



T. C.

ORDU ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PIOGLİTAZON'UN İNSAN MESANE HÜCRELERİNDE
HÜCRE CANLILIĞINA ETKİSİNİN VE NEOPLASTİK
TRANSFORMASYON POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI**

EMRE İLKUN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

ORDU 2019

T.C.
ORDU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**PIOGLİTAZON'UN İNSAN MESANE HÜCRELERİNDE
HÜCRE CANLILIĞINA ETKİSİNİN VE NEOPLASTİK
TRANSFORMASYON POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI**

EMRE İLKUN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ORDU 2019

TEZ ONAY

Emre İLKUN tarafından hazırlanan “**PIOGLITAZON’UN İNSAN MESANE HÜCRELERİNDE HÜCRE CANLILIĞINA ETKİSİNİN VE NEOPLASTİK TRANSFORMASYON POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 19.12.2019 tarihinde yapılmış ve jüri tarafından oy birliği ile Ordu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman
Doç. Dr. Vedat ŞEKEROĞLU


Jüri Üyeleri

Danışman
Doç. Dr. Vedat ŞEKEROĞLU
Moleküler Biyoloji ve Genetik,
Ordu Üniversitesi

Üye
Prof. Dr. Sevil IŞIK
Cerrahi Tıp Bölümleri, Ordu Üniversitesi

Üye
Dr. Öğr. Üyesi Rukiye DEMİR
Biyomedikal Mühendisliği, Samsun Üniversitesi

İmza







24 / 12 / 2019 tarihinde enstitüye teslim edilen bu tezin kabulü, Enstitü Yönetim Kurulu'nun 20 / 12 / 2019 tarih ve 2019 / 781. sayılı kararı ile onaylanmıştır.




Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Selahattin MADEN

TEZ BİLDİRİMİ

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan ve kullanılan intihal tespit programının sonuçlarına göre; bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu,, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.



EMRE İLKUN

Bu çalışma Ordu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğünün A-1831 numaralı projesiyle desteklenmiştir.

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

PIOGLİTAZON'UN İNSAN MESANE HÜCRELERİNDE HÜCRE CANLILIĞINA ETKİSİNİN VE NEOPLASTİK TRANSFORMASYON POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI

EMRE İLKUN

ORDU ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ, 89 SAYFA

TEZ DANIŞMANI: Doç. Dr. VEDAT ŞEKEROĞLU

Glikoz metabolizmasının bozulması sonucu oluşan tip 2 diyabet hastalığının tedavisinden kullanılan etken maddelerden biri olan pioglitazon (PIO) çağımızda en çok tercih edilen diyabet ilaçlarının başında gelmektedir. PIO hakkında birçok yararlı bilgi olmakla birlikte PIO içeren ilaç kullanan hastalarda mesane kanseri insidansının arttığına yönelik iddialar bulunmaktadır. Yapılan in vivo ve grup çalışmalarında bu etkisini birçok kez vurgulanmıştır.

PIO'un insan mesane kanseri riskini artırıp artırmadığını incelemek amacıyla hücre kültürü temeli üzerine kurduğumuz bu çalışmayla tespit edilmeye çalışılmıştır. Uygulanan metodlarda hTERT-Uro Cell olarak adlandırılan immortal sağlıklı insan mesane hücrelerini kullanılmıştır. Çalışmamızda kullanılması planlanan PIO'un insan mesane hücrelerinde (hTERT-Uro) 24, 48 ve 72 saatlik uygulamaları sonucu hücre canlılığına etkisi incelenmiştir. PIO'un sitotoksik etkisi, canlı ve proliferen hücrelerin tespitini sağlayan, mitokondriyal aktivite bazlı MTT testi ile, hücrelerin potansiyel kanserleşme durumlarını da Transformasyon (Kontak İnhibisyon) testiyle ve Soft Agar (Ankoraj Bağımsız Test) ile ölçülmüştür. PIO'un deneyde kullanılacak dozlarının belirlenmesi ve hTERT-Uro hücre hattı için IC₅₀ değerinin belirlenmesi amacıyla 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 250 µM'lık (sırasıyla PIO dozları) 8 dozluk bir skala ile mtt testi gerçekleştirilmiştir. Bu deneyler sonucunda, 72 saat uygulamada IC₅₀ değerleri PIO için 44 µM olarak belirlenmiştir. Ayrıca bu testler sonucu belirlenen PIO dozlarının 10, 20, 40 µM'lık 3 dozu kontak inhibisyon ve ankoraj bağımsız testlerinde kullanılmıştır. Deney verilerinin de PIO'un hTERT-Uro hücre hattında ve kullanılan deney şartlarında dozların artışına bağlı olarak sitotoksik etki gösterdiğini ayrıca kontak inhibisyon ve ankoraj bağımsız testlerinde hücrelerde kanserleşmeye neden olduğu gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Pioglitazon, İnsan Mesane Epitel, Kontak İnhibisyon, Hücre Canlılığı, Ankoraj Bağımsız Test

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF PIOGLITAZONE ON CELL VIABILITY AND ITS NEOPLASTIC TRANSFORMATION POTENTIAL ON HUMAN BLADDER CELLS

EMRE İLKUN

ORDU UNIVERSITY INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

MASTER THESIS, 89 PAGES

SUPERVISOR: Assoc. Prof. Dr. VEDAT ŞEKEROĞLU

Pioglitazone (PIO), which is one of the active substances used in the treatment of type 2 diabetes caused by disruption of glucose metabolism, is one of the most preferred diabetes drugs in our age. Although there is a lot of useful information about PIO, there are claims that the incidence of bladder cancer is increased in patients using PIO-containing drugs. This effect has been emphasized many times in in vivo and group studies.

The aim of this study was to determine whether PIO increases the risk of human bladder cancer. In the applied methods, immortal healthy human bladder cells called hTERT-Uro Cell were used. In this study, the effect of PIO on human viability in human bladder cells (hTERT-Uro) after 24, 48 and 72 hours of application was investigated. The cytotoxic effect of PIO was measured by MTT test based on mitochondrial activity, which enables the detection of viable and proliferating cells, and the potential cancers of the cells by Transformation (Contact Inhibition) test and Soft Agar (Anchorage Independent Test). In order to determine the doses of PIO to be used in the experiment and to determine the IC₅₀ value for the hTERT-Uro cell line, the mtt test was performed with an 8-dose scale of 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 250 µM (PIO doses respectively). As a result of these experiments, IC₅₀ values were determined as 44 µM for PIO at 72 hours application. In addition, 3 doses of 10, 20, 40 µM of PIO doses determined as a result of these tests were used in contact inhibition and anchorage independent tests. Experimental data showed that PIO showed cytotoxic effect due to increase of doses in Htert-Uro cell line and experimental conditions used and also caused cancer in cells in contact inhibition and anchorage independent tests.

Keywords: Pioglitazone, Human Bladder Epithelium, Contact Inhibition, Cell Viability, Anchorage Independent Test

TEŐEKKÜR

Tez konumun belirlenmeside, y¼r¼t¼lmesi ve yazımında baŐta danışman hocam Sayın Doç. Dr. Vedat ŞEKEROĞLU'na, laboratuvardaki çeşitli çalışmalarda öğrettikleri ve yaptığı yardımlarından dolayı Sayın Prof. Dr. Z¼lal ATLI ŞEKEROĞLU'na, çalışmalar esnasında verdiği desteklerden dolayı Sayın Seval KontaŐ Yedier'e ve son olarak y¼ksek lisans esnasında her t¼rl¼ katkılarından dolayı sevgili aileme teŐekk¼r ederim.



İÇİNDEKİLER

TEZ BİLDİRİMİ	I
ÖZET	II
ABSTRACT	III
İÇİNDEKİLER	V
ŞEKİL LİSTESİ	VIII
ÇİZELGE LİSTESİ	IX
SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ	X
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Diyabet Epidemiyolojisi.....	4
2.2 Tip 1 Diyabet.....	5
2.3 Tip 2 Diyabet.....	5
2.4 Tip 2 Diyabetle İlişkili Kronik Durumlar	6
2.5 Oral Diyabetikler.....	9
2.5.1 İnsülin Salgılatıcı İlaçlar	10
2.5.1.1 Sülfonilüreler.....	10
2.5.1.2 Glinidler (Meglitinidler)	10
2.5.2 İnsülin Duyarlılaştırıcı İlaçlar	11
2.5.2.1 Biguanidler.....	11
2.5.2.2 Tiazolidindionlar	11
2.5.3 Glikozun Emilim Hızını Yavaşlatan İlaçlar	11
2.5.4 İnsülinomimetik İlaçlar	12
2.5.4.1 Amilin Analogları.....	12
2.5.4.2 İnkretin Benzeri (GLP-1A)	12
2.5.4.3 İnkretin Mimetik (Dipeptidil Peptidaz 4 İnhibitörleri; DPP4-İ)	12
2.6 Tiazolidindionlar (TZD)	13
2.6.1 Pioglitazon	15
2.6.1.1 Pioglitazonun Farmakodinamik Özellikleri	16
2.6.2 Metabolik Etkisi	17
2.6.2.1 İnsülin Direnci ve Glikoz Seviyeleri.....	17
2.6.2.2 Yağ Dokusu Farklılaşması ve Ağırlık Artışı.....	17
2.6.2.2 Kardiyovasküler Hücreler Üstüne Etkisi	17
2.6.3 Farmakokinetik Özellikler	18

2.6.3.1 Emilim ve Dağılım.....	18
2.6.3.2 Metabolizma ve Eliminasyon.....	18
2.6.3.3 Klinik Çalışmalar	19
2.7 Benzer Çalışmalarda Pioglitazonun Kanserojen Etkinliği.....	19
3. MATERYAL VE YÖNTEM	21
3.1 Materyal	21
3.1.1 Kullanılan Araçlar.....	21
3.1.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler	21
3.1.2.1 Pioglitazon (Sigma)	21
3.1.2.2 Keratinocyte-SFM (1X) (THERMO).....	22
3.1.2.3 Bovine Pituitary Extract (BPE) (THERMO)	23
3.1.2.4 EGF, Human Recombinant (THERMO).....	23
3.2 YÖNTEMLER	24
3.2.1 Hücre Kültürü.....	24
3.2.1.1 Hücre Hattının Çözülmesi.....	24
3.2.1.2 Hücre Hattının Paşajlanması.....	25
3.2.1.3 Hücre Hattının Dondurulması	25
3.2.1.4 Hücre Sayımı.....	26
3.2.2 Deney Planı ve Grupları.....	26
3.2.2.1 Negatif (Çözücü) Kontrol Grubu	26
3.2.2.2 Pioglitazon Dozları.....	26
3.2.2 MTT Testi	27
3.2.3 Transformasyon (Kontak İnhibisyon) Testi	28
3.2.3.1 Kristal Viyole Boyama.....	31
3.2.4 Soft Agar (Ankoraj-bağımsız Büyüme) Testi.....	31
3.2.5 İstatistiksel Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi	33
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	34
4.1. BULGULAR.....	34
4.1.1. MTT Test Sonuçları	34
4.1.2 hTU1-38 Hücrelerinde Morfolojik Değişiklikler.....	40
4.1.3 hTU1-38 Hücrelerinin Transformasyonu (Kontak İnhibisyon Testi).....	41
4.1.4 Soft Agar Koloni Oluşum (Ankoraj-Bağımsız Büyüme) Sonuçları	47
4.2 TARTIŞMA	53
4.2.1 Sitotoksikite ve Morfolojik Değişimler.....	53

4.2.2 Transformasyon (Kontak İnhibisyon) Testi	57
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	67
6. KAYNAKÇA	69
ÖZGEÇMİŞ.....	77



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 3.1 Pioglitazon'un 2D (a) ve 3D (b) Kimyasal Yapısı	21
Şekil 3.2 Transformasyon Test Protokolüne Göre Kültür Kaplarına Ekim Şeması... 29	
Şekil 3.3 PIO Uygulaması Sonrası Transforme Olan hTU1-38 Hücrelerinin Oluşturduğu Odakların Genel Görüntüsü (4x).....	30
Şekil 3.4 PIO Uygulaması Sonrası Transforme Olan hTU1-38 Hücrelerinin Oluşturduğu Odakların Genel Görüntüsü (20x).....	30
Şekil 3.5 Transforme hTU1-38 Hücrelerinin Soft Agarda Oluşturduğu Koloniler (10 µM PIO Uygulaması/2. Tekrar)	32
Şekil 3.6 Transforme hTU1-38 Hücrelerinin Soft Agarda Oluşturduğu Koloniler (10 µM PIO Uygulaması/3. Tekrar)	33
Şekil 4.1 24, 48 ve 72 Saatlik Uygulama Sonrası Elde Edilen Hücre Canlılığı Verilerinden Hesaplanan Canlılık Değerleri (p<0.05)	38
Şekil 4.2 PIO Uygulaması Sonrası hTU1-38 Hücrelerinde Gözlenen Morfolojik Değişimler-1.....	40
Şekil 4.3 PIO Uygulaması Sonrası HTU1-38 Hücrelerinde Gözlenen Morfolojik Değişimler-2.....	41
Şekil 4.4 Kontrol hTU1-38 (72s) Hücreleri.....	42
Şekil 4.5 40 µM PIO Uygulanmış (72s) hTU1-38 Hücreleri	42
Şekil 4.6 PIO'un 72s'lik Uygulaması Sonunda Pasajlanan hTU1-38 Hücreleri. Kontrol (1), 10 µM (2), 20 µM (3), 40 µM (4).....	43
Şekil 4.7 72s'lik 10 µM PIO Uygulaması Sonrası 1. Pasajdan İlk Transforme hTU1-38 Hücreleri (4X)	44
Şekil 4.8 10 µM PIO (72s) Uygulaması Sonrası 1. Pasajdan İlk Transforme hTU1-38 Hücreleri (10X)	44
Şekil 4.9 Bir Hafta Boyunca 2-3 Gün Arayla Görüntülenmiş Odak Oluşumu Örneği	45
Şekil 4.10 Kontrol ve PIO Gruplarından Toplanan Odaklar. Kontrol (1), 10 µM (2), 20 µM (3), 40 µM (4).....	45
Şekil 4.11 Transforme Hücrelerin Odak Sayıları.....	47
Şekil 4.12 Transforme hTU1-38 Hücrelerinin Soft Agar'da Oluşturduğu Kolonilerin Ortalama 1 Hafta Arayla Büyüme Örneği.....	48
Şekil 4.13 Soft Agar Koloni Sayıları	50
Şekil 4.14 Ankoraj-Bağımsız Büyüyen (Soft Agar) Koloni Görünümleri-Kontrol... 50	
Şekil 4.15 Ankoraj-Bağımsız Büyüyen (Soft Agar) Koloni Görünümleri-10 µM 51	
Şekil 4.16 Ankoraj-Bağımsız Büyüyen (Soft Agar) Koloni Görünümleri-20 µM 51	
Şekil 4.17 Ankoraj-Bağımsız Büyüyen (Soft Agar) Koloni Görünümleri-40 µM 51	

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 3.1 MTT Testinde Uygulanan PIO Dozları.....	27
Çizelge 4.1 24 Saat'lik PIO Uygulaması Sonrası Ölçülen Absorbans ve Hesaplanan Normalizasyon Değerleri	34
Çizelge 4.2 24 Saat'lik PIO Uygulaması Sonrası Ölçülen Absorbans ve Hesaplanan Normalizasyon Değerleri (Devamı).....	35
Çizelge 4.3 48 Saat'lik PIO Uygulaması Sonrası Ölçülen Absorbans ve Hesaplanan Normalizasyon Değerleri	35
Çizelge 4.4 48 Saat'lik PIO Uygulaması Sonrası Ölçülen Absorbans ve Hesaplanan Normalizasyon Değerleri (Devamı).....	36
Çizelge 4.5 72 Saat'lik PIO Uygulaması Sonrası Ölçülen Absorbans ve Hesaplanan Normalizasyon Değerleri	36
Çizelge 4.6 72 Saat'lik PIO Uygulaması Sonrası Ölçülen Absorbans ve Hesaplanan Normalizasyon Değerleri (Devamı).....	37
Çizelge 4.7 24, 48 ve 72 Saat'lik PIO Uygulamaları Sonrası HTU1-38 Hücrelerinin Oransal Canlılık Sonuçları	37
Çizelge 4.8 24, 48 ve 72 Saat'lik PIO Uygulamaları Sonrası HTU1-38 Hücrelerinin Oransal Canlılık Sonuçları (Devamı).....	38
Çizelge 4.9 hTU1-38 Hücrelerinin Transformasyon (Kontak İnhibisyon) Testi İle Belirlenen Odak Sayıları	46
Çizelge 4.10 hTU1-38 Hücrelerinin Transformasyon (Kontak İnhibisyon) Testi İle Belirlenen Odak Sayıları (Devamı).....	47
Çizelge 4.11 PIO (10 µM) Uygulaması Sonrası hTU1-38 Hücrelerinin Ankorağ-Bağımsız Büyüme (Soft Agar) Koloni Sayıları	48
Çizelge 4.12 PIO (20 µM) Uygulaması Sonrası hTU1-38 Hücrelerinin Ankorağ-Bağımsız Büyüme (Soft Agar) Koloni Sayıları	49
Çizelge 4.13 PIO (40 µM) Uygulaması Sonrası hTU1-38 Hücrelerinin Ankorağ-Bağımsız Büyüme (Soft Agar) Koloni Sayıları	49

SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ

BPE	Sığır Hipofiz Ekstresi
DPP4-İ	Dipeptidil Peptidaz 4 İnhibitörleri
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
GLP-1A	Peptid-1 Reseptör Agonistleri
HDL	Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
IC₅₀	Yarı Maksimum İnhibitör Konsantrasyon
KPNC	Kaiser Permanente Kuzey Kaliforniya
MTT	3-(4,5-Dimetiltiyazol2-Y1)-2,5-Difeniltetrazolyum-Bromür
PIO	Pioglitazon
TZD	Tiyazolidondion
VLDL	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein

1. GİRİŞ

Günümüzde birçok tedavi yaklaşımı bulunan diyabet insülin eksikliğine dayanan veya etkisizliği sonucu gelişen, akut ve kronik komplikasyonların eşlik etmesiyle yaşam boyu süren bir hastalıktır. İnsülin eksikliği veya yokluğunda tip 1 (pankreatista insülin üretilmemesi) veya insülin direnci (insülinin dokular tarafından kullanılamaması) tip 2 diyabetin sebepleridir. Tip 2 diyabet dünyada en çok rastlanan diyabet tipidir. Tüm diyabet türlerinin yaklaşık %90'ı tip 2 diyabetdir. Diyabet epidemiyolojisi çalışmalarında tip 2 diyabetin çocukluk dönemi de dahil olmak üzere her yaş grubunda artan sıklıkta görüldüğünü göstermektedir. Tip 2 diyabet genellikle 40'lı yaşlar civarında ortaya çıkan, yaş arttıkça görülme sıklığı artan, diyabet belirtilerinin hafif olduğu, bazen de hiç olmadığı, kronik komplikasyonların sık görüldüğü diyabet tipidir. Tip 2 diyabet dokularda insülinin kullanılamaması (insülin direnci) ve insülin sekresyon bozukluğu ile karakterizedir. Doymuş yağdan zengin beslenme, hareketsiz yaşam ve obezite tip 2 diyabet sıklığı ile yakın ilişkisi olan faktörlerdir. Tip 2 diyabette kullanılan birçok ilaç türü bulunmaktadır (Williams ve ark., 1998).

Pioglitazon (PIO), bozulmuş insülin sekresyonu ve insülin direncini içeren bir dizi metabolik anormallik ile ilişkili bir hastalık olan tip 2 diyabet tedavisi için geliştirilen tiazolidindionler grubunun bir üyesidir. Tiazolidindionlar, karaciğer ve periferik dokuları insülinin etkilerine karşı duyarlı hale getirerek etki gösterir, bu da insülin kaynaklı glikoz imhası iyileştirilmesinde etkili olur.

Japonya menşeli Takeda firması tarafından üretilen ve piyasaya ilk olarak 1999 senesinde sunulan PIO, 1999'dan beri ABD'de ve 2000'den beri Avrupa'da (2002'den beri Fransa) pazarlanan oral bir hipoglisemik ajandır. Avrupa kamuoyunda PIO değerlendirme raporuna göre, sıçanlardaki klinik çalışmalar PIO maruziyeti ile mesane tümörleri arasında bir ilişki olduğunu gösterilmişti. PIO ülkemizde yaklaşık olarak on sene sonra 31 Aralık 2009'da ruhsat almıştır. Yıllık satış rakamlarının Dünyada 5 milyar dolara ulaşmış olması ilacın ne kadar popüler olduğunu açıkça ortaya koymaktadır. Bizde de kullanımı çok yaygınlaşan PIO için satış rakamları hakkında en net bilgi Eczacılar Birliği Başkanı Erdoğan Çolak'ın açıklamaları göstermektedir. Eczacılar Birliği Başkanı Erdoğan Çolak'ın verdiği rakamlara göre

PIO'un Türkiye'de 1 yıl içerisinde yaklaşık olarak 2 milyon 600 bin kutu satılmış olması bunu açık ortaya koymaktadır. Tüm dünyada olduğu gibi bizde de yeni çıkan ilaçlar karşı büyük bir ilgi görmektedir. PIO'un etkisinden söz etmek gerekirse glikoz ve lipit metabolizmasını düzenleyen çeşitli proteinlerin transkripsiyonuna neden olan peroksizom proliferatör aktif reseptör (PPAR γ) aktive eder. Bu proteinler karaciğerde ve periferik dokularda insülinin reseptör sonrası etkilerini artırır, bu da insülinin endojen salgılanmasında artış olmadan glisemik kontrolün artmasına neden olabilir. (Guan ve ark., 1999; Yoshimura ve ark., 2003)

PIO hakkında yapılan çalışmalar incelendiğinde ilaç inceleyen Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé (ANSM) Fransa'da diyabetli hastaların tarihsel bir kohortunda PIO kullanımı ile mesane kanseri insidansı arasındaki olası bir ilişkiyi araştırmak amacıyla yola çıkıldı. PIO maruziyetiyle ilişkili olası bir mesane kanseri riskinin özgüllüğünü değerlendirmek için, PIO maruziyeti ile diğer bölgelerdeki kanser arasındaki ilişki de araştırıldı. Çalışma sonucunda PIO'un kanser insidansını artırdığı bulundu. Bu PIO çalışmasının sonuçlarıyla, Haziran 2011'de Fransa'da PIO kullanımı askıya alınmaya karar verilmesi için ANSM'a sunuldu. (ANSM, 2011)

Ülkemizde sıkça kullanılan PIO hakkında yurt dışında birçok olumsuz yorum bulunmaktaydı. Bunun üzerine farklı hücre türlerinde yapılan çeşitli canlılık testlerinde farklı hücre grupları üzerinde canlılık seviyesinde düşümlere ve başlıca etkinlik gösterdiği hücrelere zararı olduğu tahmin edilmekteydi. Bu yönde yapılan çalışmalarda kanserojen etkinliği olduğu hakkında bilgiler mevcuttu. Bu tezde konu olarak PIO'un mesane hücreleri üzerinde potansiyel etkisi araştırıldı. Üzerinde gösterdiği etkinliği ölçmek için öncelikle toksisitesi ölçüldü. Elde ettiğimiz verilerde canlılık seviyelerinde belirli bir seviyede azalma gözlemlendi. Uygulanan çeşitli testlerde mesane hücrelerinde karsinojenik etkinliği artırdığı belirli yöntemlerle ölçüldü. PIO üyesi olduğu tiazolidindionlar grubundaki diğer birkaç diyabet ilacı gibi olumsuz etkileri olduğu da düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

Diyabet insülin eksikliğine dayanan ya da etkisizliği sonucu gelişen veya her ikisindeki kusurlardan kaynaklanan hiperglisemi ile karakterize metabolik bir hastalık grubudur. Diyabetin kronik olarak hiperglisemiye ve bazı organlarda işlev bozukluğu, özellikle; gözler, böbrekler, sinirler, kalp ve kan damarlarının yetersizliği ile ilişkilidir. Diyabet gelişiminde çeşitli patojenik süreçler söz konusudur. Bunlar, pankreasın beta hücrelerinin otoimmün yıkımıyla sonuçlanan insülin eksikliği ve insüline karşı direnç ile sonuçlanan anormalliklere kadar uzanmaktadır. Diyabetteki karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasındaki anormalliklerin temeli, insülinin hedef dokularda etkinliğinin azalmasıdır. Yetersiz insülin etkisi, yetersiz insülin sekresyonu veya hormon etkisinin karmaşık yollarındaki bir veya daha fazla noktada insüline verilen doku tepkilerinden kaynaklanır. İnsülin sekresyonunun bozulması ve insülin eylemindeki bozukluklar aynı hastada sıklıkla birlikte görülür ve genellikle tek başına hangisi olursa olsun, hipergliseminin birincil nedeni olan anormallik belirsizdir (Edelman ve ark., 2004). Uzun süreli diyabet komplikasyonları arasında görme kaybı olan retinopati; böbrek yetmezliğine yol açan nefropati; ayak ülseri, amputasyon ve Charcot eklemi riski olan periferik nöropati ve gastrointestinal, genitoüriner ve kardiyovasküler semptomlara ve cinsel işlev bozukluğuna neden olan otonom nöropatidir. Diyabetli hastalarda aterosklerotik kardiyovasküler, periferik arter ve serebrovasküler hastalık görülme sıklığı artmıştır. Hipertansiyon ve lipoprotein metabolizmasının anormallikleri diyabetli kişilerde sıklıkla bulunur. Diyabet vakalarının büyük çoğunluğu iki geniş etyopatogenetik kategoriye ayrılır. Bir kategoride, tip 1 diyabet, nedeni insülin sekresyonunun mutlak bir eksikliğidir. Bu tip diyabet geliştirme riski yüksek olan bireyler, genellikle pankreas adacıklarında meydana gelen otoimmün patolojik bir sürecin serolojik kanıtları ve genetik belirteçler ile tanımlanabilir. Diğer, çok daha yaygın kategoride, tip 2 diyabet, nedeni, insülin etkisine direnç ve yetersiz bir telafi edici insülin salgılama tepkisidir. İkinci kategoride, çeşitli hedef dokularda patolojik ve fonksiyonel değişikliklere neden olmak için yeterli ancak klinik semptomlar olmadan, diyabet saptanmadan önce uzun bir süre mevcut olabilir. Bu asemptomatik süre boyunca, açlık durumunda plazma glukozunun ölçülmesiyle veya bir oral glikoz yükü ile mücadeleden sonra, karbonhidrat

metabolizmasında bir anormallik göstermek mümkündür. (American Diabetes Association, 2001).

2.1 Diyabet Epidemiyolojisi

Diyabet; ülke, ırk, köken ayrıt etmeksizin görülebilen bir hastalıktır. Batı toplumlarında %3-5 oranında görülen diyabet oranı özellikle ilerleyen yaşlarda ve yüksek refah seviyesine sahip ülkelerde giderek artmaktadır (Hardy ve Jabbour, 2004). Diyabet görülme sıklığı ülkeler arasında ve farklı kökenli insan gruplarda belirgin düzeyde değişiklikler göstermektedir. Papua Yeni Gine'deki kabilelerde, Eskimolar arasında veya Çin'de %1 olan bu sıklık, Avustralya yerlilerinde, Arizona'daki Pima Kızılderililerinde %20-45'e kadar artabilmektedir. Görülme sıklığındaki bu farklılık ülkelerden uluslara doğru gittikçe daha da belirginleşmektedir. Örneğin Beyaz ırka göre ABD'de Afrika kökenli Amerikalılar arasında iki kat, Meksika kökenli Amerikalılar arasında iki buçuk kat ve Yerli Amerikalılar arasında beş kat daha fazla tip 2 diyabet görülmektedir (Haffner, 1998). Farklı toplumlarda görülen Tip 2 diyabet prevalansındaki bu çeşitlilik büyük olasılıkla genetik ve çevresel faktörlerden kaynaklanmaktadır (King ve Rewers, 1993).

Ülkemizde 1999 yılında yapılan ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından desteklenen bir çalışma olan Türkiye Diyabet Epidemiyoloji (TURDEP)'e göre, 20-80 yaş grubu diyabet sıklığının %7.2, glikoz toleransının %6.7, bilinmeyen (yeni) diyabet oranının ise yaklaşık %30 olduğu bulunmuştur (Satman ve ark., 2002).

