

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KEMİK METASTAZI OLAN MEME KANSERLİ HASTALARDA
VERİLEN D VİTAMİNİ TEDAVİSİNİN DOLAŞIMDAKİ HSP-90
VE CK-18 DÜZEYLERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Cemile Muhteşem DEĞİŞLİ

DOKTORA TEZİ

BİYOKİMYA (TIP) ANABİLİM DALI

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Aysel KIYICI

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü
tarafından 09102054 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2010

ii. ÖNSÖZ

Eğitime ve bilime önem veren, doktora eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. İdris MEHMETOĞLU' na,

Tezim konusunda bana ışık tutan ve hiçbir yardımı esirgemeyen değerli tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Aysel KIYICI' ya,

Destek, hoşgörü ve yönlendirmesiyle her zaman bana yardımcı olan Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü Prof. Dr. Orhan ÇETİN' e,

Tez çalışmamla ilgili bazı analizlerin yapılmasında bana yardımcı olan Araştırma Görevlisi Dr. Hümeysra ÇİÇEKLER' e,

İhtiyacım olduğunda karşılıksız yardım ve desteklerini benden esirgemeyen arkadaşlarım Aysun YILMAZ, Emine KILIÇ ve Hayrullah EVCI' ye,

Bu mücadelelerle dolu doktora eğitim sürecim boyunca hep yanımda olan ve sevgisinden güç aldığım eşim İsmail' e,

Ömür boyu benden desteğini esirgemeyen, beni yetiştiren anneme ve babama,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

iii. İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGELER ve KISALTMALAR.....v

1. GİRİŞ.....1

1. 1. Kanserin Tanımı ve Önemi.....	4
1. 1. 1. Kanser Hücrelerinin Özellikleri.....	6
1. 1. 2. Risk Faktörleri.....	7
1. 2. Meme Kanseri.....	7
1. 2. 1. Meme Kanserinde Risk Faktörleri.....	9
1. 2. 2. Meme Kanserinde Kemik Metastazının Önemi.....	10
1. 2. 3. Kemik Metastazı Tedavisinde Bifosfonatların Rolü.....	11
1. 3. D Vitamini.....	12
1. 3. 1. Biyokimyası ve Fizyolojisi.....	12
1. 3. 2. Metabolizması.....	13
1. 3. 3. Fonksiyonları.....	16
1. 3. 4. D Vitamini Kaynakları.....	17
1. 3. 5. D Vitamini Düzeyleri.....	17
1. 3. 6. D vitamini ve Kanser.....	18
1. 4. Apoptozis.....	21
1. 4. 1. Apoptotik Hücrede Gözlenen Morfolojik Değişiklikler.....	23
1. 4. 2. Apoptoziste Fagositoz.....	24
1. 4. 3. Apoptozis ve Nekroz Arasındaki Farklar.....	24
1. 4. 4. Apoptozis Mekanizmaları.....	27
1. 4. 5. Apoptozisin Genetik Kontrolü.....	29
1. 4. 6. Apoptoziste Hücre İçi Sinyal İletimi ve Metabolik Değişiklikler.....	31
1. 4. 7. Apoptozisin Görüldüğü Olaylar.....	32
1. 4. 8. Apoptozis ile Hastalıkların İlişkisi.....	34
1. 4. 9. Apoptozisin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler.....	34
1. 4. 10. Apoptozis ve Kanser.....	35
1. 4. 11. Apoptotik markerler.....	36
1. 4. 12. Sitokeratinler.....	36
1. 4. 13. Sitokeratin-18.....	37
1. 5. Isı Şok Proteinleri.....	39

1. 5. 1. Isı Şok Proteinlerinin Tayin Yöntemleri.....	40
1. 5. 2. Isı Şok Proteinlerinin Görevleri.....	41
1. 5. 3. Isı Şok Faktörü (HSF).....	41
1. 5. 4. Memelilerdeki Bazı Isı Şok Proteinleri ve Fonksiyonları.....	41
1. 5. 5. Isı Şok Proteinlerinin Hastalıklardaki Rolü.....	44
1. 5. 6. Isı Şok Proteinleri ve Kanser.....	45
1. 6. Sialik Asit.....	48
1. 6. 1. Sialik Asit ve Kanser.....	49
2. GEREÇ ve YÖNTEM.....	51
2. 1. Çalışma Şekli.....	51
2. 2. Vaka Seçimi.....	51
2. 3. Numunelerin Toplanması ve Saklanması.....	51
2. 4. Biyokimyasal Analizler.....	52
2. 4. 1. 25-(OH)D ₃ Düzeyi Tayini.....	52
2. 4. 2. Kaspazla Çentiklenmiş CK-18 Tayini.....	55
2. 4. 3. HSP-90 Tayini.....	57
2. 4. 4. Sialik Asit Düzeyi Tayini.....	60
2. 4. 5. İstatistiksel Analiz.....	62
3. BULGULAR.....	63
4. TARTIŞMA.....	66
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	73
6. ÖZET.....	74
7. SUMMARY.....	75
8. KAYNAKLAR.....	76
9. EKLER.....	87
EK-A: Etik Kurul Kararı.....	87
EK-B: Bilgilendirilmiş Onay Formu.....	88
10. ÖZGEÇMİŞ.....	89

iv. SİMGELER ve KISALTMALAR

Apaf-1: Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1

APC : Antijen sunan hücreler

ATP : Adenozintrifosfat

CAL : Kalibratör

CK : Sitokeratin

CTRL : Kontrol

CYP24: 24-hidroksilaz

DNA : Deoksiribonükleik asit

ELU : Mobil faz

ER : Endoplazmik retikulum

HRP : Horseradish peroxidase

HSF : Isı şok faktörü

HSP : Isı şok protein

IS : Internal standart

LSA : Lipide bağlı siyalik asit

PREC : Çöktürücü reaktif

PTH : Paratiroid hormon

RDA : Alınması tavsiye edilen günlük doz

TMB : Tetrametilbenzidin

TPA : Doku polipeptid antijeni

TPS : Doku polipeptidine özgü antijen

TSA : Total siyalik asit

UV : Ultraviyole

VBDP : Vitamin D bağlayıcı protein

VDR : Vitamin D reseptörü

1. GİRİŞ

Kanser, çağımızda mortalite ve morbiditenin önde gelen nedenlerinden biridir (Şahin ve ark 2000). Dünyadaki insanların dörtte biri, yani yaklaşık bir buçuk milyar insan, yaşamının herhangi bir aşamasında kansere yakalanma riski taşımaktadır (Akgül ve ark 2003). Bilim adamları gerek kanseri önlemek gerekse kanserli hastaları tedavi etmek amacıyla çeşitli çalışmalar yapmaktadırlar (O’Kelly ve Koeffler 2003).

Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen kanser türüdür ve kadın kanserlerinin üçte birinden sorumludur. Meme kanseri konusundaki araştırmalar hızla ve artarak devam etmektedir. Bunların sonucu olarak bu hastalık hem daha iyi tanınmakta hem de tedavide giderek artan başarılar elde edilmektedir. Meme tümörleri tedavi ile şifa ve sağkalım oranlarının arttığı ispatlanmış tümörlerdir (Ondrusek ve ark 1999, Williams ve ark 2002).

Son yirmi yıl içinde moleküler onkolojideki önemli gelişmeler sonucunda karsinogenez, tümör büyüme ve invazyonu ile metastaz biyolojisinde heyecan verici önemli bilgi kazanımları olmuştur (Kansu 2005).

Kanserlerin çoğunun gelişiminde 10-20 yıllık bir dönem vardır ve bu dönem önleyici sağaltım için yeterli bir süreçtir. Güncel olan birçok çalışmada D vitamininin, çeşitli kanserlerin oluşumu ve ilerlemesinin önlenmesinde etkili olduğu belirtilmiştir (Şahin ve ark 2000). Vitamin D bileşenlerinin tek başına veya diğer ilaçlarla kombine olarak kanser tedavisinde ve gerilemesindeki kullanımı halihazırda tartışılmaktadır (O’Kelly ve Koeffler 2003).

D vitamini, özellikle meme kanseri tedavisinde kemoterapi ve antiöstrojenlerle hormon tedavisinin kullanımına yeni bir alternatif teşkil etmektedir. Hem in vitro hem de in vivo araştırmalar, vitamin D bileşenlerinin meme kanseri hücrelerini inhibe edebileceğini göstermiştir (O’Kelly ve Koeffler 2003).

Vitamin D’ nin biyolojik olarak aktif formu olan 1,25-dihidroksi D₃, sadece kalsiyum homeostazının kontrolünde önemli bir rol oynamakla kalmaz, aynı zamanda hücre farklılaşması ve hücre siklusunun regülasyonu, apoptozisin indüksiyonu, hücresel proliferasyonun inhibisyonu, metastaz ve anjiogenez üzerinde de etkileri mevcuttur (Van den Bemd ve Chang 2002).

Kanser tedavisinde 1,25-dihidroksi D₃' ün potansiyel kullanımı farmakolojik olarak aktif dozlarda hiperkalsemiye neden olduğu için sınırlandırılmıştır. Böylece, kuvvetli antikanser etkileri olan fakat düşük kalsemik aktiviteye sahip vitamin D analoglarının sentezi gündeme gelmiştir (O'Kelly ve Koeffler 2003).

Kemoterapi, tümör hücrelerinde apoptozis, nekroz, otofaji, mitotik yıkım ve yaşlanmayı içeren birçok etkileri indükler. Apoptozis birçok antikanser ilaçla tedavinin hücresel sonucu şeklinde genel olarak ifade edilmiştir ve apoptotik mekanizmalardaki bozuklukların terapi direncine iştirak ettiğine inanılmaktadır (Linder ve ark 2004).

Tümör hücrelerinin en belirgin özelliklerinden biri normal farklılaşma yeteneğinin kaybolmasıdır. Farklılaşmanın bozulmasına paralel olarak kanser hücresi apoptozis yeteneğini de kaybeder ve normal hücreye kıyasla daha uzun yaşar (Keeton ve Gould 2003).

Dolaşımdaki apoptotik markerlerin kantitatif tayini tümör büyümesi ve agresifliği ile antitümör terapinin etkinliğinin değerlendirilmesinde yeni bir bakış açısına yol açmıştır. Ayrıca, bu markerlerin konsantrasyonlarında erken dönemdeki değişiklikler tedaviye cevabın önceden saptanmasında yarar sağlayabilir (Holdenrieder ve Stieber 2004).

Sitokeratinler, kanser hastalarında terapi-indüklü hücre ölümünü gösteren bir biomarker olarak belirtilmiştir. Yakın zamandaki kanıtlar kanserli hastaların kan dolaşımındaki sitokeratinlerin apoptotik ve nekrotik tümör hücrelerinden kaynaklandığını düşündürmektedir (Linder 2007).

Sitokeratin-18 (CK-18) ölü hücrelerden salınmaktadır. Apoptozis, kaspazla çentiklenmiş (caspase-cleaved) CK-18 fragmanlarının salınımıyla sonuçlandığı halde; nekroz, çentiklenmemiş (uncleaved) CK-18' in salınımıyla sonuçlanır (Linder ve ark 2004).

Yakın çalışmalarda meme kanseri tedavisi sonucu, CK-18 seviyelerinin tedavi öncesine göre artış gösterdiği ve kanser hastalarının sitotoksik antikanser ilaçlara cevabını değerlendirmek için kullanılabileceği belirtilmiştir (Demiray ve ark 2006).

Isı şok proteinleri (HSP), proteinlerin katlanarak üç boyutlu hale gelmesinde yer alan çeşitli stres uyarılarına cevap olarak bütün canlıların hücreleri tarafından üretilen bir grup refakatçi şaperon proteinlerdendir. Çoğu kanser çeşidinde HSP'lerin üretimi artar. HSP'ler tümör hücrelerinin proliferasyonu, farklılaşması, invazyonu, metastazı, ölümü ve immün sistem tarafından tanınması ile ilişkilidir. HSP'ler apoptotik sinyal yolunun birçok noktasında görev yaparlar. HSP-90 antiapoptotik etki gösterir (Gacad ve Adams 1998).

HSP-90, hücresel kalite kontrol için çok önemli olan 90 kDa'lık bir şaperondur. Hormon reseptörleri, protein kinazlar ve protein kontrollü hücre siklusu ve apoptozisteki proteinler gibi başlıca hücresel proteinlerin fonksiyonlarını yürütmede önemlidir (Pick ve ark 2007).

HSP-90 kanser hücreleri için önemli olan proteinlerin stabilitesi ve fonksiyonunda anahtardır. HSP-90 meme kanserini de içeren çoğu insan malignitelerinde HSP'lerin anormal seviyeleri gözlenmiştir (Banerji 2009). Meme kanserinin büyümesi ve sağkalımı için önemli proto-onkogenlerin stabilitesi için gereklidir (Pick ve ark 2007).

Siyalik asit glikolipid ve glikoproteinlerin yapısal bir proteindir. İnsan vücudunda siyalik asitin en çok görülen formu N-asetil-nöraminik asittir. Hücre membranının dışında glikoproteinlerin, glikolipidlerin ve polisakkaritlerin bir parçası olarak yerleşmiş olan siyalik asit dolaşıma etrafa dökülerek veya hücre lizisi gibi çeşitli yollarla girme durumundadır (Sancak ve ark 2002).

Malignitelerde siyalik asit düzeyinin normale göre daha yüksek olmasıyla ilgili çeşitli fikirler ileri sürülmüştür (Dwivedi ve ark 1988). Ayrıca, meme kanseri ve diğer bazı kanserlerde yapılan çalışmalarda tedavi sonrası total siyalik asit (TSA) ve lipide bağlı siyalik asit (LSA) düzeylerinde bir düşüş izlenmiştir.

Kanserlerin evrenmesi, prognostik değerlendirilmesi, tedavinin etkinliğinin izlenmesi ve nükslerin erken tespitinde serum TSA ve LSA düzeylerinin diğer tümör belirleyicilerle birlikte yararlı olabileceği bildirilmiştir (Adamo ve ark 1985, Tewarson ve ark 1993, Patel ve ark 1997, Cylwik ve ark 2005).

Çalışmamızda kemik metastazı olan meme kanserli hastalara verilen D vitamini tedavisinin apoptozis üzerine etki mekanizmasını aydınlatmaya yönelik

olarak ısı şok proteinlerinden HSP-90, apoptozisin dolaşımdaki göstergesi olan kaspazla çentiklenmiş CK-18 ve siyalik asit düzeylerini araştırmayı amaçladık.

1. 1. Kanserin Tanımı ve Önemi

Vücudumuzda tüm organlar hücrelerden oluşur. Hücreler vücudumuzun en küçük yapıtaşlarıdır ve ancak mikroskopla görülebilirler. Sağlıklı vücut hücreleri (kas ve sinir hücreleri hariç) bölünebilme yeteneğine sahiptirler. Ölen hücrelerin yenilenmesi ve yaralanan dokuların (vücut içi ve dışındaki) onarılması amacıyla bu yeteneklerini kullanırlar. Fakat bu yetenekleri de sınırlıdır. Sonsuz bölünemezler. Her hücrenin hayatı boyunca belli bir bölünebilme sayısı vardır. Sağlıklı bir hücre gerektiği yerde ve gerektiği kadar bölünmesini bilir. Buna karşın kanser hücreleri, bu bilinci kaybeder, kontrolsüz bölünmeye başlar ve çoğalırlar. Kanser hücreleri birikerek tümörleri (kitleleri) oluştururlar, tümörler normal dokuları sıkıştırabilirler, içine sızabilirler ya da tahrip edebilirler. Eğer kanser hücreleri oluştukları tümörden ayrılırsa, kan ya da lenf dolaşımı aracılığı ile vücudun diğer bölgelerine gidebilirler. Gittikleri yerlerde tümör kolonileri oluşturur ve büyümeye devam ederler. Kanserin bu şekilde vücudun diğer bölgelerine yayılması olayına metastaz adı verilir (Kutluk ve Kars 1992, Ata 2005).

Kanserler oluşmaya başladıkları organ ve mikroskop altındaki görünüşlerine göre sınıflandırılırlar. Farklı tipteki kanserler, farklı hızlarda büyürler, farklı yayılma biçimleri gösterirler ve farklı tedavilere cevap verirler. Bu nedenle kanser hastalarına, var olan kanser türüne göre farklı tedaviler uygulanır (Kutluk ve Kars 1992).

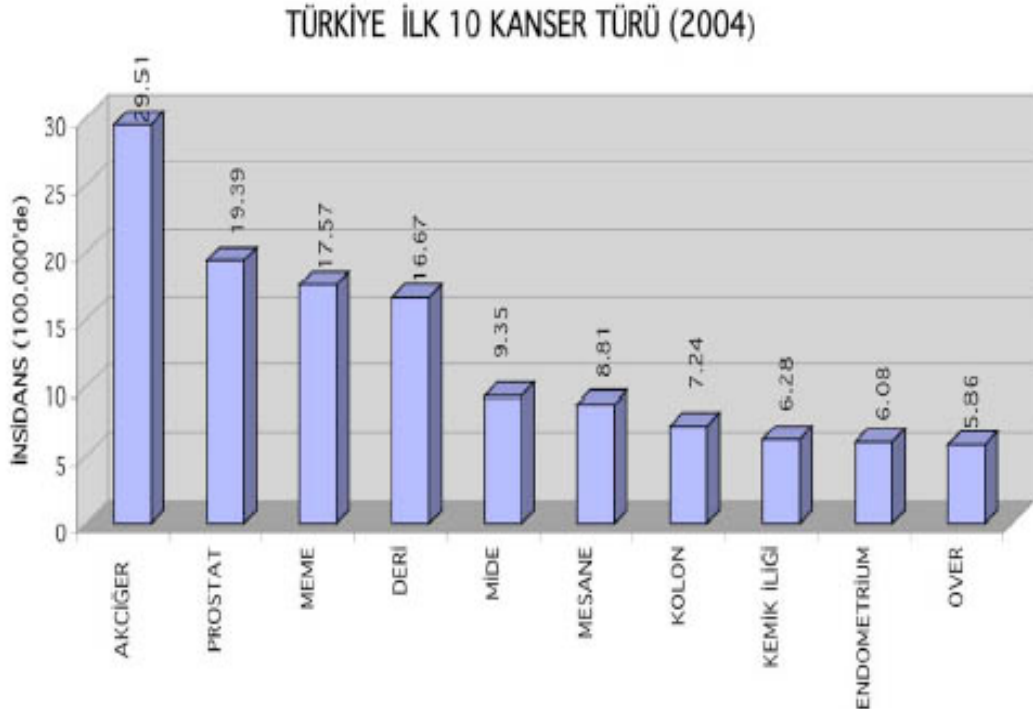
Kanser, önemi giderek artan bir sağlık ve yaşam sorunudur ve dünya genelinde ölümlerin nedeni olarak, kalp ve damar hastalıklarının hemen ardından gelmektedir. Kanser, yaygınlığı, ölüm ve sakatlıklara neden olması ve ulusal ekonomiye getirdiği yük ile Türkiye’ de de önemli ve öncelikli halk sağlığı sorunudur (Akdur 1993).

Dünya Kanser Örgütü (International Union Against Cancer-UICC) eski başkanı Dr. Franco Cavalli’ ye göre, 2007’ de yaklaşık 7,9 milyon kişi, çeşitli kanser türlerine bağlı hastalıklardan yaşamını yitirmiştir. 2008 Yılı Dünya Kanser Kongresi’

nde sunulan veriler ise hastalığın global olarak büyük boyutlara ulaştığını ortaya koymuştur;

1. Her yıl yaklaşık 11 milyon insan kansere yakalanmaktadır.
2. Kanserden ölümlerin yüzde 80' i gelişmemiş ve az gelişmiş ülkelerde meydana gelmektedir.
3. 2030 yılında 12 milyon insanın kanserden öleceği öngörülmektedir (Türkiye Bilimler Akademisi 2008).

Ülkemizde kanser verileri Sağlık Bakanlığı' na bağlı Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı' nın 2004 yılı verilerine dayanır. En sık görülen kanser türleri erkeklerde akciğer, prostat, kolon, rektum, mide ve pankreas; kadınlarda ise meme, akciğer, kolon, rektum, serviks, over, mide ve pankreas kanserleri olarak sıralanır. Deri kanseri sıklığı her iki cinste de yüksek olmakla birlikte, malign melanom dışındaki deri kanserleri tedaviye iyi cevap verdiklerinden ölüm oranı çok düşer (Yılmaz 1992, Türkiye Bilimler Akademisi 2008).



Şekil 1.1. Türkiye' de görülen ilk on kanser türü (Türkiye Bilimler Akademisi 2008).

1. 1. 1. Kanser Hücrelerinin Özellikleri

Kanser dokusu mikroskop altında belirgin değişiklikler gösterir. Bölünen hücre sayısında artış, hücre çekirdeğinde sayı ve şekil anormallikleri, özelleşmiş doku hücrelerinin bu görünümelerini kaybetmeleri, normal doku yapısının bozulması ve tümör sınırlarında belirsizlik bunlar arasında sayılabilir (Keeton ve Gould 2003).

Bir kanser hücresi oluştuğunda, vücudun bağışıklık sistemi bu yabancı hücreyi tanır ve parçalar. Bu sayede vücutta oluşan binlerce kanser hücresi bağışıklık sistemi tarafından yok edilir. Her hücrede, onkogenlerin aktivasyonunu baskılayan antionkogenler “tümör baskılayıcı gen” bulunmaktadır. Antionkogenlerin kaybolması veya inaktive olması durumunda onkogen aktivitesine izin verilmiş olur. Bunu da kanserin oluşumu izler. Vücutta mutasyona uğrayan hücrelerin ancak çok küçük bir kısmı kansere yol açar. Bunun birçok nedeni vardır;

1. Mutasyon gösteren hücrelerin yaşama kabiliyetleri normal hücrelere göre daha azdır ve bu yüzden ölürlər.

2. Mutasyon gösteren hücrelerin pek çoğunda bile aşırı büyümeyi önleyen tümör baskılayıcı genler bulunur. Bu yüzden hayatta kalabilen mutant hücrelerin çok azı kanserli hücreye dönüşür.

3. Sıklıkla, kanser potansiyeli taşıyan bu hücreler büyüyüp kanser oluşturmada önce vücudun bağışıklık sistemi tarafından yok edilirler.

Normal hücreler tamir edilemeyecek şekilde hasarlandığında apoptozis tarafından elimine edilirler. Kanserli hücreler apoptozisten uzak dururlar ve gelişmiş güzel çoğalmalarına devam ederler (Keeton ve Gould 2003).

Günümüz bilgilerine göre, kanser oluşum ve gelişim sürecinin dört ana evresi vardır;

1. Prekanseröz/oluşum evresi
2. İn-situ/sınırlı evre
3. Metastaz/yayılım evresi

4. Yaygın evre

Kanserin oluşum evresi, bazı istisnalar dışında (radyasyon ve bebeklerde görülen kalıtsal kanserler), genel olarak on beş yıl veya daha uzun sürmektedir. İşte, çok uzun süren oluşum evresi boyunca, çevresel faktörlere maruziyet ve sağlıklı yaşam biçimi ortadan kaldırılırsa, kanserin oluşumu önlenabilir (Berberoğlu 1991, Akdur 1993).

1. 1. 2. Risk Faktörleri

Doktorlar çoğunlukla neden bazı insanların kanser olduğunu, diğerlerinin olmadığını açıklayamazlar. Araştırmalar, belli risk faktörlerinin kişinin kanser geliştirme şansını artırdığını gösterir. Bu faktörlerin birçoğu önlenabilir. Aile hikayesi gibi faktörler ise önlenemez. Zamanla birçok faktör normal hücrelerin kanser hücresi olması için birlikte hareket eder. İnsanlar mümkün olduğunca bilinen risk faktörlerinden uzak kalarak kendilerini koruyabilirler.

Yaşlanma, sigara ve alkol kullanımı, kötü beslenme, fiziksel aktivite yokluğu veya fazla kilolu olma, menapozal hormon tedavisi alma, ultraviyole (UV) radyasyon ve iyonize radyasyona maruz kalma, bazı kimyasallar, bazı virüsler ve bakteriler, ailede kanser hikayesi, başlıca risk faktörleridir (Ata 2005).

1. 2. Meme Kanseri

Meme kanseri, memenin duktus veya lobüllerini örten epitelyal hücrelerin malign proliferasyonudur. Kadınlarda en sık görülen kanserdir ve akciğer kanserinden sonra, kansere bağlı ölümlerin ikinci en sık sebebidir. Tüm kanserler içinde kadınlarda görülme sıklığı % 22' dir. Bu oran gelişmiş ülkelerde % 26' ya kadar yükselir.

Dünya genelinde, her yıl yaklaşık 1 milyon yeni vaka bildirilmekte ve yılda 400 000 kadın bu hastalıktan kaybedilmektedir. Genel olarak gelişmiş ülkelerde daha yüksek insidansa sahiptir. Yaşam boyu her dokuz kadından biri, meme kanseri gelişme riskine sahiptir (Parkin ve ark 2000).

Türkiye açısından da, kadınlar arasında en sık görülen on kanser tipi içerisinde meme kanseri birinci sırada yer almaktadır (Çöl ve ark 2000). Ülkemizde bu konuda yeterli istatistiksel veri bulunmamakla birlikte Türkiye Bilimsel Araştırma

Kurumu' nun 1994 yılı verilerine göre 1985-1990 yılları arasında kadınlarda görülen kanserler arasında % 23,2 ile ilk sırada yer almaktadır (Burget ve ark 1994). Bu sonuç, Türkiye' de meme kanserinin önemini ortaya koymaktadır.

Erken tanı yöntemlerinin gelişmesi ve artan tedavi seçenekleri nedeniyle meme kanseri mortalitesi azalmaktadır (Parkin ve ark 2000).

Meme karsinomları; morfolojik, klinik, hormon reseptör düzeyi, tedaviye yanıtlarına göre farklı özellikleri olan, heterojenöz gruplara sahip tümörlerdir. Bu farklılığın sebebi, altta yatan hedef hücre (kanser hücresi) popülasyonundaki farklılık, farklı onkogen aktivasyonu ve/veya tümör supresor gen fonksiyon kayıplarındaki değişik kombinasyonlardır. Fakat, yıllardır kullanılan klasifikasyon morfoloji esaslıdır (Gusterson ve ark 2005). En sık kullanılan tanısall sınıflandırma sistemi Dünya Sağlık Örgütü' nün sınıflandırmasıdır (Dupont ve ark 1985).

Bu sınıflamaya göre meme kanserleri:

1. İn situ karsinom

- İn situ duktal karsinom
- İn situ lobuler karsinom

2. İnvaziv karsinom

- İnvaziv duktal karsinom (% 70-80)
- İnvaziv lobuler karsinom (% 5-10)
- Tubuler karsinom (% 2)
- İnvaziv kribriform karsinom
- Medüller karsinom (% 1-5)
- Müsinöz (kolloid) karsinom (% 1-2)
- İnvaziv papiller karsinom (% 1)
- İnvaziv mikropapiller karsinom
- Apokrin karsinom

- Sekretuar (juvenil) karsinom
- Adenoid kistik karsinom
- Metaplastik karsinom
- Nöroendokrin karsinom
- İnflamatuvar karsinom

olarak gruplandırılır.

1. 2. 1. Meme Kanserinde Risk Faktörleri

Meme kanserinin halen yeni bilgilerin ortaya çıktığı ve gelişmelerin yaşandığı oldukça geniş bir alan olduğu ifade edilmektedir (Campbell 2002). Meme kanserinin hangi nedene bağlı olarak ortaya çıktığı tam olarak bilinmemekle beraber yapılan araştırmalar sonucunda bazı özelliklere sahip kadınlarda meme kanseri görülme riskinin daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Karamanoğlu 1999, Driedger ve Eyles 2001, Campbell 2002). Birçok risk faktörü ile ilişkili olan meme kanserinin, risk faktörlerinin azalmasına ve artmasına göre, görülme sıklığı da farklılık göstermektedir (Bentley ve ark 1998, Manjer ve ark 2000).

Meme kanseri hormon bağımlı bir hastalıktır. Östrojenlerin, meme epitelindeki proliferatif etkisi, daha sonra DNA' nın (deoksiribonükleik asit) hatalı replikasyonu olasılığını artırarak mutasyonlara yol açabilmektedir. Bilinen birçok risk faktörü, endojen veya ekzojen östrojen uyarısının süresi ve seviyesi ile ilişkilidir (Ewertz ve ark 1990).

Meme kanserine bağlı ölümlerin azaltılması hedeflendiğinde, hastalığın erken dönemde teşhis edilebilmesinin taşıdığı önemin yükseldiği görülmektedir. Bunun için de öncelikle kadınların meme kanseri görülmesinde etkili olan risk faktörlerine yönelik olarak bilgilendirilmeleri ve bilinçlendirilmeleri gerekmektedir (Kelsey ve Gammon 1991, Vatten 1991).

Kadınlarda meme kanseri görülme riskini yükselten bu faktörler; yaş, kişisel meme kanseri hikayesi, ailede meme kanseri hikayesi, fertil çağ yaşı, çocuk doğurma yaşı, emzirme süresi, doğum kontrol hapı kullanılması, östrojen alınması, sigara ve alkol kullanımı, şişmanlık ve yağlı beslenme, yetersiz fiziksel aktivitedir (Hall ve

Hooper 1999, Remennick 1999, Goodwin 2000, Salih ve Fentiman 2002, Smith ve ark 2002, Cuzick 2003, Dumitrescu 2005, Veronesi 2005).

1. 2. 2. Meme Kanserinde Kemik Metastazının Önemi

Heterojen bir hastalık olan meme kanserinde ilk tanı aşamasında bile olguların üçte ikisinde sistemik bir yayılım olduğu kabul edilmektedir. Çizelge 1.1.’de de görüldüğü gibi meme kanseri hastalarında yapılan çalışmalarda ilk metastaz yerinin önemli bir bölümünü iskelet sistemi oluşturmaktadır (Aran ve ark 1987, Pak ve Elçi 1987, Wilson 1989).

