



T.C.  
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
İÇ HASTALIKLARI ANA BİLİM DALI-HEMATOLOJİ BİLİM DALI

**B HÜCRELİ KRONİK LENFOSİTİK  
LÖSEMİ LENFOSİTLERİNDE  
ATORVASTATİN VE ROSİGLİTAZONUN  
CD38, ZAP 70, ANNEKSİN V VE Bcl-2  
DÜZEYİNE İN VİTRO ETKİSİ**

YAN DAL UZMANLIK TEZİ

DR.İRFAN YAVAŞOĞLU

DANIŞMAN

Prof. Dr. A.ZAHİT BOLAMAN

**AYDIN-2009**

T.C.  
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
İÇ HASTALIKLARI ANA BİLİM DALI-HEMATOLOJİ BİLİM DALI

**B HÜCRELİ KRONİK LENFOSİTİK  
LÖSEMİ LENFOSİTLERİNDE  
ATORVASTATİN VE ROSİGLİTAZONUN  
CD38, ZAP 70, ANNEKSİN VE Bcl-2 DÜZEYİNE  
İN VİTRO ETKİSİ**

YAN DAL UZMANLIK TEZİ

DR. İRFAN YAVAŞOĞLU

DANIŞMAN

Prof. Dr. A.ZAHİT BOLAMAN

**AYDIN-2009**

## **ÖNSÖZ**

Yan dal uzmanlık tezi çalışmalarım ve eğitimim süresince çok büyük katkıları olan değerli hocam Prof.Dr. A.Zahit BOLAMAN ve abim Prof. Dr. Gürhan KADIKÖYLÜ'ye teşekkür ederim.

Dr. İrfan YAVAŞOĞLU  
Aydın,2009

## İÇİNDEKİLER

<b>ÖNSÖZ</b> .....	<b>Sayfa III</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>Sayfa IV</b>
<b>TABLO DİZİNİ</b> .....	<b>Sayfa V</b>
<b>ŞEKİL DİZİNİ</b> .....	<b>Sayfa V</b>
<b>KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>Sayfa V</b>
<b>GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	<b>Sayfa 1</b>
<b>GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>Sayfa 1</b>
2.1.    Kronik lenfositik lösemi	
2.1.1.    Patogenez	
2.1.2.    CD 38 ekspresyonu	
2.1.3.    ZAP 70 ekspresyonu	
2.1.4.    CD 5 ekspresyonu	
2.2.    Apopitoz	
2.2.1.    Hücre Dışından Kaynaklanan Sinyaller	
2.2.1.1.    Çevresel yaşam sinyallerinin ve büyüme faktörlerinin yetersizliği	
2.2.1.2.    Ölüm reseptörlerinin aktivasyonu (Reseptör-Ligand etkileşmesi)	
2.2.1.3.    Fas-Fas ligand aracılı apopitoz	
2.2.1.4.    Tumor Necrosis Factor (TNF) aracılıklı apopitoz	
2.2.1.5.    Sitotoksik T lenfosit aracılı apopitoz	
2.2.1.6.    Hücrelerin maruz kaldığı dış etkenler	
2.2.2.    Hücre içinden kaynaklanan sinyaller	
2.2.2.1.    Hücre İçi Proteazların Aktivasyonu	
2.3.    Apopitoz Sisteminin KLL'ye Etkisi	
2.3.1.    Anneksin V	
2.4.    Atorvastatin Ve Rosiglitazon	
<b>GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	<b>Sayfa 13</b>
<b>BULGULAR</b> .....	<b>Sayfa 15</b>
<b>TARTIŞMA</b> .....	<b>Sayfa 17</b>
<b>SONUÇ VE ÖNERİLER</b> .....	<b>Sayfa 21</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>Sayfa 22</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>Sayfa 23</b>

### **TABLO DİZİNİ**

<b>Tablo I.</b> KLL: Klasik ve biyolojik prognostik belirteçler.....	Sayfa-3
<b>Tablo II.</b> Binet evreleme sistemi .....	Sayfa-4
<b>Tablo III.</b> Hastaların Özellikleri.....	Sayfa-15
<b>Tablo IV.</b> Atorvastatin, rosiglitazon, kontrol gurubunda CD 5, CD 38, ZAP 70, Anneksin V, Bcl 2 düzeyleri.....	Sayfa-17

### **ŞEKİL DİZİNİ**

<b>Şekil 1.</b> Hastalarımızdan birinin CD 5-CD 19 pozitifliğini gösteren akım sitometri örneği. .....	Sayfa-2
<b>Şekil 2.</b> KLL'de apopitoz.....	Sayfa-11
<b>Şekil 3.</b> Kolesterol sentezi.....	Sayfa-13
<b>Şekil 4.</b> Atorvastatin öncesi Anneksin V ölçümü.....	Sayfa-16
<b>Şekil 5.</b> Atorvasatin uygulamasının 24. saatinde Anneksin V ölçümü..	Sayfa-16

### **KISALTMALAR DİZİNİ**

Kronik lenfositik lösemi	KLL
Germinal Merkez	GM
Somatik Hipermutasyon	SH
3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A	HMG-CoA
National Cancer Institute	NCI
Zeta associate protein 70	ZAP 70
Tirozin bazlı aktivasyon motifleri	ITAM
T hücre reseptörüne	THR
Natural Killer	NK
Tumor Necrosis Factor	TNF

Nükleer faktör- kB

NFkB

Peroksizom proliferator aktivator reseptör

PPAR

## 1.GİRİŞ VE AMAÇ

Kronik Lenfositik Lösemi (KLL) patogeneğinde bcl-2 yolunu içeren apoptoz önemli bir rol oynamaktadır. Hastalarda Zeta Associate Protein 70 (ZAP 70) ve CD 38 ekspresyonu prognozda önemlidir. Özellikle bu iki parametrenin beraberce eksprese edilmesi prognozun kötü olduğunu işaret eder. Statinlerin (atorvastatin, simvastatin, rosuvastatin, pravastatin gibi) ve tiazolidinedionların (rosiglitazon, pioglitazon, troglitazon, siklitazone gibi) lenfositler üzerine etkisi üzerine çeşitli çalışmalar vardır. Bilinebildiği kadarıyla atorvastatin ve rosiglitazonun KLL’de etkisini inceleyen çalışma yoktur.

Bu tezde Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalında uygun kriterlere göre tanı koyduğumuz KLL hastalarının lenfositlerinde atorvastatin ve rosiglitazonun akım sitometrik yöntemle ZAP 70, CD 38, Anneksin V üzerine ve ELISA yöntemiyle de bcl-2 düzeylerine etkisinin olup olmadığı in vitro incelendi.

## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1. KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMI

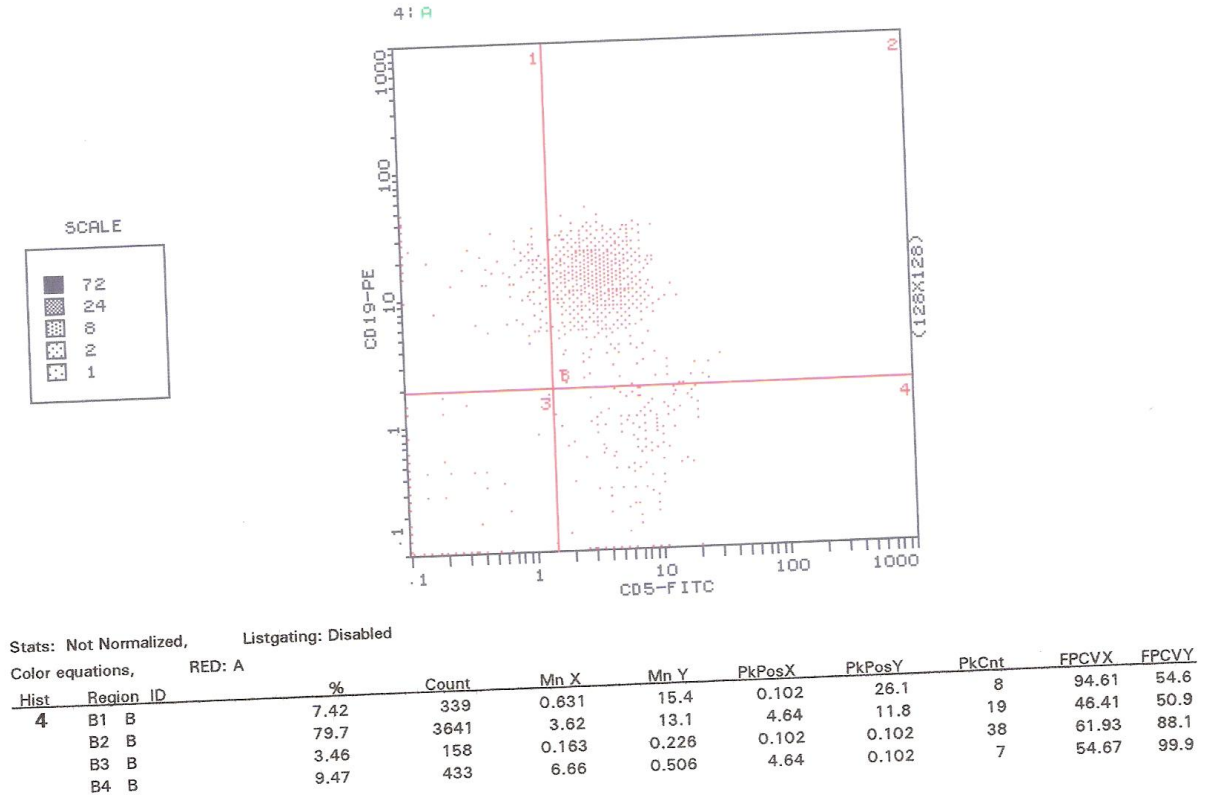
Kronik Lenfositik Lösemi kan, kemik iliği, lenf nodu, dalak ve diğer organlarda ilerleyici lenfosit artışı ile karakterize hematolojik bir neoplazmdir. Bu lenfositler göreceli olarak olgun görünümündedir ve B hücresi özelliklerini taşır (1). B hücreli KLL Kuzey Amerika ve Avrupa’da en sık rastlanan lösemi türüdür. Buna karşılık Çin ve Japonya’da nadirdir. Hastalığın görülme yaşı genellikle 50 yaş üzerindedir. Yaklaşık olarak erkekleri iki kat fazla etkiler. Etiyoloji belirsizdir. Bazı ailelerde daha sık olması genetik yatkınlığı destekler. Kromozom anomalileri de sıktır. Trizomi 12, 14q+, 13q+ ve 11q+ başlıca bozukluklardır. Bcl-1-2-3’nin KLL gelişimindeki olası rollerine ait çalışmalar giderek artmaktadır. B lenfositler malign değişime uğramış ve klonal artış göstermiştir. Lenfositler olgun görünümüne karşın immatür B hücresi aşamasında kalmış ve matürasyonlarını tamamlamamıştır. B lenfositler CD 19, 20 ve HLA-DR pozitifliği yanı sıra zayıf yoğunlukta yüzey Ig M taşır. Membranda Ig D de bulunabilir. Hücre yüzeyinde tek tür hafif zincir bulunuşu monoklonalitenin önemli bir göstergesidir. Gerçekte matür T lenfosit belirteci olan CD 5 antijeni B KLL olgularının hemen tamamında pozitifdir. Kronik

Lenfositik Lösemi’de B lenfosit in vivo olarak antijenik uyarıya yanıt veremez, bunun sonucu olarak hastalarda hipogamaglobulinemi görülebilir. Yapılan araştırmalar CD 5 antijeni taşıyan normal B lenfositlerin, fetal dalak ve erişkin lenf nodu germinal merkezlerinin periferinde bulunduğunu göstermiştir. Ayrıca az sayıda CD 5 pozitif normal B hücresi periferik kan ve tonsillerde de bulunabilir (2,3).

Tanı sırasında hastaların %25’inin yakınması yoktur. Başka bir nedenle yapılan fizik incelemede büyümüş lenf nodları veya splenomegali saptanması tam kan değerlendirmesinde lökositoz, lenfositoz varlığı ilk bulgu olabilir. İnfeksiyonlar (özellikle pnömoni), yorgunluk, kilo kaybı, terleme, nadiren ciltte morarma ve kanama ile tanı konabilir. Fizik muayenede lenfadenopati, splenomegali, hepatomegali, solukluk, sternal duyarlılık ve ekimoz saptanabilir (1,4).

