamlı artışına rağmen monositik hücre yüzey belirleyicisi olan CD14'te anlamlı bir fark bulunamamıştır. Makrofaj ve granüositik farklılaşma belirleyicisi olan CD15'te ise istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış bulunmuştur.

Günümüzde AML'de tedavi denemeleri steroid dışında farklılaşmayı uyaran diğer ajanlar ile de sürdürülmektedir. Bunlar içinde en önemli olanlardan biri de bir retinoik asit türevi olan *all-trans retinoic asit* (ATRA) olarak adlandırılan bir bileşiktir. İlk kez 1988'de Huang ve diğ. (126)'nin ATRA'yı kullanarak AML'nin M3 alt grubundan akut promyelositik lösemi (APL)'li hastalarda lösemik hücrelerin normal hücrelere farklılaşabileceğini göstermelerinden bu yana çalışmalar hız kazanmıştır. Ancak yıllardan beri devam eden ATRA çalışmalarından da görüldüğü kadarıyla henüz AML'nin diğer altgruplarında bir farklılaşma etkisi bulunamamıştır.

Bir başka farklılaşma uyarıcı ajan olarak bilinen ve tedavi protokollerinde yer alan Vinkristin (VCR)'nin ATRA ile birlikte gösterdikleri sinerjistik bir etki ile HL60 hücrelerinde granüositik farklılaşmayı göstermeleri, tedavi çalışmalarında ikili veya çoklu ilaç denemelerinin daha etkili olabileceğini göstermektedir (69).

Farklılaşmayı uyaran diğler önemli ajanlardan biri de vitamin-D türevleridir. Özellikle 1 α ,25 dihidroksivitamin-D3, özellikle monositik farklılaşmayı sağladığı bir çok in-vitro ve in-vivo çalışmada gösterilmiştir (68, 128).

Bu çalışmanın sonunda, MP'nin 10⁻³ M derişimlerinin sitotoksik etkili olduğu, 5x10⁻⁴ M derişimlerinin apoptozu uyardığı ve 10⁻⁴ M derişimlerinin granülositik farklılaşmayı gerçekleştirdiğı gösterilmiştir. Bu sonuçlar, klinik olarak YDMP'nin AML'li hastaların tedavisindeki başarılı sonuçlarını desteklemektedir.

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1. AML'nin M3 alt grubundan HL-60 hücre hattında MP'nin 10^{-3} M derişimleri 48. saatte sitotoksik etkili olmaktadır.
2. MP'nin 5×10^{-4} M derişimleri HL-60 hücrelerinde 24. saatte erken apoptozu ve 48. saatte geç apoptozu uyarmaktadır.
3. MP'nin 10^{-5} ve 10^{-4} M derişimleri 72. ve 96. saatlerde granülositik farklılaşmayı uyarmaktadır
4. MP'nin bu çalışmada kullanılan derişimlerinin HL-60 hücrelerinde monositik farklılaşmayı uyarmadığı gözlemlendi.
5. MP'nin 10^{-5} M derişimi 72. ve 96. saatlerde çok az bir granülosit-makrofaj hücre yüzey belirleyicisi (CD15) üzerinde etki göstermiştir.

Gelecek çalışmalarda, AML'nin diğer alt gruplarından olan K562 (eritrolösemi), U937 (myelomonositik lösemi), Molt4 (monositik lösemi), NB4 (15-17 translokasyonlu APL) ve Kasumi-1 (AML-M2) gibi hücre hatları ile primer blastlardan alınmış kültürlerde karşılaştırmalı olarak metilprednizolonun etkilerinin apoptoz, farklılaşma ve transkripsiyon faktörleri gen ekspresyon düzeyleri üzerine etkilerine bakılması planlanmıştır.