Çizelge 1.1. Meme kanserinde ilk metastaz yeri (%).

Metastaz Yeri	Aran ve ark 1987 (434 Olgusu)	Pak ve Elçi 1987 (293 Olgusu)
Kemik	45	42
Akciğer/Plevra	24	28
Karaciğer	15	6
Yerel/Bölgesel	6	13
Beyin	6	7
Diğer	4	4

Bu nedenle meme kanseri tanısı konmuş olguların ilk evrelendirme çalışmalarında ve tedavi sonrası takiplerinde kemik metastazı tanı ve taramasına yönelik çalışmalar önemli rol oynamakta ve geniş yer tutmaktadır. Erken kemik metastazları klinik olarak sessizdir. Metastatik hastalık kemik dokusunda proliferasyon olmaksızın destrüksiyona neden olabilir. Bu tür metastazlar radyolojik olarak osteolitik metastaz şeklinde tanımlanır. Kemikte reaktif proliferasyon olduğunda osteoblastik, destrüktif ve proliferatif alanların her ikisinin de birlikte bulunduğu durumlarda ise mikst tip olarak adlandırılır. Mikst osteolitik ve

osteoblastik lezyonlar daha azdır. Yalnız osteoblastik metastazlar ise oldukça azdır (Edeiken 1985, Campanacci 1990). Metastazın bir başka şekli de kemik iliği boşluğunu dolduran, fakat trabeküler yapıyı bozmayan, bu nedenle de radyolojik olarak gösterilemeyebilen intertrabeküler tiptir.

Meme kanserinin radyolojik olarak gösterilebilen kemik metastazlarının büyük çoğunluğu osteolitik lezyonlardır. Direkt radyolojik olarak litik bir lezyonun gösterilebilmesi için 1,5 cm çapından büyük olması ve en az % 50 demineralizasyon oluşması gereklidir (Campanacci 1990). Kemik metastazlarının saptanmasında Tc-99m ile yapılan tüm vücut kemik sintigrafisi direkt radyolojik iskelet taramasından daha hassastır (Edeiken 1985, Harris ve ark 1985, Campanacci 1990, Perez ve ark 1992).

1. 2. 3. Kemik Metastazı Tedavisinde Bifosfonatların Rolü

Bifosfonatlar pirofosfat analoglarıdır. Kemik “remodeling” inin aktif olduğu alanlarda kemiğe bağlanırlar. Klinikte hızlı kemik “turnover” ı ve osteolitik aktivitenin arttığı durumlarda faydalıdır. Bu klinik çerçeve içinde kemiğin Paget hastalığı, çeşitli klinik nedenlere bağlı osteoporoz ve malign kemik hastalıkları yer alır.

Bifosfonatlar in vitro ve in vivo olarak kemik rezorpsiyonunu inhibe ederler. Kanser hastalarında, osteolizin bifosfonatlar ile inhibisyonunun maligniteye sekonder hiperkalsemi üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, kanser ile ilişkili iskelet sistemine ait morbidite, kemik ağrısı, patolojik kırıklar ve radyoterapi ihtiyacını geciktirme veya önlemede de etkilidirler (Tamura ve ark 1996).

Bifosfonatların asıl etkisi osteoklast fonksiyonlarının inhibisyonudur (Fleisch 1991). Bifosfonatların başka bir mekanizması da, tümör hücrelerinin kemiğe adezyonunun inhibisyonudur. Bifosfonatlar prostat ve meme kanserinde mineralize olan ve olmayan kemikte ekstraselüler matrikse tümör hücrelerinin yapışmasını inhibe ederler (Boisseir ve ark 1997).

Hayvan modellerinde bifosfonatların kırıkta ve kemik yıkımını önlediği, kemik metastazını önlediği ve sıklığını azalttığı gözlenmiştir (Fleisch ve ark 1969, Russel ve ark 1970).

Gerek osteoporoz, gerekse metastatik kemik hastalıklarında bifosfonat tedavisinde gizli vitamin D eksikliği olan hastalarda istenmeyen sonuçlar ortaya çıkabilmektedir. Vitamin D eksikliği, bifosfonat tedavisinin artmış toksisitesiyle ilişkilidir. Bu yüzden, bifosfonat tedavisi sırasında vitamin D takibi önerilmekle beraber, tedaviye kalsiyum ve vitamin D preparatları ilave edilmesi uygun görülmektedir (Wang-Gillam ve ark 2008, Amir ve ark 2010).

1. 3. D Vitamini

Vitaminler, besinler ile veya ek olarak dışarıdan alınması zorunlu olan besin ögeleri olarak tanımlanmasına rağmen, D vitamini bir dokuda üretilerek kan dolaşımına verilmesi, diğer dokular üzerinde etki göstermesi ve bu etkisinin “feedback” mekanizmalarla düzenlenmesi nedeniyle vitaminden çok steroid yapılı bir hormon olarak değerlendirilir. Yağda eriyen vitaminler arasında bulunmaktadır (Holick 1994).

1. 3. 1. Biyokimyası ve Fizyolojisi

Vitamin D’ nin 37 metaboliti mevcut olup bunlardan en iyi bilinen iki formu Vitamin D₃ (kolekalsiferol) ve Vitamin D₂ (ergokalsiferol)’ dir (Zempleni 2008). Vitamin D₃ üç adet çift bağa sahiptir ve erime noktası 84-85 °C’ dir. UV absorpsiyonu ise 265 nm’ de maksimumdur. Suda çözünmez (Rucker 2001). Vitamin D₂ ise dört adet çift bağa sahip olup kaynama noktası 121 °C’ dir. UV absorpsiyon ve çözünebilirlik özellikleri D₃ ile aynıdır (Zempleni 2008). Vitamin D ısıya, ışığa ve saklama koşullarına karşı duyarlıdır.

Vitamin D₃ hayvansal kaynaklıdır, UV ışınları yardımıyla deride sentezlenir. Vitamin D₂ ise bitki ve mantarlardan elde edilir. Yapılan araştırmalar insan vücudunda vitamin D₃’ ün vitamin D₂’ ye göre çok daha etkili olduğunu göstermiştir (Armas ve ark 2004, Lips 2006).

D vitamini yapısal olarak steroid hormonlara benzer. Steroidlerde B halkası kapalıyken, D vitamininde bu halka açıktır (Holick 2006). Vitamin D yan zincirindeki farklılık nedeniyle değişik formlara sahiptir ve biyolojik olarak inaktiftir. Vitamin D’ nin 25-hidroksikolekalsiferol [25-(OH)D₃] ve 1,25-dihidroksikolekalsiferol [1,25-(OH)₂D₃] metabolitleri mevcut olup bunlardan 1,25-

(OH)₂D₃ aktif formdur. 25-(OH)D₃, 1,25-(OH)₂D₃' ün 500-1000' de bir etkinliğine sahiptir, daha çok D vitamini deposu gibi davranır (Prosser ve Jones 2004).

1. 3. 2. Metabolizması

Normal koşullarda insan vücudunda bulunan D vitamininin % 90-95' i güneş ışınlarının etkisi ile derinin 290-315 nm dalga boyunda UV-B ışınlarına maruz kalması ile sentezlenir (Whiting ve Calvo 2005). Aynı zamanda bu dalga boyundaki güneş ışınları D vitaminini parçalayarak inaktif ürünlere dönüştürür. Bu mekanizma güneşlenmenin neden D vitamini toksisitesine yol açmadığını izah eder (Holick 2006).

RDA (alınması tavsiye edilen günlük doz) kişinin vücut yüzeyinin 30 dakika güneşe maruz kalması ile sağlanabilir. D vitamininin, % 80' inden fazlası derinin epidermis tabakasında, % 20 kadarı ise dermis tabakasında sentezlenir (MacLaughlin ve Holick 1985). Bu sentez fonksiyonu, ülkenin bulunduğu enlem, mevsimler, güneş ışınlarının yeryüzüne geldiği açı (zenith açısı), deri pigmentasyonu, hava kirliliği düzeyi, deriye sürülen koruyucu kremler, giyinme tipi gibi faktörlere bağlıdır (Holick 2006).

Vitamin D deride 7-dehidrokolesterol' den güneş yardımı ile sentezlenmektedir. 7-dehidrokolesterol UV ışınlarının etkisi ile deride önce previtamin D' ye sonra karaciğerde vücut ısı ile hızla 25-(OH)D₃' e, daha sonra ise böbrekte 1,25-(OH)₂D₃' e dönüşmektedir. Previtamin D, karaciğerde 25-hidroksilaz ve böbrekte 1-alfahidroksilaz enzimi tarafından hidroksillenerek aktif form olan 1,25-(OH)₂D₃' e dönüşür. 1-alfahidroksilaz aktivitesi paratiroid hormon (PTH) ve prolaktin tarafından artırılır. Bu enzimler p450 enzim ailesine aittir (Prosser ve Jones 2004).

25-hidroksilasyonunun % 90' ı karaciğerde, %10' u fibroblast, böbrek, duodenum ve kemik gibi diğer dokularda gerçekleşir. Böbrekte özellikle proksimal tübülüs hücreleri, 1-alfahidroksilaz enzimi açısından zengindir. Ayrıca meme dokusu, prostat, kolon ve makrofajlarda da 25-(OH)D₃' ün, 1,25-(OH)₂D₃' e dönüşebildiği gösterilmiştir (Holick 2001).

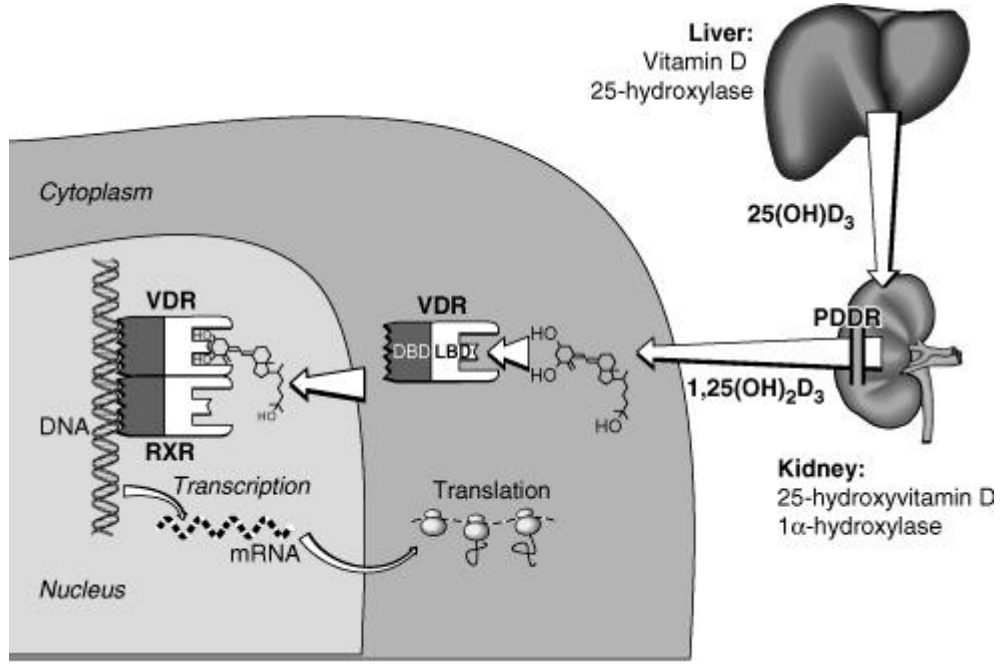
Vitamin D, safra varlığında ince bağırsak tarafından absorbe edildikten sonra lenf sistemiyle dolaşıma katılarak, karaciğer tarafından hızla alınır ve depolanır.

Kanın diğ er dokulara g ore daha y uksek konsantrasyonda vitamin D içerdiği bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda insan dokularından en çok yağ dokusunda daha sonra kas dokusunda vitamin D depolandığı bildirilmiştir (Rucker 2001).

D vitamininin katabolize olma yolu hem karaciğer hem de böbrekte 24-hidroksilasyondur. 24,25-(OH)₂D₃ daha polardır. Hızlı olarak böbrekten atılır. 1,25-(OH)₂D₃ ise 24-hidroksilasyonla “kalsitroik aside” dönüşür ve safra yolu ile atılır (Prosser ve Jones 2004, Zempleni 2008).

Oral yoldan alınan D vitamini şilomikronların yapısında kana geçerken, deride sentezlenen D vitamini, vitamin D bağlayıcı protein (VDBP)’ e bağlanarak taşınır (Prosser ve Jones 2004). Bu protein albumine benzerdir ve vitamin D metabolitleri olan 25-(OH)D₃, 1,25-(OH)₂D₃ ve 24,25-(OH)₂D₃’ e y uksek oranda afinite gösterir. VDBP alfa globülin yapısında olup karaciğerde yapılır. Östrojen kullanımı ve gebelikte VDBP düzeyi artar (Prosser ve Jones 2004).

Aktif metabolit 1,25-(OH)₂D₃ hücreye girer ve nükleer vitamin D reseptörüne (VDR) bağlanır. Bu kompleks retinoid reseptörüyle bir heterodimer oluşturur ve ilgili gen üzerindeki vitamin D duyarlı elemente bağlanır. Bu olayı transkripsiyon, translasyon takip eder ve kalsiyum bağlayıcı protein veya osteokalsin gibi proteinler meydana gelir. Nükleer VDR’ ler kas, deri, hematolenfopoietik ve sinir doku ile üreme, endokrin sistem dokularında mevcuttur. Ancak osteoklast hücrelerinde nükleer VDR bulunmadığından 1,25-(OH)₂D₃ bu hücreleri indirekt veya non-genomik bir mekanizma ile etkilemektedir. Benign, hiperplastik ve malignant epitelyal ve fibroblastik dokularda da 1,25-(OH)₂D₃ reseptörü mevcuttur. Birçok onkogen ürününü içeren elliden fazla proteinin 1,25-(OH)₂D₃ tarafından düzenlendiği bilinmektedir (Rucker 2001).

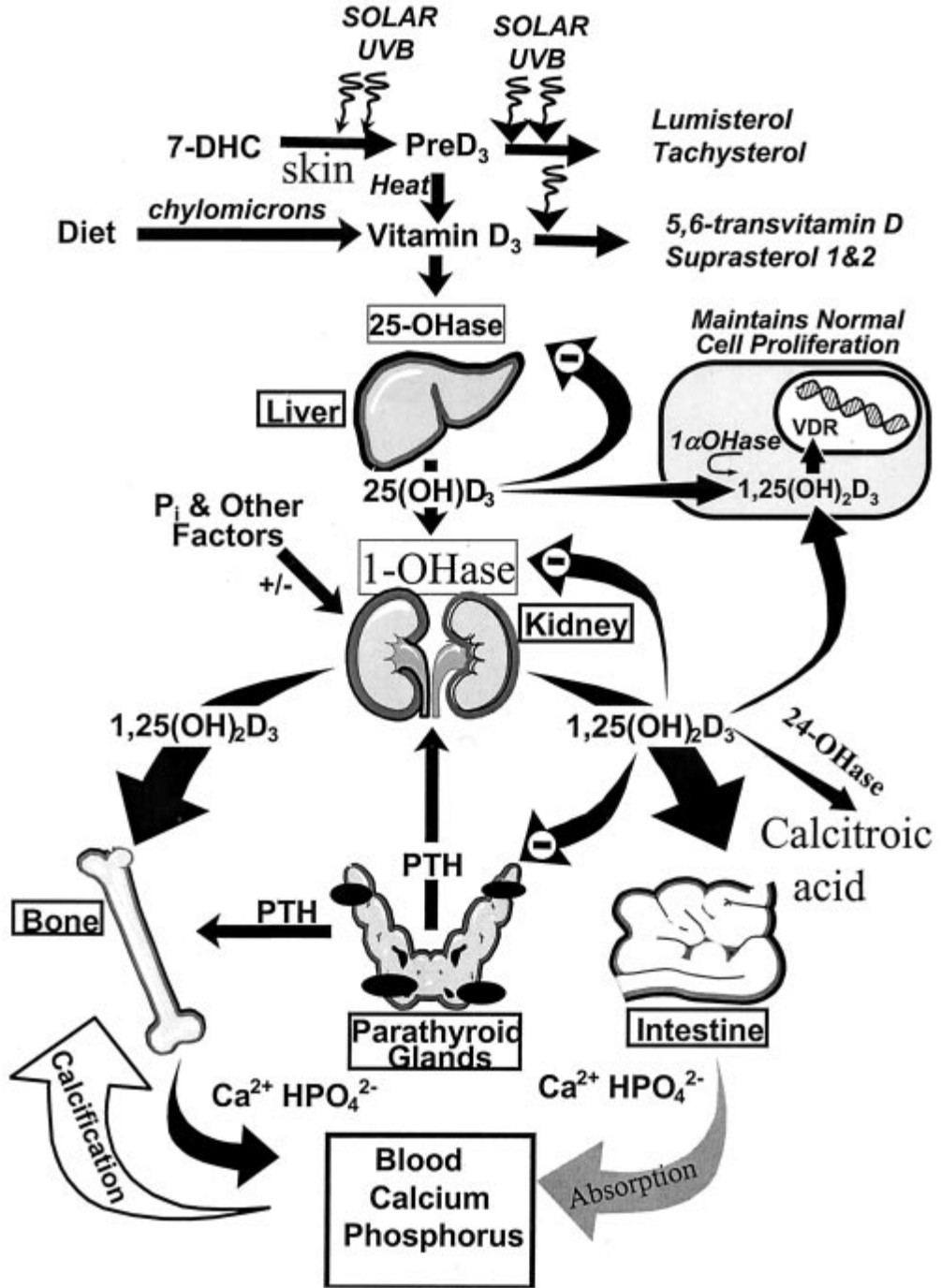


Şekil 1.2. D vitamini etki mekanizması (Brown ve ark 1999).

1,25-(OH)₂D₃' ün aktif kalsiyum transportu üzerindeki klasik etkisi ise bağırsak hücrelerinde gerçekleşmektedir. Kalsiyum hücreye membran proteinleri yoluyla girmektedir. Bağırsak hücresinde 1,25-(OH)₂D₃, reseptörüne bağlanmakta ve kalsiyum bağlayıcı protein sentezlenmektedir, bu da hücrede aktif transportu düzenlemektedir. Kalsiyum ATP (adenozintrifosfat)-bağımlı bir mekanizma ile ekstrasellüler sıvıya geçmektedir. 1,25-(OH)₂D₃ kemik, bağırsak, böbrek gibi hedef organlar üzerindeki etkisini göstermekte ve bu organlardan kana kalsiyum geçişini uyarmaktadır (Lips 2006).

Östrojen hormonu 1,25-(OH)₂D₃ üzerinde etkilidir. 1,25-(OH)₂D₃ östrojen salınımı ile artar, buna bağlı olarak kalsiyum absorpsiyonu da indirekt olarak artar. Dolayısıyla östrojen hormonu vitamin D reseptör fonksiyonunun düzenlemesinde görev almaktadır denilebilir (Karadavut ve ark 2002).

1,25-(OH)₂D₃' ün üretimi PTH tarafından uyarılmaktadır. PTH seviyesinin düşmesine neden olan negatif geribildirim mekanizması kalsiyum sayesinde olmaktadır. Diğer bir deyişle vitamin D, plazma membran reseptörleri ve MAP kinaz ya da siklik AMP gibi ikincil mesajcılar aracılığı ile de işlevini yerine getirmektedir (Lips 2006).



Şekil 1.3. D vitamininin deride sentezi, metabolizması ve kalsiyum homeostazı ile hücrel gelişimi düzenlemesi (Holick 2004).

1. 3. 3. Fonksiyonları

Vitamin D kemik gelişimi ve kalsiyum homeostazı için vazgeçilmezdir. Ayrıca, kasların fonksiyonlarının yerine getirmesinde, saçların büyümesinde, immün ve stress cevabın verilmesinde, melanin sentezinde, insülin ve prolaktin hormonlarının salgılanmasında, deri ve kan hücrelerinin farklılaşmasında önem

taşımaktadır. Vitamin D güçlü antiproliferatif, prodiferansiyatif, proapoptotik ve immünmodülatör etki göstermektedir (Özkorkmaz 2009).

1. 3. 4. D Vitamini Kaynakları

Güneş ışınları; UV ışınlarına maruz kalan yüz ve kol bölgesine ait deride 20 dakikada günlük 200 IU vitamin D sentezlenebilmektedir.

Besinsel kaynaklar; somon balığı, uskumru, ton balığı, sardalya gibi yağlı balık türleri, karaciğer, tereyağı, yumurta sarısı, süt, brokoli, yeşil soğan, maydanoz, su teresi ve mantar D vitamini yönünden zengindir (Dimitri ve Bishop 2007).

Ancak, şu unutulmamalıdır ki hiçbir gıda maddesi günlük ihtiyacı karşılayacak kadar D vitamini içermez. En önemli kaynak güneş ışınları etkisi ile deride sentez edilen D vitamindir. Anne sütündeki D vitamini 10-60 IU/L düzeyindedir ve tam olarak ihtiyacı karşılayamamaktadır (Henderson 2005, Holick 2007).

1. 3. 5. D Vitamini Düzeyleri

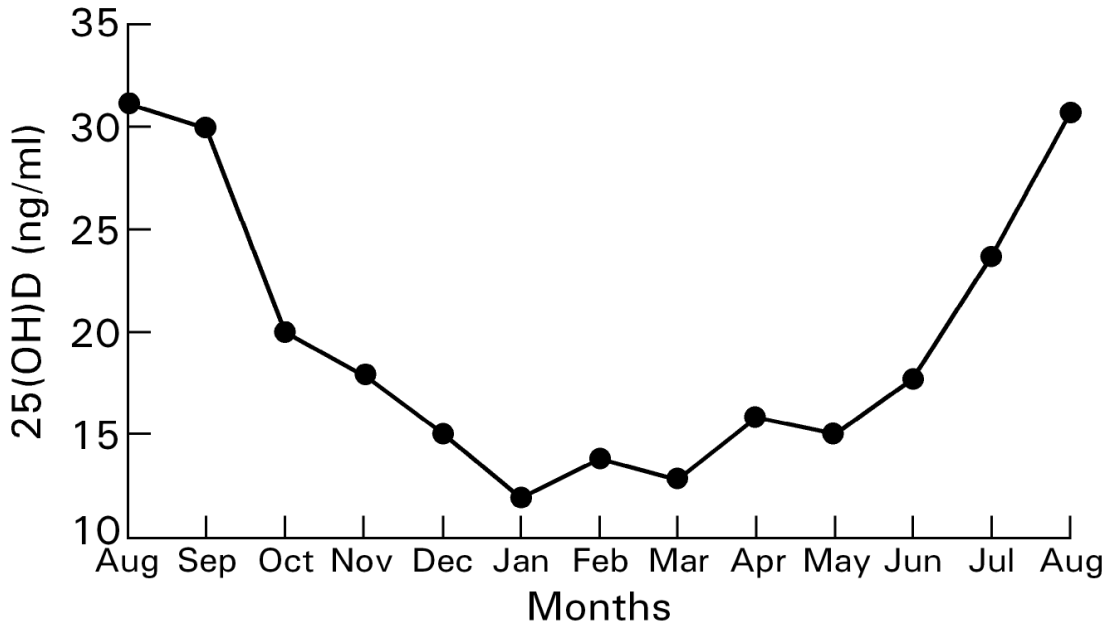
Kişide vitamin D düzeyinin normal, eksik veya fazla olduğunu anlamak için 25-(OH)D₃ düzeyine bakılmalıdır. 25-(OH)D₃ yarı ömrü 2-3 hafta olan major sirkülatuar formdur. Hem vitamin D alımını ve hem de endojen yapımı göstermektedir. Biyolojik aktif form 1,25-(OH)₂D₃ ise ideal ölçüm için uygun değildir. Çünkü, yarı ömrü 4-6 saat kadar kısa ve sirkülatuar düzeyleri 25-(OH)D₃' den 1000 kat düşüktür (Bouillon 2001).

Çizelge 1.2. Serumda kolekalsiferol seviyeleri.

25-(OH)D ₃	ng/ml	nmol/l
Eksik	<8	<20
Yetersiz	8-20	20-50
Optimal	20-60	50-150
Yüksek	60-90	150-225
Toksik	90	225

Vitamin D eksikliği, 25-(OH)D₃ düzeyinin 20 nmol/l' den az olması olarak tanımlanmaktadır. Her yedi ergin bireyden birinde vitamin D eksikliği olabileceği bildirilmiştir (Chapuy ve ark 1997). 25-(OH)D₃ 150 nmol/l üstünde olduğunda vitamin D intoksikasyonu görülmektedir. Ancak çok nadirdir (Shils 1988).

Vitamin D ve metabolitlerinin kandaki miktarı mevsimsel değişiklikler göstermektedir. Mevsimlere göre yapılan ölçümler 25-(OH)D₃ miktarında 1,25-(OH)₂D₃ formuna göre daha belirgin düşüşler olduğunu ortaya koymuştur (Vosatkova ve ark 2007).



Şekil 1.4. Mevsimsel 25(OH)D serum düzey değişiklikleri (Cannell ve ark 2006).

1. 3. 6. D vitamini ve Kanser

Yapılan in vitro ve in vivo çalışmalar, vitamin D ve analoglarının meme kanseri hücre tiplerinin çoğalmasını inhibe ettiğini, farklılaşmayı ilerlettiğini ve apoptozisi indüklediğini göstermiştir (Palmieri ve ark 2006).

Vitamin D yolağı tümör gelişimini baskılayıcı fonksiyona iştirak eder. Vitamin D etkisini çekirdek reseptör gen ailesinin bir üyesi olan vitamin D reseptörü (VDR) ile etkileşerek gösterir. VDR normal meme bezinde tanımlanmıştır (Welsh ve ark 2003). Bu reseptör DNA' da vitamin D cevap elementlerine bağlanarak, gen transkripsiyonunu kontrol eden transkripsiyon faktörünü aktive eden bir liganddır (Palmieri ve ark 2006). Vitamin D, VDR yoluyla hedef genlerin (p21, p27, c-fos ve

c-myc gibi) transkripsiyonunu modüle ederek, antikarsinojenik hareket gösterir (Abbas ve ark 2007).

VDR östrojen bağımlı proliferasyonun, farklılaşmanın oluşumunun önüne geçmede fonksiyon görür ve meme epitel hücrelerinde tümör gelişimini baskılamaya iştirak eder. D vitamini östrojen reseptörlerinin seviyelerini down-regüle ederek, 17 β -estradiol (E_2) aktivitelerini baskılar (Berube ve ark 2004).

Genel olarak hücresel, moleküler ve populasyon çalışmaları bulguları doğal olarak modüle edilen VDR' nin büyümeyi regüle edici gen olduğunu ve meme kanseri için bir hedef molekül olabileceğini savunmaktadır (Welsh ve ark 2003).

Neoplastik hücreler de VDR taşımaktadır. Sahip oldukları 1-alfahidroksilaz enzimi ile 25-(OH) D_3 düzeyi 30 ng/ml' den yüksek olduğunda 1,25-(OH) $_2D_3$ ü oluşturmaktadırlar. 1,25-(OH) $_2D_3$ ise kanseri azaltıcı özelliktedir. Proliferasyon, invazyon, anjiogenez ve metastaz üzerine azaltıcı; diferansiasyon ve apoptozis üzerine ise arttırıcı etkileri vardır (Larsen ve ark 2004).

1,25-(OH) $_2D_3$ formunun hücre döngüsünün düzenlenmesinde görev aldığı hatta G_1 fazına etki ettiği düşünülmektedir. Birçok siklin ve siklin bağımlı kinaz 1,25-(OH) $_2D_3$ formuna karşı muhtemel bir cevap vermekte, transkripsiyon faktörleri de olaya dahil edilmektedir. DNA replikasyonu ve tamirinde görev yapan bir seri gen bu şekilde aktive olmaktadır (Bouillon ve ark 2005).

Birçok gen fonksiyonu 1,25-(OH) $_2D_3$ tarafından düzenlenmektedir. Bu genler hücre proliferasyonu, diferansiasyonu, apoptozisi ve anjiogenezisi üzerine odaklanmaktadır. Bu genlere örnek olarak ostoekalsin, osteopontin, kalbindin, 24-hidroksilaz (CYP24), karbonik anhidraz verilebilir (Rucker 2001, Nagpal ve ark 2005).

1,25-(OH) $_2D_3$ malign hücrede görevini tamamladıktan sonra CYP24 genini stimule ederek kendi yıkımını başlatmaktadır. Malign hücrede görev yapan 1,25-(OH) $_2D_3$ dolaşıma geçememekte ve kalsiyum metabolizmasını etkilememektedir (Bouillon 2001, Giovannucci 2005, Holick ve Garabedian 2006).

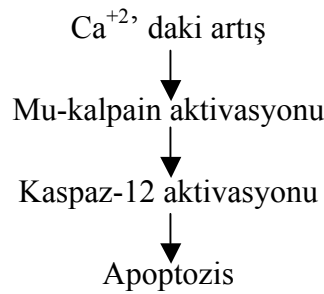
Ca^{+2} düzenleyici hormon 1,25-(OH) $_2D_3$ tarafından indüklenen kalsiyum sinyalleri kanser hücrelerinin akibetini tayin edebilir. Meme kanseri hücre tiplerinde

1,25-(OH)₂D₃, inozitol 1,4,5 trifosfat reseptör/Ca⁺² tahliye kanalı yoluyla ER depolarını tüketerek ve voltaj-duyarsız Ca⁺² kanalları yoluyla hücre dışı boşluktan içeriye Ca⁺² girişini aktive ederek, hücre içi Ca⁺² konsantrasyonunda devamlı bir artışı indükler.

