

**T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENİSTTİTÜSÜ**

**OVER KANSERLERİNDE BMP-7 VE BMP-2 NİN İNVAZYON VE
METASTAZDAKİ ETKİSİ**

Dr. Elham BAHADOR

**Histoloji - Embriyoloji Doktora Programı
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA
2018**

**T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENİSTTİTÜSÜ**

**OVER KANSERLERİNDE BMP-7 VE BMP-2 NİN İNVAZYON VE
METASTAZDAKİ ETKİSİ**

Dr. Elham BAHADOR

Histoloji - Embriyoloji Doktora Programı

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Naciye Dilara ZEYBEK

ANKARA

2018

OVER KANSERLERİNDE BMP-7 VE BMP-2'NİN İNVAZYON VE METASTAZDAKİ ETKİSİ

Elham BAHADÖR

Danışman: Doç. Dr. N Dilara ZEYBEK

Bu tez çalışması 25.06.2018 tarihinde jürimiz tarafından "Histoloji – Embriyoloji Doktora Programı" nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Prof. Dr. Figen Kaymaz

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi



Üye:

Prof. Dr. A Nur Çakar

TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi Tıp Fakültesi



Üye:

Prof. Dr. Sevdâ Müftüoğlu

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi



Üye:

Prof. Dr. Pergin Atilla

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi



Üye:

Dr. Öğr.Üyesi Züleyha Doğanlıgüt

Bazok Üniversitesi Tıp Fakültesi



Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

27 Haziran 2018



Prof. Dr. Diclehan ORHAN

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- ☐ **Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir 4 cm kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.**

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, teziniz arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir)

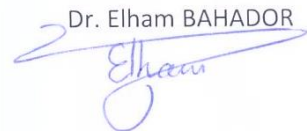
- ☒ **Tezimin/Raporumun 25.06.2020 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.**

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir)

- ☐ **Tezimin/Raporumun.....tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.**

- ☐ **Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**

25/06/2018

Dr. Elham BAHADOR


ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Tez Danışmanım Doç. Dr. Naciye Dilara Zeybek danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Dr. Elham BAHADOR

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın yürütülmesi sırasında desteğini esirgemeyen danışmanım Doç. Dr. N. Dilara Zeybek ve daima bana yol gösterici olan Prof. Dr. Figen Kaymaz'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim süresi boyunca eğitime katkıda bulunan, Prof. Dr. Ayşe Nur Çakar, Prof. Dr. Sevdâ Fatma Müftüoğlu, Prof. Dr. Petek Korkusuz, Prof. Dr. Pergin Atilla, Prof. Dr. Sinan Yürüker, Prof. Dr. Lale Karakoç Sökmensüer, Doç. Dr. Yeşim Uğur hocalarıma teşekkür ederim.

Tez önerisi sürecinde bana destek olan Dr. Can Ilgın'a ve laboratuvar çalışmalarında desteğini esirgemeyen arkadaşlarım, Araş Gör. Nilgün Yersal ve Bio. Gülizar Dağışan'a ve teşekkür ederim.

Hayatımın her devresinde yardım ve desteklerini yanımda hissettiğim babam Rahman ve annem Mina Bahador'a, kardeşlerim Elmira Sevimli ve Torkan Bahador'a teşekkürlerimi sunarım.

Tezim süresince bana sevgi ve desteğini esirgemeyen değerli eşim Dr Selim Zırh'a ve çalışmama izin verdiği için kızım Aylin Ela'ya teşekkür ederim.

ÖZET

Bahador E, Over Kanserlerinde BMP-7 ve BMP-2'nin İnvazyon ve Metastazdaki Etkisi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji – Embriyoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2018. Over kanserleri geç dönem tanı koyulmaları ve tanı aldıklarında metastaz yapmış olmaları nedeniyle klinikte önem taşımaktadır. Epitel-mezenkim geçişi (EMT) over kanserlerinin patogeneğinde rol oynamaktadır. Kemik morfojen proteinleri (BMP), transkripsiyon faktörleri ve integrinler EMT sürecinde etkilidir. Bu çalışmada hipotezimiz, over kanserlerinde BMP-2 ve BMP-7 immünreaktiviteleri arasında ters korelasyon olduğudur. Çalışmamızda, lenf nodu tutulumu olan ve olmayan yüksek dereceli seröz over kanserinde BMP-2, BMP-7, ZEB2, ITG α 5, ITG β 1 immünreaktiviteleri indirekt immünperoksidaz ile, SKOV-3 hücre hattında indirekt immünperoksidaz ve immünofloresan yöntemi ile işaretlendikten sonra H-skor analiz ile değerlendirildi. Gruplar arası fark istatistiksel olarak belirlendi. BMP-2 ve ZEB2 immünreaktivitesi lenf nodu tutulumu olan hem over hem lenf nodu örneklerinde anlamlı olarak daha güçlü bulundu ($p<0,000$, $p<0,000$). BMP-7 ile lenf nodu tutulumu olmayan over dokusu örneklerinde daha güçlü immünreaktivite gözlemlendi. ITG α 5 immünreaktivitesi lenf nodu tutulumu olmayan over dokusu örneklerinde daha güçlü saptandı ($p<0,001$). ITG β 1 immünreaktivitesi lenf nodu tutulumu olmayan over dokusu ve lenf nodu tutulumu olan lenf nodu örneklerinde anlamlı olarak daha güçlü bulundu ($p<0,001$). Çalışmamızın in vivo ve in vitro sonuçları tümör hücrelerinde BMP-2 ile güçlü immünreaktivite, BMP-7 ile zayıf immünreaktivite gözlenmesi hipotezimizi doğrulamaktadır. Over kanserinde BMP-2 ve BMP-7 ifadeleri ters korelasyon göstermektedir. BMP'lerdeki değişiklikler over kanserinde progresyonu etkilemektedir. BMP-7 artışı koruyucu mekanizmalarda rol oynayabilir.

Anahtar Kelimeler: Over Kanseri, EMT, BMP-7, BMP-2, ZEB2, integrin α 5, integrin β 1

Destekleyen kuruluş: Çalışmamız Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi (TSA-2017-13046) tarafından desteklenmiştir.

Çalışma 10-13 Mayıs 2018, Antalya'da yapılan 14. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresinde sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

ABSTRACT

Bahador E, Effect of BMP-7 and BMP-2 in invasion and metastasis of ovarian cancer, Hacettepe University Graduate School of Health Science, Histology – Embryology Program Doctorate Thesis, Ankara, 2018. Ovarian cancer is clinically important, because they are diagnosed late and have metastasis when they are diagnosed. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) plays role in the pathogenesis of ovarian cancer. Bone morphogenetic proteins (BMP), transcription factors and integrins are effective in the EMT process. Our hypothesis in this study is that there is an inverse correlation between BMP 2 and BMP 7 immunoreactivity in ovarian cancers. The immunoreactivities of BMP-2, BMP-7, ZEB2, ITG α 5 and ITG β 1 were determined by indirect immunoperoxidase in high grade serous ovarian cancer with and without lymph node metastasis and both indirect immunoperoxidase and immunofluorescence method was used for determining the immunoreactivity of these molecules in SKOV-3 cell line. Data was evaluated by H-score analysis and the difference between the groups was statistically determined. The immunoreactivity of BMP-2 and ZEB2 was found significantly stronger in both ovary and lymph node samples with lymph node metastasis ($p < 0.000$, $p < 0.000$). BMP-7 immunoreactivity was observed stronger in ovarian tissues without lymph node metastasis. The immunoreactivity of ITG α 5 immunoreactivity was stronger in ovarian tissues without lymph node metastasis ($p < 0.001$). The tumor cells showed stronger ITG β 1 immunoreactivity in lymph node samples with lymph node metastasis and ovary samples without lymph node metastasis ($p < 0.001$). In vivo and in vitro results of our study showing strong positive immunoreactivity of BMP-2 and weak immunoreactivity of BMP-7 in tumor cells confirmed our hypothesis and showed BMP-2 and BMP-7 has inverse correlation. Changes in the expression of BMPs affect progression in ovarian cancer. Increase in the level of BMP-7 expression may play a role in protective mechanisms from ovarian cancers.

Key words: Ovary cancer, EMT, BMP-7, BMP-2, ZEB2, integrin α 5, integrin β 1

Supporting organization: Our work was supported by Hacettepe University Scientific Research Unit (TSA-2017-13046).

Our work was presented as an oral presentation at the 14th National Histology and Embryology Congress held in Antalya on May 10-13, 2018.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	iv
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Over kanserleri	3
2.2 Epitel-mezenkimal geçiş (EMT)	4
2.3 Kemik morfojen protein (BMP)	6
2.3.1 BMP'ler ve kanser	8
2.4 Çinko parmak E-box bağlayıcı homeobox 2 (ZEB2)	9
2.5 Metastaz	10
2.6 İntegrinler	12
3. GEREÇ ve YÖNTEM	16
3.1 Gereç	16
3.1.1 Hasta gruplarının belirlenmesi	16
3.2. Histokimya ve İmmunohistokimya Yöntemi	16
3.2.1 Doku Kesitlerinin Alınması	16
3.2.2. Kullanılan Malzemelerin Hazırlanması	16
3.2.3. Histokimya Yönteminin Uygulanması	21
3.2.4 İmmunohistokimya Yönteminin Uygulanması	22

3.3 Hücre Kültürü	25
3.3.1 Over kanseri hücre hattı kültürü	25
3.3.2. SKOV-3 Over Kanseri Hücrelerinde İmmunositokimya Yönteminin Uygulanması	25
3.4 Kesitlerin Görüntülenmesi	29
3.5 İmmunohistokimya ve İmmunositokimya İşaretlenmesinin Değerlendirilmesi	29
3.6 İstatistiksel analiz	29
4. BULGULAR	31
4.1 Hasta verilerinin değerlendirilmesi	31
4.1.1 Hastaların demografik özellikleri	31
4.2 Seröz over karsinom vakalarında over dokusu ve lenf nodunun histopatolojik değerlendirilmesi	31
4.3 Hasta Gruplarında Tümör Hücreleri ve Tümör Stromasında İmmunohistokimyasal İşaretlenmelerinin Değerlendirilmesi	34
4.3.1 BMP-2 ve BMP-7 immunreaktivitesi	34
4.3.2 ZEB2 immunreaktivitesi	35
4.3.3 ITG $\alpha 5$ Ve ITG $\beta 1$ İmmunreaktivitesi	36
4.4 BMP-2, BMP-7, ZEB2, ITG $\alpha 5$ ve ITG $\beta 1$ immunreaktivitelerinin gruplar arası karşılaştırılması	36
4.4.1 BMP-2 immunreaktivitesinin gruplar arası karşılaştırılması	37
4.4.2 BMP-7 immunreaktivitesinin gruplar arası karşılaştırılması	39
4.4.3 ZEB2 immunreaktivitesinin gruplar arası karşılaştırılması	41
4.4.4 ITG $\alpha 5$ İmmunreaktivitesinin Gruplar Arası Karşılaştırılması	43
4.4.5 ITG $\beta 1$ İmmunreaktivitesinin Gruplar Arası Karşılaştırılması	45
4.5 BMP-2 Ve BMP-7 İmmunreaktivitelerinin Karşılaştırılması	47
4.6 SKOV-3 Hücre Hattı Kültürü	48
4.7 SKOV-3 Over Adenokarsinoma Hücre Hattına ait Hücrelerde İmmünperoksidaz ve İmmünfloresan İşaretlemelerin Değerlendirilmesi	49
4.8 SKOV-3 over adenokarsinoma hücre hattı hücrelerinde ITG $\alpha 5$, ITG $\beta 1$ 'in çift immünofloresan işaretlemesi	55

4.9 SKOV-3 Over Adenokarsinoma Hücre Hattına Ait Hücrelerde İmmünperoksidaz ve İmmünfloresan İşaretlemelemlerin H-skor ve İstatistiksel Analiz Değerlendirilmesi	56
5. TARTIŞMA	58
6. SONUÇLAR	63
7. KAYNAKLAR	66
8. EKLER	
EK-1. Tez Çalışması İle İlgili Etik Kurul İzni	
9. ÖZGEÇMİŞ	



SİMGELER ve KISALTMALAR

BMP	Kemik morfogon protein
Chrdl1	Chordin-like 1
C-IV	Kolajen-IV
DAB	Diamino benzidin
DOK1	Docking protein 1
E-box	Enhancer-box
E-kadherin	Epitel-kadherin
EMT	Epitel-mezenkim geçişi
EOK	Epitelyal over kanseri
ESM	Hücre dışı matris
FAK	Fokal adezyon kinaz
FN	Fibronektin
ICAP1	İntegrin cytoplasmic domain-associated protein 1
ILK	İntegrin benzeri kinaz
IMC	İç membran clasp
ITG	İntegrin
ITG α 5	İntegrin alfa 5
ITG β 1	İntegrin beta 1
LDV	Leu-Asp-Val sekansı
LM	Laminin
MDGI	Mammary-derived growth inhibitor
MET	Mezenkim-epitel geçiş
NaCl	Sodium chloride
OCSPC	Seröz over kanseri progenitör hücreler
OMC	Dış membran clasp
PBS	Fosfat tampon solusyonu
PBS-BSA	Fosfat tampon solüsyonu-sığır serum albumini
RGD	Arg-Gly-Asp sekansı
SHARPIN	SHANK-associated RH domain-interacting protein

TGF- β	Transforme edici büyüme faktörü- β
VN	Vitronektin
ZEB2	Zinc finger E-box bağlayıcı homeobox 2



ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Epitel-mezenkim geçişi. EMT, epitel hücrelerin epitel özelliklerini yitirdiği ve mezenkimal özellikler kazandığı morfojenetik bir süreçtir.	5
2.2. BMP-aracılı sinyal yolları. Antagonist, ligand, reseptörleri. Kanonikal ve Non-kanonikal yolları.	7
2.3. Integrinler çeşitli hücrel aktivite ve dolayısıyla metastazı düzenlerler.	11
2.4. Aktif bir integrin molekülünün alt birim yapısı, hücre dışı matrisi, aktin hücre iskeletine bağlar.	12
4.1. Seröz over karsinom tanısı almış vakaların tümör dokularında farklı morfolojik paternler izlenmektedir.	32
4.2. Tümör dokusu içinde hemorajik alanlar, stromadaki damarlarda konjesiyon gözlenmektedir.	32
4.3 Lenf nodu tutulumu olmayan yüksek dereceli, over papiller seroz adenokarsinom tanısı almış over dokusu örneği. Düzensiz dallanmış papillalar, ortalarında az miktarda stroma ve atipik çekirdekler gözlenmektedir.	33
4.4 Lenf nodu tutulumu olan yüksek dereceli over papiller seroz adenokarsinom tanısı almış over dokusu örneği.	33
4.5. Lenf nodu tutulumu olan yüksek dereceli over papiller serozadenokarsinom tanısı almış lenf nodu örneği.	34
4.6 Over dokusu örneklerinde A- tümör hücreleri sitoplazması.	35
4.7. Over dokusu örneklerinde tümör hücrelerinin sitoplazması.	35
4.8. Over dokusu örneklerinde, tümör hücrelerin membranında (mavi ok), damar endoteli (kırmızı ok) güçlü A- ITG $\alpha 5$ pozitif immünreaktivitesi B- ITG $\beta 1$ pozitif immünreaktivitesi izlenmektedir.	36
4.9. Tümör ve stromada BMP-2 immünreaktivitesi.	37
4.10 Tümör hücrelerinde BMP-2 immünreaktivitesinin gruplar arası karşılaştırılması.	38
4.11. BMP-2 immünreaktivitesinin gruplar arası karşılaştırılmasının istatistiksel değerlendirilmesi.	39
4.12. Tümör ve stromada BMP-7 immünreaktivitesi.	40
4.13. BMP-7 immünreaktivitesinin gruplar arası karşılaştırılması.	40
4.14. BMP-7 immünreaktivitesinin gruplar arası karşılaştırılmasının istatistiksel değerlendirilmesi.	41

