

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

D VİTAMİNİNİN MCF-7 MEME KANSERİ HÜCRESİ METABOLİZMASI ÜZERİNE ETKİSİ

Beyza SARAÇLIGİL

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Danışman
Yrd. Doç. Dr. Bahadır ÖZTÜRK

KONYA-2015



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

D VİTAMİNİNİN MCF-7 MEME KANSERİ HÜCRESİ METABOLİZMASI ÜZERİNE ETKİSİ

Beyza SARAÇLIGİL

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Danışman
Yrd. Doç. Dr. Bahadır ÖZTÜRK

KONYA-2015

T.C
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

D VİTAMİNİNİN MCF-7 MEME KANSERİ HÜCRESİ METABOLİZMASI ÜZERİNE ETKİSİ

Beyza SARAÇLIGİL

TIPTA UZMANLIK TEZİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı
Yrd. Doç Dr. Bahadır ÖZTÜRK

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 2013/61 Proje numarası ile desteklenmiştir

KONYA 2015

Teşekkür

Bilgi birikimi, bakış açısı, hoşgörüsü ve eğitime verdiği destek ile kendime örnek aldığım ve uzmanlık eğitimim boyunca benden desteğini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Ali Ünlü'ye danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Bahadır Öztürk'e gerek tezimde gerekse eğitim hayatımda bilgi birikimini benimle paylaştığı için, gösterdiği ilgi, destek, hoşgörü ve yol göstericiliğiyle sağladığı katkılardan dolayı sonsuz teşekkür ederim.

Eğitimime olan katkılarından ve her zaman sağladıkları motivasyon yol göstericiliği ve hoşgörülerinden dolayı Sayın Doç. Dr. Hüsamettin Vatansev'e ve Doç Dr. Abdullah Sivrikaya'ya , Yrd. Doç. Dr. Esma Menevşe' ye, eğitimimin son bölümünde bilgi birikimini ve desteğini esirgemeyen Yrd.Doç.Dr Sedat Abuşoğlu'na teşekkür ederim.

Asistanlık süresince birlikte olduğumuz, her türlü destek ve bilgi birikimini benden esirgemeyen abi olarak gördüğüm Uzm. Dr Fikret Akyürek 'e teşekkür ederim. Birlikte çalışmaktan keyif aldığım sevgili arkadaşım Uzm.Dr.Fatmagül Gün'e teşekkür ederim.

Birlikte çalıştığım tüm teknisyen ve personel arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Her türlü desteğini her zaman hissettiğim sevgili eşim ve hayat yoldaşım Uygur Saraçlıgil'e sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Ayrıca tez çalışmam esnasında yardımlarından dolayı Arş.Gör.Nedime Korucu ve doktora öğrencisi kimyacı Gülsüm Tekine teşekkür ederim

Tüm yaşamım boyunca destekleriyle, sevgileriyle, her zaman yanımda olan değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Arş.Gör.Beyza SARAÇLIGİL

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

Teşekkür i
İÇİNDEKİLER ii
KISALTMALAR iv
TABLOLAR DİZİNİ vi
ŞEKİLLER LİSTESİ vii
1.GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI 1
2.GENEL BİLGİLER 4
2.1 Kanser 4
2.1.1Meme Kanseri 4
2.2 D vitaminine Genel Bakış 6
2.2.1. D vitamini Kaynakları 6
2.2.2 D vitamini Sentez ve Metabolizması 8
2.2.3 D Vitamini ve Meme Kanseriyle ilgili Pre-Klinik Çalışmalar 12
2.2.3.1 Hücre Büyümesinin Durması ve Apopitoz 12
2.2.3.2 İnvazyon ve Metastazın İnhibisyonu 12
2.2.3.3 Anti-İnflamasyon 13
2.2.3.4 Östrojen Yolağı İnhibisyonu 13
2.2.4 Vitamin D ve Epidemiyolojik Çalışmalar 13
2.GEREÇ VE YÖNTEM 24
2.1.GEREÇLER 24
2.1.1 Cihazlar ve Laboratuvar Gereçleri 24
2.1.2 Kimyasallar 24
2.2 YÖNTEM 25
2.2.1 Hücre Kültürü 25
2.2.1.2 Gerçek Zamanlı Hücre Elektronik Algılama Sistemi 26
2.2.1.3 D vitamininin MCF-7 Hücre Proliferasyonuna Etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Elektronik Algılama Sistemiyle Belirlenmesi 27
2.2.1.4 Hücrelerin ATP, ADP ve AMP Ölçümüne Hazırlanması 27
2.2.1.5 Flow Sitometri Analizi ile Apopitoz Ölçümü 27
2.2.1.6 Hücrelerin LC/MS/MS Cihazında Amino asid ve Açil Karnitin Ölçümü. 29
2.2.1.7 Hücrelerin Protein Analizi 29
2.2.1.8 Hücrelerin Enerji Düzeylerinin Ölçülmesi 30
3.BULGULAR 34

3.1 D Vitaminin MCF-7 Hücre Proliferasyonuna Etkisi 34
3.2 D vitamininin IC_{50} Değerinin Belirlenmesi 35
3.3 Enerji Düzeyi 35
3.4 D Vitaminin MCF-7 Hücresinde Apopitoza Olan Etkisi 37
3.5 D Vitamini Uygulaması Yapılan MCF-7 Hücrelerinde Aminoasit ve Açil-Karnitin Düzeyi Ölçümü Sonuçları 40
4.TARTIŞMA 44
5.SONUÇ VE ÖNERİLER 49
ÖZET 50
ABSTRACT 51
KAYNAKLAR 52
EKLER 56
ÖZGEÇMİŞ 57

KISALTMALAR

VDR Vitamin D receptor

25(OH)D 25-hydroxyvitamin D

1,25(OH)2D 1,25-dihydroxyvitamin D

24,25(OH)$_2$D, (24,25 Hydroxyvitamin D)

RDA,Recommended Dietary Allowances

DBP D Vitamin D Binding Protein

7-DHC 7-dehydrocholesterol

PTH Parathormon

DCIS Ductal Karcinoma In Situ

ICL Invazive Lobuler Karcinoma

IBC Inflammatory breast cancer

FADD Fas -Associated Death Domain

DEDs Death Effector Domains

Bp Base pairs unit

PCD Programmed Cell Death

IGF-1 Insulin Like Growth Factor

FasL Fas Ligand

TNF-2 Tümör Nekrozis Faktör

ATP Adenosine Triphosphate

ADP Adenosine Diphosphate

AMP Adenosine Monophosphate

PKU Phenylketonuria

NBS Newborn screening

MCF-7 Michigan Cancer Foundation-7(Mammary cell line)

DNA Deoxyribonucleic acid,

HER2 Human Epidermal Growth Factor Receptor

ER Estrogen receptors

PR Progesterone receptor

BRCA1 BReast CAncer gene 1

ATM Ataxia Telangiectasia Mutated

TP53 Tumor Suppressor Gene

PTEN Phosphatase and Tensin Homolog

CDH1 epithelial cadherin 1

STK11 Serine/threonine kinase 11

PLAP2 Partner and localizer of BRCA2

DES Dietilstilbesterol

NF-κB Nükleer Faktör κB

COX-2 Cyclooxygenase-2

TABLOLAR DİZİNİ

TABLO 1 D VİTAMİNİ VE PLAZMADAKİ METABOLİTLERİ.....9
TABLO 2 ENERJİ DÜZEYİ ÇALIŞMASININ HPLC ÇALIŞMA KOŞULLARI..... 31
TABLO 3 D VİTAMİNİNİN FARKLI ZAMANLARDA ENERJİ DÜZEYİNE ETKİSİ
TABLO 4 D VİTAMİNİ UYGULAMASI YAPILDIKTAN SONRA MCF-7 HÜCRE DÖNGÜSÜNÜN FARKLI FAZLARININ DAĞILIMI..... 39

ŞEKİLLER LİSTESİ

ŞEKİL 1 D3 VİTAMİNİ (KOLEKALSİFEROL) VE D2 VİTAMİNİNİN (ERGOKALSİFEROL) YAPISI VE ÖNCÜL MOLEKÜLLERİ 7

ŞEKİL 2 PROVİTAMİN D3'ÜN PREVİTAMİN D3'E FOTOLİZİ. 8

ŞEKİL 3 D VİTAMİNİ SENTEZ VE METABOLİZMASI, KALSİYUM, FOSFOR VE KEMİK METABOLİZMASININ DÜZENLENMESİ. 11

ŞEKİL 4 ÖLÜM RESEPTÖRÜ ARACILI PROKASPAZ AKTİVASYON YOLAĞI. 17

ŞEKİL 5 MİTOKONDRİ ARACILI KASPAZ YOLAĞI. 18

ŞEKİL 6 KANSER HÜCRESİ METABOLİZMASI 22

ŞEKİL 7 APOPTOZ DEĞERLENDİRMESİ, SAĞLIKLI VE İŞARETLİ APOPTOTİK HÜCRELER 28

ŞEKİL 8 PROTEİN STANDARTLARINA AİT STANDART EĞRİ VE DOĞRUSALLIK DENKLEMİ. 30

ŞEKİL 9 FARKLI KONSANTRASYONLARDAKİ ATP DEĞERİNİN KALİBRASYON VE LİNEARİTE EĞRİSİ 32

ŞEKİL 10 FARKLI KONSANTRASYONLARDAKİ ADP DEĞERİNİN KALİBRASYON VE LİNEARİTE EĞRİSİ 32

ŞEKİL 11 FARKLI KONSANTRASYONLARDAKİ AMP DEĞERİNİN KALİBRASYON VE LİNEARİTE EĞRİSİ 33

ŞEKİL 12 10 μM ATP, ADP VE AMP MİX STANDARDININ KROMATOGRAMI. ... 33

ŞEKİL 13 FARKLI DOZLARDAKİ D VİTAMİNİN ZAMANA BAĞLI PROLİFERASYON GRAFİĞİ 34

ŞEKİL 14 D VİTAMİNİ İÇİN IC50 DEĞERİNİN GRAFİK VE DATALARI. 35

ŞEKİL 15 IC50 DOZU UYGULANAN MCF-7 HÜCRELERİNİN ENERJİ DÜZEYLERİ 36

ŞEKİL 16 BOYANMAMIŞ MCF-7 HÜCRELERİ FLOW SİTOMETRİ ANALİZİ 37

ŞEKİL 17 D VİTAMİNİNİN MCF-7 HÜCRESİ APOPİTOZU ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ 39
ŞEKİL 18 AMİNOASİT TARAMASI VERİLERİNİN GURUPLARA GÖRE DAĞILIMI 41
ŞEKİL 19 AÇİLKARNİTİN VERİLERİNİN GRUPLARA GÖRE DAĞILIMI..... 43

1.GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI

Meme kanseri en çok teşhis edilen kanser türü ve dünya çapında kadınlarda kanserden ölümler arasında, 2012'de tahminen 1,7 milyon vaka ve 521.000 ölüm ile ilk başta gelmektedir. Sadece meme kanseri, kanser vakalarının %25'ine ve ölümlerin ise %15'ine karşılık gelmektedir. (Jemal et al., 2011; Shao, Klein, & Grossbard, 2012; Torre et al., 2015). Vitamin D ve kanser ilişkisi ilk defa 1980 yılında Garland ve Garland'ın kolon kanserinin kuzey USA'da güney USA'ya kıyasla daha çok görüldüğünü gün ışığı ve D vitamini üretimi ile ilişkilendirerek ortaya koymasıyla gündeme gelmiştir. Sonrasında bu ekolojik "gün ışığı" hipotezi 18 farklı kanser türüne genişletilmiştir. Bazı popülasyon çalışmaları da göstermektedir ki düşük 25 (OH)D serum düzeyleri, artan kolon, meme, prostat kanseri riski ile bağlantılıdır. Yapılan hayvan çalışmalarıyla da hem düşük D vitamini düzeyleri hem de VDR (vitamin D reseptörü) gen delesyonu kanser riskini arttırmaktadır. Buna ilaveten 1,25 $(OH)_2$ D vitamini enjekte edilen hayvanlarda tümör çapı ve insidansının azaldığını gösteren birçok çalışma mevcuttur.(Mehta, 2004; Seubwai, Wongkham, Puapairoj, Okada, & Wongkham, 2010)

D vitamini yağda çözünen steroid yapıda bir prohormondur. D vitamininin kolekalsiferol (D_3 vitamini) ve ergokalsiferol (D_2 vitamini) olmak üzere iki kaynağı vardır. Kolekalsiferol 290–315 nm dalga boyundaki ultraviyole ışınlarının etkisiyle deride hayvansal kaynaklı olan 7- dehidrokolesterolden yapılır ve bu endojen üretim D vitamininin temel (%90 oranında) kaynağıdır. Bu dönüşüm deri pigmentasyonu arttıkça azalırken ultraviyole ışınına maruz kalma miktarı ile doğru orantılı olarak artar. Vitamin D_3 ve D_2 benzer yolla metabolize olduklarından ortak bir isimle, D vitamini olarak isimlendirilebilir [3]. Dolaşımda, DBP'ye (Vitamin D bağlayan protein) bağlı şekilde bulunur. Emilim ve sentez sonrasında dolaşımdaki D vitamini karaciğere gelerek 25-hidroksilaz enzimi ile 25 hidroksivitamin D'ye dönüştürülür. Bu formu stabil olup serum D vitamini düzeyini gösterir. Ancak fizyolojik olarak aktif formu 1,25 $(OH)_2$ D_3'tür ve böbreklerde 1-alfa hidroksilaz enzimi tarafından oluşturulur. İlaveten kolon, prostat ve meme gibi farklı dokularda ekstrarenal aktivasyon 1-alfa hidroksilaz ve VDR reseptörü üzerinden gerçekleşerek lokal hücre döngüsü düzenlenir. Son otuz yılda D vitaminin aktif formu 1α,25-dihidroksivitamin D_3 ya da kalsitrol'ün kalsiyum ve kemik metabolizmasıyla ilişkilendirilemeyecek farklı etkilere sahip olduğunu gösteren birçok bulgu toplanmıştır(Fleet ve ark 2012). Bu etkiler antiproliferasyon, antianjiyogenez, proapoptoz,

prodiferensiasyon ve immun regülasyondur (Chen et al., 2013; Chiang & Chen, 2013; Halama, Moller, & Adamski, 2011; Ylikomi et al., 2002)

Genel olarak hücrenin akıbeti çoğalma, farklılaşma ve ölüm olabilir. Hücre ölümü apopitoz ya da nekroz gibi farklı mekanizmalarla düzenlenebilmektedir (Danial & Korsmeyer, 2004). Nekroz, toksik veya fiziksel tehdit gibi hücresel olaylar tarafından tetiklenen homeostasizin bir sonucudur. Bu rastlantısal hücre ölümü sitoplazmanın vakuolizasyonu, plazma membranının bütünlüğünün bozulması, düzensiz kromatin yoğunlaşması ve DNA fragmentasyonu ile karakterizedir. Nekroz geçiren hücreler, hücresel içerikle birlikte proinflamatuar moleküllerin salınmasıyla inflamatuar tepkiye sebep olurlar. Apopitozis ise sırasıyla, nükleer kondensasyon ve fragmantasyon, kromozomal DNA'nın 200 bp uzunluğunda DNA parçacıklarına bölünmesi, plazma membranının kabarcıklaşması, hücrenin büzülmesi ile karakterizedir. Apopitoz konakçı organizmada inflamatuar yanıta neden olmaz iken nekroz olur. Nekroz ve apoptoz farklı özelliklerinden dolayı konakçı organizma tarafından farklı tolerabiliteye sahiptir. Tümörlerdeki apopitozu tetikleyen terapotik ajanların kanser tedavisi için güçlü birer araç oldukları düşünülmektedir.(Call, Eckhardt, & Camidge, 2008)

Robert Guthrie filtre kâğıdı üzerine yaşamın ikinci gününde topuktan alınan kan örneğinin emdirilmesi işlemi ile fenilketonürinin (PKU) erken taramasına 1960'lı yılların sonunda öncülük etmiştir. Yenidoğan dönemindeki taramaya MS/MS'in girişi ile karnitin ve aminoasit profillerinin multipleks analizleri ile tespit edilebilen hastalıkların sayısı önemli ölçüde artmıştır. Kanser hücreleri hedef tedaviler için kullanılabilecek farklı spesifik metabolik özellikler göstermektedir (4). İlk olarak tanımlananlardan biri Warburg Effect 'tir ki bu etki enerji metabolizmasının mitokondriyal oksidatif fosforilasyondan glikolize kaymasıdır (Weljie & Jirik, 2011)

NBS (Yenidoğan tarama testi) testi, kâğıtlara emdirilmiş kan örneklerinden metabolik tarama yapmak amacıyla kullanılmaktadır(Baumgartner, Böhm, & Baumgartner, 2005; Chace, Kalas, & Naylor, 2003). Bu yöntem hücre kültürüne adapte edildiğinde, hücrenin metabolizması hakkında bize bilgi vermektedir.(Halama et al., 2011) Biz de çalışmamızda aminoasit ve açil karnitin düzeylerini D vitamini uygulaması sonrasında inceleyeceğiz.

Adenozin trifosfat (ATP) molekülü, tüm hücresel fonksiyonlar için enerji sağlamaktadır. Normal hücreler ile karşılaştırıldığında, tümör hücreleri, farklı biyoenerjik profiller gösterir. Normal hücrelerde metabolik faaliyetler için tüketilen enerji öncelikle glikolize göre daha verimli ve daha fazla ATP üreten mitokondriyal oksidatif fosforilasyonla sağlanır. Fakat kanser hücrelerinin metabolik özelliklerinden biri de aerobik glikoliz için açgözlü bir şekilde glikoz almaktır. Kanser hücrelerindeki bu verimsiz enerji üretimi yolu için Warburg etkisi olarak bilinen ilk tanım Alman bilim adamı Otto Warburg tarafından 1920'lerde yapılmıştır. Kanser hücrelerinin enerji metabolizmasının özelliklerini ve karmaşıklığını anlamak erken teşhis ve efektif tedavileri geliştirebilmek adına bize yardımcı olabilir.

Bizim çalışmamızda da MCF–7 meme kanseri hücrelerine değişen dozlarda 1,25 $(OH)_2$ D_3 uygulaması yaparak farklı zamanlarada proliferasyon, apopitoz, amino asid, açil karnitin ve enerji düzeylerini inceleyerek D vitamininin meme kanseri hücre metabolizmasına olan etkileri anlaşılmaya çalışılacaktır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 Kanser

2.1.1Meme Kanseri

Vücut trilyonlarca canlı hücreden oluşmaktadır. Normal vücut hücreleri düzenli olarak büyür, yeni hücreler oluşturmak üzere bölünür ve ölürler. Hayatın başlangıcının ilk yıllarında normal vücut hücreleri kişinin büyümesi için daha hızlı bölünürler. Kişi bir yetişkin haline geldikten sonra ise hücrelerin çoğu yalnızca yıpranmış veya ölen hücrelerin yerine veya yaraları tamir etmek için bölünür.

Kanser vücudun bir bölümündeki hücrelerin kontrol dışı büyümesi ve çoğalmasıyla başlar. Birçok farklı kanser türü olmasına rağmen hepsinin ortak noktası, anormal hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalmasıyla başlamasıdır.

Kanser hücrelerinin büyümesi normal hücre büyümesinden farklıdır. Kanser hücreleri ölmek yerine büyümeye ve yeni anormal hücreleri oluşturmaya devam ederler. Kanser hücreleri diğer hücrelerin yapamayacağı şekilde dokuları istila eder ve büyürler.

Bir hücrenin kanser hücresi olabilmesi için DNA hasarı olması gerekir. DNA, her hücrede bulunur ve tüm eylemlerini yönlendirir. Normal bir hücrede DNA hasarlandığında hücre ya hasarı onarır ya da ölür. Kanser hücrelerinde ise hasarlı DNA tamir edilmez, ama olması gerektiği gibi de hücre ölmez. Bunun yerine bu hücre vücudun ihtiyacı olmayan yeni hücreler yapmaya devam eder. Bu yeni hücreler ilk hücredeki aynı hasarlı DNA'lara sahip olurlar.

Çoğu durumda kanser hücreleri tümör formu oluşturmakla birlikte, Lösemi gibi kanserler ise tümör oluşumuna nadiren sebep olurlar. Bunun yerine bu kanser hücreleri kan ve kan oluşturan organlara dahil olup büyümek için diğer dokular içinde dolaşır. Kanser hücreleri genellikle büyümek ve normal doku yerine yeni tümörler oluşturmak üzere vücudun diğer bölgelerine seyahat ederler. Bu süreç metastaz olarak adlandırılır ve kanser hücrelerinin vücudumuzun kan veya lenf damarları içine nüfuz etmesiyle gerçekleşir.

(National Cancer Institute, 2009;Steering Committee on Clinical Practice Guidelines for the Care and Treatment of Breast Cancer, 1998; Veronesi, Boyle, Goldhirsch, Orecchia, & Viale, 2005)

Farklı kanser türleri farklı davranışlar sergileyebilir. Buna bir örnek olarak meme ve karaciğer kanserleri birbirinden farklı hastalıklardır. Farklı oranlarda büyür ve farklı tedavilere cevap verirler. Bu yüzdendir ki, hastaların tanı konulan kanser türüne göre tedavi edilmeleri gerekmektedir.

Meme kanseri nedir?

Meme kanseri, memenin kötü huylu tümörüdür.Hastalık genel olarak kadınlarda görülse de erkeklerin de yakalanma ihtimali vardır.

Meme kanseri in situ (non-invaziv) ya da invaziv (meme stromasını istila eden) olarak sınıflandırılırlar. In situ meme kanserleri kanal veya lobülde oluşurken invaziv meme kanserlerinin çoğunluğu (>%95) duktal adenokarsinom, bez epitelinin kanserleridir. (Colditz et al., 2006; Kelsey & Bernstein, 1996)

Meme kanseri, tümör hücrelerinin farklılaşması ve histopatolojik olarak evre ve derecesine göre sınıflandırılır. Evre, tümör boyutu, bölgesel lenf nodu tutulumu ve uzak metastaza göre belirlenir.(Singletary & Connolly, 2006)Tedavi ve prognoz meme kanseri aşamasına göre belirlenir.(Bland et al., 1998)Meme kanserleri genellikle tanıya göre menopoz öncesi-sonrası ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2 (HER2)'nin ekspresyonuna ve östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörü (PR) pozitif veya negatif oluşuna göre sınıflandırılır. Mamografi 40-74 yaşları arasındaki kadınlar için yarar sağlayan somut delillere sahip en yaygın kullanılan tarama yöntemidir. Bunun yanında ultrasonografi, manyetik rezonans görüntüleme, tomosentez (3 Boyutlu Digital Mamografi) ve moleküler meme görüntüleme gibi teknolojiler genellikle mamografiye ek olarak değerlendirilmektedir. Meme kanser taraması meme kanserinin erken teşhisi için önemlidir. Yapılan randomize kontrollü çalışmalar sonucunda 40-47 yaş arasında kadınlarda yapılan mamografi taramasının meme kanseri nedeniyle ölümü %15-20 oranında azalttığı görülmüştür (Nelson et al., 2009). Meme kanseri teşhisi doku biyopsisinden yapılan histolojik inceleme ile kesinleştirilir. Tedavi seçenekleri evreye, hormon reseptörü bulunmasına ve tümörün diğer özelliklerine göre değişir. Meme kanserinin tedavisi cerrahi, radyoterapi, sistematik adjuvan tedavisi (kemoterapi, tamoksifen ve aromataz inhibitörleri) şeklindedir. (National Cancer Institute, 2009;Steering Committee on Clinical Practice Guidelines for the Care and Treatment of Breast Cancer, 1998; Veronesi, Boyle, Goldhirsch, Orecchia, & Viale, 2005)

2.1.2 MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattı

Bir meme kanseri hücre soyu olan MCF-7 hücreleri, 69 yaşında invaziv duktal karsinomalı Beyaz ırktan bir kadının plevral efüzyonundan 1970 yılında izole edilmiştir (Soule, Vazguez, Long, Albert, & Brennan, 1973). Hücre hattı Herbert Soule ve arkadaşları tarafından 1973 yılında Detroit'te kurulmuştur, enstütüye atıfta bulunarak MCF-7 Michigan Kanser Vakfı - 7 'nin kısaltmasıdır. Kanser araştırmacıları için MCF-7'nin öncesinde bir kaç aydan daha uzun yaşama yeteneğine sahip olan bir meme hücre hattı elde etmek mümkün değildi. Morfolojisi epitelyal olup, insülin benzeri çoğalma faktörü bağlanma proteinleri sentezler. Ayrıca WNT7B onkogeninin ekspresyonu mevcuttur. HER-2 geninin ekspresyonu normaldir. (Nieves-Neira ve Pommier, 1999) Meme kanseri ve diğer birçok insan kanserinin oluşumunda, hücre döngüsü kontrol noktalarından siklin D1"de oluşan mutasyonlar MCF-7 hücrelerinde de mevcuttur (Nagasawa ve ark 1998). MCF-7 hücre hattında kaspaz -6, -7 ve -9 ekspresyonunun yanısıra BCL-2 ekspresyonu da oldukça iyidir. Diğer yandan p53 ve p21 genlerinin ekspresyonu ve düzenlenmesi normaldir (Nieves-Neira ve Pommier 1999). MCF-7 hücrelerinin çoğalma mekanizmalarında; aşırı artmış östrojen ekspresyonu ve östrojene bağlı proliferasyon, EGF'den bağımsız çoğalma, artmış Her-2/Neu/c-ErbB-2 ekspresyonu (Rait ve ark 2001) artmış N-ras (Sutherhland ve ark 1999) ve Rb proteininin hızlı fosforilasyonu rol oynamaktadır (Botos ve ark 2002).

