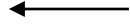


Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**MESANE KANSERİ VE VİTAMİN D İLİŞKİSİNİN
MOLEKÜLER DÜZEYDE İNCELENMESİ**

ÖZGE ÖZGEN

**DANIŞMAN
PROF.DR. İLHAN YAYLIM**

**MOLEKÜLER TIP
MOLEKÜLER TIP DOKTORA PROGRAMI**

İSTANBUL-2019

DOKTORA TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İ.Ü. Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı, Moleküler Tıp Programında Doktora öğrencisi **Özge ÖZGEN** tarafından **Prof. Dr. İlhan YAYLIM**'in danışmanlığında hazırlanan " **Mesane Kanseri ve Vitamin D İlişkisinin Moleküler Düzeyde İncelenmesi** " başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 31/12/2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı

Prof. Dr. İlhan YAYLIM
İ.Ü.Aziz Sancar DETAE
Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Jüri

Prof. Dr. Serap KURUCA
İ.Ü. Tıp Fak. Temel Tıp Bil.
Fizyoloji A.D.

Jüri

Doç. Dr. Özlem KÜÇÜKHÜSEYİN
İ.Ü.Aziz Sancar DETAE
Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Jüri

Dr. Öğr. Üyesi Dilşad ÖZERKAN
İstinye Üni Sağlık Bil. Fak.
Fiyoterapi ve Reh. A.D

Jüri

Dr. Öğr. Üyesi Cem HOROZOĞLU
İst. Gelişim Üni. Tıbbi Hiz ve
Tek.Böl. Tıbbi Lab. Tek. Bölümü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

ÖZGE ÖZGEN (İmza)



İTHAF

Oğlum Ali Demir 'e ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Çalışmam sırasında bana yardımlarını esirgemeyen ve her konuda yönlendirici etkisiyle yol gösteren tez danışmanım Prof. Dr. İlhan Yaylın' a teşekkür ederim. Araştırmalar boyunca Doç. Dr. Özlem Küçük Hüseyin' e değerli katkıları ve desteği için teşekkürü bir borç bilirim. Arş. Gör. Mehmet Tolgahan Hakan'a desteği için teşekkür ederim.

Çalışmalar sırasında bilgi, imkan ve deneyimi ile yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Serap Kuruca' ya, Uzm. Bio. Güneş Özen Eroğlu' na her türlü imkansızlık ve zor koşulda bile alternatif yöntemler bulmak konusunda sabır ve yardımları için teşekkür ederim. PhD. Mediha Süleymanoğlu' na yardımları için teşekkür ederim. Dr. Nilgün Akdeniz ve Abdullah Yılmaz' a yardımları için teşekkür ederim.

Tez yazımı ve çalışmalarım sırasında manevi ve teknik olarak yardımlarını esirgemeyen, Uzm. Bio. Selen Birdal, Dr. Özlem Dağdeviren ve Dr. Aybike Sağlam' a destekleri için teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2017-23523

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	X
ÖZET	XV
ABSTRACT.....	XVII
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. MESANE KANSERİ.....	4
2.1.1. Mesane Kanseri İnsidansı	4
2.1.2. Mesane Kanseri Etiyopatolojisi	5
2.1.3. Mesane Anatomisi.....	5
2.2. ÜRETELİYAL KARSİNOMA	6
2.2.1. Non invazif Üreteliyal Karsinoma	6
2.2.2. İnvazif Üreteliyal Karsinoma.....	7
2.2.3. Nadir Olarak Görülen Üreteliyal Karsinomalar;.....	7
2.3. MESANE KANSERİ OLUŞUMUNDA YER ALAN MOLEKÜLER MEKANİZMALAR.....	9
2.3.1. Retinoblastoma Tümör Süpresör Geni.....	11
2.3.2. P53 tümör Süpresör Geni	11
2.3.3. Kromozom Anomalileri	12
2.3.4. c-erb-B2 (HER-2/neu).....	14
2.3.5. EGF ve EGFR' ler.....	14
2.3.6. Ekstraselüler Matriks ve Hücre Adezyon Molekülleri	15
2.3.7. İntegrinler.....	15
2.3.8. Anjiyogenik Faktörler	16

2.4. MESANE KANSERİNDE TEDAVİ.....	16
2.5. MESANE KANSERİ HÜCRE HATLARI.....	19
2.6. VİTAMİN D	20
2.6.1. Kalsitriol.....	22
2.6.2. Kalsitriolün Anti Kanser Etkileri	23
2.6.3. Vitamin D’ nin Hücre Döngüsü ve Apoptoz Üzerine Etkileri.....	24
2.7. SİSPLATİN.....	27
2.7.1. Sisplatin’ in Etki Mekanizması ve Hedefleri	27
2.7.2. Sisplatin Yan Etkileri	28
2.7.3. Sisplatin, Mesane Kanseri ve İlaç Direnci	30
2.7.4. P-gP Proteinini	32
2.8. P53 Proteinini ve Mesane Kanseri	33
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	35
3.1. MATERYAL VE METODLAR.....	35
3.1.1. MATERYALLER.....	35
3.1.1.1. ÇÖZELTİLER.....	36
3.1.1.2. KİTLER.....	37
3.1.2. GEREÇLER	37
3.1.3. METODLAR	38
3.1.3.1. Hücre Kültürü.....	38
3.1.3.2. Hücre Besi Yerlerinin Hazırlanması	38
3.1.3.3. Hücrelerin Çözündürülmesi	38
3.1.3.4. Hücrelerin Pasajlanması.....	39
3.1.3.5. Hücre Sayımının Yapılması	39
3.1.3.6. Hücrelerin Dondurulması.....	40
3.1.3.7. Hücrelerin Çoğaltılması	40
3.1.3.8. MTT Testi	40
3.1.3.9. MTT Yöntemi ile Sitotoksitenin İzlenmesi.....	41
3.1.3.10. MTT Deney Protokolü	41
3.1.3.11. P-gp ANALİZİ.....	42
3.1.3.12. Apoptoz Analizi	42
3.1.3.13. EXBIO ApoFlowEx FITC Kiti	42
3.1.4. Ölçüm ve İstatistiksel Analiz	43

4. BULGULAR.....	44
4.1. MTT Test Bulguları	44
4.1.1. MTT Testi İle Optimum Sitotoksik Doz Tespiti.....	44
4.2. Apoptoz Analiz Bulguları	61
4.3. P-gp Analizi Bulguları	67
4.4. DNA Docking Analizi	72
5. TARTIŞMA	73
6. KAYNAKLAR	87
7. İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	103
8. ÖZGEÇMİŞ	104



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 4 1: T24 MTT Sonuçları Anlamlılık Değerleri.....	44
Tablo 4 2: ECV-304 Hücre Hattı MTT Sonuçları Anlamlılık Değerleri.....	50
Tablo 4 3: HUVEC Hücre Hattı MTT Sonuçları Anlamlılık Değerleri.....	56
Tablo 4 4 : ECV-304, T24, HUVEC Hücrelerinde Anneksin V-FITC ile Apoptoz Tayin Testi Sonuç Yüzdeleri ve Anlamlılık Değerleri.....	65
Tablo 4 5: 24 Saat T24, ECV-304, HUVEC Hücre Hattı Anneksin V-FITC Analizi Sonuç Yüzdeleri.....	65
Tablo 4 6 : T24, ECV-304, HUVEC Hücre Hatları P-gP Yüzdeleri.....	70
Tablo 4 7: Pg-P Analizi Anlamlılık Değerleri.....	71
Tablo 4 8: DNA Docking Analiz Değerleri Tablosu.....	72

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2 1: Mesane Kanseri Tümör Evrelemesi.....	19
Şekil 2- 2 : Vitamin D Sistemik Etkisi.....	22
Şekil 2 -3 : Kalsitriolün Moleküler Yapısı.....	24
Şekil 2 -4 : Hücre Döngüsü ve Apoptozda Görev Alan Pek Çok Yolakta Vitamin D’ nin Yeri.....	25
Şekil 2- 5 : Vitamin D’ nin Potansiyel Olarak Tetiklediği Düşünülen Mitokondriyel Apoptoz Yolakları.....	26
Şekil 2- 6: Sisplatinin Ana Hedefleri.....	28
Şekil 2 7 : Sisplatin Etkileşimi.....	31
Şekil 3-1: Neubauer-Improved Laminin Mikroskop Altında Görünümü.....	39
Şekil 4-1 : T24 Hücre Hattı MTT Sonuçları % Canlılık Değerleri Grafikleri.....	47
Şekil 4 2 : T24 Hücre Hattı MTT Kombinasyon Sonuçları % Canlılık Değerleri Grafikleri.....	48
Şekil 4 3 : ECV-304 MTT Sonuçları % Canlılık Grafikleri.....	54
Şekil 4 4: ECV-304 A: 24 Saat MTT Sonuçları % Canlılık Kombinasyon Grafikleri.....	55
Şekil 4-5 HUVEC Hücre Hattı MTT Sonuçları % Canlılık Grafiği.....	59
Şekil 4 5 : HUVEC Hücre Hattı MTT Sonuç Grafikleri.....	60
Şekil 4 6: ECV-304 Hücre Hattı Örnek Flow Sitometri Anneksin V-FITCH Apoptoz Tayin Grafikleri.....	61
Şekil 4 7: T24 Hücre Hattı Örnek Flow Sitometri Anneksin V-FITCH Apoptoz Tayin Grafikleri.....	62
Şekil 4 8 : HUVEC Hücre Hattı Flow Sitometri Anneksin V-FITCH Apoptoz Tayin Grafikleri.....	63
Şekil 4 9: Flow Sitometri Anneksin V-FITCH Apoptoz Tayini Sonuçlarının Canlı Hücre, Apoptoz, Nekroz oranlarının %Canlılık oranları Grafiği.....	64
Şekil 4 10: ECV-304 P-gp Analizi Örnek Grafikleri.....	67
Şekil 4 12: T24 P-gp Analizi Örnek Grafikleri.....	68

Şekil 4 13: HUVEC P-gp Analizi Örnek Grafikleri.....	69
Şekil 4 11 : P-gP Analizi % Grafikleri	70
Şekil 4 12: DNA Docking Analizi Kalsitriol ve Sisplatin Molekülleri	72



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

1,25-(OH)₂D₃ = Kalsitriol, 1,25-dihydroxyvitamin D₃

ATP7A: P Tipi Adenozin Trifosfat

ATCC: Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu

B-FGF: Temel Fibroblast Büyüme Faktörü

BBR3464: Triplatin

β-Katenin: Beta Katenin

Bcl-2: B Hücresi Lenfoma- 2 Proteini

Bax: Bax Proteini

BCG: Calmette Gauline Basili Varyantı

CDDP: Sisplatin

CDKN2:Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 2

c-erbB2: Erb-b2 Reseptör Tirozin Kinaz 2, HER-2/neu

CYP27A1: 25 Hidroksilaz Enzimi

CYP1A2: Sitokrom p450 1A2 Enzimi

CYP27B1:1 Alfa Hidroksilaz Enzimi

D2 vitamini: Ergokalsiferol

D3 Vitamini: Kolekalsiferol

DNA :Deoksiribonükleik Asit

EAU: Avrupa Üroloji Birliği

EGFR: Epitelial Büyüme Faktörü Reseptörü

E2F:Transkripsiyon Faktörü E2F

EGF:Epitelial Büyüme Faktörü

ESMO: Avrupa Medikal Onkoloji Derneği

FGFR3: Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü -3

Gem-Cis: Gemstabin-Sisplatin

GemRIS: Gemsitabin Salınım Tedavisi

GSTM1: Glutasyon S transferaz M1

HRAS: GTPaz Onkogeni

MDR: Çoklu İlaç Direnci
MLL: Mat-LyLu Modeli
mRNA: Messenger Ribonükleik Asit
Mdm2: E3 Ubiquitin-Protein Ligaz
MMC: Mitogel
M-Tor: Rapamisin
MVAC: Metotreksat, Vinblastin, Adriamisin, Sisplatin Kombinasyonu
NNC: N -Nitroso Bileşikleri
NF- κ B: Nükleer Faktör Kappa B
NIH: Amerikan Sağlık Enstitüsü
NAT2: N-Asetil Transferaz 2
PC: Prostat Kanseri
P-gP: P-Glikoprotein
PIK3CA: Fosfatidilinositol-4,5-Bisfosfat 3 Kinaz Katalitik Alfa Alt Ünitesi
PARP: Poli ADP Riboz Polimeraz
RNA: Ribonükleik Asit
RAD001: Everolimos
Rb: Retinoblastoma Geni
RXR: Retinoid X Reseptörü
TCC: Tranzisyonel Hücreli Karsinomalar
TCF4: Transkripsiyon Faktörü 4
TDC: Test İlaç Konsantrasyonu
TP53: Tümör Protein p53
TURBT: Transüretral Mesane Tümörü Rezeksiyonu
USA: Amerika Birleşik Devletleri
VB4-845: Vicinium
VDR: Vitamin D Reseptörü
VDRE: Vitamin D Yanıt Elementleri
VEGF: Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü



ÖZET

Özgen Ö. (2019). Mesane Kanseri ve Vitamin D İlişkisinin Moleküler Düzeyde İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Mesane kanseri tümörlerinin tedavisinde, kemoterapötiklerin kullanımının etkinliğinin araştırılması ve yan etkilerini azaltmak amaçlı çeşitli ilaç kombinasyon çalışmaları bireyler için büyük önem taşımaktadır. Farklı kanser hücre hatlarında Vitamin D' nin anti-proliferatif, farklılaşmayı ve hücre içi metabolik olayları regüle edici etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Sisplatin ise mesane kanserinde kullanılan kemoterapötik ilaçlardan biridir. Araştırmamız in vitro düzeyde yapılmış olup T24, ECV-304 ve HUVEC hücre hatları üzerinde Vitamin D ve sisplatin dozlarının kombinasyonları sitotoksik, apoptotik ve ilaç direnci konularında değerlendirmeye tabi tutulmuştur. Mesane kanseri tedavisinde kullanılan sisplatinin, Vitamin D ile birlikte kullanımında olası yan etkilerini azaltmaya yönelik doz azaltıcı ve etkinlik artırıcı fonksiyonunun olup olmayacağı değerlendirilmiştir. Çalışmamız da ulaştığımız veriler bizlere T24 mesane kanseri hücre hattında 24 saat MTT sonuçlarına göre 500nM kalsitriol dozunun 5µg/ml sisplatin ile kombine kullanımı ile, sadece sisplatin kullanımı ile karşılaştırıldığında anti-proliferatif etkinliğini arttırdığını ($p<0.0108$), HUVEC sağlıklı kontrol hücre hattında ise 500nM kalsitriol dozu ve 5µg/ml sisplatin ile kombine kullanımının sadece sisplatin kullanımına göre canlılık oranında ki düşüşe engel olduğunu ($p<0.0001$) göstermektedir. P-gp oranlarında, kombine sisplatin ve kalsitriol uygulaması ile HUVEC' de (% 92,16 $p<0,0001$) kontrolüne (% 87.08 $p< 0,0001$) oranla artış saptanırken, T24' de sisplatin ve kalsitriol kombine uygulamasıyla P-gp oranı (% 68.33 $p< 0,0001$) kontrolüne oranla (% 74.47 $p<0,0001$) azalmıştır. ECV-304 hücre hattında ise herhangi bir değişiklik saptanmamıştır. Bu veriler bizlere kalsitriolün sisplatin ile kullanımında, sisplatinin normal doz kullanımını azalttığı ve T24 hücre hattında anti-proliferatif etkinliğini az da olsa arttırdığı ve HUVEC sağlıklı hücre hattının canlılığını az oranda da olsa korumasına yardımcı olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Vitamin D, Sisplatin, Apoptoz, Mesane Kanseri, P-gP.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2017-23523



ABSTRACT

Ozgen O. (2019). Molecular Effects of Vitamin D on Bladder Cancer. İstanbul University, Institute of Health Science, Molecular Medicine Department. Doktrate Thesis. İstanbul.

It is a great importance for patients to investigate the efficacy of the use of chemotherapeutics and to study drug combinations to reduce side effects of treatment. Vitamin D has been shown to have anti-proliferative, differential and metabolic regulation effects in different cancer cell lines. Our study was performed in vitro and the combinations of different doses of Vitamin D and cisplatin on T24, ECV-304 and HUVEC cell lines were evaluated for cytotoxic, apoptotic and drug resistance. It was evaluated whether cisplatin, which is used in bladder cancer treatment, will have an effect-enhancing and dose-reducing effect in order to reduce the possible side effects in combination with Vitamin D. Datas showed that 500nM calcitriol dose in combination with 5µg / ml cisplatin increased the anti-proliferative efficacy compared to cisplatin alone ($p < 0.0108$). In the healthy control cell line, HUVEC showed that 500nM calcitriol dose and combined with 5µg / ml cisplatin prevented the decrease in viability compared to cisplatin alone ($p < 0.0001$). P-gp rates were increased with combined cisplatin and calcitriol administration in HUVEC (92.16% $p < 0.0001$) compared to control (87.08% $p < 0.0001$). The P-gp ratio (68.33% $p < 0.0001$) of combined administration of cisplatin and calcitriol in T24 decreased compared to control (74.47% $p < 0.0001$). No change was detected in ECV-304 cell line. These data show that calcitriol reduces cisplatin normal dose use and increases its anti-proliferative activity in the T24 cell line and that it can help maintain the viability of the HUVEC healthy cell line.

Key Words: Vitamin D, Cisplatin, Apoptosis, Bladder Cancer, P-gP

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. TDK-2017-23523

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hücre döngüsünde ve bu döngünün kontrolünde rol alan mekanizmalarda görevli moleküllerde meydana gelen hasar ve düzensizlikler sonucu onkogenlerin aktivasyonu ve tümör supresör genlerin fonksiyonlarında ki azalma ya da kayıplar, kanser hastalığının ortaya çıkışı ve prognozunda etkili olmaktadır. Güncel çalışmalar Vitamin D' nin çeşitli kanser türlerinin gelişiminde çeşitli etkilerinin olduğunu öne sürmektedir. Ancak, yapılan çalışmalar da vitamin D düzeyleri ve kanser gelişiminde ki etkili yollarda görevli moleküllerin düzeylerinin değişim ve etkileşimlerine dair verilerin sayısı kısıtlı olduğundan, Vitamin D' nin kanser hastalığı patogeneziine etkisinin altında yatan moleküler mekanizma tam olarak aydınlatılamamıştır.

Türkiye' de mesane kanseri alanında istatistiksel veriler yetersiz kaldığı için genel olarak mesane kanseri görülme oranları Avrupa Ülkeleri ve Amerikan verilerine dayanmaktadır. Çoklu kanser oranlarında ki varyasyonlar, sağ kalım oranlarında ki değişim ve kanser gelişimindeki çeşitlilik, mesane kanserinde sıklık oranlarını saptamayı zorlaştırmaktadır. Mesane kanseri dünya genelinde dokuzuncu sırada yer alan, kanser nedeni ölümde onüçüncü sırada yer alan kanser türüdür. Erkeklerde görülme sıklığı kadınlara oranla üç kat daha yüksektir (1). Mesane kanserlerinin gelişiminde çevresel, demografik ve genetik faktörlerin etkili olduğu bilinmektedir. Hastalık gelişimine etki oranlarını saptamada çeşitli zorluklar yaşansa da sanayi toplumlarında mesane kanseri gelişiminin görülme sıklığının yüksek olduğu bilinmektedir. Düşük güneş ışığına maruz kalan ya da kültürel sebeplerle güneş ışığından yararlanamayan toplumlar ile kansere yakalanma oranlarında ki artış arasında ilişki olabileceği araştırılması gereken konulardan biridir.

Mesane kanseri patogenezi, somatik hücrelerde meydana gelen mutasyonlar ile protoonkogenler ve tümör supresör genlerin normal fonksiyonunu sürdürememesiyle ortaya çıkmaktadır. Normal şartlarda hücreler, meydana gelen düzensizlikleri telafi etme ya da telafi edilemez noktada hücreyi apoptoza sürüklenme eğiliminde iken bazı durumlarda bu olay gerçekleştirilemez ve karsinogenez meydana gelir. Anjiyogenez ile çevre dokuda yeni damarlar meydana gelerek bu düzensiz yapı desteklenir. Ardından

tümör gelişimi ortaya çıkar ve malign transformasyon artar. Sonuç olarak invazyon ve diğer dokulara yayılım yani metastaz ile hastalık ilerlemesi gözlemlenir (2).

Vitaminler metabolik yolların regülasyonuna katkıda bulunan önemli organik materyallerdir. Vitamin D' de bu önemli organik materyallerden biridir. Kalsiyum homeostazisinde önemli regülatör fonksiyonlu bir bileşen olmasının yanında hücre büyümesi ve farklılaşmasında da görevleri olan steroid bir hormondur. Birçok hastalık grubunda koruyucu etki yapabileceğine dair çeşitli araştırmalara konu olmuştur. Hiperkalsemik etkilerinin minimuma indirileceği kullanım dozlarının saptanması üzerine yapılacak çalışmaların yanında Multipl Skleroz, Tip 1 Diyabet, Amyotrofik Lateral Skleroz, Miyopati, Retinoblastoma, Metabolik Sendrom, Obezite, Dislipidemi ve çeşitli kanser türlerinde hastalık tedavisinde olumlu katkı sunma potansiyeli taşımaktadır (3).

Çeşitli kanser türlerinde Vitamin D etkisi üzerine birçok çalışma yer almaktadır. Bu çalışmalar farklı hücrelerde kullanılan farklı düzeyde ki Vitamin D dozlarında çeşitli etkiler göstermektedir. Bu nedenle kanser alanında Vitamin D' nin doza bağlı etkisi hastalıklar üzerinde ki etkileri ile ilişkilendirilerek araştırmalara konu olmaktadır.

1,25(OH)2D3 (kalsitriol) Vitamin D' nin aktif olan hormonal formudur. 1,25(OH)2D3' ün çeşitli dokularda lokal olarak üretildiği gösterilmiştir. Hedef dokuların (örneğin; kolon, prostat, meme, akciğer, pankreas vb.) kalsitriolü sentezleyebileceği ve yıkıma uğratabileceği gösterilmiştir. Çeşitli insan kanser türlerinde kalsitriolün lokal üretiminin ve degradasyonunun önemi vurgulanmaktadır (4-5).

Mesane kanserinin kemoterapötik tedavisinde ise çeşitli kimyasallardan yararlanılmaktadır. Bunlardan biri de platin bazlı kemoterapötik ilaçlardan olan sisplatindir. Sisplatin kullanımı oldukça yaygındır. Bu kemoterapötik, tümör dokusuna zarar verirken, normal dokular ve hücreler üzerindeki yan etkilerinin de oldukça fazla olduğu görülmektedir. Sisplatin, DNA ve transdüksiyon yolları ile bağlantıya geçerek (kalsiyum sinyali, reseptör sinyali, mitokondriyal yolların aktivasyonu vb.) apoptoz yoluyla tümöre zarar vermektedir. Bununla birlikte sisplatin kullanımındaki en önemli problemler ise hastaların yaşadığı yan etkilerinin yüksek olması ve ilaç direncinin gelişerek tedavinin etkinliğinin azalmasıdır. Sisplatinin tedavideki etkinliğini arttırmak

ve yan etkilerini azaltmak için kombine terapiler ve yeni terapatik yaklaşımların araştırmalarının yapılması, mesane kanseri hastalarının tedavideki başarısını ve hastaların yaşam kalitesini arttırmak açısından önem taşımaktadır (6).

Bu nedenle çalışmamızda in vitro düzeyde sisplatin ve Vitamin D kombinasyonunun doza bağılı etkilerini saptamayı amaçladık. Tedavide kullanılan sisplatinin Vitamin D ile birlikte kullanımında, çalışmamızda yer alan hücre hatları üzerinde ki sitotoksik, apoptotik ve ilaç direnci açısından tepkileri değerlendirilmiştir. Vitamin D' nin, sisplatin adlı kemoterapötik ilaçla kombine kullanımının, kemoterapötik kullanım dozunu azaltıcı ve tümör hücreleri üzerinde ki anti-proliferatif etkiyi arttırıcı özelliğinin olup olmadığının belirlenmesi çalışmamızda amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. MESANE KANSERİ

Mesane kanseri, mesane dokularında meydana gelen anormal hücre gelişimi ve sonucunda tümör oluşumu gözlemlenen bir hastalıktır. Mesane kanseri gelişimi hastalarda heterojen özelliğe sahip olması nedeniyle, tedavi sırasında hastaya en uygun tedavi seçeneği oluşturulmaktadır. Avrupa Medikal Onkoloji Derneği (ESMO) ve Avrupa Üroloji Birliği (EAU) gibi Avrupa kuruluşları, tedavi seçeneklerinin sıralandığı ve tedaviyi bireyselleştirmek ve sonuçları düzenlemek amacıyla hastalığın daha iyi tanımlanmasını sağlayan kapsamlı kılavuzlar hazırlamıştır (7).

Moleküler belirteçlerin bireye yönelik değişimlerinin belirlenmesi mesane kanseri tedavisinde çok daha başarılı sonuçlar verebilmektedir. Dolayısıyla biyolojik belirteçlerin belirlenmesi yönünde atılacak adımlar hastaların tedavisinde önem taşımaktadır.

2.1.1. Mesane Kanseri İnsidansı

Çoklu kanser oranlarındaki varyasyonlar, sağ kalım oranlarındaki değişim ve kanser gelişimindeki çeşitlilik mesane kanserinde sıklık oranlarını saptamayı zorlaştırmaktadır. Mesane kanseri dünya genelinde dokuzuncu sırada yer alan ve kanser nedenli ölümlerde on üçüncü sırada yer alan kanser türüdür. Erkeklerde görülme sıklığı kadınlara oranla üç kat daha yüksektir. Güney ve Doğu Avrupa ülkelerinde, Afrika'nın, Orta Doğu'nun ve Kuzey Amerika'nın bazı bölgelerinde insidansı yüksektir. Mısır'da mesane kanseri mortalitesi Avrupa'nın bazı bölgelerinden üç kat, USA'ya göre ise sekiz kat yüksektir. USA'da beyaz tenli insanlarda siyah tenlilere göre insidans artmakta olup, genel olarak batı ülkelerinin çoğunda yükselmekte iken yavaşlamış ya da durmuştur. Mesane kanserinde sigara kullanımı, sistozomiazis, coğrafi etmenler gibi risk faktörlerinin bilinmesi gelişen ülkelerde çoğu bölgede, mortalite oranlarını düşürmektedir (1).

Türkiye'de mesane kanserinde sıklık oranlarının belirlenmesi için yeterli veriler bulunmayıp, yapılan bir çalışmada Avrupa verilerinde cinsiyete göre 3/1 (erkek/kadın) oranında görülen mesane kanseri sıklığı bizim toplumumuzda 6/1 oranında

bulunmuştur. Bu duruma, sigara kullanımı ve mesleki karsinojenlere maruziyetin erkeklerde daha yüksek olmasının sebep olduğu düşünülmektedir (8).

2.1.2. Mesane Kanseri Etiyopatolojisi

Mesane kanseri etiyolojisinde beslenme, demografik ve mesleki olarak maruz kalınan kimyasallar, genetik ve epigenetik etmenler, eğitim düzeyi, yaş, cinsiyet ve geçirilen hastalıklar rol oynamaktadır. Sigara kullanımı ile vücuda alınan benzo(a)piren, polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve aromatik aminler (2-naftilamin, 4-aminobifenil) mesane kanseri etiyopatogenezinde başlıca rol oynamaktadır. Sigara kullanımı ile mesane kanseri görülme oranı ortalama beş kat artış göstermektedir. Mesleki karsinojenler (uçucu katran türevleri, asbest vb.), schistosomiasis, kronik sistit, tedavi amaçlı siklofosfamid kullanımı, pelvik radyoterapi, analjezik kullanım alışkanlığı, sık kahve tüketimi, tatlandırıcı kullanımı mesane kanseri oluşumunda etkilidir. Cinsiyet, yaş ve ırk mesane kanseri gelişimini farklı oranlarda etkilemektedir. Mesane kanserinin gelişiminde çok sayıda onkogen ve tümör süpresör genlerde meydana gelen mutasyonlar da oldukça etkilidir (2,8).

2.1.3. Mesane Anatomisi

Mesane duvarı üç kısımdan oluşmaktadır.

- Üretelium
- Üreterler
- Üretra

Mesane duvarı üreteriyal hücreler veya tranzisyonel hücrelerden oluşur. Buna tranzisyonel epitelyum denmektedir. Lamina propria, ara bağlantı yapan dokudur. Üreteriyumu dış kas dokusu hattından ayırmaktadır. Kan damarları, sinirler ve salgı bezlerini içermektedir. Lamina propria, subüreteriyal bağlantı dokusu veya subepitelyal doku olarak da adlandırılmaktadır.

Muskularis propria mesanenin dış dokusudur. 3 kısımlı kas dokusundan oluşur. İç longitudinal, orta longitudinal, orta sirkular ve dış longitudinal kas olarak ayrılmaktadır.

Mesaneyi diğer dokulardan ayıran kısımlar;

*Seroza; Mesanenin üst dış kısmını çevreleyen ince membran yapıdadır.

*Adventisya; Serozanın olmadığı mesane dış bölgelerini çevreler.

*Perivesikal (viseral) yağ dokusu; Mesaneyi çevreleyen seroza ve adventisyanın üstünü kaplayarak çevrelemektedir(9,10,11,12,13,14)

2.2. ÜRETELİYAL KARSİNOMA

Üreteliyal karsinoma (tranzisyonel karsinoma) mesane kanseri tümörünü ifade etmektedir ve vücudun diğer bölümlerine metastaz yapma kabiliyetine de sahiptir ve malign tümörler olarak da adlandırılmaktadır. Üreteliyum (tranzisyonel epitelyum diye de adlandırılmaktadır.) mesanenin, üreterin ve üretranın, renal pelvisin (idrar toplayan böbreğin bir kısmı) iç yüzeyinde yer alır. Üreteliyal hücrelerden veya tranzisyonel hücrelerden oluşur. Bu hücreler kanserleşebilir ve bu duruma üreteliyal karsinoma denir. Üreteliyal karsinoma mesane kanserinin en yaygın görülen tipidir. Yaklaşık mesane kanseri vakalarının %90 ını kapsamaktadır.

Üreteliyal karsinoma üriner sistemin renal pelvis, üreterler, mesane veya üretra gibi herhangi bir kısmında başlayabilmektedir. Mesane kanserinin herhangi bir tipine sahip bireylerde, idrar sisteminin herhangi bir kısmında benzer tümörler geliştirebilmektedirler. Bu nedenle mesane de herhangi bir tümör saptandığında, tüm idrar sistemini oluşturan kısımlar tümör oluşumu için taranmaktadır.

Üreteliyal karsinomalar 2 ana gelişim paterni gösterirler. Papiler üreteliyal karsinomalar ince parmak benzeri uzantılar ile mesanenin iç yüzeyinden mesane boşluğuna doğru büyümektedir. Düz üreteliyal karsinomalar mesane yüzeyinde düz olarak yayılım göstermektedir. Mesane duvarından iç kısımlara doğru büyümektedirler.

Üreteliyal karsinomalar non-invazif (mesane boşluğuna doğru yayılan) veya invazif (mesane duvarının iç bölgelerine doğru) yayılım gösterebilmektedir.

2.2.1. Non invazif Üreteliyal Karsinoma

Mesane iç boşluğuna doğru yayılım gösteren mesane kanseri türüdür. Mesane duvarının iç bölgelerine doğru büyüme göstermemektedir. Mesane kanseri teşhisi

sırasında bireylerin yaklaşık %50-%60' ı non invazif formda mesane kanseri taşıyıcısıdır.

Non invazif üreteriyal karsinoma tipleri 4 bölümde sınıflandırılmaktadır;

- Non invazif düz üreteriyal karsinoma (karsinoma in situ)
- Non invazif papiller üreteriyal karsinoma, ileri seviye
- Non invazif papiller üreteriyal karsinoma, düşük seviye
- Düşük malignite potansiyeline sahip invazif olmayan papiller üreteriyal neoplazma (invazif forma dönüşüm olasılığı çok düşük olan tip)

2.2.2. İnvazif Üreteriyal Karsinoma

Lamina propria ve kas dokusuna doğru büyüme ve yayılım gösteren karsinomadır. Teşhis sırasında %40-%50 oranında invazif tip tespit edilmektedir. Üreteriyal karsinomalar karışık epiteliyal oluşumlara sahiptir ve kanser hücreleri ile birlikte değişik tipte hücre yapılarına sahip olup invazif olmayan tipe kıyasla çok daha agresiftir.

2.2.3. Nadir Olarak Görülen Üreteriyal Karsinomalar;

***Skvamöz farklılaşma gösteren üreteriyal karsinomalar;** üreteriyal ve skvamöz hücrelere (balık puluna benzeyen düz ve ince yapıda epiteliyal hücre tipi) sahiptir. Skvamöz hücreler mesane de yer alan üreteriyal karsinomaların %21 inde görülmektedir. Renal pelvis tümörlerinde %44 görülme oranı taşımaktadır.

***Glandüler farklılaşma gösteren üreteriyal karsinomalar;** salgı bezi hücrelerine sahiptir. Glandüler farklılaşma mesane kanserlerinde %6 oranında görülmektedir.

***Mikropapiller üreteriyal karsinomalar;** Mikropapiller (parmak benzeri uzantılar) yapıya sahip hücreler içermektedir ve ileri düzeydir.

***Sarkomatoid üreteriyal karsinomalar ;**Üreteriyal karsinosarkomalar, sarkomaya (karserli bağlantı dokusu hücreleri) benzeyen hücreler içermektedir. Bu

agresif karsinoma teşhis edildiğinde genellikle lenf nodlarına ve mesane dışı diğer organlara yayılım göstermektedir.

***Üreteliyal karsinomanın karışık formu;** Büyük çekirdeğe sahip anaplastik bir grup hücre içermektedir (immature veya özelleşmemiş hücreler). Bu grup oldukça nadirdir fakat çok agresiftir.

***Mikrokistik üreteliyal karsinomalar;** Çok nadirdir. Bu tümörler içlerinde kist barındırır ve mikroskobik boyuttan 2mm ye kadar boyutları yükselmektedir.

***Lenfoepitelioma benzeri üreteliyal karsinomalar;** Lenfatik doku (lenfatik sistemi oluşturan dokular), üreteliyal hücreler veya transizyonel hücreler içerirler. Çok nadirdir ve erkeklerde kadınlara oranla daha yüksek düzeyde görülmektedir.

