



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HEMİN İLE ERİTROİD FARKLILAŞTIRILMIŞ KRONİK  
MİYELOİD LÖSEMİ (K562) HÜCRE SOYLARININ  
ÇOĞALMASINDA  
BETA ADRENERJİK RESEPTÖRLERİN ROLÜ**

YİĞİT ANT UĞURDAĞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. Hülya CABADAK

İSTANBUL-2016





TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HEMİN İLE ERİTROİD FARKLILAŞTIRILMIŞ KRONİK  
MİYELOİD LÖSEMİ (K562) HÜCRE SOYLARININ  
ÇOĞALMASINDA  
BETA ADRENERJİK RESEPTÖRLERİN ROLÜ**

YİĞİT ANT UĞURDAĞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. Hülya CABADAK

İSTANBUL-2016

## TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Programın seviyesi : Yüksek Lisans  
Anabilim Dalı : Biyofizik  
Tez Sahibi : Yiğit Ant Uğurdağ  
Tez Başlığı : Hemin ile Eritroid Farklılaştırılmış Kronik Miyeloid Lösemi (K562)  
Hücre Soylarının Çoğalmasında Beta Adrenerjik Reseptörlerin Rolü  
Sınav Yeri : Biyofizik Ana Bilim Dalı  
Sınav Tarihi : 17/06/2016

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

**Danışman**  
Doç. Dr. Hülya CABADAK

**Kurumu**

**İmza**

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi

**Sınav Jüri Üyeleri**

Prof. Dr. Zafer GÖREN

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Doç. Dr. Oya ORUN

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 30.06/2016 tarih ve 37. sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Göksel ŞENER  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



-Sınav evrakları 3 iş günü içinde ıslak imzalı tek kopya halinde Enstitüye teslim edilmelidir.

-Bu form bilgisayar ortamında doldurulacaktır.

## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Yiğit Ant UĞURDAĞ

## TEŞEKKÜRLER

Akademik anlamda olumlu ve yüreklendirici motivasyonları, derin kültürel birikimi ve hayata dair engin tecrübeleriyle, desteğini ve güvenini benden hiçbir zaman eksik etmeyen; akademik hayata adım atmama ve akademik hayat ile tanışmama vesile olan saygıdeğer hocam **Prof. Dr. M. Zafer GÖREN**'e ziyadesiyle müteşekkir olup, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Annem ve rahmetli anneannemden sonra üzerimde en çok emeği geçen, danışmandan öte bana bir oğul gibi davranarak, anne şefkati ve ilgisini hiçbir zaman üzerimden esirgemeyen, tecrübe ve deneyimlerinden her daim istifade etmemi sağlayan, sabırlı ve pek kıymetli, saygıdeğer hocam **Doç. Dr. Hülya CABADAK**'a en derin ve kalbi şükranlarım ile teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında eşsiz tecrübelerinden faydalandığım, her konuda ablalığını ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, bitmek bilmeyen sorularımı cevapsız bırakmayan, yardımsever, mütevazı ve kendini bilime adanmış örnek bir bilim insanı olan saygıdeğer **Arş. Gör. Dr. Banu AYDIN**'a teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman güler yüzü ile biz öğrencilerini kucaklayan ve kavramlara multidisipliner olarak yaklaşmanın önemini kavratan saygıdeğer hocam **Doç. Dr. Ayşe GARİP**'e, **Yrd. Doç. Dr. Pınar MEGA TİBER**'e ve **Doç. Dr. Oya ORUN**'a teşekkür ederim.

Değerli vaktini ayırdığı keyifli ve eşsiz sohbetleri ile hoş nüktelerine katılma şansına nail olduğum için kendimi şanslı saydığım, motive edici tutumlarını esirgemeyen saygıdeğer ve pek kıymetli hocam **Yrd. Doç. Dr. Cevdet NACAR**'a teşekkür ederim.

Haddizatında alanında ülke standartlarının da ötesinde eşi benzeri olmayan bir bilgi birikimine, mesleki deneyim ile derinliğe sahip olmasına rağmen bunun tam aksi derecede olabildiğince mütevazılığı, samimiyeti, müspet ve neşeli kişiliği ile öğrencileri ve çevresi tarafından da her zaman parmakla gösterilerek takdir edilen

örnek bir akademisyen, örnek bir araştırmacı, örnek bir baba, örnek bir amca ve örnek bir arkadaş olan değerli büyüğüm, hocam ve hayat mentorum olan saygıdeğer amcam **Doç. Dr. H. Fatih UĞURDAĞ**'a kıymetli tavsiyeleri, tecrübeleri ile her konudaki karşılıksız ve cömert destekleri için teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitim sürecim boyunca desteklerini her daim hissettiren, ekip ruhu içinde çalıştığım arkadaşlarım **Begüm ÇAKICI GENÇ**'e, **Zehra KANLI**'ya, **Ayşe Melek TANRIVERDİ**'ye, gerçek kadim dostlarıma ve hayatı öğrenmeye çalıştığımız bu serüvende, vesile olan tüm insanlara da teşekkür ederim.

Son olarak başta geceli gündüzlü emekleriyle bugünlere ulaşmamı sağlayan, bana inanmaktan asla ve kat'a vazgeçmeyen sarsılmaz ve kudretli, biricik canım annem olmak üzere, yüksek lisans tezimi; aramızdan zamansız ayrılışı ile acısı ve teessürü henüz halen dahi kalbimin en derinlerinde taze olan çocukluğumun rol modeli ve adeta ikinci bir annem olan üzerimdeki hakkını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim güler yüzlü meleğim, pamuk ninem, anneanneme ithaf ediyor ve en derin sevgi, saygı, özlem ve teşekkürlerimi sunuyorum...

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                      |      |
|--------------------------------------------------------------------------------------|------|
| TEŞEKKÜRLER.....                                                                     | i    |
| İÇİNDEKİLER.....                                                                     | iii  |
| KISALTMALAR ve SİMGELER.....                                                         | vii  |
| ŞEKİL LİSTESİ.....                                                                   | xi   |
| RESİM LİSTESİ.....                                                                   | xiii |
| TABLO LİSTESİ.....                                                                   | xiv  |
| 1. ÖZET.....                                                                         | 1    |
| 2. SUMMARY.....                                                                      | 2    |
| 3. GİRİŞ ve AMAÇ.....                                                                | 3    |
| 4. GENEL BİLGİLER.....                                                               | 4    |
| 4.1. G Protein Kenetli Reseptörler.....                                              | 4    |
| 4.1.1. G proteinleri.....                                                            | 5    |
| 4.2. Adrenerjik Reseptörler.....                                                     | 8    |
| 4.2.1. Adrenerjik reseptörlerin sınıflandırılması ve tanımlanması.....               | 10   |
| 4.2.2. Adrenerjik reseptör genlerinin kromozomal lokalizasyonu.....                  | 11   |
| 4.2.3. Adrenerjik reseptörlerin yapısal özellikleri.....                             | 12   |
| 4.3. Adrenerjik Reseptörlerin Fizyolojik Fonksiyonları ve Dokularda<br>Dağılımı..... | 13   |
| 4.4. Adrenerjik Reseptörlerin Hücre Çoğalmasındaki Roller.....                       | 20   |
| 4.5. Kanser ve Beta Adrenerjik Reseptörler.....                                      | 21   |
| 4.6. Beta Adrenerjik Agonist ve Antagonistler.....                                   | 26   |
| 4.6.1. İzoprenalin.....                                                              | 30   |
| 4.6.2. Propranolol.....                                                              | 31   |
| 4.7. K562 Kronik Miyeloid Lösemi Hücreleri.....                                      | 35   |



|                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.7.1. Eritroid farklılaşma.....                                                                         | 38 |
| <b>5. GEREÇ ve YÖNTEM</b>                                                                                |    |
| 5.1. Kimyasal Maddeler.....                                                                              | 42 |
| 5.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar.....                                                                  | 44 |
| 5.3. Tampon ve Çözeltilerin Bileşimi.....                                                                | 45 |
| 5.3.1. Çalışmada kullanılan kitler.....                                                                  | 45 |
| 5.3.2. K562 kronik miyeloid lösemi hücre kültürü hazırlama ve çoğalmasında<br>kullanılan çözeltiler..... | 45 |
| 5.3.2.1. Heminle eritroid farklılaşmada kullanılan çözeltiler.....                                       | 46 |
| 5.3.2.2. Benzidin boyama.....                                                                            | 46 |
| 5.3.3. Hücre sayımında kullanılan çözeltiler.....                                                        | 47 |
| 5.3.3.1. Tripan mavisi.....                                                                              | 47 |
| 5.3.3.2. BrDU.....                                                                                       | 47 |
| 5.3.3.3. Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS).....                                                        | 47 |
| 5.3.4. Protein izolasyonunda kullanılan çözeltiler.....                                                  | 47 |
| 5.3.4.1. TE (Tris-EDTA) çözeltisi.....                                                                   | 47 |
| 5.3.4.2. Homojenleştirme tamponu.....                                                                    | 48 |
| 5.3.5. Lowry metodunda kullanılan çözeltiler.....                                                        | 48 |
| 5.3.6. Elektforez ve Western emdirimi analizlerinde kullanılan çözeltiler...                             | 48 |
| 5.3.6.1 Örnek tamponu (4X).....                                                                          | 48 |
| 5.3.6.2. Akrilamid-Bisakrilamid çözeltisi.....                                                           | 48 |
| 5.3.6.3. Ayırma jeli tamponu (2X).....                                                                   | 49 |
| 5.3.6.4. Yükleme jeli tamponu (2X).....                                                                  | 49 |
| 5.3.6.5. Yürütme tamponu (2X).....                                                                       | 49 |
| 5.3.6.6. Elektforez tamponu (5X).....                                                                    | 49 |
| 5.3.6.7. Aktarma tamponu.....                                                                            | 49 |
| 5.3.6.8. Tris tuz tamponu (TBS).....                                                                     | 50 |

|                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.3.6.9. Blok tamponu.....                                                         | 50 |
| 5.3.6.10. TBS-T tamponu.....                                                       | 50 |
| 5.3.6.11. Birincil antikor tamponu.....                                            | 50 |
| 5.3.6.12. İkincil antikor tamponu.....                                             | 50 |
| 5.3.6.13. NBT/BCIP geliştirici tampon.....                                         | 51 |
| 5.3.6.14. Jel boyama çözeltisi.....                                                | 51 |
| 5.3.6.15. Jel boya çıkarma çözeltisi.....                                          | 51 |
| 5.3.6.16. Ponceau S çözeltisi.....                                                 | 51 |
| 5.4. Yöntem.....                                                                   | 52 |
| 5.4.1 Çalışmada kullanılan yöntemler.....                                          | 52 |
| 5.4.1.1. Hücre kültürü ve hücrelerin çoğaltılması.....                             | 52 |
| 5.4.1.2. Hücre farklılaştırılması.....                                             | 52 |
| 5.4.1.3. Hücrelerin agonist ve antagonistlerle muamelesi.....                      | 52 |
| 5.4.1.4. Hücre sayımı.....                                                         | 53 |
| 5.4.1.4.1. Hücrelerin BrDU ile sayılması.....                                      | 53 |
| 5.4.1.5. Hücrelerin toplanması.....                                                | 54 |
| 5.4.1.6. Hücre özütlerinin hazırlanması.....                                       | 54 |
| 5.4.1.7. Western emdirimi.....                                                     | 54 |
| 5.4.1.8. Elektroforez.....                                                         | 54 |
| 5.4.1.8.1. Islak elektroforetik transfer düzeneği ile elektroforetik transfer..... | 55 |
| 5.4.1.8.2. Western emdirimi analizi.....                                           | 55 |

## 6. BULGULAR

|                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 6.1. Eritroid Hücre Farklılaştırılması.....                                                                | 56 |
| 6.2. Hücre Sayımı Sonuçları.....                                                                           | 57 |
| 6.2.1. Propranololün eritroid farklılaştırılmış K562 kronik miyeloid lösemi hücre çoğalmasındaki rolü..... | 57 |
| 6.2.2. İzoprenalinin eritroid farklılaştırılmış K562 kronik miyeloid lösemi hücre çoğalmasındaki rolü..... | 59 |
| 6.3. Western Emdirimi Sonuçları.....                                                                       | 63 |

|                                |            |
|--------------------------------|------------|
| 6.4. İstatistiksel Analiz..... | 64         |
| <b>7. TARTIŞMA.....</b>        | <b>65</b>  |
| <b>8. KAYNAKLAR.....</b>       | <b>72</b>  |
| <b>EK-1.....</b>               | <b>107</b> |
| <b>EK-2.....</b>               | <b>108</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>           | <b>110</b> |



## KISALTMALAR VE SİMGELER

|                                   |                                    |
|-----------------------------------|------------------------------------|
| <b><math>\alpha 7nAChR</math></b> | Nikotinik asetilkolin reseptörü    |
| <b>AML</b>                        | Akut miyeloid lösemi               |
| <b>AP-1</b>                       | Aktivatör protein-1                |
| <b>Arg</b>                        | Arjinin amino asiti                |
| <b>AV</b>                         | Auriculo-ventriküler               |
| <b><math>\beta</math>-actin</b>   | Beta aktin                         |
| <b><math>\beta</math>ARK</b>      | Beta adrenerjik reseptör kinaz     |
| <b>BCIP</b>                       | 5-Bromo-4-kloro-3-indolil fosfat   |
| <b>BrDU</b>                       | 5-Bromo-2'-deoksi-üridin           |
| <b>BSA</b>                        | Bovine (sığır) serum albümin       |
| <b>cAMP</b>                       | Siklik AMP                         |
| <b>COMT</b>                       | Katekol-O-metiltransferaz          |
| <b>CREB</b>                       | cAMP yanıt bağlayıcı protein       |
| <b>CSF</b>                        | Koloni uyarıcı faktör              |
| <b>DAG</b>                        | Diaçilgliserol                     |
| <b>DMBA</b>                       | Dimetilbenzantrasen                |
| <b>DNA</b>                        | Deoksiribonükleik asit             |
| <b>EDTA</b>                       | Etilendiamintetraasedikasit        |
| <b>ELISA</b>                      | Enzyme-linked immuno sorbent assay |
| <b>FBS</b>                        | Fetal bovine (sığır) serum         |
| <b>GABA</b>                       | Gamma-aminobütirik asit            |
| <b>GATA1</b>                      | Eritroid transkripsiyon faktörü    |

|                                  |                                                           |
|----------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| <b>GDP</b>                       | Guanozin difosfat                                         |
| <b>GPCR</b>                      | G protein kenetli reseptör                                |
| <b>GRK2</b>                      | G protein kenetli reseptör kinaz 2                        |
| <b>GRK3</b>                      | G protein kenetli reseptör kinaz 3                        |
| <b>GTP</b>                       | Guanozin trifosfat                                        |
| <b>G<math>\alpha</math>-GDP</b>  | GDP'ye bağlanan G $\alpha$                                |
| <b>G<math>\alpha</math>-GTP</b>  | GTP'ye bağlanan G $\alpha$                                |
| <b>G<math>\beta\gamma</math></b> | G proteini beta-gama kompleksi                            |
| <b>HEL</b>                       | İnsan eritrolösemi hücre soyu                             |
| <b>HEPES</b>                     | N-2-hidrosietilpiperazin N'-2-aminoetan sülfonik asit     |
| <b>IL-1<math>\alpha</math></b>   | İnterlökin-1 alfa                                         |
| <b>IL-1<math>\beta</math></b>    | İnterlökin-1 beta                                         |
| <b>IL-6</b>                      | İnterlökin-6                                              |
| <b>IL-8</b>                      | İnterlökin-8                                              |
| <b>ISA</b>                       | İntrinsik semptomimetik etkinlik                          |
| <b>IU</b>                        | Biyolojik ünite                                           |
| <b>İV</b>                        | İntravenöz enjeksiyon                                     |
| <b>kDa</b>                       | Kilodalton                                                |
| <b>KLF1</b>                      | Krueppel-benzeri faktör 1                                 |
| <b>Lys</b>                       | Lizin amino asiti                                         |
| <b>MAPK</b>                      | Mitojen aktiveli protein kinaz yolağı                     |
| <b>MEG-01</b>                    | Filadelfiya kromozomu pozitif megakaryoblastik hücre soyu |
| <b>MEL</b>                       | Murine eritrolösemi hücre soyu                            |

|                        |                                                       |
|------------------------|-------------------------------------------------------|
| <b>MMP2</b>            | Matriks metalloproteinaz 2                            |
| <b>MMP9</b>            | Matriks metalloproteinaz 9                            |
| <b>mRNA</b>            | Mesajcı ribonükleik asit                              |
| <b>NBT</b>             | Nitroblue tetrazolium                                 |
| <b>NF-κB</b>           | Nüklear faktör kappa B                                |
| <b>OD</b>              | Optik dansite                                         |
| <b>PBS</b>             | Fosfatla tamponlanmış tuz                             |
| <b>PDE</b>             | Fosfodiesteraz                                        |
| <b>PI<sub>3</sub>K</b> | Fosfatidilinositol 3 kinaz                            |
| <b>PKA</b>             | Protein kinaz A                                       |
| <b>PKC</b>             | Protein kinaz C                                       |
| <b>PLC</b>             | Fosfolipaz C                                          |
| <b>PLC</b>             | Fosfolipaz C                                          |
| <b>PMA</b>             | Phorbol 12-myristate 13-acetate                       |
| <b>PMSF</b>            | Fenilmetilsülfonil florür                             |
| <b>SA</b>              | Sino-atrial                                           |
| <b>SDS</b>             | Sodyum dodesil sülfat                                 |
| <b>SDS-PAGE</b>        | Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi |
| <b>Ser</b>             | Serin amino asiti                                     |
| <b>TBS</b>             | Transfer tampon çözeltisi                             |
| <b>TBS-T</b>           | TBS ve Tween 20 karışımı                              |
| <b>TE</b>              | Tris-EDTA                                             |
| <b>Thr</b>             | Treonin amino asiti                                   |

|                               |                                    |
|-------------------------------|------------------------------------|
| <b>TNF<math>\alpha</math></b> | Tümör Nekroz Faktör $\alpha$       |
| <b>Tris</b>                   | Trishidroksimetilaminometan        |
| <b>v/v</b>                    | Hacim/Hacim                        |
| <b>VEGF</b>                   | Vasküler endotelyal büyüme faktörü |
| <b>w/v</b>                    | Ağırlık/Hacim                      |
| <b>w/w</b>                    | Ağırlık/Ağırlık                    |



## ŞEKİL LİSTESİ

**Şekil 1:** G proteini aracılı sinyal iletimi.

**Şekil 2:** G proteinleri  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_{i/o}$ ,  $G\alpha_{q/11}$  ve  $G\alpha_{12/13}$  alttipleri ve efektör molekülleri.

**Şekil 3:** GPCR'ler aracılı heterotrimerik G proteinlerinin aktivasyon ve inaktivasyon mekanizması.

**Şekil 4:**  $\beta$ -adrenerjik reseptörlerin tarihçesi ve klinik uygulamaları.

**Şekil 5:** Adrenerjik reseptörlerin sınıflandırılması.

**Şekil 6:**  $\beta_2$ -adrenerjik reseptör yapısı.

**Şekil 7:**  $\beta_1$  ve  $\beta_2$ -adrenerjik reseptör yanıtlarının farklılaşması.

**Şekil 8:** Adrenerjik reseptör aracılı sinyal iletimi.

**Şekil 9:**  $\beta_2$ -Adrenerjik reseptör sinyal yolları.

**Şekil 10:** Düz kaslarda beta adrenerjik reseptör aracılı sinyal iletimi.

**Şekil 11:** İzoprenalinin formülasyonu.

**Şekil 12:** Propranololün formülasyonu.

**Şekil 13:** Hematopoetik farklılaşma.

**Şekil 14:** Eritroid farklılaştırılmış K562 kronik miyeloid lösemi hücre çoğalmasında 24 saat sonra propranololün konsantrasyona bağlı etkisi.



**Şekil 15:** Eritroid farklılaştırılmış K562 kronik miyeloid lösemi hücre çoğalmasında 48 saat sonra propranololün konsantrasyona bağlı etkisi.

**Şekil 16:** Eritroid farklılaştırılmış K562 hücre kronik miyeloid lösemi çoğalmasında 24 saat sonra izoprenalinin konsantrasyona bağlı etkisi.

**Şekil 17:** Eritroid farklılaştırılmış K562 hücre kronik miyeloid lösemi çoğalmasında 48 saat sonra izoprenalinin konsantrasyona bağlı etkisi.

**Şekil 18:** Eritroid farklılaştırılmış K562 hücre kronik miyeloid lösemi çoğalmasında propranolol ile izoprenalinin 24 saatteki etkisi.

**Şekil 19:** Eritroid farklılaştırılmış K562 hücre kronik miyeloid lösemi çoğalmasında, propranolol ile izoprenalinin 48 saatteki etkisi.

## RESİM LİSTESİ

**Resim 1:** K562 kronik miyeloid lösemi hücrelerinin normal mikroskop ve benzidin boyama sonrası görüntüsü.

**Resim 2:** Tripan mavisi ile boyanmış K562 kronik miyeloid lösemi hücrelerinin hemositometredeki görüntüsü.

**Resim 3: a)** Farklılaştırılmamış ve eritroid farklılaştırılmış K562 kronik miyeloid lösemi hücrelerinde  $\beta 1$  ekspresyonu. **b)** Farklılaştırılmamış ve eritroid farklılaştırılmış K562 kronik miyeloid lösemi hücrelerinde  $\beta 2$  ekspresyonu. **c)** Eritroid farklılaştırılmış K562 kronik miyeloid lösemi hücrelerinde  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  ve  $\beta$ -aktin ekspresyonu.

**Resim 4:** Eritroid farklılaştırılmış K562 kronik miyeloid lösemi hücrelerinde glikorofin A (38 kDa) ekspresyonu.

## TABLO LİSTESİ

**Tablo 1:** Heterotrimerik G Proteininin  $G\alpha$  ailesi alttipleri ve etkileştikleri sinyal ileti yolları.

**Tablo 2:** Heterotrimerik G Proteinini  $G\beta$  ve  $G\gamma$  ailesi alttipleri ve etkileştikleri sinyal ileti yolları.

**Tablo 3:** Beta adrenerjik reseptörlerin kromozomal lokalizasyonları ve etki mekanizmaları.

**Tablo 4:** Adrenerjik reseptörlerin doku dağılımları.

**Tablo 5:**  $\beta_1$  ve  $\beta_2$ -adrenerjik reseptör aracılığıyla oluşan etkiler.

**Tablo 6:** Farklı kanser tiplerinde  $\beta$ -adrenerjik reseptörler ve etki mekanizmaları.

**Tablo 7:**  $\beta$ -adrenerjik reseptör agonist ve antagonistleri

**Tablo 8:** Nonselektif  $\beta_1$ -blokerler.

**Tablo 9:** Selektif  $\beta_1$ -blokerler.

**Tablo 10:** Yaygın kullanımı olan  $\beta$ -adrenerjik reseptör antagonistlerinin ( $\beta$ -bloker) sınıflandırılması.

**Tablo 11:** K562 kronik miyeloid lösemi hücre soyunun özellikleri.

# **Hemin ile Eritroid Farklılaştırılmış Kronik Miyeloid Lösemi K562 Hücre Soyalarının Çoğalmasında Beta Adrenerjik Reseptörlerin Rolü**

**Öğrenci:** Yiğit Ant UĞURDAĞ

**Danışman:** Doç. Dr. Hülya CABADAK

**Anabilim Dalı:** Biyofizik

## **1. ÖZET**

**Amaç:** Bu çalışmada K562 kronik miyeloid lösemi hücreleri hemin ile eritroid farklılaşmaya indüklenerek farklılaştırılmıştır ve farklılaştırılmış insan eritrolösemi hücrelerinin çoğalmasında  $\beta$ -adrenerjik reseptörlerin rolünü belirlemek için izoprenalin ve/veya propranolol varlığında hücre sayım deneyleri yapılması amaçlanmıştır. Eritroid farklılaştırılmış insan eritrolösemi hücrelerinde  $\beta 1$  ve  $\beta 2$ -adrenerjik reseptör ekspresyon düzeyinin de belirlenmesi amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** K562 kronik miyeloid lösemi hücreleri çoğaltıldıktan sonra heminle eritroid farklılaştırılmıştır. Farklılaşmanın olup olmadığını belirlemek üzere benzidin boyama ve glikoforin A gen ekspresyonu çalışmaları yapılmıştır. Hemin ile farklılaştırılan K562 kronik miyeloid lösemi hücrelerinde propranololün hücre çoğalmasına etkisini belirleyebilmek için farklı konsantrasyonlarda propranolol ve/veya izoprenalin ile 24 ve 48 saat muamele edilen hücreler, BrDU yöntemi ile sayılmıştır. Farklılaştırılmış hücre gruplarından hazırlanan kesimlerinde Lowry yöntemi ile protein tayini yapıldıktan sonra Western emdirimi yöntemi ile  $\beta 1$  ve  $\beta 2$  reseptör protein düzeyi belirlenmiştir.

**Bulgular ve Sonuç:** Bu çalışmada, eritroid farklılaşmaya indüklenen K562 kronik miyeloid lösemi hücrelerinde  $\beta$ -adrenerjik reseptörlerin hücre çoğalmasındaki rolü saptanmıştır.  $\beta$ -adrenerjik agonist ve antagonistlerinin farklılaştırılmış hücre çoğalmasındaki rolü belirlenmiştir. Eritroid farklılaşmanın olup olmadığının göstergesi olan benzidin boyama ile pozitif hücreler, ayrıca glikoforin A gen ekspresyonu gösterilmiştir. Eritroid farklılaştırılmış insan eritrolösemi hücrelerinde  $\beta 1$ -adrenerjik reseptör ekspresyon düzeyinin  $\beta 2$ -adrenerjik reseptörden fazla olduğu bulunmuştur.

**Anahtar Sözcükler:** G protein kenetli reseptörler, kanser, izoprenalin, propranolol, gen ekspresyonu

## **The role of $\beta$ -adrenergic receptors on erythroid differentiated chronic myeloid leukemia cell lines K562 proliferation with hemin**

**Student:** Yiğit Ant UĞURDAĞ

**Supervisor:** Doç. Dr. Hülya CABADAK

**Department:** Biophysics

### **2. SUMMARY**

**Objective:** In the present study, K562 chronic myeloid leukemia cells induced erythroid differentiation with hemin. The aim of this study is to do the cell proliferation assay in the presence of isoprenaline and propranolol to evaluate the role of  $\beta_1/\beta_2$ -adrenergic receptors on proliferation of differentiated cells. Moreover, the expression level of  $\beta_1/\beta_2$ -adrenergic receptors are also aimed to be investigated on human erythroid differentiated K562 chronic myeloid leukemia cells.

**Materials and methods:** After the K562 cells are proliferated, these cells are differentiated with hemin (50  $\mu$ M). In order to detect if there is a differentiation or not, benzidine staining and detection of glycophorin A expression investigations are done. To understand the affect of propranolol on the proliferation of the hemin induced erythroid differentiated K562 cells, the cells are incubated with the different concentrations of propranolol and/or isoprenaline for 24 and 48 hours long and counted with BrDU method. The lysate of differentiated K562 cell groups are prepared. After the protein levels are detected with Lowry method. The  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  reseptor protein level is detected by Western blotting.

**Results and conclusion:** In the present study, we detected that the role of  $\beta$ -adrenergic receptors in erythroid differentiated cell proliferation. The effects of the nonselective antagonist and agonist  $\beta$ -adrenergic receptor on the proliferation of human erythroid differentiated K562 chronic myeloid leukemia cells are detected. Positive cells are shown with benzidine staining method which displays the erythroid differentiation. Moreover, the gene expression of glycophorin A is shown. The results showed that the expression level of  $\beta_1$ -adrenergic receptors are higher than the expression level of  $\beta_2$ -adrenergic receptors in human erythroid diffrentiated K562 chronic myeloid leukemia cells.

**Key Words:** G protein coupled receptors, cancer, isoprenaline, propranolol, gene expression

### 3. GİRİŞ VE AMAÇ

G protein kenetli reseptörlerle (GPCR) hücre büyümesi, çoğalması ve farklılaşması gibi süreçler düzenlenmektedir. G protein kenetli reseptör süper ailesinin üyesi olan  $\beta$ -adrenerjik reseptörlerin kanser hücre çoğalmasında rolü olduğu gösterilmiştir (Alberts ve ark., 2008). Hipertansiyon, iskemik kalp hastalığı ve aritmi tedavilerinde kullanılan  $\beta$ -adrenerjik reseptör blokleri propranololün insan pankreas kanseri hücre çoğalmasında inhibisyona neden olduğu bildirilmiştir. Propranololün tedavide yeni hedeflerinin belirlenmesi sayesinde hemanjioma tedavisinde kullanılması mümkün olmuştur (Léauté-Labrèze ve ark., 2008; Sloan ve ark., 2010; Sánchez-Carpintero ve ark., 2011; Madden ve ark., 2011; Pérez Piñero ve ark., 2012; Kim-Fuchs ve ark., 2014; Akbar ve Alorainy, 2014).

Beta adrenerjik reseptör agonist ve antagonistlerinin normal insan eritrolösemi hücre çoğalmasında rolü olduğu önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Gauwerky ve Golde, 1980). K562 kronik miyeloid lösemi hücreleri hemin ile eritroid farklılaşmaya indüklenerek farklılaştırılacak ve farklılaştırılmış insan eritrolösemi hücrelerinin çoğalmasında  $\beta$ -adrenerjik reseptörlerin rolünü belirlemek için  $\beta$ -adrenerjik reseptör agonisti (izoprenalin) ve antagonisti (propranolol) varlığında hücre sayım deneyleri yapılması amaçlanmıştır. Eritroid farklılaştırılmış insan eritrolösemi hücrelerinde  $\beta 1$  ve  $\beta 2$ -adrenerjik reseptör ekspresyon düzeyinin de belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yeni yapılan çalışmalar, kanser hücre çoğalmasında birkaç reseptörün bir arada rolü olduğunu göstermektedir. Alınan sonuçlar,  $\beta$ -adrenerjik reseptörlerin eritroid farklılaştırılmış insan eritrolösemi hücre çoğalmasında rolünün olup olmadığı hakkında bilgi verecektir.  $\beta$ -adrenerjik reseptörlerin farklılaştırılmış eritrolösemi hücrelerin çoğalmasında rollerinin belirlenmesi bundan sonra yapılacak sinyal ileti çalışmalarına da temel oluşturacaktır. İnsan eritrolösemi tedavisinde yeni hedeflerin belirlenmesi; var olan ilaçların yeni mekanizmalarının anlaşılması hem ekonomiye hem de tedavi sürecine ve literatüre katkı sağlayacaktır.

## 4. GENEL BİLGİLER

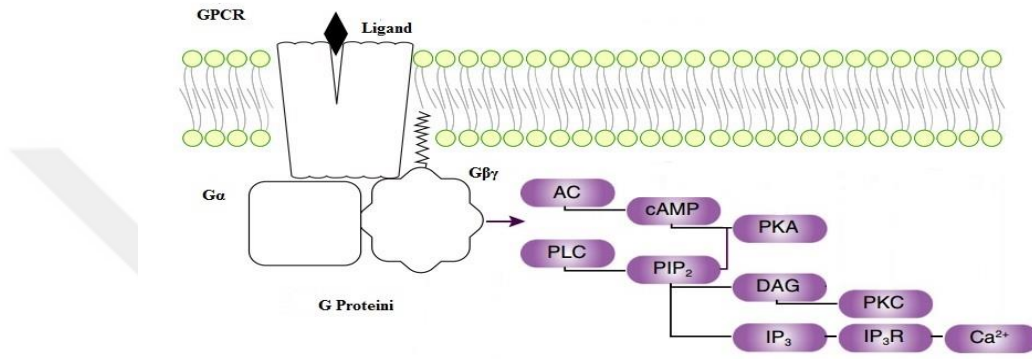
### 4.1. G Protein Kenetli Reseptörler

G protein kenetli reseptörler (GPCR) hakkında geçtiğimiz yarım yüzyılda, çok çeşitli yayınlar yapılmıştır. İnsanlarda bulunan GPCR süper ailesi yaklaşık 800 üyeden oluşmaktadır (Dohlman, 2015). Memeli genomunda membranı yedi kez kateden GPCR'ler büyük bir protein ailesidir (Freedman ve Weight, 1988; Bjarnadottir ve ark., 2006). Hücre yüzey reseptörleri ailesinin üyesi olan GPCR'lerin hücrel sinyal iletiminde önemli rolleri vardır (Rask-Andersen ve ark., 2011).

G protein kenetli reseptörler fotonlar, tekli iyonlar, uçucu kokular, lipidler, hormonlar, nörotransmitterler ve proteazlar da dahil olmak üzere bunların aracılığı ile hücre dışı sinyalleri iletirler (Neves ve ark., 2002; Milligan ve Kostenis, 2006; Dohlman, 2015). GPCR'ler çeşitli endojen ve ekzojen ligandlar ile çoklu fizyolojik süreçler boyunca uyarılarak düzenlenirler. Bu nedenle GPCR'ler tüm klinik alanlarda önemli ilaç hedefleri haline gelmişlerdir (Ellis, 2004; Jacoby ve ark., 2006; Insel ve ark., 2007; Heilker ve ark., 2009; Jafurulla ve Chattopadhyay, 2015). Reçete edilerek satılan ilaçların dörtte biri GPCR hedeflidir ve yine bu ilaçların yarısı GPCR'lerin agonist veya antagonistleridir (Thomsen ve ark., 2005; Schlyer ve Horuk, 2006; Dohlman, 2015).

Ligand GPCR'lere bağlanır ve  $G\alpha$ 'dan GDP salınımı tetiklenir ve  $G\alpha$  alttipine GTP bağlanır. GTP-bağlı  $G\alpha$  ( $G\alpha$ -GTP),  $G\beta\gamma$ 'ya karşı düşük afiniteli olup  $G\beta\gamma$ 'dan ayrılır. G proteinin bağımsız bileşenleri  $G\alpha$ -GTP ve  $G\beta\gamma$  efektörleri ile etkileşerek sinyalleri iletir.  $\alpha$ -alttipinden GTP, GDP'ye hidrolize olur ve  $G\alpha$ -GDP ile  $G\beta\gamma$  birleşerek inaktive olmaktadır. Agonist GPCR'ye bağlı durumda ise bağlı olan GDP'den  $G\alpha$  alttipinin ayrılması, siklik reaksiyonu ile tekrardan başlatılmaktadır (Gilman, 1987; Koelle ve Horvitz, 1996; Oldham ve Hamm, 2008). Bu reseptörler bir kez aktive olduktan sonra G protein heterotrimerinin alt birimleri  $\beta$ -arrestin'ler ve bazı durumlarda da protein kinazlar gibi aksesuar proteinler ile kenetlenirler. G protein sinyalini düzenleyici proteinler (Regulator of G-protein signaling) ise GPCR'ye karşı yönde bir etki ederek G proteinlerinin GTPaz aktivitesini artırır (Dohlman, 2015).

Çoğunlukla GPCR farmakolojisi ile ilgili literatür çalışmaları göreceli olarak az sayıdaki hormon ve nötransmitter reseptörlerine odaklanmıştır. Bunlar arasında öne çıkanlar ise adrenalin, histamin, adenozin, asetilkolin, dopamin, serotonin ve opioid reseptörleri gibi GPCR'lerdir (Dohlman, 2015). GPCR'nin hücre dışına bakan amino ucu ve hücre içine bakan karboksil ucu vardır. Ligandın GPCR'ye bağlanmasıyla G proteinleri aktive olur ve sinyal ileti yolları uyarılır (Şekil 1) (Inanobe ve Kurachi, 2014).



**Şekil 1:** G proteini aracılı sinyal iletimi.

(Inanobe ve Kurachi, 2014'den değiştirilmiştir).