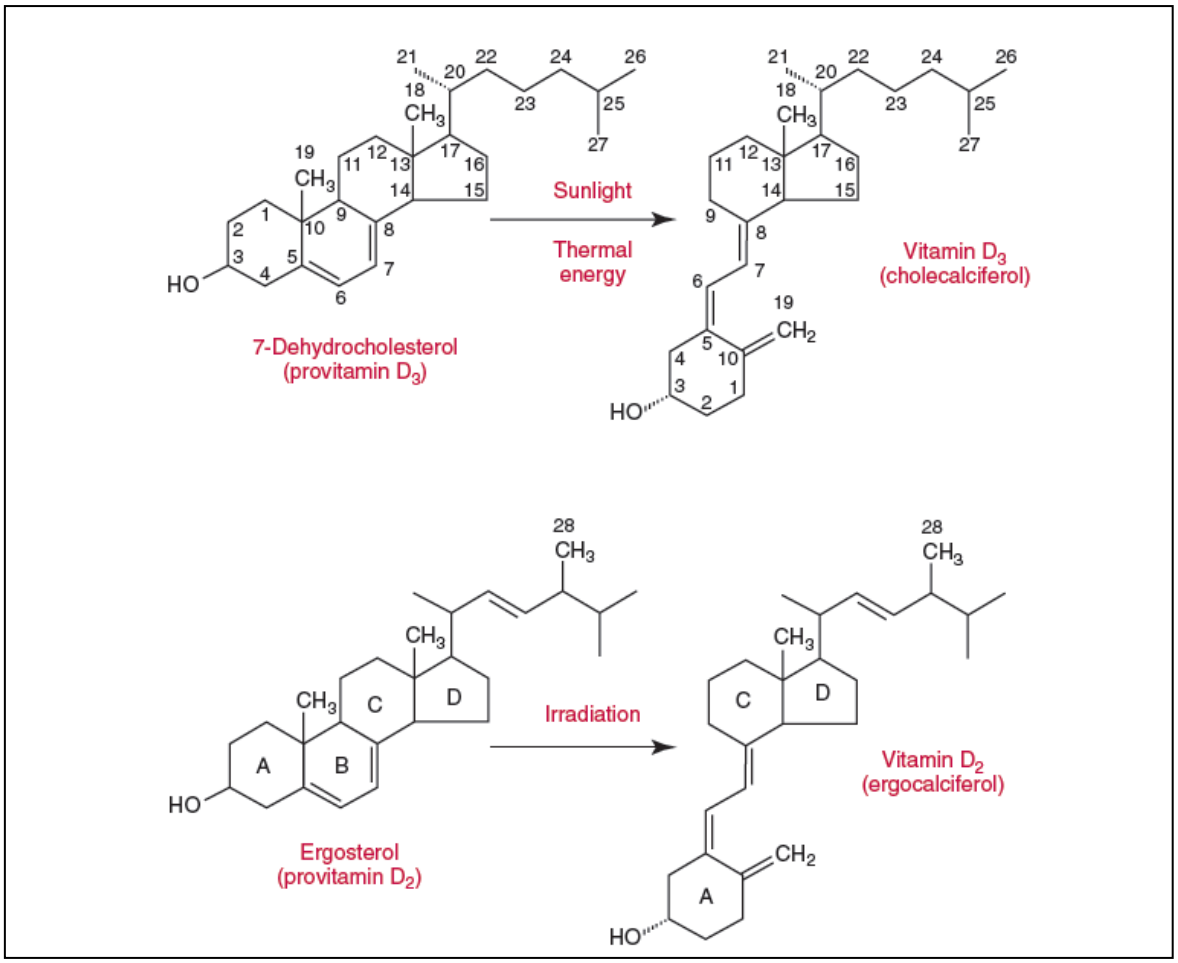
2.2 D vitaminine Genel Bakış

D vitamini, bir grup yağda çözünen steroid yapıda prohormona verilen addır. Güneş ışığının etkisiyle deride endojen olarak üretilmekte diyetle ve diyet takviyesiyle alınabilmektedir. Biyolojik olarak aktif formu 1,25 dihidroksi vitamin D (1,25$[OH]_2$D)'dir. Bilinen önemli etkisi kalsiyum homeostazı ve kemik sağlığı üzerinedir. Eksikliğinde çocuklarda raşitizm yetişkinlerde osteomalazi gelişir**.(Burtis, Ashwood, & Bruns, 2012)**

2.2.1. D vitamini Kaynakları

D vitamini ve metabolitleri kolekalsiferol (D_3 vitamini) ve ergokalsiferol (D_2 vitamini) olarak katagorize edilebir.(Şekil 1) Ana bileşik olan kolekalsiferol, 290–315 nm dalga boyundaki (UVB) ultraviole ışınlarının etkisiyle deride hayvansal kaynaklı olan 7-dehidrokolesterolden yapılır. Bu dönüşüm enlem, mevsim, yaşlanma, güneş koruyucusu kullanımı ve deri pigmentasyonundan etkilenir. Endojen üretim D vitamininin temel

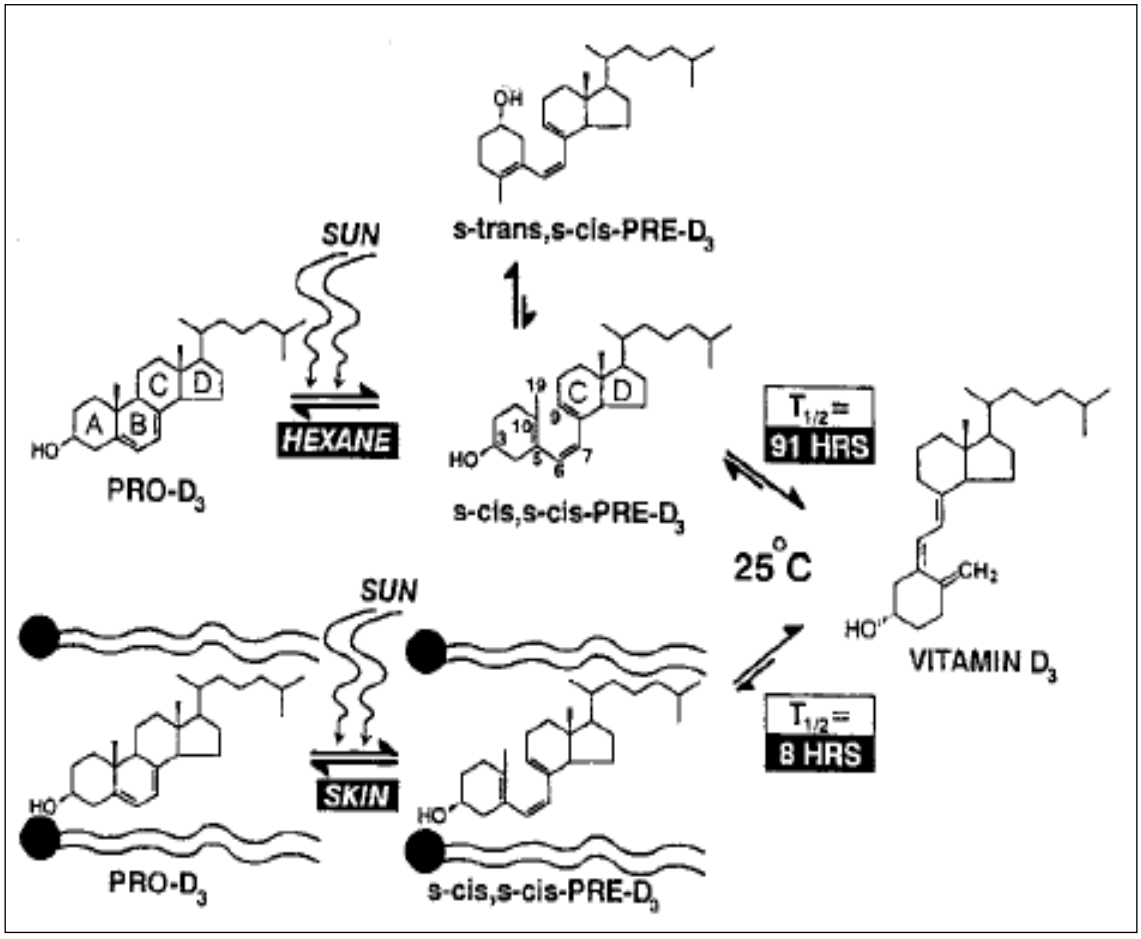
(yaklaşık %90 oranında) kaynağıdır. Ergokalsiferol ise bitkisel sterol olan ergosterolün irradiasyonuyla oluşur ve daha çok süt ürünlerinin zenginleştirilmesi amacıyla kullanılır. D_2 Vitamini 'nin D_3 Vitamin 'inden farkı, 22 ve 23. karbonlar arasında çift bağı ve 24. karbona bağlı metil grubudur. Yalnızca bazı gıdalar, öncelikle balık karaciğeri yağı, yağlı balıklar, yumurta sarısı ve karaciğer, doğal olarak önemli miktarda D vitamini içermektedir. Sonuç olarak diyet ya da besin takviyesindeki D_2 Vitamini ya da D_3 Vitaminin 'den önce ana kaynak deride sentezlenen D vitaminidir. Tavsiye edilen günlük besinle alımı (Recommended Daily Allowance, RDA) 1-70 yaş arasında 600IU, 70 yaş üstüne 800IU, gebelik ve laktasyonda 600IU'dir (Institute of Medicine IOM, 2010).(Burtis et al., 2012)



Şekil 1 D3 Vitamini (Kolekalsiferol) ve D2 Vitamininin (Ergokalsiferol) yapısı ve öncül moleküller Modified from Holick MF, Adams JS. Vitamin D metabolism and biological function. In: Avioli LV, Krane SM, eds. Metabolic bone disease, 2nd edition.Philadelphia.

2.2.2 D vitamini Sentez ve Metabolizması

Provitamin D'nin ön maddesi olan (ergosterol ya da 7-dehidrokolesterol) plazma membranının çift katlı lipit tabakası içine geçmiş 4 halkalı göreceli olarak sert bir yapıdır.(Şekil 2)



Şekil 2 Provitamin D3'ün previtamin D3'e fotolizi. Reproduced with permission from Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92:3124–6. Copyright 1995 National Academy of Sciences, U.S.A.

Güneşle temas sürecinde yüksek enerjili mor ötesi UVB ışınları (290-315nm) epidermisi geçer; epidermal keratinosit ile dermal fibroblast hücrelerinin plazma membranlarında bulunan 7-Dehidrokolesterol (7DHC) tarafından absorbe olur. Enerjinin B halkasının çift bağları tarafından absorbe olması, B halkasının açılarak çift bağların yeniden düzenlenmesiyle sonuçlanır ve previtamin D_3 oluşur. Stabil olmayan bu izomer (Previtamin D_3) termal izomerizasyon ile termodinamik daha stabil bir izomere dönüşmektedir. (Şekil 2) Bu dönüşüm süreci sırasında vitamin D_3 plazma membrandan

ekstraselüler boşluğa atılır ve dermal kapiller yatakta D vitamini bağlayıcı proteine (DBP; Vitamin D Binding Protein) bağlanarak sirkülasyona geçer. (Holick, 2004)

DBP, spesifik, yüksek affiniteli taşıyıcı protein olarak da bilinen grup *özel serum bileşeni yada Gc globülin*'dir. DBP albümin ve α-fetoprotein gen ailesine aittir. İnsanda

Tablo 1 D Vitamini ve Plazmadaki Metabolitleri.(Burtis et al., 2012)

	Konsantrasyon	**Serbest (%)**	**Yarı ömür**
Vitamin D	<0,2-20 ng/ml <0,5-52 nmol/L	-	1-2 gün
25 Hidroksivitamin D	10-65 ng/ml 25-162 nmol/L	0,03	2-3 hafta
1,25Dihidroksivitamin D	15-60 ng7ml 36-144 nmol/L	0,4	4-6 saat

458 aminoasitlik ve 51,335 Da moleküler kütleye sahiptir. Temel olarak karaciğerde sentez edilir ve serumda normalde büyük oranda 400 mg/L bulunur ve %5'den daha az D vitamini bağlama bölgesi doludur. DBP, D vitamini metabolitlerine 25(OH)D, 24,25$(OH)_2$D ve 1,25$(OH)_2$D' azalan sırayla afinite gösterir. Sadece %0,03 25(OH)D ve %0,4 1,25$(OH)_2$D plazmada serbest halde bulunur. DBP konsantrasyonu gebelik ve östrojen kullanımında artarken, nefrotik sendromda azalır.

Uzun süreli güneşe maruz kalma, aşırı miktarada previtamin D3 üretimine dolayısıyla intoksikasyona neden olmaz. Bunun nedeni, vitamin D3'ün güneşe maruz kalma esnasında alternatif iki inert izomer (lumisterol ve tachysterol) şekline veya yeniden 7-DHC'e dönüşebiliyor olmasıdır. Oluşan izomerlerin, kalsiyum metabolizması üzerine çok az etkili olduğu düşünülmektedir.

Hayvansal besinlerden alınan D_3 vitamini veya bitkisel besinlerden alınan D_2 vitamini duodenumdan ve jejenumdan emilir. D vitamini yağda eridiğinden emilimi safra ile artar. Emilen D vitaminleri DBP'ye bağlanarak lümendeki lipidlerle birlikte lenfatik kanallar yoluyla dolaşıma geçer, karaciğere gelir.

Gerek deride sentezlenen, gerek sindirim sisteminden emilen D vitamini karaciğere geldikten sonra metabolizmaları aynıdır. Karaciğere gelen D vitamini hepatosit mikrozomlarında bulunan 25-hidroksilaz enzimi (sitokrom p450), (25-OHase veya CYP27A1, CYP3A4, CYP2R1,CYP2J3 olarak da bilinmekte) aracılığı ile 25 nolu karbon (C-25) molekülü hidroksilasyona uğrar ve 25 hidroksikolekalsiferole [$25(OH)D_3$] dönüşür. Bu madde kalsidiol olarak da bilinir. Dönüşüm 25(OH)D plazma düzeyi ile ayarlanarak negatif feed-back mekanizma ile kontrol edilir (Holick, 2006). Serumdaki düzeyi yaklaşık olarak 10-65 ng/ml yada 25-162 nmol/L'dir(Tablo 1). Yarılanma ömrü 2-3 haftadır. Yaklaşık olarak 30 ng/ml 25(OH)D düzeyinde kalsiyum absorbsiyonu maksimum seviyededir. Bu yüzden 25(OH)D için gereken herhangi bir referans aralığının optimum ve sağlıklı aralığı ile karıştırılmamalıdır. Fizyolojik konsantrasyonlarada diyet kalsiyum emilimini etkileyen 25(OH)D biyolojik olarak inaktiftir. (Burtis et al., 2012)

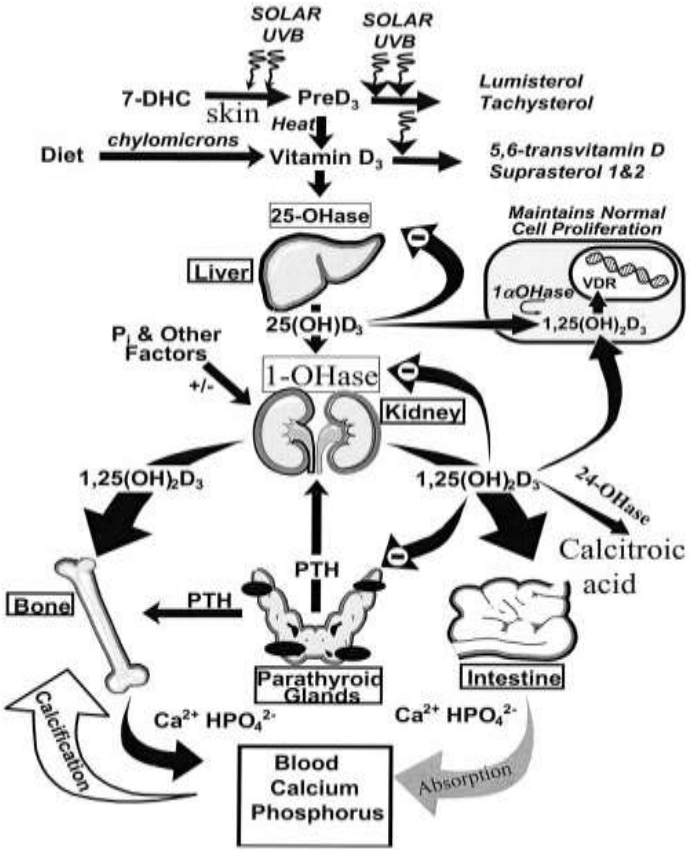
D vitamininin önemli bir kısmı 25(OH)D'ye dönüşerek kana geçerse de, az bir kısmı hepatositlerde glukoronize olup, safraya atılarak barsağa taşınır ve ileumdan tekrar emilir (enterohepatik dolaşım). Enteropatik dolaşımla karaciğere gelen D vitamini metabolitleri de karaciğerde katabolize olur.

Kalsidiol, DBP'ine bağlanarak kan yoluyla böbreğe gelir ve böbreklerde proksimal tübüler hücrelerin membranında bulunan megaline bağlanarak hücre içine geçmektedir. Hücre içinde serbestleşerek mitokondride 25-hydroxyvitamin D-1α-hydroxylase [1-OHase veya CYP27B1) olarak da adlandırılan enzimi ile ikinci kez hidroksilasyona uğrayarak, 1,25-dihidroksikolekalsiferol'e [$1,25(OH)_2D$; kalsitriol] dönüşür. Bir bölümü de 24,25 dihidrokolekalsiferole [$24,25(OH)_2D$] dönüşür. Kalsiyum ve fosfor homeostazından sorumlu D vitamininin biyolojik olarak aktif şekli $1,25(OH)_2D$ vitaminidir. Normalde sirkülasyondaki konsantrasyonu yaklaşık olarak 15-60 pg/ml ile 36-144 pmol/L yaklaşık olarak 25 (OH)D 'nin 1/1000'dir.Yarılanma ömrü ise 4-6 saattir.(Tablo1)

Kalsitriol olarak da bilinen D vitamini hücre içi bir vitamin D reseptörüne (VDR) bağlanarak etki eder. VDR, ilk defa 1979 yılında meme kanseri hücre hattında tanımlanmış olup, steroid hormon nükleer reseptörleri üst ailesine ait olan bir ligand ile aktive olan transkripsiyon faktörü olarak hareket ederek gen ekspresyonunu düzenler.(Shao et al., 2012) VDR reseptörü, D vitamini hedef hücresinin hem sitoplazma hem de çekirdeğinde bulunabilir. Fakat birçok hücrede dominant olarak nükleer proteindir (Fleet, DeSmet, Johnson, & Li, 2012). Hücre dışı kalsiyum seviyesini korumak olan ana fonksiyonuna ek

olarak VDR aktivasyonu hücre büyümesi, farklılaşması ve apoptoza neden olan 200 kadar geni etkiler.

Sirkülasyondaki $1,25(OH)_2D$ vitamini konsantrasyonu sıkı bir şekilde temel olarak PTH, fosfat, kalsiyum ve $1,25(OH)_2D$ tarafından düzenlenir.(Şekil 3) PTH ve hipofosfatemi $1,25(OH)_2D$ düzeyini 25(OH)D-1 α hidroksilaz sentezini artırarak yükseltir, oysa hipokalsemi PTH salgılanmasını uyararak dolaylı olarak etki eder. Hiperkalsemi, hiperfosfatemi ve $1,25(OH)_2D$, 25(OH)D-1 α hidroksilazı ve $25(OH)_2D$'yi azaltır. Serumdaki en yaygın dihidroksillenmiş D vitamini formu olan 25(OH)D, 24-hidroksilaz enziminin ürettiği $24,25(OH)_2D$, (24,25 Hidroksivitamin D) üretimini $1,25(OH)_2D$ vitamini uyarmaktadır. Ayrıca $1,25(OH)_2D$, 25(OH)D 24- hidroksilazı aktive ederek serumda en yaygın olarak bulunan dihidroksillenmiş D vitamini formu olan 24,25-dihydroxyvitamin D [24,25(OH)2D]'nin üretimine neden olur. Bu enzim aynı zamanda 25(OH)D kalsitroik asit oluşturarak inaktivasyonuna neden olan 24 oksidasyon yolundan sorumludur.



Şekil 3 D Vitamini Sentez ve Metabolizması, Kalsiyum, Fosfor ve Kemik Metabolizmasının düzenlenmesi. M.F. Holick / Progress in Biophysics and Molecular Biology 92 (2006) 49–59.

2.2.3 D Vitamini ve Meme Kanseriyle ilgili Pre-Klinik Çalışmalar

Meme dahil olmak üzere, vücutta çeşitli böbrek dışı dokular dolaşımdaki 25(OH)D ‘den aktif D vitamini metaboliti olan 1,25(OH)D’nin oluşumu için gerekli olan 1-α Hidroksilazı içermektedir (Zehnder et al., 2001). Dolaşımdaki 25(OH)D’nin konsantrasyonun D vitaminin aktif formunun dokuya özgü sentezini düzenlemede anahtar rolü olduğu görülmektedir (Welsh, 2007; Zehnder et al., 2001). Lokal olarak sentez edilen 1,25(OH)D meme epitelinde bulunan VDR reseptörüne bağlanarak birçok genin ekspresyonunu düzenler. Buna ek olarak meme hücreleri 1,25(OH)D’yi daha az aktif metabolit olan 24,25$(OH)_2$D’ye çevirebilen 24-Hidroksilaz enzimini (CYP24) içerir.

Birçok çalışmada ve in vitro hayvan modellerinde D vitaminin meme karsinogenezisi üzerine olan etkileri incelenmiş ve elde edilen veriler meme kanseri gelişmesinde D vitaminin koruyucu bir rolü olduğunu desteklemektedir.