***Plasmasitoid ve lenfoma benzeri üreteliyal karsinomalar;** Hücreleri lenfoma (kanseri lenfositler) veya plasmasitomaya (kanseri plazma hücreleri) benzemektedir.

***Dev hücreli üreteliyal karsinomalar;** Anormal büyüklükte birden fazla çekirdeğe sahip hücreler içermektedir.

***Saydam hücreli üreteliyal karsinomalar;** Berrak yapıda sitoplazma ve büyük çekirdeğe sahip hücreleri vardır.

***Yağ hücresi varyantlarını içeren üreteliyal karsinomalar;** İçi yağ dolu hücreler içermektedir.

***Farklılaşmamış üreteliyal karsinoma varyantı;** Net oluşum içermeyen ve hiçbir hücreye benzemeyen hücre tiplerine sahiptir.

***Trophoblastik farklılaşma gösteren üreteliyal karsinomalar;** Trophoblast hücreleri ile karışmıştır. Trophoblastlara benzeyen hücreler içerirler. Trophoblast hücreleri plasenta ve embriyoyu çevreleyen membran yapısının içeriğinde bulunmaktadır (9,10,11, 13,15, 16,17, 18).

2.3. MESANE KANSERİ OLUŞUMUNDA YER ALAN MOLEKÜLER MEKANİZMALAR

Normal bir üreteriyal hücrenin malign hücreye dönüşmesi ve metastaz yapması birçok farklı genin etkileşimi sonucu ortaya çıkmaktadır. Tümör baskılayıcı gen fonksiyonunun kaybı veya onkojenlerin indüksiyonu düzensiz hücre büyümesi ve çoğalmasına neden olur. Büyüme faktörlerinin, adezyon moleküllerinin ve anjiyogenik faktörlerin anormal ekspresyonu mesane kanserinin ilerlemesinde rol oynamaktadır. Kanser hücrelerinin genomik dengesizliği nedeniyle, olası genetik yolak ve etkileşimleri tanımlamak zorlaşmaktadır. Kromozomal ve mesane kanserinde bulunan transkripsiyonel değişiklikler epigenetik değişimleri de beraberinde getirmektedir. Etkili terapötik yaklaşımlar geliştirmek için moleküler ve prognostik bir çok yaklaşımın birlikte yorumlanmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Çevresel koşullar mesane kanseri gelişimde büyük oranda etkilidir. Mesleki karsinojenler, sigara kullanımı, uzun süreli kimyasallara maruziyet, inflamatuvar yanıtın uzun süreli olması, foley katateri, schistosomiasis enfeksiyonu mesane kanseri başlatan etken sebeplerdendir. Pelvik radyasyon ve siklofosamid maruziyeti de genetik mutasyonlara sebep olarak normal üreteriyal hücrenin malign hücreye dönüşümünü başlatmaya sebep olabilmektedir.

Sigara kullanımı mesane kanserini başlatan en önemli risk faktörlerinden biri olarak görülmektedir. Fakat spesifik olarak karsinojen etkiye bağlı yolaklar tam olarak açığa çıkartılamamıştır. Bu konuda en çok 4 aminobifenil gibi aromatik aminler araştırmalarda rol oynamaktadır. Çünkü bu kimyasal sadece sigara dumanında değil birçok endüstriyel kimyasal içerisinde de yer almaktadır. Bu kimyasallar yol açtıkları tranzisyonel mutasyonlar ile karsinogeneze yol açma potansiyeline sahiptir. DNA'ya eklenti yapan bileşiklerin formları sitokrom p450 1A2 (CYP1A2), N-asetiltransferaz 2(NAT2) ve glutatyon S transferaz M1 (GSTM1) gibi karaciğer enzimlerinden etkilenmektedir. Bu enzimlerin bazıları üreteriyal hücrelerde de bulunmaktadır. CYP1A2 aromatik aminleri demetile eden indüklenebilir bir enzimdir ve DNA eklenti oluşumlarını azaltır. Genel olarak popülasyonda polimorfik özellik gösteren bu enzimlerin varyantları bulunmaktadır ve bireyden bireye farklı moleküler yapılar ve biyolojik etkiler gösterebilirler. Bu konuda yapılan çalışmalara göre yavaş NAT2/hızlı CYP1A2 fenotipleri olan sigara kullanıcılarının, hızlı NAT2/yavaş CYP1A2 fenotipli sigara kullanıcılarından daha yüksek mesane kanseri riski taşıdığı saptanmıştır. Benzer

şekilde bireyde detoksifiye enzimi GSTM1 homozigot olarak delesyona uğramış ise mesane kanseri gelişiminde 1,8 kat daha yüksek riske sahiptir (19,20,21).

Schistosomiasis batı ülkelerinde nadir görülebilmektedir bunun yanında dünyanın diğer kısımlarında endemiktir. “Schistosoma haematobium sistitis” mesane kanseri oluşumuna yol açmaktadır. Bu bakterinin mesane kanserine yol açtığı kesin olarak kanıtlandığından beri son dikkatler araştırmalarda N-nitroso bileşiklerine (NNCler) yönelmiştir. Sekonder enfeksiyon sonrası endojen olarak NNC’ ler oluşturulabilir ve bu da sistosomal sistite her zaman eşlik eden nitrat azaltıcı bakteriler tarafından oluşturulur. NNC’ler , nitrosaminler ve doğrudan etkili nitrozamidleri içerir ve kanserojendir. DNA dizilerinin ve spesifik bazların tümörigenik alkalizasyonuna sebep olur.

Uzun süreli foley kateteri kullanımı ve kronik sistitte skuamoz hücreli mesane karsinoması oluşmasında etkilidir. Kesin karsinogenez mekanizması tam olarak anlaşılmadıysa da tekrarlayan kronik irritasyon metaplazi ardından displazi ve sonuç olarak karsinoma yol açan bağımsız birer faktördür. Kronik sistitle birlikte yükselen nitrik oksit ve NNC’ leri içerir. Nitrik oksit, 5-metilsitozini ve kendisini nitrite deamine eder. Bunlar daha sonra bakteriler tarafından, NNC’lerin endojen oluşumunu uyaran nitritlere indirgenir. NNC’ ler DNA sekanslarını alkile ettikleri için kanserojendir.

Siklofosfamid ile tedavi edilen hastalar mesane kanseri geliştirme açısından 9 kat artmış risk taşırlar. Bu nedenle oluşan mesane kanseri tümörlerinin çoğu TCC’ ler(tranzisyonel hücreli karsinomalar)’dir, hızlı büyüme gösterir ve kasa invazedirler. Kümülatif siklofosfamid dozu kullanımı (50g’dan büyük) mesane kanseri gelişimi ile direkt ilişkili gözükmemektedir. Acrolein, siklofosfamid metaboliti, mesane kanseri indüklenmesinden sorumlu gözükmemektedir. Mesane kanseri gelişim riskinin yumurtalık için pelvis, servikal ve prostatik karsinomaların radyasyon terapileri ile artış gösterdiğini ve mesane kanserinin radyasyon terapisinden 5-10 sene sonra ortaya çıkma eğiliminde olduğu gözlemlenmiştir. Sekonder olarak mesane kanseri gelişim riskini 1,5 – 4 kat arasında değiştirmektedir. Ortaya çıkan mesane kanserinin radyoterapinin serbest radikalleri açığa çıkartması ve önemli regülatör genlerde DNA mutasyonuna yol açmasıyla oluştuğu düşünülmektedir.

Moleküler açıdan bakıldığında tümör süpresör ve onkogenler de meydana gelen düzensizlikler ve mutasyonlar da mesane kanseri gelişiminde etkilidir. Delesyona

uğrayan gen bölgeleri malign transformasyonda ve kanser gelişiminde temel rol oynamaktadır. Genellikle bu genler hücre bölünmesi, apoptoz ve genetik mutasyonları düzeltme ve koruyan proteinleri kodlamaktadır.

Kromozom 13(13q) üzerinde ki retinoblastoma (Rb) geni ve kromozom 17 (17p) üzerindeki p53 geni , çalışılan en iyi tümör baskılayıcı genlerdir. Mesane kanserinin ilerlemesi ve gelişmesinde en önemli genlerdir. Kromozom 9 üzerinde bulunan delesyonların da mesane kanseri hastalarının %60'ın da bulunduğu tespit edilmiştir. Bu da bize bu kromozom üzerinde en az iki mesane kanseri tümör süpresör geninin bulunabileceği konusunda fikir vermektedir. Kasa invaze olmayan mesane kanserinde FGFR3, HRAS ve PIK3CA gibi protoonkogenlerdeki mutasyonlar daha baskınken (22,23,24)

Kasa invaziv mesane kanseri gelişiminde ise TP53, p16 ve Rb gibi tümör süpresör genlerdeki düzensizlikler başlıca sorumlu tutulmaktadır.(25,26,27,28)

2.3.1. Retinoblastoma Tümör Süpresör Geni

Rb geni hücre döngüsü regülatörü olan bir nükleer fosfoprotein (pRb) kodlamaktadır. Fosforillenmemiş pRb, transkripsiyon faktörü olan E2F adlı proteini ile bağlı halde negatif olarak regüle edicidir. pRb ne zamanki siklin/CDK kompleksi tarafından fosforillenir, E2F-1 transkripsiyon faktörü serbest bırakılır ve hücre döngüsü DNA sentez (S) fazını yürüten ürünlerin genlerini aktive eder. Mutasyonlar ve gen delesyonları sırasında normal hücreler Rb proteinini eksprese ederler ve bu durum genellikle protein ekspresyonu eksikliğiyle sonuçlanır. Rb lokusunda ki heterozigozite kaybı Rb protein ekspresyon yokluğu ile ciddi anlamda ilişkilidir. Rb gen mutasyonları mesane kanserli bireylerin yaklaşık %30 unda saptanmaktadır (31).

2.3.2. P53 Tümör Süpresör Geni

P53 geni DNA onarımında ve apoptozda kritik rol oynayan 53kDa luk transkripsiyon faktörünü kodlamaktadır. Mutasyona uğramış p53 proteini, wild tip p53'ten çok daha uzun bir yarı ömre sahiptir, ve böylece immünohistokimyasal yöntemler ile tespit edilebilir. Kas invazyonu gösteren tranzisyonel hücreli karsinomaların %50 si mutasyona uğramış p53 proteinin nükleer aşırı ekspresyonunu içerir. Bu durum ilerleyen evre, derece ile ilişkilidir ve yüzeysel invazif düzey(T1)' de meydana gelir. Bununla birlikte p53 geni mutant ekspresyonu çok daha düşük düzeydedir ve daha zayıf

prognoz ve hastalık gelişiminin daha hızlı ilerleme oranı ile ilişkilidir. Bozulmuş P53 gen yapısı, sağ kalım oranını düşüren belirteçlerdendir. Kas invaze TCC’ de mesane kanserinden ölüm oranını iki katına çıkarttığı saptanmıştır (31).

P53 durumunun yaygın olarak tedavi belirteci olarak kullanılmasının benimsenmesinde çeşitli tartışmalar vardır. Benzer olarak p53 durumunun tespitinde antikorlarını içeren teknik yöntemler kullanılır ve doku fiksasyonu sırasında kullanılan metodlar antijen saptamasını değiştirir ve düzeyinin çalışmadan çalışmaya değişiklik gösterme sorununu ortaya çıkartmaktadır (31).

2.3.3. Kromozom Anomalileri

Mesane kanserinde sayısal ve yapısal kromozomal anomaliler en sık olarak 1., 8., 9., 10., 11., 13. ve 14. kromozomlarda göze çarpmaktadır. Bununla birlikte gen lokuslarında translokasyon, insersiyon, delesyon gibi düzenlenmelerle yapısal anomaliler de üretiliyal karsinomalarda sık olarak tespit edilmektedir (31).

Kromozom 9 delesyonları mesane kanserinin tüm evre ve düzeylerinin %60’ından daha fazlasında meydana gelmesinin yanında mesane kanserini başlatıcı etkiye de sahiptir. Hastalık başlangıcında tespit edilen bu kromozomal sapma hastalığın sitogenetik ve moleküler kanıtı olarak gösterilmektedir (31). Tespit edilen kromozom 9 delesyonu genel olarak monozomi olarak görülmekte ve hastalık ilerlemesi ile değil sıklıkla nüks ile ilişkilendirilmektedir. Nitekim, kromozom 9 un (9q)’ nun uzun kolunun üzerindeki bölgelerden en az birinde, düşük derece yüzeysel TCC’ lerde, en az biri silinmektedir. Bu durumda p53 veya pRb inaktivasyonu ile meydana gelen üretiliyal tümörünün farklı bir moleküler yolda olabileceği düşüncesini desteklemektedir (31).

Kromozom 9’ un p21 bölgesi birçok tümör süpresör geni içeren bir bölgedir ve mutasyonu birçok malignite ile ilişkilendirilmektedir. Çalışmalar CDKN2 veya p16 lokusunda yer alan genlere dikkat çeker, çünkü bu bölgenin Rb fosforilasyonunu sağlayan bir siklin bağımlı kinaz inhibitörünü kodladığını bu sayede aktif Rb oluşup, hücre döngüsünün G1 fazından kaçışı bloke ettiğini göstermektedir. Rb fosforilasyonuna izin verilmesi ile P16’ nın fonksiyon kaybının etkisi hücre S fazında kaçabilecekken unregüle hücre büyümesi ile sonuçlanır. Büyümeyi durduran p16 ürünleri defektli olan mesane kanseri hücrelerine transfekte edilen yabancı tip p16’ nın tümör süpresör rolü gösterilmiştir. Başka bir potansiyel mekanizmaya göre ise p16 veya

CDKN2 fonksiyon kaybı p16' nın promotör bölgesi yoluyla gen susturumuna gitmektir. İlginç bir şekilde başka bir hücre döngüsü regülatör geni, p14, kromozom 9p21' de yer almaktadır ve INKA4a lokusunda p16 ile aynı kodlama bölgesinde yer almaktadır. P14 aşırı eksprese edildiğinde hücre döngüsünün hem G1 hemde G2 fazlarında durmasına neden olan farklı bir protein kodlamaktadır. Gonzalgo ve arkadaşları, p16 transkriptinin oluşmasının metilasyon ile mesane kanseri hücrelerinde durdurulabileceğini göstermektedirler. Bu metilasyon 5-aza-2 deoksisitidin eklenmesi ile p16 transkripsiyonu olduğu için geri dönüşümlü olarak görülmektedir. P16 promoter bölgesinin metilasyonu, CDKN2 fonksiyonunun kaybında önemli bir rol oynayabilir ve daha sonra pRb' yi etkisiz hale getirerek hücre büyümesine ve transformasyonuna izin verebilir. P14 ilk etkisini p53 proteininin Mdm2 aracılı p53 proteini degradasyonunu bloke ederek göstermektedir. Bu durum bozulmamış p53' ün inhibe edilmemiş hücre büyümesini yavaşlatmasına ve hasarlı DNA' lı hücrelerini apoptoza göndermesine izin vermektedir (31).

Mesane kanserine sahip hastaların önemli bir kısmında 9q üzerinde (9q11-13 ve 9q33-34) iki kısım seçici olarak delesyona uğramaktadır. Bu iki bölgede ki fonksiyonel proteinler bu iki varsayılan tümör baskılayıcı genin spesifik konumları gibi tanımlanmaya devam etmektedir. Bununla birlikte bunların delesyonu düşük dereceli kanserler ile daha çok ilişkilidir.

Mikrosatellit instabilitesinin de mesane kanserini tespit etmede kullanılabileceğine dair çeşitli düşünceler vardır. Mao ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 20 mesane kanseri hastasının 19' unda idrar sedimentlerinde mikrosatellit instabilitesi saptamışlardır. Bu hastaların 15' inde tümör biyopsisi yapıldığında idrarda tespit edilen mikrosatellit alterasyonlarının primer tümör yapılarıyla paralellik gösterdiğini saptamışlardır. Stainer ve arkadaşları 21 mesane kanseri hastasının 20' sini mesane kanseri nüks durumunu 20 markerla mikrosatellit analizi ile takip etmişlerdir ve 11' inin nüks 10' unun nüks etmediğini gözlemlemişlerdir. Buna benzer olarak Mourah ve arkadaşları mesane kanseri hastalarının 12' sinin 10' unda mikrosatellit kararsızlığı tespit etmişlerdir. Bu çalışmalar bizlere mikrosatellit instabilitesinin mesane kanseri klinik tanı ve erken teşhisinde faydalı olabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte bu konudaki çelişkili sonuçlara yol açabilen durum ise çevresel etmenlerin mikrosatellit tekrarlarının üzerinde ki bilinmeyen etkileridir (31).

2.3.4. c-erb-B2 (HER-2/neu)

Onkogenlerin aşırı ekspresyonları (örneğin c-erbB2) ve mutasyonları (örneğin c-Hras) kanser gelişiminin ilerlemesine katkıda bulunabilmektedirler. Onkogenlerin aşırı ekspresyonundan daha önemli mekanizmalardan biri ise gen amplifikasyonudur. Proto-onkojen c-erb-B2, epidermal büyüme faktörü reseptörüne (EGFR) benzer bir transmembran reseptör benzeri proteini kodlamaktadır. TCC' lerde c-erb-B2 aşırı eksprese edilir ve bu da gen amplifikasyonuna bağlı gibi gözükmemektedir. Bu proteinin aşırı ekspresyonu EGFR' nininkine benzer bir tirozin kinaz aktivitesine ve hücreyel uyarılma özelliğine sahiptir. Bazı çalışmalar bu proteinin aşırı ekspresyonunu gösteren tümörlerde yüksek dereceli/veya ileri evre ile hastalık ilişkisi kurmuş bazıları ise herhangi bir korelasyon bulamamıştır. Bu çelişen sonuçlar mesane kanseri için prognostik değeri tespit etmede yetersiz kalmaktadır. Bununla birlikte c-erb-B2 onkogenlerin malign transformasyona katkıda bulunduğuna dair potansiyel ajanlar olduğu fikrine katkıda bulunmaktadır ve membrana bağlanan onkoproteinler ya da tümör süpresörler immünolojik terapötik stratejilerin hedefi olabilme potansiyeli taşımaktadır.

H-ras hücre zarının sitoplazmik tarafında yer alan sinyal proteinidir ve mesane kanseri oluşumunda potansiyel etkisi olabilecek onkogenlerdendir. Mesane kanseri tümörlerinin %36' sında H-ras bulunmuştur. Mutasyonların çoğu kodon 12' de yer alan single nükleotid mutasyonlardır. Bununla birlikte kodon 13 ve kodon 61' de başka mutasyonlar tespit edilmiştir. Fontana ve arkadaşları erken dönem yüzeysel mesane kanseri ve H-ras arasındaki ilişkiyi tanımlamışlardır. H-ras mutasyonları ile analizler sınırlı olmasının yanında güçlü bir prognostik marker olabileceği düşünülmektedir.

Mesane kanseri hücreleri hızlı büyüme, invazyon ve metastaz yapmadan önce bazı özellikleri kazanmalıdırlar. Bu özellikler en azından kısmen de olsa EGF ve EGFR' ler aracılığıyla kontrolsüz büyüme, hücreyel mobilite ile spesifik hücre adezyon molekülleri ve anjiyogenik faktörlerin aşırı ekspresyonu ve ekspresyon kaybını içermektedir. Büyüme faktörleri reseptörlerinde ki anormal ekspresyon veya fonksiyon malign hücrelerdeki proliferasyon kapasitesini değiştirmektedir.

2.3.5. EGF ve EGFR' ler

EGF, insan idrarında aktif formunun yüksek konsantrasyonda salgılandığı fakat mesane kanseri hastalarının idrarında düşük konsantrasyonda bulunan güçlü bir

mitojendir. Bu üreteryumun normalde bazal tabakasında bulunan, TCC’ de anormal olarak tüm üreteryumda boydan boya eksprese edilen ve idrarla da atılan yüzeysel hücreleride içeren üreteryumun bazal tabakasında ki EGFR’ lerin artan ligand bağlanmasını yansıtabilir.

İmmünohistokimya ile tespit edilen EGFR’ nin artan ekspresyonu, evre, derece ve kötü prognoz ile de ilişkilidir. Sistoskopi ile tespit edilen normal üreteryumlu TCC’ li hastalarda tespit edilen anormal EGFR ekspresyonları mesane kanseri tümör gelişiminde erken belirteçlerden biri olabilme potansiyeli taşımaktadır. EGFR’ ler aracılığıyla çalışan ligandlar sadece mitogenezi indüklemez aynı zamanda hücrel motiliteyi de indüklemektedir. EGFR’ lerin malign üreteryumda uyarılması transepitelial motilite ve tümör invazyonunun yanı sıra proliferasyona da katkıda bulunmaktadır.

2.3.6. Ekstraselüler Matriks ve Hücre Adezyon Molekülleri

Bazal lamina altında yatan üreterial adhezyon molekülleri ve hücre dışı matriks bileşenleri bazı durumlarda alterasyonlara uğrayabilmektedir. Bu da hücrel ayrışma ve dokuda lokal hareketliliğin düzeyini değiştirir. Ayrıca birçok molekülde hücre hücre iletişimine katılmakta ve sıklıkla membrana bağlı büyüme faktörü reseptörlerinin ekspresyonunu ve fonksiyonunu düzenleyerek karsinogeneze katkıda bulunur.

E-kaderinler kalsiyum bağımlı hücre-hücre adhezyonunda rol oynayan transmembran glikoproteinleri içermektedir. Yapılan bir çalışmada mesane kanseri hastalarında E-kaderin ekspresyonunun azalmasının tümör nüks ve invazyonunda artış ve sağ kalımda düşüşe yol açtığı saptanmıştır fakat hangi e- kaderinin hangi mekanizma ile ekspresyon seviyesinin düştüğü hala bilinmemektedir (29,30).

2.3.7. İntegrinler

İntegrinler, birbirleri için ve laminin, fibronektin ve kollajen gibi hücre dışı matrisin bileşenleri için reseptör olarak işlev gören bir transmembran heterodimerik protein ailesidir. Alfa-6 beta-4 integrin normal olarak üreteryumun bazal membranındaki kolajen VII ile birleşerek oluşturduğu hemidesmosomal kompleksi, hücre göçüne karşı etkili bir bariyer oluşturmaktadır. Mesane kanserinde alfa-6 beta 4 integrinin kolajen VII ile ilişkisinin mesane kanserinde bozulması üreterial maligniteler için bir açıklama olma potansiyeli taşımaktadır.

2.3.8. Anjiyogenik Faktörler

Anjiyogenez tümör büyümesi ve metastazında etkin mekanizmalardan biridir. Anjiyogenez vasküler endotelial büyüme faktörü(VEGF) gibi anjiyogenez indükleyici faktörler veya fibroblast büyüme faktörü (b-FGF) gibi indükleyiciler tarafından gerçekleştirilebilir. Bu faktörler tümör hücreleri tarafından veya onları çevreleyen ekstraselüler matrix ya da tümörle ilişkili stromal hücreler veya inflamasyon hücreleri ürünleri tarafından üretilmiş olabilmektedir. Mikrovasküler yoğunluğun artışı mesane kanseri hastalarında sağ kalımı azaltmaktadır. İdrarda b-FGF' nin, anjiyogenik otokrin motility faktör (AMF), AMF reseptörü ve hiyaluronik asit artışı ve bunların degradasyon ürünlerinin artışı mesane kanserinde tespit edilmiştir. Mesane kanserinde normal üreterliuma kıyasla anjiyogenez inhibitörlerinin anormal derecede düşük eksprese edildiği görülmektedir. Trombospondin-1 bir matriks glikoproteindir ve mesane kanseri hastalarının mesanelerinde düşük seviyede eksprese edilir, yüksek oranda nükse sebep olur ve düşük sağ kalımla korelasyon göstermektedir.

Sonuç olarak mesane kanseri gelişimi ve ilerlemesinde yer alan moleküler mekanizmalar karmaşıktır ve büyük olasılıkla tümör süpresör genler, onkogenler, büyüme faktörleri , adezyon molekülleri ve anjiyogenik faktörlerin etkileşimi ile normal hücreden malign tip hücreye geçişe sebep olmaktadır. Bu nedenle bu mekanizmaları ve yolları daha iyi anlamak klinik tanı ve tedavide avantaj sağlayacaktır (31).

2.4. MESANE KANSERİNDE TEDAVİ

Bireyler arası heterojen farklılıklar mesane kanserindeki tedavi süreçlerindeki çeşitliliği arttırmaktadır.

Kas invazif olmayan tipe ait tümör evreleri Evre CIS, Ta, T1 olarak adlandırılmaktadır (Şekil 2-1). Nüks etme ve/veya mesane kaslarına yayılma olasılığına göre tedavi şartları belirlenmektedir. Tüm hastalarda transüretal mesane tümörü rezeksiyonu (TURBT) gereklidir ve riske göre aşağıdaki yöntemlerle tedavi devam etmektedir.

* Düşük risk taşıyan hastalarda TURBT uygulanmaktadır. Rezeksiyondan sonra, bu işlemi 6 saat içinde uygulanan tek doz peri-operatif intravezikal kemoterapötik izlemektedir.

* Orta dereceli riske sahip hastalarda, tek doz peri-operatif intravezikal kemoterapik ve ardından kemoterapi ya da immünoterapiyi içeren adjuvan intravezikal tedavii(BCG) uygulanabilmektedir.

* Yüksek risk taşıyan hastalar için tedavi seçenekleri, bir Calmette-Guerin Basili (BCG) varyantı ile aşı uygulamasını içeren bir intravezikal adjuvan tedavi ve/veya diğer risk faktörleri minimum düzeyde olan, BCG tedavisinin başarısız olduğu veya tedaviye dirençli olduğu seçilmiş olgularda üriner diversiyonlaksonuçlanan radikal sistektomidir.

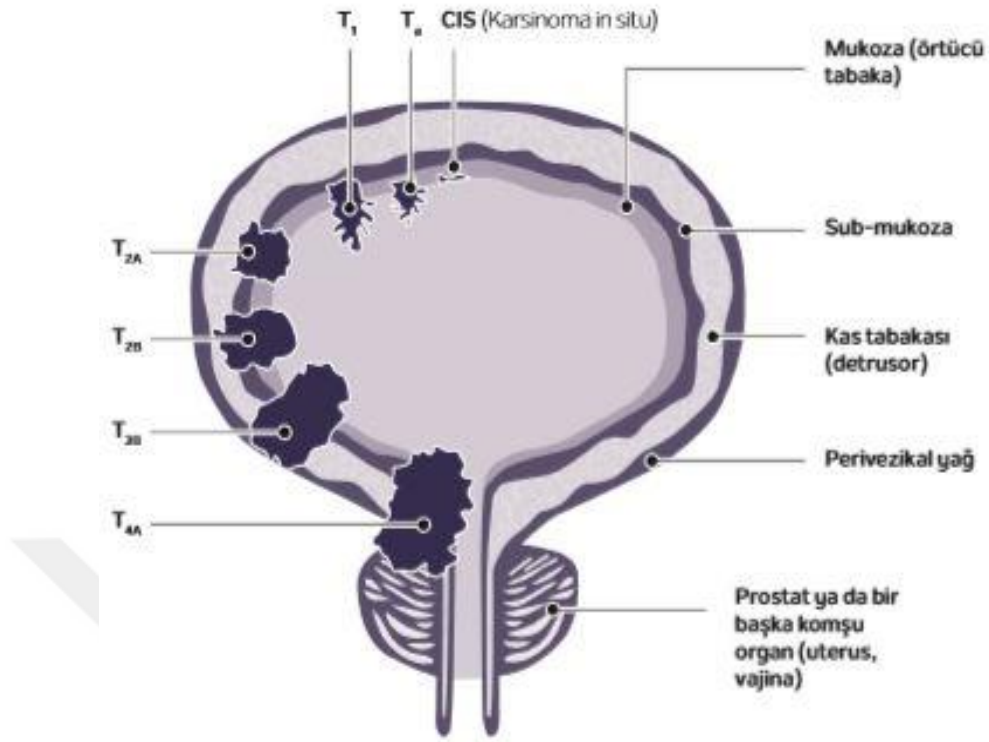
Uygulanan TURBT kalitesinin çok yüksek olması önemlidir. İlk cerrahi girişim, tedavinin optimizasyonu, tekrarlayan cerrahi girişimin azalması ve doğru evreleme açısından çok önemlidir.

Evre II ve III için kas invazif mesane kanserine yönelik tedaviyi belirlerken metastaz seviyesik yönlendirici etkindir (Şekil 2-1). En çok kullanılan seçenek, bilateral pelvis lenfadenektomisi ile birlikte radikal sistektomi ve perioperatif kemoterapi uygulamasıdır. Diğer bir alternatif ise eksternal radyoterapiyi (radyo-duyarlılık oluşturan bir ajanla birlikte ya da böyle bir ajan olmaksızın) içermektedir. Kadınlarda radikal sistektomi genellikle mesanenin ve uterus, fallop tüpleri, overler ve vajina duvarının anterior bölümünü içeren pek çok komşu organın çıkarılmasını kapsamaktadır. Erkeklerde, mesanenin çıkarılmasına ek olarak, üreter lenf düğümlerinin alt kısımları, prostat ve seminal veziküller de çıkarılmakta ve bu durum sıklıkla impotensepyol açmaktadır. Patolojik evreye ve bireyin böbrek fonksiyonuna bağlı olarak sistektomiye, preoperatif kemoterapi ya da adjuvan postoperatif kemoterapi eşlik edebilmektedir. Sisplatin temelli kombinasyon tedavileri, mikro-metastazların temizlenmeye çalışılması, tümör boyutunun küçültülmesi ve tümörlerin yayılım hızının yavaşlatılması amacıyla, sisplatin için uygun olan hastalarda sistektomiden ya da radyoterapiden önce (neoadjuvan olarak) kullanılmalıdır. Preoperatif kemoterapi ile sağkalımda % 5 oranında artış gözlemlenmektedir. Bazı hastalarda, kanserin tedavisi ve mümkün olduğunda mesanenin korunması için koruyucu tedavi (eş zamanlı kemoradyasyon ile birlikte) kullanılabilir.

Evre IV, Lokal olarak ilerlemiş ya da metastatik mesane kanserine yönelik tedavide kanser semptomlarını (ağrılı ürinyasyon, böbreklerin blokajı, vb.) hafifleten tedavi seçenekleri metastaz derecesine bağlıdır (Şekil 2-1). Kanser lokal olarak

ilerlemiş olması durumunda, intravenöz kombinasyon halinde platin bazlı kemoterapi kullanılabilir ve iyi bir yanıtın halinde, iyi seçilmiş hastalarda radikal sistektomi ve bilateral pelvis lenfadenektomisi ya da radikal radyoterapi yöntemleri düşünülmektedir. Hastalığın ve semptomların lokal kontrolü için palyatif radyoterapi de düşünülebilmektedir. Bununla birlikte kanserin çok fazla ilerlemiş olması ve sonuç olarak hastanın performans durumu ya da organ fonksiyonunun zayıf veya aktif tedavi için yetersiz olması durumunda, hasta sistemik palyatif kemoterapiye ve/veya bir palyatif bakım ekibine sevk edilmelidir. Tedavinin iyileştirilmesi ve sağ kalım oranlarını yükseltmek için bilimsel literatür takip edilmeli klinik çalışmalar sonucu elde edilen yeni gelişmeler her zaman göz önünde bulundurulmalı ve desteklenmelidir (7).

Kemoterapide kullanılan ilaçlar arasında valrubicin, gemstabin, docetaxel, kabazitaksel, mitomisin C, cisplatin gibi ajanlar ve kombinasyonları kullanılmaktadır. Hedefe yönelik olarak EGFR, FGFR3, rapamisin(m TOR) yolağı inhibitörleri ağırlıklı olarak metastazik mesane tümörlerinde çalışılmaktadır ve dovitinib gibi VEGFR3 ve FGFR3'ün ikisini bloke eden ajanlarda BCG refrakter ve kasa invaziv olmayan mesane kanseri vakalarında çalışılmaktadır. RAD001 (everolimus,) adlı mTOR yolağı inhibitörü, VB4-845 (vicinium) epitelyal hücre adezyon molekülünü içeren bir intravezikal tedavi ajanıdır. Isıya duyarlı termojelle beraber MMC tedavisi (MitoGel), GemRIS yani intravezikal sürekli gemcitabin salınım tedavisi, PANVAC adlı çiçek virüsü aşısı, EGFR antikorlu ile (nanoalphaEGFR) altın nanopartikül bileşimi tedavisi gibi yeni tedavi alternatifleri mesane tümöründe intravezikal yeni çalışma hedefleridir. Kasa invaziv mesane kanserinde çeşitli monoklonal antikorlar da kullanılmaktadır. Atezolizumab, Durvalumab, Avelumab, Nivolumab, Pembrolizumab, Ipilimumab gibi monoklonal antikorlar da cisplatin bazlı kemoterapi ardından genellikle ikinci basamak tedavilerde denemeye alınmıştır. Fakat yine de standart cisplatin ve çeşitli kemoterapötik ajanların kombinasyonu ile tedavinin önüne geçecek kadar etkili bulunmamaktadır (32).



Şekil 2 8: Mesane Kanseri Tümör Evrelemesi.

2.5. MESANE KANSERİ HÜCRE HATLARI

Preklinik çalışmalarda insan dokusu ve hücre hatları, genetik bozukluklar, temel tümör biyolojisi ve farmakolojik cevapları araştırmak adına önemli fırsatlar sağlamaktadır. Bu amaçla mesane kanseri hücre hatları üzerine yapılan araştırmalarda elde edilen veriler insan metabolizmasına dair önemli bilgilere ulaşmamızda yardımcı olmaktadır. Örneğin FGFR3 mutasyonları taşıyan ureteriyal hücre hatlarında ve FGFR3-TACC3 füzyonları FGFR seçici ajanlarına yüksek oranda hassastır. Bu durum bu yönde geliştirilen yeni terapilere yarar sağlayabilecek niteliktedir. Hücre hatları potansiyel olarak pre-klinik çalışmalar için temel veriler sağlamakta kullanılan oldukça iyi araçlardır. Bununla birlikte hücre hatları ile çalışmak, uygun hücre hattının seçimi, çapraz kontaminasyon ve hücre hattının tanımlanması konularında çeşitli zorlukları da beraberinde getirmektedir. Mesane kanseri pre klinik araştırmalarında kullanılan hücre hatları insan, sıçan ve köpekten elde edilebilmektedir (33).

2.6. VİTAMİN D

Metabolizmada ki aktivitelerde regüle edici fonksiyonları ile bilinen vitaminlerden vitamin D' nin kalsiyum metabolizmasında ki rolü büyüktür (34). Bu vitamin, Amerikan Sağlık Enstitüsü'nün (NIH) verilerine göre, et ürünleri, süt ürünleri, bazı bakliyatlar ve yumurtada bol miktarda bulunur. Bunun yanında, güneş ışığı altında deride de sentezlenebilmektedir (35).