KAYNAKLAR

1. Lee, W.C., ve Testa, J.R., Techniques for identifying cancer genes, "Basic Science of Cancer" (Ed. G.D. Kruh ve K.D. Tew)'da. Current Medicine, Inc. Philadelphia, PA 19106, s.1, 2000.
2. Harnden, D.G., ve McGee J.O'D., Neoplasia "Oxford Textbook of Pathology" Volume 1 (Ed. J.O'D. McGee, P.G. Isaacson ve N.A. Wright) de. Oxford University Press, Oxford-New York-Tokyo, 1, s. 571-577, 1992.
3. Ekmekçi, A., ve Erbaş, D., Kanser ve Onkogenler "Kanserin Moleküler Mekanizması Onkogenler ve Büyüme Faktörleri" (A. Ekmekçi ve D. Erbaş)'nde. 72 Teksir Dizgi Fotokopi Ofset Tesisleri, Ankara. s. 44-46,1991.
4. Lee, H.S.J. ve Wright, J., 21/06/2005. Cancer History (online). http://www.rare_cancer.org/history-of-cancer.html. (01/09/2005).
5. Hoffbrand, A.V., Pettit J.E. ve Moss P.A.H., Acute Leukaemias "Essential Haematology" (A.V. Hoffbrand, J.E. Pettit ve P.A.H. Moss)'de. Blackwell ScienceLtd, Massachusetts-Oxford-Carlton, s. 162-179, 2001.
6. Mehta, A., ve Hoffbrand, V., Haematological Malignancy: basic mechanisms "Haematology at a Glance" (A. Mehta ve V. Hoffbrand)'te.Blackwell Science Ltd, Oxford, s. 54-55, 2000.
7. Bennett C., Hsu K. ve Look AT., Myeloid leukemia, myelodisplasia and myeloproliferative disease in children. "Nathan and Oski's Haematology of Infancy and Childhood (Ed.: D.G.Nathan, S.H.Orkin, D.Ginsburg, A.T.Look)'ta. W.B.Saunders, Philadelphia, USA, s.1167, 2003.
8. Kuşkonmaz, B., ve Çetin, M., Akut Myeloblastik Lösemi. Katkı Pediatri Dergisi, Lösemiler, 26(3):386-404, 2004.
9. Wiernik, P.H., Acute Myelocytic Leukemia, Encyclopedia of Cancer (Ed.Joseph, R., Bertino)'da, Elsevier Science NY, USA, 19-25, 2002
10. Goldman, J.M., Myeloproliferative Disorders, Oxford Textbook of Pathology, Vol.2b: 1717-23, 1992.
11. Ward, A.C., Touw, I. ve Yoshimura, A., The Jak-Stat patway in normal and perturbed hematopoiesis, Blood, 95(01), 19-26, 2000.

12. Tanyeli, A., Çocukluk Çağı Akut Lösemileri, II. Pediatrik Hematoloji Kongresi, Antalya, s.28-31, 1999.
13. David, M., Jak/Stat Patway, Encyclopedia of Cancer (Ed. Joseph, R., Bertino)'da, Elsevier Science, NY, USA, 537-542, 2002.
14. Bennet, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H.R. ve Sultan, C., Proposals for the classification of the acute leukemias: FAB cooperative group, Br. J. Haematol, 33(4): 451-458, 1976.
15. Bennet, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H.R., ve Wilman, C.L., Hypergranular promyelocytic leukemia: correlation between morphology and chromosomal translocations including t(15;17) and t(11;17), Leukemia, 14(7): 1197-1200, 2000.
16. Mecucci, C., Rosati, R., La Starza, R., Genetic Profile of Acute Myeloid Leukemia, Rev Clin Exp Hematol vol 6(1):3-25, 2002.
17. Kelly, L.M. ve Gilliland, D.G., Genetics of Myeloid Leukemias. Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 3:179-198, 2002.
18. Virtaneva, K., Wright, F.A.; Tanner, S.M., Yuan, B., Lemon, W.J., Caligiuri, M.A., Bloomfield, C.D., de La Chapelle, A., Krahe, R., Expression profiling reveals fundamental biological differences in acute myeloid leukemia with isolated trisomy 8 and normal cytogenetics, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98:1124-1129, 2001.
19. Hayakawa, F., Towatari, M., Kiyoi, H., Tanimoto, M, Kitamura, T, Saito, H, Naoe, T., Tandem-duplicated FLT3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL3 dependent cell lines, Oncogene 19: 624-631, 2000.
20. Mizuki, M., Schwable, J., Steur, C., Choudhary, C., Agrawal, S., Sargin, B., Steffen, B., Matsumura, I., Kanakura, Y., Bohmer, F.D., Muller-Tidow, C., Berdel, W.E., ve Serve, H., Suppression of myeloid transcription factors and induction of STAT response genes by AML-specific Flt3 mutations. Blood,101(8):3164-3173, 2003.
21. Yanada, M., Matsuo, K., Suzuki, T., Kiyoi, H. ve Naoe, T., Prognostic significance of Flt3 internal tandem duplication and tyrosine kinase domain mutations for acute myeloid leukemia: a meta analysis, Leukemia, 19(8), 1345-1349, 2005.