Diyabet prevalansı 20 yaş altında %0.19 iken 20 yaş üzeri %8.6'ya yükselir. 2002'de yapılan bir çalışmada ABD'de tüm yaş gruplarında diyabet prevalansı %6.3 olarak bulunmuştur (18.2 milyon kişi) ve her yıl 1.3 milyon yeni vaka saptanmaktadır (www.cdc.gov, Erişim tarihi: 13 Ekim 2019). Nüfus artışı, sağlıksız beslenme, obezite ve fiziksel aktivite azlığı, yaşlanma ve kentleşme nedeniyle Tip 2 diyabet prevalansının daha hızlı artması beklenmektedir. Uluslararası Diyabet Federasyonu tarafından, 2025'te dünyada tip 2 diyabetli hasta sayısının tahminen 334 milyona yükseleceği bildirilmiştir (Gren ve Hirsch, 2003). Son 20 yılda çoğunluğu tip 2 diyabet olmak üzere diyabet prevalansında belirgin bir artış izlenmiş olup günümüzde tip 2 diyabet epidemisinde bahsedilmeye başlanmıştır.

2.2 Tip 1 Diyabet

Beta hücrelerinin kesin yıkımına bağlı olan tip 1 diyabet, diyabetin diğer türüne göre daha erken dönemlerde başlar. Diyabet hastalarının sadece %5-10'unu oluşturan bu diyabet grubu, pankreasın beta hücrelerinin otoimmün kaynaklı yıkımının sonucudur. Bu diyabet formunda, hücre yıkım hızı oldukça değişkendir, bazı kişilerde (çoğunlukla bebekler ve çocuklar) hızlıdır ve bazılarında (çoğunlukla yetişkinler) yavaştır. Bazı hastalar, özellikle çocuklar ve gençler, hastalığın ilk belirtisi olarak ketoasidoz ile ortaya çıkabilir. Diğerleri, enfeksiyon veya başka stres varlığında hızla ciddi hiperglisemiye veya ortotoasidoza dönüşebilen mütevazı açlık hiperglisemisine sahiptir. Yine de anneler, özellikle de yetişkinler, ketoasidozun neden olduğunu önlemek için yeterli olan artık hücre fonksiyonuna sahip olabilirler. Bağışıklık aracılı diyabet yaygın olarak çocukluk ve ergenlikte görülür ancak yaşamın her evresinde ortaya çıkabilir (Todd, 2010).

2.3 Tip 2 Diyabet

İnsülin sekresyonuna bağlı türü olan tip 2 diyabet veya yetişkin başlangıçlı diyabet olarak adlandırılan diyabetli hastaların %90-95'ini oluşturan bu diyabet formu, insülin direncine sahip olan ve kesin olmamakla beraber genellikle akraba olan bireyleri kapsar. İnsülin yetmezliği en azından başlangıçta ve sıklıkla yaşamları boyunca bu bireylerde bulunur. Muhtemelen bu diyabet formunun birçok farklı nedeni vardır (Gaede ve ark., 1998). Her ne kadar spesifik etiyolojiler bilinmese de beta hücrelerinin otoimmün yıkımı gerçekleşmez ve hastalar diğer diyabet nedenlerinden herhangi biriyle ilişkili değildir. Bu diyabet formuna sahip hastaların çoğu obezdir ve obezitenin kendisi bir dereceye kadar insülin direncine neden olur. Geleneksel ağırlık ölçütlerine göre obez olmayan hastaların ağırlıklı olarak karın bölgesinde dağılmış olan vücut yağ yüzdesi artmış olabilir. Ketoasidoz nadiren bu tip diyabetlerde kendiliğinden ortaya çıkar; Görüldüğü zaman, genellikle enfeksiyon gibi başka bir hastalığın stresi ile birlikte ortaya çıkar. Bu diyabet şekli sıklıkla yıllarca teşhis edilmez, çünkü hiperglisemi aşamalı olarak gelişir ve daha erken aşamalarda hastanın klasik diyabet semptomlarından herhangi birini fark etmesi için yeterince şiddetli değildir. Bununla birlikte, bu tür hastalar makrovasküler ve mikrovasküler komplikasyon geliştirme riski altındadır. Bu diyabet şekli olan hastalarda normal veya

yüksek görünen insülin seviyelerine sahip olabilirken, bu diyabetik hastalarda kan şekeri seviyelerinin daha yüksek olması beta hücresi fonksiyonlarının normal olması durumunda daha yüksek insülin değerlerine neden olması beklenir (Ceriolla, 1998). Dolayısıyla, insülin sekresyonu bu hastalarda kusurludur ve insülin direncini telafi etmek için yetersizdir. İnsülin direnci kilo verme ve hipergliseminin farmakolojik tedavisi ile iyileşebilir ancak nadiren normale döner. Bu diyabet formunu geliştirme riski yaş, obezite ve fiziksel aktivite eksikliği ile birlikte artar. Gestasyonel diyabetli kadınlarda ve hipertansiyon veya dislipidemili bireylerde daha sık görülür ve sıklığı etnik alt gruplara göre değişir. Genellikle tip 1 diyabetin otoimmün formundan daha fazla, güçlü bir genetik yatkınlıkla ilişkilidir. Bununla birlikte, bu diyabet formunun genetiği karmaşıktır ve açıkça tanımlanmamıştır (King ve Rewers, 1993).

2.4 Tip 2 Diyabetle İlişkili Kronik Durumlar

Tip 2 diyabet hastaların çeşitli doku ve organlarında bazı fonksiyonel, morfolojik ve biyokimyasal etkileri görülmektedir. Bu gibi kronik vakalar, tip 2 diyabetin mortalite ve morbiditesine sebep olan, hastanın yaşam kalitesini düşüren ve çok daha ağır şekilde ölümle bile sonuçlanan sorunlardır (Burant, 2004).

Yaygın olarak arteriosklerotik damar hastalığına, inflamatuvar ve trombogeneze ortama yatkınlık oluşturması nedeniyle tip 2 diyabet; gerçek bir vaskülopati durumu olduğu düşünülmektedir. Tip 2 diyabet vasküler komplikasyonları sebebiyle morbidite ve mortalitenin temel sebeplerinden birisi olduğuna işaret edilir. UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study) tip 2 diyabet hastalarında makrovasküler komplikasyon riskinin (miyokard infarktüsü periferik ve inme arter hastalığı gibi) mikrovasküler vakalarda (nefropati, retinopati gibi) 4 kat daha fazla olduğunu göstermiştir (Weyer ve ark., 1999). UKPDS tip 2 diyabet hastalarında kronik komplikasyonları azaltması için planlanan uzun süreli ve en geniş çalışmalardan biri olup, 23 merkezde 5102 vaka 10 yıl izlenmiştir. Bu çalışma neticesinde düzeltilmiş glikoz seviyeleri ile mikrovasküler komplikasyon vakalarında %25 azalma görülmüş olup aynı zamanda miyokard infarktüsü ve ani ölüm riskinde %16 oranında azalma bulunmasıyla makrovasküler vakalarında insidansı da azalma saptanmıştır. UKPDS çalışmasında A1c düzeylerindeki her %1'lik azalmayla kalp yetersizliği riskinde %16, miyokard infarktüsü prevalansında da %14, inme gelişiminde %12, alt ekstremitelerde

amputasyonlarında %43 risk azalması olduğu saptanmıştır. Bu çalışmalar neticesinde ayrıca glisemik kontrol ile mikroalbuminüri gelişiminde %34 oranında risk azalması da bulunmuştur. Bunlarında sonucunda sıkı kan şekeri kontrolüyle nöropati oluşması ve ilerlemesinde belirgin azalma görülmüştür. UKPDS ve bazı epidemiyolojik çalışmaların sonuçlarında; HbA1c düzeyinin %7 oranında ve sistolik kan basıncının 130 mmHg'nın bulunması kronik komplikasyonları azalttığı ifade edilmiştir.

Mikrovasküler anormalliler sistemik bozukluklar olarak ortaya çıkar ve mikrovasküler hastalığın prezantasyonu, etkisi görülen dokunun işlevi ve yapısına göre değişiklik ortaya çıkarır. Örneğin, nonproliferatif diyabetik retinopatide mikroanevrizma oluşması ve perisit kaybı görülür, vasküler bariyer işlevini kaybetmeye başlar ve kapiller tıkanıklıklar oluşabilir. Mikrovasküler anormalliler iskemik bir alan oluşturur ve böylece oluşan hipoksik ortamda vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) salınımını artırır. Verilen bu yanıtta neovaskülarizasyonu arttırabilmektedir (Lu ve ark., 1998).

Diyabetle ilişkili nefropatide oluşan intraglomerüler basınç artışı ve extrasellüler matriks proteinlerinin glomerülde artış göstermesi bazal membran kalınlaşmasına veya glomerüler hipertrofiye sebep olabilir. Bu değişimler glomerüler filtrasyon hızında azalmalara ve glomerüloskleroza sebep olduğu düşünülür. Diyabetik nefropati, vakaların %30-40'ında, diyabet esnasında oluşmaktadır. ABD'de son dönem böbrek yetmezliğinin en sık sebepleri arasında gösterilmektedir. Son zamanlarda böbrek yetmezliği olan hastaların %50'sinden fazlası diyabet hastasıdır. Normal populasyona göre, nefropatisi bulunan diyabetik hastaların ölüm riski, 100 kat daha fazla olduğu düşünülür (Amiri ve Garcia, 2000; Breyerj, 1992).

Glikoz konsantrasyonun yüksek olması durumunda proteinlerin amino gruplarının glikozillenmesine ve ileri glikozilasyon son ürünlerin (AGE) oluşmasına neden olmaktadır. AGE'lerin oluşması ve birikmesi mikrovasküler komplikasyonların gelişimine neden oldukları düşünülmektedir. AGE'ler reseptörlere bağlanıp endotel hücrelerinde veya makrofajlarda sinyal transdüksiyonunda farklıklara sebep olmaktadır. Oksidan maddeler ve AGE'lerin VEGF ekspresyon artışına sebep olduğuna yönelik yeni bulgular bulunmuştur. VEGF vasküler permeabiliteyi arttırmakta ve retinada anjiogenez oluşması ile ilişkilidir (Aiello ve

ark., 1994; Brownlee ve ark., 1988). AGE'ler bunun yanında sitokinlerin salınımında artış sağlar ve makrovasküler komplikasyon oluşmasına neden olur (Gaede ve ark., 1998).

Tip 2 diyabet hastalarında proteinlerin glikozillenmesi, glikozun otooksidasyonu ve serbest radikal oluşması gibi birçok farklı yolla oksidan maddeler oluşmaktadır. Bu oksidan maddeler düşük dansiteli lipoprotein (LDL) oksidasyonunda artış ve proteinlerin çapraz bağlanması gibi birçok hücrel işlevleri etkilediği düşünülmektedir. Oksidanların artması durumunda azot monoksitin azalmasına yol açar. Azot monoksitin azalması da aynı zamanda vazokonstriksiyon ve hipoksiye neden olmaktadır. En son yapılan diyabetik retinopati çalışmasında antioksidan olarak E vitaminin tecih edilmesi retinal kan akımını normale getirdiği tespit edilmiştir (Bursell ve ark., 1999).

Hiperglisemi, aldoz redüktaz enzim aktivitesini yükselterek, daha çok miktarda glikozun sorbitole dönüşmesine yol açar. Aldoza redüktaz enzimi ise en çok retina, sinirler ve böbreklerde mevcuttur. Bu sebeple bu tip organlarda metabolik değişikliklere yol açtığı düşünülmektedir. Aldoza redüktaz enzim aktivitesindeki yükselmenin diyabetik nöropatideki etkin rolü birçok çalışmaya kaynak oluşturmuştur (Greene ve ark., 1988).

Kalp-damar hastalıkları (KDH) insanları zorlayan başlıca bir hastalık olması yanı sıra, sağlık hizmetlerinin çok fazla kullanılması ve erken ölümlere yol açmasıyla diyabette önlenmesi gereken ciddi bir komplikasyondur (Gu ve ark., 1999). ABD, Kanada gibi bazı ülkede obezite nedeniyle metabolik bozukluklar diyabet riskini daha fazla artırıp ciddi bir sorun yaratarak durumu daha fazla kötüleştirmektedir (Wyatt ve ark., 2006). Tip 2 diyabet hastalarında KDH'den sorumlu çok sayıda risk faktörünün tedavisinde ilk basamak olup doktorlar için önemli bir mücadele yapmak anlamına gelmektedir. Belirlenmiş bazı risk faktörleri HbA1c düzeyleri, sistolik kan basıncı ve lipid düzeylerinin yetersiz kontrolüyle birlikte cinsiyet yaş sigara kullanımı, etnik köken ve hastalığın süresini içermektedir (Buse ve ark., 2007; Stevens ve ark., 2001; Vijan ve Hayward, 2004).

Son zamanlarda ABD’de ortalama HbA1c değerlerini dūşürmeye yönelik bazı iyileşmeler yapıldıysa da çabaların sürdürülmesinde fayda vardır. Kanıtlara dayanan kılavuzların yaygın dağılım ağı ve yeni tedavi edici ajanların bulunmasına rağmen kan basıncı kontrolü, diyet, egzersiz ve tedaviye uyum KDH risk faktörlerinde küçük de olsa bir azalma olmuştur. Ayrıca, son on yılda T2DM (Tip 2 Diyabet) hastaları arasında lipit peroksidaz kontrolünde yalnızca küçük iyileşmeler saptanmıştır (Saaddine ve ark., 2006; Beaton ve ark., 2004; Kerr ve ark., 2004; Hoerger ve ark., 2008).

2.5 Oral Diyabetikler

İnsülinin diyabet tedavisindeki olumlu etkinliğine rağmen ağız yolundan alınamaması kullanımı açısından önemli bir sorun oluşturmaktadır. Bu nedenle oral yoldan tüketilip etkili olabilecek antidiyabetik ilaçların bulunması için uzun süre araştırmalar yapılmaktadır. İlk olarak bitkisel kaynaklı bir alkaloid olan dekametilendiguanid maddesi keşfedilmiştir. Bu madde, kan glukoz düzeyini dūşürmesi yanında, belirgin bir hepatotoksik etki gösterdiğinden kullanılmaktan vazgeçilmiştir. Akabinde bulunan bir alkaloid olan hipoglisin A maddesi de hipoglisemi oluşturmaya karşın, toksik etkisinin fazlalığı ve karaciğerdeki etkisi sebebiyle tercih edilmemiştir. Karbutamid adlı sülfonilüre türevi ilaç kullanılmaya başlanmış ve bunu daha az toksik olan diğer türevler izlemiştir (Gilmer ve ark., 1997; Kayaalp ve Gürlek, 2012).

Kandaki glikoz miktarını kontrol altında tutmaya çalışan ağız yoluyla alınan antidiyabetiklerden olan ve genellikle insülin sekresyonunu arttırma, insüline karşı duyarlılığı arttırma veya karbonhidrat absorpsiyonunu azaltmaya yönelik etkinlik gösterirler. İdeal bir antidiyabetik ajan; plazmadaki glukoz miktarını normal seviyelere dūşürmeli ve diyabetin yan etkileri en aza indirgemeye yardımcı olmalıdır. Mikro ve makrovasküler komplikasyonların gelişimine de engel olması tercih edilmektedir. Bu kriterleri sağlayan ideal birçok etken madde ne yazık ki bulunmamaktadır; buna karşın kan şekerini kontrol etmeye yarayan çok sayıda ve etkinlik açısından farklı gruplarda bulunmaktadır. Bu ilaçların avantaj ve dezavantajları gözetilerek, tek başına ya da karışımlar halinde kullanılması hastalarda hedeflenen glisemi değerlerine ulaşılması açısından yardımcı olabilmektedir (Longo, 2010).

Oral antidiyabetik ilaçlarda kullanılan etken maddelere göre aşağıdaki gibi gruplandırılmıştır (Murphy ve Holder, 2000).

- ❖ İnsülin salgılatıcılar (sekretegoglar); Sülfonilüreler ve benzoik asit türevleri (glinidler)
- ❖ İnsülin duyarlılığını artırıcı ilaçlar (insülin direncini azaltmaya yönelik) ilaçlar (sensitizerler): Biguanidler ve tiazolidindion türevleri
- ❖ Glikozun emilim hızını yavaşlatan ilaçlar: Alfa glikozidaz inhibitörleri
- ❖ İnsülinomimetikler: Amilin analogları; İncretin benzeri - Peptid-1 reseptör agonistleri (GLP-1A), İncretin mimetikler - Dipeptidil peptidaz-4 inhibitörleri (DPP4-İ)

2.5.1 İnsülin Salgılatıcı İlaçlar

Bu tip ilaçlar pankreasın β hücrelerinde insülin salınımını destekleyen sülfonilüreler ile glinidler mevcuttur.

2.5.1.1 Sülfonilüreler

İlk olarak 1920'lerde keşfedilip üreilmeye başlanmıştır. İnsülin üretimini arttırarak etkinlik sağlarlar. Adenozin trifosfat (ATP) duyarlı potasyum kanallarının (K^+ ATP) beta hücreleri tarafından insülin salınımında önemli bir rol oynarlar ve iki bileşenden oluşmaktadır: bir gözenek ve düzenleyici bir alt üniteden oluşur. Bunların yanında hepatik glikoz üretiminin azalmasını desteklerler ve periferik glikoz kullanımında da artış sağlarlar (Lewis ve ark., 2011).

2.5.1.2 Glinidler (Meglitinidler)

Sülfonilüre benzeri insülin salıverilmesini arttırıcı özellikteki repaglinid ve nateglinid gibi ilaçlardır. Bu ilaçlar 2000'li yılların başında tedaviye girmişlerdir. Kısa süreli etkilidirler ve çabuk emilebilirler. Sülfonilüreler de olduğu gibi potasyum kanallarının üzerinde etkilidirler, ama mekanizmaları ve uyguladıkları işlemler farklıdır. Aynı sülfonilüre reseptörlerini etkilerler. Yarılanma ömürleri çok kısadır. Bu ilaçların bir özelliği de yemekten önce enjekte edilen kısa etki süreli insülinin etkisini taklit etmesidir. Diyet ve egzersizle yeterince kontrol altına alınamayan tip 2

diyabetlilerde kullanılmaktadır. Metformin ile birlikte de kullanılabilirler (Inzucchi, 2002).

2.5.2 İnsülin Duyarlılaştırıcı İlaçlar

Bu grupta biguanid ve tiazolidindion (TZD, glitazon) olmak üzere iki alt grup ilaç yer alır. Biguanidler karaciğer düzeyinde, TZD'ler ise daha ziyade yağ dokusu düzeyinde insülin duyarlılığını artırıcı etki gösterirler. (Lilly ve Godwin, 2009).

2.5.2.1 Biguanidler

Oral antidiyabetiklerin ikinci büyük grubu olan biguanidler ilk olarak 1950'li yıllarda ortaya çıkmışlardır. Bu gruptan metformin günümüzde yaygın olarak kullanılan antidiyabetiklerdendir. Sülfonilürelerden farkı; normal glisemiye düşürür ancak hipoglisemi yapıcı etkileri hemen hemen yoktur (Akçay, 2001). Biguanidlerin etkilerini anaerobik glikolizi doğrudan uyararak glukoz kullanımını artırıp, glukozun kan dolaşımından uzaklaştırılmasını sağlar. Hepatik glukoneogenezi ve ince bağırsaktan glukoz emilimini azaltarak ve plazma glukagon düzeylerini düşürerek etkilerini gösterirler. Bu şekillerde insülin reseptörlerine, insülinin bağlanmasındaki artış yönüyle de indirekt yolla etkinlik gösterirler. Metformin ve fenformin bu grup ilaçlara örnek gösterilebilir.

2.5.2.2 Tiazolidindionler

Tiazolidindionler, insülin direncini azaltarak glisemik kontrolü sağlarlar. Bu bileşikler ortak olarak bir tiazolidin-2-4-dion yapısına sahiptir ve her birinin farklı bir yan zinciri vardır (Bailey ve Day, 2001; Braunwald ve ark., 2004). Bu grup ilaçlar insülin sekresyonunda etkili değildir. Periferik dokularda insülinin etkisini arttırırlar (Mudaliar ve Henry, 2001).

2.5.3 Glikozun Emilim Hızını Yavaşlatan İlaçlar

Bu ilaçlar bağırsaktan glukoz absorpsiyonunu geciktirerek etkinlik gösterirler. Bu tip etken maddeler tokluk durumundaki hiperglisemi tedavisinde etkilidir ancak gastrointestinal yan etkiler nedeniyle uzun süreli kullanımları tercih edilmez. Alfa glukozidaz inhibitörleri grubunda yer alan ilaçlardan, yalnızca akarboz ülkemiz piyasasında bulunmaktadır (Chiasson ve ark., 1994).

2.5.4 İnsülinomimetik İlaçlar

Bu yeni grup içinde amilin agonistleri ve inkretin mimetik ilaçlar ve yeni geliştirilmekte olan ajanlar yer alır. Genel olarak endojen insülin sekresyonunu arttırarak etkili olmaktadır (Zinman ve ark., 2009).

- ❖ Amilin Analogları
- ❖ İnkretin Benzeri (GLP-1A)
- ❖ İnkretin mimetik (Dipeptidil peptidaz 4 inhibitörleri; DPP4-İ)

2.5.4.1 Amilin Analogları

β hücre hormonu olan amilinin sentetik analogu olan pramlintidin kullanımıyla insülin tedavisine destek amacıyla ABD’de kullanılmaktadır. Tokluk glukoz düzeylerine etkilidir, günde 3 kez derialtı enjeksiyon gerektirir (Anonim, 2012).

2.5.4.2 İnkretin Benzeri (GLP-1A)

Tip 2 diyabette en önemli defektlerden birisi olan inkretin hormonlarının (glukagon benzeri peptid; GLP-1 ve gastrik inhibitör polipeptidin; GIP) etkisinin azalması ve glukagon sekresyonunun inhibe edilememesidir. Bu grupta yer alan inkretin mimetik ya da glukagon benzeri peptid-1 reseptör agonistleri (GLP-1A) ve dipeptidil peptidaz-4 inhibitörleri (DPP4-İ) ilaçlar inkretin hormonları taklid etmek ya da inkretinlerin degradasyonunu inhibe etmek üzere geliştirilmiştir. Glikoza bağımlı etki gösterdikleri için hipoglisemiye sebep olmazlar. Bununla beraber, sekretogoglar (sülfonilüre, glinid) ve insüline ilave olarak kullanıldıklarında hipoglisemi görülebilir. Bu sebeple ilk ilacın dozu azaltılmalıdır (Crandall ve Knowler, 2008).

2.5.4.3 İnkretin Mimetik (Dipeptidil Peptidaz 4 İnhibitörleri; DPP4-İ)

Bu tip etkin maddeler GLP-1 ve GIP’in yıkımını inhibe ederler. Tip 2 diyabetli hastalarda karbonhidrat alımından sonra normalde artması gereken insülin yanıtı azalmakta veya gecikmektedir. Glukagon salınımı artmakta ve sonuçta postprandiyal hiperglisemi oluşmaktadır. Oral glukoz alımından sonra oluşan hiperglisemiye karşı, normalde insülin yanıtının artması inkretin etki olarak adlandırılmaktadır. Bağırsak

hormonları olan inkretinler yemek yenmesini ardından salınarak, pankreastan insülin salınmasını sağlatıp glukagon salınmasını inhibe etmekte ve glukoz homeostazında önemli rol oynamaktadırlar. İnkretin hormonlarının bu etkisi tip 2 diyabet hastalarında azalmakta ve kan glukoz seviyelerindeki denge bozulmaktadır. Tip 2'lerin çoğunda inkretinlere direnç vardır. Pek çok tip 1 ve 2'lerde gastrik boşalma hızının artmış olması da postprandiyal hiperglisemiye neden olmaktadır (Mu ve ark., 2009; Halimi, 2008).

2.6 Tiazolidindionlar (TZD)

Tip 2 diyabetin metabolik sendromda insülin direncinin temel mekanizma olduğunun anlaşılmasıyla birlikte yaşam tarzı değişikliği, kilo verme gibi geleneksel yaklaşımların yanında insülin direncini kırmaya yönelik çeşitli farmakolojik ajanlar geliştirilmiştir. Bu ajanlardan biri olan tiazolidindionlar 3 temel gupta etkin madde altında sınıflandırılmıştır; troglitazon, PIO ve rosiglitazon olmak üzere üç sınıftan oluşmaktadır (Mudaliar ve Henry, 2001). Yeni sınıf oral antidiyabetikler olarak adlandırılan TZD grubu ilaçlar, tip 2 diyabetli hastalarda, lipidemi, glisemi ve insülinemi azaltıp insülin hassasiyeti oluşturduklarından metabolik kontrol sağlamak amacıyla kullanılmaktadırlar. TZD'lar, glukoz ve lipid metabolizması ve enerji dengesi ile ilgili etkilerini lipoprotein lipaz, yağ asidi taşıyıcı protein, adiposit yağ asidi bağlayıcı protein, yağ açıl-KoA sentaz, malik enzim, glukoz taşıyıcısı, glukokinaz gibi yapılar için gerekli kodlar içeren karmaşık birkaç genin transkripsiyonunu değiştirebilen PPAR γ 'yı uyararak yapmaktadır. Yaygın kabul gören bu ilaçlar hücre içinde bulunan nükleer PPAR γ 'ya etkileri sonucu insülinin post reseptör işlevlerini yerine getirmesini de kolaylaştırmaktadır. TZD'lar adipoz doku, kas ve karaciğerde insülin rezistansını azaltır. Fakat PPAR γ gamma ağırlıklı olarak adipoz dokuda tanımlanmıştır. TZD grubu ilaçlar, adiposit farklılaşması yaparak hücre içine yağ asidi alınımını artırırlar. Pankreas β hücre fonksiyonlarının gelişmesine yardımcı olduğu gibi plazma SYA ve TG düzeylerini azaltarak pankreas adacıklarını SYA'ların lipotoksik etkisine karşı da korumaktadırlar. PPAR γ agonistik etki gösteren TZD grubu ilaçlardan PIO'un lipid düşürücü etkisi rosiglitazon ve troglitazondan daha fazladır. PIO'un lipoprotein lipaz ekspresyonunu arttırdığı, apolipoprotein CIII ekspresyonunu azalttığı gösterilmişse de asıl etkisinin yağ asidi ve trigliserit sentezini inhibe etmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Lebovitz, 2001).

PIO aynı zamanda LDL-K ve VLDL-K'yi de azaltmaktadır. İnsülin direncinin varlığında insüline bağımlı vasküler dengenin bozulduğu görülmüştür ancak bu durum TZD uygulanmasından sonra tek doz da bile düzelebilmektedir. TZD'ların vazokonstrüksiyonu azalttığı, L-tipi Ca kanallarını inhibe ettiği, vasküler düz kas hücrelerinde etkili olduğu, endotel disfonksiyonda artan TNF α salınımını inhibe ettiği bilinmektedir. PPAR'ların makrofajlar, T-hücreleri ve nötrofillerde yer alması dolayısıyla TZD'ların inflamasyonu baskıladığı, bunun da insülin direnci sendromunda hızlanan ateroskleroz sürecinde yavaşlamaya neden olduğu gösterilmiştir (Goldstein, 2002).

TZD grubu ilaçlar bugün piyasada bulunan ve insülin rezistansını kırmada en etkin ajanlardandır. Lipid profili, arteryel tansiyon ve inflamasyon üzerindeki olumlu etkileride düşünüldüğünde, metabolik sendromlu hastalarda monoterapi veya kombine tedavide kullanılabilirler. Kardiyovasküler hastalıklar gibi tip 2 diyabetin sekonder komplikasyonlarında da TZD'lar oldukça faydalı bulunmuştur. Bu da insülin direncini kırmaya yönelik tedavi yaklaşımlarının ne kadar akılcı bir yol olduğunu düşündürmektedir. Diyetle indüklenen obez fare ve obez sıçan modellerinde TZD uygulandığında resistin düzeylerinde azalma görülmüştür. İnsanlar üzerinde yapılan çalışmalar TZD'ların adipoz dokuda PPAR γ 'a bağlanarak resistin mRNA ekspresyonunu ve serum resistin düzeylerini azalttığını göstermiştir (Hartman, 2002). Metabolik sendrom sadece ülkemizde değil tüm dünyada en önemli sağlık sorunu olmaya adaydır. Bu durum da doğal olarak metabolik sendromla ilgili çalışmaların hız kazanmasına neden olmuştur. Özellikle etyoloji ve buna yönelik yeni tedavi yaklaşımları, üzerinde titizlikle durulan çalışma konularıdır. Metabolik sendrom insülin direnci temelinde klinik tabloyu oluşturmaktadır. Son birkaç yılda keşfedilen ve metabolik sendromla yakın ilişkisi olduğu tespit edilen resistin düzeyleri ile insülin rezistansı üzerine etkisi gösterilmiş bazı ilaç türleri, bize bu ilaçların resistin ile ilişkisinin olup olmadığını düşündürdü. TZD özellikle PPAR γ 'ya agonistik etkisi ile günümüzde metabolik sendrom tedavisinde etkin olarak kullanılmaktadır. Ancak bu ajanın resistin ile ilişkisi üzerine yayınlar olsa da bu ilişkinin düzeyi netlik kazanmamıştır (Dubois ve ark., 2002; Hauner, 2002). Kuersetin, etki spektrumu oldukça geniş bir ajandır. İnsülin rezistansı üzerine etkileri de bilinmektedir. 2008'de yapılan bir çalışmada TZD ile karşılaştırıldığında kuersetinin daha etkin olduğu

gösterilmiştir ancak kuersetinin resistin düzeyleri üzerine etkisi araştırılmamıştır. İnsülin rezistansına etkili diğer bir ajan olan α -Lipoic asit (ALA)'ın da resistin düzeyleri üzerine etkisi bilinmemektedir. Bu konularda yapılması planlanan çalışmaların önemli literatür katkısı sağlayacağı çok açıktır. Buna yönelik yapılan bir çalışmada metabolik sendromlu farelerde, kuersetin, alfa lipoik asit ve tiazolidindion uygulanmasının serum resistin düzeyleri üzerine etkilerinin araştırılmış, bu etkilerin karşılaştırılması ve tüm ajanların, serum insülin, glukoz, trigliserit, total kolesterol, VLDL-K, HDL-K, LDL-K, total antioksidan kapasite (TAOK), plazma HbA1c ve serum ürik asit düzeylerinin üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmaktadır (Bailey ve Day, 2001; Braunwald ve ark., 2004).