Bireylerin Vitamin D düzeyine ilişkin normal değerleri saptamak için serum düzeyinde ki 25(OH)D düzeyine bakılmaktadır. Çünkü aktif form olan kalsitriol 1,25(OH)₂D₃ yarı ömrü 4-6 saat olması ve dolaşımda ki seviyesi 25(OH)D seviyesine göre 1000 kat daha düşük olması nedeniyle ölçüm yapıldığı takdirde değişken sonuçlar verebilmektedir. İnsan popülasyonu üzerinde yapılan araştırmaların kan serum düzeyinde ki ölçüm sonuçlarına göre; 25(OH)D düzeyi 20 ng/mL' den düşük ise vitamin D eksikliği, 21 ile 29 ng/mL arasında ise vitamin D yetersizliği, 30 ng/mL'den yüksek ise optimum düzey (40-60 ng/mL) ve 150 ng/mL'den yüksek ise vitamin D intoksikasyonu olarak tanımlanmaktadır (36).

Vitamin D yağda çözünen bir grup steroid ve bunların ilgili metabolitlerini içermektedir. Doğada, iki büyük Vitamin D formu olan, ergokalsiferol (D2 vitamini) ve kolekalsiferol (D3 vitamini) bulunmaktadır. D2 vitamini, bitkilerde fotokimyasal olarak sentezlenmektedir. D3 vitamini ise, hayvan ve insan derisinde güneş ışığına bağlı olarak, özellikle de 290-315 nm UV-B radyasyon etkisi altında üretilmektedir (37). 1,25(OH)₂D₃ (kalsitriol) D vitamininin biyolojik olarak aktif hormonal formunu oluşturur. Bakınız (Şekil 2-2) (38).

Vitamin D' nin klasik sentez yolu, karaciğer ve böbrekte vitamin D2 ve D3' ün 25 hidroksilaz ve 1 α -hidroksilaz aktivitesiyle ilerlemektedir. İlk olarak, hidroksilasyon karaciğerde meydana gelir ve 25(OH)D₃ üretilir. 25(OH)D₃ sistemik dolaşıma girer ve 12-19 günlük bir yarılanma ömrüne sahiptir. İkinci hidroksilasyon böbreklerde oluşur ve 1,25(OH)₂D₃ (kalsitriol) vitamin D' nin biyolojik olarak aktif hormonal formunu oluşturur. 25(OH)D₃ serum seviyeleri, vücuttaki genel vitamin D miktarını vermektedir. Diyetle alınan veya deride sentezlenmiş vitamin D ile ilişkili, dolaşımdaki 1,25(OH)₂D₃ bağlantılı iki temel enzim görev yapmaktadır. Bunlar, hepatik mikrozomal veya mitokondrial enzim sterol 27-hidroksilaz (CYP27A1) ve renal mitokondriyal enzim 1 α -hidroksilaz CYP27B1' dir (39). Bu hidroksilazlar, sitokrom P450 karışık fonksiyonlu

mono oksidazları olarak bilinen bir protein sınıfına aittir. Son yıllarda makrofajlar, keratinositler, prostatlar ve kolon kanseri hücreleri de dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerinde 25 (OH) D₃-1 α -hidroksilaz (CYP27B1) aktivitesi bildirilmiştir (40,41).

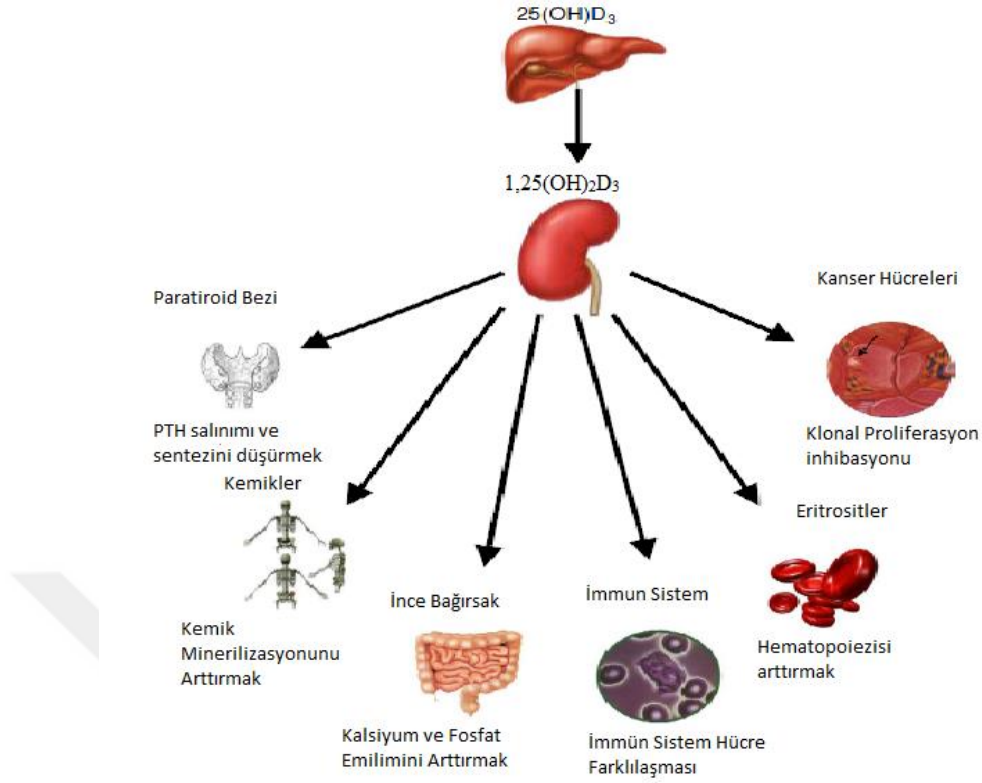
1,25(OH)₂D₃ ' ün çeşitli dokularda lokal olarak üretildiği gösterilmiştir. Hedef dokuların (örneğin, kolon, prostat, meme, akciğer, pankreas) kalsitriolü sentezleyebileceği ve bozabildiği gösterilmiştir. Çeşitli insan kanser türlerinde kalsitriolün lokal üretiminin ve degradasyonunun öneminin olduğu gösterilmiştir (42,43).

Vitamin D ve analoglarının, hücre proliferasyonu ve farklılaşması, apoptoz, anjiyogenez, paratiroid hormon ilişkili peptid salgılanması ve tümör metastazları ile ilişkili çeşitli mekanizmalarda etkisi olduğu bilinmektedir (44,45).

İn vivo ve in vitro yapılan çalışmalarda Vitamin D' nin VDR reseptörü ile bağlanmasının hücre döngüsü, apoptoz ve hücre farklılaşması ile ilişkili genlerin transkripsiyonunu regüle ettiği belirtilmektedir. Bu durum vitamin D' nin kanser tedavisinde etkili bir ajan olabileceğini düşündürmektedir (46,47).

VDR' nin klasik yerleşimi olan kemik, böbrek ve bağırsak yolu dışında lösemi hücreleri ve birçok malign hücre tipi gibi epitel ve mezenşimal hücrelerde yer alması da bu düşüncüyü kuvvetlendirmektedir (44).

Kalsitriol, vitamin D reseptörü (VDR) ve vitamin D yanıt elementlerine (VDRE) bağlı formda fonksiyonlarını göstermektedir. Birkaç transkripsiyon faktörü ile bağlantılı olarak, bu kompleks vitamin D' ye cevap veren genlerin transkripsiyonuna yol açmaktadır. Vitamin D / VDR deregülasyonu nedeniyle ortaya çıkan başlıca hücresel ve moleküler fonksiyonlar arasında kalsemik etkiler, antimikrobiyal etki, doku rejenerasyonu, bağışıklık modülasyonu ile otoantikor üretimi, kas fonksiyonu, steroid etkinliği, epigenetik düzenlenme, immün yanıt, inflamasyon, hücresel proliferasyon, farklılaşma ve apoptoz yer almaktadır (Şekil 2-2)(44).



Şekil 2- 9 : Vitamin D Sistemik Etkisi.

2.6.1. Kalsitriol

Birçok çalışma bize kalsitriol ve türevlerinin anti- proliferatif , pro-apoptotik, hücre göçünü baskılayıcı ve anti-anjiyogenik aktivitesini farklı kanser hücre tiplerinde çalışarak göstermektedir. Ne yazık ki kanser tedavisinde tekli ajanların veya kombinasyonlarının diğer antikanser ajanlarla kullanımında ki başarısızlık ilaç geliştirme ve klinik denemelerindeki çoğunluk tarafından kabul edilen yürütme koşullarındaki prensiplerin başarısızlıklarına takılı kalmıştır.

Araştırmalar 3 olgu arasında toplanmaktadır.

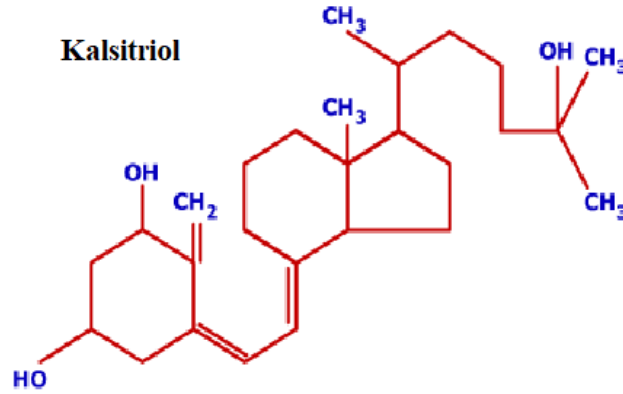
- Hayvan modellerinde kanserojen varlığında oluşturulan tümöral yapıları inhibe ettiği
- Birçok kanser hücresinde VDR reseptörünün bulunduğu
- Kalsitriol ile tedavide kanser hücresinin büyümeden kaçışının varlığının tespiti

1,25D3 Hücreye pasif difüzyonla girer, VDR ye bağlanır, retinoid X reseptörü (RXR) ile heterodimerizasyon yapar. Bu kompleks (Şekil 2-3) yaklaşık 2000' den fazla geni aktive eden Vitamin D cevap genlerini modüle etmektedir. Enzimler de bulunan genetik varyantların kompleks yapısı D3 metabolizmasından, protein bağlanmasından, heterodimerizasyondan ve bununla birlikte birçok gen, Vitamin D hormon sisteminin yol açtığı modülasyon kabiliyeti tarafından yönetilmektedir (48).

2.6.2. Kalsitriolün Anti Kanser Etkileri

- Hücre döngüsü kaçıışı ve p21 ve p27 gibi CDK inhibitörlerinin modülasyonu
- PARP ayrılması ile apoptoza girişte , anneksin bağlanması, artan bax/bcl-2 oranı
- PMARPK (ERK1/2), P-AKT gibi sinyal moleküllerinin baskılanması ve akt ve MEKK-1 in azalmasında rol oynayıcı.
- Kaspaz bağımlı MEK ayrılmasına girişte regülasyon
- Farklılaşmayı indüklemesi
- Anjiyogenezisin inhibisyonu
- Motilite ve invazyonun inhibisyonu
- Sitokin/büyüme faktör üretiminin tümör hücreleri ve stromal hücreler tarafından modülasyonu
- Monosit/makrofaj farklılaşması , T hücre fonksiyonu ve sitokin üretimi gibi durumlardaki etkiside çalışmalar tarafından gösterilmiştir. İmmün fonksiyon ve

inflamasyonda Vitamin D sinyal mekanizmasının etkili oluşu kanser tedavisinde immün sistem güçlendirmesi desteği gittikçe yaygınlaşan bir düşünce olarak yer almaktadır(48,49).



Şekil 2 -10 : Kalsitriolün Moleküler Yapısı

2.6.3. Vitamin D' nin Hücre Döngüsü ve Apoptoz Üzerine Etkileri

Kalsitriol EGFR ekspresyonunu regüle etmektedir. Kalsitriol uygulaması EGF bağlanmasını arttırmaktadır. Kalsitriol ayrıca EGFR kodlayan m RNA degradasyonunu da inhibe etmektedir. Bunun yanında kalsitriol uygulaması İnsülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-I) sinyalini azaltmaktadır. Bu etki IGF-1 bağlanma proteinlerinin artışına bağlıdır, IGF-1 reseptör seviyelerine direkt bağlı olarak büyüme faktörlerinin reseptörden uzak kalma oranına bağlı olarak değişim göstermektedir. Benzer olarak TGF sinyal yolağı reseptör ligand etkilerinin hareketine bağlı olarak kalsitriolün antiproliferatif etkilerinin yürütülmesine EGFR' den bağımsız olarak katkıda bulunmaktadır. Diğer büyüme faktörlerinin yolaklarının inhibisyonu hücreleri EGFR inhibisyonuna duyarlı hale getirmektedir. Bu olasılığı destekleyen durum, artan IGF-1 sinyalinin, EGFR inhibasyonuna direnç göstermesine aracılık etmesidir. İlginç olarak EGF normal fare bağırsağına VDR ekspresyonunu arttırmaktadır (50).

2.7. SİSPLATİN

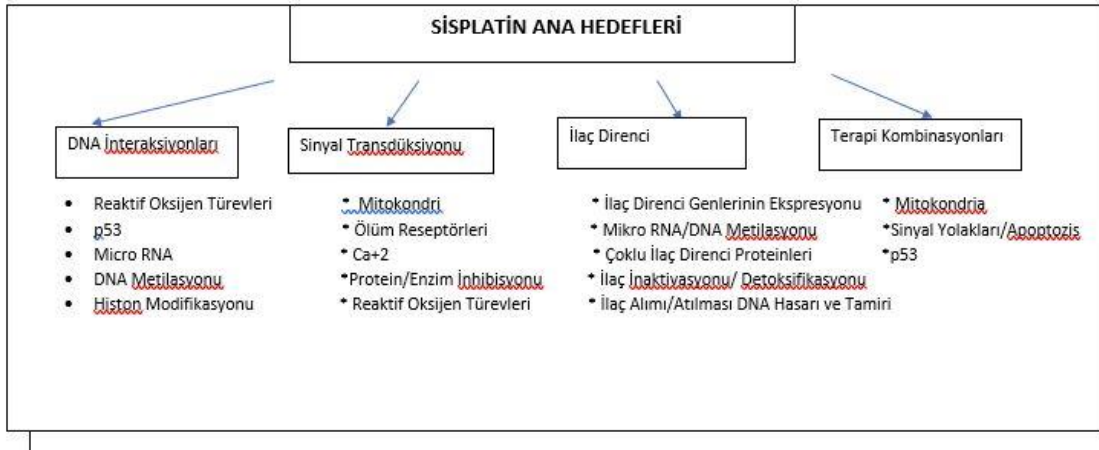
Sisplatin tümör hücrelerinin ölümünü sağlamak için adjuvan tedavide klinik olarak kullanılan platin kompleksleri grubunda yer alan kemoterapötik araçlardan biridir. Sisplatin ile kemoterapi kombinasyonu birçok kanserin tedavisi için mihenk taşıdır. Sisplatin kanser tedavisinde en çok kullanılan potansiyel kemoterapati ajanıdır.

Sisplatinin keşfi cis-[Pt(II)(NH₃)(2)Cl(2)] ([PtCl₂(NH₃)₂] or CDDP), diğer metal bazlı bileşikler ve platin bileşiklerin kanser tedavisinde kullanımı için çok büyük önem taşımaktadır. Birçok platin çeşidi klinik denemelerde test edilmiştir. Bunun yanında karboplatin ve oxaliplatin gibi birkaçı dünya çapında klinik pratikler için kabul edilmiştir. Nedaplatin, oxaliplatin, lobaplatin and heptaplatin gibi türevleri sınırlı olarak klinik kullanımda yer almaktadır. Diğer platin türevleri şu an için klinik avantajı göz önüne alındığında tercih edilmemektedir.

Sisplatin hedef tümör hücresinde ölüme yol açmaktır. Sisplatin geniş açıdan insan malignitelerinde kullanılan bileşenlerdendir. Platin kompleksleri testis, over, mesane, baş boyun, özefagus , küçük ve küçük olmayan akciğer, göğüs, servikal, mide ve prostat kanserleri özellikle Hodgkin's ve Hodgins olmayan lenfomalar, lenfomalar, nöroblastoma, sarkomalar, multiply miyeloma, miyeloma, melanoma ve mesoteliyoma da kullanılmaktadır. Pozitif etkilerinin yanında yüksek oranda toksiktirler. Limitli dozda kullanımının hastalar üzerinde yarattığı etki yönetilebilmektedir. Kanser kemoterapisindeki toksisitenin yol açtığı yan etkilerin yönetilmesi tedavinin başarı oranını yükseltmektedir (68).

2.7.1. Sisplatin' in Etki Mekanizması ve Hedefleri

Sisplatinin sitotoksik olarak in vitro da, apoptozu tetikleyici iki ayrı yolakla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Biri p53 tümör süpresör proteinini içerir. Diğeri ise p53 ilişkili p73 proteinini içerir. Apoptoza doğru sisplatin hasarıyla eşleşme, tamir aktivitesinde uyumsuzluk sağlamaktadır ve yakın zamanlı veriler homolog bütünleşik bir tamir sisteminden söz etmektedirler. Günümüzde genel olarak kabul edilen ilacın sitotoksik etkisinde DNA lezyonlarının tamirindeki bozukluğun dahil olmasıyla ve mismatch tamir aktivitesinin kaybı ile etki göstermesidir ki bu da sisplatin direncinde rol oynamaktadır. Bu durum da antineoplastik terapide ana problemidir (68, 69).



Şekil 2- 13: Sisplatinin Ana Hedefleri

2.7.2. Sisplatin Yan Etkileri

Kanser kemoterapisindeki toksisitenin yol açtığı yan etkilerin yönetilmesi tedavinin başarı oranını yükseltmektedir. Genel olarak, hücre yok edici etkilerinin yanında mide bulantısı ve kusma, kemik iliğinde üretilen kan hücresi sayısında ve platelet üretimi(kemik iliği baskılanması), enfeksiyona verilen yanıtta baskılanmadır. Kullanımında daha spesifik etki olarak böbreğin (nefrotoksisite) zarar görmesi, nöronların zarar görmesi ve işitme kaybı sayılabilmektedir. Ana yönetim prensibi ve stratejileri ise böbrek koruma ve ilaç elaminasyonunun osmotik diüretik kullanılarak damar içi hidrasyon ile böbreğe zarar vermeyecek bileşenler ile sağlanmasıdır. Sodyum tiosülfat ve plazmaferezis, hemodiyaliz desteği olsun ya da olmasın, klinik labratuvar verilerine bağlı olarak tercih edilebilmektedir. Sonuç olarak yan terapiler antiemetikler ve hematopoetik koloni stimülasyon faktörleri desteği tercih edilmesi gerekli görülmektedir.

Sisplatin aşırı doz alımına bağlı etkilerin bilinmediği hatırlanmalıdır. Spesifik antidotu bulunmamaktadır. Bunun yanında erken aşamadaki çalışmalar doz aşımına bağlı terapatik stratejiler için ışık tutmaktadır.

Sisplatin (CDDP) pediatrik solid tümörleri tedavi etmek için de kullanılır. Çocuklarda doz aşımına bağlı sınır işitme kaybıdır. Birçok geniş varyasyon, hastalardaki farklı tedavilere bağlı olarak gösterilmiştir. Her iki haftada bir verildiğinde sisplatinin işitme kaybına yol açtığı gösterilmiştir. Otokoruyucu ajanların kanser tedavisi harici gerekliliği ortadadır.

Sisplatin nefrotoksiktir. Yakın zamanlı kanıtlar sisplatinin, direk nefrotoksisitede mediatörler olan T lenfositleri ile inflamatuvar patogenezisdeki rolünü kanıtlamaktadır. T lenfositlerini hedeflemenin, sisplatinin kanser hastalarındaki tedavisinin yan etkilerini azaltıcı etki sağlayabildiği düşünülmektedir. Sıçanlarda sisplatin, akut renal bozulmayı ve hepatik sitokrom P450 i seçici enzim olarak down regülasyonunu indüklemektedir. Bu enzimin inhibisyon mekanizması sülfadril gruplarıyla etkileşim ile meydana gelmektedir (70).

Kardiyotoksisite sisplatin tedavisi ile ilişkili olaylardan biridir. Sisplatin ile yapılan antineoplastik kemoterapi elektrokardiyogramda QT interval ve farklı seviyede emesis de alterasyonlar meydana getirebilmektedir. QT intervalda meydana gelen sinerjistik etkiler olduğundan beri etkili bir antiemetik kullanımı tedavide uygun görülmemektedir. Bununla birlikte anti kanser ilaçların farmakolojik özelliklerinde riskin düşürülmesi genel sisplatin uygulaması için yararlanabilir görülmekte ve bu durum kongenital QT sendromu yaşayan bireyler için hayati bir durum oluşturmaktadır.

Sisplatinin hepatotoksisiteye etkisine düşük derecede önem gösterilmiştir. Bu konuda az sayıda çalışma bulunmaktadır. Sıçanlarda sisplatin lipid peroksidasyonunu arttırdığı ve dokunun thiol statüsünü enzimatik antioksidanlardaki değişimle birlikte değiştirdiği gösterilmiştir. Glutasyon ve glutasyon redüktaz seviyeleri sisplatin terapisinden önemli derecede düşmektedir, bunun yanında glutasyon peroksidaz, gamma-glutamil transpeptidaz ve katalaz önemli derecede artış göstermektedir. Yine de glutasyon-S-transferaz aktivitesi sisplatin ile değişmemektedir. Sisplatin uygulaması sitokrom P450 seviyesini, sitokrom b5'i düşürürken yükseltir. Bu lipid peroksidasyonundaki yükseliş ile birlikte enzimatik antioksidan seviyelerindeki değişim, bu enzimlerin serbest radikaller tarafından indüklenen oksidatif stresle mücadelesinde önemli rol oynamaktadır.

Sisplatin kaynaklı yan etkilerin üstesinden gelebilmek için ilaç direnci gibi ve düşük oral biyo ulaşılabilirlik, platin bazlı ilaçların karboplatin den türetilmesi ve oksaliplatin den satraplatine ve pikoplatin ve multinükleer platin kompleksi BBR3464 (TRIPLATİN) gerekli görülmektedir. Bunun yanında in vitro ve in vivo çalışmalar beklentilerin altında kalmaktadır. Olası açıklamaların içerikleri: in vivo da meydana gelen aktif bölgelerin ; alım ,verimli akış veya hücre içi trafik ve diğer olası intrinsik mekanizmaları içeren ve in vivoda platin türevli kemoterapötik ilaca dair kazanılan

direncin, tümör dokularında ki yetersiz difüzyona dayalı durumda içeren olayların platin komponentleri ile tedavide önemli limitsel basamaklar oluşturabildiği ortadadır.

Platin analoglarına dair yapılan araştırmaların odaklandığı iki strateji vardır. Platin komponentleri ile tedavi edilmeyen tümör tiplerinin platin terapisine etkisinin başka alandaki çalışmalar yeni yöntemler bulunana dek arttırılması hedeflenmektedir. Mevcut tedavi protokolleri tümör kontrolünde cerrahi ve kemoterapi alımını içersede hastalar relapsa girebilir ya da sistemik başka bir hastalık geliştirebilmektedirler. Randomize denemeler hayatta kalma oranını arttırabildiğini göstermektedir. Yeni sitotoksik ilaçlar ve yeni küçük moleküllere girişte, yüksek riskli hastaların terapisine yönelik optimal kullanım çalışmalarına ihtiyaç bulunmaktadır (68).

2.7.3. Sisplatin, Mesane Kanseri ve İlaç Direnci

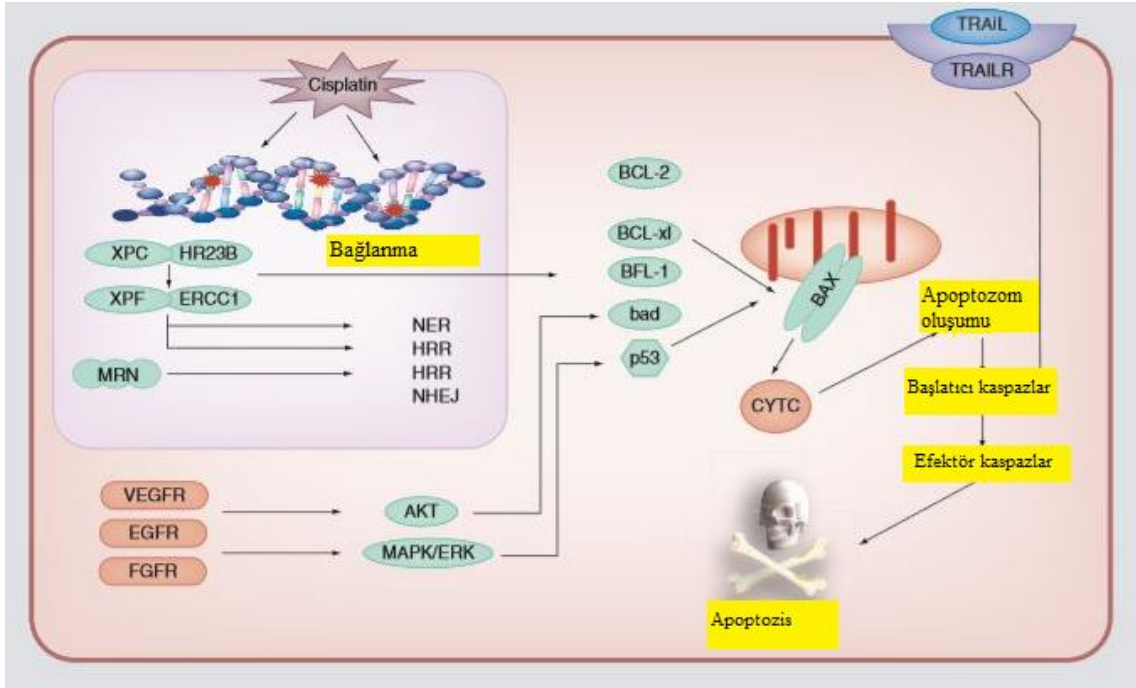
Genel olarak incelediğimizde ilaç direncine sebep olan etkilerin altında aşağıdaki sebeplerin etkili olduğunu görmekteyiz;

- Bozulmuş membran transportu
- İlaça epigenetik açıdan gösterilen cevaplarda ki değişkenlikler
- DNA tamir mekanizmasında ki değişiklikler
- Hedef moleküllerde ki bozulmalar
- Metabolik etkiler
- Büyüme faktörleri (71)

Sisplatin mesane kanserinde özellikle üretelilyal hücre karsinomlarını tedavi etmek için kullanılan metotreksat, vinblastine, adriamisin ve sisplatin (MVAC) veya gemsitabin, sisplatin (Gem-Cis) ilaç kombinasyonlarının bir parçası olarak kemoterapötik rejimlerin kilit bileşenidir. Gem-Cis, MVAC' e oranla benzer etkiye sahip fakat toksisitesi daha düşük tedavi aracıdır. Sisplatin DNA, RNA ve proteinler ile etkileşime girebilir. Bununla birlikte hücrel olarak birincil hedefi DNA' dır. DNA hasarına sebep olarak hücreyi apoptoza sürüklemektedir.

In vitro çalışmalara bakıldığında, sisplatin dirençli hücre modelleri oluşturulmuş ve bu dirençli hücreler ana hatları ile karşılaştırıldığında farklılaşmış morfolojik görüntü vermekte olduğu, çift membran ve pinositik veziküllere sahip olduğu gözlemlenmiştir.

Sisplatin dirençli hücreler ilaca maruz kalmanın ardından hücre içi ilaç birikimini azaltmaktadırlar. Sisplatin alımına bakır taşıyıcı protein Ctr1 aracılık ederken, dışa akış iki bakır taşıyıcılar olan p-tipi adenosin trifosfataz ATP7A ve ATP7B tarafından gerçekleştirilir. Over kanseri ve bazı kanser türlerinde bu proteinlerin ekspresyonlarında ki değişimler ilaç direncinde rol oynamaktadır.



Şekil 2 14 : Sisplatin Etkileşimi. CYTC: Sitokrom C; EGFR: EGF reseptörü; ERCC1: Eksizyon onarım çapraz tamamlayıcısı; FGFR: FGF reseptörü; HRR: Homolog rekombinasyonel onarım; MRN: MRE11 / Rad50 / Nbs1; NER: Nükleotid eksizyon onarımı; NHEJ: Homolojik olmayan birleşme; TRAIL: TNF ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand; TRAILR: TRAIL reseptörü; VEGFR: VEGF reseptörü

Sisplatinin neden olduğu DNA hasarının veya bunun sonucunda ortaya çıkan apoptotik sinyallerin tespit edilmesinde ve onarılmasında yer alan birçok proteinin, sisplatine dirençli mesane kanserinde düzensiz hareket ettiği gösterilmiştir. Bunlara EGFR, VEGFR ve FGFR gibi büyüme faktörü reseptörleri ve XPC-HR23B kompleksi, XPF-ERCC1 kompleksi ve MRN kompleksi gibi DNA hasarını tanıyan ve onarabilen kompleksler dahildir. CYTC' nin mitokondriden salınımını düzenleyen Bcl-2 aile üyeleri (bcl-2, bcl-xl, bfl-1 ve bad) de sisplatin direncinin geliştirilmesinde rol oynamıştır. Ayrıca, Akt ve MAPK / ERK kinazları gibi büyüme faktörü sinyalleri ile aktive olabilen ve sisplatin direncine katkıda bulunan hücreler arası hayatta kalma

faktörleri de gösterilmiştir. Ekstrinsik apoptotik yolağın (burada TRAILR tarafından temsil edilen) aktivasyonunun, sisplatinin dirençli hücrelerde sitotoksik etkilerini güçlendirdiği gösterilmiştir (Şekil 2-7) (72).

Sisplatin ile uzun süreli tedavinin, histonların ve DNA' nın metilasyonunda değişikliklere neden olduğu bilinmektedir. Histon deasetilaz inhibitörü trikostatin A' nın, muhtemelen DNA' ya zarar veren ajanlara daha kolay erişebileceği daha rahat bir kromatin durumu ile sonuçlanan histonların deasetilasyonu ile ürettiriyal karsinoma hücrelerini sisplatine duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir (73). Bununla birlikte, epigenetik olayların, birçok genin ve mikroRNA' ların (miR'ler) ekspresyonundaki değişikliklerin altında yatan ve ayrıca DNA' nın sisplatine erişimini azaltmaktan daha karmaşık bir şekilde sisplatine dirençli fenotipe katkıda bulunma olasılığı yüksektir (72).

2.7.4. P-gP Proteinini

Genellikle kullanılan antineoplastik ajanlara karşı gösterilen direncin muhtemelen en önemli formları, sitotoksik moleküllerden kaynaklı intraselüler ilaç konsantrasyonunu hücre öldürücü seviyenin altında tutma görevini üstlenen bir grup membrane proteini tarafından sağlanmaktadır. Bu ATP-bağımlı çoklu ilaç taşıyıcıları çeşitli ATP Binding Cassette Proteinleri superaillesine bağlıdır ve AIDS ve malaria gibi çeşitli enfeksiyon hastalıklarında dirençten sorumludurlar. Bu proteinler farmakolojik bileşenlerin absorpsiyonu, dağılım ve atılımını düzenlemektedirler. ABC taşıyıcılarını kodlayan yaklaşık 48 gen vardır. ABC proteinleri ABCA ve ABCG' ye doğru 7 alt sınıfa ayrılmaktadır ve bunlar bölgeye ve sekans homolojisine göre genomik organizasyona bağlı olarak fonksiyon gösterirler. P-glikoprotein kodlayan (P-gp;MDR1, ABCB1) MDR1 geni fosforile olmuş ve glikozillenmiş 1,280 aminoasitlik 170 -kDa' luk protein, MDR ilişkili klinik transportta en geniş incelenmiş mekanizmadır. MDR-ilişkili protein 1 (MRP1,ABCC1), mitoksantron direnç proteini (MXR1/BCRP,ABCG2, ABCB4(MDR3), ABCB11 (sister P-gp veya BSEP)proteinleri gibi ABC ailesine ait başka transport elemanları da tanımlanmıştır. Bu elemanlar sırasıyla hepatik fosfotidil kolin ve safra asit salınımı ve çeşitli ilaçların transportuna katılırlar. MRP3 ve MRP5 organik konjugat ve nükleositler MDR proteinlerini diğer memeli transport elemanlarından ayırt edici ilginç özellikleri yüksek oranda substratı ayırt etmeksizin transfer etmeleridir. Seçici (klasik) transfer proteinleri ile karşılaştırıldığında, çoklu ilaç

taşıyıcıları, benzersiz komponentleri yönetmesiyle ana olarak hidrofobik komponentlerden oluşan geniş sayıda yapısal bölümü transloke ederler ki bu da ilişkili olmayan çeşitli kimyasal komponentler ve MDR fenotipi ile oluşan çapraz direnci açıklamaktadır. MDR proteininin yüksek ekspresyonunu taşıyan tümörler de (hepatomalar, akciğer veya kolon karsinoması vb.) sıklıkla intrinsik direnç gösterirler. MRP ailesi hidrofobik anyonik konjugasyonlarda ve yüksüz hidrofobik ilaçları çıkartma da ana taşıyıcı araç iken P-gp geniş hidrofobik, yüksüz ya da kısmen pozitif yüklü komponentleri transfer etmektedir. Terapötiklerin ve toksinlerin yokluğunda P-gp' nin fizyolojik fonksiyonu koruyucu bir rol içermektedir. Farede yapılan Knock-out gen çalışmaları MDR proteinlerinin hücreyi ksenobiotiklerden korumada bir rol oynadığıdır. MDR -ABC proteinlerinin doku düzenlenmeleri çeşitlidir. P-gp' nin tespiti genellikle zordur çünkü düşük düzeyde eksprese edilir fakat absorpsiyon ve sekresyonu içeren dokularda ve (böbreğin proksimal tübüllerinde yer alan epitel hücrelerinde, kolon ve jejunumun süperfasiyal çeperlerinde, hepatositlerde, pankreatik küçük duktul epitelinde, adrenal medulla ve kortekste ve immun hücrelerin çeşitlerinde muhtemelen ilaç ve toksinleri kemik iliğinden uzaklaştırma fonksiyonuyla da her yerde bulunmaktadır. İfadesi bireyler arasında değişmektedir ve hem genotipik özelliklerin hem de genel metabolik / çevresel koşulların fonksiyonel bir ifadesidir; bunlar ısıya maruz kalma, ışınlama, genotoksik stres ve inflammatuar uyaranları ile sitokinler ve büyüme faktörlerini içerebilir. P-gp aracılı ilaç taşınmasının antihipertansif prazosin ve progesteron tarafından uyarılabildiği gösterilmiştir (71,72).

