

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**AKUT MYELOİD LÖSEMİ HÜCRE SERİSİNDE
ORAL ANTİDİYABETİK PPAR- γ AGONİSTİ
ROZİGLİTAZON MALEATIN ETKİLERİ**

İÇ HASTALIKLARI UZMANLIK TEZİ

Dr. Iğın YILDIRIM ŞİMŞİR

TEZ DANIŞMANI

Y. Doç. Dr. Şevki ÇETİNKALP

İZMİR

-2008-

ÖNSÖZ

Asistanlık eğitimim süresince yardımlarını esirgemeyen ve her konuda desteğini gördüğüm İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı değerli hocam Prof. Dr. Fehmi AKÇIÇEK' e,

İlgi çekici ve araştırma olanağı da sağlayan tez konumun oluşturulmasında emeği geçen, her zaman açık fikirli ve hoş görülü olan, yardım ve önerilerini benimle paylaşan tez danışman hocam Y. Doç. Dr. Şevki ÇETİNKALP' e,

Her zaman sorularıma cevap bulduğum, bilgi ve birikimini paylaşan, laboratuvar çalışmalarında sabırlı, öğretici, zamanını ve ilgisini esirgemeyen Uz. Dr. Fahri ŞAHİN' e,

Bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan Doç. Dr. Güray SAYDAM' a,

Laboratuvar çalışmalarım sırasında yardımlarını ve güler yüzlerini esirgemeyen sayın Reyhan AKAR ve Senay COŞKUN' a,

Verilerin istatistiksel analizine yardım eden Prof. Dr. Hayal BOYACIOĞLU'na,

Kazandığım bilgi ve becerinin gelişmesine, olgunlaşmasına katkısı olan tüm hocalarıma,

Desteğini her zaman yanımda hissettiğim eşim Dr. Adnan ŞİMŞİR' e,

TEŞEKKÜRLERİMİ SUNARIM.

Dr. Iğın YILDIRIM ŞİMŞİR

İZMİR, 2008

İÇİNDEKİLER

1. ÖZET	4
2. GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER	6
3. AMAÇ.....	37
4. GEREÇ VE YÖNTEM	39
Lösemik Hücre Dizisi ve Hücre Kültürü	39
Kullanılan Kimyasallar	44
Kullanılan Cihazlar	45
Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi.....	46
Sitotoksitenin Değerlendirilmesi.....	47
İstatistiksel Değerlendirme	50
5. SONUÇLAR	51
6. TARTIŞMA.....	56
7. KAYNAKLAR.....	62

1. ÖZET

PPAR'lar ligandla regüle edilen transkripsiyon faktörleridir ve çeşitli gen ürünlerinin ekspresyonunu sağlarlar. Fizyolojik ya da farmakolojik olarak ligandları ile aktiveleşen PPAR' lar aktiflenirler. Başlıca yol ligand bağlayarak olan aktivasyondur. Takiben retinoid X Reseptörü (RXR) ile heterodimer oluşturduktan sonra hedef genin DNA' sında spesifik bölgelere bağlanırlar.

PPAR' lar lipid metabolizmasında kritik regülatuar role sahiptirler. PPAR' ların sentetik ligandları olarak bilinen tiazolidinedionlar ve fibratlar, diyabet ve dislipidemi tedavisinde yerlerini almışlardır. Bunun yanında PPAR' ların patolojik yollarda da potansiyel rol sahibi oldukları saptanmıştır. Bu sayede PPAR' ların kanser, ateroskleroz, inflamasyon, infertilite ve demyelinizan hastalıkların tedavisinde nasıl bir rol alabilecekleri araştırılmaktadır.

Tüm dünyada kardiyovasküler hastalıklardan sonra kanserden ölüm oranı ikinci sırada yer almaktadır. Akut lösemilerde, lösemik blastların çoğalmaları ve kemik iliğinde birikimleri sonucunda kemik iliğinde normal hematopoetik fonksiyon gösterecek hücreler baskılanır ve kemik iliğinde yetersizlik meydana gelir.

Yapılan çalışmalarla TZD' ların insanlarda pek çok kanser hücre hatlarında orta derecede antiproliferatif etki gösterdiği ve apoptozisi artırdığı saptanmıştır.

Yapılan bu araştırmada HL-60 hücre dizisinde saf bir PPAR γ agonisti olan roziglitazon maleatın antiproliferatif, apoptozisi ve differansiyasyonu indükleyici etkileri, bu etkilerin hangi mekanizmalar üzerinden ortaya çıktığı in vitro koşullarda araştırılmıştır.

Rozigitazon maleat için inhibitör konsantrasyon (IC₅₀) dozu 75 mikromolar (mM) olarak belirlenmiştir.

Bu çalışma ile lösemik hücre hatlarında apoptozis, differansiyasyon ve hücre siklusu ile daha geniş bilgi edinilmeye çalışılmış ayrıca ilerideki çalışmalara yol gösterebilecek sonuçlar elde edilmiştir. Bu sayede akut lösemi tedavisinde bir aşama daha katdedilebilecektir. Dirençli AML-M3 olgularında PPAR γ agonisti roziglitazon maleatın additif etki yaratıp yaratmayacağı ileri çalışmalar için amaçlanabilir.

2. GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER

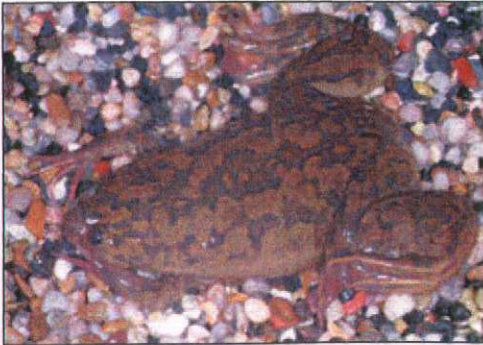
2.1. Peroksizom- Proliferatör- Aktive Edici Reseptörler (PPAR' lar)

2.1.1. Tanım

PPAR'lar 48 üyesi tanımlanmış nükleer reseptör süper ailesine bağlı bir nükleer reseptör grubudur (1, 2, 3).

2.1.2. Tarihçe

İlk tanımlanan PPAR olan PPAR- α 1980' lerin başında keşfedildi. İlk kez *Xenopus laevis* adıyla bilinen Afrika tırnaklı kurbağasında (Resim 1) ve kemirgen karaciğer dokusunda insülin duyarlılığını artırması yanında peroksizom sayısını da artırdığı için peroksizom proliferatörü olarak adlandırıldı. Peroksizom sayısını artırarak kemirgen karaciğer dokusunun açıl Co A oksidaz gibi peroksizomal beta oksidasyon enzimlerini ve bu sayede yağ asidi metabolizma kapasitesini artırdığı görüldü (4). Hemen ardından farmakolojik olarak fibratlarla ilişkili oldukları gösterildi (2, 5).

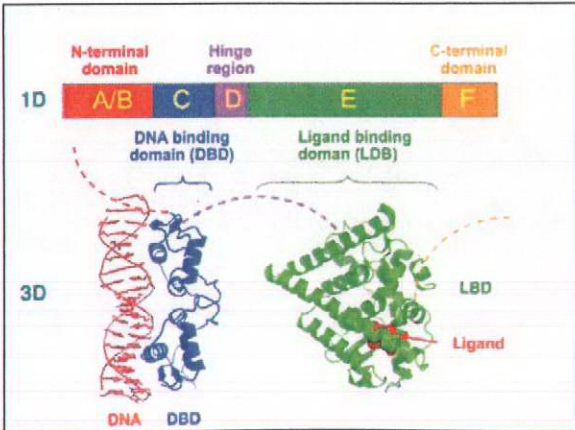


Resim 1: *Xenopus laevis*

2.1.3. Nükleer reseptörler

Nükleer reseptörler DNA'ya bağlanarak etki gösterirler. Etkileri gen transkripsiyonunu regüle etmektir. Bu etki iki farklı şekilde görülür; ya reseptör önce ligandına bağlanır ve daha sonra ikisi birlikte DNA'ya bağlanırlar ya da reseptör önce DNA'ya bağlanır ve daha sonra ligandı reseptöre bağlanır. Ligandın nükleer reseptöre ulaşmadan önce plasma membranından çekirdeğe kadar taşınması gereklidir. Ligandın hücre membranından geçişi genellikle pasif difüzyon ile olur, bunun yanında taşıyıcı proteinler de kullanılır. Nükleer reseptörler hücre içinde endoplasmik retikulumda sentez edilirler ve daha sonra çekirdeğe geçerler. Nükleer reseptörler DNA'ya ya monomer olarak ya da dimer olarak bağlanırlar. Dimer bağlanma da homodimer ya da heterodimer olarak iki farklı şekilde gerçekleşebilir (6, 7, 8, 9, 10, 11).

Nükleer reseptörler N terminal ucundan C terminal ucuna kadar dört farklı bölüm içerirler. A ve B bölgeleri transaktivasyon, C bölgesi DNA'ya bağlanma bölgesi, D bölgesi menteşe bölgesi, E ve F bölgeleri ise ligand bağlama-dimerizasyon-transaktivasyon bölgelerini içerirler.



Şekil 1: Nükleer reseptörlerin bir boyutlu ve üç boyutlu şematik bölümleri (12)

Nükleer reseptörlere ligand bağlanmasında nükleer reseptörün yüzey yapısı önemlidir. Ligand reseptör yüzeyinde şekilsel bir uyum gösteren bir kaviteye bağlanır. Bağlanmayı takiben reseptörde şekilsel bir değişim gerçekleşir ve reseptör fosforilize olur. Nükleer reseptör DNA' ya C bölgesi ile bağlanır. C bölgesi DNA üzerine iki adet çinko atomu içeren parmaklı çıkıntı (zinc finger) ile oturur. Her bir çinko atomu etrafında dörder adet sistein mevcuttur. Bu çinko ve sistein yapıları parmaklı çıkıntıların gergin bir halde tutulmalarını sağlar. C bölgesinde ayrıca iki adet özel bölüm belirlenmiştir. D ve P kutuları olarak adlandırılan bu bölgelerden P kutusu bağlanma özgülüğünü sağlarken D kutusu ise dimerizasyonda önem kazanmaktadır. Menteşe bölgesi olarak D bölgesi dimerizasyon ve taşınmada rol oynar. A-B bölgeleri ise fonksiyonu sağlayan esas bölgelerdir. E-F bölgeleri de transaktivasyonda rol alırlar (6, 7, 8, 9, 10, 11).

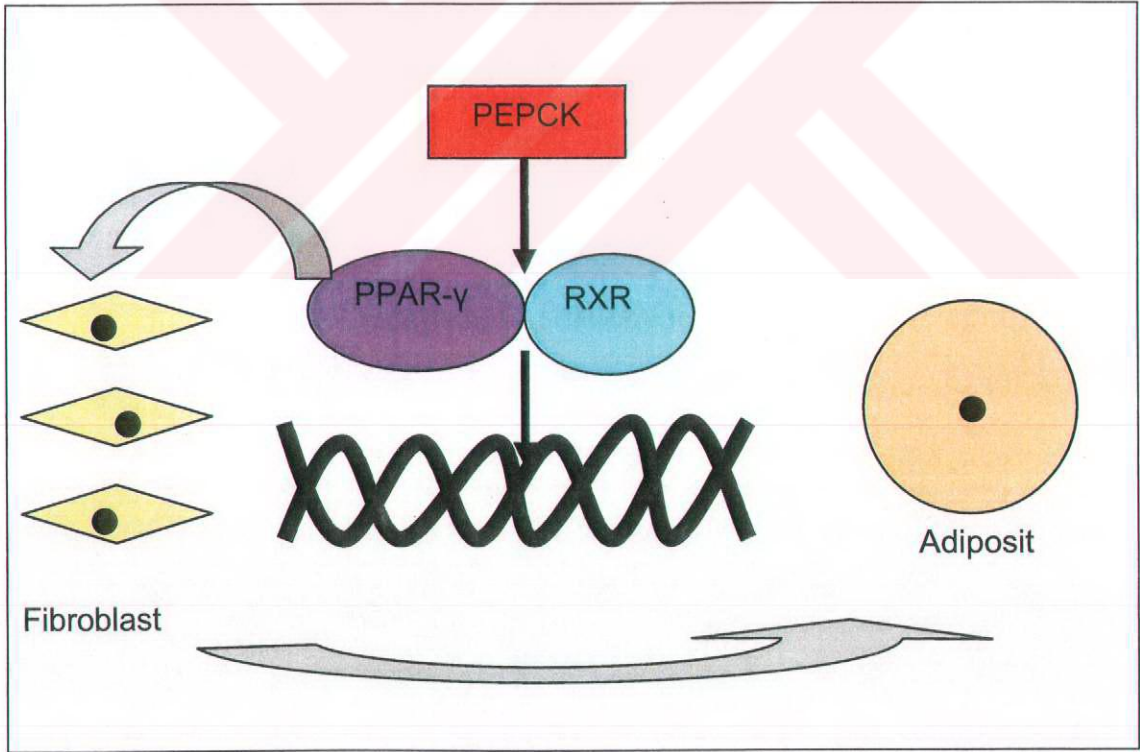
Nükleer reseptörler hedef genin DNA' sı üzerinde regülatuar bölüme bağlanırlar. Bu yer response element (RE) olarak tanımlanmaktadır.

Nükleer reseptörler etki mekanizmasına göre tip I ve tip II olarak sınıflandırılırken, dizi homolojisine göre alt-aile 0-1-2-3-4-5-6 olarak sınıflandırılırlar. PPAR' lar tip II ve alt-ailesi 1'de (tiroid hormon reseptörü benzeri) grup C olarak sınıflanmıştır.

Nükleer reseptörlerin ligandları endojen hormonlar (tiroid hormonları ve steroid hormonlar gibi), A ve D vitaminleri ve bir takım ilaçlar gibi lipofilik maddelerdir.

PPAR'lar ligandla regüle edilen transkripsiyon faktörleridir ve çeşitli gen ürünlerinin ekspresyonunu sağlarlar. Doğal PPAR ligandları, tüm araşidonik asid metabolitleri ve poliansatüre yağ asitleridir. En iyi bilinen sentetik PPAR ligandları ise tiazolidinedionlar (roziglitazon, pioglitazon, troglitazon, ciglitazon, MCC-555, GW9662) ve fibratlardır.

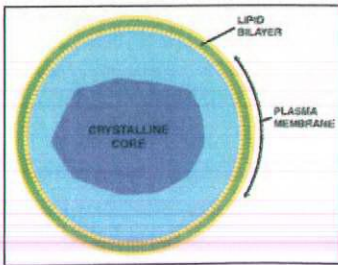
PPAR- γ ve RXR, fosfoenolpirüvat karboksikinaz (PEPCK) geni tarafından transaktive edilirler. Yüksek affinitedeki ligandlar kullanılarak PPAR- γ hücre kültürlerinde fibroblastik hücrelerden tamamen differansiye adipositler oluşturulabilmektedir (Şekil 3).



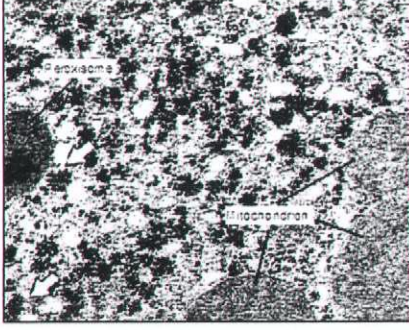
Şekil 2: PPAR γ , RXR heterodimerinin adiposit differansiasyonuna etkisi

2.1.4. Peroksizom

Peroksizomlar 0,3-0,5 mikron çapında ve lipid çift membranla çevrili ökaryotik hücre organelleridir, prokaryotlarda bulunmazlar (Şekil 3 ve Resim 2). Peroksizomlar ilk kez 1965 yılında Belçikalı bir sitolog olan Christian de Duve tarafından tanımlanmıştır. Metabolik aktivitesi fazla olan karaciğer, böbrek ve kalp kası gibi dokularda yoğun olarak bulunurlar. Hücreyi toksik maddelerden koruma görevi taşırlar. Bu bağlamda peroksizomlar içinde katalaz, ürik asid oksidaz, d-aminoasid oksidaz gibi enzimler bulunmaktadır. Bu enzimler aracılığıyla oksidasyon-redüksiyon olayları, pürin bileşiklerinin yıkımı, karaciğerde etanol oksidasyonu vb. olaylar meydana gelir. Ayrıca peroksizomların en önemli görevlerinden biri de mitokondrilerde de yapılan yağ asidlerinin beta oksidasyonudur. Bu süreçte yağ asidleri 2 karbon atomu kaybederek Asetil Co-A'ya dönüşürler. Ayrıca myelinde bol miktarda bulunan bir fosfolipid olan plasmalojenin ilk oluşum reaksiyonları peroksizomlarda meydana gelir. Eksikliğinde santral sinir sistemi myelinizasyonu anormallikleri ile seyreden nörolojik hastalıklar tanımlanmıştır. Peroksizomlar ayrıca safra asidlerinin yapımında da rol oynarlar. Son olarak peroksizomlar bir takım proteinleri alarak belli işlemlerden geçirirler. Bu protein alımı eksikliğinde Zellweger sendromu olarak tanımlanan nörolojik bir hastalık meydana gelmektedir (13).