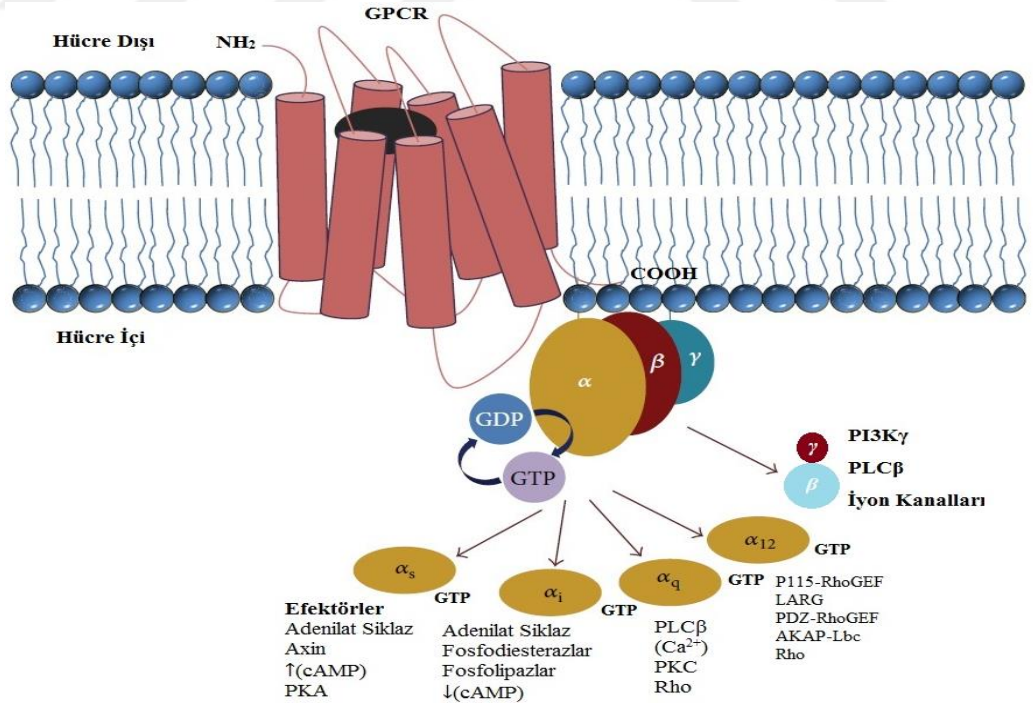
#### 4.1.1. G proteinleri

Büyük GTPaz ailesi üyelerinden olan heterotrimerik G proteinleri bakteri ve benzeri düşük yapıllı organizmalardan memelilere kadar geniş bir skalada oldukça iyi korunmuştur. Hücre yüzeyindeki zara gömülü olarak bulunan reseptörler ve efektörlerin birbirine kenetlenmesi ile hücrel sinyal iletiminde önemli rolleri vardır. G proteinleri GTP'nin bağlandığı ve hidrolize edilerek ayrıldığı bir adet  $\alpha$ -alttipi ile bir  $\beta\gamma$ -kompleksinden oluşmaktadır (Gilman, 1987; Küçükkaya ve Kan, 2007; Oldham ve Hamm, 2008). Günümüze kadar G proteinlerinin 23 farklı  $\alpha$ -alttipi, 6  $\beta$ -alttipi ve 14  $\gamma$ -alttipi olduğu tanımlanmıştır. Heterotrimerik G proteinleri  $\alpha$ -alttiplerinin birincil yapılarına göre sınıflandırılıp, dört aileye ayrılmışlardır. İnaktif durumda G proteinleri, GDP'nin bağlı olduğu bir  $\alpha$  alttipi ile  $\beta\gamma$  alttiplerinin birbirine sıkıca bağlandığı heterotrimerik bir yapıdadır. GPCR aracılı G proteini aktivasyonunda GDP ile GTP yer değiştirir, ardından  $\beta\gamma$  alttipleri  $\alpha$ -alttipinden ayrılır. GTP bağlı  $\alpha$ -alttipi ile  $\beta\gamma$



kompleksinin ikiside özgün efektörleri ile etkileşerek sinyal yollarını aktive ederler (Hamm, 1998; Milligan ve Kostenis, 2006; Küçükkaya ve Kan, 2007; Subramaniam ve ark., 2016). Fizyolojik koşullarda  $G\beta$  ve  $G\gamma$  birbirleriyle etkileşerek  $G\beta\gamma$  dimeri halinde bulunmaktadır.  $G\alpha$  dizi benzerliği, efektör kenetlenmesi ve toksinlerle ADP ribozillenme özelliğine göre gruplanmaktadır ( $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_i$ ,  $G\alpha_q$  ve  $G\alpha_{12}$ ) (Gilman, 1987; Sprang, 1997; Oldham ve Hamm, 2008).

G protein kenetli reseptörlerin önemli bir kısmı membrana gömülü olan integral membran proteinleridir. Membran lipidleri GPCR'lerin fizyolojik yapı ve fonksiyonunun düzenlenmesi ile ilgili önemli katkıda bulunurlar (Burger ve ark., 2000; Pucadyil ve Chattopadhyay, 2006; Paila ve Chattopadhyay, 2010; Oates ve Watts, 2011; Jafurulla ve Chattopadhyay, 2013; Chattopadhyay, 2014; Jafurulla ve Chattopadhyay, 2015). G proteinin alttipine göre hücrel sinyal yanıtları değişir ve farklı G proteinleri ile etkileşirler. G proteinlerini  $\alpha$ -alttipine göre sınıflandırılmış olup  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_{i/o}$ ,  $G\alpha_{q/11}$  ve  $G\alpha_{12/13}$  olmak üzere dört adet alttipi vardır (Neves ve ark. 2002; Milligan ve Kostenis, 2006). G protein alt tipleri ve etkileştiği sinyal yolları Şekil 2'de gösterilmektedir.



**Şekil 2:** G proteinleri  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_{i/o}$ ,  $G\alpha_{q/11}$  ve  $G\alpha_{12/13}$  alttipleri ve efektör molekülleri.  
(Dorsam ve Gutkind, 2007 ile Chattopadhyay, 2014'den değiştirilmiştir).

Heterotrimerik G proteinlerin alt tipleri ve etkileştikleri sinyal ileti yolları Tablo 1 ve Tablo 2’de gösterilmektedir.

**Tablo 1:** Heterotrimerik G Proteininin  $G\alpha$  ailesi alttipleri ve etkileştikleri sinyal ileti yolları.

| $G\alpha$ ailesi alttipleri | Efektörleri                                        |
|-----------------------------|----------------------------------------------------|
| $G\alpha_{i1}$              | Adenilat siklazı inhibe eder                       |
| $G\alpha_{i2}$              | Adenilat siklazı inhibe eder                       |
| $G\alpha_{oAB}$             | Adenilat siklazı inhibe eder                       |
| $G\alpha_z$                 | Adenilat siklazı inhibe eder                       |
| $G\alpha_{t1}$              | PDE’yi aktive eder (Görsel çomak hücrelerini)      |
| $G\alpha_{t2}$              | PDE’yi aktive eder (Görsel çomak hücrelerini)      |
| $G\alpha_{gust}$            | PDE’yi aktive eder (Görsel çomak hücrelerini)      |
| $G\alpha_s$                 | Adenilat siklazı uyarır                            |
| $G\alpha_{olf}$             | Adenilat siklazı uyarır (Olfaktori-koklama duyusu) |
| $G\alpha_{sXL}$             | Adenilat siklazı uyarır                            |
| $G\alpha_q$                 | PLC $\beta$ ’yı uyarır                             |
| $G\alpha_{11}$              | PLC $\beta$ ’yı uyarır                             |
| $G\alpha_{14-16}$           | PLC $\beta$ ’yı uyarır                             |
| $G\alpha_{12}$              | Rho guanin nükleotid değişim faktörlerini uyarır   |

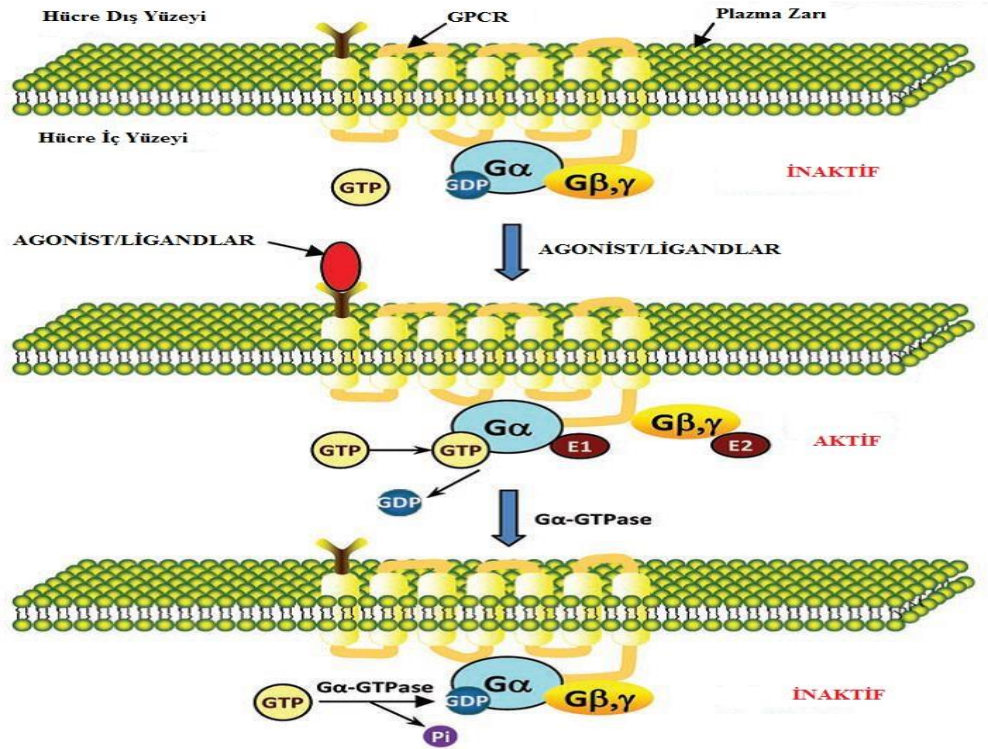
(Malbon, 2005).

**Tablo 2:** Heterotrimerik G Proteinini  $G\beta$  ve  $G\gamma$  ailesi alttipleri ve etkileştikleri sinyal ileti yolları.

| $G\beta_{1-5}$ ve $G\gamma_{1-12}$                    |
|-------------------------------------------------------|
| Adenilat siklazı inhibe eder                          |
| Ca <sup>2+</sup> ve K <sup>+</sup> kanallarını uyarır |
| PI <sub>3</sub> K aktivitesini uyarır                 |
| PLC $\beta$ ’yı uyarır                                |
| GRK2 ve GRK3 ile etkileşir                            |

(Malbon, 2005).

Heterotrimerik G proteinleri  $G\alpha$  ve  $G\beta\gamma$  inaktif durumda birbirleriyle kenetlidir. İnaktif durumda  $G\alpha$ , GDP’ye bağlı durumdadır ( $G\alpha$ -GDP). Aktive olmuş GPCR, G proteini ile etkileşir.  $G\alpha$ ’ya GTP bağlanır ve  $G\alpha$ ,  $\beta\gamma$ ’dan ayrılır. Böylece inaktif G proteini aktive olarak, özgün sinyal yollarını aktive eder (Tuteja, 2009).  $\alpha$ ,  $\beta$ , ve  $\gamma$  olmak üzere üç alttipten oluşan G proteinlerinin aktivasyonu sinyal ileti yolağında şalter görevi görür. Ligandın GPCR’ye bağlanması sinyal iletim yollarının aktivasyonunu tetiklemektedir (Şekil 3) (Boullaran ve Kehrl, 2014).



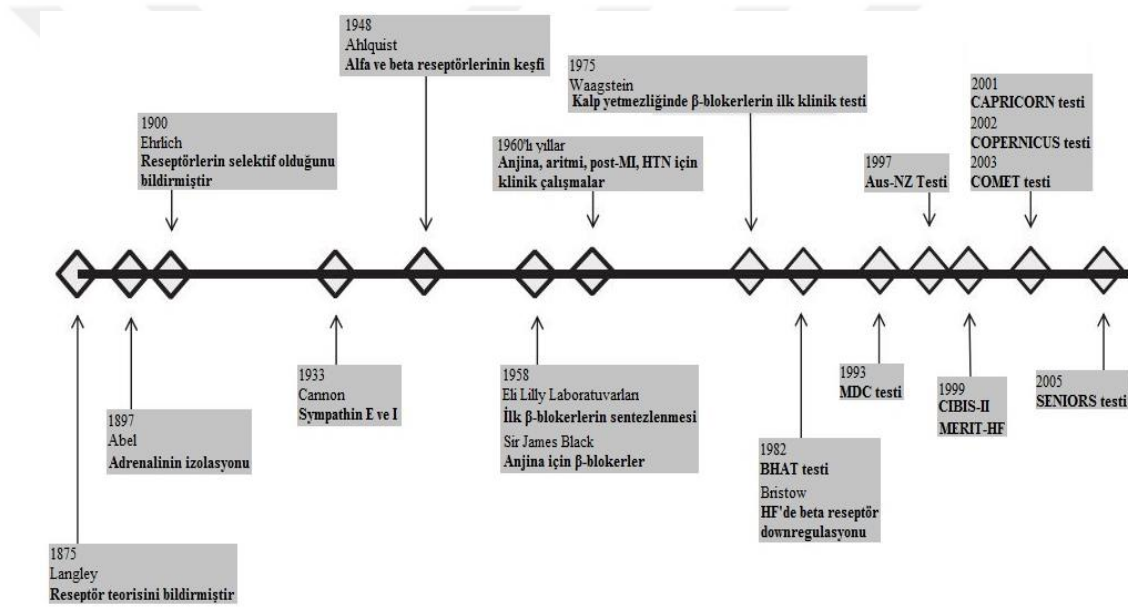
**Şekil 3:** GPCR'ler aracılı heterotrimerik G proteinlerinin aktivasyon ve inaktivasyon mekanizması. (Tuteja, 2009).

#### 4.2. Adrenerjik Reseptörler

İnsan vücudunda yaygın olarak görülen adrenerjik reseptörler, adrenoseptörler olarak da adlandırılmaktadır. Bağışıklık sistemindeki çeşitli hücrelerin adrenalin ve noradrenalin gibi endojen ligandları, bu reseptörlere bağlanırlar (Besedovsky ve ark., 1979; Lefkowitz ve Caron., 1990; Caron ve Lefkowitz, 1993; Elenkov ve ark., 1996). Çeşitli hücrelerde bulunan G protein kenetli reseptör süper ailesinin üyesi olan adrenerjik reseptörler endojen katekolaminlerin hedefidir (McGraw ve Liggett, 2005; Schuller, 2008).

β-adrenerjik reseptörler GPCR süper ailesinin bir üyesi olup düz kas gevşemesi, kalp kasılması gibi birçok hayati fonksiyonun düzenlemesine katkıda bulunurlar. Pek çok farklı doku ve tümörlerde de adrenerjik reseptörler bulunmaktadır (Reiter, 2004). Katekolaminlerle etkileşen GPCR'lerden olan adrenerjik reseptörler çok fazla sayıda hücre dışı adrenerjik ilaçlarla da aktive olurlar. Adrenerjik reseptörler, GPCR'ler arasında en fazla çalışılmış reseptörlerdendir (Stiles ve ark., 1984; Dohlman ve ark., 1991).

Ahlquist 1948’de adrenerjik aktivasyon ve inaktivasyon gibi çeşitli farmakolojik özellikleri temel alarak alfa ( $\alpha$ ) ve beta ( $\beta$ ) adrenerjik reseptörler olmak üzere adrenerjik reseptör ailesini iki büyük gruba ayırmıştır (Ahlquist, 1948; Bylund ve ark., 1998). Yirmi yıl sonra ise Lands ve arkadaşları, Ahlquist’in uyguladığına çok benzer bir metotla  $\beta$ -adrenerjik reseptörleri  $\beta_1$  ve  $\beta_2$  alttiplerine ayırmışlardır (Lands ve ark., 1967). 1980’lerden sonra ise  $\beta_3$ -adrenerjik reseptör olarak bilinen üçüncü bir alttip tanımlanmıştır (Wilson ve ark., 1984; Johnson, 1998). Adrenerjik reseptör ailesi  $\alpha_1A$ ,  $\alpha_1B$ ,  $\alpha_1D$ ,  $\alpha_2A$ ,  $\alpha_2B$ ,  $\alpha_2C$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  ve  $\beta_3$  olarak adlandırılmıştır (Bylund ve ark., 1994; Bylund ve ark., 1998). Adrenerjik reseptörlerin keşfinin kronolojik tarihçesi ve medikal olarak klinik uygulamaları Şekil 4’de gösterilmiştir.



**Şekil 4:** β-adrenerjik reseptörlerin tarihçesi ve klinik uygulamaları. (Wachter ve Gilbert, 2012).

Adrenerjik reseptör ailesi üyeleri üzerine yapılmış çalışmalarda yapısal ve dağılımsal farklılıklarına rağmen birincil yapılarındaki benzerliklerden ötürü, yapısal proteinler ile birkaç benzer noktayı ortak olarak paylaştıkları belirlenmiştir. Tüm bu reseptör alttipleri yaklaşık 400-500 adet amino asit uzunluğunda tek bir polipeptid zincirinden oluşur. Tüm adrenerjik reseptörlerin birincil yapısı yedi katmanlı olup, hidrofobik amino asit bölgeleri içermektedir. Hücre üzerindeki lipid tabakasına yerleşik halde bu çok iyi korunmuş hidrofobik katmanlara karşılık olarak gelen yedi tane alfa helikal transmembran bölgesi tanımlanmıştır (Lefkowitz ve ark., 1985; Lefkowitz ve ark., 1988; Caron ve ark., 1993).

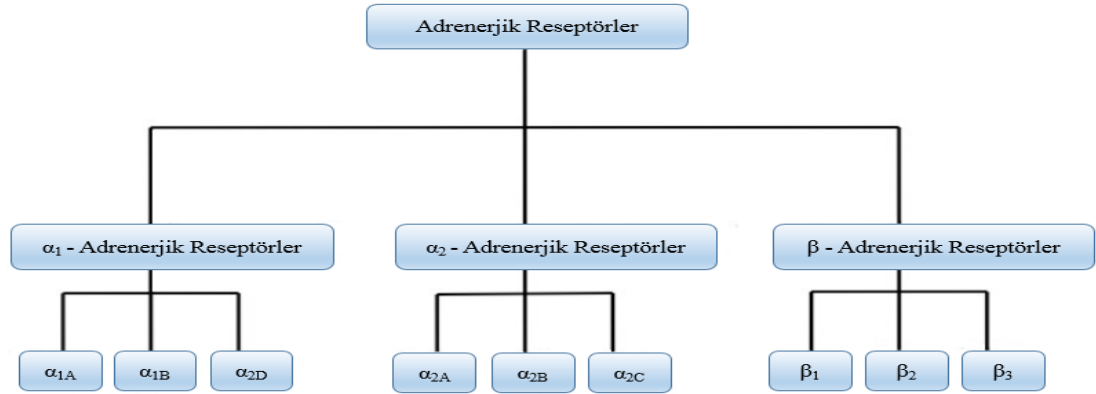
Tüm adrenerjik reseptörler üçer adet hücre içi ve hücre dışı ilmek içerir. Her bir adrenerjik reseptörün hücre dışında bir amino terminal bölgesi ve hücre içine bakan bir karboksil ucu vardır. Bu her iki terminal bölgelerin uzunluğu ve dizisi adrenerjik reseptör alttipine göre değişmektedir (Lefkowitz ve ark., 1988; Strosberg, 1993). Hücre dışı ve transmembran bölgeler ligand bağlama bölgesini düzenleyip, stabilize ederler (Lefkowitz ve Caron, 1990; Oberbeck, 2006).

G proteinleri ile ilişkili hücre içi bölgeler çok farklı sinyal kaskadları ile kenetlenirler (Lefkowitz ve Caron, 1990; Oberbeck, 2006). İkincil ulak sistemlerin aktivasyonu hücre içi kalsiyum salınımı, iyon kanalı/pompa aktivasyonu, kinaz aktivasyonu, fosforilasyon, gen transkripsiyonu da dahil çeşitli aktiviteleri vardır (Hein ve Kobilka, 1995). Yapısal benzerliklerine rağmen her bir adrenerjik reseptörün alttipi sadece kendilerine özgü ligandlarına değil G proteinleri ve sonraki ikincil ulak sinyal iletimi sistemlerini de etkilerler. Adrenerjik reseptör alttipleri sadece tek bir G proteinine ait olmayıp birden çok G proteinine, çoklu olarak bağlanabilir ya da hiç bağlanmayabilir. Böylece tüm bu farklı sinyalleşme kaskadlarını aktive edebildikleri son yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Hall ve ark., 1998; Tan ve ark., 2007).

#### **4.2.1. Adrenerjik reseptörlerin sınıflandırılması ve tanımlanması**

Adrenerjik reseptörler, alfa ( $\alpha$ ) ve beta ( $\beta$ ) adrenerjik reseptörler olarak iki büyük kategoride sınıflandırılırlar. Birçok farklı alttipler şekilde belirtildiği gibi bu sınıflandırılmaya dahil edilirler (Şekil 5) (Bylund ve ark., 1994; Bylund ve ark., 1998; Kin ve Sanders, 2006; Tan ve ark., 2007).

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda  $\beta$ -adrenerjik reseptörler üç alttipe ayrılmaktadır. Bu alttipler  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  ve  $\beta_3$  olarak adlandırılmıştır. Son yapılan araştırmalarda dördüncü bir alttipten  $\beta_4$  olarak bahsedilmektedir (Kaumann ve Molenaar, 1997; Bylund ve ark., 1998; Johnson, 1998).



**Şekil 5:** Adrenergik reseptörlerin sınıflandırılması.  
(Bylund ve ark., 1994; Bylund ve ark., 1998; Kin ve Sanders, 2006; Tan ve ark., 2007).

#### 4.2.2. Adrenergik reseptör genlerinin kromozomal lokalizasyonu

G protein kenetli reseptör ailesi üyesi olan  $\beta$ 1-adrenergik reseptörlerin, adrenalin ve noradrenalin benzeri katekolaminlerin fizyolojik etkilerine aracılık ettiği ve kalpte eksprese oldukları bildirilmiştir (Yang-Feng ve ark., 1990; Ramu ve ark., 2010). Sırasıyla,  $\beta$ 1-adrenergik ve  $\beta$ 2-adrenergik reseptörleri intronsuz 477 ve 413 amino asitle kodlanmaktadır. En az bir intron içeren  $\beta$ 3-adrenergik reseptörleri ise 408 amino asitli proteindir (Granneman ve ark., 1992; Lelias ve ark., 1993; van Spronsen ve ark., 1993).

Yapılan son çalışmalar, insanlarda  $\beta$ 1-adrenergik reseptör genlerinin 10. kromozomun uzun kolu üzerinde (10q24 - q26) konumunda lokalize olduğunu göstermektedir (Frielle ve ark., 1987; Yang-Feng ve ark., 1990; Ramu ve ark., 2010).  $\beta$ 2-adrenergik reseptörlerinin ise 5. kromozomun uzun kolu üzerinde (5q31 - 32) konumunda ve yaklaşık olarak 1,200 baz çifti uzunluğundaki intronsuz bir gen bölgesi tarafından kodlandığı belirlenmiştir (Lefkowitz ve ark., 1976; Johnson, 1998).  $\beta$ 2-adrenergik reseptörler yaklaşık 46,5 kDalton'dur. (Lefkowitz, 1976; Yang-Feng ve ark., 1990; Strosberg, 1993; Johnson, 1998).  $\beta$ -adrenergik reseptörlerin kromozomal lokalizasyonları ve etki mekanizmaları Tablo 3'de özetlenmiştir.



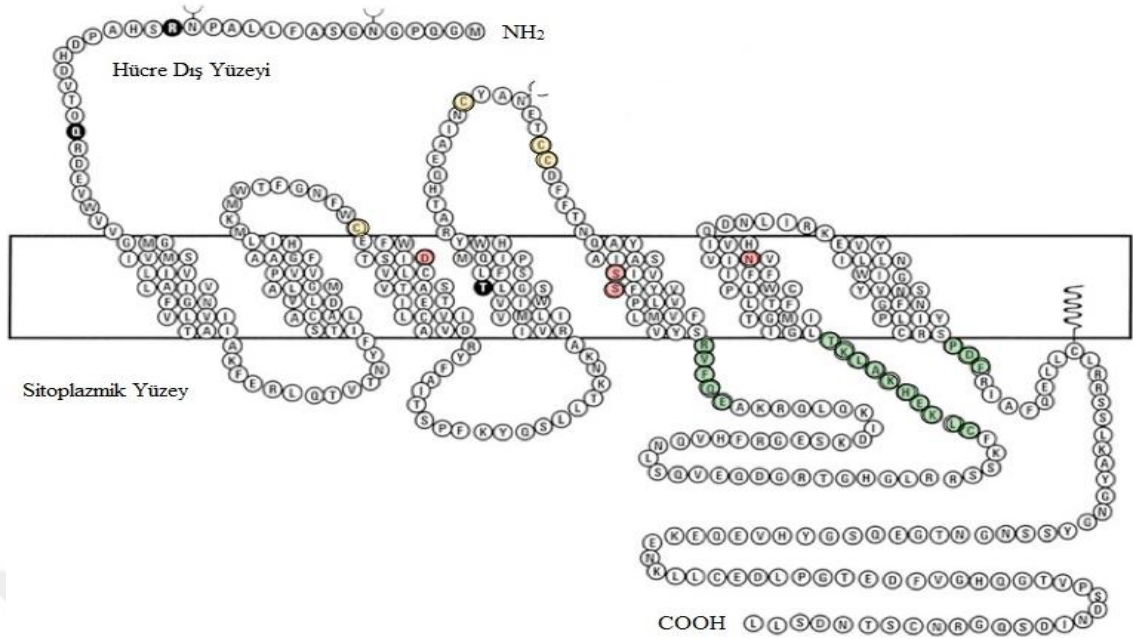
**Tablo 3:** Beta adrenerjik reseptörlerin kromozomal lokalizasyonları ve etki mekanizmaları.

| <b><math>\beta</math>-adrenerjik reseptörünün alt tipi</b> | <b><math>\beta 1</math></b> | <b><math>\beta 2</math></b> | <b><math>\beta 3</math></b> |
|------------------------------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Gen Kromozom No                                            | 10                          | 5                           | 8                           |
| İntronların Varlığı                                        | Yok                         | Yok                         | Var                         |
| Protein Yapısının Uzunluğu                                 | 477                         | 413                         | 408                         |
| Glikozilasyon Bölgeleri (N-terminal)                       | 2                           | 2                           | 2                           |
| Fosforillenme Bölgeleri                                    | PKA,<br>$\beta$ ARK         | PKA,<br>$\beta$ ARK         | 0                           |
| Etki Mekanizmaları                                         | cAMP artışı                 | cAMP artışı                 | cAMP artışı                 |

(Strosberg, 1993).

#### 4.2.3. Adrenerjik reseptörlerin yapısal özellikleri

Beta 1 adrenerjik reseptörler kalp atış oranı ile kasılma gücünü kontrol eden kalp dokusunda (Machida ve ark., 1990) ve böbreklerde lokalizedir. Böbreklerde bu reseptörler renini arttırmaktadır (Rohrer ve ark. 1996).  $\beta 1$ -adrenerjik reseptörleri, karaciğer, akciğer ve beyin (André ve ark., 1996) ile gastrointestinal sistemin sfinkter kısmında (Li ve ark., 2004) da bulunur. Ayrıca tükürük bezlerinden amilaz salgısının oluşumunu da sağlarlar (Carlsöö ve ark., 1978).  $\beta 1$ -adrenerjik reseptörlerinin presinaptik aktivasyonu sonucu noradrenalin salınımı yapılır (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR000507>, Erişim tarihi: 24.04.2016).  $\beta 2$ -adrenerjik reseptörleri, G protein kenetli reseptör ailesinin bir üyesidir.  $\beta 2$ -adrenerjik reseptörlerinin, zarı yedi kere kat eden üç hücre içi ve üç hücre dışı ilmekleri bulunmaktadır (Şekil 6) (Strosberg, 1993; Elenkov ve ark., 2000; Johnson, 2006; Oberbeck, 2006). Amino ucu hücre dışına, karboksil ucu hücre içine bakar. Kırmızı ile gösterilen dört amino asit rezidüsü ligand bağlanma bölgesidir. Yeşil ile belirtilmiş olan amino asit rezidüleri ise G protein kenetlenmesi ile ilişkilidir (Şekil 6) (Strosberg, 1993; Elenkov ve ark., 2000; Johnson, 2006; Oberbeck, 2006).



**Şekil 6:**  $\beta$ 2-adrenerjik reseptör yapısı.  
(Johnson, 2006'dan değiştirilmiştir).

Beta 3 adrenerjik reseptör alttipi aracılığıyla kalp kasılmasının zayıflatabileceği ve orta derecede bile olsa kardiyovasküler etkiye bulunabileceğine dair yeni veriler bulunmaktadır (Weiser ve ark., 1997; Vendrell ve ark., 1998 ; Tonolo ve ark., 1999; Gauthier ve ark., 2000; Gauthier ve ark., 2000).

#### 4.3. Adrenerjik Reseptörlerin Fizyolojik Fonksiyonları ve Dokularda Dağılımı

Adrenerjik reseptörlerin, adrenalin ve noradrenalin aracılığı ile kompleks biyolojik işlevleri vardır. Vücutta yaygın olarak bulunan adrenerjik reseptörler sadece tek bir doku veya hücre tipi ile kısıtlı olmayıp bağışıklık sistemi hücreleri de dahil çok çeşitli hücre tiplerinde bulunurlar (Caron ve Lefkowitz, 1993; Strosberg, 1993; Bylund ve ark., 1998; Oberbeck, 2006; Tan ve ark., 2007). Adrenerjik reseptörlerin doku dağılımları Tablo 4'de özetlenmiştir.



**Tablo 4:** Adrenerjik reseptörlerin doku dağılımları.

| <b><math>\alpha_1</math> alttipi</b> | <b>Fizyolojik Konumu/Doku</b> |
|--------------------------------------|-------------------------------|
| $\alpha_{1A}$ :                      | Düz Kas, Kan Damarları        |
| $\alpha_{1B}$ :                      | Kalp                          |
| $\alpha_{1D}$ :                      | Tanımlanmamış                 |

| <b><math>\alpha_2</math> alttipi</b> | <b>Fizyolojik Konumu/Doku</b>  |
|--------------------------------------|--------------------------------|
| $\alpha_{2A}$ :                      | Trombosit, Beyin, Sinir Dokusu |
| $\alpha_{2B}$ :                      | Tanımlanmamış                  |
| $\alpha_{2C}$ :                      | Dalak                          |

| <b><math>\beta</math> alttipi</b> | <b>Fizyolojik Konumu/Doku</b> |
|-----------------------------------|-------------------------------|
| $\beta_1$ :                       | Kalp                          |
| $\beta_2$ :                       | Akciğer                       |
| $\beta_3$ :                       | Adipoz doku                   |

(Caron ve Lefkowitz, 1993; Strosberg, 1993; Oberbeck, 2006; Tan ve ark., 2007).

Beta adrenerjik reseptör antagonistleri ( $\beta$ -blokerler),  $\beta$ -adrenerjik reseptörlere selektif olarak bağlanarak çeşitli organlar üzerine kompetitif ve geri dönüşümlü antagonizma etkileri bulunmaktadır (José López-Sendón ve ark., 2004) (Tablo 5). Bu adrenerjik reseptörlerin sempatik tonda ve çeşitli dokulardaki aktivite yanıtlarının bilgisi ile bunların farmakolojik etkileri de açıklanmıştır (Tamargo ve Delpon, 1990; Cruickshank ve Prichard, 1996).

Beta blokerlerin dinlenim halinde kalp atış hızı ve kasılmasına fazla bir etkisi olmazken, egzersiz sonrası veya stres altında bulunma gibi sempatik sinir sisteminin aktive olduğu durumlarda kalp atış hızını düşürücü ve kalp kasılmasını azaltıcı etkileri bulunmaktadır (José López-Sendón ve ark., 2004).

Beta blokerlerin,  $\beta_1$  ve  $\beta_2$ -adrenerjik reseptörlere kompetitif inhibisyon yapanları nonselektif olarak sınıflandırılır. Genellikle  $\beta_1$ -adrenerjik reseptörü selektif olarak isimlendirilenler ise  $\beta_2$ -adrenerjik reseptörlere göre,  $\beta_1$ -adrenerjik reseptöre yüksek afiniteli olarak sınıflandırılırlar (Tablo 6) (Tamargo ve Delpon, 1990; Frishman ve ark., 1991; Cruickshank ve Prichard, 1996; Frishman, 1998). Ancak selektiflik doza bağlıdır ve selektiflik azaldığı ya da ortadan kalktığı zaman çok daha yüksek dozlar kullanılır. Paradoksal olarak zayıf agonist yanıtı olan intrinsik semptomimetik etkinlik (ISA) gösteren bazı  $\beta$ -blokerler,  $\beta$ -adrenerjik reseptörleri hem uyarıp hemde

bloke edebilirler. Birkaç  $\beta$ -bloker,  $\alpha 1$ -adrenerjik reseptör blokajı (carvedilol, labetalol) aracılı periferel vazodilatör aktivisine sahip  $\beta 2$ - adrenerjik reseptör agonizmi veya  $\beta$ -adrenerjik reseptör blokajından (bucindolol, nebivolol) bağımsız mekanizmalar aracılığıyla gerçekleşir. Bunlara ek olarak,  $\beta$ -blokerler lipofilik veya hidrofilik olarak da sınıflandırılabilirler (José López-Sendón ve ark., 2004).  $\beta$ -blokerler arasında bulunan önemli farmakokinetik farklılıklar Tablo 5’de gösterilmektedir (Tamargo ve Delpon, 1990; Frishman ve ark., 1991; Cruickshank ve Prichard, 1996; Frishman, 1998).  $\beta 1$  ile  $\beta 2$ -adrenerjik reseptörlerin doku dağılımı ve etkileri Tablo 5’de özetlenmiştir.

**Tablo 5:**  $\beta 1$  ve  $\beta 2$ -adrenerjik reseptör aracılığıyla oluşan etkiler.

| Doku                          | Reseptörler        | Etkileri                                                         |
|-------------------------------|--------------------|------------------------------------------------------------------|
| Kalp /SA Nodu                 | $\beta 1, \beta 2$ | Kalp atış oranını artırır                                        |
| Kalp /AV Nodu                 | $\beta 1, \beta 2$ | Kalp atış hızını artırır                                         |
| Kalp /Atrial                  | $\beta 1, \beta 2$ | Kalp kasılmasını artırır                                         |
| Kalp /Ventriküller            | $\beta 1, \beta 2$ | Kasılma, atış hızı ve idioventriküler pacemakerların artışı      |
| Arterler                      | $\beta 2$          | Vazodilatasyon                                                   |
| Venler                        | $\beta 2$          | Vazodilatasyon                                                   |
| İskelet kası                  | $\beta 2$          | Vazodilatasyon, Kalp kasılması artışı, Glikojenoliz, $K^+$ alımı |
| Karaciğer                     | $\beta 2$          | Glikojenoliz ve Glikoneojenez                                    |
| Pankreas ( $\beta$ hücreleri) | $\beta 2$          | Insulin ve Glukagon salınımı                                     |
| Yağ hücreleri                 | $\beta 1$          | Lipoliz                                                          |
| Bronş                         | $\beta 2$          | Bronkodilatasyon                                                 |
| Böbrek                        | $\beta 1$          | Renin salınımı                                                   |
| Safra kesesi ve kanallar      | $\beta 2$          | Relaksasyon                                                      |
| İdrar torbası kası            | $\beta 2$          | Relaksasyon                                                      |
| Uterus                        | $\beta 2$          | Relaksasyon                                                      |
| Gastrointestinal              | $\beta 2$          | Relaksasyon                                                      |
| Sinir uçları                  | $\beta 1, \beta 2$ | Noradrenalin salınımını destekler                                |
| Paratiroid bezleri            | $\beta 1, \beta 2$ | Parathormon salınımı                                             |
| Tiroid bezleri                | $\beta 2$          | T4’dan T3’e dönüşüm                                              |

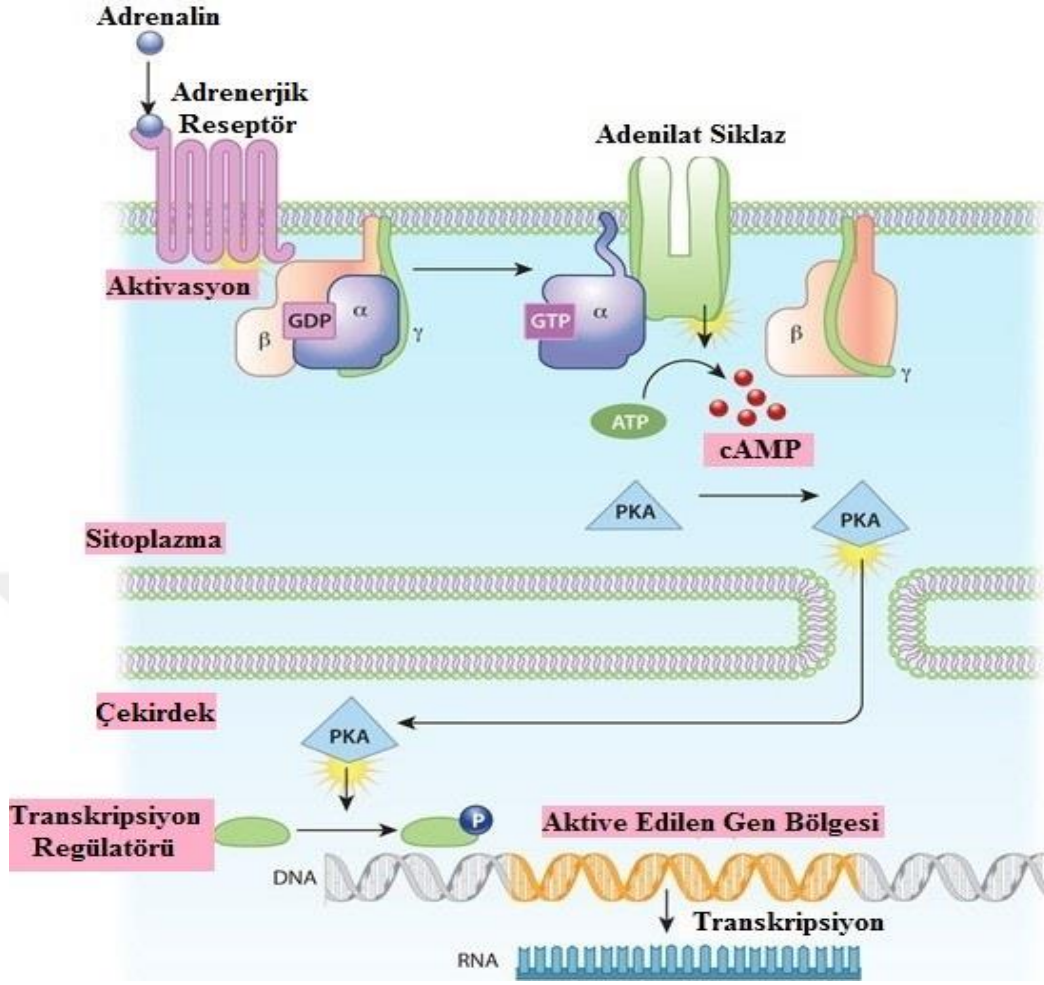
SA: Sino-Atrial; AV: Auriculo-Ventriküler  
(José López-Sendón ve ark., 2004).