2.8. P53 Proteini ve Mesane Kanseri

P53, insan kanserlerinde en yaygın mutasyona uğramış tümör süpresör gendir ve p53' ün kaybı, apoptotik sinyalleme hatası ve hücre döngüsü kontrol noktası düzenlemesinin eksikliği de dahil olmak üzere çeşitli istenmeyen fenotipik özelliklerle ilişkilidir (74).

P53' teki mutasyonların birçok kanser tipinde sisplatin direnci ile de ilişkili olduğu görülmüştür ve mesane kanserinde de kötü prognozla ilişkilendirilmektedir (75,76). Testis kanseri hücrelerinde, p53' ün siRNA ile aşağı regüle edilmesinin sisplatin direncinde artışa yol açtığı gösterilmiştir (77). Sisplatinin apoptotik etkisi, p53 wild tip ve mutant üreteriyal karsinoma hücre hatlarında çalışılmıştır (78). P53' ü kaybetmiş veya p53 geninde mutasyon taşıyan tümörlerde, wild tip p53 ekspresyonunun

yeniden oluşturulması, antiapoptotik fenotipin tersine çevrilmesi ve kemoterapötik duyarlılığının geri kazanılması için olası bir strateji olarak incelenmiştir. Wild tip p53'ün adenovirüs aracılı aşırı ekspresyonunun, p21 ve Bax' ın artan p53 aracılı ekspresyonu ile birlikte sisplatin dirençli mesane kanseri hücrelerinde, ana hatlarına kıyasla hücre döngüsü durması ve apoptoza neden olmada çok daha etkili olduğu gösterilmiştir (72,79).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. MATERYAL VE METODLAR

3.1.1. MATERYALLER

Mesane Hücre Hattı (ECV-304)

Mesane Hücre Hattı (T24)

Kontrol Hücre Hattı (HUVEC)

DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)

Fetal Bovine Serum (FBS)

Pen-STREP

Trypsin

EDTA

DMSO

İzopropanol

MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide)

Fenol indikatörü içermeyen high-glucose white DMEM

Petri Kapları

Flasklar

Pipet Uçları 1-10µl; 10-100µl; 100-1000µl ve 0,1-10µl; 2-20µl; 20-200µl

Ethanol (Merck)

Methanol (Merck)

Kalsitriol (Sigma)

Sisplatin (Koçak Farma-10mg/20ml)

3.1.1.1. ÇÖZELTİLER

***Komplet Ortam;**

- %10 Fetal Bovine Serum
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
- %1 Penisilin Streptomisin

***Trypsin-EDTA 0,25%**

50 ml distile suya:

- 1 tablet PBS
- 0.2 gr EDTA
- 0.25 gr Trypsin

eklenerek 100 ml'ye tamamlanmış ve pH değeri HCl ile 7.4 olarak belirlenmiştir.

Filtrelenmiş ve -20°C sıcaklıkta saklanmıştır.

***Kalsitriol**

Kalsitriol (Sigma), 10 µg konsantrasyonunda, moleküler ağırlığı 416.64 (Dalton), hacmi 2.4 mL, molaritesi 10 µmol'dür. Bu stok konsantrasyon HPLC kalitesinde %99' luk filtreden geçirilmiş 2,4 ml etanol içerisinde çözülerek 10.000 nM ana stok oluşturulmuş ve bir kısmı alikotlanmıştır. Deneylerde kullanmak üzere ışıktan muhafaza edilerek ara stoklar oluşturulmuştur. Deneyler boyunca tüm kalsitriol stokları ve solüsyonları- 20°C' de saklanmıştır.

***MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) Solüsyonu:**

25 mg MTT

5 ml PBS

Toz halindeki MTT, PBS içerisinde 5 mg/ml konsantrasyonunda çözülerek stok hazırlandı.

3.1.1.2. KİTLER

Santa- Cruz MDR-1 sc-73354

EXBİO Apo FlowEx Annexin V- FITC

3.1.2. GEREÇLER

Su Banyosu

Azot tankı (Taylor-Wharton)

CO₂ 'li inkübatör (Nuaire-Nu 5500 E)

Neubauer Lamı

Çalkalayıcı Bio-Rad

Isı Bloğu

Otoklav

Etüv

Ayarlanabilir Mikropipet setleri (Thermo): 1-10 mikrolitre, 10-100 mikrolitre, 100-1000 mikrolitre, 0,1-10 mikrolitre, 2-20 mikrolitre, 20-200 mikrolitre)

Buz Makinası

ELISA mikrolaka okuyucu (Rayto)

Hassas terazi (Denver Instrument)

Inverted mikroskop (Olympus)

Işık mikroskobu (Olympus)

Laminar flow Kabin-Class II BSC

pH metre set (HANNA Instrument)

Soğutmalı santrifüj (Hettich Rotina 46 R)

Soğutmalı santrifüj (Universal 32)

Vakumlu cam sterilizasyon düzeneği (Millipore)

Vorteks (Velp Scientifica)

Flow Sitometri Cihazı: NovoCyte

+4 °C Buz Dolabı (Bosch)

-20 °C Derin Dondurucu (Lec -20)

-80 °C Derin Dondurucu (Bosch)

3.1.3. METODLAR

3.1.3.1. Hücre Kültürü

Çalışmamızda kullanılan T24 ve ECV-304 hücre hatları mesane kanseri hücre hatlarından ve Amerika menşeli hücre sağlayıcısı olan ATCC firmasından sağlanmıştır. Sağlıklı kontrol ise ATCC tarafından temin edilen HUVEC hücre soyuna aittir. T24 hücre hattı, epiteliyal kökenli olup mesane kanserli bireyin tranzisyonel karsinoma hücresidir. ECV-304 yeni doğan umbilikal kord kaynaklı epiteliyal hücre hattıdır. HUVEC hücre hattı ise umbilikal ven/damar endotelinden elde edilen sağlıklı insan hücre hattıdır.

3.1.3.2. Hücre Besi Yerlerinin Hazırlanması

500 ml kültür ortamı içerisine 50 ml steril FBS ve 5 ml Penisilin Streptomisin eklenerek komplet kültür ortamı elde edilmektedir.

3.1.3.3. Hücrelerin Çözündürülmesi

Donmuş olarak gelen hücreler ve kültür ortamı 37°C su banyosunda ısıtıldı. Hücreler erimeye yakın bir sıcaklıkta komplet kültür ortamı ile toplanıp petri kaplarına ya da flasklara (hücre kültür şişeleri) ekildi.

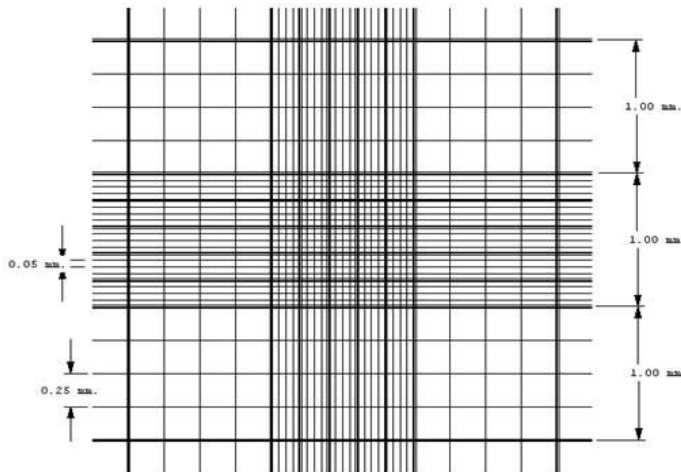
3.1.3.4. Hücrelerin Pasajlanması

Kültüre edilen hücrelerin yoğunluğu %70-80 aralığına ulaştığında hücrelerin pasajlanması yapıldı. Bu amaçla önce kültür ortamı uzaklaştırıldı, ardından steril PBS ile bir defa yıkandı. Daha sonra PBS tamamen uzaklaştırılıp Tripsin-EDTA solüsyonu ile hücrelerin birbirlerinden ve flasktan ayrılması sağlandı ve kültür ortamı ile bir falkon tüpünde toplandı. Son aşamada, falkon tüpüne toplanan bu hücre süspansiyonundan bir miktar alınıp (10 mikrolitre) hücre sayımı yapıldıktan sonra, uygun miktardaki hücreler uygun hacimde kültür ortamı içeren flasklara pipet yardımıyla ekildi ve pasajlaması tamamlanan bu yeni kültür, pasaj numarası etiketlenerek çoğalmak üzere inkübatöre kaldırıldı.

3.1.3.5. Hücre Sayımının Yapılması

Trypan Blue Boyaması ile Hücre Canlılığı Testi

Hücre sayım işlemi için 1xTripsin-EDTA çözeltisi flasklara eklenerek hücreler süspanse hale gelinceye dek yaklaşık olarak 1-2 dk 37°C de inkübe edildi. Kültür kabının içeriği toplandı ve 1500 rpm' de 10dk. santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra pellette bulunan hücreler 1 ml kültür ortamı ile homojenize edilerek hücre sayımı gerçekleştirildi. Hücre sayımı %0,4' lük Trypan Blue/PBS çözeltisi ile *Neubauer-Improved* lamında mikroskobik olarak yapıldı (Şekil 3-1).



Şekil 3-2: Neubauer-Improved Laminin Mikroskop Altında Görünümü. Hücre sayımlarında yalnızca köşelerdeki büyük içleri beyaz kareler baz alınmıştır.

3.1.3.6. Hücrelerin Dondurulması

Tripsin-EDTA ile falkonda toplanmış hücreler 900 µl alınıp cryo-tüplerin içerisinde 100 µl DMSO ile karıştırıldı. Kenarları izopropanol ile doldurulmuş bir kaba yerleştirilip -80°C’de 1 gece saklandı. Daha sonra bu tüpler sıvı azota alındı.

3.1.3.7. Hücrelerin Çoğaltılması

Her iki hücre hattı da, DMEM + 10% FBS + 1% Pen-STREP (komplet ortam) içeren ortamda büyütülmüş ve çoğaltılan hücreler MTT işlemlerinde kullanılmak üzere 24, 48, 72 saatlik deney düzenekleri oluşturulmuştur.

3.1.3.8. MTT Testi

MTT testi hızlı, kolorimetrik ve kantitatif bir yöntem olarak tanımlanmıştır. Kültür ortamındaki mitokondrial aktivitesi devam eden canlı hücrelerin kantitasyonunu sağlamaktadır. En sık kullanım alanı sitotoksik ajanların etkinliğinin test edilmesidir. MTT (3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5 diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue) suda çözünen bir tetrazolium tuzu olup fenol kırmızısı içermeyen kültür ortamı veya tuz solüsyonlarında hazırlandığında sarımtırak bir solüsyon oluşturmaktadır. Tetrazolium halkasının mitokondriyal dehidrogenaz enzimlerince parçalanması sonucu MTT reaktifi mor renkli formazana dönüşmektedir. Bu dönüşüm canlı hücrelerin mitokondrileri aracılığı ile olmaktadır. Oluşan bu formazan kristalleri izopropanol veya DMSO (dimetilsülfoksit) gibi başka bir çözücü yardımı ile çözünebilmekte, oluşan renk reaksiyonu spektrofotometrik olarak okunup kantite edilebilmektedir. Oluşan kristaller DMSO ile çözündürülerek oluşan mor renkli çözeltinin multiplak spektrofotometre kullanılarak, 620 nm referans dalga boyuna karşılık 560 nm’ da absorbans ölçümü yapılmaktadır. MTT canlı hücrelerin mitokondrilerinde ki aktif enzimler ile parçalanacağından elde edilen absorbans değerleri canlı hücre oranlarıyla ilgili bilgi vermektedir (80).

Hücre grubunun in vitro sitotoksik etkisi için absorbans değerleri kullanılarak aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\% \text{ Sitotoksosite} = 1 - [(As/Ac) \times 100]$$

As: Örneğin (Uygulama grubu) absorbansı

Ac: Kontrol grubunun absorbansı

3.1.3.9. MTT Yöntemi ile Sitotoksitenin İzlenmesi

MTT yöntemi ile T24, ECV-304 mesane kanseri hücre hatları ve kontrol olarak kullanılan HUVEC hücre hattında optimum sisplatin ve vitamin D anti-proliferatif dozu belirlemek amacıyla belirlenen deneme dozları kültür ortamına 24 saat sonra eklendi ve 24, 48 ve 72 saat sonra deney sonlandırılarak MTT deney protokolüne geçildi. Bu işlem ardından belirlenen en uygun dozlar kombine olarak çalışılarak sitotoksik değerlendirmesi yapıldı.

3.1.3.10. MTT Deney Protokolü

- MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) PBS içerisinde 5 mg/ml konsantrasyonunda çözülerek stok hazırlandı.
- Deney sırasında hazırlanan MTT stok çözeltisinden 10 µL alınıp, 100 µL kültür ortamı içeren 24-48-72 saat sürelerinde sonlandırılacak olan deney setlerine eklendi.
- MTT reaktifi konulan kültür kabı 37°C' de 3-3,5 saat arası bekletildi. Bu süreçte mikroskopta kontrol edilerek formazan kristallerinin oluşumu gözlemlendi.
- Daha sonra hücrelerin üzerindeki ortam uzaklaştırılarak kuyucuklara DMSO ilave edilerek 3-5 dk. bekletilerek homojen olmasına dikkat edildi.
- Örneklerin absorbans ölçümü, 620 nm referans dalga boyuna göre 560 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak Rayto mikroparka okuyucuda gerçekleştirildi.

3.1.3.11. P-gp ANALİZİ

Tek bir sitotoksik ilaca direnç gösteren hücreler, farklı yapıları ve hücresel hedefleri olan çok çeşitli ilaçlara çapraz dirençli hale gelebilir. Bu duruma çoklu ilaç direnci (MDR) denmektedir. MDR proteinleri (MDRs), ABC adlı yüksek oranda korunmuş bir üst ailesinin taşıma fonksiyonunu yerine getiren üyeleridir. Mdr-1 geni ABCB1 olarak bilinir ve insan kromozomunda 7q21.12'de bulunmaktadır.

Kullandığımız kit Santa- Cruz MDR-1 sc-73354 koduna sahiptir. Kit aynı zamanda fonksiyonel deneylerde kullanılmakta ve P-glukoprotein'in dışa atım aktivitesindeki inhibasyonu tayin edebilmektedir. Analiz edilecek hücreler 1 X PBS ile yaklaşık 10 milyon hücre/ml içerecek şekilde hazırlanmış ve kitede belirtildiği üzere boyama işlemine geçilmiştir. 10dk'lık inkübasyon sonrası flow-sitometride ölçüme alınmıştır.

3.1.3.12. Apoptoz Analizi

Flow Sitometri ile EXBİO Apo FlowEx FITC kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.1.3.13. EXBIO ApoFlowEx FITC Kiti

Apoptotik aktiviteyi ölçümlemek üzere kullanılan bu kit içeriğinde 3 farklı solüsyon içermektedir. Solüsyonlardan Anneksin V tampon çözeltisi kit içeriğinde 10X olarak yer alır. Çalışma öncesi 1 X' lik düzeyi örnek başına 100 mikrolitre olacak şekilde ayarlanmaktadır. Bunun dışında Anneksin V ve Propidium İyodür solüsyonları da kit içinde yer almaktadır. PBS içerisine alınan hücre hatları santrifüj yardımıyla PBS den uzaklaştırılır. Daha sonra 1X Anneksin V Buffer yardımıyla yıkanarak PBS uzaklaştırılması tamamlanır. En son aşama olarak Anneksin V ve Propidium İyodür 5' er mikrolitre olmak üzere örnek başına muamele edilip karanlık ortamda 15 dakika inkübe edilmektedir. Daha sonra örnekler Anneksin V Buffer ile yıkayıp Flow Sitometri cihazında ölçüm yapılmaktadır. Anneksin V-FITC bağlantısı yapan hücreler erken apoptotik hücreler olup, Anneksin V ve Propidium İyodür ile bağlantı yapan hücreler geç apoptozu ve nekrotik hücreleri ifade etmektedir. Propidium İyodür ise nekrotik hücreleri boyamaktadır. Canlı hücrelerde ise her iki bağlanmada gerçekleşmemektedir.

3.1.4. Ölçüm ve İstatistiksel Analiz

MTT, P-gp ve Anneksin V-PI değerleri GraphPad Prism 5.04 Software kullanılarak, unpaired Student-T test ile istatistiksel açıdan değerlendirildi. Yapılan moleküler docking çalışmasında, kalsitriol ve cis-platin moleküllerinin p53 proteini karşında protein etkinlikleri HEX 8.0.0 programı kullanılarak hesaplandı. MTT, Annexin-V, PI ve P-gp grafikleri, GraphPadh Prism 5.04 Software ve NovoExpress 1.3.0 yazılımı kullanılarak değerlendirilmiştir.



4. BULGULAR

4.1. MTT Test Bulguları

4.1.1. MTT Testi İle Optimum Sitotoksik Doz Tespiti

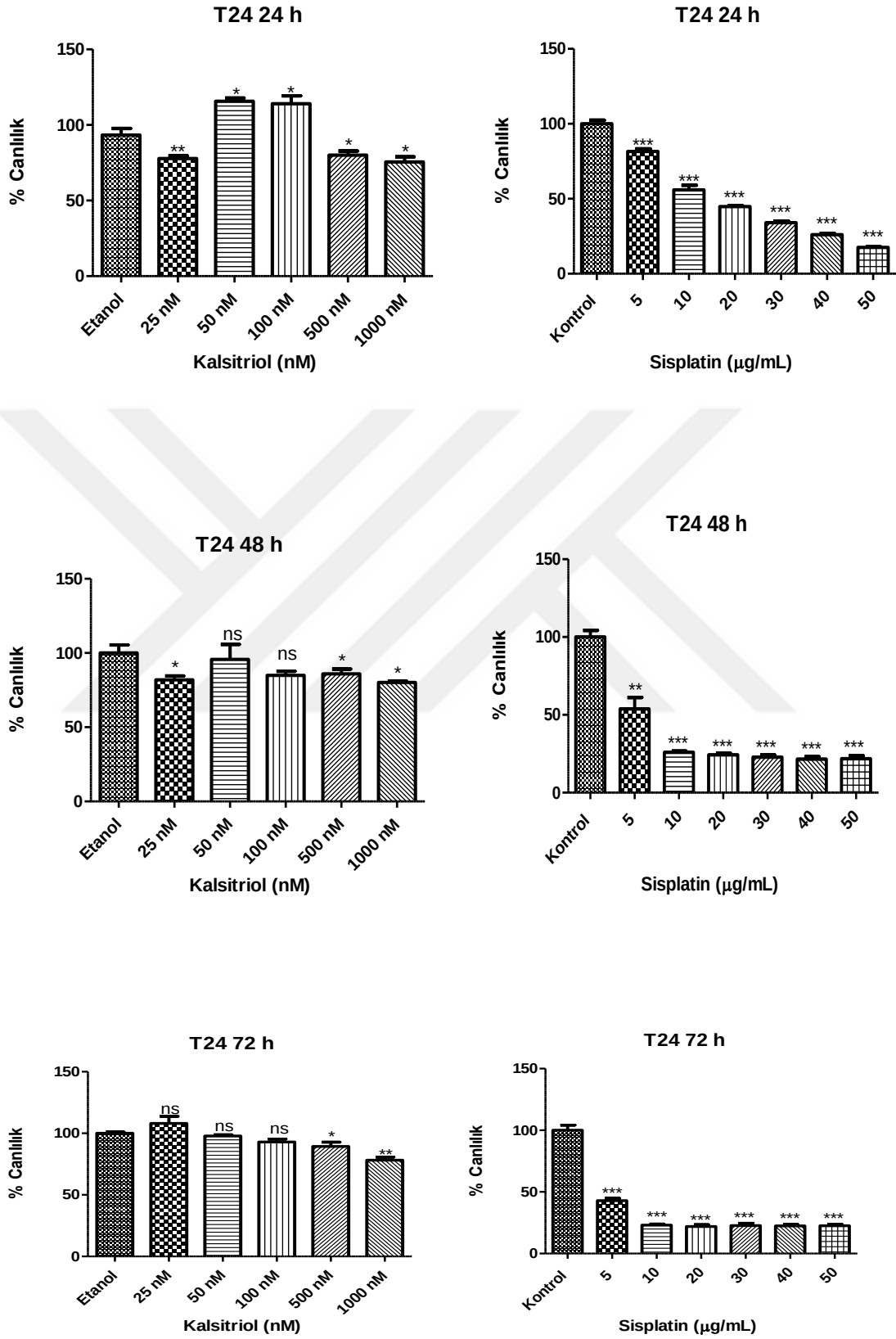
T24, ECV-304 ve HUVEC hücre hatları 24 saatlik kültür sonrası, farklı dozlarda hazırlanan kalsitriol (25nM, 50 nM, 100 nM, 500 nM, 1000 nM) ile muamele edilerek 24, 48 ve 72 saatlik hücre kültürleri yapıldı. Sisplatin için de 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml'lık dozları aynı şekilde 24, 48 ve 72 saatlik hücre kültürüne alındı. Her bir hücre hattı ve her doz için 3' er adet örnek oluşturuldu. Kalsitriol ve sisplatin için çalıştığımız hücre hatlarında optimum doz tespiti yapmak için MTT deney prosedürü uygulanarak sitotoksik etki değerlendirmesi yapıldı. Ardından kalsitriol için antiproliferatif açıdan en etkin olduğu düşünülen iki farklı doz (25nM, 500nM) ve sisplatinin optimum dozu ve bir alt ve bir üst belirlenen sınırlarının (2,5µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml) kombinasyonları MTT deney protokolü uygulanarak sitotoksik etki değerlendirmesi yapıldı. Her bir hücre kültürü 540 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüme tabii tutuldu. Canlılık yüzde grafikleri ve p değerleri aşağıda verildi. (Bkn.; Tablo 4-1)

Tablo 4 9: T24 MTT Sonuçları Anlamlılık değerleri. Ns: Anlamlı değil. $0.01 \leq p < 0.05$ istatistiksel anlamlılık. $0.001 \leq p < 0.01$, ileri düzeyde istatistiksel anlamlılık. $p < 0.001$ çok ileri istatistiksel anlamlılık. $0.05 \leq p < 0.10$ anlamlılık eğilimi (Sınırdan anlamlılık) $p > 0.10$ fark tesadüften ileri gelmiştir (istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır.).

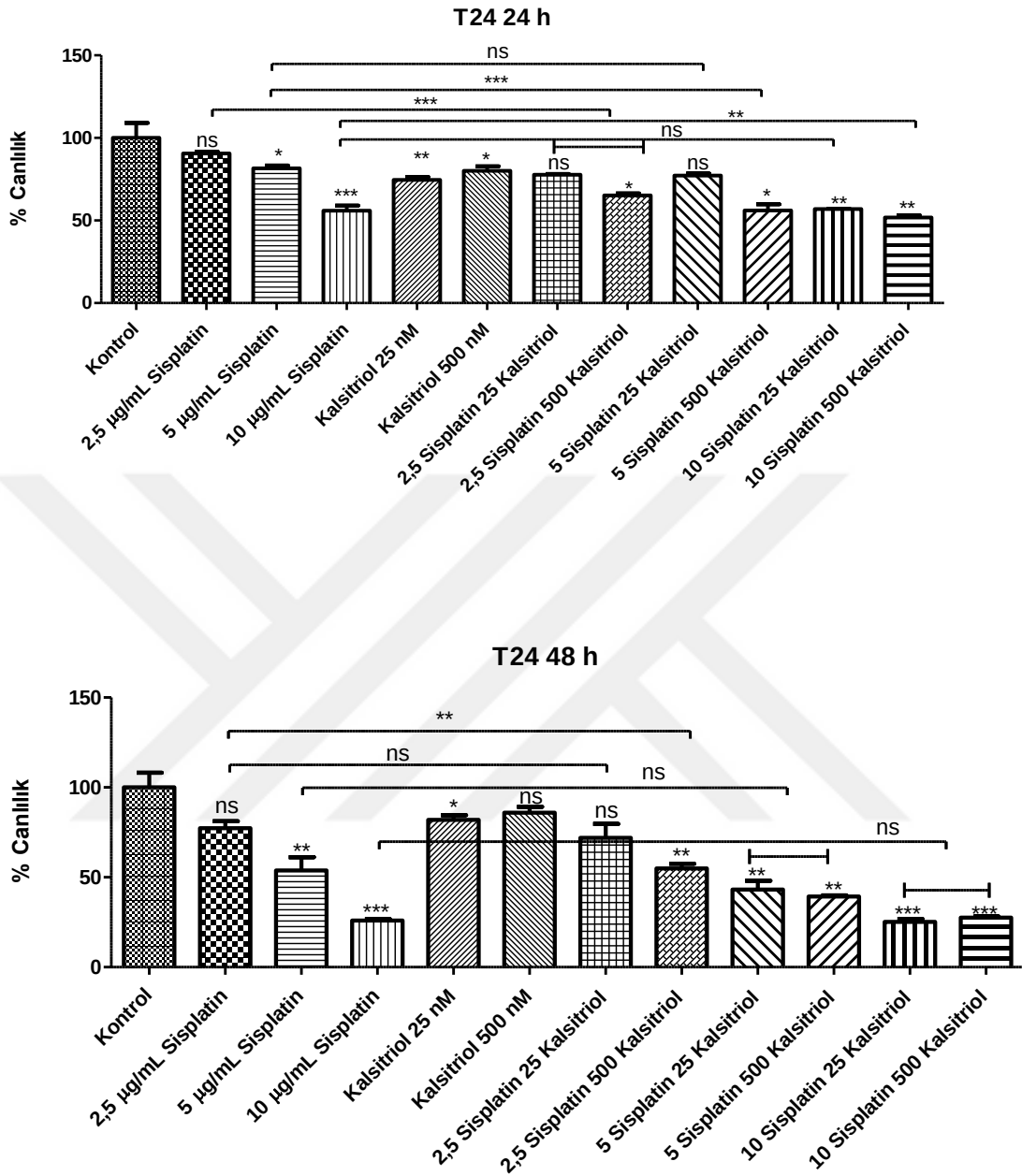
T24 KALSİTRİOL 24 Saat	P değeri	Anlamlılık
25 nM	0,0052	Anlamlı: **
50 nM	0,0101	Anlamlı: *
100 nM	0,0390	Anlamlı: *
500 nM	0,0309	Anlamlı: *
1000 nM	0,0324	Anlamlı: *

T24 SİSPLATİN 24 Saat	P değeri	Anlamlılık
5	0,0004	Anlamlı: ***
10	< 0,0001	Anlamlı: ***
20	< 0,0001	Anlamlı: ***
30	< 0,0001	Anlamlı: ***
40	< 0,0001	Anlamlı: ***
50	< 0,0001	Anlamlı: ***
T24 KALSİTRİOL 48 Saat	P değeri	Anlamlılık
25 nM	0,0107	Anlamlı: *
50 nM	0,7273	Anlamlı değil: ns
100 nM	0,0702	Anlamlı değil: ns
500 nM	0,0490	Anlamlı: *
1000 nM	0,0237	Anlamlı: *
T24 SİSPLATİN 48 Saat	P değeri	Anlamlılık
5	0,0043	Anlamlı: **
10	< 0,0001	Anlamlı: ***
20	< 0,0001	Anlamlı: ***
30	< 0,0001	Anlamlı: ***
40	< 0,0001	Anlamlı: ***
50	< 0,0001	Anlamlı: ***
T24 KALSİTRİOL 72 Saat	P değeri	Anlamlılık
25 nM	0,2389	Anlamlı değil: ns
50 nM	0,2052	Anlamlı değil: ns
100 nM	0,0514	Anlamlı değil: ns
500 nM	0,0420	Anlamlı: *
1000 nM	0,0013	Anlamlı: **
T24 SİSPLATİN 72 Saat	P değeri	Anlamlılık
5	0,0002	Anlamlı: ***
10	< 0,0001	Anlamlı: ***
20	< 0,0001	Anlamlı: ***

30	< 0,0001	Anlamlı: ***
40	< 0,0001	Anlamlı: ***
50	< 0,0001	Anlamlı: ***
T24 KOMBİNASYON 24 Saat	P değeri	Anlamlılık
2,5 CP (Sisplatin)	0,3552	Anlamlı değil: ns
5 CP	0,0237	Anlamlı: *
10 CP	0,0006	Anlamlı: ***
25 nM Kalsitriol	0,0057	Anlamlı: **
500 nM Kalsitriol	0,0267	Anlamlı: *
2,5 CP 25 nM	0,0686	Anlamlı değil: ns
2,5 CP 500 nM	0,0186	Anlamlı: *
5 CP 25 nM	0,0663	Anlamlı değil: ns
5 CP 500 nM	0,0108	Anlamlı: *
10 CP 25 nM	0,0088	Anlamlı: **
10 CP 500 nM	0,0061	Anlamlı: **
T24 KOMBİNASYON 48 Saat	P değeri	Anlamlılık
2,5 CP	0,0656	ns
5 CP	0,0064	Anlamlı: **
10 CP	< 0,0001	Anlamlı: ***
25 nM Kalsitriol	0,0284	Anlamlı: *
500 nM Kalsitriol	0,0886	Anlamlı değil: ns
2,5 CP 25 nM	0,0671	Anlamlı değil: ns
2,5 CP 500 nM	0,0063	Anlamlı: **
5 CP 25 nM	0,0039	Anlamlı: **
5 CP 500 nM	0,0018	Anlamlı: **
10 CP 25 nM	0,0008	Anlamlı: ***
10 CP 500 nM	0,0009	Anlamlı: ***



Şekil 4-13 : T24 Hücre Hattı MTT Sonuçları % Canlilik Değerleri Grafikleri



Şekil 4 14 : T24 Hücre Hattı MTT Kombinasyon Sonuçları % Canlılık Değerleri Grafikleri (Kalsitriol dozları nM , Sisplatin dozları µg/ml)

T24 hücre hattında 24 h ve 48 saatte kalsitriol uygulaması ile yapılan MTT deney sonuçlarında kalsitriolün bifazik etki gösterdiği saptandı. Buna karşılık kalsitriolün 25nM ve 500nM konsantrasyonlarında anlamlı olarak % canlılık oranında azalma

saptandı. 24 saatte kalsitriolün 50nM ve 100nM dozlarında % canlılık oranlarında artış gözlemlendi. 48 saatte kontrole göre 50nM ve 100nM’da anlamlı bir değişim saptanmadı. Bu da kalsitriolün bi fazik etkisi olabileceği yönünde veriler oluşturdu. 72 saatte de 500nM ve 1000nM ‘da kontrole göre anlamlı bir yüzde canlılık oranında azalma tespit edildi.

Sisplatinin T24 için MTT sonuç değerlendirmesinde 24 saatte 5µg/ml konsantrasyonda %19’luk canlılık azalması saptandı. 10 µg/ml’de bu oran %44 canlılık azalması oranına ulaştı. 20 µg/ml ve üzeri dozlarda ölüm oranı %82 değerine ulaştı. 48 saatte ise 5 µg/ml’ sisplatin de T24 hücreleri üzerindeki sitotoksik etki %46 oranına ulaştı. 72 saatte ise T24 hücreleri 5 µg/ml sisplatin %57 oranında sitotoksik etki ile hücre ölümüne yol açtı. T24 ‘de daha yüksek dozlarda normalin üzerinde sitotoksik etki gösterdi.

Kalsitriol ve sisplatinin kombinasyonunu incelediğimizde, literatürde yer alan en etkin dozun 7,6 µg/ml olduğu belirtilirken, bizde verilerimiz doğrultusunda 2,5 µg/ml, 5 µg/ml ve 10 µg/ml dozlarını kullanmayı uygun gördük. Kalsitriol için ise bifazik etkisi de değerlendirilerek 25nM ve 500nM dozlarının sisplatin kullanım dozunu azaltıcı ve etkisini arttırıcı fonksiyonunun olup olmayacağını saptamak için kullanıldı. Sonuçlara göre 2,5 µg/ml sisplatin ve 500nM kalsitriol kombinasyonu kontrole göre değerlendirildiğinde anlamlı derecede %35 ölüm oranı saptandı. 5 µg/ml sisplatin ve 500nM kalsitriol %44 ölüm oranıyla sitotoksik etkiyi arttırdı. Sadece 5 µg/ml sisplatin %19 oranında sitotoksik ölüm oranı verdi. Dolayısıyla 500nM kalsitriol ile kombine kullanımı sisplatin etkisini arttırdı. Sadece 10 µg/ml sisplatin %43 ölüm oranı gösterdi.

48 saatte 2,5 µg/ml sisplatin ile 2,5 µg/ml sisplatin ile 500nM kalsitriol kombinasyonu anlamlı olarak canlılığı azalttı. 2,5 µg/ml sisplatin ile %33 oranında sitotoksik etki saptandı. 2,5 µg/ml sisplatin ve 500nM kalsitriol kombinasyonunda ise bu oran %45 ‘e ulaştı. 48 saatte 5 µg/ml sisplatin dozu ve 500nM kalsitriol ile kombinasyon yapılan dozunda anlamlı bir fark saptanmadı (Tablo 4-1, Şekil 4-1, Şekil 4-2).