Şekil 3: Peroksizomun temel yapısı (12)



Resim 2: Elektron mikroskobik görünümü (14)

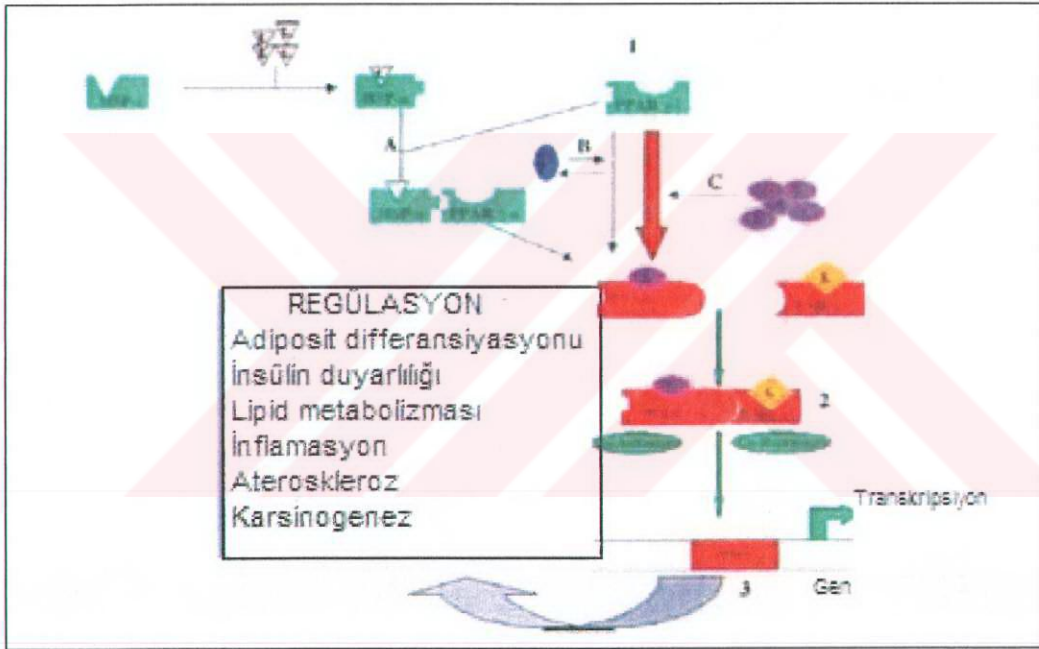
2.1.5. PPAR' ların Yapısı

Tüm PPAR' ların fonksiyonel bölgeler içeren temel bir yapısı mevcuttur. Bu bölgeler içinde en önemlileri DNA bağlayan bölge (DNA binding domain- DBD) ve ligand bağlayan bölgelerdir (Ligand binding domain- LBD). Reseptör aktive olduktan sonra DBD iki adet çinko parmak (zinc finger) olarak adlandırılan çinko içeren protein bölgesi ile DNA' nın regülatuar bölgesine bağlanır. LBD çok sayıda alfa heliks ve beta katlantıdan oluşan büyük bir sekonder protein yapısı gösterir. Doğal ve sentetik PPAR ligandları LBD' e bağlanarak reseptörü aktive ederler (16, 17) . PPARγ' nın LBD kısmının x ışını yapısı diğer nükleer reseptörlerinkinden daha büyük bir ligand bağlayan cebi olduğunu ortaya koymaktadır. Bu fiziksel büyüklük sayesinde PPAR' lar çok sayıda doğal ve sentetik ligandları bağlayabilmektedir.

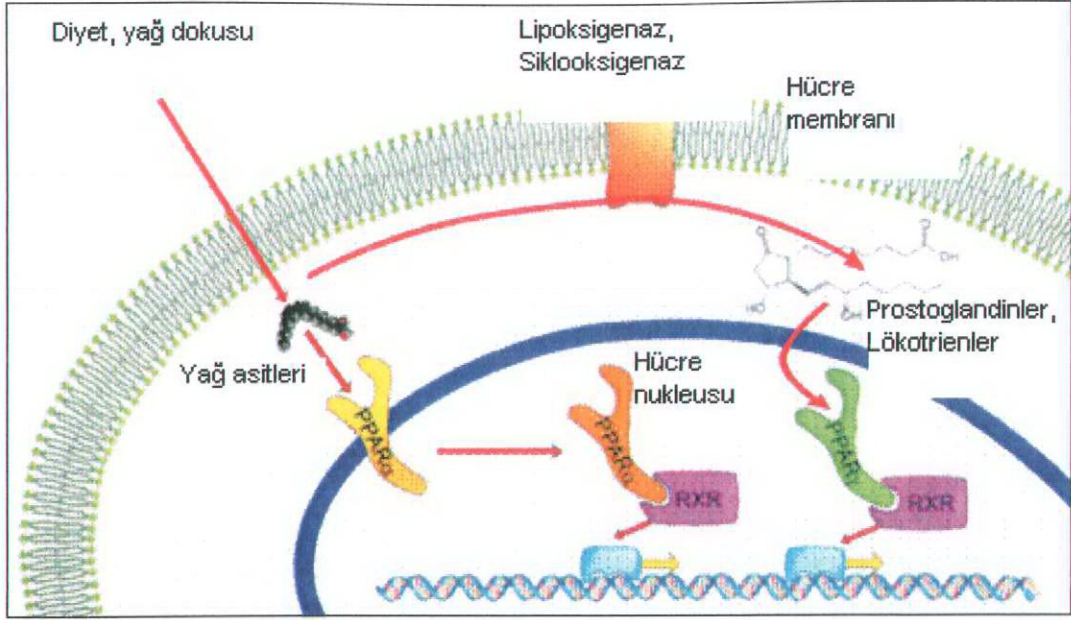
2.1.6. Etki Mekanizması

Nükleer reseptör süper ailesine ait bir grup reseptör olan PPAR' ların üçü de farklı genler tarafından kodlanır. PPAR' lar ligand ile regüle edilen transkripsiyon faktörleridir. Transkripsiyon genomik DNA' nın RNA'ya aktarılması işlemi olarak tanımlanır. Fizyolojik ya da farmakolojik olarak ligandları ile aktifleşen PPAR' lar ayrıca fosforilasyonlarını değiştiren kovalan

modifikasyon ya da bir ısı şok proteini (HSP) ile de ilişkiye geçerek de aktiflenirler (Şekil 4). Başlıca yol ligand bağlayarak olan aktivasyondur. Takiben retinoid X Reseptörü (RXR) ile heterodimer oluşturduktan sonra hedef genin DNA' sı üzerinde spesifik bölgelere bağlanırlar (Şekil 5) (2). Bu spesifik DNA dizisi "peroksizom proliferatör response elements" (PPREs) olarak isimlendirilmişlerdir. RXR, PPAR' lar dışında vitamin D ve tiroid hormonları ile de heterodimer oluşturmaktadır.



Şekil 4: PPAR aktivasyonu



Şekil 5: PPAR alfa ve gama yoluğı

Ortak DNA dizisi genellikle AGGTCA_XAGGTCA olarak tanımlanmıştır. X, random bir nükleotiddir. Genellikle bu dizi genin promotor bölgesinde meydana gelir. PPAR kendi ligandı ile bağlandığı zaman hedef genlerin transkripsiyonu artar ya da azalır.

PPAR' ların fonksiyonları ligand bağlayan bölgesinin şekli ile düzenlenir. Ayrıca çok sayıda ko-aktivatör (SRC-1 ailesi, CBP/p300, TRAP/DRIP kompleksi) ve ko-represör (SMRT, N-cor), PPAR fonksiyonlarını regüle eder (Şekil 4) (18).

PPAR' lar lipid metabolizmasında kritik regülatuar role sahiptirler. PPAR' ların sentetik ligandları olarak bilinen tiazolidinedionlar ve fibratlar diyabet ve dislipidemi tedavisinde yerlerini almışlardır. Bunun yanında PPAR' ların patolojik yollarda da potansiyel rol sahibi oldukları saptanmıştır. Bu sayede

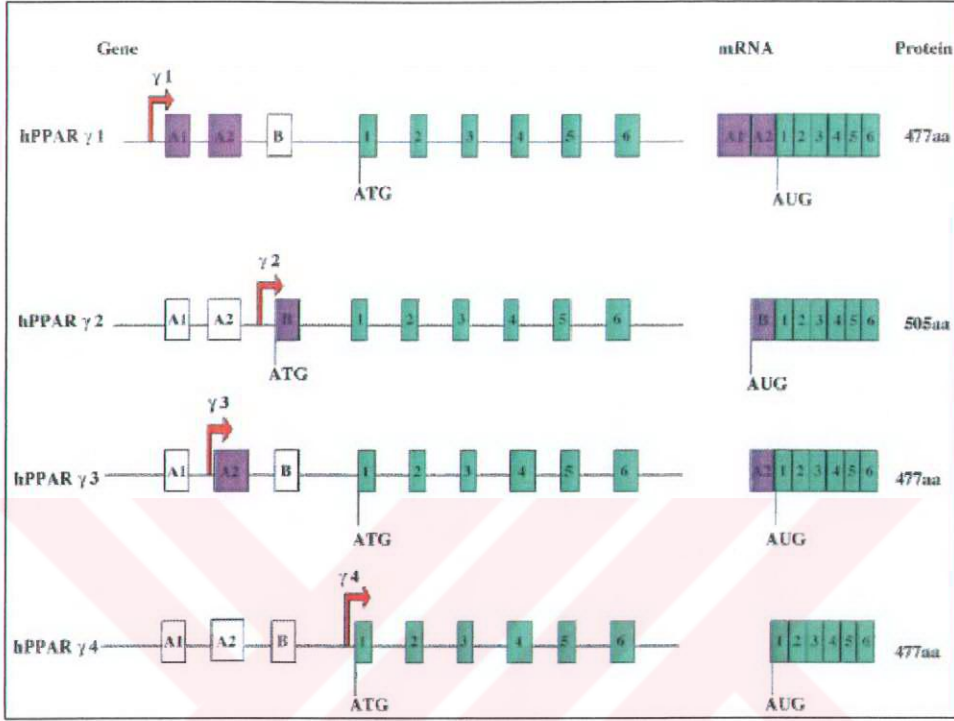
PPAR' ların kanser, ateroskleroz, inflamasyon, infertilite ve demyelinizan hastalıkların tedavisinde nasıl bir rol alabilecekleri araştırılmaktadır.

PPAR α başlıca karaciğer, böbrek proksimal tubul hücreleri, kalp kası, enterositler, düz kas ve yağ dokusunda eksprese edilir.

PPAR γ ' nın aynı gen üzerinde dört izoformu tanımlanmıştır. Bu izoformlar promoter kullanımında değişim ve eklemelerle sonuçlanan 5' ucu ile farklılık gösterirler (20, 21). PPAR γ 1 sekiz ekzon tarafından kodlanır. Bu ekzonlardan A1 ve A2 PPAR γ 1 için spesifiktir, diğer altı ekzon tüm PPAR izoformlarının mRNA' larında ortaktır. PPAR γ 2 yedi ekzon tarafından kodlanır ve ilk ekzonu B' dir. PPAR γ 2' ye özgü olan B ekzonu genomik DNA üzerinde A2' den sonra ve ilk ortak ekzondan önce yer almaktadır. PPAR γ 3' ün mRNA' sı PPAR γ 1 ile aynı proteini kodlar ancak buradaki promoter farklıdır. PPAR γ 3' ün promoteri 5' ucundaki A2 ekzonunun yanındaki bir bölgede lokalizedir. PPAR γ 4' ün mRNA' sı ortak ekzon 1 ile başlar ve PPAR γ 1 ile aynı proteini kodlar (19, 20, 21, 22, 23, 24, 25) (Şekil 6).

PPAR γ diğer transkripsiyon faktörleriyle de interaksiyondadır. İnsülin geninin regülatuar kısımlarından olan CAAT/ enhancer binding protein α (C/EBP- α) pek çok dokuda eksprese olarak adipogenezisi düzenlemede rol oynar. PPAR γ ve C/EBP- α arasında önemli çapraz regülasyon mevcuttur. Ayrıca adiposit differansiyasyon ve determinasyon faktör 1 (ADD 1)/ steroid response element binding protein 1 de PPAR γ ile ilişki içinde fonksiyon

görürler. Bu ilişki sayesinde PPAR γ 'nın transkripsiyonel aktivitesi ortamda ligand olmasa da artar.

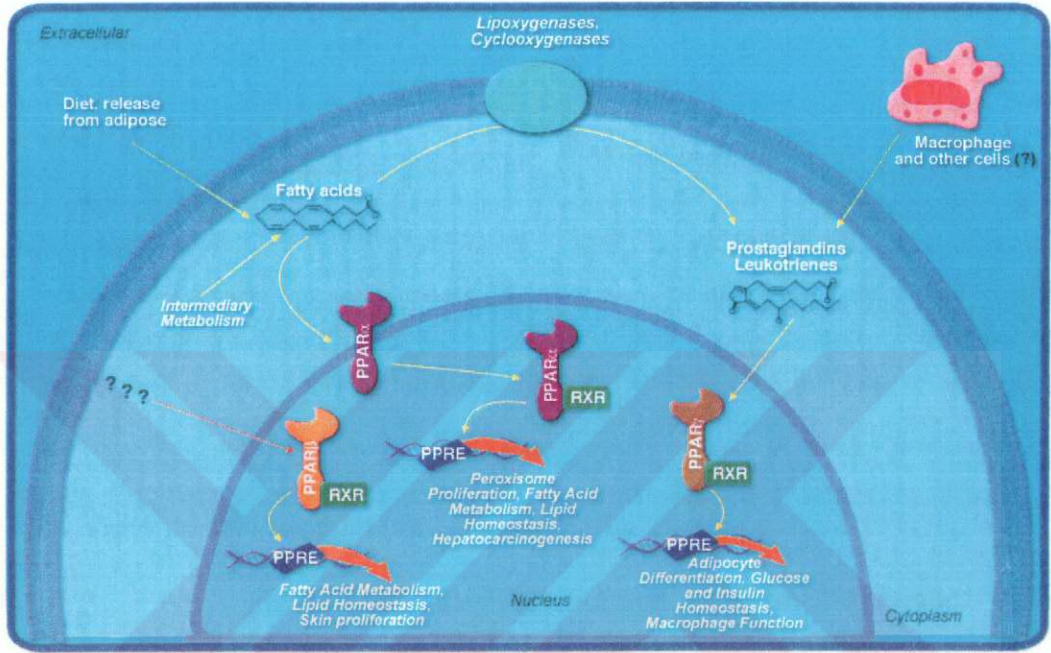


Şekil 6: PPAR γ gen düzenlemesi

PPAR γ 1, hemen hemen tüm dokularda (kalp kası, düz kas, vasküler endotel, kolon, böbrek, pankreas beta hücrelerinde, dalak, vd.) eksprese olur. PPAR γ 2 başlıca yağ dokusunda eksprese olur. PPAR γ 3 ise makrofajlarda, kolonda ve beyaz yağ dokusunda eksprese olur. PPAR γ ekspresyonu, PPAR α ekspresyonunun dominant olduğu dokularda (karaciğer, kalp, iskelet düz kası) belirgin olarak azdır.

PPAR δ da pek çok dokuda eksprese edilmekle birlikte başlıca beyin, yağ dokusu ve ciltte eksprese edilir. PPAR δ knockout micelerde yara iyileşmesinin geciktiği ve myelinizasyonun azaldığı bildirilmiştir (26).

PPAR'ların doğal ligandları serbest yağ asitleri ve eikozanoidlerdir. PPAR γ başlıca prostaglandin-J₂ ile aktive olurken PPAR α lökotrien-B4 ile aktive olur (Şekil 7).



Şekil 7: PPAR yolları

2.1.7. PPAR α Modülatörleri

PPAR α 'nın doğal ligandları serbest yağ asitleri ve eikozanoidlerdir, başlıca lökotrien B4. Sentetik ligandları ise fibratlardır. Fibratlar, amfifatik karboksilik asitlerdir ve başlıcaları klofibrat, gemfibrozil, ciprofibrat, bezafibrat ve fenofibrattır. Klinik pratikte hiperlipidemi tedavisinde kullanılmaktadırlar.

PPAR α aktivasyonu ile

- ❖ Karaciğerde; - apolipoprotein C III azalır
 - apolipoprotein A I ve A II artar
 - yağ asidi taşıyıcı protein 1 artar
 - yağ asidi translokaz/CD36 artar
 - karnitin palmitoil transferaz I ve II artar
 - C-reaktif protein azalır (antiinflamatuvar etki)
 - fibrinojen azalır (antiinflamatuvar etki)
 - serbest yağ asidi oksidasyonu artar

- ❖ İskelet kasında; - karnitin palmitoil transferaz I ve II artar

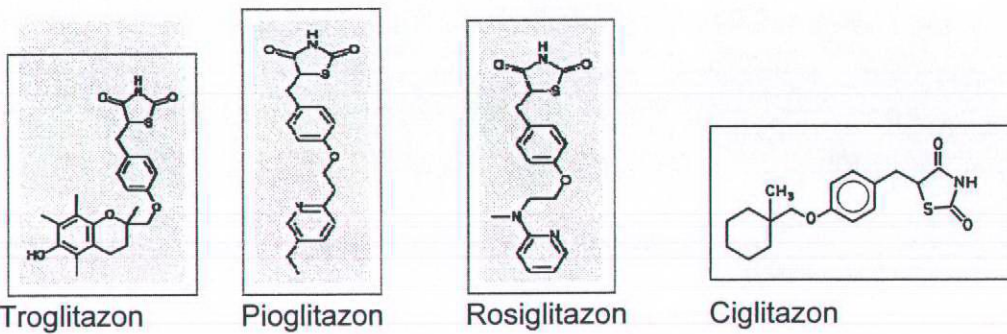
- ❖ Vasküler endotelial hücrelerde ve düz kaslarda;
 - vasküler cell adezyon molekülü-1 (VCAM-1) azalır
 - siklooksigenaz-2 azalır
 - nükleer faktör κ B artar
 - endotelin azalır
 - ATP bağlayan kaset A1 artar (kolesterol eflusu artar)
 - çöpçü reseptör B1 artar (kolesterol eflusu artar)
 - tümör nekrozis faktör α azalır
 - interlökin-6 azalır
 - doku faktörü azalır

PPAR α agonistlerinin micelerde ve insanlarda ateroskleroza önlediği veya geciktirdiği gösterilmiştir (19, 27, 28, 29).