4.15. Tümör ve stromada ZEB2 immunreaktivitesi.	42
4.16. ZEB2 immunreaktivitesinin gruplar arası karşılaştırılması.	42
4.17. ZEB2 immunreaktivitesinin gruplar arası karşılaştırılmasının istatistiksel değerlendirilmesi.	43
4.18. Tümör ve stromada ITG $\alpha 5$ immunreaktivitesi.	44
4.19. ITG $\alpha 5$ immunreaktivitesinin gruplar arası karşılaştırılması.	44
4.20. ITG $\alpha 5$ immunreaktivitesinin gruplar arası karşılaştırılmasının istatistiksel değerlendirilmesi.	45
4.21. Tümör ve stromada ITG $\beta 1$ immunreaktivitesi.	46
4.22. ITG B1 immunreaktivitesinin gruplar arası karşılaştırılması.	46
4.23. ITG $\beta 1$ immunreaktivitesinin gruplar arası karşılaştırılmasının istatistiksel değerlendirilmesi.	47
4.24. BMP-2 ve BMP-7 immunreaktivitesinin gruplar arası karşılaştırılması.	48
4.25. SKOV-3 hücreleri kültür kabının tabanına tutunmuş olarak görülmekte ve konfluent hücreler kaldırım taşı görüntüsüne sahip olduğu gözlenmektedir.	49
4.26. SKOV-3 over adenokarinom hücre hattında sitoplazmik orta derecede BMP-2 immünreaktivitesi gözlenmektedir.	50
4.27. SKOV-3 over adenokarinom hücre hattında BMP-2 ile sitoplazmik immünofloresan işaretleme gözlenmektedir	50
4.28. SKOV-3 over adenokarinom hücre hattında sitoplazmik zayıf BMP-7 immünreaktivitesi gözlenmektedir.	51
4.29. SKOV-3 over adenokarinom hücre hattında BMP-7 ile sitoplazmik immünofloresan işaretleme gözlenmektedir.	51
4.30. SKOV-3 over adenokarinom hücre hattında çekirdek ve sitoplazmada orta derecede ZEB2 immünreaktivitesi gözlenmektedir.	52
4.31. SKOV-3 over adenokarinom hücre hattında ZEB2 ile sitoplazmik immünofloresan işaretleme gözlenmektedir	52
4.32. SKOV-3 over adenokarinom hücre hattında sitoplazmik orta derecede ITG $\alpha 5$ immünreaktivitesi gözlenmektedir.	53
4.33. SKOV-3 over adenokarinom hücre hattında ITG $\alpha 5$ ile sitoplazmik immünofloresan işaretleme gözlenmektedir.	53
4.34. SKOV-3 over adenokarinom hücre hattında hücre membranı ve sitoplazmasında güçlü ITG $\beta 1$ immünreaktivitesi gözlenmektedir.	54
4.35. SKOV-3 over adenokarinom hücre hattında ITG $\beta 1$ ile sitoplazmik immünofloresan işaretleme gözlenmektedir.	54

- 4.36. SKOV-3 over adenokarinom hücre hattında ITG β 1 immünreaktivitesi fokal noktasal biçimde perinükleer alanda izlenmektedir. 55
- 4.37. SKOV-3 over adenokarsinoma hücre hattına ait hücrelerde ITG α 5 ve ITG β 1 ile çift immünofloresan işaretlemesi. 56
- 4.38. SKOV-3 Over Adenokarsinoma Hücre Hattı Hücrelerinde İmmünperoksidaz ve İmmünofloresan İşaretlemlerin istatistiksel Değerlendirilmesi. 57



TABLÖLAR

Tablo	Sayfa
2.1. Over kanserlerinin başlıca sınıflandırılması ve görülme sıklığı.	3
2.2. Over epitelyal kanserinin başlıca hücresel alt tipleri.	3
3.1. Kullanılan primer antikorların kaynağı, katalog numarası, klon adı, izotipi ve sulandırma oranı.	20
3.2. Kullanılan sekonder antikorların kaynağı, katalog numarası, klon adı, izotipi ve sulandırma oranı.	21



1. GİRİŞ

Over kanserleri en sık görülen jinekolojik malignitelerden biridir ve kadınlarda görülen beşinci ölüm nedenidir [1]. Over kanseri hastaları için ilaç direnci ve erken metastaz kötü prognoza neden olmaktadır[2]. Mortalite riski lenf nodu tutulumu varlığında 2.75 kez arttı gösterilmiştir [4]. Over kanserinin metastaz ve invazyonu, birçok düzenleyici molekülün aktivitesine bağlı olan karmaşık ve çok aşamalı bir süreçtir [5]. Over kanser invazyonu ve metastazında rol alan moleküllerin ve/veya sinyal yollarının tanımlanması, erken evrede tanı almaları için çok önemlidir [6]. Metastaz, hücre dışı matriks ve hücre-hücre bağlantılarındaki değişiklikleri içermektedir. Epitel-mezenkim geçişi (EMT), tümör hücrelerinin primer tümör bölgesinden ayrılması ve metastatik bölgelere bağlanma sırasında metastatik tümör ilerlemesi için gerekli bir adımdır. Birçok çalışma, epitelyal over kanseri (EOK) hücrelerinin EMT'sini destekleyen faktörleri incelemiştir [6,7].

EMT'de yer alan moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılması, yeni terapötik hedeflerin belirlenmesi ve EOK için yeni tedavi stratejilerinin oluşturulması açısından önemlidir [8]. Tümör hücresi stromasından kaynaklanan büyüme faktörleri, kanser hücrelerinde EMT sürecini uyaran transkripsiyon faktörlerini kullanarak EMT'yi başlatırlarlar [9].

Başlangıçta 1965'de [10] bir osteojenik faktör olarak açıklanan kemik morfogon proteinleri (BMP'ler), hücre dışı çok işlevli sinyalleme sitokini ve etkili bir büyüme faktörü ve morfogon olarak kabul edilir ve transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β) süper ailesinin bir üyesidir [11].

BMP'ler embriyonik ve postnatal gelişimde ve aynı zamanda tümör gelişimi ve yayılmasında da işlevlerinden dolayı giderek daha fazla ilgi çekmektedir [12]. BMP'lerin tümör gelişimi ve yayılımındaki rolleri, anjiyogenez, epitel-mezenkim geçişi (EMT) ve kanser kök hücreleri gibi karsinogenezin çeşitli yönleriyle de yüksek oranda ilişkilidir [13,14]. BMP'ler, EMT sürecinde rol alan transkripsiyon faktörleri üzerinden göçü etkilemektedir. ZEB2 proteini, TGF β sinyal yollarında görev alan bir transkripsiyon faktörüdür. ZEB2'nin baskılanması EMT ve hücre proliferasyonunda

azalmaya sebep olmaktadır. ZEB2 ekspresyonunun düzenlenmesinin anlaşılması, kanser prognozunu anlamakta önemlidir [15].

EMT'ye uğrayan metastatik hücreler göç sırası ve sonrası dokuda tutunmak için integrinleri kullanmaktadır. Birçok kanser türünde metastazda integrinlerin arttığı gösterilmiştir [16,17].

BMP-2 ve BMP-7'nin over kanseriyle ilişkisi gösterilmiştir ancak literatürde farklı sonuçlar mevcuttur ve bu ilişkinin mekanizması açık şekilde aydınlatılamamıştır. Bu gerekçelerden yola çıkarak çalışmamızda, lenf nodu metastazı olan ve olmayan over kanserinde BMP-2 ve BMP-7'nin ekspresyonları arasında fark olup olmadığı ve BMP-2, BMP-7, ZEB2, ITG $\alpha 5$ ve ITG $\beta 1$ immünreaktivitelerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Over kanserleri

Over kanserleri kadınlardaki kanser vakalarının %3 ünü oluşturmakla birlikte geç dönem tanı almaları ve yüksek ölüm oranları nedeniyle klinikte önem taşımaktadır. Hastaların üçte ikisi tanı aldıklarında, evre III veya IV olduklarından, beş yıllık sağkalım oranlarının % 25-30 veya daha az iken, evre I veya II hastaların beş yıllık sağkalım oranları % 80-95 oranında oldukları rapor edilmiştir [18].

Over kanserleri, epitelyal over kanseri (EOK), seks kord stromal tümörleri ve germ hücre tümörleri olmak üzere 3 çeşittir. Bunlardan epitelyal tümörler over kanserlerinin yaklaşık % 90'ını oluşturur (Tablo 2.1) ve jinekolojik kanserlerin önde gelen ölüm nedenlerindendir [19,20].

Tablo 2.1. Over kanserlerinin başlıca sınıflandırılması ve görülme sıklığı.

Over kanser türleri	insidans
Epitelyal	90%
Germ hücre	5%
Seks kord stromal	5%
Primer peritoneal	nadir

Epitelyal over kanserleri (EOK) çoğunlukla yaş ortalaması yaklaşık 60 olan peri-veya postmenopozal kadınları etkilemektedir [21]. Epitelyal tümörler üreme sisteminde bulunan hücre tiplerine göre sınıflandırılır ve seröz, müsinöz, endometrioid, şeffaf hücre ve değişici hücre tiplerini içerir (Tablo 2.2), [22].

Tablo 2.2. Over epitelyal kanserinin başlıca hücresel alt tipleri

Epitelyal kanser türü	İnsidansı
Seröz	7/10
Müsinöz	1/10
Endometrioid	1/20
Şeffaf hücre	3/100
Değişici hücre	1/10

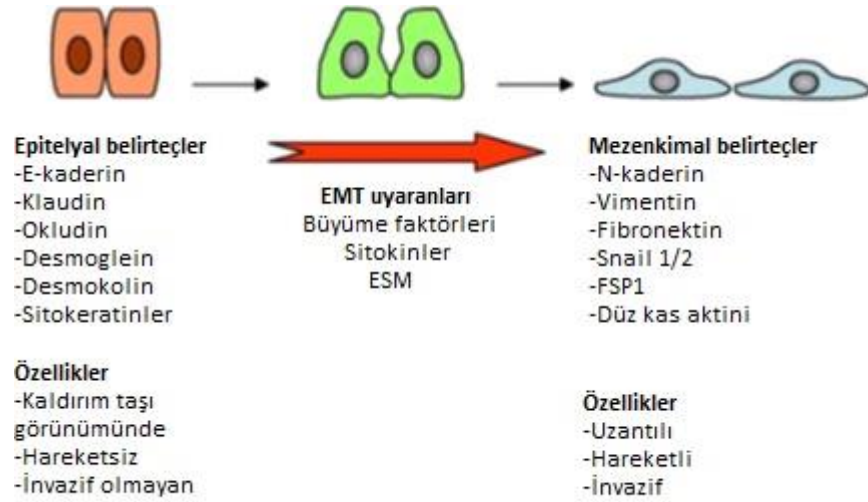
Seröz epitelyal over kanser hastalarının yüksek mortalitesi esas olarak tanı aldıklarında ileri evrede yani tanı anında metastaz yapmış olması ile ilişkilidir. Metastaz, tümör hücrelerinin epitel-mezenkimal geçişi (EMT), invazyon, hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi ve mikroçevrenin yeniden modellemesini içeren çok aşamalı bir süreçtir [23, 24]. EMT'de yer alan moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılması, yeni terapötik hedeflerin belirlenmesi ve EOK için yeni tedavi stratejilerinin oluşturulması açısından önemlidir.

2.2 Epitel-mezenkimal geçiş (EMT)

Epitel hücrelerinin, epitel özelliklerini kaybedip mezenkimal özellikler kazandığı fikri, civciv embriyolarında primitif çizgide epitel fenotipin mezenkimal fenotipe dönüşümü, Elizabeth Hay tarafından yapılan gözlemlerde 1980'lerin başlarında ortaya çıkmıştır [25].

Epitel hücrelerinin hareketli mezenşimal hücrelere dönüşümü, epitel-mezenkimal geçiş (EMT) olarak bilinmektedir. Mezenkimal-epitel geçiş (MET), tersi süreci açıklamaktadır. Epitel hücrelerinin mezenkimal hücrelere kısmen ya da tamamen dönüşme yeteneği, epitel fenotipin doğal bir plastisitesini göstermektedir [26].

Epitel hücrelerinin yüzey proteinleri, hücre iskeleti proteinleri, hücreler arası matriks proteinleri ve transkripsiyon faktörü ekspresyonları EMT öncesi ve sonrası karşılaştırıldığında, değişiklikler gösterdiği saptanmıştır. Bu moleküller EMT'ye dönüşen hücreleri tanımlamak için kullanılmaktadır [27](Şekil 21).



Şekil 2.1. Epitel-mezenkim geçişi. EMT, epitel hücrelerin epitel özelliklerini yitirdiği ve mezenkimal özellikler kazandığı morfojenetik bir süreçtir [27].

EMT sırasında epitel hücreler, hücre bağlantılarını ve apikal-bazal polaritelerini kaybeder, hücre iskeletini yeniden düzenler ve sinyal programlarında değişikliğe uğramaktadır. Bu hücre şeklini tanımlamak ve gen ifadesini yeniden programlamak için gereklidir; oluşan değişiklikler hücrelerin hareketliliğini artırır ve invaziv bir fenotip gelişimini sağlamaktadır [28, 29].

EMT, gelişimin ayrılmaz bir parçasıdır. Altta yatan mekanizmalar, yara iyileşmesi, fibrozis ve kanser progresyonunda yeniden aktive olmaktadır [29, 30].

EMT ve MET ayrıca embriyonik kök hücre farklılaşmasını, uyarılmış pluripotensi ve kanser kök hücre davranışını düzenlemektedir [31].

Gelişimsel veya patolojik olarak epitel hücrelerinin mezenkimal hücrelere geçişi, ayırt edici ve korunmuş bir program izler. Bununla birlikte, hücre tipine, doku içeriğine ve EMT programını aktive eden sinyallere bağlı olan bazı esneklik ve değişikliklere sahiptir. Buna dayanarak EMT'nin, fizyolojik süreçte üç farklı alt tip tanımlanmıştır [32].

Tip 1 EMT embriyogenez ve organ gelişiminde oluşur, tip 2 EMT; doku rejenerasyonu ve organ fibrozisi için önemlidir ve tip 3 EMT; kanser progresyonu ve kanser kök hücre özellikleri ile ilişkilidir [29, 30, 31].

Epitel fenotipin plastisitesi, hücrelerin çok sayıda EMT ve MET geçişini sağlar. EMT'deki anahtar olaylar, epitel hücre-hücre bağlantılarının bozulması; apikal - bazal

polaritenin kaybı ve ön arka polaritenin elde edilmesi; hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi ve hücre biçimindeki değişiklikler; epitel gen ekspresyonlarının azalması ve mezenkimal fenotipin tanımlanmasına yardımcı olan genlerin aktivasyonu; artan hücre uzantıları ve motilitesi; ve çoğu durumda, invaziv davranışı mümkün kılmak için hücre dışı matris (ESM) proteinlerinin degradasyonudur. Bunlara ek olarak, EMT'ye uğramış hücreler yaşlanma ve apoptoza karşı direnç kazanır [28].

2.3 Kemik morfojen protein (BMP)

Başlangıçta 1965'de osteojenik bir faktör olarak tanımlanan kemik morfojen proteinler (BMP'ler) [37], çok fonksiyonlu hücre dışı sinyal sitokini olarak kabul edilir. Ayrıca BMP'ler transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β) süper ailesine üye potansiyel bir büyüme faktörü ve morfojendir [38].

BMP'ler, embriyonik ve postnatal gelişimdeki işlevlerinin yanı sıra aynı zamanda tümör gelişimi ve yayılmasında da işlevlerinden dolayı giderek daha fazla dikkat çekmiştir [39].