2.6.1 Pioglitazon

TZD ailesinden oral bir antidiyabetik ajan olan PIO, 1999'dan beri tip 2 diyabet tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. TZD ailesinden oral bir antidiyabetik ajan olan PIO, peroksizom proliferatörle aktive edilmiş reseptör ailesinden PPAR γ 'nın agonistidir. PPAR γ dahil olduğu glikoz ve lipit dengesinin düzenlenmesi, enflamasyon, hücre çoğalması gibi işlevleri içeren geniş bir eylem skalasına sahiptir. Pioglitazon glikoz ve lipit metabolizmasında iş gören bazı protein ve enzimleri kodlayan genlerin transkripsiyonunu değiştirebilen PPAR γ 'a bağlanır ve bu reseptörü uyararak dokularda insüline duyarlılığı artırır. (Cariou ve ark., 2012).

PIO, ABD'de ilk kez onaylandığında, klinik öncesi bir çalışma PIO tedavisinden sonra erkek sıçanlarda mesane kanserinin ortaya çıktığını ve ileriye dönük (PROspective PioglitAzone Clinical Trial In MacroVascular Events Outcome) olaylarda klinik deneme de dahil olmak üzere erken klinik çalışmaların mümkün olduğunu gösterdi (PROactive, 2005). İnsanlarda güvenlik riski ayrıca, 2014 yılında yapılan meta-analizler, PIO kullanıcılarında mesane kanseri insidansının artmasının, süre ve birikmiş dozajla ilişkili olduğunu göstermiştir (U.S. Food and Drug Administration, 2011).

PIO, insülin direnci varlığında hepatik ve periferik insülin duyarlılığını artıran, böylece hepatik glukoneogenezi inhibe eden ve iç organların glikoz alımını artıran bir antihiperglisemik ajandır. PIO genellikle iyi tolere edilir, kilo alımı ve ödem en sık

görülen yan etkileridir. PIO ile diğer etkin maddeler arasında bilinen herhangi bir ilaç etkileşimi yoktur. Tip 2 diyabetli hastalarda yapılan klinik çalışmalarda, monoterapi olarak PIO veya metformin, repaglinid, insülin veya bir sülfonilüre ile kombinasyon halinde kullanılarak glisemik kontrolde ve serum lipid profillerinde hem uzun hem de kısa süreli gelişmelere neden olmuştur. PIO, bazı kardiyovasküler risklerin ve arteriyoskleroz ölçümlerinin azaltılmasında da etkili olmuştur. Bu nedenle PIO, tip 2 diyabetli hastalar için etkili bir tedavi seçeneği sunabilir (Swanson ve ark., 1995).

2.6.1.1 Pioglitazonun Farmakodinamik Özellikleri

PIO'un da dahil olduğu tiazolidindion, ligandla aktive edilmiş transkripsiyon faktörlerinin nükleer reseptör üst ailesinin bir üyesi olan PPAR γ için yüksek afiniteli ligandlardır. Bir ligand tarafından aktive edildiğinde, PPAR γ , başka bir nükleer reseptör olan retinoid-X reseptörüyle bir heterodimer oluşturur (Saltiel, 1999). Bu heterodimer daha sonra spesifik DNA dizilerine bağlanır ve glikoz ve lipidlerin metabolizmasında rol oynayan hedef genlerin transkripsiyonel aktivitesini düzenler. Troglitazon, rosiglitazon ve PIO dahil olmak üzere farklı PPAR γ agonistleri, muhtemelen reseptördeki farklı yapısal değişiklikler ve farklı ligandların yeterliliği nedeniyle 100'den fazla PPAR γ 'e yanıt veren genlerin düzenlenmesinde farklı etkiler göstermektedir. Ek bir mekanizma olan transrepresyon, nükleer faktör (NF)- γ B yolu gibi diğer transkripsiyon faktörlerinin eylemlerine müdahale ederek PPAR'ların anti-enflamatuar etkilerini düzenleyebilir. PPAR γ 'nın PIO tarafından aktivasyonu, periferik, hepatik ve adiposit insülin duyarlılığının artmasına yol açar ancak mekanizma tam olarak açıklanamamıştır (Granberry ve Fonseca, 1999). TZD'lar, adipositlerin farklılaşmasını ve çoğalmasını ve diğer insüline duyarlı dokuları ve muhtemelen pankreas beta-hücrelerinin yüksek FFA seviyelerinin zararlı metabolik etkilerinden koruyabilecek serbest yağ asitlerinin (FFA) alımını ve depolanmasını teşvik eder. PIO'un faydalı etkilerini ortaya koymak için insülinin varlığı ve Langerhans adacıklarındaki hücrelerin fonksiyonlarının korunmasına da yardımcı olabileceği gibi, insülin sekretagogu da değildir. PIO ve aktif metabolitleri, hidroksi türevleri MII ve MIV ve keto türevi MIII türevleri, karaciğerde ve periferik dokularda insülin direncini azaltarak ve karaciğer glikozunu azaltarak işlevsiz glikoz homeostazını düzeltirler. Hayvan modellerinde, MII, MIII ve MIV, PIO'un %40-

60'ında antihiperglisemik etki gösterir. Ek olarak, MII'nin trigliserit (TG) düşürücü potansiyeli, ana bileşinginkinden 2 kat daha yüksektir, MIII ve MIV, PIO'dan biraz daha az TG-düşürücü bir etkiye sahiptir (Lambe ve ark.,1996; Hallakou ve ark., 1997).

2.6.2 Metabolik Etkisi

2.6.2.1 İnsülin Direnci ve Glikoz Seviyeleri

PIO, tip 2 diyabetli hastalarda hiperglisemiyi ve hiper insülinemiyi azaltmaktadır. PIO, rastgele elde edilmiş ve kontrollü, 12 ila 26 haftalık çalışmalarda tip 2 diyabetli hastalarda hem iç organlarda hem de periferik dokularda glukoz alımını artırarak periferik insülin duyarlılığını arttırmaktadır (Kemnitz ve ark., 1994).

2.6.2.2 Yağ Dokusu Farklılaşması ve Ağırlık Artışı

Aşırı viseral yağ dokusundaki artış insülin direncinin bir özelliğidir. PIO'un da dahil olduğu Tiazolidindionler, lipid depolanmasını ve viseralden deri altı birikintilerine yeniden dağılımını teşvik eder. Bu da tüm vücut yağ dokusunda bir artışa neden olur. PIO monoterapisi uygulanan tip 2 diyabetli hastalarda ağırlık artışları (0.3-3.6 kg) bildirilmiştir. Bu tür artışların, viseral yağda azalmalar eşliğinde artmış deri altı yağına bağlı olduğu görülmektedir (Suzuki ve ark., 1999).

2.6.2.2 Kardiyovasküler Hücreler Üstüne Etkisi

Tip 2 diyabet stent veya anjiyoplasti gibi operasyonlar sonrası koroner kalp hastalığı ve koroner restenoz gibi aterosklerotik durumların olumşumda etkenlerden biri olduğu ortaya koyulmuştur. PPAR γ 'nin arter duvarlarının intimasına yerleştirilen makrofajların kolesterol yüklü köpük hücrelerine dönüşümüne katılmış olmasına rağmen aterosklerozun ilerlemesinde kritik bir adım olan klinik çalışmalardan elde edilen veriler, tiazolidindionler tip 2 diyabetli hastaları koruyabileceğini göstermektedir. Aterosklerozlardan karotis medial intima kalınlığında bir azalma ile görülür. Ek olarak, koroner stent implantasyonu sonrası neointimal doku proliferasyonu, kontrol grubundaki PIO 30 mg/gün tip 2 diyabetli hastalarda kontrol hastalarına göre anlamlı derecede düşüken, neointimal doku hacmi ve restenoz insidansı, diyabetik olmayan PIO kullanan bireylerde daha da azalmıştır (Egan ve ark., 1999).

2.6.3 Farmakokinetik Özellikler

PIO'un farmakokinetiği ile ilgili veriler, sağlıklı gönüllüler veya tip 2 diyabetli hastalarda, üreticinin elde ettiği geriye dönüşleri ve ilaç etkileşimleriyle ilgili çalışmaların incelenmesinden elde edilmiştir.

2.6.3.1 Emilim ve Dağılım

Genel olarak, tip 2 diyabetli hastalarda PIO'un farmakokinetiği, sağlıklı bireyler ve diyabetli kişilere PIO kullanımıyla elde edilmiştir. Oral olarak verilen PIO hızla emilir ve ilk 30 dakika içinde kan serumu içerisinde ölçülebilir. Hem kullanılan ilacın hem de metabolitlerin serum konsantrasyonları, genellikle 4-7 gün tedaviden sonra ulaşılan seviyesi kullanılan ilacın dozuna bağlıdır. Farmakolojik açıdan aktif metabolit, PIO'nunkinden büyük veya ona eşit serum konsantrasyonlarına ulaşır. Besin alımı ile emilim hafifçe ertelenir, yemekle birlikte 2 saat ile karşılaştırıldığında, 3-4 saat sonra beklenen serum konsantrasyonlarına ulaşılır. Bununla birlikte, serum konsantrasyonu zaman eğrisi altına kalan bölgede (sistemik maruziyeti gösterir), beslenen ve aç olan durumlar arasında benzerdir ve bu nedenle PIO, yemeklerle birlikte veya yemeksiz alınabilir (Mathisen ve ark., 1999).

2.6.3.2 Metabolizma ve Eliminasyon

PIO karaciğerde alifatik metilen gruplarının oksidasyonu ve hidroksilasyonu yoluyla, en önemli gruplar da CYP2C8 / 9 ve CYP3A4'tür. Beş primer metabolitden oluşmaktadır. Bunlar: (MI, MII, MIV, MV ve MVI); MIV ayrıca MIII'ye metabolize edilir ve MV, MVI'ya metabolize edilebilir. Kullanımının ardından, idrarda PIO dozunun yaklaşık %15-30'u metabolit olarak geri kazanılır. Geri kazanılmayan PIO'un renal eliminasyonu ihmal edilebilir. Kalıntının safrada değişmeden veya metabolit olarak salgılandığı ve dışkıda elimine edildiği varsayılmaktadır. PIO'un ortalama terminal eliminasyon yarı ömrü ($t_{1/2\beta}$) 3-7 saattir; Bununla birlikte, aktif metabolitleri çok daha uzun bir ($t_{1/2\beta}$)'ye sahiptir ve günde bir kez PIO uygulamasına izin veren farmakolojik aktiviteye katkıda bulunma olasılığı yüksektir (Egan ve ark., 1999).

2.6.3.3 Klinik Çalışmalar

PIO'un monoterapi olarak veya başka bir antidiyabetik madde ile kombinasyon halinde verildiği rastgele, çift kontrollü plasebo etkinliği göz önüne alınan çalışmalarda tip 2 diyabetli bireylerin tedavisinde değerlendirilmiştir. Tüm çalışmalarda, PIO günde bir kez oral yoldan uygulanmıştır. Bildirilen çalışmaların çoğu ABD'de uygulanan çalışmalardan oluşturuyor; PIO'un ikinci bir anti-diyabetik ilacı ile birleştirildiği durumlarda, ilave herhangi bir antidiyabetik ajan verilmemiştir ve hastaların PIO başlamadan en az 6 hafta önce ikinci bir ilacın sabit bir dozajında tutulmaları istenmiştir. Bu kombinasyon terapisinde bu duruma uygun deneklerle çalışılmıştır. Çalışmalarda bazal glikosile edilmiş hemoglobın (HbA1c) seviyeleri en az %8 olarak bulunmuştur (Mathisen ve ark., 1999; Kaneko ve ark., 1997).

2.7 Benzer Çalışmalarda Pioglitazonun Kanserojen Etkinliği

Son kanıtlar oral hipoglisemik bir ajan olan PIO'un mesane kanseri riskinin artmasıyla ilişkili olabileceği ortaya çıkmıştır. Bu potansiyel bağ, ilk olarak PROaktif (Prospektif pioglitAzone Klinik Araştırma MakroVasküler) çalışmasında, PIO'un 14 mesane kanseri vakasıyla (%0.5) plasebo grubunda (%0.2) karşılaştırıldığında fark edildi. Bununla birlikte, birkaç gözlem çalışması tarafından bildirilen sonuçlar da vardır. Fransa Ulusal Sağlık Sigortası Bilgi Sistemini kullanan bir popülasyon temelli kohort çalışması, PIO ile ilişkili olarak mesane kanseri tehlikesini %20 oranında bulmuştur (hazard ratio, düzeltilmiş risk oranı-HR 1.22) (confidence index, güven endeksi-CI %95 1.05-1.43). Veri kaynağı olarak Kaiser Permanente Kuzey Kaliforniya (KPNC) diyabet kayıt defteri kullanılarak yapılan bir çalışmada da benzer sonuçlar bildirilmiştir. Buna karşılık, bir Asya popülasyonundan elde edilen verileri kullanan bir analiz böyle bir ilişki kurulamamıştır. Bu nedenle ek çalışmalar, PIO kullanıcıları arasında mesane kanseri riskini çevreleyen kanıtların mevcut çalışmalarda görece az sayıda mesane kanseri vakası nedeniyle çok sınırlı olması nedeniyle garanti altına alınmaktadır. Ek olarak, PIO maruziyetinin uzunluğu ve mesane kanseri arasındaki korelasyon henüz onaylanmamıştır. Ayrıca, mesane kanseri riski ile diğer tiazolidindionler (örneğin rosiglitazon) arasındaki ilişki hakkındaki mevcut bilgiler çok sınırlıdır. Bununla birlikte, bu sınırlamalar, PIO'un güvenliği hakkında daha fazla

bilgiye ve iki tiazolidindionun neden olduğu göreceli mesane kanseri riskinin karşılaştırılması için büyük bir güvence gerektirir (Tuccori ve ark., 2016).

Bilim dünyasının ve ülkelerin sağlık sektörü paydaşlarının kuşku ve endişe kaynağı PIO kullanımı ile mesane kanseri arasındaki bağlantıdır. Bu tezde söz konusu bu ilişki sınanmıştır. PIO'un, in vitro sistemde, insan kaynaklı normal ürotelyal hücrelerde hücre canlılığına etkisinin mitokondriyal aktivite ile neoplastik transformasyon potansiyelinin de kontak inhibisyon ve ankoraj-bağımsız büyüme testleri ile belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla planlanıp yürütülen tezde, konu hakkındaki tartışmaların sonlandırılmasına katkı sağlanması hedeflenmiştir.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

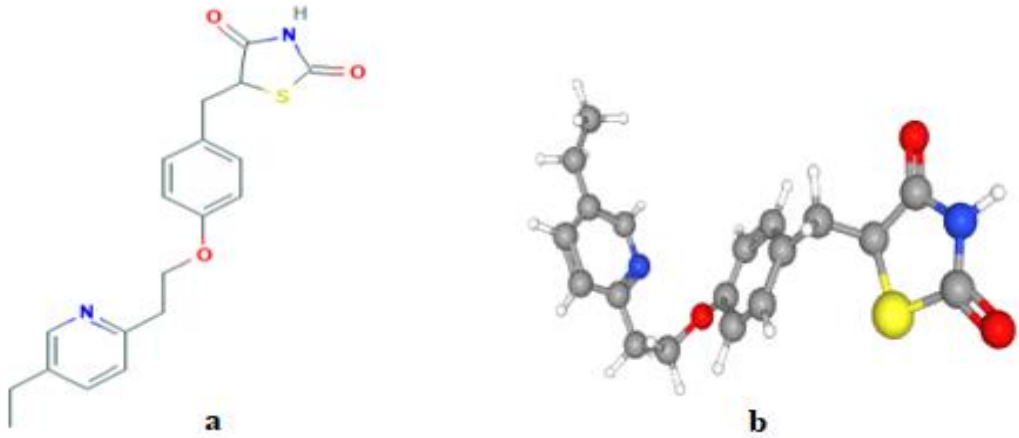
3.1 Materyal

3.1.1 Kullanılan Araçlar

- ❖ Biyogüvenlik Kabini
- ❖ Karbondioksit (CO₂)'li İnkübatör
- ❖ Hassas Terazi
- ❖ Hücre Sayım Cihazı
- ❖ İvert Mikroskop
- ❖ Işık Mikroskoku
- ❖ Mikroplaka Eliza Okuyucu
- ❖ Santrifüj
- ❖ Su Banyosu
- ❖ Vorteks Karıştırıcı

3.1.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

3.1.2.1 Pioglitazon (Sigma)



Şekil 3.1 Pioglitazon'un 2D (a) ve 3D (b) Kimyasal Yapısı

- ❖ Kimyasal Adı(IUPAC): 5-[[4-[2-(5-ethylpyridin-2-yl) ethoxy] phenyl] methyl]-1.3-thiazolidine-2.4-dione
- ❖ Kapalı Formül: C₁₉H₂₀N₂O₃S
- ❖ Moleküler Ağırlığı: 356.4 g/mol
- ❖ Erime Noktası: 183-184 °C
- ❖ Ortalama Çözünürlük: 46.85 mg/L at 25 °C (suda)
- ❖ Buhar Basıncı: 2.88X10⁻¹⁴ mm Hg at 25 °C
- ❖ Suda Dağalım Katsayısı: 2.3
- ❖ İstikrar / Raf Ömrü: Önerilen depolama koşullarında kararludur. (PIO hidroklorür)
- ❖ Yanma durumunda oluşan tehlikeli bozunma ürünleri: Karbon oksitler, Azot oksitler (NO_x), Kükürt oksitler, Hidrojen klorür gazı. PIO hidroklorür

3.1.2.2 Keratinocyte-SFM (1X) (THERMO)

Keratinosit-SFM (serumsuz besiyeri), insan keratinositlerinin ve diğer tipteki epitel hücrelerinin hücre besleyicisine ihtiyaç duymadan büyümesi ve bakımı için optimize edilmiştir. Keratinosit-SFM, kullanım sırasında İnsan Rekombinant Epidermal Büyüme Faktörü (rEGF) ve Sığır Hipofiz Ekstresi (BPE) ile desteklendiğinde serumsuz bir ortamdır. Her iki takviye de rEGF ve BPE, bazal ortam ile ayrı bir ambalaj içinde tedarik edilir. Kompleks ortam, dermal ikameleri, in vitro toksikoloji ve gen terapisini içeren çalışmalar için insan epidermal keratinositlerini yetiştirmek için kullanılabilir. Bu ortam, servikal epitel hücrelerini yetiştirmek için başarıyla kullanılmıştır ve İnsan Kornea Epitel Hücrelerinin (HCEC'ler) kültürü için önerilmektedir. Serumsuz koşullar altında çoğaldığı gösterilmiş olan insan bronşiyal epitel hücreleri gibi diğer epitel hücrelerinin yetiştirilmesi için bir ortam olarak da uygun olabilir. Kalsiyum içermeyen Keratinosit-SFM, araştırmacıların kendi uygulamalarının taleplerini karşılamak için Ca⁺⁺ konsantrasyonunu ayarlamalarını sağlamak için kullanılabilir.

3.1.2.3 Bovine Pituitary Extract (BPE) (THERMO)

Sığır Hipofiz Ekstresi (BPE), çeşitli vücut fonksiyonlarının düzenlenmesi için hayati önemi olan çeşitli hormonları üreten ve salgılayan küçük bir endokrin bezi olan hipofiz bezinden elde edilir. Hücre uygulamalarında (BPE), yalnızca Sünger Biçimli Ensefalopatinin (BSE) kontaminasyon olasılığını önlemek için Yeni Zelanda'da yetiştirilen genç ve sağlıklı sığırların hipofiz bezlerinden türetilmiştir. Sığır eti, Yeni Zelanda ve ABD Tarım Bakanlığı tarafından insan tüketimi için güvenli olarak onaylanmıştır. Geniş bir yelpazedeki in vitro hücrelerde, özellikle epitelyal menşeli ve kök hücrelerde sağlam büyümenin teşvik edilmesinde etkili bir şekilde kullanılan farazi mitojenlerin geniş yelpazesini içerir. Asla liyofilize edilmemiştir ve bu nedenle biyolojik aktivitenin tam spektrumunu korur. Yüksek saflığı ve etkisinden dolayı, sağlıklı ve sağlam hücre büyümesi için hücre kültürü ortamını desteklemek için gereken BPE hacmi, serum hacminin sadece bir kısmıdır, bu nedenle önemli maliyet tasarrufu sağlar.

3.1.2.4 EGF, Human Recombinant (THERMO)

EGF, hücre kültürü uygulamalarında kullanım amaçlı biyoaktif bir proteindir. EGF, spesifik hücrelerin in vivo farklılaşması üzerinde derin bir etkiye sahiptir ve hem ektodermal hem de mezodermal kökenli çeşitli kültür hücreleri için güçlü bir mitojenik faktördür.

- ❖ Dimetil Sülfoksit (DMSO) (MERCK)
- ❖ Ultra Saline (LONZA)
- ❖ Tripsin-EDTA (LONZA)
- ❖ Tripsin Nötralize Solüsyonu (TNS) (LONZA)
- ❖ Sıvı Azot (LN)
- ❖ Metanol (SIGMA)
- ❖ Kristal Viyole (SIGMA)
- ❖ Trypan Mavisi (GIBCO)

3.2 YÖNTEMLER

3.2.1 Hücre Kültürü

Endüstriyel kimyasallar, ilaç etken maddeleri, gıda katkı maddeleri gibi kimyasal maddelerin ve diğer çevresel etkenlerin genotoksik etkilerini belirlemek insan ve hayvan sağlığının korunması için çok önemlidir. Uluslararası standartlara uygun bir kimyasalın genotoksik etkisini araştırmak için, önceden belirlenen birçok deney uygulanması gerekmektedir. Bu deneyler önce *in vitro* olarak başlamakta daha sonra *in vivo* testler, *in vitro* testleri izlemektedir (Corvi ve ark., 2013). Çalışmamızda, mesane kanser hikayesi olmayan böbrek nakli donörlerinden elde edilen mesane dokusundan izole edilmiş ürotelyal hücrelerden özel olarak türetilmiş ve ölümsüzleştirilmiş insan transforme olmayan mesane epitel hücre hattı (hTERT-Uro) hTU1-38 kullanılmıştır (Kim ve ark., 2011; Speer ve ark., 2017). Benzer fenotip, karyotip, farklılaşma ve kültür büyümesi karakterlerine sahip olan hTU1-38 ve benzerleri ölümsüz HBLAK ve hTERT-NHU gibi hücre hatlarının, ürotelyal *in vitro* karsinogenezi, kanser gelişiminin erken durumları, ürotelyumu etkileyen başka hastalıkları, kanser ilaçlarının tümör özgülüğü çalışmalarının yanı sıra normal ürotelyal hücre/doku biyolojisi çalışmalarında kullanılabileceği belirtilmiştir (Fadl-Elmula ve ark., 2000; Georgopoulos ve ark., 2011; Kim ve ark., 2011; Hoffmann ve ark., 2016). Tezde uygulanan deneylerde PIO'un hTU1-38 hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi ve neoplastik potansiyeli test edilmiştir.

hTU1-38 hücreleri; serumsuz keratinosit besiyerinde, 37°C'de, %95 nemde ve %5 CO₂'li inkübatörde tutulmuştur. Besi yerleri kültür bakımı şartlarına uygun olarak haftada iki defa ya da gerekli görüldükçe değiştirilerek hücrelerin gelişimleri izlenmiştir.

3.2.1.1 Hücre Hattının Çözülmesi

Kültür işlemlerine başlayana kadar hTU1-38 hücreleri, -196°C sıvı azot bulunan tankta sıvı azot buhar fazı içerisinde muhafaza edilmiştir. Kültür zamanı geldiğinde sıvı azottan çıkarılarak su banyosunda hafifçe sallanarak çözülmüş ve sonrasında önce içerisindeki DMSO ve FBS uzaklaştırılmak için santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası altta kalan hücrelerin üzeri alınıp besiyeri eklenmiştir. Sonrasında

hücreler uygun miktarda besiyeri içeren kültür flask içerisine konulmuş ve flask fizyolojik pH'nın sağlanması için inkübatöre konulmuştur. Serumsuz keratinosit besiyeri içeren flask içerisine aktarılmış ve %5 CO₂'li inkübatörde 37°C'de ve %95 nemli ortamda inkübe edilmiştir.

3.2.1.2 Hücre Hattının Paşajlanması

hTU1-38 hücreleri tam konfluent duruma geldiğinde hücreler split edilmeye karar verilmiştir. Pasaj yapılacak hücrelerin besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra, hücreler üzerine tripsin-EDTA eklenmiş ve beş dakika beklenmiştir. Tripsin hücrelerin flask üzerinde bulunan proteinlerle olan bağlantılarını kırarak hücreleri yüzeyden kaldırmaktadır. Bekleme süresi sonrasında, flask içerisine eşit miktarda tripsinin etkisini nötralize solüsyon (TNS) eklenmiştir. Seyreltilmiş hücre süspansiyonu, steril falkon tüpüne alınarak santrifüj edilmiştir. Sonrasında süpernatant uzaklaştırılmış pellette bulunan hücrelerin üzerine sayım için tekrar 2-4 ml besiyeri eklenerek içerisinde süspanse edilmiştir. Hücre süspansiyonunun 10 µl'si eşit hacimde tripan mavisi ile karıştırılarak sayım lamalarına yüklenmiş ve hücre sayım aletinde mililitre solüsyon içerisindeki hücre sayısı ve canlılık oranı tespit edilmiştir. Sayım sonrası hücre solüsyonu ve besiyeri yapılacak çalışmanın amacına uygun oranda pipetlenerek ekimler yapılmıştır. Yeterli hücre sağlanıncaya kadar bu işleme devam edilmiştir. Her işlemde üretilen bir miktar hücre ise dondurularak saklanmıştır.

3.2.1.3 Hücre Hattının Dondurulması

İn vitro kültür pasajlaması hücre hatlarında geri dönüşümü olmayan genetik değişikliğe sebep olduğu için, uzun süre pasajlamada kalan hücreler başlangıç hücrelerinden daha farklı karakterlere sahip olabilir. Bunun engellenmesi ve deneylerin aynı pasaj seviyesinde tekrarının sağlanması için, hücre kültürleri düzenli olarak kısa ve uzun süreli sıvı azotta stoklanmıştır. Stoklanma için, bir milyon hücre 1ml'lik %80 besiyeri, %10 DMSO ve %10 fetal bovine serum karışımı içeren kriyojenik tüpler içerisine konulmuştur. Kriyojenik tüpler, termal şoku engellemek için 1 gece süreyle -80°C tutulmuş daha sonra sıvı azot tankına -196°C'ye transfer edilmiştir.

3.2.1.4 Hücre Sayımı

Hücre kültürüyle çalışırken, hücrelerin besin ortamındaki yoğunluğunu ve canlılığını belirlemek çok önemlidir. Deneylerin kontrol altında yapılabilmesi açısından ekilen hücrelerin miktarı büyük önem arz etmektedir. Bu açıdan hücre kültürlerinde yapılan hücre sayımlarının hassasiyeti büyük önem arz etmektedir.

Hücreler tripan mavisi [$C_{34}H_{28}N_6O_{14}S_4$] adı verilen negatif yüklü bir boya ile boyanmıştır. Hücre zarı sağlıklı olan hücrelerde tripan mavisi, hücre içerisine giremez. Cansız olan hücreler, boyayı absorbe ettikleri için, maviye boyanırlar. Hücreler tripan mavisi içerisinde uzun süre bırakılacak olursa canlı hücrelerde boyayı absorbe edeceği için bu testin seri bir şekilde tamamlanması gerekir. Bizim deneylerimizde 10 µl hücre süspansiyonu, 10 µl %0.4'lük tripan mavisiyle karıştırılmış ve bu karışımın 10 µl'si hücre sayım lamına aktararak ölçüm yapılmıştır. Ölçüm sonucunda canlı hücre, cansız hücre, toplam hücre ve hücre canlılık oranı belirlenmiştir.