2.1.8. PPAR γ Modölatörleri

PPAR γ ' nın da doğal ligandları serbest yağ asitleri ve eikozanoidlerdir, bunların başında prostaglandin-J₂ gelmektedir. Sentetik ligandları ise tiazolidinedionlardır (TZD). PPAR γ , TZD' lar (rosiglitazon (BRL-49653), pioglitazon, troglitazon (TGZ), ciglitazon (CIG)) (Şekil 8) dışında ayrıca ibuprofen gibi bazı nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar, indoller ve non TZD tirozinler (CDDO, CDDO-im, GW-7845, JTT-501, KPR-297, L-764406, MCC-555, GW-0072, GW-0207) ile de aktive olur (25). İnhibitörü olarak deneysel çalışmaları devam eden GW-9662 bildirilmiştir.

Ocak 1997' de ilk TZD olarak kullanılan troglitazon tip 2 diyabetli hastaların tedavisinde kullanılmak üzere Amerika' da piyasaya sunulmuştur. Troglitazon, Mart 2000' de hepatotoksitesi nedeniyle piyasadandan kaldırılmıştır. Günümüzde klinik pratikte kullanılan pioglitazon ve rosiglitazon 1999 yılında Amerika' da piyasaya girmişlerdir. Rosiglitazon ve pioglitazon için şu ana kadar hepatotoksiteye bağlı ölüm bildirilmemiştir. MCC-555 ile ilgili deneysel çalışmalar henüz sonuçlanmamıştır. Henüz piyasaya verilmemiş en yeni TZD ise ciglitazondur.



Şekil 8: Rosiglitazon, pioglitazon, troglitazon ve ciglitazon'un kimyasal yapıları

PPAR γ aktivasyonu ile;

- ❖ Karaciğerde; - C-reaktif protein azalır (antiinflamatuvar etki)
- ❖ İskelet kasında; - GLUT 1 ve 4 artar
 - fosfatidil-3 kinaz artar
 - pirüvat dehidrogenaz kinaz-4
- ❖ Vasküler endotelial hücrelerde ve düz kaslarda;
 - vasküler cell adezyon molekülü-1 (VCAM-1) azalır
 - intracellüler adezyon molekülü-1 (ICAM-1) azalır
 - endotelin azalır
 - ATP bağlayan kaset A1 artar (kolesterol eflusu artar)
 - çöpçü reseptör B1 artar (kolesterol eflusu artar)
 - indüklenbilir nitrik oksit sentaz azalır
 - interlökin-6 azalır
 - monosit kemoatraktan protein-1 azalır
 - makrofajlardan köpük hücresi oluşumu azalır

Bu etkiler sonucunda insülin direnci azalır, adiposit differansiyasyonu modifiye olur, vasküler endotelial büyüme faktörünün indüklediği angiogenez inhibe olur, leptin seviyeleri azalır, iştah artar, inflamasyon azalır.

PPAR γ hem normal adiposit differansiyasyonu ve proliferasyonunda hem de yağ asidi alımı ve depolamasında esansiyel role sahiptir. TZD' lar yağ dokusunda yağ asidi alımı ve depolanmasını artırır; böylece yağ dokusu kitlesini artırırken karaciğer ve kas dokusunda ve pankreasta yağ asidi birikimini engellerler (yağ asidi çalma hipotezi). Bu sayede karaciğer, kas ve

pankreas beta hücrelerini lipotoksisteden korumaktadır. Klinik çalışmalarda TZD' ların açlık ve tokluk kan şekereğini düşürdüğü ve plazmada serbest yağ asidi konsantrasyonunu azalttığı gösterilmiştir (30, 31). Bununla birlikte insülin düzeylerinde de azalma saptanmıştır. İnsanlarda in vivo yapılan çalışmalarda TZD' ların bu özellikleri insülin duyarlaştırıcı olarak davranmaları ile açıklanmaktadır. Tip 2 diyabetik hastaların ve non-diyabetik bireylerin 3-6 hafta boyunca troglitazon, roziglitazon ve pioglitazon ile tedavileri sonrasında periferel dokularda insülinle uyarılmış glukoz alımında artış olduğu, karaciğerde (endojen glukoz yapımını suprese edebilmesi) ve yağ dokusunda (insülinin serbest yağ asidi konsantrasyonunu supresyonu ile ölçülmüş) insülin duyarlılığında artış olduğu saptanmıştır (19, 30, 31, 32, 33, 34, 35). Bununla birlikte insülinin sekretuar yanıtlarında da artış meydana gelmiştir (31). Bu istenen etkiler yanında subkutan yağ dokusunda artışa bağlı kilo alımı saptanmıştır. Pioglitazon kullanımında low-density lipoprotein kolesterol (LDL-K) düzeylerinde değişiklik olmazken roziglitazon kullanımı sonucunda LDL-K düzeyinde %8-16' lık artış meydana gelmektedir. High-density lipoprotein kolesterol (HDL-K) düzeylerindeyse her iki TZD' un kullanımıyla yaklaşık %10' luk bir artış meydana gelmektedir. Trigliserid düzeyleri her iki TZD' la düşüş göstermekle birlikte bu etki pioglitazonla daha fazladır. Her ikisi de serum serbest yağ asidi düzeylerinde yaklaşık %20-30' luk düşüş sağlarlar. In vitro çalışmalarda roziglitazon sadece PPAR γ agonisti olarak etki ederken pioglitazon parsiyel olarak PPAR α aktivitesi de göstermektedir (31, 32, 36).

Bu etkiler sayesinde TZD' lar; tip-2 diyabet, polikistik over sendromu, metabolik sendrom, non-alkolik steatohepatit (NASH), psöriasis, lipodistrofi sendromları tedavisinde rutin olarak kullanılmaktadır. TZD' lar son olarak ABD' de meme kanserinin bazı tiplerinde de kullanılmak üzere ruhsatlandırılmıştır. Daha sonra ayrıntılı bahsedilecek olan antiproliferatif, apoptozisi indükleyici ve differansiyasyonu artırıcı etkileri nedeniyle de kolon kanseri, meme kanseri ve lösemi tedavilerinde de deneysel çalışmaları devam etmektedir.

2.1.9. PPAR β / δ Modölatörleri:

1992 yılında insanlarda PPAR δ keşfedildikten sonra bunun daha önce Xenopus'larda tanımlanmış olan PPAR β olduğu anlaşıldı ancak tanımlama daha sonra insanlarda keşfedilen hali olan PPAR δ olarak devam etti.

PPAR δ aktivasyonu ile;

❖ Vasküler endotelial hücrelerde ve düz kaslarda;

- ATP bağlayan kaset A1 artar (kolesterol eflusu artar)

2.2. Akut Lösemi

Tüm dünyada kardiyovasküler hastalıklardan sonra kanserden ölüm oranı ikinci sırada yer almaktadır. Erişkinlerde akut lösemi insidansı yılda yaklaşık olarak 100000 olguda 3-4' tür. ABD' de kansere bağlı ölümlerin % 1,2' sini AML hastaları oluşturmakta olup yıllık ölüm oranı 2,2/100000' dir. Tüm yetişkin kanserlerinin %10' unun akut lösemi olduğuna inanılmaktadır. Hastalık 35 yaşın öncesinde gerçekleşen kansere bağlı ölümlerin de başında

gelmektedir. Yetişkinlerde akut miyelositer lösemi (AML), akut lenfositer lösemiye (ALL) göre daha sıktır ve AML akut lösemilerin %80' ini oluşturmaktadır. Erkeklerde görülme sıklığı daha fazla olup, 20 yaş üstü popülasyonda AML' nin tüm lösemilerin %80-85' ini oluşturduğu ortaya konmuştur (37, 38, 39).

Tüm neoplazileri kısaca tanımlamak gerekirse normal büyüme kontrollerine yanıtızsızlık olarak özetlenebilir. Karsinogenezin temelini oluşturan genetik hasar sonucunda protonkogenler, antionkogenler, DNA onarımını ve apoptozisi düzenleyen genlerin birinde veya birkaçında hasar meydana gelir. Akut lösemiler, tek bir stem cell veya hematopoetik progenitor hücrenin matürasyon ve differansiyasyon özelliklerini kaybederek anormal proliferasyon göstermesi sonucunda ortaya çıkarlar. Akut lösemilerde, lösemik blastlarda differansiyasyon yeteneği bloke olur ancak çoğalma yetenekleri devam eder. Lösemik blastların çoğalmaları ve kemik iliğinde birikimleri sonucunda kemik iliğinde normal hematopoetik fonksiyon gösterecek hücreler baskılanır ve kemik iliğinde yetersizlik meydana gelir. Akut lösemi klonal bir hastalık olup köken aldığı seriye göre akut miyelositer lösemi (AML) ve akut lenfositer lösemi (ALL) şeklinde adlandırılır (38, 40, 41).

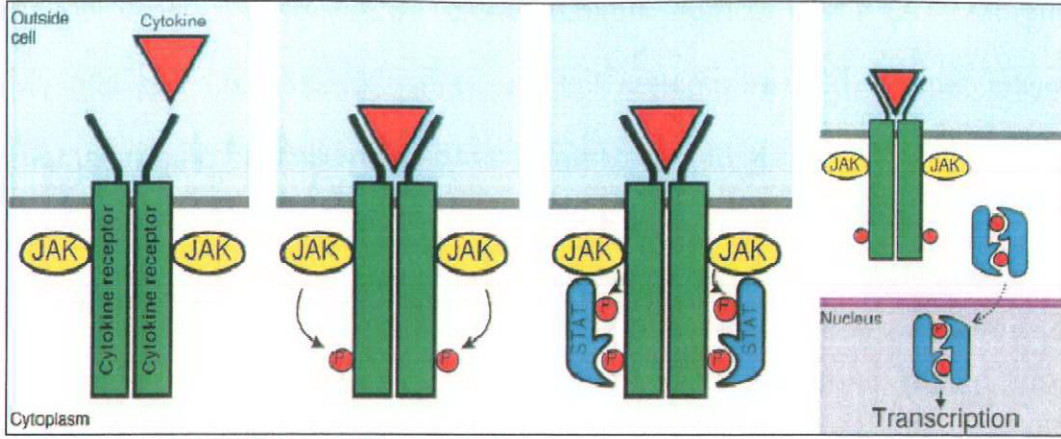
Genetik, çeşitli ilaçlar, radyasyona ve kimyasal ajanlara maruziyet, elektromanyetik alanlar ve kronik klonal hastalıklar (kronik myeloproliferatif hastalıklar, miyelodisplastik sendromlar, paroksizmal nokturnal hemoglobinüri, aplastik anemi) AML gelişiminden sorumlu tutulmaktadır. Tedavi edilmeyen akut lösemi olgularında yaşam süresi en fazla üç aydır.

Buna karşın uygun tedavi yöntemlerinin ve destek tedavi biçimlerinin gelişmesi ile yetişkin olguların yaklaşık %70-80' inde en azından bir kez tam remisyon sağlanabilmektedir (42). Ancak bununla birlikte relapslar nedeniyle hala istenen ilerleme sağlanamamıştır (43, 44).

Maturasyon bloğu ve lösemik klonal büyümenin neden olduğu proliferasyon ve differansiyasyon anomalileri genel olarak lökomogenez olarak adlandırılmaktadır. Hematopoezde iki önemli büyüme faktörü reseptör ailesi rol oynamaktadır. Bunlardan ilk grupta yer alanlar intrinsek tirozin kinaz aktivitesine sahip olan ve çoğu CD34+ progenitör hücrede eksprese edilen trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörü (PDGFR) A ve B, monosit koloni stimüle edici faktör (M-CSF) reseptörü, Kit, Flt 3 (fms-like tyrosine kinase receptor-3)' tür. AML patogenezinde Kit ve Flt 3 önemli role sahiptirler. Flt 3 kendi reseptörüne bağlanarak otofosforilasyona neden olur ve ardından Ras-MAPK (Mitogen-activated protein kinases) sinyal yolağının aktivasyonu gerçekleşir. Flt 3 erken myeloid, B-lenfoid ve monositoid progenitör hücrelerin proliferasyonunu ve yaşam sikluslarını düzenler. Flt 3 ekspresyonu AML' li vakaların %62-90' ında yüksek oranda bulunur ve kötü prognoza işaret eder. Aynı zamanda yapılan çalışmalarda blastik hücrelerdeki ekspresyon oranının normal progenitor hücrelere nazaran daha yüksek olduğu saptanmıştır. Kit reseptörüne ait mutasyonlar daha çok mast hücre bozuklukları ve gastrointestinal stromal tümörlerde gösterilmiştir. Kit hematopoezin, özellikle eritroid sistemin normal gelişimi için çok önemlidir. Aktive edici mutasyonlar c-kit geninin pek çok farklı ekzonunda ortaya çıkabilmektedir. Sonuç olarak hangi mutasyon olursa olsun ligand bağımsız

otofosforilasyon ve down-stream sinyal yolağında aktivasyona yol açmaktadır. Özellikle kodon 816' da ortaya çıkan ve valin yerine aspartik asidin gelmesi ile sonuçlanan mutasyon tirozin kinaz aktivitesinde 10 kat artışa sebep olmakta ve akut lösemilerde saptanabilmektedir (45, 46) .

İkinci grup reseptörler, enzimatik aktivitesi olmayan sitokin reseptör ailesidir. Bu grupta yer alan Janus Kinases and Signal Transducers and Activators of Transcription (JAK-STAT) yolağının hastalık gelişiminde önemli rolü vardır. Hematopoetik hücrelerin gelişimi ve fonksiyonları çok sayıda sitokin ve bu sitokinlerin reseptörleri ile regüle edilen sinyal yolları ile ilişkilidir. JAK-STAT yolağı hem normal hematopoezde hem de hematolojik malignitelere en önemlilerinden biridir. Janus kinase (JAK), intraselüler non-reseptör tirozin kinazları içeren bir ailedir. Molekül ağırlıkları 120-140 kDa arasında değişmektedir. JAK isimlendirmesi başlangıçta "just another kinase" in baş harflerinden türetilmiş ancak daha sonra yolağın fonksiyonları incelendikçe eski Romalılarda cennetin bekçisi olduğuna inanılan ve iki suratı olan Janus'a atfedilmiştir. Kinazlar, ATP gibi yüksek enerjili moleküllerden spesifik hedef moleküllere (substratlara) fosfat grupları transfer eden enzimlerdir. Bu işlem fosforilasyon olarak tanımlanmaktadır. JAK' lar hücre yüzeyindeki bazı sitokin reseptörlerine bağlanırlar ve tirozin kinaz aktivitesi gösterirler. Janus kinaz' ın iki ayrı fosfat transfer eden bölgesi mevcuttur ancak bunlardan sadece birinin biyolojik fonksiyonları bilinmektedir. Janus kinazlar sitokin aracılı sinyalleri JAK-STAT yolağı ile iletirler (Şekil 9) (47, 48, 49, 50, 51, 52).



Şekil 9: JAK-STAT şematik görünümü

Sitokinin reseptörüne bağlanması JAK aktivasyonunu tetikler. JAK' lar sahip oldukları tirozin kinaz aktivitesi ile reseptör üzerindeki tirozin rezidülerini fosforillerler. Bu sayede reseptör üzerinde proteinlerle interaksiyona girecek bölgeler meydana getirirler. Bu bölgelerle interaksiyona girecek olan proteinler fosfotirozin bağlayan SH2 bölgeleri içermektedirler. STAT' ların da bu fosfotirozin rezidülerine bağlanabilen SH2 bölgeleri mevcuttur ve bu bölgelerde dimerizasyon gerçekleşir. Aktive olan STAT dimerleri hücrenin nükleusunda kümelenir ve hedef genlerin transkripsiyonunu başlatır (49). STAT' lar aynı zamanda c-src, epidermal büyüme faktörü reseptörü gibi başka non-reseptör tirozin kinazlarca da fosforillenebilir. JAK-STAT yolağının negatif regülasyonu pek çok farklı seviyede gerçekleşir (50, 51, 52).

STAT' lar, JAK' lar aracılığıyla tirozin rezidüleriyle fosforillenirlerken serin/treonin kinazların bir çeşidiyle de serin rezidülerine fosforillenirler. STAT proteinleri; hücre büyümesi, farklılaşması, apoptozisi, transformasyonu ve diğer temel hücre fonksiyonlarını düzenlerler. Son yıllarda neoplastik klonların proliferasyonunu yöneten JAK-2 genindeki mutasyonlar

miyeloproliferatif hastalıklarda tanımlanmıştır. Ayrıca JAK-STAT yolağının AML gibi pek çok lösemi tipinde, multipl myelomda ve T hücreli lösemi-lenfomalarda da aktif rol oynadığı bildirilmektedir (48, 49, 50, 51, 52, 53).

Her iki reseptör grubunun aktive olması, hücre içi sinyal iletiminin aktive olmasına neden olur. Bu sayede hücrelerin proliferasyonu ve yaşam süreci üzerine etkisi olan gen ekspresyonları ve pek çok proteinin posttranslasyonel modifikasyonumeydana gelir. Tirozin kinaz reseptörlerinin etkileşimi ile nukleusta Ras-MAPK, PI3-kinaz/Akt (Phosphoinositole 3-kinases/protein kinase B) yollarının ve STAT proteinlerinin aktivasyonu gerçekleşir. STAT 3 ve 5 proteinleri miyeloid hücre farklılaşmasında rol oynar (45, 50, 51).