National Cancer Institute Çalışma Gurubuna göre KLL tanısı için periferik kanda monoklonal özellikte olan lenfosit sayısının  $>5000 /\text{mm}^3$ , kemik iliğinde %30 fazla lenfosit infiltrasyonu, CD 5 pozitifliği ile birlikte B hücre belirteçlerinin ekspresyonu (CD19, CD20, CD23 gibi) ile gereklidir (Şekil-1) (5).

**Şekil-1:** CD 5-CD 19 pozitifliğini gösteren akım sitometri örneği





Son yıllarda kemik iliği değerlendirme gerekliliği tartışılmaktadır. Klinik kullanıma tomografik değerlendirme ile evreleme girebilir (1). Tablo-I'de KLL'de prognostik faktörler gösterilmektedir.

**Tablo-I: KLL: Klasik ve biyolojik prognostik belirteçler (6)**

<b><u>Klasik prognostik belirteçler</u></b>	<b><u>Biyolojik prognostik belirteçler</u></b>
-Klinik evre	<i>Yaygın çalışmalar</i>
-Kan lenfosit sayısı	-Serum belirteçleri
-Periferik kandaki lenfosit morfolojisi	Timidin kinaz, beta 2 mikroglobulin, solubl CD23
-Kan lenfosit ikilenme zamanı	-IgVH mutasyon durumu
-Kemik iliği infiltrasyon derecesi (aspirasyon/biyopsi)	-V3-21 gen kullanımı
<b><u>Tedavi ilişkili</u></b>	-FISH
-Tedaviye yanıt ( tedaviden sonra minimal rezidüel hastalık durumu)	Düşük risk: normal, 13q- Yüksük risk: +12, 11q-, 17p-, kompleks karyotip
	<b><i>-CD38 ekspresyonu</i></b>
	<b><i>-ZAP 70 ekspresyonu</i></b>
	<i>Daha yaygın çalışma gerektirenler</i>
	-Kromozomal translokasyonlar
	-CLLU1 ekspresyonu
	-MikroRNA yapısı
	-TCL-1 gen
	<b><i>-Antiapoptotik genler</i></b>
	<b><i>MCL-1 ekspresyonu, Bcl2/bax ekspresyonu</i></b>
	-MDR1/MDR3 genleri
	-Aktivasyonun indüklediği sitidin deaminaz mRNA
	<b><i>-Lipoprotein lipaz A ekspresyonu</i></b>
	-ADAM29 ekspresyonu
	-Vasküler endotelial büyüme faktörü
	-Trombopoietin
	-Telomeraz uzunluğu ve aktivitesi
	-CD49d
	-CD69
	-FCRL

Evrelemede Rai (7) ve Binet (8) sistemi kullanılabilir. Binet evreleme sistemi tablo II’te gösterilmiştir.

**Tablo II: Binet evreleme sistemi**

Evre A	Üçten az bölgede lenf bezi tutulumu*
Evre B	Üç ve daha fazla lenf bezi tutulumu
Evre C	Hemoglobin 10 gr/dl ve/veya 100000 µ/l altında olması

\*: Aksiler, servikal, inguinal bölge, dalak ve karaciğer.

**2.1.1. Patogenez**

Normalde sağlıklı kişilerde sirkulasyondaki B-hücrelerinin %60’ı “saf” germinal merkez (GM) öncesi hücrelerden oluşmaktadır. İmmünglobulin sentez yapma kapasitesi kazanmamıştır. İmmünglobulin sentezi yapabilmesi için ilk önce Vh genlerinin rekombinasyonu gerekmektedir. Saf lenfositlerde Vh rekombinasyonu olmamıştır ve yüzeylerinde IgM ve IgD antikorları vardır ve ayrıca %25’inde CD5 pozitif fakat CD27 negatiftir. Sirkulasyondaki geriye kalan %40 oranındaki B-hücreleri GM sonrası “hafıza” hücreleridir. Germinal merkez sonrası B-hücreleri immünglobulin sentezi yapabilmesi için somatik hipermutasyondan (SH) geçmek zorundadır. Bu SH’dan geçen hücreler CD27 pozitif ve %60’ının yüzeylerinde IgM ve/veya IgD bulunur fakat CD5 yoktur; %40’ında immünglobulin sınıf değişimi olmuştur (9). İmmün sistemde çok çeşit antikor yapımı genelde üç genetik mekanizma ile başlar:

- 1) İmmünglobulin geninin somatik rekombinasyonu: B-hücrelerinin erken gelişme döneminde immünglobulin ağır (Vh) zincirinin V(variable) ve D (diversity) gen bölümleri, J (joining) bölümüyle kendine özgü rekombinasyon yapar ve her lenfosit yeni bir VDJ genetik yapı yaratır. Bu yapılan antikorlar hücre membranında sentezlenmek zorundadırlar. Aksi takdirde bu erken dönemde B-hücrelerinin büyük kısmı apoptozis ile ölürler. Bu bağımlılık B-hücrelerinin B-hafıza hücrelerine dönüşümüne kadar devam eder.
- 2) SH: VDJ seçildikten sonra lenfositler her ne kadar antikor yapıyorlarsa da daha bu mükemmel antikor yapma kapasitesinde değildir. SH özellikle Vh geninin CDR denilen kısmına yakın yerlerde olur. Bu işlemde herhangi bir seçim yapılmadan rastgele nukleotidler sokulur ki bazı hücrelerin yaptığı antikorlar antijene tam uyacak şekilde sentez olabilir. İşte bu yüksek affiniteli hücreler GM’de artık seçilip hafıza hücresi ve plazma

hücresine dönüşür. Seçildikten sonra artık lenfositlerin uzun yaşamları için yüzeylelerinde antikör yapmasına ihtiyaç yoktur. Buna karşılık düşük affiniteli hücreler GM'de apoptozis ile ekarte edilirler.

3) Sınıf değiştirme rekombinasyonu: Bu rekombinasyon en son olarak GM'de SH tamamlandıktan sonra VDJ ve Ch kısımları arasında transpozisyon denilen işlemle yapılarak immünglobulin sınıf değiştirmesine yol açar. Bu üç rekombinasyon işlemleri ikili-DNA zincir hasarları ve yanlışlıklarına yol açabileceğinden B-hücreli lenfoma ve lösemilerin patogeneğinde çok önemli rol oynamaktadır. Ayrıca yukarıda açıklanan immünglobulin yapısının analizi özellikle KLL'li hastaların prognozunun tayininde önemlidir (10,11).

Kronik Lenfositik Lösemi hücrelerinde Vh gen analizi yaparak SH olup olmadığına karar verilip KLL'li hastalar iki guruba ayrılmaktadır. 1) GM öncesi 2) GM odaklı veya sonrası. KLL hastalarının yaklaşık olarak %50'sinde Vh SH olduğu gösterilmiştir. GM'deki lenfositler CD38 yapınca apoptozisten kendilerini korurlar. CD38 genelde GM'deki lenfositlerde sentez olduğu için GM'den geçip SH'a uğrayan lenfositlerin ve buna eş değer olan olgunlaşmış lenfomaların ve lösemilerinde aynı şekilde CD38 yapacağı bazı çalışmalarda düşünülmüştü. Fakat daha sonraki çalışmalarda ZAP 70 olarak bilinen tirozin kinaz proteinin Vh SH'unun olup olmadığını CD38'den daha iyi saptadığı gösterilmiştir. Eğer Vh mutasyonu varsa ZAP 70 negatif fakat Vh mutasyonu yoksa yani germlinedeki yapısını korumuşsa ZAP 70 pozitifdir (12,13).

**2.1.2. CD 38 (adenozin difosfat-ribosilsiklaz, siklik adenozin difosfat-riboz hidrolaz) ekspresyonu:** CD38 tip 2 transmembran protein olarak adlandırılan ektoenzimdir. Molekül ağırlığı 45 kd olup kromozom 4p15 kodlanır. Ekstrasellüler parçası büyüktür ve 2 hiyaluronat bağlı motif içerirken sitoplazmik kısmı üçüncü bölgeyi oluşturur. B hücre öncüllerinde ekspresyon gözlenirken periferdeki B hücrelerinde yoktur. Farklı olarak aktive T hücreleri eksprese edebilirler. Monositler, doğal öldürücü hücreler, eritrositler, trombositler, kalp, iskelet kasında, böbrek, tiroid, prostat dokusunda gözlenebilir. Nikotin adenin dinukleotid biyolojik reaksiyonlarına katkı sağlar (1). B hücrelerinin proliferatif yanıtına katkı sağladığı gösterilmiştir.

IgVH mutasyonu ile korele olduğu bulunan ilk belirteçtir. Ancak birlikte eksprese edildiğine dair yayınlar tartışmalıdır. Şimdi artık IgVH mutasyonu ile CD38 ekspresyonun bağımsız prognostik belirteçler olduğu düşünülmektedir. Diğer taraftan CD38 pozitifliği

için eşik konusu da tartışmalıdır. Literatürde yüzde 5, 7, 20, 30 değerler bildirilmektedir. Eşik için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu vurgusu yapılmaktadır (14-18).

**2.1.3. ZAP 70 ekspresyonu:** Zeta ilişkili protein 70 kd (ZAP 70) ağırlığındadır. ZAP 70 geni kromozom 2q11.2 dedir. Normalde natural killer (NK) ve T lenfositlerde yüksek oranda eksprese edilirken, B lenfositlerde düşüktür, ya da çok düşük ekspresyon gösterir. CD3 ve zeta zinciri gibi bazı zar geçişli sinyal proteinleri T hücre reseptörüne (THR) eşlik eder. CD3 ve zeta sinyal iletimde önemli rol oynayan immunreseptör tirozin bazlı aktivasyon motifleri (ITAM) olarak adlandırılan tirozinden zengin motifler içerir. Bir kere aktive olduğunda zeta ve CD3 proteinlerinin ITAM'lerinde bulunan tirozin artıklarını fosforile eder. Z zincirinin fosforile ITAM'ları, enzimatik olarak aktive olan ZAP 70 olarak adlandırılan tirozin kinaz için "yanaşma bölgeleri" oluşturur. ZAP 70 sonra THR kompleksi yanında toplanır ve ek sinyal iletim olaylarında aracılık eden çeşitli adaptör proteinleri ve IgVH mutasyonu olgularda ZAP 70 negatif iken mutasyonsuz olgularda pozitifdir. Kronik Lenfositik Lösemi olgularının %10-20'si mutasyon gösteren ZAP 70 pozitif ve mutasyon göstermeyen ZAP negatif hastalardan oluşabilir. CD38 pozitifliği, IgVH gen mutasyonu gibi ZAP 70 pozitifliği ile %75 korelasyon gösterir. ZAP 70'in akım sitometrik olarak değerlendirmesinde 3 farklı yaklaşım kullanılır. Permeabilizasyonda kullanılan maddelere göre değişir. Bunlar ticari kitler, saponin, formaldehit ve alkol oluşuna göredir. Akım sitometri, immunhistokimya, RT-PCR ile ölçülebilmektedir (18-21). ZAP 70 ve CD 38 prognozda birbirini tamamlayıcı rol oynar (15).

**2.1.4. CD 5 ekspresyonu:** Molekül ağırlığı 67 kd olup kromozom 11q13 tarafından kodlanır. T hücreleri, timositler, doğal öldürücü hücrelerde bulunur. B KLL'de ekspresyonu artar. Hücreiçi tirozin fosforilasyonunu stimule eder T hücre aktivasyonunu sağlar. İnhibitör etkilere aracılık edebilir (1,22).