Tablo 4- 10: ECV-304 Hücre hattı MTT Sonuçları Anlamlılık Değerleri

Ns: Non-Significant, Anlamlı değil. $0.01 \leq p < 0.05$ istatistiksel anlamlılık. $0.001 \leq p < 0.01$ çok ileri düzeyde istatistiksel anlamlılık. $p < 0.001$ ileri düzeyde istatistiksel anlamlılık. $0.05 \leq p < 0.10$ anlamlılık eğilimi (Sınırdan anlamlılık). $p > 0.10$ fark tesadüften ileri gelmiştir (istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır.). CP: Sisplatin

ECV SİSPLATİN 24 Saat	P Değerleri	Anlamlılık
5 µg/ml	0,0379	Anlamlı: *
10 µg/ml	0,0041	Anlamlı: **
20 µg/ml	0,0002	Anlamlı: ***
30 µg/ml	< 0,0001	Anlamlı: ***
40 µg/ml	< 0,0001	Anlamlı: ***
50 µg/ml	< 0,0001	Anlamlı: ***
ECV SİSPLATİN 48 Saat	P Değerleri	Anlamlılık
5 µg/ml	0,0836	Anlamlı değil: ns
10 µg/ml	0,0470	Anlamlı: *
20 µg/ml	0,0098	Anlamlı: **
30 µg/ml	0,0084	Anlamlı: **
40 µg/ml	0,0069	Anlamlı: **
50 µg/ml	0,0055	Anlamlı: **
ECV SİSPLATİN 72 Saat	P Değerleri	Anlamlılık
5 µg/ml	0,0007	Anlamlı: ***
10 µg/ml	< 0,0001	Anlamlı: ***
20 µg/ml	< 0,0001	Anlamlı: ***
30 µg/ml	< 0,0001	Anlamlı: ***
40 µg/ml	< 0,0001	Anlamlı: ***
50 µg/ml	< 0,0001	Anlamlı: ***
ECV KOMBİNASYON 24 Saat	P Değerleri	Anlamlılık
2,5 CP	0,4907	ns
5 CP	0,0379	Anlamlı: *
10 CP	0,0041	Anlamlı: *
25 nM Kalsitriol	0,0004	Anlamlı: ***
500 nM Kalsitriol	0,0321	Anlamlı: *

2,5 CP 25 nM	0,7789	ns
2,5 CP 500 nM	0,2209	ns
5 CP 25 nM	0,4538	ns
5 CP 500 nM	0,1707	ns
10 CP 25 nM	0,0575	ns
10 CP 500 nM	0,0345	Anlamlı: *
ECV KOMBİNASYON 48 Saat	P Değerleri	Anlamlılık
2,5 CP	0,0065	Anlamlı: **
5 CP	0,0218	Anlamlı: *
10 CP	0,0282	Anlamlı: *
25 nM Kalsitriol	0,4291	Anlamlı değil: ns
500 nM Kalsitriol	0,3573	Anlamlı değil: ns
2,5 CP 25 nM	0,3272	ns
2,5 CP 500 nM	0,0094	Anlamlı: **
5 CP 25 nM	0,0106	Anlamlı: *
5 CP 500 nM	0,0092	Anlamlı: **
10 CP 25 nM	0,0010	Anlamlı: ***
10 CP 500 nM	0,0012	Anlamlı: **
ECV KALSİTRİOL 24 Saat	P Değerleri	Anlamlılık
25 nM	0,0029	Anlamlı: **
50 nM	0,0148	Anlamlı: *
100 nM	0,0710	Anlamlı değil: ns
500 nM	0,0784	Anlamlı değil: ns
1000 nM	0,4295	Anlamlı değil: ns
ECV KALSİTRİOL 48 Saat	P Değerleri	Anlamlılık
25 nM	0,3531	Anlamlı değil: ns
50 nM	0,2455	Anlamlı değil: ns
100 nM	0,1652	Anlamlı değil: ns
500 nM	0,2830	Anlamlı değil: ns
1000 nM	0,0238	Anlamlı: *
ECV KALSİTRİOL 72 Saat	P değerleri	Anlamlılık
25 nM	0,0126	Anlamlı: *
50 nM	0,0446	Anlamlı: *

100 nM	0,1608	Anlamlı değil: ns
500 nM	0,5241	Anlamlı değil: ns
1000 nM	0,0140	Anlamlı: *

24 saatte ECV-304 hücre hattında kullanılan kalsitriol dozlarında en etkin 25nM ve 50nM olarak saptandı. %20 oranında sitotoksik etki gösterdi. Diğer artan dozlarda kontrole göre anlamsız olarak değerlendirildi. 48 saatte ECV-304 hücre hattı 25-500nM doz aralığında anlamlı bir fark saptanmaz iken 1000nM 'da anlamlı olarak %canlılık artışı belirlendi. 72 saate 25nM ve 50nM dozlarında %13- %15 oranında sitotoksik etki gözlenirken 1000nM 'da kontrole göre anlamlı olarak %10 canlılık oranında artış saptandı.

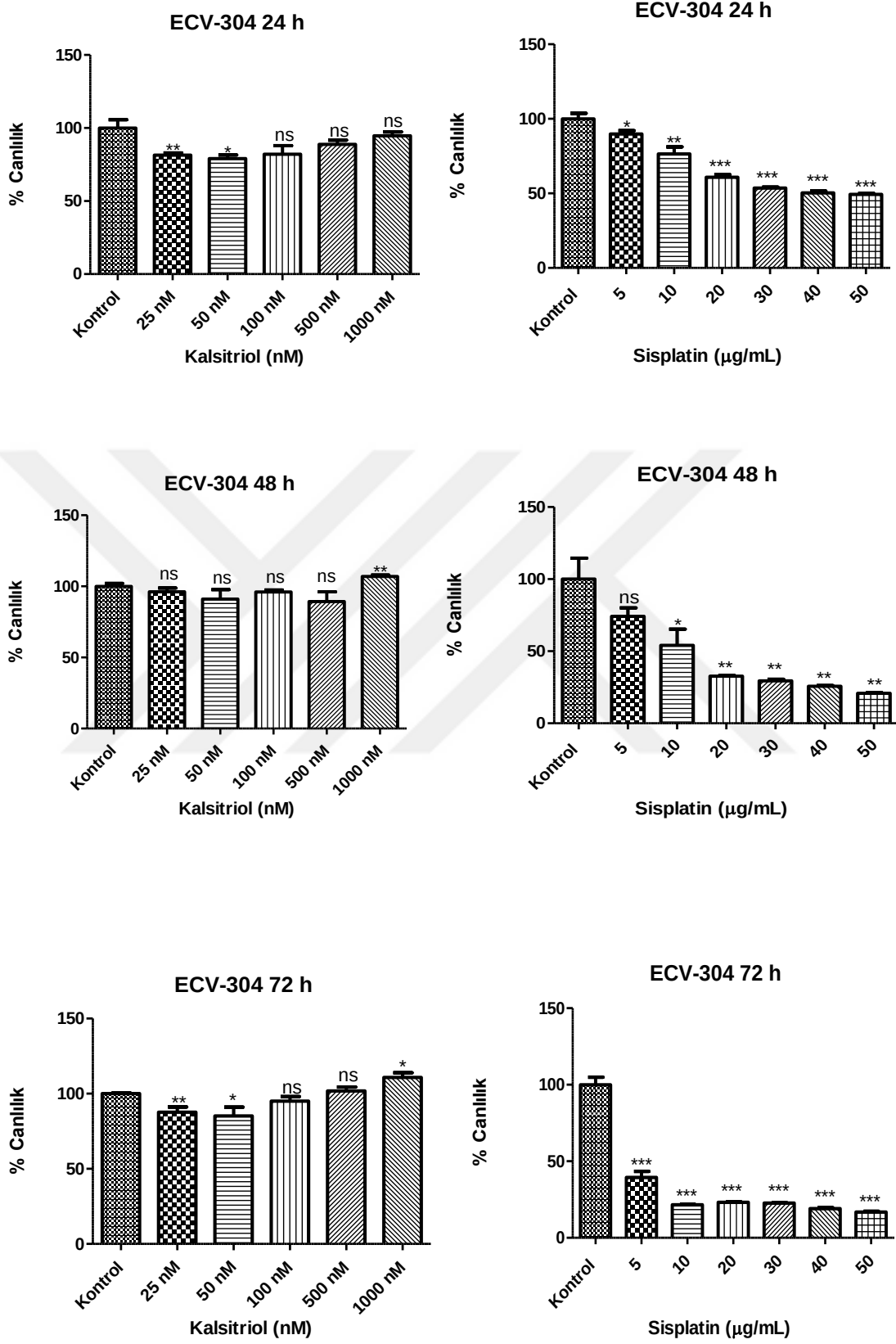
24 saat ECV-304 sisplatin uygulamasında 5 µg/ml sisplatin dozu %10 oranında sitotoksik etki gösterdi. % 50 sitotoksik etki oranına 40 µg/ml sisplatin dozunda ulaştı. 48 saatte kontrole göre 5 µg/ml sisplatine anlamlı bir değişim saptanmadı. 10 µg/ml sisplatin dozu %46 oranında sitotoksik etki gösterdi. 50 µg/ml sisplatin dozunda ise %80'lere ulaşan sitotoksik etki saptandı. 72 saatte ise 5 µg/ml sisplatin dozu %60 oranında canlılık azalması saptandı. Geri kalan yüksek dozlar hücreleri yüksek oranda ölümüne yol açtığı için değerlendirmeye alınmadı.

Kalsitriol ve sisplatin kombinasyonu açısından değerlendirdiğimizde sisplatin dozlarının tek başına kullanımına kıyasla kalsitriol ile kullanımında herhangi bir anlamlı fark görülmedi. Paralel olarak 48 saatte de anlamlı bir fark saptanmadı (Tablo 4-2, Şekil 4-3, Şekil 4-4).

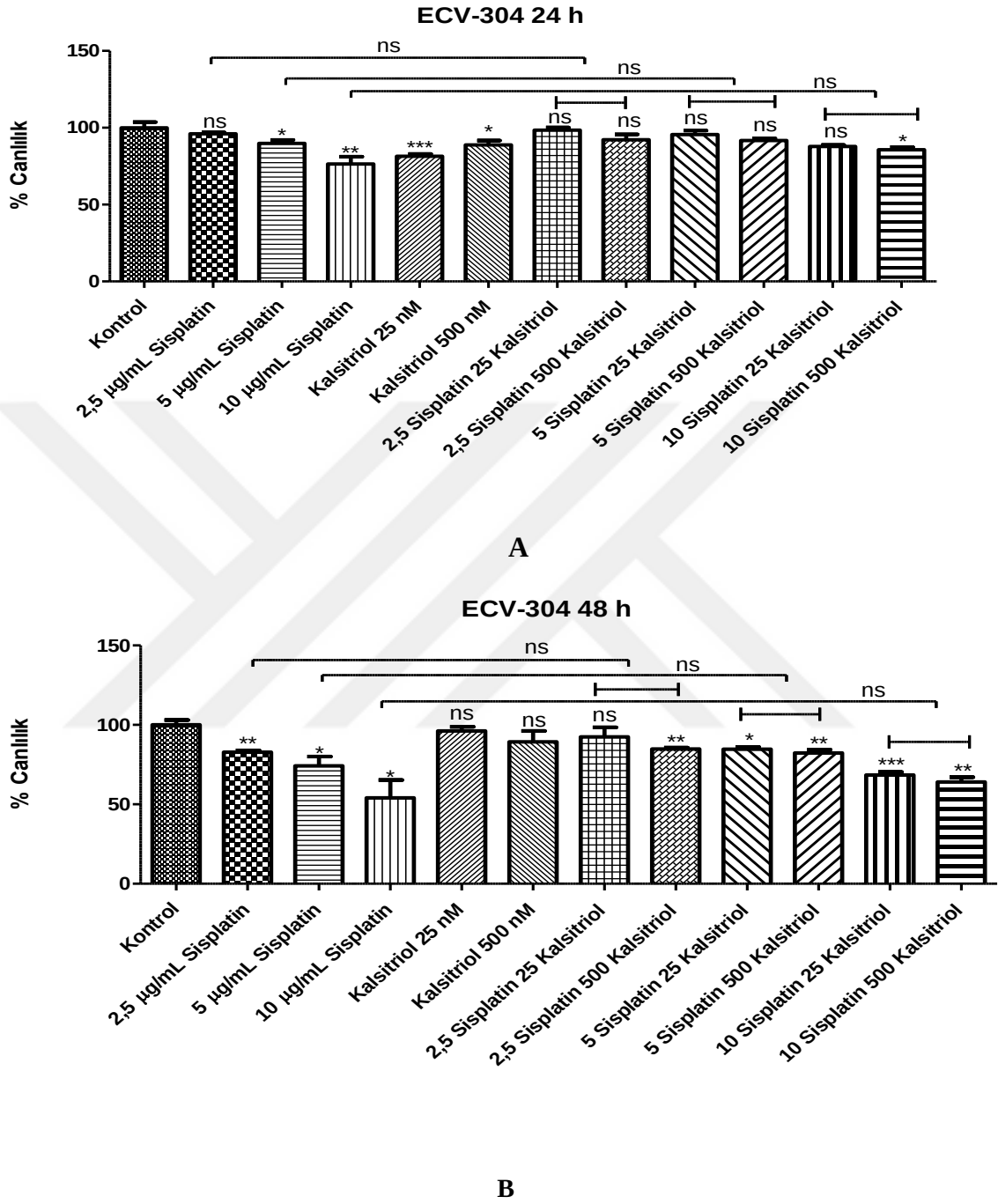
HUVEC hücre hattında 24 saat kalsitriol 25nM da %9,46 oranında anlamlı artış görülmekte, 500nM ve 1000nM canlılık oranındaki azalmayla %20 ve %27 oranlarında sitotoksik etki gösterdi. 48 saatte ise sadece 1000nM da %43 oranında canlılıkta azalma gözlemlendi. 72 saatte ise 25nM da anlamlı bir değişim gözlemlenmedi buna karşılık 50nM'da anlamlı değerinde %21 oranında sitotoksik etki belirlendi.

HUVEC sisplatin dozlarının değerlendirmesinde 24 saatte 5 µg/ml dozunda %63 oranında canlılıkta azalma görüldü. 50 µg/ml dozunda ise %70'lere varan sitotoksik etki saptandı. 48 saatte 5 µg/ml sisplatin dozu %76 oranında sitotoksik etki gösterdiği için daha yüksek dozlar aşırı ölüm oranına yol açtığından deneylerimizde kullanılmadı. 72

saatte de benzer durum saptandı. Sisplatin ve kalsitriol kombinasyon kullanımı değerlendirildiğinde 24 saatte 2,5 µg/ml sisplatin de %33 sitotoksik etki, 2,5 µg/ml sisplatin ve 500nM kalsitriol kombinasyonunda %43 oranında sitotoksik etki saptandı. Ancak 2,5 µg/ml sisplatin ve 500nM kalsitriol ile kombinasyonu karşılaştırıldığında anlamlı degree sahip olmadığı saptandı. 5 µg/ml sisplatin de %63 sitotoksik etki, 5 µg/ml sisplatin ve 500nM kalsitriol de ise %55 oranında sitotoksik etki saptandı. Sadece 5 µg/ml sisplatin ve 5 µg/ml sisplatin - 500nM kalsitriol ile kombinasyonu karşılaştırıldığında MTT sonuçlarına göre anlamlı ($p=0.0473$) bulundu. 48 saatte 2,5 µg/ml sisplatin %56 oranında sitotoksik etkiye sahipken 2,5 µg/ml sisplatin 25nM kombinasyonunda anlamlı olarak %63 sitotoksik etki saptandı. 5 µg/ml sisplatin %77 oranında canlılığı azaltırken, 5 µg/ml sisplatin ve 500 nM kalsitriol kombinasyonu canlılık oranını %78 oranında düşürdü. 5 µg/ml sisplatin, 5 µg/ml sisplatin 500nM kalsitriol kombinasyonları aralarında değerlendirildiğinde anlamlı bir fark saptanmadı. 10µg/ml sisplatin canlılık oranını %79 oranında düşürdü (Tablo 4-3, Şekil 4-5, Şekil4-6).



Şekil 4 15 : ECV-304 MTT Sonuçları % Canlılık Grafikleri



Şekil 4 16: ECV-304 A: 24 Saat MTT Sonuçları % Canlılık Kombinasyon Grafikleri .
 B: ECV-304 48 Saat MTT Sonuçları % Canlılık Kombinasyon Grafikleri (Kalsitriol dozları nM, Sisplatin dozları µg/ml)

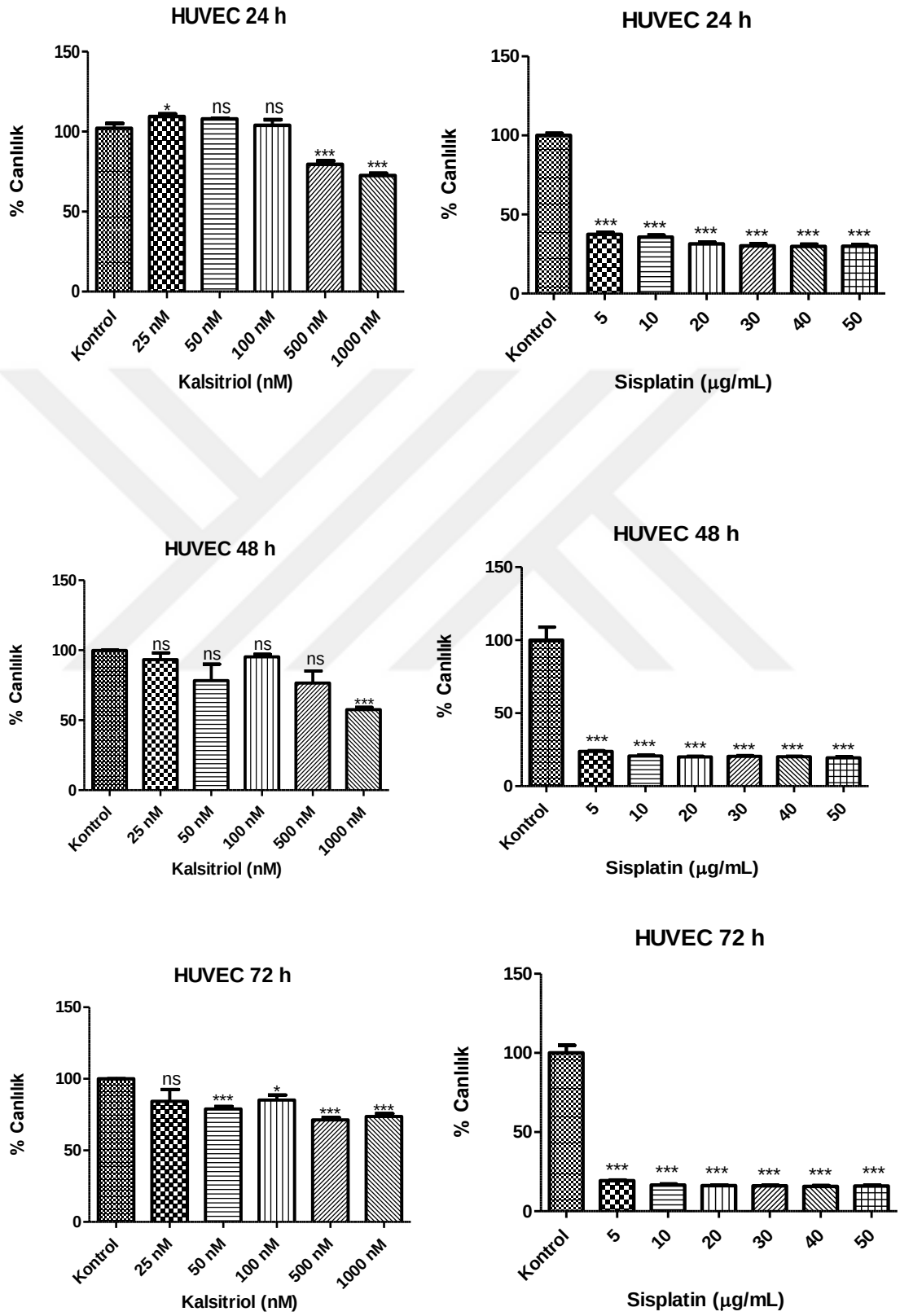
Tablo 4 11: HUVEC Hücre Hattı MTT Sonuçları Anlamlılık Değerleri

Ns: “Non-Significant”, Anlamlı değil. $0.01 \leq p < 0.05$ istatistiksel anlamlılık. $0.001 \leq p < 0.01$ ileri düzeyde istatistiksel anlamlılık. $p < 0.001$ çok ileri düzeyde istatistiksel anlamlılık. $0.05 \leq p < 0.10$ anlamlılık eğilimi (Sınırdan anlamlılık). $p > 0.10$ fark tesadüften ileri gelmiştir (istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır.) CP: Sisplatin

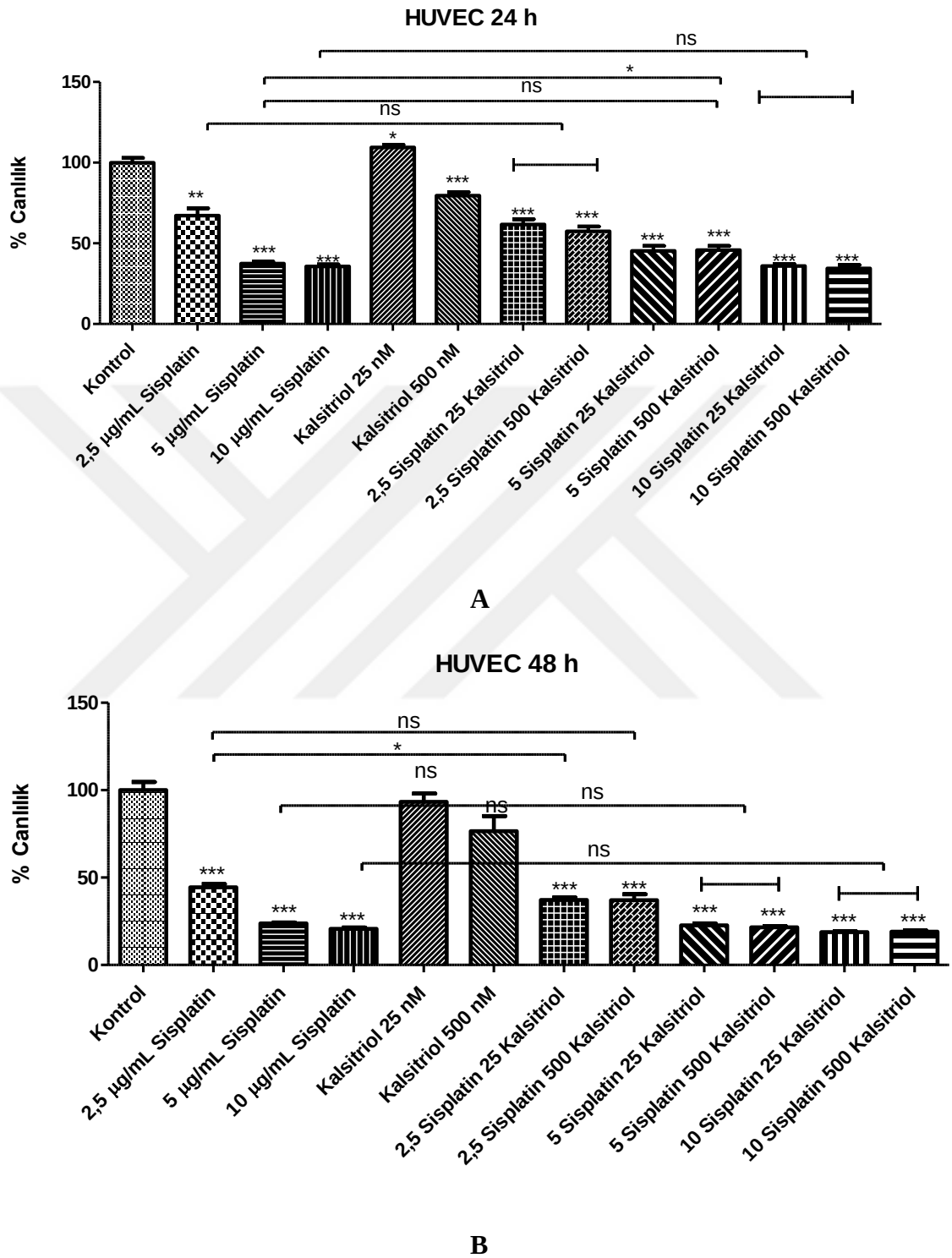
HUVEC Sisplatin 24 saat	P Değerleri	Anlamlılık
5 µg/ml	< 0,0001	Anlamlı:***
10 µg/ml	< 0,0001	Anlamlı:***
20 µg/ml	< 0,0001	Anlamlı:***
30 µg/ml	< 0,0001	Anlamlı:***
40 µg/ml	< 0,0001	Anlamlı:***
50 µg/ml	< 0,0001	Anlamlı:***
HUVEC Kalsitriol 24 saat	P Değerleri	Anlamlılık
25 nM	0,0454	Anlamlı:*
50 nM	0,1273	Anlamlı değil: ns
100 nM	0,6959	Anlamlı değil: ns
500 nM	0,0005	Anlamlı:***
1000 nM	0,0009	Anlamlı:***
HUVEC Kombinasyon 24 saat	P Değerleri	Anlamlılık
2,5 CP	0,0036	Anlamlı: **
5 CP	< 0,0001	Anlamlı:***
10 CP	< 0,0001	Anlamlı:***
25 nM Kalsitriol	0,0166	Anlamlı: *
500 nM Kalsitriol	0,0008	Anlamlı:***
2,5 CP 25 nM	0,0009	Anlamlı:***
2,5 CP 500 nM	0,0006	Anlamlı: ***
5 CP 25 nM	0,0002	Anlamlı: ***

5 CP 500 nM	< 0,0001	Anlamlı: ***
10 CP 25 nM	< 0,0001	Anlamlı: ***
10 CP 500 nM	< 0,0001	Anlamlı: ***
HUVEC Sisplatin 48 saat	P değerleri	Anlamlılık
5 µg/ml	< 0,0001	Anlamlı:***
10 µg/ml	< 0,0001	Anlamlı:***
20 µg/ml	0,0009	Anlamlı:***
30 µg/ml	0,0009	Anlamlı:***
40 µg/ml	0,0009	Anlamlı:***
50 µg/ml	0,0009	Anlamlı:***
HUVEC Sisplatin 72 saat	P değerleri	Anlamlılık
5 µg/ml	< 0,0001	Anlamlı:***
10 µg/ml	< 0,0001	Anlamlı:***
20 µg/ml	< 0,0001	Anlamlı:***
30 µg/ml	< 0,0001	Anlamlı:***
40 µg/ml	< 0,0001	Anlamlı:***
50 µg/ml	< 0,0001	Anlamlı:***
HUVEC Kalsitriol 48 saat	P değerleri	Anlamlılık
25 nM	0,3844	Anlamlı değil: ns
50 nM	0,1401	Anlamlı değil: ns
100 nM	0,0661	Anlamlı değil: ns
500 nM	0,1089	Anlamlı değil: ns
1000 nM	< 0,0001	Anlamlı:***
HUVEC Kalsitriol 72 saat	P değerleri	Anlamlılık
25 nM	0,1296	Anlamlı değil: ns
50 nM	0,0003	Anlamlı:***
100 nM	0,0141	Anlamlı: *
500 nM	< 0,0001	Anlamlı:***

1000 nM	0,0002	Anlamlı:***
HUVEC Kombinasyon 48 saat	P değerleri	Anlamlılık
2,5 CP	0,0004	Anlamlı: ***
5 CP	< 0,0001	Anlamlı: ***
10 CP	< 0,0001	Anlamlı: ***
25 nM Kalsitriol	0,4085	Anlamlı değil: ns
500 nM Kalsitriol	0,1146	Anlamlı değil: ns
2,5 CP 25 nM	0,0002	Anlamlı: ***
2,5 CP 500 nM	0,0004	Anlamlı: ***
5 CP 25 nM	< 0,0001	Anlamlı: ***
5 CP 500 nM	< 0,0001	Anlamlı: ***
10 CP 25 nM	< 0,0001	Anlamlı: ***
10 CP 500 nM	< 0,0001	Anlamlı: ***

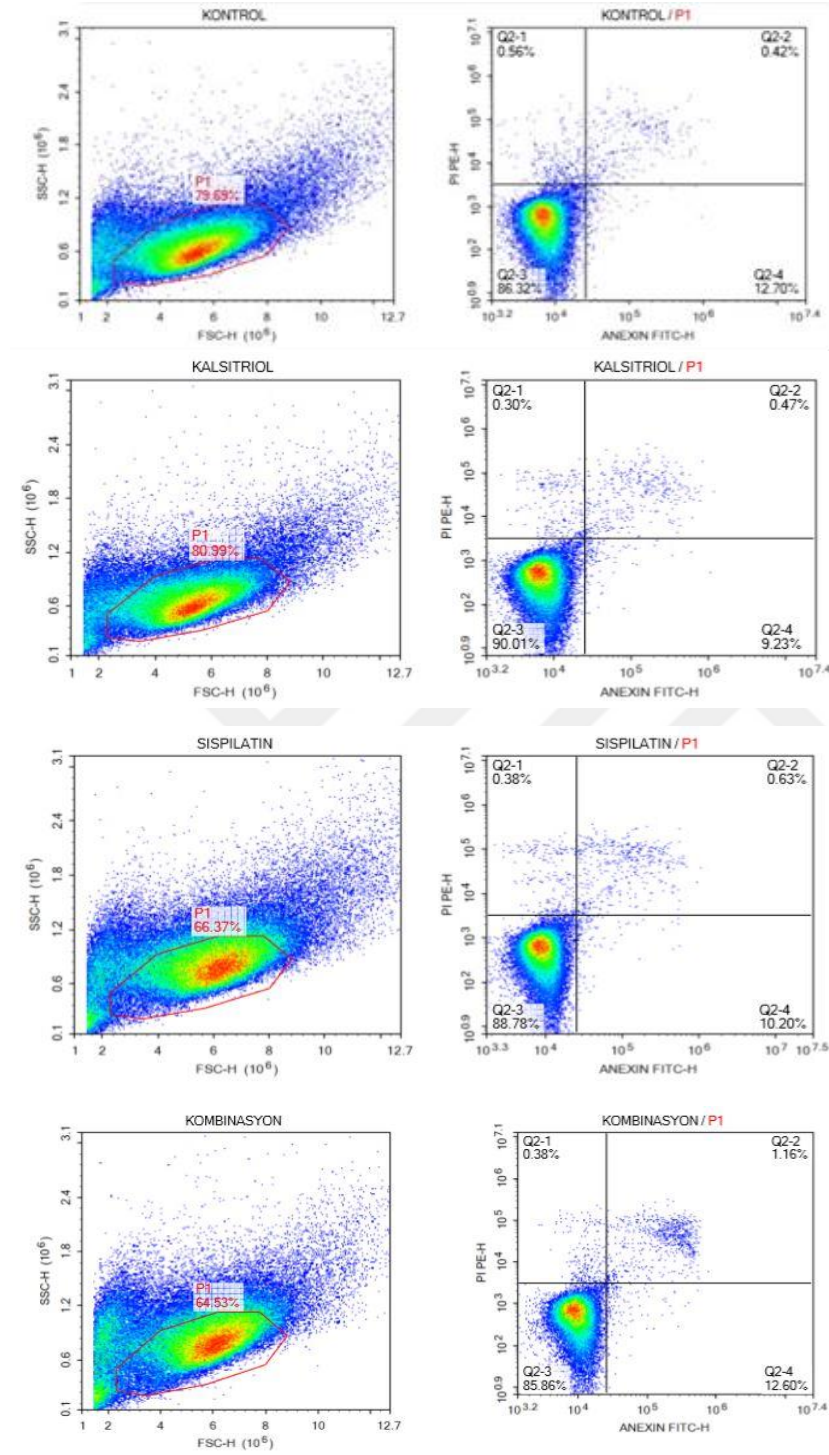


Şekil 4-5 HUVEC Hücre Hattı MTT Sonuçları % Canlılık Grafiği

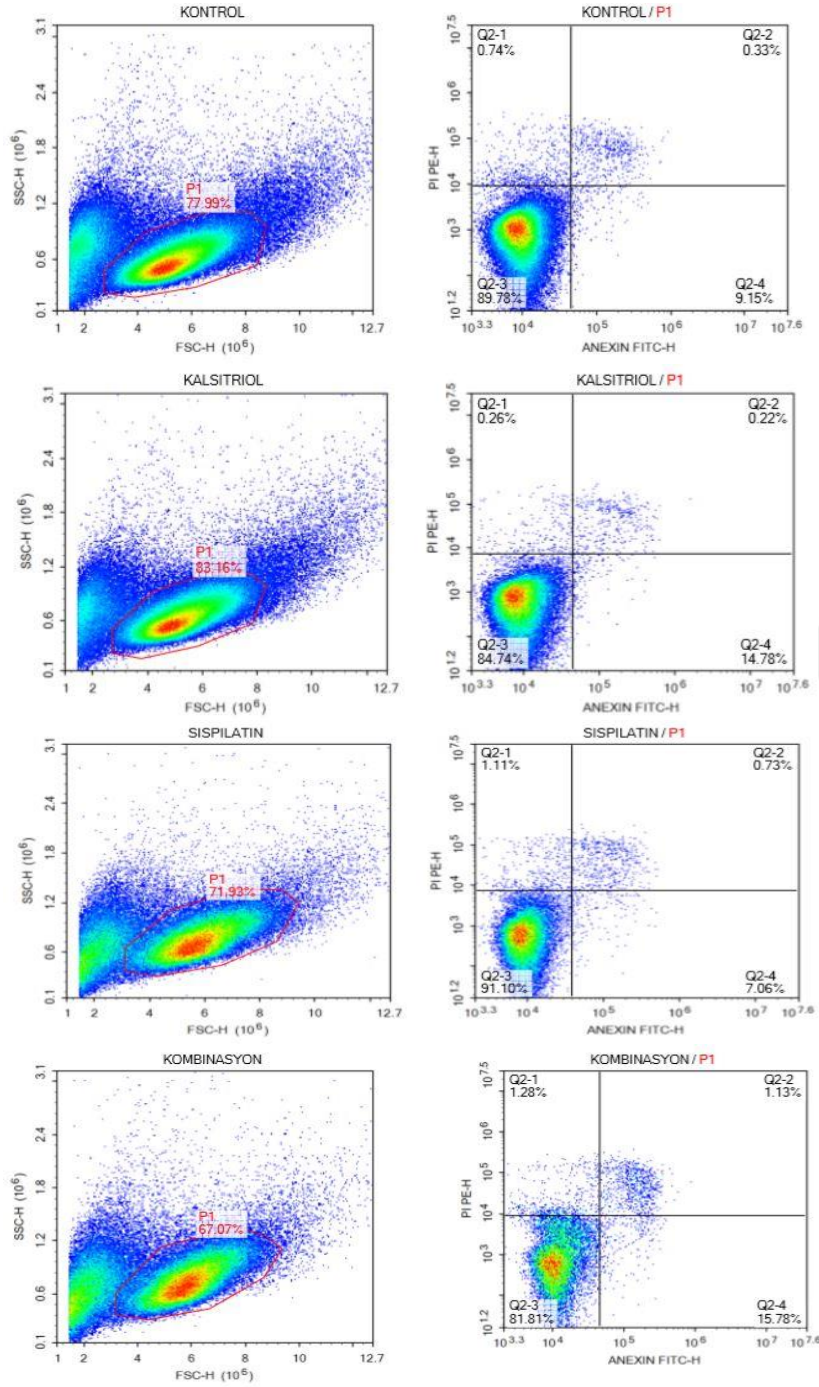


Şekil 4 17 : HUVEC Hücre Hattı MTT Sonuç Grafikleri A: 24 Saat MTT Sonuçları % Canlılık Kombinasyon Grafikleri .B: HUVEC 48 Saat MTT Sonuçları % Canlılık Kombinasyon Grafikleri (Kalsitriol dozları nM , Sisplatin dozları µg/ml)

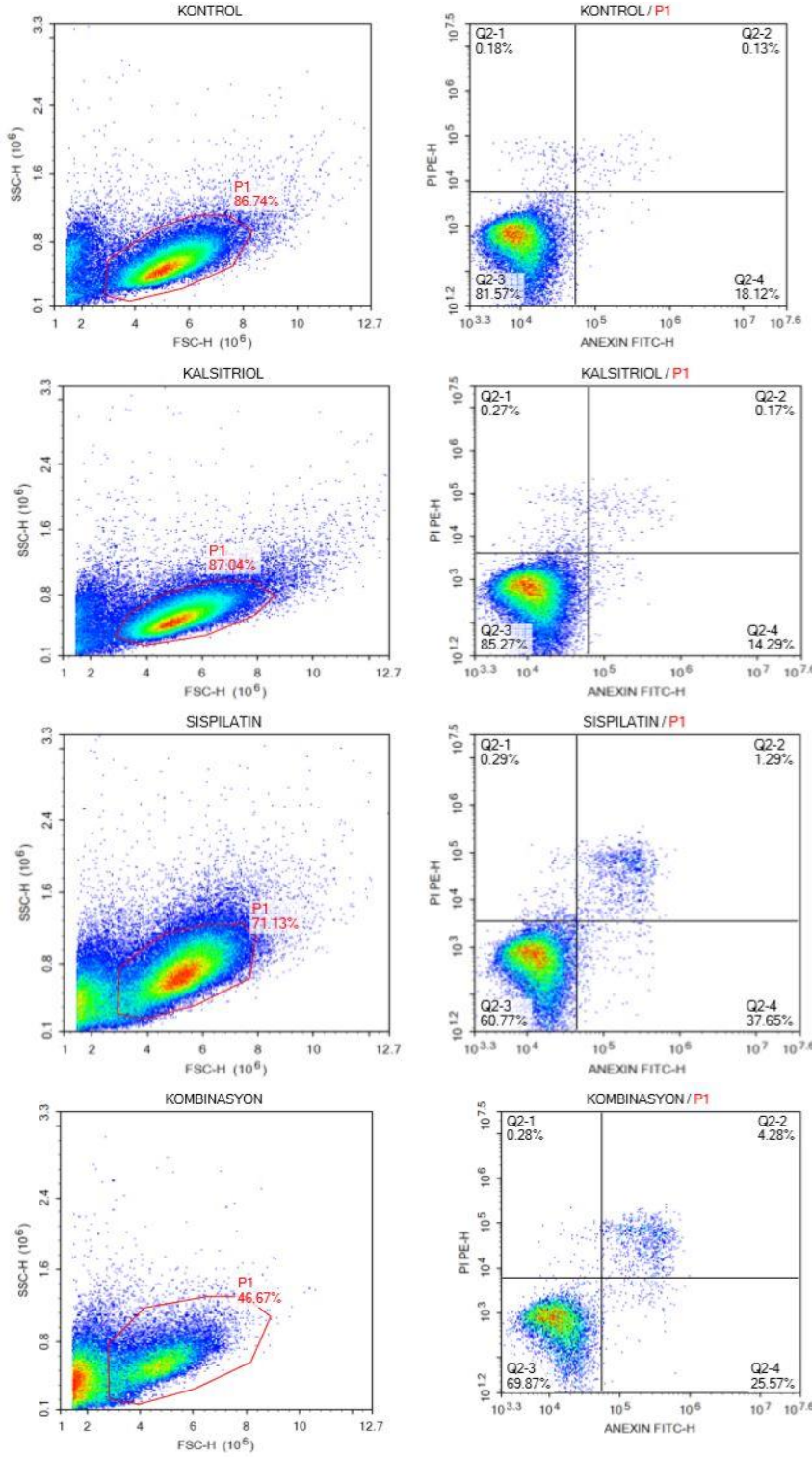
4.2. Apoptoz Analiz Bulguları



Şekil 4 18: ECV-304 Hücre Hattı Örnek Flow Sitometri Anneksin V-FITC-H Apoptoz Tayin Grafikleri. (24 saat sonra Kalsitriol 500nM, Cisplatin 5µg/ml dozunda uygulanmıştır. Kombinasyon dozu Sisplatin+Kalsitriol 500nM,5µg/ml dozlarında kullanılmıştır.)