Hücre siklusu, oluşan genetik hasarı saptamayı ve onarmayı, ayrıca kontrolsüz hücre bölünmesini engellemek için çeşitli kontrol noktalarını içeren ve hücre için hayati öneme sahip bir döngüdür. Hücre siklusu bir kaskad şeklinde ilerler, aktifleşen bir basamak tekrar geri dönemez. Tirozin kinazlar, hücre dışı büyüme faktörlerinden nukleusa kadar olan kaskad şeklinde ilerleyen proliferatif sinyal sürecinin çok önemli bir parçasıdır. Siklinler, kendilerine spesifik olan ve siklin-bağımlı kinazlar olarak adlandırılan tirozin kinazlarla kombine olurlar, onları aktifleştirirler ve etkilerini düzenlerler. Hücre siklusu fazlarında çeşitli siklinler sentezlenir ve düzeyleri senkronize bir şekilde siklusun çeşitli fazları boyunca azalır ya da artar. Siklinler ve siklin bağımlı kinazlar (cyclin dependent kinase -CDK-) hücre siklusunda anahtar rol oynayan enzimlerdir. Aktive bir heterodimer halindeyken siklinler regülatuvar subüniti, CDK' lar katalitik subüniti meydana getirirler. Siklinlerin

katalitik aktiviteleri yoktur ve CDK' lar siklin partneri olmadan inaktif durumdadırlar. CDK' lar siklinle bağlandıktan sonra fosforilasyon reaksiyonlarını meydana getirirler, böylece hücre siklusunda bir sonraki faza girecek hedef proteinler koordine bir şekilde aktiflenir ya da inaktive edilirler. Hücreye promitotik bir sinyal geldikten sonra G1 siklin-CDK (siklin D - CDK4) kompleksi aktifleşir. DNA replikasyonu için gerekli enzimlerin ve S fazı siklinlerinin ekspresyonunu sağlayacak olan transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu destekleyerek hücreyi S fazına hazırlar. G1 siklin-CDK kompleksi ayrıca S fazı inhibitörlerinin, ubiquitinlere hedef olacak şekilde degrade olmalarını sağlar. Ubiquitinler hedef proteinlerin proteazomlarda proteolitik enzimlece degradasyonunu sağlarlar. Daha sonra aktifleşen S siklin-CDK (siklin A - CDK2) kompleksi G1 fazında DNA üzerindeki replikasyon orjinlerinde toplanan prereplikasyon komplekslerini oluşturan proteinleri fosforillerler. Bu fosforilasyon sayesinde mevcut prereplikasyon komplekslerinin aktivasyonu sağlanırken yeni komplekslerin oluşumu önlenir. Bu sayede genoma ait her parçanın sadece bir kez kopyalanması garanti edilmiş olur. Mitotik siklin-CDK kompleksi (siklin B - CDK1), S fazı ve G2 fazı boyunca sentezlenmiş ancak inaktif olarak beklemektedir. Daha sonra aktifleşerek mitozu gerçekleştirirler.

Hücrenin kontrolsüz olarak çoğalmasını engellemek amacıyla doğal olarak hücre siklusu inhibitörleri de mevcuttur. Cip/kip ve INK4a/ARF (Inhibitor of Kinase 4 / Alternative Reading Frame) olarak adlandırılan iki gen ailesi hücre siklusu inhibitörleridir. Bu genler tümör supresör genlerdir. p21, p27, p57 cip/kip ailesine aittirler ve siklin- CDK kompleksine bağlanarak onları inaktive

ederler ve hücreyi G1 fazında tutarlar. p21, p53 aracılığı ile aktive olurken p27 ise başlıca Transforming Growth Factor β (TGF β) ile aktiflenir. INK4a/ARF ailesi, p16INK4a ve p14arf yi içerir. p16INK4a CDK4' e bağlanarak hücreyi G1 fazında tutarken p14arf ise p53 ün degrade olmasını önler.

Lösemi oluşumunda hücre siklus anomalilerinin de rolü olduğu bilinmektedir. Azalmış timidinle işaretlenme indeksi, düşük mitotik oran ve S ve G2+M fazındaki hücrelerin oranı, lösemik hücrelerin normallerine oranla daha yavaş proliferasyon olduğunu düşündürmektedir. Bunun muhtemel açıklaması, proliferasyon olan ve olmayan iki ayrı hücre havuzu bulunduğu şeklindedir. Değişik çapta ve büyüklükte blastların varlığının saptanması bu görüşü desteklemektedir (54).

Kanser tedavisinde CDK' lar önemli bir araştırma konusudur. Selektif olarak kanser hücrelerinde CDK aktivitesi engellenerek hücre siklusu durdurulabilirse hücre ölecektir. Klinik çalışmaları devam eden seliciclib CDK inhibitörü olarak denenmektedir. İnflamasyonda rol oynayan nötrofillerde apoptozisi indüklediği deneysel olarak gösterilmiştir. Kronik inflamasyonla seyreden hastalıkların tedavisinde de denenmesi olasıdır.

Yine karsinogenezde önemli rol oynayan bir protein ailesi de fosfoinozitol-3 kinaz (PI-3K) ailesidir. Büyüme ve yaşama sinyallerinin iletiminden sorumlu proteinlerdir. Reseptörünün uyarılmasından sonra PI-3K, hücre membranında inozitol fosfolipidlerin fosforilasyonunu katalizler ve

fosfotidilinozitol trifosfat (PIP3) meydana gelir. PIP3, PIP3 bağımlı kinazlar (PDK) ve protein kinaz B (PKB)'nin aktivasyonundan sorumludur. Sitokinler ve büyüme faktörleri PI-3K ve PKB yolunu aktive ederek hücreler için yaşama sinyalleri oluştururlar. Tümör baskılayıcı proteinlerden PTEN (Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome Ten) ise, PIP3 oluşumunu inhibe ederek negatif düzenleyici rol oynar.

2.2.1. Akut Myeloid Lösemi (AML)

İlk kez 1957' de farklı bir klinik antite olarak kabul edilen akut promyelositik lösemi (APL) tüm akut miyeloid lösemilerin %5-10' unu oluşturmaktadır. French-American-British (FAB) klasifikasyonuna göre AML-M₃ olarak adlandırılan bu tipte lösemik hücreleri promyelositler oluşturur. Kemik iliği incelemesinde blast ve promyelositlerde multipl Auer çubukları (Fagot hücreleri) izlenir. Myeloperoksidaz ve sudan black ile pozitif boyanma gösterirler. Erişkin akut lösemi hasta popülasyonunda akut promyelositik lösemi en iyi prognozlu olanıdır. AML-M₃ tedavisinde en dikkat çekici gelişme nükleer reseptörlere etki eden all-trans retinoik asidin (ATRA) tedaviye girmesi ile yaşanmıştır. Yapılan araştırmalarda AML-M₃' de t(15,17) olarak bilinen klonal bir sitogenetik bozukluk saptanmıştır. 15. kromozomda bulunan ve promyelositik gen (PML) olarak adlandırılan bir transkripsiyon (bir DNA şablonundan kendisine komplementer olan RNA dizisinin oluşumudur) ünitesinin 17. kromozomda bulunan retinoik asid reseptörü- α (RAR- α) ile birleşerek bir füzyon geni oluşturmalarından sonra üretilen bir protein, hücre farklılaşmasını ve proliferasyonunu bozar. Bu füzyon proteini nükleer represör protein kompleksine karşı artmış bir affiniteye sahiptir. Bu

kompleksin aktivitesindeki artış, histon deasetilazı (deasetilasyon ile histonların son kısımlarından asetil grupları uzaklaştırılır. Bu sayede histonlar DNA' yla daha sıkı paketlenirler ve transkripsiyon faktörleri aracılığıyla gen transkripsiyonunu önlerler. Histon deasetilasyonunun genel sonucu olarak gen ekspresyonu azalmaktadır) aktive etmekte ve bu da kromatin konformasyonunu değiştirip transkripsiyonu bloke etmektedir. Tedavide uygulanan yüksek doz ATRA, bu füzyon proteini-nükleer represör kompleks ilişkisini bozmakta, histon deasetilaz inhibe olmaktadır. Bu sayede kromatinin yapısı ve transkripsiyon korunmaktadır, yani akut lösemilerdeki temel patofizyolojik değişiklik olan matürasyon bloğu oluşması ve hücrenin bir sonraki hücreye differansiasyonunda ortaya çıkan anormallik düzeltilmiş ve differansiasyon sağlanmış olur. Son yıllarda arsenik triksidin de benzer mekanizmalarla yüksek oranda remisyon sağladığı belirtilmektedir. Bazı hastalarda farklı mutasyonlar ortaya çıkabilmektedir. Morfolojik olarak bunları klasik PML-RAR α mutasyonuna sahip hastalardan ayırt etmek mümkün değildir. Moleküler incelemeler, bu hastaların alternatif füzyon partnerlerine sahip olduğunu ortaya koymuştur. Bu mutasyonlar başlıca; promyelocytic leukemia zinc finger domain (PLZF), nucleophosmin (NPM), nuclear mitotic apparatus (NuMA) ve STAT5b (signal transducer and activator of transcription 5b)' dir. PLZF mutasyonunun saptandığı t(11:17)' de, ATRA' nın varlığı ile, ortaya çıkan histon deasetilazın inhibisyonu mümkün olamamaktadır. ATRA' nın etkisiz kaldığı bu tip vakalarda histon deasetilaz inhibitörlerinin kullanımı faydalı olabilmektedir (55, 56, 57) .

2.3. Apoptozis

“Ayrı düşme” kelimelerinden türeyen apoptozis, fizyolojik ve patolojik süreçlerde ortaya çıkan bir hücre ölüm şeklidir. Fizyolojik olarak erişkin dokuların korunmasında ve embriyogenezde rol oynar (58). Sıklıkla programlanmış hücre ölümü olarak da ifade edilen apoptoziste hücre düzeyde kabaca başlangıçta nükleer kromatin yoğunlaşması ve parçalanması (karyoreksis) meydana gelir. Daha sonra bunu sitoplazmik tomurcuklanma izler. Apoptotik cisimcikler fagosite edilerek ortamdaki uzaklaştırılırlar (59, 60, 61). Nekrozdan farklı olarak membran bütünlüğünün bozulması apoptozis sırasında gözlenmez (59, 60) .

Neoplastik hücre birikim mekanizmaları ile ilgili yapılan çalışmalar daha çok hücre proliferasyonu üzerine yoğunlaşmış olsa da son zamanlarda apoptozisin tümör gelişimi ve hastalık progresyonu üzerinde kritik role sahip olduğu gösterilmiştir. Hücre büyümesi, büyümeyi uyaran ve büyümeyi inhibe eden genlerle düzenlenirken hücrenin yaşaması da apoptozisi uyaran ve inhibe eden genlerle düzenlenmektedir (61). Apoptotik yollarda izlenen değişikliklerin, kanser gelişimi dahil pek çok hastalığın patogenezinde rolü olduğu çoğu çalışmada gösterilmiştir (62). Kemik iliğindeki sürekli üretimi dengelemek için her gün ortalama 5×10^{11} hücre apoptozis yoluyla ortadan kaldırılır (58). Bcl-2 anti-apoptotik genlerin, Bax ise apoptotik genlerin prototipidir. Mutajenik ajana maruz kalan hücrelerde DNA hasarı onarılamadığı zaman apoptozisi p53 uyarmaktadır. p53 bu etkisini bax kopyalanmasını artırarak yapmaktadır. Pek çok kemoterapötik ajanın etkinliği tümör hücrelerinde apoptozisi indüklemeleri ile olmaktadır. p53 mutasyonu

olan tümörlerde bu ilaçlara daha az yanıt ya da hiç yanıt vermeme sonucu ortaya çıkmaktadır. Antiapoptotik etkili Bcl-xL, Bcl-w, MCL-1, A1, BHRF-1 ve proapoptotik etkili Bak, Bcl-xS, Bid, Bad ve Bik gibi proteinler mitokondrial membranda yerleşmiştir. Bu genler genellikle Bcl-2 ya da Bax dengesini değiştirerek etki göstermektedirler (61).

Apoptozise giden hücrelerin sitozolik hücre ekstraktları ile yapılan çalışmalarda olayın morfolojik ve biyokimyasal iki ayrı fazı olduğu ortaya konmuştur. İlk olarak başlangıç fazı da adı verilen safhada pro-apoptotik stimulusun varlığı olayı tetikler. Effektör faz da denen ikinci safhada ise, hücrenin yok edilmesine yol açan, sitozolik hücre ekstraktlarında, nukleuslarda apoptotik değişikliklerin ortaya çıkması ile gösterilebilen mekanizmalar aktiflenir. Ancak bu safhadan sonra üçüncü aşamaya yani degradasyon fazına geçilebilir ve bu aşamada morfolojik değişiklikler ve DNA fragmentasyonu gibi apoptozisin tüm belirteçleri gözlenebilmektedir. Morfolojik açıdan, hücrede ve nukleusda gerçekleşen volüm kaybının ardından nükleer kromatinde ileri derecede kondansasyon ve karyoreksis gerçekleşir. Hücre çevre dokudan ayrılır ve plazma membranı bombeleşerek apoptotik cisimleri içeren parçalara ayrılır. Apoptotik hücreler çoğu zaman yakınındaki makrofajlarca sindirilerek ortadan kaldırılır. Fagosit edilemeyen hücreler ise sekonder nekroz olarak adlandırılan bir yol ile inflamatuvar yanıt oluşturmaksızın degradasyona uğrarlar (63, 64, 65).

İlk kez Robert Horvitz ve arkadaşlarının *Caenorhabditis elegans* adlı nematod ile yaptıkları incelemeler sonrasında apoptoziste anahtar rol

oynayan üç farklı gen tanımlanmıştır (66). Ced-3 (memelilerdeki homoloğu Apaf-1) ve Ced-4 apoptozisi indüklerken, Ced-9 (memelilerdeki homoloğu Bcl-2) inhibe etmektedir. Memelilerde de ilişkili genler tanımlanmıştır. Ced-3 bir takım proteazları içeren ve kaspazlar olarak tanımlanan bir ailenin üyesidir. Aktif bölgelerinde sistein (C) içermeleri ve substratı olan proteinleri aspartik (asp) asitten sonra kestikleri için kaspazlar (C asp ase) olarak isimlendirilmişlerdir (58, 59). Apoptozisin başarıyla tamamlanabilmesi için anahtar rol oynayan bazı proteinlerin kaspaz enzim sistemi tarafından proteolitik yıkıma uğraması gerekir. Kaspazlar yaklaşık yüz farklı proteini keserek apoptozisi sağlarlar. Bu proteinler içinde ana hedef bir DNAaz inhibitörüdür. Bu inhibitör protein aktif hale gelirse DNA parçalanarak hücrenin ölümü meydana gelir. Bu proteinlerin yıkımı ile apoptozisin morfolojik değişikliklerinin nasıl ortaya çıktığı kesin olarak açıklanamamış olsa da kaspazlar tarafından hedef alınan bu proteinlerin, hücrenin yapısal bütünlüğünün ve devamlılığının sağlanmasında öneme sahip hücre iskeletin temelini oluşturan, membranla ilişkili mikrofilaman yapıları oldukları bilinmektedir (66, 67, 68, 69, 70).

Kaspazlar inaktif proenzim şeklinde bulunurlar ve genellikle diğer kaspazlar tarafından katalizlenen proteoliz ile aktif şekillerine dönüştürülürler. Başlatıcı kaspazın aktivasyonu sonrasında zincirleme reaksiyon meydana gelir ve bu reaksiyon hücre ölümü ile sonuçlanır. Kaspazlar ayrıca sitokin üretimine katkı sağlarlar (kaspaz 1, 4, 5, 11, 12, 13, 14), adaptör moleküllere bağlanıp ölümü yönlendirirler (kaspaz 2, 8, 9, 10), hücre siklusunda interfazı gerçekleştirirler (kaspaz 3, 6 ve 7) (66). Kaspazlar başlıca iki şekilde aktive olurlar. Birincisi

Fas, Tümör nekroz faktör (TNF) reseptörleri gibi ölüm reseptörlerinin bağlanması ile daha çok kaspaz 8 üzerinden aktive olan yoldur. Diğer bir yol mitokondrial yolak olup p53, aberran onkogenlerin ekspresyonu, çeşitli sitotoksik ajanlar aracılığı ile apoptotik sinyallerin uyarılmasıdır. Bu noktada hedef, apoptozis üzerine düzenleyici rolü olan Bcl-2 ailesinin üyeleridir. Buradaki kilit nokta mitokondriden sitozole sitokrom C ve apoptozis indükleyici faktör (AIF) gibi diğer kaspaz aktivatörü maddelerin salınımıdır. Mitokondrial apoptotik yolakta kritik role sahip olan kaspaz ise kaspaz 9'dur. Her iki yolun aktive olması sonucu efektör kaspazların (kaspaz 3, 6) ve nükleozomlar arası bağlantının kırılarak DNA fragmentasyonuna yol açan bir endonükleaz enziminin aktivasyonu gerçekleşir. Kaspaz 3, kaspaz ile aktive olan deoksiribonükleazın inhibitöründen ayrılmasını sağlamaktadır. Böylece kromatin, sarmaldaki belirli noktalardan kesilerek DNA fragmentasyonu sağlanabilmektedir (58, 64, 68, 69, 70). Kaspaz 8 tarafından parçalanan Bid proteini mitokondriye transloke olarak sitokrom C'nin salınımına ve kaspaz 9'un aktivasyonuna aracılık eder. Bcl-2 proteini ise mitokondriyal membranlardaki özel porların (PTPC) açılmasını, kaspaz-9 aktivasyonunu ve serbest oksijen ürünlerinin artışını engellemektedir. Normalde hücre sağ kalımı için sitokrom C mitokondri zarları arasındaki boşlukta, Apaf-1 ve kaspaz 9 sitozolde yer alırlar. Böylece kaspaz 9 inaktif kalır. Kaspazlar da apoptozis protein inhibitörleri (IAP) olarak adlandırılan ve kaspaz aktivitesini direkt olarak baskılayan bir protein ailesi tarafından düzenlenir. Bcl-2 / Bax dengesinin Bcl-2 lehine olmasıyla hücre yaşarken, Bax lehine bozulması apoptozisle sonuçlanmaktadır (61). Apoptozisin fizyolojik yokluğu veya

patofizyolojik olarak aşırı aktivasyonu kanser, otoimmün hastalıklar, disorganogenez gibi pek çok hastalığın gelişimine katkıda bulunmaktadır.

PPAR γ ligandları hematolojik malignitelerde, mitokondrilerde membran potansiyelinin kaybına ve böylece kaspazların aktivasyonu sonucunda apoptozise yol açmaktadırlar.