3.2.2 Deney Planı ve Grupları

Deneylerimizde negatif kontrol, PIO dozları iki grup kullanılmıştır. Bütün gruplar 24, 48 ve 72 saatlik uygulamalara maruz bırakılmıştır. Transformasyon testinde sadece 72 saatlik uygulama süresi kullanılmıştır. Soft agarda ise en az 4 hafta beklenmiştir. Soft agarda transformasyonda toplanan odaklar kullanılmıştır.

3.2.2.1 Negatif (Çözücü) Kontrol Grubu

Negatif Kontrol grubu hiçbir etkinin beklenmediği gruptur. Bu gruptaki hücreler % 0.1 DMSO içeren besiyeri içerisinde bekletilmiştir.

3.2.2.2 Pioglitazon Dozları

Toz halindeki PIO % 0.1 DMSO içinde çözülerek stok çözelti hazırlanmış, daha sonra saf su ile istenen konsantrasyonlarda PIO çözeltileri elde edilmiştir. MTT testinde kullanılmak üzere PIO için belirlenen dozlar Çizelge 3.1'de gösterilmiştir. Bu PIO dozları 24, 48 ve 72 sürelerde hTU1-38 hücrelerine uygulanarak hücre canlılığı ve buna bağlı IC₅₀ MTT testi ile belirlenmiştir.

Çizelge 3.1 MTT Testinde Uygulanan PIO Dozları

	Pioglitazon (μM)
1. DOZ	1
2. DOZ	2,5
3. DOZ	5
4. DOZ	10
5. DOZ	25
6. DOZ	50
7. DOZ	100
8. DOZ	250

3.2.2 MTT Testi

3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür (MTT) bir tetrazolyum tuzu çeşitidir. Yapı olarak heterosiklik olan organik bir bileşiktir (Altman, 1976). MTT tuzları, indirgendiklerinde formazan denilen bir yapıya dönüşürken; renklerinde de sarıdan mora kayma görülmektedir. Tetrazolyum halkasının kırılması ve indirgenmesi, sadece aktif mitokondri tarafından yapılabilmektedir. Bu nedenle bir hücre kültürü, MTT ile muamele edildiğinde renk reaksiyonu yalnızca canlı hücrelerde gözlenir ve ölü hücreler tetrazolyum bileşiklerini kullanamadıkları için renk değişimine katkı sunmazlar (Mossman, 1983; Riss ve Moravec, 2004).

Uygulanan deneylerde hücre canlılığını ölçmek için MTT testi kullanılarak yapılmıştır. PBS içerisinde %5'lik MTT solüsyonu hazırlanmıştır. MTT çözeltisi ışığa

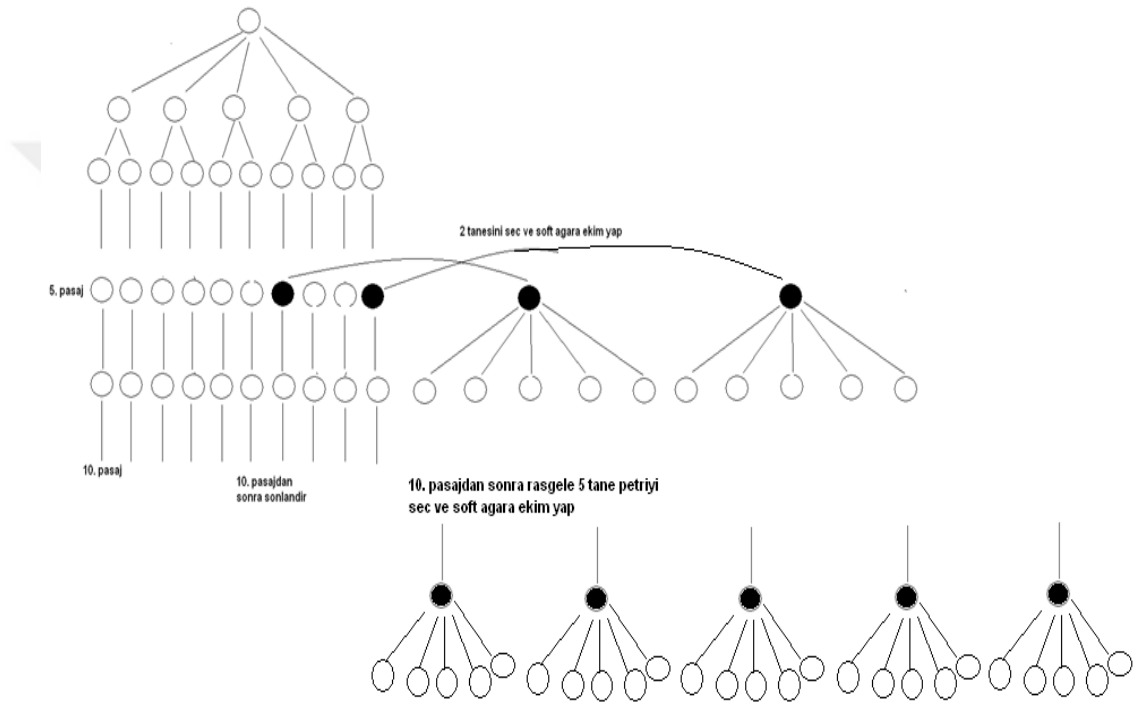
duyarlı olduğu için -4°C 'de karanlıkta saklanmıştır. İnektisite maruz bırakılan hücrelerin kuyucuklarına 20 μl yüzdesel olarak yüzde 10 civarı MTT çözeltisi eklenmiş ve kültür kapları (hücre kültürü) inkübatör içerisinde 3-4 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında MTT içeren besiyeri kuyucuklardan uzaklaştırılmıştır. Kuyucuklar içerisinde oluşan formazon kristallerinin çözülmesi için DMSO eklenmiş ve 15 dk. beklenmiştir. Tetrazolium'un indirgenmesi sonucu oluşan formazanı içeren ve renk değiştiren mor renkli solüsyonun absorbansı 570 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Absorbans değerlerinin ortalamaları alınmış ve blank (sadece besiyeri absorbans değeri) çıkarılarak değerlerin normalizasyonu gerçekleştirilmiştir.

3.2.3 Transformasyon (Kontak İnhibisyon) Testi

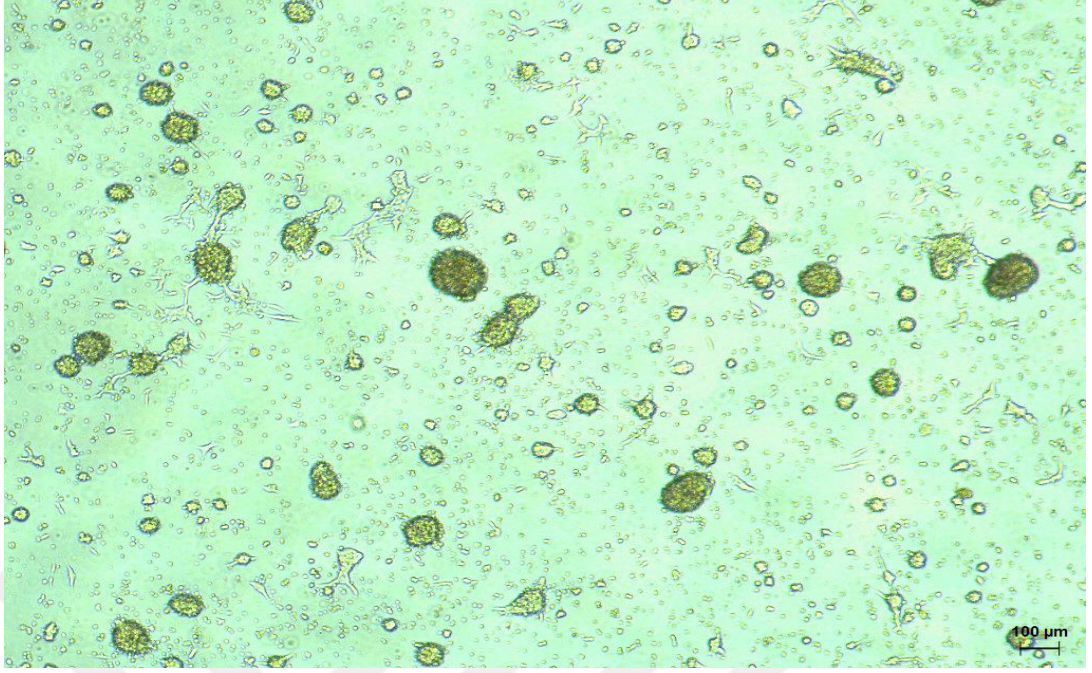
Fibroblast hücrelerinin, in vitro olarak karşılaştığı durumlarda gösterdikleri davranışlarını açıklayan temas inhibisyonu 50 yıldan daha uzun bir süre önce keşfedilmiştir. Normal hücreler çıkıntılarını geri çekerler ve temas yönünü değiştirirler. Bozulan hücre sekresyonu sonucu hücreler değişik yönelimler gösterebilir (Abercrombie ve ark., 1954; Hendrix ve ark., 2007).

PIO'un mesane kanseri potansiyeli hakkındaki tartışmalardan yola çıkarak mesane dokusundan elde edilen hTU1-38 normal hücrelerinde bu potansiyelin belirlenmesi amacıyla transformasyon testi uygulanmıştır. Uygulama öncesi hücreleri çoğaltmak amacıyla ekim yapılmıştır. 60 mm'lik petrilere her bir konsantrasyon için 4 ml besiyeri ile 2×10^5 hücre ekimi yapıp 48 saat beklenmiştir. Hücreler yeterince konfluent olduğunda belirlenen 3 doz (72 saatlik MTT sonucu belirlenen IC_{50} değeri 40 μM , $\frac{1}{2}$ 'si 20 μM ve $\frac{1}{4}$ 'ü 10 μM) uygulanmıştır. Petriler her gün gözlenerek ve %80 doluluğa ulaştığında her bir konsantrasyon 2 ayrı petriye ayrılarak ekim yapılırken sonraki her aşamada her petri için 1'er tane ekim yapılmıştır. Tüm grupların 3 günde bir besiyerleri değiştirilerek odak oluşumu her gün mikroskop altında petrilerin incelenmesi ile takip edilmiştir. Odak oluşumu gözlenirken aynı zamanda hücrelerin invert mikroskopta resimleri periyodik olarak çekilip aradaki fark da gözlenmiştir. Odak oluşumları düzenli olarak fotoğraflanmıştır. Test protokolü kapsamında odak oluşumları en fazla 10. pasaja kadar incelenerek deney sonlandırılmaktadır. Deney sonunda mikroskopta belirlenen odakların yerleri petrinin alt taraflarından

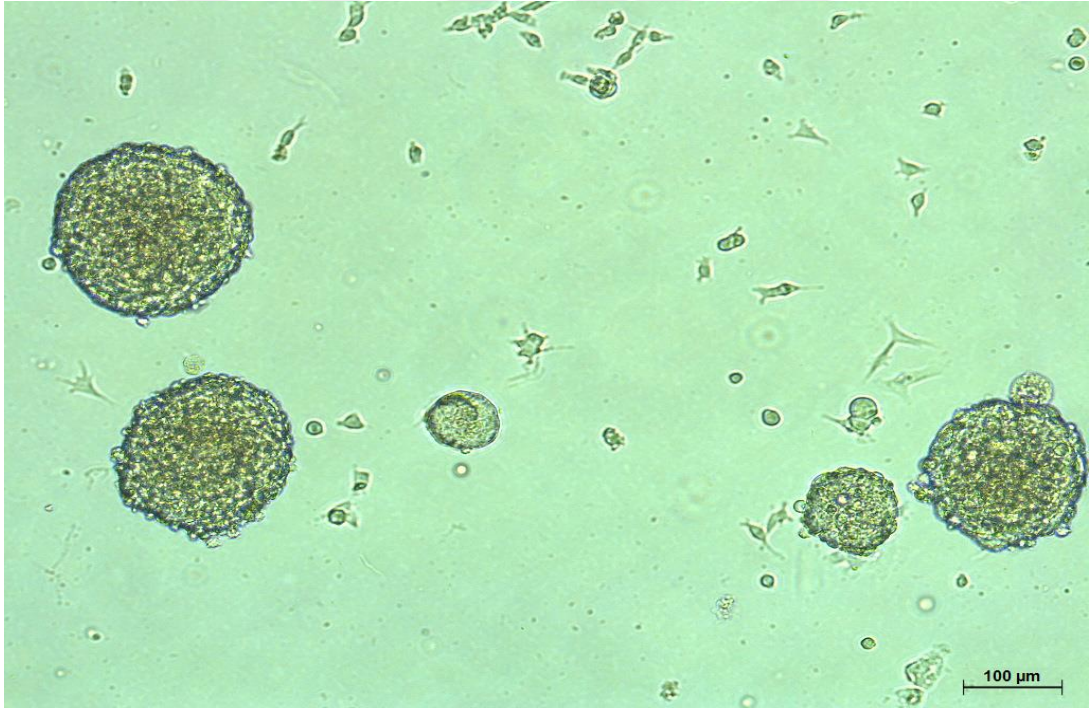
işaretlenmiş ve odaklar toplanmadan önce petripler ultrasonla yıkanmıştır. Vazelinle birlikte sabitlenen plastik halkalar işaretlenen odaklara yerleştirilmiştir. Halkaların içerisine tripsin damlatılıp 5 dakika beklenmiş sonrasında TNS eklenerek tripsin nötralize edilmiştir. Bu sayede çevredeki normal hücrelere dokunulmadan istenilen odaklar toplanıp çoğaltılmak üzere 6 kuyucuklu kültür plakalarına ekilmiştir. Odakları alınan petripler crystal violet ile boyanıp resimleri çekilip saptanan odaklar sayılmıştır (Xie ve ark., 2009).



Şekil 3.2 Transformasyon Test Protokolüne Göre Kültür Kaplarına Ekim Şeması



Şekil 3.3 PIO Uygulaması Sonrası Transforme Olan hTU1-38 Hücrelerinin Oluşturduğu Odakların Genel Görüntüsü (4x)



Şekil 3.4 PIO Uygulaması Sonrası Transforme Olan hTU1-38 Hücrelerinin Oluşturduğu Odakların Genel Görüntüsü (20x)

3.2.3.1 Kristal Viyole Boyama

Kristal viyole boyası, 2.5 gr kristal viyole boyasının 800 ml metanol içerisinde çözünmesiyle hazırlanmıştır. Bunun üzerine 100 ml %37'lik formaldehit ve 100 ml deiyonize su eklenmiştir. Sonrasında boyama işlemine başlamak için petriyerler içindeki besiyerleri uzaklaştırılmıştır. Petriyerler 2 kere ultrasaline ile yıkandıktan sonra içerisine metanol koyulup oda sıcaklığında 20 dakika beklenmiştir. Bu işlem sayesinde hücrelerin boya alması kolaylaştırılmıştır. Metanol döküldükten sonra kristal viyole koyulup hücrelerin boyanması için 30 dakika beklenmiştir. Uygulama sonrası boya tekrar kullanılmak için kabına koyulmuştur. Petriyerler yıkamak amacıyla musluğun altına bir kap bırakılmıştır. Bu kap musluğun altına getirilip su hafiften açıldıktan sonra petriyerler yavaşça kabın içine daldırılıp yıkanmıştır. Bir gece kuruması için kuruma kağıtlarının üzerine bırakılan petriyerlerin resimleri çekilip odakların sayısı saptanmıştır (Schwartz, 1983).

3.2.4 Soft Agar (Ankoraj-bağımsız Büyüme) Testi

Tümör ilerlemesinin in vivo mekanizmalarının araştırılmasındaki doğal zorluklar göz önüne alındığında, hücrelerin yarı-katı matrislerde çoğalma yeteneğini ölçen yumuşak agar koloni oluşumu deneyi gibi hücre bazlı deneyler, kanser araştırmasının bir özelliğinin kullanılmasıyla ilişkilidir. Bu tekniğin konvansiyonel 2D tek tabakalı veya 3D sfero hücre kültürü analizlerine göre önemli bir avantajı, 3D hücresel ortamın in vivo görülene yakın bir şekilde taklit edilmesidir. Önemli olarak, yumuşak agar tahlili aynı zamanda, etkilerini titizlikle test etmek için ideal bir yol sağlar (Horibata ve ark., 2015). Bağlanma ankoraj-bağımlı hücreler çoğalmak için buldukları ortamda bir yüzeye tutunma ihtiyacı duyarlar. Bağlanma-bağımsız hücreler ise çoğalmak için buldukları ortamda herhangi bir yüzeye tutunma ihtiyacı duymazlar. Bu davranış çoğunlukla transforme olmuş hücrelerin özelliğidir. Bağlanma-bağımsız hücrelerin büyümesi, hücre kültür kaplarında daha gelişigüzel ve rastgele görünür. Davranış olarak normal hücreler gibi monolayer olmak yerine gelişigüzel yayılım gösterirler.

Çalışmamızda transformasyon testi ile odaklar toplanmış ve bağlanma-bağımlı veya -bağımsız olup olmadıkları soft agar testi ile belirlenmiştir. Soft agar testi için öncelikle agar çözeltisi hazırlanmıştır (Xie ve ark., 2009):

- ❖ 250 ml'lik cam şişeye 100 ml distile su ve 1.8 g Difco Bactor-Agar eklenmiştir.
- ❖ Kapağı hafif gevşek şekilde 20 dakika otoklavda steril edilmiştir.

Agar çözeltisi hazırlandıktan sonra öncelikle alt tabaka hazırlanmıştır. %28 agar çözeltisi ve %72 Keratinosit SFM besiyeri karışımı hava kabarcığı olmadan 6 kuyucuklu plakalara zemini kaplayacak şekilde damlatılmıştır. Petriler yaklaşık 1 saat soğuması için buzdolabında bekletildikten sonra donmuş olan agar-besiyeri karışımının üzerine hücre ekimi yapılmıştır. Ekimi yapılacak hücrelerin %18 agar %82 besiyeri+hücre karışımı hazırlanmıştır. Her bir kuyucuğa 2.5×10^4 şeklinde ekilen hücreler daha sonra invert mikroskopta günlük olarak izlenmiş ve koloni oluşumu 4 hafta boyunca gözlenmiş ve görüntülenmiştir. 4 haftanın sonunda kuyucukları boyamak için öncelikle 9.5 ml steril suya 500 ul NBT (4-nitro-blue-tetrazolium chloride) eklenerek boyama solüsyonu hazırlanmıştır. Bu karışım %10 sulandırılmış ve her bir kuyucuğa 200 ul %5'lik damlatılmıştır. Kolonilerin bu solüsyon ile boyanması için 1 gece etüvde bekletilmiştir. Daha sonra kuyucukların resimleri çekilerek deney sonlandırılmıştır. Elde edilen koloni resimlerinden Image-J görüntü analiz yazılımı kullanılarak koloni sayıları tespit edilmiştir.



Şekil 3.5 Transforme hTU1-38 Hücrelerinin Soft Agarda Oluşturduğu Koloniler (10 μ M PIO Uygulaması/2. Tekrar)



Şekil 3.6 Transforme hTU1-38 Hücrelerinin Soft Agarda Oluşturduğu Koloniler (10 μ M PIO Uygulaması/3. Tekrar)

3.2.5 İstatistiksel Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi

Tezde sunulan veriler tüm deneyler için üç tekrarın ortalamasını ve \pm SE ifade eder. Deney gruplarından elde edilen verilerin homojenliği ve gruplar arasındaki farklar SPSS programı kullanılarak tek yönlü varyans analiz metodu (ANOVA) ile analiz edilmiştir. Gruplar arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak önem dereceleri Student's t testi ile karşılaştırılarak belirlenmiştir ($p < 0.05$).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. BULGULAR

4.1.1. MTT Test Sonuçları

MTT testi uygulama süresi sonrası kuyucuklarda mitokondriyal aktivitenin ölçülerek canlı hücrelerin oranının belirlendiği bir testtir. Bu test öncelikle PIO deney dozlarının belirlenebilmesi amacıyla hazırlanan bir doz skalası belirlenmiştir. Bu belirlenen doz skalası 24, 48, 72 saat sürelerince hücrelere uygulanmıştır. Bu amaçla 96 kuyucuklu kültür kaplarına hTU1-38 hücreleri besiyeri içerisinde 1×10^4 /kuyucuk olacak şekilde hücre ekimi yapılmıştır.

Hücreler kuyucuklara 3 tekrarlı olacak şekilde ekilmiştir. Hücreler ekildikten 24 saat sonra protokol doğrultusunda hazırlanan PIO kuyucukların içerisine toplam hacmin %10'nu olacak şekilde uygulanmıştır. Hücreler 37°C'de, %5 CO₂'li inkübatörde 24, 48 ve 72 saatlik süreyle PIO'a maruz bırakılmıştır. Uygulama sonrasında MTT protokolde olduğu gibi işlemler gerçekleştirilmiş ve mikropilaka okuyucu ile 570 nm'de absorbans değerleri okunmuştur. Okunan absorbans değerlerinin ortalamaları alınarak bunlardan blank değeri (sadece besiyeri konan kuyucuklara besiyeri uzaklaştırılarak eklenen çözücü (DMSO)'nün absorbans değeri) çıkarılıp normalizasyon gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.1 24 Saat'lik PIO Uygulaması Sonrası Ölçülen Absorbans ve Hesaplanan Normalizasyon Değerleri

Konsantrasyonlar (μ M)	OD 570 nm \pm SE	Veri doğrulama (Veri-Blank) = Normalizasyon
1	1.09 \pm 0.019	1.02
2,5	1.02 \pm 0.134	0.94
5	1.03 \pm 0.044	0.96
10	0.85 \pm 0.039	0.8

Çizelge 4.2 24 Saat'lik PIO Uygulaması Sonrası Ölçülen Absorbans ve Hesaplanan Normalizasyon Değerleri (Devamı)

Konsantrasyonlar (μM)	OD 570 nm \pm SE	Veri doğrulama (Veri-Blank) = Normalizasyon
25	0.73 \pm 0.008	0.66
50	0.75 \pm 0.003	0.68
100	0.68 \pm 0.021	0.60
250	0.46 \pm 0.032	0.39
Blanck	0.07	0

Çizelge 4.3 48 Saat'lik PIO Uygulaması Sonrası Ölçülen Absorbans ve Hesaplanan Normalizasyon Değerleri

Konsantrasyonlar (μM)	OD 570 nm \pm SE	Veri doğrulama (Veri-Blank) = Normalizasyon
1	0.60 \pm 0.137	0.53
2,5	0.57 \pm 0.109	0.50
5	0.48 \pm 0.055	0.41
10	0.44 \pm 0.228	0.37
25	0.47 \pm 0.115	0.40

Çizelge 4.4 48 Saat'lik PIO Uygulaması Sonrası Ölçülen Absorbans ve Hesaplanan Normalizasyon Değerleri (Devamı)

Konsantrasyonlar (μM)	OD 570 nm \pm SE	Veri doğrulama (Veri-Blank) = Normalizasyon
50	0.44 \pm 0.078	0.37
100	0.33 \pm 0.016	0.26
250	0.15 \pm 0.009	0.08
Blanck	0.07	0

Çizelge 4.5 72 Saat'lik PIO Uygulaması Sonrası Ölçülen Absorbans ve Hesaplanan Normalizasyon Değerleri

Konsantrasyonlar (μM)	OD 570 nm \pm SE	Veri doğrulama (Veri-Blank) = Normalizasyon
1	0.57 \pm 0.082	0.51
2,5	0.63 \pm 0.024	0.56
5	0.53 \pm 0.054	0.46
10	0.47 \pm 0.018	0.40
25	0.39 \pm 0.026	0.32
50	0.37 \pm 0.017	0.30

Çizelge 4.6 72 Saat'lik PIO Uygulaması Sonrası Ölçülen Absorbans ve Hesaplanan Normalizasyon Değerleri (Devamı)

Konsantrasyonlar (µM)	OD 570 nm±SE	Veri doğrulama (Veri-Blank) = Normalizasyon
100	0.34±0.017	0.28
250	0.27±0.008	0.20
Blanck	0.07	0

24, 48 ve 72 saatlik uygulama sürelerinde hTU1-38 hücrelerinin canlılık değerleri aşağıdaki formül ile hesaplanarak belirlenmiştir.

$$\text{Hücre Canlılığı} = \frac{\text{Ortalama Doğrulanmış İlaçlı Kuyucuğun Absorbans Değeri}}{\text{Ortalama Doğrulanmış Kontrol Kuyucuğun Absorbans Değeri}} \times 100$$

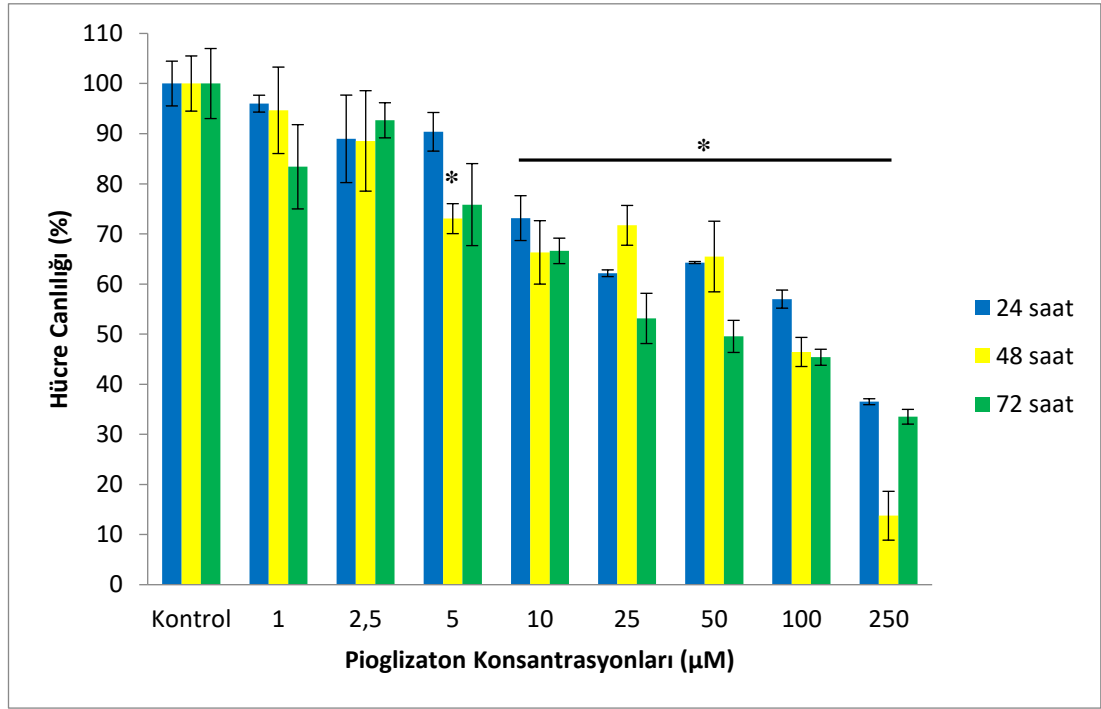
Bu değerlere göre, 24, 48 ve 72 saat uygulama sürelerinde PIO ile test edildiğinde insan hücrelerinde hücre canlılık verileri ayrı ayrı çizelgelerde ve bu bulgulara dayanarak çizilen grafiklerde gösterilmiştir.

Çizelge 4.7 24, 48 ve 72 Saat'lik PIO Uygulamaları Sonrası HTU1-38 Hücrelerinin Oransal Canlılık Sonuçları

Konsantrasyonlar (µM)	24 saat	48 saat	72 saat
	Sitotoksisite	Sitotoksisite	Sitotoksisite
Kontrol	100	100	100
1	95.99	94.66	83.39
2.5	88.97	88.55	92.66

Çizelge 4.8 24, 48 ve 72 Saat'lik PIO Uygulamaları Sonrası HTU1-38 Hücrelerinin Oransal Canlılık Sonuçları (Devamı)

Konsantrasyonlar (μM)	24 saat	48 saat	72 saat
	Sitotoksosite	Sitotoksosite	Sitotoksosite
5	90.37	73.04*	75.85
10	73.15*	66.31*	66.61*
25	62.15*	71.71*	53.13*
50	64.28*	65.48*	49.55*
100	56.99*	46.44*	45.38*
250	36.51*	13.76*	33.51*



Şekil 4.1 24, 48 ve 72 Saatlik Uygulama Sonrası Elde Edilen Hücre Canlılığı Verilerinden Hesaplanan Canlılık Değerleri ($p < 0.05$)

PIO insan mesane hücrelerinde belirlenen 8 dozda ve 24, 48 ve 72 saat uygulama sürelerinde sitotoksik olduğu belirlenmiştir. PIO hücre canlılığını doza ve zamana bağlı olarak düşürmüştür.