Normal hücrelerde ise 1,25-(OH)₂D₃, voltaj-bağımlı Ca⁺² kanallarının aktivasyonu yoluyla meme kanseri hücrelerinde olmayan geçici bir Ca⁺² cevabına eşlik eder. Meme kanseri hücrelerindeki 1,25-(OH)₂D₃-indüklü devamlı Ca⁺² artışı apoptotik hücre ölümünün indüksiyonuyla ilişkilendirilmiştir fakat, normal hücrelerdeki geçici Ca⁺² artışında bu ilişki yoktur.

Meme kanseri hücrelerinde Ca⁺², un devamlı artışı Ca⁺²-bağımlı apoptotik proteazların, mu-kalpain ve kaspaz-12' nin aktivasyonu ile birleştirilmiştir. Mu-kalpain aktivasyonu her zaman kaspaz-12' nin ekspresyonunun/aktivasyonunun önünde bulunur ve kalpain ise kaspaz-12' nin aktivasyonu/çentiklenmesi için gereklidir. Bazı kalsemik olmayan vitamin D analogları (EB 1089 gibi) Ca⁺²-bağımlı apoptotik proteazları aktive ederek devamlı bir Ca⁺² artışını tetikler ve meme kanseri hücrelerindeki apoptozisi 1,25-(OH)₂D₃' le benzer bir tarzda indükler. Normal meme epiteli hücrelerinde ise 1,25-(OH)₂D₃-indüklü geçici Ca⁺² cevabına mu-kalpain ve kaspaz-12 aktivasyonu eşlik etmez (Sergeev 2005).

1,25-(OH)₂D₃ ile muamele edilmiş meme kanseri hücrelerinde yeni bir apoptotik yolak bulunmuştur:



1,25-(OH)₂D₃ ' ün bu apoptotik yolağı devamlı bir Ca⁺² artışı tarafından direkt olarak aktive ettiği savunulmuştur. Kanserli ve normal hücreler arasındaki Ca⁺² düzenleyici mekanizmalardaki farklılıklar, 1,25-(OH)₂D₃ ' ün ve vitamin D analoglarının Ca⁺²-aracılıklı apoptozisi, meme kanseri hücrelerinde normal hücrelere göre seçici olarak indüklemesinden kaynaklanmaktadır (Sergeev 2004, Sergeev 2005).

Yapılan çalışmalarda kuzey kutbunda yaşayan kişilerde kolon, meme, pankreas, prostat, akciğer ve hodgkin lenfoma gibi kanserlere yakalanma ve bu kanserlerden ölme riskinin güney kutbunda yaşayanlara kıyasla artmış olduğu görülmüştür (Ahonen ve ark 2000, Zmuda ve ark 2000, Luscombe ve ark 2001, Feskanick ve ark 2004, Giovannucci 2005, Holick 2006).

Prospektif ve retrospektif araştırmalar göstermiştir ki 25-(OH)D₃ düzeyi 20 ng/ml' den düşük olduğunda kolon, prostat, akciğer kanseri mortalitesi % 30-50 oranında artmaktadır (Ahonen ve ark 2000, Giovannucci 2005, Gorham ve ark 2005, Giovannucci ve ark 2006, Holick 2006).

Günde 1000 IU-25 µg vitamin D uygulanan kolon kanseri vakalarında riskin % 50, meme ve yumurtalık kanseri vakalarında ise % 30 oranında azaldığı gösterilmiştir (Garland 2003).

Çocukluktan itibaren güneş ışınlarından yararlanan veya işi dış ve güneşli mekanlarda olanlarda ve D vitamininden zengin beslenenlerde meme kanseri riskinin azaldığı (% 40-50) saptanmıştır. Ayrıca, 25-(OH)D₃ düzeyi 52 ng/ml üstünde olanlarda meme kanseri riski % 50 daha az bulunmuştur. Bu nedenle bazı araştırmacılar günde en az 1000 IU D vitamini alınmasını önermektedir (Giovannucci 2005).

Yapılan başka bir çalışmada da menapoz öncesi dönemde kalsiyum ve D vitamini alımının meme dansitesini azalttığı saptanmıştır. Meme dansitesinin yüksek olması meme kanseri riskini arttırmaktadır. Bu sonuçlar, özellikle genç kadınlarda yeterli miktarda D vitamini ve kalsiyum alımının meme kanserine karşı ek koruma sağlayabileceğini düşündürmektedir (Giovannucci 2005, Kim 2006).

1. 4. Apoptozis

Organizma sürekli bir denge halindedir. Yeni hücreler sentez edilirken, varolan hücrelerin bir kısmı hücre ölümü ile ortadan kaldırılmakta ve böylece denge korunmaktadır. Hücre ölümünün iki tipi vardır, bunlar apoptozis ve nekrozdur (Thompson 1995, Ameisen 1996) . Her ikisinde de düzenli olarak birbirini izleyen biyokimyasal ve morfolojik olaylar sonucu hücre ölümü meydana gelir (Kiess ve Gallaher 1998).

Apoptozis terimi ilk kez 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır (Kerr ve ark 1972). Kerr, fizyolojik olarak ölen hücrelerin çekirdeklerinde yoğunlaşmış kromatin parçalarını gözlemlemiş ve organellerin iyi korunduğunu fark ederek bu olayı büzüşme nekrozu olarak adlandırmıştır. Köken olarak “apo-TOE-sis” den gelmektedir ve eski Yunanca’ da “sonbaharda yaprak dökümü” anlamındadır (Touchette ve Fogle 1991).

Hücre proliferasyonu nasıl ki mitoz ile belirlenmekte ise, belirli bir dokuda olması gereken hücre sayısı da apoptozis ile belirlenir (Bellamy ve ark 1995, Cummings 1997). Apoptozis ve mitoz dokuda sürekli bir denge halindedir. Programlanmış hücre ölümü, hücre intiharı, fizyolojik hücre ölümü apoptozis ile aynı anlamda kullanılan terimlerdir (Schwartzman ve Cidloski 1993, Bellamy ve ark 1995, Majno ve Torisl 1995).

Wyllie, 1980 yılında deneysel apoptozisi, glukokortikoidlere maruz bırakılan olgunlaşmamış timus hücrelerinde gerçekleştirmiş ve apoptotik hücre DNA’ sının elektroforetik jel ayrımını yaparak, hücrede DNA bütünlüğünün kalmadığını, apoptotik hücre için karakteristik olan merdiven tarzında DNA bantlarının oluştuğunu göstermiştir (Wyllie 1980). 1993 yılında Cohen yüksek dozda kullanılan steroidlerin timus hücreleri üzerine etkilerini incelemiş ve timus hücrelerinin direkt olarak apoptozisi seçmediğini, hücre ölümüne neden olacak genleri oluşturarak hücreleri apoptozise yönlendirdiğini bildirmiştir (Cohen 1993a). Böylece apoptozisin genler tarafından düzenlenen bir hücre ölümü olduğu ortaya çıkmıştır (Cohen 1993b).

Nekrozda hücre şişer, mitokondri genişler, organeller çözünür, plazma membranı yırtılır. Sitoplazma materyali hücre dışına geçerek inflamasyona neden olur. Apoptozis sırasında ise plazma membranı yırtılmaz. Apoptozisin gerçekleşebilmesi için yüksek ATP seviyelerine ihtiyaç vardır. Hücre içi ATP seviyesi hücrenin apoptozis veya nekroz ile öleceğine yön verir. Bu da mitokondrinin önemini apoptozisin erken fazında göstermektedir. Eğer, hücre ciddi olarak yaralanırsa apoptotik yol için gerekli olan enerjiyi sağlayamayacak ve nekroz ile ölecektir (Lu ve ark 2000). Apoptozis, hücrenin intihar şeklidir ve hücre kendi kendini aktif olarak yok eder. Bu olay nükleer büzülme ve DNA fragmentasyonu ile karakterizedir (Gavrieli ve ark 1992, Lu ve ark 2000).

1. 4. 1. Apoptotik Hücrede Gözlenen Morfolojik Değişiklikler

1. Yüzey organellerinin kaybı

Apoptozise uğrayan hücrenin komşu hücrelerle bağları kesilir. Hücre yüzeyindeki mikrovillüsler ve diğer hücrelerle yaptıkları özel bağlar ortadan kalkar, hücre yüzeyi yuvarlaklaşır (Wyllie 1980, Balakumran ve ark 1996).

2. Hücre büzülmesi

Apoptotik hücre komşu hücreye göre daha küçük ve sitoplazması daha yoğundur. ER dışında diğer hücre organelleri yapılarını korur (Cohen 1993a). Sitoplazma yoğunluğu arttığı için organeller kalabalık görünür. Hücre zarı sağlam olduğundan nekrozda olduğu gibi bir inflamatuvar reaksiyon gözlenmez (Wyllie 1980, Cohen 1993b, Balakumran ve ark 1996).

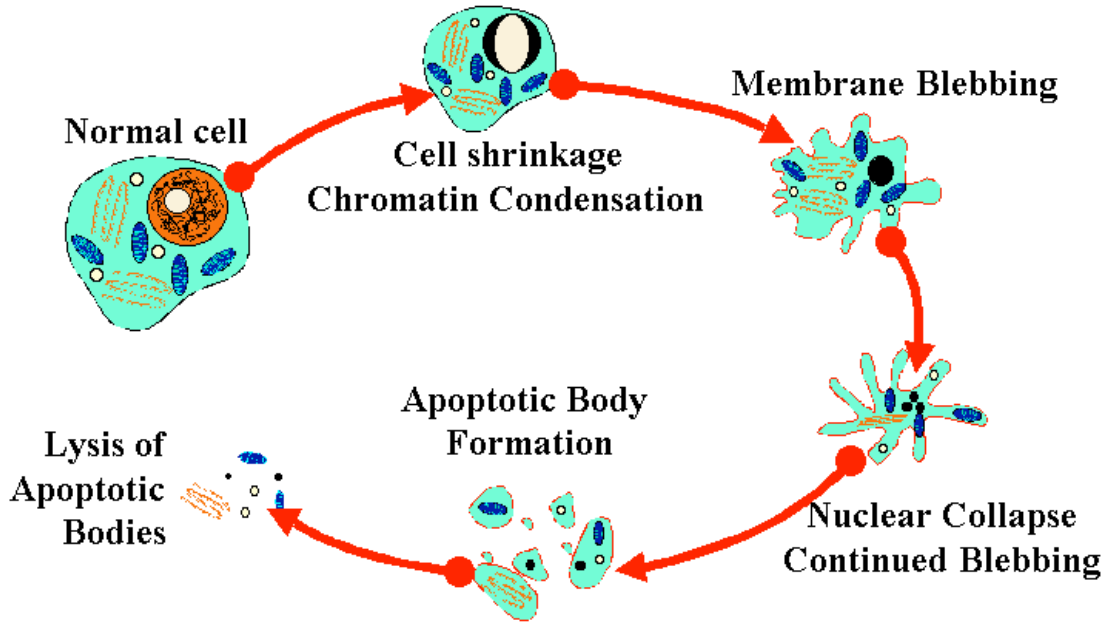
3. Kromatin yoğunlaşması

Önemli yapısal değişiklik çekirdekten başlayarak izlenir. Çekirdek apoptoziste odak noktasıdır. Hücreden hücreye değişmekle birlikte genellikle çekirdek büzülür (Cohen 1993a, Balakumran ve ark 1996). Kromatin çok yoğun bir hale gelir ve parçalar halinde bir araya toplanır. Çekirdek porları seçilemez. Çekirdek şekli düzensizleşir ve ileri evrede küçük çekirdek parçalarına bölünür. Çekirdekçik genişler ve granülleri kaba granüller halinde dağılır (Wyllie 1980, Cohen 1993b, Balakumran ve ark 1996).

4. Sitoplazmik baloncuklar ve apoptotik cisimlerin oluşması

Hücrede önce yüzeye doğru tomurcuklanmalar olur. Bunlardan bazıları sitoplazma parçacıkları içeren ve sıkı biçimde paketlenmiş organellerden oluşan zarla sarılı apoptotik cisimlere dönüşür (Cohen 1993b, Balakumran ve ark 1996). Apoptozis için morfolojik değişimler olan hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması, hücre membran tomurcuklanması olurken fosfatidilserin açığa çıkar. Sağlıklı hücrelerde plazma membranının içinde bulunan fosfatidilserin apoptotik hücrelerde plazma membranının dış yüzünde bulunur ve fagositik hücreler için sinyal görevi görür (Lu ve ark 2000).

Apoptosis (Programmed Cell Death)



Şekil 1.5. Apoptotik hücrelerdeki morfolojik değişiklikler (Balakumran ve ark 1996).

1. 4. 2. Apoptoziste Fagositoz

Ölüm mekanizması nasıl olursa olsun, ölü hücrelerin ortadan kaldırılması gerekmektedir. Gerek nekroz gerekse apoptoziste ölü hücre fagositozla ortadan kaldırılır. Apoptozis sırasındaki hücre zarı değişimleri komşu hücrelerin ölü hücreyi fagosit etmesi için gerekli tüm uyarıları verecek şekilde düzenlenir. Oluşan apoptotik hücreler, hücreler arası alana dağılırlar veya lümene dökülürler (Majno ve Torisl 1995). Dokuda 4-9 saat tanınabilir halde kalan apoptotik hücreler daha sonra fagozomlar içinde birkaç saat kadar görülebilir, sonra da sindirilemeyen materyal olarak kalır (Schwartzman ve Cidloski 1993, Majno ve Torisl 1995).

1. 4. 3. Apoptozis ve Nekroz Arasındaki Farklar

Apoptozis, hücrede yaptığı bu değişikliklerle nekrozun bir parçasıymış gibi algılanabilir. Ancak nekrozdan farkları şunlardır:

Fiziksel farklılıklar

1. Nekroz bileşik hücre gruplarını etkiler, oysa apoptoziste tek tek hücreler etkilenir (Spencer ve ark 1996, Cummings ve ark 1997).

2. Nekroz fizyolojik olmayan uyaranlarla başlar, apoptozis fizyolojik uyaranla da başlayabilir (örneğin, hormonal dengenin bozulması) (Wyllie 1980, Bellamy ve ark 1995).

3. Nekroza uğrayan hücre, çevreye yaydığı kemotaktik maddeler aracılığı ile çağrılan makrofajlar tarafından fagosite edilir. Apoptozise uğrayan hücre ise çevreye kemotaktik madde yaymaz; yanında bulunan epitelyum hücreleri veya makrofajlar aracılığı ile fagositoya uğrar.

4. Nekrozda inflamatuvar cevap vardır, apoptoziste ise yoktur (Bellamy ve ark 1995, Majno ve Torisl 1995, Cummings ve ark 1997).

Morfolojik farklılıklar

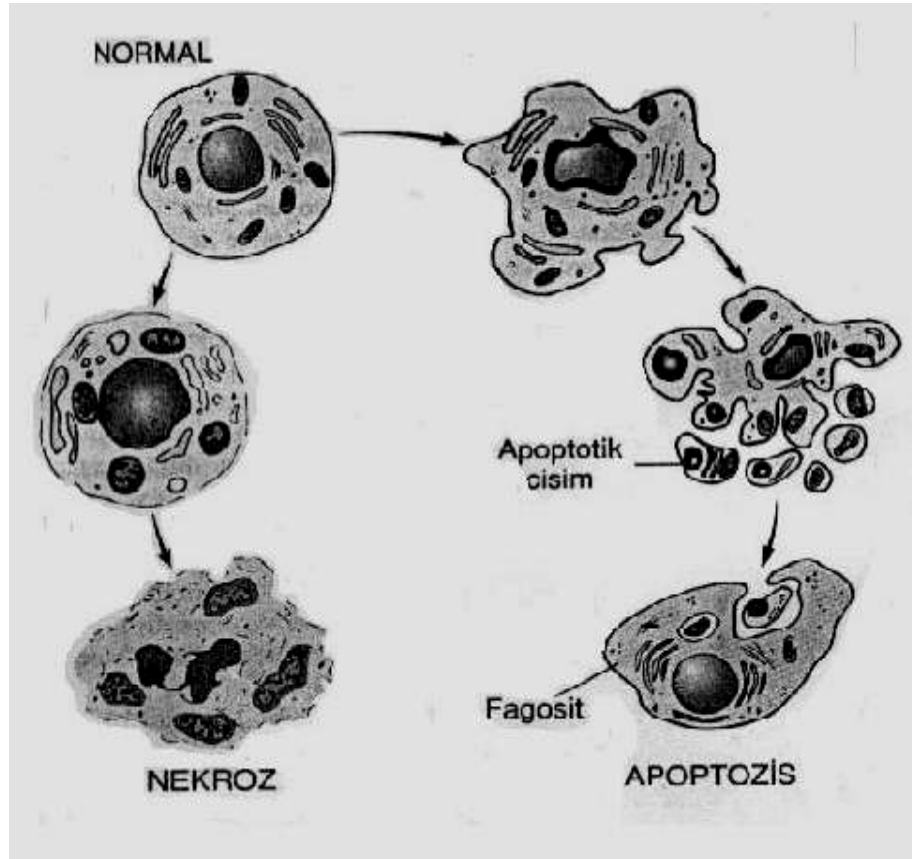
1. Nekrozda zar bütünlüğü bozulur, apoptoziste zarda kabarcıklar görülür fakat asla zar bütünlüğü bozulmaz (Cohen 1993b, Spencer ve ark 1996).

2. Nekroz sitoplazma ve mitokondride şişme ile başlar, apoptoziste ise sitoplazmada büzülme ve çekirdek yoğunlaşması görülür (Cohen 1993a, Cummings ve ark 1997).

3. Nekroz total hücre parçalanması ile sonlanır, oysa apoptozis hücrenin daha ufak fragmanlara (apoptotik cisimler) dönüşmesi ile sonlanır (Cummings ve ark 1997).

4. Nekrozda hücre zarında vezikül formasyonu yoktur, total parçalanma olur, oysa apoptoziste zara bağlı veziküller oluşur (Cohen 1993b).

5. Nekrozda organellerin devamlılığının bozulması mevcut iken, apoptoziste apoptozisi başlatan bcl-2 gen ailesinin ürettiği por oluşturan proteinlerin etkisi ile organeller bütünlüğünü korur, ancak delikli bir yapıya kavuşur (Cohen1993a, Cohen 1993b).



Şekil 1.6. Apoptozis ile nekroz arasındaki farklar (Cohen 1993b).

Biyokimyasal farklılıklar

1. Nekrozda iyon dengesi kaybolur, apoptoziste ise sıkı bir şekilde kontrol edilen enzimatik olaylar mevcuttur (Wyllie 1980).

2. Nekroz enerjiye ihtiyaç duymaz, pasif bir olgudur ve 4 °C’ de bile gerçekleşebilir. Apoptozis ise enerji gerektiren aktif bir olgudur ve 4 °C’ de gerçekleşemez (Cohen 1993b).

3. Agaroz jel elektroforezi yapıldığında, nekroz sırasında DNA’ nın rastgele sindirimi mevcuttur. Oysa apoptoziste rastgele olmayan, monooligonükleozomal parçalanma mevcuttur. Bu da agaroz jel elektroforezde apoptozis için karakteristik “ladder pattern” denen merdiven şeklinde kırılmalar meydana getirir (Wyllie 1980, Eastman 1995).

4. Nekroz sırasında hücre ölümünün geç bulgusu olan postlitik DNA parçalanması vardır (DNA, hücre bütünlüğü bozulmadan önce parçalanır).

Apoptoziste ayrıca mitokondri tarafından sitoplazmaya birçok faktör salınımı mevcuttur (sitokrom-c vb.) (Bortner ve ark 1995, Eastman 1995).

5. Nekroz sırasında nonspesifik zar parçalanması olurken, apoptoziste zar asimetrisinde değişiklikler olur (örneğin, fosfatidilserin zarın sitoplazmik yüzünden ekstraselüler yüzüne doğru yer değiştirir). Bu değişiklik apoptotik hücrenin inflamatuvar reaksiyon oluşturmada lokal hücrelerce tanınıp, fagosit edilmelerini sağlar (Cohen 1993b).

1. 4. 4. Apoptozis Mekanizmaları

Apoptozisin indüklenmesinde üç prototip sinyal yolu rol alır.

1. Mitokondri/sitokrom-c aracılı apoptozis oluşturulması

Mitokondri normal şartlar altında ATP oluşturmak üzere sitokrom-c ihtiva eder. Mitokondrial stres durumlarında serbestlenen sitokrom-c apoptotik hücre ölümünde kaspaz-3 aktivasyonu için önemli bir rol teşkil eder (Crowe ve ark 1997, Lou ve ark 1998, Li ve ark 2000, Lu ve ark 2000, Takagi ve ark 2003). Bu yolda mitokondri tarafından kontrol edilen apoptotik proteaz aktive edici faktör (Apaf-1) ve kaspaz-9 bulunmaktadır (Liu ve ark 1997, Hu ve ark 1999, Krajewski ve ark 1999). Kofaktör nükleotid trifosfat (d-ATP ve ATP) ile aktive edilen sitokrom-c ve Apaf-1 birleşerek prokaspaz-9' u aktive eder. Aktive kaspaz-9 da kaspaz-3' ü aktive ederek, diğer kaspaz kaskadının tetiklenmesini sağlar (Krajewski ve ark 1999, Keane ve ark 2001).

Sağlıklı bir hücre mitokondrisinin dış membranında bcl-2 proteini yer alır (Newton ve Strasser 1998, Choi ve ark 2001). Bcl-2, Apaf-1 proteininin bir molekülünü bağlar. Bcl-2 neden olduğu internal hasarla mitokondride çatlaklar oluşturarak Apaf-1 ve sitokrom-c salınımına yol açar. Bu iki protein kaspaz-9 moleküllerine bağlanır (Hu ve ark 1999, Krajewski ve ark 1999, Takahashi ve ark 1999).

Bu proteolitik aktivitenin kaskadı kan pıhtılaşması ve kompleman aktivasyonuna benzer. Terminal uç kaspaz-3' tür. Bu proteolitik aktivite ile sitoplazmada yapısal proteinlerin sindirimi, kromozomal DNA' nın degradasyonu ve

hücrenin fagositozu sağlanır (Nakatsuka ve ark 1999, Lu ve ark 2000, Keane ve ark 2001).

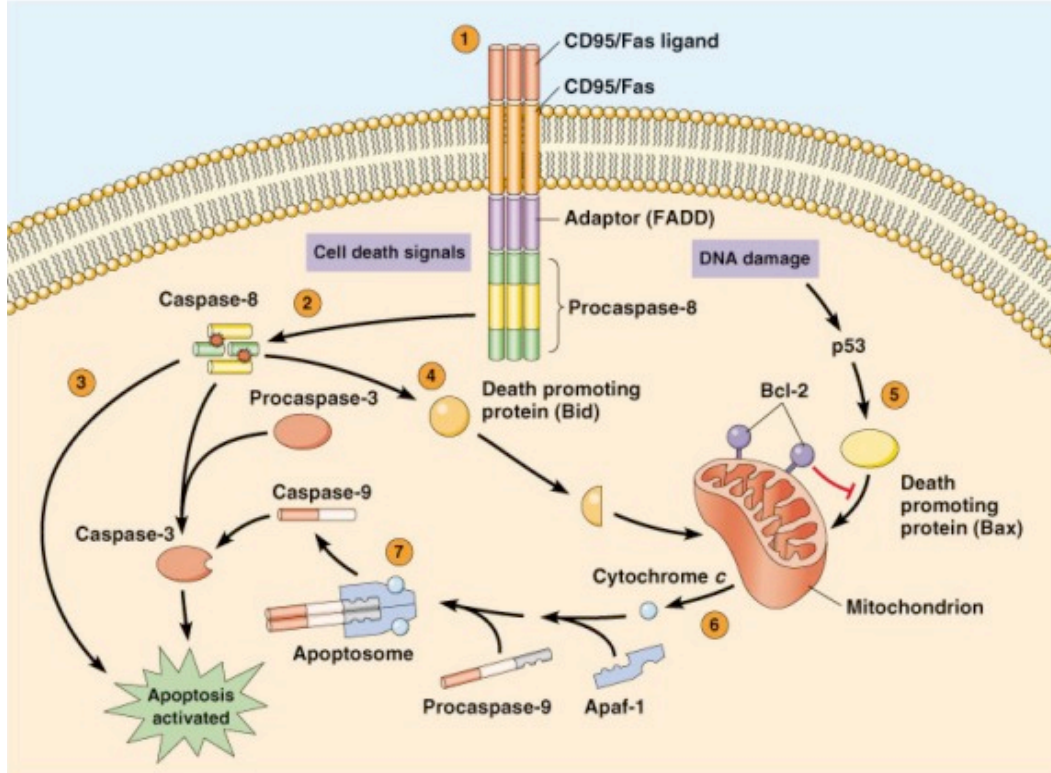
2. Dış sinyallerle apoptozisin tetiklenmesi

Birbirini tamamlayan ölüm aktivatörleri, Fas-ligand (Fas-L) ve Tümör nekroze faktörü (TNF)' nün hücre yüzeyindeki Fas ve TNF reseptörlerine bağlanmasıyla sitoplazmaya kaspaz-8' i aktive eden sinyaller yayılır. Kaspaz-8 (kaspaz-9 gibi) diğer kaspazları uyarır ve hücrenin fagositozuna yol açar (örneğin, sitotoksik-c hücrelerinin hedef hücre yüzeyine bağlanarak Fas ligand üretmesi sonrası oligodendrositlerde görülen apoptotik dejenerasyon, ölüm) (Lou ve ark 1998, Keane ve ark 2001). SCI reseptörleri Fas ve p-75 ile bağlantılıdır. Bu reseptörler tümör nekroz faktör reseptör (TNFR) gen ailesinin üyeleridir. Bunların apoptotik hücre ölümünü başlatan kaspaz kaskadını aktive ettiği bilinmektedir (Banasiak ve Haddad 1998).

Diğer sistemlerde de oligodendrositlerde olduğu gibi apoptozis oluşumunda Fas ve p-75' in sorumlu olduğu gösterilmiştir (Banasiak ve Haddad 1998). Fas reseptörünün, Fas ligand (Fas-L) ile karşılıklı etkileşimi FADD (Fas bağımlı ölüm domain proteini) aracılığı ile olur ve bunun sonucunda da kaspaz-8 aktive edilerek apoptotik döngü başlar (Kromer ve ark 1995, Banasiak ve Haddad 1998).

3. Endoplazmik retikulum aracılı apoptozis oluşturulması

Son zamanlarda amiloid β nörotoksisitesine katkıda bulunan kaspaz-12' ye bağımlı ER aracılı apoptotik yol tarif edilmiştir (Nakamura ve ark 2000, Keane ve ark 2001). Bu yol mitokondrial/sitokrom-c ve ölüm reseptör aracılı apoptozisten farklı bir yoldur. ER, hücre içi Ca^{+2} dengesi, sentezi ve membran proteinlerinin katlanmasını içeren birçok süreçte kritik öneme sahiptir (Nakamura ve ark 2000). Kaspaz-12, ER membranında lokalize olan ve ER aracılı apoptozis için esas teşkil eden bir kaspazdır. Son çalışmalar göstermiştir ki Ca^{+2} seviyelerinin yükselmesi ve kalpainin ER' i etkilemesi ile prokaspaz-12 aktiflenir. Ayrıca, kaspaz-7 salınımı ile de prokaspaz-12 salınımı arasında bir bağlantı bulunur. Aktiflenmiş kaspaz-12 sitoplazmaya yönelir. Kaspaz-9 ile karşılıklı olarak etkileşerek sitozolik kaspaz kaskadını aktive eder (Rao ve ark 2001).



Şekil 1.7. Apoptozis mekanizması (Kromer ve ark 1995).

1. 4. 5. Apoptozisin Genetik Kontrolü

Protoonkogenler normal hücre büyüme ve gelişmesini düzenleyen genlerdir. Bu genler aktive olup mutasyona uğradıklarında onkogen adını alır. Onkogenler, hücrenin aşırı büyüme ve bölünmesi doğrultusunda uyarımı gerçekleştirir. Hücrenin büyüme ve bölünmesini aktive edici genleri baskılayan ve dengeleyen genler ise adından da anlaşılacağı üzere tümör baskılayıcı genlerdir (Millerk ve ark 1990, Nowell 1990, Akins ve ark 1996). Son yapılan çalışmalar, bazı onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin programlı hücre ölümünü kontrol ettiğini göstermektedir (Caotes ve ark 1996). Omurgalılarda apoptozisi düzenleyen genler c-myc, p-53 ve bcl-2 ailesi (bcl-2, bax ve bcl-x) olarak bilinmektedir ve üretimini sağladıkları proteinler de aynı adlarla anılmaktadır (Wyllie 1995, Nakano 1997, Newton ve Strasser 1998, Choi ve ark 2001).

P-53: Apoptozisi düzenleyen bir gen olan tümör baskılayıcı p-53 geni, hipoksi ve serbest radikal oluşumu, p-53 aracılı DNA onarımı ve apoptoziste görevlidir (Banasiak ve Haddad 1998). DNA hasarı olduğu zaman S fazına geçişi bloke eder. DNA tamiri için zaman kazanılır, eğer tamir mümkün değilse

hasarlanmış hücreler apoptozisle yok edilir (Miyashita ve ark 1994, Spencer ve ark 1996, Nakano 1997).

C-myc: Bir transkripsiyon düzenleyici faktör olan c-myc proteini, ortamda bazı faktörlerin bulunmasına bağlı olarak hücrenin proliferasyonuna ve apoptozise uğramasına neden olur (Evan ve ark 1992). C-myc protoonkogeni bir hücrenin büyümesini programlar. Eğer hücrede hem c-myc hem de uygun büyüme faktörleri yoksa büyüme durur, her ikisi de yeterli ise çoğalma olur, c-myc olduğu halde büyüme faktörleri yoksa apoptozis görülür (Evan ve ark 1992, Schwartzman ve Cidloski 1993, Wagner ve ark 1993).