2.2.3.1 Hücre Büyümesinin Durması ve Apopitoz

1,25$(OH)_2D_3$’nin MCF-7 meme kanser hücre hattında sikline bağımlı kinaz inhibitörleri örneğin p21 ve p27 ekspresyonunu arttırarak hücre döngüsünün durmasını indüklediği gösterilmiştir (Jensen, Madsen, Lukas, Binderup, & Bartek, 2001; Simboli-Campbell, Narvaez, van Weelden, Tenniswood, & Welsh, 1997). Ayrıca aktif D vitamini metaboliti, c-myc ve c-fos gibi onkogenlerin ekspresyonunu ve çeşitli büyüme faktörlerini içeren epidarmal büyüme faktörü, dönüştürücü büyüme faktörü, insülin benzeri büyüme faktörünün (IGF-1) etkilerini düzenler.(Colston & Hansen, 2002)

1,25$(OH)_2$D aynı zamanda meme kanseri hücrelerinde apoptoz ile bağlantılı morfolojik değişikliklere neden olabilir. Bu değişiklikler Bcl-2 gen ailesi tarafından düzenlenerek Bax ve Bak gibi proapoptotik proteinlere karşı Bcl-2 ve Bcl-XL gibi antiapoptotik proteinlerin nispeten düşük ekspresyon seviyelerine yol açarak apoptoza neden olur.(Colston & Hansen, 2002)

2.2.3.2 İnvazyon ve Metastazın İnhibisyonu

D vitamini kemik sağlığı için çok önemlidir. D vitamini eksikliği sonucunda yükselmiş olan PTH salgısı osteoblastik PTH reseptörünü uyararak kemik rezorbsiyonu için güçlü bir aktivatör olan nükleer faktör κB (NF-κB) ligandının ekspresyonunu artırır. D vitamini eksikliğinde nude farelerin kemiklerinde insan meme kanseri hücrelerinin kanser mikroçevresini değiştirerek büyümesini teşvik ettiği gösterilmiştir (Ooi et al., 2010)

Bazı meme kanseri hücre hatlarında 1,25$(OH)_2$D invazyon ve metastazı önleyen E-kaderin ekspresyonunu arttırmaktadır.(Q. Wang et al., 2001) Buna ek olarak 1,25$(OH)_2$D tümör invazyonunun inhibisyonuna katkıda bulunan kuvvetli antianjiyogenetik aktiviteye sahiptir. 1,25$(OH)_2$D aynı zamanda invazyon ve metastaz için önemli mediatörler olan matriks mettalloproteinazlarının (MMPs) , ürokinaz tipi plazminojen aktivatörünü, doku tipi plazminojen aktivatörünü azaltır ve plazminojen aktivatör inhibitörünü ve MMP inhibitör-1'i arttırır.

2.2.3.3 Anti-İnflamasyon

1,25$(OH)_2$D'nin çeşitli insan meme kanseri hücre hatlarında prostaglandin sentezinde önemli bir rol oynayan siklooksijenaz 2 (COX-2) ekspresyonunu azaltarak düzene soktuğu gösterilmiştir. (Krishnan et al., 2010) Aynı zamanda 15-Hidroksiprostaglandin dehidrogenaz ekspresyonunu arttırarak prostaglandinlerin biyolojik olarak inaktif keto derivatlarına dönüşümünü arttırır. Prostoglandinlerin meme kanseri gelişimi ve progresyonunda rol oynadığı öne sürülmüştür.(D. Wang & Dubois, 2004) Meme kanseri hücreleri yada onları çevreleyen dokulardan salınan prostaglandinler, hücre çoğalmasını ve apopitozis direncini teşvik ederek tümör hücrelerinin invazyon ve anjiogenezini uyarak tümör ilerlemesini teşvik eder. Meme kanserinde COX-2 ekspresyonunun yüksek olmasının artan tümör boyutu ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.(Ristimaki et al., 2002)

2.2.3.4 Östrojen Yolağı İnhibisyonu

Çeşitli çalışmalar 1,25($OH)_2$D ile östrojenin sentez ve biyolojik aktivitesinin inhibe olduğunu ortaya koymuştur.(Krishnan et al., 2010; Stoica et al., 1999) 1,25($OH)_2$D androjeni östrojene çeviren enzim olan aromataz enziminini kodlayan gen ekspresyonunu azaltarak östrojen yolunu baskılar. Aynı zamanda 1,25$(OH)_2$D östrojenin aktivitelerine aracılık eden nükleer östrojen reseptör'ü azaltır. Kombine olarak 1,25($OH)_2$D östrojen seviyelerini ve sinyallere aracılık eden reseptörlerini azaltabilir.

2.2.4 Vitamin D ve Epidemiyolojik Çalışmalar

Meme kanseri ve D vitaminine dair yapılan ilk epidemiyolojik çalışmalar güneş ışığına maruz kalma ile meme kanseri insidansı ve mortalite arasında güçlü ters bağlantılar olduğunu göstermiştir.(Shao et al., 2012) Özellikle Garland ve arakadaşları tarafından ABD eyaletlerinde yapılan bir çalışmada düşük güneş ışığına maruz kalma oranı ve yaşa

göre düzeltilmiş meme kanseri oranları arasında, Güney Batı'ya kıyasla Kuzey Doğu'da daha yüksek oranlarda olmasından hareketle, güçlü korelasyonlar olduğunu ortaya koymaktadır. (Garland, Garland, Gorham, & Young, 1990) Güneş ışığı ve meme kanseri arasındaki bağlantı diğer ülkelerde de gösterilmiştir. Buna ek olarak çeşitli çalışmalar, yaz veya sonbaharda teşhis alan ve tedaviye başlanılan meme kanseri hastalarında prognozun daha iyi olduğunu göstermiştir. Bu mevsimsel etkinin nedeni olarak tanı anında yüksek güneş ışığına maruz kalınan süre boyunca artan D vitamini sonucu olduğu varsayılmaktadır.(Porojnicu, Robsahm, Berg, & Moan, 2007; Robsahm, Tretli, Dahlback, & Moan, 2004)

İlk Ulusal Sağlık ve Beslenme ve İnceleme Taraması (NHANES) dahilinde 5009 beyaz kadın, D vitaminine maruz kalmalarını ölçmek maksadıyla yüz yüze görüşmeler ve dermatolojik muayeneler ile retrospektif kohort çalışmasına katıldılar. Güneş ışığına daha sık maruz kaldığını beyan eden kadınların, takip edilen son 17 yıl içinde hiç veya az güneş ışığına maruz kaldıklarını belirten kadınlara göre %33 daha az meme kanseri riski taşıdıkları gözlemlenmiştir. (Robsahm et al., 2004) Ayrıca ABD'nin yüksek güneş radyasyonu bölgelerinde yaşayan kadınlar arasında düşük meme kanseri oranına rastlanmıştır.(Robsahm et al., 2004) Bu çalışmanın kısıtlamalarından biri sık güneşe maruz kaldığını belirten kadınların daha az güneşe maruz kalanlara göre fiziksel olarak daha aktif ve genel olarak daha sağlıklı olma ihtimaliydi.

Hücre Ölüm Mekanizmaları

Hücre ölümünün iki alternatif şekli

Apopitozis kavramı ya da programlanmış hücre ölümü (PCD) benzersiz ve dinamik morfolojik ve biyokimyasal özelliklere sahip olmasıyla nekrozdan ayırt edilebilir. Apopitoz sıkı bir şekilde kontrol edilen ve inflamatuar yanıta neden olmayan bir tür hücre ölümüdür. Nekrozun tersine apopitoz sitozolik katabolik enzimlerin aktivasyonunu içermektedir. Bu ölüm sırasında meydana gelen pek çok hücresel değişikler, komşu fagositik hücreler tarafından tanınması ve bu hücrelerin yok edilmesinde önemli bir role sahiptir. (Boole & Cho, 2007)

Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikler

Apopitoz	**Nekroz**
• Hücrenin ve organallerin büzülmesi ve kromatinin kondensasyonu	Hücrenin şişmesi ve plazma membranın parçalanması
• Hücresel içerik sızıntısı yok	Hücresel içerik sızıntısı olur
• Apoptotik cisimler fagositler tarafından yutulur	Hücre ve çekirdeksel lizisi
• Spesifik sistein proteaz ,kaspaz aktivasyonu İnternüklezomal DNA fragmantasyonu	Nekrotik hücre yok
• Sinyal mekanizmalarıyla düzenlenir	Yetersiz bir şekilde düzenlenir
• İnflamatuar yanıta neden olmaz	Akut inflamatuar yanıta neden olur

Ölümün Fazları

Bu ölüm programı dört farklı faza ayrılabilir. Başlatma fazı sırasında hücre ölüm programının aktivasyonuna neden olan sinyalleri alır. Bağlılık fazı noktasından sonra ölüm sinyaller geri dönüşümsüz hale gelir. Amplifikasyon fazında birden çok kaspaz hücrenin yıkımı için birlikte çalışır ve son olarak yıkım fazında tam teçhizatlı aktif kaspazlar ya doğrudan ya da CAD/DFF45 gibi diğer enzimleri aktive ederek hücresel yapılar sökülmeye başlar.

Kaspaz Aktivasyon Mekanizması

Kaspazlar

Kaspazlar programlanmış hücre ölümü için gerekli olan bir grup sistein proteazdır. Sistein proteaz aktivitesi kökenine veya ölüm uyaranına bakılmaksızın apopitoz geçiren tüm hücrelerde saptanabilir. Kaspazlar interlökin-1β dönüştürücü enzim ailesi proteazlarıdır. Yüksek ölçüde *Caenerahabtidis elegans* hücre ölümü geni olan CED3 ile homologdur. Şimdiye kadar aynı ortak özellikleri paylaşan on dört tane kaspaz tespit edilmiştir, bunların hepsi aspartat spesifik sistein proteaz, hepsi bir konservatif aktif pentapeptit bölge QACXG içerir ve tüm bunların prekürsörü prokaspaz olarak bilinen zimojenlerdir. Kaspaz aktivasyonu için gereken prokaspaz içindeki prodomainin N–terminali çok çeşitli yapı içerir ve bunların hepsi kendi kendilerini ve diğer kaspazları

aktivasyon yeteneğine sahiptirler. Kaspazlar amino asit dizileri içindeki benzerliği temel alınarak üç alt sınıfa ayrılmaktadır.

Alt Sınıf I: Apopitoz Etkinleştirici/Başlatıcı Kaspaz 2, 8, 9 ve 10

Alt Sınıf II: Apopitoz İnfazcı/Efektör Kaspaz 3, 6

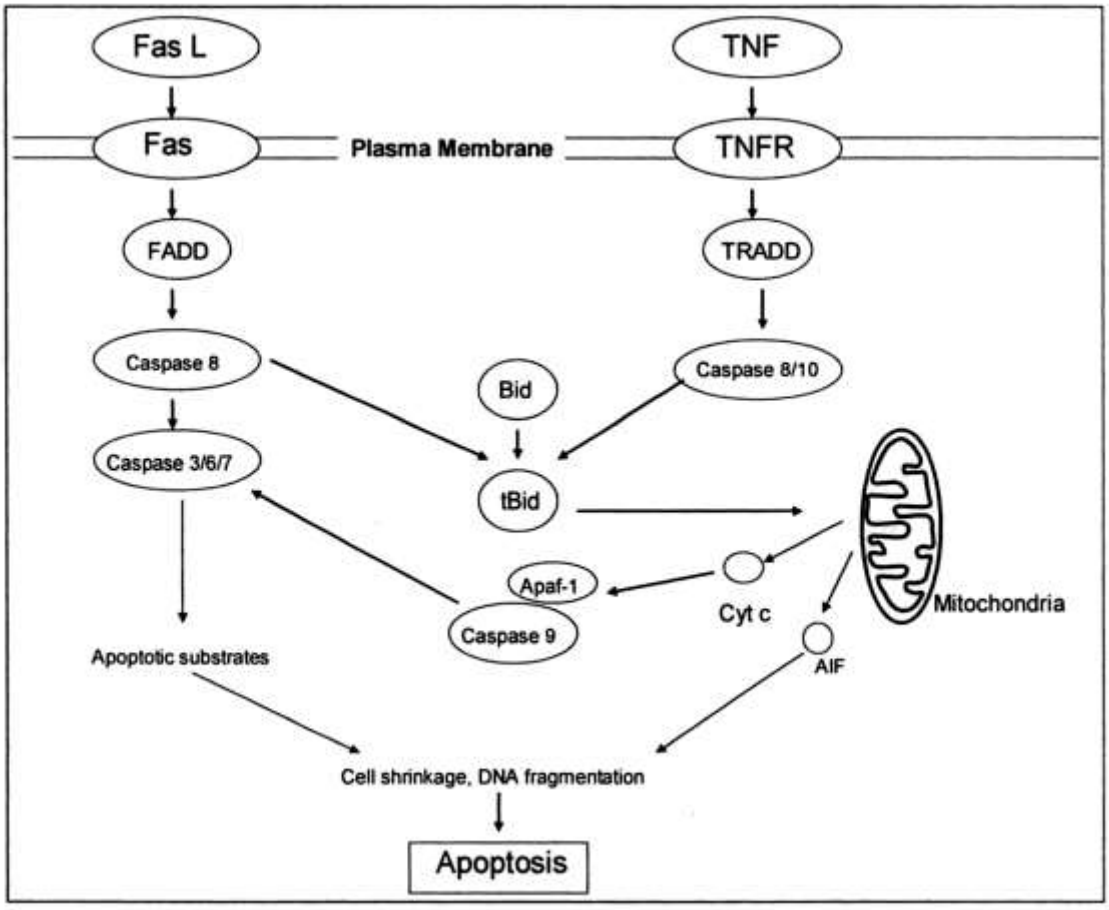
Alt Sınıf III: Apopitoz İnflamatuar Mediatör Kaspaz 1, 4, 5, 11, 12, 13 ve 14

Genel olarak kaspaz ailesinin proteazları aktive edebildiği iki yol vardır, biri ölüm reseptör aracılı yol, diğeri mitokondri aracılı yolaktır.

Ölüm Reseptör Aracılı Apopitoz Yolağı

Fas Ligand (FasL) ve tümör nekrozis faktör (TNF-2) gibi hücre ölüm sinyalleri özel olarak plazma membranında karşılık gelen Fas veya TNF-1 ölüm reseptörü tarafından kabul edilir. Bu bağlanma ile ölüm reseptörleri aktive olur. Fas ilişkili ölüm domaini (FADD) (ya da TNFR-birleşmiş ölüm domaini TRADD) bulabilir ve bu da FADD agregasyonuna ve ölüm efektör (DEDs) etki ortaya çıkmasına neden olabilir. Ölüm reseptörleri molekülleri CD95/Fas/AP 1,TNFR1, DR3/WSL/TRAMP, DR4/TRAIL-R1, DR5/TRAIL-R2,DR6, kendi sitoplazmik kuyrukları içinde ortak bir motif sergileyen hücre yüzey molekülleri TNF/NGF ölüm reseptör ailesinin alt kümesidir. Bu reseptörlerin ölüm bölgeleri reseptör kompleksine kaspazları yerleştiren seçici adaptör molleküllerini seçmekten sorumludur. Bu basit strateji büyük ölçüde kaspazların küme içinde çapraz işlemlerini kolaylaştırarak kaspaz aktivasyonu ihtimalini artırır. Bu yakınlaşmayla uyarılmış işlemin tüm ölüm reseptörleri tarafından başlatılan apikal kaspaz aktivasyon olaylarına neden olduğu düşünülmektedir. Böylece ölüm reseptörleri doğrudan kaspaz aktivasyonunu sürdürebilir. Açığa çıkan DEDs'ler prokaspaz 8 'in ön bölgesinde bulunan DEDs ile etkileşime girerek plazma zarının sitozolik tarafında lokalize Prokaspaz 8 oligomerizasyonuna neden olur. Sonra ölümü indükleyici sinyal kompleksi (DISC) olarak adlandırılan büyük molekül kompleksi meydana gelir. DISC içinde iki lineer alt birim, prokaspaz 8'den kaspaz 8'e geçişden sonra bütünleşirler. Farklı hücre tiplerinde kaspaz 8 yolağının aşağı doğru aktivasyonu değişmektedir. Tip 1 hücresinde (bazı lenfoid hücre serilerinin hücreleri) kaspas 8 kuvvetli bir şekilde aktive edilir ve doğrudan aşağı doğru prokaspazları aktive eder. Tip 2 hücrelerde ise kaspaz 8 sadece hafif şekilde aktive olduğundan prokaspaz 3'ü doğrudan aktive edemez. Ancak mitokondri aracılı yolağı sitozolde bulunan bir proapoptotik protein olan Bid'i aktif form tBid'e keserek aktive

edebilir. tBid mitokondri yolağını aktivasyonunu tetikler: sitokrom c, apopitoz uyarıcı faktör (AIF) ve mitokondriden salınan diğer moleküller apopitozun başlamasına yol açmaktadır.

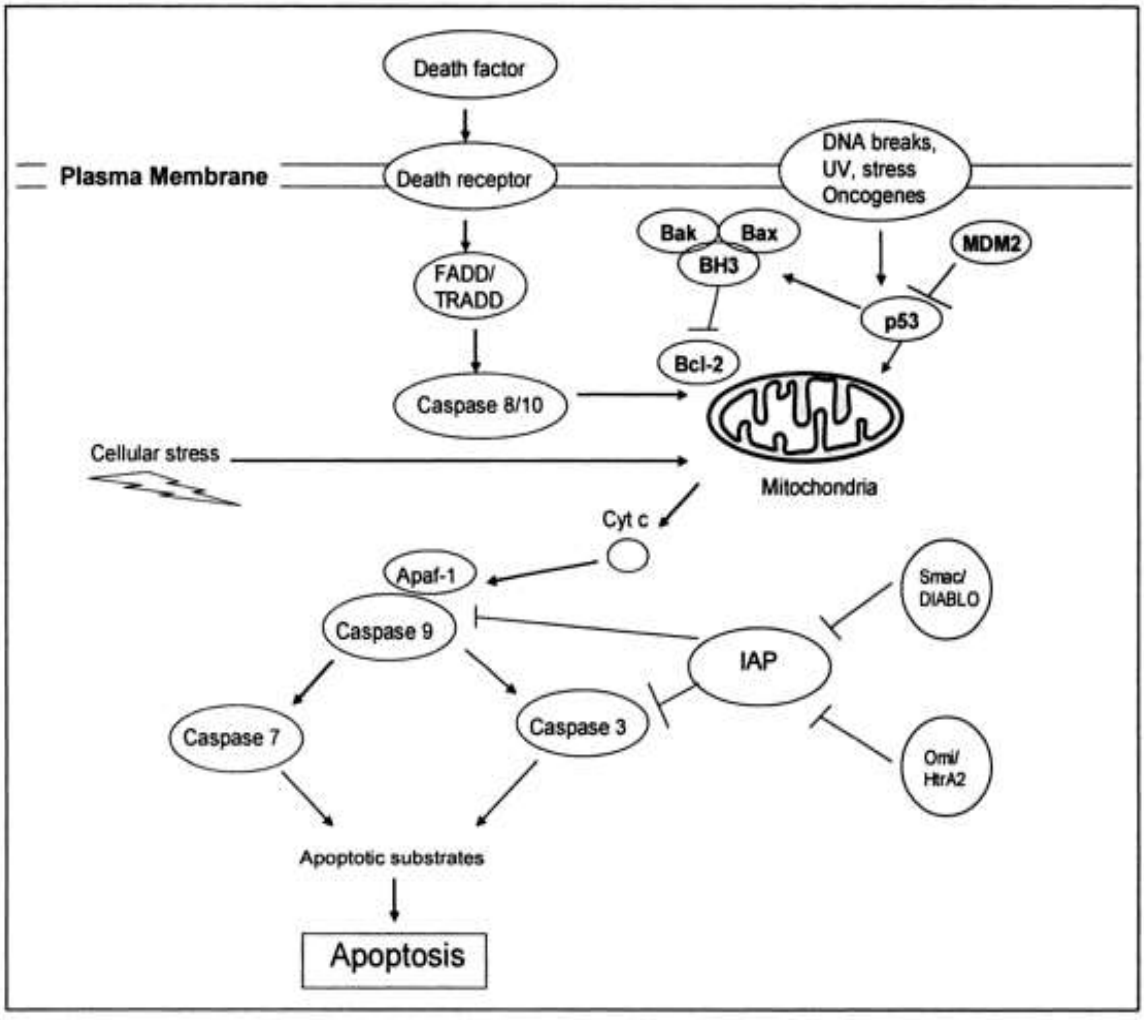


Şekil 4 Ölüm Reseptörü Aracılı Prokaspaz Aktivasyon Yolağı. AIF, apoptozu uyarıcı faktör; Apaf-1, Apopitotik proteaz aktivatör faktör-1; Cyto-c, sitokrom c; FADD, Fas ilişkili ölüm domaini; TNF Tümör nekrozis faktör; TNFR,TNF reseptör; TRADD, TNFR ilişkili ölüm

Mitokondri Aracılı Apopitoz Yolağı

Apopitozun mitokondrial yolu üzerinde mitokondrial bir işlem olan dış zar geçirgenliğinin artması önemlidir ki, bu proteinlerin mitokondrial zarlar arası boşluktan sitoplazmaya salınımına yol açar. Birçok uyaranlarla tetiklenen apoptoz içinde mitokondri çok önemli bir rol oynar. Bcl-2 gen ailesinin üyeleri ile ölüm sinyallerinin entegre ve dış zarın geçirgen hale gelmesi sonucu sitokrom c serbest bırakılması ile kaspaz aktivasyonunu koordine eder. Genel olarak Bcl-2 gen ailesinin antiapoptotik üyeleri mitokondriyal proteinlerin salgılanmasını inhibe etme eğiliminde iken proapopitotik üyeleri (BID,BAX ve BAK) serbestleştirme lehinedir. Zarlar arasındaki proteinler

sitoplazmaya salıverilir. Bunlardan biri olan holositocrom c, sitozolik bağlanan monomerik proteaz aktifleştirici faktör 1(APAF-1)'dir. Sitokrom c ile etkileşim deoksiadenozin 5 trifosfat (dATP) aracılı APAF-1'de yapısal değişim "Apoptozom" oluşturmak için APAF-1 oligomerleşmesini teşvik eder. Apoptozom sonra bir proteaz ön şekli olan kaspaz 9'a bağlanır. Apoptozom üzerindeki kaspaz 9 oligomerizasyonu proteazı aktive eder; örneğin kaspaz 9 gibi başlatıcı kaspaz sadece dimerizasyonla aktifleşebilir.



Şekil 5 Mitokondri Aracılı Kaspaz Yolağı.Apaf-1,apoptotik proteaz aktivasyon faktör;Cyto-c sitokrom c;FADD Fas ilişkili ölüm domain;TRADD Tümör nekrozis faktör aracılı ölüm reseptör domain.IAP,Apopitoz inhibitör protein

Aktif kaspaz 9 diğer iki kaspazı kaspaz 3 ve kaspaz 7 olarak böler. Aktifleşen infazcı kaspazlar, hücredeki anahtar substratlarların bölünmesi yoluyla, ölen hücrenin imhası ve fagositik hücreler tarafından paketlenmesi ile sonuçlanan apopitozisi yönetirler.