Ariens ve arkadaşları, sempatik sinirlerden noradrenalin salınmasında  $\beta 1$ -adrenerjik reseptörün, adrenal medulladan adrenalin salınımında ise  $\beta 2$ -adrenerjik reseptörün etkili olduğunu bildirmişlerdir (Ariens ve ark., 1979) (Şekil 7).



**Şekil 7:**  $\beta 1$  ve  $\beta 2$ -adrenerjik reseptör yanıtlarının farklılaşması.  
(Fain ve Garcia-Sainz, 1983).

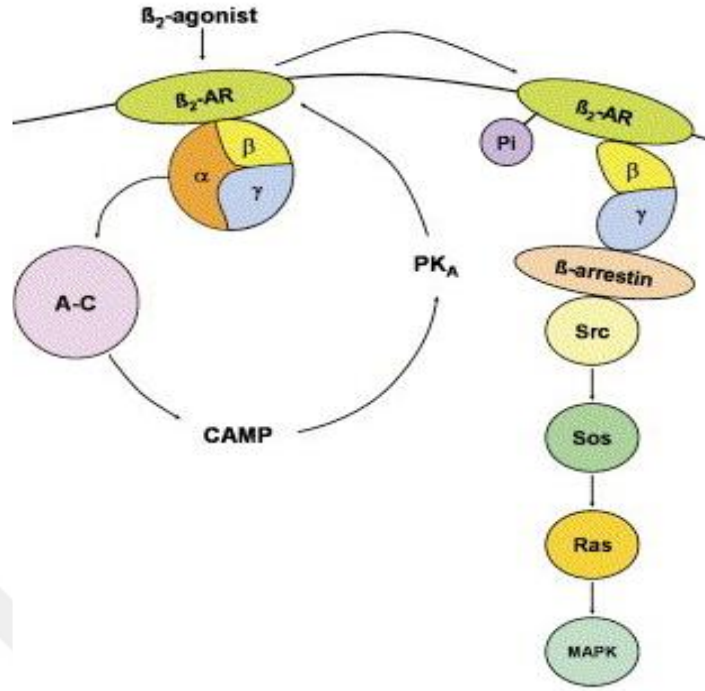
Katekolaminler özgün reseptörlerine bağlanarak çeşitli sinyal ileti mekanizmalarını GTP bağlayan G proteinleri aracılığıyla aktive ederek adenilat siklaz veya fosfolipaz C (PLC) gibi efektörleri düzenlerler (Strosberg, 1993). Adrenalinin adrenerjik reseptörlere bağlanması ile G proteinleri aracılığıyla adenilat siklaz enzimi aktive olarak cAMP sentezi gerçekleşir. cAMP molekülleri, protein kinaz A (PKA)'yı aktive eder. PKA'lar çekirdeğe girerek transkripsiyonu da etkilerler. Fosforilasyon reaksiyonları aracılığıyla hücre içerisinde hem uzun hem de kısa süreli yanıtlar verilirken, kaskadın her bir basamağı ise başlangıçtaki sinyali daha fazla amplifiye eder (Şekil 8). Fosfodiesteraz enzimi, cAMP sinyali iletimini sonlandırmaktadır. İkincil ulakların diğer örneklerinden olan diaçilgliserol (DAG) ve inositol 1,4,5-trifosfat (IP<sub>3</sub>)'ın her ikisi de bir membran proteini olan PLC enziminin aktivasyonu ile üretilmektedir. IP<sub>3</sub> hücre içi depolardan Ca<sup>2+</sup> salınımına neden olur. DAG ve Ca<sup>2+</sup> birlikte protein kinaz C (PKC) enzimini aktive ederler (Erişim tarihi: 30 Mart 2016, <http://www.nature.com/scitable/topicpage/cell-signaling-14047077>).



**Şekil 8:** Adrenerjik reseptör aracılı sinyal iletimi.

(Erişim tarihi: 30 Mart 2016, <http://www.nature.com/scitable/topicpage/cell-signaling-14047077>).

Beta 2 adrenerjik reseptör sinyal yolağında da cAMP artışı olduğu belirtilmektedir. Bu sinyal yolağı  $G_s$  veya  $G_i$  proteinleri aracılığı ile gerçekleşir.  $G_s$  proteinin  $\alpha$ -alttipi adenilat siklazı aktive eder ve cAMP regülasyonu sonucunda PKA aktive olur.  $G_i$  ise  $\beta\gamma$  altbirimleri ile diğer sinyal yolağı moleküllerinden scaffold fonksiyonu olan aksesuar molekülü  $\beta$ -arrestine ihtiyaç duyar.  $\beta$ -arrestin aracılığı ile MAPK (mitojen aktiveli protein kinaz) yolağı uyarılır (Şekil 9) (Raymond ve ark., 1990; Johnson, 2006; Kin ve Sanders, 2006; Tan ve ark., 2007).



**Şekil 9:**  $\beta$ 2-Adrenerjik reseptör sinyal yolları. (Johnson, 2006).

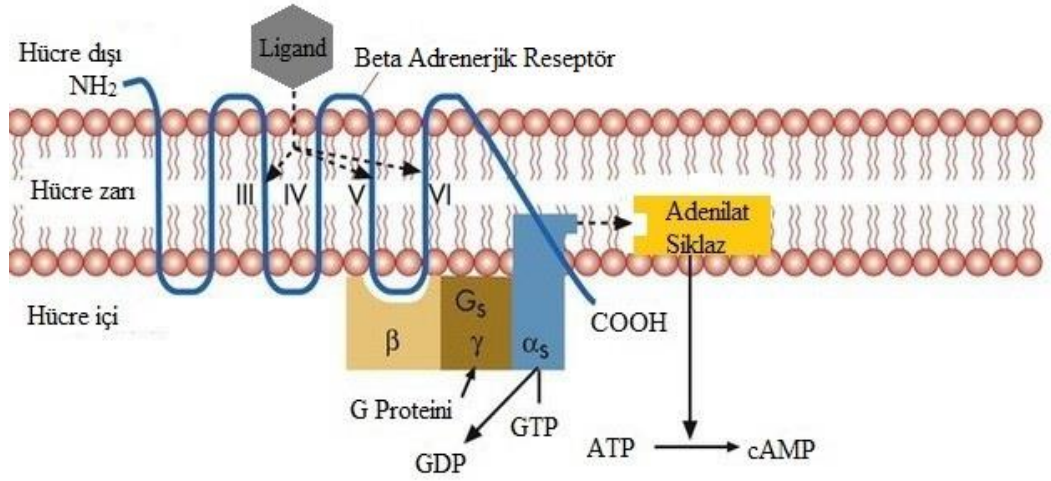
Beta 2 adrenerjik reseptörlerin agonist aktivasyonu için ligandın reseptöre bağlanması geleneksel anahtar ve kilit teorisine uyar. Bu teori ile agonistin  $\beta$ 2-adrenerjik reseptörlere bağlanmasının, reseptörün daha iyi bir konformasyonda bulunarak  $G_s$  ile etkileşmesine sebep olduğu bildirilmiştir (Nagatomo ve ark., 2001; Liggett, 2002; McGraw ve Liggett, 2005). Ligandının olmadığı durumda ise  $\beta$ 2-adrenerjik reseptörü farklı bir konformasyonda bulunmaktadır (Onaran ve ark., 1993).

Beta 2 adrenerjik reseptörlere ait bazı çalışmalarda agonistinin yokluğunda bile reseptör aktif olabilmektedir (Soudijn ve ark., 2005). Aktif ve inaktif durumlar arasındaki dengede, dinlenim koşullarında dahi inaktif durum çok daha fazla baskındır.  $\beta$ 2-adrenerjik reseptör agonistlerinin, reseptöre bağlanarak ve reseptörün aktif formunu stabilize ederek etkilerini gösterdikleri düşünülmektedir.  $\beta$ 2-adrenerjik reseptör agonistleri inaktif formdaki reseptöre bağlanarak dengenin  $\beta$ 2-adrenerjik reseptörü aktif formuna doğru gitmesini sağlar (Johnson, 2001; McGraw ve Liggett, 2005). Teknik olarak  $\beta$ 2-adrenerjik reseptör agonistleri ve antagonistlerinin aynı reseptör için rekabet etmedikleri düşünülmektedir. Bunun yerine bu ligandlar,  $\beta$ 2-adrenerjik reseptörünün farklı formlarına bağlanarak reseptörü değiştirip dengeyi

kendi lehine çevirirler. (Onaran ve ark., 1993; Houslay ve Kolch, 2000; Spreng ve ark., 2001; Leineweber ve Brodde, 2004;). Özetle, agonist veya antagonistin reseptöre bağlı olup olmadığı duruma göre konformasyonu değişmektedir.  $\beta$ 1 ve  $\beta$ 2-adrenerjik reseptörlerin, BxPC-3, MIA PaCa-2, ve Panc-1 hücre soylarında eksprese oldukları belirlenmiştir (Weddle ve ark., 2001; Schuller ve Al-Wadei, 2010; Zhang ve ark., 2010).

PanCa hücrelerinde  $\beta$ -adrenerjik agonist olan nikotin türevli nitrozamin keton veya katekolaminler  $\beta$ -adrenerjik reseptörlere bağlanarak cAMP ve PKA yolaklarını aktive ederek hücre çoğalmasını indüklemektedir. PKA sinyal yolağı olan CREB (cAMP yanıt bağlayıcı protein), aktivatör protein-1 (AP-1) veya NF- $\kappa$ B transkripsiyonu ile hücre çoğalmasını aktive etmektedir (Weddle ve ark., 2001; Schuller, 2002; Askari ve ark., 2005; McCubrey ve ark., 2007; Schuller ve Al-Wadei, 2010; Zhang ve ark., 2010).

Adrenerjik reseptör alttiplerinin bir çok hücrede bulunması immünolojik açıdan oldukça önemlidir (Oberbeck, 2006). Çünkü bu reseptör alttiplerinin fizyolojik olarak aktivasyonu hem sağlık hem de hastalıklar açısından da büyük önem taşımaktadır. Adrenerjik reseptörler kan basıncı, solunum yolu reaktivitesi, miyokard kasılma gücü ve oranı gibi fizyolojik aktivite düzenlemelerine katkıda bulunurlar (Caron ve Lefkowitz, 1993; Oberbeck, 2006). Öte yandan  $\beta$ -adrenerjik reseptörler, vazodilatasyon ve bronkodilatasyon gibi inhibisyon fonksiyonlarını da düzenlerler. Ancak, uyarıcı ve inhibe edici etkileri her zaman geçerli değildir.  $\beta$ -adrenerjik reseptörlerin uyarıcı rolünün başlıca istisnası ise kardiyak fonksiyonu düzenlemesidir (Philipp ve Hein, 2004). Düz kaslarda  $\beta$ -adrenerjik reseptör agonistinin,  $\beta$ -adrenerjik reseptörü uyarması düz kas gevşemesine sebep olmaktadır. Albuterol veya noradrenalin gibi adrenerjik agonistler  $\beta$ -adrenerjik reseptörlere bağlanırlar ve uyarıcı  $G_s$  proteini ile aktive olurlar.  $G_s$  proteini aracılığı ile adenilat siklaz aktivasyonu ikincil ulak olan cAMP'nin sentezini artırır (Şekil 10). Bunun sonucunda düz kas gevşemesi ve bronkodilasyon meydana gelmektedir (Gardenhire, 2012).



**Şekil 10:** Düz kaslarda beta adrenerjik reseptör aracılı sinyal iletimi. (Gardenhire, 2012).

#### 4.4. Adrenerjik Reseptörlerin Hücre Çoğalmasındaki Roller

Daha önce yapılan bir çalışmada bulunan  $\beta 2$ -adrenerjik reseptör agonistinin farklılaşmamış K562 kronik miyeloid lösemi hücrelerinde hücre çoğalmasını indüklediği Gauwerky ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (Gauwerky ve ark., 1980). 3T3-F44-2A fare fibroblastları  $\beta 1$  ve  $\beta 2$ -adrenerjik reseptörleri eksprese etmektedir. 3T3-F44-2A fare fibroblastlarının adipositlere farklılaşmasının indüklenmesiyle bu hücreler baskın olarak  $\beta 3$ -adrenerjik reseptörlerini eksprese etmeye başlarken,  $\beta 2$ -adrenerjik reseptörlerinin ekspresyonu ise çok azalmıştır (Feve ve ark., 1991).

Glukokortikoid deksametazon uygulanan adiposit benzeri diğer 3T3-F44-2A hücrelerinde  $\beta 2$ -adrenerjik reseptörü ekspresyonunun arttığı,  $\beta 1$  ve  $\beta 3$ -adrenerjik reseptörlerinin baskılandığı saptanmıştır (Feve ve ark., 1992).

Beta 1 adrenerjik ve  $\beta 2$ -adrenerjik reseptörlerde PKA tarafından fosforillenen en az bir bazen iki tane hedef bölgesinin olduğu belirlenmiştir. Bu bölgelerin Arg/Lys-Arg-X-(X)-Ser/Thr dizileri i3 (hücre içi üçüncü ilmek) veya karboksil terminal



domenlerinin G protein bağlanma bölgesine yakın oldukları belirtilmiştir (Emorine ve ark., 1989; Strosberg, 1993; Nantel ve ark., 1993).

Agonist tarafından  $\beta 1$  ve  $\beta 2$ -adrenerjik reseptörlerin uyarılmasının PKA fosforilasyonuna neden olduğu ve bu fosforilasyonun reseptörün mRNA seviyelerini azalttığı bildirilmiştir (Bouvier ve ark., 1989; Hadcock ve ark., 1989).

#### 4.5. Kanser ve Beta Adrenerjik Reseptörler

Yaygın kanser tiplerinde,  $\beta$ -adrenerjik sistem ile ilişkisi olan sinyal molekülleri ve reseptör alttipleri Tablo 6’da özetlenmiştir (Tang ve ark., 2013).

**Tablo 6:** Farklı kanser tiplerinde  $\beta$ -adrenerjik reseptörler ve etki mekanizmaları.

| Tümör Tipi             | $\beta$ -AR Alt tipi               | Tümöre Etkisi                                                                   | Blokerler                                            |
|------------------------|------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| Pankreas               | $\beta 1, \beta 2$                 | Çoğalma, Migrasyon, İnvazyon                                                    | Propranolol, ICI118,551, Metoprolol, Celecoxib, GABA |
| Meme                   | $\beta 1, \beta 2$                 | Anti-Apoptoz( $\beta 2$ )*, Migrasyon, Adezyon, Metastaz                        | Propranolol                                          |
| Yumurtalık             | $\beta 2$                          | Anti-Apoptoz, Tümör büyümesi, Anjiyogenez, Migrasyon, İnvazyon                  | Propranolol                                          |
| Kolorektal             | $\beta 1, \beta 2$                 | Hücre çoğalması, Tümör büyümesi, Migrasyon( $\beta 2$ ) <sup>a</sup> , Metastaz | Atenolol, ICI118,551                                 |
| Özefagus               | $\beta 1, \beta 2$                 | Hücre çoğalması                                                                 | Atenolol, ICI118,551                                 |
| Mide                   | $\beta 1, \beta 2$                 | Hücre çoğalması                                                                 | Propranolol, ICI118,551, Atenolol                    |
| Akciğer                | $\beta 1, \beta 2$                 | Hücre çoğalması, Tümör büyümesi                                                 | Propranolol, GABA                                    |
| Prostat                | $\beta 2$                          | Anti-Apoptoz, Migrasyon, Metastaz                                               | ICI118,551, Propranolol                              |
| Nazofarinks            | $\beta 1, \beta 2$                 | Anjiyogenez, İnvazyon                                                           | Propranolol                                          |
| Melanoma               | $\beta 1, \beta 2$                 | Anjiyogenez, İnvazyon                                                           | Propranolol                                          |
| Lösemi                 | $\beta 1, \beta 2$                 | Tümör büyümesi, Tümör büyümesi                                                  | Propranolol                                          |
| Hemanjiyom             | $\beta 1, \beta 2$                 | Hücre çoğalması                                                                 | ICI118,551, Metoprolol                               |
| Hemanjiyom, endotelyum | $\beta 1, \beta 2(\beta 2$ baskın) | Hücre çoğalması                                                                 | Propranolol                                          |
| Anjiyosarkom           | $\beta 1, \beta 2$                 | Hücre çoğalması                                                                 | Propranolol                                          |

\* İlgili fonksiyonların  $\beta 2$ -adrenerjik reseptör aracılığıyla yapıldığı bildirilmiştir. Metoprolol,  $\beta 1$ -adrenerjik reseptör selektif antagonisti; Celecoxib, siklooksijenaz-2 inhibitörü; GABA ise  $\gamma$ -aminobütirik asit inhibitörü nörotransmitteridir.

(Tang ve ark., 2013).



Beta adrenerjik reseptör antagonistlerinin ( $\beta$ -bloker) kardiyovasküler hastalıklardaki yaygın kullanımının yanı sıra anksiyete, migren, glom tedavisinde de kullanılmaktadır (Lowenthal ve ark., 1984; Reiter, 2004).

Beta adrenerjik reseptör antagonistleri kullanan hastalar üzerinde yapılmış önceki çalışmalarda, kanser riskinin azaldığı gösterilmiştir (Algazi ve ark., 2004; Perron ve ark., 2004). Yeni araştırmalarda da  $\beta$ -adrenerjik reseptörlerin pek çok kanser hücresinin çoğalmasına etkisinin olduğu gösterilmiştir (Masur ve ark., 2001; Zhang ve ark., 2011).

Ayrıca, insan eritrolösemi hücrelerinde de  $\alpha$ 1-adrenerjik reseptör antagonistlerinin hücre çoğalmasını inhibe edici yönde etki göstererek, apoptozu uyardıkları ifade edilmiştir (Fuchs ve ark., 2009; Jemal ve ark., 2011).

Stres, kronik depresyon ve sosyal destek eksikliği gibi faktörlerin kanser başlangıç ve gelişimi (Antoni ve ark., 2009) üzerine etkisinin  $\beta$ -adrenerjik reseptörler ile ilişkisi olduğu pek çok klinik çalışmada da gösterilmiştir (Antoni ve ark., 2006; Thaker ve ark., 2006).

Beta adrenerjik reseptörler deney hayvanlarının meme tümörlerinde (Marchetti ve ark., 1989; Marchetti ve Labrie, 1990; Marchetti ve ark., 1991) ve normal meme bezinde karakterize olmaktadır (Clegg ve Mullaney, 1985; Lavandero ve ark., 1985). İnsan meme kanseri MDA-MB-231, MCF-7, VHB-1, T47-D ve BT-20 hücre soylarında  $\beta$ -adrenerjik reseptörler tanımlanmıştır. MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerinde  $\beta$ -adrenerjik reseptör agonistlerinin  $\beta$ -adrenerjik reseptör ekspresyonlarında artışa neden olduğu ve bu reseptörlerin uyarılması ile DNA sentezini azaltarak hücre çoğalmasını inhibe ettikleri belirlenmiştir (Slotkin ve ark., 2000). Östrojene duyarlı (MCF-7, ZR-75-1, MDAMB-361) ve östrojene duyarsız (MDA-MB-453, MDAMB-435, MDA-MB-468) insan meme kanseri hücre soylarının çoğalmasını  $\beta$ -adrenerjik reseptör antagonistleri inhibe etmiştir (Cakir ve ark., 2002).

Bir agonist bazen cAMP düzeyinde az etki gösterirken, transkripsiyon düzeyinde ise çok etki göstermiştir (Baker ve ark., 2003). Dimetilbenzantrasen (DMBA) ile indüklenmiş tümörlerde  $\beta$ -adrenerjik reseptör miktarı ile tümör gelişimi arasında ilişki

bulunmuştur. Tümörün cerrahi olarak çıkarılması ile gerilemesi arasında da korelasyon saptanmıştır (Marchetti ve ark., 1989; Marchetti ve ark., 1991).

Noradrenalin, invazyon ve migrasyonda dahil olmak üzere tümör metastazının önemli aşamalarında öne çıkmaktadır. Deneysel *in vitro* modellerde adrenalin ile kolon kanseri hücre migrasyonu artarken,  $\beta$ -blokerler bu etkiyi inhibe etmektedirler (Masur ve ark., 2001; Antoni ve ark., 2006). Adrenalin ve noradrenalinin her ikisinde matriks metalloproteinaz 2 (MMP2) ve matriks metalloproteinaz 9 (MMP9) seviyelerini arttırarak *in vitro* yumurtalık kanseri hücrelerinin invazyonunu arttırmaktadırlar (Sood ve ark., 2006; Antoni ve ark., 2006). Meme ve yumurtalık kanserlerinde tanımlanan  $\beta$ -adrenerjik reseptörlerin çoğu katekolaminlerin etkilerine aracılık etmektedirler (Sood ve ark., 2006; Badino ve ark., 1996; Antoni ve ark., 2006).

Meme ve yumurtalık kanseri üzerine yapılan bu iki çalışmada da  $\beta$ 2-adrenerjik reseptörlerin baskın adrenerjik reseptör olduğu gösterilmiştir (Badino ve ark., 1996; Antoni ve ark., 2006; Sood ve ark., 2006).

Hücre dışından hücre içine bilginin iletilmesinde G protein kenetli reseptörlerden olan  $\beta$ -adrenerjik reseptörlerin adenilat siklazın aktivasyonu ve ikincil ulak cAMP'nin artışında rolü bulunmaktadır (McDonald ve Lefkowitz, 2001; Antoni ve ark., 2006).

Memeli tümörlerinde, tümör büyümesinin hızlanması ile  $\beta$ -adrenerjik reseptörlerin aktivasyonu arasında ilişki bulunmuştur (Badino ve ark., 1996; Vandewalle ve ark., 1990; Marchetti ve ark., 1991; Antoni ve ark., 2006). Dışarıdan gelen uyarılara yanıt olarak; stres hormonları da dahil çoklu sinyal iletimi yollarıyla, önemli bir transkripsiyon faktörü olan CREB proteini aktive olmaktadır (Abramovitch ve ark., 2004; Lang ve ark., 2004; Antoni ve ark., 2006). Viral onkogenlerin ekspresyonunun yanı sıra (Enserink ve ark., 2004; Antoni ve ark., 2006), CREB ailesi proteinlerinde tümör hücresi çoğalması, migrasyonu, anjiyogenezi ve apoptoz inhibisyonu üzerine rolü olduğu birkaç çalışma ile gösterilmiştir (Jean ve Bar-Eli, 2000; Abramovitch ve ark., 2004; Lang ve ark., 2004; Antoni ve ark., 2006).

Örneğin akciğer karsinoma hücrelerinde kortizol,  $\beta$ -adrenerjik reseptör yoğunluğunda artışa ve izoprenalin ile de cAMP artışına neden olur (Nakane ve ark., 1990; Antoni ve ark., 2006).

Kronik stres ile indüklenen  $\beta$ -adrenerjik sinyal iletimi aktivasyonu etkisi,  $\beta$ -blokaj ile tersine çevrilmektedir. Böylece, kronik stresin pankreas kanseri progresyonu üzerine yaptığı etki de geri çevrilmiş olacaktır. Nöral  $\beta$ -adrenerjik sinyal iletimi ile düzenlenen pankreas kanseri progresyonu için  $\beta$ -bloker ilaçları ile  $\beta$ -blokaj müdahalesi pankreas kanserini tedavi etme yeni ve etkili bir strateji olarak gözükmektedir (Kim-Fuchs ve ark., 2014).

Birleşik devletlerde her yıl yaklaşık 40,000 kadar ölüm vakası ile pankreas kanseri, kanserle ilişkili ölümlerde dördüncü sırayı almaktadır (Siegel ve ark., 2012; Kim-Fuchs ve ark., 2014). Vakalardaki toplam yaşam süresi %5'ten daha az olduğundan, mevcut klinik çıktıları iyileştirmek için efektif yeni stratejilere ihtiyaç duyulmaktadır. Pankreas kanseri hastalarının primer tümörünün cerrahi olarak çıkarılmasına bağlı olarak hastaların 5 yıllık yaşam sürelerinin %20-30 oranında arttığı bildirilmiştir (Gaedcke ve ark., 2010; Kim-Fuchs ve ark., 2014). Ancak cerrahi müdahale ile tümörden arındırılan bölgeler olsa bile tekrar nüksetme oranının artması ile tümör sınırları genişler ve sonunda çoğu hasta bu lokal tümör nüksetmesi veya metastazik hastalıklar sonucu hayatını kaybetmektedir (Hishinuma ve ark., 2006; Han ve ark., 2006; Kleeff ve ark., 2007; Kim-Fuchs ve ark., 2014).

Kronik stres sırasında hücre davranışlarını düzenlemek üzere sempatik sinir sisteminin aktive olması ve katekolaminerjik nörotransmitterlerin salgılanmasıyla adrenerjik reseptörler etkilenmektedir.  $\beta$ -adrenerjik reseptörler pankreas tümör hücrelerinde bulunurlar ve *in vitro* çalışmalarla tümör hücresi davranışının  $\beta$ -adrenerjik sinyal iletimine karşı duyarlılığı bildirilmiştir (Guo ve ark., 2009; Zhang ve ark., 2010; Schuller ve Al-Wadei, 2010; Kim-Fuchs ve ark., 2014). Kronik stresin  $\beta$ -adrenerjik sinyal iletim yolları aracılığıyla pankreas tümör büyümesi ve invazyonunu arttırdığı bildirilmiştir (Takahashi ve ark., 1995; Sperti ve ark., 1997; Hishinuma ve ark., 2006; Kim-Fuchs ve ark., 2014).

Propranolol,  $\beta$ -adrenerjik sinyal iletiminde farmakolojik blokaj yaparak tümör hücrelerinin pankreasın yakınına invazyonunu durdurur.  $\beta$ -blokerlerin kemoterapi stratejilerinin tamamlayıcısı olarak pankreas tümör büyümesi ve invazyonunu engelleyip, pankreas kanseri hastalarının yaşam sürelerini arttırabileceği bildirilmiştir (Sloan ve ark., 2010; Madden ve ark., 2011; Pérez Piñero ve ark., 2012; Kim-Fuchs ve ark., 2014).  $\beta$ -adrenerjik blokaj ile invazif genlerin ekspresyonu ve pankreas kanseri hücrelerinin dağılımı engellemektedir (Al-Wadei ve ark., 2009; Schuller ve ark., 2011; Lin ve ark., 2012; Kim-Fuchs ve ark., 2014).

Kronik stres ile transgenik deney model sistemlerinde spontan pankreas kanseri gelişimi sağlanarak, pankreas kanserinin başlangıcının  $\beta$ -adrenerjik sistem tarafından düzenlendiği bildirilmiştir (Herrerros-Villanueva ve ark., 2012; Kim-Fuchs ve ark., 2014).

Hastalarda kronik stresi yönetebilme konusunun, primer tümör büyümesi ve pankreasın çevresini saran tümörün lokal invazyonuna etkisi olduğundan hastanın yaşam süresi ile doğrudan ilişkilidir. Üzüntü gibi olumsuzluk içeren duygu durumlarının yüksek düzeyde görülmesi (Zabora ve ark., 2001; Carlson ve ark., 2004) ile pankreas kanserinin teşhisi arasında çok yakın bir ilişki bulunmaktadır (Kim-Fuchs ve ark., 2014).

Bu stres ve üzüntü durumu ile ileride ortaya çıkabilecek kanser riskini azaltmak için  $\beta$ -bloker tedavisi tek seçenek olarak gözükmektedir (Lindgren ve ark., 2013; Kim-Fuchs ve ark., 2014).

Stres yanıtı yollarına karşı; yaşam kalitesinde artış ve  $\beta$ -bloker tedavisi ile kanser progresyonu etkilenebilecektir (Kim-Fuchs ve ark., 2014). Meme kanseri ve progresyonu ile ilişkili olan hücre dışı matriks invazyonu, inflamasyon, kemotaktik sitokinlerin ekspresyonu, anjiyogenez ve tümör bağışıklık yanıtları gibi çoklu hücrelerel süreçlerin  $\beta$ -adrenerjik reseptör sinyal iletimini inhibe ettiği preklinik çalışmalarda gösterilmiştir (Barron, 2012).

Farmakoepidemiyolojik çalışmalarda,  $\beta$ -blokerlere maruz kalma ile meme kanseri progresyonu arasında da ilişki bildirilmiştir. Bu sonuçlardan dolayı  $\beta$ -adrenerjik reseptör yolağı da meme kanserinin hedeflerindendir (Barron, 2012). Kronik stres ve depresyon gibi psikososyal faktörlerin kanser başlangıcı ve progresyonu ile ilişkisi olduğu epidemiyolojik ve klinik çalışmalarla gösterilmiştir (Spiegel ve ark., 2007; Chida ve ark., 2008; Barron, 2012).

Epidemiyolojik çalışmalarda stresli durumlar ile kanser prognozu arasında yakın bir ilişki bulunmasına rağmen stresin kanser başlamasına sebep olduğu ile ilişkili görece az veri bulunmaktadır (Antoni ve ark., 2006; Chida ve ark., 2008).

Stresin olmadığı durumlarda  $\beta$ -adrenerjik agonistlerin *in vivo* olarak tümör progresyonu ve metastazını arttırdığı görülmüştür (Thaker ve ark., 2006; Palm ve ark., 2006; Sloan ve ark., 2010; Kulik ve ark., 2011).

#### **4.6. Beta Adrenerjik Agonist ve Antagonistler**

Kalp fonksiyonlarını modüle eden  $\beta$ -bloker ilaçlar (antagonistler ve invers agonistler)  $\beta_1$  ve  $\beta_2$ -adrenerjik reseptör sinyal iletimini engellemektedirler.  $\beta_2$ -adrenerjik reseptörleri aracılığıyla akciğerde bronşial konstriksiyona sebep olduğundan, yan etkileri daha az olan selektif  $\beta_1$ -adrenerjik reseptör antagonistleri tercih edilmektedir (Black, 1989; Warne ve ark., 2008).

Beta 3 adrenerjik reseptörleri,  $\beta_1$  ve  $\beta_2$ -adrenerjik reseptörlerinin aksine adipoz dokuda bulunmaktadır. Adrenalin ile uyarılan bu adipoz metabolizması, obezite tedavisi için potansiyel bir hedeftir (Cherezov ve ark., 2007; Warne ve ark., 2008).

Farklı  $\beta$ -adrenerjik reseptör alttiplerine karşı farklı afinitesi olan ilaçların bulunmasıyla çok daha az yan etkili ve farklı  $\beta$ -adrenerjik reseptör alttiplerine karşı selektif  $\beta$ -blokerler geliştirilebilecektir (Baker, 2005; Warne ve ark., 2008).

Ligand bağlayıcı cebin yapısı ile  $\beta_2$ -adrenerjik reseptörün yapısı tanımlanmış olup carazolol antagonisti bu yapıların her ikisine de yüksek afinite göstermektedir. Örneğin,  $\beta_1$  ve  $\beta_2$ -adrenerjik reseptörlerinin ligand bağlayan cebini doğrudan saran rezidülerinin görünüşleri benzer olup, yine her iki reseptörün transmembran bölgeleri %67 oranında benzerdir (Baker, 2005; Warne ve ark., 2008).

CGP 20712A gibi büyük antagonistler,  $\beta_2$ -adrenerjik reseptörlere göre  $\beta_1$ -adrenerjik reseptörlerine 500 kez daha güçlü bağlamalarına rağmen; ICI 118551,  $\beta_1$ -adrenerjik reseptörlerine göre,  $\beta_2$ -adrenerjik reseptörlerde 550 kat özgünlük gösterir (Baker, 2005; Warne ve ark., 2008).

Sadece  $\beta_1$  ve  $\beta_2$ -adrenerjik reseptörlerine özgün agonistler de bulunmaktadır (Sugimoto ve ark., 2002). Alttype ait olan özgünlüğün anlaşılması için önce  $\beta_1$ -adrenerjik reseptörlerinin yapısı çalışılmıştır (Baker, 2005; Warne ve ark., 2008). Carazolol ile siyanopindololun yapıları birbirine benzerdir ve her iki ligand tüm  $\beta$ -adrenerjik reseptörlere çok yüksek afinitelidir (Strader ve ark., 1989; Sato ve ark., 1999; Liapakis ve ark., 2000; Rosenbaum ve ark., 2007; Warne ve ark., 2008).

Beta adrenerjik reseptör agonist ve antagonistleri Tablo 7’de özetlenmiştir.

**Tablo 7:**  $\beta$ -adrenerjik reseptör agonist ve antagonistleri.

| $\beta$ -AR Altıtipi        | $\beta_1$ -AR                                                                 | $\beta_2$ -AR                                                           | $\beta_3$ -AR                          |
|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| Farmakolojik Potent Agonist | İzoprenalin > Bucindolol, Noradrenalin                                        | Clenbuterol, Epinefrin $\geq$ İzoprenalin                               | İzoprenalin > Noradrenalin, Bucindolol |
| Selektif Agonist            | Xamoterol                                                                     | Procaterol                                                              | CL316,243                              |
| Selektif Antagonist         | CGPP20712A                                                                    | ICI 118551                                                              | Bupranolol*                            |
| Selektif Antagonistler      | Acetabulol, Betaxolol, Bisoprolol, Celiprolol, Esmolol, Metoprolol, Nevibolol |                                                                         |                                        |
| Nonselektif Antagonistler   | Carteolol, Nadolol, Penbutolol, Pindolol, Propranolol, Sotalol, Timolol       | Carteolol, Nadolol, Penbutolol, Pindolol, Propranolol, Sotalol, Timolol |                                        |

\*Bupranolol:  $\beta_3$ -adrenerjik reseptör için tanımlanmış en iyi antagonisttir fakat  $\beta_3$ -adrenerjik reseptör için selektif değildir.

(Strosberg, 1993; José López-Sendón ve ark., 2004’den değiştirilmiştir).

Beta adrenerjik reseptör antagonistleri olan  $\beta$ -blokerler hipertansiyon, anjina pectoris ve kalp ritim bozukluğu tedavisinde yaygın olarak kullanımının yanında migrenin önleyici tedavisinde, titremenin önlenmesi, anksiyete tedavisinde ve hipertiroidizmin yan etkilerinin engellenmesinde de kullanılmaktadırlar Siroz hastalarındaki portal hipertansiyonun tedavisi içinde yine nonspesifik  $\beta$ -blokerler önerilmektedir.  $\beta$ -blokerler,  $\beta$ -adrenerjik reseptör bölgelerine  $\beta$ -adrenerjik agonistleri ile (adrenalin ve noradrenalin) kompetitif olarak bağlanırlar ([http://livertox.nih.gov/Beta-Adrenergic\\_Blocking\\_Agents.htm](http://livertox.nih.gov/Beta-Adrenergic_Blocking_Agents.htm), Erişim tarihi: 15 Mart 2016).

Beta blokerler kalp kasındaki  $\beta$ 1-adrenerjik reseptörlerini bloke etmesine veya bronş ile düz kaslardaki  $\beta$ 2-adrenerjik reseptörlerde bulunmalarına göre selektif ya da nonselektif olarak sınıflandırılmaktadırlar Siroz ve portal hipertansiyonu olan hastalarda varis kanamasının tekrarlamasını önleyici tedavi olarak nonselektif  $\beta$ -blokerler tercih edilirken, kalp hastalıklarında selektif  $\beta$ 1-blokerleri tercih edilir. Tablo 8 ve 9'da Birleşik Devletler'de kullanım onayı alan ve genel ticari marka isimleri ile yılları birlikte selektif ve nonselektif  $\beta$ -blokerleri gösterilmiştir ([http://livertox.nih.gov/Beta-Adrenergic\\_Blocking\\_Agents.htm](http://livertox.nih.gov/Beta-Adrenergic_Blocking_Agents.htm), Erişim tarihi: 15 Mart 2016).

**Tablo 8:** Nonselektif  $\beta$ 1-blokerler.

|                                       |
|---------------------------------------|
| Propranolol (Inderal, 1967)           |
| Nadolol (CorGard, 1979)               |
| Pindolol (Visken, 1982)               |
| Labetalol (Normodyne, Trandate, 1984) |
| Penbutolol (Levaton, 1987)            |
| Sotalol (Betapace, 1992)              |
| Carvedilol (Coreg, 1995)              |
| Timolol (Biocarden, 1995)             |

([http://livertox.nih.gov/Beta-Adrenergic\\_Blocking\\_Agents.htm](http://livertox.nih.gov/Beta-Adrenergic_Blocking_Agents.htm), Erişim tarihi: 15 Mart 2016).

**Tablo 9:** Selektif  $\beta$ 1-blokerler.

|                                      |
|--------------------------------------|
| Metoprolol (Lopressor, Toprol, 1978) |
| Atenolol (Temormin, 1981)            |
| Acebutolol (Sectral, 1984)           |
| Betaxolol (Kerlone, 1985)            |
| Esmolol (Brevibloc, 1986)            |
| Bisoprolol (Zebeta, 1992)            |
| Nebivolol (Bystolic, 2008)           |

([http://livertox.nih.gov/Beta-Adrenergic\\_Blocking\\_Agents.htm](http://livertox.nih.gov/Beta-Adrenergic_Blocking_Agents.htm), Erişim tarihi: 15 Mart 2016).

Beta blokerler tedaviye verilen yanıt bakımından tıpta en sık kullanılan ilaçlardır. Bradikardi, yorgunluk, baş dönmesi, depresyon, hafıza kaybı, uykusuzluk, impotens,

kollarda üşüme ve şiddetli hipotansiyon, kalp yetmezliği ile akut bronkospazm ise daha nadir olarak görülen  $\beta$ -adrenerjik blokajın etkileridir.