22. Kiyoi, H. ve Naoe, T., Flt3 in human hematologic malignancies, *Leuk. Lymphoma*, 43(8), 1541-1547, 2002.
23. Naoe, T. ve Kiyoi, H., Normal and oncogenic Flt3, *Cell Mol. Life Sci.* 61(23), 2932-2938, 2004.
24. Ozeki, K., Kiyoi, H., Hirose, Y., Iwai, M., Ninomiya, M., Kodera, Y., Miyawaki, S., Kuriyawa, K., Schimazaki, C., Akiyama, H., Nishimura, M., Motoji, T., Shinugawa, K., Takeshita, A., Ueda, R., Ohno, R., Emi, N. ve Naoe, T., Biologic and clinical significance of the Flt3 transcript level in acute myeloid leukemia, *Blood*, 103(5)1901-1908, 2004.
25. Minami, Y., Kiyoi, H., Yamamoto, Y., Yamamoto, K., Ueda, R., Saito, H. ve Naoe, T., Selective apoptosis of tandemly duplicated Flt3- transformed leukemia cells by Hsp90 inhibitors, *Leukemia*, 16(8), 1335-1340, 2002.
26. Minami, Y., Yamamoto, K., Kiyoi, H., Ueda, R., Saito, H. ve Naoe, T., Different antiapoptotic pathways between wild-type and mutated Flt3: insights into therapeutic targets in leukemia, *Blood*, 102(8), 2969-2975, 2003.
27. Beghini, A., Peterlonga, P., Ripamonti, C.B., Cairoli, R., Mecucci, C., Morra, E., ve Larizza, L., C-kit mutations in core binding factor leukemias. *Blood* 95: 726-727, 2000.
28. Helbling, D.; Mueller, B. U.; Timchenko, N. A.; Hagemeyer, A.; Jotterand, M.; Meyer-Monard, S.; Lister, A.; Rowley, J. D.; Huegli, B.; Fey, M. F.; Pabst, T., The leukemic fusion gene AML1-MDS1-EV11 suppresses CEBP-A in acute myeloid leukemia by activation of calreticulin, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 101: 13312-13317, 2004.
29. Pabst, T., Mueller, B.U., Harakawa, N., Schoch, C., Haferlach, T., Behre, G., Hiddemann, W., Zhang, D.E. ve Tennen, D.G., Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBP), in acute myeloid leukemia, *Nat. Genet* 27: 263-270, 2001.
30. Michaud, J., Wu, F., Osato, M., Cottles, G.M., Yanagida, M., Asou, N., Shigeseda, K., Ito, Y., Benson, K.F., Raskind, W.H., Rossier, C., Antonarakis, S.E., Israels, S., McNicol, A., Weiss, H., Horwitz, M. ve Scott, H.S., In-vitro analyses of known and novel RUNX1/AML1 mutations in dominant familial platelet disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia: implications for mechanisms of pathogenesis. *Blood*, 99(4), 1364-1372, 2002.
31. Ito, Y., Oncogenic potential of the RUNX gene family, *Oncogene*, 23(24), 4198-4208, 2004.

32. Huang, G., Shigesada, K., We, H.J., Liu, P.P., Osato, M., Ito, Y., Molecular basis for a dominant inactivation of RUNX1/AML1 by the leukomogenic inversion 16 chimera, *Blood*, 103(8), 3200-3207, 2004.
33. Buijs, A., Poddighe, P, van Wijk, R., van Solinge, W., Borst, E., Verdonck, L., Hagenbeek, A. ve Pearson, P., A novel CBFA2 single-nucleotide mutation in familial platelet disorder with propensity to develop myeloid malignancies. *Blood* 98, 2856-2858, 2001
34. Yanagida, M., Osato, M., Yamashita, N., Liqun H., Jacob, B., Wu, F., Cao, X., Nakamura, T., Yokomizo, T., Takahashi, S., Yamamoto, M., Shigeseda, K. ve Ito Y., Increased dosage of RunX1/AML1 acts as a positive modulator of myeloid leukomogenesis in BXH2 mice, *Oncogene*, 24(28), 4477-4485, 2005.
35. Raumier, C., Fenaux, P., Lafage, M., Imbert, M., Eclache, V. ve Preudhomme, C., New mechanisms of AML1 gene alterations in hematological malignancies, *Leukemia*, 17(1), 9-16, 2003.
36. Guyton A.C., Hall J.E., *Introduction to Endocrinology, Textbook of Medical Physiology*, W.B. Saunders, s.926-932, 1996.
37. Fenteany, G., 26/08/2005. SignalTransduction, <http://www.biochemweb.org/signaling.shtml> (31/08/2005).
38. Tumer, A., *Hormon reseptörlerinin lokalizasyonu, Endokrinolojiye Giriş, Meteksan*, Ankara 1989.
39. Schrader, T.W., New model for steroid hormon receptors *Nature*, 308, 17-18, 1984.
40. Evans, M.R., The steroid and Tyroid hormon receptor superfamily. *Science* 240(4854), 889-894, 1988.
41. Valverde, M.A. ve Parker, M.G., Classical and novel steroid actions: a unified but complex view, *TRENDS in Biochemical Sciences*, 27(4), 172-173, 2002.
42. Hiçsönmez, G., The effect of steroid on myeloid leukemic cells: The potential of short-course high-dose methyleprednisolone treatment in inducing differentiation, apoptosis and in stimulating myelopoiesis, *Leukemia Research*, 2005.

