T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TGFβ VE D VİTAMİNİNİN MCF-7 HÜCRESİNİN PLAZMİNOJEN AKTİVATÖR SİSTEMİ ÜZERİNE ETKİSİ

Nurdan ARPACI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Ali ÜNLÜ

KONYA-2015

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TGFβ VE D VİTAMİNİNİN MCF-7 HÜCRESİNİN PLAZMİNOJEN AKTİVATÖR SİSTEMİ ÜZERİNE ETKİSİ

Nurdan ARPACI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Ali ÜNLÜ

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 13202014 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2015

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Nurdan ARPACI tarafından savunulan bu çalışma, jürimiz tarafından Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak oy birliği / oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Ali ÜNLÜ Selçuk Üniversitesi
Danışman:	Prof. Dr. Ali ÜNLÜ Selçuk Üniversitesi
Üye:	Doç. Dr. Uğur ARSLAN Selçuk Üniversitesi
Üye:	Yrd. Doç. Dr. Bahadır ÖZTÜRK Selçuk Üniversitesi

ONAY:

Bu tez, Selçuk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmenliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu ..... tarih ve ..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Hasan Hüseyin DÖNMEZ
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Ali Ünlü yönetiminde hazırlanmış olup, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne yüksek lisans tezi olarak sunulmuştur.

Tez çalışmam sırasında bilgi ve görüşleriyle yönlendiren sayın hocam, Prof. Dr. Ali Ünlü'ye çok teşekkür ederim.

Ayrıca, çalışmamda katkı ve ilgisini esirgemeyen S.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalındaki hocalarıma, laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Emine Nedime Korucu'ya ve çok değerli arkadaşım Gülsüm Tekin'e ve emeklerinden dolayı Hatice Müge Samancı Dursun'a, son olarak bu zorlu süreçte hiçbir zaman desteğini esirgemeyen başta ailem olmak üzere eşim Veysel Arpacı'ya çok teşekkür ederim.

Nurdan ARPACI

İÇİNDEKİLER **Sayfa**

SİMGE ve KISALTMALAR vi
1. GİRİŞ 1
1. 1. Kanser 5
1. 2. Hücre Siklusu 6
1. 3. Apopitozis 8
1. 4. Onkogenler 9
1. 5. Tümör Baskılayıcı Genler 11
1. 6. Kanser Hücrelerinin Karakteristik Özellikleri 13
1. 7. Kanseri Meydana Getiren Etkenler 13
1. 8. Meme Kanseri 15
1. 8. 1. Meme Kanserinde Onkogenler ve Tümör Baskılayıcı Genler 16
1. 8. 2. Steroid Reseptörler 16
1. 8. 3. Meme Kanserinde Genetik Yatkınlık 16
1. 8. 4. Meme Kanserinde Risk Faktörleri 17
1. 8. 5. Meme Kanseri Belirtileri 17
1. 8. 6. Meme Kanseri ve Metastaz 17
1. 8. 7. Klinikte Meme Kanseri 19
1. 9. Transforming Growth Factor Beta (TGFβ) 19
1. 9. 1. Sitokinler 19
1. 9. 2. Transforming Growth Factor Beta 20
1. 9. 3. TGFβ Sinyalizasyon Yolu 21
1. 9. 4. Smad Proteinleri 22
1. 9. 5. TGFβ Ailesinin Üyeleri 23
1. 9. 6. TGFβ Fonksiyonları 25
1. 9. 7. TGFβ ve Kanser 26
TGFβ ve Meme Kanseri 27
1. 10. D Vitamini 28
1. 10. 1. D Vitamini Kaynakları 29
1. 10. 2. D Vitamini Fonksiyonları 30
1. 10. 3. D Vitamini Metabolizması 30
1. 10. 4. D Vitamini Eksikliği 31
1. 10. 5. D Vitamini ve Meme Kanseri 32
1. 11. Ürokinaz Plazminojen Aktivatörü Sistemi 33

1. 11. 1. Fibrinolitik Sistem 33
1. 11. 2. Ürokinaz Plazminojen Aktivatörü Sistemi Komponentleri 34
Ürokinaz Tipi Plazminojen Aktivatörü (uPA) 35
Doku Tipi Plazminojen Aktivatörü (tPA) 36
Plazminojen Aktivatör İnhibitörleri 37
Ürokinaz Plazminojen Aktivatörü Reseptörü (uPAR) 39
1. 12. MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücre Hattının Özellikleri 39

2. GEREÇ VE YÖNTEM
2. 1. Gereçler 41
2. 1. 1. Kullanılan Kimyasallar 41
2. 1. 2. Cihazlar ve Laboratuvar Gereçleri 42
2. 2. Metod 43
2. 2. 1. Hücre Kültürü 43
2. 2. 2. Gerçek Zamanlı Hücre Çoğalma Elektronik Algılama Sistemi 44
2. 2. 3. Gerçek Zamanlı Hücre Çoğalma Elektronik Algılama Sistemiyle Hücre Büyüme Eğrisinin Belirlenmesi 46
2. 2. 4. TGFβ2'nin MCF-7 Hücre Proliferasyonuna Etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Çoğalma Elektronik Algılama Sistemiyle Belirlenmesi 46
2. 2. 5. D Vitamininin MCF-7 Hücre Proliferasyonuna Etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Çoğalma Elektronik Algılama Sistemiyle Belirlenmesi .. 47
2. 2. 6. PAI-1 Protein Analizi ve uPA Aktivitesi İçin Hücre Lizatlarının Hazırlanması 47
2. 2. 7. Hücrelerin Protein Analizi 48
2. 2. 8. MCF-7 Hücre Hattında PAI-1 Düzeyi Ölçülmesi 49
2. 2. 9. MCF-7 Hücre Hattında uPA Aktivitesi Ölçülmesi 51
2. 3. İstatistik Analizleri 53

3. BULGULAR
3. 1. Çalışılacak Hücre Sayısının Optimizasonu 54
3. 2. TGFβ2'nin MCF-7 Hücre Proliferasyonuna Etkisi 55
3. 3. TGFβ2'nin IC_{50} Değerinin Belirlenmesi 56
3. 4. TGFβ2 Uygulanan ve Kontrol Grubundaki Hücrelerin PAI-1 Düzeyi Ölçümü Sonuçları 57

3. 5. TGFβ2 Uygulanan ve Kontrol Grubundaki Hücrelerin uPA Aktivitesi Ölçümü Sonuçları 58
3. 6. D Vitamininin MCF-7 Hücre Proliferasyonuna Etkisi 59
3. 7. D Vitamininin IC_{50} Değerinin Belirlenmesi 61
3. 8. D Vitamini Uygulanan ve Kontrol Grubundaki Hücrelerin PAI-1 Düzeyi Ölçümü Sonuçları 63
3. 9. D Vitamini Uygulanan ve Kontrol Grubundaki Hücrelerin uPA Aktivitesi Ölçümü Sonuçları 65
3. 10. TGFβ2 ve D Vitamini Kombine Uygulanan ve Kontrol Grubundaki Hücrelerin PAI-1 Düzeyi Ölçümü Sonuçları 66
3. 11. TGFβ2 ve D Vitamini Kombine Uygulanan ve Kontrol Grubundaki Hücrelerin uPA Aktivitesi Ölçümü Sonuçları 67
4. TARTIŞMA 69
5. SONUÇ ve ÖNERİLER 79
6. KAYNAKLAR 82
7. ÖZGEÇMİŞ 89

SİMGELER ve KISALTMALAR

α	Alfa
APC	Tümör baskılayıcı gen
β	Beta
Bax	Proapoptotik gen
Bcl-2	Antiapoptotik gen
BMP	Kemik morfogenetik proteini
BRCA1	Meme kanserine yatkınlık geni
BRCA2	Meme kanserine yatkınlık geni
BSA	Sığır serum albumini
CDI	Siklin bağımlı kinaz inhibitörü
CDK	Siklin bağımlı kinaz
CDM	Kıkırdak türevli morfogenetik protein
c-fos	Onkogen
c-jun	Onkogen
DCIS	İn situ duktal karsinom
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
E2F	Transkripsiyon faktörü
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ECM	Ekstrasellüler matriks
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
ER	Östrojen reseptörü
EMT	Epitelyal mezenşimal geçiş
FBS	Fetal sığır serumu
FSH	Folikül stimüle edici hormon
GDF	Büyüme ve farklılaşma faktörü
GDNF	Glial hücre kökenli nörotropik faktör
GTPaz	Guanozin trifosfataz
HER2	Büyüme faktörü reseptör geni
IC_{50}	Hücrelerin yarısını öldüren madde miktarı
IDC	İnvaziv duktal karsinom

IFN	İnterferon
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü
ILC	İnvaziv lobüler karsinom
LCIS	İn situ lobüler karsinom
LTBP	Latent TGFβ bağlayan protein
MCF-7	Meme kanseri hücre hattı
MDA-MB-231	Meme kanseri hücre hattı
MIS/AMH	Müller inhibe edice madde/ anti-Müller hormonu
MLH1	Tümör baskılayıcı gen
MLH2	Tümör baskılayıcı gen
MTT	Toksisite analiz yöntemi
Myc	Onkogen
nm	Dalga boyu
p53	Tümör baskılayıcı gen
PAI-1	Plazminojen aktivatör inhibitörü-1
PAI-2	Plazminojen aktivatör inhibitörü-2
PBS	Fosfat tuzu tamponu
PDGF	Platelet orijinli büyüme faktörü
Pna	Para nitro anilin
PSG	Penisilin streptomisin glutamin
PTHrP	Paratiroid hormon ilgili protein
Rb	Retinoblastoma
RNA	Ribonükleik asit
Src	Onkogen
TGFβ	Transforming Growth Factör Beta
tPA	Doku tipi plazminojen aktivatörü
TNF	Tümör nekroz faktörü
uPA	Ürokinaz tipi plazminojen aktivatörü
uPAR	Ürokinaz plazminojen aktivatör resptörü
VHL	Tümör baskılayıcı gen
WST	Toksisite analiz yöntemi
XTT	Toksisite analiz yöntemi

1. GİRİŞ

Kanser, normal dokulara uyum sağlayamayan, normal dokuların gelişimini aşan ve kendisini oluşturan uyarının yok olması durumunda bile aşırı seyrinde devam eden bir doku kitlesi olarak tanımlanmaktadır (Greenlee ve ark 2001).

Kadınlarda meme kanseri en fazla görülen kanserdir ve dünyada kadınlarda kanser ölümlerinin başta gelen nedenidir. Meme kanserinin, dünya çapında tahmini yıllık insidansı 1 milyon olgudur, 200.000 olgu Amerika Birleşik Devletleri'nde, 320.000 olgu ise Avrupa'da görülür. Amerika Birleşik Devletleri'nde, meme kanseri insidansı son 20 yıl içinde yavaş yavaş artmaya başlamıştır. Bununla ilgili yapılan epidemiyolojik çalışmalarda meme kanserinin epidemiyolojisinde; yaş, vücut ağırlığı, kilo değişimleri, laktasyonun zamanı ve sayısı, eksojen ve endojen hormon konsantrasyonu ve metabolizması, benign meme hastalığı öyküsü, radyasyona maruziyet, alkol kullanımı ve ailede meme kanseri öyküsü tanımlanmıştır. Meme kanseri insidansı oranlarındaki çarpıcı coğrafi farklılıklar; populasyonlar arasındaki genetik farklılıklardan ve yaşam tarzı ya da beslenme gibi çevresel faktörlerden etkilenmektedir (Moorman ve Terry 2004).

Kanser, insan ölüm nedenleri arasında kardiyovasküler hastalıklardan sonra gelmektedir ve ikinci sırada yer almaktadır. Kanserin meydana gelmesi, transforming growth faktör β (TGFβ) gibi birçok büyüme faktörlerinin de rol oynadığı çeşitli patojenik mekanizmalar ile açıklanmaya çalışılmıştır. TGFβ doku homeostazının sürdürülmesi ve embriyonik gelişimin kontrolünde rol oynamaktadır. TGFβ önemli rolleri olan geniş bir sitokin ailesinin başlıca üyesidir. TGFβ hemen hemen bütün hücrelerde sentezlenir, hücresel olayların çoğunu düzenler ve trombositlerin alfa granülleri içinde yoğun miktarda bulunur. Birçok hücre tarafından sentezlenenen TGFβ hücre bölünmesi (proliferasyon), farklılaşması (diferansiasyon), adhezyon, morfogenez, ekstraselüler matriks oluşumu ve programlı hücre ölümü gibi çeşitli hücresel süreçlerin kontrolünü sağlamaktadır. İkiyüzlü bir molekül olan TGFβ hem tümör supresör, hem de onkogen gibi davranabilmektedir. Antiproliferatif, proapoptotik ve inflamatuar cevabı baskılayıcı özellikleri ile TGFβ tümör supresyonu sağlamaktadır. Kanserde TGFβ anti-tümöral immün cevabı baskılamaktadır (Vural 2010).

TGFβ ailesi çok sayıda birbirine benzer polipeptid büyüme faktörleri içerir ve hücre proliferasyonu, farklılaşması, motilitesi, adezyonu ve ölümü gibi hücresel süreçleri düzenlemektedir. Gelişimi çok yönlü kontrol eden ekstrasellüler büyüme faktörlerinin büyük bir bölümünü oluşturan TGFβ, organizmanın tüm dokularının gelişiminde, homeostazisinde ve onarımında önemli rol oynamaktadır.

Çeşitli hastalıklarda TGFβ sinyal iletiminde farklılıklar tespit edilmiştir. Büyüme inhibitörü yanıtlarının TGFβ'ya iletimindeki aksaklıklar kanser hücrelerinde sık görülen bir durumdur. TGFβ aktivitesinin artışı akciğer, böbrek, karaciğer ve diğer organlarda, dokular arasındaki matriks materyalinin artışı ile fibrotik hastalıklarda merkezi bir rol oynamaktadır.

TGFβ hastalıkta ve sağlıklı hücrelerde farklı roller oynamaktadır. Kanserin erken evrelerinde epitelyal tümör gelişimini inhibe etmekte, geç evrelerde ise tümör ilerlemesi için bir tümör promotorü olarak ikili bir görev yapmaktadır. uPA tümör ilerlemesi sırasında kanser hücre yaşamını, yayılmasını etkilemekte ve hücre malignite gelişimini sağlamaktadır. uPA ve uPAR hareketleri normalde hassas bir şekilde düzenlenmektedir fakat bu ekspresyon kanser hücrelerinde düzensizleşmektedir. TGFβ kanser hücrelerinde uPA ekspresyonunu düzenlemektedir (Krstic ve ark 2014).

TGFβ ile erken aşamalarda kanser hücrelerinin büyümesi üzerinde önemli bir engelleyici etkiye sahiptir ve kanser gelişiminde karmaşık bir rol oynamaktadır. Erken aşamalarda epitelden mezenşimal geçiş (EMT) indüklenmekte, geç aşamalarda ise hücre invazyonu ve metastazını artırmaktadır (Khajah ve ark 2012).

TGFβ plazminojen aktivatörlerinin ekspresyonunu ve sekresyonunu düzenleyerek hücre etrafında meydana gelen proteolizin güçlü bir düzenleyicisi olarak görev yapmaktadır. Ürokinaz plazminojen aktivatörü'nün (uPA) ürokinaz plazminojen aktivatör reseptörü'ne (uPAR) bağlanması hücre migrasyonu, farklılaşması ve çoğalmasını uyarmaktadır (Suqioka ve ark 2013).

Proteazlar, tümör hücrelerinin invazyonu için gereklidir. İnvazyon meydana gelebilmesi için proteazların tümör hücre yüzeyinde yada periselüler yüzeyde aktif olması gerekir. Meme kanserinde, ürokinaz plazminojen aktivatörü (uPA), serin

proteinaz, saldırgan bir malign fenotipi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. uPA reseptörüne (uPAR) bağlı hücre yüzey uPA, meme kanser gelişimi ve metastaz da merkezi bir rolü olan plazminojeni plazmine aktive etmektedir. Plazmin, büyüme faktörleri ve glikoproteinlerin perisellular proteoliz yoluyla hücre-hücre ve ekstraselüler matriks adhezyonu bozulmasına yol açan ve proteaz kaskadlarını aktive ettiği bildirilmektedir. Plazmin de büyüme faktörlerini aktive veya inaktive etmesiyle ve büyüme faktör reseptörleri ve adhezyon reseptörlerinin modifiye edilmesiyle hücre fenotipini etkileyebildiği söylenmiştir (Obermajer ve ark 2009).

uPA ve uPAR hücre dışı matriksin proteolitik degradasyonunda yer almaktadır. uPA ve uPAR birlikte kanser hücrelerinin hayatta kalmasını sağlamakta ve tümör ilerlemesi sırasında hücrelerin malignitesini artırmaktadır. uPA'nın reseptörü olan uPAR'a bağlanması adhezyon, proliferasyon ve migrasyonu modüle etmektedir. TGFβ kanser gelişiminde uPA aktivitesini düzenlemektedir (Santibanez 2013).

uPA kanser invazyonu ve metastazında önemli rolü olan bir serin proteazdır. uPA reseptörüne bağlandığında plazminojeni plazmine çevirir ve invazyon için gerekli olan ekstrasellüler matriks (ECM) açığa çıkmasını sağlar. uPA inhibitörlerinden olan PAI-1 plazmada ve tümör dokusunda yüksek düzeylerde bulunmaktadır. Retrospektif çalışmalarda uPA inhibitörü olan PAI-1'in meme kanserinde kötü sağkalım ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Foekens ve ark 2000).

1,25$(OH)_2D_3$'ün, hem normal hem de kanser hücresi proliferasyonunu inhibe eden en güçlü hormonlardan biri olduğu bilinmektedir. 1,25$(OH)_2D_3$'ün hücresel proliferasyon ve farklılaşmayı düzenleyen tam mekanizması anlaşılamamasına rağmen, birçok gen proliferasyonunu, farklılaşmasını, apoptozisi ve anjiyogenezi kontrol etmektedir (Holick 2008).

D vitamininin apoptozisi indüklediği meme, prostat ve kolon kanserlerinde ve birçok tümör modelinde gösterilmiştir. D vitamininin hücre ölümü üzerine etkisi ya doğrudan antiapopitotik hücre proteini olan Bcl2'nin inhibisyon yolu ile yada "pro-apopitotik proteinleri" harekete geçirerek veya EGF, PG, IGF, JNFalfa ve beta katenin gibi diğer sinyal yolakları ile etkileşime girerek onları bir şekilde etkisiz kılması ile gerçekleşmektedir (Kulie ve ark 2009, Hewison 2010).

Tümör invazyonu D vitamini tarafından inhibe edilmektedir ve bu anti-invaziv etkide plazminojen aktivatör sistemi, metalloproteinazlar, tenascin C gibi invazyonda görev alan moleküllerin inhibisyonu, E-cadherin ekspresyonu artması işlev görmektedir (Holick 2010).

Meme kanseri tüm dünyada kadınlarda en yaygın görülen kanserlerden biridir. Primer tümör formatında iken tedavi şansı yüksek olan meme kanserlerinde invaziv formda oldukça yüksek mortalite ve morbiditeye sahip olduğu gözlenmektedir. Hastalığın primer tümör boyutundan çıkıp invaziv forma dönüşmesi mortalite ve morbidite açısından önemlidir. TGFβ erken evrelerde tümör hücre proliferasyon inhibisyonu ve bir tümör baskılayıcı olarak, ileri dönemlerde ise tümör hücre invazyonu ve metastazı uyararak tümör organizatörü olarak hareket edebilir. Literatürde D vitamini verilen deney hayvanları ya da hücre kültürü ortamlarında anti-proliferatif etkinliği gösterilmektedir. Literatürler PAI-1 düzeyinin invazyon açısından önemli bir markır olduğu ve primer doku PAI-1 düzeyinin kötü prognostik faktör olduğu belirtilmektedir. Çalışmamızda in vitro ortamda verilen TGFβ2 ve vitamin D'nin meme kanser hücrelerinin invazyon parametreleri üzerine etkisini araştırmayı amaçladık. Bu amaçla önemli bir invazyon markırı olan uPA aktivitesi ve PAI-1 düzeyinin TGFβ2 ve D vitamini tarafından regülasyonunu araştırılacaktır.

1. 1. Kanser

Kanser, hücrelerde iç ve dış etkilerle hücre ve hücre topluluklarının DNA hasarı sonucu kontrol dışı ve anormal bir şekilde prolife olması ve büyümesini içeren bir olgudur. Günde vücudumuzda (DNA'da) yaklaşık 10 000 mutasyon olmasına rağmen bağışıklık sistemimiz her milisaniye vücudumuzu tarar ve kanserli hücreleri yok eder.

Sağlıklı vücut hücreleri (kas ve sinir hücreleri) hariç bölünebilme yeteneğine sahiptir. Ölen hücrelerin yenilenmesi ve yaralanan dokuların onarılması amacıyla bu yeteneklerini kullanırlar. Fakat bu yetenekleri sınırlıdır. Her hücrenin hayatı boyunca belli bir bölünebilme sayısı vardır. Sağlıklı bir hücre gerektiği yerde ve gerektiği kadar bölünebilir. Buna karşın kanser hücreleri kontrol mekanizmasını kaybederek sürekli çoğalır ve invazyon yaparak organizma organlarına zarar verirler.

Kanser hücreleri bir araya gelerek tümörleri oluştururlar ve bu kanser hücreleri oluştukları tümörden ayrılıp kan ya da lenf dolaşımı aracılığıyla vücudun diğer bölgelerine gidebilirler. Kanserin bu şekilde vücudun diğer bölgelerine yayılmasına metastaz adı verilmektedir ve genel olarak hastalar metastazlar nedeniyle kaybedilir. Hızlı ilerleyen kanserlerde metastaz erken, daha iyi kanserlerde ise metastaz geç oluşmaktadır. Metastaz oluşumu tesadüften çok, kanser hücrelerinin bazı organlara kolay yerleşmesini sağlayan özelliklerine bağlıdır. Örneğin kolon kanseri karaciğere, prostat kanseri kemiğe metastaz yapabilmektedir. Metastazda kanserli dokudaki kan akımı ve damar hücrelerinin aktivasyonu gibi faktörler rol oynamaktadır.

Kanser ölüm nedeni olarak, kalp ve damar hastalıklarının hemen arkasından gelmektedir. Batı toplumlarında her yıl 250–300 kişiden biri kansere yakalanmaktadır. Kanser görülme sıklığı 60 yaşın üzerinde artmakta ve 300 kişide 4–5 civarına yükselmektedir.

Ülkemizde en sık görülen kanserler erkeklerde akciğer, prostat, kalın bağırsak, rektum, mide ve pankreas; kadınlarda meme, akciğer, kalın bağırsak, rektum, serviks, over, mide ve pankreas kanserleri olarak sıralanabilir. Deri kanseri sıklığı her iki cinste de yüksek olmakla birlikte, malign melanom dışındaki deri

kanserleri tedaviye iyi cevap verdiklerinden ölüm oranı çok düşüktür (www.iuonkolojienstitüsü.org).

Tümörler benign (iyi huylu) ve malign (kötü huylu) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Kontrolsüz olarak bölünen hücreler, bulundukları bölgede bir kitle oluşturacak şekilde çoğalıp bulundukları bölge dışında yerleşme eğilimi göstermeyip primer alanlarında kalmaya devam ediyorlarsa benign, bulunduğu yerden diğer doku ve organlara yayılma eğilimi gösteriyorsa bu tip kanserlere malign tümör adı verilmektedir.

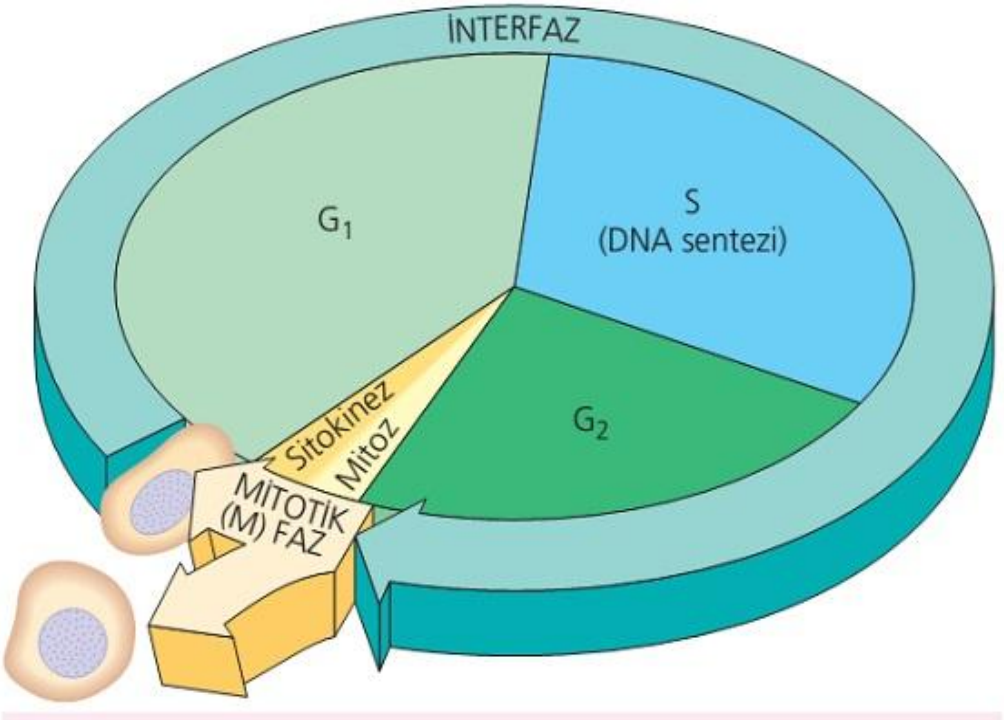
Tümör hücreleri normal hücrelerden farklı olarak kendi büyüme hormonlarını sentezlemekte ve kendi proliferasyonlarını uyarmaktadırlar. Büyüyebilmek için ekstrasellüler yüzeyle etkileşime ihtiyaç duymazlar, daha az yapışkan olup, üst üste ya da alt alta büyürler. Normal hücrelerde, hücre belirli bir yoğunluğa ulaşınca proliferasyon durur, tümör hücrelerinde ise büyüme devam eder (Dalay 2000).

1. 2. Hücre Siklusu

Hücre siklusu, çoğalmak üzere uyarılmış bir hücrede gerçekleşen ve bir dizi geçici biyokimyasal aktivitelerin ve morfolojik değişikliklerin görüldüğü bir süreçtir. Bir siklusa giren hücre, morfolojik ve genetik olarak birbirine tıpa tıp benzeyen iki hücre oluşumuyla döngü tamamlanır. Hücrenin kendine benzer iki hücreye çoğalması dış uyarılar sonucu biyokimyasal olarak başlatılan bir seri fazdan geçer ve hem dış hem de iç büyüme faktörleri tarafından düzenlenir. Bazı onkogenler ve hücre döngüsüne özgü proteinler hücre döngüsü boyunca senkronize bir şekilde aktifleştirilir ve ardından inaktifleştirilir.

Hücre siklusu, hücre büyümesi ve proliferasyonu kapsamakta ve G1, S, M ve G2 olmak üzere 4 temel fazdan oluşmaktadır (Şekil 1.1). Hücreler genel olarak bir bölünme sinyali almadıkları sürece hücre siklusunun aktif fazlarına (G1, S, M, G2) giremezler ve istirahat fazı denilen G0 fazında beklerler. Hücre bölünme sinyali alındığında sinyal ileti kaskadı "signal transduction cascade" adı verilen bir ileti mekanizması devreye girer. Bu ileti mekanizması ya transkripsiyonu, hücre siklusunu veya hücre iskeletini kontrol eden bir substratı fosforiller yada nukleusa ulaşıp doğrudan transkripsiyonu modüle eder. Böylece, hücre siklusa sokularak

bölünmeye (mitozise) teşvik edilmiş olur. Hücreler mitozise girmeden önce bir hazırlık safhası geçirirler ve bu safhada hücreler hacimce büyürler. Bu hazırlık safhasında bölünme için gerekli olan çeşitli düzenleyici proteinler (Örn. Siklinler) ve makromoleküller (Örn. Deoksiribonükleik asit'ler) sentezlenir. Bu hazırlık safhasına da interfaz denir. İnterfaz kendi içinde G1, S ve G2 olmak üzere çeşitli alt bölümlerden oluşur. Mitozis ve interfaz beraberce hücre siklusu olarak bilinen bir süreci oluşturular (www.biyokimya.uludag.edu.tr)



Şekil1.1. Hücre Siklusu (Eltun 2015).

Siklusta; G0 fazında, hücreler genellikle spesifik bir işlevi görmek için programlanır. G1 fazında, hücre metabolik olarak aktiftir ve spesifik hücre fonksiyonları için gereken proteinler ve RNA sentezlenir. Ayrıca DNA sentezi için gerekli olan birçok enzim sentezlenir, fakat DNA'nın sentezi yapılmaz. S fazında hücre içindeki DNA'nın miktarı ikiye katlanır. G2 fazında ise DNA sentezi durur, RNA ve protein sentezi devam eder. M (mitoz) fazında, protein ve RNA sentezi yavaşlar, genetik materyal, oluşan iki yeni hücreye dağılır. Bu fazdan sonra oluşan yeni hücreler ya G0 yada G1 fazına girerler.

Hücre siklusu siklusa özel bir takım proteinler olan siklinler, siklin-bağımlı serin/treonin protein kinazlar (CDK) ve siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri (CDI) tarafından özgün olarak kontrol edilir. Siklinler, CDK ve CDI'lerinin düzeyleri hücre

siklusunun çeşitli aşamalarında farklılık gösterir ve oldukça komplike bir düzen içinde siklusun ilerlemesini düzenlerler. Hücre siklusu kontrol noktalarındaki değişimler ile hücre siklusunun düzenlenmesinde oluşan hatalar sonucu hücre bölünmesi kontrolü sağlanamaz ve bu hatalar kanser gelişimine neden olabilmektedir.

Meme kanserlerinde siklin-D1 (PRAD1) ve siklin-E'nin %30 oranında aşırı üretimi saptanmış ve prognostik faktör olabilecekleri ileri sürülmüştür (Kemomarsi ve ark 1995, Zukerberg ve ark 1995).

1. 3. Apopitozis

Apopitozis klasik hücre ölüm şekli olarak bilinen nekrozisden birçok özelliği açısından oldukça farklı olan bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Apoptozis terimi, ilk kez İskoçyalı araştırmacılar olan Kerr, Wyllie ve Currie tarafından 1972 yılında kullanılmıştır ve canlı dokulardaki hücre sayısındaki azalmalarından sorumlu olan, yapısal olarak özgün bir hücre ölüm tipi olarak tanımlanmıştır (Allen ve ark 1993, Lawrence ve ark 1993).

Apopitozis fizyolojik hücre ölümünü ifade etmektedir ve çeşitli hücre dışı lezyonlar yada genetik faktörlerce aktive edilmektedir. Apopitozis hücre tarafından programlanmış bir mekanizmayla hücre ölümünü kontrol eden bir işlemdir (Altunkaynak ve Özbek 2008). Apopitozis, belirli işlemler sonunda hücrenin ölümünü sağlar ve aynı zamanda organizmanın yaşam döngüsü için gerekli ve yararlıdır.