Serumda asgari oranda aminotransferaz artışı ve klinik olarak nadir olsa da karaciğer hasarı  $\beta$ -blokerler ile ilişkilidir. Bazı vakalarda karaciğerdeki hepatotoksitesinin  $\beta$ -bloker kaynaklı olabileceği ve hasar başlangıç karakteristiğinin ise 2 ile 24 hafta arasında serum enzimlerinin hepatoselüler yükselişi şeklinde sürdüğü belirlenmiştir. Ölümcül vakalar bildirilmiş olmasına rağmen, çoğu genellikle hafif ve kendi kendini kısıtlayan vakalardır ([http://livertox.nih.gov/Beta-Adrenergic\\_Blocking\\_Agents.htm](http://livertox.nih.gov/Beta-Adrenergic_Blocking_Agents.htm), Erişim tarihi: 15 Mart 2016).

Yaygın olarak kullanılan  $\beta$ -adrenerjik reseptör antagonistlerinin ( $\beta$ -bloker) ISA, lipit çözünübilirliği, periferel vazodilatasyon ve intravenöz (İV) uygulaması ve ortalama günlük oral dozajına ilişkin sınıflandırılmasının özeti Tablo 10'da verilmiştir.

**Tablo 10:** Yaygın kullanımı olan  $\beta$ -adrenerjik reseptör antagonistlerinin ( $\beta$ -bloker) sınıflandırılması.

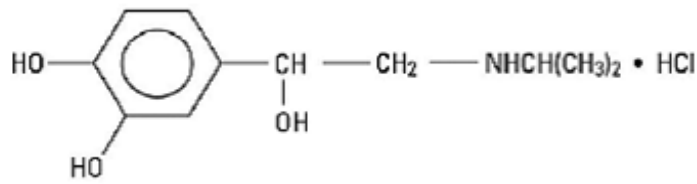
| $\beta$ -bloker                                                                | ISA | Lipit<br>çözünübilirliği | Periferel<br>Vazodilatasyon | i.v. | Ortalama Günlük Oral Doz     |
|--------------------------------------------------------------------------------|-----|--------------------------|-----------------------------|------|------------------------------|
| <b>Non selektif (<math>\beta_1 + \beta_2</math>) adrenerjik antagonistleri</b> |     |                          |                             |      |                              |
| Carteolol                                                                      | +   | Düşük                    |                             |      | 2,5-20 mg günde bir-iki kez  |
| Nadolol                                                                        | 0   | Düşük                    |                             |      | 40-320 mg günde bir kez      |
| Penbutolol                                                                     | +   | Orta                     |                             |      | 20-80 mg günde bir-iki kez   |
| Pindolol                                                                       | ++  | Yüksek                   |                             |      | 10-40 mg günde iki kez       |
| Propranolol                                                                    | 0   | Yüksek                   |                             | +    | 40-180 mg günde iki kez      |
| Sotalol                                                                        | 0   | Düşük                    |                             | +    | 5-40 mg günde iki kez        |
| Timolol                                                                        | 0   | Yüksek                   |                             |      |                              |
| <b>Selektif <math>\beta_1</math>-adrenerjik antagonistleri</b>                 |     |                          |                             |      |                              |
| Acebutolol                                                                     | +   | Orta                     |                             |      | 200-800 mg günde bir-iki kez |
| Betaxolol                                                                      | 0   | Düşük                    |                             | +    | 5-20 mg günde bir kez        |
| Bisoprolol                                                                     | 0   | Orta                     |                             |      | 2,5-10 mg günde bir kez      |
| Celiprolol                                                                     | +   | Orta                     | +                           |      | 200-600 mg günde bir kez     |
| Esmolol                                                                        | 0   | Düşük                    |                             | +    | Sadece i.v                   |
| Metoprolol                                                                     | 0   | Yüksek                   |                             | +    | 50-100 mg günde bir-iki kez  |
| Nevibolol                                                                      | 0   |                          | +                           |      |                              |
| <b><math>\alpha_1</math>- ve <math>\beta</math>-adrenerjik antagonistleri</b>  |     |                          |                             |      |                              |
| Bucindolol                                                                     | +   | Orta                     | +                           |      | 25-100 mg günde iki kez      |
| Carvedilol                                                                     | 0   | Orta                     | +                           |      | 3,125-50 mg günde iki kez    |
| Labetalol                                                                      | +   | Düşük                    | +                           |      | 200-800 mg günde iki kez     |

(José López-Sendón ve ark., 2004).



#### 4.6.1. İzoprenalin

Yapısal olarak adrenalın ile ilişkili sempatomimetik bir amin olan fakat sadece  $\beta$ -adrenerjik reseptörleri ile etkileşen izoprenalin; 3,4-dihidroksi- $\alpha$ -[(isopropilamino) metil] bir benzil alkol hidroklorittir. İzoprenalinin moleküler formülü ise  $C_{11}H_{17}NO_3 \cdot HCl$  ve moleküler ağırlığı 247,72 olup, yapısal formülü Şekil 11’de gösterilmiştir.



Şekil 11: İzoprenalinin formülasyonu.

(<http://www.rxlist.com/isuprel-drug/clinical-pharmacology.htm>, Erişim tarihi: 24 Şubat 2016).

Hayvanlarda izoprenalinin akut toksisitesi, adrenalinden daha azdır. İnsan veya hayvanlardaki aşırı dozları kan basıncını düşürebilir ve yüksek dozlarda hayvanlara tekrar verilmesi ise kardiyak genişlemeye, fokal miyokarditeye neden olabilir. Kazara yüksek doz verildiği takdirde temel olarak taşikardi veya diğer ritim bozuklukları, çarpıntılar, anjina, hipotansiyon veya hipertansiyon etkileri belirtilmiş olup, hastanın durumu stabil olana kadar izoprenalin enjeksiyonunun durdurulması veya azaltılarak uygulanmasına devam edilir (<http://www.rxlist.com/isuprel-drug/overdosage-contraindications.htm>, Erişim tarihi: 24 Şubat 2016).

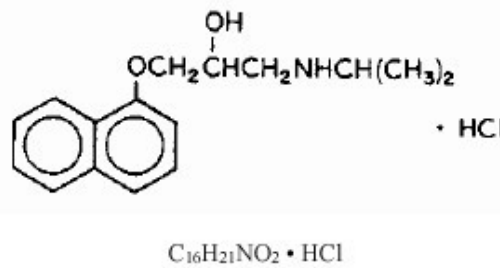
İzoprenalin, alfa adrenerjik reseptörlerine çok düşük afiniteli selektif olmayan bir beta adrenerjik agonisttir. İnsanlarda birincil olarak iskelet kası olmak üzere, renal ve mezenterik vasküler yataklarda (akciğer kan damarları) dahi izoprenalinin intravenöz infüzyonu periferik vasküler dirence sebep olur. Diastolik basıncı düşürür ve normotensif bireylerde renal kan akışı azalmaktadır fakat şok da belirgin olarak artmaktadır. Sistolik kan basıncı değişmeden kalırken yada yükselmesine rağmen arteriyel kan basıncı ise sıklıkla düşmektedir. İlacın pozitif inotropik ve kronotropik etkilerinin periferik vasküler direnci azaltması ile karşı karşıya gelindiğinden dolayı

kardiyak çıktılar da artmaktadır. Kalp çarpıntısı, sinüs taşikardisi ve pek çok ciddi ritim bozukluğu gibi kardiyak etkilerin arasında hayvanlarda da yüksek doz izoprenalin miyokardiyal nekroza sebep olabilmektedir. İzoprenalin, neredeyse kasılı durumdaki tüm düz kas çeşitlerini gevşetebilir. Ancak bu durum genellikle bronşial ve gastrointestinal düz kaslar için daha fazladır. İzoprenalin, insanlarda adrenalinden daha az hiperglisemiye sebep olur. Serbest yağ asitlerinin uyarılıp salınması ve enerji üretimi bakımından izoprenalin ve adrenalinin her ikisi de denktir. İzoprenalin, katekol-o-metil transferaz (COMT) enzimi tarafından karaciğer ve diğer dokularda metabolize edilir (<http://www.rxlist.com/isuprel-drug/clinical-pharmacology.htm>, Erişim tarihi: 24 Şubat 2016).

İzoprenalin,  $\beta$ -adrenerjik reseptörleri ile etkileşerek, adenilat siklazı aktive eder ve cAMP seviyesinde artışa sebep olarak, PKA'yı aktive eder (Tseng, 1988; Davey, 2001; Shen ve ark., 2004; Diaz ve ark., 2004; Pak ve ark., 2004; Goldhaber ve ark., 2005; Brembilla-Perrot ve ark., 2005; Shen, 2006; Sato ve ark., 2006; Weiss ve ark., 2006; Tusscher ve ark., 2006; Keldermann ve ark., 2008; Lu ve ark., 2011; Takano ve ark., 2012).

#### 4.6.2. Propranolol

Propranolol hidroklorit kimyasal olarak 1-[(1-metiletil)amino]-3-(1-naftalenoksi)-, hidroklorit,( $\pm$ ) olarak tanımlanmış sentetik bir  $\beta$ -adrenerjik reseptör blokeridir. Moleküler ve yapısal formülü Şekil 12'de gösterilmiştir.



**Şekil 12:** Propranololün formülasyonu.

Propranolol, 295,80 moleküler ağırlığa sahip kararlı, beyaz ve sert kristallin yapıda bulunmaktadır ve etanolde çözünabilmektedir (<http://www.rxlist.com/inderal-drug.htm>, Erişim tarihi: 29 Şubat 2016).

Propranolol ilacı, hipertansiyonu kontrol etmek için kullanılan  $\beta$ -adrenerjik reseptör blokeridir. Yan etkileri olarak mide bulantısı, kusma, ishal, kabızlık, mide krampları, döküntü, yorgunluk, baş dönmesi, uyku problemleri veya olağan dışı rüyalar, görüş değişimleri ile impotens benzeri rahatsızlıklar görülebilir. Birçok farklı ilaç ile etkileşen propranololün diğer kalp ilaçları ile beraber kullanımı kardiyomiyopati, konjestiv kalp yetmezliği veya kalp krizine neden olabilmektedir. Propranololün yavaş ve düzensiz kalp atışı, hipotansiyon, göğüs ağrısı, nefes darlığı, kanama, el ve ayaklarda şişme, bronkospazm ve glokom gibi şiddetli yan etkileri de bulunabilir. Propranolol kullanan yeni doğan bebek annelerinin doğum sırasında bradikardi, hipoglisemi veya solunum depresyonuna girebildiği de görülmüştür (<http://www.rxlist.com/inderal-side-effects-drug-center.htm>, Erişim tarihi: 29 Şubat 2016).

Kalbin aksiyon potansiyelini etkileyen, kinidin veya anestezi benzeri zar etkileşimi gösteren propranololün  $\beta$ -blokağı için yüksek dozları gerekmektedir.  $\beta$ 2-adrenerjik reseptör yolları aracılığıyla propranololün tedavi edici etkilerinin fazla olduğu bildirilmiştir (Tang ve ark., 2013; Melhem-Bertrandt ve ark., 2011).

Nonselektif  $\beta$ -adrenerjik reseptör antagonisti propranolol, tümör büyümesinde kronik stresin negatif etkilerini tamamen bozmaktadır (Sood ve ark., 2010; Tang ve ark., 2013). Melhem-Bertrandt ve arkadaşları tüm meme kanseri ve üçlü meme kanseri (östrojen reseptörü-negatif/progesterone reseptörü-negatif/insan epidermal büyüme faktörü-negatif) hastalarının yaşam sürelerini  $\beta$ -blokerlerin arttırdığını tespit etmişlerdir (Melhem-Bertrandt ve ark., 2011; De Giorgi ve ark., 2011; Lemeshow ve ark., 2011; Tang ve ark., 2013). İki farklı grupta yapılan çalışmada  $\beta$ -blokerlerin melanoma hastalarının yaşam sürelerini arttırdığı ve kalın melanoma gelişim riskini azalttığı gösterilmiştir (De Giorgi ve ark., 2011; Lemeshow ve ark., 2011).

Sir James Black 1964 yılında karsinojenik etkisi olmayan ilk  $\beta$ -bloker propranololün tanıtımını ve ilk klinik kullanımını anjina pectoris tedavisinde denemiştir (Bundan dolayı 1988 yılında Nobel Ödülü alan Dr. Black, 2000 yılında da İngiltere Kraliçe'si tarafından şövalye ilan edilmiştir) (Akbar ve Alsharidah, 2014).

Beta blokerlerin tüm kanserler üzerine baskılayıcı etkisi olduğu gösterilmiştir (Perez-Sayans ve ark., 2010).  $\beta$ -adrenerjik sinyal yollarının hücre çoğalması, farklılaşması ile hücre göçünde çok önemli rolleri saptanmıştır (Herlenius ve Lagercrantz, 2001; Kim ve ark., 2008). Nikotinik asetilkolin reseptörleri ( $\alpha 7nAChR$ ) ile adrenalin ve noradrenalinin her ikisinde sentez ve salınımları düzenlenir (Schuller, 2009). Adrenalin, hücre içi cAMP artışı aracılığıyla *in vitro* akciğer adenokarsinom hücrelerinin çoğalmasını sağlar (Park ve ark., 1995).  $\beta$ -blokerlerin vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), matriks metalloproteinazlar (MMP2 ve 9) ve interlökinlerin (IL-6, IL-8) üretilmesini azaltarak tümör büyümesi ve metastazı inhibe ettiği birçok *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda gösterilmiştir (Sood ve ark., 2006; Yang ve ark., 2006; Yang ve ark., 2009; Quoc Lu'o'ng ve Nguyen, 2012). Selektif  $\beta 1$ -adrenerjik reseptör blokleri olan atenolol ile selektif  $\beta 2$ -adrenerjik reseptör blokleri ICI 118,551 tarafından bu çoğaltıcı etki inhibe olmuştur (Wong ve ark., 2011). Prostat kanseri hücre tiplerinde baskın olan  $\beta 2$ -adrenerjik reseptörlere selektif olmayan  $\beta$ -blokerlerden CGP 12177 ve propranololün bu cAMP aktivitesini 80-96% oranında engellediği belirtilmiştir (Nagmani ve ark., 2003).

Noradrenalin ile indüklenen  $\beta 2$ -adrenerjik reseptör ekspresyonunu propranolol engellemektedir (Shang ve ark., 2009). Fare prostat kanseri modelinde, noradrenalin ile artan insan prostat karsinom hücrelerinin metastazı propranolol tarafından inhibe edilmektedir (Palm ve ark., 2006). Oral skuamöz hücre karsinomundaki  $\beta 2$ -adrenerjik reseptörleri ekspresyonunun; servikal lenf nodları metastazı, tümör boyutu ve tümörlerin klinik aşaması ile anlamlı korelasyonu vardır.

Pasquier ve arkadaşları 2011 yılında bir çok insan kanser tipi ve normal hücre soylarında, propranololün doza bağımlı çoğalma ve anjiyogenezi önleyici etkileri olduğunu bildirmişlerdir (Plummer ve ark., 2004; Pasquier ve ark., 2013; Akbar ve Alsharidah, 2014).

Pérez Piñero ve arkadaşları 2012 yılında  $\beta$ -adrenerjik reseptörlerin selektif olmayan agonisti izoprenalin ve selektif agonist salbutamol ile  $\beta$ -adrenerjik reseptör aktivasyonunun meme kanseri hücrelerinin çoğalmasını azalttığını ve bu agonistlerin inhibe edici etkilerinin  $\beta$ -adrenerjik reseptör antagonisti propranolol ile geri çevrildiğini rapor etmişlerdir (Pérez Piñero ve ark., 2012; Akbar ve Alsharidah, 2014).

Son zamanlarda, katekolaminlerin dendritik hücre (Maestroni, 2000) ve nötrofil granülosit hareketiyle ilişkisi tanımlanmıştır (Elferink ve ark., 1996).

Nonselektif bir  $\beta$ -bloker olan propranolol genellikle çocuklarda kalp ritm bozukluğu, hipertansiyon, konjestiv kalp yetmezliği, Fallot tetralojisi, tirotoksikoz, ve migren baş ağrıları tedavi etmek için kullanılır (Love ve Sikka, 2004). 2008 yılında Labreze ve arkadaşlarının tanımlamış olduğu propranolol tedavisi uygulanması sonucunda hipertrofik miyokardiyopati ve nazal çocuk hemanjiyomu bulunan bir bebekte hemanjiyomun hızlıca gerileyip, engellendiği tespit edilmiştir (Léauté-Labrèze ve ark., 2008). Erken çocukluk dönemi hemanjiyomlarının tedavisinde oral  $\beta$ -bloker propranololün etkili olduğu bildirilmiştir. Propranolol hipoglisemi, hipotansiyon, diyare, reflü, soğuk el ve ayak, bronkospazm gibi tanımlanmış birkaç küçük yan etkisi haricinde güvenilir bir ilaçtır. Genel olarak bakıldığında bu yan etkiler önemli değildir. Kalp, pankreas, karaciğer, çevresel kan damarları ve bronş gibi organlardaki reseptörlerin  $\beta$ -adrenerjik reseptör yolları  $\beta$ -bloker antagonizması ile engellenir. Oksiprenolol, pindolol, acebutolol, celiprolol gibi bazı intrinsik semptomimetik ilaçların, adrenerjik reseptörleri hem uyarma hem engelleme gibi etkileri vardır. Dolayısıyla, kollar ile bacaklarda üşüme ve bradikardi gibi düşük risk etkileri olduğu tanımlanmıştır.  $\beta$ -blokerler, kardiyoselektif yada nonkardiyoselektif, lipofilik veya hidrofilik olarak gruplanırlar. Ağız yoluyla aç karnına alınan propranolol ise maksimum plazma konsantrasyonuna 1 veya 2 saat sonra ulaşarak tamamen absorbe olur. Nadolol ve acebutolol gibi diğer birkaç grup  $\beta$ -blokerde hemanjiyomlarda propranolole benzer etkiler göstermiştir (Sánchez-Carpintero ve ark., 2011).

#### 4.7. K562 Kronik Miyeloid Lösemi Hücreleri

Kronik miyeloid lösemi, pluripotent bir kök hücre hastalığıdır (Rowley, 1973). 1975'te Lozzio ve Lozzio'nun (Lozzio ve Lozzio, 1975) yetişkin kronik miyeloid lösemi hastasından izole edilen K562 kronik miyeloid lösemi hücre soyu, eritroid hücre soyunun fenotipik markırlarını eksprese etmektedir. Aynı zamanda hem indüklenmiş hemde spontan globin sentezini de göstermektedir (Koeffler ve Golde, 1980).

Lozzio ve arkadaşları tarafından 1975 yılında blastik kriz evresine girmiş bir kronik miyeloid lösemi hastasının plevra sıvısından alınarak hazırlanan K562 kronik miyeloid lösemi hücre soyu günümüzde model hücre soyu olarak geliştirilip, yaygın şekilde ticari üretimi yapılmaktadır (Lozzio ve Lozzio 1975).

Terminal blast krizi evresindeki bir kronik miyeloid lösemi hastasından elde edilen insan K562 kronik miyeloid lösemi hücre soyunun eritroid özellikte olduğu Andersson ve arkadaşları tarafından da gösterilmiştir (Andersson ve ark., 1979; Andersson ve ark., 1979).

Kronik miyeloid lösemi hücre soyu olan K562 hücrelerinin hemoglobin sentezleyen hücrelere farklılaşma potansiyeli olan bir model olduğu da gösterilmiştir (Rutherford ve ark., 1981). Kronik miyeloid lösemi hücreleri olan K562'ler normal olgunlaşma sırasında granülositik, megakaryositik ve eritroid hücrelere de farklılaşmaktadır (Lozzio ve Lozzio, 1975; Green ve ark., 1993).

Model sistem olarak kullanılan K562 hücreleri; miyeloid lösemi, normal miyeloid gelişimi, farklılaşmanın kontrolü ve gen ekspresyonu çalışmalarında da kullanılmaktadır (Koeffler ve Golde, 1980). K562 kronik miyeloid lösemi hücre soyunun özellikleri Tablo 11'de özetlenmiştir.

**Tablo 11:** K562 kronik miyeloid lösemi hücre soyunun özellikleri

| <b>K562 Kronik Miyeloid Lösemi Hücresi</b> |                                                 |
|--------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Hücre kaynağı                              | Blast krizindeki kronik miyeloid lösemi hücresi |
| Morfoloji ve Histokimyası                  | Farklılaşmamış blast hücresi                    |
| Kopyalanma süresi                          | 12 saat                                         |
| Kromozom numarası                          | Modal 70 (Ph* kromozomu)                        |
| Lenfosit markeri                           | Yok                                             |
| CSF sorumluluğu                            | Yok                                             |
| Farklılaşmanın indüklenmesi                | Eritroid                                        |

\*APL, akut promiyelositik lösemi, Filadelfiya kromozomu  
(Koeffler ve Golde, 1980)

K562 kronik miyeloid lösemi hücreleri, demir klorür tuzu hem olan hemin uygulanması ile eritroid soyuna farklılaşmaktadır (Andersson ve ark., 1979; Lozzio ve Lozzio., 1975).

Kronik miyeloid löseminin blastik kriz evresinde standart kanser kemoterapisine karşı dirençlidir (Fialkow ve Singer., 1989). Bu hücreler eritroid farklılaşma ve eritroid farklılaştırıcı ajanların moleküler mekanizmalarının aktivitesi için *in vitro* model olarak kullanılmaktadır. Hemin (Fibach, 1995), antrasiklinler (Morceau ve ark., 1996; Aries ve ark., 1996; Morceau ve ark., 1996), fenilasetatlar (Samid ve ark., 1992), 5-azasitidin ribonükleozit (del Senno ve ark., 1984) ve bütirik asit (Chenais ve ark., 1997; Xu ve Zimmer, 1998) gibi ajanlar fetal globin gen ifadesinin arttırarak K562 kronik miyeloid lösemi hücrelerini farklılaştırmaktadır (Morceau ve ark., 2000).

Eritroid fenotipli insan K562 kronik miyeloid lösemi hücreleri, guanin, guanozin ve guanin nükleotidlerinin toksik olmayan konsantrasyonları ile verimli bir şekilde ekspresyonu indüklenebilmektedir (Osti ve ark., 1997).

Lösemi hücrelerinin farklılaşma sürecinde birçok indükleyici ilişkili transkripsiyonel mekanizmalar aracılığıyla gen ekspresyonu da düzenlenmektedir. Antrasiklin, aklarubisin ajanlarının K562 kronik miyeloid lösemi hücrelerindeki globin geni transkripsiyonunu arttırdığı bildirilmiştir (Morceau ve ark., 1996; Aries ve ark., 1996; Morceau ve ark., 1996; Morceau ve ark., 2000).

Kronik miyeloid lösemi hücreleri olan K562’lerde hemin ile (Charnay ve Maniatis., 1983), murine eritrolösemi hücrelerinde (MEL) ise heksametilen bisasetamit ve bütirat (Profous-Juchelka ve ark., 1983) ile benzer sonuçlar alınmıştır (Morceau ve ark., 2000).

Büyüme ve farklılaşma sinyallerinin her ikisinin koordinasyonu, hücreye spesifik gen ifadesinin kontrolündeki pluripotent hücrelerin fenotipik değişimler kazanmasıyla erişkin kan hücrelerinin oluşumu sağlanır (Metcalf, 1989).

Büyük oranda artan hücre gruplarının çoğalma ve farklılaşma süreci tamamen bir hiyerarşi sistemi şeklinde gerçekleşmektedir. Başlangıçta hematopoetik kök hücreler olan, sonrasında ise progenitor hücrelere gelişen hücreler, en son durumda ise olgun hücrelere dönüştükleri gözlenmektedir (Metcalf, 1989).

Kronik miyeloid lösemi hücresi K562, insan eritrolösemi hücre soyu (HEL) ve MEG-01 hücreleri (Filadelfiya kromozomu pozitif hücreli megakaryoblastik hücre soyu) de dahil olmak üzere birçok hücre soyunda megakaryositik ve eritroid farklılaşmanın olduğu gösterilmiştir (Murate ve ark., 1993; Alitalo, 1990; Murate ve ark., 1991; Long ve ark., 1990; Shelly ve ark., 1998).

Hemin, PMA veya bütirik asit uygulanması ile bu hücre soylarının farklılaşması modüle edilebilmektedir (Long ve ark., 1990). PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate) ile K562 kronik miyeloid lösemi hücrelerinin megakaryositik farklılaşması kemik iliğindeki fizyolojik süreçlerde çeşitli uyarımlara verilen yanıtlarıda kısmen taklit eder (Long ve ark., 1990).

Megakaryositik hücrelerin farklılaşma süreci; hücre büyümesinin durdurulması, endomitoz ve hücre ile ilişkili markırların eksprese olması şeklinde hücrenin morfolojisi ve adheziv özellikleri ile karakterize olmaktadır (Fukuda,1981; Tetters ve ark., 1984; Colamonici ve ark., 1986; Long ve ark.,1990; Butler ve ark., 1990; Hocevar ve ark., 1992; Shelly ve ark., 1998). K562 kronik miyeloid lösemi hücrelerinin eritroid farklılaşmasının daha az karakterize olduğu tespit edilmiştir. Normal eritroid soya göre K562 kronik miyeloid lösemi hücrelerinin *in vitro* olarak eritroid farklılaştırılması çeşitli ajanlar veya manipülasyonlar ile de yapılabilmektedir (Rowley ve ark., 1981).



#### 4.7.1. Eritroid farklılaşma

Kırmızı kan hücreleri tüm omurgalı canlılarda oksijen taşıma gibi çok önemli bir görevi üstlenirler. Embriyonik, fetal, neonatal, adolesan ve yetişkinlik de dahil yaşamın çok önemli tüm dönemlerinde gerekli olan hücrelerdir. Yetişkinlerdeki kırmızı kan hücrelerinin hematopoetik progenitorları eritroid soyun son farklılaşmalarını da geçirerek hiyerarşik sıralamalarındaki formunu alırlar. Organizmanın günlük ihtiyacını karşılayabilmek için yaklaşık olarak  $2 \times 10^{11}$  adet yeni eritrosit üretilebilmesi gerekir. Bunun için eritroid farklılaşma esnasında eritroid progenitorları artarlar. Hemoglobini üreten kırmızı kan hücrelerinde tanımlanan bu gelişimsel ve farklılaşma olayları oldukça önemlidir (Dzierzak ve Philipsen, 2013).

Kırmızı kan hücrelerinin mikroskopik olarak keşfi ile eritroid soyun hiyerarşik tanımlanmasının da yolu açılmıştır. Geçici bir embriyonik doku olan yolk kesesinde, erken evre eritroid soy hücreleri oluşturulmaktadır. Eritroid hücreleri, çekirdekli ve kısa ömürlüdür. Eritroid hücreler, mezodermal hücrelerden köken almaktadır (Lawson ve ark., 1991; Kinder ve ark., 1999).

Yeni oluşan mezodermal hücreler, sonrasında yolk kesesine göç edip içerisine girerek endoderm hücreleri ile yakın ilişki kurarlar. Eritropoezin başlaması için bu iki hücre katmanının etkileşimi gereklidir (Belaousoff ve ark., 1998). Kan adacıklarından yolk kesesine göç eden mezodermal hücreler sadece kırmızı kan hücreleri değil endotel hücrelerini de beraberinde taşımaktadır. Eritroid ve endotel hücrelere farklılaşma potansiyeline sahip ortak bir mezodermal öncü olan hemanjioblasttan köken alan soyların ontojenik görünimleri örtüşmektedir (Sabin 1920; Murray 1932).

Kemik iliğinden üretilen nadir bir hematopoetik kök hücre kohortunun üretimi yetişkin yaşamı boyunca sürer. Yetişkin kırmızı kan hücreleri, lenfositler, makrofajlar, granülositler, megakaryositler ve hematopoetik kök hücreler gibi diğer birçok fonksiyonu olan belirli tipteki farklılaştırılmış kan hücresi soylarını üretmek, yoğun, hücresel farklılaşma ve çoğalma için uzun süreçler geçirirler (Muller ve ark. 1994; Medvinsky ve Dzierzak 1996).

Eritropoezin insanlarda sabit bir durum olarak kemik iliğinde olduğu düşünülür, farelerde ise önemli bir eritropoetik organ olan dalakta hayat boyunca devam eder. Örneğin, düşük oksijen veya anemi gibi eritroid stres koşulları altında, hem insan hemde farenin dalağında oluşan bu acil eritropoetik kapasiteyi karşılamaktadır (Socolovsky 2007).

Fetal globin ekspresyonu yetişkin eritropoezinde sessizleşmektedir. Tüm yetişkin eritrositlerinin hemoglobinin %97'si  $\alpha$  ve  $\beta$ -globin ( $\alpha_2\beta_2$ , HbA1) içeren hemoglobin tetramerlerinden oluşur. Yetişkinlerin birçoğunun toplam hemoglobinin %2'sini HbA2 ( $\alpha_2\delta_2$ ) ve %1'ini ise HbF oluşturur (Papayannopoulou ve ark. 1977).

Yetişkin kanındaki en yaygın hücreler eritrositlerdir. 120 günlük ömrü olan eritrositler, insan kanında mikrolitre başına yaklaşık  $5 \times 10^6$ 'dır. Erkeklerde  $4.7 \times 10^6$  -  $6.1 \times 10^6$  kadınlarda ise  $4.2 \times 10^6$  -  $5.4 \times 10^6$  hücre bulunmaktadır (Wu ve ark. 1995; Bunn, 2013; Dzierzak ve Philipsen, 2013).

AML (Akut miyeloid lösemi) hücrelerinin *in vitro* çalışmalarında, çalışma süresi sadece bu hücrelerin hayatta kalabildiği süre ile kısıtlıdır. Granülosit soyunun erken farklılaşma evresini ifade eden K562 kronik miyeloid lösemi hücre soyu insan natural killer hücre tayini yapmak amacıyla hassas hedef hücre olarak da kullanılmaktadır (Andersson ve ark., 1979). Hematopoetik kök hücrelerin bazılarında tüm hematopoetik kök hücre soylarına olgunlaşmış kendi kendini yenileyebilme ve üretebilme yeteneğine sahip yeni soylar oluşumu sürecine hematopoez denilmektedir (Abdelhay ve ark., 2012).

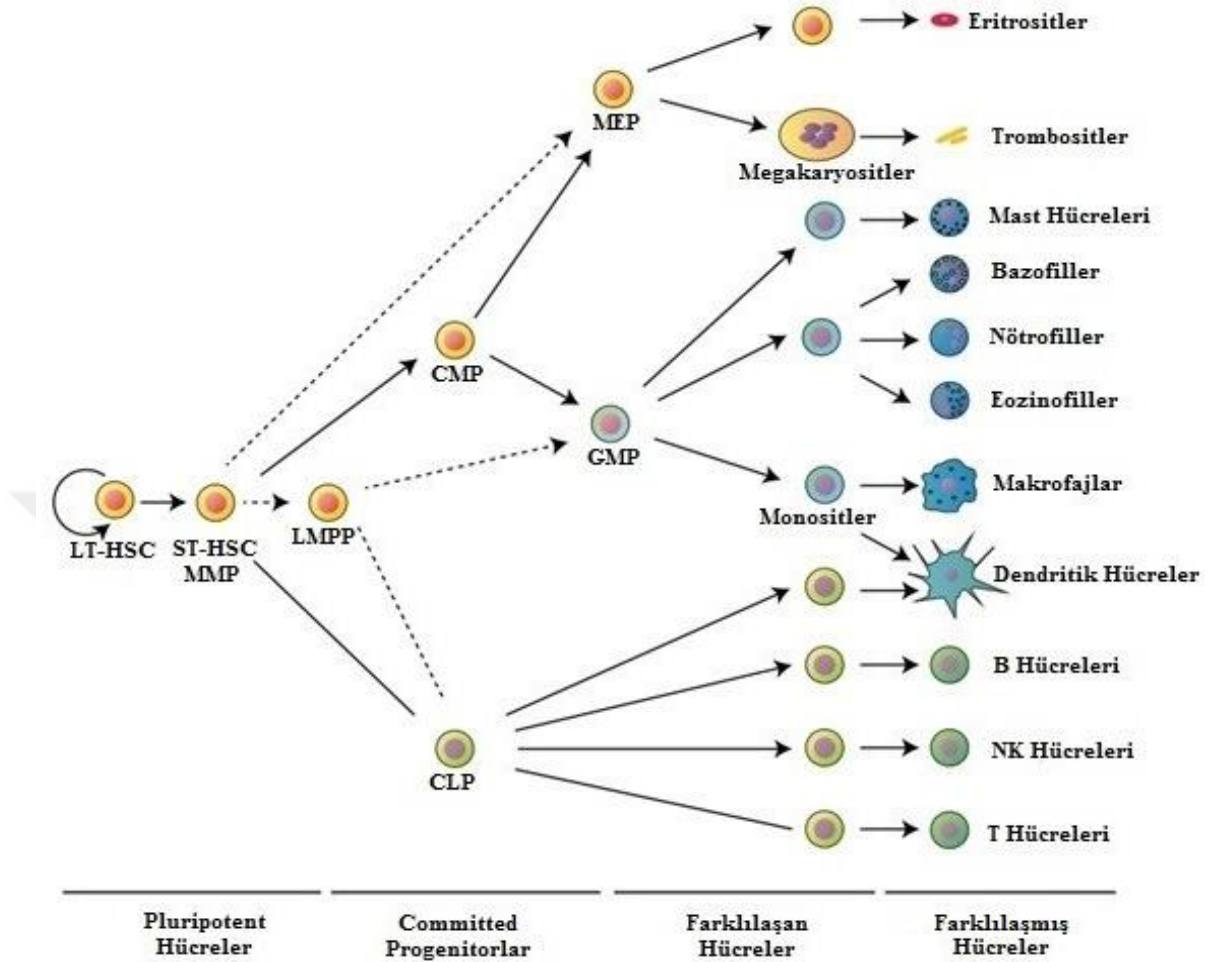
Hematopoetik kök hücrelerin kök hücreye dayalı tedavilerde ilgi çekici bir kaynak olmasını sağlayan iki adet özelliğinden biri kendini yenilemesi iken, diğeri ise çoklu hücre soyuna farklılaşma yeteneğidir. Hematolojik, bağışıklık ve genetik hastalıklar ile çok geniş bir spektrumdaki rahatsızlıkların tedavileri de dahil olmak üzere spesifik bir soyun genişletilmiş progenitörlarının *ex vivo* olarak hematopoetik kök hücre transplantasyonu ve infüzyonu şeklinde uygulanması prosedürü hayat kurtarıcı olacaktır (Hino ve ark., 2000; Lippi ve ark., 2011; Siddiqui ve ark., 2011; Walasek ve ark., 2012;).

Bu nedenle hematopoetik progenitorlar ve farklılaştırılmış alt populasyonları üzerinde yeni stratejiler geliştirilmesi aktif araştırma alanlarıdır. Eritroid hücre ve bu hücrenin olgunlaşma evresi önceki spesifik hematopoetik soya aittir. Bu bakımdan transkripsiyon faktörleri, epigenetik düzenleyiciler ve hücre döngüsü düzenleyicileri gibi hematopoetik kök hücrelerin kaderini belirleyen çoklu proteinler tanımlanmıştır (Walaseket ve ark., 2012; Kubota ve Kimura, 2012).

Miyeloid hücre soyları, miyeloid hücre farklılaşması çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak, bu farklılaşan hücreler onların normal myeloid hücrelerinden son derece farklı anormal karyotip ve fonksiyonel değişikliklere sahiptir (Choi ve ark., 2009). Eritroid farklılaştıklarında, eritrositlerin spesifik belirteci olan hemoglobin sentezi yapmaktadırlar (Samet ve ark., 2015). Günden güne sayıları sürekli olarak artan transkripsiyon faktörlerinin eritroid farklılaşmada çok önemli rolleri vardır. GATA1 (Palis, 1999; Katsumura ve ark., 2013; Moriguchi ve Yamamoto, 2014) ve KLF1 transkripsiyon faktörlerinin (Palis, 1999; Yien ve Bieker, 2013; Tallack ve Perkins, 2013) eritroistlerin yaşamsallığı ve farklılaşmasında rolleri tespit edilmiştir (Wang ve ark., 2015). Hemine yanıt veren K562 kronik miyeloid lösemi hücrelerinin eritroid farklılaşmada sabit bir yol izlediği ve embriyonik hemoglobini sentezlediği fakat erişkin globin sentezinin ise baskılandığı görülmüştür (Presley ve ark., 1980; Rutherford ve ark., 1981). Bununla birlikte *in vitro* olarak hemoglobin indükleyicilerinin uygulanması farklı hücre soylarının hemoglobin üretimini sağlanmaktadır (Rutherford ve ark., 1981).

Kronik miyeloid lösemi hücre soyu olan K562'ler normal hücresel büyüme koşullarında düşük oranda hemoglobin sentezleyen hücrelerdir, ancak hemin (Rutherford ve ark., 1979; Gambari ve ark., 1983), sitozin arabinozid (Bianchi ve ark., 1986), bütirik asit ve 5-azasitidin (Gambari ve ark., 1984) gibi bileşikler ile bu hücreler eritroid farklılaşmaya indüklenebilmektedir (Osti ve ark., 1997).

Hematopoetik farklılaşma hiyerarşisi Şekil 13’de gösterilmiştir.



**Şekil 13:** Hematopoetik farklılaşma.  
(Dzierzak ve Philipsen, 2013)

Farklılaşma süreci ile ilişkili sinyal ileti yolları halen açıklanılmaya çalışılmaktadır. K562 kronik miyeloid lösemi hücre soyları da dahil olmak üzere çok çeşitli malignant hücrelerin farklılaşma ve çoğalma süreçleri üzerinde araştırmalar sürmektedir (Hocevar ve ark., 1992; Murray ve ark., 1993; Zauli, ve ark., 1996).