Bcl-2 ve bcl-xl: Bcl-2 ailesi apoptotik kaskadın kontrolünde en önemli gruptur ve bir düzineden fazla üyesi vardır (Newton ve Stasser 1998, Lu ve ark 2000). Bunlardan bazıları apoptotik aktivitenin öncüleri iken (bax ve bad), diğerleri antiapoptotik proteinlerdir. Bu proteinlerin seviyeleri hücrenin öleceğine veya yaşayacağına karar verir. Bcl-2 ailesi proteinlerinin etki yeri mitokondridir (Newton ve Strasser 1998).

Bcl-2 güçlü bir ölüm inhibitörüdür. Bcl-2 mitokondri membranı dışında, ER ve nükleer membranlarda bulunur. Antioksidan yolda mitokondriden sitokrom-c salınımını engellemede rol oynar (Korsmeyer 1992, Miyashita ve ark 1994, Newton ve Strasser 1998, Choi ve ark 2001).

Bcl-xl mitokondri membranı dışında lokalizedir. Bcl-xl ve bcl-2 beraberce mitokondri membran geçirgenliğini korurlar. Bcl-xl, proapoptotik proteinleri (bax ve bad) inhibe ederek apoptozisi engeller (Keane ve ark 2001). Kaspaz aktivasyonunu, Apaf-1 üzerinden önler (Newton ve Stasser 1998, Hu ve ark 1999, Lu ve ark 2000).

XIAP, cIAP1, cIAP2, NAIP: Antiapoptotik protein ailesinden apoptozis protein inhibitörleri omurgalı ve omurgasızlarda bulunmuş olup, bunlar programlanmış hücre ölümünün negatif düzenleyicileridir. Bazı memeli homologları; XIAP, cIAP1, cIAP2, NAIP, Bruce, Survivin, pIAP olarak tanımlanmıştır. Bunların çoğu hücre ölümünü kaspaz-3, kaspaz-7 ve kaspaz-9' a direkt olarak bağlanıp, onları inhibe ederek gerçekleştirirler (Keane ve ark 2001). Apoptozis protein inhibitörleri, kaspazları ölüm reseptörleri ve mitokondrial yol ile inhibe ederler (Li ve ark 2000, Keane ve ark 2001, Bao ve Liu 2003).

Bax, bad ve bid: Sağlıklı hücrede bax sitozolde bulunur. Apoptotik uyarı ile sitozolik bax mitokondriye yönelir ve çeşitli değişimler sonucunda bax' ın hidrofobik C terminal ucu açığa çıkar ve sitokrom-c salınımına neden olur. Kalpain tarafından bax salınımı uyarılarak sitokrom-c açığa çıkar (Miyashita ve ark 1994, Wingrave ve ark 2003).

Bad, sağlıklı hücrelerde mitokondri membranının dış zarında bulunur. Apoptozis sırasında bax değişime uğrar ve N terminal uç açığa çıkarken bcl-xl, bad' dan ayrılır (Takahaski ve ark 1999, Wingrave ve ark 2003).

Bid, bcl-2' yi inaktive etmek veya bax' ı aktiflemek üzere mitokondriye yönelir (Newton ve Strasser 1998). Endojen bid' in yarısı sitozolde erir. Diğer yarısı ise hücre içi membranlarda özellikle de ER' de bulunur (Li ve ark 2000, Lu ve ark 2000, Rao ve ark 2001).

1. 4. 6. Apoptoziste Hücre İçi Sinyal İletimi ve Metabolik Değişiklikler

Apoptotik sinyal iletimi ile ilgili bu güne kadar elde edilen bilgiler, hücre içi diğer sinyallerin iletiminden sorumlu olan bazı molekül ve enzimlerin, apoptozisteki sinyal iletiminde de rolleri olduğunu göstermektedir (Cohen 1993a, Eastman 1995).

Hücre içi sinyal iletiminde yaygın olarak kullanılan Ca^{+2} apoptoziste de rol oynar. Hücre içindeki Ca^{+2} iyonlarının miktarındaki artış hücreyi apoptozise götürmektedir (Cohen 1993a). Sitoplazmadaki Ca^{+2} iyonu miktarındaki hafif artış, c-myc, c-fos, ısı şok proteinlerini harekete geçirir ve hücrenin apoptozise gitmesine neden olur. Ca^{+2} adenilat siklazları aktive ve inhibe etme yeteneğine sahiptir (Brinley ve ark 1978, Bellamy ve ark 1995).

C-AMP ve protein kinazlar üzerinden de sinyal iletimi etkilenir. Hücre içi c-AMP konsantrasyonundaki artışın çeşitli hücre tiplerinde apoptozisi uyardığı bildirilmiştir. Ca^{+2} dan bağımsız olarak da apoptozis olabileceği gösterilmiştir (Bellamy ve ark 1995).

Sitoplazmada artan Ca^{+2} , inaktif durumdaki Ca^{+2} bağımlı proteazları ve nükleazları aktiveleştirerek sitoplazmik proteinlerin parçalanmasına ve apoptozise özgü internükleozomal DNA kırıklarına neden olur (Touchette ve Fogle 1991).

Ca^{+2} iyonu, inaktif durumdaki endonükleaz, proteaz, transglutamaz, fosfolipaz gibi latent enzimleri aktive ederek apoptozise neden olur (Earnshaw 1995).

Kalsiyuma bağlı endonükleazlar: Endonükleazlar sitoplazmada artan Ca^{+2} tarafından aktif hale getirilir. DNA zincirini, H1 histon bölgesinden 180-200 baz çifti ve katları uzunluğunda parçalara ayırır (Earnshaw 1995, Eastman 1995, Balakumran ve ark 1996, Collins ve ark 1997).

Transglutamazlar: Apoptoziste hücreler büzüşür ve küçük parçalara ayrılır. Bu parçalar, transglutamazların yaptığı protein çapraz bağlanmaları ile kimyasal maddelere karşı dayanıklı hale getirilir (Cohen 1993b, Bellamy ve ark 1995, Eastman 1995).

Proteazlar: Proteazlar histonları ve kromatin yapısını stabilize eden proteinleri parçalar (Collins ve ark 1997). Kalsiyum bağımlı nötral bir proteaz olan “kalpin” hücrenin iskelet yapısını bozar (Earnshaw 1995). Lizozomal bir proteaz olan katepsin-D apoptozisin geç evresinde ortaya çıkan bir endopeptidazdır ve lizozomların proteolitik aktivitesinin oluşumunda önemlidir (Cohen 1993a, Schwartzman ve Cidloski 1993).

Lipid modifiye edici enzimler: Normal hücrelerin plazma membranlarında fosfolipid asimetrisi vardır. Membran fosfolipidlerinin hücre dışında ve içinde kalan kısımları farklıdır. Bu asimetri ATP’ ye bağımlı fosfolipid translokaz enzimi tarafından sağlanır (Bellamy ve ark 1995). Apoptotik indüksiyon olduğunda bu enzim etkilenir ve zar asimetrisi bozulur. Makrofajlar hücreyi yabancı bir hücre olarak algırlar ve fagosite ederler (Bortner ve ark 1995).

Protein kinazlar: Protein fosforilasyonunda rol oynayan zar ve sitoplazma enzimlerinin apoptotik sinyallerin iletiminde önemli oldukları kanıtlanmıştır (Bellamy ve ark 1995). Bu enzimlerden protein kinaz-A, apoptozisi sağlarken, protein kinaz-C apoptozisi durdurur (Cohen 1993b, Eastman 1995).

1. 4. 7. Apoptozisin Görüldüğü Olaylar

Bazı organların biyolojik gelişimleri esnasında apoptozise rastlamak mümkündür. Örnek olarak, Müller ve Wolf kanallarının involüsyonu, kalp gibi bazı

iç organların lümenlerinin oluşması gösterilebilir (Bellamy ve ark 1995). Apoptozis ayrıca her türlü neoplastik oluşumda, hem büyüme hem gerileme döneminde görülebilir (Majno ve Torisl 1995). Hafif şiddette fiziksel ve toksik uyarılara maruz kalan dokularda da apoptozis görülür. Örnek olarak hipertermi, düşük doz sitotoksik ilaçlar, iyonize radyasyon, hafif travma, hafif hipoksi gösterilebilir (Bellamy ve ark 1995). Bu anlamda apoptozis spesifik bir uyarana maruz kalan hücrenin, bu uyarıma aktif olarak verdiği düzenleyici bir cevaptır (Cummings ve ark 1997). Apoptozisli hücreler sağlıklı doku içinde dağılmış şekilde bulunur (Cohen 1993a). Apoptozisin görüldüğü başlıca olaylar şunlardır:

Fizyolojik olaylar

1. Embriyogenez ve metamorfoz sürecinde programlı hücre yıkımı (fetus implantasyonu, organogenezis ve gelişim sürecinde yaşanan involüsyon) (Levison ve Hopvwood 1976).
2. Erişkinde hormona bağımlı involüsyon (menstrüel siklusta endometriyum hücrelerinin yıkımı, menopozda folikül atrezisi, laktasyonun kesilmesinden sonra meme bezlerinin rejenerasyonu) (Cohen 1993a).
3. Sürekli çoğalan hücre gruplarında hücre sayısının dengelenmesi amacı ile hücre azaltılması (barsak kripta epitelleri) (Cohen 1993a, Majno ve Torisl 1995).
4. İmmün hücrelerin seçimi (hem B hem de T hücrelerinin sitokin depleksiyonundan sonra ve timusun gelişimi sırasında otoreaktif T hücrelerinin ortadan kaldırılması) (Cohen 1993b).

Patolojik olaylar

1. Tümörlerde hücre ölümü (hem büyüme hem de regresyon aşamasında) (Cohen 1993b).
2. Hormonlara bağlı dokularda patolojik atrofi (kastrasyon sonrası prostat atrofisi, glukokortikoid kullanımı sonrası timusta lenfosit kaybı) (Bellamy ve ark 1995, Cummings ve ark 1997).
3. Parankimden zengin dokularda duktus tıkanmasından sonra patolojik atrofi (pankreas ve böbrek tübüllerinde olduğu gibi) (Schwartzman ve Cidloski 1993).

4. Sitotoksik T hücreleri ile oluşturulan hücre ölümü (otoimmün hastalıklar) (Cohen 1993b).

5. Çeşitli etkenlerle oluşan hücre ölümü (radyasyon, antikanser ilaçları, hipertermi, hipoksi, travma) (Schwartzman ve Cidloski 1993).

1. 4. 8. Apoptozis ile Hastalıkların İlişkisi

Son zamanlarda yapılan araştırmalarda apoptozisin hatalı regülasyonunun, kanser, AIDS, otoimmün hastalıklar, viral enfeksiyonlar, nörodejeneratif hastalıklar, kardiyovasküler hastalık, malformasyon ve yaşlanma etyolojisinde de rol oynadığı gösterilmiştir (Coolsaet 1980, Hetts 1998, Kiess ve Gallaher 1998).

Apoptozisin inhibisyonu ile ilişkili hastalıklar

1. Kanser: Foliküler lenfoma p-53 mutasyonları ile oluşan karsinomlar, hormon bağımlı tümörler, akciğer kanseri, prostat kanseri, over kanseri.

2. Otoimmün bozukluklar: Sistemik lupus eritematozus, immün ilişkili glomerulonefritler, otoimmün diabet, greft rejeksiyonu.

3. Viral enfeksiyonlar: Herpes virüs, poliovirus, adenovirus.

Apoptozisin aktivasyonu ile ilişkili hastalıklar

1. Nörodejeneratif hastalıklar: Alzheimer hastalığı, parkinson hastalığı, amiotrofik lateral skleroz, retinitis pigmentosa, serebellar dejenerasyon.

2. Miyelodisplazik sendromlar: Aplastik anemi.

3. İskemik hasarlar: Myokard infarktüsü, inme, reperfüzyon hasarı.

4. Toksik nedenli karaciğer hasarı.

5. AIDS.

1. 4. 9. Apoptozisin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler

1. Morfolojik görüntüleme yöntemleri

a) Işık mikroskobu kullanımı

Hematoksilen boyama

Giemsa boyama

- b) Floresan mikroskobu
- c) Elektron mikroskobu
- d) Faz kontrast mikroskobu

2. İmmünohistokimyasal yöntemler

- a) Anneksin V Yöntemi
- b) TUNEL Yöntemi
- c) M30 Yöntemi
- d) Kaspaz-3 yöntemi

3. Biyokimyasal Yöntemler

- a) Agaroz Jel Elektroforezi
- b) Western Blotting
- c) Flow Sitometri

4. İmmünolojik Yöntemler

- a) ELISA
- DNA fragmentasyonu
- M30 düzeyi
- b) Flourimetrik Yöntem
- Kaspaz aktivasyonu

5. Moleküler Biyoloji Yöntemleri

DNA microarrays

Apoptozisin belirlenmesine yönelik geliştirilen tüm metodları, 2000' li yılların başlarında, sadece apoptotik epitelyal hücrelerde olmak üzere kaspaz aktivitesiyle kırılan bir protein olan CK-18' in kırıldıktan sonraki özgün formunu saptayan antikorlar kullanılarak daha spesifik olarak saptanması takip etmiştir (Güleş ve Eren 2008).

1. 4. 10. Apoptozis ve Kanser

Organların fonksiyonlarının devamlılığı açısından hücre proliferasyonu ve hücre ölümü arasındaki homeostaz kritik bir rol oynar. Bu denge; immunotolerans, onarım ve yaşlanma prosesleri sırasında fizyolojik olarak değişmektedir. Hücre

proliferasyonu ve ölümü arasındaki dengesizlik hücrelerin apoptozise karşı direnç oluşturmaya ve proliferasyon olarak klonal genişleme sonucu malign oluşumlara yol açmaktadır. Karsinogenezde öncelikle hücre ölümü hücre proliferasyonuna paralel olarak artmaktadır. Hücre ölüm mekanizmaları bozulduğunda tümör büyümeye başlayarak etrafındaki lokal yapıları invaze eder (Hengartner 2000).

Malign tümörlü olgularda uygulanan terapötik stratejilerin amacı proliferasyon ve dejenerasyon arasındaki dengenin tekrar sağlanmasıdır. Kemoterapötik ajanların yol açtığı hücre hasarı, normal hücre siklusunun durması, onarım mekanizmalarının yetersiz olması ve aktif apoptotik hücre ölümünün indüklenmesidir.

Hücre ölümü ve proliferasyonu ile ilgili markerlerin tayini karsinogenez prosesi ve antitümör tedavisine karşı verilen cevabın etkinliği ile ilgili bilgi verir. Normal fizyolojik koşullar altında gelişen apoptozis sonrası oluşan hücre ölümü ile ortamdaki hücre artıkları makrofajlar ve komşu hücreler tarafından uzaklaştırılır. Malign durumlarda bu denge bozulur ve hücre artıkları dolaşımda birikmeye başlar (Hengartner 2000, Holdenrieder ve Stieber 2004).

1. 4. 11. Apoptotik Markerler

Apoptozis sırasında ölü hücreye ait ürünler dolaşıma geçer ve hem serum hem de plazmada saptanabilirler. Kanser olgularında en sık araştırılan markerler arasında apoptozis reseptörlerinin çözünebilir formları, sFas ve bunun ligandı olan Fas-L, çeşitli sitokeratinler ve dolaşımdaki DNA fragmanları yer alır. Bu parametrelerin dolaşımdaki miktarı organa veya tümöre spesifik olmamakla birlikte tayinlerinin kolay olması nedeniyle tanıda, prognozda, tedavinin izlenmesinde ve hastalığın nüksünün saptanmasında faydalı olabileceği öne sürülmektedir (Stieber 2001, Holdenrieder ve Stieber 2004).

1. 4. 12. Sitokeratinler

Sitokeratinler, epitelyal dokuda intrasitoplazmik hücre iskeletini oluşturan ara filamanlardır. Biyokimyasal özellikleri birbirinden farklı 20 polipeptit tanımlanmıştır. Moleküler ağırlıkları 40-68 kDa, izoelektrik pH' ları 4,9-7,8 arasında değişmektedir. Düşük moleküler ağırlıklı asidik tip I ve yüksek moleküler ağırlıklı bazik veya nötral tip II sitokeratinler olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Sitokeratinler

genellikle biri tip I ve diğeri tip II sitokeratinden oluşan çiftler halinde heterotetramerleri oluştururlar. Yüksek moleküler ağırlıklı bazık veya nötral tip II sitokeratinler; CK-1, CK-2, CK-3, CK-4, CK-5, CK-6, CK-7, CK-8 ve CK-9 alt tiplerini kapsamaktadır. Düşük moleküler ağırlıklı asidik tip I sitokeratinler ise CK-10, CK-12, CK-13, CK-14, CK-16, CK-17, CK-18, CK-19 ve CK-20' dir.

Sitokeratinlerin ekspresyonu çoğunlukla organ ve dokuya spesifiktir. Sitokeratinler 30 geni kapsayan bir gen ailesi tarafından kodlanmaktadır. Epitel hücrelerinde başlıca CK-8, CK-18, CK-19 ve CK-20 eksprese edilmektedir (Van Muijen ve ark 1986, Manisha ve ark 2008).

Sitokeratin fragmanları içerisinde CYFRA 21-1 (sitokeratin 19-fragmanları) en sık kullanılan molekül olup, bunu sırasıyla; doku polipeptidine özgü antijen (TPS, sitokeratin 18-fragmanları) ve doku polipeptid antijeni (TPA, sitokeratin 8-, 18-, ve 19-fragmanları) izler. TPA, düşük molekül ağırlıklı epitelyum ile ilişkili sitokeratinlerin bir karışımıdır.

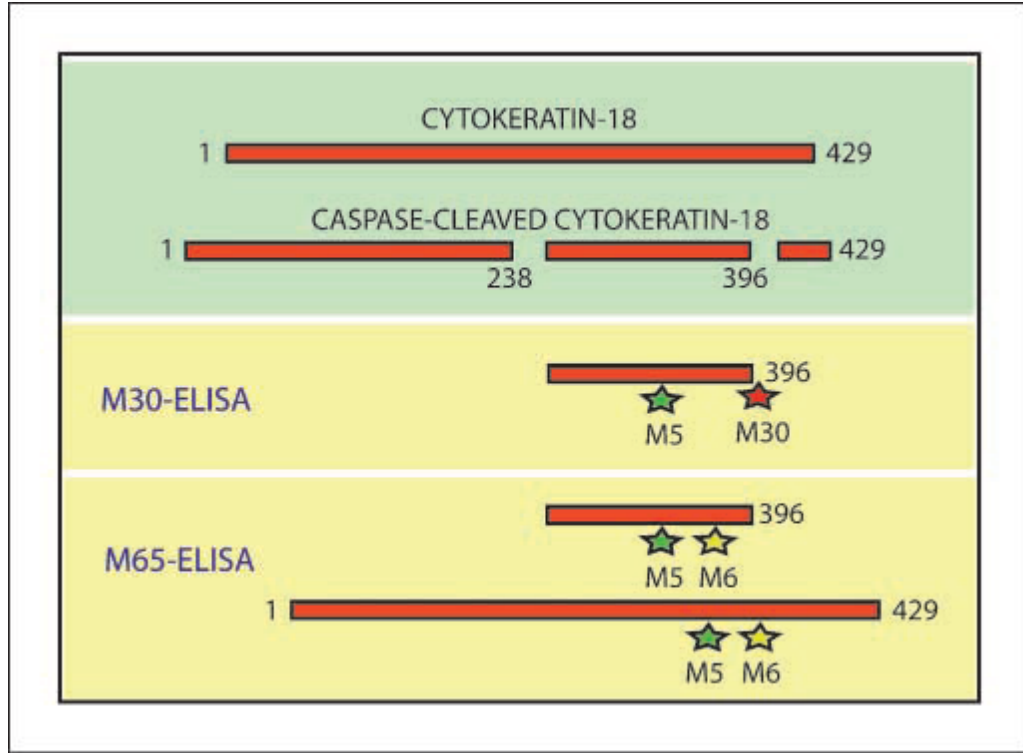
Vücut sıvılarında çözünebilir sitokeratin protein fragmanlarının tespit edilmesinin klinik önemi, hastalığın nüksünün erken tespiti ve epitelyal hücre karsinomlarında tedaviye cevabın hızlı tayin edilmesinde yarar sağlamasıdır. Bazı tip kanserler için tedaviyi göstermesi ve terapiye cevabı değerlendirmenin yanısıra, erken prognostik bilgi, kısmen tümör progresyonu ve metastaz oluşumunda da önemli olabilir.

Bu moleküller, küçük hücreli akciğer kanseri, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, mesane, servikal, nazofarengeal, özofagus, gastrik, kolanjiyosellüler, karaciğer, kolorektal, meme ve over kanseri gibi çeşitli kanser türlerinde artmakta ve tümör safhası ile korelasyon göstermektedir (Barak ve ark 2004).

1. 4. 13. Sitokeratin-18

CK-18, non-skumöz epitelde ve adenokarsinomlar ve duktal karsinomların çoğunda pozitif olan asidik keratindir. Skumöz hücreli karsinomlarda negatiftir. CK-8 ile kombinasyon halinde bulunmaktadır. CK-18 apoptozis sırasında kaspazlar tarafından çentiklenir ve bir monoklonal antikora "M30" spesifik kaspaz çentikli formuna dönüşür. Hücre ölüm metodunun apoptozis mi yoksa nekroz mu olduğunu anlamak için hücrelerden salınan kaspazla çentikli olan veya olmayan CK-18' in

moleküler formu sırasıyla, M30-Apoptosence ve M65 ELISA ile tespit edilir (Linder 2007).



Şekil 1.8. Apoptozis sırasında CK-18' in ASP238 ve ASP396 pozisyonunda kaspazlar tarafından çentiklenmesi (Olofsson ve ark 2007).

CK-18 yakın çalışmalarda kanser hastalarının sitotoksik antikanser ilaçlara cevabını değerlendirmek üzere kullanılmıştır. CK-18 antikanser ilaçların klinik denemeleri sırasında bir cevap biomarker olarak ilgi çekmektedir. Mükemmel antijen stabilitesi ve epitele özgü spesifikliğı bu biomarkerı ilgi çekici yapmaktadır (Linder 2007). Meme, gastrointestinal kanal, akciğer, pankreas, over ve tiroid gibi epitelyal kanserlerde kullanılmaktadır.

Meme kanserinde CK-18 ekspresyonu CK-8 ile birlikte özellikle luminal hücrelerden köken alan tümörlerde görülmektedir (Lacroix 2006). Primer meme tümörlerinde CK-18 ekspresyonu ile metastatik potansiyeli arasında ilişki bulunmuştur. Yüksek oranda CK-18 ekspresyonuna sahip tümörlerin metastatik potansiyeli düşüktür. Metastatik tümörlerde ise CK-18 ekspresyonu down-regüle edilmektedir. CK-18 ekspresyon kaybı, tümör hücrelerinin daha mobil olmasına neden olmakta ve meme tümörlerinde prognostik önemi olduğu düşünülmektedir.

CK-18 ayrıca, meme kanserinde bazı kemoterapi ajanlarına yanıtın değerlendirilmesi için kullanılmıştır (Schaller ve Fuchs 1996, Woelfle ve ark 2004, Lacroix 2006).

1. 5. Isı Şok Proteinleri

1962 yılında F. Ritossa, meyve sineğinin (*Drosophila melanogaster*) larvalarının tükrük hücrelerinde ısı şok cevabının spesifik gen aktiviteleri sonucu oluştuğunu bildirmiştir. Bu genlerin ilk ürünlerine “ısı şok protein” ismi 1974 yılında verilmiştir (Tissieres ve ark 1974).

Stres proteinleri olarak da isimlendirilen ısı şok proteinleri, bütün canlılarda ve hücrelerde bulunan bir grup proteindir. Yüksek sıcaklık, soğuk ve oksijen yetersizliği gibi çeşitli çevresel stres faktörleri altında, hücrede bu proteinlerin sentezi artar. Isı şok proteinleri hücrenin strese karşı direncini güçlendiren proteinlerdir. Molekül ağırlıkları 15 kDa ile 110 kDa arasında değişen bu proteinler normal koşullar altında hücrelerde bulunurlar. İnsanlar, bitkiler ve bakteriler benzer ısı şok protein yapısına sahiptirler. Isı şok proteinler molekül ağırlıkları, yapıları ve fonksiyonlarına göre sınıflandırılırlar (Henle ve ark 1998, Moseley 2006). Molekül ağırlıklarına göre HSP-100, HSP-90, HSP-70, HSP-60 ve HSP (15-30 kDa) olarak 5 gruba ayrılır (Banerji 2009).

Stres proteinleri büyüme, farklılaşma, bölünme, hatta hücre ölümü dahil hücre metabolizmasının tüm evrelerinde hayati önem taşıyan bir protein ailesidir. Ortak özellikleri hücrelerin ani sıcaklık değişimleri, anoksi, reaktif oksijen metabolitleri, glukoz düzeyi değişiklikleri, ağır metaller, kuraklık, tuzluluk gibi çevresel faktörlere maruz kaldıklarında üretilmeleridir. Ayrıca, ateş, yangı, iskemi, hipertrofi, hücre hasar ve malignensi gibi hastalık durumlarında HSP’lerin üretimi artar.

Bütün canlıların hücreleri tarafından üretilen bu proteinlerin yapısı evrim boyunca korunmuştur. İnsandan bakteriye kadar tüm canlılarda bulunduğu artık bilinmekte olan ısı şok proteinler ve ısı şok cevabı biyoloji ve tıpta özellikle kanser ve yangısal hastalıklarda önemli bir araştırma konusudur (Henle ve ark 1998).

Hücrelerin 42 °C’lik fetal olmayan ilk şok doza maruz kaldıktan sonra fetal doz olan 46 °C’ye de kolay uyum sağladıkları gözlenmiştir. İlk şoka maruz kalan hücrelerin daha sonra normal protein sentezini durdurarak yeni bazı proteinlerin

sentezine başladıkları saptanmıştır. Yüksek ısı şok protein seviyeleri sadece stresin başlangıç dönemlerinde görülür. Hücre ilk şoktan sonra yüksek ısıya maruz kalmaya devam etse bile, ısı şok protein seviyeleri düşmeye başlar ve sonuçta normal seviyelerine iner. Artmış ısı şok protein seviyeleri mRNA sentezine, stabilitesine ve bu durumun devamına imkan sağlar. Çevresel faktörler değiştikçe, ısı şok cevabı da farklı adaptasyonların oluşmasına katkıda bulunur (Moseley 2006).

Yüksek HSP düzeyi hastalıklara karşı hücre savunma mekanizmalarının uyarılması, gen tedavisi ve şaperon düzenleyici reajanlar gibi tedavi yaklaşımları için muhtemel bir hedef olarak düşünülmektedir (Clark ve Muchowski 2000).

Stres boyunca çok sayıdaki enzim ve yapısal proteinde zararlı yapısal ve fonksiyonel değişim meydana gelmektedir. Bu sebeple stres altında bulunan hücrelerin hayatta kalmasında, proteinlerin kendi fonksiyonel konformasyonlarını sürdürmek, doğal olmayan proteinlerin toplanmasını önlemek, denatüre proteinlerin yeniden yapılanması ile tekrar fonksiyonel yapılarına dönmeleri ve fonksiyonel olmayan ama zararlı olabilecek peptidlerin ortadan kaldırılması önemlidir. Böylece, şaperonlar hücresel korumada tamamlayıcı rol oynamak ve bazen bir arada çalışmak suretiyle proteinleri stresten korumaktadır (Wang ve ark 2004).

Yüksek sıcaklık, pH değişiklikleri, oksijen eksikliği gibi stres faktörleri altında proteinlerin fonksiyonel yapılarının korunması oldukça zordur. Protein katlanmalarında açılmalar meydana gelir. Bu proteinler hücrede karşılaştıkları diğer proteinlerle yapışabilir ve kümeler meydana getirirler. Konformasyon bozukluğu nedeniyle proteinler fonksiyonlarını kaybeder. Isı şok proteinleri bu denatüre proteinleri tutarak toplanmalarını engeller. Isı şok proteinleri; kuvvetli hidrojen bağları, güçlü hidrofobik etkileşimleri ve çift kutuplu heliks stabilitelerinden dolayı denatüre olmazlar (Henle ve ark 1998).

1. 5. 1. Isı Şok Proteinlerinin Tayin Yöntemleri

1. Elektroforez
2. PCR
3. ELİSA
4. Western Blotting (Pockley 2001).

1. 5. 2. Isı Şok Proteinlerinin Görevleri

Isı şok proteinleri hem hücre içerisinde hem de hücre dışında fonksiyon gösterirler.

Hücre içi görevleri:

HSP' lerin normal görevleri hücre içerisinde proteinlerin katlanmasına yardım ederek ve proteinlerin hazırlanmasını düzenleyerek, her proteinin bağlayıcı olmasını sağlamaktadır. HSP' ler hücre içerisindeki peptidleri kuşatarak sınırlandırılmalarını sağlar. Peptidler hücre içersine HSP' ler ile alınır. Bu proteinler hücreşel şaperonlar gibi fonksiyon görürler, protein sentezinde ve taşınmasında rol oynarlar. Çünkü, bu proteinler benzersiz hücreşel yerleşime sahiptir (Pockley 2001).

Hücre dışı görevleri:

HSP' ler hücre içerisinde normal olarak bulunurlar. Hücre dışında ise hücrelerin öldüğü ve içeriğı dışarı atıldığında bulunurlar. Bu dağınik hücrelerin planlanmamış ölümü nekroz olarak adlandırılır ve hücrede sadece hatalı eylemler meydana getirir. Hücre dışındaki HSP' lerin hastalık veya enfeksiyona karşı bağışıklık sistemini uyarmak için çok güçlü indükleyici etkileri vardır.