## **2.2. APOPİTOZ**

Yaşamakta olan hücreler iki farklı mekanizma ile ölürler. Bu mekanizmalar nekroz ve apopitozdur. Nekroz, hipoksi, aşırı ısı değişiklikleri, toksinler gibi hücre dışından gelen çeşitli fiziksel ve kimyasal etkenler sonucunda gelişen travmatik hücre ölümüdür. Apopitoz ise yaşlanmış, fonksiyonunu yitirmiş, fazla üretilmiş, düzensiz gelişmiş veya genetik olarak hasarlı hücrelerin, organizma için güvenli bir şekilde yok edilmelerini sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür. Nekroz patolojik bir olaydır. Apopitoz ise fizyolojik veya patolojik uyarılarla oluşabilir. Yunancada 'apo'

=ayrı, 'ptosis' =düşen anlamındadır (23). Apopitoz rejenerasyon ve tamir olaylarında, hücrel homeostazın sağlanmasında ve organ büyüklüklerinin korunmasında önemlidir. Apopitozun artması nörodejeneratif hastalıklara, AIDS'de görülen lenfosit yetersizliğine, azalması ise malignite ve otoimmun hastalıklara yol açabilir (24). Hücrenin apopitoza gidebilmesi için ilk önce, ilgili genetik mekanizmayı harekete geçirecek bir sinyalle karşılaşması gerekir. Bu sinyal hücre içinden veya dışından gelebilir.

### **2.2.1. Hücre Dışından Kaynaklanan Sinyaller**

#### **2.2.1.1. Çevresel yaşam sinyallerinin ve büyüme faktörlerinin yetersizliği:**

Hücreler çevre hücrelerden ve ekstrasellüler matriksden gelen yaşam sinyallerine, büyüme faktörlerine ihtiyaç duyarlar. Bu sinyaller düzenli bir şekilde ve yeterli miktarda olmazsa hücreler apopitoza giderler. Çevreden gelen sinyallerin kesilmesi ile hücre ölümünün nasıl başladığı tam olarak bilinmemektedir. Büyüme faktörüne bağımlı hücrelerin kültürlerinde, büyüme faktörleri çekildiği zaman, hücrelerin metabolizmalarında ani bozulmalar ve hücre siklusunda duraklama olduğu izlenmiştir (23).

#### **2.2.1.2. Ölüm reseptörlerinin aktivasyonu (Reseptör-Ligand etkileşmesi):**

Bazı sitokinler hücre membranında bulunan reseptörlere bağlanarak ölüm programını harekete geçiren sinyaller üretebilirler. Apopitozda rol alan membran reseptörleri içinde en önemli gurup "tumor necrosis factor receptor (TNFR)" ailesidir. Bu reseptör gurubunun 19 üyesi vardır. Bu reseptörlerin biyolojik etkileri çeşitlidir ve apopitoz ile sınırlı değildir. Bir kısmı apopitoz oluştururken bir kısmı da proliferasyona neden olur. Bir kısmı ise her ikisini de oluşturur. TNRF içinde apopitoz oluşturan reseptörlerden en önemlileri Fas ve TNRF1'dir. Bu reseptörler uyarıldıklarında hücrenin sitoplâzmasında bulunan parçaları, "adaptör proteinlere" bağlanır. Adaptör proteinlerin ölüm efektör parçaları vardır. Bunlar da apopitoz için başlatıcı olan kaspazlara bağlanırlar (25).

#### **2.2.1.3.Fas-Fas ligand aracılı apopitoz:**

Bu tip apopitoz hücre yüzey reseptörü Fas (CD95, APO-1) aracılığı ile oluşur. Fas ligandın Fas reseptörüne bağlanması ile Fas reseptörünün hücre içinde bulunan parçası, Fas adaptör proteinle (FADD-Fas adapter protein with a death domain) birleşerek ölüm başlatan sinyal kompleksini (death inducing signal complex-DISC) oluşturur. Bu da prokaspaz 8'in aktifleşmesini sağlar. Fas ligand membrana bağlı veya solubl olabilir. Solubl fas ligand (FasL, CD95L) immun sistem hücreleri tarafından oluşturulur. Bu ligandın T hücreleri membranında bulunan Fas

reseptörüne bağlanmasıyla, immün reaksiyonla aktive olmuş ve görevlerini tamamlamış olan lenfositlerin apopitoz ile yok edilmeleri sağlanır (26).

**2.2.1.4.Tumor Nekroz Faktör (TNF) aracılıklı apopitoz:** Bir sitokin olan TNF'nin TNFR1 gibi TNF reseptörleri ile birleşmesi sonucunda reseptörün hücre içinde bulunan parçası, TNFR adaptör protein (TRADD- TNFR adapter protein with a death domain) ile etkileşir. TRADD daha sonra FADD ile birleşerek prokaspaz 8'i aktifleştirerek apopitoza neden olur. Fas reseptörünün aksine TNFR1'in TRADD'la etkileşmesi her zaman apopitoz ile sonuçlanmaz. TRADD FADD yerine başka adaptör proteinlere bağlanabilir. Bunun sonucunda önemli bir transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör- kB (NFkB) harekete geçebilir. Bu durumda hücre canlı kalır. Hücrede hangi yolun, nasıl seçildiği açık değildir. Ancak hücrede aktif NFkB (bazı tümörlerde bulunur) bulunduğu zaman, hücrenin canlı kaldığı düşünülmektedir (25,26).

**2.2.1.5. Sitotoksik T lenfosit aracılı apopitoz:** Sitotoksik T lenfositler (CTL) infekte olmuş olan konakçı hücrelerin yüzeyinde bulunan yabancı antijenleri tanırlar. CTL'lerin ana görevi malign ve/veya virus ile infekte olmuş olan hücrelerin öldürülmesidir. Yabancı antijenleri tanıdıklarında yüzeylerinde Fas ligand oluşur. Hedef hücrelerin Fas reseptörlerine tutunurlar. CTL'ler sitoplazmalarında granzim B (serin proteaz) ve perforin adı verilen ve apopitoz oluşmasını sağlayan proteinler içeren sitoplazmik granüllere sahiptirler (24). Perforin transmembranal por oluşturucu bir proteindir. CTL'ler hedef hücrelerin membranlarında perforin ile porlar oluşturarak, sitoplazmalarına granzim B salgırlar. Granzim B hedef hücrelere girerek kaspazları aktive eder (26).

**2.2.1.6.Hücrelerin maruz kaldığı dış etkenler:** Hipoksi, ısı, antikanser ilaçlar, radyasyon, gamma ve ultraviyole ışınlar gibi etkenler apopitoza neden olabilirler. Bu etkenler DNA hasarı oluşturarak apopitoz meydana getirirler.

**2.2.2.Hücre içinden kaynaklanan sinyaller:** DNA hasarı, hücre içi Ca<sup>++</sup> seviyesinde artış, hücre içi pH'da düşme, metabolik ve/veya hücre siklus bozuklukları hücreyi apopitoza götüren merkezi hücre ölüm sinyallerini başlatabilmektedir.

**2.2.2.1.Hücre İçi Proteazların Aktivasyonu:** İç ve dış sinyallerle hücre içinde bulunan bir grup proteaz aktive olur. Bu proteazlara **kaspaz** ("caspase"= cysteine – containing aspartate specific proteases) adı verilmektedir. İnsan hücrelerinde 10'dan fazla kaspaz tespit edilmiştir. Sağlıklı hücrelerde kaspazlar, enzimatik olarak inaktif ve aktif

forma göre daha uzun bir polipeptid zincir olarak bulunurlar. Buna zimogen form denir. Kaspazlar başlatıcı ve sonlandırıcı kaspazlar olarak ikiye ayrılırlar. Ölüm reseptörleri adaptör proteinler aracılığı ile iç sinyaller ise mitokondri aracılığı ile başlatıcı kaspazları aktive ederler. Aktive olan başlatıcı kaspazlar da zincirleme olarak diğer kaspazları aktive ederler.

Hücrede iç veya dış nedenlerle DNA hasarı oluştuğunda aktive olan bazı genler, hücrenin apoptozuna neden olabilir. Bu genlerden en önemlisi p53 genidir. İnsan tümörlerinin %50'den fazlasında mutasyona uğradığı tespit edilen p53 geninin kanser oluşumunu önlemede kritik rol oynadığı kabul edilmektedir. Normalde inaktif durumda bulunan p53 geni DNA hasarı oluştuğunda aktifleşerek p21 genini harekete geçirir. p21 geni hücrenin geç G1 fazında kalarak, S fazına geçmesini engeller. Böylece hücre siklusu durdurularak oluşmuş olan DNA hasarlı hücrenin çoğalması engellenir. p53 geni DNA tamiri yapan proteinlerin transkripsiyonunu sağlar. Bu proteinler DNA hasarını tamir edebilirse, hücre siklusundaki blok kalkar. Hücre hasarının tamiri başarılı olmazsa p53 geni *bax* proteinini (bcl-2 gurubu proteinlerden, proapoptotik) aktive ederek mitokondri aracılığı ile hücrenin apoptozu giderek ölmesini sağlar. Böylece DNA hasarlı hücre ortadan kaldırılmış olur (23,24).

### **2.3. APOPTOZ SİSTEMİNİN KLL'YE ETKİSİ**

Kronik Lenfositik Lösemi olgun B-lenfositlerin malign dönüşümünden oluşan bir kanserdir. Diğer B-lenfositlerin malign hücrelerinin aksine KLL hücrelerinin büyük bir çoğunluğu proliferasyon kapasiteleri olmadığından G0/G1 hücre dönüşüm fazında tutuklu kalırlar (19). Buradan anlaşılacağı gibi KLL B-hücrelerinin fazla çoğalmasından değil apoptozun az olmasından kaynaklanmaktadır. Genelde apoptozisi yaratan mekanizma aynen koagülasyonda olduğu gibi zincirleme proteinleri aktive eden bir sistemdir (9). Bu proteinler arasında en önemli moleküller kaspaz sistemi, mitokondrideki proteinler (*bax*, *bcl-2*, *bclXL*, *mcl-1*) ve mitokondri sonrası apoptozu engelleyen proteinlerdir (*IAP-1*, *IAP2* gibi). Bu sistemler arasında KLL ile ilgili bilgilerimiz çoğunlukla mitokondrideki proteinlerde odaklanmıştır.

Mitokondriye ölüm sinyali geldiğinde genelde iç duvarındaki sitokrom molekülünü sitoplazmaya aktarması gerekmektedir. Genelde *bax* homodimer yaparak sitokromun sitoplazmaya geçişine mitokondrial membran potansiyalinden olan farktan dolayı apoptozu başarır. Antiapoptotik moleküller (*bcl-2*, *bclXL*, *mcl-1*) ise tam aksine

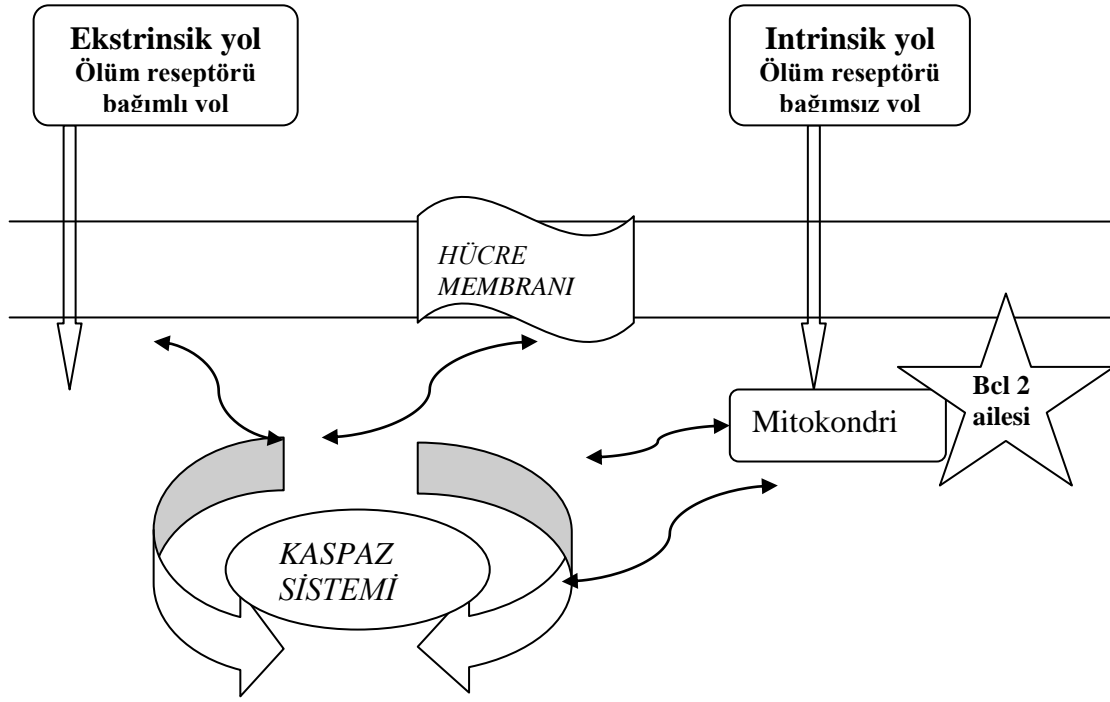
sitokromun mitokondria içinde durmasına neden olur ve apoptozisi engeller. Değişik çalışmalar KLL hücrelerinde bcl-2, bclXL, ve mcl-1 proteinlerinin fazla olduğunu ve KLL hücrelerinin bu yüzden apoptoz olmadıklarını savunmuştur. Bazı yayınlar bcl-2 proteinin fazla sentezini hipometilasyona bağlıyorsa da bcl-2 sitokinlere veya hormonların direk etkisi ile de fazla sentez olabilir. Nasıl bir mekanizmayla aktive olduğu bilinmese de bazı klinik çalışmalarda bcl-2'nin yapımını bloke ederek kemoterapinin daha başarılı olacağı düşünülmüştür. Ayrıca yeni yapılan bir çalışmaya göre bazı KLL hastalarının mcl-1 promotorundaki mutasyonunun kemoterapiye dirençli bir hastalığa dönüştürdüğünü göstermiştir (10-13). Kronik Lenfositik Lösemi'de apoptoz Şekil 2'de gösterilmiştir.