## 5. GEREÇ VE YÖNTEM

### 5.1. Kimyasal Maddeler

|                                      |                       |
|--------------------------------------|-----------------------|
| Akrilamit                            | Sigma-Aldrich         |
| Alfa-Globülin                        | Santa Cruz            |
| Amonyum persülfat                    | Sigma-Aldrich         |
| Anti-Tavşan Immunoglobulin G         | Sigma-Aldrich         |
| Aprotinin                            | Sigma-Aldrich         |
| Asetik Asit                          | Merck                 |
| Benzidin                             | Sigma-Aldrich         |
| Beta aktin                           | Santa Cruz            |
| Birincil antikor                     | Santa Cruz            |
| Bis-akrilamit                        | Sigma-Aldrich         |
| Bromfenol mavisi                     | Merck                 |
| Bromo kloroindol fosfat (BCIP)       | Promega               |
| $\beta$ 1-AR (V-19)                  | Santa Cruz            |
| $\beta$ 2-AR (H-20)                  | Santa Cruz            |
| $\beta$ -Merkaptoetanol              | Sigma-Aldrich         |
| Coomassie parlak mavisi R250         | Sigma-Aldrich         |
| Etanol                               | Merck                 |
| Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) | Sigma-Aldrich         |
| Fenilmetilsülfonil florür (PMSF)     | Sigma-Aldrich         |
| Fetal sığır serumu (FBS)             | Biological Industries |
| Glasiyal asetik asit                 | Merck                 |
| Glikoforin A                         | Santa Cruz            |
| Gliserol                             | Sigma-Aldrich         |
| Glisin                               | Sigma-Aldrich         |
| Hemin                                | Sigma-Aldrich         |
| HEPES                                | Santa Cruz            |
| Hidrojen peroksit                    | Sigma-Aldrich         |
| Hidroklorik asit                     | Merck                 |
| İkincil antikor                      | Sigma-Aldrich         |

|                                            |               |
|--------------------------------------------|---------------|
| İzoprenalin                                | Sigma-Aldrich |
| Leupeptin                                  | Sigma-Aldrich |
| L-glutamin                                 | Sigma-Aldrich |
| Magnezyum klorür                           | Sigma-Aldrich |
| Metanol                                    | Merck         |
| NP-40                                      | Sigma-Aldrich |
| Ponceau S                                  | Sigma-Aldrich |
| Potasyum dihidrojen fosfat                 | Santa Cruz    |
| Potasyum hidroksit                         | Horasan Kimya |
| Potasyum klorür                            | Horasan Kimya |
| Propranolol                                | Sigma-Aldrich |
| Protein Ladder markırı                     | Fermentas     |
| RPMI-1640                                  | Sigma-Aldrich |
| Sığır serum albümini (BSA)                 | Sigma-Aldrich |
| Sodyum bikarbonat                          | Sigma-Aldrich |
| Sodyum dodesil sülfat (SDS)                | Sigma-Aldrich |
| Sodyum florür                              | Sigma-Aldrich |
| Sodyum fosfat dibazik                      | Merck         |
| Sodyum klorür                              | Santa Cruz    |
| Sodyum orthovanadat                        | Sigma-Aldrich |
| TEMED (N, N, N', N',-tetrametiletildiamin) | Sigma-Aldrich |
| Tripan mavisi                              | Sigma-Aldrich |
| Tris                                       | Sigma-Aldrich |
| Tween 20                                   | Sigma-Aldrich |
| Nitroblutetrazolyum (NBT)                  | Promega       |

## 5.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

1. Derin dondurucu (-20°C) (Arçelik)
2. Derin dondurucu (-20 °C) (Siemens)
3. Derin dondurucu (-30 °C) (Sanyo)
4. Derin dondurucu (-80 °C) (So-Low)
5. Distile su cihazı (GFL)
6. Etüv (Memmert)
7. Fotoğraf makinası (Sony)
8. Güç kaynağı (Dan-Kar)
9. Güç kaynağı (LKB)
10. Hemositometre
11. Isıtıcılı manyetik karıştırıcı (Kotterman)
12. Işık Mikroskobu (Inverted mikroskop) (Olympos CKX41)
13. Karbondioksit Etüvü (Sanyo MCO-19AIC)
14. Karıştırıcı (Janke & Kunkel)
15. Laminar Akım Seviye II Biyogüvenlik Kabini (TEZSAN)
16. Mikrosantrifüj (Beckman Coulter Microfuge 22R)
17. Multiskan Ascent Microplate Okuyucu (ELISA) (Thermo Fisher Scientific)
18. Otoklav (Nüve)
19. Otomatik mikropipetler (Gilson, Eppendorf, Rainin)
20. pH metre (WTW)
21. Santrifüj (Beckman Coulter Allegra X-30R)
22. Santrifüj (Hettich Universal 30 RF)
23. Spektrofotometre (LKB Biochrom Ultrospec IIE)
24. Spektrometre (LKB)
25. Su banyosu (Kotterman)
26. Synergy H1 Microplate Okuyucu (ELISA) (BioTek)
27. TC20 Otomatik Hücre Sayım Cihazı (Bio-Rad)
28. Terazî (Oertling NA-114)
29. Vorteks (IKA)
30. XCell Sure Lock Mini-Hücre Elektroforez Sistemi (Invitrogen)

### 5.3. Tampon ve Çözeltilerin Bileşimi

#### 5.3.1. Çalışmada kullanılan kitler

Smart BCA Protein Kiti (Lowry) (iNtRON Biotechnology Company, Kore)

Cell Proliferation (ELISA), BrDU kiti (Roche)

#### 5.3.2. K562 kronik miyeloid lösemi hücre kültürü hazırlama ve çoğalmasında kullanılan çözeltiler

##### Hücre kültürü

|                        |                           |
|------------------------|---------------------------|
| RPMI-1640              | 100 mL                    |
| NaHCO <sub>3</sub>     | %2                        |
| Fetal Dana Serumu      | %10                       |
| Penisilin/Streptomisin | 10000 IU/mL + 10000 µg/µL |
| L-Glutamin             | 200 mM                    |
| Hepes                  | 20 mM                     |

Isı ile komplemanı inaktive edilmiş %10 FDS (fetal dana serumu), 2 mM L-glutamin, 1000 U/mL penisilin-streptomisin, 200 mM hepes ve sodyum bikarbonat eklenmiş RPMI-1640 hücre kültür medyumunu.



### 5.3.2.1. Heminle eritroid farklılaşmada kullanılan çözeltiler

#### Hemin stok çözeltisi

|                     |        |
|---------------------|--------|
| Hemin, pH=8,0       | 1 mM   |
| 1N KOH              | 0,2 mL |
| 1M Tris HCL, pH=7,8 | 0,1 mL |
| 1N HCl              | 0,2 mL |
| dH <sub>2</sub> O   | 0,4 mL |

Toplam 1 mL hacimde (1 mL hacim için) 1 N KOH ile pH=8,0'a ayarlanır.

### 5.3.2.2. Benzidin Boyama

#### Benzidin stok çözeltisi

|                      |     |
|----------------------|-----|
| Benzidin             | %3  |
| Glasiyal asetik asit | %90 |
| dH <sub>2</sub> O    | %10 |

#### Benzidin Boyama Çözeltisi

|                               |        |
|-------------------------------|--------|
| Benzidin (stok)               | 20 µL  |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 20 µL  |
| dH <sub>2</sub> O             | 100 µL |

10 µL benzidin boyama çözeltisi + 90 µL hücre örneği = 5 dk beklenir ve hücre sayımı hemositometride yapıldı.

### **5.3.3. Hücre sayımında kullanılan çözeltiler**

#### **5.3.3.1. Tripan mavisi**

##### **Tripan mavisi ile hücre sayımı**

|               |            |
|---------------|------------|
| Tripan Mavisi | %0,5 (w/v) |
| Sodyum klorür | %0,9 (w/v) |

#### **5.3.3.2. BrDU**

##### **BrDU ile hücre sayımı**

5-Bromo-2-deoksi-üridin etiketli hücre sayım kiti (Roche) kiti ile hücre sayımı yapıldı.

#### **5.3.3.3. Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS)**

##### **Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS)**

|                     |        |
|---------------------|--------|
| Sodyum klorür       | 140 mM |
| Potasyum klorür     | 3 mM   |
| Sodyum bikarbonat   | 8 mM   |
| Potasyum bikarbonat | 2 mM   |

pH=7.4

1 litre distile su içerisinde çözüldü.

### **5.3.4. Protein izolasyonunda kullanılan çözeltiler**

#### **5.3.4.1. TE (Tris-EDTA) çözeltisi**

##### **TE (Tris-EDTA) çözeltisi**

|              |       |
|--------------|-------|
| Tris, pH=8,0 | 10 mM |
| EDTA         | 1 mM  |

1 litre distile su içerisinde çözüldü.

#### 5.3.4.2. Homojenleştirme tamponu (taze hazırlanır)

|           |                |
|-----------|----------------|
| Hepes     | 20 mM, pH: 8,0 |
| PMSF      | 0,1 mM         |
| EDTA      | 1 mM           |
| Leupeptin | 10 µg/mL       |
| Aprotinin | 2 µg/mL        |

#### 5.3.5. Lowry metodunda kullanılan çözeltiler

Protein miktarları Lowry yöntemi ile Smart BCA protein kit protokolü kullanılarak 562 nm’de okunmuştur (Lowry ve ark., 1951).

#### 5.3.6. Elektroforez ve Western emdirimi analizlerinde kullanılan çözeltiler

##### 5.3.6.1 Örnek tamponu (4X)

|                            |             |
|----------------------------|-------------|
| Tris-HCl, pH 6,8           | 125 mM      |
| Gliserol                   | %30 (v/v)   |
| Üre                        | 6 M         |
| β-merkaptoetanol           | %10 (w/v)   |
| Sodyum dodesilsülfat (SDS) | %2 (w/v)    |
| Bromfenol mavisi           | %0,01 (w/v) |

##### 5.3.6.2. Akrilamid-Bisakrilamid çözeltisi

|                            |        |
|----------------------------|--------|
| Akrilamid                  | 30 g   |
| N, N-metilen bis akrilamid | 0,8 g  |
| Tepkime hacmi              | 100 mL |

#### 5.3.6.3. Ayırma jeli tamponu (2X)

|                  |            |
|------------------|------------|
| Tris-HCl, pH 8,8 | 0,75 M     |
| SDS              | %0,2 (w/v) |

#### 5.3.6.4. Yükleme jeli tamponu (2X)

|                  |            |
|------------------|------------|
| Tris-HCl, pH 6,8 | 0,25 M     |
| SDS              | %0,2 (w/v) |

#### 5.3.6.5. Yürütme tamponu (2X)

|                        |      |
|------------------------|------|
| Tris                   | 6 g  |
| Glisin                 | 30 g |
| SDS                    | 1g   |
| Tepkime hacmi: 1000 mL |      |

#### 5.3.6.6. Elektroforez tamponu (5X)

|                       |       |
|-----------------------|-------|
| Tris                  | 7,5 g |
| Glisin                | 36 g  |
| Tepkime hacmi: 500 mL |       |

#### 5.3.6.7. Aktarma tamponu, pH 8.5

|              |        |
|--------------|--------|
| Tris, pH:8.3 | 25 mM  |
| Glisin       | 192 mM |
| Metanol      | %20    |

#### 5.3.6.8. Tris tuz tamponu (TBS), pH 8.0

|          |           |
|----------|-----------|
| NaCl     | 136,75 mM |
| KCl      | 2,68 mM   |
| Tris-HCl | 21,26 mM  |

#### 5.3.6.9. Blok tamponu

|          |       |
|----------|-------|
| BSA      | %1    |
| Tween 20 | %0,05 |

#### 5.3.6.10. TBS-T tamponu

|               |      |
|---------------|------|
| TBS-T tamponu | %0,1 |
| TBS           |      |
| Tween 20      | %0,1 |

#### 5.3.6.11. Birincil antikor tamponu

Anti-beta adrenerjik reseptör 1 antikor: Bloklama çözeltisi ile 1:100 seyreltilmiş.

Anti-beta adrenerjik reseptör 2 antikor: Bloklama çözeltisi ile 1:100 seyreltilmiş.

Anti-beta aktin antikor: Bloklama çözeltisi ile 1:100 seyreltilmiş.

Anti-glikoforin A antikor: Bloklama çözeltisi ile 1:500 seyreltilmiş.

Anti-gama globin antikor: Bloklama çözeltisi ile 1:500 seyreltilmiş.

#### 5.3.6.12. İkincil antikor tamponu

Alkalen fosfataz eşlenik tavşan poliklonal IgG TBS ile 1:1000 seyreltilmiş

|          |       |
|----------|-------|
| Tween 20 | %0,05 |
|----------|-------|

#### 5.3.6.13. NBT/BCIP geliştirici tampon

|                   |        |
|-------------------|--------|
| Tris, pH:9,5      | 100 mM |
| NaCl              | 100 mM |
| MgCl <sub>2</sub> | 5 mM   |
| NBT (50 mg/mL)    | 66 µl  |
| BCIP (50 mg/mL)   | 33 µl  |

#### 5.3.6.14. Jel boyama çözeltisi

|                  |            |
|------------------|------------|
| Coomassie mavisi | %0,2 (w/v) |
| Metanol          | %50 (v/v)  |
| Asetik asit      | %10        |

#### 5.3.6.15. Jel boya çıkarma çözeltisi

|             |           |
|-------------|-----------|
| Metanol     | %10 (v/v) |
| Asetik asit | %10 (v/v) |

#### 5.3.6.16. Ponceau S çözeltisi

|                   |                      |
|-------------------|----------------------|
| Asetik Asit       | 2,5 mL               |
| Ponceau S         | 0,05 g               |
| dH <sub>2</sub> O | 50 mL'ye tamamlanır. |

## **5.4. Yöntem**

### **5.4.1 Çalışmada kullanılan yöntemler**

#### **5.4.1.1 Hücre kültürü ve hücrelerin çoğaltılması**

K562 kronik miyeloid lösemi hücreleri ATCC (CCL-243) suşu olup ticari olarak satın alındı. K562 kronik miyeloid lösemi hücreleri %10 fetal dana serumu, 10000 U/ $\mu$ L penisilin, 10000  $\mu$ g/ $\mu$ L streptomisin, 200 mM L-Glutamin içeren RPMI-1640 kültür ortamında, 37°C’de %5 CO<sub>2</sub> içeren karbondioksit etüvünde inkübe edilmiştir. Hücreler haftada üç kere kültür ortamı değiştirilerek 1x10<sup>6</sup> hücre/mL olacak şekilde çoğaltılmıştır (Rooney, Czepulkowski 1978). Hücre canlılığı tripan boyaması ile belirlenmiştir. Hücre canlılığı >%95 olduğu koşullarda deneylere başlanmıştır. Hücre sayımlarında TC20 hücre sayım aleti ve hemositometre kullanılmıştır.

#### **5.4.1.2. Hücre farklılaştırılması**

Hücreler 50  $\mu$ M hemin varlığında 72 saat eritroid farklılaşmaya uyarılmışlardır. K562 kronik miyeloid lösemi hücrelerinin eritroid farklılaşması benzidin sitokimyasal testi ile belirlenmiştir. 3  $\mu$ L %30’luk hidrojen peroksit, 500  $\mu$ L benzidin solüsyonu ile karıştırıldıktan sonra eşit hacimde hücre süspansiyonu eklenmiştir. Karışım, oda sıcaklığında 3-5 dk inkübe edilmiş ve benzidin pozitif hücrelerin yüzdesi mikroskopta incelenerek belirlenmiştir. Eritroid farklılaştırılmış hücrelerde,  $\gamma$ -globin ve glikoforin A protein ekspresyonu Western emdirimi ile denenmiştir.

#### **5.4.1.3. Hücrelerin agonist ve antagonistlerle muamelesi**

Serumsuz kültür ortamına ekilen hücreler bir gece sonra farklı konsantrasyonlarda agonist ve antagonist ile 24 ve 48 saat inkübe edildi. Serumsuz kültür ortamına ekilen hücreler bir gece sonra 100  $\mu$ M konsantrasyonda propranolol ile 30 dk sonra ise 100  $\mu$ M izoprenalin ile 24 saat muamele edilmiştir.

#### 5.4.1.4. Hücre sayımı

Hücreler 3 gün %10 FBS içeren kültür ortamında çoğaltıldı. Agonist ve antagonistlerin hücre çoğalmasına etkisi için; serumsuz kültür ortamına ekilen hücreler bir gece sonra %1 serum ve farklı konsantrasyonlarda propranolol (0-100  $\mu$ M), antagonist veya izoprenalin, agonist ile 24 saat muamele edildikten sonra BrDU yöntemi ile hücre sayımı yapılarak belirlenmiştir. Hücre sayımlarında “Cell Proliferation ELISA, BrDU (kolorimetrik), Roche Kit” ve kitin protokolü kullanılmıştır. Ölçümler ELISA okuyucuda yapılmıştır. Deneyler altı kere tekrarlanmıştır.

##### 5.4.1.4.1. Hücrelerin BrDU ile sayılması

5-Bromo-2-deoksi-üridin etiketli hücre sayım kiti (Roche) protokoüne uygun olarak hücreler sayıldı. Her bir kuyuda en fazla 100  $\mu$ L besiyeri olacak şekilde %5 CO<sub>2</sub> varlığında 37°C’ta hücreler kültüre edildi.

Yüz mikrolitre kültür ortamına 10  $\mu$ L BrDU (son konsantrasyonu 10  $\mu$ M BrDU) işaretleme tamponu (solüsyon I) eklendi. Hücreler 2-18 saat inkübe edildikten sonra işaretleme tamponu uzaklaştırıldı. Hücreler 2 saat 60°C’da kurutuldu. Önceden soğutulmuş 200  $\mu$ L fiksatif ile 30 dakika -20°C’ta hücreler fikse edildi. Hücreler 250  $\mu$ L %10 FBS içeren yıkama tamponu ile 3 kere yıkandı ve tampon uzaklaştırıldı. Hücreleri 100  $\mu$ L nükleaz tamponu ile 30 dakika 37°C’ta inkübe edildi. Nükleaz muamelesi CO<sub>2</sub> olmayan ortamda yapıldı. Nükleaz tamponu 250  $\mu$ L %10 FBS içeren yıkama tamponu ile 3 kere yıkanarak uzaklaştırıldı. 100  $\mu$ L Anti-BrDU-POD, "Fab fragments", çalışma tamponu ile 30 dakika 37°C’ta inkübe edildi. Antikor konjugatı 3 kere 250  $\mu$ L yıkama tamponu ile yıkandı (solüsyon II). Örnekler 403 nm dalga boyunda ELISA okuyucuda okundu.



#### **5.4.1.5. Hücrelerin toplanması**

Kültür ortamında yetiştirilen hücre soyu  $1 \times 10^6$  hücre/mL yoğunluğuna ulaşınca protein örnekleri için  $30 \times 10^6$  hücre toplanmıştır. Hücreler 700g'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst faz atılıp üzerine 5 mL PBS çözeltisi eklenip 700g'de 10 dakika santrifüj edildi ve bu işlem 3 kez tekrarlandı. Hücreler Lowry yöntemi ile protein tayini ve Western emdirimi yapmak için  $-80^\circ\text{C}$ 'ta derin dondurucuda saklandı.

#### **5.4.1.6. Hücre özütlerinin hazırlanması**

Gerekli koşulda hazırlanıp  $-80^\circ\text{C}$ 'ta saklanan hücrelere bölüm 5.3.4.2.'de anlatıldığı gibi hazırlanan homojenizasyon tamponundan 100  $\mu\text{L}$  eklendi. Dounce ile hücreler patlatıldı. Homojenleştirme tamponunu 1 mL'ye tamamlandı ve hücre patlatma işi tekrarlandı. 20 dakika buzda bekletildikten sonra 400g'de 10 dakika boyunca  $4^\circ\text{C}$ 'ta santrifüj edildi. Üst faz ependorf tüpe alındı. 12000g' de 30 dakika boyunca  $4^\circ\text{C}$ 'da santrifüj edildi. Pelette oluşan ham zar kesimi  $\approx 500 \mu\text{L}$  homojenleştirme tamponu ile tekrar çözüldü. 12000g'de 10 dakika boyunca  $4^\circ\text{C}$ 'da santrifüj edildi. Peleti 50  $\mu\text{L}$  homojenleştirme tamponu ile tekrar çözüldü. Protein örnekleri Lowry yöntemi ile protein miktar tayini yapılmak üzere  $-80^\circ\text{C}$ ' ta saklandı.

#### **5.4.1.7. Western emdirimi**

Hemin ile eritroid farklılaştırılan hücreler çoğaltıldıktan sonra fosfat tamponu ile yıkanmış ve dondurulmuştur. Dondurulan hücrelerden hücre homojenatları hazırlanmıştır. Lowry yöntemi ile protein miktar tayini yapılmıştır (Lowry ve ark., 1951).

#### **5.4.1.8. Elektroforez**

Yükleme tamponu ile karıştırılan, 100  $\mu\text{g}$  protein içeren örnekler  $100^\circ\text{C}$ 'ta 3-5 dakika kaynatılarak denatüre edilmiştir. Örnekler, %12'lik SDS-PAGE jeline yüklenerek elektroforez sıvısı içinde, 70 Volt'ta 1 saat yürütülmüştür.

#### **5.4.1.8.1. Islak elektroforetik transfer düzeneği ile elektroforetik transfer**

Jelin büyüklüğüne uygun olarak nitroselüloz membranlar hazırlanmıştır. Elektroforez sonrası üst jeli kesilen jel, nitroselüloz membran, filtre kağıtları ve süngerler 10 dakika aktarma tamponu içinde bekletilmiştir. Jel kasetindeki pozitif elektrodun (anot) üzerine sırasıyla sünger, 3MM filtre kağıdı, nitroselüloz membran, jel, 3MM filtre kağıdı ve sünger konularak kaset kapatılmıştır. Kaset transfer düzeneğine yerleştirildikten sonra kasetin üst kısmını kaplayacak şekilde aktarma tamponu ile doldurulmuştur. Düzenek güç kaynağına bağlanıp 150 V'da 1,5 saat süresince aktarma yapılmıştır.

#### **5.4.1.8.2. Western emdirimi analizi**

Membranlar BSA TBS-T blok tamponunda oda sıcaklığında 4°C'ta gece boyu inkübe edilmiştir. Ardından  $\beta$ -adrenerjik reseptör alttipleri,  $\beta$ 1 (1:100),  $\beta$ 2 (1:100) reseptörlerine ve  $\beta$ -aktin'e (1:1000) özgü protein antikorları (Santa Cruz) ile gece boyu etkileştirildi. Ardından membran TBS-T tamponuyla üç kez 10'ar dakika yıkanmıştır. Membranlar alkalen fosfataz eşlenik anti-tavşan IgG ile 1 saat etkileştirildikten sonra, TBS-T tamponuyla üç kez 10'ar dakika yıkandı. Birincil antikor (Santa Cruz) ve ikincil antikor (Sigma) ile etkileştirilen membran BCIP/NBT yöntemi ile görüntülenmiştir.  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 ve  $\beta$ -aktine (internal kontrol) özgün bantların LI-COR Image Studio 5 ücretsiz yazılımı ile densitometrik analiz yapılmıştır.

## 6. BULGULAR

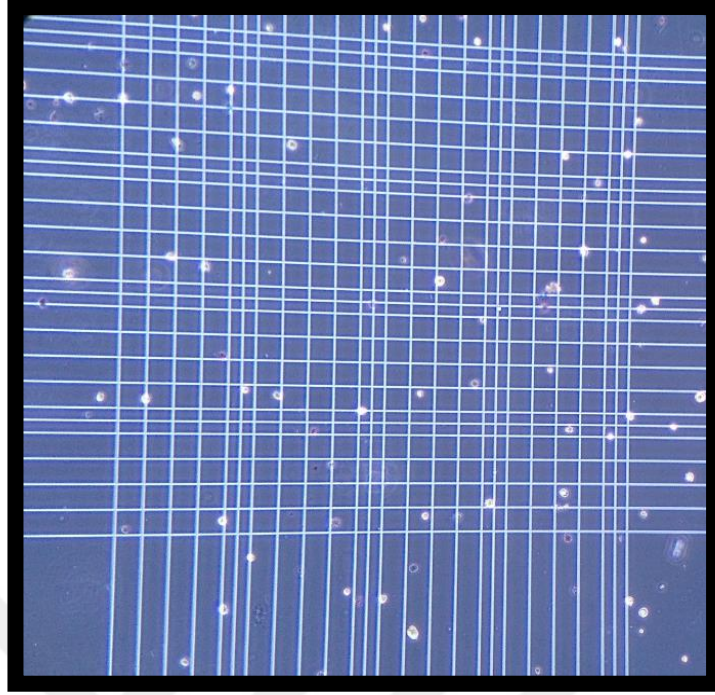
### 6.1. Eritroid Hücre Farklılaştırılması

Hemin ile eritroid farklılaştırılan K562 kronik miyeloid lösemi hücrelerinin farklılaşıp farklılaşmadıkları benzidin boyama yöntemi ile belirlenmiştir (Resim 1). Hücre canlılığı ise tripan mavisi boyama ile belirlenmiştir (Resim 2). Hemin (50  $\mu$ M) ile eritroid farklılaştırılan kronik miyeloid lösemi K562 hücrelerinin benzidin ile boyanması sonucundaki görüntüsü Resim 1’de gösterilmiştir.



**Resim 1:** Eritroid K562 kronik miyeloid lösemi hücrelerinin normal mikroskop ve benzidin boyama sonrası görüntüsü.

K562 kronik miyeloid lösemi hücrelerinin, tripan mavisi boyama tekniği ile hücre canlılığı Resim 2’de gösterilmiştir.



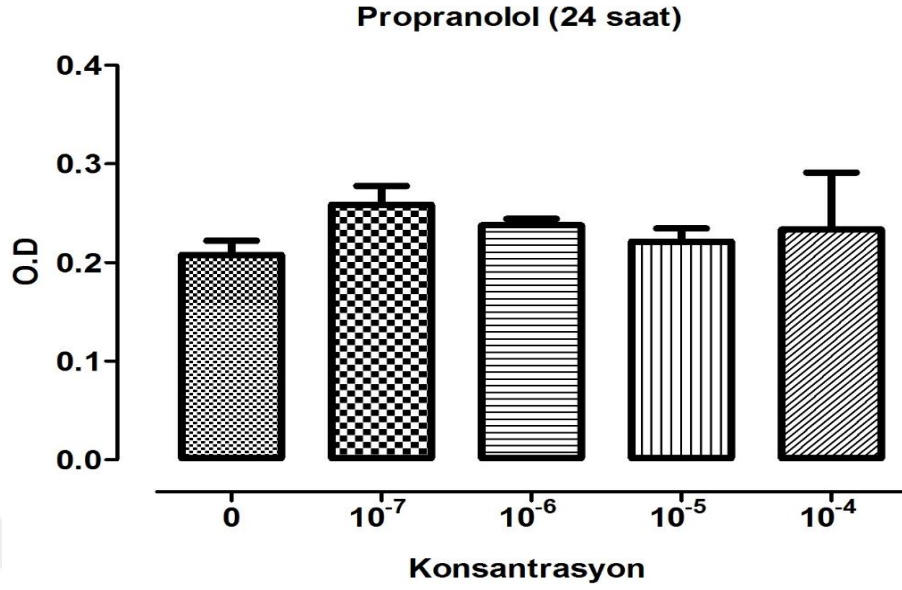
**Resim 2:** Tripan mavisi ile boyanmış K562 kronik miyeloid lösemi hücrelerinin hemositometredeki görüntüsü.

## **6.2. Hücre sayımı sonuçları**

Eritroid farklılaştırılmış K562 kronik miyeloid lösemi hücreleri kültür ortamında propranolol, antagonist veya izoprenalin, agonist varlığında ve yokluğunda 24 ve 48 saat muamele edilen hücreler BrDU yöntemi ile hücre sayımı yapılarak belirlenmiştir. Deneyler dört kere tekrarlanmıştır.

### **6.2.1. Propranololün eritroid farklılaştırılmış K562 kronik miyeloid lösemi hücre çoğalmasındaki rolü**

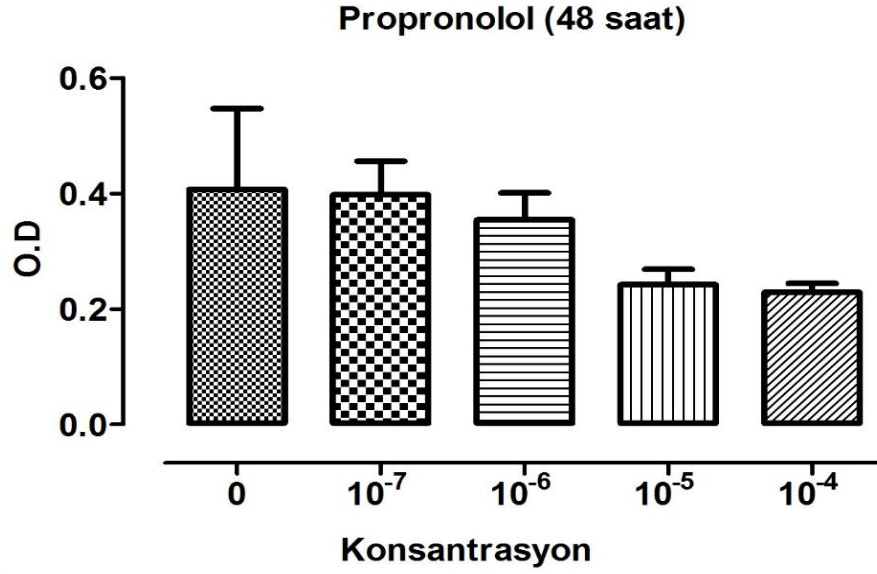
Eritroid farklılaştırılmış K562 kronik miyeloid lösemi hücreleri bir gece serumsuz ortamda tutulduktan sonra propranololün konsantrasyona bağlı hücre çoğalmasına etkisini saptamak için hemin ile eritroid farklılaştırılmış hücreler %10 FBS içeren kültür ortamında çoğaltılmıştır. Serumsuz kültür ortamına ekilen hücreler bir gece sonra 0-100  $\mu$ M konsantrasyon aralıklarında propranolol ile 24 saat muamele edilmiştir. Hücre sayımı BrDU yöntemi ile ELISA okuyucuda yapılmıştır (n=4). Kontrol hücreleri steril distile su ile muamele edilmiştir (Şekil 14).



**Şekil 14:** Eritroid farklılaştırılmış K562 kronik miyeloid lösemi hücre çoğalmasında 24 saat sonra propranololün konsantrasyona bağlı etkisi ( $P>0,001$ ).

Propranololün 24 saat eritroid farklılaştırılmış hücreler ile muamele edilmesi sonrasında hücre sayımları BrDU yöntemi ile belirlendi. Propranololün hücre çoğalmasına etkisinin konsantrasyona göre değişmediği belirlenmiştir ( $P>0,001$ ).

Hemin ile eritroid farklılaştırılmış hücreler %10 FBS içeren kültür ortamında çoğaltılmıştır. Serumsuz kültür ortamına ekilen hücreler bir gece sonra 0-100  $\mu$ M konsantrasyon aralıklarında propranolol ile 48 saat muamele edilmiştir. Hücre sayımı BrDU yöntemi ile ELISA okuyucuda yapılmıştır ( $n=4$ ) Kontrol hücreleri steril distile su ile muamele edilmiştir (Şekil 15).

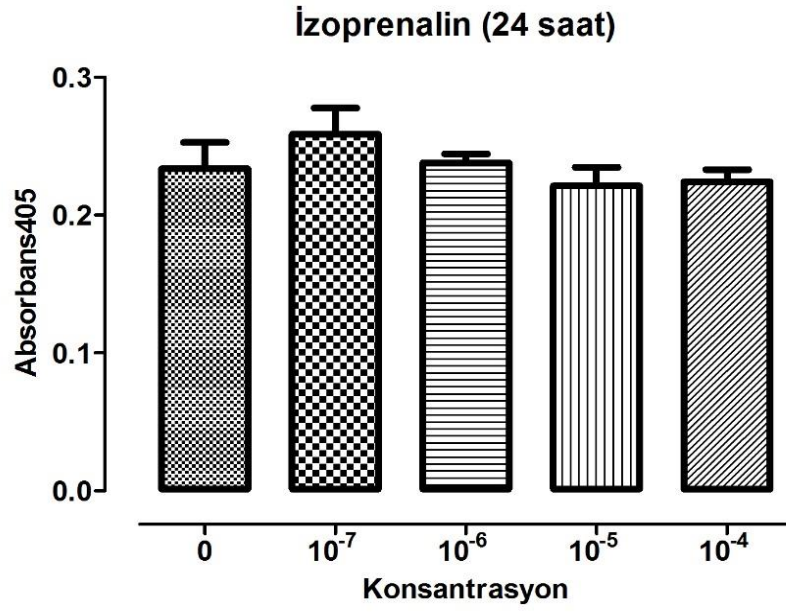


**Şekil 15:** Eritroid farklılaştırılmış K562 kronik miyeloid lösemi hücre çoğalmasında 48 saat sonra propranololün konstransasyona bağlı etkisi ( $P>0,001$ ).

Propranololün 48 saat eritroid farklılaştırılmış hücreler ile muamele edilmesi sonrasında hücre sayımları BrDU yöntemi ile belirlendi. Propranololün inhisiyon etkisinin konstransasyona göre anlamlı olmadığı belirlenmiştir ( $P>0,001$ ).

#### **6.2.2. İzoprenalinin eritroid farklılaştırılmış K562 kronik miyeloid lösemi hücre çoğalmasındaki rolü**

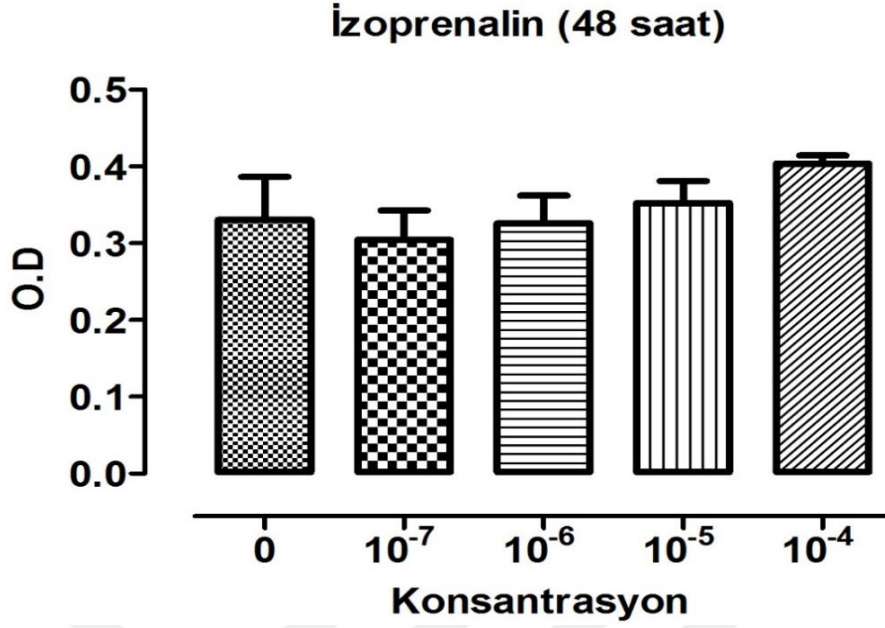
Eritroid farklılaştırılmış hücreler bir gece serumsuz ortamda tutulduktan sonra izoprenalinin konstransasyona bağlı hücre çoğalmasına etkisi için; hemin ile eritroid farklılaştırılmış hücreler %10 FBS içeren kültür ortamında çoğaltılmıştır. Serumsuz kültür ortamına ekilen hücreler bir gece sonra 0-100  $\mu$ M konstransasyon aralıklarında izoprenalin ile 24 saat muamele edilmiştir. Hücre sayımı BrDU yöntemi ile ELISA okuyucuda yapılmıştır ( $n=4$ ). Kontrol hücreleri steril su ile muamele edilmiştir (Şekil 16).



**Şekil 16:** Eritroid farklılaştırılmış K562 kronik miyeloid lösemi hücre çoğalmasında 24 saat sonra izoprenalinin konsantrasyona bağlı etkisi ( $P>0,001$ ).

İzoprenalin ile muamele edilen hücrelerde 24 saatte hücre çoğalmasında konsantrasyona göre fark görülmemiştir ( $P>0,001$ ).

Hemin ile eritroid farklılaştırılmış hücreler %10 FBS içeren kültür ortamında çoğaltılmıştır. Serumsuz kültür ortamına ekilen hücreler 1 gece sonra 0-100  $\mu$ M konsantrasyon aralıklarında İzoprenalininin ile 48 saat muamele edilmiştir. Hücre sayımı BrDU yöntemi ile ELISA okuyucuda yapılmıştır ( $n=4$ ), Kontrol hücreleri steril distile su ile muamele edilmiştir (Şekil 17).

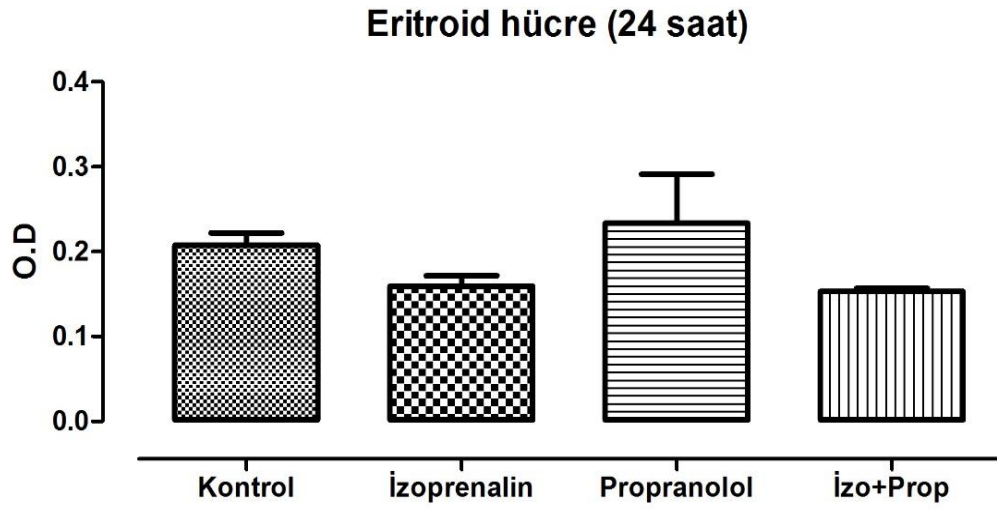


**Şekil 17:** Eritroid farklılaştırılmış K562 kronik miyeloid lösemi hücre çoğalmasında 48 saat sonra izoprenalininin konsantrasyona bağlı etkisi ( $P>0,001$ ).