1. 5. 3. Isı Şok Faktörü (HSF)

Isı şok proteinin gen transkripsiyonu, ısı şok faktör transkripsiyon faktörleri ile ısı şok protein gen promotor bölgelerindeki ısı şok elementlerinin etkileşimi aracılığı ile sağlanır. Normal koşullar altında ısı şok faktör-1 (HSF-1) sitoplazma içinde DNA' ya bağlı olmayan bir monomer molekül gibi bulunur. Stres koşulları altında HSF-1, DNA' ya bağlanma kapasitesine sahip olmak için üç fosfatlı forma dönüştürölür ve sitoplazmadan çekirdeğe geçer. Çekirdekte HSF-1, DNA' nın promotör bölgelerine bağlanır. Böylece, HSP geninin transkripsiyonunu sağlayarak, HSP sentezini arttırır. HSF' nin 3 sub grubu vardır (Pockley 2001).

1. 5. 4. Memelilerdeki Bazı Isı Şok Proteinleri ve Fonksiyonları

HSP-110: Isı şoku durumunda nükleolustaki rRNA ile bağlantı kurar.

HSP-100: Fizyolojik koşullar altında bu protein moleküler şaperonlar gibi fonksiyon göstererek, proteinlerin yeniden düzenlenmesinde görev alır. HSP-100 protein kümelerini ayırmak için onları eritir (Pockley 2001) .

GRP-94: Golgi aparatı ve plazma membranında HSP-90 benzeri fonksiyonlara sahiptir.

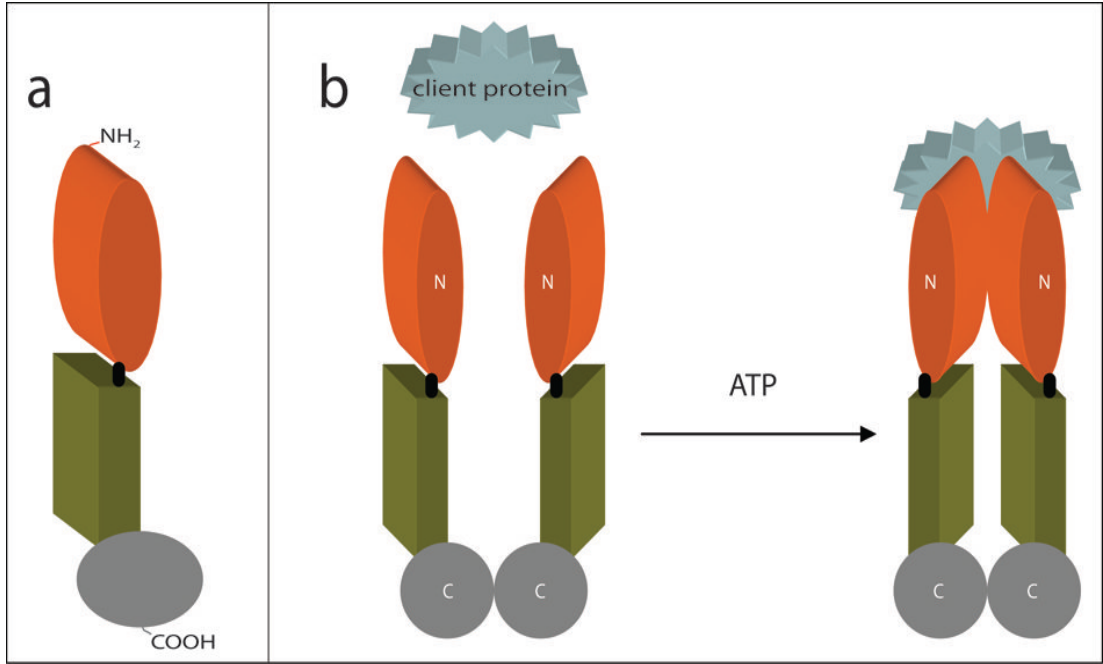
HSP-90: HSP-90 hücredeki bütün proteinlerin % 1 ve 2' sini tutan önemli bir şaperon moleküldür (Banerji 2009). Sitoplazma ve ER' da bulunur. ER' da en fazla bulunan ısı şok proteinidir. İnsanlarda, sitozol içerisinde HSP-90 α ve HSP-90 β olmak üzere iki izoformu vardır. HSP-90 β , HSP-90 α ' dan daha fazla bulunur. HSP-90, aynı zamanda HSP-82, HSP-83 ve HSP-89 olarak da bilinir. HSP-90' nın yapısında 3 önemli bölge vardır; NH₂-terminal bölge (24-28 kDa), orta bölge (38-44 kDa) ve COOH-terminal bölge (11-15 kDa). Bu bölgelerin birincil fonksiyonları sırasıyla; ATP-bağlama, client protein bağlama ve dimerizasyondur (Banerji 2009).

HSP-90 proteinlere bağlanarak onların aktivasyonunu ve katlanmasını düzenler. Geri katlanan peptidlerin kümeleşmesini önler. Hücrenin yaşam sürecinin yenilenmesini ve immünesinin devamlılığını sağlar. ATP' yi bağlar, ancak ATPaz aktivitesi bilinmemektedir. HSP-90, HSF-1' in fizyolojik koşullarda durumunun dengelenmesinde görev alır (Wang ve ark 2004).

HSP-90, yüksek ısılarda oligomerik şekilde artan bir aktiviteye sahip, hedef proteinle kompetitif fazda etkileşen, moleküler şaperon olarak tanımlanır. Fonksiyonları bivalan katyon konsantrasyonuna hassastır. HSP-90, hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde, çok sayıdaki hücresel kinazın kompleks formu oluşturmada, transkripsiyon faktörlerinin oluşmasında, diğer moleküllerle çok yönlü bağlantıda rol oynar. HSP-90 hücre içerisinde düzenleyici proteinlerle etkileşimde anahtar rol oynar (Netzer ve Hartl 1998, Neckers ve Ivy 2003, Pratt ve Toft 2003).

HSP-90 gibi proteinler ligand yokluğunda hormon reseptör bağlayıcı etki gösterirler. Bu moleküller steroid reseptörlerine bağlanarak, steroid hormonlar bağlanıncaya kadar steroid reseptörlerin nükleer DNA' ya bağlanmasını engellerler. Böylece steroid reseptörler ile DNA arasında zamanından önce oluşacak bir etkileşim önlenmiş olur (Russell ve ark 2000).

HSP-90 bir kanser hedefidir (Banerji 2009).



Şekil 1.9. HSP-90' ın yapısı ve ATP-bağlı moleküler kümesi (Brown ve ark 2007).

GRP-78: ER ve lizozomda bulunur. Sekretuar hücrelerde yüksek seviyededir. Proteinlerin ER ve lizozomların içine alımını sağlar.

GRP-75: Proteinlerin mitokondri içine alımını, burada tutulumunu ve birleştirilmesini kolaylaştırır.

HSP-70: HSP-70 sitoplazma, çekirdek, ER ve mitokondride protein taşınmasına katılır. Stres altında proteinleri korur. Katlanmamış proteinlerin kümeleşmesini önler. Katlanmamış ve yanlış katlanmış proteinler arasındaki dengeyi sağlar. Polipeptitleri birbirine bağlar. HSP-70 HSF' nin aktivitelerini düzenler ve ısı şok proteinlerin transkripsiyonunun kontrolünü sağlar. ATP' ye bağlanır ve ATPaz aktivitesi gösterir (Nollen ve ark 1999).

HSP-70 ailesi açılmış proteinleri yakalayıp parçalanmaya hazır hale getirir. HSP-72 ve HSP-73 hücre döngüsünün düzenlenmesinde yer alırlar. HSP-72 uyarıcı, HSP-73 ise düzenleyici fonksiyona sahiptir. Her ikisi de hem sitoplazmada, hem de nükleusta yer alır (Henle ve ark 1998).

HSP-65: Hipoksi süresince stres proteinlerinin uyarılmasında ve hipoksik şartlar altında hücresel bütünlüğün sürdürülmesinde önemli rol oynar (Ganju ve ark 1999).

HSP-60: Büyük oligomerler şeklinde mitokondride ve sitoplazmada bulunur. HSP-60, 14 alt üiteden meydana gelir. Stresten korunma ve protein katlanması için gereklidir. HSP-70 ile birlikte proteinin doğal katlanmasına aracılık yapar. Hatalı katlanan polipeptidlere bağlanarak doğru katlanmalarına yardım eder. Makromoleküler protein yapımında ve hücresel solunumda rol oynar. ATP' ye bağlanır ve zayıf ATPaz aktivitesi gösterir (Nollen ve ark 1999).

HSP-28: Perinükleer sitoplazma ve golgide büyük oligomerler şeklinde bulunur. Embriyogenez, gelişim, proliferasyon ve hücre transformasyonunda rol oynar.

HSP-26: Şaperon aktivitesi gösterir ve in vitro olarak proteinleri irreversibl aggregasyondan korur (Haslbeck ve ark 1999).

HSP-20: Küçük molekül ağırlıklı ısı şokuyla ilişkili bir protein olup reseptöre bağlı kalsiyum girişini inhibe ederek, antiplatelet aktivite gösterir (Niva ve ark 2000).

HSP-15: Ribozomla ilişkili bir HSP olup hücredeki translayon görevinden dolayı diğer proteinlerden oldukça farklıdır (Korber ve ark 2000).

Ubiquitin: Hem sitoplazma, hem de nükleusta bulunur. ATP yardımıyla protein yıkımını kolaylaştırır. Muhtemelen gen düzenlenmesinde rol oynar (Pockley 2001).

1. 5. 5. Isı Şok Proteinlerinin Hastalıklardaki Rolü

HSP' ler pek çok patolojik ajanın konakta immün cevap oluşturmada rol oynayan antijenlerdir. İn vitro olarak ökaryot hücrelerde viral enfeksiyonu takiben çeşitli stres proteinlerin arttığı gösterilmiştir. Konağın patojene uyguladığı stres, patojende stres proteinlerinin yapımını arttırmakta, belki de miktarları arttığında, immün cevabı tetikleyen başlıca antijen konumuna geçmektedirler (Nollen ve ark 1999).

Stres proteinlerine karşı gelişen immün cevaplar çapraz reaksiyonlar vasıtasıyla hücrenin kendisine karşı da “anti-self” reaksiyon gelişimine neden olabilmektedir. Sağlıklı bireylerin, enfeksiyon veya herhangi bir şekilde strese maruz kalmış kendi hücrelerinden arınmak için, kendi stres proteinlerine karşı immün cevap verebilme yeteneklerinden yararlanabildikleri ileri sürülmektedir. İşte bu yeteneklerin düzenlenmesindeki bozukluklar bazı otoimmün hastalıklara yol açabilir. Stres proteinleri, immün cevapta hedef olmanın yanı sıra, antijen sunulmasında da önemli rol oynarlar.

Virüs ile transforme edilmiş ya da kimyasal olarak oluşturulmuş tümör hücrelerinde stres proteinlerinin arttığı gözlenmiştir. Bu hücrelerin tanınıp reddedilmesinde stres proteinlerinin, özellikle de HSP-90’ ın rolü olabileceği düşünülmektedir (Laad ve ark 1999).

1. 5. 6. Isı Şok Proteinleri ve Kanser

1981 yılında Connecticut Üniversitesi Tıp Fakültesi’ nde Pramod Srivastara adında bir öğrencinin yaptığı bir seri deneyler sonucunda tümör hücrelerinin parçalarıyla aşılana farelerin kanserden korunduğu ve burada ısı şok proteinlerinin rol aldığı anlaşıldı (Laad ve ark 1999).

Çoğu kanser çeşidinde ısı şok proteinlerinin üretimi artar. Isı şok proteinler tümör hücrelerinin proliferasyonu, farklılaşması, invazyonu, metastazı, ölümü ve immün sistem tarafından tanınması ile ilişkilidir (Ciocca ve Calderwood 2005).

Kanser hastası bireylerin kanser hücrelerinde HSP-peptit kompleksleri oluşur. Bu anormal peptitlerin hasta hücreler içerisinde bulunuşu, kanserden kansere ve bireyden bireye farklı şekildedir. Bu yüzden anormal peptitlerin çok düşük düzeydeki oluşumu dahi kanser düşüncesini akla getirmelidir (Laad ve ark 1999).

Normal durumlarda HSP’ ler hücre dışında bulunmaz. Ancak, eğer kanserli veya enfekte olmuş bir hücre patlarsa, peptide bağlı olan HSP’ ler dahil hücrelerin bütün içerikleri dökülür. Bu hücrenin dışında olan HSP’ ler immün sisteme, hasta hücrelerin yok edilmesini emreden çok kuvvetli bir “tehlike mesajı” gönderir. Bu mesajdan sonra hasta bir hücre ölüp patlar, antijenik peptide bağlı olan HSP komplekslerini döker. Hücre dışında olan bu HSP kompleksleri, sirkülasyondaki antijen sunan hücreler (APC) tarafından farkedilir. HSP kompleksleri APC hücreleri

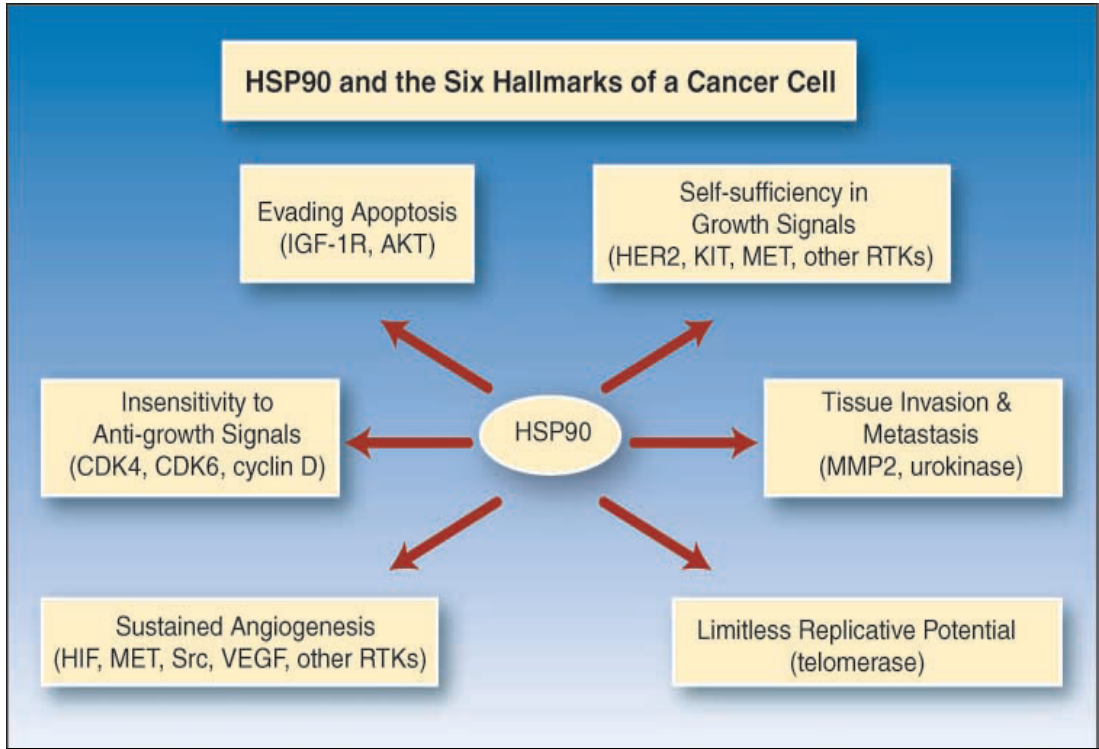
yüzeyindeki CD91 reseptörüne bağladıktan sonra APC-HSP komplekslerini içeriye alır. HSP komplekslerini içeren APC' ler lenf nodlarına gider. Lenf nodlarında APC' ler, HSP' lere önceden bağlanmış olan antijenik peptidlerini alıp, onları yeniden APC hücrelerin yüzeyinde sergiler. Bu antijenler, immünolojik cevabı tetikler.

Lenf nodlarında, spesifik immün sisteme ait olan tüm hücreler antijenlerin yok edilmesi için özel olarak programlanırlar. Her hastanın durumu ve kanserin gelişimi farklı olduğu için, antijenik hücreler kanser hastasının bireysel spesifik “parmak izi” ni taşır (Basu ve Matsutake 2004, Facciponte ve ark 2005, Javid ve ark 2007). Ayrıca, HSP' ler bazı kanser tiplerinde hücre farklılaşma derecesinin de göstergesidir (Ciocca ve Calderwood 2005).

İntrasellüler HSP' ler koruyucu bir fonksiyona sahiptirler. Hücreyi yaşama koşullarında tutmaya çalışırlar. HSP' lerin hücre koruyucu fonksiyonları onların antiapoptotik özelliklerini anlatır. HSP-90, HSP-70 ve HSP-27 programlanmış hücre ölümü mekanizmasının değişik proteinleriyle ve o münasebetle apoptotik prosesi aşkar anahtar noktalarda bloke etmek için direkt olarak etkileşirler (Didelot ve ark 2007).

HSP-90, HSP-70 gibi co-şaperonlarla ve “client” proteinler olarak bilinen 100' ün üstünde şaperonlarla fonksiyon gösterirler (Pick ve ark 2007). HSP-90' ın client proteinlerinin çoğu hücre proliferasyonu, hücre siklusü progresyonunun regülasyonu ve apoptozis için gerekli sinyal yollarına girer (Taldone ve ark 2009).

HSP-90' ın kanserli hücrelerde 2-10 kat fazla olması etkili bir ilaç olma hedefini gösterir (Pick ve ark 2007). HSP-90 kanser hücreleri için önemli olan proteinlerin stabilitesi ve fonksiyonundan sorumludur. Bu proteinler kanserin altın özelliklerine tesir eder. Bunlar; büyüme faktörü bağımsızlığı, büyüme baskılayıcı sinyallere direnç, sınırsız kopyalama potansiyeli, doku invazyonu ve metastaz, apoptozisten kaçınmak ve devamlı anjiogenez' dir (Banerji 2009).

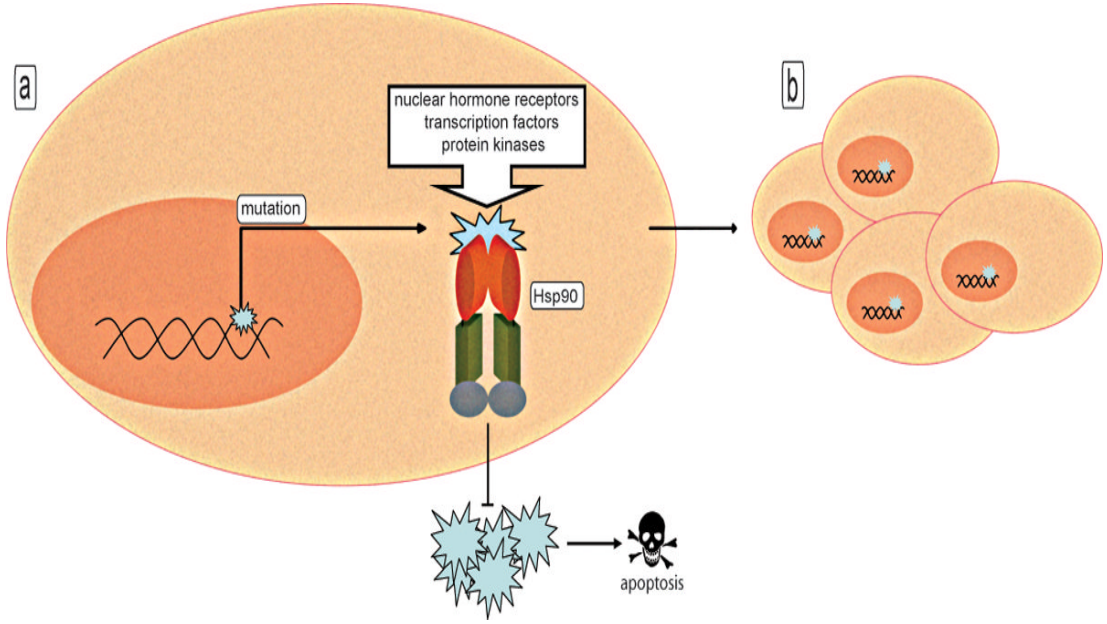


Şekil 1.10. HSP-90 ve kanser hücresinin 6 altın kuralı (Xu ve Neckers 2007).

VEGF gibi anahtar sinyal molekülleri bcl-2 antiapoptotik proteininin ekspresyonunu indükler ve apoptozisi inhibe etmek için bcl-2 ve Apaf-1 ile beraber HSP-90' nın birleşimini stimule eder (Solit ve Chiosis 2008).

Kanser hücrelerinde HSP-27, HSP-70 ve HSP-90' nın ekspresyonunun anormal derecede yüksek olması, onkogeneze iştirak etme ve kemoterapiye direnç gösterme içinde olduklarını gösterir. Böylece, HSP' lerin inhibisyonu kanser terapisi için ilginç bir strateji haline gelmiştir (Didelot ve ark 2007). Çünkü, apoptozis indüklenir ve agresif kanserlerin kemoterapiye dirençleri redüklenir (Pick ve ark 2007). Günümüzde HSP-90 inhibitörleri klinik denemelerde daha çok tercih edilmektedir (Calderwood ve ark 2006). HSP-90 inhibisyonu solid ve hematolojik malignitelerin birçoğunun tedavisi için önerilmektedir (Mahalingam ve ark 2009).

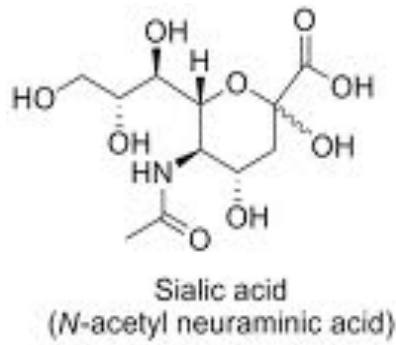
Meme, prostat, akciğer gibi solid tümörler, malignant melanoma ve hematolojik maligniteleri (kronik myloid lösemi ve multiple myeloma) içeren kanserlerde HSP' lerin yüksek düzeyleri gözlenmiştir (Banerji 2009).



Şekil 1.11. Tümörögenezi şaperonlamada HSP-90' ın rolü (Brown ve ark 2007).

1. 6. Siyalik Asit

Çeşitli dokularda, doku sıvılarında ve bakterilerde bileşik proteinlerin kapsamında siyalik asit ailesi elemanları bulunmaktadır (Warren 1959). Siyalik asitler, çoğunlukla moleküllerde ve hücre yüzeylerinde oligosakkarit zincirlerinin terminal pozisyonlarında bulunan heterojenik karbonhidrat gruplarıdır (Süer ve ark 2007). Nöraminik asidin asile edilmiş derivasyonlarıdır (N-asetil, N-glikolil, N,O-diasetil nöraminik asit). Bunların tümüne birden siyalik asitler denir. Nöraminik asit 9 karbon zincirli yapıdır (Warren 1959).



Şekil 1.12. Siyalik asitin yapısı (Warren 1959).

Serumda total siyalik asitin yaklaşık olarak % 98-99,5' i glikoproteinlere bağlı olarak bulunur. Siyalik asitin sadece küçük bir miktarı lipidlere bağlı olarak esasta gangliozidlerin formunda bulunur.

Serum siyalik asitinin mühim bir kısmı α_1 - asit glikoprotein, α_1 -proteaz inhibitörü ve haptoglobulin gibi akut faz proteinlere bağlanır ve böylece, karaciğerde akut-faz glikoproteinlerinin biyosentezinde ve translayon sonrası glikolizasyonunda sitokin-indüklü değişiklikleri yansıtır (Sancak ve ark 2002).

Siyalik asitler, negatif yüklerinden dolayı pozitif yüklü moleküllerin transportu ve bağlanmasında, moleküller arasındaki çekme ve itme olaylarında önemli rol oynarlar. Spesifik hücrese tanınma bölgelerini maskeleyebilme yeteneğine sahiptirler ve biyolojik bilginin transferinde de önemli rolleri vardır (Süer ve ark 2007).

Serum total siyalik asit düzeylerinin çeşitli benign hastalıklar, inflamatuvar hastalıklar, bakteriyel enfeksiyonlar, aktif romatoid artrit gibi romatolojik hastalıklar, miyokard infarktüsü, diabetes mellitus, renal hastalık ve kanser gibi çeşitli hastalıklarda yükseldiği bildirilmiştir (Passaniti ve Hart 1988, Singhal ve Hakomori 1990, Özben 1991, Süer ve ark 2000).

1. 6. 1. Siyalik Asit ve Kanser

Tümoral durumlarda siyalik asit düzeyindeki yükseklikle ilgili olarak çeşitli faktörler ileri sürülebilir. Yüksek siyalik asit içeriğine sahip tümör hücresinden siyalik asidin artmış sekresyonu veya hızlanmış hücre metabolizması nedeniyle hücrelerin artmış yıkımı suçlanabilir (Dwivedi ve ark 1988).

Neoplastik transformasyonun tümör hücre yüzeyinden siyalik asitin dökülmesi veya salıverilmesi aracılığı ile plazma siyalik asit konsantrasyonunda bir artışı başlattığı ileri sürülmüştür (Emmelot 1973, Singhal ve Hakomori 1990).

Malign hücrelerin siyalik asit metabolizmasındaki en önemli değişikliklerden birinin siyalil transferaz aktivitesindeki artış olduğu ileri sürülmüştür (Evans ve ark 1980, Ronquist ve Nou 1983, Fingerhut ve ark 1992).

Tümör hücre yüzeyinin hedef organdaki hücreler ve ekstrasellüler matriks ile etkileşimleri, yayılma ve uzak metastaz oluşumu için önemlidir. Siyalik asit içeren oligosakkaridlerin kanser hücreleri ve endotelial hücreler arasındaki adezyonda önemli bir rol oynadığı ve tümör hücrelerinin metastaz yeteneğinin hücre yüzeyinin siyalillenmesi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Thomas 1996).

Tümör hücrelerinin değişmiş yüzey özelliklerine sahip oldukları ve bu değişikliklerden plazma membran siyalo-glukokonjugatlarının ekspresyonundaki değişimin kısmen sorumlu olabileceği bildirilmiştir (Evans ve ark 1980, Yogeewaran 1983, Passatini ve Hart 1988).

Siyalik asit düzeylerinin; hastalık evresi (Sebzda ve ark 2006), tümör kitlesi (Rao ve ark 1998), metastaz derecesi (Yogeewaran ve Salk 1981, Albuquerque ve ark 2004) ve hastalık nüksü ile (Feijoo-Carnero ve ark 2004) ilişkili olduğu bulunmuştur.

Total ve lipide bağlı serum siyalik asit düzeyleri meme, akciğer, baş ve boyun, gastrointestinal sistem, lösemi, lenfoma ve melanoma gibi pek çok kanser türlerinde araştırılmış ve sağlıklı bireylere göre düzeyleri yüksek bulunmuştur (Adamo ve ark 1985, Başoğlu ve ark 2007).

Ayrıca, meme kanserli hastaların TSA (Raval ve ark 1997, Kıyıcı ve ark 2010) ve LSA (Raval ve ark 1997) seviyelerinde tedavi sonrasında düşüş gözlenmiştir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2. 1. Çalışma Şekli

Çalışmamız; Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesi Onkoloji Polikliniği'ne başvuran hastalar üzerinde gerçekleştirildi. Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Etik Kurul Komisyonu tarafından 24.04.2009 tarih ve 2009/132 numaralı karar ile tez projemiz onaylandı (Bkz. Ek-A). Daha sonra, Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 09102054 numaralı proje olarak desteklenmesine karar verildi ve çalışmaya başlandı. Çalışmamızdaki 25-(OH)D₃ düzeyi Ankara Delta Laboratuvarı'nda, CK-18, HSP-90 ve siyalik asit düzeyleri ise Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarı'nda tayin edildi.

2. 2. Vaka Seçimi

Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Onkoloji Polikliniği'nde tanı almış ve tedavisi takip edilen çeşitli yaşlarda kemik metastazlı meme kanseri olan 35 kadın çalışmaya dahil edildi. Yeterli sayıda yeni tanı almış kemik metastazlı meme kanseri hastasının katılımı sağlanamadığı için takipte olan hastalar üzerinde çalışmamız yapıldı. Çalışmaya katılan hastalarda rutin olarak gördükleri intra venöz bifosfonat tedavisi sonrası 15 gün boyunca günde bir defa 400 IU vitamin D içeren Caldevita preparatı kullanmaları şartı arandı.

Çalışmamıza katılan hastalara projenin amacı ve kapsamı açıkça anlatıldıktan sonra, kendilerinden bilgilendirilmiş onay formu alındı (Bkz. Ek-B). Multiple kanser sendromu olanlar, beraberinde kemik yapım ve yıkımı ile giden ek bir hastalığı bulunanlar ve çalışmaya katılmayı kabul etmeyenler çalışmaya alınmadı.

2. 3. Numunelerin Toplanması ve Saklanması

Çalışmamıza katılan hastalardan sabah saatlerinde çalışma başlangıcında ve 15 gün boyunca vitamin D kullanımları sonrasında serum ve plazma elde etmek üzere venöz kan örnekleri alındı. Serum örnekleri için herhangi bir koruyucu veya antikoagülan madde içermeyen tüpler ve plazma örnekleri için ise antikoagülan olarak EDTA içeren tüpler kullanıldı. Alınan kan örnekleri Eppendorf 5810 marka santrifüj cihazı ile 4000 rpm/dk hızla 10 dakika süre ile santrifüj edilerek hastaların

serum ve plazmaları ayrıldı. Ayrılan serum örnekleri CK-18, HSP-90 ve siyalik asit, plazma örnekleri ise 25-(OH)D₃ çalışmak üzere eppendorf tüplere bölünerek çalışma gününe kadar -80 °C’de derin dondurucuda saklandı.