Apopitozis intrensek ve ekstrensek yollarla uyarılmaktadır. Apopitozis çok sayıda modülatörler tarafından düzenlenmektedir. Bunlar arasında, bazı iyonlar (kalsiyum), moleküller (seramid), genler (c-myc), proteinler (p53) ve organeller (mitokondri) bulunmaktadır. Apoptotik süreç boyunca hücre içine sürekli kalsiyum girişi olur. Kalsiyum iyonları endonükleaz aktivasyonunda, doku transglutaminaz aktivasyonunda, gen regulasyonunda, proteazların aktivasyonunda ve hücre iskeleti organizasyonunda rol alabilirler. Mitokondrilerin apoptozis sürecinde önemli bir görevi vardır. Proapoptotik ve antiapoptotik üyeleri olan, Bcl-2 ailesi, sitokrom C2'nin sitoplazmaya salınımını engelleyerek apoptozisin durdurulması şeklinde mitokondriyi aktifleştirirle

Hücre ölümü sırasında oluşan pek çok hücresel ve şekilsel değişimler, kaspazların rol oynadığı birtakım süreçler neticesinde gerçekleşmektedir. Kaspazlar, zimojen olarak sitoplâzmada bulunan ve aktif merkezlerinde sistein yer aldığından sistein proteazlar olarak adlandırılan apoptozu başlatan ve hücre için bileşenlerin sindiriminden sorumlu enzimlerdir. Kaspazların 14 tanesi tanımlanmıştır ve çoğu apoptoziste rol almaktadır. Kaspazlar birbirlerini aktifleştirerek proteolitik bir kaskada neden olurlar. Aktif kaspaz-3, kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörünü (ICAD) inaktifleştirir, böylece ICAD'ın bağladığı kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz (CAD) serbestleşir. Bu da apoptozisin karakteristik bulgularından biri olana kromatin yoğunlaşmasına ve DNA fragmentasyonuna neden olur (www.istanbul.edu.tr/fen/notları).

Apoptoz, embriyonik dönemden ölüme kadar pek çok fizyolojik veya patolojik olayda izlenen programlı hücre ölümüdür. Apoptozda, hücre yüzeyinde, hücre organellerinde ve çekirdekte çeşitli değişiklikler görülmektedir. Nekrozdan farklı olarak apoptoz belirli bir moleküler işlemlerin sonunda hücrenin ölümünü sağlar ve aynı zamanda organizmanın yaşam döngüsü için gerekli ve yararlıdır. Nekrozda apoptozdan farklı olarak rastgele, kontrolsüz gerçekleşen bir süreçtir ve inflamasyonla sonuçlanan patolojik bir hücre ölümüdür. Apoptoza uğrayan bir hücre nekrozdan farklı olarak küçülerek ölmektedir (Vaux ve ark 1994).

1. 4. Onkogenler

Kanser hücrelerinde protoonkogenler ve tümör baskılayıcı genler olmak üzere iki genel gen kategorisi mutasyona uğrar ve yanlış ifadelenir.

Protoonkogenler mutasyonlar veya artmış gen ekspresyonu nedeniyle onkogene dönüşebilen normal genlerdir. Protoonkogenler, ürünleri hücre büyümesini ve bölünmesini ilerleten genlerdir. Bu görevlerini, diğer genlerin ifadelerini uyaran transkripsiyon faktörlerini kodlayarak, hücre bölünmesini uyaran sinyal iletim moleküllerini yada hücrenin hücre döngüsü boyunca ilerlemesini sağlayan hücre döngüsü düzenleyicilerini kodlayarak yaparlar.

Protoonkogenler, hücrenin sinyal ileti mekanizmasında görev yapan birçok proteinin sentezinden sorumlu olan genlerdir. Normal hücrelerin bölünmesinin düzenlenmesinde işlev gören proteinler (büyüme faktörleri, büyüme faktörlerinin

reseptörleri, ileti çeviricileri ve transkripsiyon faktörleri), protoonkogenler ve onkogenler tarafından sentezlenmektedir. Büyümenin düzenlenmesini kontrol eden proteinler olan protoonkogenlerin, onkogen haline dönüşümü hücre büyümesinin kontrol mekanizmasını bozmakta, kanser hücrelerinin kontrolsüz çoğalmalarına ve büyümelerine yol açmaktadır (Onat ve ark 2002, Scriver ve ark 2001).

Onkogenler hücre farklılaşması ve çoğalması üzerinde etkili olan genlerdir. Normal şartlarda, genetik değişimlerin gözlenmediği durumlarda bu yapılara protoonkogenler adı verilir. Fonksiyonel değişikliğe neden olan mutasyonların gözlenmesi durumunda ise onkogen olarak adlandırılır ve bu durumda aşırı hücre çoğalmasına neden olurlar. Onkogenler dominant karakterde hareket etme eğilimindedirler. Bu nedenle, anne ve babadan gelen allerlerden sadece bir tanesinde dahi mutasyon oluşması hücrenin aşırı çoğalması ve buna bağlı olarak kanser gelişmesi için yeterlidir. Onkogenler, hücre transformasyonunu başlatma ve sürdürme kapasitesine sahiptirler. Hücre siklusunun normal çalışma düzenini bozan onkogenler, yeterli prolifere olmayan hücreleri de yok ederek apoptozisi de tetiklerler (Cotran ve ark 1998).

İlk onkogen 1970 yılında keşfedilmiştir ve src olarak adlandırılmıştır. 1976 yılında J. Michael Bishop ve Harold E. Varmus adlı doktorlar onkogenlerin hasarlı protoonkogenler olduğunu kanıtlamış ve insanlar dahil birçok organizmada var olduklarını bulmuşlardır. Bishop ve Varmus bu buluşları nedeniyle 1989 yılında Nobel Fizyoloji veya Tıp Ödülüne nail görülmüşlerdir.

Ras geni: İnsan tümörlerinde sıklıkla mutasyona uğrayan genlerinden birisi ras gen ailesindendir. Ras geni insan tümörlerinin %40'ında mutasyona uğramışlardır. Ras gen ailesi hücre membranının iç yüzeyine yerleşmiştir ve GTPaz aktivitesine sahiptir. Ras geni hücresel büyümenin kontrolünden sorumlu olan p21 proteinini kodlamaktadır. Ras genindeki mutasyonlar, insan kanserlerindeki onkogenlerin en yaygın anormalliklerindendir ve nokta mutasyonu ile aktivasyonun en güzel örneğini oluştururlar (Öztürk 2006, Dönmez ve ark 2009).

H-ras, K-ras ve N-ras olmak üzere üç homologu vardır. İnsan tümörlerinin yaklaşık % 30 kadarında ras genlerinin mutant olmasına karşılık tümörü çevreleyen sağlıklı dokularda ras genlerinin normal olduğu belirlenmiştir.

Fosfoinositid-3 kinaz (PI-3K) geni: Büyüme ve yaşama sinyallerinin iletiminden sorumlu olan bu protein, apoptozu baskılamaktadır ve onkogenik Ras geni ile aktifleşir (McCormick 1999).

erb-B2: HER2/neu olarak da biline erb-B2 epidermal büyüme föktörü (EGF) için hücre yüzey reseptörünü şifreleyen gen ailesi tarafından kodlanmaktadır ve EGF reseptör analoğudur. Büyüme faktörü reseptörlerinin tümünde olduğu gibi erb-B2 onkoproteini de tirozin kinaz aktivitesine sahiptir. erb-B2 onkogeninin meme, over ve gastrik kanserle ilişkili olduğu belirlenmiştir. cerbB-2 ekspresyonu meme kanserlerinin ortalama %30'unda gösterilmiştir ve hücre farklılaşması ve hücre bölünmesine katılmaktadır. Bu genin amplifikasyonunun klinik önemi, meme kanserlerinde prognostik bir belirleyici olabilmesinden kaynaklanmaktadır (Slamon ve ark 1987).

Myc: Myc proteini çekirdekte bulunur ve hücre büyümesi ile ilişkili genlerin ekspresyonunu kontrol eden bir transkripsiyon faktörüdür. C-myc'nin 17. gen amplifikasyonu, hücre döngüsünün bozulmasına neden olur ve p53'e bağlı yoldan hücrenin apoptoza gönderilmesinde rol oynar. C-myc gen yapısındaki değişiklikler ve bu genin aşırı üretimi meme kanserine neden olmaktadır (Öztürk 2006).

1. 5. Tümör Baskılayıcı Genler

Tümör baskılayıcı genler, hücre çoğalmasını ve tümör gelişimini kontrol altında tutan genlerdir. Etkilerini, bozulmuş hücre döngüsünün devamını engelleyerek, gerekli durumlarda hücreleri apoptozise yönlendirerek, hücre içerisinde DNA replikasyonu ve tamiri ile segragasyonun hatasız gerçekleşmesini kontrol altında tutarak, mutasyon oranlarının düşük seviyede tutulmasını ve genomun stabil kalmasını sağlayarak gösterirler.

Hücre çoğalmasını baskılayan tümör baskılayıcı genler etkilerini iki farklı şekilde gerçekleştirirler. Hücre siklusunu kontrol altında tutan ve gatekeeper adı verilen APC ve VHL gibi genler bu etkilerini hücre proliferasyonunu direkt baskılayarak gösterirler. Hücre proliferasyonu üzerine indirekt etki gösteren ve caretaker olarak adlandırılan BRCA1, BRCA2, MLH1 ve MLH2 gibi genler ise

DNA tamirinden sorumlu olup mutasyon oluşumuna engel olarak genomun stabil kalmasında etkin rol oynarlar (www.kansergenetigi.com.tr).

Tümör baskılayıcı genleri onkogenlerden ayıran en önemli özelliklerden birisi çekinik karakterli hareket etmeleridir. Onkogenler tek bir mutasyon sonrasında kansere neden oldukları için yaşam içerisinde somatik hücrelerde meydana gelen değişiklikler sonucunda hastalık gözlenir ve üreme hücresi ile sonraki nesillere aktarılmazlar. Tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu için gerekli olan iki değişiklik yaşam içerisinde arka arkaya kazanabildiği gibi bir tanesi nesiller boyu aktarılarak bu kişilerde kanser predispozisyonuna ve ailesel kanser sendromlarının gözlenmesine neden olabilirler.

P53 Geni: p53 veya bir diğer adı olan tümör protein 53(TP53), hücre siklusunu düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. P53 geni nokta mutasyonlarla değişikliğe uğramaktadır. P53 geni insan kanserleri içinde en sık mutasyona uğrayan gendir. P53 geni 17p13.1 kromozom bölgesinde yer alır. Bilinen en ünlü tümör süpresör genidir. Bu genin bozulması durumunda yaklaşık %50–55 insan kanserlerinin oluşum etkenidir. Normal durumlarda p53 geni sürekli sentezlenir fakat hızla parçalanır ve bu yüzden hücrelerde çok düşük bir seviyede bulunur. Eğer DNA hasarı onarılamıyorsa, p53 geni apoptoz genlerinden olan BAX genini uyararak apoptoza neden olmaktadır. Gen, hücreyi DNA hasarına karşı korur ve hasar oluştuğu zaman hücre çoğalmasını G1/S sınırında durdurarak DNA onarımını başlatır, onarımın gerçekleşmesini sağlar (Aydemir 2007).

Rb: Retinoblastoma proteini, hücre döngüsünün G1/S kontrol noktasını kontrol eden bir tümör baskılayıcı proteindir. Retinoblastoma tümör baskılayıcı gendeki kayıp veya mutasyon meydana geldiğinde; meme, kemik, akciğer ve mesane gibi kanserlerin gelişimine neden olur. Retinoblastoma tümör baskılayıcı geni E2F gibi transkripsiyon faktörünü inaktivasyonuna neden olarak hücre döngüsünü G1/S fazında kontrol eder. Retinoblastoma protein yolağı normal hücre gelişiminde, kanseri engellemede, terminal farklılaşmada, apoptoziste ve ökaryotik hücre döngüsü sürecinde esas rol oynar (Aydın ve ark 2004)

Tümör baskılayıcı genlerdeki anormallikler, hücre siklusunun baskılanmasından sorumlu genlerdir. Bozulmaları durumunda organizma genetik olarak anormal hücreleri yok edemediğinden kanser gelişmektedir.

1. 6. Kanser Hücrelerinin Karakteristik Özellikleri

Kanser hücrelerin sürekli birikmesiyle karakterize olan bir bozukluktur. Sürekli çoğalarak aşırı miktarlarda artan hücre sayısı normal olarak gerçekleşen hücre kaybıyla dengelenememektedir. Bu hücreler invazyon yaparlar ve organizma organlarını hasara uğratırlar.

2000 senesinde yayınlanan makalede kanser hücresini özellikleri;

1- Büyüme hormonu sinyallerine artmış; büyüme karşıtı sinyallere karşı azalmış duyarlık sonucu kontrolsüz büyüme potansiyeli

2- "Planlı hücre ölümü" sisteminin bozulması sonucu mutasyona uğramış veya genetik olarak hatalı hücrelerin hızla çoğalması

3- Normal süreç içinde yaşlanma yeteneğini yitiren hücrelerin sonsuz bölünme potansiyeline erişmesi

4- Yeni damarlanmalar yapabilme yeteneği, tümör hücrelerinin çoğalma ve kitlesel büyüme hızını çok arttırır şeklinde tanımlamışlardır (Hanahan ve Weinberg 2000).

Komşu dokuları istila etme ve uzak bölgelere metastaz yapabilme yeteneği kanser hücrelerinin ayırt edici özelliğidir.

1. 7. Kanseri Meydana Getiren Etkenler

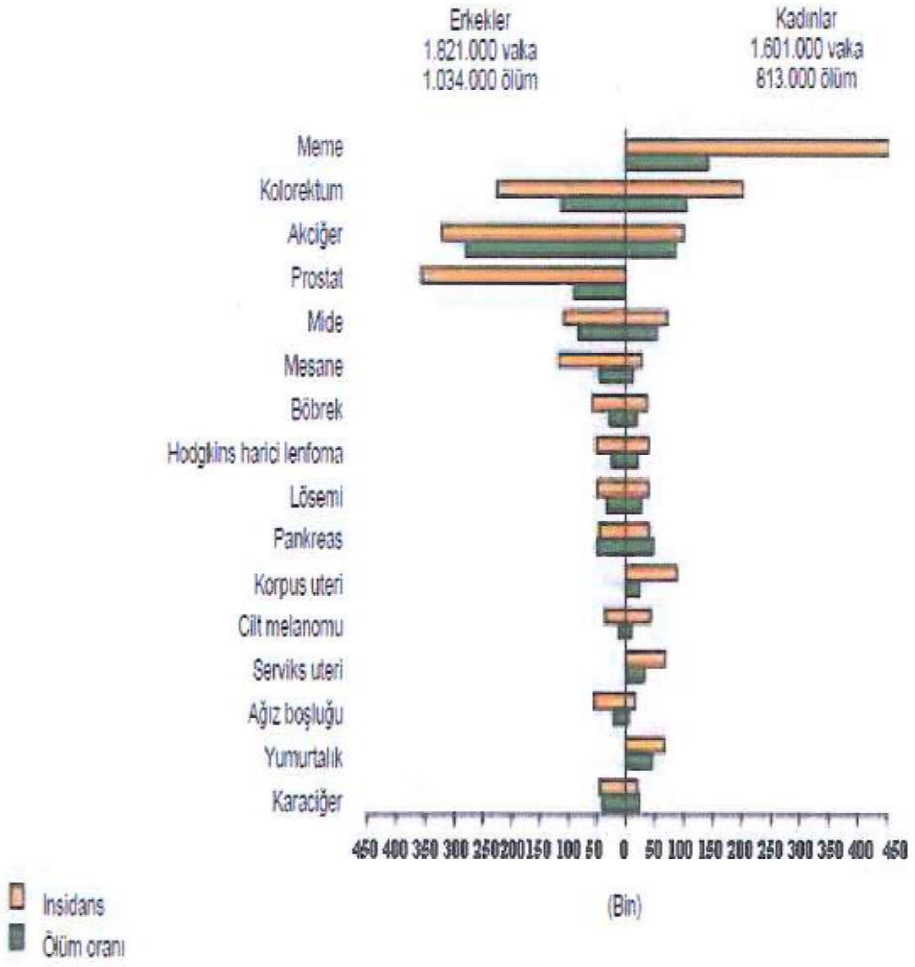
Kanserin esas nedeni hücre bölünmesi esnasında DNA replikasyonunun hatalı olması sonucu hücrelerin farklılaşmasıdır. DNA replikasyon anormalisine sebep olduğu sanılan birçok faktör mevcuttur ve bunlara predispozan (hazırlayıcı) faktörler denir. Hücre bölünmesi, doku tamiri ve yenilenmesi amacıyla yapılır. Doku tamiri ve yenilenmesini hızlandıran tüm etmenler aslında bir kanser hazırlayıcısı olabilir (http://wikipedia.org).

X ışınları, gama ışınları, radyoaktif maddelerden yayılan partikül radyasyonları ve ultraviyole ışınlar DNA zincirlerini kopararak mutasyona sebep olmaktadır ve kansere zemin hazırlamaktadır.

Bazı kimyasal maddelerin mutasyon potansiyeli yüksektir. Mutasyona neden olan kimyasal maddelere kanserojen denilmektedir. Anilin boya türevleri, sigara dumanındaki çok sayıda kimyasal, metilmetakrilat, asbest, silika tozları ve alçı tozları bunlara örnektir.

Kanser oluşumunda viral faktörlerinde etkisi bulunmaktadır. Örneğin papilloma virüsü ile rahim kanseri; Epstein-barr virüsü ile Burkitt lenfoması ve nazofaringal karsinoması arasında kesin etkileşimler olduğu saptanmıştır.

Dünya Sağlık Örgütü 2008 yılı istatistik verilerine göre (Şekil 1.2), kadınlarda en çok meme, kalınbağırsak, akciğer kanserleri; erkeklerde ise en çok akciğer, prostat, mide ve kalınbağırsak kanserleri görülmektedir (http://whqlibdoc.who.int).



Şekil 1.2. Balkanlar ve Türkiye genelinde teşhis edilen kanser çeşitlerinin dağılımı (Uluslararası Kanser Araştırmaları Kurumu, 2008).

1. 8. Meme Kanseri

Meme, kadınlarda süt üretimi için düzenlenmiş farklılaşmış bir ter bezidir ve tubulo-alveolar bir bezdir. Süt üreten lobüs sistemi ile bunları meme başına aktaran duktus sistemin birleşiminden oluşmaktadır. Zengin kanlanma, lenfatik yapı, bağ dokusu, yağ dokusu, sinirler, deri memenin şeklini verir ve aynı zamanda sekonder bir seks organı olmasını sağlamaktadır. Meme kanseri, lobüllerin ya da süt kanallarını oluşturan hücrelerin kontrol dışı çoğalmalarıyla gerçekleşmektedir. Süt kanallarından kaynaklanan kanserlere duktal karsinom, lobüllerden kaynaklanan kanserlere ise lobüler karsinom adı verilmektedir.

Meme kanseri memenin yapısında meydana gelen kötü huylu bir gelişim olarak tanımlanmaktadır (Zincir 1999). Kadınlarda sadece en çok görülen kanser türü olarak değil, aynı zamanda birçok ülkede özellikle de batı ülkelerinde kanserden meydana gelen ölümlerin başlıca sebepleri arasında sayılmaktadır (Barton 2001, Karayurt 2003). Meme kanseri, tüm kadın kanserlerinin yaklaşık dörtte birini teşkil etmektedir ve kadınlarda en sık görülen ve ölüm nedeni olan kanserdir (Parkin ve ark 2005).

Literatürler incelendiğinde; dünyada her üç dakikada bir kadına meme kanseri teşhisi konulduğu görülmektedir (Tükel 2008). Amerika'da yaşamı boyunca her dokuz kadından birisi meme kanserine yakalanmaktadır ve üçte ikisinin meme kanserine bağlı olarak hayatını kaybetme tehlikesi ile karşı karşıya kaldığı belirtilmektedir (Bottorff ve ark 1998, Günal ve Günal 2000). Avrupa ülkelerinde de, her on kadından birine yaşamı boyunca meme kanseri teşhisi konulmaktadır. Türkiye açısından bakıldığında ise; meme kanseri kadınlarda görülen en sık kanser türü olarak ifade edilmekte ve Sağlık Bakanlığı'nın 1999 yılı istatistiklerine göre kadınlarda görülme oranı %24.1 olduğuna işaret edilmektedir (Sağlık Bakanlığı Kanser İstatistikleri 1999).

Meme kanseri meme hücrelerinde meydana gelen kötü huylu bir tümördür. Bu hastalık genellikle kadınlarda ortaya çıkar. Fakat ender olarak erkeklerde de görülebilir. Klinikte her 100–200 kadın meme kanserine karşılık, bir erkek meme kanseri ile karşılaşılmaktadır (Aydıntuğ 2004).

1. 8. 1. Meme Kanserinde Onkogenler ve Tümör Baskılayıcı Genler

Meme kanserinin genetik temeli üzerinde yapılan çalışmalar tümörogeneziste birden fazla role sahip olan genlere yönelmiştir. Bu genler arasında onkogenler (ras, c-myc genleri), tümör supresör genleri (p53, BRCA1, BRCA2, nm23), büyüme faktörü reseptör genleri (HER2), hücre döngüsünün düzenlenmesinde rol alan genler (telomeraz) ve apoptozda rol alan genler (bcl gen ailesi) olarak bilinmektedir (yeniweb.mersin.edu.tr).

1. 8. 2. Steroid Reseptörler

Östrojen ve progesteronun meme kanseri gelişiminde kilit rol oynamaktadır. Östrojen meme dokusunda duktal epitelyumun diferansiyasyonu ile proliferasyonunu sağlamaktadır. Östrojen α ve β yoluyla fonksiyonlarını göstermektedir. Östrojen reseptörü yolağı meme kanseri patofizyolojisinde kritik bir rol oynamaktadır ve ERα'nın aşırı üretimi meme kanserli hastalarda prognostik ve prediktif faktördür.

1. 8. 3. Meme Kanserinde Genetik Yatkınlık

Genetik yatkınlık meme kanseri gelişimini artıran faktörlerden birisidir. Ailesinde meme kanseri olan bireylerde meme kanseri görülme riski artmaktadır. Birinci derece akrabalarda anne, kız kardeş, kız gibi meme kanseri olanlarda risk iki kat artar. İki veya daha fazla birinci derece akrabasında meme kanseri olanlarda risk daha fazla olmaktadır. Meme kanserinin oluşumunda %5–10 oranında genetik nedenli ailesel yatkınlık ortaya çıkmaktadır ve buna BRCA1 ve BRCA2 yatkınlık genlerinin neden olduğu gösterilmiştir.

BRCA1 kromozom 17q21'e, BRCA2 ise 13q12'ye yerleşik olarak bulunan genlerdir. BRCA1 ve BRCA2 genlerinde mutasyon meydana geldiğinde meme kanseri daha erken dönemde görülmektedir. Bu genlerdeki mutasyonu taşıyan kadınlarda tüm hayatları boyunca meme kanseri görülme riski %60–85 iken, over kanseri görülme riski %10–40 arasındadır. BRCA1'in kadınlarda meme kanseri riskini artırma oranı daha fazladır ve meme kanserli hastalarda 17. kromozomun BRCA1 geninin bulunduğu q12-q21 bölgesinde allel kayıpları gözlenmiştir. BRCA2 gen mutasyonu ise erkeklerde meme kanseri görülme riskini artırmaktadır.

1. 8. 4. Meme Kanseri Risk Faktörleri

Kadınlarda meme kanseri görülme riskini artıran faktörler şöyledir;

- 65 yaşından büyük kadınlarda meme kanserine yakalanma riski genç kadınlara oranla 6 kat fazladır. Hastalığın en sık görüldüğü ortanca yaş 61 olarak belirlenmiştir.
- Bir memesinde kanser geçirmiş bir kadının diğer memesinde kanser oluşma riski, aynı yaştaki diğer kadınlara oranla 2–4 kat artmaktadır.
- İlk adet yaşı 12'den önce olan kadınlarda risk artmaktadır.
- Akrabalarında meme kanseri olan kadınlarda risk daha yüksektir.
- İlk doğum yaşı 18 veya 19 olanlara karşın ilk doğum yaşı 30 ve üstünde olanların meme kanseri olma riski 4–5 kat artmaktadır.
- Doğum kontrol hapı kullanan kadınlarda hiç kullanmayan kadınlara oranlara meme kanserine yakalanma riski biraz yüksek bulunmuştur.
- Over yada uterus kanseri öyküsü
- Elektromanyetik alanlara ve radyasyona maruz kalma

1. 8. 5. Meme Kanseri Belirtileri

Meme kanseri belirtileri hastalığın vücuttaki yayılım derecesine ve kişiden kişiye farklılık göstermektedir (Cancerbackup 2006).

- Memede bir kitlenin varlığı
- Memenin portakal kabuğu şeklinde bir görüntü alması
- Doğumsal nedenlere bağlı olmaksızın meme başının içe çekilmesi
- Meme başından kanlı veya kansız akıntı gelmesi
- Meme dersinde ülser, kızarıklık ve ödem meydana gelmesi
- Lenf bezlerinde şişlik olması
- Kolda şişlik ve ödem oluşması

Önemli olduğu görülen meme kanseri belirtileridir (Özdemir ve Çalışkan 2002).

1. 8. 6. Meme Kanseri ve Metastaz

Metastaz, ekstrasellüler matrikse yapışmaktan sorumlu hücresel proteinlerin eksikliği yada anormalliklerinden, ekstrasellüler interaksiyonun bozukluğundan, ekstrasellüler bazal membrana tutunmalarındaki anormalliklerden, bazal membran

üretimindeki bozukluklardan ve metalloproteaz gibi bazı enzimlerin bazal membranı degradasyonundan dolayı gerçekleşir (Barry ve ark 2002).

Meme kanseri sistemik bir hastalıktır ve bu hastalığın belirgin duruma gelmesi için, yani metastaz gelişmesi için genellikle tümör çapının 1 cm'den büyük olması gerekir (Aydıntuğ 2004). Meme kanseri ilk olarak bölgesel lenf bezlerine yayılmakta ve sıklıkla da koltukaltı lenf bezlerini tutmaktadır. Bölgesel lenf bezlerini aşan kanser hücreleri kan dolaşımına katılarak sırasıyla akciğer, plevra, kemik (kaburga, bel omurları, kafatası, kol kemikleri), karaciğer, periton, böbrek üstü bezleri, beyin ve yumurtalıklara metastaz yapabilmektedir (Kocaeli 2004).

Meme, prostat, akciğer ve renal kanserler iskelet sistemine en fazla yayılım gösteren tümörlerdir. Yapılan bir çalışmada 75 meme kanserli bir hastalık grubunun 23 hastasında kemik metastazı saptanmış, bunların 16'sında multiple metastaz görülmüştür (Muşat ve ark 1999).

Metastatik meme kanserli hastaların yaklaşık %70'inde kemik metastazı görülmektedir. Meme kanseri hastalarının yaklaşık %25'inin ilk metastaz yeri kemiktir. Tümör kökenli büyüme faktörleri ve sitokinler osteoklast aktivasyonu yolu ile meme kanserli hastalarda osteolitik kemik metastazı gelişiminde önemli rol oynarlar. Meme kanserlerinde sıklıkla kemik yıkımı ve hiperkalsemi nedeniyle kemiğe metastaz gerçekleşmektedir.

Metastazın gerçekleşebilmesi için ilk olarak primer tümör hücresinden malign hücrelerin serbest kalması gereklidir. İmmün sisteme rağmen yaşayabilen ve kemiğe ulaşan malign hücreler burada ürettikleri adheziv moleküller ile kemik iliği stromal hücreleri ve kemik matriksine bağlanır. Kemik büyüme faktörleri için bir depo görevi görmektedir, tümör hücresinin ürettiği büyüme faktörleri ve sitokinler ile tümör hücrelerinin gelişimi için uygun bir gelişme ortamı oluşmaktadır. Kemik kökenli TGFβ osteoklastik kemik yıkımı sırasında aktif formda salgılanır ve tümör hücrelerinde PTHrP(paratiroid hormon ilgili protein) salınımını uyarır. Bu durum kemik yıkımının artmasına neden olur ve kemik yıkımı arttıkça TGFβ salınımı da artar ve böylece osteolitik kemik metastazlarının gelişimi ve ilerlemesi sağlanır (Arslan ve ark, 2011).

1. 8. 7. Klinikte Meme Kanseri

Meme kanserleri noninvaziv ve invaziv kanserler olmak üzere iki ana grupta toplanmaktadır. Noninvaziv olanlarda kanser hücreleri meme içinde belirli bir bölgede olup çevre dokulara yayılma göstermezler. Mesela, in situ duktal karsinom (DCIS), sadece süt kanalları içinde sınırlı iken, in situlobüler karsinom (LCIS) süt bezleri içindedir. İnvaziv karsinom ise, meme kanseri süt bezleri veya süt kanallarına yayılmış ve vücudun diğer bölümlerine de invazyon yapma potansiyeli olan kanserlerdir. İnvaziv duktal karsinom (IDC) süt kanallarından başlar ve çoğalarak yakındaki tüm meme dokularına yayılır. İnvaziv lobüler karsinom (ILC) süt bezlerinden başlar ve çevre dokulara yayılır. Bu nedenle invaziv karsinomlar, lenfatik ve kan damarlarını invaze ederek bölgesel lenf düğümlerine ve diğer organlara metastaz yapabilme kapasitesine sahiptir (İlvan 2006).

1. 9. Transforming Growth Factor Beta (TGFβ)

1. 9. 1. Sitokinler

Sitokinler hücrelerin birbiriyle iletişimini sağlayan hücresel düzenleyici proteinlerdir. Çeşitli uyarılara karşı cevap olarak özel hücreler tarafından salgılanır ve hedeflenen hücrelerin davranışını etkilerler. Sitokin ailesi başlıca suda çözünebilir küçük proteinlerin ve glikoproteinlerin 8 ila 30 kDa'lık birimlerini içerirler. Sitokinler oldukça çeşitli hücreler tarafından üretilirler ve enflamasyon, hücre büyümesi, iyileşmesi ve yaralanmaya karşı sistemik yanıtı içine alan bağışıklık ve enflamatuar olayları düzenler.

Çeşitli hücreler tarafından üretilen sitokinler aynı biyolojik etkiyi gösterirler. Sitokinlerin etkileri sistemik ve lokaldir. Bazı sitokinler klasik hormon gibi davranmaktadır fakat tam hormon değildirler. Sitokinler belli hücreler tarafından kana veya çeşitli hücresel sıvılara salgılanıp vücudun diğer bölgelerindeki hücresel reseptörlerine bağlanırlar. Bazı sitokinler daha lokalize olmuş etkiler gösterirler. Bunlar otokrin (bir hücre tarafından salgılanan sitokinin aynı hücre üzerine etkisi) ve parakrin (belli bir hücre tarafından salgılanan sitokinin yakındaki komşu hücreye etkisi) etkilerdir.