24 saatlik MTT uygulaması sonucu hTU1-38 hücrelerinin sağkalımı doza bağlı azalmıştır. Hücre canlılığındaki bu düşüş ancak yüksek dozlarda %50 canlılığa ulaşmış olup, en yüksek dozda (250 μ M) %50'nin altına düşmüştür. Bununla birlikte dozlarda hücre canlılığında gözlenen bu azalış kontrole göre istatistiksel anlamda ($p<0,05$) farklı bulunmamıştır (Şekil 4.1).

PIO'un 8 dozu ile 48 saat maruziyet süresi sonunda uygulanan MTT testi ile benzer bir şekilde doza bağlı sitotoksosite artışı tespit edilmiştir. Orta dozlara kadar düşük seviyede seyreden sitotoksosite değerleri 100 μ M'lık dozdan itibaren ve özellikle en yüksek üç dozda önceki dozlara göre daha ciddi artış göstermiştir. 48 saat deney süresinde hücre canlılığında gözlenen bu düşüşler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde ($p<0.05$), 50-100-250 μ M şeklindeki en yüksek üç PIO dozunda kontrol ile kıyaslandığında anlamlı bulunmuştur (Şekil 4.2).

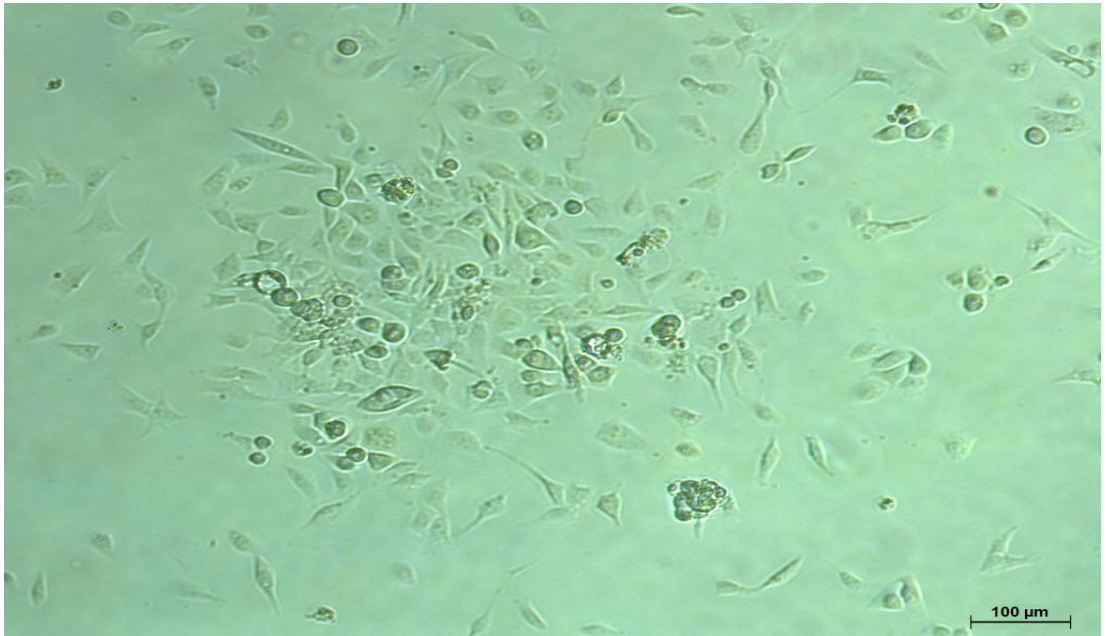
PIO'un hTU1-38 insan mesane hücrelerinde 72 saat zaman noktasında sitotoksik etkisinin belirlenmesi için yapılan MTT testi ile doza bağlı bir etki artışı gözlenirken aynı zamanda bu en uzun uygulama süresine göre ilgili insektisit karışımının söz konusu hücrelerde IC_{50} ($IC=İnhibisyon\ Konsantrasyonu\ 50$, hücre sayısını yarıya indiren doz) değeri de belirlenmiştir. Bu sürede hücre canlılığındaki azalış düşük dozlarda dahi diğer uygulama sürelerine göre fazla olmuştur. Bunun yanında, 8 dozluk skala göz önüne alındığında 6. doz ve sonraki yüksek dört dozda da hTU1-38 hücrelerinin sağ kalım oranları dramatik bir şekilde düşmüştür. Bu dozlarda ortaya çıkan sitotoksosite seviyeleri kontrol ile karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel anlamda önemli bulunmuştur ($p<0,05$). Bu dozlar sırasıyla, 25, 50, 100,250 μ M şeklindedir (Şekil 4.3). IC_{50} değeri ise 44,67 olarak belirlenmiş olup, 72 saatlik maruziyet için test edilen doz skalasında hücre canlılığının dramatik olarak düşmeye başladığı 5. ve 6. dozlar arasında yer almaktadır (Şekil 4.3).

Tezde üç zaman noktası için uygulanan PIO konsantrasyonlarının sitotoksosite seviyeleri ve 72 saat uygulaması sonucu belirlenen IC_{50} değeri dikkate alındığında; 40

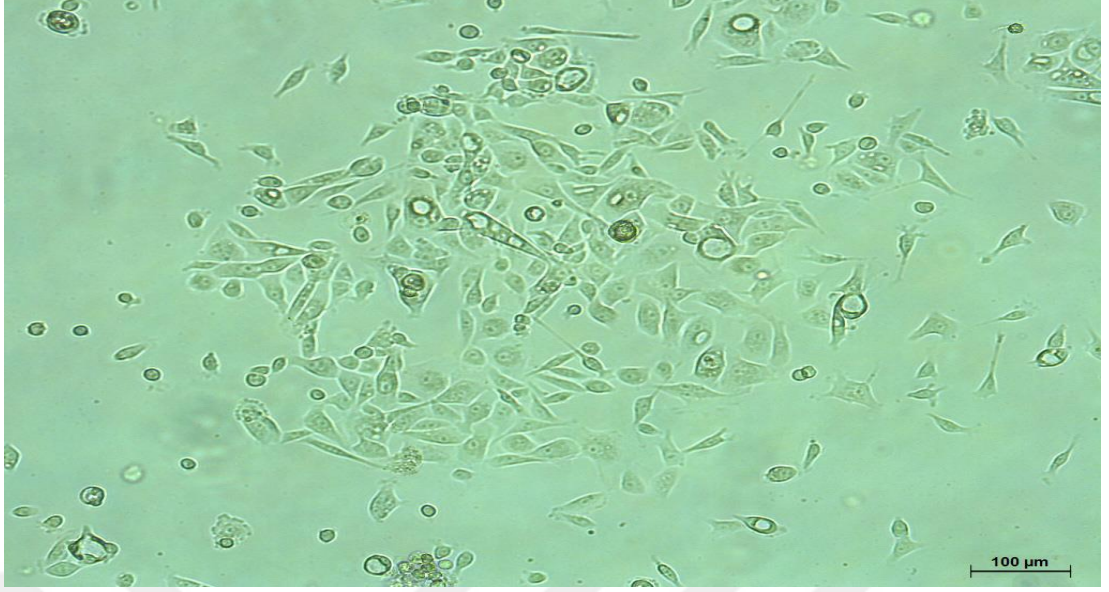
μM konsantrasyonu, MTT, kontak inhibisyon ve ankoraj bağımlı testleri için en yüksek doz olarak belirlenmiştir.

4.1.2 hTU1-38 Hücrelerinde Morfolojik Değişiklikler

Kontak inhibisyon testi sırasında hTU1-38 hücreleri mikroskop altında 1 ay boyunca gözlemlenmiştir. Hücrelerde kontrol ile kıyaslandığında doz uygulanması esnasında ve pasajlamalarda morfolojik değişiklikler gözlenmiştir. Hücreler oluşturdukları morfolojileri itibariyle; bazıları yırtık ve parçalı olmak üzere hasarlı sitoplazmaya sahip, bazıları büyük boşlukları olan halka görünümü ve çekirdekleri anormal konumlanmıştır. Polaritesini ve multigonol özelliğini kaybetmiş polimorf hücrelerin kültürde pleomorfik kümeler oluşturduğu ve normal boyutlarından farklı olarak displazik/hipertropik görünümle uyumlu oldukları gözlenmiştir. Ek olarak artmış pigmentasyona yorumlanabilecek şekilde granüle sitoplazmaya sahip hücreler de mevcuttur. Hücreler kültürdeki bu değişimleri sonucu monolayer yapışma özelliğinin aksine üst üste büyümeye devam etmiş, özellikle belirlenen transformasyon sonrası, multifokal ve aşırı gelişme/çoğalma göstererek kültürün ilerleyen zamanlarında hipertropik durum sergilemiştir (Şekil 4.2-3).



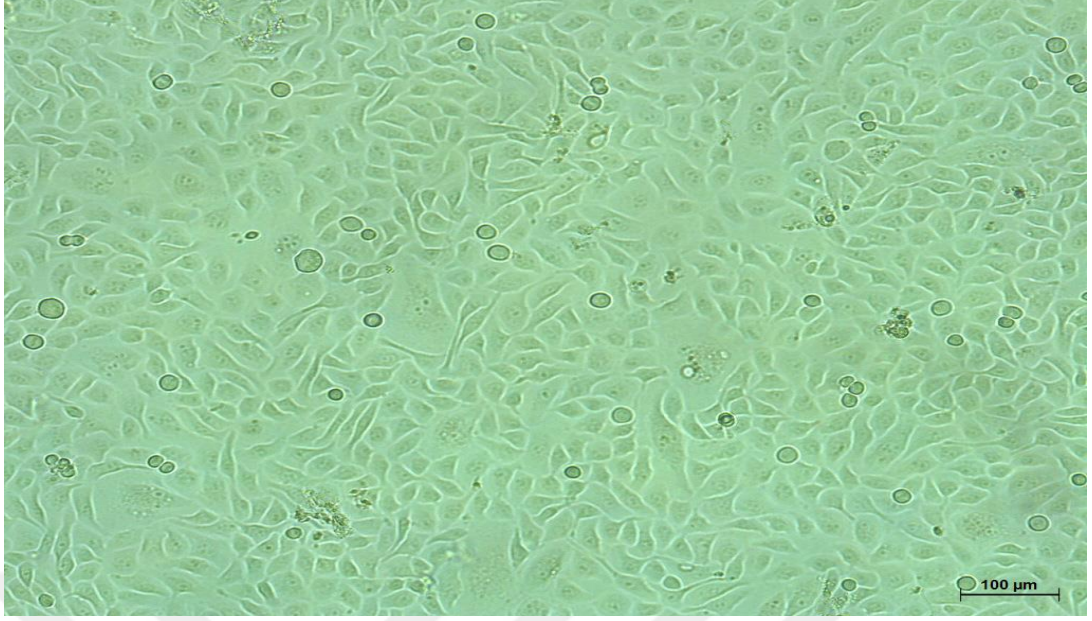
Şekil 4.2 PIO Uygulaması Sonrası hTU1-38 Hücrelerinde Gözlenen Morfolojik Değişimler-1



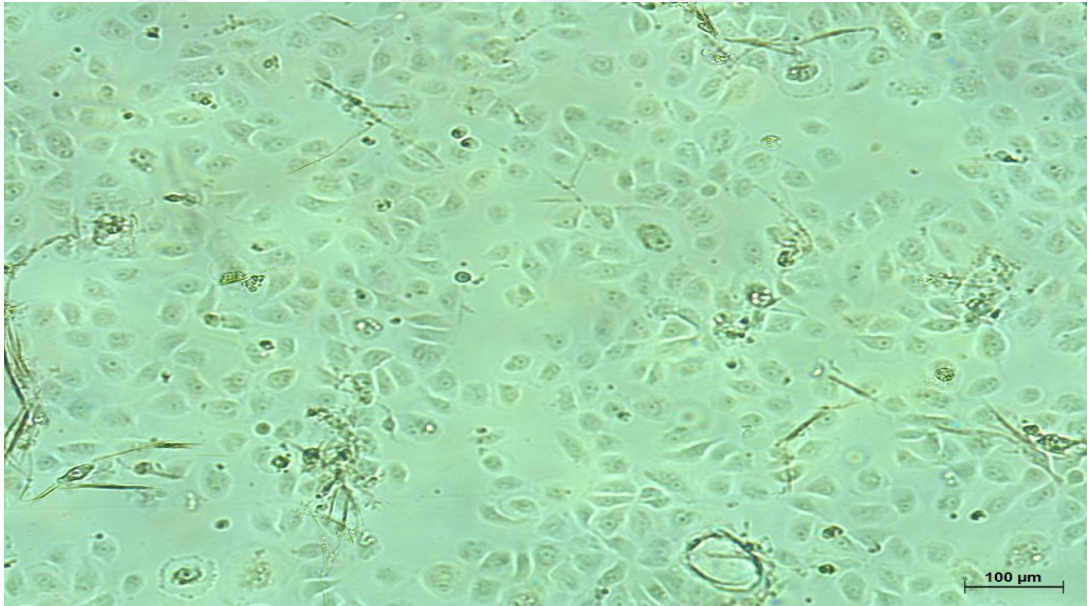
Şekil 4.3 PIO Uygulaması Sonrası HTU1-38 Hücrelerinde Gözlenen Morfolojik Değişimler-2

4.1.3 hTU1-38 Hücrelerinin Transformasyonu (Kontak İnhibisyon Testi)

PIO'un hTU1-38 hücreleri üzerindeki tümörejenik potansiyelinin araştırılması için MTT testi sonuçları ile belirlenen dozlarda transformasyon testi uygulanmıştır. Mesane hücreleri PIO'un 10, 20 ve 40 µM'lık 3 dozuna 72 saat boyunca maruz bırakılmıştır. PIO'a maruz bırakılan gruplarda hücrelerin değişimi üç gün boyunca izlenerek görüntüledikten sonra her doz ikişer tane olacak şekilde pasajlanmıştır. PIO uygulaması sonrası hücre kültüründeki değişimlere kontrol ve en yüksek doz grubundan örnekler aşağıda gösterilmiştir (Şekil 4.4-5).



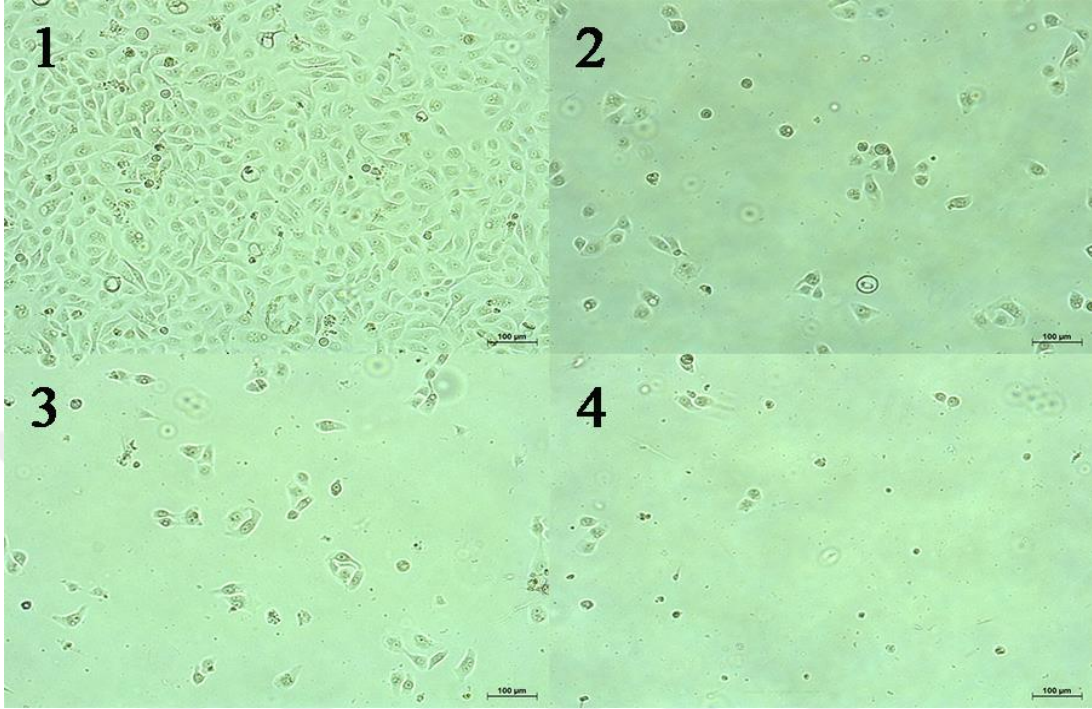
Şekil 4.4 Kontrol hTU1-38 (72s) Hücreleri



Şekil 4.5 40 µM PIO Uygulanmış (72s) hTU1-38 Hücreleri

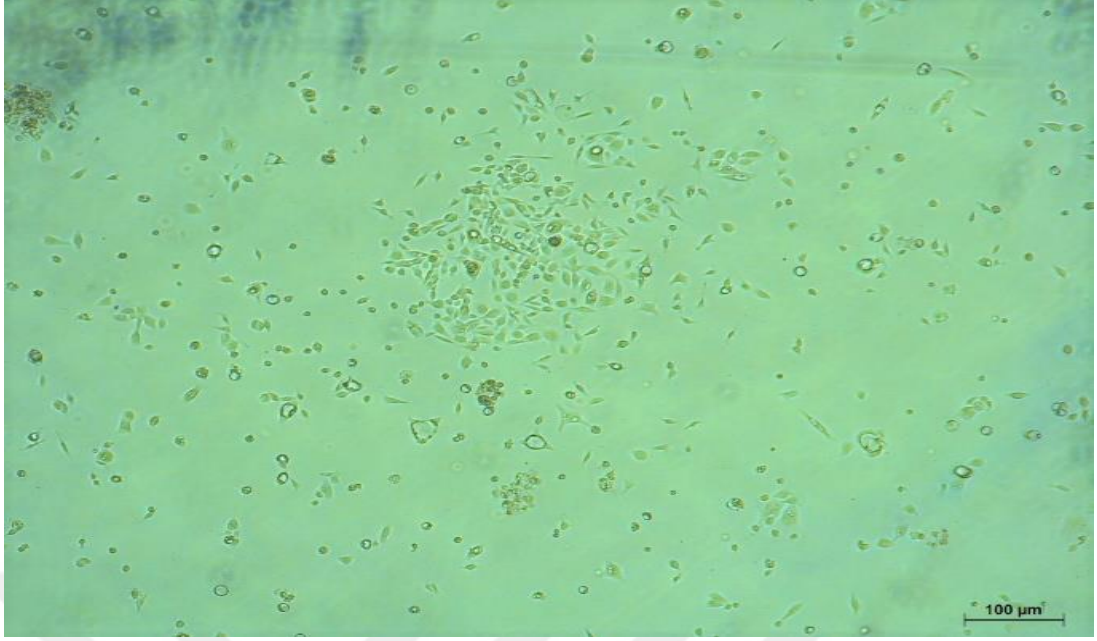
İlk pasaj sonrası kontrol ile kıyaslanan gruplara ait hücrelerde değişiklikler görülmüştür. Hücrelerde gözlenen morfolojik değişikliklere rağmen ilk pasaj sonrası odak oluşumu gözlenmemiştir. Kontrol grubu ilk pasaj sonrası, en kısa sürede, 3. gün konfluent hale gelmiştir. Bu süreden iki gün sonra en düşük doz (10 µM), daha sonra 7. günde orta (20 µM) ve yüksek doz (40 µM) konfluent duruma ulaşmıştır. Bu

aşamada kontrol ve gruplar pasajlanmıştır. İlk pasaj sırasında aynı gün çekilen farklı doz gruplarının kültür görüntüleri aşağıda verilmiştir (Şekil 4.6).

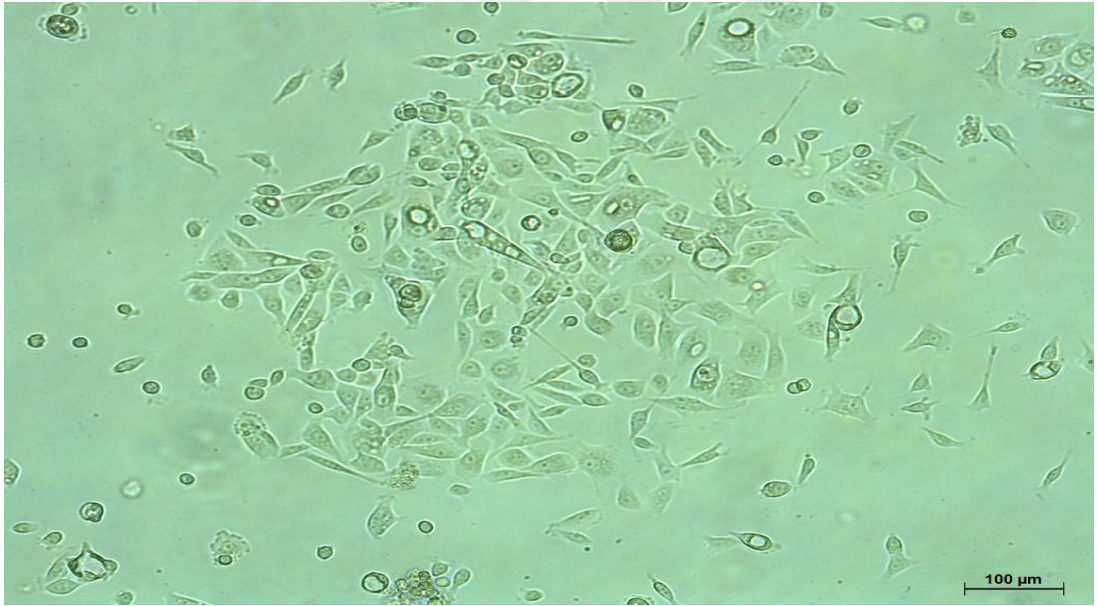


Şekil 4.6 PIO'un 72s'lik Uygulaması Sonunda Pasajlanan hTU1-38 Hücreleri. Kontrol (1), 10 µM (2), 20 µM (3), 40 µM (4)

Hücreler ikinci pasaj esnasında gözlemlendiğinde ilk transforme hücre oluşumu en düşük dozda görülmüştür (Şekil 4.7-8). Orta ve yüksek dozlarda ise daha sonraki günlerde transforme hücreler gözlenmiştir.



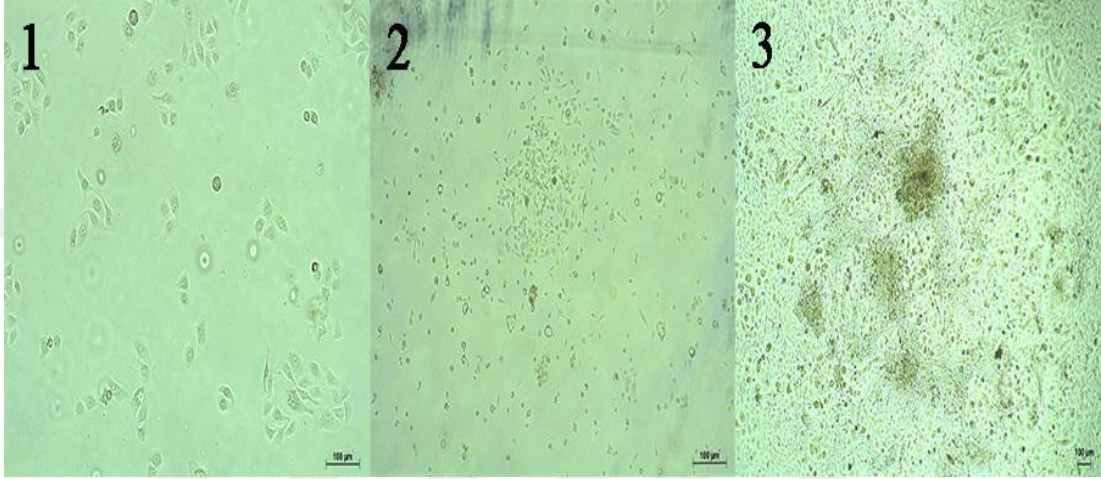
Şekil 4.7 72s'lik 10 μ M PIO Uygulaması Sonrası 1. Pasajdan İlk Transforme hTU1-38 Hücreleri (4X)



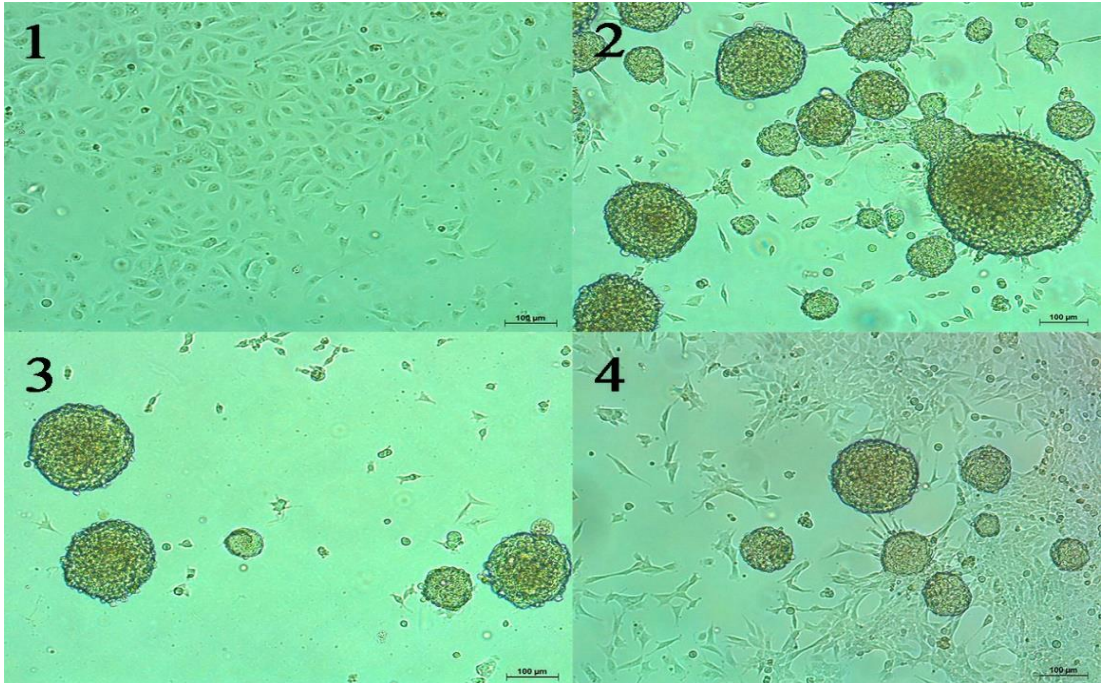
Şekil 4.8 10 μ M PIO (72s) Uygulaması Sonrası 1. Pasajdan İlk Transforme hTU1-38 Hücreleri (10X)

Deneylerin ilerlerleyen günlerinde oluşan transforme hücreler buldukları yerlerde üst üste çoğalarak odaklar oluşturmuşlardır (Şekil 4.9). Odaklar gruplarda genellikle üçüncü pasajda gözlenmiştir (Şekil 4.10). 10 μ M PIO dozunda 3. pasaj sonunda yeterli sayıda odak topladıktan sonra deney sonlandırılmıştır. 20 μ M ve 40

μM PIO gruplarında ise deneyler 4. pasaj sonunda tamamlanmıştır. Deneyler sırasında belirlenen odakların belirli günlerde görüntüleri alınmıştır. Gruplardaki odak gelişimine bağlı olarak gerçekleştirilen ileri pasajlama işlemleri sırasında hücrelerde gözlenen morfolojik değişimler ve odak oluşumlarına ilaveten muhtemel PIO'un etkileri sonucu hücre tutunma/yayılma ve proliferasyon oranlarında değişiklikler gözlenmiştir.



Şekil 4.9 Bir Hafta Boyunca 2-3 Gün Arayla Görüntülenmiş Odak Oluşumu Örneği



Şekil 4.10 Kontrol ve PIO Gruplarından Toplanan Odaklar. Kontrol (1), 10 μM (2), 20 μM (3), 40 μM (4)

Deney gruplarından toplanan odaklar çoğaltılmak amacıyla 6 kuyucuklu kültür plakalarına ekilmiştir. Elde edilen odakların bir kısmı ise ileri araştırmalarda kullanılmak üzere dondurulmuştur. Bunlardan bazıları (ankoraj bağımsız büyüme) soft agar koloni oluşum testinde (bir kısmı ise transforme hTU1-38 hücrelerin proliferasyon potansiyelinin parental hTU1-38 hücreleriyle karşılaştırılması amaçlı) kullanılmıştır.