2. 4. Biyokimyasal Analizler

Cihazlar ve teknik araç, gereçler

Biotek ELx800 ELISA okuma cihazı

Biotek ELx50/8 ELISA yıkama cihazı

Shimadzu ProLicence HPLC Cihazı

ImmuChrom HPLC kolonu (IC3401rp)

Nüve FN 400 Etüv

Spekol 1300 Spektrofotometre

DPC shaker

Nüve NM 110 vorteks

Eppendorf 5810 Santrifüj

Medispec-plus mikropipetler (10-100 µl ve 100-1000 µl ayarlamalı)

Ölçekli silindir (500 veya 1000 ml)

Eppendorf tüpleri

Çıkarılabilir pipet uçları

Kurutma kağıdı

2. 4. 1. 25-(OH)D₃ Düzeyi Tayini

25-(OH)D₃ düzeyi tayininde ImmuChrom marka HPLC analiz kiti (ImmuChrom, Almanya) (Cat No: IC3401) ve yine aynı firmaya ait HPLC kolonu (Cat No: IC3401rp) kullanıldı.

Bu HPLC uygulaması serum ve plazmada 25-(OH)D₃' ün sayısal tespiti için tasarlanmıştır.

Yöntemin prensibi

25-(OH)D₃' ün tespitinde bir çöktürme basamağı yer almaktadır. Bunun için bir numune hazırlığı yerine getirilir. Santrifüjden sonra numune iki sıvı faz ve bir katı presipitat (çökmüş proteinler) olarak ayrışır. HPLC sistemine enjeksiyon için sadece en yukarıdaki sıvı faz kullanılır.

HPLC ayırması bir “karşıt faz” kolonu ile 30 °C’ de bir izokratik metodla çalışır. Kromatogramlar bir UV-dedektör tarafından oluşturulur. Ayırma kullanılan kolona bağlı olarak her akış için 15 dakika alır. Sonuçlar, verilmiş serum kalibratör tarafından ölçülür ve “internal standart-metod” tarafından pik alanlar ve yüksekliklerin bütünlemesiyle hesaplanır. Saptanabilen en düşük 25-(OH)D₃ konsantrasyonu 5,8 nmol/l’ dir.

25-(OH)D₃ için referans aralıkları;

Yaz: 50-300 nmol/l (20-120 µg/l)

Kış: 25-150 nmol/l (10-60 µg/l)’ dir.

Üretici firma tarafından verilen yöntemin çalışma içi ve çalışmalar arası % CV değerleri sırasıyla;

Çalışma içi CV: % 2,6 (56,5 nmol/l) [n = 6]

% 1,5 (104,8 nmol/l) [n = 6]

Çalışmalar arası CV: % 4,0 (54,1 nmol/l) [n = 6]

% 3,6 (105,4 nmol/l) [n = 6]

şeklindedir.

Kullanılan malzemeler

1. Mobil faz (ELU) 1000 ml

2. Kalibratör (CAL) 6 ml

3. Internal standart (IS)	40 ml
4. Çöktürücü reaktif (PREC)	50 ml
5. Düşük ve yüksek kontroller (CTRL)	3 ml

Çalışma prosedürü

1. 1,5 ml' lik eppendorf tüplerinin içine, 400 µl numune, CAL ve CTRL pipetlendi.

2. 400 µl IS (soğuk olarak) eklendi.

3. Kısaca vorteksle karıştırıldı.

4. 500 µl PREC ilave edildi.

5. 2 dakika vortekslendi.

6. Tüpler 15 dakika 2-8 °C' ye bırakıldı ve arkasından 10 000 g' de 5 dakika santrifüj edildi.

7. HPLC sistemindeki kromatografi için süpernatandan 50 µl alınarak sisteme enjekte edildi.

Kromatografik ayarlar

Kolon materyali:	ImmuChrom kolon (IC3401rp)
Kolon boyutu:	125mm x 4mm
Akış oranı:	1,0 ml/min
UV-deteksiyonu:	264 nm
Enjeksiyon volümü:	50 µl
Akış süresi:	15 dakika
Sıcaklık:	30 °C

Sonuçların hesaplanması

$$\text{Numune konsantrasyonu} = \frac{\text{Hasta pik alanı} \times \text{standart konsantrasyonu} \times F}{\text{IS hasta pik alanı}}$$

$$F = \frac{\text{Kalibratör IS pik alanı}}{\text{Kalibratör analit pik alanı}}$$

25-(OH)D₃ konsantrasyonları nmol/l olarak verildi.

2. 4. 2. Kaspazla Çentiklenmiş CK-18 Tayini

Kaspazla çentiklenmiş CK-18 tayininde M30-Apoptosense ELISA kiti (Peviva, İsveç) (Ref:10010) kullanıldı. M30-Apoptosense ELISA, serum ve plazmada CK-18 ASP396 “M30” neo-epitopuyla birleşik apoptozisin sayısal tespiti için bir in vitro immunoassaydir. M30 bir fare monoklonal IgG2b antikordur. Kaspazlar apoptozis sırasında çeşitli hücrel proteinlere bağlanırlar. Epitel hücrelerinde bu substratlardan biri ara filament protein olan CK-18’ dir. M30 antikor, aspartik asit kalıntısı 396’ dan sonra CK-18’ in kaspaza bağlanmasıyla açıkta kalmış bir neo-epitop olarak bilinir. Bu pozisyonda bağlanma kaspaz-9 tarafından apoptozis sırasında erkenden, kaspaz-3 ve kaspaz-7 tarafından yürüme fazı sırasında oluşur.

Yöntemin prensibi

M30-Apoptosense ELISA bir katı-faz sandviç enzim immunoassaydir. Standartlar, kontroller ve numuneler CK-18’ e karşı bir katı-faz antikor yakalayıcı olan “M5” ile ve CK18 ASP396 neo-epitopuna karşı M30 antikoruyla birleşik Horseradish Peroxidase (HRP) ile reaksiyona girer. Bağlanamamış konjugatlar bir yıkama basamağıyla uzaklaştırılır. Daha sonra ortama enzimin substratı olan Tetrametilbenzidin (TMB) eklenir. Renk oluşumu durdurulur ve absorbanslar alınır. Sonuçta oluşan renk şiddeti ölçümün konsantrasyonla doğru orantılıdır. Standartların absorbanslarına karşı konsantrasyonlardan elde edilen standart eğri yardımı ile

numunenin antijen miktarı hesaplanabilir. Antijen konsantrasyonu U/L olarak belirtilir. M30-Apoptosense ELISA’ da ölçülebilir en düşük konsantrasyon 25 U/l’ dir.

Kullanılan malzemeler

1. M30 kaplı mikrostripler (96 kuyucuklu mikropate)
2. M30 HRP konjugatı
3. M30 konjugat dilüsyon tamponu
4. M30 standartları (A-G)
5. Düşük ve yüksek düzeyli M30 kontrol örnekleri
6. TMB substratı
7. Stop solüsyonu
8. Yıkama solüsyonu
9. Kapatmak için film
10. Deiyonize su

Reaktiflerin hazırlanması

1. M30 HRP konjugatı dilüsyonu

0,4 ml M30 HRP konjugatı, 9,2 ml M30 konjugat dilüsyon tamponu ile dilüe edildi.

2. Yıkama solüsyonunun dilüsyonu

Yıkama solüsyonu, kullanılmadan önce 450 ml deiyonize su ile dilüe edildi. Dilüe edilmiş tampon, 0,15 M sodyum klorid ve % 0,1 Tween 20 ile birlikte 0,014 M fosfat tamponu karışımıdır.

Çalışma prosedürü

1. Çalışmaya başlamadan önce bütün reaktifler oda sıcaklığına bırakıldı. Bütün reaktifler kullanmadan önce vortekslendi.

2. M30 konjugat dilüsyon tamponuyla M30 HRP konjugatı dilüe edildi ve tam olarak karıştırıldı.

3. M30 Standartları (A-G), düşük M30 kontrolü, yüksek M30 kontrolü ve numunelerin 25µl' si kuyucuklara pipetlendi.

4. Her kuyucuğa dilüe edilmiş M30 HRP konjugat solüsyonundan 75 µl ilave edildi.

5. Kuyucuklar kapama örtüsüyle örtüldü.

6. Shaker' de 600 rpm' de 4 saat inkübe edildi.

7. Kuyucukların içeriği aspire edildi ve 250 µl dilüe edilmiş yıkama solüsyonuyla 5 kez yıkandı.

8. TMB substratından her kuyucuğa 200 µl ilave edildi ve oda sıcaklığında 20 ± 1 dakika karanlıkta inkübe edildi.

9. Stop solüsyonundan her kuyucuğa 50 µl ilave edildi. TMB substratı ve stop solüsyonunun tam karışımını sağlamak için mikropate 5-10 saniye sallandı. Absorbansın okutulmasından önce mikropate 5 dakika bekletildi.

10. Absorbanslar, ELISA okuyucuda 450 nm' de okutuldu ve sonuçlar kaydedildi.

Sonuçların hesaplanması

Standartların absorbanslarına karşı konsantrasyonlardan elde edilen standart eğri yardımı ile numunelerin CK-18 düzeyi hesaplandı. CK-18 konsantrasyonu U/l olarak verildi.

2. 4. 3. HSP-90 Tayini

HSP-90 tayininde HSP90 ELISA kiti (Uscn Life Science Inc, Çin) (Cat No:E0863Hu) kullanıldı. Bu kit serum, plazma ve diğer biyolojik sıvılarda insan HSP-90' nın in vitro ölçümü için bir sandviç enzim immunoassay ELISA kitidir.

Yöntemin prensibi

HSP-90 kiti içinde bulunan mikropate HSP-90' a spesifik bir antikor ile önceden kaplanmıştır. Standartlar ve numuneler HSP-90 için özel olarak düzenlenmiş biotinle birleşik poliklonal antikorlu uygun mikropate kuyucuklarına eklenir. Sonra, avidinle birleşik HRP her kuyucuğa eklenir ve inkübe edilir. Daha sonra her kuyucuğa TMB substrat solüsyonu eklenir. HSP-90 içeren biotinli antikor ve enzim-avidin kompleksi içeren kuyucuklarda renk değişikliği gözlenir. Reaksiyon sülfürik asit ilavesiyle sonlandırılır ve renk değişimi 450 ± 2 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür. Numunelerdeki HSP-90 konsantrasyonu standart eğriyle numunelerin O.D.' sinin karşılaştırılmasından sonra belirlenir. Ölçülebilir minimum konsantrasyon yaklaşık 0,039 ng/ml' dir.

Kullanılan malzemeler

1. 96 kuyucuklu mikropate
2. Kapatmak için film
3. HSP-90 Standardı
4. Standart dilüenti 20 ml
5. Deteksiyon reaktifi A 120 µl
6. Deteksiyon reaktifi B 120 µl
7. Çalışma dilüenti A 6 ml
8. Çalışma dilüenti B 6 ml
9. TMB substratı 9 ml
10. Stop solüsyonu 6 ml
11. Yıkama solüsyonu 20 ml
12. Deiyonize su

Reaktif hazırlanması

1. HSP-90 Standardı

Standart 0,5 ml standart dilüent ile sulandırıldı ve oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Mevcut solüsyondaki standart konsantrasyonu 10 ng/ml' dir. Mevcut standart solüsyonundan 7 farklı düzeyde standart 10 ng/ml, 5 ng/ml, 2,5 ng/ml, 1,25 ng/ml, 0,625 ng/ml, 0,312 ng/ml, 0,156 ng/ml ve en son tüp blank olarak 0 ng/ml şeklinde hazırlandı.

2. Çalışma dilüenti A ve çalışma dilüenti B

Çalışma dilüenti A veya B' yi hazırlamak için konsantre çalışma dilüentleri A veya B' nin 6 ml' si 6 ml deionize su ile dilüe edildi.

3. Deteksiyon reaktifi A ve deteksiyon reaktifi B

Çalışma solüsyonları, deteksiyon reaktifleri A ve B' nin çalışma dilüenti A veya B ile (1:100) dilüe edilmesiyle hazırlandı.

4. Yıkama solüsyonu

Yıkama solüsyonunu hazırlamak için 20 ml (30x) konsantre yıkama solüsyonu 580 ml deiyonize su ile dilüe edildi.

Çalışma prosedürü

1. Kullanmadan önce bütün kit bileşenleri ve numuneler oda sıcaklığına getirildi.

2. Dilüe edilmiş standartlar, blank ve numuneler için kuyucuklar tespit edildi. Standart için 7 kuyucuk, blank için 1 kuyucuk hazırlandı. Uygun kuyucuklara standart dilüsyonlarının her birinden, blankten ve numunelerden 100 µl ilave edildi. Plate örtücü ile örtüldü. 37 °C' de 2 saat inkübe edildi.

3. Her kuyucuktaki sıvı aspire edildi.

4. Her kuyucuğa deteksiyon reaktifi A' nın çalışma solüsyonundan 100 µl ilave edildi. Plate örtücü ile kapattıktan sonra 37 °C' de 1 saat inkübe edildi.

5. Her kuyucuktaki sıvı aspire edildi. Otomatik ELISA yıkayıcı kullanarak kuyucuklar yıkama solüsyonunun 350 µl' siyle yıkandı ve 1-2 dakika bekletildi. Mikroplate absorban kağıdının üzerine birdenbire vurularak tam olarak bütün kuyucuklardan kalan sıvı uzaklaştırıldı. Bu işlem 3 kez tekrarlandı. Mikroplate ters çevirilerek, absorban kağıdıyla kurutuldu.

6. Deteksiyon reaktifi B' nin çalışma solüsyonundan her kuyucuğa 100 µl ilave edildi. Plate örtücü ile örttükten sonra 37 °C' de 30 dakika inkübe edildi.

7. Beşinci basamaktaki aspirasyon/yıkama süreci 5 kez tekrar edildi.

8. Her kuyucuğa substrat solüsyonundan 90 µl ilave edildi. Yeni bir plate örtücü ile örtüldü. 37°C' de 15-25 dakika ışıktan koruyarak inkübe edildi. Substrat solüsyonu ekleyince rengin maviye dönüştüğü gözlemlendi.

9. Her kuyucuğa 50 µl stop solüsyonundan ilave edildi. Stop solüsyonunun ilavesiyle rengin sarıya dönüştüğü gözlemlendi.

10. Mikroplate okuyucuda 450 nm' de absorbans ölçümleri yapıldı.

Sonuçların hesaplanması

Standartların absorbanslarına karşı konsantrasyonlardan elde edilen standart eğri yardımı ile numunelerin HSP-90 konsantrasyonları hesaplandı. HSP-90 konsantrasyonları ng/ml olarak verildi.

2. 4. 4. Siyalik Asit Düzeyi Tayini

Total siyalik asit düzeyinin tayini için Warren tarafından geliştirilen tiyobarbitürik asit metodu kullanılmıştır (Warren 1959).

Yöntemin prensibi

Warren yöntemine göre asit ile hidrolizde serbest hale geçen siyalik asit, asidik ortamda ve periyodat varlığında okside edilir. Oksidasyon ürünü β-formilpirüvik asit, tiyobarbitürik asit varlığında pembe renkli bir ürünün oluşumuna neden olur. Pembe renkli ürünün absorbansı siyalik asit miktarı ile orantılıdır (Warren 1959, Kazezoğlu ve ark 2007).

Kullanılan malzemeler

1. Periyodat çözeltisi (9 M fosforik asit (H_3PO_4) içinde 0,2 M sodyum-meta-periyodat (NaIPO_4) çözeltisi)
2. Arsenit çözeltisi (0,5 M sodyum sülfat (Na_2SO_4) ve 0,1 N sülfirik asit (H_2SO_4) içinde %10 sodyum arsenit çözeltisi)
3. Tiyobarbitürik asit çözeltisi (0,5 M sodyum sülfat (Na_2SO_4) içinde % 0,6 tiyobarbitürik asit ($\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$) çözeltisi)
4. Sikloheksanon ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}$)
5. Deiyonize su

Çalışma prosedürü

1. Cam tüpler kullanıldı ve numune tüpüne 200 μl numune ve kör tüpüne ise distile su pipetlendi.
2. Tüm tüplere 100 μl periyodat çözeltisinden eklendi.
3. Tüpler sallandı ve oda ısısında 20 dakika bekletildi.
4. Tüm tüplere 1 ml arsenit çözeltisinden ilave edildi, sarı-kahverengi renk oluşumu gözlemlendi ve bu renk beyazlayana kadar vortekslendi.
5. Tüm tüplere 3 ml tiyobarbitürik asit çözeltisinden eklendi ve tüpler çalkalandı.
6. Tüplerin ağzı kapatılarak, kaynar su banyosunda 15 dakika bekletildi.
7. Tüpler kaynar sudan alınarak, soğuk suda 5 dakika bekletildi.
8. Tüplerin içeriğinin 2ml' si 2 ml sikloheksanon içeren başka tüplere alındı ve vortekslendi.
9. 3 dakika 2500-3000 g' de santrifüj edildi.
10. Tüplerin süpernatantlarının 549 nm' de kör tüplerine karşı absorbansları ölçüldü.

Sonuçların hesaplanması

Siyalik asit konsantrasyonu (mmol/ml) = $2/57 \times \text{O.D.} \times 1000$

Siyalik asit sonuçları mmol/ml olarak verildi.

2. 4. 5. İstatistiksel Analiz

Hastaların demografik özellikleri ve laboratuvar sonuçlarına ait verilerin tanımlayıcı istatistikleri, frekansları hesaplandı. Verilerin dağılımı Shapiro Wilk testi ile test edildi. Ölçülen tüm testler nonparametrik dağılım gösterdiğinden Vitamin D tedavisi öncesi ve sonrası ölçümleri karşılaştırmada Wilcoxon Signed Rank testi kullanıldı. Kanserin histopatolojik türüne göre ve Vitamin D tedavi süresine göre alt grupların biyokimyasal analiz sonuçlarının karşılaştırılmasında Mann Whitney U testi kullanıldı. Parametreler arası korelasyonlar Spearman nonparametrik korelasyon analizi ile değerlendirildi. Sonuçlar, Ortanca (Min-Max) olarak verildi. $p < 0,05$ anlamlılık derecesi olarak kullanıldı.

3. BULGULAR

Çalışmamıza katılan kemik metastazlı meme kanseri 35 kadın hastanın demografik özellikleri çizelge 3.1.' de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Hastaların demografik özellikleri.

Parametre	Hasta Sayısı	Oran %
N=35		
Yaş=55(28-78)		
Histopatolojik Tipi		
İnfiltratif duktal	14	40
İnvaziv duktal	15	42,9
İnfiltratif mikst	3	8,5
İnvaziv mikst	1	2,9
Atipik medüller	2	5,7
Evre		
I	4	11,4
II	19	54,3
III	10	28,6
IV	2	5,7
Kemik Metastazı Yeri		
Yakın	14	40
Uzak	8	22,9
Multipl	13	37,1
Metastaz Sayısı		
Tekli	11	31,4
Yaygın	24	68,6
Tümör Boyutu		
10-20(mm)	11	31,4
21-40(mm)	15	42,9
41-60(mm)	9	25,7
Tedavi Türü		
Kemoterapi	15	42,9
Hormon tedavisi	2	5,7
Kemoterapi ve hormon tedavisi	9	25,7
Kemoterapi ve radyoterapi	7	20
Kombine tedavi	2	5,7
Tedavi Süresi		
1- 5 (yıl)	26	74,3
6 ve üzeri (yıl)	9	25,7
Vitamin D Tedavisi Süresi		
1-3 (yıl)	22	62,9
4-7 (yıl)	13	37,1

Biyokimyasal analiz verileri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, kemik metastazlı meme kanseri hastalarının vitamin D tedavisi aldıktan sonraki CK-18 değerlerinin tedavi öncesine göre anlamlı olarak yüksek olduğu gözlemlendi. Siyalik asit düzeylerinin ise anlamlı olarak azaldığı tespit edildi. Fakat, HSP-90 seviyelerinde anlamlı bir fark görülmedi (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Hastaların vitamin D tedavisi öncesi ve sonrası biyokimyasal analiz sonuçları.

Parametre	Tedavi Öncesi	Tedavi Sonrası	p
	Ortanca (Min-Max)	Ortanca (Min-Max)	
25(OH)D3 (nmol/l)	19 (8,70-46,70)	25,6 (11,60-52,80)	<0,01
HSP-90 (ng/ml)	5,78 (0,26-6,73)	5,18 (0,20-6,74)	>0,05
CK-18 (U/l)	196,3 (121,70-1799,60)	250,2 (138,40-2326,10)	<0,01
Siyalik asit (mmol/ml)	3,37 (1,26-6,91)	2,56 (0,88-4,70)	<0,01

Meme tümörü histopatolojik türüne göre hastalar infiltratif duktal ve invazif duktal meme kanseri şeklinde iki gruba ayrılıp ölçülen parametrelere vitamin D tedavisinin etkileri karşılaştırıldı. CK-18' in tedavi öncesi düzeylerinin infiltratif duktal meme kanseri grubunda [242,3 (143,1-848,1)] invazif duktal grubundan [163 (124,90-434,90)] anlamlı olarak yüksek olduğu görüldü ($p<0,01$). CK-18' in tedavi sonrası düzeylerinin de aynı şekilde infiltratif duktal meme kanseri grubunda [378,25 (177,20-1194,60)] invazif duktal grubundan [220,1 (138,4-2326,1)] anlamlı olarak yüksek olduğu görüldü ($p<0,05$). Diğer parametreler açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0,05$).

Vitamin D tedavisi alma sürelerine göre hastalar 1-3 yıl ve 4-7 yıldır vitamin D alanlar şeklinde iki gruba ayrıldı. 4-7 yıldır vitamin D alan grubun tedavi sonrası CK-18 düzeyleri 1-3 yıldır alanlara göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu [CK-18 düzeyleri sırasıyla 216,10 (143,90-1194,60) ve 377,90 (138,40-2326,10)] ($p<0,05$).

Hastalığın evresi, kemik metastazı yeri, metastaz adedi, tümör boyutu, tedavi tipi, meme kanseri tedavisi süresi ile gerek vitamin D tedavisi öncesi gerekse sonrası CK-18, HSP-90 ve siyalik asit arasında anlamlı bir korelasyon bulunamadı. Hastaların demografik karakteristikleri ile biyokimyasal ölçümleri arasındaki korelasyonlar ikişerli olarak Spearman nonparametrik korelasyon analizi ile değerlendirildi. Sonuç olarak, sadece vitamin D tedavisi sonrası CK-18 değeriyle tümör boyutu arasında kuvvetli negatif bir korelasyon ($r=-0,351$ ve $p=0,0039$) bulundu. Diğer parametreler arasında ise anlamlı bir korelasyon saptanmadı.

CK-18, HSP-90 ve siyalik asit düzeyleri ile vitamin D düzeyleri arasında bir ilişki olup olmadığı araştırıldığında vitamin D düzeyleri ile CK-18 arasında kuvvetli pozitif bir korelasyon olduğu görüldü ($r=0,341$, $p=0,004$). Diğer parametrelerle vitamin D düzeyi arasında ya da diğer parametrelerin kendi aralarında anlamlı bir korelasyon bulunamadı.

4. TARTIŞMA

Vitamin D' nin meme kanseri tedavisinde ne kadar etkili olduğunu araştırmayı amaçladığımız çalışmamızda kemik metastazlı meme kanseri hastalarının vitamin D tedavisi aldıktan sonra CK-18 seviyelerinin anlamlı olarak arttığı, siyalik asit seviyelerinin anlamlı olarak azaldığı, HSP-90 seviyelerinin ise anlamlı bir değişiklik göstermediği bulunmuştur.

Diyetsel vitamin D alımının meme kanseri riskine etkisini araştırmak üzere İtalya'da 6 bölgede yaşayan Haziran 1991 ve Nisan 1994 yılları arasında, 23-74 yaşlarında 2569 meme kanseri tanısı konulmuş hasta ve 20-74 yaşlarında 2588 sağlıklı bayanın 2 yıl boyunca haftalık diyetleri sorulmuş ve D vitamini alımıyla meme kanseri riskinin ters ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Rossi ve ark 2009).

Aynı amaçla, New York' ta yapılan çalışmada 1996-1997 yılları arasında 1026 meme kanseri hastası ve 1075 kontrol grubu alınmıştır. Meme kanseri hastalarının plazma 25-(OH)D₃ oranlarının düşük olduğu bulunmuştur. Özellikle postmenapozal kadınlarda kandaki vitamin D miktarının artmasıyla meme kanseri riskinin azaldığı gözlenmiştir (Crew ve ark 2009).

Bizim çalışmamızda meme kanseri olan hastaların vitamin D tedavisi öncesi ve sonrası 25-(OH)D₃ düzeyleri karşılaştırılmıştır. Sağlıklı kontrol grubu çalışmamıza dahil edilmemiştir. Ancak hastalarımızın vitamin D düzeyleri tedavi öncesinde sağlıklı bireyler için belirlenen referans aralığının altındaydı.

1993-1995 yılları arasında 45 yaş ve üstü kanser ve kalp hastalığı olmayan 10578 premenapozal ve 20909 postmenapozal sağlıklı kadında total kalsiyum ve vitamin D alımının meme kanseri riskine etkisini araştırmaya yönelik yapılan çalışmada kadınların diyetleri sık aldıkları yiyecekleri sorarak değerlendirilmiştir. Ortalama 10 yıllık bir takip sonrasında 276 premenapozal ve 743 postmenapozal kadına invaziv meme kanseri teşhisi konulmuştur. Sonuç olarak, total kalsiyum ve vitamin D' nin yüksek alımı, premenapozal meme kanserinin düşük bir riskiyle ilişkilendirilmiştir. Postmenapozal kadınlarla meme kanseri riski arasında ise anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (Lin ve ark 2007).

Yapılan çalışmalara bakılırsa, postmenapozal kadınların daha değişken bir tablo çizdiği söylenebilir. Çalışmamıza katılan hastaların hepsi menapozdaydı. Bu nedenle premenapoz/postmenapoz ayrımı çalışılan testler için yapılamadı.

Çalışmamızda meme kanseri evresiyle parametreler arasında herhangi bir ilişki bulamamıza rağmen, Palmieri ve arkadaşlarının 204' ü erken-evre (evre I ve II) ve 75' i bölgesel ilerlemiş veya metastatik (evre III ve IV) invaziv meme kanseri hastası 279 beyaz ırktan kadında yaptıkları çalışmada, vitamin D seviyelerinin, sağlıklı kadınlarda erken evre meme kanseri hastalarına göre yüksek olduğu, erken evre meme kanseri hastalarında ise bölgesel ilerlemiş veya metastatik olanlara göre göze çarpan şekilde yüksek olduğu bulunmuştur. Ayrıca, ilerlemiş kemik metastazlı meme kanseri hastalarında vitamin D seviyelerinde bir azalma gözlenmiştir (Palmieri ve ark 2006).

Çalışmamızda hastalarımızın hepsi kemik metastazlı meme kanseri tanısı ile takip edilmekteydi ve vitamin D seviyeleri başlangıçta sağlıklılar için belirlenen referans aralığının altındaydı. Ancak, bu hastalar dönem dönem vitamin D tedavisi almaktaydı. Hiç vitamin D almamış hastalar çalışmamıza dahil edilmesi düşünülen hasta grubu olmasına rağmen, çalışma sürecimizde yeterli sayıda bu tür hasta başvurmadiğundan çalışmamızı takipte olan ve vitamin D tedavisi almakta olan hastalar üzerinde gerçekleştirmek zorunda kaldık. Bu grupta da çalışma başlangıcındaki düzeylerini bazal düzey olarak kabul edip, vitamin D tedavisini etkin olarak alan hastaların tedavi sonrası düzeyleri ile karşılaştırdık.

Meme dokusu dansitesindeki artma meme kanseri risk faktörlerinden biridir. Diyetsetel vitamin D ve kalsiyumun mamografik meme yoğunluğuyla ilişkisini izah etmek üzere Aralık 1988 ve Aralık 1990 yılları arasında Rhode adası ve doğu Massachusetts' de yaşayan 40-60 yaş arası mamogramları bulunan 1092 kadınla bir çalışma yapılmıştır. Alınan yiyecek sıklığı anketle değerlendirilmiştir. D vitamini ve kalsiyum alımındaki artış, meme dansitesindeki azalışla sonuçlanmıştır. Azalmış mamografik meme dansitesi ise kuvvetli olarak azalmış meme kanseri riskiyle ilişkilendirilmiştir. Sonuç olarak, diyetsetel D vitamini ve kalsiyumun meme kanserinden korunmada yardımcı olabileceği fikri savunulmuştur. Bunun, D vitamini ve kalsiyumun antiproliferatif aktivitesi yoluyla meme dokusu morfolojisindeki tesirlerinden dolayı olduğu düşünülmüştür (Berube ve ark 2004).

Vitamin D' nin meme kanseri hücreleri üzerindeki etkilerini araştırmak üzere Sundaram ve arkadaşlarının P-53 saldırgan tip MCF-7 meme kanseri hücreleri enjekte edilmiş 6 haftalık 4 fare kullanarak yaptıkları çalışmada farelere, tümörleri yeterli boyuta ulaşınca 8 gün vitamin D analogu EB1089 verilmiştir. Vitamin D alan ve almayan her iki grup iyonize radyasyon ışımasına maruz bırakılmış ve EB1089 ile yapılan kombine radyoterapinin tek başına yapılan radyoterapiye göre tümör hücre gelişiminde ve tümör hücre ölümünü oluşturmada daha etkili olduğu görülmüştür (Sundaram ve ark 2003).