Sitokinler fonksiyonel benzerliklerine ve etki mekanizmalarına dayanarak şu ana gruplara ayrılmaktadır;

- Büyüme faktörleri (epidermal büyüme faktörü EGF, platelet orjinli büyüme faktörü PDGF, insülin benzeri büyüme faktörü-1 IGF-1, insülin benzeri büyüme faktörü-2 IGF-2 vb.)
- Lenfokinler (interlökin-1α, 1L-1α, 1L-1β, vb.)
- Koloni sitimüle eden faktörler (granülosit/makrofaj koloni sitimüle eden faktör GM-CSF, granülosit-CSF, multi-CSF, eritropoietin EPO vb.)
- Transforme edici büyüme faktörleri (TGFα ve TGFβ)
- Tümör nekroz faktörleri (TNF-α ve TNF-β)
- İnterferonlar (IFN-α, IFN-β ve IFN-γ) (Clemens 1991).

Sitokinler hücre bölünmesi, hematopoez, hücre farklılaşması ve bağışıklık sisteminin regulasyonu, yaraların iyileşmesi, kemik formasyonu ve hücresel metabolizmanın düzenlenmesi gibi biyolojik olaylarda rol oynamaktadır. Sitokinlerin en önemli etkilerinden birisi hücre bölünmesi ve hücre farklılaşması üzerinedir. Normal hücreler belli faktörler tarafından gönderilen spesifik sinyaller sonucu bölünürler. Bu faktörler büyüme faktörleri ve sitokinlerdir. Büyüme faktörleri hücre bölünmesi üzerinde pozitif etki gösterirken, bazı sitokinler hücre bölünmesini engelleyici etkileri bulunmaktadır. Belli bir hücrenin yüzeyinde bulunan reseptörler, bu hücrenin hangi faktörlere cevap vereceğini belirler.

Çeşitli büyüme faktörleri G0/G1'de kompetans ve progresyon faktörü olarak rol oynarlar ve hücrelerin bölünmeyen durumdan bölünme durumuna geçmesini kontrol ederler. Hücre bölünmesini engelleyen sitokinler, büyüme faktörlerinin hücre bölünmesi için aktive ettiği mekanizmaları inhibe ederler.

Büyüme faktörlerinin hücre proliferasyonunu arttırıcı etkisi, büyüme faktörü reseptörlerine karşı geliştirilen antikorlarla engellenebilmektedir (Zumkeller ve Schofiels 1995).

1. 9. 2. Transforming Growth Factor Beta

Büyüme faktörlerinden TGFβ hemen hemen bütün hücrelerde sentez edilen önemli bir polipeptid olup, hücresel olayların çoğunu düzenlemektedir. Trombositlerin alfa granülositleri içinde yoğun miktarda bulunur. TGFβ hücrede

hasarlı bölgeye degranülasyonla salınmaktadır ve üretimi otokrin yolla düzenlenmektedir (Lawrence ve Diagelmann 1994).

TGFβ ailesi, gelişimi ve farklılaşmayı çok yönlü kontrol eden ekstrasellüler büyüme faktörlerinin büyük bir grubunu oluşturur. Çok sayıda birbirine benzer polipeptid büyüme faktörleri içeren TGFβ üyeleri hücre proliferasyonu, farklılaşması, motilitesi, adezyonu, ekstrasellüler matriks oluşumu ve programlı hücre ölümü gibi çeşitli hücresel süreçleri düzenleme yeteneğine sahiptir. TGFβ ve ilgili faktörler, organizmanın tüm dokularının gelişiminde, homeostazisinde ve onarımında çok önemli rol oynarlar.

TGFβ, yapısında bir disülfit köprüsü bulunan 122 aminoasitten oluşan identik 2 peptid zincirinin oluşturduğu 25 kDa'luk bir homodimerdir. Genelde TGFβ salındığında biyolojik olarak aktif değildir. Salındıktan sonra latent haldeki TGFβ bağlayıcı proteinle birleşerek büyük latent bir kompleks oluşturur. Daha sonra çeşitli sinyal ileti yolları ile aktif hale gelir (santesaglik.com.tr).

1. 9. 3. TGFβ Sinyalizasyon Yolu

TGFβ hücrede inaktif propeptid şeklinde sentezlenir ve daha sonra LTBP (latent TGFβ bağlayan proteinler) ile kompleks oluşturarak latent TGFβ formunda salgılanır. Propeptidin N-terminalinde "latency associated protein"(LAP) olarak adlandırılan bir dizi bulunur. Latent TGFβ'nin yapısından LTBP ve LAP proteinlerinin serin proteazlar aracılığı ile uzaklaştırılması sonucu aktif TGFβ oluşur (Annes ve ark 2003, Massague 1998).

TGFβ ve ilgili faktörler, 2 tip reseptör olan serin/treonin protein kinazları bir araya getirerek gen ekspresyonunu düzenlerler. Bu kinazlardan biri diğerini fosforlar, bu fosforlanan kinaz SMAD proteinlerine dönüşür.

TGFβ sinyalizasyon yolu aktivasyonu ligandın reseptörlerine bağlanması ile başlatılır. Hücre membranında reseptörler TGFβ tip I (TβRI) ve TGFβ tip II (TβRII) olmak üzere iki şekilde bulunur. Protein kinaz bölgesinin hemen önünde çok iyi korunmuş 30 aminoasitlik bölge tip I reseptörünü diğerlerinden ayırır. Sahip olduğu SGSGSG dizileri nedeni ile bu bölge GS bölgesi olarak adlandırılır. GS

bölgesi, nuhtemel tip I reseptör kinazların katalitik aktivitelerini veya substratlarla etkileşimi kontrol edebilen önemli bir düzenleyici bölgedir (Wrana ve ark 1994).

Endoglin ve betaglican olarak da adlandırılan TGFβ tip III reseptörleri (TβRIII) TGFβ'nin TβRI ve TβRII reseptörlerine bağlanmasını kolaylaştırır. TGFβ tip II reseptörün membran dışı bölgesine, sonra da tip I reseptörüne bağlanır. Oluşan TβRI ve TβRII reseptörleri serin/treonin kinaz özelliğine sahiptir. Bu şekilde aktiflenmiş TβRI sitozolde bulunan SMAD proteinlerini fosforiller (Shi ve Massague 2003).

TβRI ve TβRII reseptörlerinin kinaz bölgeleri, serin/treonin protein kinaz bölgesinin dizileri ile uygunluk gösterir. Buna bağlı olarak, tip I reseptörler kendi susbtratlarını fosforlarken serin rezidüleri üzerinde SMAD proteinlerini fosforlamaktadırlar. Tip II reseptörler ise kendilerini ve serin/treonin rezidüleri üzerindeki tip I reseptörleri fosforlar fakat tirozin rezidülerini fosforlayamazlar (Kretzschmar ve ark 1997, Souchelnytskyi ve ark 1996).

TGFβ sinyalleri, aktivatörü olan TβRII tarafından fosforlanmış TGFβ tip I reseptörlerinden (TβRI) ortama verilir. Reseptör aktivasyonundaki en önemli olan basamak tetramerik reseptör kompleksin fosforilasyonudur. TβRII'deki belirli fosforilasyon bölgeleri reseptörün sinyal aktivitesini düzenler; ser 213 ve ser 409'un fosforilasyonu TβRII aktivitesi için gereklidir, bunun yanında ser 416'nın fosforilasyonu TβRII sinyal iletimini inhibe eder (Luo ve Lodish 1997). Ser 165'te meydana gelen herhangi bir mutasyon tip I reseptörün daha güçlü sinyal vermesine yol açar ve bu güçlü sinyallerde büyümenin inhibisyonunu ve matriks birikimini etkiler. Buna göre, ser 165'in fosforilasyonu TGFβ sinyal iletimini düzenleyebilir (Heldin ve ark 1997, Ten Dijke ve Hill 2004).

1. 9. 4. SMAD Proteinleri

SMAD'lar, hücre çekirdeği içerisine sinyal taşıyan ve özel olarak DNA'ya bağlanma yeteneği ile transkripsiyonel kompleks oluşturan orijinal bir protein ailesidir (Massague 1998, Liu 2006).

Yapısal ve fonksiyonel etkenler göz önünde tutulduğunda, SMAD'lar üç ayrı alt gruba ayrılırlar;

- Reseptör ile regüle edilen SMAD'lar (R-Smad'lar): TGFβ ailesi reseptör kinazların direkt substratlarıdır.
- Common-partner SMAD'lar (Co-Smad'lar): R-Smad'larla birleşerek sinyal iletimine katılan gruptur.
- İnhibitör SMAD'lar (I-Smad'lar): diğer iki grubun sinyal fonksiyonunu inhibe eden antogonist SMAD'lardır.

R-Smadlar kendi içinde BMP SMAD'lar ve TGFβ/aktivin SMAD'lar olmak üzere iki gruba ayrılırlar. BMP SMAD'lar, SMAD1 ve birbirine yakın homologlardan SMAD 5 ve SMAD 8 "Bone Morphogenetic Protein Receptor-I (BMPR-I)'in substratları ve BMP sinyallerinin aracılarıdır. TGFβ/aktivin SMAD'lar ise SMAD2 ve SMAD 3, TβR-I'in substratları ayrıca TGFβ ve aktivin sinyallerinin aracılarıdır. Memeli epitelyum hücrelerinde SMAD 2 ve SMAD 3 gelişimin inhibisyonuna ve haberci genlerden TGFβ ve aktivinin transkripsiyonunun aktivasyonuna aracılık ederler (Lagna ve ark 1996, Suzuki ve ark 1997).

1. 9. 5. TGFβ Ailesinin Üyeleri

TGFβ ailesi, hedef hücrenin uyarıya verdiği yanıtın çeşidine bağlı etkileri olan çok fonksiyonlu agonistlerdir. Örneğin, bu ailenin bir üyesi olan TGFβ1 mezenşimal gelişimin düzenleyicisi olarak tanımlanmış ve bundan farklı olarak epitelyum hücrelerde antimitojen olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 1.1.TGFβ ailesi ve tanımlanan aktiviteleri (Massague 1998, Shi ve Massague 2003).

İSİMLERİ	BELİRLENEN AKTİVİTELERİ
BMP2 alt grubu BMP2 BMP4	Gastrulasyon, nörogenez, kondriogenez, interdijital apoptozis, kurbağada mezoderm oluşumu, sinekte dorsalizasyon, gözler ve kanatlar.
BMP5 alt grubu BMP5 BMP6/Vgrl BMP7/OP1 BMP8/OP2	BMP2 ve 4ile birlikte bu alt gruphemen hemen bütün organizmalaringelişimine katılırlar; norogenezis.

Çizelge 1.1 (Devam). TGFβ ailesi ve tanımlanan aktiviteleri (Massague 1998, Shi ve Massague 2003).

GDF5 alt grubu GDF5/CDMP1 GDF6/CDMP2 GDF7	Kol ve bacakların oluşumunda kondriogenez
BMP3 alt grubu BMP3/osteogenin GDF10	Osteojenik farklılaşma, endokondral kemik oluşumu, monosit kemotaksisi.
Ara üyeler Nodal Dorsalin GDF8 GDF9	Aksiyal mezoderm indüksiyonu, sağ-sol asimetrisi Nöral tüpte hücre farklılaşmasının düzenlenmesi İskelet kası büyümesinin inhibisyonu
Aktivin alt grubu Aktivin βA Aktivin βB Aktivin βC Aktivin βD	Hipofiz hormonu olan folikül stimüle edici hormonun (FSH) üretimi, eritroid hücre farklılaşması, kurbağada mezoderm indüksiyonu
TGFβ alt grubu TGFβ1 TGFβ2 TGFβ3	Epitelyum ve hematopoietic hücrelerde hücre döngüsünün tutulması, mezenşimal hücre proliferasyonu ve farklılaşmasının kontrolü, ekstrasellüler matriks üretimi, immün baskılama.
Diğer üyeler MIS/AMH İnhibin α GDNF	Müler kanalının gerilemesi FSH üretimini inhibisyonu ve aktivinin diğer faaliyetleri Dopaminerjik nöronların sürekliliği, böbrek gelişimi.

BMP: Kemik morfogenetik proteini

GDF: Büyüme ve farklılaşma faktörü

CDMP: Kıkırdak türevli morfogenetik protein

MIS/AMH: Müller inhibe edici madde/anti-Müller hormonu
GDNF: Glial hücre kökenli nörotropik faktör.

TGFβ ailesinin TGFβ1, TGFβ2 ve TGFβ3 olmak üzere üç izoformu bulunmaktadır. TGFβ1 19q13 geninde bulunmaktadır. Hücre büyümesi, hücre çoğalması, hücre farklılaşması ve apoptozun kontrolü de dâhil olmak üzere birçok hücresel işlevi gerçekleştirir.

TGFβ1 ilk olarak yara iyileşmesinde potansiyel bir role sahip olduğu bulunmuş ve 25 kDa bir moleküler kütleye sahip olan bir protein olarak insan plateletlerinde tespit edilmiştir. Daha sonra 112 aminoasit olgun bir peptid üretmek için proteolitik olarak işlenmiş 390 aminoasit ihtiva eden büyük bir prokürsör olarak karakterize edilmiştir. TGFβ1 bağışıklık sisteminin kontrolünde önemli bir rol oynamaktadır.

TGFβ2 birçok hücresel işlevleri gerçekleştiren ve embriyonik gelişim sırasında önemli bir rolü olan bir proteindir. Hücre dışı glikozillenmiş bir proteindir ve interlökin bağımlı T-hücresi tümör etkilerini bastırdığı bilinmektedir.

TGFβ3 hücre farklılaşması, embriyogenez ve gelişimi ile ilişkili olan sitokinlerin bir türüdür. TGFβ3 memeli akciğer gelişimin kontrolünde önemli bir rol oynamaktadır, ayrıca bu dokuda hücre adhezyonu ve ECM oluşumunu düzenler. Yaralı deride epidermal ve dermal hücrelerin hareketlerini düzenleyerek yara iyileşmesini kontrol eder. TGFβ3 ve TGFβ1 arasında doğrudan bir karşılaştırma yapıldığımda, TGFβ3 TGFβ1'den üç ila beş kat daha güçlü olduğu ortaya konulmuştur.

1. 9. 6. TGFβ Fonksiyonları

- Normal hücrelerde TGFβ'in başlıca fonksiyonu proliferasyonu baskılaması ve diferansiasyonu hızlandırmasıyla ilgili olanıdır. Epitelyal ve hematopoetik hücrelerde ise TGFβ antiproliferatif etkilidir ve hücre siklusunun G1 fazında durmasını sağlamaktadır (Siegel ve Massague 2003). TGFβ'nın etkisi ile hücre siklusunun ilerlemesi için gerekli olan sikline bağımlı kinazların (CDK)

inhibitörleri olan p21 ve p15 proteinlerin sentezini aktifler (Pardali ve ark 2000, Seoane ve ark 2001).

- TGFβ bir trankripsiyon faktörü olan c-myc, ve diferansiasyonu inhibe edici faktörler olan Id1, 2 ve 3 genlerinin inaktivasyonunu sağlamaktadır (Chen ve ark 2002, Lavarone ve ark 1994).
- TGFβ SMAD yolunun etkisi ile TIEG-1(TGF-β-inducible-early-response gene) genini indüklemektedir. TIEG-1 apoptozu indükleyen ve proliferasyonu baskılayan bir transkripsiyon faktörüdür (Tachibana ve ark 1997).
- TGFβ bilinen en güçlü immun-supresif moleküllerden biridir. TGFβ immün sistemin efektör T ve sitostatik T hücrelerini baskılayarak, düzenleyici T-reg hücrelerini ise aktifleyerek immün ve inflamatuar cevabı baskılamaktadır (Li ve ark 2006).

1. 9. 7. TGFβ ve Kanser

TGFβ ikiyüzlü bir moleküldür ve hem tümör supresör, hem de onkogen gibi davranabilmektedir. TGFβ epitelyal hücrelerin bölünmesini baskılayarak tümör supresif etkisini göstermektedir. Fakat tümör hücreleri TGFβ'nın antitümoral etkilerini bertaraf etmektedir. Tümöral dokularda TGFβ onkogenik özellikler sergileyerek kontrolsüz proliferasyon, metaplazi, displazi ve aplazi gelişmesi, invazyon ve metastaz gibi olayların gerçekleşmesine aracılık etmektedir (Derynck ve ark 2001, Wakefield ve Romerts 2002).

TGFβ kanserin erken evrelerinde tümör hücre çoğalması inhibisyonu ve tümör baskılayıcısı olarak görev alırken, geç evrelerde ise tümör hücre invazyonu ve metastazını uyararak tümör organizatörü olarak hareket etmektedir.

Normal koşullarda hücreler TGFβ'nın sitostatik ve diferansiasyonu hızlandırıcı etkisini kullanırlar. Herhangi bir nedenin etkisi ile TGFβ sinyal yolunda bir aksama olduğunda hiperplazi gelişir. Hiperplazide hücre çoğalması hala kontrol altındadır. Premalign durumlarda ise hücreler daha çok TGFβ'nın proapoptotik etkisini kullanırlar. TGFβ yolunun baskılanması sonucu hücreler kontrolsüz bir şekilde çoğalmaya başlar ve neoplaziler oluşmaktadır. Tümör hücrelerinde TGFβ'nın antiproliferatif ve tümör supresif etkisi ortadan kalkar. TGFβ onkojenik özellikler

kazanır ve kanser hücreleri TGFβ'yı kendi avantajları için kullanıp kontrolsüz bir şekilde çoğalmaya başlar, tümör komşu dokulara invazyon yapar ve metastazlar meydana gelir (Massague 2008).

Büyüme inhibitörü yanıtlarının TGFβ'ya iletiminin eksikliği kanser hücrelerinde çok sık görülen bir durumdur. TGFβ aktivitesinin artışı akciğer, böbrek, karaciğer ve diğer organlarda dokular arasındaki matriks materyalinin aşırı bir şekilde artışı ile sonuçlanır. TGFβ fibrotik hastalıklarda merkezi bir rol oynamaktadır (Fynan ve Reis 1993, Border ve Ruoslahti 1992). Anormal TGFβ aktivitesinin iltihaplı hastalıklarda rol aldığı bildirilmiştir.

TGFβ sinyal iletiminin aksaması nedeniyle kansere yatkınlık veya kanser oluşabilmektedir. Microsatellit instabiliteli gastrintestinal kanserlerdeki mutasyonlarda inaktif TβRII reseptörünün bulunması, TGFβ sinyal iletim aksaklığının kansere yatkınlık oluşturabileceği görüşünü doğrulamaktadır (Markowitz ve ark 1995).

Plazma TGFβ düzeyleri, prostat kanseri, hepatosellüler karsinom, serviks kanseri, meme kanseri, hodgkin hastalığı gibi pek çok kanserde artış göstermektedir. Örneğin meme kanserinde yüksek olan değerler, cerrahi olarak tümörün çıkarılmasıyla normale dönmektedir.

TGFβ yolu sitoplazmik kolu elemanlarının genlerindeki mutasyonlar kolorektal, pankreas, over, mide ve baş/boyun bölgesi kanserlerinde sıklıkla görülmektedir. Meme, prostat, glioma, melanom ve hematopoetik hücre kanserlerinde TGFβ yolun sitoplazmik kolu etkilenmezken, nükleer kolunda değişiklikler meydana gelmiştir (Vural 2010).

TGFβ ve Meme Kanseri

TGFα ve TGFβ meme kanserinde önemli olan iki büyüme faktörüdür. TGFβ meme kanserinde inhibitör etkiye sahiptir. Östrojen, ÖR pozitif hücrelerde büyümeyi uyaran faktörlerin yapımını azaltır. Antiöstrojenler ise uyarıcı büyüme faktörlerini azaltıp TGFβ' yı arttırırlar (Chang ve ark 2002).

p15 ve p21 proteinlerinin yokluğunda TGFβ tümör süpresif etkilerini gösterememektedir. Meme kanseri hücre kültürlerinde TGFβ'nın Id1, Id2 ve Id3 genleri üzerindeki baskılayıcı etki yerine indüksiyon yaptığı gösterilmiştir (Padua ve ark 2008).

TGFβ meme kanseri hücrelerinin invazyon ve proliferasyonunu düzenleyen güçlü bir düzenleyicidir. TGFβ1 ile meme kanserinde hücre metastazı teşvik edilmektedir. TGFβ1'in G1 hücre döngüsünü durdurma yoluyla proliferasyonu önlediği bilinmektedir. TGFβ1 düzeyinin artışı immunsupresyon, ekstrasellüler matriks artışı ve anjiogenez stimülasyonu ile tümör progresyonuna yol açmaktadır. Tedavi öncesi TGFβ1 seviyesinin yüksek olmasının prognozun kötü olacağına işarettir.

Farelerle yapılan bir çalışmada anti-TGFβ antikorunun meme kanserli hayvanda kemik kaybını azalttığı ve sonuçta kemiğe metastazı engellediği saptanmıştır. Farelerin sol ventriküllerine meme kanseri hücreleri enjekte edildikten sonra anti-TGFβ antikoru verilen grupta kemik kitlesinin arttığı, tümörün kemikte yayılımını azalttığı gösterilmiştir. Bu çalışmada meme kanserine bağlı kemik metastazlarının ve iskelet ilişkili olayların azaltılmasına yönelik olarak fikir vermektedir (Biswas ve ark 2011).

TGFβ 'nın meme epitelyal hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği gösterilmiş ve meme kanserine karşı koruyucu bir rol oynadığı belirtilmiştir. TGFβ1 ile MCF–7 hücre hattında büyüme önemli ölçüde inhibe edildiği gösterilmiş ve bu büyümeyi önleyici etkisi tümör ilerlemesinin erken dönemlerinde meme kanserinde koruyucu bir etki sağlamaktadır (Ramont ve ark 2003).

1. 10. D Vitamini

D vitamini yağda eriyen ve kalsiyum, fosforun sindirim yollarında kullanımı ve emilimi ile özellikle çocuklarda büyüme için gerekli bir vitamindir. D vitamini hem vitamin hem de hormon özelliğindedir. Çünkü uygun koşullarda insan vücudu tarafından sentezlenebilmektedir. Hormon yapan özelliği ise insan vücudunda hemen her hücrede reseptörleri olmasıdır.

İnsanlarda D vitamininin ana kaynağı güneş ışınlarından gelen UVB radyasyondur. Günlük D vitamini ihtiyacının %80-90'ı güneş ışınlarından kaynaklanmaktadır. Besin ve gıdalardan oldukça düşük bir miktar alınmaktadır.

D vitamini dört halkadan oluşan bir sterol türevidir. Vitamin D'nin insanlar için iki önemli formu mevcuttur:

- Ergokalsiferol (Vitamin D2)
- Kolekalsiferol (Vitamin D3),

Vitamin D2 bitkisel kaynaklı ergosterol şeklinde besinler içinde bulunur ve ciltte toplanır. Ciltte ultraviyole ışınlara maruz kalma sonucu ergosterol, ergokalsiferole dönüşür. Karaciğer ve böbreklerde hidroksillenerek 1,25(OH)2D2' e çevrilir.

Vücudumuzdaki vitamin D3'ün çoğunluğu dışarıdan alınmaz vücutta sentez edilir. Kısmen hayvansal kaynaklı besinler içinde alınır. Cilt kaynaklı yada gıda ile dışarıdan alınan D vitamini karaciğer ve böbreklerde biyotransformasyona uğrayarak etkin şekli 1,25(OH)2D3'e dönüşür.

Diyetle alınan veya endojen olarak sentezlenen vitamin D2 veya vitamin D3 yağ hücrelerinde depo edilir ve gerektiğinde dolaşıma katılır (Holick 2007).

1. 10. 1. D Vitamini Kaynakları

Esas vitamin D kaynağı güneş ışınlarına maruziyettir. Yağlı balıklar, balık karaciğer yağı ve yumurta gibi çok az sayıda gıda doğal olarak vitamin D içermektedir. Çok az miktarlarda olmak üzerede et ve peynirde de vitamin D bulunmaktadır. Vitamin D içeren ana diyetsel kaynaklar; süt, yoğurt, ekmek ve kahvaltıda yenilen tahıllardır.

D vitamini için günlük ihtiyaç;

- 0-30 yaş arası 200 IU
- 31-50 yaş arası 300 IU
- 51-70 yaş arası 400 IU
- 71 yaş ve üzeri 600 IU olarak belirlenmiştir.

Kanada Osteoporoz Cemiyeti ise 50 yaş üzeri kadın ve erkeklerde 800 IU/gün D vitamini desteğini önermektedir.

D vitamini besinler ve güneş tarafından karşılanabilmektedir. Beslenmeyle D vitamini gereksinimini karşılamak oldukça zordur. Bir tane yumurta 20 IU, bir bardak süt 100 IU, bir tatlı kaşığı balık yağı 400 IU D vitamini içermektedir. Saat 10:00 ile 15:00 arasındaki bölümde 10 dakika kadar güneşlenmek 3000 IU civarında ciltten D vitamini sentezi sağlar (www.dvitamini.gen.tr).

1. 10. 2. D Vitamini Fonksiyonları

1- Kemik sağlığı için çok önemli olan kalsiyum emilimini artırmaktadır. Yetersiz D vitamini çocuklarda raşitizm ve erişkinlerde osteomalazi nedenidir.
2- D vitamini bağırsaklardan kalsiyum iyonu ve kalsiyumla ilişkili olan fosforun emilimini düzenler.
3- Bağışıklık sistemini temelinde olan mekanizmalardan birisi olan fagositoz D vitamini tarafından etkin hale getirilmektedir.
4- Bağışıklık sisteminin temel yapılarından olan monosit ve lenfositler kaliteli ve yeterli fonksiyon görebilmeleri için aktif D vitamini gerekmektedir.
5- Kathelcidin isminde bir biyomolekül D vitamini tarafından daha fazla üretilmektedir. Bu biyomolekül bakteri, virüs ve mantarların fagosite edilmesini kolaylaştırmaktadır.
6- Romatolojik hastalıkların kökeninde D vitamini eksikliği olduğu tespit edilmiştir.
7- Normal düzeylerde D vitamininin hipertansiyonu düzelttiği ve koroner arter hastalık riskini azalttığı bilinmektedir.
8- D vitamini eksikliği kemik ve kas güçsüzlüğüne neden olmaktadır.
9- Kanada Kanser Derneği bilimsel veriler sonucunda sonbahar ve kış aylarında her gün 1000 ünite D vitamini almayı tavsiye etmektedir. Çünkü kolon, meme, prostat, over ve pankreas kanserleri başta olmak üzere birçok kanser gelişiminde düşük D vitamini düzeyleri ile ilgisi bulunmuştur (Aydıntuğ 2004).

1. 10. 3. D Vitamini Metabolizması

D vitamini dört halkadan oluşan bir sterol türevidir. İki önemli formda bulunmaktadır. Diyet ile alınan bitkisel kaynaklı ergokalsiferol (D2 vitamini,

25(OH)D2) ve hayvansal kökenli olup deride kolesterolün oksitlenme ürünü olan 7-dehidrokolesterolden türeyen kolekalsiferol (D3 vitamini, 25(OH)D3). İnsan vücudunda sadece D3 vitaminini sentezlenir.

Deride sentezlenen veya diyetle alınan vitamin D2 ve vitamin D3 biyolojik olarak aktif olmadığı için, vitamin D bağlayıcı protein ile karaciğere taşınır ve karaciğerdeki 25 hidroksilaz enzimi ile 25 hidroksivitamin D' ye çevrilir. Bu madde kalsidiol olarak bilinmektedir. Ancak vitamin D'nin aktif hale gelebilmesi için böbreklerde 1 alfa hidroksilaz enzimi ile 1,25(OH)2D'ye dönüşmesi gerekir. 1 alfa hidroksilaz enzimi D vitamini sentezinde kilit rol oynar. 25(OH)D, D vitamininin dolaşımdaki asıl formudur. İnaktif olan bu formun konsantrasyonu 1,25(OH)2D'nin yaklaşık 1000 katıdır (Holick 2007).

Fizyolojik olarak aktif olan 1,25(OH)2D 4 önemli biyolojik fonksiyona sahiptir:

1- Kalsiyum ve fosfor homeostazisinin düzenlenmesi ve metabolizması
2- Diğer hormonların düzenlenmesi
3- Hücre farklılaşmasının indüksiyonu ve büyüme modülasyonu

4- İmmün sistem regülasyonu, kanser ve immün aracılı hastalıkları önleme

D vitamininin, meme hücreleri dahil olmak üzere çeşitli tiplerinde, hücresel farklılaşma ve proliferasyon kontrolünde rol oynadığı düşünülmektedir (Faustino ve ark. 2009).

1. 10. 4. D Vitamini Eksikliği

Serum 25-hidroksivitamin D seviyesi ≤10 ng/ml olduğunda ciddi eksiklik, 10-20 ng/ml olduğunda eksiklik, 20-30 ng/ml orta derecede eksiklik veya yetersizlik, ≥30 ng/ml yeterli, 40-50 ng/ml ideal, >150 ng/ml olduğunda ise toksik olarak kabul edilmektedir (Lavie ve ark 2011). 25(OH)D veya 1,25(OH)2D vitamini total miktarlarının yalnız %1'inin dolaşımda serbest bulunması, D vitamini intoksikasyonuna karşı önemli bir koruyucu mekanizmadır.

Deri pigmentasyonu vitamin D eksikliği üzerinde önemli rol oynamaktadır. Cilt renginin koyu olması ve yetersiz güneş ışığı maruziyetinin neden olduğu sınırlı

deri sentezi ve diyetle yetersiz alım, 25(OH)D seviyesinin düşüklüğünün başlıca nedenidir.

Vitamin D ileumda emilmektedir. Bu nedenle birçok gastrointestinal bozukluk vitamin D eksikliğine neden olabilmektedir. Obezite vitamin D eksikliğine neden olabilmektedir, çünkü yağda çözünen vitamin dolaşıma katılmak yerine yağ dokuda depo edilir. Crohn ve çölyak hastalığı gibi malabsorbsiyon sendromları, vitamin D eksikliği ile koreledir (Heath ve Elovic 2006).

D vitamini eksikliğinde kas iskelet sisteminde ciddi sağlık sorunları meydana gelmektedir. Bu sağlık sorunları; osteopeni, osteoporoz, kas zayıflığı, patolojik kırıklar, yaygın kanser türlerine yatkınlık, otoimmün enfeksiyoz ve kardiyovasküler hastalıklar sayılabilir (Holick 2007, Pe´rez-Lo´pez 2008). Son yıllarda yapılan önemli çalışmalarda vitamin D'nin mortaliteyi azaltıcı, kanseri önleyici ve tedavi edici etkilere sahip olduğu gösterilmektedir. Meme bezindeki vitamin D nin patofizyolojisi ile ilgili bilimsel kanıtlar artmıştır. Bu durumda meme bezi, lokal hormon sentezi regülasyon için vitamin D'nin hidroksillendiği gibi vitamin D reseptörlerine de sahiptir (Faustino ve ark. 2009).

1. 10. 5. D Vitamini ve Meme Kanseri

D vitamini yağda çözünen bir hormon öncülü olup sağlık üzerinde kanserden korunmada dâhil pek çok olumlu etkisi yapılmış çalışmalarda gösterilmiştir. Sağlık üzerinde olumlu etkilerinin ortaya çıkabilmesi için D vitamininin vücuttaki aktif formu olan 1,25 dihidroksivitamin D düzeylerinin güneş ışınlarına yeterli maruziyet ve dışarıdan alınan D vitamini aracılığıyla normal seviyelerde tutulması gerekmektedir. Güneş ışığına maruz kalma, ciltte D_3 vitamini sentezini teşvik eder ve D_3 vitamini içeren besin alımı meme kanseri riski ve mortalite ile ters ilişkili olduğu bildirilmiştir (Coyle 2004, Freedman ve ark 2002, Knight ve ark 2007) .