43. Hicsonmez, G., Ozsoylu, S., Tuncer, M., Erturk, G., Ozbek, N. ve Karadeniz, N., Direct morphological evidence of high dose methylprednisolone-induced maturation of leukemic cells in children with acute nonlymphoblastic leukemia, *Experimental Hematol*, 19, 232-233 1991.
44. Tuncer, A.M., Hicsonmez, G., Erturk, G., Gumruk, F., Albayrak, D. ve Oguz, H., The effect of HDMP treatment on GM-CSF level in children with acute leukemia: A pilot study, *Leukemia Research* 16(6/7), 615-619, 1992.
45. Hicsonmez, G., Ozsoylu, S. ve Tuncer, M., Differentiation of myeloid leukemic cells induced by high-dose methylprednisolone and its therapeutic potential for acute myeloblastic leukemia *Leukemia Research*. 15, 537-541 1991.
46. Hicsonmez, G., Karadeniz, N., Prozorova-Zamani, V., Tuncer, M.A., Gumruk, F., Erturk, G., Gurgey, A. ve Ozsoylu, S., High remission rate in acute myeloblastic leukemia in children treated with HDMP, *Eur. J. Haematol*. 48, 215-220 1992.
47. Hicsonmez, G., Tuncer, M., Güler, E., Tan, E. ve Tekelioğlu, M., The potential role of high-dose methylprednisolone on the maturation of leukemic cells in children with acute promyelocytic leukemia, *Exp. Hematol*. 21, 599-601, 1993.
48. Hicsonmez, G., Tuncer, M., Cetin, M., Gumruk, F., Kara, A. ve Yalcın, S., Morphologic evidence of in-vivo differentiation in acute myeloblastic leukemia, *Acta Hematol*, 90, 214-215, 1993.
49. Hicsonmez, G., Tuncer, M., Toksoy, H.B., Yenicesu, I. ve Cetin, M., Differentiation of leukemic cells induced by short-course high-dose methylprednisolone in patients with different subtypes of acute myeloblastic leukemia, *Leuk. Lymphoma*, 33, 573-580, 1999.
50. Hiçsönmez, G., Erdemli, E., Tekelioğlu, M., Tuncer, A.M., Özbek, N., Çetin, M. ve Cotter, T.G., Morphologic evidence of apoptosis in childhood acute myeloblastik leukemia treated with high-dose methylprednisolone, *Leukemia and Lymphoma*, 22, 91-96, 1996.
51. Cetin, M., Hicsonmez, G., Tuncer, A.M., Kansu, E. ve Canpinar, H., The effect of short course high dose corticosteroid therapy on peripheral blood CD34 progenitor cells in children with acute leukemia, *Experimental Hematology*, 24, 1191-1194, 1996.