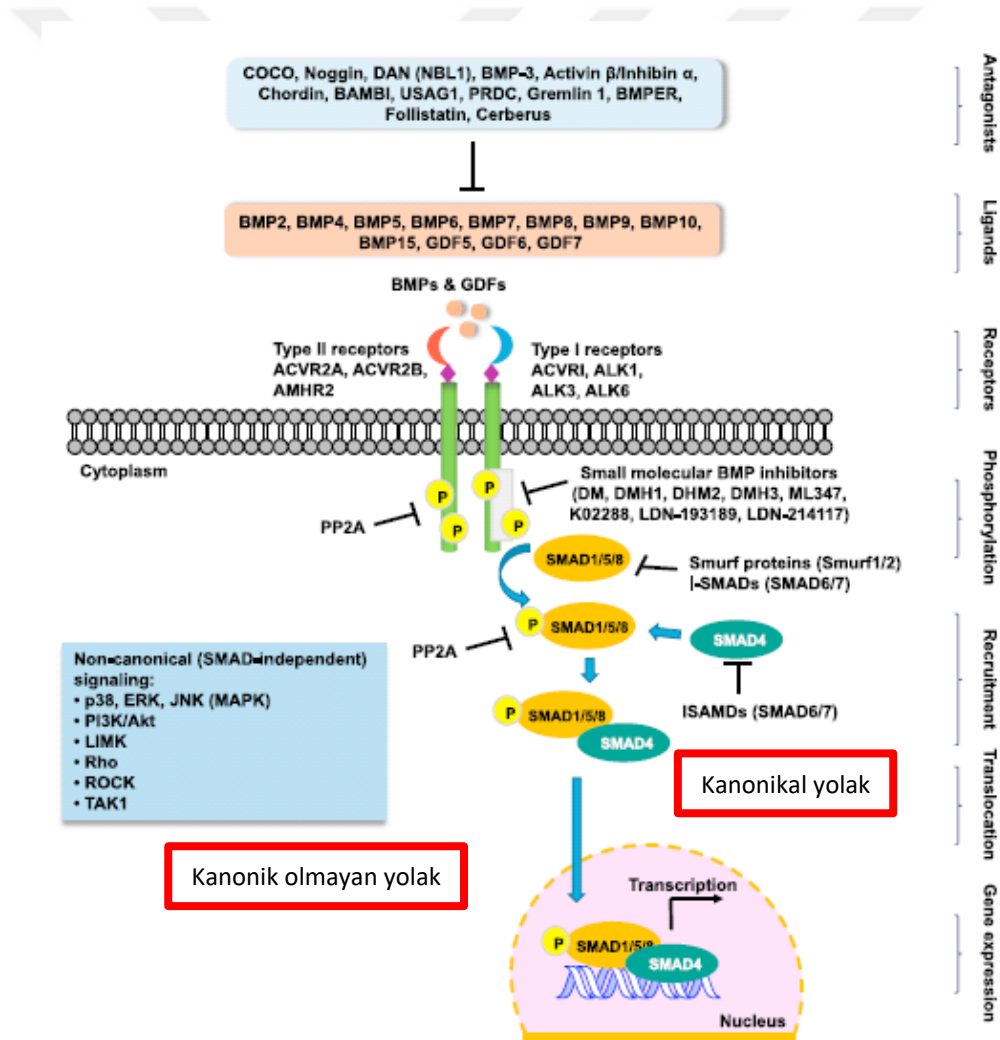
BMP'lerin bu rolleri, anjiyogenez, EMT ve kanser kök hücreleri gibi karsinogenezin çeşitli yönleriyle de yüksek oranda ilişkilidir.

BMP'ler hücre içi sinyalizasyonu hem kanonik hem de kanonik olmayan yollarla üstünden iletirler. Kanonik yolda, BMP'ler sinyallerini serin/treonin protein kinaz reseptörleri üstünden iletirler. Bunu izleyen süreçte reseptör tip 1 ve 2 ile heterotetramerik kompleksler oluşturular. Bu kompleksler fosforillenerek aktive olduğunda düzenleyici reseptör substratlarını (R-Smadlar: Smad 1/5/8) fosforillerler. R-Smadlarda co-Smadlara bağlanır. Tip II reseptör, tip I reseptörünü trans-fosforile eder. Her ikisi de sinyal iletimi için gereklidir. Çeşitli kanserlerde tümör büyümesi, farklılaşması veya apoptozu düzenlerler [40].

Tüm BMPler sinyal kaskadlarını bu temel mekanizma üstünden yürütürler. Kanonik olmayan yollarda BMP ler PI3K/AKT, MAP kinaz, p38 gibi değişik tipte sinyalleri aktive ederler. BMP sinyalinin moleküler detaylarının anlaşılması, BMP'lerin tümör hücreleri de dahil çeşitli hücrelerdeki fonksiyonel aktivitesini açıklamak için gereklidir [40].

BMP'ler, 20'den fazla büyüme faktörü proteinine sahip olan ve kemik oluşumu ve hastalık gelişimi ile yakından ilişkili olan çeşitli molekül sınıfıdır. Çeşitli kanser dokularında çeşitli BMP'lerin ekspresyonu bildirilmiştir. Biyolojik fonksiyon çalışmaları, BMP'lerin hem kanser gelişimi hem de baskılamadaki ikili rolü olduğunu öne sürmektedir. Çeşitli BMP antagonistleri, ligandları ve reseptörlerinin, tümör oluşumu ve metastazı azalttığı veya arttırdığı gösterilmiştir [41].

BMP'ler ve antagonistleri veya reseptörleri arasındaki etkileşimler, primer tümörlerin agresifliğini tanımayı ve kanser hücresi metastazı için bir mekanizma oluşturulmasını önemli ölçüde desteklemektedir (Şekil 2.2)[41].



Şekil 2.2. BMP-aracılı sinyal yolları. Antagonist, ligand, reseptörleri. Kanonikal ve Non-kanonikal yolları[41].

BMP antagonistleri, BMP biyolojik fonksiyonlarının genel inhibitörü olarak bilinirler. Son çalışmalarda, gelişimin farklı aşamalarında BMP aktivatörü olarak da işlev gördüklerini gösterilmiştir [42, 43].

Antagonistler üç sınıfa ayrılır; Ligand antagonistler, doğrudan BMP'lere bağlanırlar, BMP pro-region antagonistler, BMP'lerin işlev göreceği alanlara bağlanır, Reseptör antagonistler, BMP'lerin reseptörlerine bağlanırlar (reseptörlere benzer şekilde, varsayılan N-bağlantılı glikozilasyon bölgeleri için bir sinyal peptidine sahiptirler) [44, 45].

Çeşitli BMP antagonistleri arasında Noggin, ilk olarak *Xenopus* su kurbağa cinsinden orijinal olarak izole edilir ve NOG geni tarafından kodlanır, Kanserdeki biyolojik fonksiyonları nedeniyle çok dikkat çekmiştir [46].

Noggin, Gremlin 1 [47], Chordin-like 1 (Chrdl1) [48], follistatin [49], BMPlerin bilinen antagonistlerindendir.

2.3.1 BMP'ler ve kanser

Over kanseri gibi birçok kanser türünde kanser hücrelerinin yayılımında EMT rol oynamaktadır. 2010 senesine kadar yapılan çalışmalarda, kolorektal, hepataselüler ve osteosarkom gibi kanser tiplerinde, BMP-2 hücre proliferasyonunu inhibe ettiği öne sürülmektedir. Over malign tümörlerde, BMP-2, BMPRII ve BMPRII mRNA seviyeleri, benign tümörler ve normal over dokusuna oranla daha düşük olduğu saptanmıştır [50]. Bu durum BMP-2 artışının metastazdan koruyucu olduğunu akla getirmektedir. Bu bulguların aksine, son yıllarda yapılan çalışmalarda; mide, pankreas, akciğer ve over kanseri hastalarında BMP-2 tedavisinin, EMT'yi arttırdığı ve kötü prognoz ile korele olduğu gösterilmiştir [51]. Seröz over kanseri progenitör hücrelerinde (OCSPC ler) yenilenme ve multipotent farklılaşma kapasitesinin artışı, BMP-2, BMP-4 ve TGF- β seviyelerinde artış ile seyrettiği bildirilmiştir. Bu sonuçlarda BMP-2'nin metastaz ve invazyonu artırdığını göstermektedir [52].

Meme kanserinde, BMP-7'nin TGF- β 1 tarafından aktive edilen EMT ile ilgili genleri belirgin olarak inhibe ettiği ve böylece TGF- β 1 tarafından tetiklenen hücre büyümesi ve metastazında belirgin azalmaya sebep olduğunu gösterilerek meme

kanserinde bu molekülün umut vadeden bir tedavi hedefi olabileceği belirtilmiştir [53]. Metastatik meme kanseri hücre hattı MCF10CA1a da, BMP-7, TGF- β tarafından indüklenen invazyonu inhibe ettiği gösterilmiştir, mekanizmasına bakmak için yapılan çalışmada, BMP-7'nin TGF- β ile indüklenen integrin $\alpha\beta 3$ ün ekspresyonunu inhibe ettiği gözlemlenmiştir [54]. Bu bulguların aksine bir grup çalışmada ise, BMP-7 nin artışının, metastatik prostat kanser hücrelerinin artışına sebep olduğu ve daha da artmış seviyelerinin opere olamayacak evredeki prostat kanserlerinde bulunduğu tespit edilmiştir [55]. Kemiğe metastazı olan 4T1E/M3 hücre hattı hücrelerinde BMP-7, BMPR1B ve BMPR2 ekspresyonlarında artış ve ayrıca Smad1/5/8 in fosforilasyonunun arttığı da gösterilmiştir. Aynı hücre hattında BMP-7'nin gen ekspresyonunun susturulması ile, düzenleyici Smad aktivasyonunu ve hücre proliferasyonunun baskılandığı, hücre büyümesi ve hücre göçünün azaldığı bildirilmiştir [56]. Literatür taramasında bulunan farklı sonuçlar, BMP'lerin farklı alt tiplerinin, farklı yollar üzerinden farklı kanser türlerinde farklı davranışlarını ortaya koymaktadır. BMP'ler, transkripsiyon faktörleri üzerinden EMT sürecinin düzenlenmesinde rol almaktadırlar.

2.4 Çinko parmak E-box bağlayıcı homeobox 2 (ZEB2)

ZEB transkripsiyon faktörleri, EMT sürecinde aktif rol oynayan transkripsiyon faktörleridirler. İki omurgalı ZEB transkripsiyon faktörü, ZEB1 ve ZEB2, E - BOX (Enhancer - box) düzenleyici gen dizilerini bağlarlar. SNAIL ve TWIST gibi, ZEB'ler transkripsiyonel baskılayıcı ve aktivatör olarak işlev görürler, böylece bazı epitel bağlantı ve polarite genlerini baskılayarak EMT fenotipini tanımlayan mezenkimal genleri aktive ederler [57, 58].

ZEB2, Zinc finger E-box bağlayıcı homeobox 2 olarak bilinen ve ZEB2 geni tarafından temsil edilen bir insan proteindir. ZEB2 proteini, transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF β) sinyal yollarında görev almakta ve SMAD larla (TGF β ligandlarına gelen hücre dışı sinyallerin çekirdeğe iletimini yapan hücre içi proteinler) ilişki halindedir, TGF β proteinleri RAS-MAPK sinyallemesini aktive eden büyüme faktörlerine yanıt olarak ZEB ifadesini indüklerler [59].

TGF β reseptörlerinin aktivasyonu, R-SMAD isimli hücre içi efektör moleküllerin fosforilasyonunu sağlar. ZEB2 de bir R-SMAD bağlayıcı proteindir ve transkripsiyonel ko-reseptör gibi davranır. Birçok çalışmada, ZEB2'nin EMT'yi aktive ederek tümör başlangıcı ve gelişiminde anahtar rol oynadığı ve prognozu kötü etkilediği gösterilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, böbrek, kolon, mide ve karaciğer kanseri hücre hatlarında, ZEB2 nin (E-kaderini inhibe ve $\alpha 5$ integrini upregüle ederek) kanser invazyonunu arttırdığı gösterilmiştir, ZEB'nin baskılanması göç, invazyon ve hücre proliferasyonunda azalmaya sebep olmaktadır [60, 61].

Over kanserlerinde, ZEB2'nin çekirdek içinde, kanser dokusunun ön kısmında lokalize olduğu, EMT ve invazyonu arttırdığı başka bir çalışmada gösterilmiştir [62]. Over kanser hücre hatları, OVCAR3 ve SKOV3, üzerinde yapılan çalışmada, mir200 artışının, ZEB1/pSMAD3 yolağı üzerinden, ZEB1 ekspresyonunu azalttığı dolayısı ile de kanser hücre invazyonu ve metastazı azalttığı gösterilmiştir [63].

ZEB2 ekspresyonunun düzenlenmesinde rol alan yolakların anlaşılması, kanser prognozunun anlaşılmasında önemlidir. Büyüme faktörlerini transkripsiyon faktörleri ile EMT sürecini düzenlemeleri sonucu eğer EMT süreci aktif oluyorsa bir sonraki adım EMT sonucu oluşan mezenkimal hücrelerin invazyonu ve tutunarak ilerlemesidir. Bu invazyon hücre yüzeyi bağlantı proteinlerinin (özellikle integrinlerin) düzenlenmesi ile gerçekleşir.

2.5 Metastaz

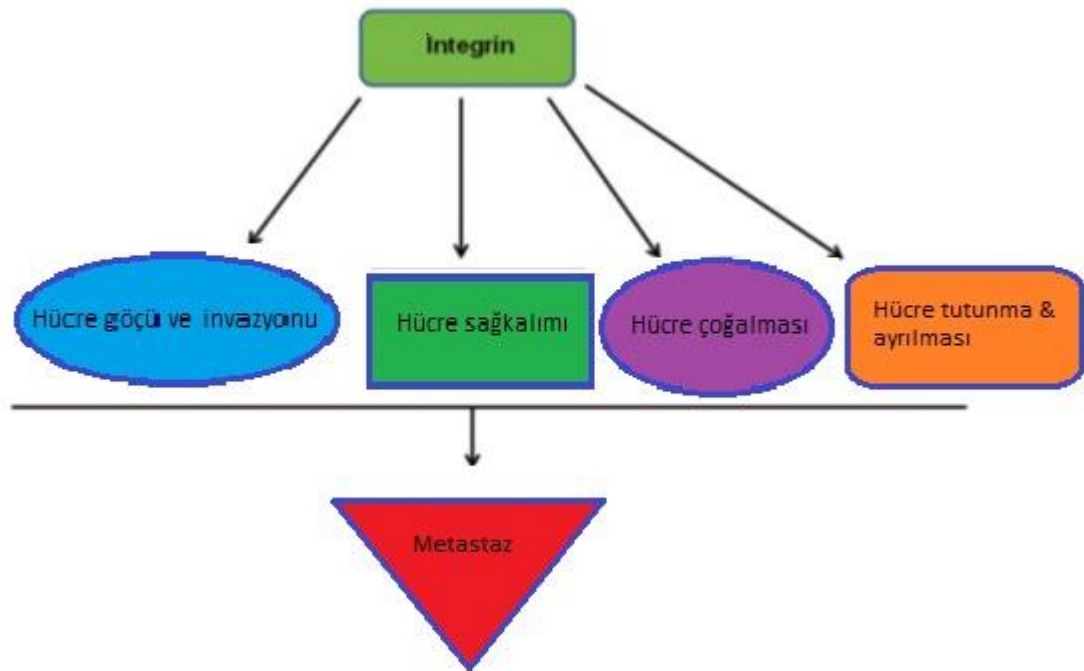
Ökaryotik organizmaların hayatta kalması, hücreler ve ESM arasında dengeli etkileşimler gerektirir. Homeostaz hücre sağkalımı, proliferasyon, farklılaşma ve hücre ölümünün sıkı regülasyonu ile korunur (ör. apoptoz ile). Neoplastik hücreler, iyi huylu bir tümör oluşturan tek bir kütle halinde kümelenirse, bu kitlenin cerrahi olarak çıkarılması, tam bir iyileşme ile sonuçlanabilir. Ancak, tümörün agresif hale gelmesi, çevre dokuları, kan ve lenf damarlarını istila etmesi ve vücudun uzak bölgelerine metastaz olarak adlandırılan sekonder tümörleri oluşturması durumunda tedavi karmaşılaşır.

Hem hücre çoğalması hem de metastaz, ESM bileşenleri ile sürekli etkileşim ve hücre sinyalinin modülasyonunu gerektirir [17].

ESM sinyalleme ve bu tür etkileşimlerin doğası, kanser hücrelerinde normal hücrelerden çok farklıdır. Hücre dışı matriks esas olarak glikoproteinler, fibröz proteinler, vb. gibi makromoleküllerin oluşturduğu karmaşık bir ağdan oluşur.

ESM bileşenlerinin bazı önemli örnekleri fibronektin (FN), laminin (LM), vitronektin (VN) ve kollagen-IV (C-IV) 'dir. Bu matris bileşenleri metastaz için gerekli olan adezyon sinyalleri, proliferasyon, farklılaşma, hayatta kalma, yara iyileşmesi, migrasyon, tümör oluşumu, vb. gibi biyolojik süreçleri düzenleyebilir [66].

Bu düzenlemeler, integrinler aracılığıyla gerçekleşir. Integrinler hücre göçü-invazyonu, hücre proliferasyonu, hücre sağkalımı-apoptoz, ESM ile hücre bağlanması, hücre döngüsü vb gibi farklı hücresel aktiviteleri ve dolayısıyla metastazı düzenlerler(Şekil 2.4) [17].