Diyetle alınan D vitamini, meme kanseri de dahil olmak üzere birçok kanserde anti-proliferatif, anti-inflamatuar, pro-diferansiasyon ve pro-apoptotik faaliyetleri gösteren 1,25(OH)2D3 veya kalsitriol steroid hormonu için gerekli öncüldür (Deeb ve ark 2007, Krishnan ve Feldman 2011).

Vücudun kanserden korunma mekanizmalarından en önemlisi olan apoptozisi artıran ve azaltan birçok madde vardır. D vitamini apoptozisi artıran güçlendiren faktörlerden birisidir. Kanser yapıcı genlerde apoptozu durdururlar.

1,25(OH)2D3, D vitamininin aktif metabolitidir, hem in vivo hem de in vitro meme kanseri hücre büyümesinin güçlü bir inhibitötüdür. 1,25(OH)2D3 anti-proliferatif etkisinin verilerini tamamlamak için, MCF–7 hücrelerinin apoptoz vitamin D aracılı büyüme rolü değerlendirilmiş ve 1,25(OH)2D3'ün önemli ölçüde MCF–7 hücre sayısını azalttığı gösterilmiştir. 48 saat içerisinde morfolojik değerlendirme sonucu MCF–7 hücrelerinin 1,25(OH)2D3 ile tedavi edildiği gösterilmiştir (Simboli-Campbell ve ark 1996).

1,25(OH)2D3 olgunlaşmada dâhil hem normal hem de kanser hücresi proliferasyonunu inhibe eden güçlü hormonlardan birisidir. 1,25(OH)2D3 hücresel proliferasyon ve farklılaşmayı düzenlemektedir (Holick 2008). 1,25(OH)2D3' ün normal ve malign meme kanseri hücrelerinde anjiogenezisi inhibe ettiği, farklılaşma ve apoptozisi indüklediği, hücre çoğalmasını inhibe ettiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Cui ve Rohan 2006).

1. 11. Ürokinaz Plazminojen Aktivatörü Sistemi

1. 11. 1. Fibrinolitik Sistem

Plazminojen aktivatör sistemi koagülasyon ve fibrinolitik sistem arasındaki dinamik dengede merkezi bir rol oynar. Fibrinolitik sistem aktif enzim olan plazmine dönüşebilen, inaktif proenzim plazminojeni içerir. Plazmin fibrini parçalar ve matriks metalloproteinazları, proteazları aktive ederek ekstrasellüler matriksinin (ECM) parçalanmasını sağlar.

Plasmin; hepatosit büyüme faktörü, insülin benzeri büyüme faktörü–1 (IGF-1), FGF-2, TGFβ da dahil olmak üzere bazı büyüme faktörlerini serbest bırakır veya etkinleştirir. Bu pleitropik peptitler, hücre proliferasyonunun stimülasyonu, apoptozu baskılama, migrasyonu artırma, angiogeneze teşvik etme potansiyeline sahiptir. Plazmin, kanser invazyon ve metastazın birçok aşamasında önemli rol oynamaktadır (Rifkin 1997).

Tümör hücrelerinin koagülasyonu aktive etmesi oldukça karmaşık bir olaydır. Doku faktörü, pek çok kanserde gösterilen fibrin depolanmasını sağlayarak etki eden primer koagülan faktördür. Tümör hücrelerinin doku faktörünü eksprese etmesi metastazı kolaylaştırır. Neoplastik hücrelerin çevresinde fibrin depolanması, konak immün sistemi tarafından tümör hücresinin tanınmasını engelleyerek tümör hücresinin yayılımını kolaylaştırmaktadır. Meme kanseri başta olmak üzere, birçok kanserde fibrinolitik aktivite azalmış olarak bulunmuştur.

Fibrinolizis ve tümör dokusu arasındaki ilişki ilk kez 1911 yılında malign tümörlerin in vitro kültürlerinde, plazma içeren medyumun erimesi ile gündeme gelmiştir. İlk klinik gözlemler, metastatik prostat kanserli hastalarda kanamaya eğilim ve azalmış plazma fibrinojen düzeyinin gösterilmesi ve tümör dokusunda plazminojen aktivatörlerinin saptanması ile doğrulanmıştır (Veronica ve ark 1999).

Plazminojenin plazmine çevrilmesi intrensek ve ekstrensek aktivatör sistemler ve eksojen yolla olur. İntrensek aktivatör sistemle oluşan plazmin total fibrinolitik aktivitenin %15'ini oluşturur. Ekstrensek sistemde ise tPA ve uPA yer alır. Plazminojenin plazmadaki en önemli aktivatörü tPA'dür ve esas olarak endotel hücrelerinde yapılır. Ortamda fibrin varsa tPA'nün etkisi 500 kat artar. uPA'nın fibrine afinitesi tPA'dan azdır ve plazminojen üzerine olan etkisi ortamda fibrin bulunmasıyla değişmez (Tutar ve ark 2000).

1. 11. 2. Ürokinaz Plazminojen Aktivatörü Sistemi Komponentleri

Plazminojen aktivatör sistemindeki enzimlerin tümü serin proteaz grubundandır. Serin proteazların aktif bölgeleri serin, aspartik asit ve histidinden oluşan "katalitik triad" içerir. Bu aktif bölge molekülün karboksi terminal ucunda yer alırken, amino terminal ucunda yapısal ve fonksiyonel parçalar bulunur. Plazminojen aktivatör sistemi inhibitörleri ise, serpin (serin proteaz inhibitör) ailesinin üyeleridir. Plazminojen sistem inhibitörlerinin karboksi terminal ucunda, spesifik reaktif bölge peptid bağları (Arg-X veya Lys-X) bulunur. Bunlar hedef enzimler ile ayrılarak inaktif enzim inhibitör komplekslerini oluştururlar (Desire 1999).

Ürokinaz plazminojen aktivatörü sistemi; ürokinaz tipi plazminojen aktivatörü (uPA), doku tipi plazminojen aktivatörü (tPA), plazminojen aktivatör

inhibitörü (PAI) ve uPA reseptörünü (uPAR) içeren bir serin proteaz ailesidir. Ürokinaz plazminojen sistemi, kötü prognoz ve yüksek mortalite ile uzak organlara primer tümörlerin yayılması ile ilişkilidir (Dass ve ark 2008).

Ürokinaz Tipi Plazminojen Aktivatörü (uPA)

Ürokinaz tripsin benzeri bir proteazdır ve plazminojeni aktive etme yeteneğine sahiptir. İlk defa idrardan izole edilmesi nedeniyle ürokinaz olarak adlandırılmıştır ve daha sonra plazma ve dokularda da izole edilmiştir.

Ürokinaz plazminojen aktivatörü (uPA) 55 kD ağırlığındadır ve 411 aminoasit içermektedir. Başlangıçta katalitik olarak inaktif tek zincirli polipeptit olarak sentezlenir. Olgunlaşmış bir uPA, sistein 148–279 arası tek bir disülfit bağı ile bağlanmış iki zincirli bir proteindir. Tek zincirli uPA özel olarak fibrine bağlanamaz ancak intravenöz infüzyonu dolaşımda belirgin plazminojen aktivasyonu olmaksızın trombüs yıkımını indükler. Fibrin pıhtısı oluştuğunda tek zincirli uPA fibrin spesifik pıhtı yıkımına yol açar, iki zincirli uPA' nın ise böyle bir etkisi yoktur.

Ürokinaz plazminojen aktivatörü yapısal olarak 3 ana domainden meydana gelmektedir. uPAR için bağlanma bölgesi içeren amino terminal büyüme faktör domaini, işlevi bilinmeyen kringle domaini ve katalitik bölgeyi içeren karboksil terminal dizisidir.

1966 yılında over kanserlerinde plazminojen aktivatörü olarak, uPA salınımı gösterilmiş ve uPA'nın tümörlerden salınan dominant plazminojen aktivatörü olduğu kanıtlanmıştır (Veronica ve ark 1999).

Ürokinaz plazminojen aktivatörleri, lokal fibrinolizisi, tümör invazyonu, anjiogenesisi, neointima ve aterosklerotik plak oluşumunu, inflamasyon ve yara iyileşmesi sırasında matriks yeniden düzenlenmesi gibi pek çok biyolojik olayda rol oynamaktadır. Ürokinaz plazminojen aktivatör sistemi öncelikle, metastaza yol açan ekstrasellüler matriks ve bazal membranın degredasyonu ve rejenerasyonu ile ilgilidir. uPA aynı zamanda pıhtılaşmayı önlemek için anti-trombolitik faaliyetlere yardımcı olur ve tümör hücrelerinde anjiyogenezi stimüle eder (Fisher 2001).

uPA kanser gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. Özellikle invazyon ve metastazda primer kanserdeki seviyeleri hasta prognozu ve metastatik potansiyel ile koreledir. uPA, reseptörüne(uPAR) bağlandıktan sonra Lys158-Ile159 peptid bağının parçalanması ile aktive olur. Bu aktivasyon plazmin ile meydana getirilir. Reseptörüne bağlandığında plazminojeni plazmine çevirir ve tümör invazyonu için gerekli olan ekstrasellüler matriksin (ECM) uygun hale gelmesine aracılık etmektedir. uPA inhibitörleri olan PAI-1 ve PAI-2'den PAI-1 tümör dokusunda ve plazmada yüksek oranda bulunur. PAI-2 ise, gebelik ve myeloid lösemi gibi durumlar dışında genellikle düşük seviyelerde bulunmaktadır. Meme kanserli hastalarda yüksek uPA, uPAR ve PAI-1 seviyeleri kısalmış sağkalım ile ilişkili iken, PAI-2 seviyesinin ise daha iyi prognozla ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bu inhibitör, antiproteaz aktivitesinden başka sitolize ve viral enfeksiyonların karşı etkisine karşı direnç gösterme, apoptozu kontrol etmek ve Mycobacterium indüklü apoptozdan hücrelerin korunması dâhil olmak üzere ek işlevleri yerine getirir (Zhou ve ark 2001).

uPA, meme kanserli hastalarda hayatta kalma ve metastazda doğrudan yer aldığı tespit edilmiştir (Stillfried ve ark 2007). uPA ve PAI-1, meme kanserinde kullanılan en yaygın biyolojik prognostik faktörlerdendir. EORTCRBG (Kanser Araştırma ve Tedavi için Avrupa Teşkilatı-Reseptör ve Biyomarker Grubu) tarafından 8377 meme kanserli hastayı içeren çalışmada hem uPA hem de PAI-1 özellikle lenf nodu negatif meme kanserli hastalarda kötü prognoz ile ilişkili bulunmuştur (Look ve ark 2002).

Doku Tipi Plazminojen Aktivatörü (tPA)

tPA endotelyal hücreler tarafından tek zincirli aktif enzim olarak sentezlenir ve salgılanır. Plazmin ile proteolitik parçalanma sonucunda iki zincirli moleküle dönüşür. Hem tek hem de iki zincirli formları aktivatör özelliğe sahiptir.

tPA'nın doğal formu 530 amino asit rezidüsü içermektedir ve moleküler ağırlığı yaklaşık 70 kD'dur. Beş bölgeden oluşmaktadır; N-terminal domain, Epidermal Büyüme Faktör (EGF) domaini, plazminojenin iki "kringle-like" domainleri ve "tripsin-like" proteazlar ile homolog aktif C-terminal bölge. Aktif bölge His322, Asp371 veSer478'den oluşur (Nicoloso ve ark 1988).

Fibrin varlığında tPA'nın iki formu da plazminojeni benzer oranda aktive eder. Fibrin varlığında hem tPA hem de plazminojen fibrine bağlanır. Plazminojenin tPA ile aktivasyonu sadece fibrin ile stimüle edilmez. Hücre membranları ve ekstraselüler matriks proteinleri de plazminojen aktivasyon oranını artırır (Zorio ve ark 2008). tPA fibrin yokluğunda zayıf bir enzim iken fibrin oluştuğunda etkinliği güçlü bir şekilde artar.

tPA plazminojeni plazmine dönüştüren ve ekstraselüler matriks proteinlerinin yıkımına sebep olan bir serin proteazdır. tPA, plazmin proteolitik sistemi hem fizyolojik hem de patolojik süreçlerde ortaya çıkarılmıştır. Beyinde tPA motor öğrenme ve uzun vadeli potensiyalizasyon gibi sinaptik plastisite ile ilişkili olayları teşvik etmektedir. Enflamatuar olmayan koşullar altında, aynı zamanda eksitoksik nöronal ölümüne katkıda bulunur. Sinir sitemi dışında tPA özellikle kan içinde bulunur, burada bir trombolitik enzim olarak işlev görür ve damarda fazla fibrin birikimini önler (Sharma ve ark 2010).

Plazminojen Aktivatör İnhibitörleri

PAI-1 ve PAI-2 olmak üzere iki tip plazminojen aktivatör inhibitörü mevcuttur. PAI-3 ve PAI-4 olarak tanımlanan inhibitörlerin ise Protein C inhibitör ve Proteaz Neksin-1 oldukları anlaşılmıştır. Plazminojen aktivatör inhibitörleri serin proteaz süperailesine aittir ve metastaz, büyüme ve kanserde etkili oldukları gösterilmiştir. Plazminojen aktivatör inhibitörleri, tPA ve uPA inhibisyonu için çalışmaktadırlar.

PAI-1, plazmada plazminojen aktivasyonunun esas inhibitörüdür. Tanımlanan dört adet plazminojen aktivatör inhibitörlerinden en önemlisi PAI-1 olup, toplam PAI aktivitesinin en az %60'ından sorumludur. tPA ile birleşik oluşturan tek inhibitördür. Hem tPA hem de uPA'yı hızlıca inaktive eder ve etkileşimi diğer aktivatör inhibitörlerinden daha fazladır.

PAI-1 tek zincirli glikoprotein yapısındadır ve molekül ağırlığı 52 kD'dur ve 379 aminoasit içermektedir. Metionin bakımından zengindir ve bu nedenle oksidan ajanlara duyarlıdır ve bu ajanlarla geri dönüşümsüz olarak inaktive olur. Sistein rezidüleri yokluğu nedeniyle de aktif PAI-1 biyolojik olarak instabil olmasına

neden olmaktadır (Van Meijer ve Pannekoek 1995). İnsan PAI-1 geni 7. kromozomun uzun kolu üzerinde (q21.3-q22) bulunmaktadır ve dokuz ekzon içeren 12.2 kb büyüklüğünde bir gendir. Promotor delesyon haritalama ile PAI-1 geninin ilk 187 bç'lik bölümünde güçlü doku spesifik bir promotor bölge bulunduğu gösterilmiştir (Van Zonneveld ve ark 1988). PAI-1 5'flanking DNA bölgesinde glukokortikoide cevap veren "enhancer" ve "Transforming Growth Factor-β" (TGFβ)' ya cevap veren elementler tanımlanmıştır (Follo ve Ginsburg 1989).

PAI-1 damar duvarı, makrofajlar, karaciğer, dalak ve adipoz doku tarafından sentezlenmektedir. Hücrelerden aktif form olarak salgılanmaktadır. PAI-1'in yaklaşık %80 'ni trombositlerdeki alfa granüllerde latent olarak bulunur.

PAI-1 uPA/uPAR sisteminin önemli bir inhibitörüdür. PAI-1 uPA ile kompleks oluşturarak aktif uPA'ya bağlanır ve bütün kompleks, uPAR-uPA-PAI-1 kompleksinin internalizasyonuna neden olur (Binder ve ark 2007). uPA'nın kanserde tümör hücre invazyonunda proteolitik etki gösterdiği ve metastaz sırasında PAI-1 ile aktivitesinin regüle edildiği bilinmektedir. Meme kanserli hastalarda yüksek uPA ve PAI-1 düzeyinin kötü prognoz ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Foekens ve ark 1995). Epidemiyolojik çalışmalar artmış PAI-1 seviyelerinin myokard enfarktüsü riskini arttırdığını göstermiştir (Meade ve ark 1993). PAI-1 düzeyleri hastalıkların akut fazlarında hızla birkaç kat yükselebilir. İnflamatuar cevapta, akut karaciğer hasarında, sepsiste, endotoksemilerde, meningokoksik sepsiste ve lökopeni durumlarında da yüksek PAI-1 düzeyleri gözlenmektedir (Hermans ve Hazelzet 2005).

Her PAI-1 hem de PAI-2 aynı mRNA'dan elde edilmiş ve aynı fizyolojik fonksiyonları olmasına rağmen, PAI-2 60 kD olarak glikolize edilmiş salgılanmış formda ve 47 kD glikolize edilmemiş intraselüler formda bulunmaktadır. PAI-2 apoptozu kontrol etme, sitolize ve viral enfeksiyonlara karşı direnç gösterme, antiproteaz etki ve Mycobacterium indüklü apoptozdan hücrelerin korunması gibi işlevleri yerine getirmektedir. PAI-2 plasenta, monositler/makrofajlar ve epidermisteki diferensiye keratinositler gibi sınırlı sayıdaki doku ve eksprese edilmektedir (Zhou ve ark 2001). PAI-2'nin intrasellüler fonksiyonlarda özellikle hücre apoptozisi ve nekrozun regülasyonunda önemli olduğu bilinmektedir.

Meme kanserinde, agresiflik ve invazyon ile ilişkili olduğu bilinen uPA ve PAI-1'nın aksine PAI-2 düzeyinin yüksek olmasının prognozu olumlu yönde etkilediği gösterilmiştir (Gershtein ve Kushlinskii 1999).

Ürokinaz Plazminojen Aktivatörü Reseptörü (uPAR)

uPAR in vivo ortamda membran reseptörüne bağlandığında uPA plazminojenin plazmine dönüşümünü katalizler. uPAR glikozil fosfotidil ankonuyla hücre membranına bağlı 3 domainli glikoprotein yapısındadır ve CD87 olarak da bilinir.

uPA'nın uPAR'a bağlanması sadece proteolizi güçlendirmez ayrıca sinyal transdüksiyonuna yol açar. uPA'nın biyolojik faaliyetlerinin çoğu, onun reseptörü olan uPAR'a bağlanmasına bağlı olduğu düşünülmektedir, ancak az sayıda çalışmada uPA'nın uPAR'dan bağımsız faaliyetleri bildirilmiştir. Rapor edilen uPA'nın uPAR bağımsız faaliyetleri, melanoma hücrelerinde uPA'nın mitojenik etkilerine ve vasküler düz kas hücrelerinin migrasyonuna yol açan matriks metalloproteinazları (MMP) ve plazmin proteolizini kapsamaktadır (Dass ve ark 2008).

1. 12. MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücre Hattının Özellikleri

MCF-7 hücreleri, 64 yaşında evre IV invaziv duktal karsinomalı beyaz ırktan bir kadının plevral efüzyonundan izole edilmiştir (Soule ve ark 1973). Morfolojisi epitelyal olup, insülin benzeri çoğalma faktörü bağlanma proteinleri sentezler. Ayrıca WNT7B onkogeninin ekspresyonu mevcuttur. HER-2 geninin ekspresyonu normaldir. MCF-7 hücrelerinin sitogenetik analizlerinde; kromozom sayılarındaki anormal artış ve azalış (anöploid 66-87), hatalı eşleşmiş bazların onarım sisteminde (mismatch repair) bozukluklar (Watanabe ve ark 2001) görülmektedir (Nieves-Neira ve Pommier, 1999). DNA'da hatalı eşleşen bazlar, DNA tamir proteinleri (mismatch repair, MMR) tarafından onarılırlar ve ayrıca genomun bütünlüğünün korunmasında görev alırlar. Hatalı eşleşmiş bazların onarımında görev alan MLH1 ve MSH2 tamir proteinleri MCF-7 hücrelerinde mutasyona uğradığı için, hücreler antikanser ajanlara karşı direnç geliştirir. Sonuç olarak, DNA tamir genlerindeki mutasyonlar ve/veya tamir proteinlerinin az veya aşırı ifadesi, direnç gelişiminde önemli bir faktördür (Schwarz ve ark 2002).

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 yanı sıra 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. GEREÇ VE YÖNTEM

2. 1. Gereçler

2. 1. 1. Kullanılan Kimyasallar

- 1α,25-Dihidroksivitamin D3: Sigma-Aldrich D1530 10µg (min %99 HPLC)
- TGFBeta 2 human recombinant: Sigma-Aldrich SRP3170 5µg
- Human PAI-1 ELİSA BioVendor Research and Diagnostic Products Lot No:X13-093
- Etanol: Merck K38169483 750-2500 ml (%99,9)
- Tris: Merck K38173887-500gr
- $C_6H_5Na_3O_7$. $2H_2O$: Merck A570048438-1Kg
- 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)
- Rekombinant Human u-Plasminogen Activator (uPA)/Urokinase: R&D

systems Cat No:1310-SE (10µg)

- Substrat: Instrumentation Laboratory Company-Bedford, Chromogenix

Cat No: S2251(25 mg)

2. 1. 2. Cihazlar ve Laboratuvar Gereçleri

- $C0_2$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
- Spektrofotometre: Perkin Emler Lambda 25 UV/Vis Spectrometer

Eliza: Kayto RT-2100-C Microplate Reader

2. 2. Metod

2. 2. 1. Hücre Kültürü

TGFβ ve D vitamininin meme kanseri hücre proliferasyonundaki etkilerinin gözlemlenmesi açısından insan meme kanseri hücresi MCF-7 hücre hattı kullanılmıştır. MCF-7 hücreleri, 1970 yılında 69 yaşındaki beyaz bir kadının hasta memesinden izole edilmiş meme kanseri hücre serisidir. MCF-7 hücreleri epitelyal kökenli, östrojen reseptörü pozitif ve invazyon kapasitesi azdır. MCF-7 hücre serisi Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıbbi Biyokimya A.B.D. Başkanı Prof. Dr. Abdülkerim Bedir tarafından hediye edilmiştir. 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 5-6 günde bir olacak şekilde, tripsin-EDTA ile 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 besiyerinin uzaklaştırılması, %10 DMSO ve %90 FBS içeren solüsyonla karıştırılması ve 1,5 ml'lik kriyo tüplere alınarak -195°C'de sıvı azot tankına konularak saklanması şeklinde gerçekleştirilmiştir. Dondurma işleminde hücreler, -20°C'de 1 gece bekledikten sonra -80°C'ye alınmıştır ve daha sonra sıvı azot tankına aktarılmıştır. Bu şekilde depolanan hücreler gerektiğinde hızlıca 37°C'de çözülüp, üzerine 3 ml besiyeri ilave edilerek santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılıp, hücre pelleti tekrar 1 ml besiyerinde çözülerek, petri kabında taze besiyeriyle pasajlanmıştır.

Hücre sayımı için, tripsinlenen hücreler 2500 rpm'de 3 dk santrifüj edildikten sonra kalan hücre pelleti, DMEM ile homojen bir şekilde çözüldükten sonra bu karışımdan 10'ar µl Thoma lamına aktarılarak hücre sayımı yapılmış ve ortalamaları alınarak hesaplanmıştır.

2. 2. 2. Gerçek Zamanlı Hücre Çoğalma Elektronik Algılama Sistemi

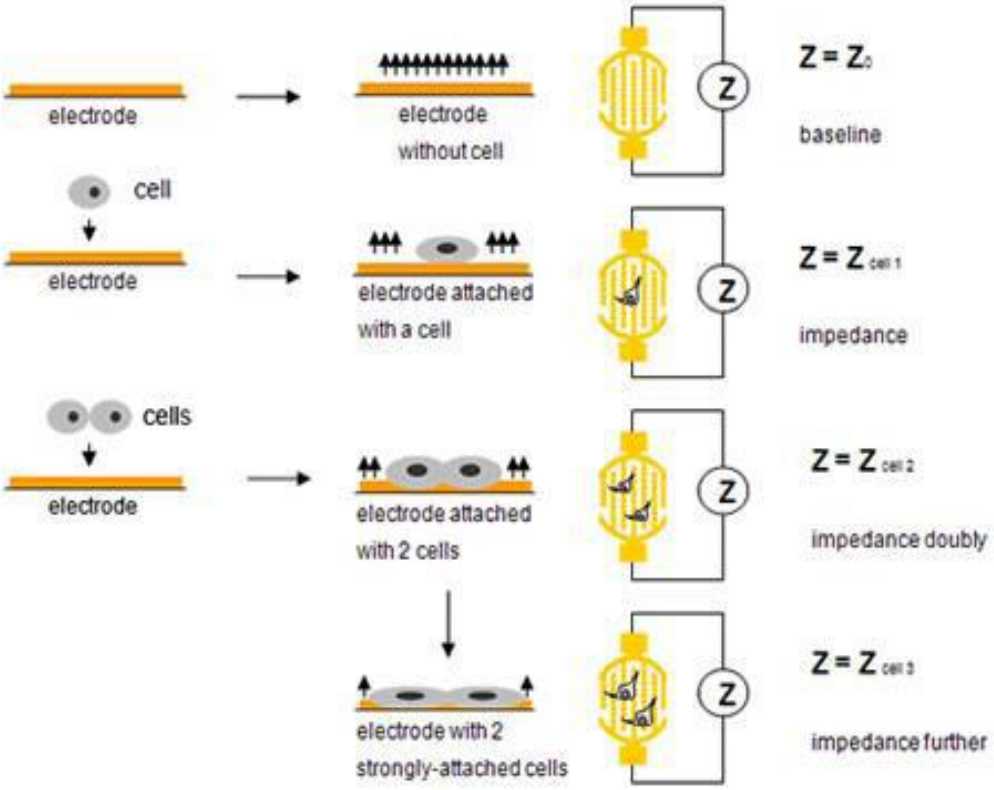
Hücre canlılığının, çoğalmasının yada inhibisyonunun ölçümü için çeşitli metodlar vardır. Bunlardan en yaygın olanları MTT, XTT ve WST metodlarıdır. Bizim kullandığımız metod ise, istediğimiz zaman aralıklarında online veri veren xCELLigence® online hücre proliferasyon takip sistemidir. xCELLigence Sistemi, gerçek zamanlı invaziv olmayan bir şekilde hücresel durumu ölçmek için bir empedans okuma kullanır (Solly 2004 ve Xi ve ark 2008).

xCELLigence® (Gerçek Zamanlı Hücre Elektronik Algılama Sistemi), hücre mönitörizasyonunun belirlenmesi için hassas, kantitatif, dinamik ve eş zamanlı çalışan bir sistemdir. Böylece diğer metodlara göre pek çok manipülasyon azaltılmış ve anlık veri alınabilen bu sistemde bileşik yada renk girişimine sebep verebilecek şeylerden kaçınılmıştır. Elektrik empedans okuma yoluyla eş zamanlı olarak hücre canlılığı ölçümüne izin verir. Sistem; elektronik sensör analizörü, cihaz ve 16 yada 96'lık e-platelerden ve cim-plate (Şekil 2.1) olmak üzere üç bileşeni kapsar.

Şekil 2.1. Elektronik sensör analizörü, cihaz, E-plate 16 ve cim-plate 16 (http://www.acebio.com./productlist 2).

E-Plateler, kuyu tabanlarına gömülmüş uygun geometriye sahip mikro elektrotlardan oluşur. Diğer empedans sensörleri ise kuyunun yüzey alanının %80'ini kaplar. Bu sistem hücre sensör elektrot merkezli olarak geliştirilmiştir. İnkübatör içinde bulunan cihaza plateler yerleştirilir ve software 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 ölçer (Şekil 2.2). Önce e-plateteki kuyular boşken sistemden yerleşmeye başladığından itibaren ise sistemden geçen akım hücrelerin elektrik geçen elektrik akımı, boş kuyucuğun empedansına eşit olur. Hücreler elektrotlara

empedansına eşit olur. Sürekli olarak empedans ölçümü yapar. Empedans verisi bilgisayara gönderilir ve software tarafından analiz edilir.



Şekil 2.2. Hücrelerin elektrik empedansının ölçümü(http://www.roche.com).

Empedans verisi ilgili software tarafından analizi sonucu hücre sayısını cell index (CI) olarak vermektedir. CI hücre sayısına bağlı olarak artış göstermektedir. CI hesaplaması ise aşağıdaki denklem ile gerçekleştrilmektedir. CI denklem ve bileşenleri;

CI = max (i= 1….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 arka plan empedansıdır.

2. 2. 3. Gerçek Zamanlı Hücre Çoğalma Elektronik Algılama Sistemiyle Hücre Büyüme Eğrisinin Belirlenmesi

Bu çalışmada MCF-7 hücrelerinin normal büyüme eğrisi ve çeşitli uygulamalar için kullanılacak optimal hücre sayısını belirlemek için yapıldı. Hücre büyüme eğrisinin belirlenmesi deneyinde önce 100'er µl DMEM, 16 kuyulu e-platelerin (mikro elektrot içeren özel hücre kültürü kapları) her bir kuyusuna koyuldu ve DMEM'in yarım saat kuyulara yerleşmesi beklendi. Ardından hücre sayımı yapıldı ve farklı sayılarda (5.000, 10.000, 15.000, 20.000, 25.000, 30.000, 40.000, 50.000) hücre karışımı hazırlandı. Farklı sayılardaki MCF-7 hücreleri, önceden içine DMEM koyduğumuz kuyulara 100'er µl olacak şekilde eklendi. Hücrelerin besiyeri 72 saatte bir değiştirildi. Hücre sayısında meydana gelen değişiklikler, e-platelerde 196 saat boyunca her 15 dk'da bir inkübatör içindeki xCELLigence® cihazı ile gözlemlendi. Buradan MCF–7 hücrelerinin prolifere olduğu ideal hücre sayısını bulup sonraki deneyleri bu sayıyla çalıştık.

Cell Indeks (CI), elektrot içeren kuyucuklardaki hücre durumunun niceliksel ölçümüdür. Aynı fiziksel şartlar altında, elektrotlar üzerine hücre yapışmasındaki artan sayı, daha büyük CI değerlerine neden olur. Ayrıca hücre sayısı aynı kaldığı takdirde, hücre morfolojisinde bir değişme CI'da değişikliklere yol açacaktır. Belirli bir zaman noktasında normalize edilmiş Cl, referans bir zaman noktasındaki CI'nın, zaman noktasındaki CI'ya bölünmesi ile hesaplanır.

2. 2. 4. TGFβ2'nin MCF-7 Hücre Proliferasyonuna Etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Çoğalma Elektronik Algılama Sistemiyle Belirlenmesi

TGFβ2, 10^4 ng/ml olacak şekilde distile suda çözüldü, 0,2 µm çaplı steril filtreden geçirilerek porsiyonlayıp sıvı azotta saklandı. Diğer dozlar hazırlamış olduğumuz bu TGFβ2'den dilüsyon yaparak hazırlandı.

Hücre büyüme eğrisinde yapıldığı gibi, 16 kuyulu e-platelere önce 100'er µl DMEM koyuldu, ardından hücre sayımı yapıldıktan sonra her bir kuyucuğa MCF-7 hücrelerinden 10 000 hücre olacak şekilde eklendi. MCF-7 hücreleri, belirlenmiş olan TGFβ2 doz grupları (0,1, 1, 5, 10 ve 500 ng/ml) ile 24 saat sonra muamele

edildi. Hücre sayısındaki değişiklikler, 114 saat boyunca her 15 dk'da bir inkübatör içindeki xCELLigence® cihazı ile gözlemlendi.