**2.3.1. Anneksin V:** Akım sitometri ile immunfenotipleme uygulamalarında özgün olmayan antikor bağlanmalarından kaçınabilmek için canlı hücrelerle çalışılması gerekir. Bu amaçla 7AAD, Propidyum Iyodür (PI) gibi floresan veren boyalar kullanılarak hiç bir ön işlem yapılmadığı halde membranı geçirgen hale gelmiş olan hücrelerin DNA'sının boyanması sağlanarak canlı/ölü hücre ayırımı yapılabilir. Canlı hücreler floresan vermezken ölü hücrelerin kullanılan florokromun özelliklerine göre farklı sinyal verdikleri gözlenir.

Hücre ölümüne eşlik eden moleküller arasında en çok çalışılanlar: bcl-2 ailesinin elemanları, kaspazlar, protoonkojenler (ör:c-myc, ras), tümör suprese edici genlerdir (ör: p53, pRB). Apoptozun belirlenmesi için kullanılan çok sayıda yöntem vardır. Akım sitometresinde ışığın dar (FSC) ve dik açı ile kırılma (SSC) özelliklerinden yararlanılarak sırasıyla hücrenin boyutları ve granüler yapısındaki değişiklikler kaydedilir. Apoptozun erken dönemlerinde hücredeki büzüşmeye bağlı olarak FSC de bir azalma meydana gelir, SSC'de başlangıçta genellikle bir farklılık gözlenmese de bazı hücrelerde SSC'nin kromatindeki ve sitoplazmadaki yoğunlaşmayı yansıtacak şekilde arttığı gözlenir. Olay ilerleyip hücre büzüşünce ise SSC'nin de azaldığı gözlenir. Nekroz olayında ise hücrede büzüşme değil şişme olduğundan FSC başlangıçta bir artış gösterir; plazma membranının yırtılıp sitozolün boşalmasını takiben FSC ve SSC de belirgin bir azalma göze çarpar. Plazma membranındaki fosfolipidlerin dağılımı incelenebilir Plazma membranındaki fosfolipidler iç ve dış yapraklar arasında asimetric bir dağılım gösterirler, apoptoz sırasında bu asimetri bozularak fosfatidilserin, hücre membranının dış yaprağına geçer. Antikoagulan bir protein olan Anneksin V'in yüksek affinite ile fosfatidilserine bağlanmasından yararlanarak florokromla işaretli anti-Anneksin aracılığı ile apoptotik



hücreler saptanabilir. Plazma membranındaki aktif transportun kaybı değerlendirilebilir, ya da mitokondrial membran potansiyelindeki değişimler ölçülebilir (22).



Şekil 2: KLL’de apopitoz

#### 2.4. ATORVASTATİN VE ROSİGLİTAZON

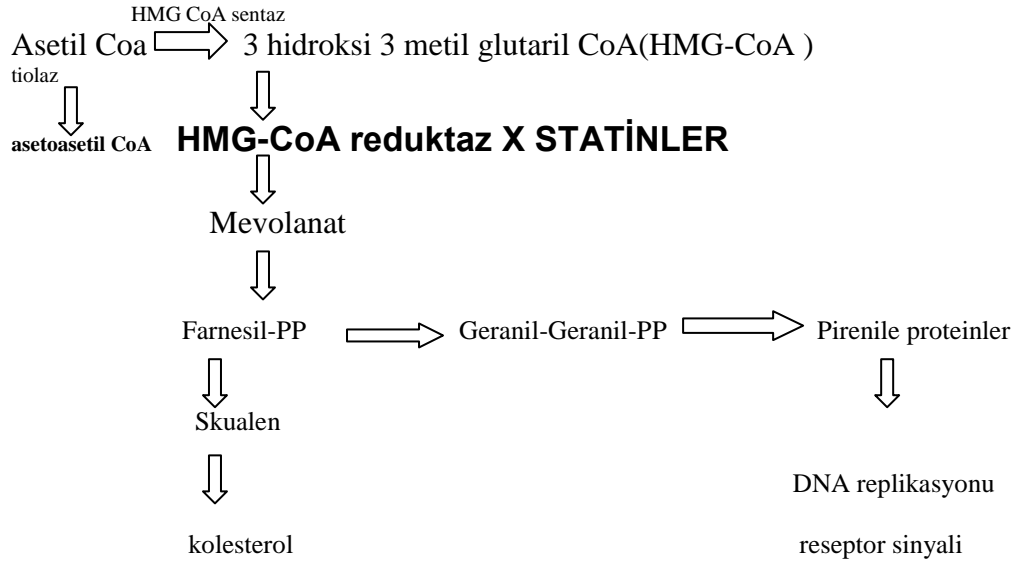
Atorvastatin, simvastatin, rosuvastatin, pravastatin gibi statinler 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A (HMG-CoA) redüktaz inhibitörleri yüksek kan kolesterol seviyesi bulunan hastalarda ve kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde kullanılan etkili ajandır. Oral olarak alınan statinler etkisini HMG-CoA redüktaz enzimini kompetitif olarak inhibe ederek gösterirler. Bu enzim HMG-CoA'nın L-mevalonat'a dönüşmesini katabolize eder ve bu inhibisyonla statinler L-mevalonat'ın oluşturacağı kolesterolü önlenmiş olur (Şekil-3). Statinlerin kolesterol düşürücü etkilerinin yanı sıra endotel fonksiyonunu düzenlemede, plak stabilizasyonunda, hücrel immünite ve inflamasyon, lipoprotein oksidasyonunda, reoloji ve koagülasyon üzerine de etkili olduğu gösterilmiştir (27,28). Kobashigawa ve ark. (29)'nın yaptığı çalışmada kardiyak transplantlı hastalarda pravastatin kullanan grupta statinlerin lipid düşürücü etkisinden bağımsız olarak rejeksiyon reaksiyonunu azalttığı gösterilmiştir. Çalışma böbrek transplantlı hastalarda da devam ettirildiğinde de aynı sonuçlar alınınca pravastatinin anti-inflamatuar etki mekanizmasının, siklosporin ile moleküler benzerliği nedeni ile doğal öldürücü (natural

killer /NK) hücrelerinde sitotoksik etkisi olabileceği üzerinde duruldu. Bu çalışmalardan çok önce mevalonik asitin NK hücreleri için gerekli olduğu Cutts ve ark. (30) tarafından 1989 gösterilmiş olmasına rağmen statinlerin inflamasyondaki etkisi üzerinde ise 2000'li yıllara kadar durulmamıştır.

Statinlerin inflamasyondaki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. İki tür etki mekanizması üzerinde durulmaktadır. Bunlar HMG-CoA redüktaz bağımlı etki ve immün reseptörler üzerine direkt etkidir (31). L-mevalonat katabolizmasının engellenmesi ile statinler, farnesilpirofosfat (FPP) ve geranilgeranilpirofosfat (GGPP) yolu ile oluşan ara ürünleri de engellemiş olur. FPP ve GGPP ile frenilasyon, hücre içi organizasyon ve hücre membranı yapımı için önemlidir. Ayrıca küçük rasa benzer rab, rac, rap, ve rho gibi piranile proteinlerin modifikasyonu da FPP ve GGPP'ye bağlıdır (Şekil-3). Ras'a benzer proteinler GTP'ye bağlanıp hücre çoğalması, farklılaşması ve migrasyonu üzerinde önemli etkiye sahiptir. Son yıllarda özellikle in vitro koşullarda statinlerin miyeloma, lösemi hücre dizileri üzerine benzer mekanizmalarla etkisi olduğuna ilişkin yayınlar vardır. Statinler solid tümör büyümesi ve progresyonunu da önleyebilmektedirler. Atorvastatin sentetik HMG-KoA redüktaz enzim inhibitörüdür. HMGKoA'nın mevolanata dönüşümünü inhibe eder. Yan etkileri kabul edilebilir düzeyde ve doz ilişkilidir. Miyopati, transaminazlarda ılımlı yükselmeler görülebilir (32-36).

Peroksizom proliferator aktivatör reseptör (PPAR) nükleer hormon süper ailesindedir. Farklı dokularda dağılan ve ligandları olan alfa, beta ve gamma olmak üzere 3 alt tipi vardır. Özellikle PPAR gamma'nın diyabet, ateroskleroz, inflamasyon ve kanserde önemli rolü vardır. Tiazolidinedionlar sentetik PPAR gamma ligandı olarak etki gösterirler (37). Pleiotropik etkileri yanı sıra adipogenez, glikoz metabolizması, inflamasyon ve immünite üzerine etkileri vardır. Makrofaj ve monositlerden proinflamatuvar sitokin salınımını azaltırlar ve özellikle T lenfositlerin induklediği apoptozise yol açarlar. Hücre siklusunda durdurma, differansiasyon ve apoptoz aktivasyonu ile bazı malign tümör hücre dizilerinde antiproliferatif etkileri gösterilmiştir (38,39). Rosiglitazonu da içeren tiazolidinedionlar PPAR gamma agonist etki gösterirler (40,41). İnsan PPAR  $\gamma$  ilk kemik iliğinden klonlanmıştır. Kemik iliği öncülleri, T ve B lenfosit, monosit ve makrofajların ekspresine ettiği gösterilmiştir. Son zamanlarda monosit ve makrofajların inflamatuvar reaksiyonlarını PPAR  $\gamma$ 'nın inhibe ettiği gösterilmiştir. PPAR  $\gamma$ 'nın lenfositlerin anti-inflamatuvar rollerinde etkisi vardır. Bununla birlikte T ve B lenfositler, lenfoma hücre

dizilerinde lenfosit ölümüne katkıda bulunmaktadır (42). Proapoptotik etkilerinin olup olmadığı belirsizdir (43). Hem murin lenfositik hücre dizilerinde hem de insan lenfoma hücre dizilerinde yüksek oranda PPAR  $\gamma$  ekspresyonu olduğu ve hücre yaşamını arttırdığı bulunmuştur (44). Son çalışmalarda insan ve fare B lenfositleri üzerinde PPAR  $\gamma$  ve buna bağlı bu hücrelerde apoptoz olabildiği gösterilmiştir. Gene miyeloma hücre dizilerinde tiazolidinedionların in vitro apoptozu uyardığı ve tedavi için ileri çalışmalarla kullanılabileceği vurgulanmıştır (45,46). Ayrıca son zamanlarda Liverias ve ark. (47,48) rosiglitazon ve atorvastatinin birlikte değerlendirildiği çalışmalarında özellikle kolesterolün hücre içinde azaltılmasında etkilerinin olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmalarda rosiglitazon, atorvastatinin köpük hücresi oluşumunu azaltma etkisini potansiyalize etmiştir. Ancak bu çalışmada apoptoz değerlendirilmemiştir.