Sundaram ve arkadaşlarının insan MCF-7 meme tümörü hücrelerinin iki metastatik alttipi kullanarak yaptıkları bir başka çalışmada ise 1,25-(OH)₂D₃' 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 (Sundaram ve ark 2006).

Benzer olarak insan MCF-7 meme kanseri hücrelerinde 1,25-(OH)₂D₃' ün büyüme ve apoptozis üzerine etkisini araştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada MCF-7 hücreleri 10⁻⁷ mol/l 1,25-(OH)₂D₃ ile inkübe edilmiş ve anlamlı bir büyüme inhibisyonu görülmüştür. Flow sitometrik analizde hücreler G₀/G₁ dinlenme evresi boyunca artan apoptotik yüzdesi bulunmuştur. Böylece, 1,25-(OH)₂D₃' ün meme kanseri tedavisinde yeni bir hormon olabileceği savunulmuştur (Zhang ve Yao 1999).

Vitamin D' nin meme kanseri riskinde etkili olmadığını belirten bazı çalışmalar da vardır.

Kuper ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada 30-50 yaş arası 1991-1992 yıllarında çalışmaya katılan 41889 İsveçli kadın Aralık 2004' e kadar takibe alınmıştır. Beslenmeleri anketle değerlendirilmiş ve 840' ına meme kanseri teşhisi konulmuştur. Sonuç olarak, güneşlenme ve diyetel vitamin D alımıyla meme kanseri riski arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (Kuper ve ark 2009).

Görüldüğü gibi bilim adamları tarafından vitamin D' nin meme kanseriyle ilişkisini ortaya koymak üzere çeşitli yöntemler kullanılarak değişik çalışmalar yapılmıştır. Bizim çalışmamızda ise vitamin D' nin kemik metastazlı meme kanseri hastalarının tedavisindeki önemini anlamak amacıyla apoptozis üzerindeki etkisi araştırıldı. Bunun için vitamin D tedavisi sonrası CK-18 seviyelerindeki değişiklikler incelendi. Vitamin D tedavisi sonrasında CK-18 düzeylerinde anlamlı bir yükselme ve vitamin D düzeyleri ile CK-18 düzeyleri arasında kuvvetli pozitif bir korelasyon bulundu. Ayrıca 4-7 yıldır vitamin D tedavisi alanlarda 1-3 yıldır bu tedaviyi alanlara göre tedavi sonrası CK-18 düzeylerinin belirgin olarak yüksek olduğu görüldü.

Hastalarımız kemoterapi, radyoterapi, hormon tedavisi gibi tedavi seçeneklerinden birini ya da kombine tedavileri zaten almaktaydı. Apoptozisteki artışın bunlardan da kaynaklandığı düşünülebilir. Ancak, hem bu tedavi türlerine göre alt gruplarda CK-18 düzeyleri açısından anlamlı bir fark bulunmayışı hem de daha uzun süredir (4-7 yıl) vitamin D tedavisi alanlarla 1-3 yıldır alanlar arasında belirgin bir fark bulunuşu bizi apoptozis üzerindeki bu olumlu etkinin vitamin D aracılıklı olduğunu düşünmeye yöneltmiştir.

Olofson ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 61 meme kanserli hastanın docetaxel ve CEF (siklofosfamid/epirubicin/5-fluorouracil) terapisi görürken serumları alınmış ve meme kanseri hücre ve dokularından ilaç-indüklü CK-18 salınımı incelenmiştir. Docetaxel ve CEF ile indüklenmiş kaspaz-çentikli CK-18 düzeylerinde artış olduğu gözlenmiştir (Olofson ve ark 2007).

Bir başka çalışmada ise 4 kür anthracycline tabanlı neoadjuvan kemoterapi alacak 42 invaziv meme kanserli hastanın ilk kemoterapi kürünü almadan önce, aldıktan 24 ve 48 saat sonra serum örnekleri alınarak CK-18 seviyeleri ölçülmüştür. Tedaviye cevap verenlerde kemoterapi-indüklü apoptozis değerlendirildiğinde ilaç öncesine göre 24 ve 48 saat sonraki CK-18 seviyeleri anlamlı olarak yüksek bulunmuş olup, tedaviye cevap vermeyenlerde ise anlamlı bir fark bulunamamıştır (Demiray ve ark 2006).

CK-18 seviyelerinin artışı bize apoptozisteki artışı anlatmaktadır. Gerek Olofson ve ark (2007)' nın gerekse Demiray ve ark (2006)' nın sonuçlarına göre, meme kanserli hastalarda tedavinin etkinliğini anlamak amacıyla apoptozisin belirteci olan CK-18' in araştırılmasının uygun olduğu anlaşılmaktadır. Bu iki

çalışmada da artan CK-18 seviyeleri elde edilmiş ve tedavinin faydalı olduğu sonucuna varılmıştır, bizim çalışmamızda da CK-18 düzeyi vitamin D tedavisi sonrası artış gösterdiğinden, vitamin D tedavisinin meme kanserinde başarılı olduğu söylenebilir.

Çalışmamızda HSP-90 düzeylerine vitamin D tedavisinin anlamlı bir etkisi gösterilememiştir.

HSP-90' la ilgili Pick ve ark (2007)'nın yaptığı çalışmada 10 yıldır takipte olan 655 meme kanserli hastadan elde edilen hücre kültürlerinde doku mikroyarray çalışması yapılmıştır. Çalışmada HSP-90 düzeyleri yüksek bulunmuş olup, bunun tümör büyüklüğü, nükleer evre ve lenf nodu yayılımıyla ilişkili olduğu düşünülmüştür.

3 sağlıklı ve 30 meme malign tümörlü köpekte immünohistokimyasal yöntemle yapılan çalışmada ise HSP-90 hem infiltratif hem de invaziv olan tümörlerin tümünde yüksek oranda bulunmuştur (Romanucci ve ark 2006).

Yapılan çalışmalarda HSP-90 seviyelerinin meme kanserinde yükseldiği tespit edilmiştir. Şimdiye kadar meme kanseri tedavisi sonrası HSP-90 seviyelerinin araştırıldığı herhangi bir çalışmaya rastlayamadık.

Siyalik asit, inflamatuvar bir belirteç olarak da kullanılan ancak, son yıllarda pek çok kanser türünde olduğu gibi meme kanserinde de düzeyleri ölçülen bir belirteçtir. Çalışmamızda vitamin D tedavisinin siyalik asit düzeyleri üzerine de bir etkisi olup olmadığını araştırdık.

Hogan-ryan ve arkadaşları tarafından 56 sağlıklı ve 65 meme kanserli olguda tedavilerine 2 hafta ara vermek suretiyle serum total siyalik asit seviyeleri çalışılmıştır. Meme kanserlilerde serum TSA değerlerinin anlamlı olarak sağlıklı gruptan yüksek olduğu ve ayrıca, tümör evreleriyle uyumlu olarak artış gösterdiği bulunmuştur (Hogan-ryan ve ark 1980).

Raval ve arkadaşları tarafından meme kanserinde tedavi sonrası siyalik asit seviyelerini değerlendirmek üzere, 170 meme kanserli ve 56 sağlıklı kadında yapılan çalışmada TSA ve LSA değerleri araştırılmıştır. Henüz tedavi edilmemiş meme kanseri hastalarının serum TSA ve LSA değerlerinin kontrol grubuna göre daha

yüksek olduğu bulunmuştur. Ayrıca, aynı meme kanserli hastaların tedavi aldıktan sonraki TSA ve LSA düzeylerinin tedavi öncesi değerleriyle karşılaştırıldığında anlamlı olarak düştüğü tespit edilmiştir. Sonuçta, TSA ve LSA değerlerinin meme kanseri teşhisinde ve meme kanseri hastalarının antikanser tedaviye cevabının değerlendirilmesinde yararlı olacağı düşünülmüştür (Raval ve ark 1997).

Benzer olarak, meme kanserli hastalarda, aromatoz inhibitörü tedavisinin serum total siyalik asit düzeyine etkisini ortaya koymak amacıyla 20 postmenapozal meme kanserli hastada yapılan çalışmada, çalışmaya katılan tüm hastalardan hem aromatoz inhibitörü tedavisi başlamadan önce hem de 3 aylık tedavi sonrasında olmak üzere iki kez kan örneği alınarak siyalik asit ölçümü yapılmıştır. Tedavi sonrası total siyalik asit düzeylerinde anlamlı bir azalma gözlenmiş ve bunun meme kanseri tedavisinde prognostik bir belirteç olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır (Kıyıcı ve ark 2010).

Hem Raval ve ark (1997)' nin hem de Kıyıcı ve ark (2010)' nin çalışmalarında meme kanseri hastalarının farklı tedaviler sonrası siyalik asit düzeyleri azalmıştır. Ancak vitamin D tedavisinin siyalik asit düzeyleri üzerine etkisini araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bizim çalışmamızda da vitamin D tedavisi sonrası siyalik asit seviyeleri anlamlı olarak azalma göstermiştir. Buna dayanarak, ilave D vitamininin meme kanseri tedavisinde faydalı olduğu ve siyalik asitin tedavi takibinde kullanılabileceği sonucuna varılabilir.

Vitamin D tedavisi verilen kemik metastazlı meme kanseri hastalarıyla yaptığımız çalışmada vitamin D' nin hastaların tedavisine katkısını anlamak üzere tedavi sonrası apoptozis araştırıldı. Bu amaçla, HSP-90, CK-18 ve ilaveten siyalik asitle ilgili çalışmalar yapıldı.

Literatür bilgilerine göre, apoptozis uyarılırsa CK-18' in artması, siyalik asitin ise azalması beklenmekteydi. Bizim çalışmamızda da vitamin D' nin apoptozisi uyardığı artan CK-18 düzeyleri ile gösterildi. Fakat, HSP-90 düzeylerinin vitamin D tedavisi ile nasıl etkileneceği konusunda elde edilmiş bir sonuç bulunmamaktaydı. Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz CK-18 ve siyalik asit düzeyleri ile ilgili bulgularımız literatürle uyumlu olmasına rağmen, HSP-90 düzeyleri anlamlı bir değişiklik göstermedi. Ayrıca, hem verilen vitamin D tedavisi süresi hem de vitamin D düzeyleri ile CK-18 düzeyleri arasında kuvvetli

korelasyonlar olduğu gösterildi. Bu da vitamin D tedavisinin apoptozisi belirgin biçimde uyardığını düşündürmektedir. Bu sonuçlar ışığında vitamin D' nin meme kanseri tedavisine yardımcı olduğu düşünülebilir.

HSP-90 düzeylerinde ne tedaviye bağı anlamlı bir fark gözlenmiştir. Ne de verilen vitamin D tedavisi süresi, vitamin D ve CK-18 düzeyleri ile HSP-90 düzeyleri arasında bir ilişki bulunmuştur. HSP-90' ın tümörlerde arttığı daha önceki çalışmalarda immünohistokimyasal olarak gösterilmiştir. D vitamini tedavisinin serum HSP-90 düzeyleri üzerine etkisi bizim çalışmamızda ilk olarak değerlendirilmiştir. Ancak, bu düzeylerde anlamlı bir fark bulamayışımızın farklı nedenleri olabilir. İlk olarak, hasta grubumuzun 15 gün süre ile vitamin D tedavisi alması HSP-90 düzeylerinin etkilenmesi için yeterli bir süre olmayabilir. İkinci olarak, vitamin D de diğer hücre içi reseptörleri olan hormonlar gibi ısı şok protein ailesi üyeleri ile etkileşiyor olabilir. Bu yüzden, HSP-90' ın hem apoptozisle hem de vitamin D ile ilişkisini ortaya koymaya yönelik ileri çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünüyoruz.

Tümör histopatolojik türüne göre ölçtüğümüz belirteçlerin düzeylerinin değişip değişmediğini incelediğimizde de infiltratif duktal ve invazif duktal meme kanseri gruplarındaki hasta sayısı diğer alt gruplara göre daha fazla olduğundan bu iki grup karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak infiltratif duktal meme kanserinde invazif duktal kansere göre hem vitamin D tedavisi öncesinde hem de sonrasında CK-18 düzeylerinin anlamlı olarak yüksek olduğunu bulduk. Bu durumu infiltratif duktal meme kanserinde vitamin D aracılıklı apoptozisin daha fazla olduğu şeklinde yorumladık.

Çalışmamızda tümör boyutuyla tedavi sonrası CK-18 düzeyi arasında negatif bir korelasyon bulunmuş olup, tedavi sonrası CK-18 seviyelerinin artmasıyla tümör boyutunun azalması zaten beklenen bir durumdur.

Ancak CK-18, HSP-90 ve siyalik asit arasında anlamlı korelasyon bulunamamıştır, böylelikle bunların birbirinden bağımsız olarak meme kanseri tedavisinin değerlendirilmesinde kullanılabileceği düşünülmüştür.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bulgularımıza göre, meme kanseri tedavisinde vitamin D' nin olumlu etkisinin olduğunu düşünüyoruz. Vitamin D' nin meme kanserinde apoptozisi uyarmada hem kısa süreli hem de uzun süreli etkilerinin olduğunu çalışmamızda gözledik. Ayrıca, meme kanserinde tedaviye cevabın değerlendirilmesinde CK-18 ve siyalik asit düzeylerinin kullanılabileceği kanaatindeyiz.

Meme kanseri tedavisinde vitamin D' nin fazla kullanımı hiperkalsemiye sebep olabileceği için kuvvetli antikanser etkileri olan fakat, düşük kalsemik aktiviteye sahip vitamin D analoglarıyla ilgili ve meme kanseri tedavisinde HSP-90' nın önemini araştırmak amacıyla daha ileri çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

6. ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Kemik Metastazı Olan Meme Kanseri Hastalarda Verilen D Vitamini Tedavisinin Dolaşımdaki HSP-90 ve CK-18 Düzeyleri Üzerine Etkisi

“Cemile Muhteşem Değişli”

Biyokimya (Tıp) Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2010

Kemik metastazı olan meme kanseri hastalarına verilen D vitamini tedavisinin apoptozis üzerine etkisini araştırmayı amaçladığımız çalışmamızda, ısı şok proteini HSP-90 ve apoptozisin dolaşımdaki belirteci olan kaspazla çentiklenmiş sitokeratin CK-18 ve siyalik asit düzeyleri araştırılmıştır.

Çalışmaya katılan 35 hastanın çalışma başlangıcında ve 15 günlük vitamin D tedavisi sonrasında kan örnekleri alınarak, 25-(OH)D₃, CK-18, HSP-90 ve siyalik asit düzeyleri ölçülmüştür. 25-(OH)D₃ düzeyleri HPLC, CK-18 ve HSP-90 düzeyleri ELİSA ve siyalik asit düzeyleri ise kolorimetrik yöntemlerle ölçülmüştür. Sonuçta, vitamin D tedavisi sonrası CK-18 düzeyleri anlamlı olarak artmış, siyalik asit düzeyleri anlamlı olarak azalmıştır; fakat HSP-90 düzeylerinde anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. Ayrıca, vitamin D düzeyleri ile CK-18 düzeyleri arasında kuvvetli pozitif korelasyon bulunmuştur. Verilen vitamin D tedavisi süresi uzadıkça da CK-18 düzeylerinin arttığı gözlenmiştir.

Vitamin D tedavisinden sonra CK-18’ in yükselmesi apoptozisin arttığını, siyalik asitin azalması da tedavinin faydalı olduğunu düşündürmektedir. Bu sonuçlara dayanarak, meme kanseri tedavisinde vitamin D’ nin olumlu etkisi olduğu düşünülmektedir. Alınması gereken vitamin D miktarı, hiperkalsemiye sebep olmadan kuvvetli antikanser etki gösteren vitamin D analogları ve HSP-90’ la ilgili daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Sözcükler: CK-18; HSP-90; meme kanseri; siyalik asit; vitamin D.

7. SUMMARY

The Effect of Vitamin D Treatment on Circulating Levels of HSP-90 and CK-18 in Patients with Breast Cancer with Bone Metastasis

In our study in which we aimed to investigate the effects of vitamin D therapy on apoptosis in breast cancer patients with bone metastasis, heat shock protein HSP-90, caspase cleaved cytokeratin CK-18 which is an apoptosis marker in the circulation and sialic acid levels were evaluated.

25-(OH)D₃, CK-18, HSP-90 and sialic acid levels were measured in blood samples of 35 patients participated in the study at the beginning of the study and after vitamin D therapy for 15 days. 25-(OH)D₃ levels, CK-18 and HSP-90 concentrations were determined with HPLC and ELISA technique respectively and sialic acid levels with colorimetric method. CK-18 levels were significantly increased and sialic acid levels were significantly decreased after vitamin D therapy, however there was no significant difference in HSP-90 levels. There was strong positive correlation between vitamin D and CK-18 levels. As duration of vitamin D therapy increases, CK-18 levels also significantly increase.

We suggest that apoptosis is induced after vitamin D therapy by increased CK-18 levels and the effectiveness of the therapy by decreased sialic acids. It is also suggested that vitamin D has beneficial effects in treatment of breast cancer. Further studies are needed in order to clarify the amount of vitamin D to be supplied, vitamin D analogs which show strong anticancer effect and HSP-90.

Key words: CK-18; HSP-90; breast cancer; vitamin D; sialic acid.

8. KAYNAKLAR

1. Adamo V, Altavilla G, Caristi N, Chillemi S, Giacobello T, Scalisi R, Palmara D. Behavior of serum sialic acid levels at various stages of neoplastic disease. *Minerva Med.* 1985; 76(43): 2067-70.
2. Ahonen MH, Tenkanen L, Teppo L, Hakama M, Tuohimaa P. Prostate cancer risk and prediagnostic serum 25-hydroxyvitamin D levels. *Cancer Causes Control (Finland).* 2000; 11: 847-52.
3. Akdur R. Kanser epidemiyolojisi ve kanserden korunma ilkeleri. Sağlık ve Sosyal Yardım Vakfı Dergisi. 1993; Sayı: 4
4. Akgül H, Tez M, Ünal AE, Keşkek M, Sayek İ, Özçelik T. Echinococcus against cancer: Why not? *Cancer.* 2003; 98(9): 1999-2000.
5. Akins PT, Liu PK, Hsu CY. Immediate early gene expression in response to cerebral ischemia: friend or foe? *Stroke.* 1996; 27: 1682-1687.
6. Albuquerque GRP, Nakamura CV, de Souza W, Morgado-Diaz JA. Differential expression of sialic acid and N-acetylgalactosamine residues on the cell surface of intestinal epithelial cells according to normal or metastatic potential. *J Histochem Cytochem.* 2004; 52(5): 629-40.
7. Ameisen JS. The origin of programmed cell death. *Science.* 1996; 272: 1278.
8. Amir E, Simmons CE, Freedman OC, Dranitsaris G, Cole DE, Vieth R, Ooi WS, Clemons M. A phase 2 trial exploring the effects of high-dose (10 000 IU/day) vitamin D(3) in breast cancer patients with bone metastases. *Cancer.* 2010; 116(2): 284-91.
9. Aran M, Eştürk H, İncekara O. Meme kanserinde mastektomiden sonra semptomsuz hastalık süresi. 6. Ulusal Kanser Kongresi Bildirileri Cilt 1. Çeltüt Matbaacılık. 1987; 622-8.
10. Armas LA, Hollis BW, Heaney RP. Vitamin D2 is much less effective than vitamin D3 in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89: 5387-5391.
11. Ata N. Kanser hakkında bilmeniz gerekenler. Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi Dergisi. İmpress Baskı Tesisleri. Ankara. 2005; 5-15.
12. Balakumran A, Champbell GA, Maslen MT. Calcium channel blockers induce thymic apoptosis in vivo in rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1996; 139: 122-127.
13. Banasiak KJ, Haddad GG. Hypoxia-induced apoptosis: effect of hypoxic severity and role of p53 in neuronal cell death. *Brain Res.* 1998; 797: 295-304.
14. Banerji U. Heat shock protein 90 as a drug target: some like it hot. *Clin Cancer Res.* 2009; 15(1): 9-14.
15. Bao F, Liu D. Peroxynitrite generated in the rat spinal cord induces apoptosis cell death and activates caspase-3. *Neuroscience.* 2003; 116: 59-70.
16. Barak V, Goike H, Panaretakis KW, Einarsson R. Clinical utility of cytokeratins as tumour markers. *Clin Biochem.* 2004; 37: 529-540.
17. Basu S, Matsutake T. Heat shock protein-antigen presenting cell interactions. *Methods.* 2004; 32: 38-41.
18. Başoğlu M, Atamanalp SS, Yıldızan Mİ, Aydın B, Öztürk G, Akçay F, Ören D. Correlation between the serum values of soluble intercellular adhesion molecule-1 and total sialic acid levels in patients with breast cancer. *Eur Surg Res.* 2007; 39(3): 136-40.
19. Bellamy CO, Malcomson RD, Harrison DJ, Wyllie AH. Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Cancer Biology.* 1995; 6: 3-16.

20. Bentley JR, Delfino RJ, Taylor TH, Howe S, Anton-Culver H. Differences in breast cancer stage at diagnosis between non-hispanic white and hispanic populations. San Diego County 1988-1993. *Breast Cancer Research and Treatment*. 1998; 50: 1-9.
21. Berberoğlu U. Kanserde erken tanının önemi. I. Kanser Sempozyumu, Özdeniz Matbaacılık, Ankara. 1991.
22. Berube S, Diorio C, Verhoek-Oftedahl W, Brisson J. Vitamin D, calcium and mammographic breast densities. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004; 13(9): 1466-1472.
23. Boisseir S, Magnetto S, Frappart L. Bisphosphonates inhibit prostate and breast carcinoma cell adhesion to unmineralized and mineralized bone extracellular matrices. *Cancer Res*. 1997; 57: 3890-3894.
24. Bortner CD, Odehburg NBE, Crdowski JA. The role of fragmentation in apoptosis. *Trends in Cell Biology*. 1995; 5: 21-28.
25. Bouillon R. Vitamin D: from photosynthesis, metabolism, and action to clinical applications. *Endocrinology*. 2001; 1009-28.
26. Bouillon R, Moody T, Sporn M, Barrett JC, Norman AW. NIH deltanoids meeting on vitamin D and cancer conclusion and strategic options. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2005; 97: 3-5.
27. Brinley FJJ, Tiffert T, Scarpa A. Mitochondria and other calcium buffers of squid axon studied in situ. *J Gen Physiol*. 1978; 72: 101-127.
28. Brown AJ, Dusso A, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol*. 1999; 277: 157-175.
29. Brown MA, Zhu L, Schmidt C, Tucker PW. HSP90-from signal transduction to cell transformation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 363(2): 241-246.
30. Burget R, Tuncer İ, Bozdemi N. Türkiye’de kanser sıklığı. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi. 1994; 38-39.
31. Calderwood SK, Khaleque MA, Sawyer DB, Ciocca DR. Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem Sci*. 2006; 31(3): 164-72.
32. Campanacci M. Bone and soft tissue tumors. Wien-Newyork, Springer Verlag. 1990; 677-99.
33. Campbell JB. Breast cancer-race, ethnicity, and survival: a literature review. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2002; 74: 187-192.
34. Cannell JJ, Vieth R, Umhau JC, Holick MF, Grant WB, Madronich S, Garland CF, Giovannucci E. Epidemic influenza and vitamin D. *Epidemiol Infect*. 2006; 134(6): 1129-40.
35. Caotes PJ, Hales SA, Hall PA. The association between cell proliferation and apoptosis; studies using cell cycle-associated proteins Ki67 and DNA polymerase alpha. *J Pathol*. 1996; 178: 71-77.
36. Chapuy MC, Preziosi P, Maamer M, Arnaud S, Galan P, Hercberg S, Meunier PJ. Vitamin D insufficiency in adults and the elderly. *Vitamin D*. Academic Press. 1997; 679-693.
37. Choi WS, Lee EH, Chung CW. Cleavage of bax is mediated by caspase dependent or independent calpain activation in dopaminergic neuronal cells: protective role of Bcl 2. *J Neurochem*. 2001; 77: 1531-1541.
38. Ciocca DR, Calderwood SK. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive and treatment implications. *Cell Stress & Chaperones*. 2005; 10(2): 86-103.
39. Clark JI, Muchowski PJ. Small heat shock proteins and their potential role human disease. *Curr Opin Biol*. 2000; 10(1): 52-9.
40. Cohen JJ. Apoptosis: the physiological pathway of cell death. *Hosp Pract*. 1993a; 15: 35-43.

41. Cohen JJ. Apoptosis. *Immunol Today*. 1993b; 14: 126-130.
42. Collins JA, Cytinthia CA, Young KK, Vesely JM. Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. *J Histochem Cytochem*. 1997; 45: 923-934.
43. Coolsaet BL. The varicocele syndrome: venography determining the optimal level for surgical management. *J Urol*. 1980; 124: 833-838.
44. Crew KD, Gammon MD, Steck SE, Hershman DL, Cremers S, Dworakowski E, Shane E, Terry MB, Desai M, Teitelbaum SL, Neugut AI, Santelle RM. Association between plasma 25-hydroxyvitamin D and breast cancer risk. *Cancer Prev Res*. 2009; 2(6): 598-604.
45. Crowe MJ, Bresnahan JC, Shuman SL, Masters JN, Beattie MS. Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. *Nat Med*. 1997; 3: 73-76.
46. Cummings MC, Winterford CM, Walker NI. Apoptosis. *Am J Surg Pathol*. 1997; 21: 88-101.
47. Cuzick J. Epidemiology of breast cancer. *The Breast*. 2003; 12: 405-411.
48. Cylwik B, Chrostek L, Szmitkowski M. Diagnostic value of total and lipid-bound sialic acid in malignancies. *Pol Merkuriusz Lek*. 2005; 19(110): 237-41.
49. Çöl M, Erçevik E, Genç Y. Bor madenlerinde çalışan işçiler ve ailelerinde kanser araştırması. *Sağlık ve Toplum*. 2000; 10(1): 15-20.
50. Demiray M, Ulukaya EE, Arslan M, Gökgöz S, Saraydaroglu O, Ercan İ, Evrensel T, Manavoğlu O. Response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer could be predictable by measuring a novel serum apoptosis product, caspase-cleaved cytokeratin 18: a prospective pilot study. *Cancer Invest*. 2006; 24(7): 669-676.
51. Didelot C, Lanneau D, Brunet M, Joly AL, De Thonel A, Chiosis G, Garrido C. Anti-cancer therapeutic approaches based on intracellular and extracellular heat shock proteins. *Curr Med Chem*. 2007; 14(27): 2839-47.
52. Dimitri P, Bishop N. Rickets: new insights into a re-emerging problem. *Curr Opin Orthop*. 2007; 8: 486-493.
53. Driedger SM, Eyles J. Organochlorines and breast cancer: The uses of scientific evidence in claims-making. *Social Science and Medicine*. 2001; 52: 1589-1605.
54. Dumitrescu RG. Understanding breast cancer risk-where do we stand in 2005? *J Cell Mol Med*. 2005; 9: 208-221.
55. Dupont WD, Page DL, Rogers LW. Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. *N Engl J Med*. 1985; 312(3): 146-51.
56. Dwivedi C, Dixit M, Hardy RE. Plasma sialyltransferase as a tumor marker. *Cancer Detect Prev*. 1988; 11(3-6): 191-6.
57. Earnshaw WC. Nuclear changes in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol*. 1995; 7: 337-43.
58. Eastman A. Survival factors, intranuclear signal transduction and the activation of endonucleases in apoptosis. *Cancer Biology*. 1995; 6: 45-52.
59. Edeiken J. Roentgen Diagnosis of Diseases of Bone. Vol I, 3rd ed. Baltimore/London. Williams&Williams. 1985; 340-74.
60. Emmelot P. Biochemical properties of normal and neo-plastic cell surfaces. *Eur J Cancer*. 1973; 9: 319-333.
61. Evan GL, Wyllie AH, Gilbert GS, Littlewood TD, Lond H, Breaks M. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell*. 1992; 69: 119-128.

62. Evans IM, Hilf R, Murphy M, Bosmann HB. Correlation of serum, tumor, and liver serum glycoprotein: N-acetylneuraminic acid transferase activity with growth of the R3230AC mammary tumor in rats and relationship of the serum activity to tumor burden. *Cancer Res.* 1980; 40: 3103-11.
63. Ewertz M, Duffy SW, Adami HO. Age at first birth, parity and risk of breast cancer: a meta-analysis of 8 studies from the Nordic countries. *Int J Cancer.* 1990; 46: 597.
64. Facciponte JG, MacDonald IJ, Wang XY, Kim H, Manjili MH, Subjeck JR. Heat shock proteins and scavenger receptors: role in adaptive immune responses. *Immunol Invest.* 2005; 34: 325-342.
65. Feijoo-Carnero C, Rodriguez-Berrocal FJ, Paez de la Cadena M, Ayude D, de Carlos A, Martinez-Zorzano VS. Clinical significance of preoperative serum sialic acid levels in colorectal cancer: utility in the detection of patients at high risk of tumor recurrence. *Int J Biol Markers.* 2004; 19(1): 38-45.
66. Feskanich D, Ma J, Fuchs CS. Plasma vitamin D metabolites and risk of colorectal cancer in women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004; 13: 1502-8.
67. Fingerhut R, van der Horst GT, Verheijen FW, Conzelmann E. Degradation of gangliosides by the lysosomal sialidase requires an activator protein. *Eur J Biochem.* 1992; 20: 623-9.
68. Fleisch H, Russel RGG, Francis MD. Diphosphonates inhibit hydroxiapatite dissolution in vitro and bone resorption in tissue culture and in vivo. *Science.* 1969; 165: 1262-1264.
69. Fleisch H. Bisphosphonates: pharmacology and use in the treatment of the tumour induced hypercalcaemic and metastatic bone disease. *Drug.* 1991; 42: 919-944.
70. Gacad MA, Adams JS. Proteins in the heat shock-70 family specifically bind 25 hydroxyvitamin D3 and 17 β -estradiol. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83: 1264-1267.
71. Ganju L, Chanda S, Karan D. Induction of stress protein in response to hypoxia. *J Exp Biol.* 1999; 37(4): 344-9.
72. Garland CF. Sun avoidance will increase incidence of cancers overall. *BMJ.* 2003; 327: 1228.
73. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol.* 1992; 119: 493-501.
74. Giovannucci E. The epidemiology of vitamin D and cancer incidence and mortality: review (UnitedStates). *Cancer Causes Control.* 2005; 94: 1867-75.
75. Giovannucci E, Liu Y, Rimm EB. Prospective study of predictors of vitamin D status and cancer incidence and mortality in men. *J Natl Cancer Inst.* 2006; 98: 451-9.
76. Goodwin PJ. Management of familial breast cancer risk. *Breast Cancer Research and Treatment.* 2000; 62: 19-33.
77. Gorham ED, Garland CF, Garland FC. Vitamin D and prevention of colorectal cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2005; 97: 179-94.
78. Gusterson AB, Ross TD, Heath JV, Stein T. Basal cytokeratins and their relationship to the cellular origin and functional classification of breast cancer. *Breast Cancer Reseach.* 2005; 7: 143-148.
79. Güleş Ö, Eren Ü. Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi.* 2008; 2: 73-78.
80. Hall AM, Hooper C. The frequency of breast screening in older women. *Professional Nurse.* 1999; 15(3): 155-159.