2. 2. 5. D vitamininin MCF-7 Hücre Proliferasyonuna Etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Çoğalma Elektronik Algılama Sistemiyle Belirlenmesi

D vitamini, 10^4 nM olacak şekilde %99,9'luk etanolde çözüldü, 0,2 µm çaplı steril filtreden geçirilerek porsiyonlayıp sıvı azotta saklandı. Diğer dozlar hazırlamış olduğumuz bu D vitamininden dilüsyon yapılarak hazırlandı.

Hücre büyüme eğrisinin belirlenmesinde yapıldığı gibi, 16 kuyulu e-platelere önce 100'er µl DMEM koyuldu, ardından hücre sayımı yapıldıktan sonra her bir kuyucuğa 10 000 hücre olacak şekilde hücre eklendi. MCF-7 hücreleri, belirlenmiş olan D vitamininin doz gruplan (25, 50, 125, 250 ve 500 nM) ile 24 saat sonra muamele edildi ve bu işlem her 24 saatte bir tekrarlandı. Hücre sayısındaki değişiklikler, 92 saat boyunca her 15 dk'da bir inkübatör içindeki xCELLigence® cihazı ile gözlemlendi.

2. 2. 6. PAI-1 Protein Analizi ve uPA Aktivitesi İçin Hücre Lizatlarının Hazırlanması

Her petri kabına TGFβ2, D vitamini, kombine çalışma ve kontrol grubu için 250 000 hücre 20 cm^2'lik çaplı petri kaplarına ekildi ve 24 saat sonra hücreler yapışınca belirlenen dozlarda TGFβ2 ile 2 gün, D vitamini ile 4 gün ve TGFβ2 ve D vitamini ile kombine şekilde 3 gün inkübe edildi. Ayrıca D vitamini ile muamele edilen hücrelere 48 saat sonra tekrar D vitamini verildi. Kontrol grubuna ise hücre ekiminden 24 saat sonra hücre DMEM'leri alınıp yerine 3 ml %5'lik DMEM verildi. İnkübasyon sonrası elde edilen hücreler tripsinize edilerek yapıştıkları yüzeyden kaldırıldı. Tripsin DMEM ile nötralize edildi. Toplanan hücreler 2500 rpm'de 3 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı. Daha sonra bu hücrelere soğuk PBS ile 3 sefer yıkandı. Her bir yıkama sonrası hücreler 2500 rpm de 3 dakika santrifüj edildi. Yıkama işlemlerinden sonra hücrelere hazırlanan 1 ml lizat tamponunda lize edildi. Birkaç kez -80'e kısa süreli bırakıp çıkarıldı. Daha sonra sonikatörde titreşimle parçalandı. 14000 rpm'de +4 derecede 30 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmından porsiyonlayarak -80'e kaldırıldı. Daha sonra

hazırlanan lizatlardan total protein ölçülüp, uPA aktivitesi ve PAI-1 düzeyi için örnek ayrıldı.

2. 2. 7. Hücrelerin Protein Analizi

Hücrelerin hem PAI-1 hem de uPA aktivitesi için kullanılacak hücre örneklerinde protein miktarları analiz edildi. Protein analizi Lowry (Lowry 1951) metodu kullanılarak yapıldı. Buna göre;

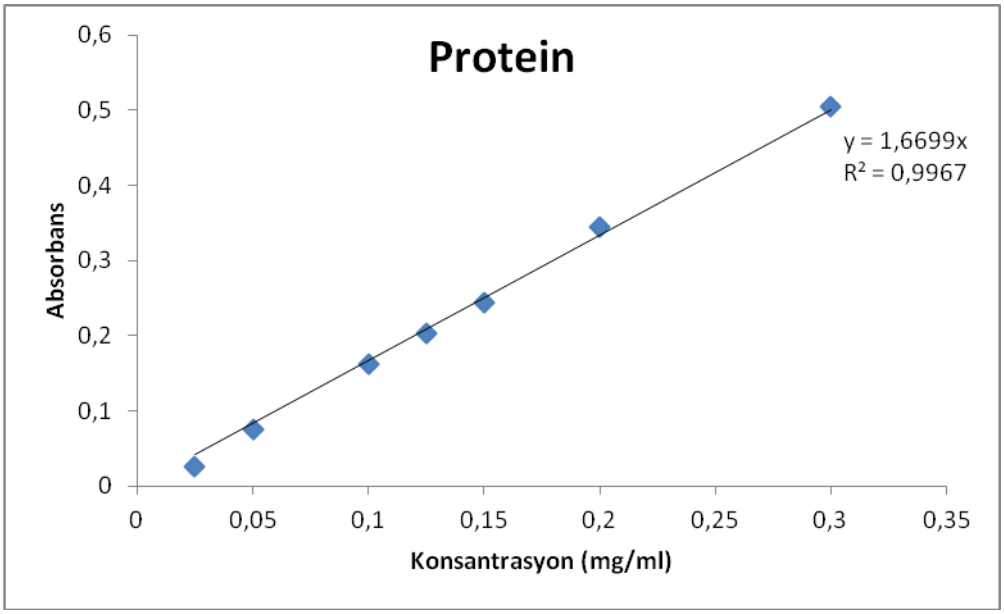
- ✓ A reaktifi; 1 g sodyum-potasyum tartarat ve 0,5 g $CuS0_4.5H_20$ 100 ml distile suda çözülerek hazırlandı.
- ✓ B reaktifi; 20 g Na_2C0_3 ve 4 g NaOH bir litre distile suda çözülerek hazırlandı.
- ✓ C reaktifi; 50 ml B reaktifi içerisine 1 ml A reaktifi eklenerek hazırlandı.

Protein analizinde standart olarak Bovine Serum Albumin (BSA) kullanıldı. BSA'nın stok çözeltisi 1 mg/ml olacak şekilde distile suyla hazırlandı. Diğer standartlar (0,025; 0,05; 0,1; 0,125; 0,15; 0,2; 0,3 mg/ml) da, 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. (çizelge 2.1). 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.

Çizelge 2.1. Protein ölçümünü uygulaması.

	Numune	Kör	Standart
Numune	200 µl	-	
Standart	-	-	200 µl
C reaktifi	1 ml	1ml	1ml
Folin reaktifi	100 µl	100 µl	100 µl

Farklı konsantrasyonlardaki BSA standartlarına ait standart eğri ve doğrusallık denklemi şekil 2.3'de gösterilmektedir. Elde edilen bu standart eğriye göre hücrelerin protein miktarları bulunmuştur.



Şekil 2.3. Protein standartlarına ait standart eğri ve doğrusallık denklemi.

2. 2. 8. MCF-7 Hücre Hattında PAI-1 Düzeyi Ölçülmesi

Hücrelerin PAI-1 düzeyi ölçülmesinde Human PAI-1 Eliza kiti kullanılmıştır. Eliza yöntemiyle yapılan bu metodda kuyucuk başına yaklaşık 400 µl yıkama tamponu ile kuyucuklar ikişer defa yıkandı. Bu aşamada kuyucukların çizilmemesine özen gösterildi ve son yıkamadan sonra yıkama tamponunu emici ped veya kağıt havlu kullanılarak kuyucuklardan giderildi. Tüm kuyucuklara ve blank kuyucuğuna distile su ile seyreltilerek hazırlanan 100 µl deney tamponu (5 ml deney tamponu+95 ml distile su) eklendi. Deney tamponuna ilave olarak TGFβ2 ve D vitamini uygulanan hücre lizatlarından ve dilüe edilmiş standartlardan 100 µl ilave edildi. Deney tamponu ile 1/100 oranında seyreltilen biotin konjugatı 50 µl olacak şekilde kuyucuklara ilave edilip oda sıcaklığında 400 rpm'de çalkalayıcıda 2 saat inkübasyona bırakıldı. 2 saat sonunda tüm kuyucuklar yıkama tamponu ile 3 kez yıkandı ve blank kuyucuğuda dahil olmak üzere tüm kuyucuklara 100 µl deney tamponu ile 1/200 oranında seyreltilmiş Streptavidin-HRP solüsyonu ilave edildi. 1 saat oda sıcaklığında 400 rpm'de çalkalayıcıda inkübasyona bırakılan kuyucuklar

inkübasyon sonrasında yıkama tamponu ile 3 kez yıkandı. Tüm kuyucuklara 100 µl TMB substrat solüsyonu eklendi ve oda sıcaklığında yaklaşık 10 dakika karanlık ortamda inkübe edildi ve ve 100 µl stop solüsyonu kuyucuklara eklendi. Tüm numunelerin absorbansı 450 nm' de eliza cihazında ölçüldü. Son olarak standart eğrigrafiği (Şekil 2.4) hazırlanarak numunelerdeki PAI-1 düzeyi hesaplandı.

100 µl deney tamponu + 100 µl std veya numune

+

50 µl biotin konjugatı

↓ 2 saat inkübasyon oda ısısı

100 µl streptavidin-HRP solüsyonu

↓ 1 saat inkübasyon oda ısısı

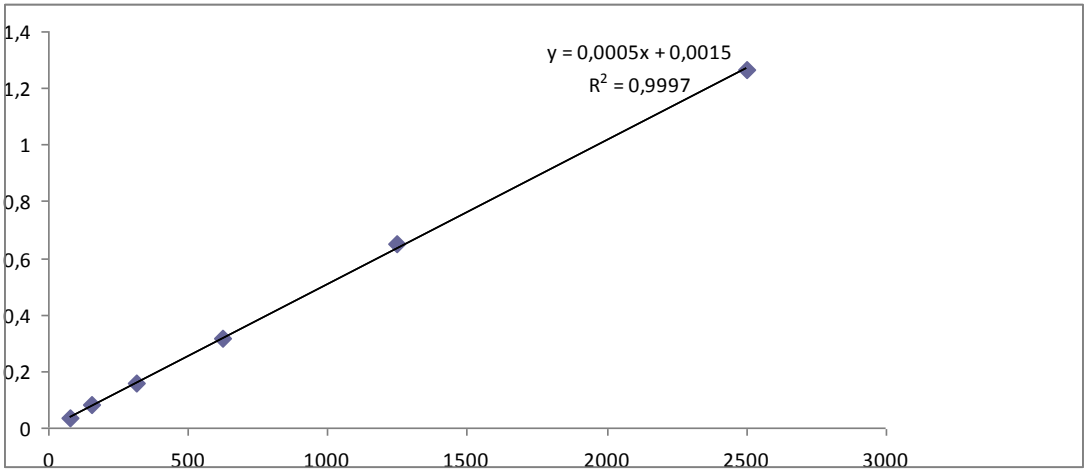
100 µl TMB subsrat

↓ 10 dakika karanlık odada inkübasyon

100 µl Stop solution

↓

450 nm'de okutuldu.



Şekil 2.4. PAI-1 standart eğrisi grafiği.

2. 2. 9. MCF-7 Hücre Hattında uPA Aktivitesinin Ölçülmesi

Hücrelerin uPA aktivitesinin ölçülmesinde Prof.Dr. Ali ÜNLÜ hocamızın tezindeki metodu kısmen değiştirilerek geliştirildi. Bu metoddaki reaktifler;

- ✓ A reaktifi; 0,5 M Tris ph=7,4 10 ml distile suda çözülerek hazırlandı daha sonra 1:10 oranında distile suyla dilue edildi.
- ✓ B reaktifi; %20'lik 1 ml BSA distile su içerisinde hazırlandıtan sonra içerisine 40 ml A reaktifi eklenerek hazırlandı.
- ✓ C reaktifi; 25 mg plazminojen aktivatör substratı (S-2251) 10 ml distile suda çözülerek hazırlandı
- ✓ D reaktifi; 1,7 ml B reaktifi içerisine 0,5 ml C reaktifi eklenerek hazırlandı.
- ✓ E reaktifi; 10 µg uPA standardı 1 ml PBS ile çözülerek hazırlandı.
- ✓ F reaktifi; 200 µg plazminojen 1 ml distile suda çözülerek hazırlandı.

uPA stok standardından 10-50-100-500-1250-2500 ng/ml konsantrasyonlarında olacak şekilde distile suyla hazırlandı. uPA analizinde, önceden hazırlanmış kontrol, TGFβ2 ve D vitamini uygulanan hücre lizatlarından ve standartlardan 10 µl alınarak 31 µl belirlemiş olduğumuz plasminojen miktarından (8 µg/ml) ekledikten sonra üzerine 150 µl A reaktifinden koyup 2 saat 37 ºC inkübatörde beklettikten sonra 150 µl C reaktifi eklendi ve hafifçe çalkalandı. 6 saat 37 ºC inkübatörde beklettikten sonra 405 nm'de tüm numunelerin absorbansı Eliza

cihazında ölçüldü. Bu numuneler triplicate çalışılmıştır. Son olarak standart eğri grafiği hazırlanarak numunelerdeki uPA derişimi hesaplandı. Sonuçlar mg protein başına oranlanarak verildi.

10 µl std veya numune

+

31 µl plasminogen

+

150 µl Tris-HCl

↓ 2 saat inkübasyon

150 µl substrat

↓

405 nm'de okuma

Çalışmanın prensibi;

<u>Reaksiyon 1;</u>

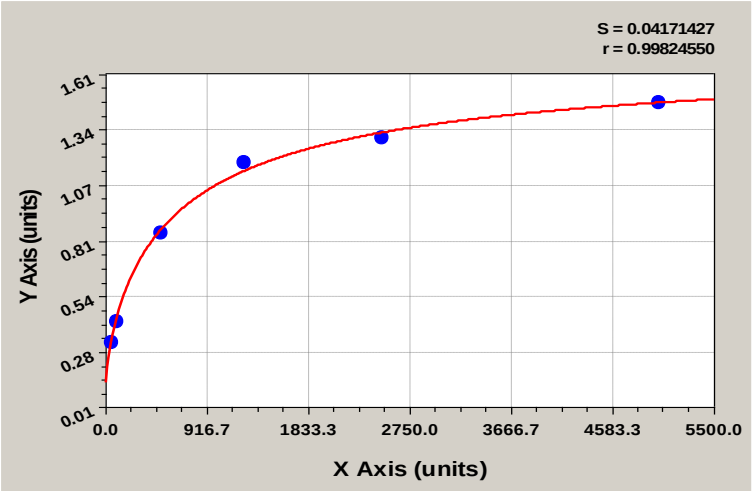
Plasminojen + uPA $\xrightarrow{\text{enzim}}$ uPA + Plasmin

<u>Reaksiyon 2 ;</u>

H-D-Val-Leu-Lys-pNA + Plasmin $\longrightarrow$ H-D-Val-Leu-Lys-OH+ pNA oluşur.

Plazmin kromojenik substratı hidrolize ederek, kromojenik grup pNA'yı serbest bırakır. Daha sonra oluşan sarı renk fotometrik olarak 405 nm'de okutuldu. pNA oluşum hızı, yani 405 nm'deki absorbansdaki artış, enzimatik aktivite ile orantılıdır.

uPA'ya ait kalibrasyon ve doğrusallık çalışmaları için 10–50–100–500–1000–2500 ng/ml konsantrasyonlarında uPA standartlarına ait standart eğri ve doğrusallık denklemi şekil 2.5'de gösterilmiştir. Hücrelerin uPA değerleri Eliza cihazında 405 nm'de ölçülmüş ve enzim aktivitesi için uPA'nın tek tek protein sonuçlarına oranlanmasıyla bulunmuştur. Bulunan bu uPA standartlarına ait grafik, şekil 2.5'de verilmiştir.



Şekil 2.5. uPA'nın kalibrasyon ve doğrusallık eğrisi.

2. 3. İstatistik Analizleri

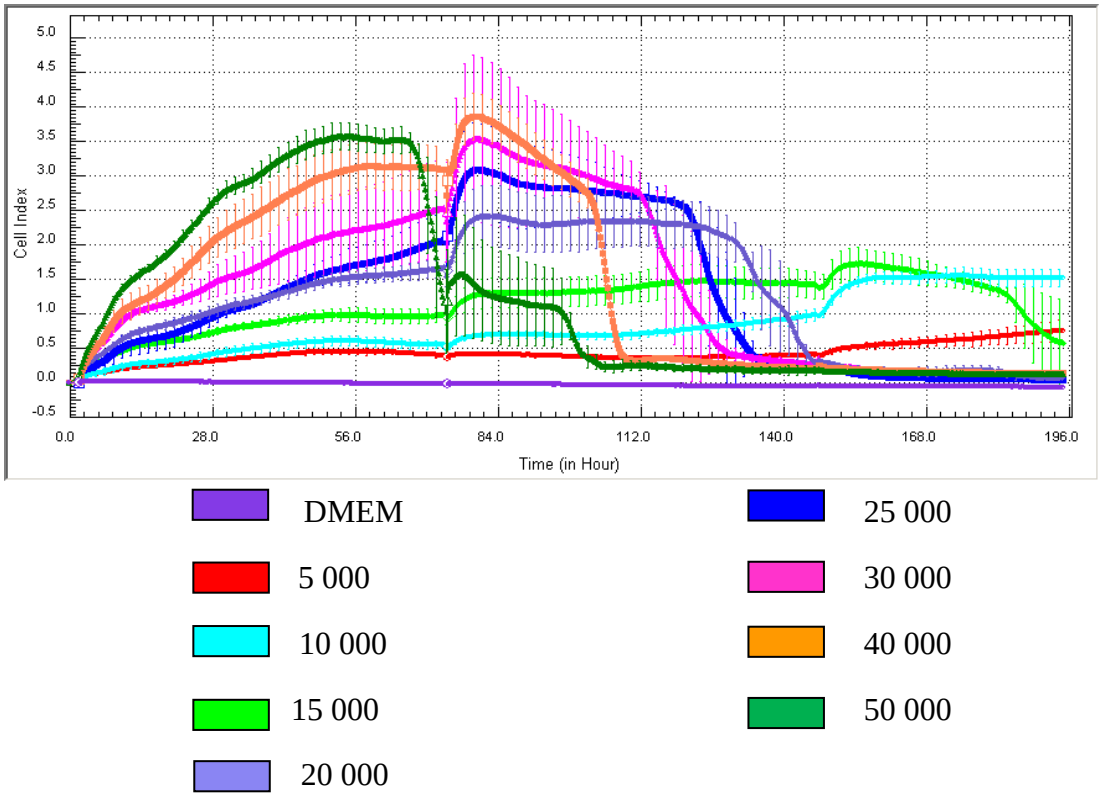
İstatistik analizler SPSS 18,0 paket programı ile yapılmıştır. Çeşitli dozlarda TGFβ2 ve D vitamini ile muamele edilen MCF-7 hücre serisi proliferasyonu, uPA aktivitesi ve PAI-1 düzeyi verileri normal dağılıma uyup uymadığının incelenmesinde Kolmogorov-Smirnov testi yapıldı. Buna göre verilerin normal dağılım gösterdiği görüldü. Bunun üzerine doz grupları ve zamanlar arasındaki farklılıkların etkileşimli olarak incelenmesi için tekrarlı ölçümlerde One Way Anova varyans analizi yapılmıştır. Her doz grubundaki zamanlar açısından farklılık Post Hoc Dunnett testi ile analiz edilmiştir. Farklı zaman aralıklarındaki uPA aktivitesi ve PAI-1 düzeyleri verileri "t" testi ile değerlendirilmiştir. İstatistikî farklılık için $p<0,05$ kabul edilmiştir.

3. BULGULAR

3. 1. Çalışılacak Hücre Sayısının Optimizasyonu

Şekil 3.1'de 5 000, 10 000, 15 000, 20 000, 25 000, 30 000, 40 000 ve 50 000 gibi farklı sayılardaki MCF-7 hücrelerinin büyüme eğrileri görülmektedir. Hücrelerin besiyeri 72. saatte değiştirilmiştir. Grafikteki ani iniş ve çıkışlar hücrelerin besiyerinin değiştirilmesinden kaynaklanmaktadır.

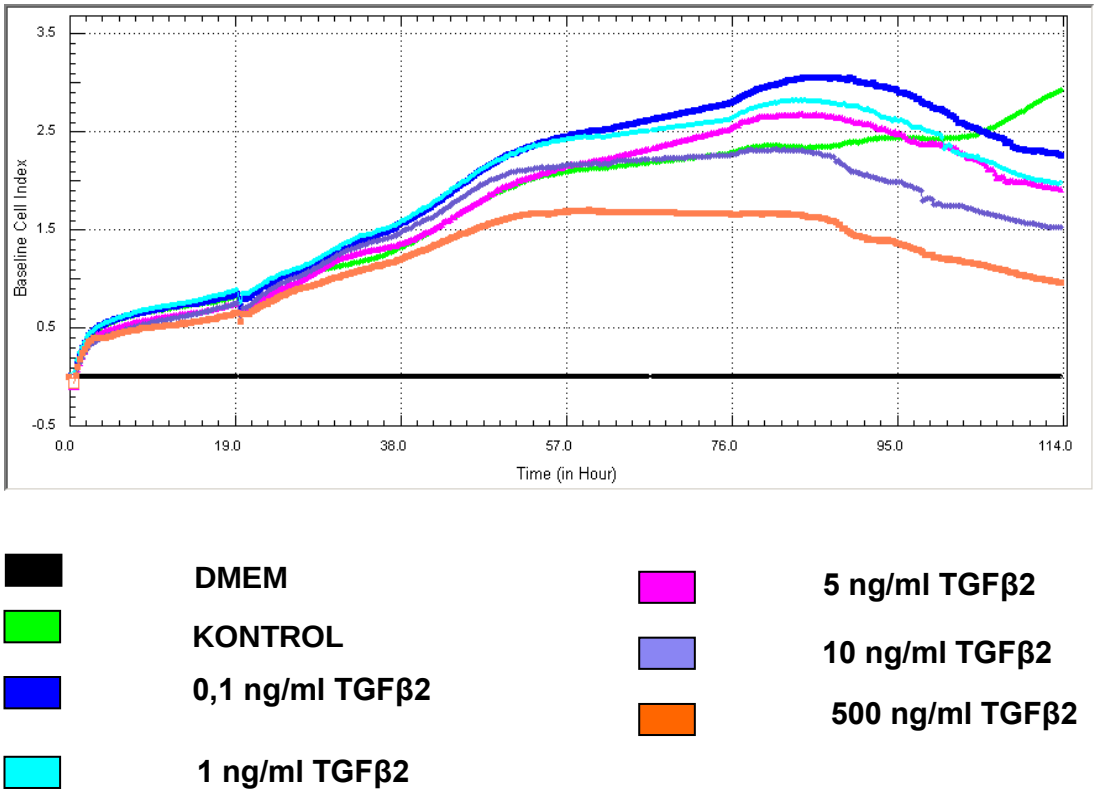
Şekil 3.1'de görüldüğü gibi 30 000 ve üstü sayıdaki hücrelerin, diğer sayıdaki hücrelere göre daha erken bir zaman diliminde ölmeye başladığı gözlemlendi. MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunun devam ettiği hücre sayıları 10 000 ve 15 000 olarak tespit edildi. Yine uygulanacak maddelerin etkili olduğu doz aralığı tespit edilirken uygulanan maddelerin etkilerinin geç ortaya çıkması nedeniyle çalışmalar 10 000 hücre sayısıyla gerçekleştirildi.



Şekil 3.1. Farklı sayılardaki MCF-7 hücrelerinin 196 saatlik büyüme eğrileri.

3. 2. TGFβ2'nin MCF-7 Hücre Proliferasyonuna Etkisi

TGFβ2'nin MCF-7 hücre büyümesine doz ve zaman bağımlı etkisi, gerçek zamanlı hücre elektronik algılama sistemiyle analiz edildi. TGFβ2 0,1; 1; 5; 10 ve 500 ng/ml konsantrasyonlarında hücre büyüme oranları, 114 saat boyunca izlendi. Şekil 3.2'de anlaşıldığı gibi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında TGFβ2, hücreleri doz ve zamana bağımlı olarak inhibe ettiği görüldü.



Şekil 3.2. TGFβ2'nın MCF-7 hücrelerine 114 saat boyunca etkisi.

TGFβ2'nın MCF-7 hücrelerine etkisine ait sonuçlar, farklı zamanlarda doz grupları ve kontrol grubu arası karşılaştırma çizelge 3.1'de verilmiştir. Doz grupları arasındaki fark sırasıyla 64., 90. ve 114. saatlerde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Doz grupları arasında anlamlı bir fark olup olmadığı, kontrol grubuna göre ayrı ayrı değerlendirildiğinde 64. saatte 500 ng/ml doz grubu ile kontrol grubu arasında, 90. saatte 500 ng/ml doz grubu ile kontrol grubu arasında, 114. saatte ise 0,1 ng/ml, 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml ve 500 ng/ml doz grupları ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark olduğu ortaya çıkmıştır. 40. saatte ise doz

grupları arasında kontrol grubuna göre değerlendirildiğinde istatistiksel olarak bir fark bulunamamıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar doz faktörü ile zaman faktörü etkileşiminden dolayı, doz grupları arasındaki farklılığın zamandan zamana değiştiğini göstermiştir.

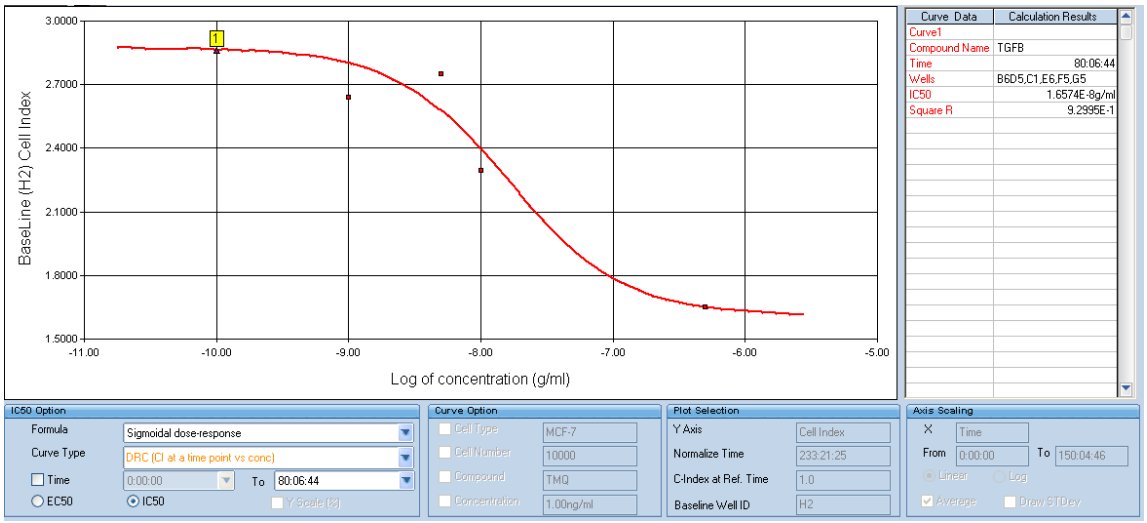
Çizelge 3.1. TGFβ2 uygulanan doz gruplarının farklı zamanlarda karşılaştırılması.

	40. saat (ort±std)	64. saat (ort±std)	90. saat (ort±std)	114. saat (ort±std)
KONTROL	1,38±0,18	2,19±0,16	2,45±0,12	2,91±0,43
0,1 ng/ml	1,63±0,05	2,43±0,10	2,92±0,03	2,27±0,24*
1 ng/ml	1,49±0,09	2,24±0,07	2,82±0,29	1,91±0,20*
5 ng/ml	1,48±0,19	2,18±0,22	2,67±0,18	2,04±0,18*
10 ng/ml	1,53±0,02	2,14±0,04	2,37±0,39	1,43±0,12*
500 ng/ml	1,34±0,10	1,78±0,17*	1,51±0,20*	1,05±0,18*

* $p<0,05$

3. 3. TGFβ2'nin IC_{50} Değerinin Belirlenmesi

TGFβ2 verilen hücrelerin proliferasyon eğrisinden IC_{50} değeri şekil 3.3'te görüldüğü üzere 16 ng/ml (r^2=0,99) olarak hesaplanmıştır. Bu değer cihaz tarafından, kontrol grupları hariç, uygulanan tüm doz gruplarının, 80. 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, TGFβ2 için hücrelerin yarısını öldürmeye yetecek toksik değer hesaplanmıştır.



Şekil 3.3. TGFβ2 için IC_{50} Değerinin Belirlenmesi. Xcelligence sisteminde bulunan software kullanılmıştır.

3. 4. TGFβ2 Uygulanan ve Kontrol Grubundaki Hücrelerin PAI-1 Düzeyi Ölçümü Sonuçları

TGFβ2'nin, MCF-7 hücrelerinin PAI-1 düzeyi üzerine etkisi farklı zamanlar göz önüne alınarak istatistiksel açıdan anlamlı olup olmadığı değerlendirilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlarda, 24. saatte ve 48. saatte kontrol grubu ile TGFβ2 uygulanan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma bulunmuştur ($p<0,05$).

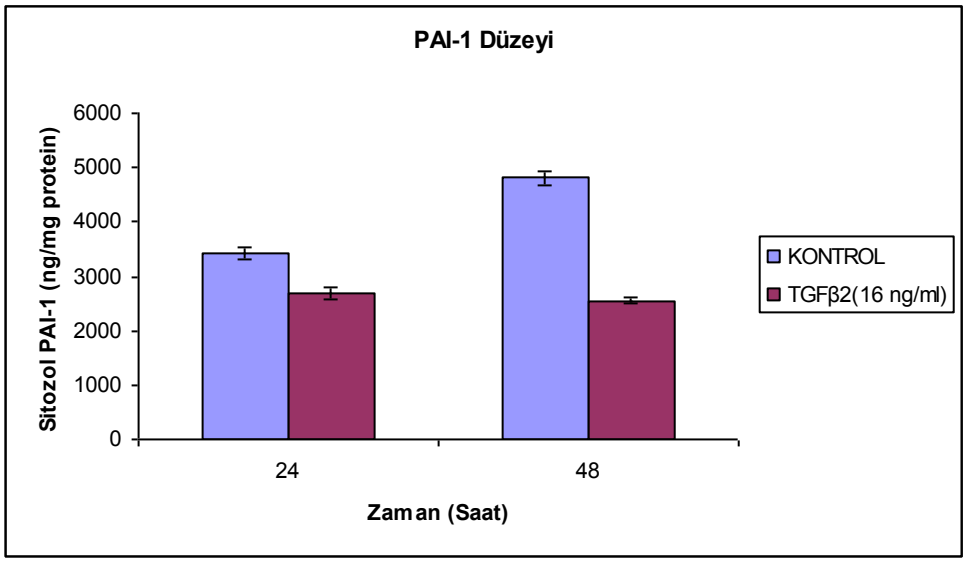
TGFβ2'nın farklı zamanlarda PAI-1 düzeyine etkisinin karşılaştırılması çizelge 3.2.'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. TGFβ2'nin farklı zamanlarda PAI-1 düzeyine etkisinin karşılaştırılması.

PAI-1 Düzeyi (ng/mg protein)	KONTROL (ort±std)	TGFβ2 (16 ng/ml) (ort±std)
24. saat	3420,67±121,33	2684,33±98,22*
48. saat	4808,67±131,32	2551,33±54,77*

* $p<0,05$

PAI-1 düzeyi için TGFβ2 uygulanan ve kontrol gruplarına ait grafik şekil 3.4'de verilmiştir.