2.4. Rosiglitazon Maleate

5- { [4- (2- (methyl -2- pyridinylamino) ethoxy) phenyl] methyl } - 2,4-thiazolidinedione, (Z)-2-butenedioate (1:1) kimyasal adıyla bilinen rosiglitazon maleate' ın kimyasal formülü $C_{18}H_{19}N_3O_3S.C_4H_4O_4$ ' dür. Molekül ağırlığı ise 473,52 g/mol olarak hesaplanmıştır. 1999 yılından beri ABD' de kullanımda olan etken maddenin erime ısı 122-123°C'dir ve rengi beyaz ve fildişi olarak belirtilmektedir. pKa değeri 6,8-6,1 arasındadır. Etanolde ve pH değeri 2,3 olan sulu tampon solüsyonlarda çözünebilmektedir. Çözünürlüğü fizyolojik sınırlar içinde pH değerinin artması ile azalmaktadır. Her bir tablet rosiglitazona eş değer miktarda rosiglitazon maleat içermektedir. Her bir tablette ayrıca inaktif bileşenler olarak hypromellose 2910, laktoz monohidrat, magnezyum stearate, microcrystalline cellulose, polyethylene glycol 3000, sodyum starch glycolate, titanium dioksit, triacetin, sentetik kırmızı ve sarı demiroksit ve talk bulunmaktadır.

Roziglitazonun maksimum plazma konsantrasyonu (C_{max}) ve eğri altında kalan alanı (AUC) terapötik doz aralığında doz arttıkça artmaktadır. Eliminasyon yarı ömrü ise dozdan bağımsız olarak 3-4 saat kadardır.

Mutlak biyoyararlanırlığı %99 olan roziglitazon pik plazma konsantrasyonuna oral alımdan yaklaşık bir saat sonra ulaşır.

Roziglitazon %99,8 oranında başlıca albumin olmak üzere plazma proteinlerine bağlanmaktadır. Ortalama dağılım hacmi 17,6 litre kadardır.

Roziglitazon büyük oranda değişmeden %64 oranında idrarla ve %23 oranında feçesle atılır. Metabolizması başlıca N-demetilasyon, hidrosilasyon ve sülfatlarla ve glukuronik asitle konjugasyondur. Dolaşımdaki metabolitleri büyük oranda daha az potenttir ve roziglitazonun insülin-hassaslaştırıcı etkisine katkıları yoktur. İn vitro çalışmalarda roziglitazonun başlıca sitokrom P450 izoenzim 2C8 ve daha olarak da izoenzim 2C9 tarafından metabolize edildiği gösterilmiştir.

Farmakokinetiği yaş, ırk, sigara içimi ve alkol alımı ile ilişkili değilken bayan cinsiyet ve kilo ile ilişkili bulunmuştur. Aynı kilodaki erkek hastalara göre bayan hastalarda roziglitazonun ortalama oral klirensi %6 daha düşük saptanmıştır (71).

Roziglitazon reseptöre U şeklinde bağlanır ve kabaca ligand bağlayan bölümün %40' ını kaplar. Bağlanma sırasında H3, H4, H10 aminoasitleri ve AF-2 (activation function 2) heliksi ile çeşitli etkileşimleri SRC-1 bağlanmasını sağlar (72) .

3. AMAÇ

İlk kez 1827' de Fransız doktor Velpeau' nun ateşli bir hastalık olarak tanımladığı akut lösemi tedavisinde günümüzde oldukça uzun bir yol katedilmiştir. Ancak agresif tedavilere rağmen ancak yalnızca %20-30 oranında hastada uzun dönem hastalıksız sağ kalım mümkün olmaktadır. Standart remisyon indüksiyon ve ardından konsolidasyon tedavileri sonrasında günümüzde hala %50 oranında relapslar görülmektedir. Relapslar sıklıkla ilk iki yılda izlenmektedir. Relaps AML' nin standart tedavisi yüksek doz kemoterapi eşliğinde kemik iliği transplantasyonudur. Tedavi etkinliğini ve başarısını artırmak üzere farklı yöntemler denenmektedir. Bu tedavi yöntemleri arasında tümör immünoterapisi, yeni kemoterapötik ajanlar, sinyal ileti sistemini hedef alan yeni moleküler ajanlar, apoptozisin hedef alındığı ilaç araştırmaları, telomeraz aktivitesine yönelik ve benzeri deneysel çalışmalar yer almaktadır.

Karsinogenezin pek çok faktörün etkisi ile oluşmasından yola çıkılarak tüm dünyada her basamak için farklı tedavi yöntemleri araştırılmaktadır. İnsülin duyarlılığını artırıcı etkileri bilinen TZD' ların preadipositten adiposit differansiyasyonu artırıcı etkileri bildirilmiştir (73). Yapılan çalışmalarla TZD' ların insanlarda pek çok kanser hücre hatlarında (prostat, meme, kolon, tiroit, akciğer, hipofiz, pankreas, böbrek, karaciğer, mesane) orta derecede antiproliferatif etki gösterdiği ve apoptozisi artırdığı saptanmıştır (75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85). Ayrıca yine bir deneysel çalışmada Ph kromozomu pozitif lenfoblastik lösemi hücre hattında TZD' ların İmatinib tedavisinin etkinliğini artırdığı ve apoptozisi indüklediği gösterilmiştir (85).

AML-M3 tedavisinde kullanılan ATRA nükleer reseptörlere etkili bir ajandır. PPAR γ da aynı reseptör ailesinin bir yesir. PPAR γ agonistlerinin etkileri için de retinoik aside gereksinim vardır. Bu noktadan hareketle saf bir PPAR γ agonisti olan roziglitazon maleatın AML hücre serisi üzerinde etkilerinin olup olmadığının araştırılması hedeflenmiştir.

Bu preliminer çalışma sırasında yapılan deneylerde tripan mavisi canlılık testleri ve sitotoksisite değerlendirilmesi n görülmüştür.



4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Lösemik Hücre Dizisi ve Hücre Kültürü

Hücre kültürü, izole hücre populasyonlarının pek çok fiziksel, kimyasal ve fizyolojik değişkenlerden uzak tutularak incelenebildiği bir ortamdır. Bu ortamdaki hücreler bir dokudan spontan migrasyon mekanik ya da enzimatik yöntemlerle ayrılır ve in vitro olarak yaşatılır ve üretilebilir. Kültür ortamında hücrelerin in vivo birbirleri ile ve ekstrasellüler matriks ile etkileşimi taklit edilir. Günümüzde hasta ve hayvan hakları gibi etik kavramlar geliştikçe in vitro testler öncelik kazanmıştır. Ayrıca hücre kültürlerinde çevresel faktörlerin daha iyi optimize edilebilmesi, deneyin tekrarlanabilmesi ve canlı organizmalara göre daha az oranda test materyali gerektirmesi en önemli avantajlarını oluşturmaktadır. Ancak deneyim gerektirmesi, asepsi şartlarına mutlak uyum zorunluluğu, pahalı olması, pasajdan pasaja hücrelerin üreme hızlarında değişkenlikler olması ve hücre orijininin kaybolabilmesi de dezavantajlarıdır. Aynı hücre tipinden oluşturulmuş kültürler histiyotipik kültürler olarak adlandırılırken farklı hücrelerin bir düzen içerisinde beraberce üretildiği kültürlerse organotipik kültürlerdir. Genellikle monolayer ve süspanse kültürler olmak üzere iki farklı hücre kültürü tipi mevcuttur. Monolayer kültürlerde (fibroblastlar, epitelyal hücreler gibi) hücreler bir destek materyalin yüzeyine tutunarak yayılırlar ve bir hücre tabakası oluştururlar, süspanse kültürler (kan, kemik iliği, lösemik hücreler gibi) ise destek materyaline ihtiyaç duymaksızın ortamda asılı olarak kalabilen hücrelerden oluşurlar. Süspanse kültür hücreleri genellikle transforme hücrelerdir (86, 87, 88).

Günümüzde hücre ve doku kültürleri; gen ekspresyonlarının gösterilmesinde, hücre proliferasyonunun ve transformasyonunun mekanizmalarının incelenmesinde, aşı geliştirilmesinde, monoklonal antikor, interferon, enzim, interlökin, hormon, büyüme faktörleri, insektisid üretilmesinde, biyouyumluluk ve sitotoksosite deneylerinde, hücre içinde belirli maddelerinin ya da substratlarının aktivite ve miktarlarının ölçümünde, ilaç ve benzeri etken maddelerin hücre içinde etki mekanizmalarının ve hücre siklusuna etkilerinin araştırılmasında, sitogenetik incelemelerde ve embriyonik araştırmalarda sıklıkla kullanım alanı bulmaktadır.

Hücre hatlarının kültür ortamında sonsuza dek devam ettirilebilmesi mümkün değildir. Bu nedenden dolayı hücrelerin stoklanmaları gereklidir.

Yapılan bu araştırmada HL-60 hücre dizisinde saf bir PPAR γ agonisti olan roziglitazon maleatin antiproliferatif, apoptozisi ve differansiyasyonu indükleyici etkileri, bu etkilerin hangi mekanizmalar üzerinden ortaya çıktığı in vitro koşullarda araştırılmıştır. Hücre dizisi Gülhane Askeri Tıp Akademisi (GATA) Kanser Araştırma ve Geliştirme Merkezi'nden Prof. Dr. Ali Uğur Ural'dan temin edilmiştir.

Bu çalışmada, in vitro koşullarda hücre kültürü yöntemleri kullanılarak, insan akut myeloblastik lösemi hücre dizisi (HL-60) üzerinde çalışılmıştır. HL-60 lösemik hücre dizisi, ilk kez 1976 yılında AML M2 tanılı 35 yaşında bir bayanın periferik kanından üretilmiştir. Uzun yıllar akut promyelositik lösemi modeli olarak yanlışlıkla adlandırılmıştır. Ama PML-RAR α veya PZDF-RAR α

füzyon geninin bulunmadığının anlaşılması doğasını aydınlatmıştır. AML lökomogenez çalışmalarında en sık kullanılan hücre serisidir (47-50). Özellikle diferansiyasyon indüksiyon araştırmalarında yoğunlukla kullanılmaktadır (51-55). DMSO, ATRA ile granüositik diferansiyasyon, metilprednisolon, vitamin D3 ve arsenik trioksit ile granüositik ve monositik diferansiyasyon, bir forbol ester türevi olan TPA ile makrofaj benzeri diferansiyasyon gösterir. Orijinal hipodiploid hücrelerin tetraploid türevleridir ve c-myc onkogeninin amplifikasyonu söz konusudur. Bu hücre serisinde p53 tümör süpressör gen ekspresyonu knock-out'dur. CD3, CD14, CD19, CD34 yüzey markırları negatif, CD4, CD13, CD15, CD33 pozitifdir (47-50).

4.1.1. Dondurulmuş Hücre Dizisinin Çözülmesi

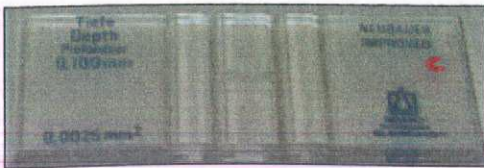
%10 DMSO ile dondurulmuş olan HL-60 hücre dizisi sıvı azot tankı veya -80°C' den çıkarıldıktan sonra 37°C' de çözüldü. Hücrelerin üzerine 10-15ml besi yeri eklenerek 800 devir/dakika' da 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Bu işlemler DMSO'nun toksik etkilerinden uzak durmak için mümkün olduğunca hızlı yapıldı. Santrifüj sonrasında oluşan süpernant atıldı ve daha sonra kalan hücre çökeltisi üzerine taze besiyeri eklenerek homojenize edildi. Tekrar toksik maddelerden kurtulmak amacıyla hücreler 1000 devir/dakika' da 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernant atıldı ve tekrar ortama taze besiyeri eklenerek homojenize edildi. Daha sonra hücreler flasklara alındı. Devam eden çalışma boyunca kullanılan hücre dizisinin devamının sağlanması ve canlılığının korunması amacıyla pasajlar yapıldı.

4.1.2. Hücre Dizisinin Pasajı

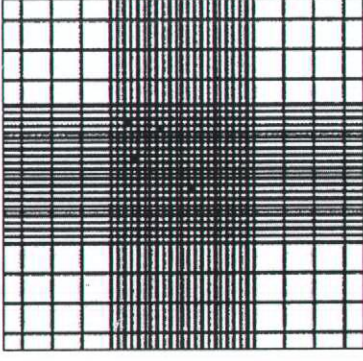
Daha önce flasklara alınmış besiyeri içindeki hücreler 50ml' lik falcon tüplere aktarıldı. Falcon tüpler 1000 devir/dakika' da 5 dakika boyunca santrifüj edildi, oluşan süpernatant ortamdan uzaklaştırıldı. Dipte kalan hücreler üzerine 10ml besiyeri eklendi ve yavaşça vortekslendi. Bu işlem sonrasında hücreler tekrar flasklara aktarıldı, üzerlerine 15ml taze besiyeri eklendi ve standart hücre kültürü ortamında çoğalmaları için beklendi.

4.1.3. Hücrelerin Sayımı

Hücreler pasajlanırken, dondurulurken, çözündürülürken ve deneyler sırasında hücre kültürünün o andaki durumunun göstergesi olarak sayıldı. Sayım işlemi besiyerinin mililitresi başına veya hücrelerin tutundukları yüzeyin cm^3 bölgesi başına hücre sayısı olarak belirlendi. Neubauer hemositometresi (Resim 3 ve Şekil 11) ile sayım yapıldı. Bu hemositometrede lamel doğru pozisyonda ise sayma odacığının derinliği 0.1mm' dir. Hücre süspansiyonu, odacığa mikro pipetler yardımıyla yerleştirilir. Mevcut hücre sayısına göre hücreler karelerin üçlü çizgilerle çevrelenmiş olduğu merkezi bölmelerde sayılabilir. Sol ve üst üçlü çizgilerdeki hücreler sayıma dahil edilir. Bu bölmelerin alanı 1 mm^2 ' dir. Böylece hacmi 0.1 mm^3 olur. Bu alandaki tüm hücreler sayılırsa ($N=0.1\text{mm}^3$ te mevcut hücre sayısı) 1 ml yani 1cm^3 teki hücre sayısı = $2N \times 10^4$ olur.



Resim 3: Neubauer Hemositometresi



Şekil 11: Neubauer Hemositometresi

HL-60 hücre dizisinde, hücre sayımı yapılarak büyüme eğrisi ile ikilenme zamanı yaklaşık 72 saat olarak bulundu. Hücrelerin pasajları ikilenme zamanına uygun olarak 72 saatte bir gerçekleştirildi. Her pasaj sırasında ortalama 2×10^6 hücre, 10 ml besiyeri konmuş flasklara alındı ve hücreler tripan mavisini ile boyandı. %90' ın üzerinde canlı hücre saptandığında işleme devam edildi. Canlı hücreler tripan mavisini boyasına geçirgen olmayıp, ölü hücreler bu boyayı hücre içine aldıklarından mavi renkte görünmektedirler. Bu özellikler doğrultusunda hücreler, inverted mikroskop kullanılarak, canlılık, çoğalma ve enfeksiyon yönünden değerlendirilmiştir.

HL-60 hücre dizisi üzerinde rozigitazon maleatin etkilerini göstermek amacıyla yaptığımız bu çalışma iki aşamadan oluşmaktadır.

- Hücre canlılığının (viabilite) değerlendirilmesi
- Sitotoksitenin değerlendirilmesi

4.2. Kullanılan Kimyasal Ajanlar

Roziglitazon maleattan 25mg alınıp 2ml DMSO ile stok solüsyon hazırlanmıştır. RPMI 1640 besi yerinde hücreler üretilmiştir. Roziglitazon maleattan 10-20-25-30-40-50-55-60-65-70-75-80-90-100 mikroMolar dilüsyonlarda örnekler hazırlanmıştır.

Kullanılan RPMI 1640 besiyeri; esansiyel aminoasitler (L-arjinin, L-sistin, L-glutamin, L-histidin, L-izolösin, L-lösin, L-lizin, L-metiyonin, L-fenilalanin, L-treonin, L-tirozin, L-valin), nükleozid, pirüvat, Ca^{+2} , Mg^{+2} , Na^{+} , K^{+} , Cl^{-} , P^{-3} , HCO_3^{-} , Fe, Zn, Se, glukoz, B grubu vitaminleri içermektedir. Besi ortamına enerji kaynağı ve karbon vericisi olarak glutamin, nonesansiyel aminoasitler (L-alanin, L-asparajin, L-aspartik asit, L-pirolin, L-glisin, L-serin), enfeksiyonu önlemek amacıyla da penisilin ve streptomisin eklenmiştir. Enerji kaynağı olarak glukoz yerine glutamin tercih edilmesinin sebebi fazla miktarda glukoz kullanıldığında glikolizis ile laktik asid oluşumu ve pH' ın düşmesidir. Düşük pH değerlerinde hücrelerin üremesi inhibe olacaktır. Glutamin ışıktan ve beklemekle degradasyona uğrayacağı için her onbeş günde bi mediuma ilave edilerek işleme devam edilmiştir.

Kültivasyon işlemleri Jouan marka Hood ve Stericult 200 marka inkübatörde yapılmıştır. İşlem öncesi Hood otuz dakika süreyle ultraviyole lambası ile sterilize edilmiş ve alkol ile silinmiştir.

Tablo 4' de kullanılan kimyasal ajanlar görülmektedir.

Kimyasal Ajan	Markası
Rozigitazon maleat	US Biological
DMSO	Sigma Chemical Co., St Louis Missouri
Tripan Mavisi	Sigma Chemical Co., St Louis Missouri

Tablo 4: Kullanılan kimyasal ajanlar

4.3. Kullanılan Cihazlar

Tablo 5' da kùltivasyon işlemleri ve deneylerde kullanılan cihazlar izlenmektedir.