İnfazcı kaspazlar orkestrası bir kez aktive olduktan sonra apopitoz anahtar substratların bölünmesi, yıkımı ve fagositik hücre tarafından ortadan kaldırılması için ölen hücre paketlenir. Mitokondri dış membranın geçirgenliğindeki apopitosiz süreci apoptosom ve kaspazların herbirinde düzenlenir. Bunlar, proteozomal ayrışma için kaspazları bağlayan ve ubiqutinleyen apoptoz proteinlerinin inhibitörü tarafından kontrol edilir. Bunun sonucunda Inhibitors of Apoptosis Protein (IAPs) işlevleri IAPs inhibitörleri tarafından bloke edilir. Bunlar Smac (DIABLO) ve Omi (HtrA2)'dir ve IAPs'a bağlanma için kaspazla rekabet eder .Sitokrom c gibi Smac ve Omi'de mitokondrial zarlar arası boşlukta birikir ve bunlar mitokondrial dış mebranın geçirgen hale gelmesi üzerine sitozolik IAPs'ları düzenlerler.

Apopitoz çok hücreli organizmaların oldukça iyi bir şekilde düzenlenmiş, istenmeyen gereksiz ya da hasarlı hücreleri, inflamatuvar cevaba sebep olmaksızın ortadan kaldıran doğal bir süreçtir.Tipik bir yetişkin insanda milyarlarca hücre her gün apopitoza maruz kalır. Kanser hücreleri çoklu genetik bozuklukların varlığı ve maligntransformasyon, genel hücresel stresler önemli proapopitotik aktivite ile bağlantı yüksek apopitoz oranı bir çok kanser çeşidinde yaygındır.

Apopitoz hücre canlılığı için gerekli olan efektör kaspaz ve proteinlerin bölünmesi, aktivasyonu ile karakterize DNA faragmantasyonu, kromatin kondensasyonu, hücrenin büzülmesi ve hücre zarının kabarcıklaşması ile sonuçlanır. Geleneksel sitotoksik ajanlar ve radyoterapi dolaylı olarak apopitozu maniple eder.

Çeşitli raporlar apopitoz bozulması kaynaklı tümör oluşmasının tümör ilerlemesini ve tedaviye olan direnci harekete geçirdiğini göstermiştir (Edinger & Thompson, 2004). Kanser tedavilerinde seçici olarak apopitozun tetiklenmesi önemli bir hedeftir.(Call et al., 2008) Bu nedenle antikanser tedavilerinin klinik çalışmalarında erken apopitoz biyomarkırlarının izlenmesi gereklidir.

Kanser Hücresi Metabolizması

Kanser hücrelerinin metabolik özellikleri normal hücrelerden farklıdır. Kanser hücreleri çoğalmak için daha fazla aerobik glikoliz, yağ asidi sentezi ve glutaminolizis bağımlıdır(Call et al., 2008). 1956 yılında Warburg kanser hücrelerinde glikoliz oranının anormal derecede yüksek olduğunu gözlemledi. Bu 'Warburg Etkisi' kanser hücrelerinin enerji için mitokondriyal oksidatif fosforilasyondan ziyade glikozun glikolitik yolda kullanımını tercih ettiğini göstermektedir (Vander Heiden, Cantley, & Thompson, 2009)

(Kroemer & Pouyssegur, 2008). Son çalışmalar protoonkogen aktivasyonu (Myc vb.) sinyal yolları (PI3K vb) ve transkripsiyon faktörlerinin (HIF-1 vb) yanı sıra tümör supresör genlerinin (p53 vb.) baskılanmasının kanser hücrelerinde Warburg etkisine neden olduğunu göstermektedir(Vander Heiden et al., 2009). Warburg fenomeni evrensel olarak tüm kanserlere uygulanabilir olmasa da, artmış glikoz alımı pozitron emisyon tomografisi (PET) ile glukoz analoğu 2-(18F)-fluoro-2-deoxy-D-glucose (FDG) kullanılarak klinikte kanser görüntülemede yaygın olarak kullanılmaktadır. FDG-PET bilgisayarlı tomografi ile birlikte (PET/BT) bir çok epitelyal kanser metastazlarının tespiti için %90 özgüllük ve duyarlılığa sahiptir.(Mankoff et al., 2007). Kanser hücrelerinde gözlenen glikoliz artışının malign fenotipi desteklemede önemli olduğu kabul edilmektedir. (Gillies, Robey, & Gatenby, 2008)

Artmış glikoz alımının sebebi glikolitik ATP üretimi veya anabolik reaksiyonlardır ki bu tümör büyümesi için avantaj oluşturmaktadır.

İlk olarak aerobik glikoliz koşullarınada hücreler dalgalanan oksijen gerilimi koşullarında yaşayabilirler iken (Uzak kan damarlarının değişen hemodinamisi nedeni ile) bu ATP üretimi için oksidatif fosforilasyonu (OXPHOS) kullanan hücreler için ise ölümcül olurdu. (Pouyssegur, Dayan, & Mazure, 2006).

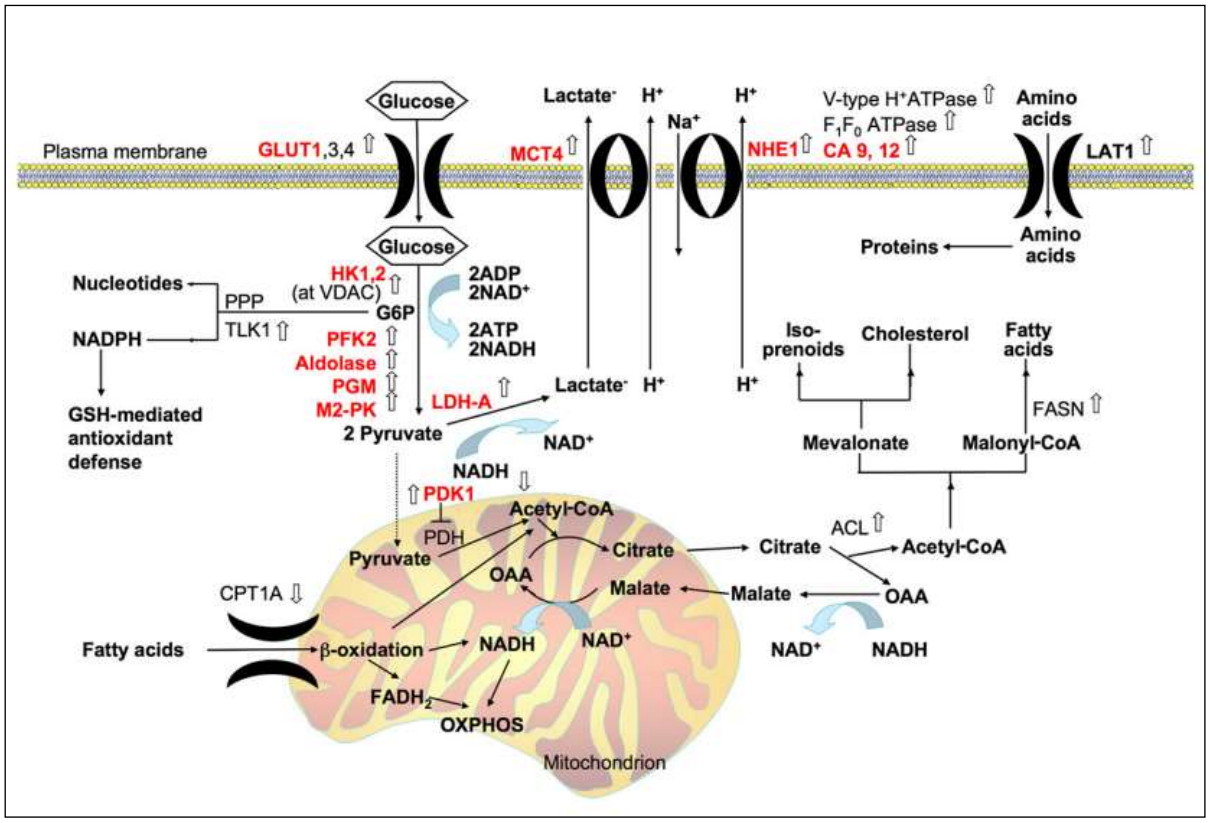
İkinci olarak kanser hücreleri karbonik ve laktik asit üretirler, aerobik glikozun son ürünü laktattır. Bu gibi asitler ve çevreleri, tümör için invazyon lehinedir ve antikanser bağışıklık efektörlerini baskılamakta kullanılır. Tümör hücreleri tarafından üretilen laktat, stromal hücreler tarafından içeri alınabilir (monokarboksilat taşıyıcıları MCT-1ve MCT-2 yoluyla) yeniden oluşturulan piruvat, kanser hücreleri tarafından ya yakıt ikmali için dışarı çıkabilir veya OXPHOS için kullanabilir. Bu düzenek bir mikrosistem içinde anaerobik bileşenler ve aerobik bileşenler oluşturur. Bu düzenleme, anaerobik komponentlerin (kanser hücreleri) ve aerobik komponentlerin (dönüşmemiş stromal hücreler) tamamlayıcı metabolik yollar izlediği, böylelikle kanser hücresinin hayatta kalmasını ve büyümesini sağlayan anaerobik metabolizmanın ürünlerini tamponlayan ve geri dönüştüren bir mikrosistem oluşturmaktadır.

Üçüncü olarak, tümörler düşman mikroçevre ve kemoterapötik ajanlara karşı hücrenin antioksidan savunmasını sağlayan Nikotinamid Adenin Dinükleid Fosfat (NADPH) meydana getirmek için glikozu Pentoz Fosfat yolu ile (PPP) metabolize edebilir (Gatenby & Gillies, 2004). Ayrıca NADPH yağ asidi sentezine katkıda bulunabilir.

PPP'nin okside olmayan parçası (ki içinde PPP'nin bir aracı olan riboz 5 fosfat, glikoliz içine katılır) transketolaz reaksiyonları tarafından kontrol edilir ve ve bu transketolaz izoformu (TKL1birçok kanser vakasında fazlasıyla yapılmaktadır.(Foldi et al., 2007)

Dördüncü ve en önemlisi, kanser hücreleri anabolik reaksiyonlar için glikolitik yolun ara metabolitlerini kullanırlar (örneğin, glikojen için glikoz-6-fosfat, riboz 5 fosfat sentezi, trigliserit ve fosfolipit sentezi için dihidroksiaseton fosfat, alanin ve malat sentezi için pirüvat). Fosfenol pirüvattan fosforu ayırıp piruvata çeviren Pirüvat kinazın (PK) embriyonik izoformu tümörlerde sıklıkla ortaya çıkmakta, adipositler hariç yetişkin dokularda rastlanmamaktadır.(Christofk et al., 2008) (Gatenby & Gillies, 2004). İlginç olarak, bu isoform (PKM2), yüksek (tetrametrik) aktiviteden düşüğe (dimerik) doğru salınır. PKM2'nin düşük aktiviteli dimerik formu ile laktat üretimi önlenirken, priuvatın biriktirilmesi, amino asitlerin, nükleik asitlerin ve lipidlerin sentezi için prekürsör olarak hazır hale getirilmesi şeklinde metabolik avantaj sağlamaktadır. Ara metabolitleri glikolitik yollardan anabolik reaksiyonlara doğru yönlendirme (en azından bir kısmını) prensibi glikolitik yoldan elde edilmiş pirüvat metabolizması için de geçerlidir. Yayılan kanser hücrelerinde pirüvat trikarboksilik asit siklusuna (TCA) girebilir. Asetil CoA mitkondriyal matriksten (**şekil 6**) dışarı atılır ve yağ asitlerinin, kolesterolün ve izoprenoidlerin sentezi için kullanılabilir hale gelir. Aslında, asetil CoA, malonil-CoA ve NADPH'tan uzun zincirli yağ asitleri sentezleyen yağ asidi sentaz (FASN), birçok kanser vakasında up regüle edilmekte veya aktive edilmektedir (H. Q. Wang et al., 2005). Benzer şekilde fosforilkolini meydana getiren kolin kinaz (ChoK), kanser vakalarında sıklıkla ortaya çıkar.(Glunde & Bhujwalla, 2007).

Böylece, metabolizmanın tamamı (özellikle glikoliz ve TCA siklusu) hücre büyümesine ve yayılmasına bağlı anabolik reaksiyonları arttıracak şekilde yeniden organize olur. Ancak, arttırılmış laktat üretimi (anabolik reaksiyonlar için kullanılabilecek karbonun net kaybı ile sonuçlanır) ile azalan PK aktivitesini (pirüvat üretimini ve dolayısıyla laktat üretimini azaltır) ve kesintiye uğrayan TCA siklusunu (pirüvat tükenmesine yol açar) uyumlu hale getirmek, kanser hücrelerindeki net glikoz tüketiminin normale göre daha fazla olmasını gerektirir ki, aksi zor olacaktır.



Şekil 6 Kanser Hücresi Metabolizması

Normal hücrelerde aerobik glikoliz, piruvatın asetil CoA'ya dönüşümü ve CO2 ve H2O'ya tamamıyla oksidasyonu (Mitokondride lokalize TCA trilkarboksilik asit döngüsü ve oksidatif fosforilazsyon yoluyla) anlamına gelmektedir. Buna karşın tümör hücrelerinde, glikoliz iki adımdan biri ile devre dışı kalma eğilimi taşır. Birincisi, tümör hücrelerindeki aerobik glikolizis, glikozun pirüvata (her glikoz molekülü için sadece iki ATP molekülü üreten) ve akabinde laktik asit olarak atık ürüne dönüşümünü ifade eder. İkincisi, tümör hücrelerinde asetil CoA, kesintiye uğrayan TCA çevriminin içine dahil olur ki bunun sonucu olarak asetil-CoA sitozole taşınır ve hücre büyümesi ve yayılımı için yapı taşı görevi görür. Bu kesintiye uğrayan TCA siklusu içinde, sitrat trikarboksilat transportörü vasıtasıyla sitozole taşınır. Sitrat, sitozolde ATP sitrat liyaz (ACL) ile oksaloasetat ve asetil CoA oluşturur. çevrelenir. Oksaloasetat malata indirgenir ve mitokondriye geri döner ve matriks içindeki oksaloasetata çevrilir (TCA'yı baskılayan NADH üretilirken) ve asetil CoA ile substrat çevrimini tamamlamak için asetil CoA ile reaksiyona girer. Yukarı ve aşağı yönleri gösteren küçük oklar, kanser bağlantılı enzimlerin sırasıyla upregülasyonunu/aktivasyonunu veya downregülasyonunu/inhibisyonunu göstermektedir. Kırmızı ile gösterilen değişikliklere HIF-1, aktivasyonu neden olabilir. CA9 ve CA12, karbonik anhidraz 9 ve 12; CPT, karnitin palmitoiltransferaz; GLUT, glukoz taşıyıcısı; GSH, glutatyon; HIF, hipoksiyle indüklenebilir faktör; IDO, idolamin 2,3-dioksigenaz; HK, heksokinaz; OXPHOS, oksidatif fosforilasyon; LAT1, L-tipi amino asit taşıyıcısı 1; LDHA, laktat dehidrogenaz izoform A; MCT, monokarboksilattaşıyıcısı; PDH, piruvat dehidrogenaz; PDK, piruvat

dehidrogenaz kinaz; PFK, fosfofruktokinaz; PI3K, fosfaditilinositol 3-kinaz; PGM, fosfoglisetatmutaz; PKM2, piruvat kinaz izoformM2; PPP, pentoz fosfat yolu; SCO2, sitokrom c oksidaz 2 sentezi; TLK, transketolaz; VDAC, voltaja bağımlı anyon kanalı.

Kanser hücreleri glikoz bağımlılığına ek olarak artan yağ asidi sentezi ve glutamin metabolizması gibi metabolik özellikler ortaya koyar. Geliştirilmiş yağ asidi sentezine bağlı tümör hücreleri membran biyogenezi, kanser hücrelerine hızla büyüme ve hayatta kalma avantajı kazandırır.(Pandey, Liu, Xing, Fukuda, & Watabe, 2012). Benzer şekilde kanser hücreleri glutamin yoksunluğuna son derece duyarlıdırlar ve glutaminsiz kültür içinde çoğalamazlar. Hızlı çoğalan hücreler için gerekli ürünlerin üretiminde artış örneğin aminoasit ön maddeleri gibi 'glutamin bağımlılığı'ile sonuçlanır.1979 yılında Reitzer ve arkadaşları şeker olmayan gulutaminin HeLa hücre kültüründe önemli enerji kaynağı olduğunu rapor etmişlerdir.

Kanser metabolizması açısından değerlendirelen bir başka parametre olan L-karnitin (trimetilamino-b hidroksibutirat) serbest karnitin ve açilkarnitin hem de asetil L-karnitin de dahil olamak üzere hücre ve dokularda mevcuttur. L-karnitin tüm memeli türlerinde doğal olarak oluşmuş olan endojen bir bileşiktir ve en yaygın bilinen fonksiyonu β –oksidasyon için mitokondriye uzun zincirli yağ asitlerinin önemli bir taşıyıcısı olmasıdır.

Karnitin yağ asitlerinin β –oksidasyonunda yer alan önemli bir metabolit iken, aynı zamanda birçok karboksilik asit ile ester oluşturma yeteneği nedeniyle diğer metabolitlerin taşınmasında da önemli olabilir.(Jones, McDonald, & Borum, 2010)

2.GEREÇ VE YÖNTEM

2.1.GEREÇLER

2.1.1 Cihazlar ve Laboratuvar Gereçleri

- CO_2 inkübatörü: SANYO O_2/CO_2 INCUBATOR MCO-175M
- Laminar akımlı kabin: Steril VBH Compact
- Santrifüj: Sigma 3K30
- Işık mikroskobu: LeicaDmilLed (invertedmicroscop)
- Buzdolabı (+4 °C ve -20°C): ALTUS AL 302
- -40°C buzdolabı: SANYO MDF-U425
- -80°C buzdolabı: SANYO MDF-U5186S
- Azot tankı: LS 750 Las Systems Taylor-Wharton
- xCELLigence® Gerçek Zamanlı Hücre Elektronik Algılama Cihazı: Roche Diagnostics GmbH, Penzbeerg, Germany
- E-PLATE 16: ACEA biosciences, Inc. Cat no: 05469813001
- Sıcak su banyosu: Wise Bath fuzzy systems
- Thoma lamı: IsoLab, Tiefedepthprofendeur 0,200mm
- Steril filtre: 0,45µm Lot No: N0403113103
- Flask: TC Flask,75 cm^2,Canted Neck, Anti-Tip, Plug Seal, Sterile (CORNİNG,CC430720)
- Falcon tüp: 352098 Blue max™ 50ml polypropyleneconicaltube 30x115mm style
- Kriyo tüp: REF:C12ARBIPS
- Serolojik pipet: Corning® Costar® Stripette® serological pipettes, bulkpacked (5 ve 10 ml)
- Mikropipet (1000, 200, 10µl): Gilson
- HPLC (High Performance Liquid Chromatography): Shimadzu DGU-20A3R
- Spektrofotometre: Perkin Emler Lambda 25 UV/Vis Spectrometer
- Kolon: Vertical VertiSep™ GES C18 HPLC column, 4,6x150 mm, 5µm

2.1.2 Kimyasallar

- 1α,25-Dihidroksivitamin D_3: Sigma-Aldrich D1530 10µg(min %99HPLC)
- Etanol: Merck K38169483 750 -2500ml (%99,9)
- Tris: Merck K38173887-500 g

- $C_6H_5Na_3O_7$. $2H_2O$: Merck A570048438-1Kg
- ATP: Sigma-Aldrich A7699-1g
- ADP: Sigma-Aldrich A2754-100 mg
- AMP: Sigma-Aldrich A1752- 5g
- KH_2P0_4: Merck A0047373 923- 1kg
- KOH: Merck B0201933 811-1 kg
- KC1: Sigma-Aldrich 12636-1 kg
- $C_4H_4KNaO_6.4H_2O$: Merck A875387811-1 kg
- Na_2C0_3: Sigma-Aldrich S7795-500 g
- $CuS0_4.5\ H_20$: Merck A897690 739-1 kg
- Folinciocalteu's fenol: Merck HC140610-1 lt
- Cell Lysis Buffer Solution: Merck MSP010065
- NaOH: Sigma-Aldrich S8045- 500 g
- BSA (Bovin Serum Albumin): Sigma-Aldrich A9418-10 g
- Triton X-100: Sigma-Aldrich-X100- 100 ml
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) : Biological Industries Kibutz Haemek Israel cat no:01-l A (500 ml)
- Penisilin-Streptomisin: Penicillin-Streptomycin Solution 10,000 units/ml Penicil (BİO-IND,BI03-031-1C) (20 ml)
- Glutamin-L-glutamin Solution, 29.2mg/ml in Saline) (200 mmol)(BI0.IND,BI03-020-1B) (100 ml)
- Fetal Bovin Serum (FBS): Foetal Bovine Serum (FBS) European Grade Heat Inactivated (BI0-IND,BI04-127-1B) (100ml)
- Phosphate Buffered Saline (PBS): Biological Industries Kıbutz Haemek Israel Cat No:02-lA(500 ml)
- Tripsin-EDTA: Trypsin EDTA, Solution C (0.05%) EDTA (0.02%), with Phenol(BIO. IND, BI03-053-lB) (100 ml)
- Metanol Sigma: 34885-2,5L-R (lot: S2BD126SV)

2.2 YÖNTEM

2.2.1 Hücre Kültürü

D vitamininin meme kanseri hücresi proliferasyonuna olan etkilerini gözlemlemek amacıyla MCF-7 insan meme adenokarsinom hücre hattı kullanılmıştır. MCF-7 hücreleri

epitelyal ve östrojen reseptör pozitifdir. MCF-7 hücre serisi ATCC ‘den (American Type Culture Collection) alınmıştır.

MCF-7 hücreleri nemlendirilmiş, %5 CO_2 içeren ve 37°C’lik atmosferde, %10 FBS ve %1 PSG içeren DMEM besi yerinde kültüre edilmiştir.

Hücrelerin pasajlanması %70-80 konflüent olduktan sonara, tripsin-EDTA uygulamasıyla kaldırılması ve 2500 rpm’de 3 dakika santrifüj edilerek 75 cm^{2}’lik flasklarda besi yerine alınması şeklinde yapılmıştır.

Hücre stoklanması ise tripsinlenen hücrelerin, santrifüjden sonra besi yerinin uzaklaştırılması, %10 DMSO ve %90 FBS içeren solüsyonla karıştırılması ve 1,5 ml’lik kriyo tüplere alınarak -170°C’de sıvı azot tankına konularak saklanması şeklinde gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde depolanan hücreler gerektiğinde hızlıca 37 °C’de çözülüp, üzerine 3 ml besi yeri ilave edilerek santrifüj edilmiştir. Süpernatan atılıp, hücre pelleti tekrar 1 ml besi yerinde çözülerek, petri kabında taze besi yerine pasajlanmıştır.

Hücre sayımı için, tripsinlenen hücreler 2500 rpm’de 3 dk santrifüj edildikten sonra kalan hücre pelleti, içinde 1-2 ml besi yeri olan tüpe aktarılarak hücre sayımı Thoma lamında yapılmıştır.

2.2.1.2 Gerçek Zamanlı Hücre Elektronik Algılama Sistemi

xCELLigence (Gerçek Zamanlı Hücre Elektronik Algılama Sistemi) sistem, hücre mönitörizasyonunun belirlenmesi için hassas, kantitatif, dinamik ve eş zamanlı çalışan bir sistemdir. Elektrik empedans okuma yoluyla eş zamanlı olarak hücre canlılığı ölçümüne izin verir. Sistem; elektronik sensör analizörü, cihaz ve 16 ya da 96’ lık e-platelerden olmak üzere üç bileşeni kapsar. Plateler, kuyu tabanlarına gömülmüş uygun geometriye sahip mikro elektrotlardan oluşur. Bunun tersine diğer empedans sensörleri kuyunun yüzey alanının %80’ini kaplar. Bu sistem hücre sensör elektrot merkezli olarak geliştirilmiştir. İnkübatör içinde bulunan cihaza plateler yerleştirilir ve yazılım kontrolü altında, sensör analizörü ölçüm için kuyuları otomatik olarak seçer. Bu sistem e-platelerdeki hücrelerin bulunduğu kuyuların altında, birleşik haldeki mikro elektrotlar üzerindeki elektrik empedansını sürekli ölçer. Empedans verisi bilgisayara gönderilir ve yazılım tarafından aşağıdaki formülle analiz edilir.

$$CI = \max(i = 1 \dots N)\ ((R(hücre(fi))/Rb(fi) - 1)$$

N= empedansı ölçülen frekans noktalarının sayısıdır.