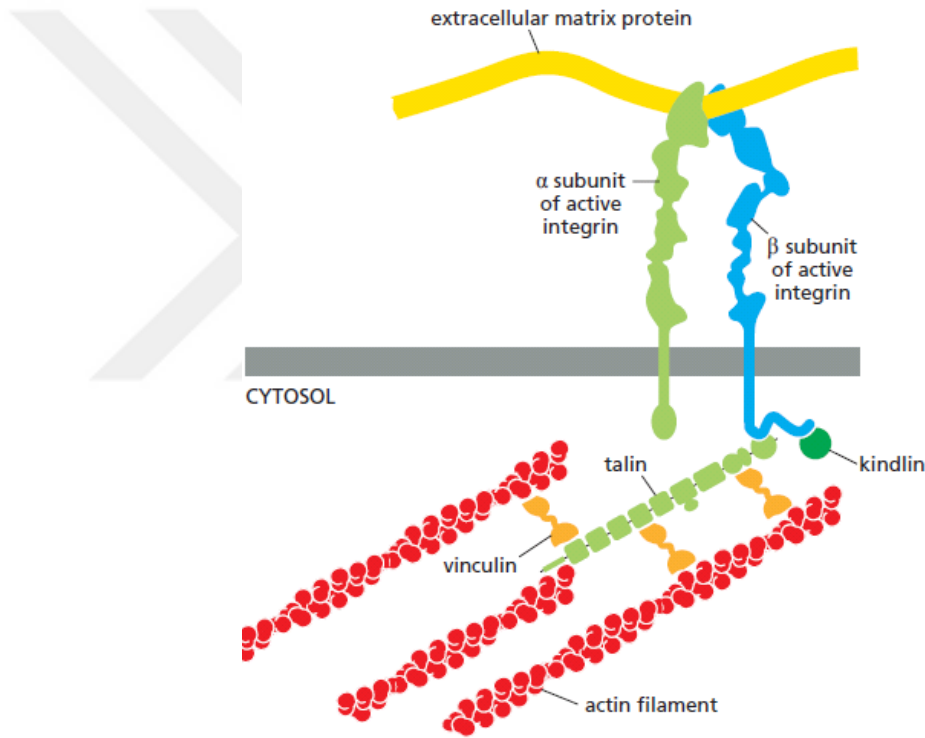


Şekil 2.3. Integrinler çeşitli hücresel aktiviteleri ve dolayısıyla metastazı düzenlerler [17].

2.6 İntegrinler

İntegrinler, kovalent olmayan heterodimerik α ve β alt ünitelerinden oluşan iyi karakterize edilmiş hücre yüzey reseptörleridir [64]. Şimdiye kadar 18 α ve 8 β alt birimleri bulunmuş ve farklı özelliklerde 24 farklı kombinasyon oluşturmak üzere birleşmiştir [65].

α ve β ünitelerin çok fazla çeşitleri olmasına rağmen temel bir yapıya sahiptirler. Transmembran, küçük bir hücre içi C-kuyruğu, büyük hücre dışı N-kuyruğu içerirler (Şekil 2.3) [65, 66].



Şekil 2.4. Aktif bir integrin molekülünün alt birim yapısı, hücre dışı matrisi, aktin hücre iskeletine bağlar.

İntegrinlerin N kuyrukları hücre dışında, Fibronektin(FN), Laminin(LM), Vitronektin(VN), kollagen-IV(C-IV) gibi ESM in önemli komponentlerine bağlanır. ESM, N terminali fibronektin üzerinde bulunan spesifik aminoasit dizilerine bağlanır, bu diziler, Arg-Gly-Asp (RGD) sekansı veya Leu-Asp-Val (LDV) sekansıdır. ESM - integrin tutunmaları, zayıf, kaderin aracılıklı hücre-hücre bağlantısına benzer şekilde

veya kuvvetli ve belirgin olarak fokal adeziyonlar aracılığı ile gerçekleşir ve tutundukları yerde kümeler oluştururlar.

İntegrinler hücre içinde C-kuyruğu hücre iskeletinin aktin filamanlarına tutunurlar. Bu tutunma Vinkulin, Talin, Kindlin gibi ara proteinlerin aracılığı ile gerçekleşir [65].

İntegrin kümelerinin ESM elemanlarına yapışmasına yardımcı proteinleri, ILK (integrin benzeri kinaz), pinch, parvini ve hücre içinde integrin kümelerine bağlanmada ve sinyal iletiminde yardımcı proteinleri, vinculin, zyxin, VASP, α -actinin, FAK (fokal adezyon kinaz) olarak bilinmektedir [65].

İntegrinlerin etkinliği, hem hücre üzerinde bulunduğu yer hem de zaman (hücre siklusu) açısından sıkı bir şekilde kontrol edilmelidir.

İntegrinlerin aktifleşmesi, hücre dışı veya hücre içi alanlarını bağlayan proteinler tarafından düzenlenir, bu outside-in ve inside-out sinyalizasyon olarak bilinir ve çift yönlü sinyal iletimi konusunda eşsiz bir yeteneğe sahip olmasını sağlar [67, 68].

Inside-out integrin aktivasyonu sırasında, Talin ve fokal adhezyon kinazlar (FAK), bağlanacak ilk proteinler arasındadır. Talin, β -integrinin sitoplazmik alanına bağlanır. Talin ve fokal adhezyon kinazlar, PtdIns (4,5) P2 bağlanmasıyla aktive olurlarlar. Söz konusu proteinlerin tam hiyerarşisi hâlâ tartışma konusudur ancak bu aşamalı bir süreç olarak düşünülmektedir [69].

Bu proteinlerin bağlanması ile integrin altbirimleri arasındaki bağlantılar bozulur, β -integrinin transmembran alanının eğim açısı değişir, dış membran clasp (OMC) ve iç membran clasp (IMC) olarak adlandırılan, α - ve β -altbirimlerinin transmembran alanları arasındaki arayüzdeki etkileşimleri serbest kalır [67].

Kindlinler, integrin ko-aktivatörlerinden biri, talin ile indüklenen integrin aktivasyonunu arttırırlar. IPP kompleksi, integrin-ILK, PINCH, parvin, adezyon bölgelerine paxillin ve α -actinin gibi önemli fokal adezyon proteinlerini bağlar ve integrin aktivatör proteinleri arasındadırlar [70].

Outside-in etkinleştirme sırasında, ligand bağlanması, genellikle başlık açıklığı olarak adlandırılan β alt biriminin 'I' alanının 'kapalı'dan, 'açık' konformasyonuna geçişi ile indükler [71].

İntegrin inaktivatörleri integrinler ile doğrudan etkileşime girer. İntegrin inhibisyonunun, inhibitör molekülün integrin sitoplazmik bölgelerinde, integrin aktivatörlerinin bağlanacağı bölgeye bağlanarak aktivatörlerin bağlanmasını engellemesi şeklinde gerçekleşir.

Bu moleküller, inside-out aktivasyona müdahale ederek integrin inaktivasyonunu sağlarlar. Birkaç inhibitör tanımlanmıştır ve bunlar β veya α integrinin sitoplazmik kuyruğuklarına bağlanırlar [65, 66-71, 72] böylece talin ve kindlin bağlanmasını inhibe ederler [74, 75, 76].

Filamin, ICAP1 (integrin cytoplasmic domain-associated protein 1), DOK1 (docking protein 1), SHARPIN (SHANK-associated RH domain-interacting protein), MDGI (mammary-derived growth inhibitor) bilinen integrin inhibitör proteinlerindendir [77].

İntegrinlerin değişik bağlanma bölgeleri, ligandları ve görevleri olduğundan, aynı integrin tipi farklı hücrelerde farklı ligandlara bağlanıp, farklı işlev görebilir. Hücreler tutunmaya bağımlı olarak büyür, proliferer olur ve hayatta kalırlar. Bu durumu oluşturan ana etmen integrinler ve onların hücre içi sinyal yollarıdır. Hücrelerin tutunma bağımlılıklarındaki mutasyonlar, onların bağımsız şekilde göç edip, çoğalıp; kansere dönüşümlerine neden olur[65].

Yapılan çalışmalarda integrinlerin artışı veya azalmasının birçok kanser dokusunun invazyon ve metastazında rol oynadığı gösterilmiştir.

Örneğin akciğer kanserlerinde erken evrede $\alpha 5$, $\beta 1$ ve $\beta 3$ integrin ekspresyonu kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca lenf nodu metastazı ve rekürrens için işaretleyici olarak kullanılabileceği gösterilmiştir [78].

Seröz epitelyal over kanserlerinde $\alpha v\beta 6$ integrinin artmış ekspresyonunun plazminojen aktivasyon kaskadı yoluyla ekstrasellüler matriks degradasyonu yaparak invazyon potansiyelini artırdığı ve over kanser gelişimi ve metastazında rol oynayabildiği gösterilmiştir [79].

Literatürde over epitel kanserlerinde kemoterapi direnci ve integrinler üzerine yapılan çalışmalarda bulunmaktadır. Over epitelyal kanserlerinde Lewis Y antijeni ve integrin $\alpha 5\beta 1$ artışı kemoterapi direnci ile ilişkilendirilmiştir [80].

Başka bir çalışmada epitelyal over kanserlerinde Lewis Y antijeni ve αv , $\beta 3$ integrin ekspresyon artışının ilaç direnci ile ilişkisine bakılmış ve Lewis Y antijeni ve αv integrinin klinik evreden bağımsız ilaç direnci ile pozitif korelasyonu gösterilmiştir [81]. Over seröz kanserlerinde E-cadherin ekspresyonunun kaybolması $\alpha 5$ integrin artışı ve metastaz ile ilişkilendirilmiştir [82].

Embriyonik böbrek, kolon kanser, mide kanseri ve karaciğer kanseri hücre hatlarında hattında ZEB2 nin transkripsiyon faktörü olan Sp1 ile koopere şekilde integrin $\alpha 5$ i ve kaderin 11'i upregüle ettiği gösterilmiştir. Böylece EMT'yi artırarak kanser invazyonunu artırdığı gösterilmiştir[83].

Over kanserlerinde yapılan çalışmalarda; $\alpha v\beta 6$, $\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\beta 4$ integrinlerin metastaz ve invazyonda arttığı gösterilmiştir. Epitelyal over kanserlerinde $\beta 1$ -integrinin artışı kanser hücrelerinin agresifliğinin artışı ile ilişkilendirmişlerdir, $\beta 1$ integrinin inhibisyonunun, hücre motilitesini azalttığı aynı çalışmada gösterilmiştir [84]. Over kanseri hücre hatlarında (HO-8910 ve HO-8910PM), $\beta 1$ -integrinin artışı gösterilmiştir. Bu integrinin siRNA ile susturulmasının apoptozu artırdığı, adhezyon ve göçü azalttığı bildirilmiştir [85]. Over kanserlerinde yapılan başka bir çalışmada, $\alpha 5\beta 1$ -integrinin, c-Met/FAK/Src yoluyla aktivasyonu ile metastaz ve invazyonu arttırdığı bildirilmiştir[86].

Bizim incelediğimiz kadarıyla literatürde BMP-2 ve BMP-7'nin over kanseriyle ilişkisi gösterilmiştir ancak bu ilişkinin mekanizması açık şekilde aydınlatılamamıştır. Çalışmamızda, lenf nodu metastazı yapan ve yapmayan over kanserinde BMP-2 ve BMP-7'nin ekspresyonları arasında fark olup olmadığına bakılacaktır. Metastaz ile ilişkili ZEB2 ve integrinlerden alfa5 ve beta1 immunreaktivitesindeki değişiklikler ileri evre over seröz kanseri lenf nodu tutulumu olan ve olmayan gruplarda over dokusu ve lenf nodu dokusundaki tümör odaklarında karşılaştırılacaktır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Gereç

3.1.1 Hasta gruplarının belirlenmesi

Çalışma kapsamında retrospektif olarak, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalından, yüksek dereceli over seröz karsinom tanısı almış, 84 hastadan elde edilen arşiv materyali kullanıldı. Çalışma için 13.07.2016 tarihinde, 2016/14 numaralı toplantıda, GO 16/479 kayıt numarasıyla Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu izni alındı.

Çalışmaya lenf nodu tutulumu olan ve olmayan yüksek dereceli over seröz karsinom tanısı almış hastaların over ve lenf noduna ait örnekleri dahil edildi. Cerrahi rezeksiyon öncesi kemoterapi veya radyoterapi alan hastalar çalışma dışında bırakıldı.

Buna göre;

1. Lenf nodu tutulumu olan yüksek dereceli over seröz kanseri tanısı almış hastalara ait over tümör dokusu (n=42)
2. Lenf nodu tutulumu olan yüksek dereceli over seröz kanseri tanısı almış hastalara ait lenf nodu dokusu (n=42)
3. Lenf nodu tutulumu olmayan yüksek dereceli over seröz kanseri tanısı almış over tümör dokusu (n=42) olmak üzere çalışma grupları belirlendi.

3.2. Histokimya ve İmmunohistokimya Yöntemi

3.2.1 Doku Kesitlerinin Alınması

Tıbbi Patoloji anabilim dalından alınan parafin bloklar, kesit alınmadan bir gün önce -20 °C' de bekletildi. Ertesi gün kızaklı mikrotom kullanılarak 5 µm kalınlığında kesitler histokimyasal ve immunohistokimyasal incelemeler için lamlara alındı.

3.2.2. Kullanılan Malzemelerin Hazırlanması

Çalışmada Mayer'in Hematoksileni, Eozin, Fosfat tampon solüsyonu, Fosfat tampon solüsyonu-sığır serum albümini, Sitrat Tampon, Hidrojen peroksidaz blokaj

solüsyonu, serum blokaj solüsyonu, primer antikorlar, sekonder antikorlar, Diamino benzidin (DAB) solüsyonu kullanıldı.

Mayer'in Hematoksileni

Hematoksilen kristali	(Sigma K.N:H 9627) 1 gr
Aluminyum potasyum sülfat ($KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$)	(Sigma K.N:A 7167) 50 gr
Sitrik asit (monohidrat)($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$)	(Sigma K.N:C 7129) 1 gr
Kloral hidrat ($C_2H_3Cl_3O_2$)	(Sigma K.N:N 8383) 50 gr
Sodyum iyodat ($NaIO_3$)	(Sigma K.N:S 407) 0,2 gr
Distile su	1000 ml

Hazırlanışı:

Hematoksilen, aluminyum potasyum sülfat ve sodyum iyodat distile suda karıştırılarak çözüldü. Daha sonra kloral hidrat ve sitrik asit karışıma eklendi. Karışım kaynatılıp soğutmaya bırakıldı. Soğuyan karışım süzüldü.

Boyama:

Hematoksilen-eozin boyama protokolünde 20 dk süreyle uygulandı. İmmunohistokimya boyama protokolünde çekirdek boyama aşamasında 1dk süreyle uygulandı.

Eozin

Eozin Y (suda eriyen)	3gr
Asetik asit	2 damla
%95 Etanol	125 ml
Distile su	475 ml

Hazırlanışı:

3 gr Eozin Y 100 ml distile suda çözüldü. Üzerine 125 ml %95' lik etanol eklendi.

Hazırlanan karışımın üzerine 375 ml distile su eklenerek 2 damla asetik asit damlatıldı ve karıştırıldı.

Boyama:

Hematoksilen-eozin boyama protokolünde 1 dk süreyle uygulandı.

Fosfat tampon solusyonu (PBS)

Solüsyon I:

Sodium dihydrogen phosphatemonohydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$)	(Merk K,N:3090)	13,7 gr
Sodium chloride(NaCl)	(Merk K,N:6408)	87,66 gr
Distile su		1000 ml

Solüsyon II:

Sodium dihydrogen orthophosphat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	(BDH Chemical No:30132)	71,2 gr
Sodium chloride(NaCl)	(Merk K,N:6408)	350,64 gr
Distile su		4000 ml

Stok solüsyonu:

Hazırlanan solüsyon I ve solüsyon II ayrı ayrı süzüldü. 4000 ml solüsyon I içerisine 500 ml solüsyon II eklendi. Karışımın pH' sı pHmetre ile ölçüldü. Karışımın pH' sı 6,9 olana kadar solüsyon I veya II eklendi.

Kullanma solüsyonu (yıkama solüsyonu)

Kullanılırken 100 ml stok fosfat tampon solusyonu (PBS), distile su ile 10 kat sulandırılarak 1000 ml çalışma solüsyonu elde edildi. Solüsyon I veya II yardımı ile pH' sı 7,4 olacak şekilde ayarlandı.