Şekil 3.4. Kontrol grubu ve TGFβ2 uygulanan grupların PAI-1 düzeyi.

3. 5. TGFβ2 Uygulanan ve Kontrol Grubundaki Hücrelerin uPA Aktivitesi Ölçümü Sonuçları

TGFβ2'nin, MCF-7 hücrelerinin uPA aktivitesi üzerine etkisi farklı zamanlar göz önüne alınarak istatistiksel açıdan anlamlı olup olmadığı değerlendirilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlarda, 24. saatte ve 48. saatlerde kontrol grubu ile TGFβ2 uygulanan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma bulunmuştur ($p<0,05$).

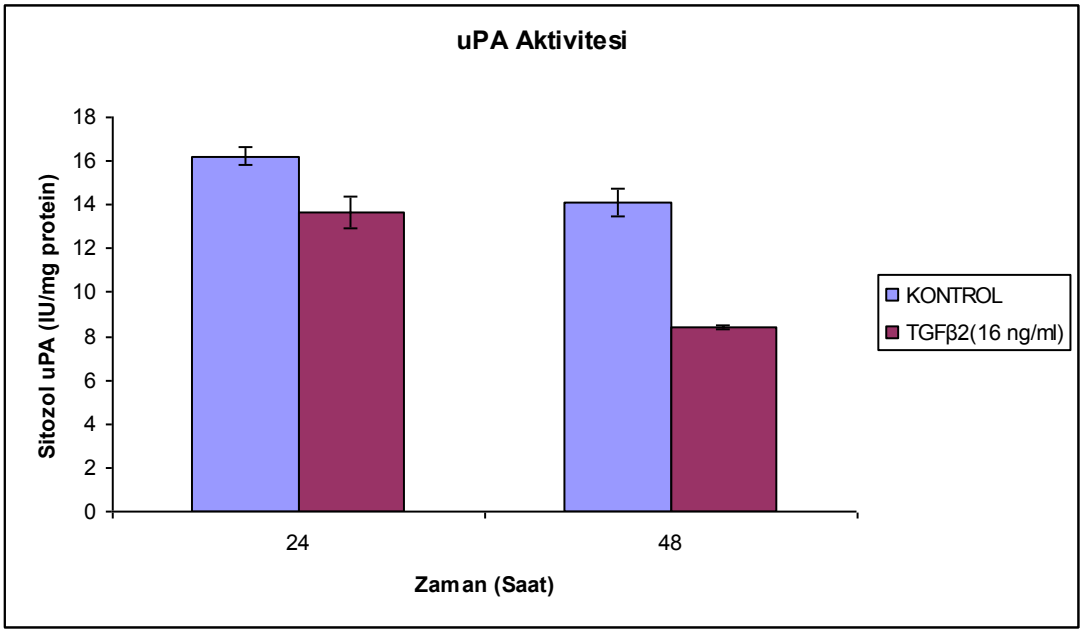
TGFβ2'nın farklı zamanlarda uPA aktivitesi etkisinin karşılaştırılması çizelge 3.3'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. TGFβ2'nin farklı zamanlarda uPA aktivitesine etkisinin karşılaştırılması.

uPA aktivitesi (IU/mg protein)	KONTROL (ort±std)	TGFβ2 (16 ng/ml) (ort±std)
24. saat	16,22±0,41	13,67±0,75*
48. saat	14,14±0,62	8,44±0,08*

* $p<0,05$

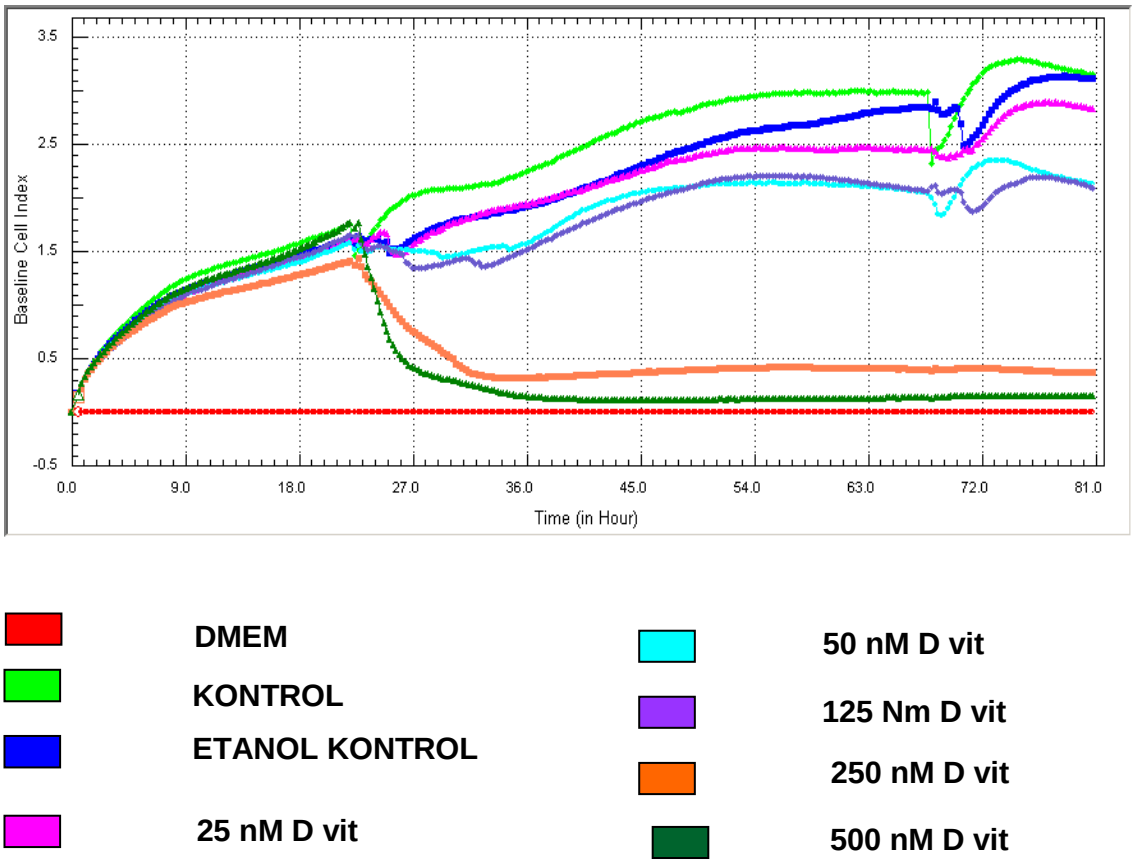
uPA aktivitesi için TGFβ2 uygulanan ve kontrol gruplarına ait grafik şekil 3.5'de verilmiştir.



Şekil 3.5. Kontrol grubu ve TGFβ2 uygulanan grupların uPA aktivitesi.

3. 6. D vitamininin MCF-7 Hücre Proliferasyonuna Etkisi

D vitamininin MCF-7 hücre büyümesine doz ve zaman bağımlı etkisi, gerçek zamanlı hücre elektronik algılama sistemiyle analiz edildi. D vitamininin 25, 50, 125, 250, 500 nM konsantrasyonlarında hücre büyüme oranları, 92 saat boyunca izlendi. Şekil 3.6'de anlaşıldığı gibi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında D vitamininin, hücreleri doz ve zamana bağımlı olarak inhibe ettiği görüldü.



Şekil 3.6. D vitamininin MCF-7 hücrelerine 81 saat boyunca etkisi.

D vitamininin MCF-7 hücrelerine etkisine ait sonuçlar, farklı zamanlarda doz grupları arası karşılaştırma çizelge 3.4'de verilmiştir. Doz grupları arasındaki fark sırasıyla 32., 52., 72. ve 92. saatlerde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Doz grupları arasında anlamlı bir fark olup olmadığı, kontrol grubuna göre ayrı ayrı değerlendirildiğinde; 32., 52., 72., ve 92. saatte kontrol ile 250 nM ve 500 nM'de ile anlamlı bir fark olduğu ortaya çıkmıştır. Farklı zamanlarda 25 nM, 50 nM ve 125 nM doz grupları ve kontrol grubu karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak bir fark bulunamamıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar doz faktörü ile zaman faktörü etkileşiminden dolayı, doz grupları arasındaki farklılığın zamandan zamana değiştiğini göstermiştir.

Çizelge 3.4. D vitamini doz gruplarının farklı zamanlarda karşılaştırılması.

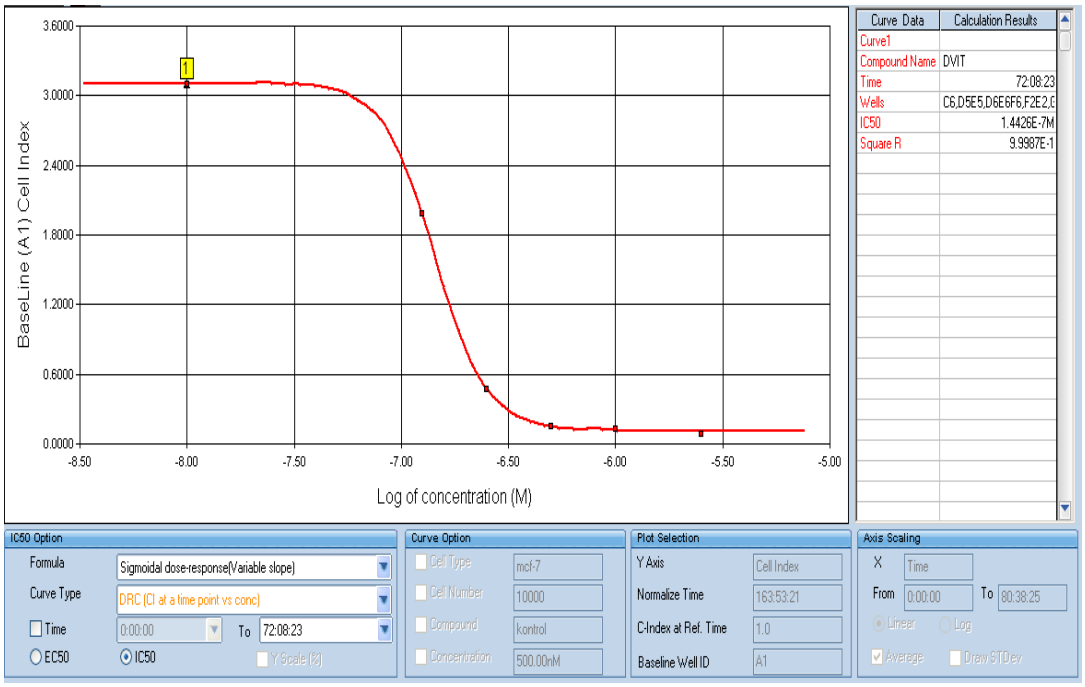
	32.saat (Ort ± std)	52.saat (Ort ± std)	72.saat (Ort ± std)	92.saat (Ort ± std)
Kontrol	2,03 ± 0,5	2,91 ± 0,15	3,17 ± 0,1	2,78 ± 0,21
25 nM D vitamini	1,96 ± 0,17	2,39 ± 0,1	2,6 ± 0,15	2,35 ± 0,1
50 nM D vitamini	1,45 ± 0,12	2,04 ± 0,53	2,23 ± 0,15	1,9 ± 0,15
125 nM D vitamini	1,43 ± 0,1	2,28 ± 0,1	2,04 ± 0,15	1,85 ± 0,15
250 nM D vitamini	0,37 ± 0,06*	0,53 ± 0,14*	0,48 ± 0,15*	0,2 ± 0,08*
500 nM D vitamini	0,21 ± 0,08*	0,11 ± 0,02*	0,12 ± 0,05*	0,11 ± 0,03*

* $p<0,05$

3. 7. D vitamininin IC_{50} Değerinin Belirlenmesi

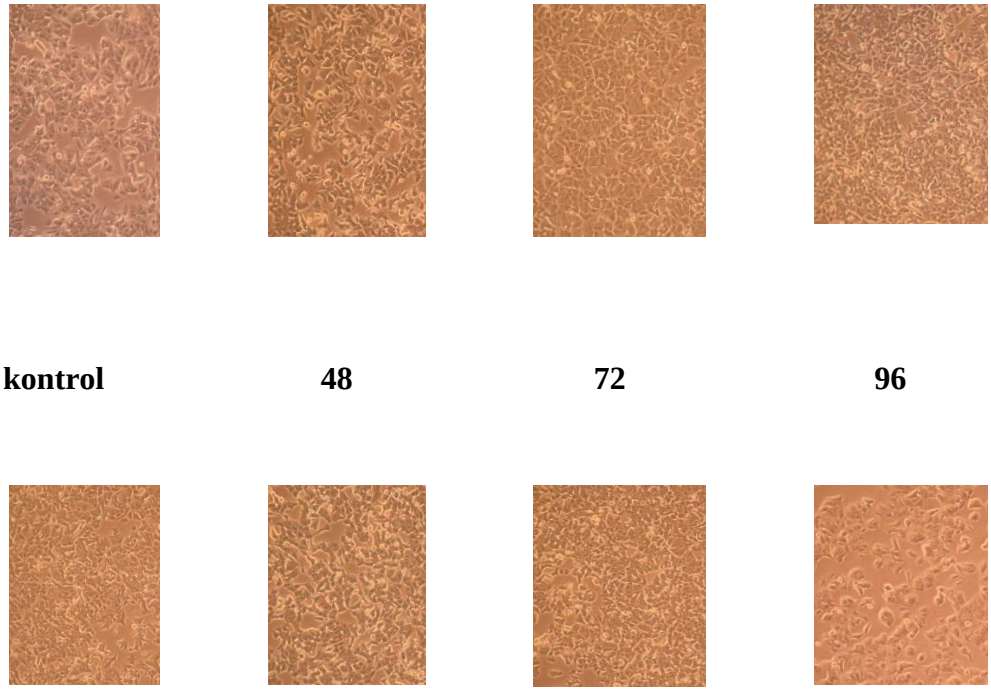
D vitamininin, doz ve zamana bağımlı olarak antiproliferatif etki göstermesine karşı, bu etkinin moleküler etki mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

D vitamininin verilen hücrelerin proliferasyon eğrisi grafiğinden IC_{50} değeri Şekil 3.7'te görüldüğü üzere 140 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 toksik değer hesaplanmıştır.



Şekil 3.7. D vitamini için IC_{50} Değerinin Belirlenmesi. Xcelligence sisteminde bulunan software kullanılmıştır.

Hücrelerin mikroskobik görüntülerinde de D vitamin uygulamasının önemli derecede hücre çoğalmasını engellediği görülmektedir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. D vitamini uygulanan ve kontrol gruplarının 24, 48, 72 ve 96. saatlerde invert mikroskobundaki görünümü(*10).

3. 8. D Vitamini Uygulanan ve Kontrol Grubundaki Hücrelerin PAI-1 Düzeyinin Ölçümü Sonuçları

D vitamininin, MCF-7 hücrelerinin PAI-1 düzeyi üzerine etkisi farklı zamanlar göz önüne alınarak istatistiksel açıdan anlamlı olup olmadığı değerlendirilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlarda, 24, 48, 72 ve 96. saatlerde kontrol grubu ile D vitamini uygulanan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0,05$). D vitamini uygulaması PAI-1 protein seviyesini önemli derecede azaltmıştır.

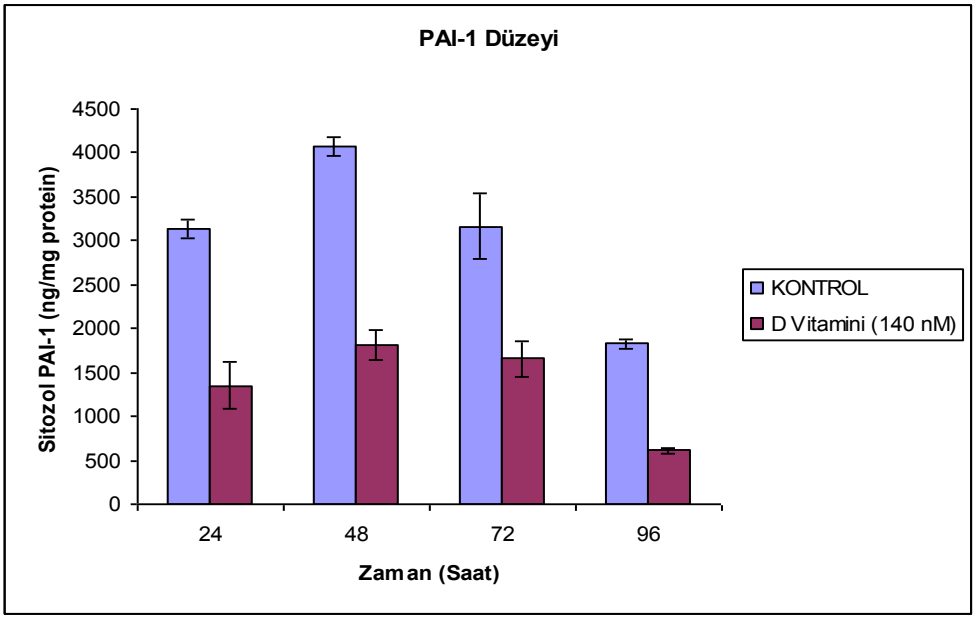
D vitamininin farklı zamanlarda PAI-1 düzeyine etkisinin karşılaştırılması çizelge 3.5’de verilmiştir.

Çizelge 3.5. D vitamininin farklı zamanlarda PAI-1 düzeyine etkisinin karşılaştırılması.

PAI-1 Düzeyi (ng/mg protein)	KONTROL (ort±std)	D VİTAMİNİ (140 nM) (ort±std)
24. saat	3136,11±110,97	1353,33±272,27*
48. saat	4069,23±110,94	1818,75±175,0*
72. saat	3164,28±373,61	1652,94±204,11*
96. saat	1826,66±46,66	614,28±28,57*

* $p<0,05$

PAI-1 düzeyi için D vitamini uygulanan ve kontrol gruplarına ait grafik şekil 3.9'da verilmiştir.



Şekil 3.9. Kontrol grubu ve D vitamini uygulanan grupların PAI-1 düzeyi.

3. 9. D Vitamini Uygulanan ve Kontrol Grubundaki Hücrelerin uPA Aktivitesi Ölçümü Sonuçları

D vitamininin, MCF-7 hücrelerinin uPA aktivitesi üzerine etkisi farklı zamanlar göz önüne alınarak istatistiksel açıdan anlamlı olup olmadığı değerlendirilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlarda 24, 48, 72 ve 96. saatlerde kontrol grubu ile D vitamini uygulanan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0,05$). D vitamini uygulanan gruplarda uPA aktivitesinde 24. saatte bir artış, 48., 72. ve 96. saatlerde ise önemli derecede bir azalma olmuştur.

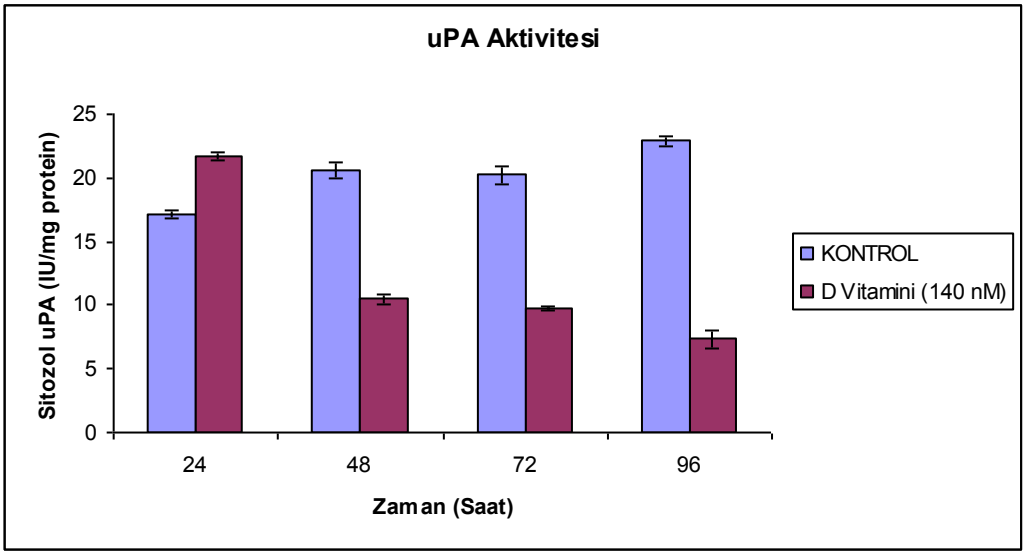
D vitamininin farklı zamanlarda uPA aktivitesi etkisinin karşılaştırılması çizelge 3.6'da verilmiştir.

Çizelge 3.6. D vitamininin farklı zamanlarda uPA aktivitesine etkisinin karşılaştırılması.

uPA Aktivitesi (IU/mg protein)	KONTROL (Ort ± std)	D VİTAMİNİ(140 nM) (Ort ± std)
24.saat	17,1 ± 0,33	21,69 ± 0,25*
48. saat	20,57 ± 0,68	10,5 ± 0,41*
72. saat	20,22 ± 0,69	9,75 ± 0,17*
96. saat	22,89± 0,39	7,34± 0,66*

* $p<0,05$

uPA aktivitesi için D vitamini uygulanan ve kontrol gruplarına ait grafik şekil 3.10'da verilmiştir.



Şekil 3.10. Kontrol grubu ve D vitamini uygulanan grupların uPA aktivitesi.

3. 10. TGFβ2 ve D Vitamini Kombine Uygulanan ve Kontrol Grubundaki Hücrelerin PAI-1 Düzeyi Ölçümü Sonuçları

TGFβ2 ve D vitamininin son konsantrasyonları 16 ng/ml ve 140 nM olacak şekilde muamele edilen hücre homojenatlarındaki PAI-1 düzeyi üzerine etkisi farklı zamanlar göz önüne alınarak istatistiksel açıdan anlamlı olup olmadığı değerlendirilmiştir. Hücreler ekildikten sonra 24. saatte maddeler verilmiş ve madde verildikten 24., 48. ve 72. saatlerde ölçümler yapılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlarda, kontrol grubu ile TGFβ2+D vitamini uygulanan gruplar arasında 24., 48. ve 72. saatlerde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0,05$).

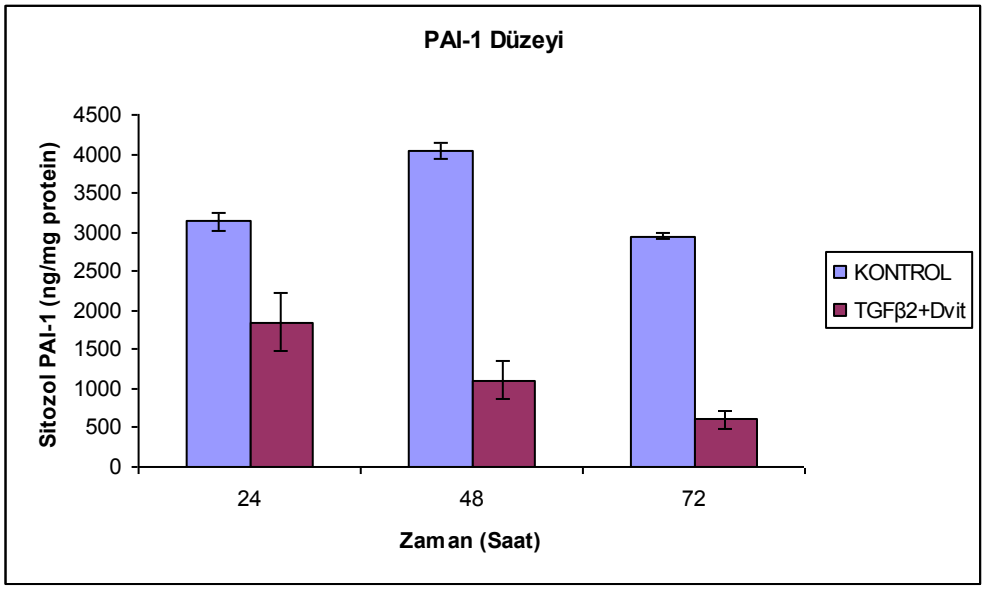
TGFβ2 ve D vitamininin farklı zamanlarda PAI-1 düzeyine etkisinin karşılaştırılması çizelge 3.7'de verilmiştir.

Çizelge 3.7. TGFβ2 ve D vitamininin farklı zamanlarda PAI-1 düzeyine etkisinin karşılaştırılması.

PAI-1 Düzeyi (ng/mg protein)	KONTROL (ort±std)	TGFβ2+D Vitamini (ort±std)
24. saat	3134,02±109,45	1852,66±378,82*
48. saat	4042,11±109,58	1107,07±250,31*
72. saat	2950,12±42,85	602,77±113,43*

* $p<0,05$

PAI-1 düzeyi için TGFβ2 ve D vitamini uygulanan ve kontrol gruplarına ait grafik şekil 3.11'de verilmiştir.



Şekil 3.11. Kontrol grubu, TGFβ2 ve D vitamini uygulanan grupların PAI-1 düzeyi.

3. 11. TGFβ2 ve D Vitamini Kombine Uygulanan ve Kontrol Grubundaki Hücrelerin uPA Aktivitesinin Ölçümü Sonuçları

TGFβ2 ve D vitamininin, MCF-7 hücrelerinin uPA aktivitesi üzerine etkisi farklı zamanlar göz önüne alınarak istatistiksel açıdan anlamlı olup olmadığı değerlendirilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlarda, 24. ve 72. saatlerde kontrol grubu ile

D vitamini uygulanan gruplar arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0,05$). 48. saatte ise kontrol grubu ile TGFβ2+D vitamini uygulanan grupta ise istatistiksel bir fark bulunmamıştır.

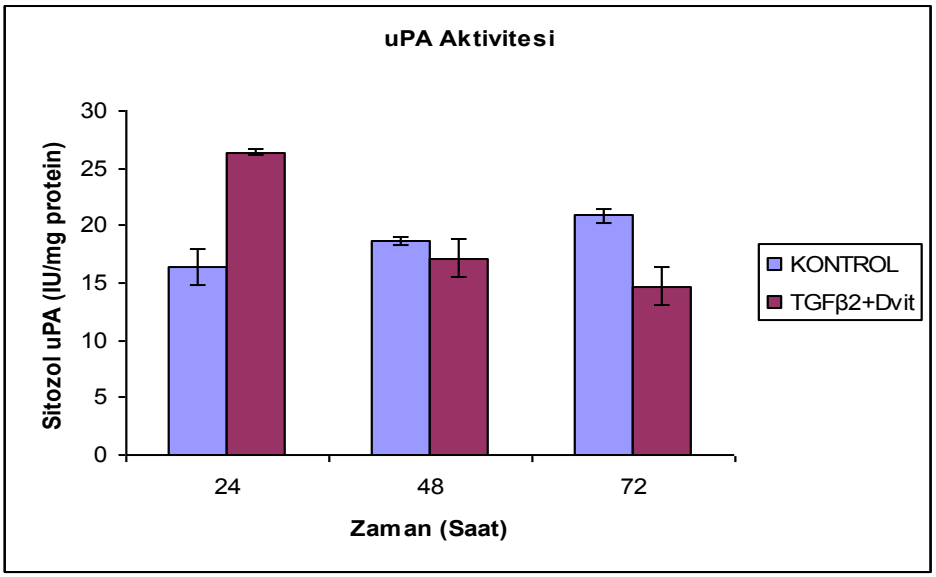
TGFβ2 ve D vitamininin farklı zamanlarda uPA aktivitesine etkisinin karşılaştırılması çizelge 3.8.'de verilmiştir.

Çizelge 3.8. TGFβ2 ve D vitamininin farklı zamanlarda uPA aktivitesine etkisinin karşılaştırılması.

uPA Aktivitesi (IU/mg protein)	KONTROL (ort±std)	TGFβ2+D Vitamini (ort±std)
24. saat	16,39±1,50	26,41±0,21*
48. saat	18,67±0,42	17,13±1,69
72. saat	20,89±0,65	14,71±1,63*

*p<0,05

uPA aktivitesi için TGFβ2 ve D vitamini uygulanan gruplar ile kontrol gruplarına ait grafik şekil 3.12'de verilmiştir.



Şekil 3.12. Kontrol grubu, TGFβ2 ve D vitamini uygulanan grupların uPA aktivitesi

4. TARTIŞMA

TGFβ ailesi hücre proliferasyonu, farklılaşması, motilitesi, adezyonu ve ölümü gibi hücresel süreçleri düzenler ve çok sayıda birbirine benzer polipeptid büyüme faktörleri içermektedir. TGFβ gelişimi çok yönlü kontrol eden büyüme faktörlerinin büyük bir bölümünü oluşturur ve organizmanın tüm dokularının gelişiminde, homeostazisinde ve onarımında önemli rol oynamaktadır. Çeşitli hastalıklarda TGFβ sinyal iletiminde farklılıklar tespit edilmiştir. Büyüme inhibitörü yanıtlarının TGFβ'ya iletimindeki aksaklıklar kanser gelişiminde sık görülen bir durumdur (Soyöz ve Özçelik, 2007).

TGFβ2' nin meme kanseri tedavisinde ne kadar etkili olduğunu araştırmayı amaçladığımız çalışmamızda MCF-7 hücresine TGFβ2 verdikten sonra proliferasyon, uPA aktivitesini ve PAI-1 düzeyini azalttığı gözlemlenmiştir.

Zuqmaier ve arkadaşlarının (1989) yaptığı çalışmada östrojen reseptörü negatif hücre serileri MDA-MB-231, SK-BR-3, Hs578T, MDA-MB-468 ve MDA-MB-468-S4 ve östrojen reseptörü pozitif hücre serileri MCF-7, ZR-75-1, T-47-D üzerinde TGFβ1 ve TGFβ2'nin inhibitör etkileri incelenmiştir. TGFβ1 ve TGFβ2 MDA-MB-231, SK-BR-3, Hs578T ve MDA-MB-468 hücrelerinde %75-90 ve ZR-75-1 ve MCF-7 hücrelerinde %50'lik bir büyüme inhibisyonu görülmüştür. Büyümenin önlenmesi 6 gün sonra görülmüş ve hücre döngüsü değişiklikleri TGFβ eklenmesinden 12 saat sonra görülmüştür. Hücreler G1 fazında birikmiş ve dolayısıyla S fazına girmesi inhibe edilmiştir.

TGFβ birçok hücre tipinde hücre büyümesi ve farklılaşması üzerinde çok fonksiyonlu bir düzenleyicidir ve meme epitelyum hücreleri üzerinde büyümeyi inhibe edici bir etkiye sahiptir. TGFβ2 meme kist sıvısında yüksek konsantrasyonlarda mevcut olduğu ve memede bulunan aktif östrojenlerin miktarını azaltarak meme kanserinde koruyucu bir role sahip olabileceği gösterilmiştir (Erbas ve Lai 2000).

TGFβ1 ve TGFβ2'nin MCF-7 ve T-47D hücre serileri üzerindeki etkisi incelenmiştir. TGFβ1 ve TGFβ2 MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunu inhibe etmiştir fakat T-47D hücrelerinin büyümesini etkilememiştir. TGFβ1 MCF-7

hücrelerinin inhibe edilmesinde TGFβ2'den 10 kat daha güçlü olduğu bulunmuştur (Arrick BA ve ark 1990).