Cihaz	Markası
Karbondioksitli İnkübatör	Stericult 200
Otomatik mikropipetler	Eppendorf
Laminar Hava Akımlı Kabin	Jouan
Işık Mikroskobu	Olympus, Japan
Steril Kùltür Kapları (Flask)	Greiner
Çok kuyucuklu plateler (6, 24, 96)	Greiner
Vorteks	Electro-mag
Lam	Neubauer
Falcon tüpler	Greiner

Tablo 5: Kullanılan Cihazlar

4.4. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi

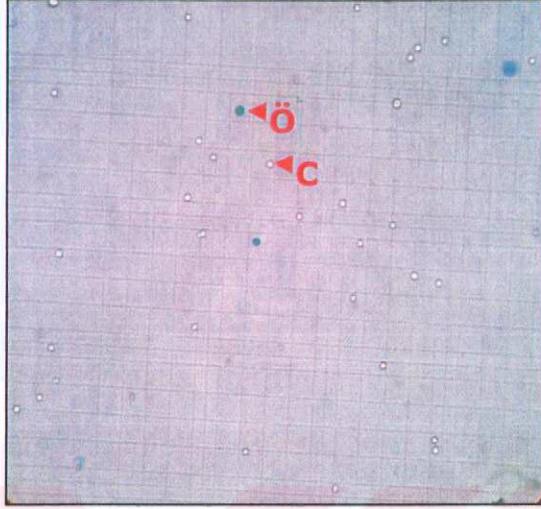
HL-60 hücrelerinde, rozigitazon maleatın sitotoksik etkisini göstermek amacıyla;

1. 24 kuyucuklu platelerde, her kuyucuk içine çift kontrollü olarak rozigitazon maleatın 10-20-25-30-40-50-55-60-65-70-75-80-90-100 mikromolar konsantrasyonları ilave edilmiştir.
2. Kuyucuklar üzerine, içinde $2-4 \times 10^5$ hücre/ml olacak şekilde, 1ml besiyeri eklenmiştir.
3. Negatif kontrol olarak 1 ml besiyeri kullanılmıştır.
4. Platelere içindeki hücreler, 37°C ' de ve % 95 nem % 5 CO_2 ' li etüvde inkübe edilmiştir.
5. Hücre canlılığı 0, 24, 48, 72 ve 96. saatlerde Tripan mavisi canlılık testi ile değerlendirilmiştir.

4.4.1. Tripan Mavisi Canlılık Testi

1. 24 kuyucuklu platelerdeki her bir kuyucukta, farklı konsantrasyonlarda rozigitazon maleat içeren hücrelerden 50 µl alınarak 96 kuyucuklu platelere, her bir konsantrasyon için 2 kez tekrarlanacak şekilde hücreler aktarılmıştır.
2. Hücreler üzerine 50 µl Tripan mavisi eklenerek Neubauer lamında ışık mikroskopunda değerlendirilmiştir. Canlı hücreler Tripan mavisi boyasını metabolize edip hücre dışına attıklarından boya almamış yani beyaz renkte görünürken ölü hücreler boyayı almış yani mavi renkte görülmektedir (Resim 4) (89).

3. Neubauer lamında bir alanda sayılan 1 hücre ml' de 2×10^4 hücreye eşit olacak şekilde hücre sayımı yapılmıştır.



Resim 4: Tripan mavisi boyası ile hücre sayımı. Ö: Ölü hücre, C: Canlı hücre

4.5. Sitotoksisitenin Değerlendirilmesi

HL-60 hücrelerinde rozigitazon maleatın sitotoksik etkisinin değerlendirilmesi için Tripan Mavisi yönteminden sonra XTT yöntemi kullanılmıştır.

4.5.1. XTT Yöntemi

Hücreler 24, 48, 72 ve 96. saatlerde XTT (2,3-bis [2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide inner salt) solüsyonu kullanılarak spektrofotometrik olarak değerlendirilmiştir.

Reaktifler 50 birim XTT ajanı (Labelling reagent)/1 birim aktivasyon ajanı (electron coupling reagent) olacak şekilde karıştırılarak XTT solüsyonu hazırlanmıştır. XTT suda çözünen bir tetrazolium tuzudur ve bu yöntem de

tetrazolium tuzuna dayanan kolorimertrik bir metoddur. XTT metodu ilk kez 1988 yılında Scudiero tarafından tanımlanmıştır. Tetrazolium tuzunun, metabolik olarak aktif, çekirdekli hücre mitokondrilerinde dehidrogenaz enzimi ile suda çözünen ve turuncu renk veren formazana dönüşümü prensibi ile çalışan bir metoddur. Başlangıçta ortamdaki renk sarı iken, madde canlı hücrelerde metabolize edildikçe turuncuya döner. Canlı hücre sayısı ne kadar fazla ise renkte koyulaşma o kadar fazla gözlenir. Formazandan kaynaklanan turuncu renk reaksiyonu, spektrofotometrik olarak okunup, kantite edilmektedir. Boyanın yoğunluğu, metabolik olarak aktif hücrelerin sayısı ile orantılıdır. Kuyucuklardaki aktif hücrelerin sayılarının çokluğu ise, mitokondriyal enzimlerin aktivitesinin çokluğu ile doğru orantılıdır.

Tripan mavisi ile canlılığı doğrulanan HL-60 hücre süspansiyonu, 96 kuyucuklu mikrolatelerde her bir kuyucuğa 1×10^6 hücre/ml düşecek şekilde düzenlenmiştir. Her ölçüm aşaması (0, 24, 48, 72 ve 96. saat) için ayrı bir mikrolate hazırlanmıştır. Her bir kuyucuğa 100 µl hücre süspansiyonu ve kontrol dışındaki kuyucuklara belli konsantrasyonlarda rozigitazon maleat eklenmiştir. Toplam hacim, besiyeri ile 200 µl' ye tamamlanmış, negatif kontrol olarak hücre ve reaktif içermeyen 200 µl besiyeri kullanılmıştır. Mikrolateler içindeki hücreler nemli, 37°C' de % 5 CO₂ ortamında inkübe edilmiştir. Graplardan 0, 24, 48, 72 ve 96. saatlerde birer mikrolate alınmış, her kuyucuğa 50 µl XTT solüsyonu eklenmiş ve dört saat daha inkübe edilmiştir. 492 nanometre dalga boyunda ve 630 referans aralığında her bir kuyucuğun absorbans değeri (OD), spektrofotometre (ELISA okuyucusu)

kullanılarak okunmuştur. Negatif kontrol sıfır absorbans olarak kullanılmıştır. Sitotoksosite yüzdesi aşağıdaki formül kullanılarak saptanmıştır.

$$\% \text{ Sitotoksosite} = 1 - \frac{\text{Ölçülen optik dansite değeri}}{\text{Kontrol optik dansite değeri}} \times 100$$

4.6. İstatistiksel Değerlendirme

Deneylemler sonucunda elde edilen veriler Ege Üniveristesi Fen Fakültesi İstatistik Bölümünden Prof. Dr. Hayal Boyacıoğlu tarafından istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. İstatistiki analiz olarak T test kullanılmıştır. T test sonuçlarında p değeri 0.05 altında olanlar istatistiksel olarak anlamlı olarak değerlendirilmiştir.

5. SONUÇLAR

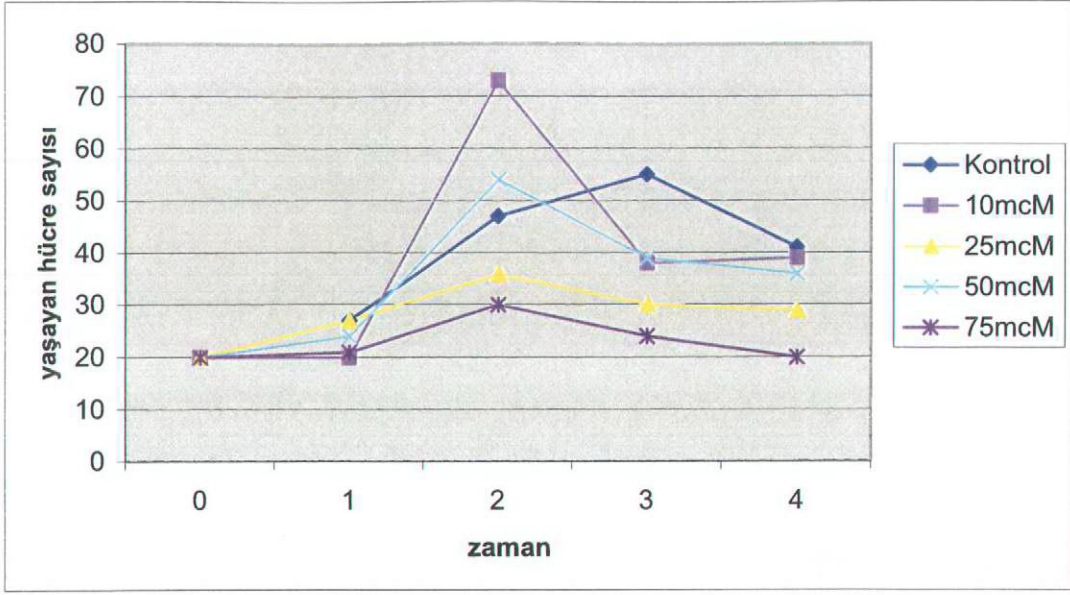
Roziglitazon maleatın sitotoksik etkileri HL-60 hücre dizisi üzerinde araştırılmış ve elde edilen sonuçlar grafiklerle gösterilmiştir.

5.1. Roziglitazon maleatın hücre canlılığı üzerine etkisi

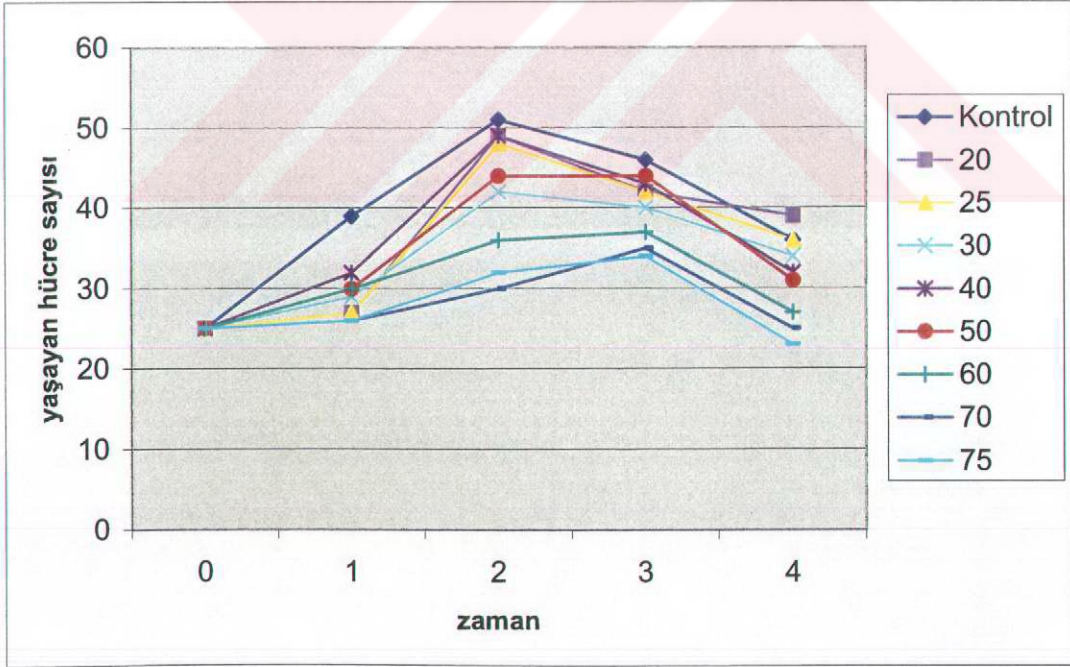
5.1.1 Tripan Mavisi Canlılık Testi Sonuçları

Roziglitazon maleatın 10-20-25-30-40-50-55-60-65-70-75-80-90-100 mikroMolar konsantrasyonları ile deneyler kurulmuştur. Sitotoksisite 70 mikroMolar ve üzeri konsantrasyonda giderek artan oranda saptanmıştır.

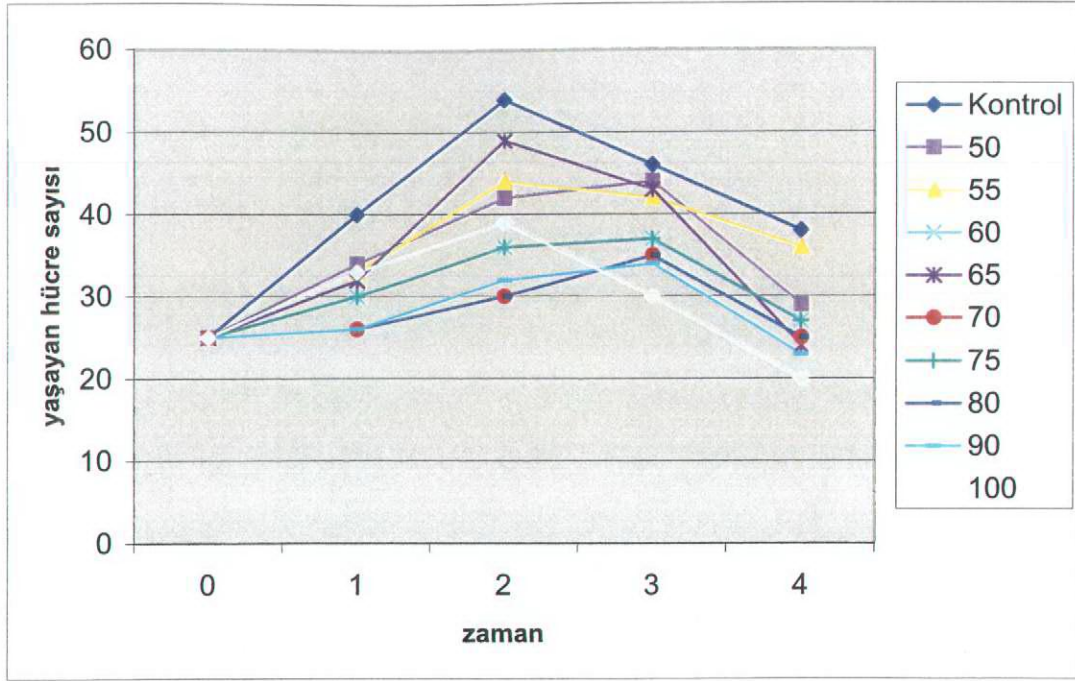
Roziglitazon maleat için inhibitör konsantrasyon (IC_{50}) dozu 75 mikroMolar (mM) olarak belirlenmiştir. Çift kontrollü olarak yürütülen deneylerde 24., 48., 72. ve 96. saatlerde Tripan mavisi boyası ile yapılan canlılık testi sonuçları Grafik 1-8' de belirtilmiştir.



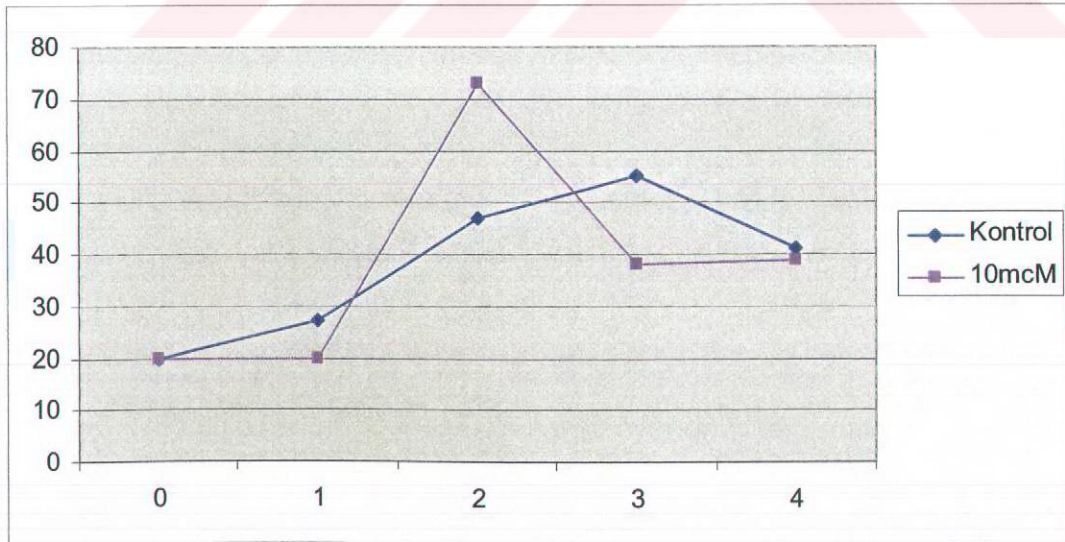
Grafik 1: Rozigitazonun 10, 25, 50, 75 mcM konsantrasyonlarında tripan mavisi boyası ile 0., 24., 48., 72. ve 96. saatlerdeki canlılık değerlendirmesi



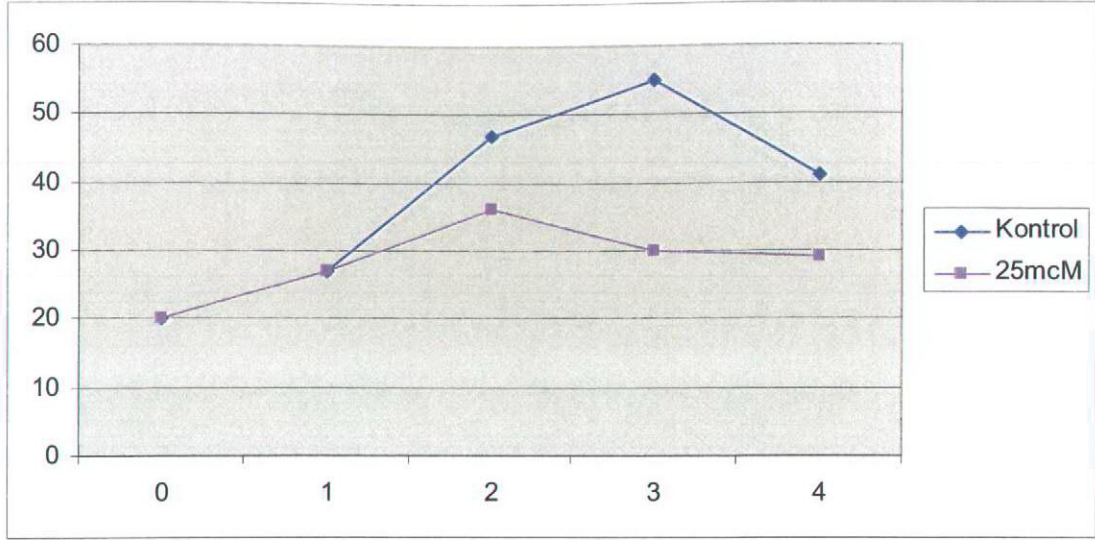
Grafik 2: Rozigitazonun 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 75 mcM konsantrasyonlarında tripan mavisi boyası ile 0., 24., 48., 72. ve 96. saatlerdeki canlılık değerlendirmesi