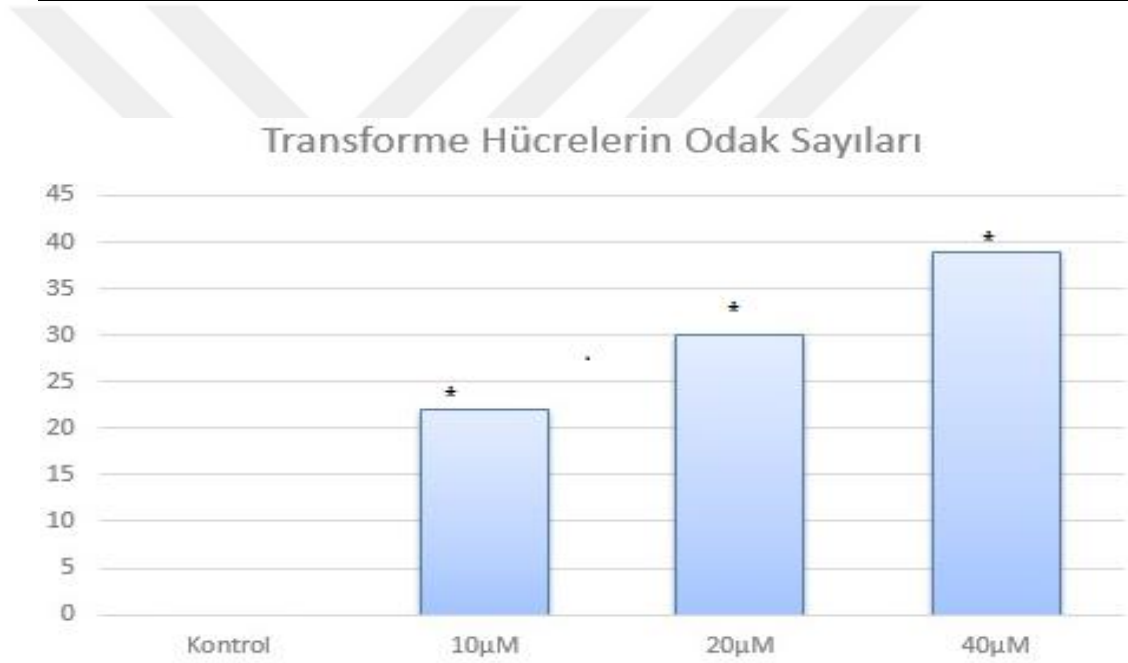
Odakların toplandığı petriyer odak sayılarının belirlenmesi için kristal viyole kullanılmış ve boyanan odaklar ışık altında işaretlenerek bir sayaç yardımıyla sayılmıştır. 10 µM PIO dozu transformasyon (kontakt inhibisyonu) tekrarlarında toplam odak sayısı 22 olup, petri başına ortalama 2.2 odak/petri bulunmuştur. 20 µM PIO dozunda 30 adet odak tespit edilmiş ve 3 odak/petri sayısına ulaşılmıştır. 40 µM PIO doz grubunda ise odak sayıları 39 toplam ve 3.9 odak/petri şeklinde tespit edilmiştir (Çizelge 4.5). PIO konsantrasyonlarının artışına bağlı olarak gruplardaki odak sayıları da artmıştır. Bununla birlikte doz yoğunluğu bağlı artış hücrelerin morfolojileri ve davranışları üzerine etkisinin belirginliği gözlenmiştir (Şekil 4.8-10).

Çizelge 4.9 hTU1-38 Hücrelerinin Transformasyon (Kontakt İnhibisyon) Testi İle Belirlenen Odak Sayıları

PETRİ ve Tekrar SAYILARI	1.Doç	2.Doç	3.Doç
1. PETRİ-1	1*	0*	3*
1.PETRİ-2	4*	0*	0*
2. PETRİ-1	2*	3*	11*
2. PETRİ-2	3*	9*	0*
3. PETRİ-1	2*	4*	0*
3. PETRİ-2	6*	6*	3*
4. PETRİ-1	0*	4*	4*

Çizelge 4.10 hTU1-38 Hücrelerinin Transformasyon (Kontak İnhibisyon) Testi İle Belirlenen Odak Sayıları (Devamı)

PETRİ ve Tekrar SAYILARI	1.Doz	2.Doz	3.Doz
4. PETRİ-2	0*	2	9*
5. PETRİ-1	0*	0*	3*
5. PETRİ-2	4*	2*	6*

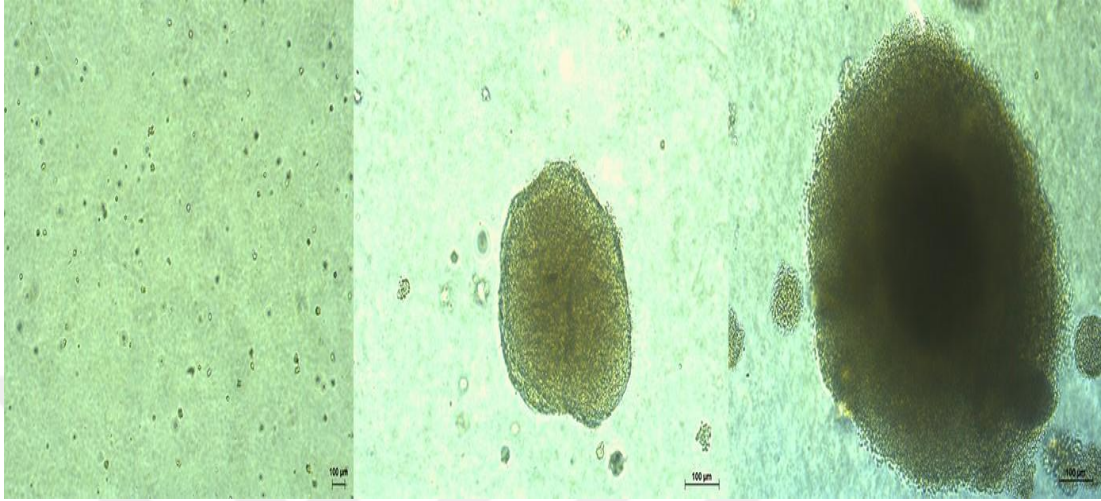


Şekil 4.11 Transforme Hücrelerin Odak Sayıları

4.1.4 Soft Agar Koloni Oluşum (Ankoraj-Bağımsız Büyüme) Sonuçları

Transforme olan hücrelerin malignite potansiyellerini belirlemek amacıyla ankoraj-bağımsız büyüme ve koloni oluşturma özellikleri soft agar testi uygulanarak araştırılmıştır. Transformasyona uğramış hTU1-38 hücrelerinin oluşturduğu ve kontak inhibisyon testi sonunda toplanan odaklar, her bir PIO dozundan 4 ayrı odak seçilerek her biri üç tekrar olacak şekilde ve kontrol olmak üzere 6 kuyucuklu kültür kaplarına ekilmiş ve koloni oluşumu 4 hafta boyunca incelenmiştir. Hücreler her gün takip

edilerek oluşan koloniler tespit edilmiş ve işaretlenmiştir. Birinci günden dördüncü haftanın sonuna kadar 2 günde bir görüntülenerek koloni oluşumları ve kolonilerin büyüme izlenmiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.12 Transforme hTU1-38 Hücrelerinin Soft Agar'da Oluşturduğu Kolonilerin Ortalama 1 Hafta Arayla Büyüme Örneği

4 haftanın sonunda kolonilerin sayılması amacıyla NBT ile boyanarak fotoğraflanmıştır (Şekil 4.12-15). Aşağıda sonuçları verildiği üzere, kolonilerin Image J görüntü analiz yazılımı ile büyüklüklerine göre sayımı yapılmıştır.

Çizelge 4.11 PIO (10 µM) Uygulaması Sonrası hTU1-38 Hücrelerinin Ankoraj-Bağımsız Büyüme (Soft Agar) Koloni Sayıları

Odak Numarası	10 µ<	10-100 µ	>100 µ
ODAK 1	61±36.8*	749±248.1*	225,3±55.7*
ODAK 2	211±102.4	803±247.0*	329,7±58.8*
ODAK 3	49.3±15*	49.3±20.6	33±15.6
ODAK 4	360.7±171,8	282.3±73.7*	228.7±49.1*
KONTROL	17	21	14

Çizelge 4.12 PIO (20 µM) Uygulaması Sonrası hTU1-38 Hücrelerinin Ankoraj-Bağımsız Büyüme (Soft Agar) Koloni Sayıları

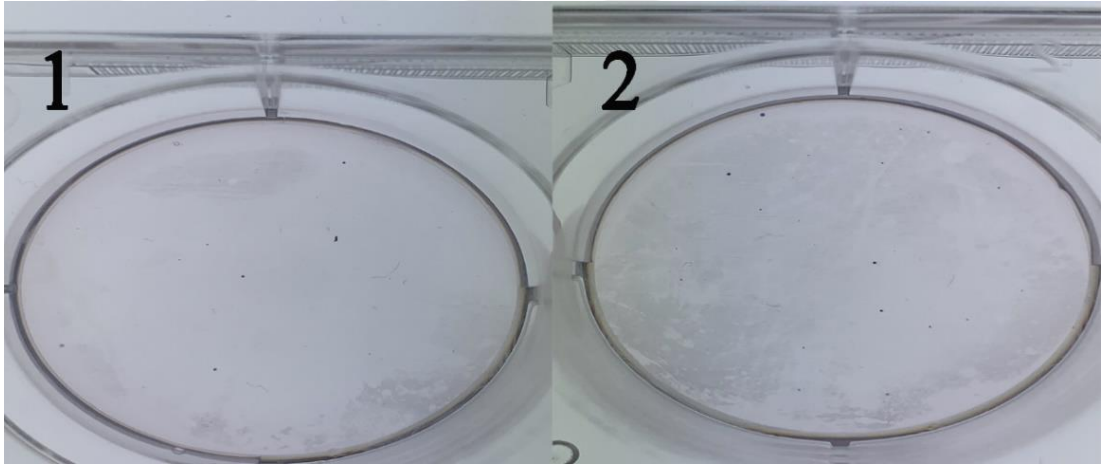
Odak Numarası	10 µ<	10-100 µ	>100 µ
ODAK 1	287.7±30.9	800,3±81,3	432,7±91,2*
ODAK 2	92±74.6	311±54.1*	86.2±13.7*
ODAK 3	38.4±19.3*	131.9±40.4*	165.6±21.1*
ODAK 4	71.3±41.6*	151.9±111.4*	217.9±53.5*
KONTROL	17	21	14

Çizelge 4.13 PIO (40 µM) Uygulaması Sonrası hTU1-38 Hücrelerinin Ankoraj-Bağımsız Büyüme (Soft Agar) Koloni Sayıları

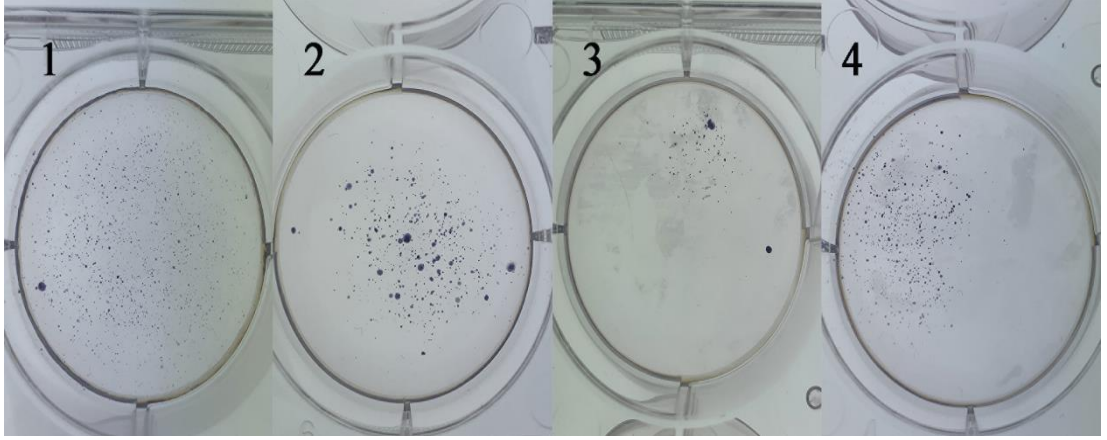
Odak Numarası	10 µ<	10-100 µ	>100 µ
ODAK 1	286±44.2*	2037.6±221,2*	428.7±53.9*
ODAK 2	558±37.3*	2595±97.6*	357.3±88.2*
ODAK 3	191.3±70*	1158.7±73.9	313±13.3*
ODAK 4	106±7.8*	916.7±8.4*	500±31.2*
KONTROL	17	21	14



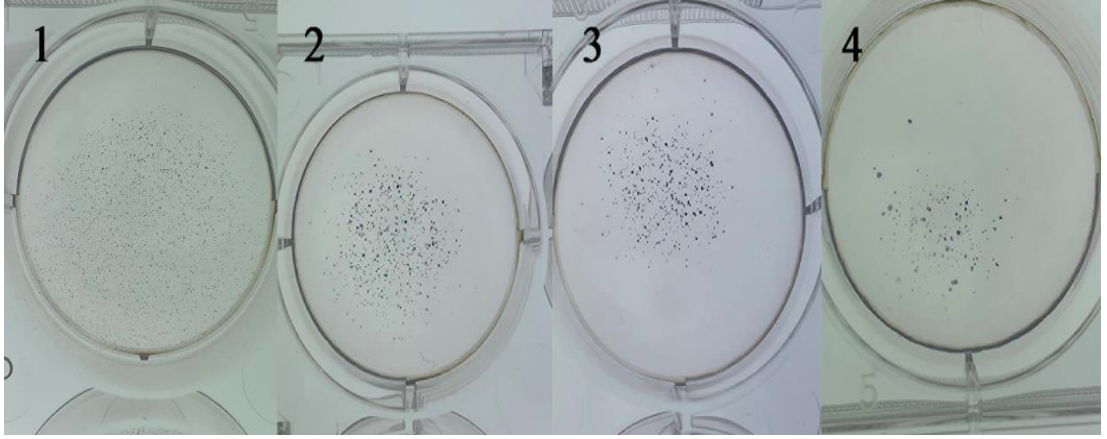
Şekil 4.13 Soft Agar Koloni Sayıları



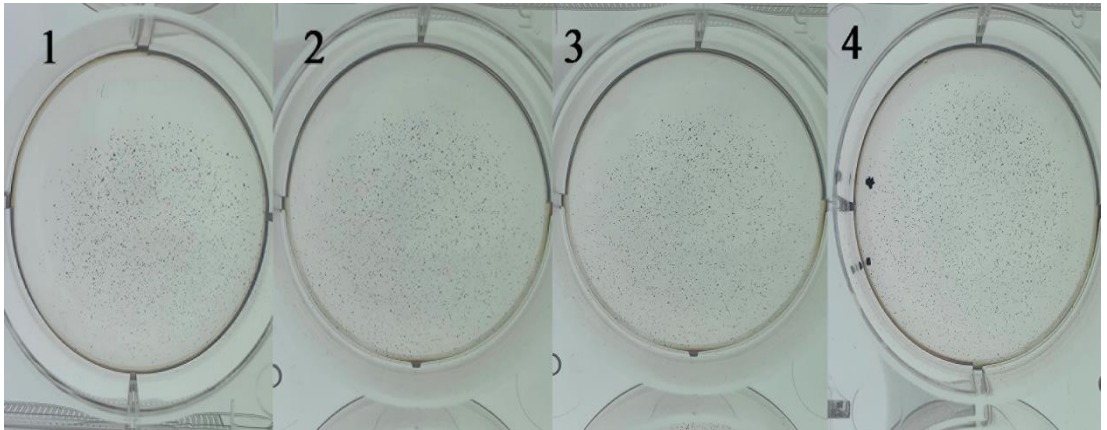
Şekil 4.14 Ankoraj-Bağımsız Büyüyen (Soft Agar) Koloni Görünümleri-Kontrol



Şekil 4.15 Ankoraj-Bağımsız Büyüyen (Soft Agar) Koloni Görünümleri-10 µM



Şekil 4.16 Ankoraj-Bağımsız Büyüyen (Soft Agar) Koloni Görünümleri-20 µM



Şekil 4.17 Ankoraj-Bağımsız Büyüyen (Soft Agar) Koloni Görünümleri-40 µM

Ankoraj-bağımsız test ortamı (Soft agar) neoplastik transformasyon sonucu, özellikle malgnitenin belirlenebildiği, hücrelerin çoğalabildikleri sağlıklı hücrelerin çoğalamadıkları bir ortamdır. Elde edilen verilerde en yüksek koloni sayısı en yüksek dozda saptanmıştır. 72 saatlik PIO uygulaması, transforme olan hTU1-38 hücrelerinin oluşturduğu ve soft agarda büyüyen kolonilerin sayısını doza bağlı bir şekilde artırdığı gözlenmiştir (Çizelge 4.8 ve Şekil 4.12-15). PIO dozları uygulaması sonrası gruplarda oluşan koloni sayıları Student's t testi kullanılarak kontrol ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır ($p < 0.05$). Normal ürotelyal hücrelerde doza bağlı olarak in vitro neoplastik transformasyona yol açmasına paralel olarak, PIO'un organizmada da tümör oluşumu ve karsinogenez potansiyeline sahip olabileceğini göstermektedir.

4.2 TARTIŞMA

Diyabet tedavisi için sıkça tercih edilen PIO'un mesane hücreleri üzerinde olumsuz etkileri ve mesane kanseri potansiyeli hakkında tartışmalar mevcuttur. Bu konuda genel olarak birbirine zıt görüşleri destekleyen kohort (grup) çalışmaları bulunmaktadır. Ayrıca in vitro ve in vivo çalışmaları da söz konusudur. Tüm bu çalışmalardan bazılarında PIO'un mesane hücrelerinde çeşitli mekanizmaları bozup hücrelerin kanserleşmesine yol açtığı belirtilirken bazılarında ise bu görüşün aksi yönündeki düşünce desteklenmiştir. Bu konudaki tartışmaların sonlandırılmasına katkı sağlamak için planlanıp yürütülen bu tezde söz konusu etken maddenin olası etkilerinin in vitro sistemde çeşitli yöntemlerle sınılanması amaçlanmıştır.

4.2.1 Sitotoksikite ve Morfolojik Değişimler

Çalışmamızda MTT testi sonucu elde edilen sitotoksikite verilerinde PIO'un hücrelerin çoğalması üzerine sitotoksik etkisi olduğu belirlenmiştir. Doz yoğunlukları ve uygulama süresi arttıkça hücre canlılık oranı düşmüştür. PIO'un 2 ile 10 µmol/L arasında değişen 5 farklı konsantrasyonun ve ayrıca iki farklı PPAR ligandının da farklı konsantrasyonlarının 24 saatliğine test edildiği bir çalışmada hepsi insan kaynaklı biri non-neoplastik olan ölümsüzleştirilmiş, diğer üçü mesane karsinomlu dört farklı ürotelyal hücre hattı kullanılmıştır (Nakashiro ve ark., 2001). PPAR ligandlarının hücre büyümesi üzerine etkileri enzim-bağımlı immüno-sorbent testi ile incelenmiş bu sonuçlar 72 saatlik hücre kültürü sonunda sayılan hücre miktarı ile karşılaştırılmıştır. Üç günlük hücre kültürü sayımının 24 saatlik uygulama sonunda enzim temelli bir testin ölçtüğü hücre canlılığı ile karşılaştırılmasının garipliği bir yana, çalışmada sadece 72 saatlik PIO uygulaması sonrası hücre sayım sonuçları verilmiştir. Buna göre, PIO, 253J hücreleri hariç, diğer neoplastik ve non-neoplastik insan ürotelyal hücre hatlarında proliferasyonu inhibe etmiştir. Çalışmanın sonuç kısmında, araştırmacılar non-neoplastik hücrelerin PPAR ligandların sitosidal etkilerine, ilgili genlerin PPAR ekspresyonu bakımından transkripsiyonel etkinliklerinden dolayı oldukça duyarlı oldukları sonucuna varmışlardır ki bu PIO MTT bulgularıyla çelişmektedir. Bununla birlikte, aynı araştırmacılar, Yang ve ark. (2018)'nin kronik sürelerde mesane kanser tedavisi için kullanılma önerilerinin aksine, PPAR

ligandlarının normal hücreler üzerindeki sitotoksik etki potansiyellerine dikkat çekmiştir.

Sonuçların karşılaştırılabilmesi açısından özetle, Nakashiro ve ark. (2001) ile Kawakami ve ark. (2002)'nin sonuçları PIO'un sırasıyla; mesane kanser hücreleri üzerine tedavi edici etkisinden önce normal ürotelyal hücrelerde ciddi sitotoksik etkiler ortaya çıkarabileceğini ve insan normal ürotelyal hücrelerde proliferasyonu baskıladığını ortaya koymuştur.

Yang ve ark. (2005)'nin renal karsinom hücrelerinde yaptığı çalışmada PIO'un apoptozu teşvik ettiği bildirilmiş olup antikanser potansiyeli olabileceğinden bahsedilmiş, Chaffer ve ark. (2006) ise PIO'un metastatik mesane karsinomlu transisyonel hücrelerde proliferatif etkisinin olmadığını rapor etmişlerdir.

Bu tezin hücre canlılığı verileri ile uyumlu sonuçlara ulaşılan başka bir çalışmada, diğer üç PPAR alt türünün agonistleri yanında PIO ile aynı grup bir diyabetik olan PPAR γ agonisti troglitazon (TZ)'un normal insan ürotelyal hücrelerde proliferasyona ve farklılaşmaya etkileri incelenmiştir. 10 nM ile 100 μ M arasında bir doz yelpazesinin 6 güne kadar uygulandığı araştırma sonucu, 5 μ M ve daha düşük dozlarda uygulandığında kültür büyümesinde küçük bir inhibisyon dışında önemli bir farklılık olmamıştır. Fakat 5 μ M'dan daha büyük PPAR δ ve PPAR γ agonist dozları hücre ölümüne sebep olmuştur. Burada, hücredeki hareket tarzı, hedef ve etki mekanizması açısından aynı olan thiazolidinedion grubu PPAR γ agonistleri TZ ve PIO'un karşılaştırılması uygun olacaktır. Çalışmamızda 1-250 μ M arasında değişen sekiz dozun 24, 48 ve 72 saatlik uygulamalarının MTT analizi sonucu PIO'un insan normal-ölümsüz mesane hücrelerinde doza ve zamana bağlı bir şekilde sitotoksik etkisi gösterilmiştir. Her iki çalışmada da benzer deney şartlarında aynı gruptan iki etken maddenin benzer hücresel etki ortaya çıkardığı söylenebilir (Varley and Southgate, 2008).

Suzuki ve ark. (2010)'daki bir makalelerinde, Varley ve ark.'nın PPAR γ agonistlerinin, ürotelyal hücre kültüründe otokrin ile uyarılan epidermal büyüme faktörü reseptör yolağının inhibisyonu sonucu, hücre proliferasyonu ve farklılaşma potansiyelini engellediği sonucuna vardıklarını belirtmişlerdir. Suzuki ve ark., bu

sebeple ve kendilerinin Sıçan ürotelyal hücre hattında yaptıkları deneyler sonucu, PPAR γ agonistlerinin ürotelyum üzerine direkt bir mitojenik etkilerinin mümkün olmadığını belirtmişlerdir. Söz konusu araştırmacılar, küçük benign bir nodülden elde edilmiş Sıçan mesane epitel (MYP3) hücre hattında, 5 μ M'lık PIO'un 72 saatlik uygulaması sonrası hücre döngüsünün tüm aktif safhalarında mevcut olan ve özellikle sürecin S fazında dikkate değer bir artış gösteren ve hücre proliferasyonu ile sıkı ilişki içinde olan Ki-67 proteinini içeren bir etiketleme yöntemiyle proliferasyon tespiti yapmış ve sonuçta PIO'un deney şartlarında Ki-67 işaretleme indeksini kontrole göre istatistiksel anlamda düşürdüğünü açıklamışlardır. Suzuki ve ark.'ı bu ve daha önceki çalışmalarına dayanarak, PIO'unu da içeren thiazolidinedionların hücre kültüründe Sıçan ürotelyal hücre proliferasyonunu baskıladığını ve hatta farklılaşmayı güçlendirdiğini söylemelerine rağmen bunun Sıçanlara özgü bir fenomen olduğunu fakat bu ajan ile tedavi edilen insanlarda bir ürotelyal kanser riskine sahip olmadığını da iddia etmişlerdir.

Bu tezde insan mesane hücresi hTU1-38'da yürütülen mitokondri bazlı metabolik aktiviteye dayalı hücre canlılığı deneyleri sonucu görülen doza ve zamana bağlı görülen çoğalma inhibisyonunun direkt bir etki olup olmadığına ya da hangi hücresel yolağın bozulma veya baskılanması sonucu gerçekleştiğine yönelik bir yorum yapabilmek, mekanistik bir yaklaşımla ileride yapılacak incelemeler sonucu mümkün olabilir. Ancak, tezde transformasyon deneyleriyle parental hücrelerden morfolojik ve kültür davranışı bakımından farklılaştığı belirlenen ve tüm doz uygulamaları sonucu oluşan odaklarda ayrı ayrı alınan transforme hücreler ile parental hücreler, bu tez kapsamı dışında yapılacak farklı deneylerin alt yapısını oluşturması açısından hücre proliferasyonları bakımından karşılaştırılmıştır. 48 saatlik kültür sonucu hücre sayım cihazı ile belirlenen sayım sonuçlarına göre; transforme hücrelerin proliferasyon oranları kontrol parental hücre proliferasyonundan doza bağlı bir şekilde %50 ile %300 arasında bir artış gösterdiğini belirtmemiz gerekir.

Yang ve ark. (2018)'nin geçen yıl yayımladığı PIO ile ilgili bir çalışmada yapılan MTT analizi için Rat normal üriner transisyonel epitel (NUTE) ve insan üriner karsinom (J82) hücrelerinin çoğalması üzerindeki etkilerini değerlendirmek üzere 24, 48 ve 72 saat boyunca NUTE ve J82 hücreleri 5, 10, 20 veya 40 μ mol/L PIO ile

muamele edilmiştir. Düşük (5-10 $\mu\text{mol/L}$) veya yüksek (20-40 $\mu\text{mol/L}$) PIO konsantrasyonlarının J82 hücrelerinin proliferasyonu üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığı, bununla birlikte, NUTE hücrelerinde ise 10 $\mu\text{mol/L}$ PIO'un, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında 24 saat sonra proliferasyonu önemli ölçüde inhibe ettiği görülmüştür. Dahası, hücreler 48 saat ve 72 saat boyunca veya 20 $\mu\text{mol/L}$ PIO ile muamele edildiğinde hücre canlılığında dramatik düşüşler olduğu bununla birlikte Annexin V ile yapılan ölçümde 72 saatlik uygulamada yüksek apoptoz oranı gözlenmiştir. Böylece, çalışmamızda hücre canlılığı tespitinde kullanılan PIO doz skalasında yer alan benzer doz ve süre uygulamaları sonrası farklı bir organizma da olsa benzer hücre hattında elde ettiğimiz doza ve zamana bağlı sitotoksosite sonuçlarımızla paralel gösteren farklı orijinli (Sıçan NUTE) üriner sistem epitel hücrelerde PIO'un hücre çoğalmasında zamana ve doza bağlı bir şekilde inhibe ettiği ve kontrolle karşılaştırıldığında morfolojik değişimlerin de buna eşlik ettiği belirlenmiştir. Aynı çalışmada insana ait karsinom hücre hattında ise anlamlı bir proliferasyon düşüşü gözlenmemiştir. Buna rağmen, hücre döngüsü ve apoptotik yolak proteinlerin ekspresyonuna dayanarak PIO kullanımının Sıçan normal ürotelyal NUTE hücrelerinde 1. dokuya has apoptozise neden olsa da 2. mesane kanseri riskini artırmadığı ve üstelik 3. kronik süreçlerde mesane kanser hücrelerinin tümör oluşmasını azaltabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bütünsel bir bakış açısıyla, çalışmanın bulgularına rağmen böyle bir sonuca varılabilmesi; hücre karakterizasyonu, organizmalarda tümör oluşum süreçleri ve neoplastik transformasyon/kanser mekanizmaları ve bunların moleküler karmaşıklığı düşünüldüğünde anlaşılması güçtür. Araştırmacılar tarafından hücre proliferasyonunun bozulması ve apoptozdan kaçınmanın kanser hücrelerinin iki özelliği olduğunun belirtilmesi dikkate değerdir, çünkü tezimizde PIO hücre canlılığını doza ve zaman bağlı olarak düşürürken hTU1-38 hücrelerinin farklılaşmasını da doğurmuştur. Morfolojik gözlemlerimiz ve daha sonra parental hTU1-38 hücreleri ve transforme hücreler ile yapılan ve transforme hücrelerin parental proliferasyonun 3 katına kadar çoğaldığını gösteren proliferasyon ölçümleri bu hücrelerin farklılaştığını ve hücre döngüsünün bozulduğunu desteklemektedir.