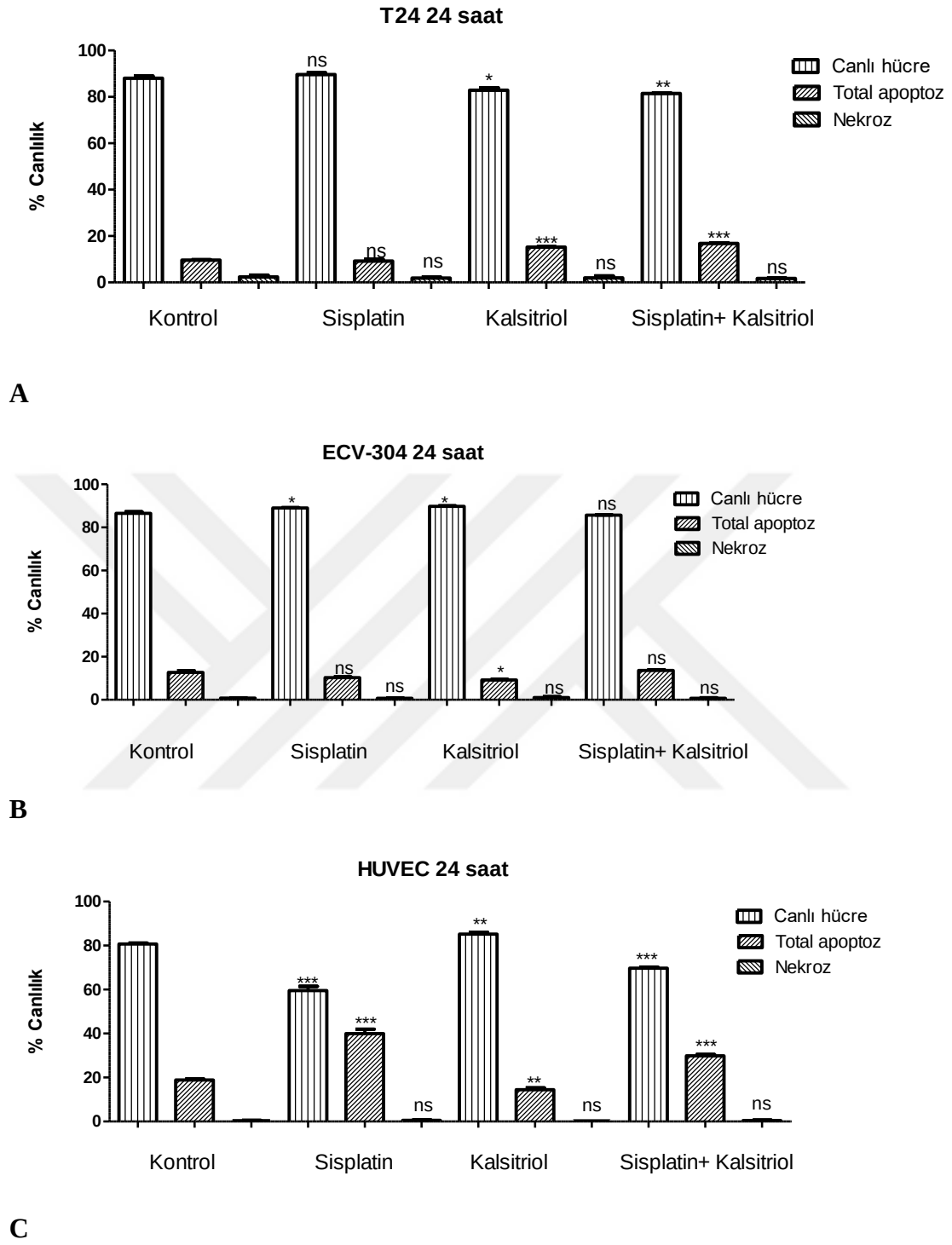


Şekil 4 19: T24 Hücre Hattı Örnek Flow Sitometri Anneksin V-FITC Apoptoz Tayin Grafikleri. (24 saat sonra Kalsitriol 500nM, Cisplatin 5µg/ml dozunda uygulanmıştır. Kombinasyon dozu Sisplatin+Kalsitriol 500nM,5µg/ml dozlarında kullanılmıştır.)



Şekil 4 20 : HUVEC Hücre Hattı Flow Sitometri Anneksin V-FITC Apoptoz Tayin Grafikleri.

(24 saat sonra Kalsitriol 500nM, Sisplatin 5µg/ml dozunda uygulanmıştır. Kombinasyon dozu Sisplatin+Kalsitriol 500nM,5µg/ml dozlarında kullanılmıştır.)



Şekil 4 21: Flow Sitometri Anneksin V-FITC Apoptoz Tayini Sonuçlarının Canlı Hücre, Apoptoz, Nekroz oranlarının %Canlılık oranları Grafiği. A; (T24 Hücre Hattı 24 saat hücre kültürü sonrası Flow Sitometri Anneksin V-FITC Apoptoz Tayini Sonuçlarının Canlı Hücre, Apoptoz, Nekroz oranlarının %Canlılık oranları Grafiği). B; (ECV-304 Hücre Hattı 24 saat hücre kültürü sonrası Flow Sitometri Anneksin V-FITC Apoptoz Tayini Sonuçlarının Canlı Hücre, Apoptoz, Nekroz oranlarının %Canlılık oranları Grafiği). C; (HUVEC Hücre Hattı 24 saat hücre kültürü ardından doz uygulaması sonrası Flow Sitometri Anneksin V-FITC Apoptoz Tayini Sonuçlarının Canlı Hücre, Apoptoz, Nekroz oranlarının %Canlılık oranları Grafiği) 24 saat sonra Kalsitriol 500nM, Sisplatin 5µg/ml dozunda uygulanmıştır. Kombinasyon dozu Sisplatin+Kalsitriol 500nM,5µg/ml dozlarında kullanılmıştır.

Tablo 4 12 : ECV-304, T24, HUVEC Hücrelerinde Anneksin V-FITC ile Apoptoz Tayin Testi Sonuç Yüzdeleri ve Anlamlılık Değerleri

T24	Canlı hücre	Apoptoz	Nekroz
5 µg/ml Sisplatin	p=0,2626 (ns)	p=0,5838 (ns)	p=0,6240 (ns)
500 nM Kalsitriol	p=0,0178 (*)	p=0,0001 (***)	p=0,7469 (ns)
5 µg/ml Sisplatin+ 500 nM Kalsitriol	p=0,0023 (**)	p=0,0001 (***)	p=0,4735 (ns)
ECV-304			
5 µg/ml Sisplatin	p=0,0311 (*)	p=0,0535 (ns)	p=0,7687 (ns)
500 nM Kalsitriol	p=0,0150 (*)	p=0,0160 (*)	p=0,5534 (ns)
(5µg/ml) Sisplatin +500 nM Kalsitriol	p=0,3224 (ns)	p=0,3511 (ns)	p=0,8109 (ns)
HUVEC			
5µg/ml Sisplatin	p=0,0004 (***)	p=0,0005 (***)	p=0,5348 (ns)
500 nM Kalsitriol	p=0,0076 (**)	p=0,0075 (**)	p=0,6667 (ns)
5µg/ml Sisplatin+ 500 nM Kalsitriol	p< 0,0001 (***)	p=0,0001 (***)	p=0,6858 (ns)

Tablo 4 13: 24 Saat T24, ECV-304, HUVEC Hücre Hattı Anneksin V-FITC Analizi Sonuç Yüzdeleri. (total apoptoz/ nekroz)

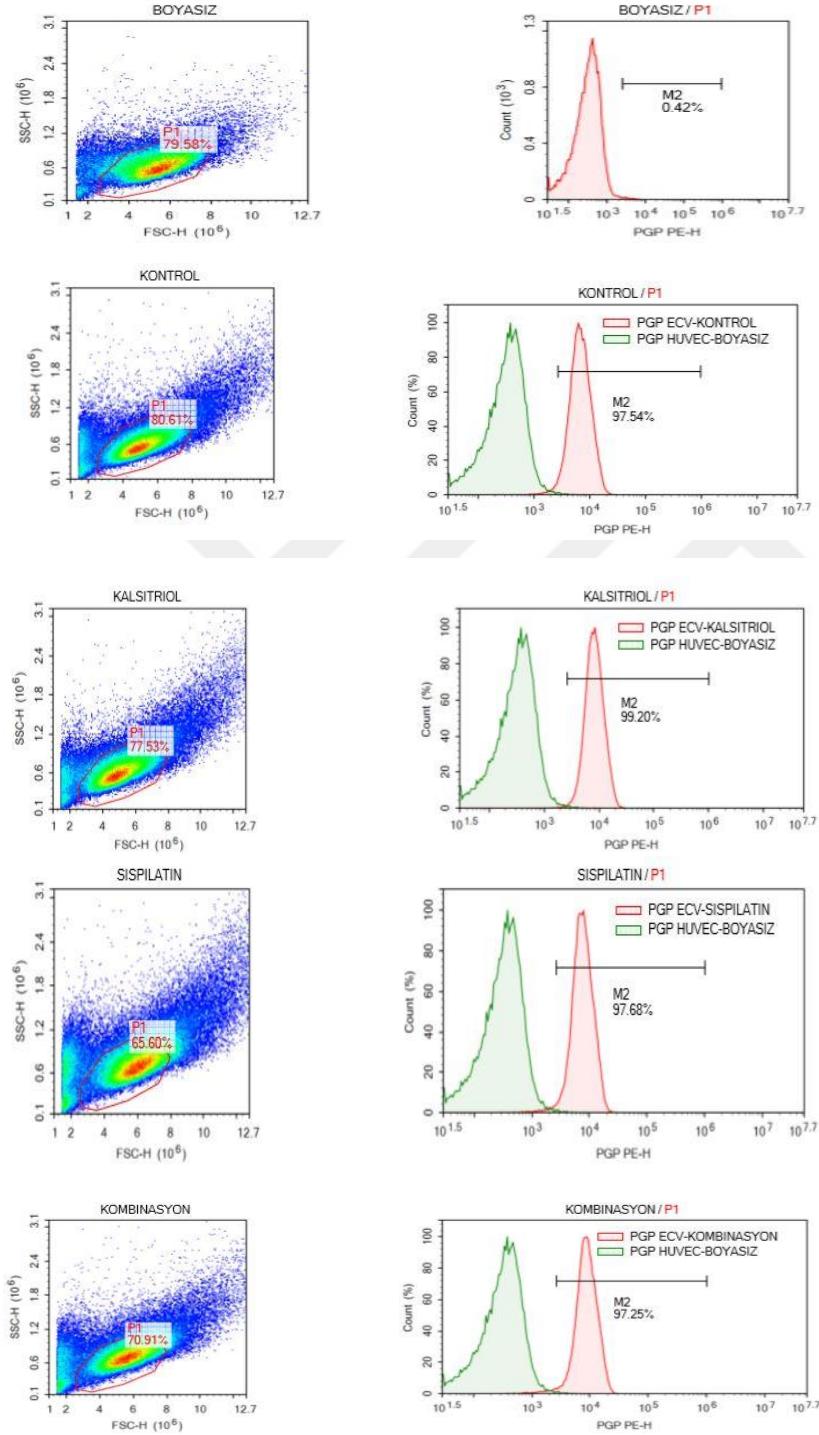
Total Apoptoz/Nekroz Yüzde Ortalama Oranları (%)	Kontrol	Sisplatin 5µg/ml	Kalsitriol 500nM	Sisplatin+Kalsitriol (5µg/ml+500nM)
T24	9.65 /2.33	9.22/1.85	15.18/1.93	16.83/ 1.67
ECV-304	12.67/0.78	10.25/0.70	9.17/1.04	13.61/ 0.70
HUVEC	18.91/0.37	39.95/0.52	14.46/0.30	29.84 /0.47

T24, ECV-304, HUVEC hücre hatlarında 24 saatlik 5µg/ml sisplatin ve 500nM kalsitriol ve her iki maddenin kombinasyonu ile yapılan Anneksin V-PI Flow Sitometri sonuçlarına göre; Tüm hücre hatlarında apoptoz ve nekroz oranları Tablo 4-5’ de verildi. Anlamlılık oranları ise Tablo 4-4’ de yer almaktadır. Sonuçlar değerlendirildiğinde T24 hücre hattında canlı hücre-apoptoz-nekroz da 5µg/ml sisplatin uygulamasın kontrole göre karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanmadı. Kalsitriol uygulamasında kontrole göre %canlılığında azalma, total apoptoz oranında anlamlı artış gözlenirken nekroz oranında herhangi bir değişim görülmedi. 5µg/ml sisplatin ve 500nM kalsitriol kombinasyonunda ise canlılık oranında anlamlı azalma, total apoptoz oranında anlamlı artış, nekrozda ise anlamlı bir fark saptanmadı.

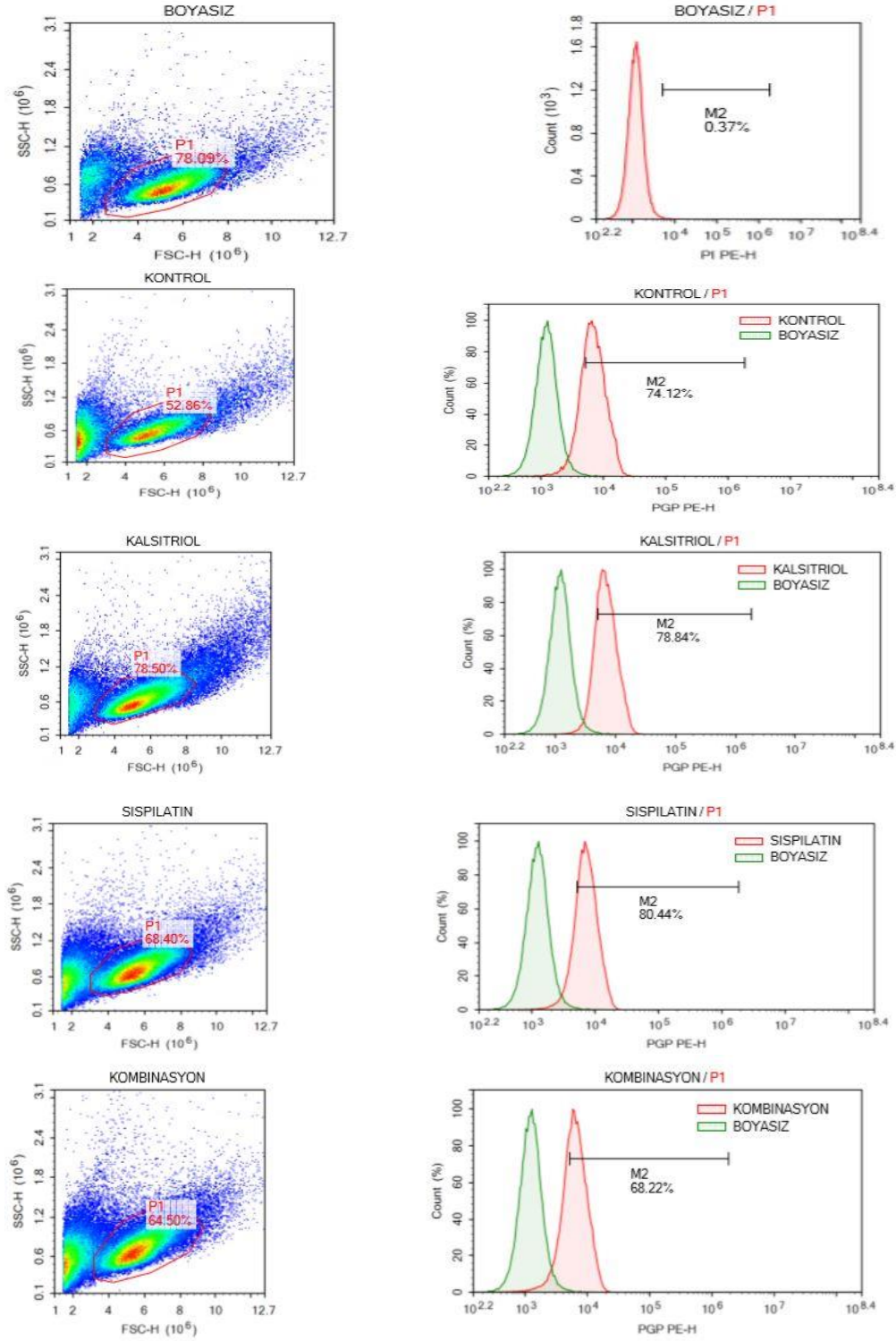
ECV-304 hücre hattında 5µg/ml sisplatin uygulamasında apoptotik oranda anlamlı bir değişim saptanmadı. 500nM kalsitriol uygulamasında ise apoptoz oranında kontrole göre anlamlı bir azalma tespit edildi. 5µg/ml sisplatin ve 500nM kalsitriol kombinasyon uygulamasında herhangi bir anlamlı değişim saptanmadı. Tüm uygulamalarda ki nekrotik oranlar anlamlı bir fark belirlenmedi (Şekil 4-7, Şekil 4-8, Şekil 4-9, Şekil 4-10, Tablo 4-4)

HUVEC hücre hattında tüm uygulamalarda nekrotik oranlarda herhangi bir fark belirlenmedi. 5µg/ml sisplatin de %39.95 apoptoz oranıyla kontrole göre anlamlı bir artış saptandı. 500nM kalsitriol %14.46 apoptotik yüzde oranıyla kontrole göre azalma gösterdi. 5µg/ml sisplatin ve 500nM kalsitriol kombinasyon uygulamasında ise %29.84 total apoptoz oranıyla kontrole göre anlamlı bir artış saptanırken sisplatin uygulaması ile karşılaştırıldığında apoptoz oranında anlamlı bir azalma belirlendi (Şekil 4-7, Şekil 4-8, Şekil 4-9, Şekil 4,10, Tablo 4-4, Tablo 4-5)

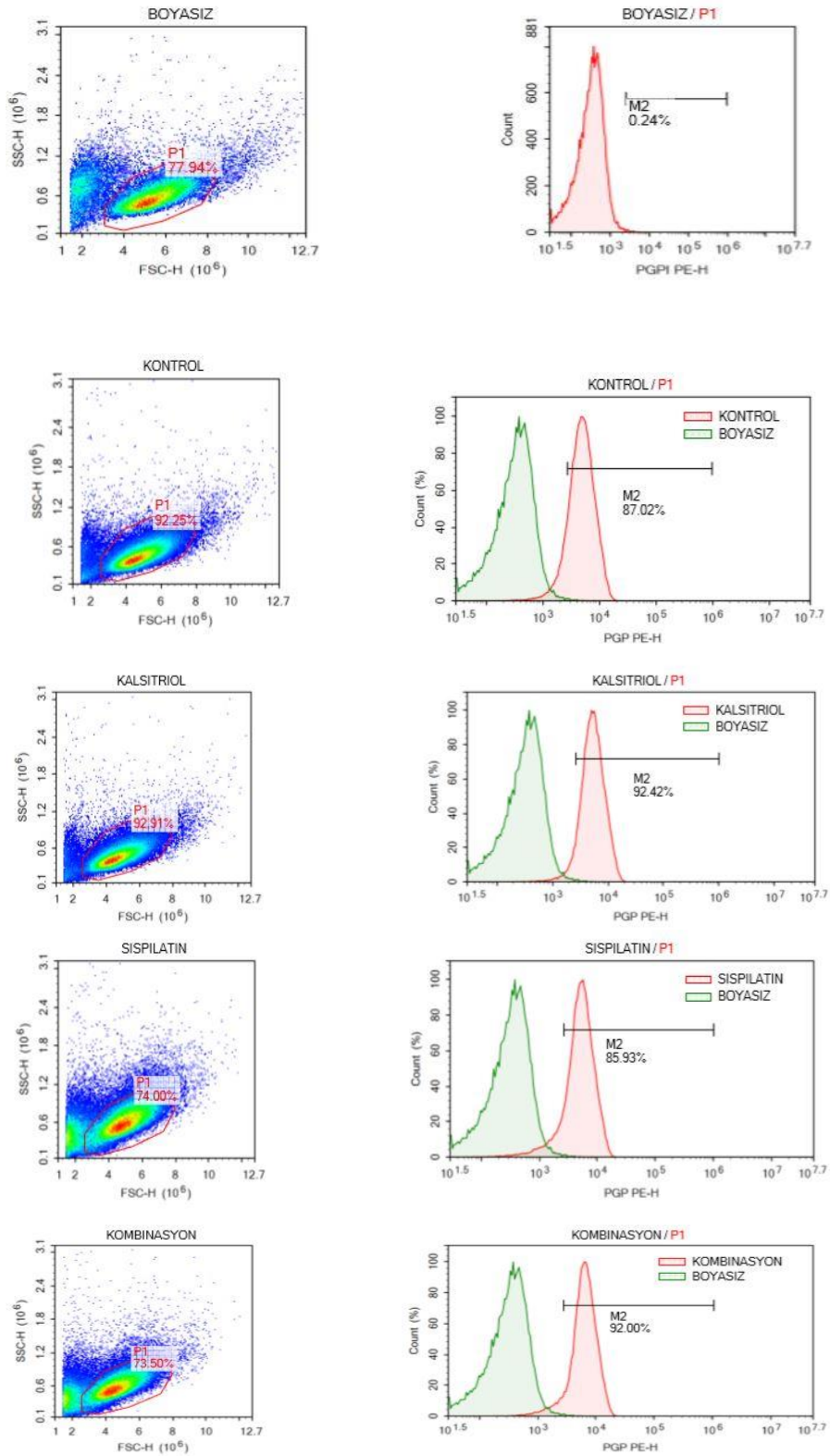
4.3. P-gp Analizi Bulguları



Şekil 4 22: ECV-304 P-gp Analizi Örnek Grafikleri. 24 saat sonra Kalsitriol 500nM, Cisplatin 5µg/ml dozunda uygulanmıştır. Kombinasyon dozu Sisplatin+Kalsitriol 500nM,5µg/ml dozlarında kullanılmıştır.

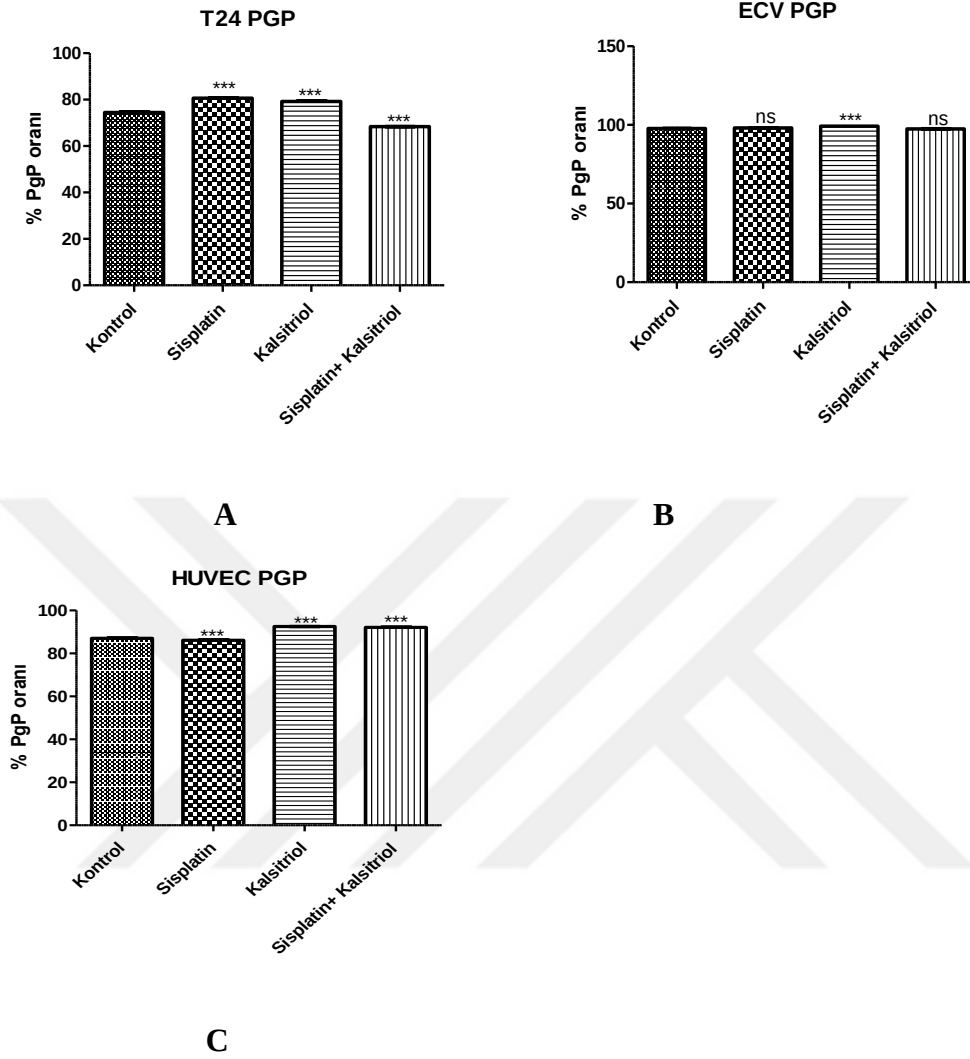


Şekil 4 23: T24 P-gP Analizi Örnek Grafikleri. 24 saat sonra Kalsitriol 500nM, Sisplatin 5µg/ml dozunda uygulanmıştır. Kombinasyon dozu Sisplatin+Kalsitriol 500nM, 5µg/ml dozlarında kullanılmıştır.



Şekil 4 24: HUVEC P-gp Analizi Örnek Grafikleri.

24 saat sonra Kalsitriol 500nM, Sisplatin 5µg/ml dozunda uygulanmıştır. Kombinasyon dozu Sisplatin+Kalsitriol 500nM,5µg/ml dozlarında kullanılmıştır.



Şekil 4 25 : P-gP Analizi % Grafikleri

A;(T24 P-gP analizi sonuçları), B;(ECV-304 P-gP analizi sonuçları), C;(HUVEC P-gP analizi sonuçları), Kalsitriol 500nM, Sisplatin 5µg/ml dozunda kullanılmıştır. Kombinasyon dozu Sisplatin+Kalsitriol 500nM,5µg/ml dozunda 24 saat sonra P-gP yüzde ölçümleridir.

Tablo 4 14 : T24, ECV-304, HUVEC Hücre Hatları P-gP Yüzdeleri

PGP Yüzde Oranları (%)	Kontrol	Sisplatin 5µg/ml	Kalsitriol 500nM	Sisplatin+Kalsitriol (5µg/ml+500nM)
T24	74.47	80.65	79,22	68,33
ECV-304	97.64	98.05	99.18	97.47
HUVEC	87.08	86.09	92.50	92.16

T24 hücre hattında 5µg/ml sisplatin ve 500nM kalsitriolün tek başına uygulamaları kontrole göre P-gp oranında anlamlı artış gösterdi. Her iki maddenin kombinasyon uygulamasında ise kontrole göre anlamlı azalma belirlendi.

ECV-304 hücre hattında ise kalsitriolde istatistiksel olarak anlamlı veriye ulaşmamıza rağmen, tüm uygulamalarda ulaşılan değerler birbiri ile benzerlik gösterdi. Dolayısıyla P-gp yüzdeleri açısından ulaşılan değerler birbirinden farklı bulunmadı.

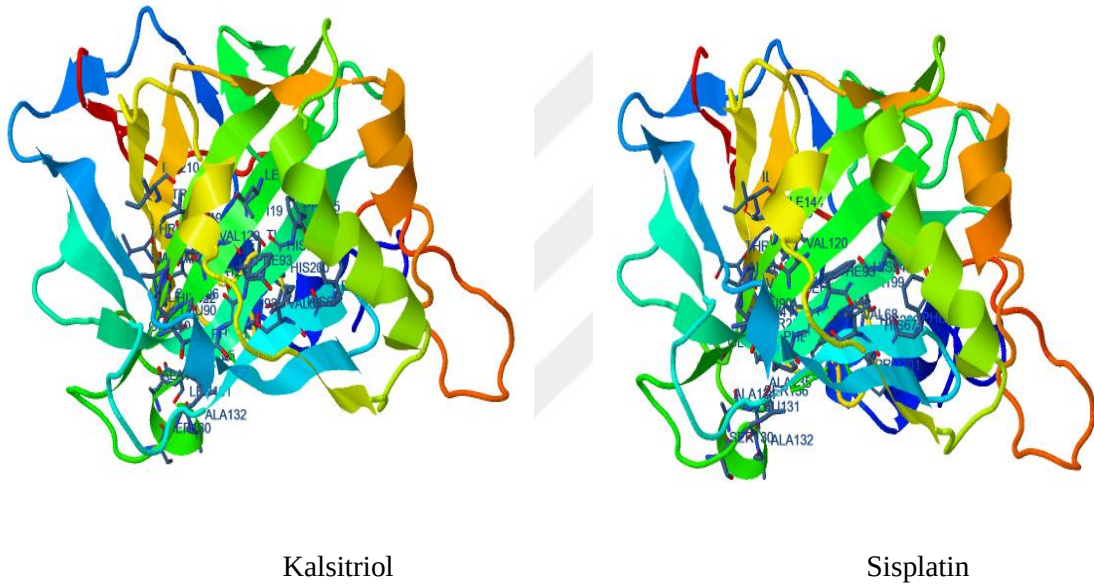
HUVEC hücre hattında kontrole göre anlamlı 5µg/ml sisplatin uygulaması ile P-gp oranında %86.09 oranıyla azalma saptandı ve 500nM kalsitriol uygulaması ile P-gp oranı %92.50 oranına ulaştı. Bununla birlikte her iki maddenin kombinasyonunda ulaşılan P-gp yüzde değerleri kontrole göre %92.16 anlamlı derecede artış gösterdi. P-gp yüzde oranları Tablo 4-6'da yer almaktadır. Anlamlılık oranları TABLO 4-7'de verildi. P-gp analizi örnek flow sitometri görüntüleri, grafikleri için Şekil 4-11, Şekil 4-12, Şekil 4,13, Şekil 4-14'de verildi.