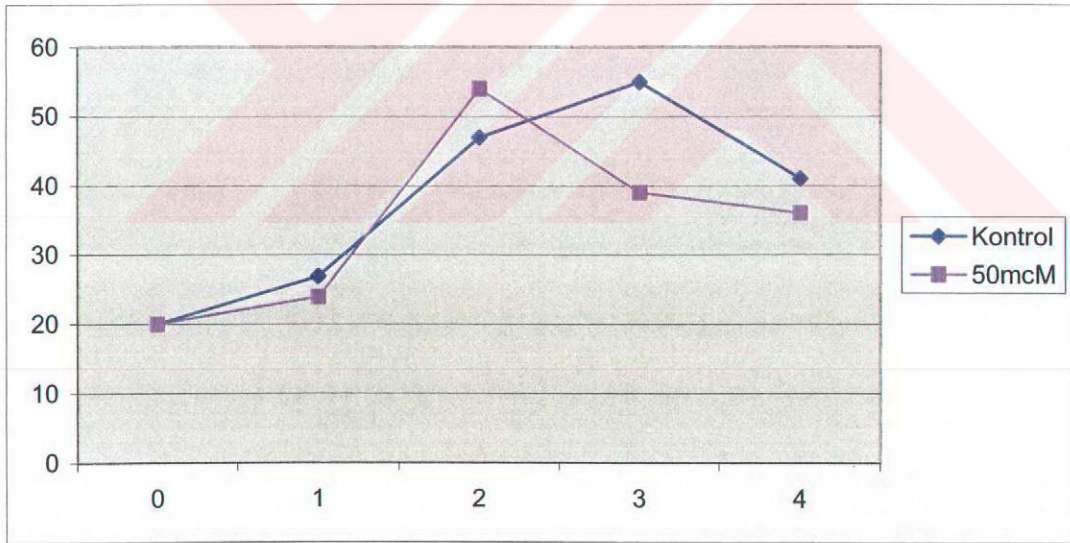
Grafik 3: Rosiglitazonun 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 90, 100 mcM konsantrasyonlarında tripan mavisi boyası ile 0., 24., 48., 72. ve 96. saatlerdeki canlılık değerlendirmesi



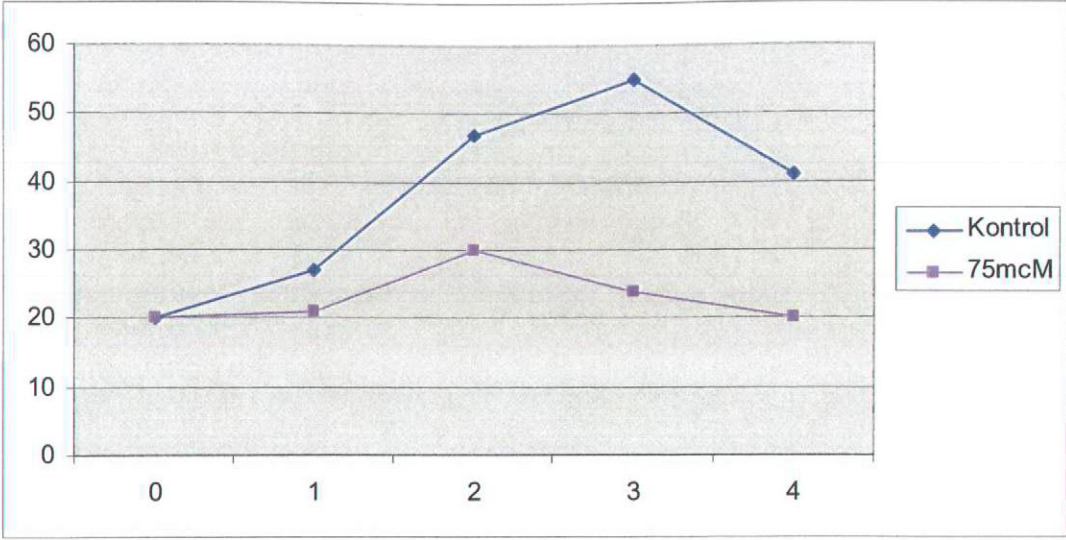
Grafik 4: Rosiglitazonun 10 mcM konsantrasyonda tripan mavisi boyası ile 0., 24., 48., 72. ve 96. saatlerdeki canlılık değerlendirmesi



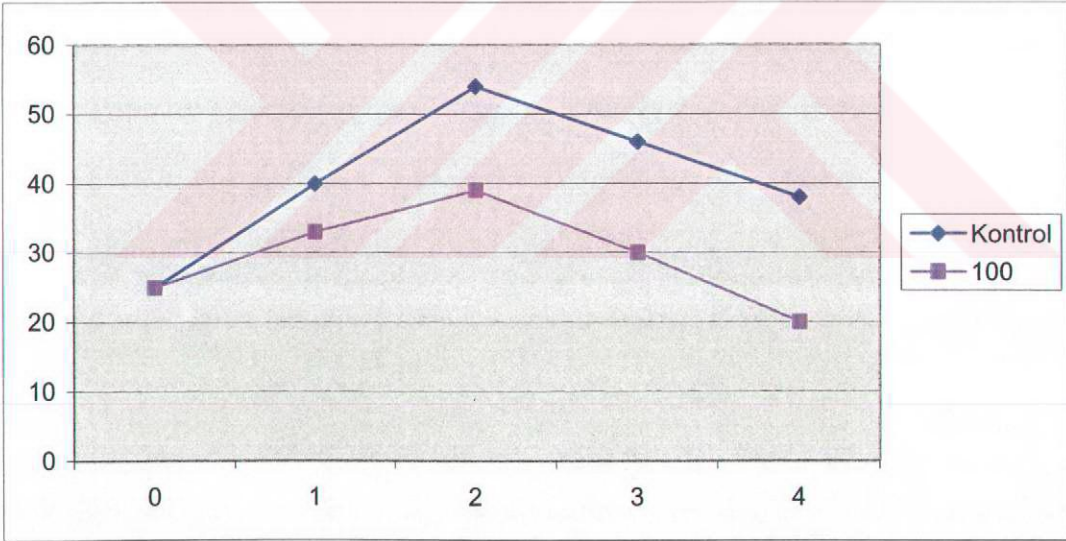
Grafik 5: Rozigitazonun 25 mcM konsantrasyonda tripan mavisi boyası ile 0., 24., 48., 72. ve 96. saatlerdeki canlılık değerlendirmesi



Grafik 6: Rozigitazonun 50 mcM konsantrasyonda tripan mavisi boyası ile 0., 24., 48., 72. ve 96. saatlerdeki canlılık değerlendirmesi



Grafik 7: Rozigitazonun 75 mcM konsantrasyonda tripan mavisi boyası ile 0., 24., 48., 72. ve 96. saatlerdeki canlılık değerlendirmesi



Grafik 8: Rozigitazonun 100 mcM konsantrasyonda tripan mavisi boyası ile 0., 24., 48., 72. ve 96. saatlerdeki canlılık değerlendirmesi

İstatistiksel değerlendirmede 75mcM konsantrasyondaki sitotoksosite kontrol grubu ile kıyaslandığında her defasında anlamlı bulundu ($p < 0.05$).

5.2. Rozigitazon maleatın sitotoksisite üzerine etkisi

5.2.1. XTT Testi Sonuçları

Tripan mavisi testi sonuçları ile benzer olarak XTT testinde de hücre proliferasyonunda %50 oranda azalmaya neden olan IC_{50} dozu 75mcM konsantrasyonda saptandı.



6. TARTIŞMA

Hücre proliferasyonu, apoptozis ve terminal differansiyasyon arasındaki dengelerin bozulması sonucunda neoplastik hücre büyümesi ortaya çıkmaktadır. Her geçen gün kanser tedavileri ile ilgili pek çok gelişme kaydedilmektedir. Bunlardan birisi de nükleer reseptörlerin ligandları aracılığı ile differansiyasyon ve apoptozisin indüklenmesidir. Nükleer reseptörler ve fonksiyonları tanındıkça kanser tedavisi için giderek daha da artan bir hızda hedef teşkil edeceklerdir, çünkü bu moleküller gen transkripsiyonunda anahtar rol oynamaktadırlar. Bunun klasik tedavide yerini almış örneği AML-M3 tedavisinde kullanılan retinoik asittir.

PPAR γ agonistleri, hücre sel hemostaz ve differansiyasyonu regüle eden anahtar genlerin fonksiyonlarını düzenlerler. Altta yatan mekanizması halen tam açıklanamamış olsa da antitümör aktivitesine sahiptirler. PPAR γ ' nın miyeloid ve monositik lösemi hücre hatlarında indüklenbildiği ya da eksprese edildiği gösterilmiştir (90, 91). Günümüzde PPAR γ ' nın ayrıca liposarkom, kolon karsinomu, gastrik karsinom, pankreas karsinomu, özefagus karsinomu, meme karsinomu, hepatoma, prostat karsinomu, mesane karsinomu, renal hücreli karsinom, akciğer karsinomu, astrositoma, glioma, nöroblastoma, oral skuamöz hücreli karsinom, papiller tiroid karsinomu, koryokarsinom, osteosakom, lenfoid lösemiler, lenfoma ve myelomada eksprese edildiği bilinmektedir (25).

Doğal ya da sentetik ligandları ile PPAR γ ' nın aktive edilmesi hücre proliferasyonunun inhibisyonunu ve/veya apoptozis ve differansiyasyonun

indüklenmesini sağlamaktadır. PPAR γ agonistleri siklin bağımlı kinaz inhibitörlerini hedef alır ve indükler. Glitazonlarla cip/kip ailesine ait bir CDK inhibitörü olan p21' in indüklenmesi sonucunda pankreatik tümör hücre hatlarında G1 fazında arrest izlenmiştir (92). Ayrıca CDK' ları da direkt inhibe ederek hücre siklusunun durmasına neden olurlar. TGZ tedavisi ile MCF-7 meme kanseri hücre hattında hücrelerin G1 fazında durdukları gözlenmiştir. Yapılan çalışmalarla TGZ' un özellikle siklin D1' i hedef aldığı gösterilmiştir. Ayrıca siklin D1' in overekspresyonu indüklendiğindeyse hücrelerin troglitazonun (TGZ) neden olduğu hücre ölümünden kurtuldukları izlenmiştir (93).

Yine Shao et al. tarafından yapılan bir çalışmada PPAR γ aktivasyonunun hücre siklusunda G1 fazındaki süreyi uzattığı ve uzamanın da PI3K/Akt aktivitesindeki artışa ve aynı zamanda siklin D1 ekspresyonundaki azalmaya bağlı olduğu gösterilmiştir (94).

Yukarda değinilen çalışmalar PPAR γ aktivasyonunun antiproliferatif etkilerini açıklamaya çalışmaktadır. Bunun dışında apoptozisi indüklediği de pek çok çalışmada gösterilmiştir. İnsan meme kanseri hücrelerinin troglitazon ve ATRA' ya maruz bırakılması sonucunda antiapoptotik genlerin prototipi sayılan bcl-2 seviyesinin neredeyse ölçülemeyecek düzeylerde düşük olduğu saptanmıştır (95). Yine meme kanseri hücre hattında PPAR γ aktivasyonu ile meme epitelyal gen ekspresyonunda daha çok differansiye, daha az malign olacak şekilde değişiklikler ve lipid birikimi izlenmiştir (96).

PPAR γ aktivasyonunun sağladığı antineoplastik etkileri özetlemek gerekirse;

1. CDK inhibitörlerinin upregülasyonu, CDK aktivitesinin inhibisyonu ve PI3K/Akt aktivitesinin inhibisyonu sayesinde antiproliferatif etkiler.
2. Azalmış Bcl-2, artmış Bax ve Bad düzeyleri, kaspaz aktivitesinde artış, c-myc ve FLIP düzeylerine azalma sayesinde antiapoptotik etkiler sağlar.
3. Progenitor hücre markerlarında azalma ve differansiyasyon markerlarında artış sayesinde differansiyasyonu indükler.
4. Endotel hücre proliferasyonunun ve migrasyonunun inhibisyonu ve VEGF, Flt ve leptin düzeylerinde azalma sayesinde anjiogenezini inhibe eder (25).

İn vivo olarak da troglitazonun intermediate ve yüksek gradeli liposarkomlu hastalarda malign hücrelerin histopatolojik olarak lipojenik differansiyasyonunun indüklendiği gösterilmiştir (97).

Solid tümörler üzerine yapılan başlıca araştırmalardan sonra lösemik hücre hatlarında da PPAR γ aktivasyonu çalışılmıştır. Makrofajların ve myelomonositik lösemi hücrelerinin aşırı miktarda PPAR γ eksprese ettikleri bilinmektedir. Ayrıca Tontonoz P et al. tarafından yürütülen bir çalışmada da monositik lösemi hücre hattı olan THP-1' de PPAR γ 'nın ligandla aktivasyonu sonrasında CD11b, CD14 ve CD18 gibi differansiyasyon markerlarının artmış ekspresyonu gösterilmiştir (90).

Hem myeloid hem de lenfoid lösemik hücre hatlarında PPAR γ ekspresyonu gösterilmiştir. PPAR γ ' nın 15-deoxy-D_{12,14} – prostaglandin J₂ gibi bir doğal ligandı ya da troglitazon gibi sentetik bir ligandı ile aktivasyonu sonucunda proliferasyonun inhibe olduğu ve apoptozisin indüklendiği gözlemlenmiştir. Yapılan incelemelerle apoptozis indüksiyonunun kaspaz 3 aktivasyonu sayesinde gerçekleştiği anlaşılmıştır. Ayrıca troglitazon tedavisinin 24. saatinde diğer apoptozis ile ilişkili moleküller değişmeden kalırlarken c-myc ekspresyonu belirgin olarak down-regüle olmuştur (98).

Hirase N et al. promyelositik hücre hattı HL60 üzerinde yaptıkları çalışmalarda TZD' un hücre siklusunun G0/G1 fazında arreste yol açarak ve de apoptozisi indükleyerek proliferasyonu belirgin şekilde suprese ettiğini göstermişlerdir (99). Ayrıca yine myelositik lösemi hücre hattında troglitazon ve 15-deoxy-D_{12,14} – prostaglandin J₂' nin Bax upregülasyonu ve Bcl-2 ve survivin downregülasyonu ile anlamlı derecede apoptozisi indüklediği gösterilmiştir (100).

İlginç olarak PPAR γ ' nın ligandla aktivasyonundan bağımsız bir şekilde de yüksek konsantrasyonlarda fosforilasyonla ökaryotik başlatma faktörü-2 (initiation factor 2)' yi inhibe ederek translasyonun başlamasını inhibe ettiği gösterilmiştir (101).

Akut promyelositer lösemi vakalarının yaklaşık %90' ında ATRA tedavisi ile komplet remisyon sağlanabilmektedir. Ancak ATRA dirençli ve nüks vakalarda arsenik triksit ve histon deasetilaz inhibitörleri kullanımı yanında

PPAR γ agonistlerinin kullanımı da bir seçenek gibi görünmektedir. PPAR γ aktivitesinin inhibisyonunun, APL patofizyolojisindeki differansiyasyonda duraklamaya katkısı olabileceği ve bu bilgiler ışığında PPAR γ ' nın ligandla aktivasyonunun APL hücrelerinin differansiyasyonunu sağlayabileceği düşünülmüştür.

Glitazonlar 1990 yılında Isseman ve Green tarafından nükleer reseptörlerden gen transkripsiyonuna yol açan ve peroksizom proliferasyonuna neden olan moleküller olarak tanımlandı (102). Bir dekat içinde PPAR' ların fonksiyonları tanımlandı. Yine yakın gelecekte bu fonksiyolar üzerinden işleyen mekanizmalar detaylandırılıp hastalıkların tedavisinde yeni basamaklar oluşturulacaktır.

Tezimizde myelositik lösemi hücre dizisi olan HL-60 üzerinde PPAR γ ' nın sentetik ligandlarından roziglitazon maleatın sitotoksik etkisi olup olmadığı araştırıldı. IC₅₀ dozunun 75mcM konsantrasyonda olduğu saptandı.

PPAR γ agonisti olarak roziglitazon maleat; glitazonlar içinde PPAR γ reseptörüne bağlanma affinitesinin en yüksek düzeyde yani IC₅₀ dozunun en düşük düzeyde olmasından dolayı seçildi. Bilindiği üzere PPAR γ reseptörüne bağlanma affinitesi roziglitazonda pioglitazona göre 30 kat, troglitazona göre ise 100 kat fazladır (103).

Literatürde roziglitazon maleat ile HL-60 hücre serisinde yürütülen çalışmalarda IC₅₀ dozu saptanamamış, daha düşük konsantrasyonlarda

deneyler sonlandırılmıştı (104). Bizim yaptığımız deneyler sonucunda literatürde bahsedilen çalışmalardan daha yüksek konsantrasyonda IC₅₀ dozunu saptadık.

Bundan sonraki aşamada bu dozda hücrelerin differansiyasyon gösterip göstermedikleri ve apoptozise gidip gitmedikleri incelenecektir.