**Şekil-3-Statınlerin etki mekanizmaları**

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

National Cancer Institute çalışma gurubuna (5) göre tanı konan 7 KLL hastası çalışmaya alındı. Çalışmaya bilinen hiperkolesterolemisi, diyabetes mellitusu ve bunlarla ilgili ilaç kullanımı olan hastalar çalışmaya alınmadı. Hastaların periferik yol ile alınan kanlarından fikol separasyon (Histopaque 1077, lot:105K6168)) yöntemle mononükleer hücreleri ayrıldı. 24 kuyucuklu kültür plağında (1000000 hücre/ml) 2 ml RPMI 1640 (lot: 125K83551) ile süspanse edildi. RPMI'ya %20 human albumin, 2mM L- glutamin, 100U/L penisilin, 100 mikrogram/ml streptomisin ilave edildi. %5 CO<sub>2</sub>'li 37 °C etüvde 24 saat enkübe edildi. Bu hücrelerde akım sitometrisi ile CD5 (FITC, Lot:10, Beckman

Coulter), CD 38 (FITC lot:30, Immunotech), ZAP 70 (PE, klon:1E7.2 lot:08010607, Caltag), Anneksin V (FITC, propidium iodine kit, Lot: F107005, Beckman Coulter), ELİSA ile bcl 2 değerlendirmesi yapıldı. KLL lenfositlerinin in vitro ölümü bilindiğinden (52,53) 1 ng/ml IL-4 (lot numarası: R031801) ilave edildi (49,50).

Çalışma 3 grupta yapıldı. 1. guruba 5 mikromolar oranında süspanse edilmiş atorvastatin kalsiyum (C<sub>33</sub>H<sub>34</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)<sub>2</sub>Ca<sub>3</sub>H<sub>2</sub>O) (lot: 20150, Sanovel), 2. guruba 2 mikromolar rosiglitazon maleat (C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>SC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>4</sub>) (lot:051342, biofarma) ve 3. grup kontrol gurubu olarak alındı. 24 saat sonra akım sitometrisi ile CD 5, CD 38, ZAP 70, Anneksin V çalışıldı. Akım sitometrisi değerlendirmeleri EPICS XL-MCL cihazı, Bcl-2 düzeyleri ticari ELİSA (Biosource, Katalog No: KHO 0311, Camarillo, California, USA) ile ölçüldü.

#### **Akım sitometrisi çalışması:**

**CD5-CD38 çalışma yöntemi:** Örneklendirme kabına 100 µl örnek koyulur, üstüne 10 µl CD 5 FITC (CD38 FITC) eklenir. Onbeř dakika karanlık alanda bekletilir. Multi-Q prep cihazında geğirilir. Cihazda okutulur.

**Anneksin V çalışma yöntemi:** Örneklendirme kabına 100 µl örnek ve 2 cc PBS (Phosphate buffering saline) koyulur, 500 rpm de 5 dakika santrifüj edilir, süpernatant atılır. Hazır binding Buffer şişesinde (10x) 100 µl alınır, 1/10 oranında sulandırdıktan sonra örneklendirme kabına eklenip karıştırılır. Anneksin 1 µl ilave edilir. Üzerine 5 µl propidium Iodide eklenir. Karanlık alanda 15 dk bekletilir. Sonrasında örneklendirme kabına 400 µl hazır binding Buffer şişesinden (10x) ilave edilerek karıştırılır. Cihazda okutulur.

**ZAP 70 çalışma yöntemi:** Örneklendirme kabına 100 µl örnek ve 10 µl CD 5 FITC koyulur. Karışım 15 dakika karanlık alanda bekletilir. Süre sonunda içine 100 µl reagent-1 (Intraprep fixation reagent) ilave edilerek tekrar 15 karanlık alana konur. Süre sonunda kabın içine 2 cc PBS eklenerek 5 dk 2500 rpm'de santrifüj edilir. Süpernatant atılarak 2 cc PBS eklenir ve 5 dk 2500 rpm'de tekrar santrifüj edilir. Süpernatant tekrar atılarak üzerine 100 µl reagent-2 (Intraprep permeabilization reagent) ve 5 µl ZAP 70 eklenerek 30 dakika karanlık alana bırakılır. Süre sonunda üzerine 2cc PBS eklenerek 5 dk 2500 rpm'de santrifüj edilir. Süpernatant atılarak aynı işlem birkez daha tekrar edilir. Süpernatant atılır, üzerine 1cc izoton (sheath) eklenerek cihazda okutulur. Akım sitometrik sonuçlar iki kişi tarafından çift kör olarak değerlendirildi ve ortalaması alındı.

### İstatistiksel değerlendirme:

Tüm sayısal veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verildi. Kayıtlar ve sonuçların karşılaştırılması için SPSS 13.0 for Windows programında two-paired student-t testi kullanıldı ve  $p < 0.05$  değerleri anlamlı kabul edildi.

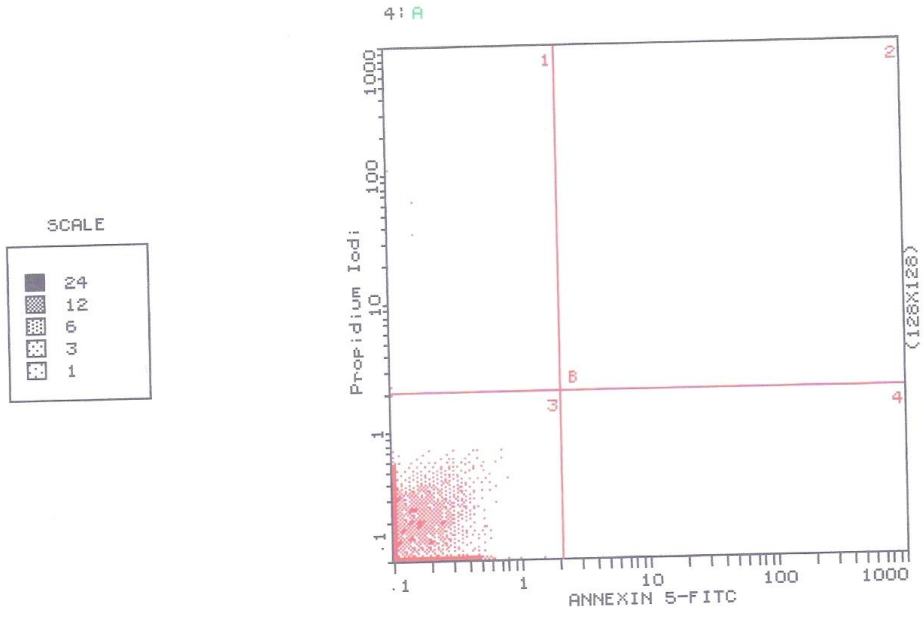
Bu çalışma için Adnan Menderes Üniversitesi Etik Kurul onayı alındı (2006/00106).

## 4. BULGULAR

Hastaların yaş ortalaması  $56 \pm 8$  (4'ü erkek) idi. Dört hasta evre Binet A, 2'si Binet C, diğeri de Binet B'de idi. Hemoglobin ortalamaları  $12 \pm 1.8$  gr/dl, hematokriti düzeyleri  $\%35 \pm 6$ , trombosit sayıları  $156.000 \pm 68.000/\text{mm}^3$ , lökosit sayısı  $50.500 \pm 38.700/\text{mm}^3$ , lenfosit sayıları  $45700 \pm 38100/\text{mm}^3$  idi (Tablo III). Atorvastatin ve rosiglitazon CD38, Bcl-2 düzeylerini etkilememekte iken, Anneksin V düzeylerini kontrol gurubuna göre belirgin arttırmaktaydı ( $p < 0.001$ ) (Şekil 3-4). CD5 ekspresyonu ise kontrol gurubuna göre belirgin azalmaktaydı ( $p = 0.03$ ). ZAP 70 ekspresyonu ise her iki ilaçla da azalmaktaydı (Her iki ilaç için de  $p < 0.05$ ) (Tablo. IV).

**Tablo III: Hastaların Özellikleri**

Özellikler	n=7
Yaş (yıl)	$56 \pm 8$
Cins (E/K)	4/3
Evre	
Binet A	4
Binet B	1
Binet C	2
Hemoglobin düzeyi (gr/dl)	$12 \pm 1.8$
Trombosit sayısı $\times 10^3$ (/mm <sup>3</sup> )	$156 \pm 68$
Lökosit sayısı $\times 10^3$ (/mm <sup>3</sup> )	$50 \pm 38.7$
Lenfosit sayısı $\times 10^3$ (/mm <sup>3</sup> )	$45.7 \pm 38.1$

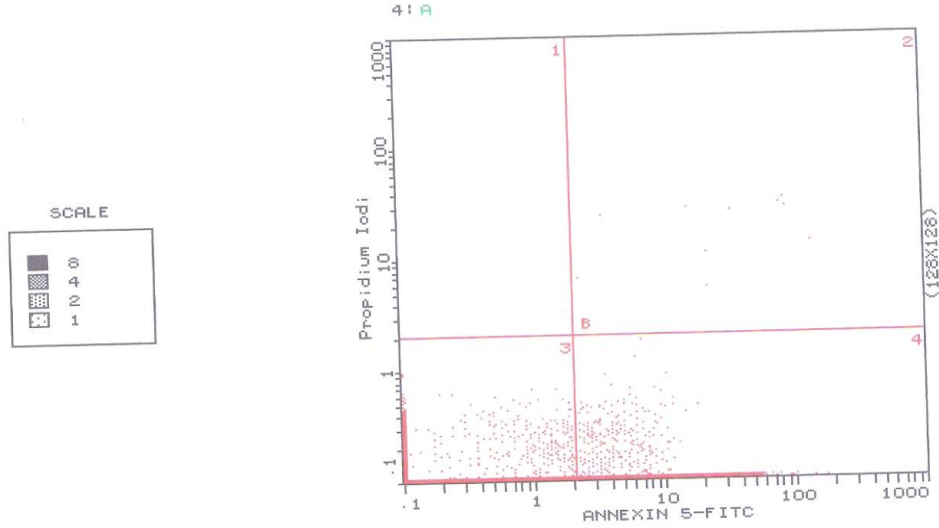


Stats: Not Normalized, Listgating: Disabled

Color equations, RED: A

Hist	Region ID	%	Count	Mn X	Mn Y	PkPosX	PkPosY	PkCnt	FPCVX	FPCVY
4	B1 B	0.02	9	0.131	15.4	0.102	2.26	1	31.79	144.4
	B2 B	0.00	0	****	****	****	****	**	**	**
	B3 B	100	49081	0.119	0.126	0.102	0.102	27213	32.60	39.9
	B4 B	0.00	1	12.7	0.226	12.7	0.226	1	0.00	0.0

Şekil 4: Atorvastatin öncesi Anneksin V ölçümü.



Stats: Not Normalized, Listgating: Disabled

Color equations, RED: A

Hist	Region ID	%	Count	Mn X	Mn Y	PkPosX	PkPosY	PkCnt	FPCVX	FPCVY
4	B1 B	0.00	0	****	****	****	****	**	**	**
	B2 B	0.08	30	31.2	17.9	88.7	32.4	2	141.58	76.4
	B3 B	55.5	19840	0.177	0.107	0.102	0.102	13904	102.06	20.3
	B4 B	44.4	15889	6.98	0.105	7.68	0.102	579	71.57	17.7

Şekil 5: Atorvastatin uygulamasının 24. saatinde Anneksin V ölçümü

**Tablo IV: Atorvastatin, rosiglitazon, kontrol gurubunda CD 5, CD 38, ZAP 70, Anneksin V, Bcl 2 düzeyleri**

	Atorvastatin gurubu	p	Rosiglitazon gurubu	p	Kontrol gurubu	p	İşlem öncesi
CD5 (%)	57.5±16	<b>0.03</b>	56±17	<b>0.01</b>	67±14	<b>0.019</b>	<b>70.5±13</b>
CD 38 (%)	11±10	0.59	12±11	0.26	16 ±14	0.225	<b>17±15</b>
ZAP 70 (%)	1.5±2.3	<b>0.04</b>	1.4 ±2.2	<b>0.044</b>	2.7 ±3.2	0.59	<b>2.8±3.4</b>
Anneksin V (%)	35 ±16	<b>0.001</b>	32 ± 8.5	<b>&lt;0.001</b>	12.5± 2.5	<b>&lt;0.001</b>	<b>2.17 ±2.9</b>
Bcl-2 (U/ml)	0.43± 0.11	0.268	0.42±0.061	0.31	0.6 ±0.26	0.8	<b>0.58± 0.37</b>

## 5.TARTIŞMA

Kronik lenfositik lösemi’de apoptoz bcl-2 ve anneksin V ölçümü ile değerlendirilebilir (10,11,22).