Tablo 4 15: Pg-P Analizi Anlamlılık Değerleri

T24	P değeri	Anlamlılık
5 µg/ml Sisplatin	< 0,0001	Anlamlı: ***
500 nM Kalsitriol	< 0,0001	Anlamlı: ***
5 µg/ml Sisplatin+ 500 nM Kalsitriol	< 0,0001	Anlamlı: ***
ECV-304	P değeri	Anlamlılık
5 µg/ml Sisplatin	0,1025	Anlamlı değil: ns
500 nM Kalsitriol	< 0,0001	Anlamlı: ***
5µg/ml Sisplatin+500nM Kalsitriol	0,2752	Anlamlı değil: ns
HUVEC	P değeri	Anlamlılık
5 µg/ml Sisplatin	0,0005	Anlamlı: ***
500 nM Kalsitriol	< 0,0001	Anlamlı: ***
5 µg/ml Sisplatin+ 500 nM Kalsitriol	< 0,0001	Anlamlı: ***

4.4. DNA Docking Analizi

Yapılan moleküler docking çalışmasında, kalsitriol ve sisplatin moleküllerinin p53 proteini karşısında etkinlikleri incelenmiştir (Şekil 4-15). Bu protein docking çalışması HEX 8.0.0 programı kullanılarak docking verileri hesaplandı. Yapılan çalışmada, protein veri bankasından p53 protein için ID' si 2MWY nolu protein kullanılmıştır. Yapılan hesaplamalarda, kalsitriol molekülünün E_{total} enerjisi -282.10, sisplatin molekülün ise -135.16 bulunmuştur (Tablo4-8). Bu değerler ışığında kalsitriol molekülünün p 53 proteini karşısında daha etkin olduğu görülmüştür.



Protein ID: 2MWY (p53)

Şekil 4 26: DNA Docking Analizi Kalsitriol ve Sisplatin Molekülleri

Tablo 4 16: DNA Docking Analiz Değerleri Tablosu

	E_{total}	E_{shape}	E_{force}
Kalsitriol	-282.10	-282.10	0.00
sisplatin	-135.16	-135.16	0.00

5. TARTIŞMA

Kanser günümüzde sanayileşmenin de artışı ile birlikte toplumun kanserojenlere maruziyetin artmasıyla önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Hava ve su kirliliğinde ki artışın, doğal ve sağlıklı besine ulaşmada ki yaşanan zorluğun, çevresel ve mesleki karsinojenlere maruziyetlerin ve sigara kullanımının artması ile ilerleyen yıllarda daha da artış göstermesi söz konusudur. Mesane kanseri Avrupa ülkelerinde görülme sıklığı 5. sıradadır ve her geçen yıl bu kanser türünün görülme sıklığı artmaktadır (7). Bu kanser türüne yönelik tanı ve tedavi geliştirmek için ayrılan bütçe ve imkanlar oldukça azdır. Mesane kanseri gelişimi bireysel olarak çok çeşitlilik göstermekte olup, bu durumun tedavi sınıflaması konusunda çeşitli zorluklara yol açtığı belirtilmektedir. Kanserde bireysel farklılıklara yönelik tedavi yaklaşımları tedavide başarı artışının sağlanması için günümüzde uygulanma maliyeti yüksek fakat daha başarılı sonuçlara götüren yaklaşımlardır.

Türkiye' ye kıyasla Avrupa Birliği ülkelerinde mesane kanseri hastalarına uygulanan tedavi ve bakımda farklılıklar söz konusudur. Yeni tanı konmuş bir kas invazif mesane kanseri hastasına, tercih ettiği tedaviye karar vermeden önce danışmanlık sağlanmaktadır. Bu danışmanlık hem hastanın hem de tümörün özelliklerine ve her bir tedavi seçeneğinin yan etkilerine (akut ve uzun dönemli) dayanmalıdır. Ürologlar, medikal onkologlar, radyasyon onkologları ve psiko-onkologları içeren bir multidisipliner ayaktan hasta viziti gerçekleştirilmesi ve bunun yanı sıra her üroloji bölümünde özel bir 'mesane kanseri birimi' olması gerektiği üzerinde durulması gereken konulardır (7).

Mesane kanseri insidansında ırksal-etnik farklılıklar gözlemlenmiştir. Bu durumun asetilatör fenotipe ki (NAT2) farklılıktan kaynaklanmakta olduğu düşünülmektedir. Beyazların , siyah tenlilere oranla daha yüksek oranda yavaş asetilatör fenotipi taşımaları nedeniyle mesane kanseri riski artış göstermektedir. Yavaş asetilleyci taşıyıcılarının, ırk ve sigara içme durumuna bakılmaksızın hızlı asetilleycilerden daha yüksek ABP-hemoglobin katkı seviyesine sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca yaş açısından değerlendirildiğinde ise mesane kanserinin ileri yaş hastalığı olduğu görülmektedir. TCC' lerin kabaca %80' i 60 yaş ve üzeri kişilerde her iki cinsiyette de görülür. Genel olarak bakıldığında ise ömür boyu karsinojen ve

prokanserojenlere maruz kalmanın kümülatif etkilerinin ileri yaşlarda hastalığın belirmesinde etkili olduğunu düşündürmektedir (31).

Bunun yanında bireyler arası polimorfik çeşitliliğin de olası kanser türlerinde risk faktörlerini etkilediği bilinmektedir. Türk toplumunda prostat kanserli hastalarda, VDR geninde daha önce tanımlanmış olan 8. introndaki BsmI ve ApaI ve 9. ekzondaki TaqI polimorfizmleri ile sporadik prostat kanserinin gelişimi arasındaki ilişki üzerine yapılan çalışmada, ApaI “a” allelinin risk faktörü olabileceği bulunmuştur (57).

Yapılan çalışmalarda mesane kanserinin gelişiminin kalıtımsallığı da sorgulanmıştır. Birinci derece akrabalarda risk artışı belirlenmiş fakat ikinci ve üçüncü derecede ki akrabalarda daha büyük risk taşıdığı gözlemlenmesi mesane kanseri gelişimine neden olan gen yerleşimleri açısından birçok soruyuda beraberinde getirmiştir. Kadın ve erkek arasındaki mesane kanseri görülme sıklığı arasındaki fark bir hipoteze göre CYP1A2 aktivitesine dayanmaktadır (31).

In vitro deneyler kanser tedavisinde kemoterapötiklerin etkisini arttırıcı ve istenmeyen yan etkilerinin azaltılması için çeşitli maddeler yardımıyla kompleks sistem üzerinde önemli ipuçları sağlayan araçlardır. Kanser de Vitamin D ve analoglarının da kemoterapötiklerin etkilerini arttırmak ya da azaltmak konusunda yardımcı olabileceği düşünülmektedir. 1,25-Dihidroksikolekalsiferol (kalsitriol), Vitamin D’ nin aktif formu olup, kemik ve mineral metabolizmasındaki geniş etkileri ile bilinmektedir. Epidemiyolojik veriler bizlere düşük Vitamin D seviyelerinin prostat kanseri ve olası diğer tümörlerinin gelişmesinde katkısı olabileceğini göstermektedir. Kalsitriol birçok malign hücre tipinde etkili potansiyel bir anti-proliferatif ajandır. Prostat, meme, kolorektal, baş/boyun ve akciğer kanseri, lenfoma, lösemi ve miyeloma sistem modellerinde in vivo ve in vitro önemli bir anti-tümör aktiviteye sahiptir. Kalsitriol hücrede G0/G1 kaçışını arttırarak, hücreyi apoptoza ve farklılaşmaya doğru götürür bununla birlikte büyüme faktörleri reseptörlerinin ekspresyonunu arttır. Glukokortikoidler kalsitriolün anti tümör potansiyelini arttırlarken, kalsitriole bağlı hiperkalsemiyayı düşürücü etki yapmaktadırlar. Bunun yanında kalsitriol birçok sitotoksik ajanın anti-tümör potansiyelini ortaya çıkartırken tümör hücrelerinin hareket ve yayılım kabiliyetini etkiler ve yeni damar oluşumunu uyarmaktadır (50).

Vitamin D’ nin hiperkalsemik etkileri kanser tedavisinde kullanımı konusunda kısıtlayıcı etmenlerden biridir. Vitamin D’ nin ve analoglarının kanser hücreleri

üzerinde antiproliferatif etkilerinin terapötikler ile birlikte kullanımında, bu etkiyi arttırılabileceği düşünülmektedir. Hiperkalsemik etkiyi azaltıcı analogları üzerinde yapılacak çalışmalar bu konudaki kısıtlayıcılığı azaltıcı alternatifler olabilme potansiyeli taşımaktadır (45).

Literatürde yer alan bilgilerde daha çok mesane kanseri vitamin D ilişkisine yönelik hastaların beslenme ve vitamin D serum seviyeleri üzerinde durulmaktadır. Bu çalışmalardan bazıları mesane kanseri ve diğer kanser türleri ile vitamin D arasında ilişki olabileceğini belirtirken bazıları ise ilişki olmadığını belirtmektedir. Örneğin, Michaud ve arkadaşlarının 2000 yılında yaptıkları 12 yıllık izleme dayalı 320 mesane kanseri vakasında makrobesinler ve aldıkları toplam kalori miktarı arasında mesane kanseri ile ilişki kurulamamıştır. Benzer olarak diyetle alınan potasyum, sodyum, kalsiyum, magnezyum, fosfor, demir veya suyla çözülebilen vitaminler ve mesane kanseri riski açısından herhangi bir ilişki bulunamamıştır. Toplam vitamin E alımı ve düzeyleri açısından mesane kanseri riski ile artan risk gözlemlenmiştir (81).

Farklı kanser türlerinde ki vitamin D ilişkisine yönelik Danimarka’ da 217,244 kişilik popülasyonda yapılan çalışmada ortalama 46 nmol/L (IQR 27–67 nmol/L) lık Vitamin D seviyesine sahip bireyler dahili edilmiştir. Non-melanoma deri kanseri en yüksek sayıda bireye sahiptir, bunu meme, akciğer ve prostat kanseri izlemiştir. Ortalama 10 nmol/L lık Vitamin D seviyesine sahip bireyler ile meme, kolorektal, üreter, over ve rahim kanseri arasında ilişki kurulamamıştır. Bunun yanında Vitamin D’ nin daha yüksek dozları non-melanoma ve melanoma deri kanseri, prostat ve hematolojik kanserler ile yüksek insidansları arasında ilişki kurulmuş fakat akciğer kanserinin düşük insidansı ile ilişki kurulmuştur. Çalışmalarında vitamin D seviyeleri birçok kanser türünde artan insidansla ilişkilendirilememiş, fakat Vitamin D yüksek insidansla ilişkilendirilmedi deri, prostat, ve hematolojik kanserler ile ve akciğer kanserinin düşük insidansı ile ilişkilendirilmiştir.

RT-112, MGH-U4, J-82, MGH-U3 hücrelerinde kalsitriolün FGFR3, p21, p27, alfa-Tubulin ekspresyonu üzerinde etkisinin saptandığı çalışmada, FGFR3’ ün ürettiriyal mesane kanserinde en çok etkilenen genlerden biri olduğu ve kalsitriol konsantrasyonlarının artan ürettiriyal kanser riski ile ilişkili olduğunu belirtmektedir. Dolayısıyla mesane kanseri olgularının yer aldığı deneysel çalışmalara bakıldığında

yüksek sayıda olgunun düşük Vitamin D seviyelerine sahip olduğu görülmektedir. Vitamin D' nin mesane kanseri ile ilişkisinin tam olarak saptanması için deneysel çalışmaların tekrarlanması ve moleküler çalışmalara ağırlık verilmesi gerekmektedir. Mesane kanseri ve Vitamin D' ye yönelik çalışmaların artırılması biyomarkerlar bulunması ve bireysel çeşitlilik gösteren bu hastalığa karşı tedavide daha yüksek başarı elde edilmesini sağlayabilecektir (82,106).

Çoklu model sistemlerde (Murin singenik SCC VII/SF, metastatik Dunning rat prostat adenokarsinoması ve insan ksenograf PC-3 prostat), yapılan çalışmada kalsitriolün in vivo ve in vitro da önemli antiproliferatif etkileri olduğu öne sürülmektedir. Metastatik sıçan Mat-LyLu (MLL) modeli, kalsitriolün tümör büyümesini inhibe ettiği, ayrıca akciğer metastazının genişliği ve sayısında azalmaya yol açtığı belirtilmiştir. Kalsitriolün tümör hücrelerinde G0/G1' den kaçışına yol açtığı ve hücre döngüsü regülatör proteinlerinin ekspresyon seviyelerini değiştirdiği saptanmıştır. In vitro koşullar altında kalsitriol uygulaması, p21 mRNA ve protein seviyelerinin ve Rb defosforilasyonunun ekspresyonunu azalttığı belirlenmiştir. In vivo kalsitriol ile uyarılmış tümör hacminde ki düşüş, intratümöral p21 ekspresyonunda ki önemli düşüş ile ilişkilendirilmiştir. Yapılan Western Blot çalışması ile 10 nM (yarı düzey IC50) kalsitriol muamele edilmiş MLL hücrelerinde 90-100% PARP ayrılması tespit edilmiştir. Kalsitriol ile muamele edilen MLL hücrelerinde bax değişmediği fakat bcl-2 seviyesinin 24 saat sonunda düştüğü; bu durum bax/bcl-2 oranında yükselmeye yol açarken hücreyi ölüme götürdüğü saptanmıştır (50).

T24, UM-UC-3, 5637 and 293T hücre serilerinde yapılan bir çalışmada Vitamin D3 metabolizmasını regüle eden CYP27A1 enziminin kolesterol homeostazisi ile ilişkili olduğu ve mesane kanseri gelişimi ve ilerlemesiyle ilgili rolü olduğu bununla birlikte over ekspresyonunun mesane kanseri hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Hücrelerin yüksek seviye LDL' ye maruz bırakılması sonucu proliferatif etki gözlemlenmiştir. Yapılan klinik çalışmalarda, mesane düşük derece ve yüksek derece kanser hastalarında AR ekspresyonu karşılaştırıldığında farklılık saptanmamıştır, fakat bazı bağımsız çalışmalar androgenler-AR sinyallerinin mesane kanseri hücrelerinde proliferasyonu arttırabileceğini öne sürmektedir. Bunun yanında mesane

kanser hücresi AR geni knockdown edildiğinde hücre apoptoze doğru gitmektedir. Liang Z. ve ark. yaptığı çalışmada AR -pozitif mesane kanseri T24/UM-UC-3 hücre serilerinde CYP27A1' in çok az eksprese edildiği tespit edilmiştir. Mesane kanseri hücrelerinde CYP27A1/27-HC disregülasyonunun da önemli derecede proliferasyona sebep olduğu gösterilmiştir (107).

Vitamin D' nin proliferasyon üzerine olan etkilerini dikkate aldığımızda mesane kanseri gelişiminde rol oynama olasılığı değerlendirilebilmektedir. Bunun yanında mesane kanseri ve vitamin D ilişkisi üzerine yapılan çalışmalar son derece kısıtlıdır. Mondul A.M. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada serum vitamin D ve mesane kanseri ile kuvvetli bir ilişki saptanamamıştır. Bunun yanında bu çalışmanın ileri çalışmalarla desteklenmesi gerektiğini çünkü hastalar arası sigara kullanımı, yaş, cinsiyet, vitamin D arası farklılıkların oldukça fazla olduğu belirtilmiştir (108). Yakın zamanlı çalışmalar ise mesane kanseri ve Vitamin D arasında bağlantı olabileceğini belirtmektedirler. Üreteliyal kanserin agresif formlarında düşük plazma 25(OH)D3 seviyesinin hastalığın kötü prognoz göstermesinde etkili olabileceğini belirten çalışmalar bulunmaktadır. Kalsitriolün proliferasyonu, apoptozu ve hücre adhezyonunu regüle edici fonksiyonunun tümör gelişiminde etkisinin olabileceği ve ayrıca tümör bağlantılarına anjiyogenez, invazyon ve metazas vasıtasıyla mikroçevre ile etkileşimi sonucu etkileyebileceği düşünülmektedir. Kalsitriol kansere sebebiyet verdiği düşünülen oksidadif DNA hasarını da azaltması ile koruyucu etki gösterebilmektedir (82).

Çalışmamızda ilk aşama da mesane kanseri ile ilişkili T24, ECV-304 hücre hattı, kontrol olarak kullandığımız HUVEC hücre hattı ile vitamin D' nin sitotoksik etkisini belirlemeyi amaçladık. Çalışmamızda kullanılan hücre hatlarından ECV-304, geçmiş yıllarda mesane kanseri hücre hattı olarak belirlenmiş fakat ilerleyen zamanda yayınlarda HUVEC adlı hücre soyundan transforme olduğu ve çapraz kontaminasyona uğradığı düşünülen hücre hattıdır (33). Bununla birlikte ECV-304'ün mesane kanseri hücre hatlarından T24/83 ile genetik identifikasyon gösterdiğini belirten bir araştırmada bulunmaktadır (83).

ECV-304 hücre hattının HUVEC (umbilical ven endotel hücreleri) hücrelerinden spontane olarak transforme olan kültür soyu olduğu belirtilmektedir. Bir

çok morfolojik immünokimyasal ve genetik çalışmalar ECV-304' ün kıymetli biyomedikal araştırma aracı olduğunu ve in vitro anjiyogenezis ve G protein-eş reseptörü varyasyonu sinyal transdüksiyonu için kullanılabileceğini vurgulamaktadır. Bunun yanında ECV-304 ve HUVEC arasındaki farklar bulunmaktadır ve ECV-304 ve T24/83 (insan mesane kanseri hücre hattı) arasındaki genetik benzerliği belirtmektedir. T24/83 ve ECV-304 genetik analizler de genetik olarak özdeş bulunmuştur. ECV-304 spesifik büyüme faktörleri yokluğunda tipik olarak endotelial morfolojiye sahiptir (84). Bunun yanında bu hücre hattı endotelial hücre markırı von Willebrand Factor markırından yoksundur. Endotelial hücre hattı yerine daha çok metastazik hücre hattına benzerliği yüksek olan ECV-304 hücre hattı epitelial hücre markerları olan sitokeratin 6, 8, 10, 17, 18, ve 19 (86) kalsitonin reseptörlerini açısından pozitif ekspresyon göstermektedir (85). Bu fenotipik farklar Avrupa Hayvan Hücre kültürleri Koleksiyonları (ECACC) tarafından kanıtlanmıştır ve ECV-304 ve mesane kanseri hücre hattı T24/83 arasında ki genetik özdeşlik, yapılan bir çalışmada DNA parmakizi metoduyla gösterilmektedir (83).

Biz çalışmamızda T24, ECV-304 ve HUVEC hücre hatlarının değerlendirmesinde kullandığımız kimyasallara olan sitotoksik, apoptotik ve P-gp değerlendirmelerinde farklı sonuçlara ulaşmış bulunmaktayız. İki hücre hattı da kalsitriolün ve sisplatinin farklı dozlarına farklı sitotoksik tepkiler vermiştir. Çalışmamızda kullandığımız hücre hatları ile ulaştığımız sonuçlarımıza göre vitamin D' nin literatürde diğer hücre hatlarında belirtilen yüksek oranda ki anti-proliferatif etkisini saptamadık. Vitamin D' nin ECV-304 hücre hattında en etkin olduğu doz 25-50nM olarak saptandı. Hücre canlılık oranlarında çok büyük bir sitotoksik etkiye sahip olmayan vitamin D' nin T24, ECV-304, HUVEC hücre hatlarında yüksek oranda antiproliferatif etkisi olduğunu söyleyemeyiz. Ancak çalıştığımız hücre hatlarında Vitamin D' nin farklı dozlarında farklı sitotoksik etkiye sahip olduğunu ve bi fazik etki gösterdiği sonuçlarına deneylerimizde ulaştık. Bununla birlikte mesane kanserine yönelik moleküler verilerin arttırılması adına farklı mesane kanseri hücre soyları ile de vitamin D ilişkisinin araştırılması gerektiğini belirtmek isteriz.

Konety B.R. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 253j ve T-24 hücre soylarının kalsitriol ile muamele edildiklerinde proliferasyonun kuvvetli biçimde inhibe olduğunu gözlemlemişlerdir. Normal ve neoplastik mesane dokusu ve hücre soylarının Vitamin D reseptörünü eksprese etmekte olduğundan bahsetmektedirler. Kalsitriol ile muamele edilen kontrol grupları ve hücre soyları apoptotik ilişki açısından farklı tepkiler göstermişlerdir. Bu çalışmanın sonuçları kalsitriolün mesane kanseri ile ilişkisi olabileceğine dair veriler vermektedir (87).

Biz çalışmamızda T24, ECV-304 ve HUVEC hücre hatlarının MTT sonuçlarına göre T24 hücre hattında 24 saat ve 48 saatte kalsitriol uygulaması ile yapılan MTT deney sonuçlarında kalsitriolün bifazik etki gösterdiğini saptamış bulunmaktayız (88).

Buna karşılık kalsitriolün 25nM ve 500nM konsantrasyonlarında anlamlı olarak % canlılık oranında azalma saptanmıştır. 24 saatte kalsitriolün 50nM ve 100nM dozlarında % canlılık oranlarında artış gözlemlendi ve 48 saatte kontrole göre 50nM ve 100nM' da anlamlı bir değişim saptanmamıştır. 72 saatte de 500nM ve 1000nM' da kontrole göre anlamlı bir yüzde canlılık oranında azalma tespit edilmiştir. Yine de elimizde ki sitotoksikite sonuçlarına göre T24 hücre hattında kalsitriol için IC50 sonuçlarına ulaşamadık dolayısıyla kalsitriolün çalışmamızda yer alan hücre hatları üzerinde yüksek oranda anti-proliferatif etkisi olduğundan söz edemiyoruz. Kalsitriolün en etkin anti-proliferatif olduğu doz 24 saatte 25nM olarak bulunmuştur. Daha yüksek dozlarda sitotoksik etkinliğin artmadığı gözlemlenmiştir.

Sisplatinin T24 için MTT sonuç değerlendirmesinde 24 saatte 5µg/ml konsantrasyonda %19' luk canlılık azalması saptanmıştır. 10 µg/ml' de bu oran %44 canlılık azalması oranına ulaşmıştır. 20 µg/ml ve üzeri dozlarda ölüm oranı %82 değerine ulaştığı için 10 µg/ml üzerindeki dozların kullanımı sağlıklı kontrol hücre hattımızla karşılaştırıldığında yüksek oranda canlılığı yok etmesi sebebiyle ilerleyen çalışmalarımızda uygun dozlar olarak kabul edilmemiştir. 48 saatte ise 5 µg/ml sisplatin de T24 hücreleri üzerindeki sitotoksik etki %46 oranına sahip ve 72 saatte ise T24 hücreleri 5 µg/ml sisplatin %57 oranında sitotoksik etki ile hücre ölümüne yol açmıştır. %72 T24' de 5 µg/ml sisplatinden daha yüksek dozlarda kullanım % 60 üzerinde sitotoksik etki göstermiştir.

Kalsitriol ve sisplatinin kombinasyonunu incelediğimizde, literatürde yer alan sisplatin TDC (Test Drug Concentration) dozunun 7,6 µg/ml olduğu belirtilirken (89) bizde verilerimiz doğrultusunda 2,5 µg/ml, 5 µg/ml ve 10 µg/ml dozlarını kullanmayı uygun gördük. Bu dozları tercih etme sebebimiz TDC dozunun altında ve üstünde kullanımının kalsitriol kombinasyonu ile vereceği tepkiyi ölçmektir. Kalsitriol için ise bifazik etkisi de değerlendirilerek 25nM ve 500nM dozlarının 2,5 µg/ml, 5 µg/ml ve 10 µg/ml sisplatin kullanım dozunun anti-proliferasyonu azaltıcı ve etkisini artırıcı fonksiyonunun olup olmayacağını saptamak için kullanılması uygun görülmüştür. Sonuçlara göre, 2,5 µg/ml sisplatin ve 500nM kalsitriol kombinasyonu kontrole göre değerlendirildiğinde anlamlı derecede %35 ölüm oranına sahip olduğu saptanmıştır. Sadece 5 µg/ml sisplatin %19 oranında sitotoksik ölüm oranı vermiştir. 5 µg/ml sisplatin ve 500nM kalsitriol kombinasyonu %44 ölüm oranıyla sitotoksik etkiyi arttırmıştır. Dolayısıyla 500nM kalsitriol ile kombine kullanımı sisplatinin etkisini arttırmıştır. Sadece 10 µg/ml sisplatin ise %43 ölüm oranı göstermiştir. Bu ölçümler ışığında 500nM kalsitriolün T24 hücre hattında sisplatinin TDC dozunun altında kullanımını sağladığı ve anti-proliferatif etkiyi arttırdığını belirtebiliriz.

48 saatte ise 2,5 µg/ml sisplatin ile 2,5 µg/ml sisplatin ve 500nM kalsitriol kombinasyonu karşılaştırıldığında anlamlı olarak canlılığı azalttığı saptanmıştır. 2,5 µg/ml sisplatin ile %33 oranında sitotoksik etki, 2,5 µg/ml sisplatin ve 500nM kalsitriol kombinasyonunda ise bu oran %45'e ulaşmıştır. 48 saatte 5 µg/ml sisplatin dozu ve 500nM kalsitriol ile kombinasyon yapılan dozunda anlamlı bir fark saptanmamıştır. Bu noktada kalsitriolün yarılanma ömrünün 4-6 saat olduğu göz önüne alınırsa ileride yapılacak çalışmalarla kalsitriolün kümülatif doz denemeleri ile değerlendirilmesini uygun bulmaktayız.

Çalışmamızda 24 saatte ECV-304 hücre hattında kullanılan kalsitriol uygulamasında ise en etkin sitotoksik dozlar, %20 oranında sitotoksik etki göstererek 25nM ve 50nM olarak saptanmıştır. Diğer artan dozlar ise kontrole göre anlamsız olarak değerlendirilmiştir. 48 saatte ECV-304 hücre hattı 25-500nM kalsitriol doz aralığında anlamlı bir fark saptanmaz iken 1000nM'da anlamlı olarak % canlılık artışı belirlenmiştir. 72 saate 25nM ve 50nM dozlarında %13- %15 oranında sitotoksik etki gözlenirken 1000nM'da kontrole göre anlamlı olarak %10 canlılık oranında artış saptanmıştır.

24 saat ECV-304 sisplatin uygulamasında 5 µg/ml sisplatin dozu %10 oranında sitotoksik etki göstermiştir. % 50 sitotoksik etki oranına 40 µg/ml sisplatin dozunda ulaşılmıştır. 48 saatte kontrole göre 5 µg/ml sisplatin dozunda anlamlı bir değişim saptanmamıştır. 10 µg/ml sisplatin dozu %46 oranında sitotoksik etki göstermiştir. 50 µg/ml sisplatin dozunda ise %80'lere ulaşan sitotoksik etki saptanmıştır. 72 saatte ise 5 µg/ml sisplatin dozu %60 oranında canlılık azalması saptandı. Geri kalan yüksek dozlar hücreleri yüksek oranda ölümüne yol açtığı için değerlendirmeye alınmamıştır.

Kalsitriol ve sisplatin kombinasyonu açısından değerlendirdiğimizde sisplatin dozlarının tek başına kullanımına kıyasla kalsitriol ile kullanımında herhangi bir anlamlı fark görülmemiştir. Paralel olarak 48 saatte de anlamlı bir fark saptanmamıştır. ECV-304 hücre hattının diğer hücrelere oranla kullandığımız dozlara çok daha dirençli olduğunu söyleyebiliriz.

HUVEC sağlıklı kontrol hücre hattında 24 saatlik MTT deney sonuçlarımızda kalsitriol 25nM uygulamasında %9,46 oranında anlamlı artış görülmekte, 500nM ve 1000nM canlılık oranındaki azalmayla %20 ve %27 oranlarında sitotoksik etki göstermiştir. 48 saatte ise sadece 1000nM da %43 oranında canlılıkta azalma gözlemlenmiştir. 72 saatte ise 25nM da anlamlı bir değişim gözlemlenmemiş, buna karşılık 50nM' da anlamlı değerde %21 oranında sitotoksik etki belirlendi.

HUVEC sisplatin dozlarının değerlendirmesinde 24 saatte 5 µg/ml dozunda %63 oranında canlılıkta azalma görülmüştür. 50 µg/ml dozunda ise %70' lere varan sitotoksik etki saptamıştır. 48 saatte 5 µg/ml sisplatin dozu %76 oranında sitotoksik etki gösterdiği için daha yüksek dozları aşırı ölüm oranına yol açmıştır. 72 saatte de benzer durum saptanmış ve sisplatin-kalsitriol kombinasyon kullanımı değerlendirildiğinde 24 saatte 2,5 µg/ml sisplatin de %33 sitotoksik etki, 2,5 µg/ml sisplatin ve 500nM kalsitriol kombinasyonunda %43 oranında sitotoksik etki saptanmıştır. Ancak 2,5 µg/ml sisplatin ve 500nM kalsitriol ile kombinasyonu karşılaştırıldığında anlamlı değere sahip olmadığı saptandı. 5 µg/ml sisplatin de %63 oranında sitotoksik etki, 5 µg/ml sisplatin ve 500nM kalsitriol de ise %55 oranında sitotoksik etki saptanmıştır. Sadece 5 µg/ml sisplatin ve 5 µg/ml sisplatin-500nM kalsitriol kombinasyonu karşılaştırıldığında MTT sonuçlarına göre ulaşılan veriler anlamlı ($p=0.0473$) bulunmuştur. Bu veriler bize kalsitriolün sağlıklı HUVEC hücre hattında sisplatin ile kombine kullanımında ölüm oranını

düşürdüğünü bu durumunda sisplatinin normal hücreler üzerinde ki toksik etkisini azaltabileceğini düşündürmektedir.

48 saatte 2,5 µg/ml sisplatin %56 oranında sitotoksik etkiye sahipken 2,5 µg/ml sisplatin 25nM kombinasyonunda anlamlı olarak %63 sitotoksik etki saptanmıştır. 5 µg/ml sisplatin %77 oranında canlılığı azaltırken, 5 µg/ml sisplatin ve 500 nM kalsitriol kombinasyonu canlılık oranını %78 oranında düşürmüştür. 5 µg/ml sisplatin, 5 µg/ml sisplatin 500nM kalsitriol kombinasyonları aralarında değerlendirildiğinde anlamlı bir fark saptanmamıştır. 10µg/ml sisplatinin ise canlılık oranını %79 oranında düşürmüştür.

T24, ECV-304, HUVEC hücre hatlarında 24 saatlik 5µg/ml sisplatin ve 500nM kalsitriol ve her iki maddenin kombinasyonu ile yapılan Anneksin V-PI Flow Sitometri sonuçlarına göre; tüm hücre hatlarında apoptoz ve nekroz oranları Tablo 4-5' de yer almaktadır. Sonuçlar değerlendirildiğinde T24 hücre hattında canlı hücre-apoptoz-nekroz da 5µg/ml sisplatin uygulamasının kontrole göre karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Kalsitriol uygulamasında kontrole göre % canlılıkta azalma, total apoptoz oranında anlamlı artış gözlenirken nekroz oranında herhangi bir değişim görülmemiştir. 5µg/ml sisplatin ve 500nM kalsitriol kombinasyonunda ise canlılık oranında anlamlı azalma, total apoptoz oranında anlamlı artış, nekrozda ise anlamlı bir fark saptanmamıştır.

ECV-304 hücre hattında 5µg/ml sisplatin uygulamasında apoptotik oranda anlamlı bir değişim saptanmamıştır. 500nM kalsitriol uygulamasında ise apoptoz oranında kontrole göre anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. 5µg/ml sisplatin ve 500nM kalsitriol kombinasyon uygulamasında herhangi bir anlamlı değişim saptanmamış ve tüm uygulamalarda ki nekrotik oranlar anlamlı bir fark belirlenmemiştir.

HUVEC hücre hattında tüm uygulamalarda nekrotik oranlarda herhangi bir fark belirlenmemiştir. 5µg/ml sisplatin de %39.95 apoptoz oranıyla kontrole göre anlamlı bir artış saptanmıştır. 500nM kalsitriol %14.46 apoptotik yüzde oranıyla kontrole göre azalma göstermiştir. 5µg/ml sisplatin ve 500nM kalsitriol kombinasyon uygulamasında ise %29.84 total apoptoz oranıyla kontrole göre anlamlı bir artış saptanırken sadece sisplatin uygulaması ile karşılaştırıldığında apoptoz oranında anlamlı bir azalma belirlenmiştir. Bu da bizlere sisplatin-kalsitriol birlikte kullanımının canlılık oranında ki düşüşü azalttığını göstermektedir.

Çalışmamızda yer alan P-gp yüzde oranlarını incelediğimizde T24 hücre hattında 5µg/ml sisplatin ve 500nM kalsitriolün tek başına uygulamaları kontrole göre P-gp oranında anlamlı artış göstermiştir. Her iki maddenin kombinasyon uygulamasında ise kontrole göre anlamlı azalma belirlenmiştir.

ECV-304 hücre hattında ise kalsitriolde istatistiksel olarak anlamlı veriye ulaşmamıza rağmen, tüm uygulamalarda ulaşılan değerler birbiri ile benzerlik gösterdi. Dolayısıyla P-gp yüzdeleri açısından ulaşılan değerler birbirinden farklı bulunmamıştır.

HUVEC hücre hattında ise kontrole göre anlamlı 5µg/ml sisplatin uygulaması ile P-gp oranında %86.09 oranıyla azalma saptandı ve 500nM kalsitriol uygulaması ile P-gp oranı %92.50 oranına ulaştı. Bununla birlikte her iki maddenin kombinasyonunda ulaşılan P-gp yüzde değerleri kontrole göre %92.16 anlamlı derecede artış gösterdi. Dolayısıyla P-gp oranları değerlendirildiğinde kalsitriolün sağlıklı hücrede P-gp oranlarını yükselttiği verilerine ulaşmış bulunmaktayız. P-gp yüzde verileri Tablo 4-6' da, anlamlılık oranları Tablo 4-7' de yer almaktadır.

Literatürü incelediğimizde ise sisplatinin P-gp için bir substrat olmadığı belirten yayınlar yer almaktadır (90) ve bu nedenle üretteliyal karsinoma hücrelerindeki (UCC) P-gp ekspresyon çalışmalarının çoğu, sisplatin bazlı kemoterapiye yanıt ile bir ilişki gösteremediği belirtilmektedir (91,92).

UCC'de yapılan son geniş bir çalışma, artmış P-gp ekspresyonunun MVAC' a zayıf bir yanıtla ilişkili olduğunu öne sürse de, bu etki muhtemelen bu rejim içinde sisplatin (doksorubisin yerine pamp kaynaklı ilaç akışı) nedeniyle ortaya çıkmakta olduğu düşünülmektedir. Vinblastin ve bazı durumlarda metotreksat P-gp'nin en iyi bilinen substratlarıdır (93,94,95). Aslında, MVAC ile tedavi edilen hastalarından gelen tümörlerin, tedavi edilmeyen hastalara kıyasla daha yüksek P-gp seviyeleri ifade ettiği bulunmuştur (96,97).