52. Olcay, L., Hiçsönmez, G., Ertem, U., Okur, H. ve Tuncer, A.M., The importance of cell size and surface marker analysis in childhood acute myeloblastik leukemia, *Leukemia Research*, 000, 1-7, 1999.
53. Hicsonmez, G., A novel approach to treatment with high-dose steroid as a differentiation inducer in children with acute myeloblastic leukemia, *Pediatric Pathology and Molecular Medicine*, 19, 251-59, 2000.
54. Shimohakamada, Y., Shinohara, K. ve Fukuda, N., Remission of Acute Myeloblastic Leukemia after severe pneumonia treated with HDMP, *Int J. Hematol.* 74, 173-177, 2001.
55. Özbek, N., Erdemli, E., Hiçsönmez, G., Okur, H. ve Tekelioglu, M., Effects of methylprednisolone on human myeloid leukemic cells in-vitro, *American Journal of Hematology* 60, 255-259, 1999.
56. Tallman, M.S. ve Nabhan, C., Management of acute promyelocytic leukemia, *Curr. Oncol. Rep.*, 4(5), 381-389, 2002.
57. Tallman, M.S., Gilliland D.G. ve Rowe, J.M., Drug therapy for acute myeloid leukemia, *Blood*, 106(4), 1154-1163, 2005.
58. Hozumi, M., Differentiation therapy of leukemia: achievements, limitations and future prospects, *Int. J. of Hematology*, 68, 107-129, 1998.
59. Bruserud, O., Gyerdson, B.T. ve Huang, T.J., Induction of Differentiation and Apoptosis –A possible Strategy in the treatment of Adult Acute Myelogenous Leukemia, *The Oncologist*, 5, 454-462, 2000.
60. Ozpolat, B., Lopez-Berestein, G. ve Mehta, K., ATRA (ouble) in the treatment of acute promyelocytic leukemia, *J. Biol. Regul. Homeost.*, 15, 107-122, 2001.
61. Lin, R.J., Sternsdorf, T., Tini, M. ve Evans, R.M., Transcriptional regulation in acute promyelocytic leukemia, *Oncogene* 20(49): 7204-7215, 2001.
62. Zhu J., Lallemand-Breitenbach, V. ve de The, H., Patways of retinoic acid- or arsenic trioxide- induced PML/RAR- α catabolism, role of oncogene degradation in disease remission, *Oncogene* 20(49), 7527-7265, 2001.
63. Yüksel, S., Saydam, G., Uslu, R., Sanli, U.A., Terzioglu, E., Büyükkececi, F. ve Omay, S.B., Arsenic trioxide and methylprednisolone use different signal transduction pathways in leukemic differentiation, *Leukemia Research*, 26, 391-398, 2002.

64. Matsui, W., Smith, B.D., Vala, M., Beal, N., Huff, C.A., Diehl, L.F. ve Jones, R.J., Requirement for myeloid growth factors in the differentiation of acute promyelocytic leukaemia, *Br. J. Hematology*, 128: 853-862, 2005.
65. Omay, S.B., Ogasawara, H., Toyoda, H., Nakai, K., Shima, H., Nagao, M., Mumby, M.C., Shiku, H. ve Nishikawa, M., Translocation of protein phosphatase 1 catalytic subunits during 1,25-dihydroxyvitamin D₃-induced monocytic differentiation of HL-60 cells, *Cancer Research*, 55(4), 774-780, 1995.
66. Omay, S.B., Nakai, K. ve Kuno T., 1,25-dihydroxyvitamin D₃-induced upregulation of calcineurin during leukemic HL-60 cell differentiation, *Blood* 87, 2947-2955, 1996.
67. Hughes, P.J., Steinmeyer, A., Chandraratna, R.A. ve Brown, G., 1 alpha,25-dehydroxyvitamin D₃ stimulates steroid sulphatase activity in HL-60 and NB4 acute myeloid leukemia cell lines by different receptor-mediated mechanisms, *J. Cell Biochem.*, 94(6), 1175-1189, 2005.
68. Savli, H., Aalto, Y., Nagy, B., Knuutila, S. ve Pakala, S., Gene expression analysis of 1,25 (OH)₂D₃-dependent differentiation of HL60 cells: a cDNA array study, *Br. J Hematol*, 118, 1065-1070, 2002.
69. Leung, M.F. ve Wong, K.F., The differentiation effect of retinoic acid and vincristine on acute myeloid leukemia, *Journal of Hematotherapy*, 8, 275-279, 1999.
70. Huang, W.W., Yang, J.S., Lin, C.F., Ho, W.J. ve Lee, M.R., Pycnogenol induces differentiation and apoptosis in human promyeloid leukemia HL-60 cells, *Leukemia Research*, 29, 685-692, 2005.
71. Giles, F.J., New drugs in acute myeloid leukemia, *Curr. Oncol. Rep.*, 4(5), 369-374, 2002.
72. Schmelz, K., Sattler, N., Wagner, M., Lubbert, M., Dorken, B. ve Tamm, I., Induction of gene expression by 5-aza-2'-deoxycytidine in acute myeloid leukemia (AML) and myelodysplastic syndrome (MDS) but not epithelial cells by DNA-methylation-dependent and independent mechanisms, *Leukemia*, 19(1), 103-11, 2005.
73. Insinga, A., Monestiroli, S., Ronzoni, S., Gelmetti, V., Marchesi, F., Viale, A., Altucci, L., Nervi, C., Minucci, S. ve Pelicci, P.G., Inhibitors of histone deacetylases induce tumor-selective apoptosis through activation of the death receptor pathway, *Nature Medicine*, 11, 71-76, 2005.