Fosfat tampon solüsyonu-sığır serum albumini (PBS+BSA) (%2,5)

PBS	100 ml
BSA	2,5 gr

Hazırlanan fosfat tampon solüsyonu (PBS pH=7,4) içine 2,5 gr toz BSA tartılarak karıştırıldı.

Sitrat Tampon (100 mm trisodyum sitrat)

Trisodyum sitrat	44,1 gr
Distile su	1000 ml

pH ayarı için:

1 N NaOH

1N hidroklorik asit

Hazırlanışı:

pH' sı 6,0 olan sitrik tampon çözeltisi (100 Mm Trisodyum sitrat) stok solüsyonu (10X) hazırlamak için 44,1 gr trisodyum sitrat tartılarak son hacim 1500 ml ye tamamlandı. Ph metre ile pH: 6,0 olacak şekilde ayarlanan stok solüsyonu +4 derecede kullanıma kadar saklandı. Kullanılırken 100 ml stok sitrat tamponu distile su ile 10 kat sulandırılarak 1000 ml çalışma solüsyonu elde edildi. Her kullanımda sulandırma işlemi sonrasında hafifçe artmış olan pH, 1N HCl solüsyonundan eklenerek pH metre yardımıyla tekrar 6,0'ya ayarlanarak kullanıldı.

H₂O₂ Blokaj Solüsyonu

H ₂ O ₂ (%30, Merck, Almanya)	100 µl
Metanol (Merck, Almanya)	450 µl
Distile su	450 µl

Hazırlanması:

Belirtilen oranlar kullanılarak 1000 µl H₂O₂ blokaj solüsyonu hazırlandı. Kesitler yaklaşık olarak 150-200 µl ile kapandığı için bu oranın katları hesaplanarak kesit sayısına göre H₂O₂ blokaj solüsyonu her işlem öncesinde taze olarak hazırlandı.

%30 stok H₂O₂ solüsyonundan 100 µl alınarak, metanol ve distile su dilüsyonu ile 1/10 oranında hazırlandı.

Serum Blokaj Solüsyonu

Keçi serumu	100 µl
PBS + BSA	900 µl

Hazırlanışı:

Serum blokaj basamağında sekonder antikorun üretildiği canlı türünün serumu 1/10 oranında sulandırılarak uygulandı. Bu işlemde 1 ml %10 serum blokaj solüsyonu için, 100 µl normal keçi serumu 900 µl PBS + BSA ile sulandırıldı.

Primer Antikorlar

Çalışmada kullanılan primer antikorlar, fare ve tavşanda üretilmiş, insan antijenlerini belirleyebilecek özellikte ticari olarak sağlanan antikorlardır (Tablo 3.1) . Anti-Smad Interacting Protein 1 (ZEB2) hariç tüm antikorlar monoklonaldır. Bu antikorlar tabloda verilen oranlarda PBS-BSA karışımı ile sulandırılarak kesitlere uygulandı.

Tablo 3.1. Kullanılan primer antikorların kaynağı, katalog numarası, klon adı, izotipi ve sulandırma oranı

Antikor	Kaynak	Katalog no	Klonalite	Klon numarası	İzotipi	Sulandırma oranı
Anti-BMP-2	Abcam	ab6285	Monoklonal	65529.111	Mouse IgG2b	1/200
Anti-BMP-7	Abcam	ab54904	Monoklonal	*	Mouse IgG1	1/200
Anti-Smad Interacting Protein 1 (ZEB2)	Abcam	ab138222	Poliklonal	-	Rabbit IgG	1/400
Anti-Integrin alpha 5	Abcam	ab150361	Monoklonal	EPR7854	Rabbit IgG	1/200
Anti-Integrin beta 1	Abcam	Ab30388	Monoklonal	JB1B	Mouse IgG2a	1/50

* Ürüne ait bilgi kağıdında verilmemiştir.

Sekonder Antikorlar

Çalışmada kullanılan primer antikorlar fare veya tavşanda üretildiği için bunlara karşı keçide üretilmiş sekonder antikorlar kullanıldı (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. Kullanılan sekonder antikorların kaynağı, katalog numarası, klon adı, izotipi ve sulandırma oranı

Antikor	Kaynak	Katalog no	Klon	İzotipi	Sulandırma oranı
Anti-rabbit IgG(HRP)	Abcam	ab97051	Poliklonal	Goat anti-mouse IgG	1/1000
Anti-mouse IgG(HRP)	Abcam	ab97023	Poliklonal	Goat anti-rabbit IgG	1/1000

Diamino benzidin (DAB) solüsyonu

Kromojen olarak Diamino benzidin (DAB) (Lab vision, TA-125-HDX, İngiltere) kullanıldı. 1 ml DAB substratı içine 1 damla DAB eklenerek karıştırıldı. Hazırlanan kromojen solüsyonunun ışıktan uzak tutulması için hazırlanan tüp alüminyum folyo ile sarıldı. Solüsyon taze hazırlandı ve bekletilmeden kullanıldı.

3.2.3. Histokimya Yönteminin Uygulanması

Mayer's Hematoksilen Boyama Protokolü

Mayer's hematoksilen boyama protokolünde rodajlı lamlara alınan 5 µm kalınlığındaki parafin kesitler 1 gece etüvde deparafinize edildi. Etüvden çıkarıldıktan sonra aşağıdaki sırayla boyama işlemi gerçekleştirildi:

- Üç kez 15 dk süreyle ksilolde bekletilerek kalan parafin uzaklaştırıldı.
- İki kez 10 dk süreyle % 96 etanol ve bir kez 10 dk süreyle %80 etanolde bekletilerek rehidratasyon uygulandı.
- Çeşme suyunda yıkandıktan sonra hematoksilende 20 dk bekletildi. Boyanın fazlası yıkanarak uzaklaştırıldı.
- Sonrasında amonyaklı sudan geçirilen kesitler çeşme suyunda yıkandı.
- Eozin içinde 1dk tutularak sitoplazma boyanması gerçekleştirildi.
- %80, %96, %96 etanolden geçirilerek dehidratasyon yapıldı.

- Üç kez 15 dk süreyle ksilolde şeffaflandırıldıktan sonra entellan kapatma medyumu (Merck, Almanya) ile kapatıldı.

3.2.4 İmmunohistokimya Yönteminin Uygulanması

Deparaffinizasyon ve Rehidratasyon

Parafin kesitler gece boyu 60°C etüvde deparafinize edildi. Sonrasında ksilolde 3X5 dk bekletilip, kesitler kurutuldu. Rehidratasyon için % 96 etanolde 2 X 3 dk, % 80 etanolde 3 dk, % 70 etanolde 3 dk etanol uygulandı. Rehidrate edilen kesitler distile su ile yıkandı ve sonrasında fosfat tamponlu solusyonu (PBS) içinde antigen geri çağırma (retrival) kadar bekletildi.

Antijen Geri Çağırma

BMP-2, BMP-7, ZEB2, İntegrin Alfa 5 antijenleri için pH'sı 6 olan sitrat tampon çözeltisi ile antijen açığa çıkarma yöntemi uygulandı. Dödüklü tencereye 1500 ml sodyum sitrat çözeltisi eklendikten sonra, tencere ısıtıldı. Başlangıçta açık olan dödüklü tencere kapağındaki düdük, kaynamaya başladıktan sonra kapatılarak 3 dakika beklendi. Daha sonra dödüklü tencere, havuza alınarak soğuması beklendi.

İntegrin Beta 1 antijeni için proteinaz K (Dako Cytomation 095069) enzimi oda sıcaklığında 20 dk uygulanarak, enzimatik antijen açığa çıkarma yöntemi gerçekleştirildi.

Antijen geri çağırma sonrası kesitler, Fosfat tampon solusyonu (PBS) ile 3x5 dk yıkandı.

Yıkama sonrası doku kesitlerinin çevresi hidrofobik kalem ile çizilerek işaretlendi. Kesitler işaretleme sonrası nemli ortama (kapaklı, içinde distile su içeren nemli küvete) yerleştirildi ve diğer işlemler nemli ortamda gerçekleştirildi.

Endojen Peroksidaz Blokajı

Kesitlere, oda sıcaklığında nemli ortamda 5 dk süreyle % 3 H₂O₂ solüsyonuyla endojen peroksidaz blokajı uygulandı.

Serum ile Blokaj

Serum blokaj aşamasında, sekonder antikorların geliştirildiği canlı türünün normal serumu kullanıldı. Sekonder antikorların üretildiği canlı türünün serumu 1/10 oranında sulandırılarak uygulandı. Bu işlemde 1 ml % 10 serum blokaj solüsyonunun hazırlanması için, 100 µl normal keçi serumu 900 µl %1 BSA içeren PBS ile sulandırıldı. Hazırlanan serum blokaj solüsyonu ile kesitler oda sıcaklığında 1 saat muamele edildi.

Ardından yıkama yapılmadan sadece blokaj solüsyonu mekanik olarak uzaklaştırılarak primer antikor uygulama basamağına geçildi.

Primer antikorun uygulanması

BMP-2 antijenine yönelik primer antikor (Abcam; ab6285) 1/200 oranında %1 BSA içeren PBS solüsyonu ile seyreltilerek kesitlere uygulandı (dilüsyon aralığı 1/100-1/500 olarak tavsiye edilmiştir). Kesitler, nemli küvet içinde bir gece + 4°C'da inkübe edildi.

BMP-7 antijenine yönelik primer antikor (Abcam; ab54904) 1/200 oranında %1 BSA içeren PBS solüsyonu ile seyreltilerek kesitlere uygulandı (dilüsyon aralığı 1/100-1/500 olarak tavsiye edilmiştir). Kesitler, nemli küvet içinde gece boyu (over night) + 4°C'da inkübe edildi.

ZEB2 antijenine yönelik primer antikor (Abcam; ab138222) 1/400 oranında %1 BSA içeren PBS solüsyonu ile seyreltilerek kesitlere uygulandı (dilüsyon aralığı 1/100-1/500 olarak tavsiye edilmiştir). Kesitler, nemli küvet içinde bir gece (over night) + 4°C'da inkübe edildi.

Anti-Integrin alpha 5 antijenine yönelik primer antikor (Abcam; ab150361) 1/200 oranında %1 BSA içeren PBS solüsyonu ile seyreltilerek kesitlere uygulandı (dilüsyon aralığı 1/100-1/500 olarak tavsiye edilmiştir). Kesitler, nemli küvet içinde bir gece (over night) + 4°C'da inkübe edildi.

Anti-Integrin beta 1 antijenine yönelik primer antikor (Abcam; ab3167) 1/50 oranında %1 BSA içeren PBS solüsyonu ile seyreltilerek kesitlere uygulandı (dilüsyon aralığı 1/100-1/500 olarak tavsiye edilmiştir). Kesitler, nemli küvet içinde bir gece (over night) + 4°C'da inkübe edildi.

Sekonder antikorun uygulanması

BMP-2, BMP-7, ITG $\beta 1$ antikorunu uygulanan kesitler 1/1000 dilüsyonla hazırlanan goat-anti mouse sekonder antikorunu ile nemli küvette oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.

ZEB2, ITG $\alpha 5$ antikorunu uygulanan kesitler 1/1000 dilüsyonla hazırlanan goat-anti rabbit sekonder antikorunu ile nemli küvette oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.

Kromojen uygulanması

Kromojen olarak, diaminobenzidin (DAB) solüsyonu kullanıldı. Hazırlanan kromojen solüsyonunun ışıktan uzak tutuldu. Her antikor için uygun inkübasyon süresini belirlemek için, kesitler mikroskop ile incelenerek uygun süreye karar verildi. Optimum süre belirlendikten sonra diğer kesitlerde aynı süre uygulandı. BMP-2, BMP-7 antijeni için uygulanan boyamalarda hazırlanan DAB solüsyonu kesitlere 5 dakika boyunca uygulandı. ZEB3 ile yapılan işaretlemelemlerde ise kesitlere 3 dakika boyunca kromojen solüsyonu uygulandı. ITG $\alpha 5$, ITG $\beta 1$ ile yapılan işaretlemelemlerde solüsyon 6 dakika boyunca kesitlere uygulandı. Kesitlere kromojen uygulaması boyunca kesitlerin bulunduğu küvet ışık geçirmez alüminyum folyo ile kaplandı veya siyah renkli nemli kutu kullanıldı. DAB yüksek oranda toksik olduğundan, kesitlerdeki DAB, çamaşır suyu (sodyum hidroklorit) içeren atık kabı içine boşaltılarak nötrale edildi. Sonrasında kesitler distile su ile 3 kere 5 dk yıkanarak fazla kromojen uzaklaştırıldı.

Çekirdek boyası uygulanması

Çeşme suyuyla yıkama sonrası kesitlere Mayer'in hematoksilin çekirdek boyası yapıldı. Hematoksilin sonrası kesitler, çeşme suyuyla yıkandı. BMP-2, BMP-7, ZEB2 antijenleri için Mayer'in hematoksilini kesitlere 1 dk uygulanırken, ITG $\alpha 5$ ve ITG $\beta 1$ antijenleri için 45 saniye uygulandı.

Dehidratasyon, şeffaflama ve kapama

Kesitler, % 70 etanolde 3 dakika, % 80 etanolde 3 dakika, % 96 etanolde 3 dakika, %100 etanolde 3 dakika bekletilerek dehidrate edildi. Daha sonra ksilolde 2 kere 5 dakika şeffaflama işleme gerçekleştirildi. Sonrasında Entellan kullanarak kesitler kapatıldı.

Kontrol boyaması

Negatif kontrol: primer antikor basamağı atlanarak, izleyen basamaklar aynen uygulandı.

3.3 Hücre Kültürü

3.3.1 Over kanseri hücre hattı kültürü

İnsan Ovarian Adenocarcinoma hücre hattı SKOV-3 (HTB77, ATCC, ABD) ticari olarak satın alındı. Gelen hücre hattı optimal kültür koşullarında çoğaltıldı. Kısaca hücre hattı üretici firma tarafından soğuk zincir bozulmadan laboratuvara ulaştırıldıktan sonra steril şartlar altında laminar akım kabini içinde çözüldü. Çözülen over kanseri hücre serisine ait hücreler besiyeri içinde 75cm² lik flasklara ekilip 37° C, %5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırıldı. SKOV-3 hücre hattı için uygun besiyeri McCoy's 5A (30-2007, ATCC, ABD) hücre hattına özel olarak satın alındı. Besiyeri McCoy bazal besiyeri içine %10 FBS, %2 L-glutamin, %1 antibiyotik-antimikotik çözeltisi eklenerek hazırlandı ve kullanıldı. Ertesi gün hücreler faz kontrast mikroskobu altında kontrol edildi ve iki gün sonrada besiyerleri değiştirildi. Flasklar %80 konfluent olduğunda pasajlandı. Birinci pasajdan sonra bir miktarı dondurulup ileri dönemde kullanılmak üzere azot tankında saklandı. Diğer hücreler deneyler için kullanıldı.

3.3.2. SKOV-3 Over Kanseri Hücrelerinde İmmunositokimya Yönteminin Uygulanması

Üretilen SKOV-3 hücre hatında (4.pasaj hücrelerde) immunfloresan ve immünperoksidaz immünositokimyasal işaretleme gerçekleştirildi.

İmmünperoksidaz işaretleme protokolü:

SKOV-3 hücre hatlarına ait hücreler 5000-10000 hücre/kuyu olmak üzere özel 8 kuyulu lamlara ekilip, tutunmaları için beklendi. Hücreler konfluent olduktan sonra:

- Besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler PBS ile yıkandı.
- Hücreler 5 dakika süreyle oda sıcaklığında %4 paraformaldehit ile tespit edildi. PBS ile yıkandı.
- Enzim HRP kullanıldığından endojen peroksidaz blokajı için Hidrojen peroksit blokaj solüsyonu (12 ml H₂O₂ + 54 ml metanol + 54 ml distile su) ile kesitler 10 dk inkübe edildi. Sonrasında dokular 3'er kez 5 dk PBS ile yıkandı.
- Serum blokaj için blokaj solüsyonu (goat serum 1:50 oranında %1 BSA içeren PBS ile sulandırılarak kullanıldı) ile hücreler 1 saat inkübe edildi. Blokaj solüsyonundan sonra yıkama yapılmadı.
- Primer antikorlar uygun dilusyonda sulandırıldı (BMP-2, BMP-7 ve ITG α 5 için uygun dilusyon oranı 1/200; ITG β 1 için 1:50; ZEB2 için 1:400). Primer antikor ile oda sıcaklığında 1 saat süreyle inkubasyon yapıldı.
- Preparatlar 3 kere 5 dakika PBS ile yıkandı.
- Uygun sekonder antikorlar ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.
- Üç kere 5 dk PBS ile yıkandı
- Uygun şekilde hazırlanan DAB ile inkübe edildi. Mikroskop altında boyama gözlenince çeşme suyu ile yıkama işlemi yapıldı.
- Mayer's hematoksilen ile 2 dk çekirdek boyaması yapıldı. Ardından çeşme suyu ile yıkandı.
- Dehidratasyon ve şeffaflandırma (ksilol) işlemlerinden sonra kapama yapılarak görüntülemeler yapıldı. Spesifik immune işaretlenmenin varlığı negatif ve pozitif kontrol boyamaları ile karşılaştırmalı olarak değerlendirildi.