R (hücre)= hücrenin bulunduğu kuyunun hücre elektrot empedansıdır

Rb = medyumun bulunduğu kuyunun empedansıdır.

2.2.1.3 D vitamininin MCF-7 Hücre Proliferasyonuna Etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Elektronik Algılama Sistemiyle Belirlenmesi

D vitamini, 10^4 nM olacak şekilde %99,9'luk etanolde çözüldü, 0,2 µm çaplı steril filtreden geçirilerek eşit şekilde ayrılarak sıvı azotta saklandı. İstenilen dozlar bu D vitamini stoklarından dilüsyon yapılarak hazırlandı.

E-platelere önce 100'er µl DMEM koyuldu, ardından hücre sayımı yapıldıktan sonra her bir kuyucuğa 1.10^4 hücre olacak şekilde hücre eklendi. MCF-7 hücreleri, belirlenmiş olan D vitamininin doz grupları (10nM,100nM, 250nM,500nM,1000nM) ile 24 saat sonra muamele edildi. Hücre sayısındaki değişiklikler, 72 saat boyunca her 15 dk'da bir inkübatör içindeki xCELLigence® cihazı ile gözlemlendi.

2.2.1.4 Hücrelerin ATP, ADP ve AMP Ölçümüne Hazırlanması

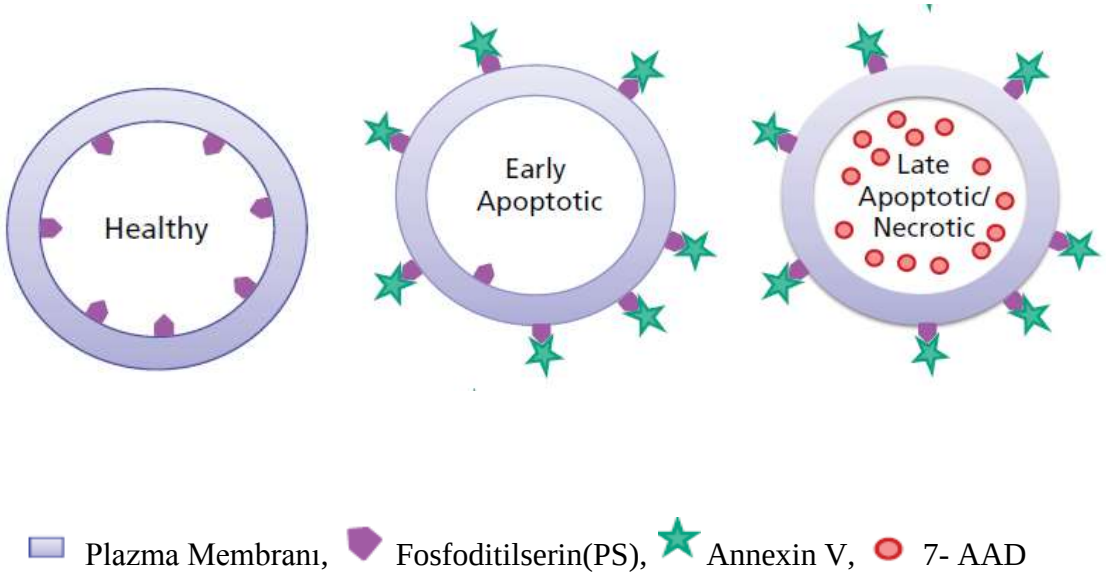
D vitamini verilen hücrelerin proliferasyon eğrisi grafiklerinden IC_{50} (hücrelerin %50' sini öldüren madde miktarı) değerleri belirlendi. IC_{50} değeri 145 µM olarak hesaplanmıştır. Hücre grupları D vitamini ve kontrol gurupları 24, 48 ve72 saat olmak üzere oluşturuldu. 145 µM dozunda ve kontrol grubu için 2'şer adet 100 cm^2'lik petri kabına,10^6 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. D vitamini uygulanacak petri kaplarındaki hücreler ekim işleminden 24 saat sonra 145 nM D vitamini ile muamele edildi. Kontrol grubunun ise sadece DMEM'i değiştirildi. Hücrelere D vitamini uygulandıktan sonra 24. 48. ve 72. saatlerde hücreler tripsinize edildi, PBS'le yıkandı ve 1 ml filtreden geçirilmiş hücre lizis buffer çözeltisi eklenerek -80˚C'ye kaldırıldı.

Hücrelerin enerji düzeylerini ölçmeden önce ön işlemler yapıldı. -80°C'den çıkarılan hücreler, sonikatörde 30 dk süreyle parçalandı. Parçalanan hücreler 14.000 rpm'de 30 dk süreyle santrifüj edildi. Süpernatanı alınıp filtreden geçirildi ve numuneler cihaza verilmeye uygun hale gelmiş oldu. Numuneler cihaza verilmeden önce hücrelerin protein miktarı Lowry yöntemiyle analiz edildi.

2.2.1.5 Flow Sitometri Analizi ile Apopitoz Ölçümü

MCF-7 hücre apopitozu Annexin V- FITC (fluorescein isothiocyanate) ve 7-AAD (Aminoactinomycin D) (BioVision Research Products, California, CA, USA) boyama

kiti kullanılarak akım sitometresinde analiz edilmiştir. Plazma membranı asimetri kaybı apopitozun erken belirtilerinden biridir. Apopitotik hücrelerde membran fosfolipid fosfotidilserini (PS), plazma zarının iç kısmından dış yüzeye çıkmaktadır. Annexin V, 35-36 kDa ağırlığında PS için yüksek affiniteli Ca^{+2} bağımlı fosfolipid bağlayıcı proteindir ve apopitotik hücre yüzeyindeki PS'e bağlanır. Annexin V, PS için afinitesini korurken florokromlarla konjuge olabilir ve bu şekilde apopitozis esnasında hücrelerin sitometrik analizi için hassas bir prob görevi görür. (Şekil 7)



Şekil 7 Apoptoz Değerlendirmesi, Sağlıklı ve İşaretli Apoptotik Hücreler

7-AAD ise nükleik asit boyasıdır ve ancak membran bütünlüğü bozulmuş yani geç apopitotik ve nekrotik hücrelerin tespitinde kullanılmaktadır. Anneksin-V ve 7-AAD beraber kullanıldığında, erken apoptotik hücreler anneksin-V ile boyanırken, apoptotik veya geç apoptotik hücreler hem anneksin-V hem de 7-AAD ile boyanırlar. Canlı hücreler ise anneksin-V ve 7-AAD ile boyanma göstermezler. Ölü ve nekrotik hücreler ise sadece 7-AAD ile boyanma gösterirler.

Doz ve kontrol grupları için 10^6 adet hücre 2 adet 100 cm^2 lik petri kabına ekildi. Sonra doz gruplarına 145 µM D vitamini, kontrol gruplarına ise yalnızca DMEM uygulaması yapıldı. Uygulamayı takip eden 24 saat ve 48 saat sonrasında hücreler tripsinize edildi. Hücreler PBS ile 3 kere yıkandıktan sonra 1ml antikor bağlayıcı solüsyon eklendi. Bu karışımdan 100 µl analiz tüplerine alınıp 10µl 7AAD ve 5µl Annexin V reaktifi eklendi ve vortekslenerek 15dk oda sıcaklığında karanlıkta inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası 400µl bağlayıcı solüsyon ilave edilerek 1 saat içinde analiz yapıldı.

2.2.1.6 Hücrelerin LC/MS/MS Cihazında Amino asid ve Açil Karnitin Ölçümü

Doz ve kontrol gurupları için 10^6 adet hücre 2 adet 100cm^2'lik petri kaplarına ekildi. 24 sonra doz guruplarına 145 µM D vitamini, kontrol gruplarına ise yalnızca DMEM uygulaması yapıldı.Uygulamayı takip eden 24 saat ve 48 saat sonrasında hücreler tripsinize edildi ve PBS ile yıkandıktan sonra 1 ml filtreden geçirilmiş hücre lizis buffer çözeltisi eklenerek -80˚C'ye kaldırıldı.

Hücreler -80°C'den çıkarıldıktan sonra, sonikatörde 30 dk süreyle parçalandı ve 14.000 rpm'de 30 dk süreyle santrifüj edildi. Süpernatan alınıp filtreden geçirildikten sonra NBS kağıtlarına emdirilerek bir gece bekletildi. Ertesi gün numuneler aşağıda tarif edildiği gibi hazırlanarak (LC/MS-MS API 3200) analiz edildi.

- Plate Kuyucuklarına Punch makinesiyle kuru hücre punçlanır.
- Kuyucuklara 200 µl hazırlanmış standart mix'den eklenir.
- Platelerin ağızı kendi kapakları ile kapatılır. Şeykıra konulur (37°C 26 Dakika)
- Çözücü standartı boş kuyucuklara aktarılır.
- Plate uçurma düzeneğine yerleştirilir. Azot gazı ile uçurma yapılır.
- Uçurma işleminden sonra türev solüsyonundan (1:10 Asetil klorid-Butanol) 60µl eklenir.
- Plate ağzı kapatılarak etüve yerleştirilir (15dk 65°C)
- Plate uçurma düzeneğine yerleştirilir. Azot gazı ile uçurma yapılır.
- 100µl çözücü solüsyonu ilave edilir.(1:4 Asetonitril/Su)
- Plate 20 saniye masa üzerinde hafifçe sallanır.
- Plate otomatik numune alanına (oto sampler) yerleştirilir. Enjeksiyon yapılır.

2.2.1.7 Hücrelerin Protein Analizi

Protein analizi Lowry (Lowry 1951) metodu kullanılarak yapıldı. Buna göre;

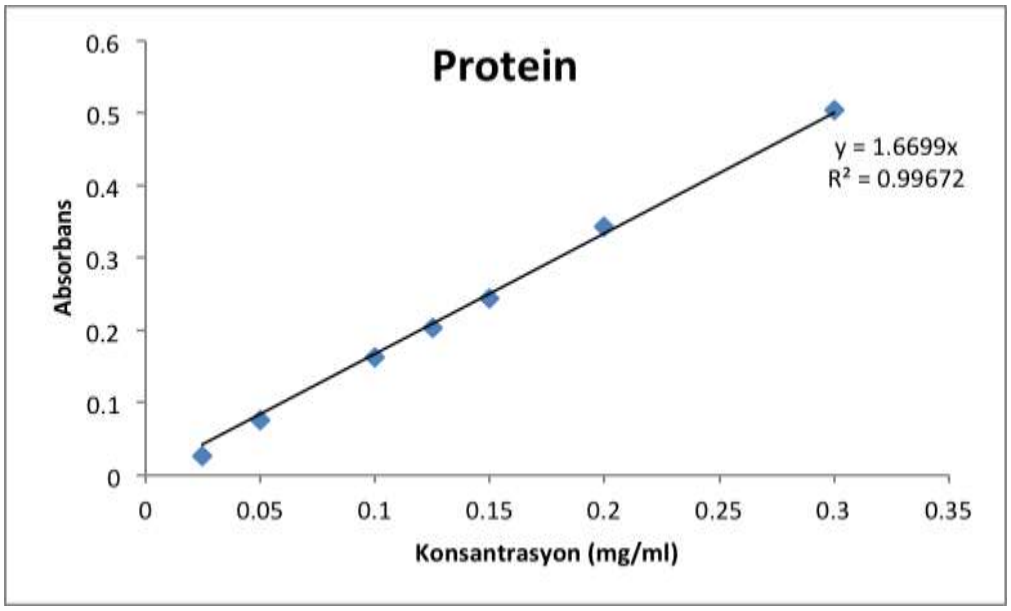
✓ A reaktifi; 1 g sodyum-potasyum tartarat ve 0,5 g $CuS0_4.5H_20$ 100 ml distile suda çözülerek hazırlandı.

✓ B reaktifi; 20 g Na_2C0_3 ve 4 g NaOH bir litre distile suda çözülerek hazırlandı.

- ✓ C reaktifi; 50 ml B reaktifi içerisine 1 ml A reaktifi eklenerek hazırlandı.

Protein analizinde standart olarak Bovine Serum Albumin (BSA) kullanıldı. BSA'nın stok çözeltisi 1 mg/ml olacak şekilde distile suyla hazırlandı. Diğer standartlar da (0,025-0,05-0,1-0,125-0,15-0,2-0,3 mg/ml), hazırlanan bu çözeltiden distile suyla dilüsyonlar yapılarak hazırlandı. Çalışma aralığına uygun konsantrasyonda hazırlanan 0,2 ml'lik numune çözeltileri, kör ve protein çözeltilerinin her birine 1 ml C reaktifi katıldı. Çözeltiler vortekslenerek 10 dakika beklendi. Daha sonra çözeltilere 0,1 ml Folin reaktifi eklenerek tekrar vortekslenerek 30 dakika karanlıkta bekletildi. Ardından 700 nm'de köre karşı spektrofotometre cihazında tüm numunelerin absorbansları ölçüldü. Son olarak

standart eğri grafiği hazırlanarak örneklerdeki protein derişimi hesaplandı



Şekil 8 Protein standartlarına ait standart eğri ve doğrusallık denklemi.

2.2.1.8 Hücrelerin Enerji Düzeylerinin Ölçülmesi

Hücrelerin enerji düzeyleri, Çimen ve ark 2004'te yaptığı bir çalışmadaki metod kullanılarak ölçülmüştür. Mobil faz, içinde 160 mM KH_2PO_4 ve 100 mM KCI içeren solüsyonun pH'ı doygun KOH ile 6,5'a ayarlanarak, 0.45 µm'lik selüloz asetat filtreden süzülüp degaze edilerek hazırlandı. ATP, ADP ve AMP'den hem tek standartlar şeklinde, hem de mix standartlar şeklinde farklı konsantrasyonlarda çözeltiler distile suyla hazırlandı. Hücrelerin ATP, ADP ve AMP değerleri HPLC'de ölçülmüş ve enerji hesabı ATP, ADP ve AMP'nin tek tek protein sonuçlarına oranlanmasıyla bulunmuştur.

HPLC cihazı ATP, ADP ve AMP analizi için uygun çalışma koşullarına ayarlandı. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan ATP, ADP ve AMP standartları HPLC sistemine verildikten sonra, piklerin ortaya çıkış zamanı, uygun mobil faz bileşeni ve uygun akım hızı saptandı.

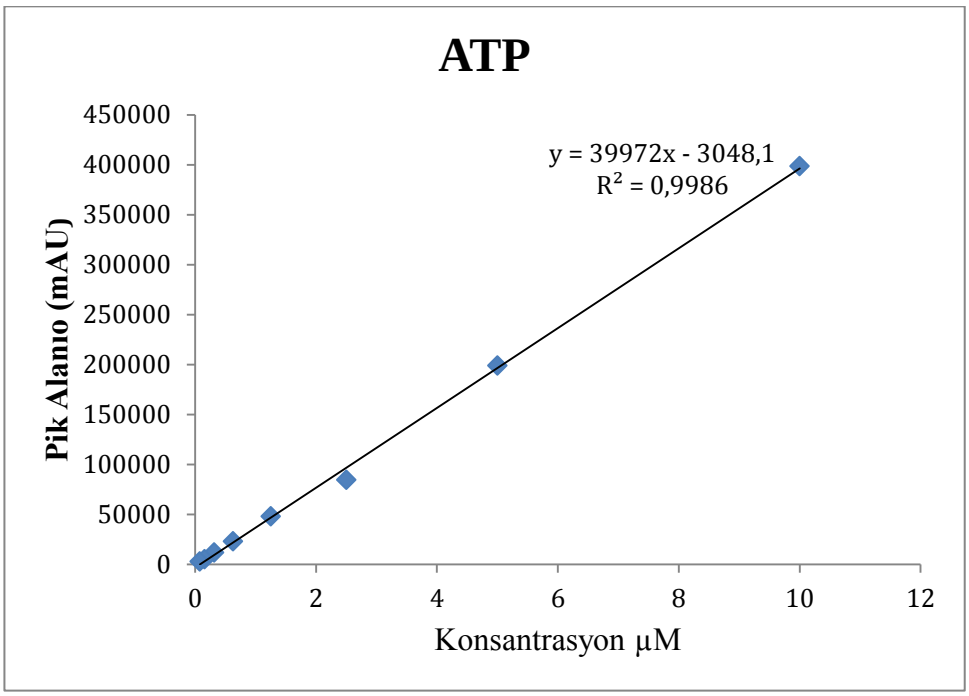
Tablo 2 Enerji Düzeyi Çalışmasının HPLC Çalışma Koşulları

Çalışma Koşulları	Sistem Parametreleri
HPLC modeli	Shimadzu DGU-20A3R
Dedektör	UV dedektör
Mobil faz	160 µM KH_2P0_4-100 µM KCl_2 içeren çözelti Ph=6,5
Analitik kolon	GES C18 HPLC column, 4,6x150 mm, 5 µm
Dalga boyu	254nm
Akım hızı	1ml/dk
Numune hacmi	50 µL
Çalışma süresi	15 dk
Ayırım	Ters faz iyon değişimi

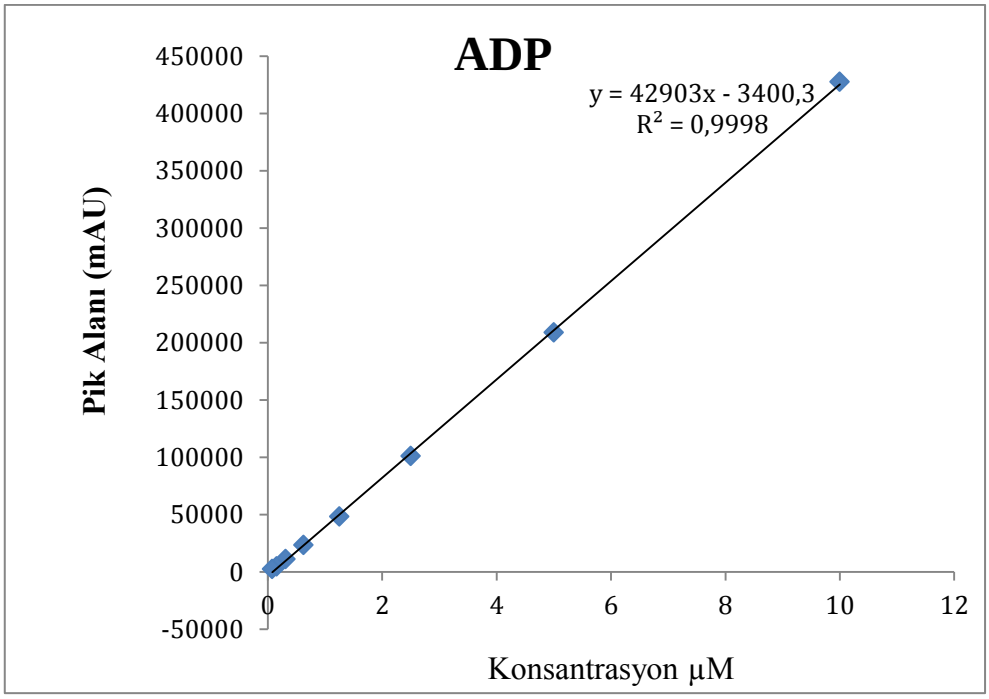
Değişen konsantrasyonlarda hazırlanan ATP, ADP ve AMP standartları önce tek tek sisteme enjekte edilerek retansiyon süreleri belirlendi. Daha sonra mix standartlar HPLC sistemine verilerek piklerin ortaya çıkış zamanı, uygun mobil faz bileşeni ve uygun akım hızı saptandı. Standart çalışmalardan elde edilen pik alanları esas alınarak, ATP, ADP ve AMP standart eğrileri çizildi.

ATP, ADP ve AMP için 10, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312, 0.156, 0.078, µM konsantrasyonlarında hazırlanan standartlar HPLC sistemine verildikten sonra, piklerin ortaya çıkış zamanı, uygun mobil faz bileşeni ve uygun akım hızı saptandı. Standart çalışmalardan elde edilen pik alanları esas alınarak, ATP, ADP ve AMP standart eğrileri çizildi. ATP, ADP ve AMP standart eğri ve doğrusallık denklemleri sırasıyla **Şekil 10 , Şekil 11 ve Şekil 12**'de gösterilmiştir. Şekil 13'de ATP, ADP ve AMP mix standartlarının kromotogramı görülmektedir. Elde edilen standart değerlere göre, numunelerden elde edilen pik alanlarından ATP, ADP ve AMP konsantrasyonları hesaplandı. Önceden hazırlanan hücreler de standartların ardından cihaza verildi ve standartlara göre

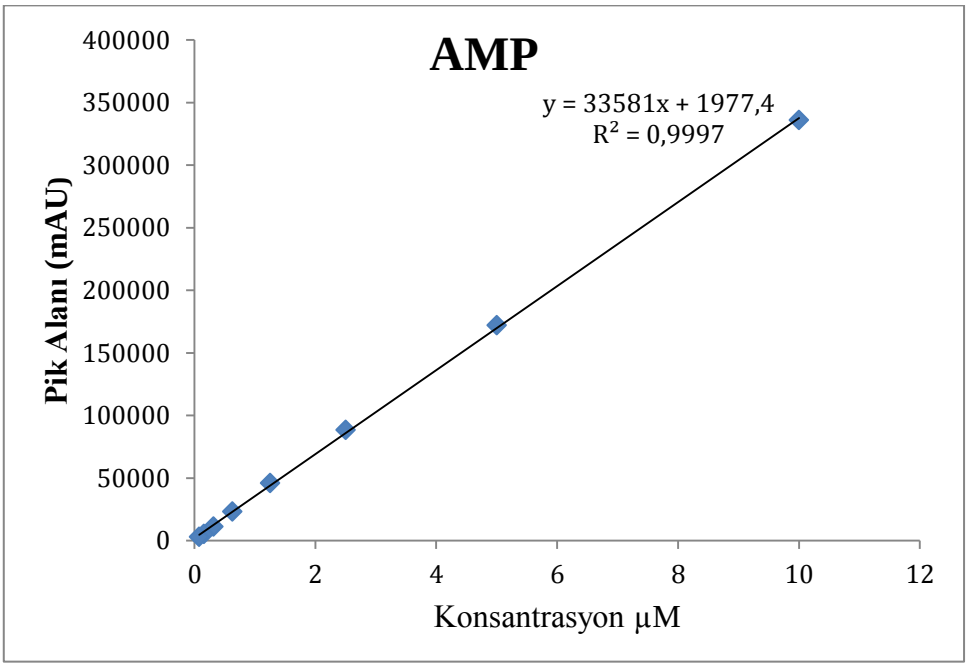
numunelerin pik alanları değerlendirildi.