48 Saatte  $10^{-4}$  M izoprenalin hücre sayısında artış eğiliminin anlamlı olmadığı belirlenmiştir ( $P>0,001$ ).

Hemin ile eritroid farklılaştırılmış hücreler %10 FBS içeren kültür ortamında çoğaltılmıştır. Serumsuz kültür ortamına ekilen hücreler bir gece sonra 100  $\mu$ M konsantrasyonda propranolol ile 30 dk sonra 100  $\mu$ M izoprenalin ile 24 saat muamele edilmiştir. Hücre sayımı BrDU yöntemi ile ELISA okuyucuda yapılmıştır ( $n=4$ ) (Şekil 18).

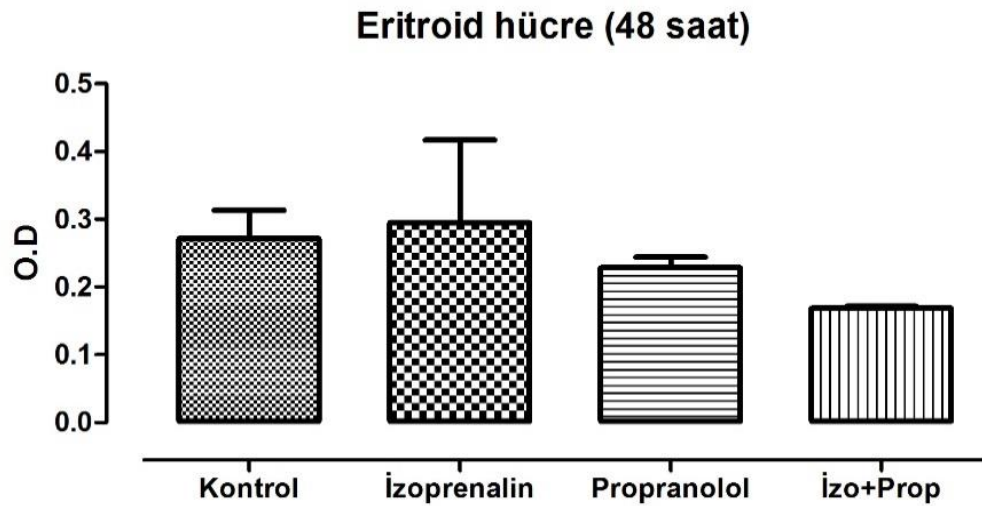




**Şekil 18:** Eritroid farklılaştırılmış K562 kronik miyeloid lösemi hücre çoğalmasında propranolol ile izoprenalinin 24 saatteki etkisi ( $P>0,001$ ).

Propranolol ve izoprenalinin birlikte verildiği hücre gruplarında hücre çoğalmasının inhibe olma eğilimi vardır ( $P>0,001$ ).

Hemin ile eritroid farklılaştırılmış hücreler %10 FBS içeren kültür ortamında çoğaltılmıştır. Serumsuz kültür ortamına ekilen hücreler bir gece sonra 100  $\mu$ M konsantrasyonda propranolol ile 30 dk sonra izoprenalin ile 48 saat muamele edilmiştir. Hücre sayımı BrDU yöntemi ile ELISA okuyucuda yapılmıştır (Şekil 19).

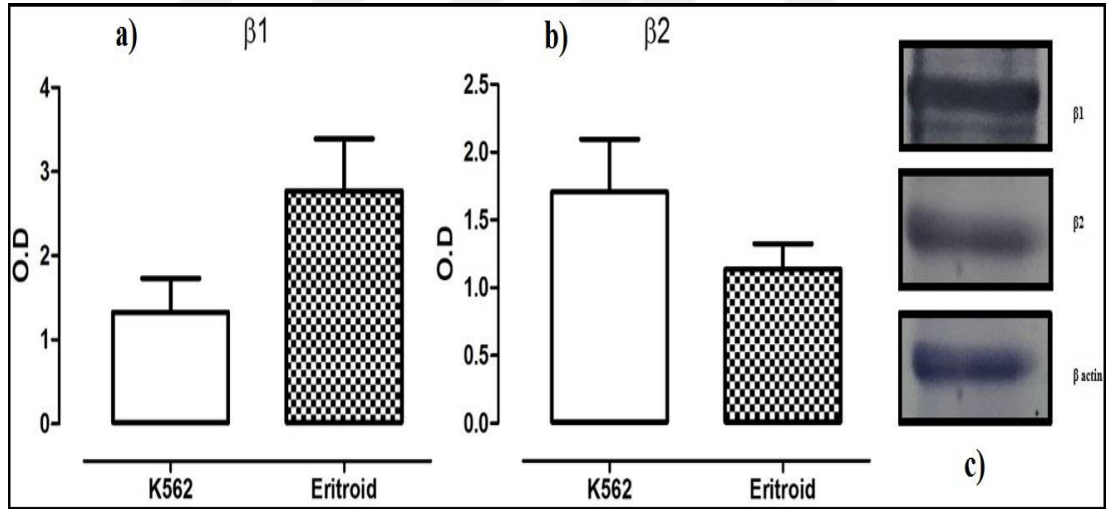


**Şekil 19:** Eritroid farklılaştırılmış K562 kronik miyeloid lösemi hücre çoğalmasında, propranolol ile izoprenalinin 48 saatteki etkisi ( $P>0,001$ ).

Kontrole göre propranolol ve izoprenalinin birlikte verildiği hücre gruplarında ise hücre çoğalmasında inhibisyon eğilimi vardır ancak anlamlı değildir ( $P>0,001$ ).

### 6.3. Western emdirimi sonuçları

Hücreler üç gün %10 FBS içeren kültür ortamında çoğaltılmıştır. Hemin ile eritroid farklılaştırılan K562 kronik miyeloid lösemi hücreleri PBS ile yıkanmış ve dondurulmuştur. Daha sonra bu dondurulmuş hücrelerden hücre homojenatları hazırlanmıştır. Lowry yöntemi ile protein miktar tayini yapılmıştır. Yükleme tamponu ile karıştırılan, protein içeren örnekler SDS-PAGE jelinde yürütülmüştür. Jelde yürütülen örnekler nitroselüloz membranlara aktarılmıştır. Membranlar BSA ile bloklanmıştır. Ardından  $\beta 1$  (1:100),  $\beta 2$  (1:100) glikoforin A(1:500) ve  $\beta$ -aktin'e (1:500) özgü protein antikorları ile gece boyu etkileştirilmiştir. Görüntüleme BCIP/NBT yöntemi ile yapılmıştır. Farklılaştırılmamış K562 hücreleri ile heminle eritroid farklılaştırılmış K562 hücreleri reseptör ekspresyonu bakımından karşılaştırıldığında farklılaştırılmış hücrelerde  $\beta 1$  adrenerjiklerin arttığı,  $\beta 2$  adrenerjiklerin ise azaldığı belirlenmiştir.  $\beta 1$  (65 kDa),  $\beta 2$  (56-85 kDa) ekspresyonunun  $\beta$ -aktin'e oranlanmış değerleri grafikte gösterilmektedir (Resim 3).

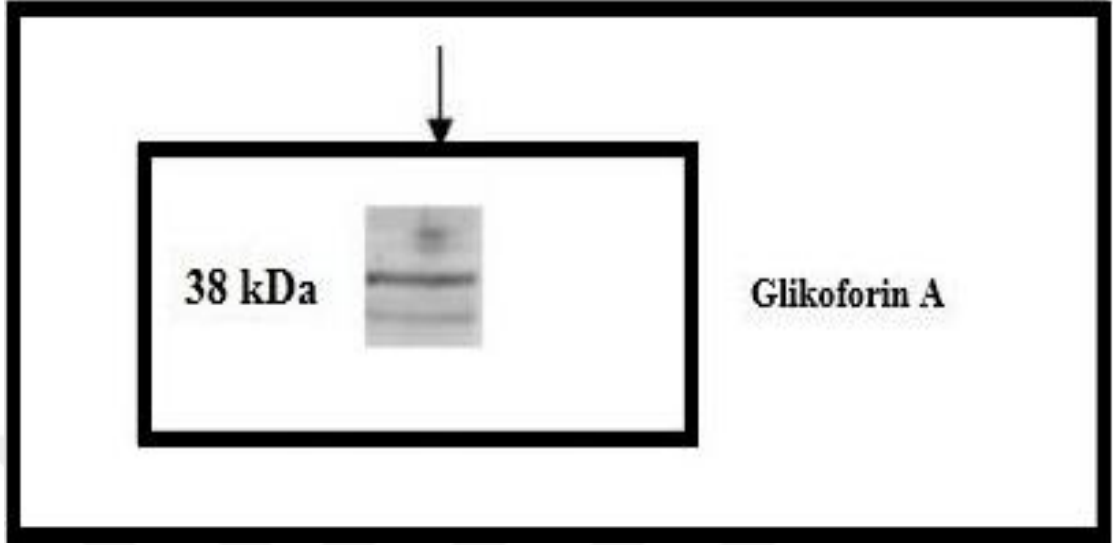


**Resim 3:** a) Farklılaştırılmamış ve eritroid farklılaştırılmış K562 kronik miyeloid lösemi hücrelerinde  $\beta 1$  ekspresyonu. b) Farklılaştırılmamış ve eritroid farklılaştırılmış K562 kronik miyeloid lösemi hücrelerinde  $\beta 2$  ekspresyonu. c) Eritroid farklılaştırılmış K562 kronik miyeloid lösemi hücrelerinde  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  ve  $\beta$ -aktin ekspresyonu.

Eritroid farklılaştırılmış hücrelerde,  $\beta 1$ -adrenerjik reseptör ekspresyonunun  $\beta 2$ -adrenerjik reseptör ekspresyonundan %245 fazla olduğu gösterilmiştir.

Eritroid farklılaşmanın markırlarından olan  $\gamma$ -globin gen ekspresyonları yapılmış fakat antikordan ile yeterince güçlü sinyal alınamamıştır. Antikor ile ilgili problem

olduğu için eritroid farklılaşmanın göstergesi olan diğer gen, glikoforin A ekspresyonu çalışılmıştır (Resim 4).



**Resim 4:** Eritroid farklılaştırılmış K562 kronik miyeloid lösemi hücrelerinde glikorofin A (38 kDa) ekspresyonu.

#### 6.4. İstatistiksel Analiz

Deneyler altı kere tekrarlanmış olup GraphPad Prism 5.0 programında One-way ANNOVA ve Bonfferoni post test istatistiksel analizleri kullanılmıştır. Densitometrik analizlerde LI-COR Image Studio 5 ücretsiz yazılımı kullanılmıştır.

## 7. TARTIŞMA

Adrenalin ve noradrenalin, tümör öncesi ve metastaz öncesi etkiler aracılığıyla  $\beta$ -adrenerjik reseptör sinyal iletimi yolağına etki ederler.  $\beta$ -adrenerjik reseptör antagonisti olan  $\beta$ -blokerlerin kanser ilerleyişini iyileştirici yönde etki ettiği bildirilmiştir (Entschladen ve ark., 2004; Antoni ve ark., 2006; Thaker ve ark., 2007; Armaiz-Pena ve ark., 2009; Lutgendorf ve ark., 2010; Barron, 2012).  $\beta$ -blokerler kanser hücrelerinin çoğalmasını; büyüme faktörü üretimini inhibe ederek ve tümör hücrelerinin apoptoza gidişini indükleyerek tümör gelişimini azaltmaktadır (Benish ve ark., 2008; Hajighasemi ve Mirshafiey, 2009).

Beta adrenerjik reseptörlerin  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  ve  $\beta_3$  olmak üzere her biri kendi fizyolojik özelliklerine göre üç adet alttipi bulunmaktadır (Barron, 2012).  $\beta$ -adrenerjik reseptörler aracılı sinyal iletimi kanser gelişimi ve prognozu ile ilişkilidir (Tang ve ark., 2013).  $\beta$ -adrenerjik sistemin aktivasyonu farklı kanser hücrelerinde birden fazla sinyal ileti yolağı ile tetiklenmesine rağmen bu sinyal yolları arasındaki sinerjistik etkiler göz ardı edilemez (Tang ve ark., 2013). Beta adrenerjik uyarılma ile apoptozun inhibisyonu, anjiyogenez, invazyon ve metastaz gibi pro-onkogenik etkilere sebep olan cAMP düzeyinde artışa ve PKA/CREB aktivasyonuna neden olmaktadır (Al-Wadei ve ark., 2012). Fitzgerald'ın hipotezine göre birçok kanserin etiyolojik faktörü noradrenalin ve kanser ile noradrenalin arasındaki bağlantı retrospektif çalışmalarla gösterilmiştir (Fitzgerald, 2009; Fitzgerald, 2010; Akbar ve Alsharidah, 2014). Kanser hastalarında yapılan klinik çalışmalarda,  $\beta$ -blokerlerin kanser riski ve kanserin görülme sıklığını azalttığı gösterilmiştir (Perron ve ark., 2004; Algazi ve ark., 2004; Thaker ve Sood, 2008). Kardiyovasküler hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada  $\beta$ -bloker kullanan hastalar ile hiç kullanmayanlar arasında kanser riskinde %49 oranında azalma görülmüştür. Ayrıca,  $\beta$ -bloker kullanımı her yıl boyunca kanser riskini %6 oranında azaltmaktadır (Algazi ve ark., 2004; Thaker ve ark., 2007). Ancak diğer bir popülasyon tabanlı meme karsinoması kontrol çalışmasında ise hastaların  $\beta$ -bloker kullanımı ile risk faktörünün değiştiği noktasında herhangi bir ilişki olduğu kesin olarak belirlenmemiştir (Meier ve ark., 2000; Li ve ark., 2003; Thaker ve ark., 2007). Çeşitli kanser türlerinde,  $\beta$ -blokerlerin kanseri önleyici ve kanser hastalarının yaşam sürelerini arttırıcı etkilerinin gösterilmesi, yeni hedeflerin belirlenmesinde rol

oynayacaktır (Akbar ve Alsharidah, 2014). Kortizol ve glukokortikoidler gibi katekolaminler sinerjistik olarak etkileşerek kanser hücre çoğalmasını hızlandırmaktadırlar.

Adrenalin ve noradrenalinin  $\beta 1$  ve  $\beta 2$ -adrenerjik reseptörlerine olan etkisini propranololün tamamıyla inhibe ettiği belirtilmektedir (Léauté-Labrèze ve ark., 2008; Wolter ve ark., 2014). *In vitro* pankreas, meme, mide kanseri gibi birçok hücre soylarında, baş ve boyundaki skuamöz hücre karsinomaları ile lösemide propranololün tümör önleyici etkisi gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2009; Hajighasemi ve Mirshafiey, 2009; Powe ve ark., 2010; Liao ve ark., 2010; Zhang ve ark., 2010; Wolter ve ark., 2012; Wolter ve ark., 2014).  $\beta$ -adrenerjik reseptörlerin eksprese olduğu malignant hücre soylarının propranolol ile tedavisinin, tümör yaşam süresini azalttığı hatta bazı pankreas, mide, lösemi melanoma ve oral skuamöz hücre karsinoması gibi vakalarda ise apoptozun indüklendiği bildirilmiştir (Weddle ve ark., 2001; Zhang ve ark., 2009; Hajighasemi ve Mirshafiey, 2009; Zhang ve ark., 2010; De Giorgi ve ark., 2011; Wolter ve ark., 2012; Wolter ve ark., 2014).

Akciğer karsinoma hücrelerinde kortizolün etkisiyle, cAMP konsantrasyonu,  $\beta$ -adrenerjik reseptör miktarı ile IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ve TNF $\alpha$ 'nın artışına benzer olarak, izoprenalinde aynı etkiyi yapmaktadır (Nakane ve ark., 1990; Thaker ve Sood, 2008). Adrenalin ve noradrenalin gibi katekolaminlere benzer olarak, izoprenalinde akciğer, pankreas ve oral skuamöz hücre karsinomalarından türevlenen kanser hücre soylarında pro-proliferatif etki yapmaktadır (Park ve ark., 1995; Chan ve ark., 2008; Liu ve ark., 2008; Shang ve ark., 2009; Bernabe ve ark., 2011; Huang ve ark., 2012; Pérez Piñero ve ark., 2012; Wolter ve ark., 2014).

Adrenalin ve noradrenalin öncelikli olarak  $\beta 2$ -adrenerjik reseptörleri olmak üzere,  $\beta$ -adrenerjik reseptörler aracılığıyla kolorektal kanser hücrelerinin çoğalmasını uyardığı gösterilmiştir (Wong ve ark., 2011; Wu ve ark., 2005). Meme kanserinde ise bu etkileşimin tam aksi yönde etkileri olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmalarda  $\beta$ -adrenerjik reseptör agonistleri ile *in vitro* olarak hücre çoğalması ve *in vivo* olarak da tümör büyümesinin azaldığı gösterilmiştir (Pérez Piñero, 2012; Carie ve Sebt, 2007).

Fare meme kanseri modelinde nonselektif izoprenalin, metastazı 22 kat artmıştır (Sloan ve ark., 2010). İnsan prostat kanseri hücrelerindeki cAMP seviyesindeki artış yanıtında ve  $\beta$ -adrenerjik reseptör agonistlerine yanıtta terbutalinden izoprenaline, adrenalinden noradrenaline doğru azalma olduğu görülmüştür (Nagmani ve ark., 2003).

Beta adrenerjik reseptörlerin meme tümörü büyümesini hem inhibe (Slotkin ve ark., 2000; Carie ve Sebti, 2007) ettiği hem de uyardığı belirtilmiştir. Son yapılan çalışmalarda  $\beta$ -adrenerjik reseptörler aracılı sinyal iletisi, meme tümörü büyümesine (Re ve ark., 1992; Cakir ve ark., 2002; Thaker ve ark., 2006; Shi ve ark., 2011) *in vivo* etkisi olduğu ancak *in vitro* etkisinin ise önemsiz olduğu bildirilmiştir (Sloan ve ark., 2010; Madden ve ark., 2011; Barron, 2012). Meme kanserinin farmako-epidemiolojik analizleri ile nonselektif  $\beta$ -adrenerjik antagonistlerin (Melhem-Bertrandt ve ark., 2011) selektif  $\beta_1$ -adrenerjik ajanlardan daha fazla koruyucu etkisi gösterilmiştir (Barron ve ark., 2011; Cole ve Sood, 2012). Bu etkinin birincil tümör ve nodal/metastatik oluşumları azalttığı tespit edilmiştir (Barron ve ark., 2011; Melhem-Bertrandt ve ark., 2011). Yüksek tansiyondan dolayı  $\beta$ -bloker kullanan meme kanseri hastası kadınlar üzerinde on yıl boyunca yapılmış bir çalışmada hastalığın nüksetmesi ile metastaz gelişimi ve ölüm oranını azalttığı bildirilmiştir (Powe ve ark., 2010; Tang ve ark., 2013; Wolter ve ark., 2014). Diğer bir retrospektif çalışmada  $\beta_1$ -adrenerjik reseptör antagonistleri kullanmayan nonselektif  $\beta$ -bloker propranolol kullanan meme kanseri hastası kadınların gelişmiş tümör seviyelerinde olsalar bile gözle görülür bir iyileşme kaydettikleri bildirilmiştir (Barron ve ark., 2011; Wolter ve ark., 2014). Örneğin, meme karsinomasında hızlandırılmış tümör büyümesi ile  $\beta$ -adrenerjik reseptörlerin aktivasyonu birbirleriyle ilişkilidir (Vandewalle ve ark., 1990; Marchetti ve ark., 1991; Badino ve ark., 1996; Thaker ve ark., 2007).

Beta adrenerjik reseptörlerin uyarılması ile DNA sentezini azaltarak hücre çoğalmasını inhibe ettikleri belirlenmiştir (Slotkin ve ark., 2000). Östrojene duyarlı (MCF-7, ZR-75-1, MDAMB-361) ve östrojene duyarsız (MDA-MB-453, MDAMB-435, MDA-MB-468) insan meme kanseri hücre soylarının çoğalmasını  $\beta$ -adrenerjik reseptör antagonistleri inhibe etmiştir (Cakir ve ark., 2002).

Prostat kanserinde  $\beta$ -blokerlerin kanser teşhisi öncesi kullanımının, teşhis sonrası kullanımından daha koruyucu olduğu bildirilmiştir (Akbar ve Alsharidah, 2014). Fakat yapılan diğer iki çalışmada ise iki büyük popülasyondaki prostat kanseri riskinde azalma veya kanser riskinde önemli bir artışın  $\beta$ -blokerler ile ilişkisi saptanamamıştır (Rodriguez ve 2009; Bangalore ve ark., 2011).

Yumurtalık kanseri modellerindeki  $\beta$ -adrenerjik sinyal iletimi ile tümör gelişiminin  $\beta$ 2-adrenerjik reseptör ekspresyonu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Thaker ve ark., 2006; Barron, 2012). Adipoz doku ve yumurtalık kanseri hücre soylarında, noradrenalinin  $\beta$ -adrenerjik reseptör aracılığıyla PKA yolağı ve cAMP ile VEGF artışından sorumlu olduğu gösterilmiştir. Propranolol bu etkiyi ortadan kaldırır. İzoprenalinin katekolaminlere benzer etkisi  $\beta$ -adrenerjik reseptör aracılı olduğunu göstermektedir (Fredriksson ve ark., 2000; Lutgendorf ve ark., 2003; Antoni ve ark., 2006). Sood ve arkadaşları,  $\beta$ -adrenerjik reseptör agonistleri olan adrenalin ve noradrenalinin yumurtalık tümörü hücrelerini apoptozdan koruduğunu ve bu koruyucu etkinin propranolol ile inhibe edildiği bildirilmiştir (Sood ve ark., 2010; Barron, 2012).

Panc-1, BxPC-3, HDPE6-C7, MIA Paca-2 ve PC-2 dahil insan pankreas hücre soylarındaki stromal hücrelerde bulunan makrofajlar, fibroblastlar ve endotel hücreleri  $\beta$ 1 ve  $\beta$ 2-adrenerjik reseptörleri eksprese ederler (Weddle ve ark., 2001; Turner ve ark., 2003; Askari ve ark., 2005; Zhang ve ark., 2009; Schuller ve Al-Wadei, 2010; Schuller ve ark., 2012; Zhang ve ark., 2010; Zhang ve ark., 2011; Lamyel ve ark., 2011; Lin ve ark., 2012; Stiles ve ark., 2012; Kondo ve ark., 2013; Chang ve ark., 2015).

Selektif  $\beta$ 1-adrenerjik reseptör antagonistlerinin kullanımı ise nonselektif  $\beta$ 2-adrenerjik reseptör antagonisti olan  $\beta$ -blokerlere eşit oranda benzer inhibisyon göstermemektedir (Masur ve ark., 2001; Drell ve ark., 2003; Lang ve ark., 2004; Zhang ve ark., 2010; Barron, 2012). Önceki çalışmalarda  $\beta$ -adrenerjik reseptör antagonistlerinin PanCa hücrelerinin çoğalması, invazyonu ve apoptozunu indüklediği belirtilmektedir (Zhang ve ark., 2009; Hu ve ark., 2010; Zhang ve ark., 2010; Zhang ve ark., 2011). Ancak, PanCa hücre ölüm mekanizmasının  $\beta$ 2-adrenerjik reseptör antagonisti ile indüklendiği kesin değildir (Zhang ve ark., 2011). Beta adrenerjik reseptör antagonistlerinin PanCa hücrelerinin çoğalmasını, apoptozunun

indüklenmesini ve hücre bölünmesinin G1/S aşamasında durdurduğunu göstermiştir. Zhang ve arkadaşları, MIA PaCa-2 ve BxPC-3 hücrelerinde  $\beta$ 2-adrenerjik reseptör antagonisti ile hücre ölümünün indüklendiğini göstermişlerdir (Zhang ve ark., 2011). Kemoterapik ajanları tamamlayıcı olan ve pankreas kanseri hastalarından cerrahi müdahale ile tümörün alınmasının öncesinde verilen  $\beta$ -blokerlerin, artan nörotransmitter seviyelerini düşürdüğü ve inflamasyonu sınırlayarak kanseri iyileştirici yönde çıktılar sağladığı anlaşılmıştır (Chang ve ark., 2015).

İzoprenalin tedavisi, doza bağımlı Panc-1 pankreas kanseri hücrelerinin zarın zeminine invazyonunu arttırmaktayken, propranolol  $\beta$ -blokeri ise bu invazyon etkisini engeller (Bloomston ve ark., 2002; Egeblad ve ark., 2002; Kessenbrock ve ark., 2010; Chang ve ark., 2015). İzoprenalinin, kültürdeki tümör hücrelerinde MMP2 ve MMP9 ekspresyon düzeyini sırası ile 2 ve 4 kat arttırdığı bildirilmiştir (Kim-Fuchs ve ark., 2014; Chang ve ark., 2015).  $\beta$ -adrenerjik sinyal iletiminin aktivasyonuna aracılık eden (Askari ve ark., 2005; Schuller ve ark., 2008; Lin ve ark., 2012) endojen nörotransmitterlerin *in vitro* pankreas kanseri hücresi çoğalmasına sebep olduğu gösterilmiştir (Huang ve ark., 2012; Zhang ve ark., 2009; Chang ve ark., 2015). Nonselektif  $\beta$ -adrenerjik reseptör agonisti izoprenalin ile aktive olan  $\beta$ -adrenerjik reseptörleri *in vitro* pankreas kanseri hücre çoğalmasını uyardığı belirlenmiştir (Askari ve ark., 2005; Schuller ve ark., 2008). Pankreas kanseri hastalarının tedavisi ve iyileşmesi için  $\beta$ -blokerlerin kullanımıyla yeni bir tedavi seçeneği olacağı belirtilmiştir (Chang ve ark., 2015). Çoğalma (Zhang ve ark., 2009; Huang ve ark., 2012), motilite (Huang ve ark., 2012; Guo ve ark., 2013) ve invazyon (Guo ve ark., 2009; Huang ve ark., 2012; Guo ve ark., 2013) gibi *in vitro* çalışılmış pankreas kanser hücresi davranışları üzerine adrenerjik sinyal iletiminin belirgin bir etkisi vardır (Chang ve ark., 2015).

Nöroblastoma hücre soyları ve birincil tümör dokusunda  $\beta$ 2-adrenerjik reseptörünün ekspresyon seviyesindeki artış ile yaşam süresindeki artış arasında ilişki bulunmuştur. Wolter ve arkadaşları insan nöroblastoma hücre soylarının propranolol ile hücre çoğalmasının inhibisyonunu ve apoptozunun indüklenmesi ile yaşam süresinin azaldığını göstermişlerdir (Wolter ve ark., 2014). Propranololün



topoizomera I inhibitörü SN-38 ile sinerjistik olarak kullanımı ile nöroblastoma büyümesini inhibe ettiği bildirilmiştir (Wolter ve ark., 2014).

Literatürde propranolol ile ilgili farklı sonuçlar bulunmaktadır. Örneğin, nöroblastoma hücre soylarının büyük çoğunluğunda ve birincil tümörlerde eksprese olan  $\beta$ 2-adrenerjik reseptörlerin mRNA seviyelerinin artışı ile hasta yaşam süresinin artışı arasında bir korelasyon bulunurken, ekspresyon seviyeleri ve propranolole karşı *in vitro* hassasiyet arasında herhangi bir korelasyon bulunamamıştır (Wolter ve ark., 2014) Son yapılan çalışmalarda kanser hücre çoğalmasının baskılanması, büyüme faktörü üretiminin inhibisyonu ve tümör hücrelerinin apoptozunun indüklenmesi gibi etkiler aracılığıyla  $\beta$ -blokerlerin tümör ilerleyişini azalttığı bildirilmiştir (Benish ve ark., 2008; Hajighasemia ve Mirshafiey, 2009). Propranololün tütün indüklü pulmoner adenokarsinom gelişimi (Schuller ve ark., 2000), uterin leiomyoma başlangıcı, insan akciğer karsinoma hücre soyu çoğalması (Schuller ve Cole, 1989), cerrahi müdahale ile artan akciğer tümörünün durdurulması (Benish ve ark., 2008) ve sıçan C6 glioma hücrelerinin tümör nekroz faktör alfa (TNF $\alpha$ ) indüklü çoğalmasını (Lung ve ark., 2005) inhibe edici etkide bulunduğu bildirilmiştir (Hajighasemia ve Mirshafiey, 2009). Ayrıca propranololün sıçan ve insan akciğer hücreleri (Kastelova ve ark., 2003), insan derisi keratinositleri, kornea ve retina epitel hücre soyları (Cheong ve ark., 2008) ve tümör hücrelerindeki sitotoksik etkileri olduğu tespit edilmiştir (Finney ve ark., 2000; Hajighasemia ve Mirshafiey, 2009). 30  $\mu$ M konsantrasyondaki propranololün 48 saatlik inkübasyonu sonrasında, lösemili insan T hücreleri (Molt-4 ve Jurkat) ve monosit hücrelerinde (U937) VEGF'nin gözle görülür oranda azaldığı tespit edilmiştir. Adipoz dokudaki noradrenalin aracılı VEGF ve noradrenalin uyarımıyla nazofaringeal karsinoma tümör hücrelerindeki fonksiyonel anjiyojenik faktörlerin salınımının propranolol ile inhibe edildiğini bildiren Fredriksson ve arkadaşları (Fredriksson ve ark., 2000) ile Yang ve arkadaşlarının (Yang ve ark., 2006) çalışmaları ile de bu önceki bulgular uyumludur (Hajighasemi ve Hajighasemi, 2009).

İnsan lösemi hücre soylarında doza bağlı olarak propranololün hücre çoğalmasını önemli derecede azalttığını tespit etmişlerdir (Hajighasemia ve Mirshafiey, 2009). Sonuçlarımıza göre, farklılaştırılmamış K562 hücreleri ile heminle eritroid farklılaştırılmış K562 hücreleri karşılaştırıldığında  $\beta$ 1-adrenerjik reseptör

ekspresyonunun arttığı ancak  $\beta 2$ -adrenerjik reseptör ekspresyonu ise eritroid farklılaştırılmamış hücrelere göre eritroid farklılaştırılmış hücrelerde azalmıştır. Hemin ile eritroid farklılaştırılmış K562 hücrelerinde  $\beta 2$ -adrenerjik reseptörlerin ekspresyonunun  $\beta 1$ -adrenerjik reseptörlerinden daha az olduğu belirlenmiştir. Nöroblastoma hücrelerinde  $\beta 2$ -adrenerjik reseptörlerinin artışı ile yaşam süresindeki artış arasında korelasyon bulunmuştur.

Eritroid farklılaştırılmış K562 kronik miyeloid lösemi hücrelerinde propranolol ile 48 saatte doza bağımlı inhibisyon eğilimi görülmüştür. Propranolol ile azalma trendi olmasına rağmen anlamlılık belirlenemedi. 48 saatte propranololün  $10^{-7}$  ile  $10^{-4}$  arasında fark olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlılık bulunamamıştır. Ayrıca diğer konsantrasyonlarda ve 24 saatlik inkübasyon ile anlamlı değişim belirlenememiştir. Propranololün ISA değeri olmadığı için, 48 saatte doza bağımlı azalmadaki bu etkinin  $\beta$ -adrenerjik etki olmadığını söyleyebiliriz.

İnsan lösemi T hücreleri (Molt-4 ve Jurkat) ve monosit hücrelerinde (U937) 30  $\mu$ M propranolol ile beta adrenerjik reseptör aracılı VEGF artışının inhibisyonu, hücre büyümesinin ve çoğalmasının inhibisyonu ile ilişkili bulunmuştur. Bizim bulgularımıza göre de eritroid farklılaştırılmış K562 kronik miyeloid lösemi hücrelerinde  $10^{-4}$  ve  $10^{-5}$  M konsantrasyonlarda hücre çoğalması inhibe olmuştur ancak istatistiksel olarak anlamlı. Bu verilerimiz diğer lösemi hücrelerindeki benzer bulunmuştur. Ancak bu hücrelerde propranololün cAMP, PKA ve VEGF düzeyine etkisinin araştırılması daha aydınlatıcı bilgiler verecektir.

## 8. KAYNAKLAR

Abdelhay E, Pizzatti L ve Binato R. Networks Establishing Hematopoietic Stem Cell Multipotency and Self-Renewal. In: Pelayo R, eds. *Advances in Hematopoietic Stem Cell Research*. Brazil, Rio de Janeiro: InTech; 2012.

Abramovitch R, Tavor E, Jacob-Hirsch J, Zeira E, Amariglio N, Pappo O, Rechavi G, Galun E, Honigman A. A pivotal role of cyclic AMP-responsive element binding protein in tumor progression. *Cancer Res*. 2004;15;64(4): 1338-1346.

Ahlquist RP. A study of the adrenotropic receptors. *Am J Physiol*. *Am J Physiol*. 1948;153(3): 586-600.

Akbar S, Alsharidah MS. Are Beta Blockers New Potential Anticancer Agents? *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(22): 9567-9574.

Akbar S, Alorainy MS. The current status of beta blockers' use in the management of hypertension. *Saudi Med J*. 2014;35(11): 1307-1317.

Algazi M, Plu-Bureau G, Flahault A, Dondon MG, Le MG. Could treatments with beta-blockers be associated with a reduction in cancer risk? *Rev Epidemiol Sante Publique*. 2004;52(1): 53-65.

Alitalo R, Partanen J, Pertovaara L, Holtta E, Sistonen L, Andersson L, Alitalo K. Increased erythroid potentiating activity/tissue inhibitor of metalloproteinases and jun/fos transcription factor complex characterize tumor promoter-induced megakaryoblastic differentiation of K562 leukemia cells. *Blood*. 1990;75: 1974-1982

Alitalo R. Induced differentiation of K562 leukemia cells: a model for studies of gene expression in early megakaryoblasts. *Leuk Res*. 1990;14(6): 501-14.

Al-Wadei HA, Al-Wadei MH, Schuller HM. Prevention of pancreatic cancer by the beta-blocker propranolol. *Anticancer Drugs*. 2009;20(6): 477-82

Al-Wadei HA, Al-Wadei MH, Ullah MF, Schuller HM. Celecoxib and GABA cooperatively prevent the progression of pancreatic cancer in vitro and in xenograft models of stress-free and stress-exposed mice. *PLoS ONE* 2012;7(8): e43376.

Al-Wadei HA, Plummer HK 3rd, Schuller HM. Nicotine stimulates pancreatic cancer xenografts by systemic increase in stress neurotransmitters and suppression of the inhibitory neurotransmitter gamma-aminobutyric acid. *Carcinogenesis*. 2009; 30(3): 506-511.

Al-Wadei HA, Schuller HM. Nicotinic receptor-associated modulation of stimulatory and inhibitory neurotransmitters in NNK-induced adenocarcinoma of the lungs and pancreas. *J Pathol*. 2009;218(4):437-45.

Al-Wadei HA, Plummer HK 3rd, Ullah MF, Unger B, Brody JR, Schuller HM. Social stress promotes and  $\gamma$ -aminobutyric acid inhibits tumor growth in mouse models of non-small cell lung cancer. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2012;5(2): 189-96.

Andersson LC, Jokinen M, Gahmberg CG. Induction of erythroid differentiation in the human leukaemia cell line K562. *Nature*. 1979;278: 364-365

André C, Erraji L, Gaston J, Grimber G, Briand P, Guillet JG. Transgenic mice carrying the human beta 2-adrenergic receptor gene with its own promoter overexpress beta 2-adrenergic receptors in liver. *Eur J Biochem*. 1996;241(2): 417-24.

Antoni MH, Lutgendorf SK, Cole SW, Dhabhar FS, Sephton SE, McDonald PG, Stefanek M, Sood AK. The influence of bio-behavioural factors on tumour biology: pathways and mechanisms. *Nat Rev Cancer*. 2006 Mar;6(3): 240-248.

Antoni MH, Lechner S, Diaz A, Vargas S, Holley H, Phillips K, McGregor B, Carver CS, Blomberg B. Cognitive behavioral stress management effects on psychosocial and physiological adaptation in women undergoing treatment for breast cancer. *Brain Behav Immun*. 2009;23(5): 580-91.

Ariens EJ, Beld AJ, Miranda JFR, Simonis AM. The Pharmacoreceptor-Effector Concept. In: O'Brien RD, eds. *A Basis for Understanding the Transmission of Information in Biological Systems*. 1st ed. New York: Plenum Press; 1979, p:33-91.

Aries A, Trentesaux C, Ottolenghi S, Jardillier JC, Jeannesson P, Doubeikovski A. Activation of erythroid-specific promoters during anthracycline-induced differentiation of K562 cells. *Blood*. 1996;87(7): 2885-2890.

Armaiz-Pena GN, Lutgendorf SK, Cole SW, Sood AK. Neuroendocrine modulation of cancer progression. *Brain Behav Immun*. 2009;23 (1):10-15

Askari MD, Tsao MS, Schuller HM. The tobacco-specific carcinogen, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone stimulates proliferation of immortalized human pancreatic duct epithelia through beta-adrenergic transactivation of egf receptors. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2005;131(10): 639-648.