İmmünfloresan işaretleme protokolü:

SKOV-3 hücre hatlarına ait hücreler 5000-10000 hücre/kuyu olmak üzere özel 8 kuyulu lamlara ekilip, tutunmaları için beklendi.

Hücreler konfluent olduktan sonra:

- Besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler PBS ile yıkandı.
- Hücreler 5 dakika süreyle oda sıcaklığında %100 metanol ile tespit edildi.
- PBS ile yıkandı.
- Permabilizasyon için 5 dk süreyle % 0,1 Tween20 ile inkübe edildi.
- PBS ile 3 kere 5 dk yıkandı.
- Spesifik olmayan boyanmayı engellemek amacı ile serum blokaj (%1 BSA+% 10 keçi serumu+% 0,1 PBS-Tween 20) 1 saat süreyle yapıldı.
- Yıkama yapılmadan serum uzaklaştırıldı.
- Uygun dilusyonlarda primer antikorlar ile oda sıcaklığında 1saat süre ile inkübasyon yapıldı.
- PBS ile 3 kere 5 dk yıkandı.
- BMP-2, BMP-7, ITG β 1 antikorları uygulanan kuyulara goat anti-mouse-FITC %1 BSA içeren PBS'de 1/1000 dilüsyonla, oda sıcaklığında 1 saat süreyle uygulandı. ZEB2, ITG α 5 antikorları uygulanan kuyulara, goat anti-rabbit Alexa Fluor 568 %1 BSA içeren PBS'de 1/1000 dilüsyonla, oda sıcaklığında 1 saat süreyle uygulandı.
- Hücre çekirdekleri DAPI ile işaretlendi.
- Floresan için uygun olan kapama medyumunu ile kapatıldı.
- Spesifik immün işaretleme varlığı negatif kontrol işaretleme ile karşılaştırmalı olarak floresan mikroskobu altında yapıldı.

Çift işaretleme için İmmünfloresan işaretleme protokolü:

ITG α 5 ve ITG β 1'in hücrede lokalizasyonlarını belirlemek amacıyla hücre hattında çift immünofloresan işaretleme gerçekleştirildi. SKOV-3 hücre hattına ait

hücreler 5000-10000 hücre/kuyu olmak üzere özel 8 kuyulu lamlara ekilip, tutunmaları için beklendi.

Hücreler konfluent olduktan sonra:

- Besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler PBS ile yıkandı.
- Hücreler 5 dakika süreyle oda sıcaklığında %100 metanol ile tespit edildi.
- PBS ile yıkandı.
- Permabilizasyon için 5 dk süreyle % 0,1 Tween20 uygulandı.
- PBS ile 3 kere 5 dk yıkandı.
- Spesifik olmayan işaretlenmeyi engellemek amacı ile serum blokaj (%1BSA + %10 keçi serumu + %0.1PBS-Tween20) 1 saat süreyle yapıldı.
- Yıkama yapılmadan serum uzaklaştırıldı.
- Primer antikor uygun dilusyonda sulandırıldı. İntegrin alfa5 için uygun dilusyon oranı 1/200 idi. Diluent olarak %1 BSA içeren PBS kullanıldı. İntegrin alfa 5 ile inkubasyon bir gece (over night) + 4°C'de gerçekleştirildi.
- Ertesi gün 3 kere 5 dk PBS ile yıkandı
- Sekonder antikor olarak goat anti-rabbit Alexa Fluor 568, %1 BSA içeren PBS'de 1/1000 dilüsyonla, oda sıcaklığında 1 saat süreyle uygulandı.
- PBS ile 3 kere 5 dk yıkandı
- İkinci primer antikor uygun dilusyonda sulandırıldı. integrin beta1 için uygun dilusyon oranı 1/50 idi. Diluent olarak %1 BSA içeren PBS kullanıldı. integrin beta1 ile inkubasyon gece boyu (over night) + 4°C'de gerçekleştirildi.
- Ertesi gün PBS ile 3 kere 5 dk yıkandı
- Goat anti mouse FITC %1 BSA içeren PBS'de 1/1000 dilüsyonla, oda sıcaklığında 1 saat süreyle uygulandı.
- PBS ile 3 kere 5 dk yıkandı
- Çekirdekler DAPI ile işaretlendi.
- Floresan için uygun olan kapama medyumunu ile kapatıldı.
- Spesifik immün işaretlenmenin varlığı negatif kontrol işaretlemeleri ile karşılaştırmalı olarak floresan mikroskobu altında yapıldı.

3.4 Kesitlerin Görüntülenmesi

Hematoksilen–Eozin, immunohistokimya ve immunositokimya uygulanan kesitler LAS X programı kullanarak, Leica DM6B Upright ışık mikroskobu ile görüntülendi. Kesitlerin fotoğraflarının elde edilmesinde Leica DFC7000T kamera kullanıldı.

3.5 İmmünohistokimya ve İmmünohistokimya İşaretlenmesinin Değerlendirilmesi

İmmünohistokimyasal ve immünohistokimyasal işaretlemelemlerin değerlendirilmesi için 40 lık büyütmede, rastgele seçilen sırası ile 5 ve 7 alanda LAS X programı kullanılarak Leica DFC7000T kamera ile fotoğraflar çekildi. İmmünreaktivite semi-kantitatif olarak H-skor ile değerlendirildi. Bunun için primer antikorlar ile işaretleme yoğunluğu (0=boyanma yok, 1=zayıf boyanma, 2=fark edilebilen boyanma 3=güçlü, yoğun boyanma) ve işaretlemlen hücrelerin yüzdesi (%0-%100 arası) değerlendirildi. Değerlendirme 2 kişi tarafından yapıldı ve 2 kişinin ortalama skoru kullanıldı.

3.6 İstatistiksel analiz

Örneklem genişliği Ki-kare analizine göre hesaplamıştır. Buna göre iki grup arasında boyanma dereceleri açısından (0, 1+,2+ ve 3+) 0.40'lık bir etki genişliğini $\alpha=0.05$ 'de ve %80 güç ile saptayabilmek için iki grupta toplamda 84 vakanın alınması gerekli olduğu NCSS-PASS 11,0 programı ile hesaplanarak bulunmuştur. Verilerin değerlendirilmesinde tanımlayıcı istatistiklerden sayısal ölçümler için ortalama $\pm$ standart sapma, ortanca, minimum ve maksimum değerler, niteliksel veriler için ise sayı ve yüzde kullanılmıştır. Ölçümlerin normal dağılım gösterip göstermediği Shapiro Wilk testi ile değerlendirilmiştir. Normal dağılım gösteren ölçümler için grup karşılaştırmaları tek yönlü varyans analizi ve bağımsız gruplarda t testi ile yapılmıştır. Normal dağılım göstermeyen veriler için ölçüm karşılaştırmaları Kruskal Wallis testi ve Mann Whitney U testi ile yapılmıştır. Gruplarda niteliksel özelliklerin karşılaştırmalarında ise çapraz tablo analizi ve Ki-kare testleri

kullanılmıştır. Ölçümler arası ilişkiler için Pearson veya Spearman korelasyon katsayısı kullanılmıştır. İstatistiksel önemlilik için $p < 0,05$ ise anlamlı kabul edilmiş ve istatistiksel analizlerin tümünde SPSS 21,0 for Windows paket programı kullanılmıştır.



4. BULGULAR

4.1 Hasta verilerinin değerlendirilmesi

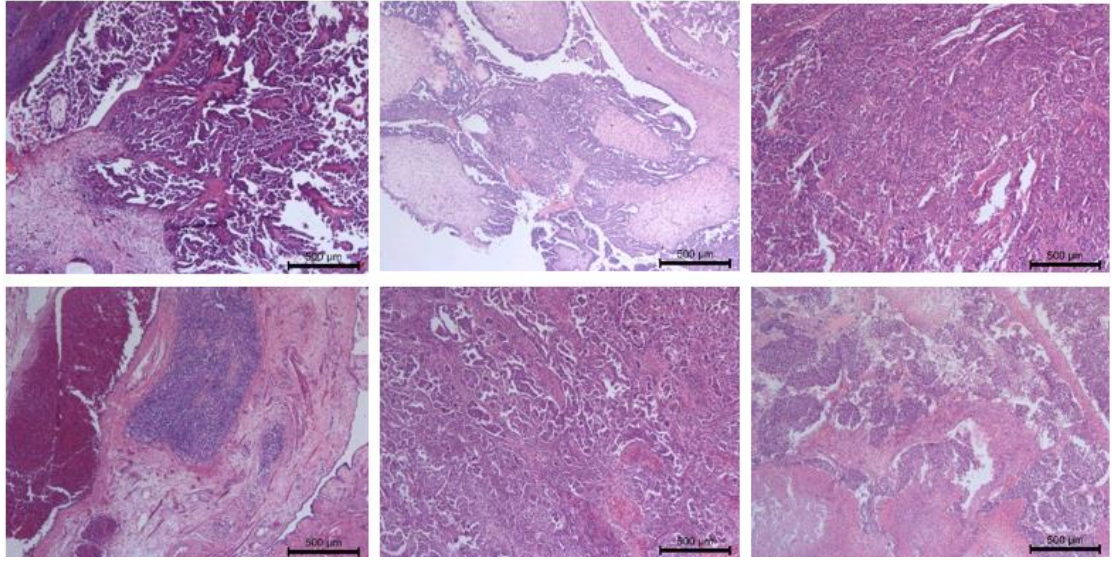
4.1.1 Hastaların demografik özellikleri

Lenf nodu tutulumu olan ve olmayan grupta yaş ortalaması benzerdi. Lenf nodu tutulumu olan grupta yaş ortalaması $58,619 \pm 11,170$, lenf nodu tutulumu olmayan grupta yaş ortalaması $58,838 \pm 10,178$ olarak saptandı.

4.2 Seröz over karsinom vakalarında over dokusu ve lenf nodunun histopatolojik değerlendirilmesi

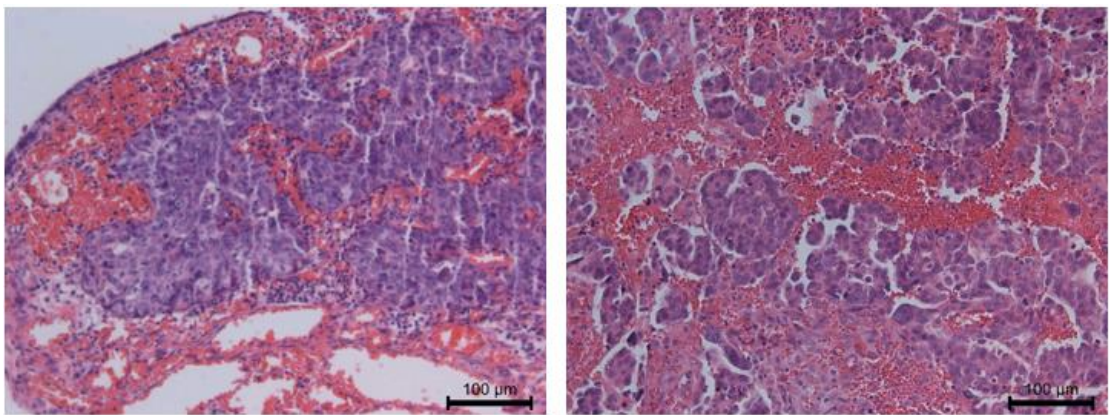
Lenf nodu tutulumu olan ve olmayan seröz over karsinom vakalarının over ve lenf nodlarıdaki tümör örneklerinin ışık mikroskopunda incelenmesinde genel olarak dokuların tümör hücreleri ile infiltre oldukları gözlemlendi.

Yüksek dereceli seröz over karsinomlar histopatolojik olarak papiller, mikropapiller, infiltratif, glanduler, mikrokistik, mikroglanduler, solid, psödoendometrioid, transizyonel hücre benzeri karsinom gibi farklı morfolojik paternlerde olabilir. Çalışmamızda, seröz over karsinom tanısı almış vakaların tümör dokularında farklı morfolojik paternler izlendi (Şekil 4.1).

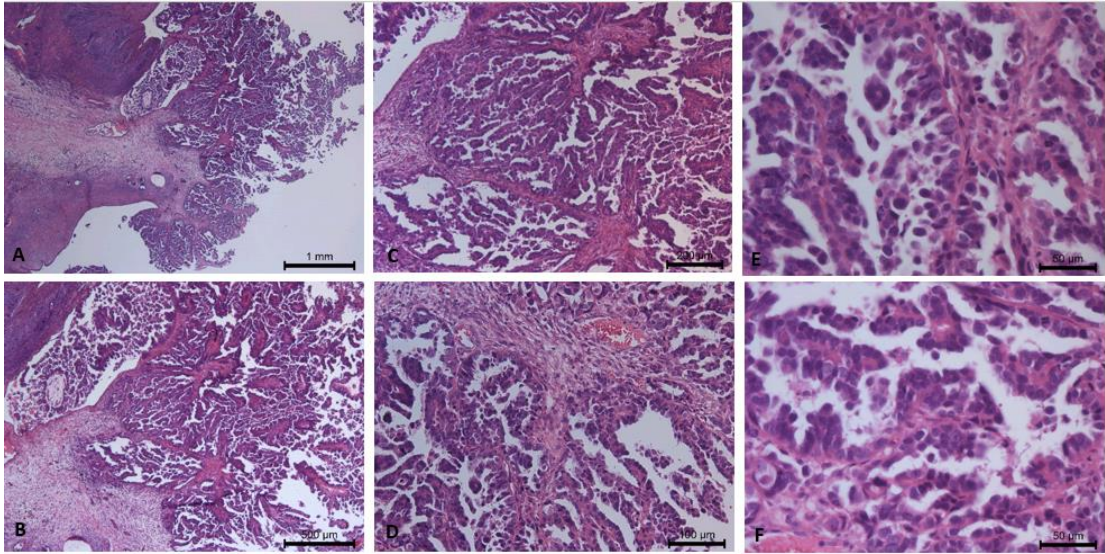


Şekil 4.1. Seröz over karsinom tanısı almış vakaların tümör dokularında farklı morfolojik paternler izlenmektedir (Hematoksilen-Eozin X50)

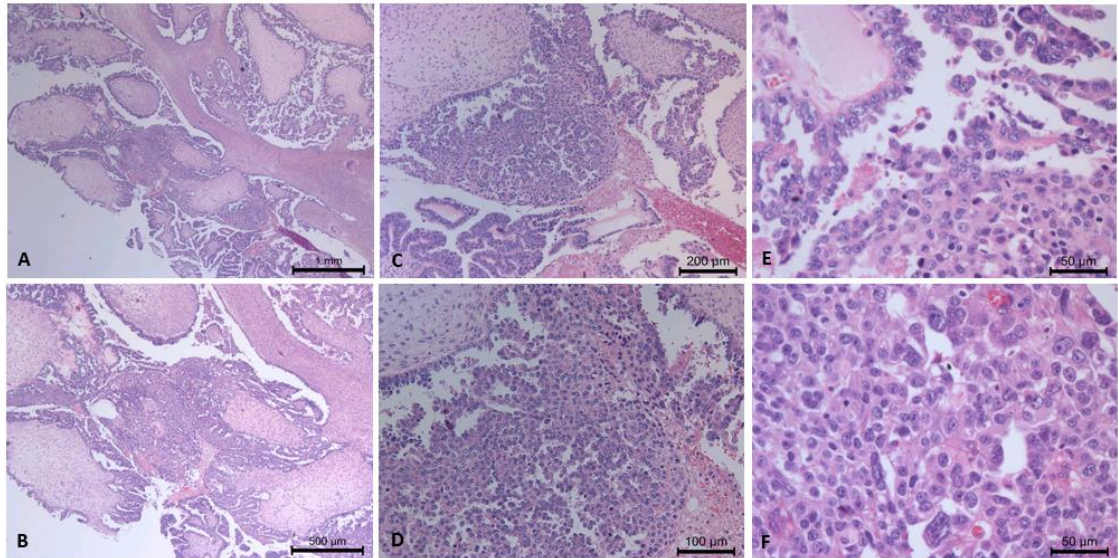
Tümör içinde hemorajik alanlar, stromadaki damarlarda konjesyon izlendi (Şekil 4.2). Tüm gruplara ait örneklerde tümör dokusu incelendiğinde tümör hücrelerinde, belirgin nükleer pleomorfizm dahil olmak üzere yüksek çekirdek: sitoplazma oranı, hiperkromazi, bir veya daha fazla belirgin çekirdek, artan mitotik aktivite yanında atipik mitozlar ve tümör bizzar dev hücreleri izlendi (Şekil 4.3, 4.4, 4.5).