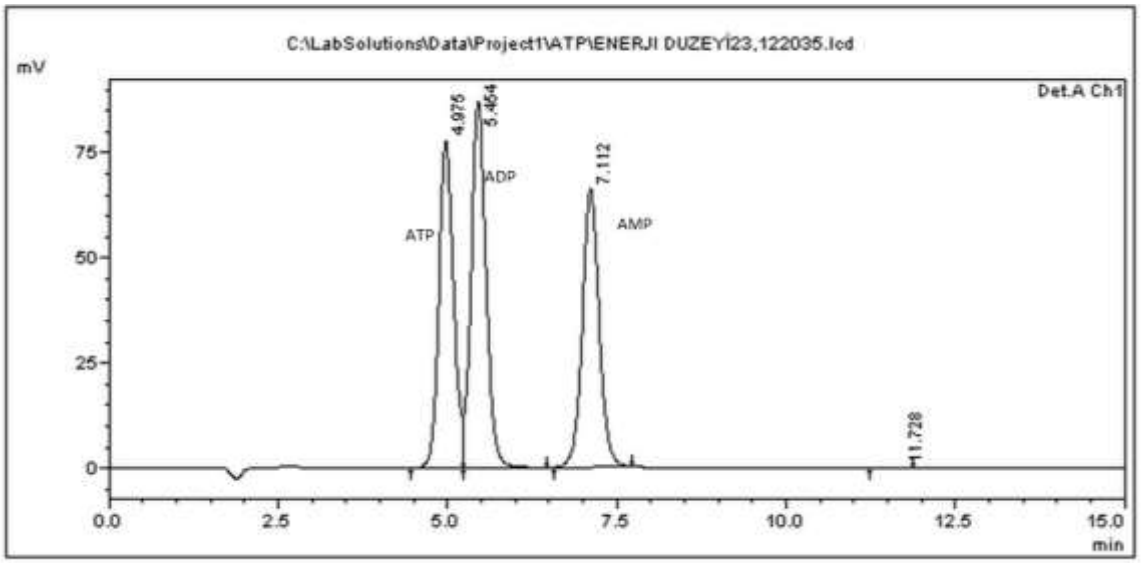
Şekil 9 Farklı konsantrasyonlardaki ATP Değerinin Kalibrasyon ve Linearite Eğrisi



Şekil 10 Farklı konsantrasyonlardaki ADP Değerinin Kalibrasyon ve Linearite Eğrisi



Şekil 11 Farklı konsantrasyonlardaki AMP Değerinin Kalibrasyon ve Linearite Eğrisi

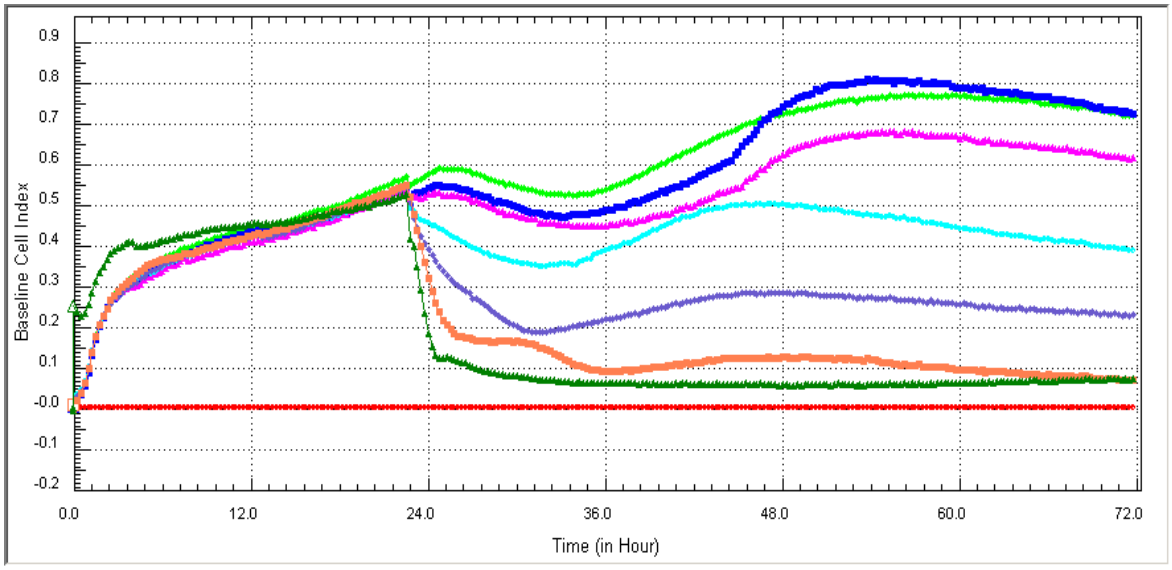


Şekil 12 10 µM ATP, ADP ve AMP mix standardının kromatogramı.

3.BULGULAR

3.1 D Vitaminin MCF-7 Hücre Proliferasyonuna Etkisi

Gerçek zamanlı hücre elektronik algılama sistemi ile D vitamininin MCF-7 hücre büyümesine olan etkisi doz ve zamana bağlı olarak analiz edildi. D vitamininin 10, 25, 50, 125, 250, 500, 1000 nM konsantrasyonlarında hücre büyüme oranları, 72 saat boyunca izlendi. Şekil 13'de görüldüğü gibi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında D vitamininin, hücre büyümesini doz ve zamana bağımlı olarak inhibe ettiği görüldü. Doz guruplarından 500nM ve 1000nM dozları hücreler üzerine direkt toksik etki göstermiştir.

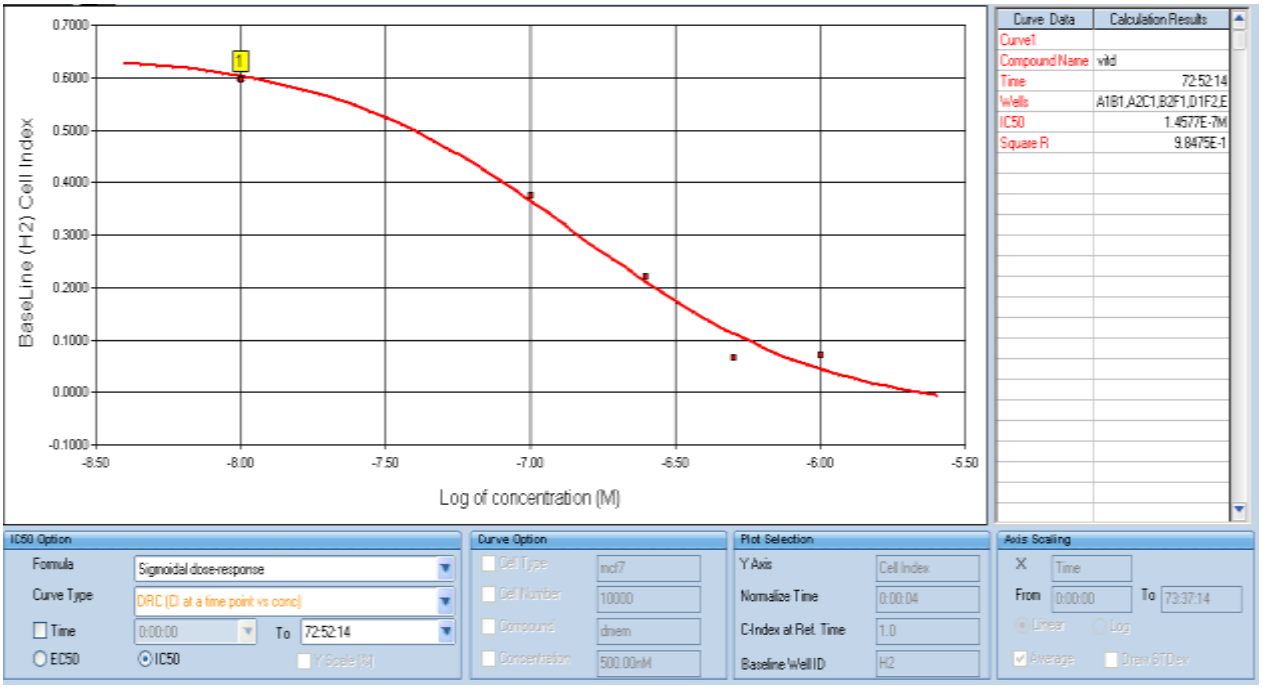


Şekil 13 Farklı Dozlardaki D Vitaminin Zamana Bağlı Proliferasyon Grafiği

DMEM
KONTROL
ETANOL
10nM D Vitamini
100nM D Vitamini
250nM D Vitamini
500nM D Vitamini
1000nM D Vitamini

3.2 D vitamininin IC_{50} Değerinin Belirlenmesi

D vitamininin verilen hücrelerin proliferasyon eğrisi grafiğinden IC_{50} değeri şekil 15'te görüldüğü üzere 145 nM (r^2= 0,99) olarak hesaplanmıştır. Bu değer cihaz tarafından, kontrol ve etanol grupları hariç, uygulanan tüm doz gruplarının, 72. saatte logaritmalarının alınması ve bu değerle birlikte hücre indeks değerine karşı bir grafik çizilmesi şeklinde hesaplanmıştır. Bu grafik çizimine göre r^2 değerine de bakılarak, D vitamini için hücrelerin yarısını öldürmeye yetecek değer hesaplanmıştır.



Şekil 14 D Vitamini için IC50 Değerinin Grafik ve Dataları. (Xcelligence Sistemi kullanılarak hesaplanmıştır.) D Vitamini için IC50 Değerinin Grafik ve Dataları. (Xcelligence Sistemi kullanılarak hesaplanmıştır.)

3.3 Enerji Düzeyi

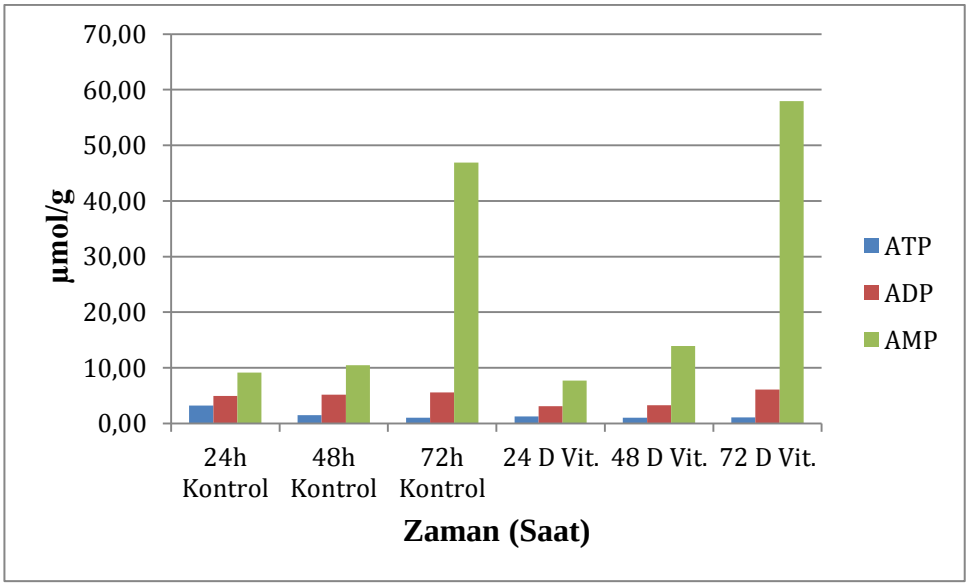
D vitamininin, MCF-7 hücrelerinin enerji düzeylerine etkisi farklı zamanlar göz önüne alınarak n=6 olmak üzere analiz edilerek ve istatistiki açıdan anlamlı olup olmadığı SPSS 18 programı kullanılarak Mann-Whitney U testiyle değerlendirilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlarda, kontrol 72. Saat ADP ve AMP gurupları dışındaki diğer gurupların tamamında analamlı fark elde edilmiştir. Bulunan değerler tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. D vitamininin farklı zamanlarda enerji düzeyine etkisinin karşılaştırılması

Saat	K ATP(Ort ± Std)	D Vit. ATP(Ort ± Std)	P
24	3,22 ± 0,51	1,24 ± 0,06	< 0.005
48	1,45 ± 0,22	1,01 ± 0,11	< 0,005
72	1,20 ± 0,30	1,04 ± 0,05	>0,005
	K ADP(Ort ± Std)	D Vit. ADP(Ort ± Std)	
24	4,90 ± 0,75	3,06 ±0,16	< 0.005
48	5,09 ± 0,45	3,30 ± 0,22	<0.005
72	5,50 ± 0,21	6,02 ± 0,24	>0,005
	K AMP(Ort ± Std)	D Vit. AMP(Ort ± Std)	
24	9,13 ± 0,33	7,65±0,51	< 0.005
48	46,8 ± 0,12	1,64 ± 0,05	<0.005
72	57,9 ± 1,59	1,81 ± 0,70	<0.005

.

D vitamini uygulaması yapılan MCF-7 hücrelerinin ATP, ADP ve AMP sonuçları 24. 48. ve 72.saatlerde HPLC cihazı ile ölçülmüş ve hücre protein düzeyine oranlanarak sonuçlar elde edilmiştir.

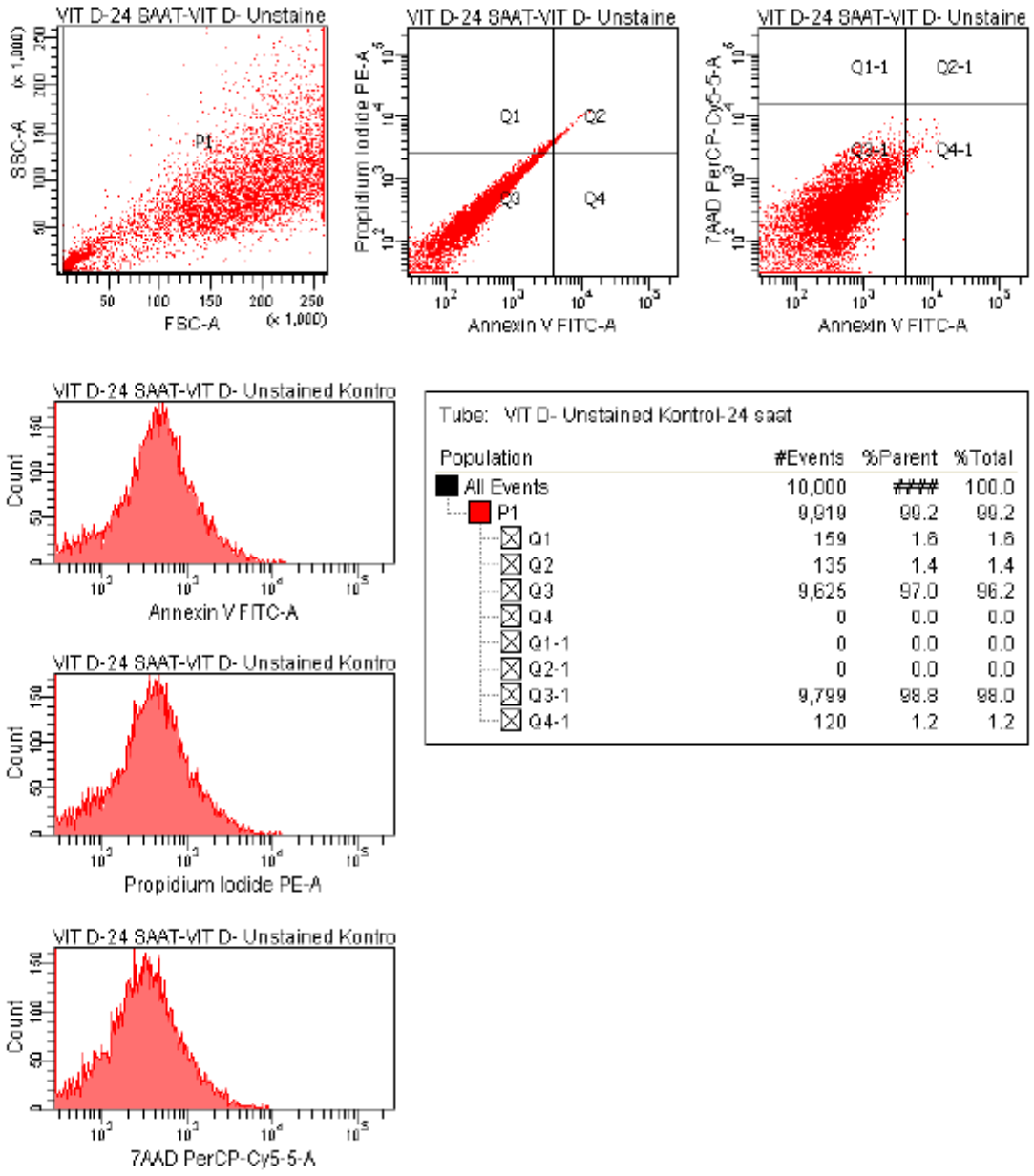


Şekil 15 IC50 Dozu Uygulanan MCF-7 Hücrelerinin Enerji Düzeyleri

3.4 D Vitaminin MCF-7 Hücresinde Apopitoza Olan Etkisi

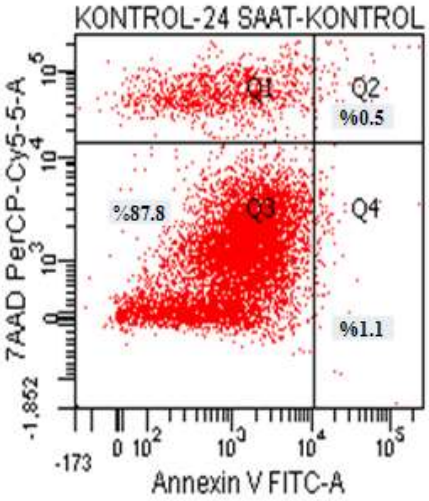
D vitamini uygulaması yapılan MCF-7 hücre apopitozu, Annexin V- FITC ve 7 ADD boyama kiti kullanılarak akım sitometresiyle (BD FACS Canto II) analiz edilmiştir. Boyanmamış kontrol hücreleri kullanılarak ve cihaz kalibrasyonu yapılarak 24. ve 48.saatte D vitamini gruplarının analizi yapılmıştır.

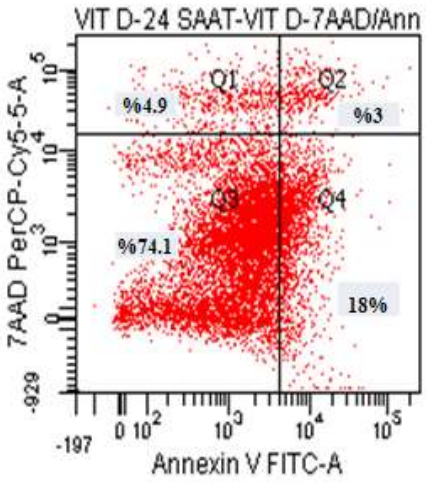
Boyanmamış MCF-7 Kontrol Hücreleri



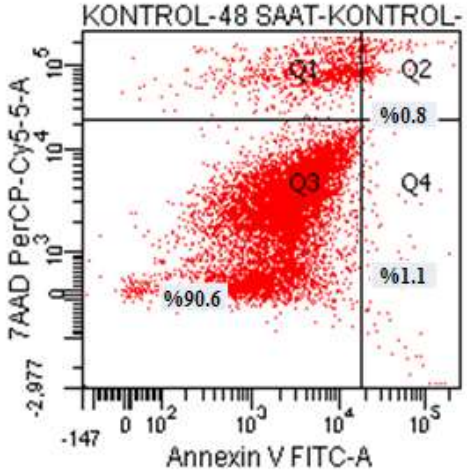
Şekil 16 Boyanmamış MCF-7 Hücreleri Flow Sitometri Analizi

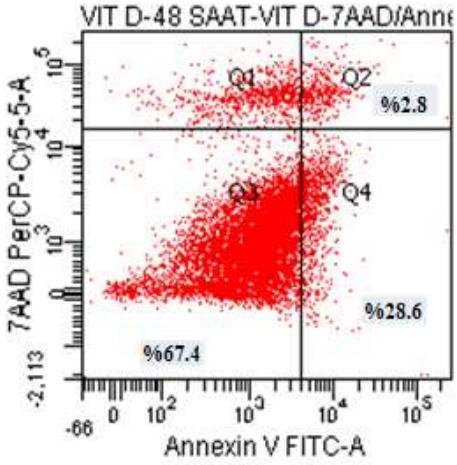
A-24. Saat Gurubu



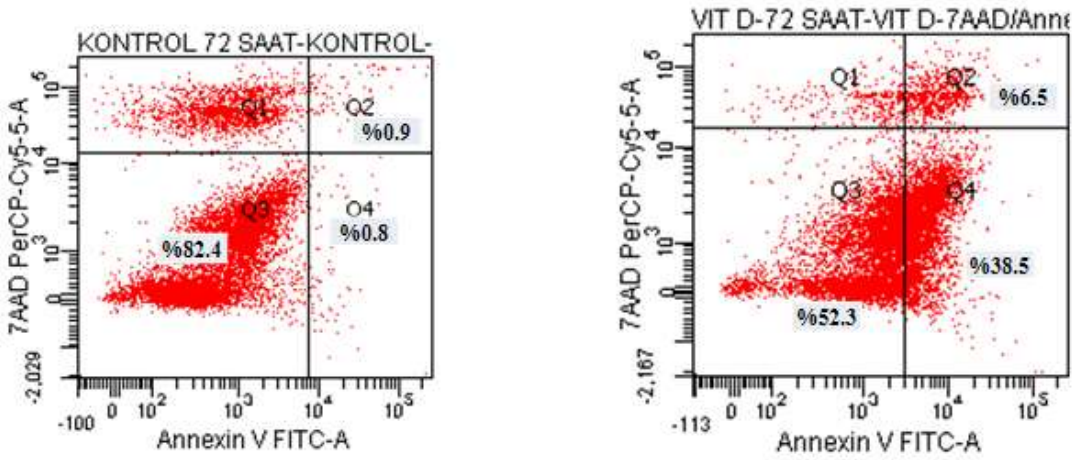


B-48. Saati Gurubu





C-72.Saat Gurubu



Şekil 17 D Vitamininin MCF-7 hücresi apopitozu üzerindeki etkileri akım sitometrisinde Annexin V- FITC ve 7-ADD boyama kiti ile analiz edilmiştir. (A) ve (B) 7-AAD boyama ile birlikte Anneksin V- FITC , (Anneksin pozitif, 7-ADD negatif hücreler her panelin sağ

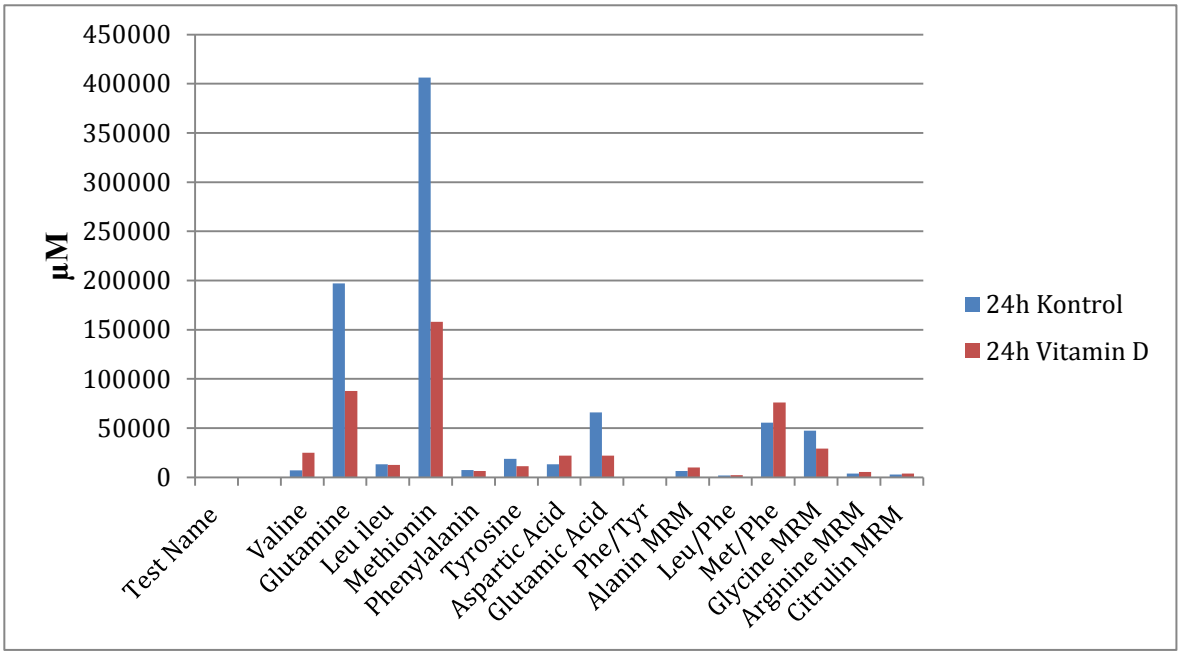
Tablo 4 D vitamini uygulaması yapıldıktan sonra MCF-7 hücre döngüsünün farklı fazlarının dağılımı akım sitometresinde Annexin V ve 7-AAD boyama ile tespit edilmiştir.