Kim WJ, Kakehi Y. ve ark. çalışmasına göre yüksek P-gp eksprese eden doksorubisine dirençli UCC hücreleri üreten in vitro çalışmalar sisplatin direncinde bir artış göstermediğini belirtmektedir (72,91,98,99).

Yapılan çalışmalar Çoklu İlaç Drenç Protein (MRP)' nin UCC' nin sisplatine verdiği cevabı etkilemediğini göstermektedir. Clifford ve ark. 25 kanser hastasında MRP mRNA düzeylerinin, tümör derecesi ve sisplatin direnci arttıkça seviyeleri

azaldığını göstermiştir (99). Ayrıca MRP mRNA seviyelerinin sisplatin tedavisinden hemen sonra değişmeden kaldığını göstermişlerdir. Kanaliküler multispesifik organik anyon taşıyıcı / MRP2 Kanaliküler multispesifik organik anyon taşıyıcı (cMOAT) / MRP2 pompası, UCC'de sisplatin direncinin modülasyonunda da rol oynayabileceğini belirtmektedirler. Keşfedilmesini açıklayan ilk makalede (100) cMOAT' ın, ekspresyonu azalmış sisplatin birikimi ile ilişkili olduğu T24 UCC hücre hatları dahil olmak üzere, insan kanser hücre hatlarının çeşitli sisplatin dirençli türevlerinde yukarı doğru düzenlendiği gösterilmiştir. P-gp' de olduğu gibi, MVAC ile tedavi edilen hastalardan gelen mesane tümör materyali, tedavi edilmeyen hastalara kıyasla artmış MDR2 ekspresyonu sergilediğini belirtmişlerdir (97) .

P-gp' nin rolü hakkındaki prelinik verinin vaadi, ilaç direncinin üstesinden gelmek için P-gp modulatorleri ile klinik deneyim açısından bir miktar hayal kırıklığı yaratmıştır. Her ne kadar P-gp, ilaçların merkezi sinir sistemi penetrasyonunda çok önemli bir rol oynuyor gibi görünse de, ilaç absorpsiyonu üzerindeki etkisi genel olarak düşünüldüğü kadar önemli olmayabileceği iddia edilmiştir.

Bazı çalışmalarda, P-gp' nin bazı neoplazma tiplerinde prognostik önemi olduğu bildirilmiştir, ancak sıklıkla klinik yanıtla korelasyon göstermediği için sıklıkla başarısız olmuştur. Bu, P-gp' nin klinik olarak alakalı tümör ilaç direncindeki kesin rolü hakkında çok fazla tartışmaya neden olmuştur. Kesin eylem süreci şaşırtıcı bir problem olmaya devam etmektedir. MDR proteinlerinin kendi başlarına ilaç taşımaması, ancak iyon aktarımını veya sinyal iletimini değiştirmesi, ilaç dağıtımını etkilemektedir (72).

Çalışmamızda yer alan DNA Docking verilerine göre ise kalsitriol ve sisplatinin p53 proteini karşısında ki etkinlik düzeyi de simülatif olarak değerlendirilmiştir. Bu noktada p53'ün sisplatinin ana hedeflerinden biri olduğu ve p53' de yer alan değişikliklerin kemoterapiye verilen yanıtta rol oynayabileceği düşüncesi ile yola çıkılmıştır. Ulaşılan verilere göre kalsitriolün p53 proteini karşısında sisplatine göre daha yüksek oranda etkileşime sahip olduğu saptanmıştır. Ayrıca T24 hücre hattının p53 mutasyonuna sahip olduğu literatürde belirtilmektedir.

Yapılan çalışmaları incelediğimizde p53 durumu kemoterapi ya da cerrahi işlemlere verilecek cevabı saptamada yardımcı olduğu belirtilmektedir. Sarkis ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada p53 bozulmasının, invazif mesane kanseri hastalarında M-VAC (methotrexate, vinblastin, doksurubisin ve sisplatin) ile tedavide başarısızlık ve

sağ kalım konusunda bir belirteç olduğunu göstermişlerdir. Tersine ise Cote ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise anormal p53 ekspresyonuna sahip lokal ve bölgesel TCC hasta grubunun sisplatin bazlı adjuvan kemoterapiden fayda gördüklerini bulmuşlardır (31,101,102).

Yapılan başka bir çalışmada P53 geninin mutasyonları son zamanlarda siklofosamid ile ilişkili mesane tümörü taşıyan hastaların neredeyse %50' sinde tespit edilmiştir. Fakat bunların siklofosamid ve metabolitlerine bağlı olup olmadığı ya da mesane kanseri ileri seviye düzeyiyle ilişkili olduğu için mi böyle olduğu tam olarak tespit edilememiştir (103).

Sisplatinden ek olarak fayda görebilecek hastaları belirlemek için p53 durumunu kullanma girişimleri ilk olarak p53 değişiklikleri olan mesane kanseri hastalarda MVAC kemoterapisine yanıt verme olasılıklarının daha yüksek olduğunu belirleyen eski bir çalışma ile belirlenmiştir. Bununla birlikte, başka klinik çalışmalar bu gözlemi desteklememiştir (102,104).

P53 değişikliklerinin prognostik değerini belirlemeye çalışan daha yeni bir Faz III çalışmasında, MV53 kemoterapisine verilen yanıtın p53 durumu ile kemoterapötik yanıt arasındaki herhangi bir korelasyonu doğrulayamadığı gösterilmiştir (105). Sonuç olarak ulaştığımız verileri değerlendirdiğimizde kalsitriolün T24, ECV-304 ve HUVEC hücre hatlarında 25nM -1000nM dozları aralığında IC50 dozuna ulaşamadığımızı, bununla birlikte kalsitriolün farklı dozlar da bifazik etki gösterdiğini belirtmekteyiz. Bir çok hücre tipinde reseptörünün bulunması ve 2000'in üzerinde gen ile ilişkisinin bulunduğu göz önüne alındığında önemli bir regülatör eleman olduğunu söyleyebiliriz. Belirli dozlar da anti-proliferatif etki gösterirken, belirli dozlarda proliferatif etkiyi artırması, doza bağımlı değişken tepkiler verdiğini göstermektedir.

Verilerimiz ışığında sisplatin ile kalsitriolün birlikte kullanımının yüksek oranda olmasada mesane kanseri hücre hattı T24' te anti-proliferasyonu arttırdığı ve sağlıklı kontrol HUVEC hücre hattında sisplatin ile kullanımında canlılık oranını az da olsa arttırdığını saptadık. Sisplatinin kalsitriol ile kombine kullanımının, sisplatin normal kullanım dozunun altında kullanıma imkan verdiği T-24 hücre hattında P-gp seviyesini düşürdüğü ve bu kombinasyonun HUVEC hücre hattında P-gp seviyesini yükselttiği gözlemlenmiştir. Bu veriler bize kalsitriolün kemoterapide yaygın olarak kullanılan ve yan etkisi oldukça fazla olan sisplatin ve türevleri ile kemoterapötik kullanımını azaltıcı

ve sağlıklı hücrenin hayatta kalmasına katkıda bulunabileceğine dair ipuçları vermektedir.

Sunulan projemiz, gelecekte farklı hücre hatları üzerinde yapılacak Vitamin D doz çalışmalarından ulaşılacak bilgiler ile, kalsitriolün çeşitli moleküler yollar karşısında hücresel tepkilerinin ölçölmesi, kalsitriolün farklı analoglarının geliştirilmesi bununla birlikte gelecekte mesane kanseri de dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinde kemoterapi etkinliğini arttırmak adına bizlere önemli bilgiler sunma ve kanserde tedavi etkinliğini arttırma açısından yüksek oranda katkı sağlama potansiyeline sahiptir.



6. KAYNAKLAR

1-Parkin, D.M. The global burden of urinary bladder cancer. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology* 2010; Volume 42, Issue 218. <https://doi.org/10.1080/03008880802285032>

2-Altaylı, E., Güneş, S. Mesane Kanseri Gelişiminde Moleküler Mekanizmaların Rolü. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Science* 2011; 31,(1).

3- Genç, A., Sevim, D.G., Özen, A.T., Yılmaz, G., D. Vitamininin Çeşitli Hastalıklarda ki Nadir Kullanım Alanları. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası* 2015; 68, (2). DOI: 10.1501/Tıpfak_0000000890.

4-Bernardi, R.J., Johnson, C.S., Modzelewski, R.A., Trump, D.L. Antiproliferative effects of 1 alpha, 25- dihydroxy vitamin D3 and vitamin D analogs on tumor-derived endothelial cells. *Endocrinology* 2002; 143: 2508-14. 19.

5- Chen, S.T., Pan, T.L., Tsai, Y.C. Huang, C.M. Proteomics reveals protein profile changes in doxorubicin-treated MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Letters* 2002; 181: 95-107. 20.

6- Florea A.M., Büsselberg D. Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effect. *Cancers* 2011; 3: 1351-1371; doi:10.3390/cancers3011351

7-ECPC Mesane Kanseri İlişkin Bilgiler: European Cancer Patient Coalition (İnternette) 2016. Erişim 15.12.2017, http://www.ecpc.org/Mesane_TR.son.pdf

8-Yarıř F., Sabuncu H.H. Mesane Kanserinde Etiyolojik Faktörler. *Türk Aile Hekimleri Dergisi*.2002; 6(2): 63-68.

9-Scardino PT, Lineham WM, Zelefsky MJ, Vogelzang NJ. editörler. *Comprehensive Textbook of Genitourinary Oncology*. (4. Baskı). Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins. 16:295-316. 2011.

10-ACS About Bladder Cancer. American Cancer Society. (İnternette).2016 Ocak. Erişim 15.07.2016, <https://www.cancer.org/cancer/bladder-cancer/about.html>.

11- ASCO. Bladder Cancer. American Society of Clinical Oncology. (İnternette) 2017, Ekim) Erişim 17.12.2017, <https://www.cancer.net/cancer-types/bladder-cancer>.

12-Martini FH, Timmons MJ, Tallitsch RB. Human Anatomy. (7. Baskı). San Francisco: Pearson Benjamin Cummings. 2012.

13- NCI. Bladder Cancer Treatment (PDQ®): Health Professional Version. National Cancer Institute. 2018, 12 Nisan. Erişim 10.12.2018, <https://www.cancer.gov/types/bladder/hp/bladder-treatment-pdq>.

14-NCI. Surveillance Epidemiology and End Results (SEER), SEER Training Modules: Anatomy of the Bladder. National Cancer Institute. 2018, Ekim 12.. Erişim 12.11.2018 : <https://training.seer.cancer.gov/bladder/anatomy/>.

15- Al-Shamsi H, Hansel DE, Bellmunt J, Siefker-Radtke AO. Uncommon cancers of the bladder. Raghavan D. editörler. Textbook of Uncommon Cancer. (5. Baskı). Wiley Blackwell. 5:41-53. 2017

16-Feldman AS, Efstathiou JA, Lee RJ, Dahl DM, Michaelson MD, Zietman AL, DeVita VT Jr, Lawrence TS, Rosenberg SA. Cancer: Principles and Practice of Oncology. Cancer of the bladder, ureter, and renal pelvis. (10. Baskı). Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins. 65:896-916. 2015

17-Humphrey PA., Moch H, Cubilla AL., Ulbright TM, Reuter VE. WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs - Part B: Prostate and Bladder Tumours. *European Urology*. 2016, 70(1):106-119.: [https://www.europeanurology.com/article/S0302-2838\(16\)00205-0/fulltext](https://www.europeanurology.com/article/S0302-2838(16)00205-0/fulltext).

18- *Merck Manual Professional Edition*. Kenilworth, NJ: Merck Sharp & Dohme Corp. 2017. Erişim: July 31, 2018. <https://www.merckmanuals.com/en-ca/professional/genitourinary-disorders/genitourinary-cancer/bladder-cancer>.

19-Kadlubar FF, Badawi AF. Genetic susceptibility and carcinogen-DNA adduct formation in human urinary bladder carcinogenesis. *Toxicol Lett*. 1995;82-83:627-632.

20- Butler MA, Iwasaki M, Guengerich FP.,Kadlubar FF. Human cytochrome P450PA (P-450IA2), the phenacetin O-deethylase, is primarily responsible for the hepatic 3-demethylation of caffeine and Noxidation of carcinogenic arylamines. *Proc Natl Acad Sci* . 1989; 86:7696-7700.

21-. Risch A,Wallace DM,Bathers, Sim E. Slow N-acetylation genotype is a susceptibility factor in occupational and smoking related bladder cancer. *Hum Mol Genet*. 1995;4:231-236

22- Mitra AP, Cote RJ. Molecular pathogenesis and diagnostics of bladder cancer. *Annual Review Pathology* 2009;4:251-285.

23- Lopez-Knowles E, Hernandez S, Malats N. PIK3CA mutations are an early genetic alteration associated with FGFR3 mutations in superficial papillary bladder tumors. *Cancer Research*; 2006; 66:7401-7404.

24- Kompier LC, Lurkin I, van der Aa MN. FGFR3, HRAS, KRAS, NRAS and PIK3CA mutations in bladder cancer and their potential as biomarkers for surveillance and therapy. *PLoS One*; 2010; 5:13821

25- Mitra AP, Datar RH, Cote RJ. Molecular pathways in invasive bladder cancer: new insights into mechanisms, progression, and target identification. *Journal of Clinical Oncology* 2006 ; 24:5552-5564.

26- Wu XR. Urothelial tumorigenesis: a tale of divergent pathways. *Nat Rev Cancer* 2005; 5:713-725.

27- Kubota Y, Miyamoto H, Noguchi S. The loss of retinoblastoma gene in association with c-myc and transforming growth factor-beta 1 gene expression in human bladder cancer. *Journal of Urology* 1995;154 371-374

28- Küçükodacı Z., Yörükoğlu K. Mesane Ürotelyal Kanserlerinin Tanısal Prognostik Moleküler Özellikleri ve Yeni Tedavi Yaklaşımları; *Bulletin of Urooncology* 2015;14:258-270

29- Bringuier PP, Umbas R, Schaafsma HE, Karthaus HFM. Debruyne, FMJ. , and Schalken, J. A.. Decreased E-cadherin immunoreactivity correlates with poor survival in patients with bladder tumors. *Cancer Research*. 1993;53:3241-3245.

30- Lipponen PK, Eskelinen MJ. Reduced expression of E-cadherin is related to invasive disease and frequent recurrence in bladder cancer. *Journal of Cancer Res Clin Oncol*. 1995;121:303-308.

31- Jung I. ve Messing E. Molecular Mechanisms and Pathways in Bladder Cancer Development and Progression; *Cancer Control* 2000; Vol.7, No.4 syf: 325-334

32-Ürolojik Onkoloji Bülteni. Mesane Kanseri 2018; **Cilt 2** -Sayı 1: 11-19 ISSN 2564-6699

33- Zuiverloon T.C.M, Jonga F.C, Costello J.C., Theodorescu D. Systematic Review: Characteristics and Preclinical Uses of Bladder Cancer Cell Line. *Bladder Cancer* (2018), 4; 169–183 DOI 10.3233/BLC-180167

34-Holick M.F. "Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease ". *Am J Clin Nutr.* 2004; 80(6 Suppl):1678S-88S.

35-Crissey S.D, Ange K.D, Jacobsen K.L., Slifka KA., Bowen P.E., Spuntzakis M.S. et al. Serum concentrations of lipids, vitamin D metabolites, retinol, retinyl esters, tocopherols and selected carotenoids in twelve captive wild felid species at four zoos. *The Journal of nutrition* 2003; 133 (1): 160–6.

36-Fidan F., Alkan B.M., Tosun A.; Çağın Pandemisi: D Vitamini Eksikliği ve Yetersizliği; *Turkish Journal of Osteoporosis* 2014; 20: 71-4.

37-Barinaga M. From bench top to bedside. *Science*, 1997; 278:1036–39.

38-Cross HS. Extrarenal vitamin D hydroxylase expression and activity in normal and malignant cells: Modification of expression by epigenetic mechanisms and dietary substances. *Nutr. Rev.* 2007; 65:S108–S112.

39- Harbeck N, Salem, M, Nitz U, Gluz O, Liedtke C. Personalized treatment of early-stage breast cancer: present concepts and future directions. *Cancer Treat. Rev.* 2010; 36(8), 584-594.

40- Robsahm TE, Tretli S, Dahlback A, Moan J. Vitamin D3 from sunlight may improve the prognosis of breast, colon and prostate cancer (Norway). *Cancer Causes Control*, 2004; 15:149–158.

41- Tuohimaa P. Vitamin D, aging, and cancer. *Nutr. Rev.* 2008; 66:S147–S152.

42- Johnson B.R.J., Modzelewski RA, Trump DL. Antiproliferative effects of 1 alpha, 25- dihydroxy vitamin D3 and vitamin D analogs on tumor-derived endothelial cells. *Endocrinology* 2002; 143:2508–2514.

43- Chen ST, Pan TL, Tsai YC and Huang CM. Proteomics reveals protein profile changes in doxorubicin-treated MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Lett.* 2002; 181: 95-107

44-Hines SL, Jorn HKS, Thompson KM, Larson JM. Breast cancer survivors and vitamin D: A review. *Nutrition*, 2010; Vol: 26, issue 3, page; 255–262.

45- Bemd GJCM, Chang GTG. Vitamin D and Vitamin D Analogs in Cancer Treatment. *Current Drug Targets*, 2002; 3,85-94.

46- Gissel T, Rejnmark L, Mosekilde L, Vestergaard P. Intake of vitamin D and risk of breast cancer; A meta-analysis; *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 2008; 111, 195–199.

47- Reichrath J, Friedrich M, Vogt T. Vitamin D and its analogs in cancer prevention and therapy. *Anticancer Res.* 2012; 32:209–210.

48-Trump D.L. Calcitriol and cancer therapy: A missed opportunity; *Bone Reports* 2018; 9, 110–119

49- Studzinski G.P., Gocek E., Danilenko M.; *Vitamin D*, Vitamin D Effects on Differentiation And Cell Cycle (3rd ed), USA. *Elsevier* 2011; Bölüm 84; syf:1625-1656

50- Trump D.L., Hershberger P.A., Bernardi R.J., Ahmed S., Muindi J., Fakih M., Yu W.D., Johnson C.S. Anti-tumor activity of calcitriol: pre-clinical and clinical studies, *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 2004; 89–90 519–526.

51- Jimenez-Lara Ana B. Colorectal cancer: Potential therapeutic benefits of Vitamin D. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2006; Volume 39, Issue 4, pp. 672–677

52- Rosli SNZ, Shintani T, Hayashido Y., Toratani S., Usui E., Okamoto T. 1- α 25(OH)2D3 down-regulates HBp17/FGFBP-1 expression via NF- κ B pathway. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 2013; Volume 136, Syf. 98-101

53- Zhuang S-H, Burnstein KL. Antiproliferative Effect of 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3 in Human Prostate Cancer Cell Line LNCaP Involves Reduction of Cyclin-Dependent Kinase 2 Activity and Persistent G1 Accumulation. *Endocrinology* 1997 Vol. 139, No. 3

54- Shah S, Islam MD, Dakshanamurthy S Rızvi I., Rao M., Herrell R. et al. The Molecular Basis of Vitamin D Receptor and β -Catenin Crossregulation. *Molecular Cell* 2006; Volume 21, Issue 6, Syf. 799–809

55- Salehi Tabar R, Nguyen-Yamamoto L, Tavera-Mendoza L.E.,Quail T., Dimitrov V., An B.S. et al. Vitamin D receptor as a master regulator of the c-MYC/MXD1 network. *PNAS* 2012; vol. 109 no. 46, Syf. 18827–18832

56-Deeb K.K., Trump D.L., Johnson C.S. Vitamin D signaling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nature Reviews Cancer* 2007; 7, 684-700

57- Ekmekçi A., Konaç E., Önen H. İ. Gen Polimorfizmi ve Kansere Yatkınlık; *Marmara Medical Journal* 2008; Cilt 21, Sayı 3, 282-295

58- Wang J, Slominski A, Tuckey Janjetovic Z.,Kulkarni A., Chen J. et al. 20-Hydroxyvitamin D3 Inhibits Proliferation of Cancer Cells with High Efficacy while Being Non-toxic. *Anticancer Res.* 2013; 32(3): 739–746.

59-Xie S.P., Pirianov G., Colston K.W. Vitamin D analogues suppress IGF-I signaling and promote apoptosis in breast cancer cells. *EJOC* 1999; Volume 35, Issue 12, Syf.. 1717–1723

60- Dormoy V, Beraud C, Lindner V Coquard C., Barthelmebs M., Brasse D., et al. Vitamin D3 triggers antitumor activity through targeting hedgehog signaling in human renal cell carcinoma. *Oxford Journals Carcinogenesis* 2012; Vol 33, Issue 11, pp. 2084-2093

61- Samuel ve Sitrin Vitamin D's role in cell proliferation and differentiation. *Nutr Rev.* 2008; 66(10 Suppl 2):S116-24

62- Narvaez CJ, Byrne BM, Romu S. Valrance M., Welsh J.E. Induction of apoptosis by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in MCF-7 Vitamin D3-resistant variant can be

sensitized by TPA. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2003; Volume 84, Issues 2–3, Pages 199–209

63- Blutt SE, McDonnell TJ, Polek TC Wigle N.L. Calcitriol-Induced Apoptosis in LNCaP Cells Is Blocked By Overexpression of Bcl-2. *Endocrinology* 2000; Vol. 141, No 1

64- McGuire T.F., Trump D.L., Johnson C.S. Vitamin D3 induced Apoptosis of Murine Squamous Cell Carcinoma Cells". *J. Biol. Chem.* 2001, 276:26365-26373,

65- Guzey M., Kitada S., Reed C.J. Apoptosis Induction by 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3 in Prostate Cancer 1. *Mol Cancer Ther* 2002;1:667-677.

66- Hillyer RL, Sirinvasin P, Joglekar M., Sikes R.A., Golen K.L., Nohe A. Differential effects of vitamin D treatment on inflammatory and non-inflammatory cancer cell lines. *Clin Exp Metastasis* 2012; 29:971–979

67- Diaz GD, Paraskeva C, Thomas M.G., Binderup L. ve Hague A. Carcinoma Cells: Possible Implications for Prevention and Its Analogue EB1089 in Colorectal Adenoma and Apoptosis Is Induced by the Active Metabolite of Vitamin D3 Therapy. *Cancer Res* 2000; 60, pp. 2304-2312.

68- Galluzzi L., Senovilla L., Vitale I., Michels J., Martins I., Kepp O., Castedo M., ve Kroemer G. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene* 2012; 31, 1869–1883; doi:10.1038/onc.2011.384; 5

69- Ma Y., Yu W.D., Trump D.L. ve Johnson C.S. 1,25D3 Enhances Antitumor Activity of Gemcitabine and Cisplatin in Human Bladder Cancer Models; *Cancer* 2010; 3294-3303

70- Yao X., Panichpisal K., Kurtzman N., Nugent K. Cisplatin Nephrotoxicity: A Review; *American Journal of Medicine Science* 2007; 334(2):115–124.

71- Yugmani L.A. Mechanisms of Drug Resistance in Cancer Chemotherapy. *Medical Principles and Practice* 2005; 14(suppl 1):35–48

72- Drayton R.M., Catto JW. Molecular Mechanisms of Cisplatin Resistance In Bladder Cancer. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2012; 12(2):271-81.; doi: 10.1586/era.11.201.

73- Yoon C.Y., Park M.J., Lee J.S., Lee S.C., Oh J.J., Park H. The histone deacetylase inhibitor trichostatin A synergistically resensitizes a cisplatin resistant human bladder cancer cell line. *J. Urol.* 2011; 185(3), 1102–1111

74- Slaton JW, Benedict WF, Dinney CP. p53 in bladder cancer: mechanism of action, prognostic value, and target for therapy. *Urology* 2001; 57(5), 852–859.

75- Ma Y., Yu W.D., Trump D.L. ve Johnson C.S. 1,25D3 Enhances Antitumor Activity of Gemcitabine and Cisplatin in Human Bladder Cancer Models; *Cancer* 2010; 3294-3303

76- Branch P, Masson M, Aquilina G, Bignami M, Karran P. Spontaneous development of drug resistance: mismatch repair and p53 defects in resistance to cisplatin in human tumor cells. *Oncogene* 2000; 19(28), 3138–3145.

77- Koberle B, Tomicic MT, Usanova S, Kaina B. Cisplatin resistance: preclinical findings and clinical implications. *Biochim. Biophys. Acta.* 2010; 1806(2), 172–182 94.

78- Konstantakou EG, Voutsinas GE, Karkoulis PK, Aravantinos G, Margaritis LH, Stravopodis DJ. Human bladder cancer cells undergo cisplatin-induced apoptosis that is associated with p53dependent and p53-independent responses. *Int. J. Oncol* 2009;.35(2), 401–416

79- Shirakawa T., Sasaki R., Gardner T.A., Kao C., Zhang Z.J., Sugimura K. et al. Drug-resistant human bladder-cancer cells are more sensitive to adenovirus-mediated wild-type p53 gene therapy compared to drug-sensitive cells. *Int. J. Cancer* 2001: 94(2), 282–289

80- Meerloo J., Kaspers G. J. L., Cloos J. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. *Cancer Cell Culture Methods in Molecular Biology* 2011; Volume 731 Syf. 237-245

81-Michaud D.S., Spiegelman D., Clinton S.K., Rimm E.B., Willett W.C. ve Giovannucci E., Prospective Study of Dietary Supplements, Macronutrients, Micronutrients, and Risk of Bladder Cancer in US Men. 2000 *American Journal of Epidemiology*, Volume 152, Issue 12 Syf. 1145–1153

82- Amaral A.F.S., Méndez-Pertuz M., Muñoz A., Silverman D. T, Allory Y., Kogevinas M., et al.; Plasma 25-Hydroxyvitamin D3 and Bladder cancer risk According to tumor Stage and FGFR3 Status: A Mechanism Based epidemiological Study. *Journal of the Cancer Institute*. 2012; 1-8

83-Brown J., Reading S. J., Jones S., Fitchett C.J., Howl J., Martin A., et al. Critical Evaluation of ECV304 as a Human Endothelial Cell Model Defined by Genetic Analysis and Functional Responses: A Comparison with the Human Bladder Cancer Derived Epithelial Cell Line T24/83. *Laboratory Investigation* 2000; Vol. 80, No. 1, Syf. 37

84- Takahashi K., Sawasaki Y., Hata J.-I., Mukai K., and Goto T. Spontaneous transformation and immortalization of human endothelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol.* 1990; 25:263–274

85- Howl J., Mondszein R.M., Wheatley M. Characterization of G protein-coupled receptors expressed by ECV304 human endothelial cells. *Endothelium* 1998; 6:23–32.

86- Hughes S.E. Functional characterization of the spontaneously transformed human umbilical vein endothelial cell line ECV304: Use in an in vitro model of angiogenesis. *Exp Cell Res.* 1996; 225:171–185.

87- Konety B.R., Lavelle J.P., Pirtskalaishvili G., Dıhır R., Meyers S.A., Neguen T.S.T., et al. Effects of Vitamin D on Transitional Cell Carcinoma of The Bladder In Vitro and In Vivo. *The Journal of Urology* 2001; Volume 165, Issue 1, January Syf. 253-258

88- Kısım A., Uzunoğlu S. Hormesis: Toksik Ajanların Düşük Dozlarına Uyum Sağlamada Öncül Fenomen. *Adli Tıp Dergisi / Journal of Forensic Medicine* 2011; Cilt / Vol.:26, Sayı / No:3

89- Oral Y.A., Oral H.B., Sarımahmut B., Cevatemre B., Özkaya G., Korkmaz Ş., Ulukaya E. Combination of esomeprazole with chemotherapeutics result in more pronounced cytotoxic effect via apoptosis on A549 non-small-cell lung cancer cell line. *Turkish Journal of Biology* 2017; 41:231-241

90- Takara K, Sakaeda T, Yagami T., Kobayashi H., Ohmoto N., Horinouchi M., et al. Cytotoxic effects of 27 anticancer drugs in HeLa and MDR1-overexpressing derivative cell lines. *Biol. Pharm. Bull.* 2002; 25(6), 771–778

91- Sandlow J., Cohen M.B., Robinson R.A., Dreicer R., Williams R.D. DNA ploidy and P-glycoprotein expression as predictive factors of response to neoadjuvant chemotherapy for invasive bladder cancer. *Urology* 1994; 43(6), 787–791

92- Siu L.L., Banerjee D., Khurana R.J., Pan X., Pflueger R., Tannock I.F. et al. The prognostic role of p53, metallothionein, P-glycoprotein, and MIB-1 in muscle-invasive urothelial transitional cell carcinoma. *Clin. Cancer Res* 1998; 4(3), 559–565

93- Shen F, Chu S, Bence A.K., Bailey B., Xue X., Erickson P.A. et al. Quantitation of doxorubicin uptake, efflux, and modulation of multidrug resistance (MDR) in MDR human cancer cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2008; 324(1), 95–102

94- Bruggemann E.P., Currier S.J., Gottesman M.M., Pastan I. Characterization of the azidopine and vinblastine binding site of P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 1992; 267(29), 21020–21026

95- De Graaf D, Sharma R.C., Mechetner E.B., Schimke R.T., Roninson I.B. (1996). P-glycoprotein confers methotrexate resistance in 3T6 cells with deficient carrier-mediated methotrexate uptake. *Proc. Natl Acad. Sci.* 1996; 93(3), 1238–1242

96- Petrylak D.P., Scher H.I., Reuter V., O'brien J.P., Cordon-Cardo C. P-glycoprotein expression in primary and metastatic transitional cell carcinoma of the bladder. *Ann. Oncol.* 1994; 5(9), 835–840

97- Tada Y., Wada M., Migita T., Nagayama J., Hinoshita E., Mochida Y. et al. Increased expression of multidrug resistance associated proteins in bladder cancer during clinical course and drug resistance to doxorubicin. *Int. J. Cancer* 2002; 98(4), 630–635.

98- Kim W.J., Kakehi Y., Hirai M., Arao S., Hiai H., Fukumoto M. et al. Multidrug resistance-associated protein mediated multidrug resistance modulated by cyclosporin A in a human bladder cancer cell line. *Jpn J. Cancer Res.* 1995; 86(10), 969–977

99- Clifford S.C., Neal D.E., Lunec J. Alterations in expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene in high-grade transitional cell carcinoma of the bladder. *Br. J. Cancer* 1996; 73(5), 659–666.

100- Taniguchi K., Wada M., Kohno K., Nakamura T., Kawabe T., Kawakami M. et al. A human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene is overexpressed in cisplatin-resistant human cancer cell lines with decreased drug accumulation. *Cancer Res.* 1996; 56(18), 4124–4129

101- Sarkis A.S., Bajorin D.F., Reuter VE, Herr H.W., Netto G., Zhang Z.F. et al. Prognostic value of p53 nuclear overexpression in patients with invasive bladder cancer treated with neoadjuvant MVAC. *J Clin Oncol.* 1995; 13:1384-1390.

102- Cote R.J., Esrig D., Groshen S., Jones P.A., Skinner D.G. p53 and treatment of bladder cancer. *Nature* 1997; 385(6612), 123–125

103- Khan M.A., Travis L.B., Lynch C.F. Soini Y., Hruszkewycz A.M., Delgado R.M., et al. p53 mutations in cyclophosphamide-associated bladder cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1998; 7:397-403.

104- Qureshi K.N., Griffiths T.R., Robinson M.C., Marsh C., Roberts J. T., Hall R. R. et al. TP53 accumulation predicts improved survival in patients resistant to systemic cisplatin-based chemotherapy for muscle-invasive bladder cancer. *Clin. Cancer Res.* 1999; 5(11), 3500–3507

105- Stadler W.M., Lerner S.P., Groshen S., Stein J.P., Shi S.R., Raghavan D. et al. Phase III study of molecularly targeted adjuvant therapy in locally advanced urothelial cancer of the bladder based on p53 status. *J. Clin. Oncol.* 2011; 29(25), 3443–3449

106- Vojdeman F. J., Madsen C.M., Frederiksen K., Durup D. , Olsen A., Hansen L., et al. Vitamin D levels and cancer incidence in 217, 244 individuals from primary health care in Denmark, *International Journal Of Cancer, Cancer Epidemiology*. 2019;Vol: 0, Issue 0

107- Liang Z., Chen Y., Wang L., Li D., Yang X., GuofengMa, Wang Y., et al. CYP27A1 inhibits bladder cancer cells proliferation by regulating cholesterol homeostasis, *Cell Cycle* 2019; 18:1, 34-45. DOI: 10.1080/15384101.2018.1558868

108- Mondul A. M., Weinstein S. J., Horst R. L., Purdue M., Albanes D.; Serum vitamin D and risk of bladder cancer in the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2012; 21(7); 1222–5. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-12-0439



7. İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

MESANE KANSERİNİN VİTAMİN D İLE MOLEKÜLER İLİŞKİSİ2

ORJİNALLİK RAPORU

%5	%4	%1	%2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.ecpc.org İnternet Kaynağı	%2
2	www.toraks.org.tr İnternet Kaynağı	%1
3	adudspace.adu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%1
4	www.yumpu.com İnternet Kaynağı	<%1
5	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
6	Submitted to Kastamonu University Öğrenci Ödevi	<%1
7	Submitted to Istanbul Medipol Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
8	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	<%1
9	Submitted to Inonu University Öğrenci Ödevi	<%1

8. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	ÖZGE	Soyadı	ÖZGEN
Doğ.Yeri	ANTALYA	Doğ.Tar.	13.11.1984
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	37888074038
Email	00ozge01@gmail.com	Tel	05447245939

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi İşletme Fakültesi İşletme Yöneticiliği	2015
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enst. Genetik Programı	2012
Lisans	İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2007
Lise	Yeşilköy 50. Yıl Anadolu Lisesi	2002

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Kalite Kontrol Proje Müdürlüğü	Archem Diagnostik Ltd. Şti	2015-2016
2.	Laboratuvar Koordinatörü	MEV Özel Basıncıköy Okulları	2011-2013
3.	Information Scientist Assistant	Orphanet Avrupa Birliği Projesi	2008-2009

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	İyi	Çok İyi		Yökdil:83
Almanca	Orta	Orta	Orta		

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office Programları(Word,Excel,Power Point)	Çok İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Gezmek, Kitap Okumak, Su Sporları