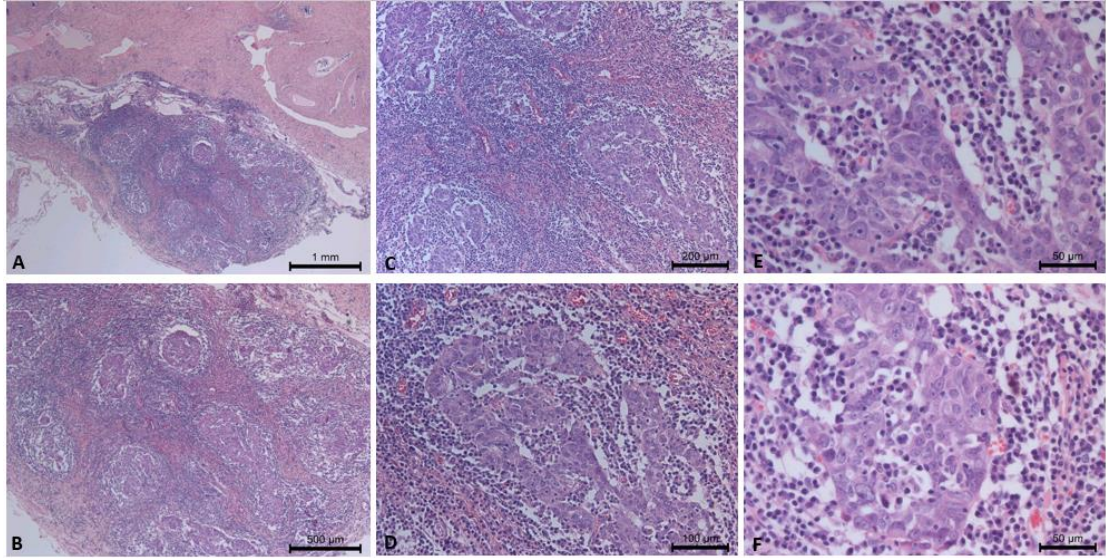
Şekil 4.2. Tümör dokusu içinde hemorajik alanlar, stromadaki damarlarda konjesiyon gözlenmektedir (Hematoksilen-Eozin X200)



Şekil 4.3 Lenf nodu tutulumu olmayan yüksek dereceli, over papiller seroz adenokarsinom tanısı almış over dokusu örneği. Düzensiz dallanmış papillalar, ortalarında az miktarda stroma ve atipik çekirdekler gözlenmektedir (Hematoksilen-Eozin A X2.50, B X50, C X100, DX200, E, F X400)



Şekil 4.4 Lenf nodu tutulumu olan yüksek dereceli over papiller seroz adenokarsinom tanısı almış over dokusu örneği. Çok sayıda atipik çekirdek ve tümör bizzar dev hücreler gözlenmektedir (Hematoksilen-Eozin A X2.50, B X50, C X100, DX200, E, F X400)

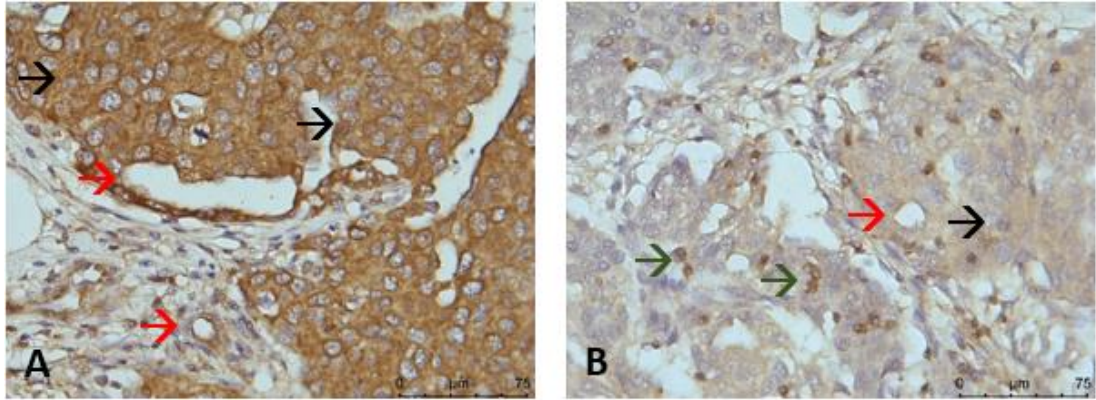


Şekil 4.5. Lenf nodu tutulumu olan yüksek dereceli over papiller serozadenokarsinom tanısı almış lenf nodu örneği. Lenf nodu içinde yer alan tümör dokusunda infiltratif hücreler arasında tek veya gruplar oluşturan eozinofilik sitoplazmalı tümör hücreleri izlenmektedir (Hematoksilen-Eozin A X2.50, B X50, C X100, DX200, E, F X400)

4.3 Hasta Gruplarında Tümör Hücreleri ve Tümör Stromasında İmmunohistokimyasal İşaretlenmelerinin Değerlendirilmesi

4.3.1 BMP-2 ve BMP-7 immünreaktivitesi

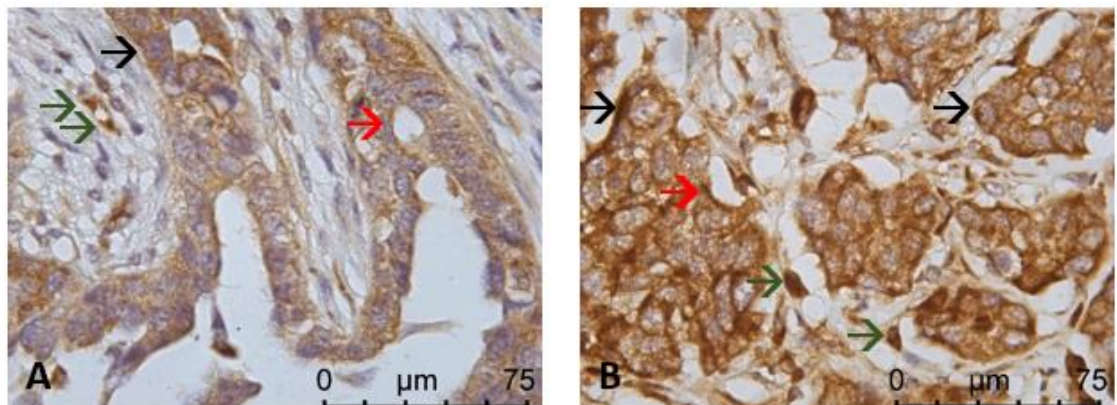
BMP-2 ile yapılan immün işaretlemelerde, lenf nodu tutulumu olmayan ve lenf nodu tutulumu olan yüksek dereceli over seröz kanseri tanısı almış hastalara ait over dokusu örneklerinde tümör hücreleri sitoplazması, stromadaki hücreler ve damar endotel hücrelerinde pozitif immünreaktivite izlendi. Lenf nodu tutulumu olan hastaların lenf nodu örneklerinde de tümör hücreleri, stromadaki hücreler ve damar endotel hücrelerinde pozitif BMP-2 immünreaktivite gözlemlendi. BMP-7 ile yapılan immün işaretlemelerde, lenf nodu tutulumu olmayan ve lenf nodu tutulumu olan yüksek dereceli over seröz kanseri tanısı almış hastalara ait over dokusu örneklerinde tümör hücreleri ve damar endotelinde zayıf, stromadaki infiltratif hücrelerde güçlü immünreaktivite izlendi. Lenf nodu tutulumu olan hastaların lenf nodu örneklerinde de tümör hücreleri, stromadaki infiltratif hücreler ve damar endotel hücrelerinde benzer pozitif BMP-7 immünreaktivite gözlemlendi (Şekil 4.6)



Şekil 4.6 Over dokusu örneklerinde A- tümör hücreleri sitoplazması (siyah ok) ve endotel hücrelerinde (kırmızı ok) güçlü pozitif BMP-2 immünreaktivitesi B- tümör hücreleri sitoplazması (siyah ok) ve endotel hücrelerinde (kırmızı ok) zayıf, stroma hücreleri, stromada ve tümörde infiltratif hücrelerde (yeşil ok) güçlü BMP-7 immünreaktivitesi izlenmektedir (indirekt immünperoksidaz-hematoksilen A, B x 630)

4.3.2 ZEB2 immünreaktivitesi

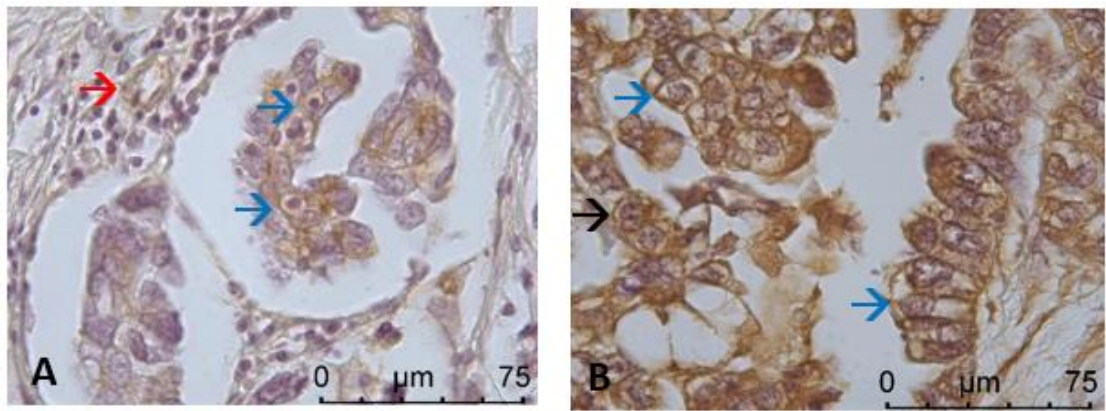
ZEB2 için yapılan immün işaretlemelerde, lenf nodu tutulumu olmayan ve lenf nodu tutulumu olan over dokusu örneklerinde tümör hücreleri, stromadaki hücreler ve damar endotel hücrelerinin sitoplazması ve yer yer çekirdeklerinde pozitif güçlü immünreaktivite izlendi. Lenf nodu tutulumu olan hastaların lenf nodu örneklerinde benzer güçlü pozitif ZEB2 immünreaktivitesi gözlemlendi (Şekil 4.7)



Şekil 4.7. Over dokusu örneklerinde tümör hücrelerinin sitoplazması (siyah ok) ve tümör ve stromadaki çekirdekler (yeşil ok) ve damar endotel hücrelerinde (kırmızı ok) pozitif güçlü ZEB2 immünreaktivitesi izlenmektedir (indirekt immünperoksidaz-hematoksilen A, B x 630)

4.3.3 ITG $\alpha 5$ Ve ITG $\beta 1$ İmmünreaktivitesi

Lenf nodu tutulumu olmayan ve lenf nodu tutulumu olan yüksek dereceli over seröz kanseri tanısı almış hastalara ait over dokusu örneklerinde tümör hücreleri membranında ve damar endotel hücrelerinde güçlü ve ITG $\beta 1$ immünreaktivitesi izlendi. Lenf nodu tutulumu olan hastaların lenf nodu örneklerinde de benzer şekilde tümör hücre membranında her iki molekül ile güçlü pozitif immünreaktivite gözlemlendi (Şekil 4.8).



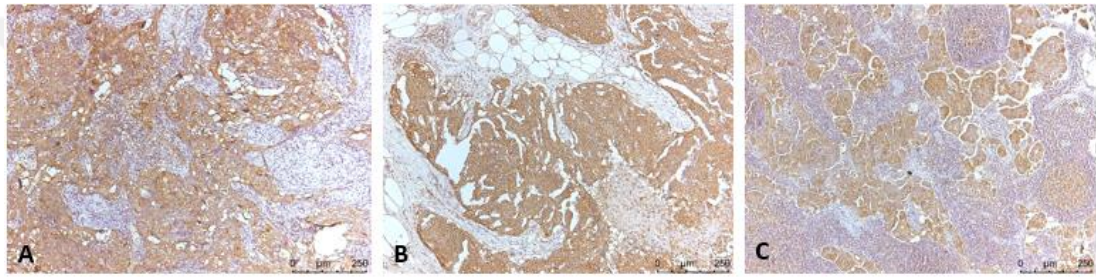
Şekil 4.8. Over dokusu örneklerinde, tümör hücrelerin membranında (mavi ok), damar endoteli (kırmızı ok) güçlü A- ITG $\alpha 5$ pozitif immünreaktivitesi B- ITG $\beta 1$ pozitif immünreaktivitesi izlenmektedir (indirekt immünperoksidaz-hematoksilen A, B x 630)

4.4 BMP-2, BMP-7, ZEB2, ITG $\alpha 5$ ve ITG $\beta 1$ immünreaktivitelerinin gruplar arası karşılaştırılması

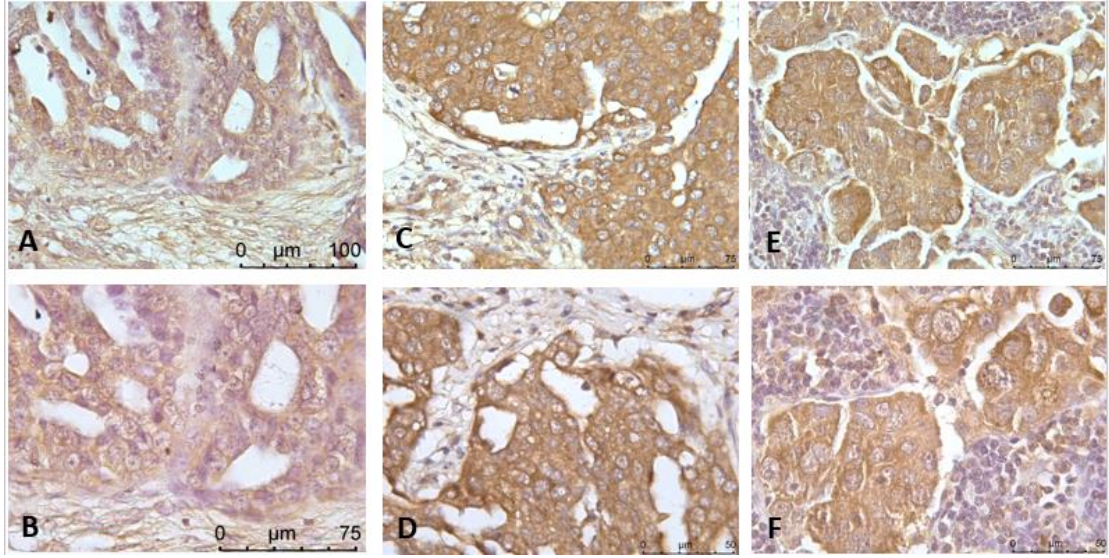
Lenf nodu tutulumu olmayan ve olan yüksek dereceli over seröz kanser tanısı almış hastaların over dokusu örnekleri ve lenf nodu tutulumu olan grubun lenf nodu dokusu örnekleri olmak üzere 3 grupta BMP-2, BMP-7, ZEB2, ITG $\alpha 5$ ve ITG $\beta 1$ immünreaktiviteleri belirlendi ve H-skor analiz ile skorlandıktan sonra karşılaştırılarak gruplar arası farklılıklar istatistiksel olarak değerlendirildi.