10 ng/ml TGFβ1 ile muamele edilmiş MDA-MB-231 meme kanseri hücre serisinde TGFβ1 hücre invazyonunda önemli bir inhibisyona neden olmuştur. TGFβ1 ile MMP-9, Smad 2, ERK ½ ve p38 aktivasyonunun düzenlendiği gösterilmiştir (Mo ve ark 2012). MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre serisi kullanılmış retionik asit ve TGFβ2'nin hücre büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir (Gucev ve ark 1996).

Enriori ve arkadaşları (2006) MCF-7 meme kanseri hücre serisi üzerinde TGFβ2'nin anlamlı negatif korelasyon gösterdiği bulunmuştur.

TGFβ2'nin insan meme kanseri hücre serisi MDA-MB-231'de etkisi çalışılmış ve sonuç olarak büyümeyi önleyici bir etki bulunmuştur (Gucev ve ark 1996).

MCF-7 ve Smad 4 eksikliği olan MDA-MB-468 hücre serileri kullanılarak yapılan deneyde hücre serilerinin her ikisine de 10 ng/ml TGFβ1 ilavesinden 30 dakika sonra Smad 2 fosforilasyonunda bir artış gözlenmiştir (Giehl ve ark 2007).

TGFβ'nın T47D hücre serisinde 10 ng/ml eklenmesiyle Smad proteinlerini ve p38 MAPK yolunu aktive ederek meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Burdette ve ark 2005).

TGFβ1(40pM)'de MCF-7 hücrelerinde etkisi bakılmış ve hücre inhibisyonuna neden olduğu gözlenmiştir(Mazars ve ark 1995). Bizim çalışmamızda ise 16 ng/ml TGFβ2 eklenmesiyle MCF-7 meme kanseri hücrelerinde önemli bir inhibisyon gözlenmiştir.

Plazminojen aktivatörleri, plazminojeni plazmine çeviren, fibrinoliz, hücre göçü, doku harabiyeti ve tümör hücresi yayılımı gibi çeşitli fizyolojik ve patolojik olaylarda rol oynayan heterojen bir madde grubudur ve bu proteolitik enzimler hem normal hem de tümör kaynaklı çeşitli hücrelerden salınmaktadır. Hücrenin lizozomlarında ve damar endotelinde yoğunlaşmış olan plazminojen aktivatörleri normalde plazmada eser miktarda bulunmaktadır.

uPA aktif bir şekilde plazminojenin plazmine dönüşümünü katalizlemektedir. Plazmin ise ekstrasellüler matriks(ECM) ve bazal membranı degrade edebilir ve doğrudan veya dolaylı olarak pro-matriks metalloproteinazları(pro-MMP) aktive ederek kanser hücrelerini metastaz ve invazyona teşvik etmektedir. uPA sistemi, Ras ERK yolu ve p38 MAPK yolu gibi çeşitli mekanizmalarla meme kanseri metastazını kolaylaştırdığı sunulmuştur. Bu sonuçlarla insan meme kanserinin önlenmesi ve tedavisinde uPA sisteminin rolü tartışılmaktadır (Tang ve Han 2013).

Ürokinaz plazminojen aktivatörü ve ürokinaz plazminojen aktivatör inhibitörü (uPA ve PAI-1) kanser dokularında bulunan metastaz ve invazyondan sorumlu protein yapısındaki maddelerdir. İki madeninde düzeyi düşük olan meme kanserli vakalarda klinik gidişin daha iyi olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu iki markırında prognostik değerinin tümörün evresi, büyüklüğü, reseptör durumu ve cerrahi tedaviden bağımsız olduğu görülmüştür. Aksiller nodülü bulunmayan hastalarda uPA ve PAI-1 düzeyi düşük vakalarda relaps riskinin daha az olduğu bulunmuştur (Erdenen 2007).

Doku tipi plazminojen aktivatörü (tPA) ve ürokinaz tipi plazminojen aktivatörü (uPA) kanserde oldukça farklı rollere sahiptir. tPA östrojen reseptör sistemi ile östrojen tarafından düzenlenmektedir ve kanserde iyi bir prognoz ile ilişkilidir. uPA ise yüksek düzeylerde metastaz oluşumu ve invazyon ile ilişkili bulunmuştur (Yamashita ve ark 1992).

Descotes ve arkadaşlarının (2008) çalışmasında PAI-1 düzeylerinin yüksek olması halinde uPA ile ilgili kötü prognoz sonucuna varılmıştır.

7,5 yıl süren bir izlenim çalışmasında invaziv meme kanserli hastalarda yükselmiş uPA/PAI-1 değerleri ve tümör agresifliği arasında güçlü bir ilişki gösterilmiştir (Jelisavac-Cosic ve ark 2011).

Protease nexin-1 (PN-1) ekspresyonu meme kanseri tümör oluşumu sırasında PAI-1 ile birlikte artar ve uPA'nın neden olduğu tümör hücre motilitesi ve daha gelişmiş bir metastatik fenotipe katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Candia ve ark 2006).

uPA, plazmin ve matrix metalloproteinazlar (MMP) dahil olmak üzere hücre dışı proteazları aktif hale getirmektedir. Plazmin, latent MMP'leri ve büyüme faktörlerini aktive ederek ECM bozulmasını kolaylaştırmaktadır. Kanser ilerlemesinde ECM parçalayıcı proteinazların sayısının artması arasında en ağırlıklı MMP ve plazminojen aktivatör sistemi ailesi olmuştur. MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonunun artması kanser hücrelerinde invaziv bir fenotip ile ilişkili bulunmuştur (Ramont ve ark 2003). Bu ECM parçalayıcı proteazların düzenleyen faktörlerden biriside TGFβ olarak belirlenmiştir. TGFβ Smad 4 yoluyla uPA proteinin salgılanmasını düzenlemektedir.

PAI-1 -675 4G5G polimorfik geninin meme kanserinin prognozunda belirteç olarak yardımcı olabileceği önerilmektedir (Ekmekçi ve ark 2008).

uPA ve PAI-1'in konsantrasyonlarının güçlü birer prognostik faktör oldukları gösterilmiş ve yüksek oranda uPA ve PAI-1 eksprese meme kanserli dokularda, adjuvan kemoterapi sonrası nüks oranı, düşük oranda uPA ve PAI-1 eksprese eden dokulara göre daha düşük saptanmıştır (Harbeck ve ark 2002). Hansen ve arkadaşları (1990) bazı tümör hücre tiplerinde uPA reseptörünü tanımlamışlardır. Tümör içindeki transforme olmuş epitelyum hücrelerinin özellikle ürokinaz salgıladıkları düşünülmektedir. Meme kanseri olan kadınlarda kontrol grubuna göre uPAR konsantrasyonu daha yüksek bulunmuştur ve bu fark istatiksel olarak anlamlı olarak değerlendirilmiştir (Thielemann ve ark 2013).

Malign tümörler kontrollü proteolizle ekstrasellüler matriks bozulmasına yönelik bir kapasiteye sahiptir. Bu işlemde yer alan sistemlerden bir tanesi de uPA sistemidir. uPAR seviyeleri birçok kanser türlerinde tümörlerde yükselmektedir. Soydinç ve arkadaşlarının (2012) yapmış olduğu çalışmada meme kanserli hastalarda (n=180) ve sağlıklı kontrol grubunda (n=60) ELİSA ile uPAR'ın serum ve idrar düzeylerine bakılmıştır. Hastalarda serum ($p<0,001$) ve idrarda ($p<0,001$) uPAR değerlerinde anlamlı olarak artış gözlendi. uPAR'ın serum ve idrarda yüksek düzeyleri, lenf nodu negatif hastalarda teşhis aracı olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

uPAR uPA aktivite düzenlenmesinde önemli bir reseptördür. uPA'nın reseptörüne bağlanması, tümör hücresi proliferasyonuna, migrasyonuna, invazyona

ve hücre dışı matriks proteolizine yol açmaktadır. Tümör hücreleri tarafından anormal uPA ekspresyonu metastatik tümör hücrelerinin çoğalması, tümör hücre ekstravazasyonu ve intravazasyonuna neden olmaktadır. Son çalışmalar uPA aktivitesinin bastırılması için gerekli olan fazla PAI-1 düzeyleri kötü prognozla alakalı bulunmuştur. PAI-1 yüksek seviyeleri anjiyogenezi ve tümör hücre proliferasyonunu teşvik etmektedir. PAI-1 aynı zamanda geliştirilmiş tümör hücresinin hayatta kalması için apoptosizi inhibe etmektedir. Amerika Klinik Onkoloji Derneği nod-negatif meme kanserli hastalarda adjuvan kemoterapiyi bırakmaya karar vermek için meme tümörlerinde uPA ve PAI-1 düzeylerinin kullanılmasını önermektedir (Fowler ve ark 2014).

TGFβ'nın transforme edilmiş hücre tiplerinde, uPA ekspresyonu modülasyonu ilk olarak Keski-Oja ve arkadaşları tarafından 1988 yılında gerçekleştirilmiştir. TGFβ içeren A549 insan akciğer kanseri hücre serisinde uPA'nın ekspresyonu düzenlenmiştir. Normal hücrelerde TGFβ hücre farklılaşması, anjiyogenez, hücre gelişimi ve uPA'nın düzenlenmesini sağlamaktadır. Tümör hücrelerinde ise uPA ekspresyonunu regüle ettiği gösterilmiştir. TGFβ yolunun Smad ve non-Smad yollarda dâhil olmak üzere sinyal transdüksiyon yollarının aşırı derecede aktivitesiyle uPA ekspresyonu düzenlenmektedir. İlk olarak transforme edilmiş fare keratinositlerinde TGFβ uPA ekspresyonunda Ha-Ras-ERK1,2 ve MAPK sinyalleri içermektedir. Ayrıca TGFβ aynı zamanda EMT indüksiyonu ile JNK yolunu aktive ederek uPA ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir. SMAD3'ün TGFβ'nın uPA düzenlemesi için gerekli olduğu gösterilmiş ve meme kanseri hücrelerinde TGFβ ile indüklenen uPA için SMAD4 yolu gereklidir (Santibanez 2013).

TGFβ insan tümör dokularında uPA ve PAI-1 düzeyleri ile ilişkili bulunmuştur. Tümör örneklerinin %96'sında ve tüm vakaların %88'inde uPA ve PAI-1 TGFβ ile ilişkili bulunmuştur. TGFβ'nın plazminojen aktivatörleri bileşenleri ve tümör özellikleri meme kanserinde metastazı engellediği için umut verici bulunmuştur (Lang ve ark 2014).

Dihidroartemisin (DHA)'nın MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre serilerinde metastaz ve tümör büyümesi üzerine etkilerine bakılmış ve her iki hücrede de uPA ekspresyonları tespit edilmiştir. MCF-7 hücre serisi ile karşılaştırıldığında MDA-

MB-231 yüksek metastatik potansiyeli nedeniyle uPA daha yüksek bir ekspresyona sahiptir (Zhang ve ark 2014).

TGFβ MDA-MB-231 hücre serisi üzerinde incelenmiş ve normal hücrelerde TGFβ hücre çoğalması ve uPA'nın aktivitesinin güçlü bir önleyicisi iken, MDA-MB-231 hücre serisinde uPA aktivitesi ve PAI-1 seviyelerini artırarak invazyona ve tümör hücrelerinin metastazına yol açtığı gösterilmiştir (Dog-Le Bourhis ve ark 1998).

Artan TGFβ normal ve transforme edilen epitelyum hücrelerinde epitelden mezenşimal geçişi (EMT) indüklemekte ve buda invazyonu artırmaktadır. Smad bağımlı veya Smad bağımsız sinyal iletim yolları, TGFβ'nın indüklediği EMT'de işe karışarak kötü huylu hücrelerde invazif ve metastatik özelliklerin artışına neden olmaktadır (Pinkas ve Teicher 2006). Smad yoluna ek olarak aynı zamanda MAPK yolu PAI-1 ekspresyonu indüksiyonuna neden olmaktadır.

uPA ve PAI-1 seviyelerinin hasta-türevli primer meme kanseri hücrelerinde ve immortalize meme kanseri hücre serilerinde farklı olduğu görülmektedir. Bu protein seviyeleri MDA-MB-231 bulgulanabilir miktarlarda, MCF-7 hücrelerinde ise tespit sınırına yakın bulunmuştur. TGFβ1 ile MDA-MB-231 hücrelerinde migrasyon ve invazyonu artırmış, MCF-7 hücrelerinde ise uPA ve PAI-1 düşmesine neden olmuştur (Mandel ve ark 2013). Bizim çalışmamızda ise TGFβ2 ile MCF-7 hücrelerinde uPA aktivitesi ve PAI-1 seviyesinde azalma gözlenmiştir. PAI-1 protein seviyesi azalmasına rağmen uPA aktivite düşüklüğü TGFβ2 uygulamasının uPA protein seviyesini de azaltmış olabilir. uPA protein seviyesi azaldığı için uPA aktivitesi de azalmış olabilir. uPA aktivitesinin inhibitörlerinden olan PAI-2 artışı da bu azalmaya neden olmuş olabilir. Her ne kadar çalışmamızda uPA protein düzeyi, PAI-2 düzeyi ve uPAR düzeyi bakmamış olsak da bu moleküllerin seviyesi de uPA aktivitesinin belirleyicilerindendir. Yine hücrenin total invazyonunun gözlenmesi ve bunun üzerine etkinliğinin bakılması total anlamda çalışmamıza destek olabilir. Bizim çalışmamızda uPA aktivitesinin azalması ile TGFβ2 MCF-7 hücre invazyonunu azaltabileceğini düşünebiliriz. Ama çalışmamızın eksik yönü olan matriks metalloproteinaz sistemi ve total hücre invazyonu çalışmalarıda gerçekleştirilerek daha net bilgi ortaya konulabilir.

D vitamini, özellikle meme kanseri tedavisinde kemoterapi ve antiöstrojenlerle hormon tedavisinin kullanımına yeni bir alternatif olarak gösterilmektedir. Hem in vitro hem de in vivo araştırmalar, vitamin D bileşenlerinin meme kanseri hücrelerini inhibe edebileceğini göstermiştir.

Vitamin D'nin meme kanseri tedavisinde ne kadar etkili olduğunu araştırmayı amaçladığımız çalışmamızda MCF-7 hücresine vitamin D verdikten sonra proliferasyon, uPA aktivitesini ve PAI-1 düzeyini azalttığı gözlemlenmiştir.

Veldhuis ve arkadaşlarının (2011) yapmış olduğu çalışmada, toplam 885 kadın dâhil edilmiş, tüm kadınların 112'sinde (% 12.7) çeşitli kanser türleri bulunmuştur. Meme kanseri (n = 56,% 50) olguların yarısında görülen en yaygın malignite olduğu söylenmiştir. Düşük 25-hidroksi D3 düzeyleri (25OHD; <50 nmol / L) olan kadınlardaki meme ve çeşitli kanser tipleri görülme prevalansı, yüksek 25OHD düzeylerine sahip (≥ 50 nmol / L) olan kadınlardan daha yüksek bulunmuştur. Düşük 25OHD (<50 nmol / L) serum seviyesine sahip osteoporotik kadınlarda meme ve çeşitli kanser türleri prevelansı arttığı söylenmiştir.

Farklı hücre hatlarında yapılan bir çalışmada ise; malign olmayan MCF-12A ve malign MCF-7, MDA- MB-231 epitel meme hücreleri, artan 1,25-D_3 konsantrasyonlarında 6 gün boyunca muamele edilmiş. Malign olmayan ve MCF-12A hücreler (6 günde 100 nM muamele ile büyüme inhibisyonu % 60) 1,25-D3 ile muamelede malign MCF-7 hücrelerinden (6 günde 100 nM muamele ile büyüme inhibisyonu % 40) daha duyarlı olduğu gösterilmiştir ($p < 0.001$). Malign MDA-MB-231 hücreleri 1,25-D_3 ile muamelede büyüme inhibisyonuna duyarlı değildir ($p < 0.05$) (Brosseau ve ark 2010).

Marchionatti ve arkadaşlarının (2009) yaptığı bir çalışmada; hücreler 96 saat boyunca farklı dozlarda 1,25(OH)2D3 ±Menadion konsantrasyonlarıyla muamele edilmiş. MCF-7 hücre büyümesini, 1 veya 10 nM D3 yalnız başına veya 5 µM menadion ilavesi inhibe etmezken, 100 nM D3 yalnız başına veya farklı menadion dozlarıyla inhibisyon sağladığı bulunmuştur. Bizim çalışmamızda da farklı yöntemle uyguladığımız D vitamini dozu (140 nM) literatürlerdeki etkin olan doza yakın bulunmuştur.

$25(OH)D_3$ ve $1,25\text{-}D_3$'ü karşılaştırılarak yapılan çalışmada, MCF-7 hücrelerindeki proliferasyon deneyinde 10^{-7} -10^{-9} M $25(OH)D_3$'ün önemli olmayan büyüme inhibisyonuna sebep olduğu ancak 10^{-7} -10^{-8} M 1, 25-D3 ile muamele edildiği zaman, hücre büyümesini önemli ölçüde inhibe ettiği bulunmuştur (Friedrich ve ark 2006).

Melatonin ve D3 vitamini meme kanseri hücre büyümesini önleyerek apoptoza neden olmaktadır. MCF-7 hücrelerinde vitamin D3 ve melatonin etkisine bakıldığında birlikte 114 saat sonra hemen hemen tam bir hücre büyümesini durmasına neden olarak sinerjik bir büyüme inhibisyonuna neden olmuştur. Hücre büyümesi blokajı TGFβ1, SMAD4 ve fosforlanmış SMAD3 seviyelerinin artışı ile TGFβ1 yolunun aktivasyonu ile ilişkilidir. Buna paralel olarak melatonin ve vitamin D3 tek yada kombine halinde, Akt fosforilasyonuna ve MDM2 değerlerinde belirgin bir azalmaya, p53/MDM2 oranında bir artışa neden olmuştur. Bu etkiler tamamen kültür ortamına, bir monoklon anti TGFβ1 antikoru ilave edilerek bastırılmıştır. Aktif fosforilasyonu ve MDM2 oranındaki azalma TGFβ1 bağımlı bir mekanizma ile bağlantılı olduğu gösterilmektedir (Proietti ve ark 2011).

Sundaram ve arkadaşlarının (2006) insan MCF-7 meme tümörü hücrelerinin iki metastatik alt tipi kullanarak yaptıkları bir başka çalışmada ise $1,25\text{-}(OH)_2D_3$' ün sentetik analogu QW-1624F2-2' nin, meme tümörü hücre çoğalmasını ve invazyonunu inhibe ettiği, hücre farklılaşmasını ilerlettiği ve apoptotik hücre ölümünü indüklediği belirtilmiştir. QW-1624F2-2' nin, 24-hidroksilazın bloke edilmesini etkilediği, böylece 1,25-(OH)2D3 ve analoglarını 24-hidroksilasyondan koruyarak, onların biyolojik ömürlerini uzattığı sonuçta meme kanserinin etkili tedavisini kolaylaştırdığı ve kemoterapik ajanların düşük seviyelerde kullanımına imkân sağladığı düşünülmüştür.

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 etmiştir. 1,25 $(OH)_2D_3$ uygulaması hücre büyüme ve proliferasyonunu inhibe etmiş ve apoptozu artırmıştır. İn vivo olarak, daha hızlı osteosklerotik lezyonlar gelişmiş ve tümör alanı D vitamini eksikliği olan farelerde% 55.8 artmış olduğu gösterilmiştir.

Kalsitonin ve kalsitonin reseptörü hücre büyümesi, farklılaşması ve hayatta kalması, doku gelişiminin düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Ancak meme kanserinde kalsitonin/kalsitonin reseptörünün kesin fonksiyonel rolü bilinmemektedir. uPA sisteminin meme kanseri invazyon ve metastaz bakımından önemli rol oynadığı bilinmektedir. Yüksek oranda invaziv MDA-MB-231 hücre serisi içinde 10(-8)M kalsitonin ekstrasellüler sinyal-regüle kinaz(ERK) ½ yolunu engellemesi ile ilişkili olan uPA ve uPAR mRNA ve protein ekspresyonunu azaltmıştır. İki hafta boyunca kalsitonin ile muamele edilen farelerin kontrol grubuna göre muamele edilmemiş hayvanlara kıyasla %25 ($p<0,001$) birincil tümörlerde uPA mRNA ekspresyonu önlenmiştir (Han ve ark 2006). Kalsitonin tedavisi MDA-MB-231 hücrelerinin PAI-1 ekspresyonu üzerinde herhangi bir etki göstermemiş fakat uPA ve uPAR mRNA hem de protein seviyelerini düşürmüştür (Andreasen ve ark 1997).

Vitamin D ve türevlerine(deltanoid) MDA-MB-231 hücre serisinde plazminojen aktivatör sistemi üzerindeki etkisine bakılmış ve doza bağımlı bir şekilde deltanoidler uPA ve tPA'yı azaltmış PAI-1 düzeyini arttırmıştır. Sonuç olarak azalmış bir total PA aktivitesine neden olduğu gösterilmiştir (Koli ve Keski Oja 2000).

Ürokinaz sistemi faktörlerinin kıyaslandığı bir çalışmada, primer hücre tümörlerinin sitozolünden belirlenen uPA düzeyleri, ER+ hastalarda tamoksifen tedavisiyle 296 düşük uPA düzeyli hastanın %68'ine, 395 yüksek uPA düzeyli hastanın %51'ine fayda sağladığı gösterilmiştir (Marion ve ark 2004). Bizim yaptığımız çalışmada ise uPA aktivitesi kontrole göre D vitamini verilen gruplar kıyaslandığı zaman 24. saatte artıp 48, 72 ve 96. saatlerde azalmıştır. PAI- seviyeleri ise 24. saatte azalıp, 48. saatte artıp tekrar azalmıştır. uPA aktivitesinin 24. saatte artması muhtemelen PAI-1 miktarının azalmasına bağlı olabilir. Bu sürede uPA sentezi baskılanmamış ve hali hazırdaki uPA'lar ilgili aktivitede sorumlu olabilirler. Diğer zamanlardaki düşüşler D vitamininin uPA sentezini baskılamış olabilir.

Son yıllarda, kalsiyum ve kemik homeostazı üzerine etkilerine ek olarak, kalsitriol meme kanseri de başta olmak üzere kanserlerin önlenmesi ve tedavisinde kullanımı görülmektedir. Kalsitriol, hem ER+ ve ER- meme kanseri hücre serilerinde büyümeyi inhibe ettiği gösterilmiştir. Kalsitriol matriks metalloproteinazları (MMP),

ürokinaz tipi plazminojen aktivatörü (uPA), doku tipi plazminojen aktivatörü (tPA) faaliyetlerini azaltarak ve plazminojen aktivatör inhibitör-1 (PAI-1) ve MMP inhibitör-1 ekspresyonunu artırarak meme kanseri hücrelerinin invaziv ve metastatik potansiyelini azalttığı gösterilmiştir. Kalsitriol TGFβ'da dahil olmak üzere çeşitli büyüme faktörlerini kodlayan genlerin modüle edilmesi işlemleriyle meme kanseri hücrelerinin büyümesini inhibe ederler (Flanagon ve ark 2003, Koli ve ark 2000).

uPA, uPAR ve PAI-1 düzeyleri meme kanseri organ kültürü altında 100 nM 1,25dihidroksivitamin tarafından düzenlenmesi incelenmiştir. uPA, uPAR ve PAI-1 düzeyleri epitel hücrelerinde vitamin D3'den etkilenmemiştir fakat fibroblastlarda güçlü PAI-1 reaktivitesi gösteren olgularda kontrol dilimlerine kıyasla azalmıştır (Barbosa ve ark 2004).

Çalışmamızda D vitamininin PAI-2, uPAR ve uPA protein seviyesine olan etkisini kontrol edemedik. Ama önemli bir invazyon parametresi olan uPA aktivitesinin düşmesi D vitamininin MCF-7 hücresinin invaziv kapasitesini düşürdüğünü söyleyebiliriz.

TGFβ nötralize edici antikorlar ile yapılan deneylerde hücre çoğalması üzerinde 1,25(OH)2D3 vitamininin en büyük etkisinin TGFβ bağımsız mekanizma ile ilişkili olduğunun ihtimalini göstermektedir. TGFβ sinyal yolunun p21 upregülasyonundan sorumlu olduğu düşünülmektedir. 1,25(OH)2D3 hücre proliferasyonunu G1 fazında durdurarak sağlamaktadır (Verlinden ve ark 1998). Bizim yaptığımız kombine çalışmada ise TGFβ2'nin daha etkin olduğunu gözlemledik. Kombine uygulamada D vitaminine bağlı olan 24. saatte uPA aktivitesi artışının TGFβ2 tarafından baskılanamadığı, 48. saatte anlamsız bir azalma ve 72. saatte ise azalmanın meydana geldiğini bulduk. Bu azalma muhtemelen uPA protein seviyesindeki azalmadan veya PAI-2 seviyesindeki artıştan kaynaklandığını düşünmekteyiz

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Elde ettiğimiz sonuçlara göre TGFβ2 ve D vitamini'nin anti-proliferatif, uPA ve PAI-1 sisteminde etkili olduğunu gözlemledik. Çalışmamızın eksik yönü tüm plazminojen sisteminin ve matriks metalloproteinaz sisteminin kontrol edilememiş olmasıdır. Yine invazyon sisteminde hücrelerin total invazyonuna bu parametrelerin etkisi araştırılabilir. Yine de çalışmamız uPA aktivitesinin azalması ile hem TGFβ2 hemde D vitamininin hücre invazyonuna negatif etkisi olduğunu destekler niteliktedir. İnvazyon baskılanması yanısıra proliferasyonu inhibe edici özelliklerde belirgin olarak gözlenmiştir.

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TGFβ ve D Vitamininin MCF-7 Hücresinin Plazminojen Aktivatör Sistemi Üzerine Etkisi

Nurdan ARPACI
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA-2015

TGFβ, organizmanın tüm dokularının gelişiminde, homeostazisinde ve onarımınında önemli rolleri olan gelişimi çok yönlü kontrol eden önemli bir polipeptitdir. TGFβ meme kanseri hücrelerinin invazyon ve proliferasyonunu düzenleyen güçlü bir düzenleyicidir.

Vitamin D,kalsiyum ve fosfor homeostazisi klasik etkisinin yanında anti-proliferatif, anti-invazif, anti-neoplastik, pro-apoptotik etkileri olan pleotropik bir hormondur. Epidemiyolojik ve deneysel in vivo ve vitro çalışmalarda kanser üzerine etkinliği gösterilmiştir.

Bizim çalışmamızda MCF-7 meme kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerindeTGFβ2 ve D vitamininin etkisini ölçmeyi amaçladık. TGFβ2 ve D vitamininin proliferasyon üzerine etkisini gerçek zamanlı hücre elektronik algılama sistemiyle (xCELLigence) ortaya koymayı amaçladık. Hücre sayısındaki değişiklikler, mikro elektrot içeren özel hücre kültürü kuyucuklarında, deney süresince her 15 dk'da bir sürekli olarak izlendi. Proteaz çalışmaları için uPA aktivite ve PAI-1 protein seviyesi ölçmek amaçlanmıştır.

TGFβ2 ve vitamin D uygulanan MCF-7 hücrelerindeki proliferasyon inhibisyonu doz ve zaman bağımlı olarak gözlendi. TGFβ2 ve D vitamini için belirlenen IC_{50} dozu uPA aktivitesi ve PAI-1 düzeyi analizleri için hesaplanmıştır. TGFβ2 ve D vitamini her iki IC_{50} dozu ile muamele edilen lizatlarda uPA aktivitesi ve PAI-1 düzeyi hesaplandı. uPA aktivitesi ve PAI-1 protein ekspresyonu hem TGFβ2 hem de D Vitamini ile engellenmiştir. TGFβ2 uPA aktivitesi ve PAI-1 protein ekspresyonunu sadece inhibe ederken, D vitamini ise ikili bir etki göstemiştir.

Sonuç olarak, TGFβ2 ve vitamin D'nin meme kanseri hücresi proliferasyonunu doz ve zaman bağımlı olarak inhibe ettiği ve bunu uPA aktivitesini ve PAI-1 düzeyini azaltarak gösterdiği gözlenmiştir. Bu değerlendirmeyle birlikte, TGFβ2 ve vitamin D'nin hücre üzerine etki mekanizmasıyla ilgili daha ileri çalışmalar ve hiperkalsemik olmayan analoglarının geliştirilmesi ile eksiklikler giderilebilir.

Anahtar Sözcükler: MCF-7; PAI-1 düzeyi; proliferasyon; uPA aktivitesi; xCELLigence.

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY
SELÇUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

The Effect of TGFβ and Vitamin D on MCF-7 Cell Plasminogen Activation System

Nurdan ARPACI

MASTER THESIS/KONYA-2015

TGFβ is a polypeptide which has an important role of the development homeostasis and repair of all the tissues. TGFβ is a potent regulators regulate breast cancer cell invasion and proliferation.

$1,25(OH)_2D_3$, is a pleiotropic hormone with anti-proliferative, pro-apoptotic and pro-differentiative effects on numerous cell types, which suggest anti-cancer activity in addition to its classical regulatory action on calcium and phosphate metabolism. Epidemiological and experimental *in vitro* and *in vivo* data support a cancer preventive role of $1,25(OH)_2D_3$.

In our study, we aimed to measure the effect of TGFβ2 and vitamin D effect on the MCF-7 breast cancer cells proliferation . The cell proliferation studies were done by on line and real-time cell electronic sensing system (xCELLigence). Changes in the number of cells, the particular cell culture in wells containing micro-electrodes, a duration of the experiment was continuously monitored every 15 min. For protease studies we aimed to measure uPA activity and its inhibitör PAI-1 protein level.

Dose and time dependent inhibition of proliferation were observed in TGFβ2 and vitamin D treated MCF-7 cells. Inhibitor concentration of 50% doses were calculated from the software for both TGFβ2 and vitamin D. The cells lysates treated by IC50 doses for both TGFβ2 and vitamin D were taken for uPA activity and PAI-1 protein. uPA activity and PAI-1 protein expression were inhibited by both TGFβ2 and vitamin D. Vitamin D showed dual effect on the system while TGFβ2 showed onlyu inhibiton of both PAI-1 protein level and uPA activity.

In conclusion, proliferation of breast cancer cell was inhibited by TGFβ2 and vitamin D via dose-time dependent decreasing uPA activity and PAI-1 level were observed. Further studies of the mechanisms effect of TGFβ2 and vitamin D on cell proliferation and the development of analogues with non-hypercalcemic deficiencies rectified.

Key Words: activity of uPA; MCF-7; PAI-1 levels; proliferation; xCELLigence.

6. KAYNAKLAR

Allen PD, Bustin SA, Newland AC. The role of apoptosis (programmed cell death) in haemopoiesis and the immune system. Blood Rev, 1993;7:63-73.

Altunkaynak BZ, Özbek E. Programlanmış hücre ölümü: Apoptoz nedir?. Tıp Araştırmaları Derg, 2008;6(2):93-104.