	7-ADD Negatif, Annexin V Negatif	7-ADD Negatif, Annexin V Pozitif	7-ADD Pozitif, Annexin V Pozitif
Kontrol 24 Saat	%87,8	%1,1	%0,5
D Vitamini 24 Saat	%74,1	%18	% 3
Kontrol 48 Saat	%90,6	%1,1	%0,8
D Vitamini 48 Saat	%67,4	%28,6	%2,8
Kontrol 72 Saat	%82,4	%0,8	%0,9
D Vitamini 72 Saat	%52,3	%38,5	%6,5

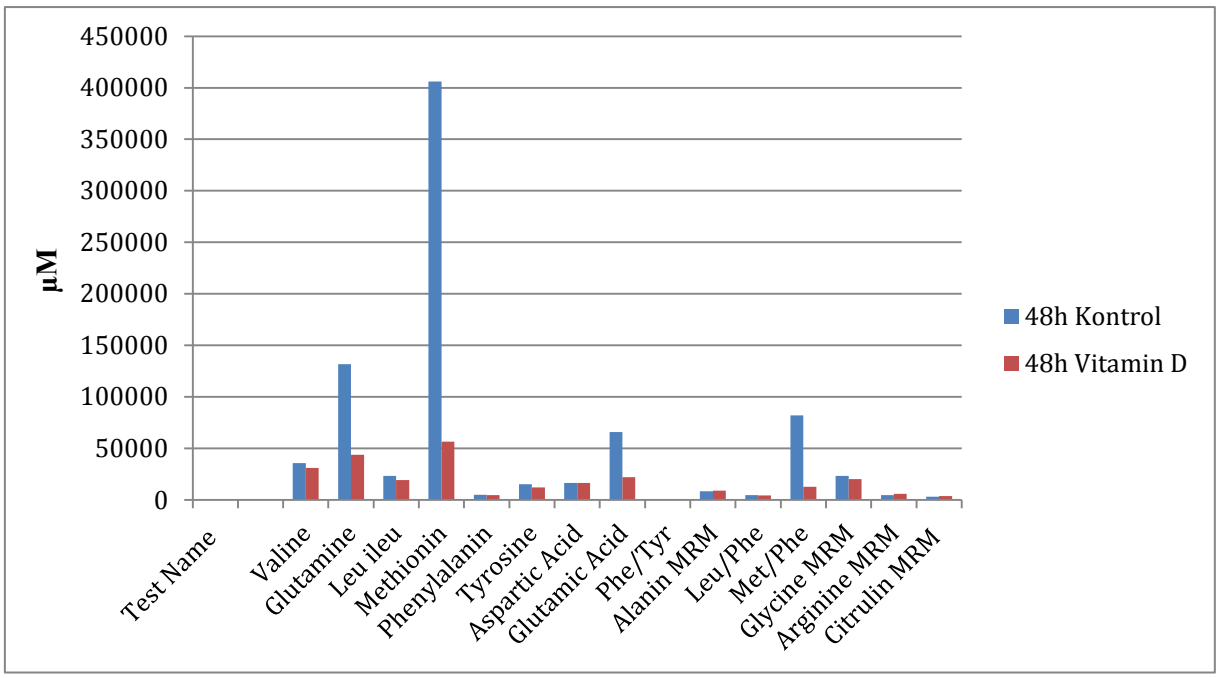
3.5 D Vitamini Uygulaması Yapılan MCF-7 Hücrelerinde Aminoasit ve Açil-Karnitin Düzeyi Ölçümü Sonuçları

Bu aşamada D vitamini ve kontrol hücre gruplarının aminoasit ve açilkarnitin düzeyleri taraması LC MS/MS cihazında yapıldı. Kan örneklerinde 42 adet aminoasit ve açilkarnitinleri hızlı ve eş zamanlı olrak tespit edbilen NBS analizi metabolik tarama için kullanıldı. Şekil19 ve Şekil 20'de aminoasit düzeyleri şekil 21'de ise gruplara ait toplam açil karnitin düzeyleri gösterilmiştir.

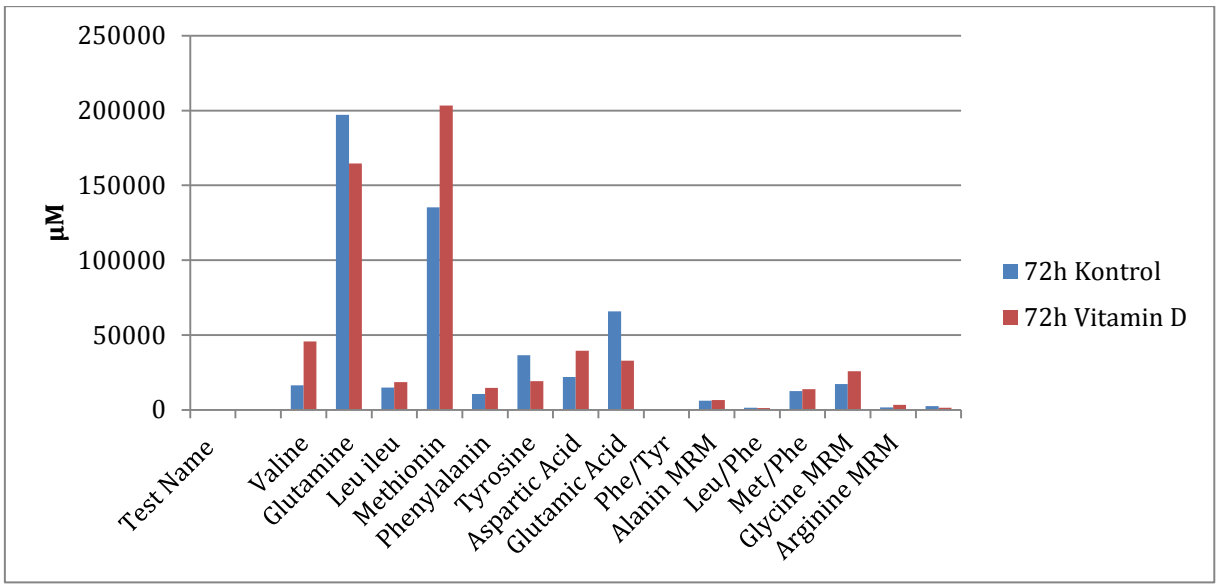
A-24.Saat Gurubu



B-48.Saat Gurubu

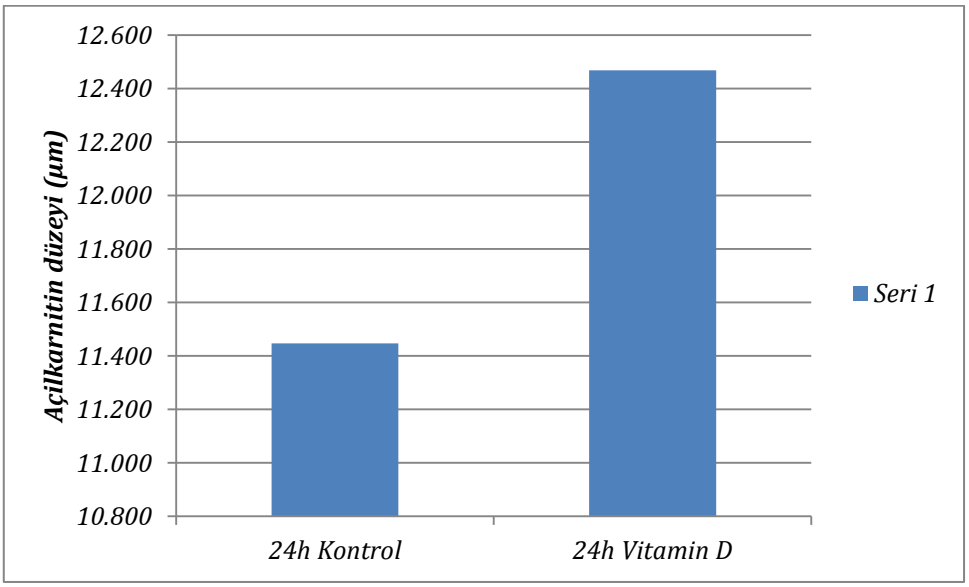


C-72. Saat

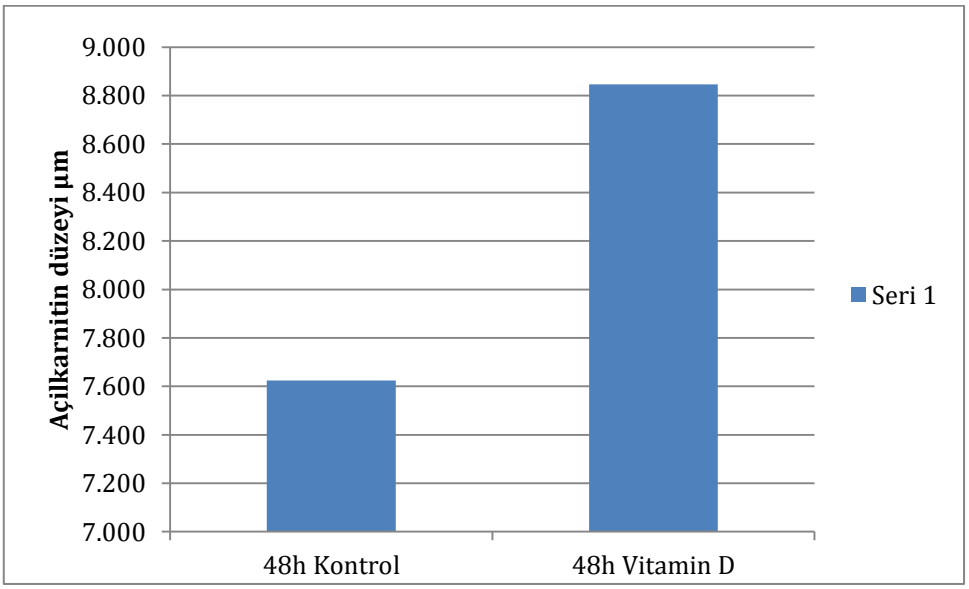


Şekil 18 Aminoasit taraması verilerinin guruplara göre dağılımı. A-24. saat B-48.saat. C-72 saat.

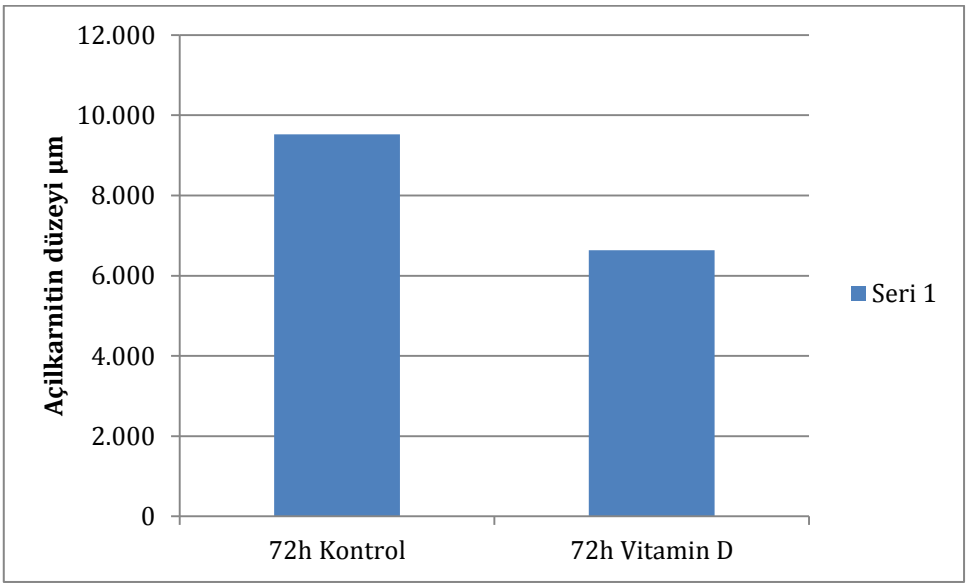
A-24.Saat Gurubu



B-48.Saat Gurubu



C-72.Saat Gurubu



Şekil 19 Açilkarnitin miktarının gruplara göre dağılımı

4.TARTIŞMA

D vitamini kalsiyum ve kemik metabolizmasının en iyi bilinen modülatörüdür. Son otuz yılda D vitamininin aktif formunun (1α,25-dihidroksivitamin $D_{3)}$, kalsiyum ve kemik metabolizmasıyla ilişkilendirilemeyecek farklı etkilere sahip olduğunu gösteren birçok bulgu toplanmıştır.

D vitaminin meme kanserinde koruyucu rolü ile ilgili literatürde büyük bir bilgi birikimi oluşmuştur. İki ana tip epidemiyolojik çalışma yapılmıştır; birincisi güneş radyasyonu ve meme kanseri riski arasındaki ilişki üzerinde duranlar, ikincisi D vitamini alımı ve meme kanseri riski arasındaki ilişkiyi analiz edenlerdir. Vitamin D ve kanser ilişkisi ilk defa 1980 yılında Garland ve Garland'ın kolon kanserinin kuzey U.S'da güney U.S kıyasla daha çok görüldüğünü, gün ışığı ve D vitamini üretimi ile ilişkilendirerek ortaya koymasıyla gündeme gelmiştir. Daha sonra bu ekolojik "gün ışığı" hipotezi 18 farklı kanser türüne de uyarlanmıştır. Garland ve ark (1990), ABD'de güneş ışığı ve meme CA insidansı ve mortalitesinin ilişkisine bakmıştır. Çalışmada meme CA mortalitesi ve güneş ışığı arasında güçlü bir ters ilişki gösterilmiş ($r=-0,80$ $p<0,0001$). Aynı protektif etki melanoma, kolon CA ve prostat CA için de bulunmuştur (Garland ve ark 2006)

İlk Ulusal Sağlık ve Beslenme ve İnceleme Taraması (NHANES) dahilinde 5009 beyaz kadın arasında,17 yıl içinde güneş ışınlarına daha az maruz kalanlarda %33 oranında daha fazla meme kanseri gözlemlenmiştir (Robsahm ve ark 2004).

Altı adet vaka kontrollü çalışma kapsamında D vitamini alımı ile meme kanseri riski arasındaki ilişki incelenmiştir. Bunlardan en büyüğü olan, 2569 vaka ve 2588 adet kontrolü içeren İtalyan araştırmacılar tarafından yapılmış bir çalışmada, D vitamini içeren besin kaynakları hakkında bilgilerin toplanma aşamasında 78 maddelik yiyecek sıklığı anketi kullanılmıştır. Yüksek D vitamini alan kadınların düşük D vitamini alan kadınlara kıyasla %34 daha az meme kanseri riski taşıdıkları ortaya konmuştur. Tahmini risk oranı (Odds ratio) premenopozal veya perimenopozal ve postmenopozal kadınlar arasında sırasıyla 0,80 (%95 güven aralığında CI 0.64-0.99) ve 0,78 (%95 güven aralığında CI, 0,66-0,92) idi. (Rossi et al., 2009).

Epidemiyolojik çalışmaların yanısıra D vitamini ve meme kanseri ilişkisini inceleyen birçok preklinik çalışma da yapılmıştır. Meme dahil olmak üzere, vücutta çeşitli böbrek dışı dokular dolaşımdaki 25(OH)D 'den aktif D vitamini metaboliti olan $1,25(OH)_2D$'nin oluşumu için gerekli olan 1-α hidroksilaz'ı içermektedir (Zehnder et al.,

2001). Lokal olarak sentez edilen 1,25(OH) $_2$D meme epitelinde bulunan VDR reseptörüne bağlanarak birçok genin ekspresyonunu düzenler. Buna ilaveten meme hücreleri 25(OH)D'yi daha az aktif metabolit olan 24,25$(OH)_2$D'ye çevirebilen 24-hidroksilaz enzimini (CYP24) içerir. Bu nedenle, meme hücreleri, 1,25$(OH)_2$D'nin lokal sentezini ve metabolizmasını ve VDR'ler yoluyla sinyal transduksiyonunu koordine eder.

İn vitro hayvan modellerinde D vitamininin meme karsinogenezisi üzerine olan etkileri incelenmiş ve elde edilen veriler meme kanseri gelişmesinde D vitaminin koruyucu bir rolü olduğunu desteklemektedir. Ek olarak, farelerdeki D vitamini eksikliği, knock out farelerde olduğu gibi, kanser gelişimine yol açabilmektedir.

İnsan östrojen reseptörü-pozitif meme kanser hücrelerinde (MCF-7) yapılan bir in vitro çalışmada, apopitozun proliferasyona (A/P) oranı belirlenerek 1,25(OH) $_2$D düzeylerinin, in vitro MCF-7 meme kanseri hücrelerinde artan A/P oranına bağlı olduğu belirtilmiştir (Veldhuis, Wolbers, Brouckaert, Vermes, & Franke, 2011).

Bu çalışmanın odak noktası MCF-7 meme kanseri hücrelerinde D vitamininin antiproliferatif, proapoptotik ve metabolik etkilerini araştırmaktı. Doz ve zamana bağlı olarak D vitaminin antiproliferatif etkilerini gerçek zamanlı hücre elektronik algılama sistemiyle gözlemledik. İlk olarak Colston ve ark (1981) tarafından 1,25 $(OH)_2$D ile muamele edilmiş melanom kültür hücrelerinin büyüme hızında doza bağlımlı azalma gösterildi. Kolon, göğüs ve prostat dahil olmak üzere kanserli diğer dokularda da 1,25 $(OH)_2$D'nin büyümeyi inhibe edici özelliği bildirilmiştir.(Kang, ve ark. 2011,Skowronski ve ark 1993). Biz de çalışmamızda benzer şekilde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında D vitamininin, hücre büyümesini doz ve zamana bağımlı olarak inhibe ettiğini gördük (Şekil 13). Bu veriler kullanılarak hesaplanan IC $_{50}$ dozu literatürdekine benzer şekilde $1{,}4.10^5$ olarak bulundu.(Chiang ve ark.2012)

Apoptoz, inflamatuar olmayan bir şekilde çok hücreli organizmalardan istenmeyen gereksiz ya da hasarlı hücreleri ortadan kaldıran oldukça iyi düzenmiş doğal bir süreçtir. İn vivo yada in vitro olarak radyoterapi yada antikanser ilaçlarıyla etkili kanser tedavisi sıklıkla artan apoptoz markırlayla ilişkilidir.(Call et al., 2008) Ooi ve ark'nın (2010) yapmış olduğu çalışmada; in vitro olarak, MCF-7 hücreleri D vitamini sinyal yolağı ve metabolizması için kritik rol oynayan genleri eksprese etmiş ve 1,25 $(OH)_2D_3$ uygulaması hücre büyümesi ve proliferasyonu inhibe ederek ve apoptozu artırmıştır.

D Vitamini ve hiperkalsemik yan etkilerini ekarte etmek için kullanaılan D vitamini analoglarıyla yapılan apopitoz çalışmalardan biri Chiang ve ark'nın 2014 yılında yaptıkları çalışmadır. Bu çalışmada MCF-7 hücreleri D vitamini ve bir D vitamini anoloğu olan MART-10 ile tedavi edilmiş Bax/Bcl-2 oranının MART-10 gurubunda daha fazla olmak üzere her iki gurupta da arttığı gözlemlenmiştir. Bir diğer çalışma ise 2000 yılında Blutt ve ark. tarafından yapılan hücre kültürü çalışmasıdır. Bu çalışmada LNCaP (Androjen pozitif, prostat adenokarsinom hücresi) hücreleri 6 gün boyunca 1,25 $(OH)_2D$ ile tedavi edilmiş ve antiapoptik proteinler olan Bcl-2 ve Bcl-X azaltarak apoptoza neden olduğu görülmüştür. Bizde D vitamini guruplarımızda kontrol gurpları ile kıyaslandığında 24.saatte %18 (Annexin V Pozitif,7-AAD Negatif), 48. saatte %28 (Annexin V Pozitif,7-AAD Negatif) olan apopitoz oranının 72. saatte %38,5 olduğunu gözlemledik.

ATP hücrede meydana gelen enerji gerektiren reaksiyonlar için primer enerji taşıyıcısıdır.Sitozol içindeki AMP seviyeleri, ATP kullanım oranı için ATP konsantrasyonunun kendisinden daha iyi bir indikatör görevi görmektedir.Sitoplazma içindeki AMP konsantarasyonu adenilat kinaz reaksiyonunun denge noktası ile belirlenir.Denge noktasında ATP'nin ADP'ye hidrolizi gibi enerji gerektiren reaksiyonlarda sitozolü hem ADP hem de AMP içeriklerini artırmaktadır.Ancak ATP ,AMP veya ADP'ye kıyasla daha yüksek miktarda bulunur,bu sebeple sitozol içindeki ATP konsantrasyonundaki küçük bir azalma bile küçük AMP havuzunda yüksek oranda artışa neden olur.(Smith, Marks, Lieberman, Marks, & Marks, 2005)AMP bir enerji sensoru ve metabolizma düzenleyicisi olarak fonksiyon görür.ATP üretimi ihtiyaçlara ayak uyduramadığı zaman bir hücrenin adenin nükleotid havuzunun büyük bir kısmı AMP şeklindedir.AMP bundan sonra ATP üreten metabolik yolları uyaracaktır.D vitamini uygulaması yaptığımız hücrelerin 24, 48. ve 72. saat gurupları kontrol gurupları ile karşılaştırıldığında AMP düzeylerinin zamana bağlı olarak arttığını yani ATP'nin kullanıldığını gözlemledik.Bu durum artan apopitoz oranı ile paralellik gösterdiğini bize düşündürmüştür.

Tümör hücreleri büyümek ve çoğalmak için tümör tipine ve gelişim evresine bağlı olarak glukozu, lipitleri veya aminoasitleri kullanırlar.(Gu et al., 2015) Tümörler büyüyebilmek için esansiyel aminoasitlere (EAA); purin ve pirimidin sentezi için glutamin, glisin ve aspartik asit gibi aminoasitlere ve membran lipit komponentlerinin sentezi için serine ihtiyaç duyarlar. Dolayısıyla seçici aminoasit ihtiyaçları vardır NBS

analizi ile içinde aminoasit ve açilkarnitinlerin yer aldığı 43 parametre taranmakatadır. Bizim NBS analizi ile yaptığımız metabolik taramada glutamin, metiyonin ve glutamik asit düzeylerinin kontrol gurupları ile kıyaslandığında D vitamini guruplarında daha fazla kullanıldığını gözlemledik.

Metiyonin, DNA sentezi ve tek karbon metabolizmasında önemli bir rolü olduğu vurgulanan esansiyel bir aminoasittir. Bazı kanser hücresi hücre kültürleri metiyonine bağımlı büyüme gösterir. Bizimde çalışmamızda kontrol guruplarıyla kıyaslandığında azalma gözlemlediğimiz metiyonin miktarı dikkat çekici olmuştur.