Anneksin V KLL’de in vitro apoptozu belirlemede iyi bir gösterge olabilir (51). KLL’de Anneksin V ile in vitro apoptozun ölçülmesi ilaç duyarlılığı belirleyebilir (52). Biz de çalışmamızda apoptozu bcl-2 ve anneksin V ile belirlenmeye çalıştık.

Birçok dokuda olduğu gibi HMG CoA redüktaz lenfositlerde de eksprese edilmektedir. HMG CoA aktivitesi ilk olarak lenfositler üstünde ölçülmüştür (53,54). Statinler protein prenilasyonun inhibisyonu ile Ras gibi proteinlerin inaktivasyonuna yol açarlar. Bu proteinler lenfosit aktivasyonuna yol açan signal transduserleridir. Ras proteinleri farnesile iken, rho, Rac, rab proteinleri geranil geranile ya da prenilidir (55). Statinler esas olarak protein isoprenilasyonun inhibisyonuyla lenfosit fonksiyonunu suprese ederler. Bu durum statinlerin otoimmün hastalıklar ve allogreft rejeksiyonundaki olumlu etkileri açıklar (56, 57).

Statinler antijen sunan hücrelerde aktivasyonun azaltırlar. Bunu antijen sunumu, antijen sunumu sırasında T hücre adezyonu, kostimulasyon, aktivasyon ve proliferasyon, inflamasyon bölgesine migrasyon sırasında yapabilirler. Multiple sklerosis, romatoid artrit, sistemik eritematosusta klinik ve deneysel modellerde T ve B lenfositler üzerinden etkileriyle yararlı olabileceği vurgulanmaktadır (58). Fluvastatin, insan lenfositlerinde CD 3 stimülasyon yanıtını %90 azaltmıştır (59). Statinlerin lenfositler üzerine etkileri doz

değişikliklerinde farklılıklar gösterebilmektedir (60). Dozlardaki değişiklik ile apoptoz etkisi artabilir. T hücre ölümünde esas mekanizma olan Fas, FasL(CD95) etkileşimi iyi bilinmektedir. Atorvastatin ve simvastatin T hücre sitotoksitesinin supresyonunu hücre yüzeyinde FasL ekspresyonunu down regulege ederek de gösterebilir (61). Bu çalışmada ise Fas Ligand aracılıklı apoptoz değerlendirilmedi. Lupus Fare modellerinde atorvastatinin B hücre sekresyonunu azalttığı gösterilmiştir (62). Bunun yanı sıra statinler NK hücrelerini de suprese ederler (63).

Lipid taşınımı T, B lenfositler, antijen sunan hücrelerde sinyal yolu için esastır (64-66). Çalışmamızda da lipid metabolizmasını etkileyen atorvastatin ve rosiglitazon B lenfosit sinyal yolunu etkilemiş olabilir. Statinler murin melanoma hücrelerinde Fas ligand ekspresyonu, Rho aracılığıyla apoptozu indüklerler (67). Atorvastatin ise T hücre aktivasyonunu inhibe eder (68). Akım sitometrik yöntemle değerlendirildiğinde IM-9 human lenfoblastlarda serivastatin ile birlikte fibratların proapoptotik etkisini anneksin V yardımıyla ortaya çıkardığı gösterilmiştir. Bir çalışmada lösemik hastalarda kullanılabileceği yönünde yorum yapılmıştır (69). Atorvastatin insan periferik kan lenfositlerinde DNA hasarını indükler (70). Cafforio ve ark. (71) insan T ve B lenfoblastlarında, myeloma hücrelerinde atorvastatin dahil olmak üzere statinlerin özellikle kaspazlar üzerinden apoptozun tetiklendiğini göstermişlerdir. Çalışmamızda kaspaz sistemi değerlendirilmedi.

Yüksek lipoprotein lipaz (LPL) ekspresyonu KLL'de kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. Şilomikronların katalizlenmesinde rolü olan LPL endotel yüzeyinde bulunur ve monositler arasında köprü görevi görür (72). Bizim diğer bir çalışmamızda yağ metabolizmasında değişiklik gözlemedik (73). Bu çalışmada KLL'li hastalarda kontrol gurubuna göre total kolesterol ve LDL kolesterol düzeyleri belirgin azalmıştı.

Atorvastatinin Anneksin V düzeylerini kontrol gurubuna göre belirgin arttırdığını bulduk ( $p=0.001$ ). Kronik lenfositik Lösemi lenfositlerinde atorvastatin apoptozu artırabilir.

Çalışmamızda CD5 ekspresyonu ise kontrol gurubuna göre belirgin azalmaktadır ( $p=0.03$ )

Hem atorvastatin hem rosiglitazon yağ metabolizması üzerine etki göstermektedir. Blank ve ark. (68) çalışmalarında atorvastatinin kolesterol sentezini azaltmadan da T lenfosit aktivasyonunu inhibe ettiğini göstermişlerdir. Lökosit fonksiyone antijen 1



etkilenmesi sitokin sentezini azaltmaları bu durumu oluşturabilir. Çalışmamızda da aynı zamanda T lenfosit belirteci olan CD 5 düzeyinin etkilenmesi böylece açıklanabilir.

PPAR  $\gamma$ 'nın lenfosit apoptozu üzerine etkisi belirsizdir. Ancak çalışmalar çoğunlukla apoptozun arttığı yönündedir (42-46). T ve B lenfositler, lenfoma hücre dizilerinde lenfosit ölümüne katkıda bulunmaktadır (42). Proapoptotik etkilerinin olup olmadığı belirsizdir (43). Hem murin lenfositik hücre dizilerinde hem de insan lenfoma hücre dizilerinde yüksek oranda PPAR  $\gamma$  eksprese ettiği ve hücre yaşamını arttırdığı bulunmuştur (44). Son çalışmalarda insan ve fare B lenfositleri üzerinde PPAR  $\gamma$  ve buna bağlı bu hücrelerde apoptoz olabildiği gösterilmiştir. Gene miyeloma hücre dizilerinde tiazolidinedionların in vitro apoptozu uyardığı ve tedavi için ileri çalışmalarla kullanılabileceği vurgulanmıştır (45,46).

Siglitazon PPAR  $\gamma$  agonisti etkisinden bağımsız olarak da anti B hücre lenfoma etkisi gösterebilir. Bu etki serbest oksijen radikalleri üzerinden açıklanmaya çalışılmıştır. Normal B hücrelerinin etkisi de canlanmıştır (74).

PPAR  $\gamma$  agonisti triglitazon, monosit hücre dizilerinde apoptozu indüklemiştir. Bu etki Bcl-2 ailesi üyeleri, mitokondriyal sinyal yolu ve kısmen siklooksijenaz etkisi ile açıklanmaya çalışılmıştır (75).

Rosiglitazon Anneksin V düzeylerini kontrol grubuna göre belirgin arttırdığını bulduk ( $p < 0.001$ ). Rosiglitazon KLL lenfositlerinde apoptozu artırabilir.

Bairey ve ark. (76) KLL hücrelerinde arsenik trioksit kullanarak kaspaz 3, bax, bcl-2 ile yaptıkları değerlendirmelerinde apoptozun indüklendiğini göstermişler. İn vitro çalışmalarında arseniğin KLL lenfositlerinde apoptozu arttırdığını saptanmıştır. Bu çalışmada spontan apoptoz düzeyi belirli olmayıp IL 4 de kullanılmamıştır. Çalışmamızda IL 4 kullanarak spontan apoptozu azaltmayı düşündük. Kontrol grubundada apoptoz gözlenmesine rağmen bu oran rosiglitazon ve atorvastatin grubunda daha yüksekti.

KLL'de yüksek düzeyde antiapoptotik bcl-2, düşük oranda ise bax gibi proapoptotik proteinler bulunur. Mitokondri üzerinden etkileri bilinmesine rağmen, bcl-2 endoplazmik retikulumda lokalizedir (77). Bcl-2 KLL'de apoptozu değerlendirmede yeterli görünmemektedir.

Tedavisiz 33 hastanın değerlendirildiği bir çalışmada yüksek bcl-2 düzeyi kötü survival ile korele bulunmuştur (78). Ancak tüm hastalarda yüksek düzeyler saptanmaz (79,80).

Diğer bir çalışmada da statinler solid tümörlü hastalarda bcl-2 ekspresyonunu azaltmıştır (28).

Çalışmamızda atorvastatin ve rosiglitazon CD38, bcl-2 düzeylerini değiştirmemişti.

Sargent ve ark. (81) KLL'de prognozda bcl-2 düzeyinin ana belirleyici faktör olmadığını göstermiş ve CD38-ZAP 70 ile birlikteğinin yavaş ya da agresivite konusunda daha önemli olduğunu saptamıştır. Bizim sonuçlarımız da bu duruma paralellik göstermektedir.

Çalışmamızda ZAP 70 ekspresyonu ise her iki ilaçla da azalmaktadır ( $p<0.05$ ).

Günümüze kadar literatürde KLL'de ZAP 70 düzeyini değiştiren ilaç bildirilmemiştir. Ancak Boelens ve ark. (82) metilprednizolonun ZAP 70 pozitif KLL'de negatif guruba göre apoptozun daha hızlı indüklendiği göstermişlerdir. Bu çalışmada ZAP 70 down regülasyonu da gözlenmiştir. Bunun tek başına yeterli mekanizma olamayacağı vurgusu yapılmıştır.

Sonuç olarak KLL lenfositlerinde atorvastatin ve rosiglitazon Anneksin V ile belirlenen apoptozu arttırmıştır. Bu tedavide yeni açılımlar sağlayabilir.

## 6.SONUÇLAR VE ÖNERİLER:

- A) KLL en sık lösemidir.
- B) KLL patogeneğinde bcl-2 yolunu içeren apoptoz önemli bir rol oynamaktadır.
- C) Hastalarda ZAP 70 ve CD 38 ekspresyonu prognozda önemlidir. Özellikle bu iki parametrenin beraberce eksprese edilmesi prognozun kötü olduğunu işaret eder.
- D) Statinlerin (atorvastatin, simvastatin, rosuvastatin, pravastatin gibi) ve tiazolidinedionların (rosiglitazon, pioglitazon, troglitazon, siklitazon gibi) lenfositler üzerine etkisi üzerine çeşitli çalışmalar vardır.
- E) Atorvastatin ve rosiglitazon CD38, Bcl 2 düzeylerini etkilememekte iken, Anneksin V düzeylerini kontrol gurubuna göre belirgin arttırmaktaydı.
- F) CD5 ekspresyonu ise kontrol gurubuna göre belirgin azalmaktaydı.
- G) ZAP 70 ekspresyonu ise her iki ilaçla da azalmaktaydı.
- H) KLL lenfositlerinde atorvastatin ve rosiglitazon Anneksin V ile belirlenen apoptozu arttırmıştır. Bu tedavide yeni açılımlar sağlayabilir.
- İ) CD5 ve ZAP 70 azalması atorvastatin ve rosiglitazonun KLL patogenezi üzerine etkisini gösterebilir. Bu durum ileri çalışmalar ile belirlenmelidir.