Badino GR, Novelli A, Girardi C, DiCarlo F. Evidence for functional beta-adrenoreceptor subtypes in CG-5 breast cancer cell. *Pharmacol Res*. 1996;33(4-5): 255-60.

Baker JG, Hall IP, Hill SJ. Agonist and inverse agonist actions of beta-blockers at the human beta 2-adrenoceptor provide evidence for agonist-directed signaling. *Mol Pharmacol*. 2003;64(6): 1357-1369.

Baker JG. The selectivity of beta-adrenoceptor antagonists at the human beta1, beta2 and beta3 adrenoceptors. *Br. J. Pharmacol*. 2005;144(3): 317-322.

Bangalore S, Kumar S, Kjeldsen SE, Makani H, Grossman E, Wetterslev J, Gupta AK, Sever PS, Gluud C, Messerli FH. Antihypertensive drugs and risk of cancer: network meta-analyses and trial sequential analyses of 324,168 participants from randomised trials. *Lancet Oncol*. 2011;12(1): 65-82.

Barron TI, Connolly RM, Sharp L, Bennett K, Visvanathan K. Beta blockers and breast cancer mortality: a population-based study. *J Clin Oncol* 2011;29(19): 2635-44.

Barron TI. Beta-adrenergic blocking drugs in breast cancer: a perspective review. *Ther Adv Med Oncol*. 2012;4(3): 113-125.

Belaoussoff M, Farrington SM, Baron MH. Hematopoietic induction and respecification of A-P identity by visceral endoderm signaling in the mouse embryo. *Development*. 1998;125(24): 5009-5018.

Benish M, Bartal I, Goldfarb Y, Levi B, Avraham R, Raz A, Ben-Eliyahu S. Perioperative use of beta-blockers and COX-2 inhibitors may improve immune competence and reduce the risk of tumor metastasis. *Ann Surg Oncol*. 2008;15(7): 2042-2052.

Bernabe DG, Tamae AC, Biasoli ÉR, Oliveira SHP. Stress hormones increase cell proliferation and regulates interleukin-6 secretion in human oral squamous cell carcinoma cells. *Brain Behavior and Immunity* 2011;25(3): 574-583.

Besedovsky HO, del Rey A, Sorkin E, Da Prada M, Keller HH. Immunoregulation mediated by sympathetic nervous system. *Cell Immunol*. 1979;48: 346-355.

Bianchi Scarrà GL, Romani M, Coviello DA. Terminal erythroid differentiation in the K-562 cell line by 1- $\beta$ -D-arabinofuranosylcytosine by c-myc messenger RNA decrease. *Cancer Research*. 1986;46: 6327-6332.

Bjarnadóttir TK, Gloriam DE, Hellstrand SH, Kristiansson H, Fredriksson R, Schiöth HB. Comprehensive repertoire and phylogenetic analysis of the G protein coupled receptors in human and mouse. *Genomics*. 2006;88(3): 263-273

Black J. Drugs from Emasculated Hormones - The Principle of Syntopic Antagonism. *Science*. 1989;245(4917): 486-93.

Bloomston M, Zervos EE, Rosemurgy AS 2nd. Matrix metalloproteinases and their role in pancreatic cancer: A review of preclinical studies and clinical trials. *Ann. Surg. Oncol*. 2002;9(7): 668-674.

Boullaran C, Kehrl JH. Implications of non-canonical G-protein signaling for the immune system. *Cell Signal*. 2014;26(6): 1269-1282.

Bouvier M, Collins S, O'Dowd BF, Campbell PT, DeBlasi A, Kobilka BK, McGregor C, Irons GP, Caron MG, Lefkowitz RJ. Two distinct pathways for cAMP-mediated down-regulation of the  $\beta$ 2-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem*. 1989;264: 16786-16792.

Brembilla-Perrot B, Muhanna I, Nippert M, Popovic B, Beurrier D, Houriez P, Chaise AT, Claudon O, Louis P, Abdelaal A, State S, Andronache M, Suty-Selton C. Paradoxical effect of isoprenaline infusion. *Europace*. 2005;7(6): 621-7.

Bunn HF. Erythropoietin. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3(3): a011619.

Burger K, Gimpl G, Fahrenholz F. Regulation of receptor function by cholesterol. *Cell. Mol. Life Sci*. 2000;57(11): 1577-1592.

Butler TM, Ziemiecki A, Friis RR. Megakaryocytic differentiation of K562 cells is associated with changes in the cytoskeletal organization and the pattern of chromatographically distinct forms of phosphotyrosyl-specific protein phosphatases. *Cancer Res*. 1990;50(19): 6323-6329.

Bylund DB, Bond RA, Clarke DE, Eikenburg DC. Adrenoceptors. In: Girdlestone D., eds. *The IUPHAR Compendium of Receptor Characterization and Classification*: 58-74. 2nd ed. London: IUPHAR Media; 1998, p:183-186.

Bylund DB, Eikenburg DC, Hieble JP, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP, Molinoff PB, Ruffolo RR Jr, Trendelenburg U. International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol Rev*. 1994;46(2): 121-136.

Cakir Y, Plummer HK III, Tithof PK, Schuller HM. Beta-adrenergic and arachidonic acid-mediated growth regulation of human breast cancer cell lines. *Int J Oncol*. 2002;21(1): 153-157.

Carie AE, Sebti SM. A chemical biology approach identifies a beta-2 adrenergic receptor agonist that causes human tumor regression by blocking the Raf-1/Mek-1/Erk1/2 pathway. *Oncogene*. 2007;26(26): 3777-88.

Carlson LE, Angen M, Cullum J, Goodey E, Koopmans J, Lamont L, MacRae JH, Martin M, Pelletier G, Robinson J, Simpson JSA, Specia M, Tillotson L, Bultz BD. High levels of untreated distress and fatigue in cancer patients. *Br J Cancer*. 2004;90(12): 2297-2304.

Carlsöö B, Danielsson A, Henriksson R. Effects of a new selective beta1-adrenoceptor agonist on amylase secretion from the rat parotid gland. *Br J Pharmacol* 1978 Mar; 62(3): 364-366.

Caron MG, Lefkowitz RJ. Catecholamine receptors: structure, function, and regulation. *Recent Prog Horm Res.* 1993;48: 277-290.

Carre M, Gifford AJ, Murray J, Norris MD, Trahair T, Andre N, Kavallaris M.  $\beta$ -blockers increase response to chemotherapy via direct antitumour and anti-angiogenic mechanisms in neuroblastoma. *Br J Cancer.* 2013;108(12): 2485-94.

Chan C, Lin HJ, Lin J. Stress-associated hormone, norepinephrine, increases proliferation and IL-6 levels of human pancreatic duct epithelial cells and can be inhibited by the dietary agent, sulforaphane. *Int J Oncol.* 2008;33(2): 415-419.

Chang A, Kim-Fuchs C, Le CP, Hollande F, Sloan EK. Neural Regulation of Pancreatic Cancer: A Novel Target for Intervention. *Cancers (Basel)* 2015;7(3): 1292-1312.

Charnay P, Maniatis T. Transcriptional regulation of globin gene expression in the human erythroid cell line K562. *Science* 1983;220(4603): 1281-1283.

Chattopadhyay A, Paila YD, Shrivastava S, Tiwari S, Singh P, Fantini J. Sphingolipid-binding domain in the serotonin1A receptor. *Adv Exp Med Biol.* 2012;749: 279-293.

Chattopadhyay A. GPCRs: Lipid-Dependent Membrane Receptors That Act as Drug Targets. *Advances in Biology*, vol. 2014, Article ID 143023.

Chattopadhyay A. GPCRs: lipid-dependent membrane receptors that act as drug targets. *Adv Biol.* 2014;143023.

Chenais B, Molle I, Trentesaux C, Jeannesson P. Time-course of butyric acid-induced differentiation in human K562 leukemic cell line: rapid increase in gamma-globin, porphobilinogen deaminase and NF-E2 mRNA levels. *Leukemia.* 1997;11(9): 1575-1579.



Cheong HI, Johnson J, Cormier M, Hosseini K. In vitro cytotoxicity of eight beta-blockers in human corneal epithelial and retinal pigment epithelial cell lines: comparison with epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts. *Toxicol In Vitro* 2008;22(4): 1070-1076.

Cherezov V, Rosenbaum DM, Hanson MA, Rasmussen SGF, Thian FS, Kobilka TS, Choi HJ, Kuhn P, Weis WI, Brian K. Kobilka BK, Stevens RC. High-resolution crystal structure of an engineered human  $\beta_2$ -adrenergic G protein-coupled receptor. *Science*. 2007;318(5854):1258-1265.

Chida Y, Hamer M, Wardle J, Steptoe A. Do stress-related psychosocial factors contribute to cancer incidence and survival? *Nat Clin Pract Oncol*. 2008;5(8): 466-475.

Choi KD, Vodyanik MA, Slukvin II. Generation of mature human myelomonocytic cells through expansion and differentiation of pluripotent stem cell-derived lin-CD34<sup>+</sup> CD43<sup>+</sup> CD45<sup>+</sup> progenitors. *J Clin Investig*. 2009;119(9): 2818-2829.

Clegg RA, Mullaney I. Acute change in the cyclic AMP content of rat mammary acini in vitro. Influence of physiological and pharmacological agents. *Biochem J*. 1985;230(1): 239-246.

Colamonici OR, Trepel JB, Vidal CA, Neckers LM. Phorbol ester induces c-sis gene transcription in stem cell line K-562. *Mol Cell Biol* 1986;6(5): 1847-1850.

Cole SW, Sood AK. Molecular Pathways: Beta-Adrenergic Signaling in Cancer. *Clin Cancer Res*. 2012;18(5): 1201-1206.

Cruickshank JM, Prichard BNC. Beta-adrenoceptors. In: Cruickshank JM, Prichard BNC, eds. *Beta-blockers in clinical practice*. 2nd ed. London: Churchill Livingstone; 1996, p: 9-86.

Davey P, Bryant S, Hart G. Rate-dependent electrical, contractile and restitution properties of isolated left ventricular myocytes in guinea-pig hypertrophy. *Acta Physiol Scand* 2001;171(1): 17-28.

De Giorgi V, Grazzini M, Gandini S, Benemei S, Lotti T, Marchionni N, Geppetti P. Treatment with  $\beta$ -blockers and reduced disease progression in patients with thick melanoma. *Arch Intern Med*. 2011;171(8): 779-81.

del Senno L, Conconi F, Barbieri R, Amelotti F, Bernardi F, Piva R, Viola L, Gambari R. Human leukemic K562 cells: differential effects of 5-azacytidine on DNA methylation of epsilon-, gammaglobin and 7SL RNA genes. *Boll Soc Ital Biol Sper* 1984;60(8): 1613-1619.

Diaz ME, O'Neill SC, Eisner DA. Sarcoplasmic reticulum calcium content fluctuation is the key to cardiac alternans. *Circ Res* 2004;94(5): 650-6.

Dohlman HG. Thematic Minireview Series: New directions in G protein-coupled receptor pharmacology. *J Biol Chem*. 2015;290(32): 19469-70.

Dorsam RT, Gutkind JS. G-protein coupled receptors and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(2): 79-94.

Drell TL 4th, Joseph J, Lang K, Niggemann B, Zaenker KS, Entschladen F. Effects of neurotransmitters on the chemokinesis and chemotaxis of MDA-MB-468 human breast carcinoma cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2003;80 (1): 63-70.

Dzierzak E, Philipsen S. Erythropoiesis: Development and Differentiation. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013;3(4): a011601.

Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* 2002;2(3): 161-174.

Elenkov IJ, Papanicolaou DA, Wilder RL, Chrousos GP. Modulatory effects of glucocorticoids and catecholamines on human interleukin-12 and interleukin-10 production: clinical implications. *Proc Assoc Am Physicians* 1996;108(5): 374-381.

Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES. The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev*. 2000;52(4): 595-638.

Elferink JG, VanUffelen BE. The role of cyclic nucleotides in neutrophil migration. *Gen. Pharmacol.* 1996;27(2): 387-393.

Ellis C. The state of GPCR research in 2004. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2004; 3(7), 575, 577-626.

Emorine LJ, Marullo S, Briend-Sutren MM, Patey G, Tate K, Delavier-Klutchko C, Strosberg AD. Molecular characterization of the human beta 3-adrenergic receptor. *Science* 1989;245(4922): 1118-1121.

Enserink JM, Price LS, Methi T, Mahic M, Sonnenberg A, Bos JL, Taskén K. The cAMP-Epac-Rap1 pathway regulates cell spreading and cell adhesion to laminin-5 through the  $\alpha 3\beta 1$  integrin but not the  $\alpha 6\beta 4$  integrin. *J Biol Chem.* 2004;279(43): 44889-96.

Entschladen F, Drell TL 4th, Lang K, Joseph J, Zaenker KS. Tumour-cell migration, invasion, and metastasis: navigation by neurotransmitters. *Lancet Oncol.* 2004;5(4): 254-8.

Fain JN, Garcia-Siinz JA. Role of phosphatidylinositol turnover in alpha-1 and of adenylate cyclase inhibition in alpha-2 effects of catecholamines. *Life Sci.* 1980;26: 1183-1194.

Fève B, Baude B, Krief S, Strosberg AD, Pairault J, Emorine LJ. Dexamethasone down-regulates  $\beta 3$ -adrenergic receptors in 3T3-F442A adipocytes. *J. Biol. Chem.* 1992;267: 15909-15915.

Fève B, Emorine LJ, Lasnier F, Blin N, Baude B, Nahmias C, Strosberg AD, Pairault J. Atypical beta-adrenergic receptor in 3T3-F442A adipocytes. Pharmacological and molecular relationship with the human beta 3-adrenergic receptor. *J Biol Chem.* 1991;266(30): 20329-36.

Fialkow PJ, JW Singer. Chronic leukemias. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA eds. *Cancer Principles and Practice of Oncology*. Philadelphia: J.B. Lippincott Co.; 1989, p:1841.

Fibach E, Kollia P, Schechter AN, Noguchi CT, Rodgers GP. Hemin-induced acceleration of hemoglobin production in immature cultured erythroid cells: preferential enhancement of fetal hemoglobin. *Blood* 1995;85(10): 2967-2974.

Finney RE, Nudelman E, White T, Bursten S, Klein P, Leer LL, Wang N, Waggoner D, Singer JW, Lewis RA. Pharmacological inhibition of phosphatidylcholine biosynthesis is associated with induction of phosphatidylinositol accumulation and cytolysis of neoplastic cell lines. *Cancer Res.* 2000;60(18): 5204-13.

Fitzgerald PJ. Is norepinephrine an etiological factor in some types of cancer? *Int J Cancer.* 2009;124(2): 257-63.

Fitzgerald PJ. Testing whether drugs that weaken norepinephrine signaling prevent or treat various types of cancer. *Clin Epidemiol.* 2010;2: 1-3.

Fredriksson JM, Lindquist JM, Bronnikov GE, Nedergaard J. Norepinephrine induces vascular endothelial growth factor gene expression in brown adipocytes through a  $\beta$ -adrenoreceptor–cAMP–protein kinase A pathway involving Src but independently of Erk1/2. *J Biol Chem.* 2000;275(18): 13802-13811.

Freedman JE, Weight FF. Single K<sup>+</sup> channels activated by D2 dopamine receptors in acutely dissociated neurons from rat corpus striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85(10): 3618-3622.

Frielle T, Collins S, Daniel KW, Caron MG, Lefkowitz RJ, Kobilka BK. Cloning of the cDNA for the human beta 1-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(22): 7920-4.

Frishman WH, Lazar EJ, Gorodokin G. Pharmacokinetic optimisation of therapy with beta-adrenergic-blocking agents. *Clin Pharmacokinet* 1991;20(4): 311-8.

Frishman WH. Carvedilol. *N Engl J Med* 1998;339(24): 1759-65.

Fuchs R, Stelzer I, Haas HS, Leitinger G, Schauenstein K, Sadjak A. The  $\alpha_1$ -adrenergic receptor antagonists, benoxathian and prazosin, induce apoptosis and a switch towards megakaryocytic differentiation in human erythroleukemia cells. *Ann Hematol.* 2009;88(10): 989-97.

Fukuda M. Tumor-promoting phorbol diester-induced specific changes in cell surface glycoprotein profile of K562 human leukemic cells. *Cancer Res.* 1981;41 (11 Pt 1):4621-4628.

Gaedcke J, Gunawan B, Grade M, Szöke R, Liersch T, Becker H, Ghadimi BM. The mesopancreas is the primary site for R1 resection in pancreatic head cancer: relevance for clinical trials. *Langenbecks Arch Surg.* 2010;395(4): 451-8.

Gambari R, Del Senno L, Barbieri R, Viola L, Tripodi M, Raschella G, Fantoni A. Human leukemia K-562 cells: induction of erythroid differentiation by 5-azacytidine. *Cell Differentiation.* 1984;14: 87-97.

Gambari R, Raschella G, Biagini RR, Raschella G, Biagini R, Tripodi M, Farace MG, Romeo A, Fantoni A. Predominant expression of  $\zeta$  and  $\epsilon$  globin genes in human leukemia K-562(S6) variant cell line. *Experientia.* 1983;39: 415-416.

Gardenhire DS. Airway Pharmacology, Chapter 32. In: Gardehire DS, eds. *Rau's Respiratory Care Pharmacology*. 8th ed. St. Louis: Elsevier; 2012.

Gauthier C, Langin D, Balligand JL.  $\beta_3$ -adrenoceptors in the cardiovascular system. *Trends Pharmacol. Sci.* 2000;21: 426-431.

Gauthier C, Leblais V, Moniotte S, Langin D, Balligand JL. The negative inotropic action of catecholamines: role of  $\beta_3$ -adrenoceptors. *Can J Physiol. Pharmacol.* 2000;78: 681-690.

Gauwerky C, Golde DW. Hormonal effects on cell proliferation in a human erythroleukemia cell line (K562). *Blood.* 1980;56(5): 886-91.

Gilman AG. G proteins: transducers of receptor-generated signals, *Annu. Rev. Biochem.* 1987;56: 615-649.

Goldhaber JI, Xie LH, Duong T, Motter C, Khuu K, Weiss JN. Action potential duration restitution and alternans in rabbit ventricular myocytes. The key role of intracellular calcium cycling. *Circ Res* 2005;96(4): 459-66.

Granneman JG, Lahners KN, Rao DD. Rodent and human  $\beta$ 3-adrenergic receptor genes contain an intron within the protein-coding block. *Mol Pharmacol*;42: 964-970.

Green AR, Rockman S, DeLuca E, Begley CG. Induced myeloid differentiation of K562 cells with downregulation of erythroid and megakaryocytic transcription factors: a novel experimental model for hemopoietic lineage restriction. *Exp Hematol* 1993;21(4): 525-531.

Guo K, Ma Q, Li J, Wang Z, Shan T, Li W, Xu Q, Xie K. Interaction of the sympathetic nerve with pancreatic cancer cells promotes perineural invasion through the activation of STAT3 signaling. *Mol Cancer Ther.* 2013;12(3): 264-73.

Guo K, Ma Q, Wang L, Hu H, Li J, Zhang D, Zhang M. Norepinephrine-induced invasion by pancreatic cancer cells is inhibited by propranolol. *Oncol Rep* 2009;22(4): 825-30.

Hadcock JR, Ross M, Malbon CC. Regulation of  $\beta$  adrenergic receptor mRNA analysis in S49 mouse lymphoma mutant. *J. Biol. Chem.* 1989;264: 13956-13961.

Hajighasemi F, Hajighasemi S. Effect of propranolol on angiogenic factors in human hematopoietic cell lines in vitro. *Iran Biomed J.* 2009;13(4): 223-8.

Hajighasemia F, Mirshafiey. In Vitro Sensitivity of Leukemia Cells to Propranolol. *A. J Clin Med Res.* 2009;1(3): 144-149.

Hall RA, Premont RT, Chow CW, Blitzer JT, Pitcher JA, Claing A, Stoffel RH, Barak LS, Shenolikar S, Weinman EJ, Grinstein S, Lefkowitz RJ. The beta2 adrenergic receptor interacts with the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchanger regulatory factor to control Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange. *Nature.* 1998;392(6676): 626-30.

Hamm HE. The many faces of G protein signaling. *J Biol Chem.* 1998;273(2): 669-72.

Han SS, Jang JY, Kim SW, Kim WH, Lee KU, Park YH. Analysis of long-term survivors after surgical resection for pancreatic cancer. *Pancreas*. 2006;32(3): 271-275.

Heilker R, Wolff M, Tautermann CS, Bieler M. G-protein-coupled receptor-focused drug discovery using a target class platform approach. *Drug Discov. Today*. 2009;14(5-6): 231-240.

Hein L, Kobilka BK. Adrenergic receptor signal transduction and regulation. *Neuropharmacology* 1995;34(4): 357-366.

Herlenius E, Lagercrantz H. Neurotransmitters and neuromodulators during early human development. *Early Hum Dev*. 2001;65(1): 21-37.

Herreros-Villanueva M, Hijona E, Cosme A, Bujanda L. Mouse models of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*. 2012;18(12): 1286-1294.

Hino M, Suzuki K, Yamane T, Sakai N, Kubota H, Koh KR, Ohta K, Hato F, Kitagawa S, Tatsumi N. Ex vivo expansion of mature human neutrophils with normal functions from purified peripheral blood CD34<sup>+</sup> haematopoietic progenitor cells. *Br J Haematol*. 2000;109(2): 314-21.

Hocevar BA, Morrow DM, Tykocinski ML, Fields AP. Protein kinase C isotypes in human erythroleukemia cell proliferation and differentiation. *J. Cell Sci*. 1992;101: 671-679.

Houslay MD, Kolch W. Cell-type specific integration of cross-talk between extracellular signal-regulated kinase and cAMP signaling. *Mol Pharmacol*. 2000; 58(4): 659-68.

Hu HT, Ma QY, Zhang D, Shen SG, Han L, Ma YD, Li RF, Xie KP. HIF-1 $\alpha$  links beta-adrenoceptor agonists and pancreatic cancer cells under normoxic condition. *Acta Pharmacol Sin*. 2010;31(1): 102-10.

Huang XY, Wang HC, Yuan Z, Huang J, Zheng Q. Norepinephrine stimulates pancreatic cancer cell proliferation, migration and invasion via  $\beta$ -adrenergic receptor-dependent activation of P38/MAPK pathway. *Hepatogastroenterology*. 2012;59(115): 889-93.

Inanobe A, Kurachi Y. Membrane channels as integrators of G-protein-mediated signaling. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1838(2): 521-31.

Insel PA, Tang CM, Hahntow I, Michel MC. Impact of GPCRs in clinical medicine: monogenic diseases, genetic variants and drug targets. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1768(4): 994-1005.

Jacoby E, Bouhelal R, Gerspacher M, Seuwen K. The 7 TM G-protein-coupled receptor target family. *ChemMedChem*. 2006;1(8): 761-82.

Jafurulla M, Chattopadhyay A. Membrane lipids in the function of serotonin and adrenergic receptors. *Curr. Med. Chem*. 2013;20(1): 47-55.

Jafurulla M, Chattopadhyay M. Sphingolipids in the function of G protein-coupled receptors. *Eur J Pharmacol*. 2015;763: 241-246.

Jafurulla M, Pucadyil TJ, Chattopadhyay A. Effect of sphingomyelinase treatment on ligand binding activity of human serotonin<sub>1A</sub> receptors. *Biochim. Biophys. Acta*. 2008;1778(10): 2022-2025.

Jean D, Bar-Eli M. Regulation of tumor growth and metastasis of human melanoma by the CREB transcription factor family. *Mol Cell Biochem*. 2000;212(1-2): 19-28.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin*. 2009;59(4): 225-49.

Johnson M. Beta<sub>2</sub>-adrenoceptors: mechanisms of action of beta<sub>2</sub>-agonists. *Paediatr Respir Rev*. 2001;2(1): 57-62.

Johnson M. Molecular mechanisms of beta<sub>2</sub>-adrenergic receptor function, response, and regulation. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117(1): 18-24; quiz 25.



Johnson M. The beta-adrenoceptor. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;158 (5 Pt 3): S146-53.

Katsumura KR, DeVilbiss AW, Pope NJ, Johnson KD, Bresnick EH. Transcriptional mechanisms underlying hemoglobin synthesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3(9): a015412.

Kaumann AJ, Molenaar P. Modulation of human cardiac function through 4 beta-adrenoceptor populations. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1997;355(6): 667-81.

Keldermann RH, ten Tusscher KH, Nash MP, Hren R, Taggart P, Panfilov AV. Effect of heterogeneous APD restitution on VF organization in a model of the human ventricles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;294(2): H764-74.

Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*. 2010;141(1): 52-67.

Kim MO, Na SI, Lee MY, Heo JS, Han HJ. Epinephrine increases DNA synthesis via ERK1/2s through cAMP, Ca(2+)/PKC, and PI3K/Akt signaling pathways in mouse embryonic stem cells. *J Cell Biochem*. 2008;104(4): 1407-20.

Kim-Fuchs C, Le CP, Pimentel MA, Shackelford D, Ferrari D, Angst E, Hollande F, Sloan EK. Chronic stress accelerates pancreatic cancer growth and invasion: a critical role for beta-adrenergic signaling in the pancreatic microenvironment. *Brain Behav Immun*. 2014;40: 40-7.

Kin NW, Sanders VM. It takes nerve to tell T and B cells what to do. *J Leukoc Biol*. 2006;79(6):1093-104.

Kinder SJ, Tsang TE, Quinlan GA, Hadjantonakis AK, Nagy A, Tam PP. The orderly allocation of mesodermal cells to the extraembryonic structures and the anteroposterior axis during gastrulation of the mouse embryo. *Development*. 1999; 126(21): 4691-701.

Kleeff J, Reiser C, Hinz U, Bachmann J, Debus J, Jaeger D, Friess H, Büchler MW. Surgery for recurrent pancreatic ductal adenocarcinoma. *Ann Surg.* 2007; 245(4): 566-72.

Koeffler HP, Golde DW. Human myeloid leukemia cell lines: a review. *Blood.* 1980;56(3): 344-50.

Koelle MR, Horvitz HR. EGL-10 regulates G protein signaling in the *C. elegans* nervous system and shares a conserved domain with many mammalian proteins. *Cell.* 1996;84(1): 115-25.

Kondo H, Takeuchi S, Togari A.  $\beta$ -Adrenergic signaling stimulates osteoclastogenesis via reactive oxygen species. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2013;304(5): E507-15.

Kubota Y, Kimura S. Regulation of hematopoietic stem cell fate: self-renewal, quiescence and survival. In: Pelayo R, eds. 1st ed. *Advances in Hematopoietic Stem Cell Research*. Rijeka: In Tech; 2012, p:39-60.

Kulik GA, Hassan S, Karpova Y, Baurin V. Behavioral stress protects prostate cancer cells from apoptosis. *Cancer Res* 2011;71: SY04-01.

Küçükkaya B, Kan B. Derleme makalesi [Review article] - Heterotrimerik G Proteinleri. *Turk J. Biochem.* 2007;32 (1): 39-50.

Lamyel F, Warnken-Uhlich M, Seemann WK, Mohr K, Kostenis E, Ahmedat AS, Smit M, Gosens R, Meurs H, Miller-Larsson A, Racké K. The  $\beta$ 2-subtype of adrenoceptors mediates inhibition of pro-fibrotic events in human lung fibroblasts. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2011;384(2): 133-45.

Lands AM, Arnold A, McAuliff JP, Luduena FP, Brown TG Jr. Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature.* 1967;214(5088): 597-8.

Lang K, Drell TL 4th, Lindecke A, Niggemann B, Kaltschmidt C, Zaenker KS, Entschladen F. Induction of a metastatogenic tumor cell type by neurotransmitters and its pharmacological inhibition by established drugs. *Int J Cancer.* 2004;112(2): 231-8.

Lavandero S, Donoso E, Sapag-Hagar M. Beta-adrenergic receptors in rat mammary gland. *Biochem Pharmacol* 1985;34: 2034-2036.

Lawson KA, Meneses JJ, Pedersen RA. Clonal analysis of epiblast fate during germ layer formation in the mouse embryo. *Development*. 1991;113(3): 891-911.

Léauté-Labrèze C, Dumas de la Roque E, Hubiche T, Boralevi F, Thambo JB, Taïeb A. Propranolol for severe hemangiomas of infancy. *N Engl J Med*. 2008;358(24): 2649-51.

Lefkowitz RJ, Caron MG. Adrenergic receptors. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res*. 1988;21: 1-10.

Lefkowitz RJ, Caron MG. Adrenergic receptors. *Harvey Lect*. 1990;86: 33-45.

Lefkowitz RJ, Caron MG. Adrenergic receptors: molecular mechanisms of clinically relevant regulation. *Clin Res* 1985;33: 395-406.

Lefkowitz RJ, Limbird LE, Mukherjee C, Caron MG. The beta adrenergic receptor and adenylate cyclase. *Biochim Biophys Acta* 1976;457: 1-39.

Lefkowitz RJ. The beta-adrenergic receptor. *Life Sci* 1976;18: 461-472.

Leineweber K, Brodde OE. Beta2-adrenoceptor polymorphisms: relation between in vitro and in vivo phenotypes. *Life Sci*. 2004;74(23): 2803-14.

Lelias JM, Kaghad M, Rodriguez M, Chalon P, Bonnin J, Dupre I, Delpech B, Bensaid M, LeFur G, Ferrara P, Bensaid M, LeFur G, Ferrara P, Caput D. *FEBS Lett*. 1993;324(2): 127-30.

Lemeshow S, Sørensen HT, Phillips G, Yang EV, Antonsen S, Riis AH, Lesinski GB, Jackson R, Glaser R.  $\beta$ -Blockers and survival among Danish patients with malignant melanoma: a population-based cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2011;20(10): 2273-9.

Li CI, Malone KE, Weiss NS, Boudreau DM, Cushing-Haugen KL, Daling JR. Relation between use of antihypertensive medications and risk of breast carcinoma among women ages 65-79 years. *Cancer* 2003;98(7): 1504-13.

Li F , De Godoy M , Rattan S. Role of adenylate and guanylate cyclases in  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - and  $\beta_3$ -adrenoceptor-mediated relaxation of internal anal sphincter smooth muscle. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2004;308(3):1111-1120.

Liao X, Che X, Zhao W, Zhang D, Bi T, Wang G. The  $\beta$ -adrenoceptor antagonist, propranolol, induces human gastric cancer cell apoptosis and cell cycle arrest via inhibiting nuclear factor  $\kappa$ B signaling. *Oncol Rep.* 2010;24(6): 1669-76.

Liapakis G, Ballesteros JA, Papachristou S, Chan WC, Chen X, Javitch JA. The forgotten serine - A critical role for Ser-203(5.42) in ligand binding to and activation of the beta(2)-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* 2000;275: 37779-37788.

Liggett SB. Update on current concepts of the molecular basis of beta2-adrenergic receptor signaling. *J Allergy Clin Immunol.* 2002;110 (6 Suppl): S223-7.

Lin X, Luo K, Lv Z, Huang J. Beta-adrenoceptor action on pancreatic cancer cell proliferation and tumor growth in mice. *Hepatogastroenterology.* 2012;59(114): 584-588.

Lindgren ME, Fagundes CP, Alfano CM, Povoski SP, Agnese DM, Arnold MW, Farrar WB, Yee LD, Carson WE, Schmidt CR, Kiecolt-Glaser JK. Beta-blockers may reduce intrusive thoughts in newly diagnosed cancer patients. *Psychooncology.* 2013; 22(8): 1889-94.

Lippi G, Montagnana M, Franchini M. Ex-vivo red blood cells generation: a step ahead in transfusion medicine? *Eur J Intern Med.* 2011;22(1): 16-9.

Liu GX, Xi HQ, Sun XY, Wei B. Role of periostin and its antagonist PNDA-3 in gastric cancer metastasis. *World J Gastroenterol.* 2015;21(9): 2605-13.

Long MW, Heffner CH, Williams JL, Peters C, Prochownik EV. Regulation of megakaryocyte phenotype in human erythroleukemia cells. *J Clin Invest.* 1990;85(4): 1072-1084.

López-Sendón J, Swedberg K, McMurray J, Tamargo J, Maggioni AP, Dargie H, Tendera M, Waagstein F, Kjeksbus J, Lechat P, Torp-Pedersen C. Expert consensus document on beta-adrenergic receptor blockers. *Eur Heart J*. 2004;25(15): 1341-62.

Love JN, Sikka N. Are 1-2 tablets dangerous? Beta-blocker exposure in toddlers. *J Emerg Med*. 2004;26(3): 309-14.

Lowenthal DT, Saris SD, Packer J, Haratz A, Conry K. Mechanisms of action and the clinical pharmacology of beta-adrenergic blocking drugs. *Am J Med*. 1984; 77(4A): 119-27.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1): 265-75.

Lozzio CB, Lozzio BB. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*. 1975;45(3): 321-34.

Lu Z, Cui B, He B, Hu X, Wu W, Wu L, Huang C, Po SS, Jiang H. Distinct restitution properties in vagally mediated atrial fibrillation and six-hour rapid pacing-induced atrial fibrillation. *Cardiovasc Res*. 2011;89(4): 834-42.

Lung HL, Shan SW, Tsang D, Leung KN. Tumor necrosis factor-alpha mediates the proliferation of rat C6 glioma cells via beta-adrenergic receptors. *J Neuroimmunol*. 2005;166(1-2): 102-12.

Lutgendorf SK, Cole S, Costanzo E, Bradley S, Coffin J, Jabbari S, Rainwater K, Ritchie JM, Yang M, Sood AK. Stress-related mediators stimulate vascular endothelial growth factor secretion by two ovarian cancer cell lines. *Clin Cancer Res*. 2003;9(12): 4514-21.

Lutgendorf SK, Sood AK, Antoni MH. Host factors and cancer progression: biobehavioral signaling pathways and interventions. *J Clin Oncol* 2010;28: 4094-4099.

Machida CA, Bunzow JR, Searles RP, Van Tol H, Tester B, Neve KA, Teal P, Nipper V, Civelli O. Molecular cloning and expression of the rat beta 1-adrenergic receptor gene. *The Journal of Biological Chemistry*. 1990;265(22): 12960-12965.

Madden KS, Szpunar MJ, Brown EB.  $\beta$ -Adrenergic receptors ( $\beta$ -AR) regulate VEGF and IL-6 production by divergent pathways in high  $\beta$ -AR-expressing breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;130(3): 747-58.

Malbon CC. G proteins in development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(9): 689-701.

Marchetti B, Labrie F. Hormonal regulation of beta-adrenergic receptors in the rat mammary gland during the estrous cycle and lactation: role of sex steroids and prolactin. *Endocrinology.* 1990;126(1): 575-81.

Marchetti B, Spinola PG, Pelletier G, Labrie F. A potential role for catecholamines in the development and progression of carcinogen-induced mammary tumors: hormonal control of beta-adrenergic receptors and correlation with tumor growth. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1991;38(3): 307-20.

Marchetti B, Spinola PG, Plante M, Poyet P, Foll  a N, Pelletier G, Labrie F. Beta-adrenergic receptors in DMBA-induced rat mammary tumors: correlation with progesterone receptor and tumor growth. *Breast Cancer Res Treat.* 1989;13(3): 251-63.

Masur K, Niggemann B, Zanker KS, Entschladen F. Norepinephrine-induced migration of SW 480 colon carcinoma cells is inhibited by beta-blockers. *Cancer Res.* 2001;61(7): 2866-9.

McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Chang F, Lehmann B, Terrian DM, Milella M, Tafuri A, Stivala F, Libra M, Basecke J, Evangelisti C, Martelli AM, Franklin RA. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1773(8): 1263-84.

McDonald PH, Lefkowitz RJ. Beta-Arrestins: new roles in regulating heptahelical receptors' functions. *Cell Signal.* 2001;13(10): 683-9.

McGraw DW, Liggett SB. Molecular mechanisms of  $\beta$ 2-adrenergic receptor function and regulation. *Proc Am Thorac Soc* 2005;2: 292-296.

Medvinsky A, Dzierzak E. Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell*. 1996;86(6): 897-906.

Meier CR, Derby LE, Jick SS, Jick H. Angiotensin-converting enzyme inhibitors, calcium channel blockers, and breast cancer. *Arch Intern Med*. 2000;160(3): 349-53.

Melhem-Bertrandt A, Chavez-Macgregor M, Lei X, Brown EN, Lee RT, Meric-Bernstam F, Sood AK, Conzen SD, Hortobagyi GN, Gonzalez-Angulo AM. Beta-blocker use is associated with improved relapse-free survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol*. 2011;29(19): 2645-52.

Metcalf D. The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in haemopoietic cells. *Nature*. 1989;339(6219): 27-30.

Milligan G, Kostenis E. Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br J Pharmacol*. 2006;147 (Suppl 1):S46-55.

Morceau F, Aries A, Lahlil R, Devy L, Jardillier JC, Jeannesson P, Trentesaux C. Evidence for distinct regulation processes in the aclacinomycin- and doxorubicin-mediated differentiation of human erythroleukemic cells. *Biochem Pharmacol*. 1996;51(6): 839-45.

Morceau F, Chénais B, Gillet R, Jardillier JC, Jeannesson P, Trentesaux C. Transcriptional and posttranscriptional regulation of erythroid gene expression in anthracycline-induced differentiation of human erythroleukemic cells. *Cell Growth Differ*. 1996;7(8): 1023-9.

Morceau F, Dupont C, Palissot V, Borde-Chiche' P, Trentesaux C, Dicato M, Diederich M. GTP-mediated differentiation of the human K562 cell line: transient overexpression of GATA-1 and stabilization of the g-globin mRNA. *Leukemia* 2000;14: 1589-1597.