74. Nebbioso, A., Clarke, N., Voltz, E., Germain, E., Ambrosino, C., Bontempo, P., Alvarez, R., Schiavone, E.M., Ferrara, F., Bresciani, F., Weisz, A., de Lera, A.R., Gronemeyer, H. ve Altucci, L., Tumor-selective action of HDAC inhibitors involves TRAIL induction in acute myeloid leukemia cells, *Nature Medicine*, 11, 77-84, 2005.
75. Kerr, J.F.R., Shrinkage Necrosis. A distinct model of cell death, *Journal of Pathology*, 105, 13. 1971.
76. Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H. ve Currie, A.R., Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics, *Br. J. Cancer*, 26, 239-257, 1972.
77. Yehielly, F., ve Deiss, L.P., Apoptosis and cancer, *Basic Science of Cancer* (Ed. Kruh, G.D. ve Tew, K.D.)'da, Chapter 11, *Current Medicine inc*, Philadelphia, 2000.
78. Wyllie, A.H., ve Duvall, E., *Cell Injury and Death*, *Oxford Textbook of Pathology* (Ed. McGee JOD, Isaacson P, ve Wright NA)'de. University Press. Oxford-NewYork-Tokyo, Vol 1, s. 1141-1157, 1992.
79. Green, D.R. ve Kromer, G., The pathophysiology of mitochondrial cell death, *Science*, 305(5684), 626-629, 2004.
80. Ricci, J.E., Waterhouse, N. ve Green, D.R., Mitochondrial functions during cell death, a complex (I-V) dilemma, *Cell Death Differ.*, 10(5), 488-492, 2003.
81. Lahin, A., Paradisi, A., Green, D.R. ve Melino, G., Death fold domain interaction in apoptosis, *Cell Death Differ.*, 10(1), 10-12, 2003.
82. Green, D.R. ve Evan, G.I., A matter of life and death, *Cancer cell*, 1(1), 19-30, 2002.
83. Wolf, B.B. ve Green, D.R., Apoptosis: letting slip the dogs of war, *Curr. Biol.* 12(5), R177-R179, 2002.
84. Lozano, G. ve Elledge, S. J., p53 sends nucleotides to repair DNA, *Nature*, 404, 24-25, 2000
85. Carr, A.M., Piecing Together the p53 puzzle, *Science*, 287, 1765-1766, 2000.
86. Jaattela, M., Escaping cell death, survival proteins in cancer, *Exp. Cell Research*, 248(1), 30-43, 1999.

87. Jaattela, M., Programmed cell death: many ways for cells to die decently, *Ann. Med.*, 34(6), 480-488, 2002.
88. Curtin, J.F. ve Cotter, T.G., Apoptosis: Historical perspectives. *Assays Biochem.* 39, 1-10, 2003.
89. Jaattela, M., Multiple cell death pathways as regulators of tumor initiation and progression, *Oncogene*, 449(2), 175-185, 2004.
90. O’Gorman, D.M. ve Cotter, T.G., Molecular signals in anti-apoptotic survival pathways, *Leukemia*, 85(1), 115-121, 2001.
91. Schroter, M., Peli, J., Hane, M., Tschopp, J. ve Reichmann, E., Fas-dependent tissue turnover is implicated in tumor cell clearance, *Oncogene*, 19(14), 1794-1800, 2000.
92. Nagata, S., Steering anti-cancer drugs away from the TRAIL, *Nat. Medicine*, 6(5), 502-503, 2000.
93. Boudard, D., Vasselon, C., Bertheas, M.F., Jaubert J., Mounier, C., Reynoud, J., Viallet, A., Chautard, S., Guyotat, D. ve Campos, L., Expression of prognostic significance of Bcl-2 family proteins in myelodysplastic syndromes, *Am. J. Hematol.*, 70(2), 115-125, 2002.
94. Lotem, J. ve Sachs, L., Cytokine control of developmental programs in normal hematopoiesis and leukemia, *Oncogene* 21(21), 3284-3254, 2002.
95. Kamps, P.M., Differentiation and Cancer: Basic Research, *Encyclopedia of Cancer* (Ed Joseph R. Bertino)’da, Elsevier Science USA, s.49-63, 2002.
96. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. ve Watson, J.D., Differentiated cells and the maintenance of tissues, *Molecular Biology of the Cell*, Garland Publishing, Inc. New York ve London, s.1139-1194, 1994.
97. Martin, G.S., Normal Cells and Cancer Cells, *Scientific American Molecular Oncology* (Ed. Bishop, J.M. ve Weinberg, R.A.)’de, Scientific American Inc. New York, s. 13-40, 1996.
98. Prasad, K., Hovland, A.R., Nahreini, P., Cole, W.C., Hovland, P., Kumar, B. ve Prasad, K.C., Differentiation Genes: Are they primary targets for human carcinogenesis? *Exp. Biol. Med.*, 226(9), 805-813, 2001.