Gulutamin(GLN), kanda en fazla bulunan, tüm vücuttaki serbest aminoasit havuzunun %50'sini oluşturan, %75'i iskelet kasında geri kalan kısmının çoğunluğu karaciğerde bulunan nötral ve duruma göre esansiyel olabilen bir aminoasittir.(Cresci, 2005) GLN, proteinlerin en önemli kompanentidir. Yapısında, molekül başına iki amin grubu içerir; pürin ve pirimidin dolayısıyla nükleik asit sentezinde nitrojen taşıyıcısı olarak önemli görev alır. GLN metabolizmasının bir yan ürünü olan glutatyon (GSH/glutamil-sisteinil-glisin) hücre içerisinde bulunan en yoğun antioksidanlardan biridir ve normal dokuyu oksidatif hasara karşı korur.

Nükleik asit sentezindeki önemi nedeniyle GLN özellikle sürekli bölünen ve çoğalan hücrelerin devamlılığı için gerekli bir aminoasittir. Enerji kaynağı ve nitrojen taşıyıcı olarak fonksiyonu vardır. Glikoneogenez ve protein sentezinin en önemli düzenleyicisidir. Kanser metabolizması üzerindeki son çalışmalar, hücre çoğalması ve bakım, alternatif enerji kaynakları, özellikle glutamin ve diğer aminoasitlerin rolüne ışık tutmuştur. Çeşitli hücre tiplerinde elde edilen kanıtlar bu sonucu desteklemektedir. Östrojen sitümülasyonunun meme kanseri hücrelerindeki glutaminolisi indüklediği gösterilmiştir.(Forbes, et al., 2006).

Bizim çalışmamızda da glutamin miktarı dikkate değer oranda değişiklik göstermiştir. Kontrol guruplarıyla kıyaslandığında 24.saat D vit. gurubu ve 48.saatte D vit. gurubunda daha belirgin olacak şekilde glutamin miktarı azalmıştır.

NBS analizinin bir diğer parametresi olan Karnitin profili (ACP) analizi yağ asiti oksidasyon bozuklukları ve organik asit metabolizmasının biyokimyasal taramasını yapmaktadır.

Karnitinlerin sisplatinin neden olduğu toksik etkiler üzerinde koruyucu bir etki ortaya koydukları (Altun, Gunes, Aktas, Erbayraktar, & Olgun, 2010) ve hücre içi taşınmasının apoptozise bağlı olduğu gösterilmiştir. (Mazzarelli et al., 2007) Yanı sıra, karnitinler enerji üretiminde ve yağ asiti metabolizmasında hayati bir rol oynamakta ve yararlı etkileri sebebiyle nutrisyonel değişikliği incelenmektedir.(Flanagan, Simmons, Vehige, Willcox, & Garrett, 2010).

Açil-Karnitinler oksidatif gerilime karşı, hem mitokondriyal hem de sitozolik redoks durumundaki değişiklikler veya antioksidan genlerin indiksüyonu yoluyla ROS oluşumuna neden olan laktik asidozun azltılması yoluyla koruyucu olabililer.(Jones et al., 2010) Bizde çalışmamızda 24.ve 48.saat guruplarımızda kontrole kıyasla arttığını 72.saate ise azaldığını gözlemledik.72 saat gurubundaki azalma %38 apopitoz oranı ile bağlantılı olabileceği gibi artan AMP yani azalmış metabolik hız ile de bağlantılı olabileceğini düşündürdü..

5.SONUÇ VE ÖNERİLER

D vitamininin MCF-7 meme kanseri hücresinde literatürdekine benzer şekilde antiproliferatif etkinliğini gerçek zamanlı hücre elektronik algılama sistemiyle gözlemledik. Bu verileri kullanarak 140 nM olarak hesapladığımız IC50 değerinin gerek tedavi açısından gerekse diğer hücre kültürü çalışmalarına faydalı olacağını düşünmekteyiz. ATP, ADP ve AMP nükleotidlerinde yani enerji düzeyinde 24.saat grubunda belirgin olmak üzere 48. saat de azalmaya neden olduğunu gözlemledik. Bu veriler zamana bağlı olarak artan ve enerji gerektiren apopitoz mekanizmasını destekler nitelikteydi. Terapotik ajan olarak düşündüğümüzde D vitamininin apopitoza neden olması meme kanseri başta olmak üzere kanser tedavisinde değerlendilebileceğini ve D vitamini kan düzeyleri optimizasyonunun önemli olduğunu düşünmekteyiz.

NBS analizi hücre kültürüne başarıyla adapte edilmiş olup metabolik tarama gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar özellikle glutamin, glutamik asit ve metiyonin aminoasidi açısından dikkat çekiciydi. Kontrol grubu ile kıyaslandığında D vitamini gruplarında her üçünde de azalma gözlemlendi. NBS analizinin bir tarama testi olduğunu düşünürsek bir sonraki aşamada aminoasit ve açilkarnitinler için kantitasyon yapılmasının faydalı olabileceğini düşünmekteyiz. Sonuç olarak İleri çalışmalarla gerek erken apopitozis için biyobelirteç gerekse kanser beslenmesi ve metabolizması açısından aminoasitlerin daha detaylı olarak incelenmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

D VİTAMİNİNİN MCF-7 MEME KANSERİ HÜCRESİ METABOLİZMASI ÜZERİNE ETKİSİ

ÖZET

D vitaminin kalsiyum emilimi ve kemik sağlığı için önemli olduğu uzun zamandan beri bilinmektedir. Ancak, son yapılan çalışmalar D Vitamin'in meme kanseri hücresinin büyümesini kontrol ettiğini ortaya çıkarmakta ve epidemolojik çalışmalar ise aratan bir şekilde D Vitamin'in düşük kanser riski ile bağlantısı olduğunu iddia etmektedir. Bu tezin öncelikli amacı D Vitamin'in MCF-7 meme kanseri line'ına olan metabolik etkisini ortaya koymaktır

Bu amaçla, hücre kültürü labaratuarında farklı konsantrasyonlarda D vitamini dozu uygulanmış olan MC-7 hücrelerinde zaman bağlı proliferasyon inhibisyonu gözlemlendi. Gerçek zamanlı hücre elektronik algılama sistemi kullanılarak proliferasyon değerlendirildi. Hücre sayılarındaki değişiklikler, mikroelektrot içeren kuyucuklarda yapılan özel hücre kültürü, deneyi süresince her onbeş dakikada bir sürekli takip edildi. Elde edilen veriler kullanılarak IC50 değeri hesaplandı. Tanımlı IC_{50} dozu hücrelere uygulandıktan sonra hücre lisatları elde edildi. Bu numuneler apopitoz, enerji, aminoasit ve asil karnitin analizlerinde kullanıldı.

Sonuç olarak D vitamininin meme kanseri hücresi proliferasyonunu doz ve zamana bağlı olarak azaltığını gözlemledik. Elde ettiğimiz diğer bir veri olan apopitoz artışıda bu proliferasyon inhibisyonunu açıklamaktaydı. Buna ilaveten D vitamini guruplarındaki glutamin, metiyonin ve glutamik asit düzeylerindeki azalmanın ileri çalışmalarla değerlendirilmesinin; D vitamininin meme kanseri metabolizmasına olan etkilerini anlamada katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: D Vitamini,MCF-7 meme kanseri hücresi, proliferasyon,enerji düzeyi,aminoasit ve açilkarnitin düzeyi

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

THE EFECT OF VİTAMİN D ON MCF-7 BREAST CANCER CELL

ABSTRACT

It has long been known that vitamin D is important for calcium absorption and bone health. However, recent studies have revealed that Vitamin D modulates breast cancer cell growth and epidemiologic studies suggest increasingly that vitamin D may be associated with reduced breast cancer risk. The primary objective of this thesis is to highlight the metabolic effect of Vitamin D on MCF-7 breast cancer cell line.

For this purpose in the cell culture laboratory MCF-7 cells which those treated with various concentrations of vitamin D, dose and time dependent inhibition of proliferation was observed. Changes in the proliferation of cells were assessed using real-time cell detection system. Changes in the number of cells, the particular cell culture in wells containing micro-electrodes, a duration of the experiment were continuously monitored every 15 min and IC_{50} dose was calculated. After Determined IC_{50} dose was applicated to cells cell lysate were obtained. These samples were was used for the energy, aminoacid and aci-carnitine levels analysis.

As a result, we have observed that vitamin D reduces cancer cell proliferation depending on dose and time. The increase of apoptosis, the other datum that we have obtained, has been explaining the proliferation inhibition. In addition to this, we consider that a further evaluation of the acid reduction of glutamine, methionine, and glutamic acid levels in vitamin D groups, would be helpful in understanding the effects of vitamin D on breast cancer metabolism.

In conclusion, proliferation of breast cancer cell was inhibited by vitamin D via dose and time dependent.

Key words: Vitamin D,MCF-7 cells, proliferation, energy levels, aminoacid and acil-carnitine levels

KAYNAKLAR

Altun, Z. S., Gunes, D., Aktas, S., Erbayraktar, Z., & Olgun, N. (2010). Protective effects of acetyl-L-carnitine on cisplatin cytotoxicity and oxidative stress in neuroblastoma. *Neurochem Res, 35*(3), 437-443. doi: 10.1007/s11064-009-0076-8

Baumgartner, C., Böhm, C., & Baumgartner, D. (2005). Modelling of classification rules on metabolic patterns including machine learning and expert knowledge. *Journal of Biomedical Informatics, 38*(2), 89-98. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.jbi.2004.08.009

Bland, K. I., Menck, H. R., Scott-Conner, C. E., Morrow, M., Winchester, D. J., & Winchester, D. P. (1998). The National Cancer Data Base 10-year survey of breast carcinoma treatment at hospitals in the United States. *Cancer, 83*(6), 1262-1273.

Boole, D. D., & Cho, D. W. (2007). *Focus on Cell Apoptosis Research*: Nova Science.

Burtis, C. A., Ashwood, E. R., & Bruns, D. E. (2012). *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*: Elsevier Health Sciences.

Call, J. A., Eckhardt, S. G., & Camidge, D. R. (2008). Targeted manipulation of apoptosis in cancer treatment. *Lancet Oncol, 9*(10), 1002-1011. doi: 10.1016/s1470-2045(08)70209-2

Chace, D. H., Kalas, T. A., & Naylor, E. W. (2003). Use of tandem mass spectrometry for multianalyte screening of dried blood specimens from newborns. *Clin Chem, 49*(11), 1797-1817.

Chen, P., Li, M., Gu, X., Liu, Y., Li, X., Li, C., . . . Wang, H. (2013). Higher blood 25(OH)D level may reduce the breast cancer risk: evidence from a Chinese population based case-control study and meta-analysis of the observational studies. *PLoS One, 8*(1), e49312. doi: 10.1371/journal.pone.0049312

Chiang, K. C., & Chen, T. C. (2013). The anti-cancer actions of vitamin D. *Anticancer Agents Med Chem, 13*(1), 126-139.

Christofk, H. R., Vander Heiden, M. G., Harris, M. H., Ramanathan, A., Gerszten, R. E., Wei, R., . . . Cantley, L. C. (2008). The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature, 452*(7184), 230-233. doi: 10.1038/nature06734

Colston, K. W., & Hansen, C. M. (2002). Mechanisms implicated in the growth regulatory effects of vitamin D in breast cancer. *Endocr Relat Cancer, 9*(1), 45-59.

Cresci, G. A. (2005). *Nutrition Support for the Critically Ill Patient: A Guide to Practice*: CRC Press.

Danial, N. N., & Korsmeyer, S. J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell, 116*(2), 205-219.

Edinger, A. L., & Thompson, C. B. (2004). Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol, 16*(6), 663-669. doi: 10.1016/j.ceb.2004.09.011

Flanagan, J. L., Simmons, P. A., Vehige, J., Willcox, M. D., & Garrett, Q. (2010). Role of carnitine in disease. *Nutr Metab (Lond), 7*, 30. doi: 10.1186/1743-7075-7-30

Fleet, J. C., DeSmet, M., Johnson, R., & Li, Y. (2012). Vitamin D and cancer: a review of molecular mechanisms. *Biochem J, 441*(1), 61-76. doi: 10.1042/bj20110744

Foldi, M., Stickeler, E., Bau, L., Kretz, O., Watermann, D., Gitsch, G., . . . Coy, J. F. (2007). Transketolase protein TKTL1 overexpression: A potential biomarker and therapeutic target in breast cancer. *Oncol Rep, 17*(4), 841-845.

Garland, F. C., Garland, C. F., Gorham, E. D., & Young, J. F. (1990). Geographic variation in breast cancer mortality in the United States: a hypothesis involving exposure to solar radiation. *Prev Med, 19*(6), 614-622.

Gatenby, R. A., & Gillies, R. J. (2004). Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer, 4*(11), 891-899. doi: 10.1038/nrc1478
Gillies, R. J., Robey, I., & Gatenby, R. A. (2008). Causes and consequences of increased glucose metabolism of cancers. *J Nucl Med, 49 Suppl 2*, 24s-42s. doi: 10.2967/jnumed.107.047258
Glunde, K., & Bhujwalla, Z. M. (2007). Choline kinase alpha in cancer prognosis and treatment. *Lancet Oncol, 8*(10), 855-857. doi: 10.1016/s1470-2045(07)70289-9
Gu, Y., Chen, T., Fu, S., Sun, X., Wang, L., Wang, J., . . . Wang, M. (2015). Perioperative dynamics and significance of amino acid profiles in patients with cancer. *Journal of Translational Medicine, 13*, 35. doi: 10.1186/s12967-015-0408-1
Halama, A., Moller, G., & Adamski, J. (2011). Metabolic signatures in apoptotic human cancer cell lines. *Omics, 15*(5), 325-335. doi: 10.1089/omi.2010.0121
Holick, M. F. (2004). Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr, 80*(6 Suppl), 1678s-1688s.
Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., & Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin, 61*(2), 69-90. doi: 10.3322/caac.20107
Jensen, S. S., Madsen, M. W., Lukas, J., Binderup, L., & Bartek, J. (2001). Inhibitory effects of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) on the G(1)-S phase-controlling machinery. *Mol Endocrinol, 15*(8), 1370-1380. doi: 10.1210/mend.15.8.0673
Jones, L. L., McDonald, D. A., & Borum, P. R. (2010). Acylcarnitines: role in brain. *Prog Lipid Res, 49*(1), 61-75. doi: 10.1016/j.plipres.2009.08.004
Krishnan, A. V., Swami, S., Peng, L., Wang, J., Moreno, J., & Feldman, D. (2010). Tissue-selective regulation of aromatase expression by calcitriol: implications for breast cancer therapy. *Endocrinology, 151*(1), 32-42. doi: 10.1210/en.2009-0855
Kroemer, G., & Pouyssegur, J. (2008). Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell, 13*(6), 472-482. doi: 10.1016/j.ccr.2008.05.005
Mankoff, D. A., Eary, J. F., Link, J. M., Muzi, M., Rajendran, J. G., Spence, A. M., & Krohn, K. A. (2007). Tumor-specific positron emission tomography imaging in patients: [18F] fluorodeoxyglucose and beyond. *Clin Cancer Res, 13*(12), 3460-3469. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-07-0074
Mazzarelli, P., Pucci, S., Bonanno, E., Sesti, F., Calvani, M., & Spagnoli, L. G. (2007). Carnitine palmitoyltransferase I in human carcinomas: a novel role in histone deacetylation? *Cancer Biol Ther, 6*(10), 1606-1613.
Mehta, R. G. (2004). Stage-specific inhibition of mammary carcinogenesis by 1alpha-hydroxyvitamin D5. *Eur J Cancer, 40*(15), 2331-2337. doi: 10.1016/j.ejca.2004.05.025
Nelson, H. D., Tyne, K., Naik, A., Bougatsos, C., Chan, B. K., & Humphrey, L. (2009). Screening for breast cancer: an update for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med, 151*(10), 727-737, w237-742. doi: 10.7326/0003-4819-151-10-200911170-00009
Ooi, L. L., Zhou, H., Kalak, R., Zheng, Y., Conigrave, A. D., Seibel, M. J., & Dunstan, C. R. (2010). Vitamin D deficiency promotes human breast cancer growth in a murine model of bone metastasis. *Cancer Res, 70*(5), 1835-1844. doi: 10.1158/0008-5472.can-09-3194
Pandey, P. R., Liu, W., Xing, F., Fukuda, K., & Watabe, K. (2012). Anti-cancer drugs targeting fatty acid synthase (FAS). *Recent Pat Anticancer Drug Discov, 7*(2), 185-197.

Porojnicu, A., Robsahm, T. E., Berg, J. P., & Moan, J. (2007). Season of diagnosis is a predictor of cancer survival. Sun-induced vitamin D may be involved: a possible role of sun-induced Vitamin D. *J Steroid Biochem Mol Biol, 103*(3-5), 675-678. doi: 10.1016/j.jsbmb.2006.12.031

Pouyssegur, J., Dayan, F., & Mazure, N. M. (2006). Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature, 441*(7092), 437-443.

Ristimaki, A., Sivula, A., Lundin, J., Lundin, M., Salminen, T., Haglund, C., . . . Isola, J. (2002). Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *Cancer Res, 62*(3), 632-635.

Robsahm, T. E., Tretli, S., Dahlback, A., & Moan, J. (2004). Vitamin D3 from sunlight may improve the prognosis of breast-, colon- and prostate cancer (Norway). *Cancer Causes Control, 15*(2), 149-158. doi: 10.1023/b:caco.0000019494.34403.09

Rossi, M., McLaughlin, J. K., Lagiou, P., Bosetti, C., Talamini, R., Lipworth, L., . . . La Vecchia, C. (2009). Vitamin D intake and breast cancer risk: a case-control study in Italy. *Ann Oncol, 20*(2), 374-378. doi: 10.1093/annonc/mdn550

Seubwai, W., Wongkham, C., Puapairoj, A., Okada, S., & Wongkham, S. (2010). 22-oxa-1,25-dihydroxyvitamin D3 efficiently inhibits tumor growth in inoculated mice and primary histoculture of cholangiocarcinoma. *Cancer, 116*(23), 5535-5543. doi: 10.1002/cncr.25478

Shao, T., Klein, P., & Grossbard, M. L. (2012). Vitamin D and breast cancer. *Oncologist, 17*(1), 36-45. doi: 10.1634/theoncologist.2011-0278

Simboli-Campbell, M., Narvaez, C. J., van Weelden, K., Tenniswood, M., & Welsh, J. (1997). Comparative effects of 1,25(OH)2D3 and EB1089 on cell cycle kinetics and apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat, 42*(1), 31-41.

Singletary, S. E., & Connolly, J. L. (2006). Breast cancer staging: working with the sixth edition of the AJCC Cancer Staging Manual. *CA Cancer J Clin, 56*(1), 37-47; quiz 50-31.

Smith, C. M., Marks, A. D., Lieberman, M. A., Marks, D. B., & Marks, D. B. (2005). *Marks' basic medical biochemistry : a clinical approach*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

Soule, H. D., Vazguez, J., Long, A., Albert, S., & Brennan, M. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst, 51*(5), 1409-1416.

Stoica, A., Saceda, M., Fakhro, A., Solomon, H. B., Fenster, B. D., & Martin, M. B. (1999). Regulation of estrogen receptor-alpha gene expression by 1, 25-dihydroxyvitamin D in MCF-7 cells. *J Cell Biochem, 75*(4), 640-651.

Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin, 65*(2), 87-108. doi: 10.3322/caac.21262

Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science, 324*(5930), 1029-1033. doi: 10.1126/science.1160809

Veldhuis, S., Wolbers, F., Brouckaert, O., Vermes, I., & Franke, H. R. (2011). Cancer prevalence in osteoporotic women with low serum vitamin D levels. *Menopause, 18*(3), 319-322. doi: 10.1097/gme.0b013e3181f81ad5

Wang, D., & Dubois, R. N. (2004). Cyclooxygenase-2: a potential target in breast cancer. *Semin Oncol, 31*(1 Suppl 3), 64-73.

Wang, H. Q., Altomare, D. A., Skele, K. L., Poulikakos, P. I., Kuhajda, F. P., Di Cristofano, A., & Testa, J. R. (2005). Positive feedback regulation between AKT

activation and fatty acid synthase expression in ovarian carcinoma cells. *Oncogene, 24*(22), 3574-3582. doi: 10.1038/sj.onc.1208463

Wang, Q., Lee, D., Sysounthone, V., Chandraratna, R. A. S., Christakos, S., Korah, R., & Wieder, R. (2001). 1,25-dihydroxyvitamin D3 and retonic acid analogues induce differentiation in breast cancer cells with function- and cell-specific additive effects. *Breast Cancer Res Treat, 67*(2), 157-168.

Weljie, A. M., & Jirik, F. R. (2011). Hypoxia-induced metabolic shifts in cancer cells: moving beyond the Warburg effect. *Int J Biochem Cell Biol, 43*(7), 981-989. doi: 10.1016/j.biocel.2010.08.009

Welsh, J. (2007). Targets of vitamin D receptor signaling in the mammary gland. *J Bone Miner Res, 22 Suppl 2*, V86-90. doi: 10.1359/jbmr.07s204

Ylikomi, T., Laaksi, I., Lou, Y. R., Martikainen, P., Miettinen, S., Pennanen, P., . . . Tuohimaa, P. (2002). Antiproliferative action of vitamin D. *Vitam Horm, 64*, 357-406.

Zehnder, D., Bland, R., Williams, M. C., McNinch, R. W., Howie, A. J., Stewart, P. M., & Hewison, M. (2001). Extrarenal expression of 25-hydroxyvitamin d(3)-1 alpha-hydroxylase. *J Clin Endocrinol Metab, 86*(2), 888-894. doi: 10.1210/jcem.86.2.7220

EKLER

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI

GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARARLARI

Toplantı Sayısı: 2013/02	Toplantı Tarihi : 26.02.2013

Karar Sayısı 2013/61 S.Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd.Doç.Dr. Bahadır ÖZTÜRK'ün, "D Vitaminin MCF- 7 Meme Kanseri Hücresi Metabolizması Üzerine Etkisi" başlıklı araştırmasının değerlendirilme talebi ile ilgili 21.02.2013 tarihli dilekçesi ve ekleri görüşüldü.

Yapılan inceleme ve görüşmelerden sonra; Yrd.Doç.Dr. Bahadır ÖZTÜRK'ün, "D Vitaminin MCF-7 Meme Kanseri Hücresi Metabolizması Üzerine Etkisi" adlı araştırmanın kabulüne, BAP desteği alındıktan sonra protokolün dosyaya ilave edilmek üzere Etik Kurul sekretaryasına teslim edilmesine oy birliği ile karar verildi.

ASLI ÇİBİDİK
26/02/2013

Mahmut KESİK
Sekreterya

ÖZGEÇMİŞ

Beyza SARAÇLIGİL

Beyhekim Mah.Şehit Mustafa Aydın sk.
Yeşl site Konakları 5/12
Selçuklu - KONYA

Telefon **:** 0 332 263 13 96
Cep Telefonu **:** beyzaozel@yahoo.com
Doğum Tarihi **:**13.04.1979
Medeni Hali :Evli

Eğitim Durumu ve Nitelikler

- 2010- Selçuk Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya ,Uzmanlık Eğitimi
- 2005-2007 İstanbul Bilgi Üniversitesi, İşletme yüksek Lisansı (MBA)
- 2003-2004 İstanbul Üniversitesi, Genel İngilizce ve İşletme Programı
- 1997-2002 İstanbul Üniversitesi,Veteriner Fakültesi
- Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi

  Südam Günleri – V

- Türk Klinik Biyokimya Derneği Sürekli Meslek Gelişimi Elektroforez Kursu
- 13.Ulusal Biyokimya Kongresi
- Uluslararası Katılımlı Kongre & Lab Expo 2014