Moriguchi T, Yamamoto M. [Network regulation of Gata1 and Gata2 gene-dynamics underlies erythroid differentiation]. *Rinsho Ketsueki*. 2014;55(6):633-42.

Murate T, Hotta T, Tsushita K, Suzuki M, Yoshida T, Saga S, Saito H, Yoshida S. Aphidicolin, an inhibitor of DNA replication, blocks the TPA-induced differentiation of a human megakaryoblastic cell line, MEG-01. *Blood* 1991;78: 3168-3177.

Murate T, Saga S, Hotta T, Asano H, Ito T, Kato K, Tsushita K, Kinoshita T, Ichikawa A, Yoshida S, Saito H. The close relationship between DNA replication and the selection of differentiation lineages of human erythroleukemia cell lines K562, HEL, and TF1 into either erythroid or megakaryocytic lineages. *Exp Cell Res* 1993;208: 35-43.

Murray NR, Baumgardner GP, Burns DJ, Fields AP. Protein kinase C isotypes in human erythroleukemia (K562) cell proliferation and differentiation. Evidence that beta II protein kinase C is required for proliferation. *J Biol Chem* 1993;268: 15847-15853.

Murray P. The development in vitro of the blood of the early chick embryo. *Proc Roy Soc London* 1932;11: 497-521.

Müller AM, Medvinsky A, Strouboulis J, Grosveld F, Dzierzak E. Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo. *Immunity*. 1994;1(4): 291-301.

Nagatomo T, Ohnuki T, Ishiguro M, Ahmed M, Nakamura T. Beta-adrenoceptors: three-dimensional structures and binding sites for ligands. *Jpn J Pharmacol*. 2001;87(1): 7-13.

Nagmani R, Pasco DS, Salas RD, Feller DR. Evaluation of beta-adrenergic receptor subtypes in the human prostate cancer cell line-LNCaP. *Biochem Pharmacol*. 2003;65(9): 1489-94.

Nakane T, Szentendrei T, Stern L, Virmani M, Seely J, Kunos G. Effects of IL-1 and cortisol on beta-adrenergic receptors, cell proliferation, and differentiation in cultured human A549 lung tumor cells. *J Immunol*. 1990;145(1): 260-6.



Nantel F, Bonin H, Emorine LJ, Zilberfarb V, Strosberg AD, Bouvier M, Marullo S. The human beta 3-adrenergic receptor is resistant to short term agonist-promoted desensitization. *Mol Pharmacol*. 1993;43(4): 548-55.

Neves SR, Ram PT, Iyengar R. G protein pathways. *Science*. 2002;296(5573): 1636-9.

Oates J, Watts A. Uncovering the intimate relationship between lipids, cholesterol and GPCR activation. *Curr. Opin. Struct. Biol*. 2011;21(6): 802-807.

Oberbeck R. Catecholamines: physiological immunomodulators during health and illness. *Curr Med Chem*. 2006;13(17): 1979-89.

Ogata Y, Tomikawa M, Ozawa I, Hirabayashi K, Igarashi S, Hishinuma S. Patterns of recurrence after curative resection of pancreatic cancer, based on autopsy findings. *J Gastrointest Surg*. 2006;10(4): 511-518.

Oldham WM, Hamm HE. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(1): 60-71.

Onaran HO, Costa T, Rodbard D. Beta gamma subunits of guanine nucleotide-binding proteins and regulation of spontaneous receptor activity: thermodynamic model for the interaction between receptors and guanine nucleotide-binding protein subunits. *Mol Pharmacol*. 1993;43(2): 245-56.

Osti F, Corradini FG, Hanau S, Matteuzzi M, Gambari R. Human leukemia K562 cells: induction to erythroid differentiation by guanine, guanosine and guanine nucleotides. *Haematologica*. 1997;82(4): 395-401.

Paila YD, Chattopadhyay A, 2010. Membrane cholesterol in the function and organization of G-protein coupled receptors. *Subcell. Biochem*. 2010;51: 439-466.

Pak HN, Hong SJ, Hwang GS, Lee HS, Park SW, Ahn JC, Moo Ro Y, Kim YH. Spatial dispersion of action potential duration restitution kinetics is associated with induction of ventricular tachycardia/fibrillation in humans. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2004;15(12): 1357-63.

Palis J, Robertson S, Kennedy M, Wall C, Keller G. Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development*. 1999;126(22): 5073-5084.

Palm D, Lang K, Niggemann B, Drell TL 4th, Masur K, Zaenker KS, Entschladen F. The norepinephrine-driven metastasis development of PC-3 human prostate cancer cells in BALB/c nude mice is inhibited by beta-blockers. *Int J Cancer*. 2006;118(11): 2744-9.

Papayannopoulou T, Brice M, Stamatoyannopoulos G. Hemoglobin F synthesis in vitro: evidence for control at the level of primitive erythroid stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74(7): 2923-7.

Park PG, Merryman J, Orloff M, Schuller HM. Beta-adrenergic mitogenic signal transduction in peripheral lung adenocarcinoma: implications for individuals with preexisting chronic lung disease. *Cancer Res*. 1995;55(16): 3504-8.

Pérez Piñero C, Bruzzone A, Sarappa MG, Castillo LF, Lüthy IA. Involvement of  $\alpha$ 2- and  $\beta$ 2-adrenoceptors on breast cancer cell proliferation and tumour growth regulation. *Br J Pharmacol*. 2012;166(2): 721-36.

Pérez-Sayáns M, Somoza-Martín JM, Barros-Angueira F, Diz PG, Gándara Rey JM, García-García A. Beta-adrenergic receptors in cancer: therapeutic implications. *Oncol Res*. 2010;19(1): 45-54.

Perron L, Bairati I, Harel F, Meyer F. Antihypertensive drug use and the risk of prostate cancer (Canada). *Cancer Causes Control*. 2004;15(6): 535-41.

Philipp M, Hein L. Adrenergic receptor knockout mice: distinct functions of 9 receptor subtypes. *Pharmacol Ther*. 2004;101(1): 65-74.

Plummer HK 3rd, Yu Q, Cakir Y, Schuller HM. Expression of inwardly rectifying potassium channels (GIRKs) and beta-adrenergic regulation of breast cancer cell lines. *BMC Cancer*. 2004;4: 93.

Powe DG, Voss MJ, Zänker KS, Habashy HO, Green AR, Ellis IO, Entschladen F. Beta-blocker drug therapy reduces secondary cancer formation in breast cancer and improves cancer specific survival. *Oncotarget*. 2010;1(7): 628-38.

Pressley L, Higgs DR, Clegg JB, Weatherall DJ. Gene deletions in alpha thalassemia prove that the 5' zeta locus is functional. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980; 77(6):3586-3589.

Profous-Juchelka HR, Reuben RC, Marks PA, Rifkind RA. Transcriptional and post-transcriptional regulation of globin gene accumulation in murine erythroleukemia cells. *Mol Cell Biol*. 1983;3(2): 229-32.

Pucadyil TJ, Chattopadhyay A. Role of cholesterol in the function and organization of G-protein coupled receptors. *Prog. Lipid Res*. 2006;45(4), 295-333.

Quốc Lu'o'ng KV, Nguyễn LT. The roles of beta-adrenergic receptors in tumorigenesis and the possible use of beta-adrenergic blockers for cancer treatment: possible genetic and cell-signaling mechanisms. *Cancer Manag Res*. 2012;4: 431-45.

Ramu P, Mahesh Kumar KN, Shewade DG, Swaminathan RP, Dutta TK, Balachander J, Adithan C. Polymorphic variants of beta1 adrenergic receptor gene (Ser49Gly & Arg389Gly) in healthy Tamilian volunteers. *Indian J Med Res*. 2010;132: 62-6.

Rask-Andersen M, Almén MS, Schiöth HB. Trends in the exploitation of novel drug targets. *Nat Rev Drug Discov*. 2011;10(8): 579-90.

Raymond JR, Hnatowich M, Lefkowitz RJ, Caron MG. Adrenergic receptors. Models for regulation of signal transduction processes. *Hypertension*. 1990;15(2): 119-31.

Re G, Badino P, Girardi C, Di Carlo F. Effects of a beta 2-agonist (clenbuterol) on cultured human (CG-5) breast cancer cells. *Pharmacol Res*. 1992;26(4): 377-84.

Reiter MJ. Cardiovascular drug class specificity: beta-blockers. *Prog Cardiovasc Dis*. 2004;47(1): 11-33.

Rodriguez C, Jacobs EJ, Deka A, Patel AV, Bain EB, Thun MJ, Calle EE. Use of blood-pressure-lowering medication and risk of prostate cancer in the Cancer Prevention Study II Nutrition Cohort. *Cancer Causes Control*. 2009;20(5): 671-9.

Rohrer DK, Desai KH, Jasper JR, Stevens ME, Regula DP Jr, Barsh GS, Bernstein D, Kobilka BK. Targeted disruption of the mouse beta1-adrenergic receptor gene: developmental and cardiovascular effects. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(14): 7375-80.

Rooney DE, Czepulkowski BH. Tissue culture methods in human cytogenetics. In: Czepulkowski BH, eds. *Human cytogenetics*. 2nd ed. Oxford-Washington DC: IRL Press; 1978, p:1-37

Rosenbaum DM, Cherezov V, Hanson MA, Rasmussen SG, Thian FS, Kobilka TS, Choi HJ, Yao XJ, Weis WI, Stevens RC, Kobilka BK. GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta2-adrenergic receptor function. *Science*. 2007;318(5854): 1266-73.

Rowley JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*. 1973;243(5405): 290-3.

Rowley PT, Ohlsson-Wilhelm BM, Farley BA, LaBella S. Inducers of erythroid differentiation in K562 human leukemia cells. *Exp Hematol*. 1981;9(1): 32-7.

Rutherford T, Clegg JB, Higgs DR, Jones RW, Thompson J, Weatherall DJ. Embryonic erythroid differentiation in the human leukemic cell line K562. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981;78(1): 348-352.

Rutherford TR, Clegg JB, Weatherall DJ. K562 human leukaemic cells synthesise embryonic haemoglobin in response to haemin. *Nature*. 1979;280(5718): 164-5.

Sabin F. Studies on the origin of blood vessels and of red blood corpuscles as seen in the living blastoderm of chicks during the second day of incubation. In: Sabin F, eds. 1st ed. Washington DC: Carnegie Institute of Washington; 1920, p: 214.

Samet I, Villareal MO, Motojima H, Han J, Sayadi S, Isoda H. Olive leaf components apigenin 7-glucoside and luteolin 7-glucoside direct human hematopoietic stem cell differentiation towards erythroid lineage. *Differentiation*. 2015;89(5): 146-55.

Samid D, Yeh A, Prasanna P. Induction of erythroid differentiation and fetal hemoglobin production in human leukemic cells treated with phenylacetate. *Blood*. 1992;80(6): 1576-81.

Sánchez-Carpintero I, Ruiz-Rodríguez R, López-Gutiérrez JC. Propranolol in the treatment of infantile hemangioma: clinical effectiveness, risks, and recommendations. *Actas Dermosifiliogr*. 2011;102(10): 766-79.

Sato D, Shiferaw Y, Garfinkel A, Weiss JN, Qu Z, Karma A. Spatially discordant alternans in cardiac tissue: role of calcium cycling. *Circ Res* 2006;99: 520-7.

Sato T, Kobayashi H, Nagao T, Kurose H. Ser(203) as well as Ser(204) and Ser(207) in fifth transmembrane domain of the human beta(2)-adrenoceptor contributes to agonist binding and receptor activation. *Br. J. Pharmacol*. 1999;128: 272-274.

Schlyer S, Horuk R. I want a new drug: G-protein-coupled receptors in drug development. *Drug Discov Today*. 2006;11(11-12): 481-93.

Schuller HM, Al-Wadei HA, Ullah MF, Plummer HK 3rd. Regulation of pancreatic cancer by neuropsychological stress responses: a novel target for intervention. *Carcinogenesis*. 2012;33(1):191-6.

Schuller HM, Al-Wadei HA. Neurotransmitter receptors as central regulators of pancreatic cancer. *Future Oncol*. 2010;6(2): 221-8.

Schuller HM, Cole B. Regulation of cell proliferation by beta-adrenergic receptors in a human lung adenocarcinoma cell line. *Carcinogenesis*. 1989;10(9): 1753-5.

Schuller HM, Cole B. Regulation of cell proliferation by beta-adrenergic receptors in a human lung adenocarcinoma cell line. *Carcinogenesis*. 1989;10(9): 1753-5.

Schuller HM, Porter B, Riechert A. Beta-adrenergic modulation of NNK-induced lung carcinogenesis in hamsters. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2000;126(11): 624-30.

Schuller HM, Porter B, Riechert A. Beta-adrenergic modulation of NNK-induced lung carcinogenesis in hamsters. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2000;126(11): 624-30.

Schuller HM. Mechanisms of smoking-related lung and pancreatic adenocarcinoma development. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(6): 455-63.

Schuller HM. *Nat Rev Cancer*. Is cancer triggered by altered signalling of nicotinic acetylcholine receptors? 2009;9(3): 195-205.

Schuller HM. Neurotransmission and cancer: implications for prevention and therapy. *Anticancer Drugs*. 2008;19(7): 655-71.

Schuller HM: Mechanisms of smoking-related lung and pancreatic adenocarcinoma development. *Nat Rev Cancer* 2002;2: 455-463.

Shen JX. Isoprenaline enhances local Ca<sup>2+</sup> release in cardiac myocytes. *Acta Pharmacol Sin*. 2006;27(7): 927-32.

Sheppard BJ, Williams M, Plummer HK, Schuller HM. Activation of voltage-operated Ca<sup>2+</sup>-channels in human small cell lung carcinoma by the tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *International Journal of Oncology*. 2000;16(3): 513-8.

Shi M, Liu D, Duan H, Qian L, Wang L, Niu L, Zhang H, Yong Z, Gong Z, Song L, Yu M, Hu M, Xia Q, Shen B, Guo N. The  $\beta$ 2-adrenergic receptor and Her2 comprise a positive feedback loop in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;125(2): 351-62.

Siddiqui NF, Shabrani NC, Kale VP, Limaye LS. Enhanced generation of megakaryocytes from umbilical cord blood-derived CD34(+) cells expanded in the presence of two nutraceuticals, docosahexanoic acid and arachidonic acid, as supplements to the cytokine-containing medium. *Cytotherapy*. 2011;13(1): 114-28.

Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2012;62(1): 10-29.

Sloan EK, Priceman SJ, Cox BF, Yu S, Pimentel MA, Tangkanangnukul V, Arevalo JM, Morizono K, Karanikolas BD, Wu L, Sood AK, Cole SW. The sympathetic nervous system induces a metastatic switch in primary breast cancer. *Cancer Res*. 2010;70(18): 7042-52.

Slotkin TA, Zhang J, Dancel R, Garcia SJ, Willis C, Seidler FJ. Beta-adrenoceptor signaling and its control of cell replication in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2000;60(2): 153-66.

Socolovsky M. Molecular insights into stress erythropoiesis. *Curr Opin Hematol*. 2007;14(3): 215-24.

Sood AK, Armaiz-Pena GN, Halder J, Nick AM, Stone RL, Hu W, Carroll AR, Spannuth WA, Deavers MT, Allen JK, Han LY, Kamat AA, Shahzad MM, McIntyre BW, Diaz-Montero CM, Jennings NB, Lin YG, Merritt WM, DeGeest K, Vivas-Mejia PE, Lopez-Berestein G, Schaller MD, Cole SW, Lutgendorf SK. Adrenergic modulation of focal adhesion kinase protects human ovarian cancer cells from anoikis. *J Clin Invest*. 2010;120(5): 1515-23.

Sood AK, Bhatti R, Kamat AA, Landen CN, Han L, Thaker PH, Li Y, Gershenson DM, Lutgendorf S, Cole SW. Stress hormone-mediated invasion of ovarian cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2006;12(2): 369-75.

Soudijn W, van Wijngaarden I, Ijzerman AP. Structure-activity relationships of inverse agonists for G-protein-coupled receptors. *Med Res Rev*. 2005;25(4): 398-426.

Sperti C, Pasquali C, Piccoli A, Pedrazzoli S. Recurrence after resection for ductal adenocarcinoma of the pancreas. *World J Surg*. 1997;21(2): 195-200.

Spiegel D, Butler LD, Giese-Davis J, Koopman C, Miller E, DiMiceli S, Classen CC, Fobair P, Carlson RW, Kraemer HC. Effects of supportive-expressive group

therapy on survival of patients with metastatic breast cancer: a randomized prospective trial. *Cancer*. 2007;110(5): 1130-8.

Sprang SR. G protein mechanisms: insights from structural analysis. *Annu Rev Biochem*. 1997;66: 639-78.

Spreng M, Cotecchia S, Schenk F. A behavioral study of alpha-1b adrenergic receptor knockout mice: increased reaction to novelty and selectively reduced learning capacities. *Neurobiol Learn Mem*. 2001;75(2): 214-29.

Stiles GL, Caron MG, Lefkowitz RJ. Beta-adrenergic receptors: biochemical mechanisms of physiological regulation. *Physiol Rev*. 1984;64(2):661-743.

Stiles J, Amaya C, Pham R, Rowntree RK, Lacaze M, Mulne A, Bischoff J, Kokta V, Boucheron LE, Mitchell DC, Bryan BA. Propranolol treatment of infantile hemangioma endothelial cells: A molecular analysis. *Exp Ther Med*. 2012;4(4): 594-604.

Strader CD, Candelore MR, Hill WS, Sigal IS, Dixon RA. Identification of two serine residues involved in agonist activation of the beta-adrenergic receptor. *J Biol Chem*. 1989;264(23): 13572-8.

Strosberg AD. Structure, function, and regulation of adrenergic receptors. *Protein Sci*. 1993;2(8): 1198-209.

Subramaniam G, Trusov Y, Lopez-Encina C, Hayashi S, Batley J, Botella JR. Type B Heterotrimeric G Protein  $\gamma$ -Subunit Regulates Auxin and ABA Signaling in Tomato. *Plant Physiol*. 2016;170(2): 1117-34.

Sugimoto Y, Fujisawa R, Tanimura R, Lattion AL, Cotecchia S, Tsujimoto G, Nagao T, Kurose H. Beta(1)-selective agonist (-)-1-(3,4-dimethoxyphenethylamino)-3-(3,4-dihydroxy)-2-propanol [(-)-RO363] differentially interacts with key amino acids responsible for beta(1)-selective binding in resting and active states. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;301(1): 51-8.



Takahashi S, Ogata Y, Miyazaki H, Maeda D, Murai S, Yamataka K, Tsuzuki T. Aggressive surgery for pancreatic duct cell cancer: feasibility, validity, limitations. *World J Surg.* 1995;19(4): 653-9; discussion 660.

Takano Y, Ueyama T, Ishikura F. Azelnidipine, unique calcium channel blocker could prevent stress-induced cardiac dysfunction like  $\alpha$ - $\beta$  blocker. *J Cardiol.* 2012; 60(1): 18-22.

Tallack MR, Perkins AC. Three fingers on the switch: Krüppel-like factor 1 regulation of  $\gamma$ -globin to  $\beta$ -globin gene switching. *Curr Opin Hematol.* 2013;20(3): 193-200.

Tamargo J, Delpón E. Optimization of beta-blockers' pharmacology. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1990;16 (Suppl 5):S10-8.

Tan KS, Nackley AG, Satterfield K, Maixner W, Diatchenko L, Flood PM. Beta2 adrenergic receptor activation stimulates pro-inflammatory cytokine production in macrophages via PKA- and NF-kappaB-independent mechanisms. *Cell Signal.* 2007;19(2): 251-60.

Tang J, Li Z, Lu L, Cho CH.  $\beta$ -Adrenergic system, a backstage manipulator regulating tumour progression and drug target in cancer therapy. *Semin Cancer Biol.* 2013;23(6 Pt B): 533-42.

ten Tusscher KH, Panfilov AV. Alternans and spiral breakup in a human ventricular tissue model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;291(3): H1088-100.

Tetteroo PA, Massaro F, Mulder A, Schreuder-van Gelder R, von dem Borne AE. Megakaryoblastic differentiation of proerythroblastic K562 cell-line cells. *Leuk Res.* 1984;8(2): 197-206.

Thaker PH, Han LY, Kamat AA, Arevalo JM, Takahashi R, Lu C, Jennings NB, Armaiz-Pena G, Bankson JA, Ravoory M, Merritt WM, Lin YG, Mangala LS, Kim TJ, Coleman RL, Landen CN, Li Y, Felix E, Sanguino AM, Newman RA, Lloyd M, Gershenson DM, Kundra V, Lopez-Berestein G, Lutgendorf SK, Cole SW, Sood AK. Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of ovarian carcinoma. *Nat Med.* 2006;12(8): 939-44.

Thaker PH, Lutgendorf SK, Sood AK. The neuroendocrine impact of chronic stress on cancer. *Cell Cycle.* 2007;6(4): 430-3.

Thaker PH, Sood AK. Neuroendocrine influences on cancer biology. *Semin Cancer Biol.* 2008;18(3):164-70.

Thomsen W, Frazer J, Unett D. Functional assays for screening GPCR targets. *Curr Opin Biotechnol.* 2005;16(6): 655-65.

Tonolo G, Melis MG, Secchi G, Atzeni MM, Angius MF, Carboni A, Ciccarese M, Malavasi A, Maioli M. Association of Trp64Arg beta 3-adrenergic-receptor gene polymorphism with essential hypertension in the Sardinian population. *J Hypertens.* 1999;17(1): 33-8.

Tseng GN. Calcium current restitution in mammalian ventricular myocytes is modulated by intracellular calcium. *Circ Res.* 1988;63(2): 468-82.

Turner NA, Porter KE, Smith WH, White HL, Ball SG, Balmforth AJ. Chronic beta2-adrenergic receptor stimulation increases proliferation of human cardiac fibroblasts via an autocrine mechanism. *Cardiovasc Res.* 2003;57(3): 784-92.

Tuteja N. Signaling through G protein coupled receptors. *Plant Signal Behav.* 2009;4(10): 942-7.

van Spronsen A, Nahmias C, Krief S, Briend-Sutren MM, Strosberg AD, Emorine LJ. The promoter and intron/exon structure of the human and mouse beta 3-adrenergic-receptor genes. *Eur J Biochem.* 1993;213(3): 1117-24.

Vandewalle B, Revillion F, Lefebvre J. Functional beta-adrenergic receptors in breast cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1990;116(3): 303-6.

Vendrell J, Gutierrez C, Broch M, Fernandez-Real JM, Aguilar C, Richart C. Beta 3-adrenoreceptor gene polymorphism and leptin. Lack of relationship in type 2 diabetic patients. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1998;49(5): 679-83.

Wachter SB, Gilbert EM. Beta-adrenergic receptors, from their discovery and characterization through their manipulation to beneficial clinical application. *Cardiology*. 2012;122(2): 104-12.

Walasek MA, van Os R, de Haan G. Hematopoietic stem cell expansion: challenges and opportunities. *Ann N Y Acad Sci*. 2012;1266: 138-50.

Wang H, Li Y, Wang S, Zhang Q, Zheng J, Yang Y, Qi H, Qu H, Zhang Z, Liu F, Fang X. Knockdown of transcription factor forkhead box O3 (FOXO3) suppresses erythroid differentiation in human cells and zebrafish. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;460(4): 923-30.

Warne T, Serrano-Vega MJ, Baker JG, Moukhametzianov R, Edwards PC, Henderson R, Leslie AGW, Tate CG, Schertler GFX .Structure of a  $\beta$ 1-adrenergic G protein-coupled receptor. *Nature*. 2008;454(7203): 486-491.

Weddle DL, Tithoff P, Williams M, Schuller HM. Beta-adrenergic growth regulation of human cancer cell lines derived from pancreatic ductal carcinomas. *Carcinogenesis*. 2001;22(3): 473-9.

Weiser M, Frishman WH, Michaelson MD, Abdeen MA. The pharmacologic approach to the treatment of obesity. *J Clin Pharmacol*. 1997;37(6): 453-73.

Weiss JN, Karma A, Shiferaw Y, Chen PS, Garfinkel A, Qu Z. From pulsus to pulseless: the saga of cardiac alternans. *Circ Res*. 2006;98(10): 1244-53.

Wilson C, Wilson S, Piercy V, Sennitt MV, Arch JR. The rat lipolytic beta-adrenoceptor: studies using novel beta-adrenoceptor agonists. *Eur J Pharmacol*. 1984; 100(3-4): 309-19.

Wolter JK, Wolter NE, Blanch A, Partridge T, Cheng L, Morgenstern DA, Podkowa M, Kaplan DR, Irwin MS. Anti-tumor activity of the beta-adrenergic receptor antagonist propranolol in neuroblastoma. *Oncotarget*. 2014; 5(1): 161-72.

Wolter NE, Wolter JK, Enepekides DJ, Irwin MS. Propranolol as a novel adjunctive treatment for head and neck squamous cell carcinoma. *J Otolaryngol Head Neck Surg.* 2012;41(5): 334-44.

Wong HP, Ho JW, Koo MW, Yu L, Wu WK, Lam EK, Tai EK, Ko JK, Shin VY, Chu KM, Cho CH. Effects of adrenaline in human colon adenocarcinoma HT-29 cells. *Life Sci.* 2011;88(25-26): 1108-12.

Wu H, Klingmuller U, Besmer P, Lodish HF. Interaction of the erythropoietin and stem-cell-factor receptors. *Nature* 1995;377: 242-246.

Wu H, Klingmüller U, Besmer P, Lodish HF. Interaction of the erythropoietin and stem-cell-factor receptors. *Nature.* 1995;377(6546): 242-6.

Wu WK, Wong HP, Luo SW, Chan K, Huang FY, Hui MK, Lam EK, Shin VY, Ye YN, Yang YH, Cho CH. 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone from cigarette smoke stimulates colon cancer growth via beta-adrenoceptors. *Cancer Res.* 2005;65(12): 5272-7.

Xu J, Zimmer DB. Differential regulation of A gamma and G gamma fetal hemoglobin mRNA levels by hydroxyurea and butyrate. *Exp Hematol.* 1998;26(3): 265-72.

Yang EV, Kim SJ, Donovan EL, Chen M, Gross AC, Webster Marketon JI, Barsky SH, Glaser R. Norepinephrine upregulates VEGF, IL-8, and IL-6 expression in human melanoma tumor cell lines: implications for stress-related enhancement of tumor progression. *Brain Behav Immun.* 2009;23(2): 267-75.

Yang EV, Sood AK, Chen M, Li Y, Eubank TD, Marsh CB, Jewell S, Flavahan NA, Morrison C, Yeh PE, Lemeshow S, Glaser R. Norepinephrine up-regulates the expression of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase (MMP)-2, and MMP-9 in nasopharyngeal carcinoma tumor cells. *Cancer Res.* 2006;66(21): 10357-64.

Yang-Feng TL, Xue FY, Zhong WW, Cotecchia S, Frielle T, Caron MG, Lefkowitz RJ, Francke U. Chromosomal organization of adrenergic receptor genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(4): 1516-20.

Yien YY, Bieker JJ. EKLF/KLF1, a tissue-restricted integrator of transcriptional control, chromatin remodeling, and lineage determination. *Mol Cell Biol*. 2013; 33(1): 4-13.

Zabora J, BrintzenhofeSzoc K, Curbow B, Hooker C, Piantadosi S. The prevalence of psychological distress by cancer site. *Psychooncology*. 2001; 10(1): 19-28.

Zauli G, Bassini A, Catani L, Gibellini D, Celeghini C, Borgatti P, Caramelli E, Guidotti L, Capitani S. PMA-induced megakaryocytic differentiation of HEL cells is accompanied by striking modifications of protein kinase C catalytic activity and isoform composition at the nuclear level. *Br. J. Haematol*. 1996;92: 530-536.

Zhang D, Ma Q, Shen S, Hu H. Inhibition of pancreatic cancer cell proliferation by propranolol occurs through apoptosis induction: the study of beta-adrenoceptor antagonist's anticancer effect in pancreatic cancer cell. *Pancreas*. 2009;38(1): 94-100.

Zhang D, Ma Q, Wang Z, Zhang M, Guo K, Wang F, Wu E.  $\beta$ 2-adrenoceptor blockage induces G1/S phase arrest and apoptosis in pancreatic cancer cells via Ras/Akt/NF $\kappa$ B pathway. *Mol Cancer*. 2011;10: 146.

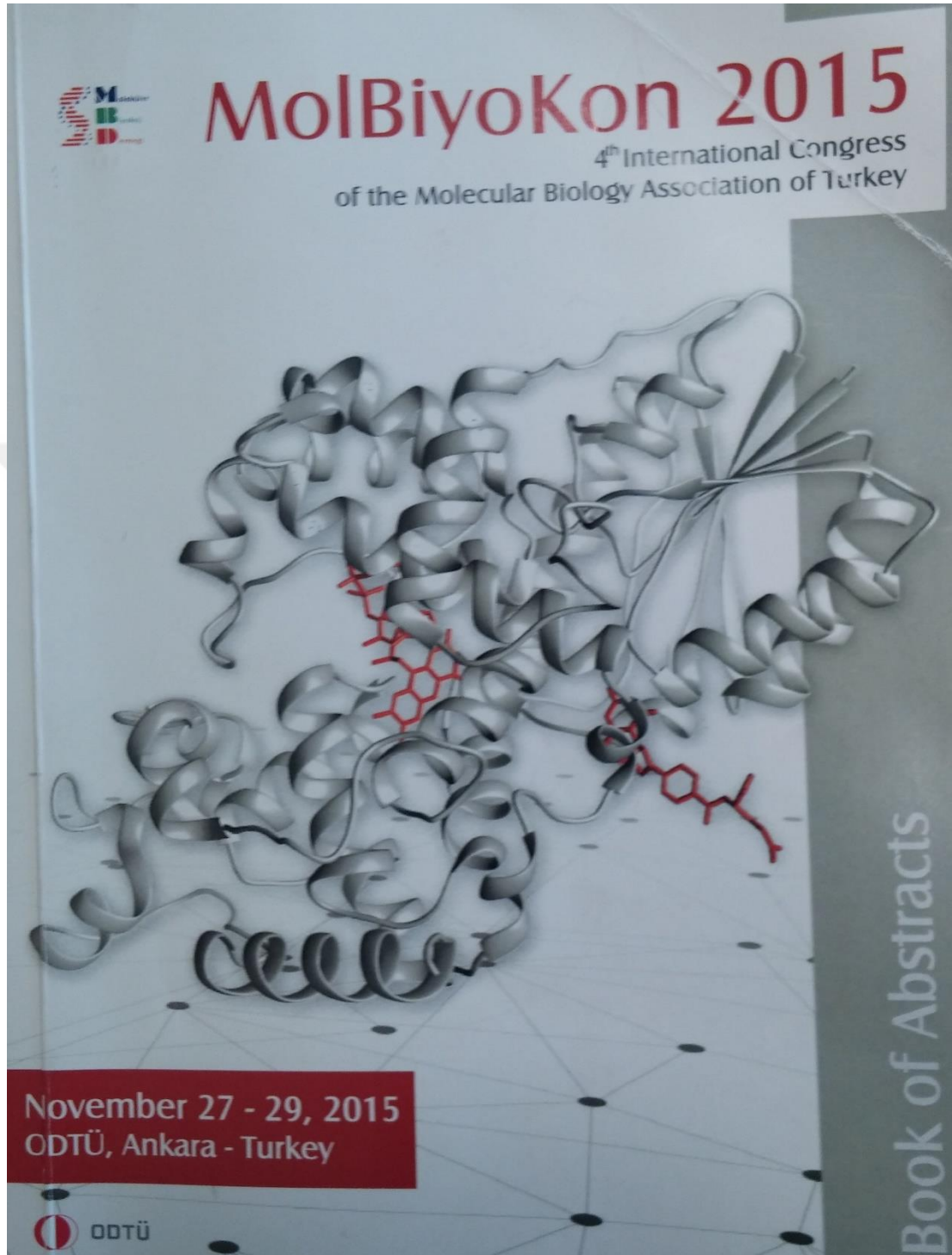
Zhang D, Ma QY, Hu HT, Zhang M.  $\beta$ 2-adrenergic antagonists suppress pancreatic cancer cell invasion by inhibiting CREB, NF $\kappa$ B and AP-1. *Cancer Biol Ther*. 2010;10(1): 19-29.

**EK-1**

Etik kurul iznine gerek bulunmamaktadır.



EK-2



CANCER BIOLOGY

P83

Effects of Propranolol on Human Erythroid Differentiated K562 Cell Proliferation

Ant Y. Uğurdağ<sup>1</sup>, Banu Aydın<sup>1</sup>, M.Zafer Gören<sup>2</sup>, Hülya Cabadak<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Marmara University, School Of Medicine, Department Of Biophysics, <sup>2</sup>School Of Medicine, Medical Pharmacology, İstanbul, Turkey

$\beta$ -adrenergic antagonist, propranolol may be important treatments for leukemia.  $\beta$ -adrenergic agonist, isoprenaline stimulated erythroid differentiated K562 cell proliferation in 48 h. Propranolol and isoprenaline inhibited cell proliferation 48 h. The  $\beta$  adrenergic agonist, caused a decrease in DNA synthesis in the human erythroid differentiated K562 cells in 24h. This isoprenaline-induced inhibition was not reversed by propranolol. On the contrary, BrDU incorporation was further reduced by 12% of control in the presence of propranolol. Isoprenaline stimulated the human erythroid differentiated K562 cell proliferation in 48h, Isoprenaline-treatment in the presence of propranolol, inhibited these cell proliferation in 48h. Propranolol also have inhibitory effect on erythroid differentiated K562 cell proliferation. In our experiments, the  $\beta_{1,2}$ -adrenergic expression was detected in the human erythroid differentiated K562 cells. Isoprenaline,  $\beta$ -adrenergic receptor antagonist, propranolol (10 $\mu$ M), when used, was added 30 min prior to adding the agonist. After 24 hours and 48 hours, cells were counted by BrDU cell proliferation kit.  $\beta_{1,2}$ -adrenergic receptor expression was determined by western blot analysis. in human erythroid differentiated K562 cells. Erythroid differentiated K562 cells treated with isoprenaline (100  $\mu$ M), beta adrenergic agonist or its vehicle.  $\beta_{1,2,3}$ -adrenergic receptors, are expressed in different tumor types, such as those of the brain, lung, liver, kidney, adrenal gland, breast, ovary, prostate or lymphoid tissues. Recently different studies implicated that propranolol inhibited cancer cell proliferation. In the present study, we investigated to the expression of  $\beta$ -adrenergic receptors are members of the G-protein-coupled receptors. These receptors are involved in distinct downstream signalling pathways.

This study was supported by a grant from Marmara University Research Fund SAG-B-110913-0363



## ÖZGEÇMİŞ

|                   |                      |                     |            |
|-------------------|----------------------|---------------------|------------|
| <b>Adı</b>        | Yiğit Ant            | <b>Soyadı</b>       | UĞURDAĞ    |
| <b>Doğum Yeri</b> | BEYOĞLU              | <b>Doğum Tarihi</b> | 01/03/1989 |
| <b>Uyruğu</b>     | T.C.                 | <b>Tel</b>          |            |
| <b>E-mail</b>     | antugurdag@gmail.com |                     |            |

### Eğitim Düzeyi

|                         | Mezun Olduğu Kurumun Adı            | Mezuniyet Yılı |
|-------------------------|-------------------------------------|----------------|
| <b>Doktora/Uzmanlık</b> |                                     |                |
| <b>Yüksek Lisans</b>    | Marmara Üniversitesi                | -              |
| <b>Lisans</b>           | Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi | 2012           |
| <b>Lise</b>             | Hasan Şadoğlu Lisesi                | 2006           |

### İş Deneyimi

|  | Görevi                              | Kurum                                        | Süre (Yıl - Yıl) |
|--|-------------------------------------|----------------------------------------------|------------------|
|  | Numune Kabul ve Raporlama Sorumlusu | Mikrokim Gıda Analiz ve Kontrol Laboratuvarı | 06/2015-12/2015  |

| Yabancı Dilleri | Okuduğunu Anlama* | Konuşma* | Yazma* |
|-----------------|-------------------|----------|--------|
| İngilizce       | İyi               | İyi      | İyi    |

| Yabancı Dil Sınav Notu # |     |       |           |           |           |     |     |     |
|--------------------------|-----|-------|-----------|-----------|-----------|-----|-----|-----|
| YDS                      | ÜDS | IELTS | TOEFL IBT | TOEFL PBT | TOEFL CBT | FCE | CAE | CPE |
| 57,50                    |     |       |           |           |           |     |     |     |

|                      | Sayısal | Eşit Ağırlık | Sözel |
|----------------------|---------|--------------|-------|
| <b>ALES Puanı</b>    | 65,91   | 66,34        | 65,52 |
| <b>(Diğer) Puanı</b> |         |              |       |

### Bilgisayar Bilgisi

| Program                                 | Kullanma becerisi |
|-----------------------------------------|-------------------|
| Bio-Rad CFX Manager                     | İyi               |
| Image J                                 | Orta              |
| iMark Microplate Manager                | İyi               |
| LI-COR Image Studio Lite                | İyi               |
| Mikro Muhasebe                          | Orta              |
| MS Ofis Uygulamaları                    | Çok iyi           |
| Shimadzu BioSpec-nano Spectrophotometer | Çok iyi           |
| Tenay Gıda Asistanı                     | Çok iyi           |
| Thermo Fisher Scientific SkanIt         | Çok iyi           |

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendiriniz.

**EK :** Diğer Bilimsel faaliyetler (yayın, kongre bildirisi vs.)

|                   |                                      |               |               |
|-------------------|--------------------------------------|---------------|---------------|
| YİĞİT ANT UĞURDAĞ | MARMARA ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST. | YÜKSEK LİSANS | İSTANBUL-2016 |
|-------------------|--------------------------------------|---------------|---------------|