99. Smithgall, T.E., Signal Transduction Pathways regulating hematopoietic differentiation, *Pharmacological Reviews*, 50(1), 1-19, 1998.
100. Ward, A.C., Loeb, D.M., Soede-Bobok, A.A., Touw, I.P., ve Friedman, A.D., Regulation of granulopoiesis by transcription factors and cytokine signals, *Leukemia*, 14, 973-990, 2000.
101. Crans, H.N. ve Sakamoto, K.M., Transcription factors and translocations in lymphoid and myeloid leukemia, *Leukemia* 15, 313-331, 2001.
102. Giles, R.H., Peters, D.J. ve Breuning, M.H., Conjunction dysfunction: CBP/p300 in human disease, *Trends Genetics*, 14(5), 178-183, 1998.
103. Benjamin Lewin, Signal Transduction, *Genes VIII'de*, Pearson Education Inc. N.J., s. 811-842, 2004.
104. MAP Kinase modules in signaling, *Encyclopedia of Cancer* (Joseph R. Bertino)'da, Elsevier Science USA, s. 119-129, 2002.
105. Nguyen, M.H., Ho, J.M., Beattie, B.K. ve Barber, D.L., TEL/JAK2 mediates constitutive activation of the phosphatidylinositol 3'-kinase/protein kinase B signaling pathway, *J. Biol. Chem.* 276(35), 32704-32713, 2001.
106. Ward, A.C., Touw, I. ve Yoshimura, A., The Jak-Stat pathway in normal and perturbed hematopoiesis, *Blood* 95(1), 19-26, 2000.
107. Aktaş E, Lökosit yüzey molekülleri, *Flow Sitometre*, İst Üniv. DETAE, s.31-42, 2004.
108. Alice Longabardi Givan, *Diseases and Diagnosis: The Clinical Lab. Flow Cytometry*, Wiley-Liss, Inc., N.Y., s. 135-149, 1992.
109. Kipps, T.J., *Flow Cytometry*, Williams Hematology (Ed. Beutler E, Lichtman MA, Coller BS)'de, McGraw-Hill Inc USA, s. L56-L63, 1995.
110. Alice Longabardi Givan, *Flow Cytometry First Principles*, Wiley-Liss, Inc., N.Y., s. 1-41, 1992.
111. Stewart, C.C., Goolsby, C. ve Shackney, S.E., Emerging technology and developments in flow cytometry, *Hematol. Oncol. Clin. North. Am.*, 16(2), 477-495, 2002.