Bununla beraber, Tsubaki ve ark. (2018)'nin aynı zamanlarda yayımladığı bir başka çalışmada mesane transisyonel hücre karsinomu dahil çeşitli kanser hatlarında

10, 25, 50 ve 100 μ M PIO'un 24, 72 ve 120 saat uygulamasında kaspaz bağımsız bir yolla apoptozu indüklediğini göstererek Yang ve ark.'nın son varsayımını desteklemiştir.

Kim ve ark., (2019) bu yıl yayımladıkları çalışmalarında, insan mesane epitel hücrelerinden (HblEpC) türetilen hücrelere, yüksek glukoz ve insülin ile metformin (MET) veya PIO ile muamelesi sonrasında MTT testi ile hücre canlılığını belirlemişlerdir. Deney sonucunda PIO'un düşük ve yüksek glukoz içeriğinde hücre canlılığının doza (2.5-25 μ M) ve zamana (24 ve 72 saat) bağlı bir şekilde düştüğünü bildirmişlerdir. Deneylerimizde ulaşılan sonuçlara benzer olarak, Kim ve ark. da 72 saatlik uygulamada kontrole göre istatistiksel öneme sahip dramatik düşüşler görmüşlerdir. Ancak, kontrol edilemeyen yüksek glukoz ve insülin seviyelerinin HblEpC'lerde anormal hücre döngüsü ve proto-onkogenik proteinlerin ekspresyonuna yol açtığını ve bunun mesane epiteli hücre döngüsünün düzenlenmesi ve onkogenik protein ekspresyonu için uzun süreli PIO kullanımının olduğundan daha kritik bir etken olduğunu ifade etmişlerdir.

4.2.2 Transformasyon (Kontakt İnhibisyon) Testi

Avrupa İlaç Ajansı (European Medicines Agency=EMA)'nın resmi internet sitesinde yer alan 9 Haziran 2011 tarihli açıklamada, Fransa Ulusal İlaç ve Sağlık Ürünleri Güvenliği Ajansı (ASN) 'nın "Pioglitazon" içeren ilaçların satışını Fransa'da durdurma kararı aldıklarını Avrupa İlaç Ajansı'na bildirdikleri ifade edilmektedir. Fransa'da 2006 ve 2009 yılları arasında antidiyabetik ilaç alan hastalar üzerinde yapılan incelemeler sonucunda PIO'un mesane kanseri riskini arttırdığının ortaya çıkması Fransa ASN'ni PIO içeren ilaçların satılmasını durdurma kararı almaya yöneltmiştir. Avrupa İlaç Ajansı açıklamasında, ASN kararının antidiyabetik ilaçların fayda ve risklerine ilişkin hali hazırda Avrupa çapında yapılmakta olan gözden geçirme çalışmalarının sonuçlarının beklenmeden alındığına dikkat çekilmektedir. Avrupa İlaç Ajansı'nın söz konusu açıklamasında, EMA Beşeri Kullanım İçin Tıbbi Ürünler Komitesi (CHMP), PIO içeren ilaçların mesane kanseri riskini artırıp artırmadığını incelemek üzere Mart 2011 tarihinden itibaren Avrupa çapında PIO maddesi içeren ilaçları gözden geçirmeye başladığı belirtilmektedir. Komite, bu süreçte farmako epidemiyolojik araştırmaları, çeşitli klinik ve klinik

olmayan çalışmaları, ilacın piyasaya sürümünden sonraki süreçte mesane kanseri riski taşıyıp taşımadığına yönelik araştırma raporları ve bunların fayda-risk dengesi üzerindeki etkisini değerlendirmek üzere hazırlanmış ve yayınlanmış tüm değerlendirmeleri ele alarak faaliyetlerini yürütmektedir (EMA, 2011).

Avrupa İlaç Ajansının raporları, farelerde genotoksik ve karsinojenik etki göstermemesine rağmen, ratlarla yapılan pre-klinik çalışmalar PIO maruziyeti ile erkek rat'larda mesane tümörleri oluşumu arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir. Mesane tümörlerinin oluşumu için olası biyolojik mekanizmanın PPAR'dan kaynaklandığı öne sürülmektedir (Yoshimura ve ark., 2003; European Medicines Agency, 2011). Her ne kadar insanlarda PIO'un doğrudan genotoksisiteyi indüklediğini gösteren çalışmalar bulunmasa da PIO verilen rat'larla yapılan bir çalışmada hem karaciğer hem de kan hücrelerinde doz artışına bağlı olarak DNA hasarının arttığı belirtilmiştir (Bedir ve ark., 2008). Araştırmacılar PIO'un serbest oksijen radikallerinin oluşumunu artırarak yani oksidatif stresi artırarak, rat'ların karaciğer ve periferel kan lenfositlerinde doza bağlı olarak DNA hasarını indüklediğini belirtmiştir. Rabbani ve ark. (2009) PIO ve glime pirid'in birlikte verildiği diyabetik rat'larda MN oluşumunun ve sperm anormalliklerinin görüldüğünü bildirmişlerdir. Ancak araştırmacılar yaptıkları diğer bir çalışmada, PIO ve metformin uygulanan erkek rat'larda polikromatik ve normokromatik eritrositlerde mikronükleus oluşumunun azaldığını belirtmiştir. Shaik ve ark. (2010) ise hem PIO hem de glimepirid ilaçlarını birlikte uzun süre kullanan tip 2 diyabet hastalarının bukkal mukoza hücrelerinde MN frekansında artış olduğunu bildirmişlerdir. Alzoubi ve ark. (2012) kültüre edilmiş insan lenfositlerinde oksidatif DNA hasarı ve kromozomal hasarı artırabilme yeteneğinden dolayı, PIO'un genotoksik olabileceğini öne sürmüşlerdir. Öz Gül ve ark. (2013) da yaptıkları çalışmada PIO kullanan Tip-2 diyabetli hastalarda kromozom anormallikleri, MN ve kardeş kromatid değişimi oluşumlarının kontrol grubuna göre önemli ölçüde arttığını belirtmişlerdir.

Yukarıda bahsedilen in vitro ve in vivo çalışmalardan çıkan fikir PIO'un genotoksik olabileceğidir. Söz konusu genotoksisite ister kromozomal düzeyde olsun ister gen düzeyinde olsun DNA hasarı ile sonuçlanır. Böyle DNA hasarları onarılamayacak seviyede olur ise ya da onarımından sorumlu olan genlerdeki

yetersizlik, genlerde yaygın mutasyonlara neden olur ve buna bağılı olarak kolaylıkla neoplastik transformasyonlar meydana gelir (Elenbaas ve ark., 2001). Genlerdeki hasarlar, karsinogenezis olayındaki başlıca hedef noktalarıdır. Bu genlerdeki değişimler sonucu, neoplastik hücreler gelişir. Onkogenik proteinlerin üretimindeki aşırılığı veya antionkogenik proteinlerin üretimindeki eksikliği, dengeyi neoplastik transformasyon ve proliferasyon yönünde değiştirebilir. Sonuçta genetik hasarı tamir edilemeyen mutasyona uğramış (mutant) hücrelerde yeni ek mutasyonlar meydana gelir. Bunlar çoğalır, birikir ve hücre artımı yanı sıra, malign transformasyonlar oluşur (Devereux ve ark., 1999; Corn ve El-Deiry, 2002). Bunlarla paralel olarak, çalışmamızda tümör oluşumunu belirlemek için transformasyon-kontak inhibisyon ve ankoraj-bağımsız büyüme şeklinde iki yöntem kullanılmıştır. Kültürde, normal hücreler komşu hücrelere yapışarak ilişkilerini devam ettirirler. Bu yapışma (adezyon) noktalarında hücrelerde elektronca yoğun bir plak oluşur. Bununla birlikte, hücrelerin stoplazmik uzantılarında yavaşlama ve durma görülür. Bu şekildeki kontak inhibisyonu hücre bölünmesini kontrol eder ki konfluent hücre kültürlerinde hücre yoğunluğunun artmasıyla hücre hareketliliğinde ve mitotik oranda dramatik bir azalış görülür (Puliafito ve ark., 2012). Deneysel olarak, normal hücreler bir kültür ortamında kendilerine sağlanan ortam şartları ne kadar iyi olursa olsun kontak inhibisyon nedeniyle tek tabaka oluşturduktan sonra daha fazla çoğalmazlar. Çünkü bölünme sınırlı sayıda olur. Fakat kanser hücreleri sürekli çoğalarak birkaç tabakalı düzensiz kitleler oluştururlar. Bu da kanser hücrelerinde kontak inhibisyon kaybı olduğunu göstermektedir (McClatchey ve Yap, 2012; Sun, 2014). Çalışmamızda uygulanan deney şartlarında PIO mesane hücrelerinde en düşük dozda dahi kontak inhibisyonu ortadan kaldırarak hücrelerin monolayer çoğalmadan saparak üst üste gelecek şekilde odaklar oluşturmasına yol açmıştır. Hücreler kanserleşme gibi yaşadığı değişimlerle yönelimi bozularak değişik yayılımlar gösterebilir. Bozulan kontak inhibisyon sonucu üst üste gelerek belirli bir yerde malign özellik kazanabilir (Davis ve Trinkaus, 1981; Kulesa ve ark., 2006; Paddock ve ark., 1986). Abercrombie ve Heaysman (1954)'ın fibroblastlardaki gözlemleri, hücre gruplarının tutarlı yönsel göçü yani hareketliliği ile ilgili temas inhibisyonunun moleküler temeli için bir açıklama sağlayan ve bunun in vivo olarak meydana geldiğini gösteren ilk örneği olmuştur. Araştırmacıların tavuk embriyosu kalp fibroblastlarındaki gözlemlerine ek olarak kontak inhibisyona eşlik

eden Rac1, Kadherin ve mikrotübül dinamikleri gibi moleküler süreçler *Drosophila* ve Zebra balığında da gösterilmiştir (Roycroft ve Mayor, 2016).

Neoplastik transformasyon karsinogeneze gibi çok safhalı ve kademeli bir süreçtir ve şüphesiz karsinogeneze dahil olan bazı basamakları paylaştığı için bir anoloji gösterdiği söylenebilir (Rhim ve Dritscilo, 1991). Olasılıkla bunlardan ilki *in vitro* olarak gözlenen ölümsüzleşmedir ve çoğunlukla *in vitro* transformasyon dönemiyle ilişkilendirilen bir özelliktir. İkincisi ve eş zamanlı olması gerekmeyen, çoğalma kontrolündeki bir değişimdir ki bu durum artık bağlanma-bağımlı olmayan ve çok daha hızlı çoğalan hücrelerin ortaya çıkmasına yol açar. Bağlanma-bağımlı hücreler çoğalmak için bir yüzeye tutunma ihtiyaç duyarken bağlanma-bağımsız hücreler bu zorunluluğa sahip değildir. Bu, çoğunlukla transforme olmuş hücrelerin özelliğidir. Bağlanma-bağımsız hücrelerin büyümesi, hücre kültürü kaplarında daha gelişmiş ve rastgele görülür (Pullman ve ark., 1980; Weisburger, 1989; Rhim ve Dritscilo, 1991). Genellikle kontak inhibisyon kaybı ve bağlanma bağımsızlığı malignite ile ilişkili olmasının yanında partikül veya çözülmüş Kobalt'ın sitotoksik ve genotoksik potansiyelinin gösterildiği çalışmada (Speer ve ark., 2017) bu etkilerin de özellikle hTU1-38 hücrelerinde mesane kanserinin gelişimiyle sonuçlanabileceği belirtilmiştir. *In vitro* transformasyonun malignite ile sıkı ilişkisinden dolayı, transforme olmuş hücreleri tanımak için kullanılan özellikler sıklıkla *in vitro* tümör oluşumunu belirlemek amacıyla kullanılırlar (Freshney ve Freshney, 2002). Bu tezin yöntemlerinden bir diğeri olan soft agar ortamında hücrelerin bağlanma-bağımsız olarak büyüme özelliği (ankoraj-bağımsız büyüme) incelendiğinde, hTU1-38 hücrelerinin PIO maruz kalmalarının soft agarda ankoraj-bağımsız bir büyüme göstermelerine ve invazyon yeteneği kazanmalarına yol açtığı anlaşılmıştır. Çalışmanın bu sonuçları PIO'un mesane hücrelerinde malign değişimi teşvik ederek karsinojen potansiyel gösterdiğini ortaya koymuştur.

Mesane tümörlerinin oluşumu için olası biyolojik mekanizmanın PPAR'dan kaynaklandığı öne sürülmektedir (Yoshimura ve ark., 2003; European Medicines Agency, 2011). Peroksizom proliferatör ile aktive edilmiş bir reseptör-gama agonisti olan PIO'un mesane kanseri gelişme riskine katkısı ile ilgili tartışmalar yakın zamanda oldukça yoğunlaşmıştır. Çalışmamızdan elde edilen bulguları destekler nitelikteki

retrospektif kohort ve meta-analiz çalışmalarının yanında aksi yönde çalışmalar da mevcuttur. Özellikle uzun süreli ve yüksek doz PIO maruz kalan erkek diyabetik hastalarda, mesane kanseri riskinde artış olduğunu gösteren bu tür araştırmaları bir araya getiren derlemeler çalışmamızda elde edilen verileri açıkça desteklemektedir (Jin ve ark., 2014; Lewis ve ark., 2014; Tuccori ve ark., 2016).

İngiltere’de 1 Ocak 1988 ve 31 Aralık 2009 tarihleri arasında oral hipoglisemik ajanlarla tedavi edilen tip 2 diyabet hastalarından oluşan retrospektif bir kohort çalışmasında, giriş yılı, cinsiyet ve takip süresi baz alınarak karşılaştırmalar yapılmıştır. Maruz kalmanın her zaman PIO kullanımı, süre ve kümülatif dozaj ölçümleriyle birlikte tanımlandığı çalışmada 115.727 yeni oral hipoglisemik madde kullanıcısı içermekte olup, 470 hastaya izlem sırasında mesane kanseri teşhis konulmuştur. Bir yıllık takipten sonra tanı alan 376 mesane kanseri vakası 6699 kontrol ile eşleştirilmiş, genel olarak, hiç PIO kullanmamışlara göre mesane kanseri oranının artması ile ilişkilendirilmiştir. Bu oran, kullanım süresinin bir fonksiyonu olarak artmıştır; en yüksek oran 24 aydan daha uzun süre (1.99, 1.14 ile 3.45) ve 28.000 mg'den (2.54, 1.05 ile 6.14) daha fazla kümülatif dozaj olan hastalarda gözlenmiştir. Sonuç olarak, PIO kullanımı, tip 2 diyabet hastaları arasında artmış mesane kanseri riski ile ilişkilendirilmiştir (Azoulay ve ark., 2012).

Fransa'da PIO maruziyeti ve mesane kanseri arasındaki ilişkiyi araştırmayı amaçlayan bir diğer kohort çalışma, Fransız hastane veri tabanı ile bağlantılı Fransız ulusal sağlık sigortası bilgi sisteminden (Système National d'Information Inter-régimes de l'Assurance Maladie; SNIIRAM) verilerini kullanarak hazırlanmıştır. Çalışmada yer alan hastalar 2006'da PIO içeren ilaç için reçete yazan 40 ila 79 yaşları arasındaki hastaları içermekte olup grup 42 aya kadar takip edilmiştir. PIO maruziyeti, zamana bağlı bir değişken olarak modellenmiş ve 6 aylık bir süre boyunca en az iki reçete doldurulmasıyla tanımlanmıştır. Yaş, cinsiyet ve diğer glukoz düşürücü ilaçlara maruz kalma için ayarlanmış çok değişkenli bir Cox modelini içeren istatistiksel analizlere göre grupta 155.535'i PIO'a maruz kalan 1.491.060 diyabetik hastalar arasında 175, maruz kalmayanlar 1.841 vaka tespit edildi. İnsidans oranları 100.000 kişi başına sırasıyla 49.4 ve 42.8 olarak bulunmuş ve PIO maruziyeti ile mesane

kanseri insidansı ve risk artışı arasında anlamlı olarak nitelendirilen bir ilişki rapor edilmiştir (Neumann ve ark., 2012).

Medline ve Embase gibi elektronik veri tabanlarının kullanıldığı benzer meta-analiz çalışmalarında PIO tedavisinin, diyabetli hastalarda mesane kanseri gelişme riskini anlamlı bir şekilde artırdığı belirtilmiştir (Zhu ve ark., 2012; Ferwana ve ark., 2013).

Yukarıda paylaşılan retrospektif, grup ve meta-analiz çalışmalarından dördünü ve bir randomize çalışmayı sistematik bir veri tabanında PRISMA ve MOOSE kriterleri dikkate alınarak bir araya getiren bir meta-analiz çalışması, PIO kullanıcıları ve hiç kullanmayanlar arasında mesane kanseri görülme sıklığını yılda 100.000 kişi başına sırasıyla 84.51 ve 66.68 olarak tespit etmiştir. Sonuçlar PIO'a maruz kalan hastalarda mesane kanseri riskinde artış olduğunu göstermiştir. PIO'un artan maruziyetini ele alan bu analizler sonucu, kümülatif kullanım süresi ve kümülatif dozaj açısından PIO kullanımı ve mesane kanseri gelişimi arasında bir doz-yanıt ilişkisini gözlemlendiği belirtilmiştir (He ve ark., 2014).

Bu çalışmaların sunduğu verilerin ve araştırmamız sonucu elde edilen bulguların aksine PIO ile mesane kanseri arasında güçlü ve oransal bir istatistiksel ilişki olmadığını raporlayan bazı in vivo, kohort ve derleme çalışmaları da mevcuttur. Suzuki ve ark. (2010) da yayımladıkları çalışma sonucunda PIO gibi PPAR agonistlerinin ratlarda üriner tümörlerin oluşumunu indüklediğini belirtmiş fakat bunu ratlara özel bir fenomen olarak tanımlayarak bu ajan ile tedavi edilen insanlarda bir mesane kanser riski oluşturmadıkları sonucuna varmışlardır. Yine bazı randomize kontrollü çalışmalarda PIO kullanımı ile mesane kanseri arasında anlamlı bir ilişki bulunmadığı ya da PIO'un mesane kanseri riskini artırdığı hipotezini destekleyen kanıtların sınırlı olduğu rapor edilmiştir (Colmers ve ark., 2012). Aynı yıl yayımlanan üç derlemeden birinde PIO ile mesane kanser riski arasındaki bağlantının farklı etnisitelerde önemli derecede değişebileceği öne sürülürken (Tseng, 2012), diğerinde PIO'un ratlarda doza bağlı değişen bir yanıt kalıbıyla mesane kanseri riskini artırabileceği desteklenmiştir (Tseng ve Tseng, 2012). Song ve ark., (2012)'nin yaptığı etnik olarak uyumlu yatkın vakalardan oluşan diğer bir retrospektif çalışmada, PIO

kullanan Kore diyabetiklerde mesane kanseri riskinin artış göstermediğini bildirmiştir.

Bu konuyu inceleyen ve yine fikir birliğine varamayan derlemeler arasında; Gale (2015) tekrarlanabilir sonuçlara, sistematik derlemelere ve meta-analizlere dayanan bilimsel bilgilerin PIO kullanımı ile mesane kanseri arasında tutarlı bir ilişkinin varlığına işaret ettiğini ve PIO'un bir tümör destekçisi olduğunu öne sürmüştür. Bu fikrin aksine derginin aynı sayısında Ryder (2015), konu hakkında veri sağlayan ilgili çalışma gruplarından ne PROactive ne de KPNC'dan gelen kanıtların PIO'un bir tümör promotörü olduğunu desteklemediğini savunmuştur. Benzer bir şekilde Wise (2015) PIO ile mesane kanseri arasında güçlü bir ilişkinin bulunmadığını bildirmiştir.

Bunlar dışında, PIO'un etkileri hakkında fikir ayrılıklarının derinleşmesi ve görülen risklerden hastaları korumak amaçlı Avrupa'da reçetelenmesinin durdurulması ile artan ilgi sonucu son iki yıl içinde yapılan iki çalışmadan biri Yang ve ark. (2018)'nin PIO'un etkilerini Rat normal üriner transisyonel epitelinde (NUTE) ve insan üriner karsinom (J82) hücrelerinde inceledikleri çalışmadır. Bir diğeri ise Kim ve ark. (2019)'nin insan mesane epitel hücrelerinden türetilen hücreleri (HBlEpC) yüksek glukoz ve insülin varlığında ve yokluğunda metformin ve PIO (2.5-25 µM) ile 24 ve 72 saat muamele ettikleri çalışmadır.

Yang ve ark., (2018) PIO'u Sıçan normal ürotelyal değişici epitel (NUTE) hücreleri ve insan mesane kanseri (J82) hücrelerinde MTT ve Annexin V yöntemleri kullanarak proliferasyon ve apoptoz yanında morfolojik değişimler bakımından test etmiş ve karşılaştırmıştır. Araştırmacılar, 72 saatlik uygulamada 10 µmol/L PIO dozundan başlayarak NUTE hücrelerinde (J82 hücrelerinde tespit etmedikleri) aşırı sitoplazmik kabarcıklanma ve yırtılmalar gözlediklerini rapor etmişlerdir. Bahsettikleri değişimlerin bu tezde deneyler sırasında hTU1-38 hücrelerinin izlenmesi sonucu belirlenen; yırtık ve parçalı sitoplazmalar, anormal konumlanmış çekirdekler ve büyük boşlukları olan halka görünüm, normal boyutlarından farklı polimorf şekiller ve monolayer yapışma özelliği göstermeyen üst üste binmiş gruplar ile uyumlu olduğu düşünülmektedir. Ayrıca artmış pigmentasyonu akla getiren granüle sitoplazmaya sahip hücreler de gözlenmiştir.

Kim ve ark., (2019)'nın bu yıl yayımladıkları PIO (4.2 μ M) ve MET (0.4 mM)'in tek başlarına ve kombinasyonunun HblEpC hücrelerinde düşük ve yüksek glukoz ve/veya insülin varlığında 3 ve 7 günlük sürelerde uygulandığı çalışmada, PIO uygulamasının ve MET ile kombinasyonunun 3. günde hücre döngüsü G₁/S geçişini sağlayan siklinlerin ifadesini ve siklin-bağımlı kinaz aktivitelerini baskıladığını, 7. günde ise yüksek glukoz/insülin varlığının bu etkiyi geçersiz kıldığını bildirmişlerdir. Aynı zamanda bu ilaçların uygulandığı hücrelerde, yüksek glukoz ve insülin kombinasyonu veya bunlara uzamış sürelerde maruziyetin CDK inhibitörleri baskıladığını ve c-myc/Bax ekspresyonlarını teşvik ettiğini de bildirmişlerdir. Bu verilere dayanarak araştırmacılar, PIO ve MET kombinasyonunun yüksek glukoz ve insülin varlığında HblEpC hücrelerinde kontrolsüz hücre çoğalmasını önlediğini belirtmiş olup, hiperglisemik ve hiperinsülinemi koşullarının muhtemelen diyabet ilaçlarından daha büyük kanser risk faktörleri olduğu sonucuna varmışlardır. Aynı çalışmada Fransa ve Almanya sağlık ürünleri güvenlik ajanslarının, ilaçla ilişkili tüm risklerin faydalarına ağır bastığı için PIO kullanımını 2011'de askıya alındığından da bahsedilmiştir. Bununla beraber, çalışmamızdaki transformasyon verileriyle uyumlu görünmemesine rağmen anılan araştırmada; PIO'un dikkat çekilen hücre döngüsü ilerlemesi ve kontrolsüz çoğalmayı engelleyen bir nevi tümör oluşumunun karşısındaki potansiyeli düşük glukoz varlığında ve insülin yokluğunda gerçekleşmiştir. Oysa, PPAR γ reseptörüne etki ederek işlevini kolaylaştıran ve hücrenin insüline duyarlılığını ve insülinin etkinliğini artıran, PIO'un kullanım amacı doğrultusunda etkisini yüksek glukoz ve insülin varlığında göstermesi beklenmelidir ki bu durum çalışma sonuçlarında gözlenmemiştir.

Genel bir değerlendirme yapabilmek üzere ve ayrıca literatürde/gerçekte ilgili araştırma grupları arasındaki PIO'un olumlu/olumsuz potansiyeli ya da fayda-risk tespitlerindeki uyumsuzluk ve karmaşıklığa dikkat çekmek amacıyla, tartışma bölümünde izlemeye dikkat edilen kronolojik düzenin dışına çıkarak aşağıdaki üç araştırmanın varsayımlarını ve çıkarımlarını ayrıca ele alarak tartışmanın gerekli ve faydalı olacağı düşünülmüştür.

Bunlardan ilki Lewis ve ark., (2014)'nin proteinüri testinin uygulanarak risk değerlendirmesi için yaptıkları kohort (grup) çalışmasıdır. Yapılan bu grup

çalışmasında araştırmacılar, kullanılan rutin test sonuçlarına göre tüm idrar analizine devam edilmesi durumunda proteinüri testinin mesane kanser tanısı ve PIO kullanımı arasında ortaya çıkan mevcut ilişkideki sapmayı belirleyebileceğini varsaymışlardır. Araştırmacıların kuramsal metod uygulaması ve veri incelemeleri sonucu ilişkinin gücünün yüksek tespit edilmesine rağmen, önceki tüm çalışmalarda proteinüri testi ile ilgili verilerin eksik olduğunu ve proteinüri testi sonuçlarının uzun süreli yüksek dozlardaki PIO kullanımı ile mesane kanseri riski arasındaki olası bağlantıyı tam olarak açıklayamadığını belirtmişlerdir. Veri analizinde karşılaştıkları sapmanın bu gruba özgü olarak küçük olsa da başka grup verilerinde bunun değişebileceğini varsayarak PIO kullanımı ile mesane kanseri arasındaki ilişkinin abartıldığı sonucunu çıkarmışlardır. Oysa yukarıda bahsedilen çalışmaların ikincisinde, Azoulay ve ark. (2012) bunun aksine, gruplandırılmış vaka kontrol çalışmasında PIO ile uzun süreli veya yüksek doz tedavisi alan hastalarda artmış mesane kanseri riskini göstermiş ve sonuçların çeşitli hassas analizlerde tutarlı kaldığını bildirmiştir.

Son olarak, PPAR agonistlerinin risk potansiyellerini belirlenmesi için sıçanlarda yürütülmüş bir çalışmada Cohen (2005) PIO ve benzeri agonistler ile mesane kanseri arasındaki olası bir ilişki olduğunu kabul eden bir hipotez sınamıştır. Araştırmada böyle herhangi bir hipoteze mekanistik yaklaşımlarla yönlendirilebilecek çeşitli zorlayıcı noktalar değerlendirilmiştir. Bazı çelişkiler içeren, birbirini sönmüleyen önerme-sonuç ilişkisi kurulan ve hipotezi zorladığı iddia edilen gözlemlerin bizce en önemli noktası, PPAR reseptörlerinin ürotelyum biyolojisinde (paralel olarak ligandı olan agonistlerin etkisi) normal hücrelerde farklılaşmayı güçlendirdiği, ayrıca normal ve hatta karsinomlu ürotelyal hücrelerde çoğalma inhibisyonu ile ilişkili olduğu, böylece proliferasyonu artıran bir karsinojen için beklenenin tam tersi davranış sergilediğidir. Bu açıklamaya paralel olarak, bu tezin sitotoksikite sonuçları non-tümöröjenik transforme olmamış ürotelyal hücreler için inhibisyon görüşünü desteklemektedir. Bu durumun açıklamanın ikinci kısmındaki proliferasyon teşviki ile zıt gibi görünmesini sağlayan kritik nokta artmış hücre bölünmesinin bozulmuş hücre döngüsü şartlarına bağlı olduğu ve bunun da tümöröjenik olarak dönüşmüş kanser hücresinde gerçekleşeceğidir. Bu noktada, tezin ikinci yöntemini oluşturan transformasyon testinde PIO'un hücrelerin transformasyonunu indüklediği ve odaklar

oluşturan transforme hücrelerin parental hücrelere oranla (yaklaşık 3 kata kadar) artmış proliferasyon örnekleri gösterdiklerine dikkat çekmek gerekmektedir.