## ÖZET

### **B HÜCRELİ KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİ LENFOSİTLERİNDE ATORVASTATİN VE ROSİGLİTAZONUN CD38, ZAP 70, ANNEKSİN VE Bcl-2 DÜZEYİNE İN VİTRO ETKİSİ**

**GİRİŞ:** Kronik Lenfositik Lösemi (KLL)'de CD 38 ve ZAP 70 ekspresyonu prognozda önem taşımaktadır. Kronik Lenfositik Lösemi patogeneğinde apoptozun rolü bilinmekte ve tedaviyi yönlendirmektedir. Atorvastatin ve rosiglitazonunun lenfosit apoptozu ve immun sistem üzerindeki etkilerini araştıran çalışmalar giderek artmaktadır. Bu deneysel çalışmada iki ilacın KLL'li hastaların lenfositlerindeki CD38, ZAP 70, anneksin V ve Bcl 2 düzeylerine etkisini belirlemeyi amaçladık.

**MATERYAL VE METOD:** Yaş ortalaması  $56 \pm 8$  (4'ü erkek) olan 7 KLL hastası çalışmaya alındı. Dört hasta evre Binet A, 2'si Binet C, diğeri de Binet B'de idi. Hastaların hemoglobin düzeyleri  $12 \pm 1,8$  gr/dl, hematokrit düzeyleri  $\%35 \pm 6$ , trombosit sayıları  $156 \pm 68 \times 10^3/\text{mm}^3$ , lökosit sayısı  $50 \pm 38.7 \times 10^3/\text{mm}^3$  ve lenfosit sayıları  $45,7 \pm 38.1 \times 10^3/\text{mm}^3$  idi. Çalışmaya hiperkolestolemi, diabetes mellituslu ve bunlarla ilgili ilaç kullanımı olan hastalar alınmadı. Hastaların periferik yol ile alınan kanlarından ficol separasyon yöntemiyle mononükleer hücreleri ayrıldı. 24 kuyucuklu kültür plağında (1000000 hücre/ml) 2ml RPMI 1640 ile süspansedildi. RPMI'ya  $\%20$  human albumin, 2mM L-glutamin, 100U/L penisilin, 100 mikrogram/ml streptomisin ilave edildi.  $\%5$  CO<sub>2</sub>'li 37 derece etüvde 24 saat enkübe edildi. Bu hücrelerde akım sitometrisi yöntemi ve EPICS XL-MCL cihazı ile CD5, CD 38, ZAP 70, anneksin V ekspresyonları, ELİSA ile bcl 2 düzeyleri değerlendirildi. Flow sonuçları iki kişi tarafından çift kör olarak değerlendirildi ve ortalaması alındı. Kronik Lenfositik Lösemi lenfositlerinin in vitro ölümü bilindiğinden 1 ng/ml IL-4 ilave edildi. 3 guruba ayrıldı. 1. guruba 5 mikromolar oranında süspansedilmiş atorvastatin kalsiyum, 2. guruba 2 mikromolar rosiglitazon maleat 3. grup kontrol olarak alındı. 24 saat sonra CD 5, CD 38, ZAP 70 ve anneksin V değerleri tekrar değerlendirildi. İstatiksel yöntem olarak two-paired student-t testi kullanıldı ve  $p < 0.05$  değerleri anlamlı kabul edildi. Bu çalışma için Adnan Menderes Üniversitesi Etik Kurul onayı alındı.

**BULGULAR:** Atorvastatin ve rosiglitazon CD38 ekspresyonlarını ve Bcl-2 düzeylerini etkilememekte iken, anneksin V ekspresyonlarını kontrol gurubuna göre belirgin arttırmaktadır ( $p<0.001$ ). CD5 ekspresyonu ise kontrol gurubuna göre belirgin azalmaktadır ( $p=0.03$ ). ZAP 70 ekspresyonu ise her iki ilaçla da azalmaktadır (Her ikisi için  $p<0.05$ ).

**SONUÇ:** Daha geniş çaplı in vivo değerlendirmeler ile atorvastatin ve rosiglitazon KLL tedavisinde yer alabilir.

**Anahtar kelimeler:** Kronik Lenfositik Lösemi, apopitoz, atorvastatin, rosiglitazon

## SUMMARY

### IN B-CELL CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA LYMPHOCYTES, IN VITRO EFFECT OF ATORVASTATIN AND ROSIGLITAZON ON CD38, ZAP 70, ANNEXIN V AND BCL-2

**OBJEKTIVE:** CD38 and ZAP 70 expression have an important prognostic role in Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). Also the role of apoptosis is well known in the pathogenesis of CLL and it may direct the treatment. The studies on the effects of atorvastatin and rosiglitazon on lymphocytic apoptosis and immune system are increased. We aimed to determine the effects of these drugs on CD38, ZAP 70, annexin V, and Bcl-2 levels of CLL lymphocytes.

**MATERIALS AND METHODS:** Seven (4 males) patients with CLL with average age  $56 \pm 8$  years were enrolled to the study. Of them 4 were in Binet A, 2 in Binet C, and 1 in Binet B. Hemoglobin levels of the patients were  $12 \pm 1.8$  g/dL, hematocrit levels  $35 \pm 6\%$ , platelet counts  $156 \pm 68 \times 10^3/\text{mm}^3$ , leukocyte counts  $50.5 \pm 38.7 \times 10^3/\text{mm}^3$ , and lymphocyte counts  $45.7 \pm 38.1 \times 10^3/\text{mm}^3$ . Patients with hypercholesterolemia, DM, and using drugs for these disorders were excluded. Mononuclear cells of blood samples from peripheral veins were separated by ficol method. On culture plate with 24 wells (1000000 cells/ml), it was suspended with 2 ml RPMI 1640. (20% human albumin, 2mM l-glutamin, 100U/L penicillin, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin were added to RPMI). It was incubated for 24 hours in a 37 C and 5% CO<sub>2</sub> 'etüv. In these cells, the expressions of CD5, CD38, ZAP 70, and annexin V were evaluated with flow cytometry using EPICS XL-MCL instrument. These results were evaluated by two researcher as double-blind and means were calculated. Because CLL lymphocytes can die in vitro, 1 ng/ml IL-4 was added. 3 groups were formed. 5 micromolar atorvastatin suspension in first group and 2 micromolar rosiglitazon maleat in second group were added. The third group was used as control group. After 24 hours, the expressions of CD5, CD38, ZAP 70, and annexin V, the levels of Bcl-2 were reevaluated. Two-paired student t test was used for statistical analysis and  $p < 0.05$  was accepted as significance level. Adnan Menderes University ethic board approved the study.

**RESULTS:** Atorvastatin and rosiglitazon did not affect CD38 expressions and Bcl-2 levels but Annexin V levels increase significantly when compared with control group ( $p < 0.001$ ). CD5 expression significantly decreases when compared with control group ( $p = 0.03$ ). ZAP 70 expression decreases with both drugs ( $p < 0.05$  for both).

**CONCLUSIONS:** To determine the role of atorvastatin and rosiglitazon in CLL, extensive in vivo studies are needed.

**Key words:** Chronic Lymphocytic Leukemia, apoptosis, atorvastatin, rosiglitazon

## **KAYNAKLAR**

- 1) Johnston JB, Seftel M, Gibson SB. Chronic Lymphocytic Leukemia. Greer JP, Foerster J, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B, Arber DA, Means RT. Wintrobe's Clinical Hematology Lippincott Williams &Wilkins. Twelfth edition 2009, page 2214-2255.
- 2) Motta M, Wierda WG, Ferrajoli A. Chronic lymphocytic leukemia: treatment options for patients with refractory disease. *Cancer* 2009; 115:3830-41.
- 3) Pleyer L, Egle A, Hartmann TN, Greil R. Molecular and cellular mechanisms of CLL: novel therapeutic approaches. *Nat Rev Clin Oncol* 2009; 6:405-18.
- 4) Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukaemia. *N Engl J Med* 2005; 352:804-15.
- 5) Cheson BD, Bennett JM, Grever M, Kay N, Keating MJ, O'Brien S, et al. National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood* 1996; 87:4990-97.
- 6) Montserrat E. New prognostic markers in CLL. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2006:279-84.
- 7) Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975; 46:219-34.
- 8) Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguët H, Goasguen J, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 198; 48:198-206.
- 9) Lawen A. Apoptosis-an introduction. *Bioessays* 2003; 25:888-96.
- 10) Sanz L, Garcia-Marco JA, Casanova B, de La Fuente MT, Garcia-Gila M, Garcia-Pardo A, et al. Bcl-2 family gene modulation during spontaneous apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 315:562-7.
- 11) Kitada S, Andersen J, Akar S, Zapata JM, Takayama S, Krajewski S, et al. Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with In vitro and In vivo chemoresponses. *Blood* 1998; 91: 3379-89.
- 12) Saxena A, Viswanathan S, Moshynska O, Tandon P, Sankaran K, Sheridan DP. Mcl-1 and Bcl-2/Bax ratio are associated with treatment response but not with Rai stage in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol* 2004;75:22-33.
- 13) Alkan S. Kronik lenfositik lösemi (KLL).Patogenezi Ve biyolojisi. XXXI. Ulusal Hematoloji Kongresi VIII. Mezuniyet Sonrası Eğitim Kursu sayfa 17-22.



- 14) Matrai Z. CD38 as a prognostic marker in CLL. *Hematology* 2005;10:39-46.
- 15) Ertault-Daneshpouy M, Noguera ME, Gisselbrecht C, Haddad A, Brice P, Marolleau JP, et al. ZAP-70 protein expression and CD38 positivity in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Clin Adv Hematol Oncol* 2008; 6:55-63.
- 16) Domingo-Domènech E, Domingo-Clarós A, González-Barca E, Beneitez D, Alonso E, Romagosa V, et al. CD38 expression in B-chronic lymphocytic leukemia: association with clinical presentation and outcome in 155 patients. *Haematologica* 2002; 87:1021-7.
- 17) Del Poeta G, Maurillo L, Venditti A, Buccisano F, Epiceno AM, Capelli G, et al. Clinical significance of CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001; 98:2633-9.
- 18) Mainou-Fowler T, Dignum HM, Proctor SJ, Summerfield GP. The prognostic value of CD38 expression and its quantification in B cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Leuk Lymphoma* 2004;45:455-62.
- 19) Danilov AV, Klein AK, Lee HJ, Baez DV, Huber BT. Differential control of G0 programme in chronic lymphocytic leukaemia: a novel prognostic factor. *Br J Haematol* 2005; 128:472-81.
- 20) Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, Marcé S, et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2003; 348:1764-75.
- 21) Scielzo C, Camporeale A, Geuna M, Alessio M, Poggi A, Zocchi MR, et al. ZAP-70 is expressed by normal and malignant human B-cell subsets of different maturational stage. *Leukemia* 2006; 20:689-95.
- 22) Dunphy CH. Applications of flow cytometry and immunohistochemistry to diagnostic hematopathology. *Arch Pathol Lab Med* 2004; 128:1004-22.
- 23) Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407:770-6.
- 24) Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* 2002;108:153-64.
- 25) Öztürk F. Apoptoz. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2002; 9:143-48.
- 26) Ayaşlıoğlu E. Apoptoz. *T Klin J Med Sci* 2001, 21:57-62.
- 27) Bellosta S, Ferri N, Bernini F, Paoletti R, Corsini A. Non-lipid-related effects of statins. *Ann Med* 2000; 32:164-76.