81. Harris JR, Canellos PG, Helman S. Cancer of the breast. *Cancer Principles & Practice of Oncology*. 2nd ed. Philadelphia. J.B Upplncott Co. 1985; 1119-77.
82. Haslbeck M, Walke S, Stromer T. Hsp 26: a temperature regulated chaperone. *EMBO J*. 1999; 18(23): 6744-51.
83. Henderson A. Vitamin D and the breastfed infant. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs*. 2005; 34: 367-372.
84. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000; 407: 770-776.
85. Henle KJ, Jethmalani SM, Nagle WA. Stres proteins and glycoproteins. *Int J Mol Med*. 1998; 1(1): 25-32.
86. Hetts SW. To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA*. 1998; 278: 300-307.
87. Hogan-Ryan A, Fennelly JJ, Jones M, Cantwell B, Duffy MJ. Serum sialic acid and CEA concentrations in human breast cancer. *Br J Cancer*. 1980; 41: 587-592.
88. Holdenrieder S, Stieber P. Apoptotic markers in cancer. *Clin Biochem*. 2004; 37: 605-617.
89. Holick MF. McCollum award lecture, 1994: vitamin D-new horizons for the 21st century. *Am J Clin Nutr*. 1994; 60: 619-630.
90. Holick MF. Sunlight “D” ilemma: risk of skin cancer or bone disease and muscle weakness. *Lancet*. 2001; 357: 4-6.
91. Holick MF. Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, hearth disease and osteoporosis. *Am J Clin Nutr*. 2004; 79: 362-71.
92. Holick MF. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *J Clin Invest*. 2006; 116: 2062-72.
93. Holick MF, Garabedian M. Vitamin D: photobiology, metabolism, mechanism of action, and clinical applications. *American Society for Bone and Mineral Research*. 2006; 129-37.
94. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*. 2007; 357: 266-281.
95. Hu YM, Benedict MA, Ding LY. Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf I-mediated caspase-9 activation and apoptosis. *EMBO J*. 1999; 18: 3586- 95.
96. Javid B, MacAry PA, Lehner PJ. Structure and function: heat shock proteins and adaptive immunity. *J Immunol*. 2007; 179: 2035-2040.
97. Kansu E. Hedeflenmiş tedavilerde “hedef” moleküller. *ANKEM Dergisi*. 2005; 19(2): 112-116.
98. Karamanoğlu AE. Kemoterapi alan kanser hastalarında yaşam kalitesi ve yaşam kalitesini etkileyen faktörlerin incelenmesi. *Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Sağlık Kurumları Yöneticiliği Ana Bilim Dalı, Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi, İstanbul*. 1999.
99. Kazezoğlu C, Gökmen SS, Sunar B, Aygıt C, Çakır B. Benin ve melanom dışı malin deri tümörlü hastalarda serum total ve lipide bağlı siyalik asit düzeyleri. *Türk Biyokimya Dergisi*. 2007; 32(1): 17-21.
100. Keane RW, Kraydieh S, Lotocki G, Bethea JR, Krajewski S, Reed JC, Dietrich WD. Apoptotic and anti-apoptotic mechanisms following spinal cord injury. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2001; 60: 422-429.
101. Keeton WT, Gould JL. Büyüme ve kötü huylu gelişme. *Genel Biyoloji*. 5. Baskıdan Çeviri. Palme Yayıncılık. Ankara. 2003; 24: 600-604.
102. Kelsey JL, Gammon MD. The epidemiology of breast cancer. *CA-A Cancer Journal for Clinicians*. 1991; 41(3): 146-165.

103. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis. A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972; 26: 239-245.
104. Kıyıcı A, Artaç M, Çiçekler H, Eren Ö, Mehmetoğlu İ, Börüban C. Aromatoz inhibitörü tedavisinin meme kanserli hastalarda serum total siyalik asit düzeylerine etkisi. *Selçuk Tıp Derg*. 2010; 26(2): 35-37.
105. Kiess W, Gallaher B. Hormonal control of programmed cell death apoptosis. *Eur J Endocrin*. 1998; 18: 482-91.
106. Kim KN. Retinoic acid and ascorbic acid act synergistically in inhibiting human breast cancer cell proliferation. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2006; 17: 454-462.
107. Korber P, Stahl JM, Nierhaus KH. Hsp 15: a ribosome associated heat shock protein. *EMBO J*. 2000; 19(4): 741-8.
108. Korsmeyer SJ. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes; regulators of cell death. *Blood*. 1992; 80: 879-86.
109. Krajewski S, Krajewska M, Ellerby LM, Welsh K, Xie Z, Deveraux QL, Salvesen GS, Bredesen DE, Rosenthal RE, Fiskum G, Reed JC. Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci*. 1999; 96: 5752-57.
110. Kromer G, Petit P, Zamzami N, Vayssiere JL, Mignotte B. The biochemistry of programmed cell death. *Fedn Am Soc exp Biol J*. 1995; 9: 1277-87.
111. Kuper H, Yang L, Sandin S, Lof M, Adami HO, Weiderpass E. Prospective study of solar exposure, dietary vitamin D intake, and risk of breast cancer among middle-aged women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009; 18(9): 2558-61.
112. Kutluk T, Kars A. Kanser konusunda genel bilgiler. *Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu Yayınları*, Ankara. 1992.
113. Laad AD, Thomas ML, Fakih AR, Chiplun kar SV. Human gamma delta T cells recognize heat shock protein-60 on oral tumor cells. *Int J Cancer*. 1999; 80(5): 709-714.
114. Lacroix M. Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells. *Endocrine-Related Cancer*. 2006; 13(4): 1033-67.
115. Larsen ER, Mosekilde L, Foldspang A. Vitamin D and calcium supplementation prevents osteoporotic fractures in elderly community dwelling residents: a pragmatic population-based 3-year intervention study. *J Bone Miner Res*. 2004; 19: 370.
116. Levison DA, Hopwood D. Atrophy and apoptosis in the cyclical human endometrium. *J Pathol*. 1976; 119: 159-166.
117. Li M, Ona VO, Chen M, Kaul M, Tenneti L, Zhang X, Stieg PE, Lipton SA, Friedlander RM. Functional role and therapeutic implications of neuronal caspase-1 and -3 in a mouse model of traumatic spinal cord injury. *Neuroscience*. 2000; 99: 333-342.
118. Lin J, Manson JE, Lee IM, Cook NR, Buring JE, Zhang SM. Intakes of calcium and vitamin D and breast cancer risk in women. *Arch Intern Med*. 2007; 167: 1050-9.
119. Linder S, Havelka AM, Ueno T, Shoshan M. Determining tumor apoptosis and nekrosis in patient serum using cytokeratin 18 as a biomarker. *Cancer Letters*. 2004; 214: 1-9.
120. Linder S. Cytokeratin markers come of age. *Tumour Biol*. 2007; 28(4): 189-95.
121. Lips P. Vitamin D physiology. *Prog Biophys Mol Biol*. 2006; 92: 4-8.
122. Liu XZ, Xu XM, Hu R, Du C, Zhang SX, McDonald JW, Dong HX, Wu YJ, Fan GS, Jacquin MF, Hsu CY, Choi DW. Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. *J Neurosci*. 1997; 17: 5395-5406.

123. Lou J, Lenke LG, Ludwig FJ, O'Brien MF. Apoptosis as a mechanism of neuronal cell death following acute experimental spinal cord injury. *Spinal Cord*. 1998; 36: 683-690.
124. Lu J, Ashwell K, Ken WS, Waite P. Advances in spinal cord injury: role of apoptosis. *Spine*. 2000; 25: 1859-1866.
125. Luscombe CJ, Fryer AA, French ME. Exposure to ultraviolet radiation: association with susceptibility and age at presentation with prostate cancer. *Lancet*. 2001; 358: 641-2.
126. MacLaughlin J, Holick MF. Aging decreases the capacity of human skin to produce vitamin D3. *J Clin Invest*. 1985; 76: 1536-1538.
127. Mahalingam D, Swords R, Carew JS, Nawrocki ST, Bhalla K, Giles FJ. Targeting HSP90 for cancer therapy. *British Journal of Cancer*. 2009; 100: 1523-1529.
128. Majno G, Torisl A. Apoptosis oncosis and necrosis. *Am J Pathol*. 1995; 146: 3-15.
129. Manisha B, Liu J, Geng X. Repeated exposure to acid and bile selectively induces colonic phenotype expression in a heterogeneous Barrett's epithelial cell line. *Lab Invest*. 2008; 88: 643-51.
130. Manjer J, Berglund BL, Garne JP, Janzon L, Malina J. Breast cancer incidence in relation to smoking cessation. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2000; 61: 121-129.
131. Millerk DM, Blume S, Borst M. Oncogenes: Malignant transformation and modern medicine. *Am J Med Sci*. 1990; 300: 59-65.
132. Miyashita T, Krajewski S, Krajewsko M. Tumor supressor p53 is a regulator of bcl-2 bax gene expression in vivo. *Oncogene*. 1994; 9: 1799-1805.
133. Moseley P. Stress proteins and the immune response. Erişim adresi: www.elsevier.com/locate/immpharm. Erişim Tarihi: 09.02.2006.
134. Nagpal S, Na S, Rathnachalam R. Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. *Endoc Rev*. 2005; 26: 662-687.
135. Nakamura K, Bossy-Wetzel E, Burns K. Changes in endoplasmic reticulum luminal environment affect cell sensitivity to apoptosis. *J Cell Biol*. 2000; 150: 731-740.
136. Nakano R. Apoptosis: gene directed cell death. *Horm Res*. 1997; 48: 2-4.
137. Nakatsuka H, Ohta S, Tanaka J, Toku K, Kumon Y, Maeda N, Sakanaka M, Sakaki S. Release of cytochrome c from mitochondria to cytosol in gerbil hippocampal CA1 neurons after transient forebrain ischemia. *Brain Research*. 1999; 849: 216-219.
138. Neckers L, Ivy SP. Heat shock protein 90. *Curr Opin Oncol*. 2003; 15: 419-424.
139. Netzer WJ, Hartl FU. Protein folding in the cytosol: chaperonin-dependent and-independent mechanisms. *Trends Biochem Sci*. 1998; 23: 68-74.
140. Newton K, Strasser A. The Bcl-2 family and cell death regulation. *Curr Opin Genet Dev*. 1998; 8: 68-75.
141. Niva M, Kozava O, Matsuna H. Small molecular weight heat shock related protein, HSP20, exhibits an antiplatelet activity. *Life Sci*. 2000; 66(1): 7-12.
142. Nollen EA, Brunsting JF, Roelofsen H, Weber LA, Kampinga HH. In vivo chaperone activity of heat shock protein 70 and thermotolerance. *Mol Cell Biol*. 1999; 19(3): 2069-79.
143. Nowell PC. Cytogenetics of tumor progression. *Cancer*. 1990; 65: 2172-75.

144. O'Kelly J, Koeffler HP. Vitamin D analogs and breast cancer. *Resent Results Cancer Res.* 2003; 164: 333-348.
145. Olofsson MH, Ueno T, Pan Y, Xu R, Cai F, Van der Kuip H, Muerdter TE, Sonnenberg M, Aulitzky WE, Schwarz S, Andersson E, Shoshan MC, Havelka AM, Toi M, Linder S. Cytokeratin-18 is a useful serum biomarker for early determination of response of breast carcinomas to chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 2007; 3(11): 3198-2006.
146. Ondrusek N, Warner E, Goel V. Development of a knowledge scale about breast cancer and heredity. *Breast Cancer Research and Treatment.* 1999; 53: 69-75.
147. Özben T. Elevated serum and urine sialic acid levels in renal disease. *Ann Clin Biochem.* 1991; 28: 44-48.
148. Özkorkmaz EG. Vitamin D ve biyolojik önemi. *Biyolojik Bilimler Araştırma Dergisi.* 2009; 2: 11-15.
149. Pak Y, Elçi H. GATA' da postoperatif radyoterapi uygulanan meme kanserli hastalarda alınan sonuçlar. 6. Ulusal Kanser Kongresi Bildirileri Cilt 1. Çeltüt Matbaacılık. 1987; 635-9.
150. Palmieri C, MacGregor T, Girgis S, Vigushin D. Serum 25- hydroxyvitamin D levels in early and advanced breast cancer. *J Clin Pathol.* 2006; 59: 1334-1336.
151. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer.* 2001; 94: 153-156.
152. Passaniti A, Hart GW. Cell surface sialylation and tumor relates with their relative numbers of specific penultimate oligosaccharide structures. *J Biol Chem.* 1988; 263(16): 7591-603.
153. Patel PS, Raval GN, Rawal RM, Patel MM, Balar DB, Patel DD. Importance of glycoproteins in human cancer. *Indian J Biochem Biophys.* 1997; 34(1-2): 226-33.
154. Perez CA, Garcia DM, Kuske RR. Breast: T1 and T2 tumors. *Principles and Practice of Radiation Oncology.* 2nd ed. 1992; 877-947.
155. Pick E, Kluger Y, Giltane JM, Moeder C, Camp RL, Rimm DL, Kluger HM. High HSP90 expression is associated with decreased survival in breast cancer. *Cancer Res.* 2007; 67(7): 2932-7.
156. Pockley AG. Heat shock proteins in health and disease: therapeutic agents? Erişim adresi: <http://www-erm.m.cbcu.cam.ac.uk>. Erişim tarihi: 21.09.2001.
157. Pratt WB, Toft DO. Regulation of signalling protein function and trafficking by the HSP90/HSP70-based chaperone machinery. *Exp Biol Med.* 2003; 228: 111-133.
158. Prosser DE, Jones G. Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D. *Trends Biochem Sci.* 2004; 29: 664-673.
159. Rao VR, Krishnamoorthy L, Kumaraswamy SV, Ramaswamy G. Circulating levels in serum of total sialic acid, lipid-associated sialic acid and fucose in precancerous lesion and cancer of the oral cavity. *Cancer Detect Prev.* 1998; 22(3): 237-40.
160. Rao VR, Hermel E, Castro-Obregon S. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: mechanism of caspase activation. *J Biol Chem.* 2001; 276: 869-874.
161. Raval GN, Parekh LJ, Patel MM, Patel PS, Rawal RM, Balar DB, Patel DD. Role of sialic acid and alkaline DNase in breast cancer. *Int J Biol Markers.* 1997; 12(2): 61-7.
162. Remennick LI. Preventive behavior among recent immigrants: Russian-speaking women and cancer screening in Israel. *Social Science and Medicine.* 1999; 48: 1669-1684.

163. Romanucci M, Marinelli A, Sarli G, Salda LD. Heat shock protein expression in canine malignant mammary tumours. *BMC Cancer*. 2006; 6(171): 1-12.
164. Ronquist G, Nou E. Serum sialyltransferase and fucosyltransferase activities in patients with bronchial carcinoma. *Cancer*. 1983; 52: 1679-83.
165. Rossi M, McLaughlin JK, Laggiou P, Bosetti C, Talamini R, Lipworth L, Giacosa A, Montella M, Franceschi S, Negri E, Vecchia CL. Vitamin D intake and breast cancer risk: a case-control study in Italy. *Annals of Oncology*. 2009; 20(2): 374-378.
166. Rucker RB. Handbook of vitamins. 3rd ed. Marcel Dekker, Inc. New York. 2001: 616.
167. Russell KS, Haynes MP, Glaser T. Estrogen stimulates Hsp 90 binding to eNOS in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem*. 2000; 275(7): 5026-30.
168. Russel RGG, Muhlbauer RC, Bisaz S. The influence of pyrophosphate, condensed phosphates, phosphonates and other phosphate compounds on the dissolution of hydroxiapatite in vitro and on bone resorption induced by parathyroid hormone in tissue culture and in thyroparathyroidectomised rats. *Calcif Tissue Res*. 1970; 6: 183-196.
169. Salih AK, Fentiman İS. Breast cancer prevention. *International Journal of Clinical Practice*. 2002; 56(4): 267-71.
170. Sancak B, Kulaksızoğlu S, Ünal A, Çevik C, Coşkun U, Günel N. Serum lipid-bound sialic acid concentrations in patients with breast cancer at different clinical stages. *Gazi Medical Journal*. 2002; 13: 133-137.
171. Schaller G, Fuchs I. Elevated keratin 18 protein expression indicates a favorable prognosis in patients with breast cancer. *Clinical Cancer Research*. 1996; 2: 1879-1885.
172. Schwartzman RA, Cidloski JA. Apoptosis; the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Reviews*. 1993; 14: 133-144.
173. Sebzda T, Saleh Y, Gburek J, Warwas M, Andrzejak R, Siewinski M, Rudnicki J. Total and lipid-bound plasma sialic acid as diagnostic markers in colorectal cancer patients: correlation with cathepsin B expression in progression to Dukes stage. *J Exp Ther Oncol*. 2006; 5(3): 223-229.
174. Sergeev IN. Calcium as a mediator of 1,25-dihydroxyvitamin D₃-induced apoptosis. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004; 89-90(1-5): 419-25.
175. Sergeev IN. Calcium signaling in cancer and vitamin D. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2005; 97(1-2): 145-51.
176. Shils ME. *Modern Nutrition in Health and Disease*. 7th ed. Lea and Febiger, Philadelphia. 1988: 1694.
177. Singhal A, Hakomori S. Molecular changes in carbohydrate antigens associated with cancer. *Bioassays*. 1990; 12: 223-30.
178. Smith RA, Cokkinides V, Von Eschenbach AC, Levin B, Cohen C, Runowcz CD, Sener S, Saslow D, Eyre HJ. American cancer society guidelines for the early detection of cancer. *CA-Cancer Journal for Clinicians*. 2002; 52(1): 8-22.
179. Solit DB, Chiosis G. Development and application of HSP90 inhibitors. *Drug Discov Today*. 2008; 13(1-2): 38-43.
180. Spencer S, Cataldo NA, Jaffe RB. Apoptosis in the human female reproductive tract. *Obstetrical and Gynecological Survey*. 1996; 5: 314-323.
181. Stieber P. Sensible use of tumour markers. *J Lab Med*. 2001; 25: 327-336.

182. Sundaram S, Sea A, Feldman S, Strawbridge R, Hoopes PJ, Demidenko E, Binderup L, Gewirtz DA. The combination of a potent vitamin D₃ analog, EB 1089, with ionizing radiation reduces tumor growth and induces apoptosis of MCF-7 breast tumor xenografts in nude mice. *Clinical Cancer Research*. 2003; 9: 2350-56.
183. Sundaram S, Beckman MJ, Bajwa A, Wei J, Smith KM, Posner GH, Gewirtz DA. QW-1624F2-2, a synthetic analogue of 1,25-dihydroxyvitamin 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.
184. Süer GS, Kılıçlı G, Özçelik F, Gülen Ş. Serum total and lipid-bound sialic acid levels following acute myocardial infarction. *Clin Chem Lab Med*. 2000; 38(12): 1249-1255.
185. Süer GS, Kazezoğlu C, Tabakoğlu E, Altıay G, Güngör Ö, Türe M. Küçük hücreli ve küçük hücreli dışı akciğer kanserli hastalarda serum total ve lipide bağlı siyalik asidin marker olarak önemi. *Trakya Üniv Tıp Fak Derg*. 2007; 24(2): 101-108.
186. Şahin MO, Canda AE, Mungan Mu, Kırkalı Z. 1,25-dihidroksi vitamin D₃ ve reseptörlerinin insan kanserlerindeki yeri. *Türkiye Ekopatoloji Dergisi*. 2000; 6(1-2): 73-79.
187. Takagi T, Takayasu M, Mizuno M, Yoshimoto M, Yoshida J. Caspase activation in neuronal and glial apoptosis following spinal cord injury in mice. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2003; 43: 20-29.
188. Takahashi K, Schwarz E, Ljubetic C, Murray M, Tessler A, Saavedra RA. DNA plasmid that codes for human Bcl-2 gene preserves axotomized Clarke' s nucleus neurons and reduces atrophy after spinal cord hemisection in adults rats. *J Comp Neurol*. 1999; 404: 159-71.
189. Taldone T, Sun W, Chiosis G. Discovery and development of heat shock protein 90 inhibitors. *Bioorg Med Chem*. 2009; 17(6): 2225-2235.
190. Tamura H, Ishii S, Ikeda T. Therapeutic efficacy of pamidronate in combination with chemotherapy to bone metastasis of breast cancer in a rat model. *Surg Oncol*. 1996; 5: 141-147.
191. Tewarson SL, Mittal VP, Singh M, Gupta GP. Serum sialic acid-an important cancer marker. *Indian J Cancer*. 1993; 30(3): 125-31.
192. Thomas P. Cell surface sialic acid as a mediator of metastatic potential in colorectal cancer. *Cancer J*. 1996; 9: 1-6.
193. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 1995; 267: 1456-1462.
194. Tissieres A, Mitchell HK, Tracy UM. Protein synthesis in salivary glands of drosophila melanogaster: relation to chromosome puffs. *J Molecular Biology*. 1974; 84(3): 389- 398.
195. Touchette N, Fogle S. Apoptosis: it chimes with mitosis. *JNIH Res*. 1991; 3: 75.
196. Türkiye Bilimler Akademisi. Çağın hastalığı kanser. [http:// www. tuba. gov. tr /](http://www.tuba.gov.tr/). Erişim tarihi: 17.11.2008
197. Van den Bemd GJ, Chang GT. Vitamin D and vitamin D analogs in cancer treatment. *Curr Drug Targets*. Feb 2002; 3(1): 85-94.
198. Van Muijen GN, Ruiter DJ, Franke WW. Cell type heterogeneity of cytokeratin expression in complex epithelia and carcinomas as demonstrated by monoclonal antibodies specific for cytokeratins nos. 4 and 13. *Exp Cell Res*. 1986; 162: 97-113.
199. Vatten LJ. Can breast cancer be prevented? *Tidsskr Nor Laegeforen*. 1991; 111(14): 1745-1748.
200. Veronesi U. Breast cancer. *Lancet*. 2005; 365: 1727-1741.

201. Vosatkova M, Hoskovcova P, Bilek R. Vitamin D and its metabolites-supply of patients with various endocrine disorders and comparison of analytical methods. *Endoc Regul.* 2007; 41: 19-28.
202. Wagner AJ, Small MB, Itoy N. Myc-mediated apoptosis is blocked by ectopic expression of bcl-2. *Mol Cell Biol.* 1993; 13: 2432-2440.
203. Wang W, Basia Sho seyov VO, Altman A. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science.* 2004; 9(5): 244-252.
204. Wang-Gillam A, Miles DA, Hutchins LF. Evaluation of vitamin D deficiency in breast cancer patients on bisphosphonates. *The Oncologist.* 2008; 13: 821-827.
205. Warren L. The thiobarbituric acid assay of sialic acids. *J Biol Chem.* 1959; 234: 1971-75.
206. Welsh JE, Wietzke JA, Zinser GM, Byrne B, Smith K, Narvaez CJ. Vitamin D-3 receptor as a target for breast cancer prevention. *J Nutr.* 2003; 133: 2425-2433.
207. Whiting SJ, Calvo MS. Dietary recommendations to meet both endocrine and autocrine needs of Vitamin D. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2005; 97: 7-12.
208. Williams T, Clarke VA, Savage S. Women's perceptions of familial aspects of breast cancer. *Health Education.* 2002; 102(2): 50-59.
209. Wilson JF. The breast. *Radiation Oncology Rationale, Technique, Results.* The CV Mosby Co. 1989; 312-50.
210. Wingrave JM, Schaecher KE, Sribnick EA. Early induction of secondary injury factors causing activation of calpain and mitochondria mediated neuronal apoptosis following spinal cord injury in rats. *Journal of Neuroscience Res.* 2003; 73: 95-104.
211. Woelfle U, Sauter G, Santjer S, Brakenhoff R, Pantel K. Down-regulated expression of cytokeratin 18 promotes progression of human breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2004; 10: 2670-2674.
212. Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature.* 1980; 284: 555-556.
213. Wyllie AH. The genetic regulation of apoptosis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1995; 5: 97-104.
214. Xu W, Neckers L. Targeting the molecular chaperone heat shock protein 90 provides a multifaceted effect on diverse cell signaling pathways of cancer cells. *Clin Cancer Res.* 2007; 13(6): 1625-1629.
215. Yılmaz G. Avrupa topluluğu ve Türkiye'de kanser kontrol programı, A.Ü. Avrupa Araştırma ve Uygulama Merkezi (çoğaltılmış teksir), Ankara. 1992.
216. Yogeewaran G, Salk PL. Metastatic potential is positively correlated with tumor cell lines. *Science.* 1981; 212(4502): 1514-6.
217. Yogeewaran G. Cell surface glycolipids and glycoproteins in malignant transformation. *Adv Cancer Res.* 1983; 38: 289-350.
218. Zempleni J. *Handbook of vitamins.* 4th ed. CRC Press. New York. 2008: 608.
219. Zhang J, Yao Z. The effect of 1,25(OH)(2)D(3) on growth and apoptosis in breast cancer cell line MCF-7. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi.* 1999; 37(8): 497-9.
220. Zmuda JM, Cauley JA, Ferrell RE. Molecular epidemiology of vitamin D receptor gene variants. *Epidemiol Rev.* 2000; 22: 203-217.

9. EKLER

EK-A: Etik Kurul Kararı



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
Meram Tıp Fakültesi Dekanlığı

Sayı : B.30.2.SEL.0.20.00.00.281- 2887
Konu :

Tarih : 29 NISAN 2009

Sayın

Yrd.Doç.Dr. Aysel KIYICI
Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

İlgi: 20.04.2009 tarihli dilekçeniz;

“Kemik metastazı olan meme kanserli hastalarda verilen D vitamini tedavisinin dolaşımdaki HSP-90 ve CK-18 düzeyleri üzerine etkisi” başlıklı doktora tezi ile ilgili Fakültemiz Etik Kurulunun 24 Nisan 2009 tarih ve 2009/132 sayılı kararı ekte gönderilmiştir.

Gereğini bilgilerinize rica ederim.

Doç.Dr. Ayşe S. ŞAHİN
Dekan Yardımcısı

Eki: Etik Kurul Kararı

Adres: S.Ü. Meram Tıp Fakültesi Dekanlığı 42080 –Meram KONYA
Tel: (0332) 223 65 00 Faks: (0332) 223 61 81
Web Adresi: www.mtipetik@selcuk.edu.tr

Bilgi İçin : Personel Şubesi Tel : (0332) 2236504
: Etik Kurul Tel : (0332) 2236523

EK-B: Bilgilendirilmiş Onay Formu

BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAY FORMU

Meme kanseri günümüzde çok yaygın bir kanser türüdür. Kemik metastazı olan meme kanserli hastalara onkoloji kliniğinde bifosfonat tedavisi sonrası vitamin D analogu verilmektedir. Son yıllardaki çalışmalarda vitamin D'nin meme kanseri hücrelerini öldürdüğü tespit edilmiştir. HSP-90 ve CK-18 kanser hücrelerinin ölümü ile ilgili bize bilgi vermektedir. Biz de kemik metastazı olan meme kanserli hastaların tedaviden ne kadar yararlandığını araştırmak amacıyla bu çalışmayı yapmaktayız. Hastalardan vitamin D almadan önce ve aldıktan sonra olmak üzere iki kere kan alınarak, Vitamin D, HSP-90 ve CK-18 düzeyleri ölçülecektir. Hastaların kimliği gizli tutulacak ve herhangi bir ücret alınmayacaktır.

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarda söz konusu Klinik Araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Tarih

...../...../.....

Gönüllünün Adı soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon/faks no.)

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin.
Adı soyadı, imzası (varsa telefon/faks no.)

Açıklamaları yapan araştırmacının Adı soyadı, İmzası:

Cemile Muhteşem Değişli

Tel: 2236790 Cep:05062308056

Orhan Önder Eren

Tel: 2237266

Herhangi bir nedenle başvurulacak doktorun Adı soyadı, İmzası (varsa telefon/faks no.)

Aysel Kıyıcı

Tel: 2237245

Mehmet Artaç

Tel: 2236434

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kişinin.

Adı soyadı, İmzası, Görevi.

10. ÖZGEÇMİŞ

1975 yılında Adana’ da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Şanlıurfa Anadolu Lisesi’ nde tamamladı. 1994 yılında İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü’ nü kazandı ve 1998 yılında mezun oldu. 2001 yılında Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı’ nda yüksek lisans öğrenimini tamamladı. Halen Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı’ nda doktora öğrencisidir. Yabancı dili İngilizce’ dir.