Non-tümörjenik olan türetilmiş ölümsüz veya normal hücreler ve karsinom hücrelerinde paylaşılan bir özellik olarak ilginç bir kromozomal anomali olgusu açıklanarak tartışma bölümü sonlandırılabilir. Baud ve ark. (1998) malignite hikayesi bilinmeyen şeker hastalarından alınan ürotelyal örneklerin %50'si kromozom 9'da p-q kol kayıpları veya kısmi delesyonlar sergilediğini tespit etmişlerdir. Ayrıca başka bir çalışmada, moleküler anomalisi olan ve olmayan örnekler arasında histopatolojik olarak önemli bir fark gözlenmeyip, mesane kanserli hastaların normal morfolojili ürotelyal örneklerinin yaklaşık %10'unda kromozom 8p veya 9 delesyonları görüldüğü raporlanmıştır. Bu delesyonların %73'ü 9q, %40'ı 9p delesyonu olup toplamın %47'sinde her iki delesyon birlikte tespit edilmiştir. Bu ve diğer delesyon tipleri ilgili karsinoma sahip ürotelyumlarda (T24 gibi) da görülmüştür (Stoehr, 2005). Çalışmanın sonucunda kromozom 9 delesyonlarından özellikle 9q'nun mesane kanseri gelişiminin en erken gerçekleşen genetik olgusu olduğu sonucuna varılmış olup, buna paralel, hTU1 ve HBLAK gibi ölümsüz hücre hatlarının türetildiği non tümörejenik ve transforme olmamış parental hücrelerin (TRT-HU1, NHUC gibi) de bu delesyonlara sahip olduğu ve bunların doğada pre-neoplastik/malignant olarak bulunabileceği öne sürülmüştür (Fadl-Elmula ve ark., 2000; Kim ve ark., 2011; Hoffmann ve ark., 2016). Normal ürotelyal hücreler in vitro çalışmalarda kullanılmak için senesens vb. etkiler nedeniyle sınırlı yaşam sürelerine sahiptirler. Dolayısıyla bu hücrelerden köken alan ve çeşitli yöntemlerle ölümsüzleştirilen türev hücre hatlarına ihtiyaç duyulmuştur. Genel çalışma amaçlarına uygunluk açısından, karyotipinde önemli herhangi bir kromozomal değişiklik bulundurmayan normal ürotelyal hücrelerden türevlenmiş ölümsüz hatlar geliştirilmişse de böyle hücre hatları farklılaşma ve fonksiyonel kapasite bakımından ödün veren ve normal ürotelyal hücre/doku biyolojisi ve fizyolojisinin incelenmesinde sınırlı öneme sahiptir (Chapman ve ark., 2006; Georgopoulos ve ark., 2011).

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Antidiyabetik ilaçlar kullanılması esnasında birçok ilaçta olabileceği gibi bazı yan etkileri olabilmektedir. Dünya genelinde çok yaygın görülen diyabet hastalığında sıkça başvurulan antidiyabetik ilaçlardan biri de PIO'dur. PIO kullanımı ve olası sonuçları nedeniyle ilgili çelişkiler hala sürmektedir. PIO, bazı kardiyovasküler risklerin ve arteriyoskleroz ölçümlerinin azaltılmasında da etkili olmuştur. PIO, tip 2 diyabetli hastalar için etkili bir tedavi seçeneği sunabilmesi yanında (Swanson ve ark., 1995) etkilediği mekanizmalardan, organizmadaki hareket tarzından ve oluşturduğu sonuçlardan diyabet dışında kalp sağlığına iyi geldiği hatta bazı kanser tiplerinde terapötik ajan olabileceği bile iddia edilmektedir. Bu nedenle mesane kanseri riskini artırdığı fikirler bulunmakla birlikte PIO'un mesane kanserli diyabetik hastalar için faydalı olabileceğini ile ilgili fikirler de mevcuttur (Shao L ve ark., 2018). PIO etken maddesini üreten firmanın yaptırdığı çalışma sonrasında mesane kanseri riskini çok az oranda artırdığı ancak bunun kullanıcılarla da bağlantılı olabileceği ve kesin bir sonuca varılamadığı vurgulanmıştır (Ferrara ve ark., 2014). İlgili retrospektif kohort veya meta-analiz çalışmalarında belirtildiği gibi kanser tanısı konmamış şeker hastalarından elde edilen dokulara ait ya da mesane kanseri hikayesi olan dokulardaki normal morfolojideki transforme olmayan hücrelerde ve aynı zamanda ürotelyal karsinomlu hücrelerde yapılan karakterizasyon çalışmalarında bu hücrelerce paylaşılan 9. kromozomdaki kol kayıpları veya kısmi delesyonların tespiti, normal ürotelyal hücrelerin herhangi bir etken sebebiyle ya da spontan olarak neoplastik transformasyona yatkınlığını göstermesi açısından çok önemlidir. PIO gibi bir kimyasal ajanın bu duyarlılıkla beraber neoplastik transformasyonu kolaylaştırabileceği ve hızlandırabileceği unutulmamalıdır. PIO'un başlatıcı, kolaylaştırıcı veya hızlandırıcı herhangi bir karsinojenik potansiyeli olmadığı fikri skeptik bakıştan fazlasıyla nasibini alacak şekilde bilim dünyasını ve tüm paydaşları tatmin edinceye kadar ayrıntılı ve çok tekrarlı araştırmalarla sınanmalıdır.

Daha fazla kanıt ortaya çıktıkça PIO kullanım risklerinin faydalarına ağır bastığı ve kullanımla mesane kanseri oluşumu arasındaki ilişkinin güçlendiği gerçektir. Hekimler, hastalar ve düzenleyici birliklerin PIO ile tedavinin tüm risk ve faydaları değerlendirilirken bu ilişkinin farkında olmaları gerektiği düşünülürse,

riskleri ve faydaları dengeleyen holostik bir bakış açısıyla yürütülecek, farklı ve mekanistik yöntemlerle ürotelyal hücrelerde yapılacak ileri araştırmalar PIO'un in vitro hareket tarzının belirlenmesinde göz ardı edilemeyecek bilgilere ulaşılmasını sağlayacaktır.

PIO'un söz konusu potansiyelinin aydınlatılması için yapılacak farklı in vitro çalışmalarda kullanılmak üzere seçilecek hücre hattı konusunda diyabetli hastalardan alınan mesane dokusuna ait normal veya tümör hücre hatlarının kullanılması önerilmektedir. Bu sayede uzun süre ilaç kullanan hastalarda PIO etkisinin organizma açısından in vitro modellenmesi yapılabilecektir.

Bunun yanında, günümüzde ülkemizde yaklaşık 11 milyon diyabet hastası bulunmaktadır. İçlerinden diyabetik ilaçlar kullanan 6 milyon diyabet hastası olduğu göz önüne alındığında, bu konuda karşılaştırılmalı olarak etkisi kanıtlanmış ve iyi araştırılmış özellikle doğal ürünlerin (kuersetin vb.) de yer aldığı yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi insan yaşamının kalitesinin artırılması açısından ve ekonomik kaynakların daha verimli ve doğru kullanılması açısından çok önemlidir.

6. KAYNAKÇA

- Abercrombie, M. & Heaysman, J. E. (1954). Invasiveness of sarcoma cells. *Nature* 174, 697-698.
- Abercrombie, M. & Heaysman, J. E. M. (1954). Observations on the social behaviour of cells in tissue culture: II. 'Monolayering' of fibroblasts. *Exp. Cell Res.* 6, 293-306.
- Abercrombie, M. & Contact (1979). Inhibition and malignancy. *Nature* 281, 259-262.
- Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé (ANSM). (2011). Use of Medications Containing Pioglitazone (Actos®, Competact®) Suspended. www.anism.sante.fr/var/anism_site/storage/original/application. (Erişim Tarihi: 09 Kasım 2019).
- Akçay, G. (2001). Diabetes mellitus'un tanı ve tedavisindeki gelişmeler. İç Hastalıkları Mezuniyet Sonrası Eğitim Kursu. Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Erzurum.
- Alzoubi, K., Khabour, O., Hussain, N., Al-azzam, S. & Mhaidat, N. (2012). Evaluation of vitamin B12 effects on DNA damage induced by pioglitazone. *Mutation Research* 748, 48-51.
- Amiri, F. & Garcia, R. (2000). Renal angiotensin II receptors and protein kinase C in diabetic rats: effects of captopril, losartan, and bradykinin on early steps of insulin action. *Am J Physiol Renal Physiol*, 278. F603-612.
- Anonim, (2001). American Diabetes Association Clinical Practice Recommendations. *Diabetes Care*, 24, Supplement 1.
- Anonim, (2012) <http://www.eczanet.com>, (Erişim tarihi: 12.10.2019).
- Anonim, (2014). Your Health with Joan Lunden and CDC (Diabetes) CDC. www.cdc.gov, (Erişim tarihi: 13.10.2019).
- Azoulay, L., Yin, H., Filion, KB., Assayag, J., Majdan, A., Pollak, MN. & Suissa, S. (2012). The use of pioglitazone and the risk of bladder cancer in people with type 2 diabetes: nested case-control study. *BMJ*, 344, e3645.
- Bailey, CJ. & Day, C. (2001). Thiazolidinediones today. *Brit J Diab Vasc Dis.*, 1, 7-13.
- Beaton, SJ., Nag, SS., Gunter, MJ., Gleeson, JM. & Sajjan SS. (2004). Alexander CM. Adequacy of glycemic, lipid, and blood pressure management for patients with diabetes in a managed care setting. *Diabetes Care*, 27(3), 694-8.
- Braunwald, E., Fauci, AS., Kasper, DL., Hauser, SL., Longo, DL. & Jameson, JL. (2004). Harrison İç Hastalıkları Prensipleri, Cilt 2, Nobel Kitabevleri, 2109-2138.

- Burant, CF. (2004). Tip 2 diabetin tibbi tedavisi, Beşinci baskı, ADA. Port City Pres., 100.
- Bursell, SE., Clermont, AC. & Aiello, LP. (1999). High dose vitamin E supplementation normalizes retinal blood flow and creatinine clearance in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care*; 22, 1245-1251.
- Cariou, B., Charbonnel, B. & Staels, B. (2012). Thiazolidinediones and PPARgamma agonists: time for a reassessment. *Trends Endocrinol Metab.*, 23 (5), 205-15.
- Ceriolla, A. (1998). The emerging role of postprandial hyperlycaemic spikes in pathogenesis of diabetic complications. *Diabet Med*, 15, 188-193.
- Chaffer, C.L., Thomas, D.M., Thompson, E.W., & Williams, E.D. (2006). PPARgamma-independent induction of growth arrest and apoptosis in prostate and bladder carcinoma. *BMC Cancer*, 6, 53.
- Chapman, E., Hurst, C., Pitt, E., Chambers, P., Aveyard, S.J. & Knowles, M.A. (2006). Expression of hTERT immortalises normal human urothelial cells without inactivation of the p16/Rb pathway. *Oncogene*, 25, 5037-5045.
- Chiasson, JL., Josse, RG. & Hunt, JA. (1994). The efficacy of acarbose in the treatment of patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. A multicenter controlled clinical trial. *Ann. Intern. Med.*, 121, 928-35.
- Colmers, IN., Bowker, SL., Majumdar, SR. & Johnson, JA. (2012). Use of thiazolidinediones and the risk of bladder cancer among people with type 2 diabetes: a meta-analysis. *CMAJ*, 184, E675-83.
- Davis, E. M. & Trinkaus, J. P. (2005). Significance of cell-to-cell contacts for the directional movement of neural crest cells within a hydrated collagen lattice. *J. Embryol, Exp. Morphol*, 63, 29-51.
- Dubois, M., Vantyghem, MC., Schoonjans, K. & Pattou, F. (2002). Thiazolidinediones in type 2 diabetes. Role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma). *Ann Endocrinol*, 63, 511-523.
- Edelman, D., Olsen, MK., Dudley, TK. & Harris, AC. (2004). Oddone EZ. Utility of hemoglobin A1c in predicting diabetes risk. *J Gen Intern Med.*, 19, 1175-1180.
- Egan, J., Rubin, C., Mathisen, A. (1999). Combination therapy with pioglitazone and metformin in patients with type 2 diabetes [abstract]. *Diabetes* 1999 May, 48 Suppl., 1, A117
- Fadl-Elmula, I., Gorunova, L., Mandahl, N., Elfving, P., Lundgren, R., Mitelman, F. & Heim, S. (2000). Karyotypic characterization of urinary bladder transitional cell carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer*, 29 (3), 256-265.

- Ferwana, M., Firwana, B., Hasan, R., Al-Mallah, MH., Kim, S, Montori, VM. & Murad, MH. (2013). Pioglitazone and risk of bladder cancer: a meta-analysis of controlled studies. *Diabet Med.*, 30, 1026-32.
- Folli, F., Saad, MJ. & Velloso, L. (1999). Crosstalk between insulin and angiotensin II signaling systems. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 107, 133-139.
- Füchtenbusch, M., Standl, E. & Schatz, H. (2000). Clinical efficacy of new thiazolidinediones and glinides in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 108, 151-163.
- Gaede, P., Vedel, P. & Parving H. (1998). The Steno Type 2 Study: Intensive multifactorial intervention delays progression in diabetic micro and macroangiopathy in microalbuminuric type 2 diabetic patients. *Diabetologia*, 41(1), 4.
- Gilmer, TP., Oconnor, PJ., Manning, WG. & Rush, WA. (1997). The cost to health plans of poor glycemic control. *Diabetes Care*, 20, 1847-53.
- Goldstein, B.J. (2002). Differentiating members of the thiazolidindione class: a focus on efficacy. *Diabetes Metab. Res. Rev.*, 18, 16-22.
- Granberry, MC. & Fonseca, VA. (1999). Insulin resistance syndrome: options for treatment. *South Med J*, Jan, 92, 2-14.
- Gren A. & Hirsch NC. (2003). The changing World demography of type 2 diabetes. *Diabetes Metab.*, Res, 19, 3-7.
- Greene, DA., Lattimer, SA. & Sima, AAF. (1998). Pathogenesis and prevention of diabetic neuropathy. *Diabetes Metab Res. Rev.*, 4, 201-221
- Gu, K., Cowie, CC. & Harris, MI. (1999). Diabetes and decline in heart disease mortality in US adults. *JAMA*, 281(14), 1291-7.
- Guan, YF., Zhang, YH., Breyer, RM., Davis, L. & Breyer, MD. (1999) Expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human transitional bladder cancer and its role in inducing cell death. *Neoplasia*, 1, 330-339
- Haffner, SM. (1998). Epidemiology of type 2 diabetes risk factors. *Diabetes Care*, 21, 3-6.
- Hallakou, S., Doaré, L. & Foufelle, F. (1997). Pioglitazone induces in vivo adipocyte differentiation in the obese Zucker fa/fa rat. *Diabetes*, Sep; 46: 1393-9.
- Hartman, HB., Hu, X., Tyler, KX., Dalal, CK. & Lazar, M.A. (2002). Mechanisms regulating adipocyte expression of resistin. *J Biol Chem*, 277, 19754 -19761.
- Hauner, H. (2002). The mode of action of thiazolidinediones. *Diabetes, Metab Res Rev.*, 18, 10-15.

- He, S., Tang, YH. & Zhao, G. (2014). Pioglitazone prescription increases risk of bladder cancer in patients with type 2 diabetes: an updated meta-analysis. *Tumour Biol.*, 35(3), 2095-102
- Heaysman, J. E. (1970). Non-reciprocal contact inhibition. *Experientia* 26, 1344–1345.
- Hendrix, M. J. C., Seftor, E. A., Seftor, R. E. B., Kasemeier-Kulesa, J., Kulesa, P. M. & Postovit, L.-M. (2007). Reprogramming metastatic tumour cells with embryonic microenvironments. *Nature Reviews Cancer*, 7(4), 246–255.
- Hendrix, M. J. (2007). Reprogramming metastatic tumour cells with embryonic microenvironments. *Nature Rev. Cancer* 7, 246–255.
- Inzucchi, SE. (2002). Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes: Scientific review. *JAMA*, 287, 360-372
- Kaneko, T., Baba, S., Toyota, T. (1997). Clinical evaluation of an insulin-resistance improving agent, AD-4833, in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) on diet therapy alone - a placebo-controlled double-blind clinical study. *Rinsho to Kenkyu*, 74 (6), 1491-514.
- Kawakami, S., Arai, G., Hayashi, T., Fujii, Y., Xia, G., Kageyama, Y. & Kihara, K. (2002). PPARgamma ligands suppress proliferation of human urothelial basal cells in vitro. *J Cell Physiol*, 191,3, 10-9.
- Kayaalp, O. & Gürlek, A. (2012). Türkiye İlaçla Tedavi Kılavuzu 2011-2012 Formülleri- Pelikan Kitabevi Tıbbi Farmakoloji, 1039-1075
- Kemnitz, JW., Elson, DF. & Roecker, EB. (1994). Pioglitazone increases insulin sensitivity, reduces blood glucose, insulin, and lipid levels, and lowers blood pressure in obese, insulin resistant rhesus monkeys. *Diabetes*, Feb, 43, 204-11.
- Kerr, EA., Gerzoff, RB., Krein, SL., Selby, JV., Piette, JD & Curb, JD. (2004). Diabetes care quality in the Veterans Affairs Health Care System and commercial managed care: the TRIAD study. *Ann Intern Med.*, 141(4), 272-81.
- Kim, J., Ji, M., Di Donato, J.A., Rackley, R.R., Kuang, M., Sadhukhan, P.C., Mauney, J.R., Keay, S.K., Freeman, M.R., Liou, S.L. & Adam, R.M. (2011). An hTERT-immortalized human urothelial cell line that responds to anti-proliferative factor. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.*, 47 (1), 2-9.
- Kim, D., Ahn, B. N., Kim, Y. S., Hur, D. Y., Yang, J. W., Park, G. B., Jang, J. E., Lee, E. J., Kwon, M. J., Kim, T. N., Kim, M. K., Park, J. H., Rhee, B. D. & Lee, S. H. (2019). High Glucose with Insulin Induces Cell Cycle Progression and Activation of Oncogenic Signaling of Bladder Epithelial Cells Cotreated with Metformin and Pioglitazon. *Journal of Diabetes Research*, DOI: 10.1155/2019/2376512.

- King, H. & Rewers M. (1993). WHO And Hoc Diabetes Reporting Group: Global estimates for prevalance of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance. *Diabetes Care*, 16, 157-77.
- Kulesa, P. M. (2006). Reprogramming metastatic melanoma cells to assume a neural crest cell-like phenotype in an embryonic microenvironment. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 103, 3752–3757.
- Kuriyama, S. & Mayor, R. (2008). Molecular analysis of neural crest migration. *Phil. Trans. R. Soc. B* 363, 1349–1362.
- Lambe, KG. & Tugwood, JD. (1996). Ahuman peroxisome-proliferator-activated receptor is activated by inducers of adipogenesis, including thiazolidinedione drugs. *Eur J Biochem*, 1, 239, 1-7.
- Lebovitz, HE. (2001). İnsülin resistance: definition and consequences. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabet*, 109, 135-148.
- Lewis, J.D., Habel, L., Quesenberry, C., Ronac, M., Peng, T., Bilker, W.B., Hedderson, M., Nessel, L., Vaughn, D.J., Strom, B.L. & Ferrara, A. (2014). Proteinuria testing among patients with diabetes mellitus is associated with bladder cancer diagnosis: potential for unmeasured confounding in studies of pioglitazone and bladder cancer. *Pharmacoepidemiol Drug Saf.*, 23(6):636-45.
- Lilly, M. & Godwin, M. (2014). Treating prediabetes with metformin: systematic review and metaanalysis. *Can. Fam. Physician*, 55, 363-9.
- Longo, R. (2010). Understanding oral antidiabetic agents. *Am. J. Nursing*, 110, 49-52.
- Lu, M., Kuroki, M. & Amano, S. (1998). Advanced glycation end products increase retinal vascular endothelial growth factor expression. *J Clin Invest*, 101, 1219-1224.
- Mathisen, A., Egan, J. & Schneider, R. (1999). The effect of combination therapy with pioglitazone and sulfonylurea on the lipid profile in patients with type 2 diabetes [abstract]. *Diabetes*, 48 Suppl. 1, A106.
- Mathisen, A., Geerlof, J. & Houser, V. (1999). The effects of pioglitazone on glucose control and lipid profile in patients with type 2 diabetes [abstract]. *Diabetes*, 48 Suppl. 1, A102-3.
- Mu, J., Petrov, A., Eiermann, GJ., Woods, J., Zhou, YP., Li Z., Zycband, E., Feng, Y., Zhu, L., Roy, RS., Howard, AD., Li, C., Thornberry, NA. & Zhang, BB. (2009). Inhibition of DPP-4 with sitagliptin improves glycemic control and restores islet cell mass and function in a rodent model of type 2 diabetes. *Eur. J. Pharmacol.*, 623, 148-154
- Mudaliar, S. & Henry, RR. (2001). New oral therapies for type 2 diabetes mellitus: the glitazones or insulin sensitizers. *Ann. Rev. Med.*, 52, 239-57.

- Murphy, GJ. & Holder, JC. (2000). PPAR- γ agonists: therapeutic role in diabetes, inflammation and cancer. *Trends Pharmacol. Sci.*, 21, 469-74
- Nakashiro, K.I., Hayashi, Y., Kita, A., Tamatani, T., Chlenski, A., Usuda, N., Hattori, K., Reddy, J.K. & Oyasu, R. (2001) Role of peroxisome proliferator-activated receptor- γ and its ligands in non-neoplastic and neoplastic human urothelial cells. *Am J Pathol*, 159, 591-597.
- Neumann, A., Weill, A., Ricordeau, P., Fagot, JP., Alla, F. & Allemand, H. (2012). Pioglitazone and risk of bladder cancer among diabetic patients in France: a population-based cohort study. *Diabetologia*, 55, 1953-62.
- Nielsenb, O. S., Bentzen, M. & Overgaard, J. (1995). Selective assessment of in vitro radiosensitivity of tumour cells and fibroblasts from single tumour biopsies using immunocytochemical identification of colonies in the soft agar clonogenic assay. *Radiotherapy and Oncology*, 37, 87-99
- Paddock, S. W. & Dunn, G. A. (1986). Analysing collisions between fibroblasts and fibrosarcoma cells: fibrosarcoma cells show an active invasionary response. *J. Cell Sci*, 81, 163–187.
- Pullman, B. & Gelbion, H. (1980). Carcinogenesis: Fundamental Mechanisms and Environmental Effects. The Jerusalem Symposia on Quantum *Chemistry and Biochemistry*, Dordrecht, Springer, Vol, (13), 592.
- Rhim, J.S. & Dritschilo, A. (1991). Neoplastic Transformation in Human Cell Culture: Mechanism of Carcinogenesis. *Experimental Biology and Medicine*, New York, Humana Press, Vol, (25), 396.
- Ryder, R.E.J. (2015). Neither evidence from the PROactive study nor the KPNC supports pioglitazone as a tumour promoter. *Diabet Med.*, 32, 438–439
- Saaddine, JB., Cadwell, B., Gregg, EW., Engelgau, MM., Vinicor, F. & Imperatore, G. (1988-2002). Improvements in diabetes processes of care and intermediate outcomes: United States, *Ann Intern Med.*, 144(7), 465-74.
- Saltiel, AR. & Olefsky, JM. (1996). Thiazolidinediones in the treatment of insulin resistance and type II diabetes. *Diabetes*, Dec; 45, 1661-9.
- Satman, I., Yilmaz T., Sengül A., Salman S., Salman F., Uygur S., Bastar I., Tütüncü Y., Sargin M., Dinççag N., Karsidag K., Kalaça S., Özcan C. & King H. (2002). Population-Based Study of Diabetes and Risk Characteristics in Turkey. *Diabetes Care*, Sep; 25(9), 1551-1556.
- Schwartz, F.J. (1983). Shark ageing methods and age estimation of scalloped hammerhead, *Sphyrna lewini* and dusky *Carcharhinus obscurus* sharks based on vertebral ring counts. In: E.D. Prince, and L.M. Pulos (eds), Proceedings of the international workshop on age determination of oceanic pelagic fishes: tunas, billfishes and sharks. *NOAA Tech. Rep.*, NMFS 8, 167-174pp.

- Shao-ling, Y., Ji-jiao, W. & Ming, C. (2014). Pioglitazone Use and Risk of Bladder Cancer. *In Vitro Study*, 15(3), 228-237. doi: 10.7150/ijms.22408
- Song, SO., Kim, KJ., Lee, BW., Kang, ES., Cha, BS. & Lee, HC. (2012). The risk of bladder cancer in Korean diabetic subjects treated with pioglitazone. *Diabetes Metab J*, 36, 371-8.
- Speer, R.M., The, T., Xie, H., Liou, L., Adam, R.M. & Wise Sr, J.P. (2017). The Cytotoxicity and Genotoxicity of Particulate and Soluble Cobalt in Human Urothelial Cells. *Biol Trace Elem Res.*, 180, 48-55.
- Stevens, RJ., Kothari, V., Adler AI. & Stratton, IM. (2011). The UKPDS risk engine: a model for the risk of coronary heart disease in type II diabetes (UKPDS 56). *Clin Sci (Lond.)*, 101(6), 671-9.
- Sun, P. (2014). Contact inhibition against senescence. *Oncotarget*, 5 (17), 7212-7213.
- Suzuki, M., Odaka, H. & Sugiyama, Y. (1999). Effect of pioglitazone in combination with metformin on diabetes and obesity in Wistar fatty rats [abstract]. *Diabetes*, 48 Suppl. 1, A454.
- Swanson, ML. & Bleasdale, JE. (1995). Antidiabetic agent pioglitazone increases insulin receptors on 3T3-L1 adipocytes. *Drug Dev., Res*, 35: 69-82.
- Todd, JA. (2010). Etiology of type 1 diabetes. *Immunity*; 32, 457–67.
- Tseng, CH. (2012). Pioglitazone and bladder cancer: a population-based study of Taiwanese. *Diabetes care*, 35, 278-80
- Tsubaki, M., Takeda, T., Tomonari, Y., Kawashima, K., Itoh, T., Imano, M., Satou, T. & Nishida, S. (2018). Pioglitazone inhibits cancer cell growth through STAT3 inhibition and enhanced AIF expression via a PPAR γ -independent pathway. *Diabetes care*, 165, 255-80
- Tuccori, M., Fillion, KB. & Yin, H. (2016). Pioglitazone use and risk of bladder cancer: population-based cohort study. *BMJ*, 352, 1541.
- U.S. Food and Drug Administration. (2011). FDA Drug Safety Communication: Update to ongoing safety review of Actos (pioglitazone) and increased risk of bladder cancer. *Safety Announcement*. Accessed.
- Vijan S. & Hayward RA. (2004). Pharmacologic lipid-lowering therapy in type 2 diabetes mellitus: background paper for the *American College of Physicians*. *Ann Intern Med.*, 140(8), 650-8.
- Weisburger, E.K. (1989). Mechanisim of Carcinogenesis. *Cancer Growth and Progression Netherlands*, Springer, Vol: (2), 50.

- Weyer, C., Bogardus, C. & Mott, D. (1999). The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest*, 104, 787-794.
- Williams R. (1998). The burden of diabetes in the next millennium. *Diabetes Reviews International*, 7, 21-23.
- Wise, J. (2015). No strong association is found between pioglitazone and bladder cancer. *BMJ*, 351
- Wyatt., SB, Winters., KP. & Dubbert., PM. (2006). Overweight and obesity: prevalence, consequences, and causes of a growing public health problem. *Am J Med Sci.*, 331(4): 166-74.
- Xie, H., La Carte, C., Thompson, D.W. & Wise Sr, J.P. (2009) Depleted Uranium Induces Neoplastic Transformation in Human Lung Epithelial Cells. *Toxicol*, 23, 373–378.
- Yang, F.G., Zhang, Z.W., Xin, D.Q., Shi, C.J., Wu, J.P. & Guo, Y.L. (2005). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands induce cell cycle arrest and apoptosis in human renal carcinoma cell lines. *Acta Pharmacol Sin.*, 26, 753-61.
- Yoshimura, R., Matsuyama, M. & Segawa, Y. (2003). Expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in human urinary bladder carcinoma and growth inhibition by its agonists. *Int J Cancer* 104, 597–602
- Zhu, Z., Shen, Z, Lu, Y., Zhong, S. & Xu, C. (2012). Increased risk of bladder cancer with pioglitazone therapy in patients with diabetes: a meta-analysis. *Diabetes, Res Clin Pract*, 98, 159-63.
- Zinman, B., Gerich, J., Buse, JB., Lewin, A., Schwartz, S., Raskin, P., Hale, PM., Zdravkovic, M. & Blonde, L. (1999). LEAD-4 Study Investigators. Efficacy and safety of the human glucagon-like peptide-1 analog liraglutide in combination with metformin and thiazolidinedione in patients with type 2 diabetes (LEAD-4 Met+TZD). *Diabetes Care*, 32, 1224-30.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	EMRE İLKUN
Doğum Yeri	MERKEZ/GİRESUN
Doğum Tarihi	18.03.1994
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
Telefon	05464054654
E-Posta Adresi	emreilkun@gmail.com



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Edebiyat Fakültesi
Bölümü	Moleküler Biyoloji ve Genetik
Mezuniyet Yılı	21.06.2017