- 28)** Larsson O. HMG-CoA reductase inhibitors: role in normal and malignant cells. *Crit Rev Oncol Hematol* 1996; 22:197-212.
- 29)** Kobashigawa JA, Katznelson S, Laks H, Johnson JA, Yeatman L, Wang XM, et al. Effect of pravastatin on outcomes after cardiac transplantation. *N Engl J Med* 1995; 333:621-7.
- 30)** Cutts JL, Scallen TJ, Watson J, Bankhurst AD. The role of mevalonic acid in the regulation of natural killer cell cytotoxicity. *J Cell Physiol* 1989; 139:550-57.
- 31)** Wong WW, Dimitroulakos J, Minden MD, Penn LZ. HMG-CoA reductase inhibitors and the malignant cell: the statin family of drugs as triggers of tumor-specific apoptosis. *Leukemia* 2002; 16:508-19.
- 32)** Chapman- Shimshoni D, Yuklea M, Shapiro H, Lishner M. Simvastatin induces apoptosis of B-CLL cells by activation of mitochondrial caspase 9. *Exp Hematol* 2003;31:779-83.
- 33)** Vitols S, Angelin B, Juliusson G. Simvastatin impairs mitogen-induced proliferation of malignant B-lymphocytes from humans--in vitro and in vivo studies. *Lipids* 1997; 32:255-62.
- 34)** Ganne F, Vasse M, Beaudeau JL, Peynet J, Francois A, Mishal Z, et al. Cerivastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, inhibits urokinase/urokinase-receptor expression and MMP-9 secretion by peripheral blood monocytes--a possible protective mechanism against atherothrombosis. *Thromb Haemost* 2000; 84:680-88.
- 35)** Li H, Appelbaum F, Willman C, Zager R, Banker D. Cholesterol-modulating agents kill acute myeloid leukemia cells and sensitize them to therapeutics by blocking adaptive cholesterol responses. *Blood* 2003; 101:3628-34.
- 36)** Weitz-Schmidt G, Welzenbach K, Brinkmann V, Kamata T, Kallen J, Bruns C, et al. Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site. *Nature Med* 2001; 6: 687-92.
- 37)** Konopleva M, Elstner E, McQueen T, Tsao T, Sudarikov A, Hu W, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor; and retinoid X receptor ligands are potent inducers of differentiation and apoptosis in leukemias *Mol Cancer Ther* 2004; 3:1249-62.
- 38)** Padilla J, Kaur K, Cao HJ, Smith TJ, Phipps RP. Peroxisome proliferator activator receptor-g agonists and 15-deoxy-D12,14-PGJ2 induce apoptosis in normal and malignant B-lineage cells. *J Immunol* 2000; 165: 6941-48.

- 39) Padilla J, Leung E, Phipps RP. Human B lymphocytes and Blymphomas express PPAR-g and are killed by PPAR-g agonists. *Clin Immunol* 2002; 103: 22– 33.
- 40) Greene ME, Blumberg B, McBride OW, Yi HF, Kronquist K, Kwan K, et al. Isolation of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma cDNA: expression in hematopoietic cells and chromosomal mapping. *Gene Expr* 1995; 4:281-99.
- 41) Vamecq J, Latruffe N. Medical significance of peroxisome proliferator-activated receptors. *Lancet* 1999; 354:141-8.
- 42) Padilla J, Kaur K, Cao HJ, Smith TJ, Phipps RP. Peroxisome proliferator activator receptor-gamma agonists and 15-deoxy-Delta(12,14)(12,14)-PGJ(2) induce apoptosis in normal and malignant B-lineage cells. *J Immunol* 2000; 165:6941-8.
- 43) Gardner OS, Shiau CW, Chen CS, Graves LM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-independent activation of p38 MAPK by thiazolidinediones involves calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase R: correlation with endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* 2005; 280:10109-18.
- 44) Jo SH, Yang C, Miao Q, Marzec M, Wasik MA, Lu P, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma promotes lymphocyte survival through its actions on cellular metabolic activities. *J Immunol* 2006; 177:3737-45.
- 45) Eucker J, Bangeroth K, Zavrski I, Krebbel H, Zang C, Heider U, et al. Ligands of peroxisome proliferator-activated receptor gamma induce apoptosis in multiple myeloma. *Anticancer Drugs* 2004; 15:955-60.
- 46) Inoue S, Snowden RT, Dyer MJ, Cohen GM. CDDO induces apoptosis via the intrinsic pathway in lymphoid cells. *Leukemia* 2004; 18:948-52.
- 47) Llverias G, Rebollo A, Pou J, Vazquez-Carrera M, Sanchez RM, Laguna JC, et al. Effects of rosiglitazone and atorvastatin on the expression of genes that control cholesterol homeostasis in differentiating monocytes. *Biochem Pharmacol* 2006; 71:605-14.
- 48) Llverias G, Lacasa D, Vinals M, Vazquez-Carrera M, Sanchez RM, Laguna JC, et al. Reduction of intracellular cholesterol accumulation in THP-1 macrophages by a combination of rosiglitazone and atorvastatin. *Biochem Pharmacol* 2004; 68: 155-63.
- 49) Panayiotidis P, Ganeshguru K, Jabbar SAB, Hoffbrand AV. Interleukin-4 inhibits apoptotic cell death and loss of the bcl-2 protein in B-chronic lymphocytic leukemia cells in vitro. *Br J Haematol* 1993; 85:439.

- 50)** Mainou-Fowler T, Craig VA, Coppelstone AJ, Hamon MD, Prentice AG. Effect of anti-APO1 on spontaneous apoptosis of B cells in chronic lymphocytic leukaemia: the role of bcl-2 and interleukin 4. *Leuk Lymphoma* 1995; 19:301-8.
- 51)** Groves MJ, Maccallum S, Boylan MT, Coates PJ, Tauro S. The annexin-V assay reflects susceptibility to in vitro membrane damage in chronic lymphocytic leukemia and may overestimate cell death. *Am J Hematol* 2009;84:196-7.
- 52)** Castejón R, Yebra M, Citores MJ, Villarreal M, García-Marco JA, Vargas JA. Drug induction apoptosis assay as predictive value of chemotherapy response in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2009; 50:593-603.
- 53)** Spady DK, Dietschy JM: Sterol synthesis in vivo in 18 tissues of the squirrel monkey, guinea pig, rabbit, hamster, and rat. *J Lipid Res* 1983; 24: 303– 15.
- 54)** Simons K, Ikonen E. Functional lipid rafts in cell membranes. *Nature* 1997; 387: 569– 72.
- 55)** Robinson MJ, Cheng M, Khokhlatchev A, Ebert D, Ahn N, Guan KL, et al. Contributions of the mitogen-activated protein (MAP) kinase backbone and phosphorylation loop to MEK specificity. *J Biol Chem* 1996; 271: 29734– 39.
- 56)** O'Donnell MP, Kasiske BL, Massy ZA, Guijarro C, Swan SK, Keane WF. Isoprenoids and Ras: potential role in chronic rejection. *Kidney Int* 1995; Suppl. 52: S29– S33.
- 57)** Kwak B, Mulhaupt F, Myit S, Mach F. Statins as newly recognized type of immunomodulator. *Nat Med* 2000; 12: 1399– 402.
- 58)** Brumeanu TD, Goldstein R, Casares S. Down-regulation of autoreactive T-cells by HMG CoA reductase inhibitors. *Clin Immunol* 2006; 119:1-12.
- 59)** Hillyard DZ, Cameron AJ, McIntyre AH, Hadden MH, Marshall HE, Johnston N, et al. Inhibition of proliferation and signalling mechanisms in human lymphocytes by fluvastatin. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2002; 8: 673– 78.
- 60)** Fehr T, Kahlert C, Fierz W, Joller-Jemelka HI, Riesen WF, Rickli H, et al. Statin-induced immunomodulatory effects on human T cells in vivo. *Atherosclerosis* 2004; 175: 83– 90.
- 61)** Branco-Colio LM, Munoz-Garcia B, Martin-Ventura JL, Lorz C, Diaz C, Hernandez G, et al. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors decrease Fas ligand expression and cytotoxicity in activated human T lymphocytes. *Circulation* 2003; 108: 1506– 13.

- 62)** Lawman S, Mauri C, Jury EC, Cook HT, Ehrenstein MR. Atorvastatin inhibits autoreactive B cell activation and delays lupus development in New Zealand Black/White F1 mice. *J Immunol* 2004; 173: 7641– 46.
- 63)** Cutts JL, Brankhurst AD. Suppression of lymphoid cell function in vitro by inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by lovastatin. *Int J Immunopharmacol* 1989; 11: 863– 69.
- 64)** Drake DR, Braciale TJ. Cutting edge: lipid rafts integrity affects the efficiency of MHC class I tetramer binding and cell surface TCR arrangement on CD8+ T cells. *J Immunol* 2001; 166: 7009– 13.
- 65)** Cheng PC, Dykstra ML, Michell RN, Pierce SK. A role of lipid rafts in B cell antigen receptor signaling and antigen targeting. *J Exp Med* 1999; 190: 1549– 60.
- 66)** Xavier R, Brennan T, Li Q, McCormack C, Seed B. Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation. *Immunity* 1998; 8:723– 32.
- 67)** Sarrabayrouse G, Synaeve C, Leveque K, Favre G, Tilkin-Mariamé AF. Statins stimulate in vitro membrane FasL expression and lymphocyte apoptosis through RhoA/ROCK pathway in murine melanoma cells. *Neoplasia* 2007; 9:1078-90.
- 68)** Blank N, Schiller M, Krienke S, Busse F, Schätz B, Ho AD, et al. Atorvastatin inhibits T cell activation through 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase without decreasing cholesterol synthesis. *J Immunol* 2007; 179:3613-21.
- 69)** Tomiyama N, Yasuda N, Iwano C, Matzno S, Matsuyama K. Flow cytometric evaluation of synergistic pro-apoptotic effects of statins and clofibrates in IM-9 human lymphoblasts. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007;34:876-80.
- 70)** Gajski G, Garaj-Vrhovac V, Orescanin V. Cytogenetic status and oxidative DNA-damage induced by atorvastatin in human peripheral blood lymphocytes: standard and Fpg-modified comet assay. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 231:85-93.
- 71)** Cafforio P, Dammacco F, Gernone A, Silvestris F. Statins activate the mitochondrial pathway of apoptosis in human lymphoblasts and myeloma cells. *Carcinogenesis* 2005; 26:883-91.
- 72)** Heintel D, Kienle D, Shehata M, Kröber A, Kroemer E, Schwarzingler I, et al; CLL Study Group. High expression of lipoprotein lipase in poor risk B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2005; 19:1216-23.

- 73)** Yavasoglu I, Gun T, Unubol M, Kadikoylu G, Bolaman Z. “Cholesterol levels in untreated patients with chronic lymphocytic leukemia”, 2.International Lymphoma, Leukemia, Myeloma Congress, 2009, İstanbul (Poster no:29)
- 74)** Ray DM, Akbiyik F, Phipps RP. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) ligands 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 and ciglitazone induce human B lymphocyte and B cell lymphoma apoptosis by PPARgamma-independent mechanisms. *J Immunol* 2006;177:5068-76.
- 75)** Liu JJ, Liu PQ, Lin DJ, Xiao RZ, Huang M, Li XD, et al. Downregulation of cyclooxygenase-2 expression and activation of caspase-3 are involved in peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists induced apoptosis in human monocyte leukemia cells in vitro. *Ann Hematol* 2007;86:173-83.
- 76)** Bairey O, Vanichkin A, Shpilberg O. *Int J Lab Hematol* 2009 Feb 5. [Epub ahead of print]
- 77)** Goolsby C, Paniagua M, Tallman M, Gartenhaus RB. Bcl-2 regulatory pathway is functional in chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom* 2005; 63:36-46.
- 78)** Robertson LE, Plunkett W, McConnell K, Keating MJ, McDonnell TJ. Bcl-2 expression in chronic lymphocytic leukemia and its correlation with the induction of apoptosis and clinical outcome. *Leukemia* 1996; 10:456-9.
- 79)** Pepper C, Hoy T, Bentley DP. Bcl-2/Bax ratios in chronic lymphocytic leukaemia and their correlation with in vitro apoptosis and clinical resistance. *Br J Cancer* 1997; 76:935-8.
- 80)** Thomas A, El Roubi S, Reed JC, Krajewski S, Silber R, et al. Drug-induced apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia: relationship between p53 gene mutation and bcl-2/bax proteins in drug resistance. *Oncogene* 1996; 12:1055-62.
- 81)** Sargent RL, Craig FE, Swerdlow SH. Comparison of bcl-2, CD38 and ZAP-70 Expression in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Int J Clin Exp Pathol* 2009; 2:574-82.
- 82)** Boelens J, Lust S, Van Bockstaele F, Van Gele M, Janssens A, Derycke L, et al. Steroid effects on ZAP-70 and SYK in relation to apoptosis in poor prognosis chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 2009; 33:1335-43.