Andreasen PA, Kjoller L, Christensen L, Duffy MJ. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis. Int J Cancer, 1997;72(1):1-22.

Annes JP, Munger JS, Rifkin DB. Making sense of latent TGF-beta activation. J Cell Sci, 2003;116:217-24.

Apopitozis. Erişim Tarihi: 8 Mart 2014. www.istanbul.edu.tr/fen/notları/1260110414

Arrick BA, Korc M, Derynck R. Differential regulation of expression of three transforming growth factor beta species in human breast cancer cell lines by estradiol. Cancer Res, 1990;50(2):299-303.

Arslan ÜY, Önder FO, Alkış N. Meme kanserli hastalarda kemik metastazı tedavisinde bifosfonatlar. Türk Onkol Derg, 2011;26(1):38-44.

Aydemir N. Genistein'in meme kanseri hücreleri üzerine etkisinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Gebze İleri Teknoloji Enstitüsü, Biyoloji A.B.D., Gebze, 2007.

Aydın S, Çaylak E, Yıldırım S, Kılıç N, Erman F, Kabakuş N. The retinoblastoma susceptibility gene, and retinoblastoma. Türkiye Klinikleri J Med Sci, 2004;24(2):173-7.

Aydıntuğ S. Meme kanserinde erken tanı. Sted, 2004;13(6):226-8.

Barboa EM, Nonogaki S, Katayama ML, Folgueira MA, Alves VF, Brentani MM. Vitamin D3 modulation of plasminogen activator inhibitor type-1 in human breast carcinomas under organ culture. Virchows Arch, 2004;444(2):175-82.

Barry B, Lowitz A, Dennis A, Casciato F. Medical Oncology&Principles of Cancer Biology, 2002.

Barton MB. Screening mammography for women aged 40-49: Are we off the fence yet?. CMAJ, 2001;164(4):498-9.

Binder BR, Mihaly J, Prager GW. uPAR-uPA-PAI-1 interactions and signaling: a vascular biologist's view. Thromb Haemost, 2007;97(3):336-42.

Bir Tümör Belirteci ve Akciğer Kanserindeki Rolü. Erişim Tarihi: 17 Mart 2014. www.santesaglik.com.tr/icerik.asp?id=81.

Biswas S, Nyman JS, Alvarez J, Chakrabarti A, Ayres A, Sterling J, Edwards J, Rana T, Johson R, Perrien DS, Lonning S, Shyr Y, Matrisian LM, Mundy GR. Anti-transforming growth factor β antibody treatment rescues bone loss and prevents breast cancer metastasis to bone. PLoS One, 2011;6(11):27090.

Border WA, Ruoslahti E. Transforming growth factor-beta in disease: the dark side of tissue repair. J Clin Invest, 1992;90:1-7.

Botos J, Barhoumi R, Burghardt R, Kochevar DT. Rb localization and phosphorylation kinetics correlate with the cellular phenotype of cultured breast adenocarcinoma cells. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2002;38:235-41.

Bottorff JL, Johnson JL, Bhagat R, Grewal S, Balneaves LG, Clarge H, Hilton BA. Beliefs related to breast health practices: The perceptions of South Asian women living in Canada. Soc Sci Med, 1998;47(12):2075-2085.

Brosseau CM, Pirianov G, Colston KW. Involment of stres activated protein kinases (JNK and p38) in 1,25 dihydroxyvitamin D3-induced breast cell death. Steroids, 2010;75(13-14):1082-8.

Burdette JE, Jeruss JS, Kurley SJ, Lee EJ, Woodruff TK. Activin A mediates growth inhibition and cell cycle arrest through Smads in human breast cancer cells. Cancer Res, 2005;65(17):7968-75.

Candia BJ, Hines WC, Heaphy CM, Griffith JK, Orlando RA. Protease nexin-1 expression is altered in human breast cancer. Cancer Cell Int, 2006;31:6-16.

Causes of Breast Cancer. Erişim Tarihi: 12 Ekim 2013. www.cancerbacup.org.uk.

Chang M, Liu H, Jordon VC. Hormone and growth factor receptors. In: Donegon WL, Priatt JS(eds). Cancer of the breast, 5thed. Philadelphia: PA Saunders, 2002:417-41.

Chen JR, Kang Y, Siegel PM, Massague J. E2F4/5 and p107 as Smad cofactors linking the TGF-beta receptor to c-myc repression. Cell, 2002;110:19-32.

Clemens MJ. Cytokines. Oxford. Bros Scientific Publishers LTD, 1991:57-75.

Cotran R, Kumar V, Collins T. Robins Pathologic Basis of Disease. In: Cellular Pathology I: Cell Injury and Cell Death. Cellular Pathology. II:Adaptations, Intracellular Accumulations and Cell Aging, Philadelphia: WB Saunders Co, 1998:23885.

Coyle YM. The effect of environment of breast cancer risk. Breast Cancer Res Treat, 2004;84(3):273-88.

Cui Y, Rohan TE. Vitamin D, calcium and breast cancer risk. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2006;15(18):1427-37.
Dalay N. Kanser Biyolojisi. In: Klinik Onkoloji. Topuz E, Aydıner A, Karadeniz AN, Ends. İstanbul Üniv. Onkoloji Enstitüsü Yayınları, 2000.
Dass K, Ahmad A, Azmi AS, Sarkar SH, Sarkar Fh. Evolving role of uPA/uPAR system in human cancers. Cancer Traet Rev, 2008;34(2):122-36.
Debb KK, Trump DL, Johnson CS. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. Nat Rev Cancer, 2007;7(9):684-700.
Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. TGF-beta signaling in tumor supression and cancer progression. Nat Genet, 2001;29:117-29.
Descotes F, Riche B, Saez S et al. Plasminogen activator inhibitor type 1 is the most significant of the usual tissue prognostic factors is node-negatif breast ductal adenocarcinoma independent of urokinase type plasminogen activator. Clin Breast Cancer, 2008;8:168-77.
Desire C. The plasminogen system. Thromb Haemost, 1999;82(2):259-70.
Dong-Le Bourhis X, Lambrecht V, Boilly B. Transforming growth factor beta 1 and sodium butyrate differentially modulate urokinase plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in human breast norman and cancer cells. Br J Cancer, 1998;77(3):396-403.
Dönmez Altuntaş H, Öztürk F, İlhan Yılmaz S, Eröz R. Asbest ve erionite bağlı mezotelyomalo hastaların parafin bloklarında p53 tümör supressör ve ras onkogen mutasyonlarının araştırılması. Erciyes Tıp Derg, 2009;31:1-8.
Duffy MJO, Garady P, Dewaney DO, Siorain L, Fennely JJ, Lijnen H. Urokinase plasminogen activator, a marker for aggresive breast carcinomas cancer. Cancer, 1988;62(3):531-3.
Uluslararası kanser araştırmaları kurumu. Dünya Kanser Raporu 2008. Erişim Tarihi: 24 Nisan 2014. http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789283204237_tur_pl-104.pdf.
Ekmekçi A, Konaç E, Önen Hİ. Gen polimorfizmi ve kansere yatkınlık. Marmara Med J, 2008;21(3):282-95.
Eltun F. Mitoz ve eşeysiz üreme. Erişim Tarihi: 10 Ocak 2015. http://www.delinetciler.org/bilgi-merkezi/160817-mitoz-ve-eseysiz-ureme-konu-anlatimi.html.
Enriori PJ, Vazquez SM, Chiauzzi V, Perez C, Fischer CR, Gori JR, Etkin AE, Charreau E, Calandra RS, Lüthy IA. Breast cyst fluids increase the proliferation of breast cell lines in correlation with their hormone and growth factor concentration. Clin Endocrinol, 2006;64(1):20-8.
Erbas H, Lai LC. Effect of transforming growth factor beta 2 on oestrogen metabolism in the MCF-7 breast cancer cell line. J Clin Pathol, 2000;53(4):322-4.
Erdenen F. Tümör belirteçleri. İstanbul Tıp Derg, 2007;4:49-5215-19.
Erhan Y. Meme kanserinde onkogenler ve tümör süpressör genlerin rolü. Türk Patol Derg, 1995;11(2):40-42.
Faustino R, Perez-Lopez FR, Chedraui P, Haya J. Vitamin D acquisition and breast cancer risk. Reprod Sci, 2009;16:7-19.
Fisher JL, Mackie PS, Howard ML, Zhou H, Choong PF. The expression of the urokinase plasminogen activator system in metastatic murine osteosarcoma: an in vivo Mouse model. Clin Cancer Res, 2001;7(6):1654-60.
Flanagan L, Packman K, Juba B, O'Neill S, Tenniswood M, Welsh J. Efficacy of vitamin D compounds to modulate estrogen receptor negative breast cancer growth and invasion. J Steroid Biochem Mol Biol, 2003;84:181-92.
Freedman DM, Dosemeci M, McGlynn K. Sunlight and mortality from breast, ovarian, colon, prostate and non-melanoma skin cancer: a composite death certificate based case-control study. Occup Environ Med, 2002;59(4):257-62.
Friedrich M, Diesing D, Cordes T, Fischer D, Becker S, Chen TC, Flanagan JN, Tangpricha V, Gherson I, Holick MF, Reichrath J. Analysis of 25-hyroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase in normal and malignant breast tissue. Anticancer Res, 2006;26(4A):2615-20.
Foekens JA, Look MP, Peters HA, Putten WL, Portegen H, Klijn JGJ. uPA and its inhibitor PAI-1: predictors of poor response to tamoksifen theraphy in recurrent breast cancer. Natl Cancer Inst, 1995;87(10):751-6.
Foekens JA, Peters HA, Look MP et al. The urokinase system of plasminogen activation and prognosis in 2780 breast cancer patients. Cancer Res, 2000;60:636.
Follo M, Ginsburg D. Structure and expression ot the human gene encoding plasminogen activator inhibitor, PAI-1. Gene, 1989;84(2):447-53.
Fowler CB, Man YG, Mason JT. An ultra-sensitive immunoassay for quantifying biomarkers in breast tumor tissue. J Cancer, 2014;5(2):115-24.

Fynan TM, Reiss M. Resistance to inhibition of cell growth by transforming growth factor-beta and its role in oncogenesis. Crit Rev Oncog, 1993;4:493-540.
Gershtein ES, Kushlinskii NE. The clinical prospects fort he study of the plasminogen activation system in breast cancer. Vestn Ross Akad Med Nauk, 1999;8:58-61.
Giehl K, Imamichi Y, Menke A. Smad4-independent TGF-beta signaling in tumor cell migration. Cells Tissues Organs, 2007;185(1-3):123-30.
Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. Cancer statistics 2001. CA Cancer J Clin, 2001;51:15-36.
Gucev ZS, Oh Y, Kelley KM, Rosenfels RG. Insulin-like growth factor binding protein 3 mediates retinoic acid-and transforming growth factor beta 2-induced growth inhibition in human breast cancer cells. Cancer Res, 1996;56(7):1545-50.
Günal SY, Günal Aİ. 22-55 yaş çalışan kadınların meme kanserine yönelik davranışları. Sağlık ve Toplum, 2000;10(1):21-4.
Han B, Nakamura M, Zhou g, Ishii A, Nakamura A, Bai Y, Mori I, Kakudo K. Calcitonin inhibits invasion of breast cancer cells: involvement of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and uPA receptor. Int J Oncol, 2006;28(4):807-14.
Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell, 2011;144:646-74.
Hansen SH, Behrendt N, Dano K, Kristensen P. Localization of urokinase-type plasminogen activator receptor on U937 cells phorbol ester PMA induces heterogenity. Exp Cell Res, 1990;187:255-62.
Harbeck N, Look MP, Meijer-Van Gelder ME, Klijn JG, Krüger A, Kiechle M, et al. Enhanced benefit from adjuvant chemotherapy in breast cancer patients classified high-risk according to urokinase-type plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitor type-1 (n=3424). Cancer Res, 2002;62:4617-4622.
Heath KM, Elavic EP. Vitamin D Deficiency: Implications in the rehabilitation setting. Am J Phys Med Rehabil, 2006;85:916-23.
Heldin CH, Miyazano K, Ten Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus throug SMAD proteins. Nature, 1997;390:465-71.
Hermans PWM, Hazelzet JA. Plasminogen activator inhibitor type 1 gene polymorphism and sepsis. Clin Infect Dis, 2005;41:453-8.
Hewison M. Vitamin D and the immun system: new perspectives an old theme. Endocrinol Metab Clin North Am, 2010;39:365-79.
Hines SL, Jom HK, Thompson KM, Larson JM. Breast cancer survivors and vitamin D3.Nutrition, 2010;26(3):255-62.
Holick MF. Vitamin D and sunlight: Strategies for cancer prevention and other health benefits. Clin J Am Soc Nephrol, 2008;3:1548-54.
Holick MF. Vitamin D deficiency. N Engl J Med, 2007;357(3):266-81.
Holick MF. Vitamin D: Extraskeletal health. Endocrinol Metab Clin North Am, 2010;39:381-400.
Hücre Döngüsü v Apoptosis. Erişim Tarihi: 18 Şubat 2014. www.biyokimya.uludag.edu.tr.
İlvam Ş. Meme karsinomu patolojisi. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimleri Etkinlikleri. Meme Kanseri Sempozyum Dizisi, 2006;5:65-71.
Jelisavac-Cosic S, Sirotkovic-Skerlev M, Kulic A, Jakic-Razumovic J, Kovac Z, Vrbanec D. Prognostic significance of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitor (PAI-1) in patients with primary invasive ductal breast carcinoma-a 7.7-year follow-up study. Tumori, 2011;97(4):532-9.
Kanser. Erişim Tarihi: 06 Haziran 2014. http://tr.wikipedia.org/wiki/Kanser.
Kanser Nedir? Erişim Tarihi: 01 Mart 2014. www.iuonkolojienstitusu.org/pdf/halk/kanser_nedir.Pdf.
Karayurt Ö. Meme kanseri. www.saglik.gov.tr.
Keyomarsi K, Conte D Jr, Toyofuku W, Fox MP, Scambia G. Deregulation of cyclin-E breast cancer. Oncogene, 1995;11:941-50.
Khajah MA, Al Saleh S, Mathew PM, Lugmani YA. Differantial effect of growth factors on invasion and proliferation of endocrine resistant breast cancer cells. Plos One, 2012;7(7):418-47.
Knight JA, Lesosky M, Barnett H, Raboud JM, Vieth R. Vitamin D and reduced risk of breast cancer: a population-based case-control study. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2007;16(3):422-9.
Kretzschmar M, Liu F, Hata A, Doodj J, Massague J. The TGF-beta family mediator Smad1 is phosphorylated directly and activated functionally by the BMP receptor kinase. Genes Dev, 1997;11:984-95.
Krishnan AV, Feldman D. Mechanisms of the anti-cancer and anti-inflamatory actions of vitamin D. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2011;51:311-36.
Kristensen P, Pyke C, Lund LR, Andreasen PA, Dano K. Plasminogen activator inhibitor type-1 in lewis lung carcinoma. Histtoche Mistry, 1990;93:559-66.

Krstic J, Maslovaric I, Santibanez JF. Novel patents and cancer therapies for transforming growth factor-beta and urokinase type plasminogen activator: potential use of their interplay in tumorigenesis. Recent Pat Anticancer Drug Discov, 2014;9(3):354-71.
Kocaeli Ö. Meme Kanseri. Erişim Tarihi: 06 Haziran 2013. www.saglikbe.kou.edu.tr/ozgurkocaeli01.htm.
Koli K, Keski-Oja J. 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and its analogues down-regulate cell invasion-associated proteases in cultured malignant cells. Cell Growth Differ, 2000;11(4):221-9.
Kulie T, Graff A, Medmer J, Hounsbell J, Scrager S. Vitamin D: a evidence-based review. J Am Board Fam Med, 2009;22:698-706.
Lagna G, Hata A, Hemati-Brivanlou A, Massague J. Partnerskip between DPC4 and Smad proteins in TGF-beta signalling pathways. Nature, 1996;383:832-6.
Land DS, Marwitz S, Heilenkötter U, Schumm W, Behrens O, Simon R, Reck M, Vollmer E, Goldman T.Transforming growth factor-beta signaling leads to uPA/PAI-1 activation and metastasis: a study on human breast cancer tissues. Pathol Oncol Res, 2014;20(3):727-32.
Lavarone A, Garg P, Lsorella A, Hsu J, Israel MA. The helix-loop-helix protein Id2 enhances cell proliferation and binds to the retinoblastoma protein. Genes Dev, 1994;8:1270-84.
Lavie CJ, Lee JH, Milani RV. Vitamin D and cardiovasculer disease will it live up to its hype? J Am Coll Cardiol, 2011;58:1547-56.
Lawrence MS, Barbara AO. Programmed cell death, apoptosis and killer genes. Immunol Today, 1993;14:582-90.
Lawrence WT, Diagelmann DF. Growth factor on wound healimg. Clin Dermatol, 1994;12:157-69.
Liu F. Smad 3 phosphorylation by cyclin_dependent kinases. Cytokine Growth Factor Rev, 2006;17:9-17.
Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Falvell RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. Annu Rev Immunol, 2006;24:99-146.
Look MP, Van Putten WL, Duffy MJ, Harbeck N, Christensen IJ, Thomssen C, et al. Pooled analysis of prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in 8377 breast cancer patients. J Natl Cancer Inst, 2002;94(2):116-28.
Luo K, Lodish HF. Positive and negative regulation of type II TGF-beta receptor signal transduction by auto-phosphorylation on multiple serine residues. EMBO J, 1997;16:1970-81.
Mandel K, Seidl D, Rades D, Lehnert H, Gieseler F, Hass R, Ungefroren H. Characterization of spontaneous and TGF-β-induced cell motility of primary human normal and neoplastic mammary cells in vitro using novel real-time technology. Plos One, 2013;8(2):565-91.
Marchionetti AM, Picotto G, Narvaez CJ, Welsh J, Tolosa de Tlamoni NG. Antiproliferative action of menadione and 1,25(OH)2D3 on breast cancer cells. J Steroid Biochem Mol Biol, 2009;113(3-5):227-32.
Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, et al. Inactivation of the type TT TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instabilirt. Science, 1995;268:1336-8.
Massague J. TGF-β in cancer. Cell, 2008;134:215-30.
Massague J. TGF-beta signal transduction. Annu Rev Biochem, 1998;67:753-91.
Mazars P, Barboule N, Baldin V, Vidal S, Ducommun B, Valette A. Effects of TGF-β1 on the cell cycle regulation of human breast adenocarcinoma (MCF-7) cells. FEBS Lett, 1995;362(3):295-300.
McCormick. Signaling Networks that cause cancer trends cell biol. Trends Cell Biol, 1999;9(12):53-6.
Meade TW, Ruddock V, Stirling T, et al. Fibrinolytic activity, clotting factors and long term incidence of ischemic heart disease in the Nortwick Park Heart study. Lncet, 1993;342:1076-9.
Meme Kanseri. Erişim Tarihi: 03 Mart 2014. http://yeniweb.mersin.edu.tr/uploads/304/files/memekanseri.pdf.
Mo N, Li ZQ, Li J, Cao YD. Curcumin inhibits TGF-β1-induced MMP-9 and invasion through ERK and Smad signaling in breast cancer MDA-MB-231 cells. Asian Pac J Cancer Prev, 2012;13(11):5709-14.
Moorman G, Terry PD. Consumption of dairy products and the risk of breast cancer. Patricia Am J Clin Nutr, 2004;80:5-14.
Muşat E, Stefanescu C, Rusu V. Whole-bodybone scintigraphy in the diagnosis and follow-up of the evolution of breast cancer. Rev Med Chir Soc Med Nat Lasi, 1999;103:163-9.
Nagasawa H, Keng P, Maki C, Yu YL, Little JB. Absence of a radiation-induced first-cycle G(1)-S arrest in p53(+) human tumor cells synchronized by mitotic selection. Cancer Res, 1998;58:2036-41.

Nicoloso G, Hauert J, Kruithof EK, Van Mrllr G, Bachmann F. Fibrinolysis in normal subjects-comparison between plasminogen activator inhibitor and other components of the fibrinolytic system. Thromb Haemost, 1988;59(2):299-303.
Nieves-Neira W, Pommier Y. Apoptotic response to camptothecin and 7-hydroxystaurosporine (UCN-01) in the 8 human breast cancer cell lines of the NCI anticancer drug screen: multifactorial relationship with topoisomerase I, protein kinase C, Bcl-2, p53- MDM-2 and caspase pathways. Int J Cancer, 1999;82:396-404.
Obermajer N, Doljak B, Kos J. Cytokeratin 8 ecoplasmic domain binds urokinase-type plasminogen activator to breast tumor cells and modulates their adhesion, growth and invasivenss. Mol Cancer, 2009;8:88.
Onat T, Emerk K, Sözen EY. İnsan Biyokimyası. Ankara: Palme Yayıncılık, 2002:569-75.
Ooi LL, Zheng Y, Zhou H, Trivedi T, Conigrave AD, Seibel MJ, Dunstan CR. Vitamin D deficiency promotes growth of MCF-7 human breast cancer in a rodent model of osteosclerotic bone metastasis. Bone, 2010;47(4):795-803.
Özdemir O, Çalışkan D. Meme kanserinin erken tanısında kullanılan yöntemler. Sağlık ve Toplum, 2002;12(4):10-14.
Öztürk M. Meme kanserinin genetiği ve risk faktörleri. Sempozyum Dizisi, 2006;54:15-26.
Padua D, Zhang XH, Wang Q, Nadal C, Gerald WL, Gomis RR, Massague J. TGFbeta primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4. Cell, 2008;133:66-77.
Pardali K, Kurisaki A, Moren A, Ten Dijke P, Kardassis D, Moustakis A. Role of Smad proteins and transcription factor Sp1 in p21 (Waf1/Cip1) regulation by transforming growth factor-beta. J Biol Chem, 2000;275-29244-56.
Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin, 2005;55(2):74-108.
Perez-Lopez FR.Sunlight the vitamin D endocrine system, and their relationships with gynaecologic cancer. Maturitas, 2008;59(2):101-13.
Pinkas J, Teicher BA. TGF-beta in cancer and as a therepeutic target. Biochem Pharmacol, 2006;72:523-29.
Proietti S, Cucina A, D'Anselmi F, Dinicola S, Pasqualato A, Lisi E, Bizzari M. Melatonin and vitamin D3 synergistically down-regulate Akt and MDM2 leadig to TGFβ-1-dependent growth inhibition of breast cancer cells. J Pineal Res, 2011;50(2):150-8.
Rait AS, Pirollo KF, Rait V, Krygier JE, Xiang LM, Chang EH. Inhibitory effects of the combination oh HER-2 antisense oligonucleotide and chemotherapeutic agents used fort he treatment of human breast cancer. Cancer Gene Therapy, 2001;8:728-39.
Ramont L, Pasco S, Hornebeck W, Maquart FX, Monboisse JC. Transforming growth factor-beta 1 inhibits tumor growth in a Mouse melanoma model by down-regulating the plasminogen activation system. Exp Cell Res, 2003;292(1):1-10.
Rifkin DB. Cross-talk among proteases and matrix in the control of growth factor action. Fibrinol Proteolysis, 1997;11:3-9.
Sağlık Bakanlığı Kanser İstatistikleri. Erişim Tarihi: 23 Şubat 2014. www.saglik.gov.tr.
Santibanez JF. Transforming growth factor-beta and urokinase-type plasminogen activator: dangerous partners in tumorigenesis-implications in skin cancer. ISRN Dermatol, 2013;18:597927.
Schwarz V, Hornung A, Fedier R, Fehr A, Walt MK, Haller H, Fink UD. Photodynamic therapy of DNA mismatc repair-deficient and proficient tumour cells. Br J Cancer, 2002;86:1130-35.
Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. The metabolic&molecular bases of inherited disease. McGrew-Hill, 2001:613-74.
Seoane J, Pouponnot C, Staller P, Schader M, Eilers M, Massague J. TGF-β influences Myc, Miz-1 and Smad to control the CDK inhibitors p15INK4b. Nat Cell Biol, 2001;3:400-8.
Sharma M, Ownbey RT, Sharma MC. Breast cancer cell surface annexin induces cell migration and neoangiogenesis via tPA dependent plasmin generation. Exp Mol Pathol, 2010;88(2):278-86.
Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. Cell, 2003;113:685-700.
Siegel PM, Massague J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-β in homeostasis and cancer. Nat Rev Cancer, 2003;3:807-21.
Simboli-Campbell Mİ Narvaez CJ, Tenniswood M, Welsh J. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 induces morphological and biochemical markers of apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. J Steroid Biochem Mol Biol, 1996;58(4):367-76.
Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. Science, 1987;235:117.

Souchelnytskysi S, Ten Dijke P, Miyazano K, Heldin CH. Phosphorylation of Ser165 in TGF-beta type 1 receptor modulates TGF-beta 1 induced cellular responses. EMBO J, 1996;15:6231-40.
Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. Human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. J Nat Cancer Inst, 1973;51:1409-16.
Soydinc HO, Duranyildiz D, Guney N, Derin D, Yasasever V. Utility of serom and urine uPAR levels for diagnosis of breast cancer. Asian Pac J Cancer Prev, 2012;13(6):2887-9.
Soyöz M, Özçelik N. TGFβ ve sinyal iletimi. Türkiye Klinikleri J Med Sci, 2007;27(3):426-33.
Sutherhland RL, Watts CK, Lee CSL, Musgrove EA. Breast cancer. In: Masters JRW, Palsson B. Human cell culture, 1999; II: Cancer cell lines. Part 2. Kluwer Academic Publishers, Boston:79-106.
Stillfried GE, Saunders DN, Ranson M. Plasminogen binding and activation at the breast cancer cell surface: the integral role of urokinase activity. Breast Cancer Res, 2007;9(1):R14.
Sundaram S, Bechman MJ, Bajwa A, Wei J, Smith KM, Posner GH, Gewirtz DA. QW-1624F2-2, a synthetic analogue of 1,25-dihyroxyvitamin D3, enhances the response to other deltanoids and suppresses the invasiveness of human metastatic breast tumor cells. Mol Cancer Ther, 2006;5(11):2806-16.
Suqioka K, Kodama A, Okada K, Iwata M, Yoshida K, Kusaka S, Matsumoto C, Kaji H, Shimomura Y. TGF-β2 promotes RPE cell invasion into a collagen gel by mediating urokinase-type plasminogen activator (uPA) expression. Exp Eye Res, 2013;115:13-21.
Suzuki A, Chang C, Yingling JM, Wang XF, Hermati-Brivanlou A. Smad 5 induces ventral fates in xenopus embiyo. Dev Biol, 1997;184:402-5.
Tachibana I, Imoto M, Adjei PN, Gores GJ, Subramaniam M, Spelberg TC, Urritia R. Overexpression of the TGFbeta-regulated zinc finger encoding gene, TIEG, induces apoptosis in pancreatic epithelial cells. J Clin Invest, 1997;66:2365-74.
Tang L, Han X. The urokinase plasminogen activator system in breast cancer invasion and metastasis. Biomed Pharmacother, 2013;67(2):179-82.
Ten Dijke P, Hill CS. New insights into TGF-beta-Smad signalling. Trends Biochem Sci, 2004;29:265-73.
Thielemann A, Baszczuk A, Kopczynski P, Kopcznski Z. High concntration of urokinase-type plasminogen activator receptor in the serum of women with primary breast cancer. Contemp Oncol, 2013;17(5):440-5.
Tutar E, Tokuç G, Öktem S. Hemostaz. Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıp Dergisi, 2000;x1:3.
Tümör Supressör Genler. Erişim Tarihi: 23 Mayıs 2014. www.kansergenetigi.com/tr/kanser-ve-gebetic-tumor-supressor-genler.
Tükel S. Dünyada meme kanseri görülme sıklığı nedir? www.metam.org/sss.pdf?id=86.
Van Meijer M, Pannekoek H. Structure of plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) and its function in fibrinolysis: an update. Fibrinolysis, 1995;9:263-76.
Van Zonneveld AJ, Curriden SA, Loskutoff DJ. Type 1 plasminogen activator inhibitor gene: Functional analysis and glucocorticoid regulation of its promoter. Proc Natl Acad Sci, 1988;85(15):5525-9.
Vaux DL, Haecker G, Strasse A. An evolutionary perspective on apoptosis. Cell, 1994;76:777-9.
Veldhuis SI, Wolbers F, Brouckaert O, Vermes I, Franke HR. Cancer prevalence in osteoporotic women with low serum vitamin D levels. Menopause, 2011;18839:319-22.
Verlinden L, Verstyyf A, Convents R, Marcelis S, Van Camp M, Bouillon R. Action of 1,25(OH)D3 on the cell cycle genes, cyclin D1, p21 and p27 in MCF-7 cells. Mol Cell Endocrinol, 1998;142(1-2):57-65.
Veronica A, Carrol PHD, Bernd MD. The role of plasminogen actication system in cancer. Semin Thromb Haemost, 1999;25(2):10-19.
Vural P. The suppressing role of transforming growth factor-β in cancer. Türk Klin Biyokimya Derg, 2010;8(1):35-42.
Wakefield LM, Romerts AB. TGF-beta signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. Curr Opin Genet Dev, 2002;12:22-9.
Watanabe N, Okochi E, Mochizuki M, Sugimura T, Ushijima T. The presence of single nucleotide instability in human breast cancer cell lines. Cancer Res, 2001;61:7739-42.
Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventuna F, Massague J. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. Nature, 1994;370:341-7.
Yamashita J, Inada K, Ogawa M. Plasminogen activators in breast-cancer cells. Int J Oncol, 1992;1(6):683-6.
Zhang S, Ma Y, Jiang J, Dai Z, ao X, Yin X, Xi W, Min W. Inhibition of urokinase-type plasminogen activator expression by dihydroartemisinin in breast cancer cells. Oncol Lett, 2014;7(5):1375-80.

Zhou HM, Bolon I, Nichols A, Wohlwend A, Vassalli JD. Overexpression of plasminogen activator inhibitor type 2 in basal keratinocytes enhances papilloma formation in transgenic mice. Cancer Res, 2001;61(3):970-6.

Zincir H. Malatya il merkezinde 40 yaş üzeri kadınların meme kanseri ve korunma konusunda bilgi tutum ve davranışları. İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Halk Sağlığı Ana Bilim Dalı, Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi, Malatya,1999.

Zorio E, Gilabert-Estelles J, Espana F, Ramon LA, Cosin R, Estelles A. Fibrinolysis: The key to new pathogenetic mechanisms. Curr Med Chem, 2008;15(9):923-9.

Zukerberg LR, Yang WL, Gadd M, Wooater R. Cyclin d1 protein expression in breast cancer: approximately one third of infiltratting mammary carcinomas show overexpression of the cyclin D1 oncogene. Mol Pathol, 1995;8:560-7.

Zumkeller W, Schofield PN. Growth factors, cytokines and soluble forms of receptor molecular in cancer patients. Anticancer Res, 1995;15:343-8.

Zuqmaier G, Enis BW, Deschauer B, Katz D, Knabbe C, Wilding G, Daly P, Lippman ME, Dickson RB. Transforming growth factor type beta 1 and beta 2 equipotent growth inhibitors of human breast cancer cell lines. J Cell Physiol, 1989;141(2):353-61.

7. ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Karabük'te doğdu. 2010 yılında Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldu. 2010 yılında Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında yüksek lisansa başladı. Halen yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.