112. Stewart, C.C. ve Stewart, S.J., Multiparameter data acquisition and analysis of leukocytes by flow cytometry, *Methods Cell Biol.*, 64, 289-312, 2001.
113. Pruitt, S.C., Mielnicki, L.M. ve Stewart, C., Analysis of fluorescent protein expressing cells by flow cytometry, *Methods Mol. Biol.*, 263, 239-258, 2004.
114. Uçar, F., Hücre Kültüründe Temel İlkeler, Hematolojide Uygulamalı Hücre Kültür Teknikleri (ed. Ovalı E.) 'nde, 7-16, 2003
115. Fleck, R.A., Use of HL60 cell line to measure opsoniv capacity of pneumococcal antibodies. *Clin. Diag. Lab. Immuno.*, 12(1), 19-27, 2005.
116. Bilgin, A. A., Steroid Hormonlar, *Farmasötik Kimya* (Ed. Akgün H)'da, Ankara, s.671-631, 2004.
117. *Curr. Pro. Mol. Bio.*, Fig. A3F1 by John Wiley Sons Inc., 1996.
118. Dalva, K., Apoptozun akım sitometresinde değerlendirilmesi, *Hematolojide Uygulamalı Hücre Teknikleri*, s. 125-134, 2003.
119. MBL Catalog International Corporation, Apoptosis detection by annexin-V, s. 12, 2003.
120. Kolmogrov-Smirnov Test,
<http://www.physics.csbj.edu/stats/KS-test.html>. (20/07/2005).
121. Kruskal-Wallis Test,
<http://www.socr.stat.ucla.edu/Applets.dir/ChoiceOfTest.html> (20/07/2005).
122. Kruskal-Wallis Test,
http://www.ku.edu/coms/virtual_assistant/vsa/fivk.htm (20/07/2005).
123. Lotem, J., ve Sachs, L., Induction of specific changes in the surface membrane of myeloid leukemic cells by steroid hormones, *Int. J. Cancer*, 15, 731-740, 1975.
124. Sachs, L., Control of normal cell differentiation and phenotypic reversion of malignancy in myeloid leukemia, *Nature*, 274, 535,1978.

125. Honma, Y., Kasukabe, K., Okabe, J. Ve Hozumi, M., Glucocorticoid binding and mechanism of resistance in some clones of mouse myeloid leukemic cells resistant to induction of differentiation by dexamethasone, *J. Cell Physiol.*, 93, 227-235, 1977.
126. Huang, M.E., Ye, Y.C., Chen S.R., Chai, J.R., Lu, J.X., Zhao, L., Gu, L.J. ve Wang, Z.Y., Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia, *Blood*, 72, 567-572, 1988.
127. Omay, S.B., Saydam, G., Aydın, H.H., Selvi, N., Oktem, G., Sanli U.A., Tobu, M. Ve Büyükkeçeci, F., Potential involvement of calcineurin in regulating the state of differentiation and apoptosis of HL-60 cells during methylprednisolone treatment, *Turk. J. Haematol.*, 20(3), 143-151, 2003.
128. White, S.L., Belov, L., Barber, N., Hodgkin, P.D. ve Christopherson, R.I., Immunophenotypic changes induced on human HL60 leukemia cells by $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 and 12-*O*-tetradecanoyl phorbol-13-acetate, *Leukemia Research* 29, 1141-1151, 2005.

EK

İleri Saatlerde MP Uygulanan HL-60 Hücrelerinde CD11-b, CD14 ve CD15 Hücre Yüzey Belirleyicileri ile Akım Sitometrik İnceleme Sonuçları.

0.SAAT:

CD11-b : 1.80%

CD14 : 0.045%

CD15 : 85.59%

120. SAAT

	CD11-b		CD14		CD15	
	Sonuçlar	Ortalama	Sonuçlar	Ortalama	Sonuçlar	Ortalama
10⁻⁶ M	13.02	13.08	0.52	0.41	98.83	98.77
	13.15		0.29		98.71	
10⁻⁵ M	2.35	3.06	0.13	0.17	97.95	98.20
	3.78		0.21		98.45	
10⁻⁴ M	5.86	5.37	0.12	0.24	92.76	92.33
	4.88		0.35		91.89	

144. SAAT

	CD11-b		CD14		CD15	
	Sonuçlar	Ortalama	Sonuçlar	Ortalama	Sonuçlar	Ortalama
10⁻⁶ M	2.44	3.70	0.24	0.64	97.06	97.56
	4.96		1.04		98.06	
10⁻⁵ M	3.47	2.87	1.29	1.31	71.04	71.19
	2.26		1.32		71.34	
10⁻⁴ M	0.79	0.67	1.33	1.61	49.38	51.52
	0.52		1.88		53.67	

168. SAAT

	CD11-b		CD14		CD15	
	Sonuçlar	Ortalama	Sonuçlar	Ortalama	Sonuçlar	Ortalama
10⁻⁶ M	3.20	2.82	0.21	0.31	96.85	92.11
	2.45		0.40		86.46	
10⁻⁵ M	1.02	1.03	0.21	0.27	92.28	90.11
	1.03		0.33		87.94	
10⁻⁴ M	1.44	1.64	0.33	0.50	70.41	64.16
	1.84		0.67		57.91	