Bu çalışma ile lösemik hücre hatlarında apoptozis, differansiyasyon ve hücre siklusu ile daha geniş bilgi edinilmeye çalışılmış ayrıca ilerideki çalışmalara yol gösterebilecek sonuçlar elde edilmiştir. Bu sayede akut lösemi tedavisinde bir aşama daha katdedilebilecektir. Dirençli AML-M3 olgularında PPAR γ agonisti rosiglitazon maleatın additif etki yaratıp yaratmayacağı ileri çalışmalar için amaçlanabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Chawla A, Repa JJ, Evans RM, Mangelsdorf DJ. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science* 2001; 294: 1866-70.
2. Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med* 2002; 53: 409-35.
3. Barbier O, Torra IP, Duguay Y, et al. Pleiotropic actions of peroxisome proliferator activated receptors in lipid metabolism and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 717-26.
4. Green S. PPAR: a mediator of peroxisome proliferator action. *Mutat Res* 1995; 333(1-2): 101-9.
5. <http://en.wikipedia.org/wiki/Xenopus>. 14 Mart 2007.
6. Smirnov AN. Nuclear receptors: nomenclature, ligands, mechanisms of their effects on gene expression. *Biochemistry (Mosc)* 2002 Sep; 67(9): 957-77.
7. Germain P, Staels B, Dacquet C, Spedding M, Laudet V. Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev* 2006; 58(4): 685-704.
8. Gronemeyer H, Gustafsson JA, Laudet V. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat Rev Drug Discov.* 2004; 3(11): 950-64.
9. Kabalak T, Yılmaz C, Tüzün M. *Endokrinoloji El Kitabı*. İzmir Güven Kitabevi, 3. Basım, 2004, 19-44.
10. Novac N, Heinzl T. Nuclear receptors: overview and classification. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy.* 2004; 3(4): 335-46.

11. Nuclear Receptors Nomenclature Committee. A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell*. 1999; 97(2): 161-3.
12. http://en.wikipedia.org/wiki/nuclear_receptors. 14 Mart 2007.
13. <http://en.wikipedia.org/wiki/Peroxisome>. 14 Mart 2007.
14. Junqueira LC, Carneiro JK, Robert O. *Basic Histology*. Appleton & Lange, 11th ed, 2005, 49.
15. http://en.wikipedia.org/wiki/Peroxisome_proliferator-activated_receptor. 16 Mart 2007.
16. Mångelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM. The Nuclear Receptor Superfamily: The Second Decade. *Cell*. 1995; 83: 835–839.
17. Uppenberg J, Svensson C, Jaki M, Bertilsson G, Jendeberg L, Berkenstam A. Crystal Structure of the Ligand Binding Domain of the Human Nuclear Receptor PPAR γ . *The Journal Of Biological Chemistry*. 1998; 273(47): 31108-31112.
18. Takeyama K, Kodera Y, Suzawa M, Kato S. Peroxisome proliferator-activated receptor(PPAR)—structure, function, tissue distribution, gene expression. *Nippon Rinsho*. 2000; 58(2): 357-63.
19. Järvinen HY. Thiazolidinediones. *N Engl J Med*. 2004; 351: 1106-18.
20. Beamer BA, Negri C, Yen CJ. Chromosomal localization and partial genomic structure of the human peroxisome proliferator activated

- receptor- γ (hPPAR γ) gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 233: 756-9.
21. Zhu Y, Qi C, Korenberg JR. Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor γ (MPPAR γ) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR γ isoforms. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 92: 7921-5.
 22. Fajas L, Auboeuf D, Raspe E. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPAR- γ gene. *J Biol Chem.* 1997; 272: 18779-89.
 23. Fajás L, Fruchart JC, Auwerx J. PPAR γ 3 mRNA: a distinct PPAR γ mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Lett.* 1998; 438: 55-60.
 24. Sundvold H, Lien S. Identification of a novel peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma promoter in man and transactivation by the nuclear receptor ROR α 1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 287: 383-90.
 25. Wang T, Xub J, Yu X, Yang R, Hana ZC. Peroxisome proliferator-activated receptor γ in malignant diseases. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2006; 58: 1–14.
 26. Michalik L, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors beta/delta: emerging roles for a previously neglected third family member. *Curr Opin Lipidol.* 2003; 14: 129-35.
 27. Duez H, Chao YS, Hernandez M, et al. Reduction of atherosclerosis by the peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist fenofibrate in mice. *J Biol Chem.* 2002; 277: 48051-7.

28. Rubins HB, Robins SJ, Collins D, et al. Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol. *N Engl J Med.* 1999; 341: 410-8.
29. Diabetes Atherosclerosis Intervention Study Investigators. Effect of fenofibrate on progression of coronary-artery disease in type 2 diabetes: the Diabetes Atherosclerosis Intervention study, a randomised study. *Lancet* 2001; 357: 905-10. [Erratum, *Lancet* 2001; 357: 1890.]
30. Nolan JJ, Ludvik B, Beerdsen P, Joyce M, Olefsky J. Improvement in glucose tolerance and insulin resistance in obese subjects treated with troglitazone. *N Engl J Med.* 1994; 331: 1188-93.
31. Miyazaki Y, Glass L, Triplitt C, et al. Effect of rosiglitazone on glucose and nonesterified fatty acid metabolism in Type 2 diabetic patients. *Diabetologia* 2001; 44: 2210-9.
32. Evans JL, Rushakoff RJ. Oral pharmacological agents for type 2 diabetes: sulfonylureas, meglitinides, metformin, thiazolidinediones, α -glucosidase inhibitors, and emerging approaches. www.endotext.com. 2002; Chapter 14. 09 Ocak 2005.
33. Suter SL, Nolan JJ, Wallace P, Gumbiner B, Olefsky JM. Metabolic effects of new oral hypoglycemic agent CS-045 in NIDDM subjects. *Diabetes Care* 1992; 15: 193-203.
34. Bajaj M, Suraamornkul S, Piper P, et al. Decreased plasma adiponectin concentrations are closely related to hepatic fat content

- and hepatic insulin resistance in pioglitazone-treated type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 200-6.
35. Miyazaki Y, Mahankali A, Matsuda M, et al. Effect of pioglitazone on abdominal fat distribution and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 2784-91.
36. Sakamoto J, Kimura H, Moriyama S, et al. Activation of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) subtypes by pioglitazone. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 278: 704-11.
37. Beutler E, Lichtman M, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U. Acute myelogenous leukemia. *Williams Hematology*. McGraw Hill, 6th Edition, 2001, 1047-1084.
38. Hillman RS, Ault KA, Rinder HM. The acute myeloid leukemias. *Hematology in Clinical Practice*. McGraw Hill, 4th Edition, 2005, 206-219.
39. Jemal A, Thomas A, Murray T, Thun M. Cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2002; 52(1): 23-47.
40. Greer JP, Rodgers GM, Foerster J, Paraskevas F, Lukens JN, Glader B. The acute leukemias. *Wintrobe's Clinical Hematology*. Williams & Wilkins, 11th Edition, 2004, 2045-2206.
41. Kern WF. The acute leukemias. In *PDQ Hematology*. Bc Decker Inc, 2002, 227-254.
42. Mazza JJ. Acute leukemias in adults. *Manual of Clinical Hematology*. Lippincott Williams & Wilkins PA, 3rd edition, 2002, 214-227.
43. Schiffer CA. The acute myeloid leukemia in adults: where do we go from here? *Cancer Chemother Pharmacol* 2001; 48(1): 45.

44. Liu J, Lu H, Huang R, Lin D, Wu X, Lin Q. Peroxisome proliferator activated receptor- γ ligands induced cell growth inhibition and its influence on matrix metalloproteinase activity in human myeloid leukemia cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005; 56: 400–408.
45. Steffen B, Tidow CM, Schwable J, Berdel WE, Serve H. The molecular pathogenesis of acute myeloid leukemia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2005; 56: 195-221.
46. Ihle JN. Signal transducers and activators of transcription. *Cell* 1996; 84: 331-334.
47. Ferrajoli A, Faderl S, Ravandi F, Estrov Z. The JAK-STAT pathway: a therapeutic target in hematological malignancies. *Curr Cancer Drug Targets*. 2006; 6(8): 671-9.
48. http://en.wikipedia.org/wiki/Janus_kinase. 27 Mart 2007.
49. http://en.wikipedia.org/wiki/JAK-STAT_signaling_pathway. 27 Mart 2007.
50. Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler CW. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* 2002; 285: 1-24.
51. Hebenstreit D, Horejs-Hoeck J, Duschl A. JAK/STAT-dependent gene regulation by cytokines. *Drug News Perspect* 2005; 18(4): 243-249.
52. Krebs DL, Hilton DJ. SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem Cells* 2001; 19: 378-387.
53. Shuai K. Regulation of cytokine signaling pathways by PIAS proteins. *Cell Research* 2006; 16(2): 196–202.

54. Sawyers CL. Molecular genetics of acute leukemia. *Lancet* 1997;349:196-200.
55. www.akutlosemikursu.com, 2004.
56. Pandolfi PP. Oncogenes and tumor suppressors in the molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Human Molecular Genetics*. 2001; 10(7): 769-775.
57. Piazza F, Gurrieri C, Pandolfi PP. The theory of APL. *Oncogene*. 2001; 20: 7216-7222.
58. Cooper GM, Hausman RE. *Hücre: Moleküler Yaklaşım*. ASM Press, 3rd Edition, 2006; 579-590.
59. Adams JM, Cory S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci*. 2001; 26(1): 61-6.
60. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. *Basic Pathology*. W. B. Saunders, 6th Edition, 2000; 13-15.
61. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. *Basic Pathology*. W. B. Saunders, 6th Edition, 2000; 154-156.
62. Bold RJ, Termuhlen PM, McConkey DJ. Apoptosis, cancer and cancer therapy. *Surgical Oncol* 1997; 6(3): 133-142.
63. Allen RT, Hunter WJ, Agrawal DK. Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. *J Pharmacol Toxicol Meth* 1997; 37: 215-228.
64. Sareste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular Research*. 2000; 45: 528-537.
65. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 1995; 267(5203): 1456-62.

66. Yuan J, Horvitz HR. A First Insight into the Molecular Mechanisms of Apoptosis. *Cell* 2004; 116: 53-56.
67. Li P, Nijhawan D, Wang X. Mitochondrial Activation of Apoptosis. *Cell* 2004; 116: 57-59.
68. Cohen GM. Caspases; the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997; 326: 1-16.
69. Brown SB, Bailey K, Savill J. Actin is cleaved during constitutive apoptosis. *Biochem J* 1997; 323: 233–237.
70. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell Death: Critical Control Points. *Cell* 2004; 116: 205-219.
71. Avandia prescribing information. Erişim adresi: http://us.gsk.com/products/assets/us_avandia.pdf. 01 Haziran 2007.
72. Konopleva M, Andreeff M. Role of peroxisome proliferator-activated receptor- γ in hematologic malignancies. *Hematol* 2002, 9:294–302.
73. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR γ 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 1994; 79(7); 1147-1156.
74. Kubota T, Koshizuka K, Williamson EA, Asou H, Said JW, Holden S, Miyoshi I, Koeffler HP. Ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (troglitazone) has potent antitumor effect against human prostate cancer both in vitro and in vivo. *Cancer Research* 1998; 58: 3344-3352.
75. Kato M, Kusumi T, Tsuchida S, Tanaka M, Sasaki M, Kudo H. Induction of differentiation and peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression in colon cancer cell lines by

- troglitazone. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 2004; 130: 73-79.
76. Ohta K, Endo T, Haraguchi K, Hershman JM, Onaya T. Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibit growth and induce apoptosis of human papillary thyroid carcinoma cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2001; 86: 2170-2177.
77. Tsubouchi Y, Sano H, Kawahito Y, Mukai S, Yamada R, Kohno M, Inoue K, Hla T, Kondo M. Inhibition of human lung cancer cell growth by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists through induction of apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2000; 270: 400-405.
78. Yin F, Wakino S, Liu Z, Kim S, Hsueh WA, Collins AR, Van Herle AJ, Law RE. Troglitazone inhibits growth of MCF-7 breast carcinoma cells by targeting G1 cell cycle regulators. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001; 286: 916-922.
79. Heaney AP, Fernando M, Melmed S. PPAR-gamma receptor ligands: novel therapy for pituitary adenomas. *Journal of Clinical Investigation* 2003; 111: 1381-1388.
80. Sasaki T, Fujimoto Y, Tsuchida A, Kawasaki Y, Kuwada Y, Chayama K. Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Inhibits the Growth of Human Pancreatic Cancer. *Pathobiology* 2001; 69: 258-265.
81. Yang FG, Zhang ZW, Xin DQ, Shi CJ, Wu JP, Guo YL, Guan YF. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands induce

- cell cycle arrest and apoptosis in human renal carcinoma cell lines. *Acta Pharmacol Sin.* 2005; 26(6): 753-61.
82. Yu J, Qiao L, Zimmermann L, Ebert MP, Zhang H, Lin W, Röcken C, Malfertheiner P, Farrell GC. Troglitazone inhibits tumor growth in hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *Hepatology.* 2006; 43(1): 134-43.
83. Yoshimura R, Matsuyama M, Hase T, Tsuchida K, Kuratsukuri K, Kawahito Y, Sano H, Segawa Y, Nakatani T. The effect of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand on urological cancer cells. *Int J Mol Med.* 2003; 12(6): 861-5.
84. Yoshizumi T, Ohta T, Ninomiya I, Terada I, Fushida S, Fujimura T, Nishimura G, Shimizu K, Yi S, Miwa K. Thiazolidinedione, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand, inhibits growth and metastasis of HT-29 human colon cancer cells through differentiation-promoting effects. *Int J Oncol.* 2004; 25(3): 631-9.
85. Liu H, Zang C, Fener MH, Liu D, Possinger K, Koeffler HP, Elstner E. Growth inhibition and apoptosis in human Philadelphia chromosome-positive lymphoblastic leukemia cell lines by treatment with dual PPAR α / γ ligand TZD18. *Blood* 2006; 107(9): 3683-3692.
86. Gürhan İD. Temel Hücre Kültürleri. Temel Hücre Kültürü Ve Moleküler Uygulamaları Kursu Kitabı 2006; 1-23.
87. Gürhan İD. Hücre Üretme Vasatları (Besi Ortamları). Temel Hücre Kültürü Ve Moleküler Uygulamaları Kursu Kitabı 2006; 33-55.
88. Gürhan İD. Hücre Kültürü Laboratuvarının Planlanması. Temel Hücre Kültürü Ve Moleküler Uygulamaları Kursu Kitabı 2006; 99-108.

- 89.Şahin F, Büyükkeçeci F. Serin/Treonin Protein Fosfataz İnhibitörleri, Paklitaksel ve Doseetaksel ile İndüklenen HL-60 Lösemik Hücre Sitotoksitesini Artırırlar. Ege Üniversitesi. Hematoloji uzmanlık tezi. 2005.
- 90.Tontonoş P, Nagy L, Alvarez JG. PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. Cell 1998; 93: 241-252.
- 91.Moore KJ, Rosen ED, Fitzgerald ML. The role of PPAR- γ in macrophage differentiation and cholesterol uptake. Nat Med 2001; 7: 41-47.
- 92.Kawa S, Nikaido T, Unno H, Usuda N, Nakayama K, Kiyosawa K. Growth inhibition and differentiation of pancreatic cancer cell lines by PPAR gamma ligand troglitazone. Pancreas. 2002; 24: 1-7.
- 93.Yin F, Wakino S, Liu ZI. Troglitazone inhibits growth of MCF-7 breast carcinoma cells by targeting G1 cell-cycle regulators. Biochem Biophys Res Commun. 2001; 286: 916-22.
- 94.Shao J, Sheng H, DuBois RN. Peroxisome proliferator-activated receptors modulate K-Ras-mediated transformation of intestinal epithelial cells. Cancer Res 2002;62:3282-8.
- 95.Elstner E, Muller C, Koshizuka K. Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BNX mice. Proc Natl Acad Sci USA. 1998; 95: 8806-11.
- 96.Mueller E, Sarraf P, Tontonoş P. Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR gamma. Mol Cell. 1998; 1: 465-70.

97. Demetri GD, Fletcher CD, Mueller E. Induction of solid tumor differentiation by the peroxisome proliferator-activated receptor- γ ligand troglitazone in patients with liposarcoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96: 3951-6.
98. Yamakawa-Karakida N, Sugita K, Inukai T, Goi K, Nakamura M, Uno K, Sato H, Kagami K, Barker N, Nakazawa S. Ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ induces apoptosis of leukemia cells by down-regulating the c-myc gene expression via blockade of the Tcf-4 activity. *Cell Death and Differentiation*. 2002; 9, 513-526.
99. Hirase N, Yanase T, Mu Y, Muta K, Umemura T, Takayanagi R, Nawata H. Thiazolidinedione Induces Apoptosis and Monocytic Differentiation in the Promyelocytic Leukemia Cell Line HL60. *Oncology* 1999; 57: 17-26.
100. Liu JJ, Huang RW, Lin DJ, Peng J, Wu XY, Lin Q, Pan XL, Song YQ, Zhang MH, Hou M, Chen F. Expression of survivin and bax/bcl-2 in peroxisome proliferator activated receptor- γ ligands induces apoptosis on human myeloid leukemia cells in vitro. *Annals of Oncology*. 2005; 16: 455-459.
101. Palakurthi SS, Aktas H, Grubissich LM, Mortensen RM, Halperin JA. Anticancer effects of thiazolidinediones are independent of peroxisome proliferator-activated receptor γ and mediated by inhibition of translation initiation. *Cancer Res*. 2001; 61: 6213-8.

102. Isseman I, Green S. Activation of a number of steroid receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Natur* 1990; 347: 645-50.
103. Çetinkalp Ş, Tüzün M. Peroxisome proliferator-Activated Reseptör (PPAR). *Endokrinolojide Yönelişler* 202; 11(3): 134-138.
104. Konopleva M, Elstner E, McQueenTJ, Tsao T, Sudarikov A, Hu W, Schober WD, Wang RY, Chism D, Kornblau SM, Younes A, Collins SJ, Koeffler HP, Andreeff M. Peroxisome proliferator-activated receptor ; and retinoid X receptor ligands are potent inducers of differentiation and apoptosis in leukemias. *Mol Cancer Ther* 2004; 3(10): 1249-1262.