4.4.1 BMP-2 immunreaktivitesinin gruplar arası karşılaştırılması

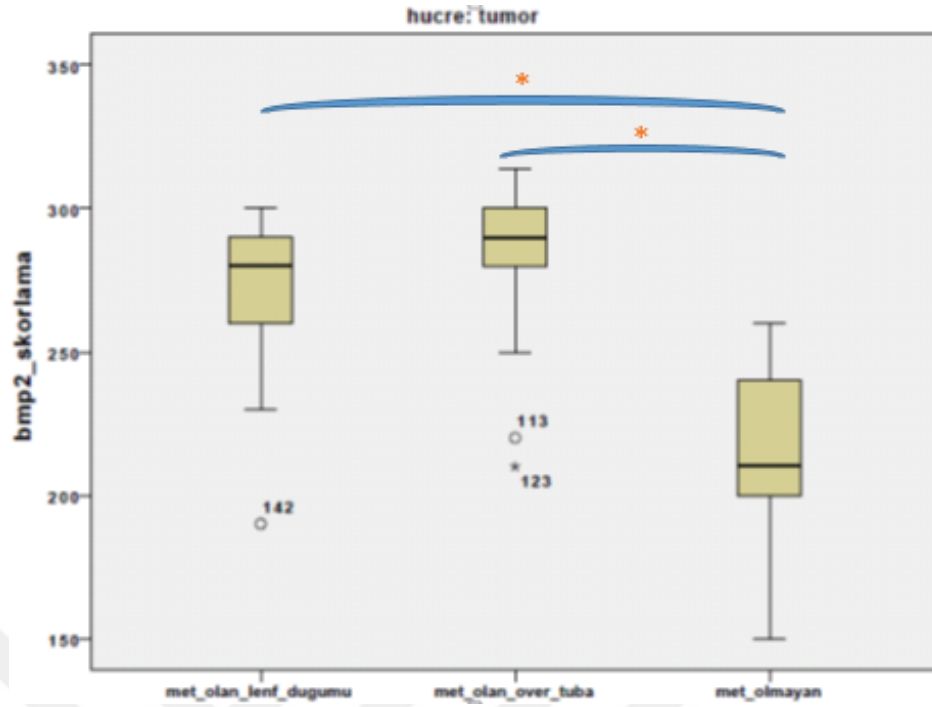
BMP-2 immunreaktivitesi üç grupta da tümör hücreleri sitoplazması, stromadaki hücreler ve damar endotel hücrelerinde gözlemlendi. BMP-2 immünreaktivitesi tümör hücrelerinde güçlü, stromada zayıf olarak izlendi. (Şekil 4.9) Tümör hücrelerinde BMP-2 immünreaktivitesinin H-skor analizi sonuçları, gruplar arası karşılaştırıldığında lenf nodu tutulumu olan over dokusu ve lenf nodu dokusu örneklerinde, lenf nodu tutulumu olmayan over dokusu örneklerinden daha güçlü immünreaktivite gözlemlendi (Şekil 4.10) ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,000$) (Şekil 4.11).



Şekil 4.9. Tümör ve stromada BMP-2 immunreaktivitesi. A) Lenf nodu tutulumu olmayan over dokusu B) Lenf nodu tutulumu olan over dokusu C) Lenf nodu tutulumu olan lenf nodu. (indirekt immünperoksidaz- Hematoksilen A, B, C x100)



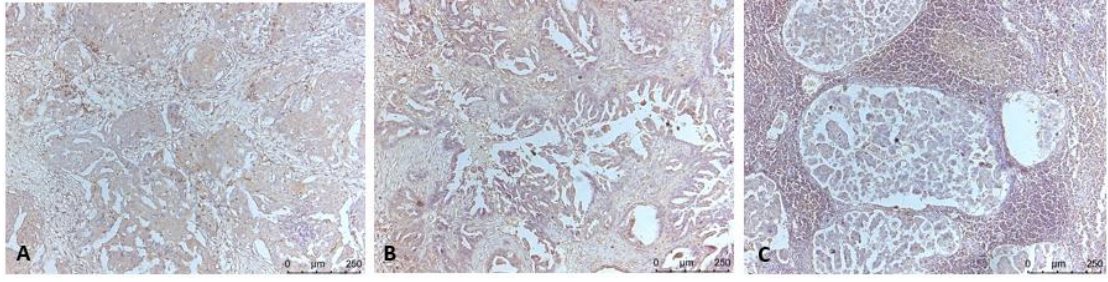
Şekil 4.10 Tümör hücrelerinde BMP-2 immünreaktivitesinin gruplar arası karşılaştırılması. A, B) Lenf nodu tutulumu olmayan over dokusu C, D) Lenf nodu tutulumu olan over dokusu E, F) Lenf nodu tutulumu olan lenf nodu (indirekt immünperoksidaz- Hematoksilen A, C, E x 40- B, D, F x 630)



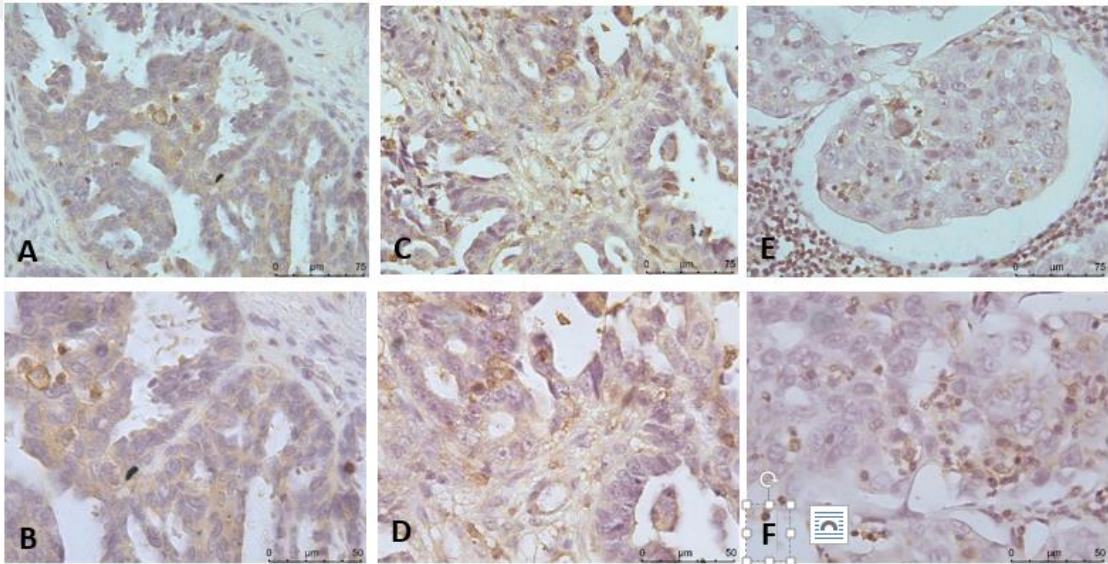
Şekil 4.11. BMP-2 immünreaktivitesinin gruplar arası karşılaştırılmasının istatistiksel değerlendirilmesi. Tümör hücrelerinde BMP-2 immünreaktivitesi H-skor analiz sonuçları gruplar arası karşılaştırıldığında lenf nodu tutulumu olan over dokusu ve lenf nodu dokusu örneklerinde, lenf nodu tutulumu olmayan over dokusu örneklerinden daha güçlü immünreaktivite gözlemlendi ve bu fark istatistiksel analiz sonrası anlamlı bulundu (* $p < 0,000$).

4.4.2 BMP-7 immünreaktivitesinin gruplar arası karşılaştırılması

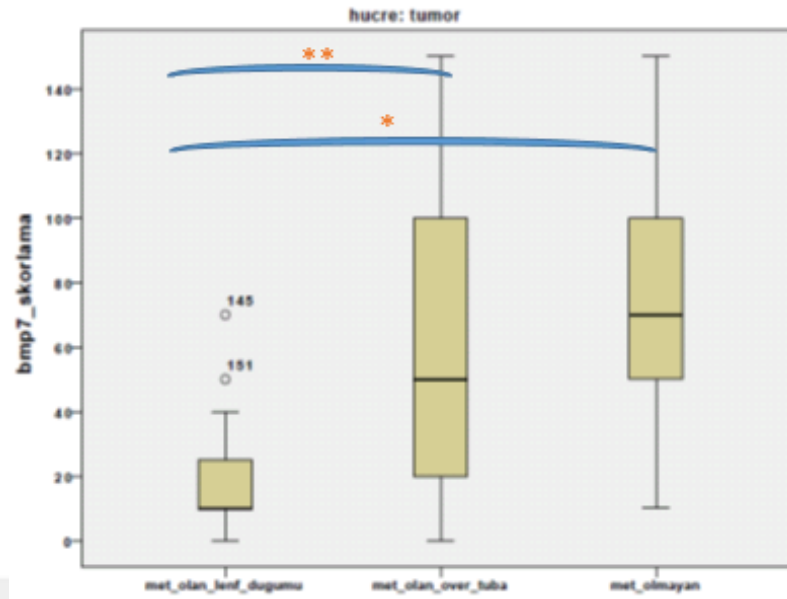
immünreaktivitesi üç grupta da tümör hücreleri ve damar endotelinde zayıf, stromadaki infiltratif hücrelerde güçlü pozitif olarak izlendi (Şekil 4.12). BMP-7 immünreaktivitesi H-skor analizi gruplar arası karşılaştırıldığında lenf nodu tutulumu olmayan over dokusu örneklerinde, lenf nodu tutulumu olan over dokusu örneklerinden daha güçlü immünreaktivite gözlemlendi, ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Lenf nodu tutulumu olmayan over dokusu örnekleri ve lenf nodu tutulumu olan lenf nodu örnekleri karşılaştırıldığında lenf nodu tutulumu olmayan over dokusu örneklerinde daha güçlü immünreaktivite gözlemlendi ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,000$). Lenf nodu tutulumu olan over dokusu örneklerinde, lenf nodu tutulumu olan lenf nodu örneklerinden istatistiksel olarak daha güçlü pozitiflik saptandı ($p < 0,001$) (Şekil 4.13) (Şekil 4.14).



Şekil 4.12. Tümör ve stromada BMP-7 immunreaktivitesi. A) Lenf nodu tutulumu olmayan over dokusu B) Lenf nodu tutulumu olan over dokusu C) Lenf nodu tutulumu olan lenf nodu. (indirekt immünperoksidaz- Hematoksilen A, B, C x100)



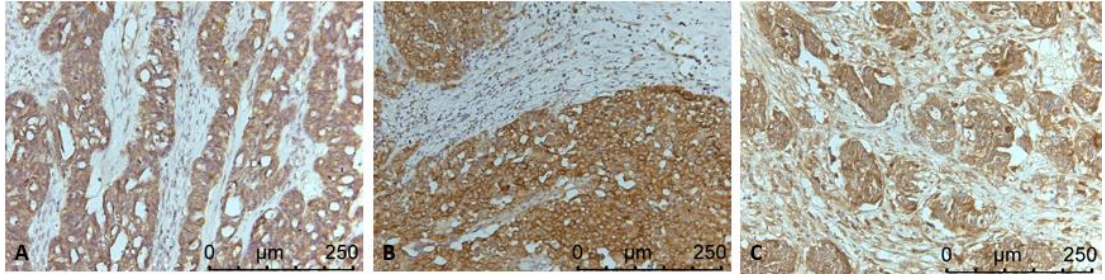
Şekil 4.13. BMP-7 immunreaktivitesinin gruplar arası karşılaştırılması. A, D) Lenf nodu tutulumu olmayan over dokusu B, E) Lenf nodu tutulumu olan over dokusu C, F) Lenf nodu tutulumu olan lenf nodu (indirekt immünperoksidaz- Hematoksilen A, C, E x 40- B, D, F x 630)



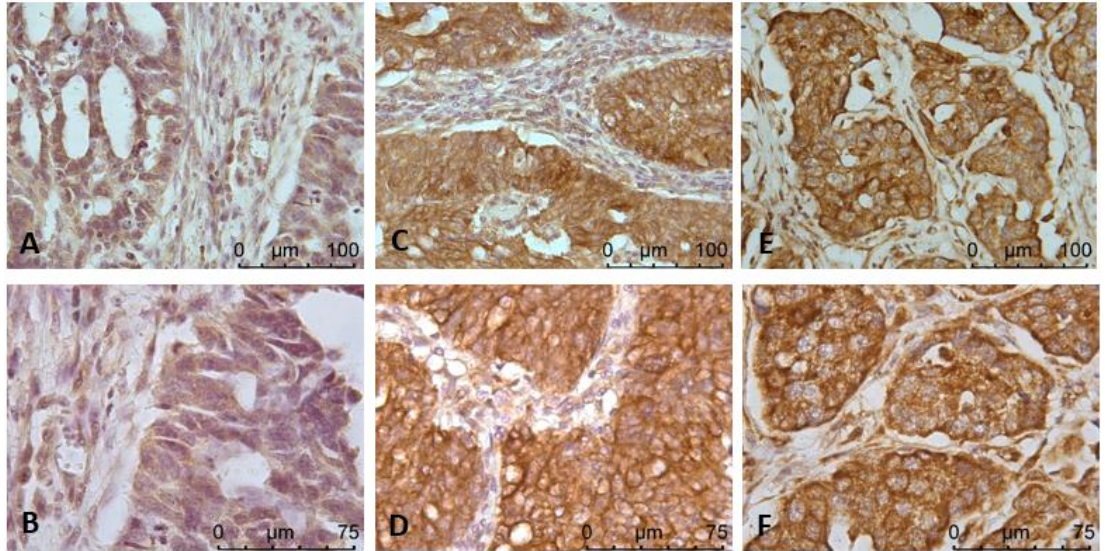
Şekil 4.14. BMP-7 immunreaktivitesinin gruplar arası karşılaştırılmasının istatistiksel değerlendirilmesi. Lenf nodu tutulumu olmayan over dokularında, lenf nodu tutulumu olan over dokusu ve lenf nodu örneklerinden daha güçlü immünreaktivite tesbit edildi. Bu fark lenf nodu tutulumu olmayan over ve lenf nodu tutulumu olan lenf nodu örnekleri arasında anlamlıyken (* $p < 0,000$), lenf nodu tutulumu olmayan ve olan over dokuları arasındaki fark anlamlı bulunmadı. Lenf nodu tutulumu olan grubda over dokusu ve lenf nodu örnekleri arasında anlamlı fark saptandı (** $p < 0,001$).

4.4.3 ZEB2 immunreaktivitesinin gruplar arası karşılaştırılması

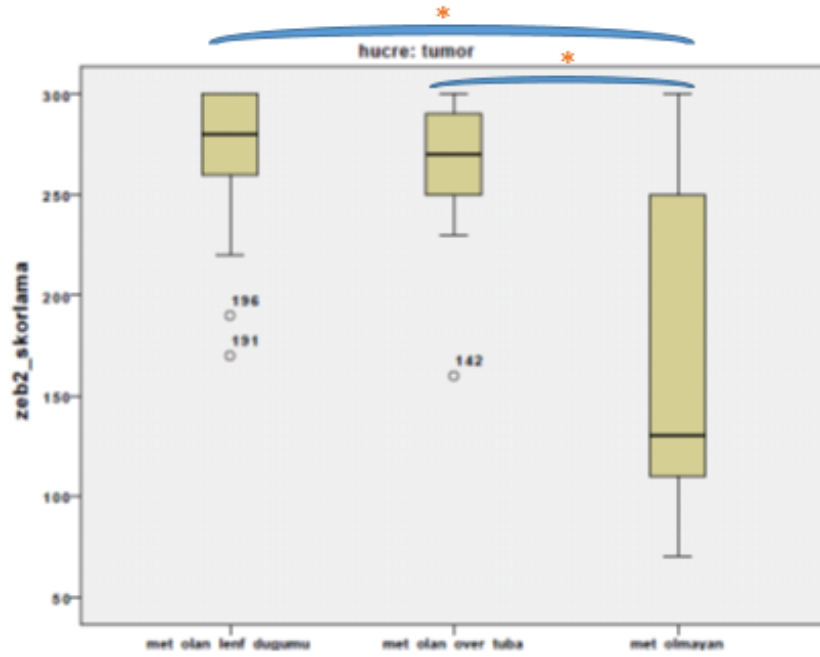
ZEB2 immunreaktivitesi üç grupta da tümör ve stromadaki hücreler ve damar endotel hücrelerinin sitoplazması ve yer yer çekirdeklerinde gözlendi. H-skor analizine göre tümör hücrelerinde güçlü ve stromada zayıf immünreaktivite izlendi (Şekil 4.15). ZEB2 immünreaktivitesinin H-skor analizi sonuçları gruplar arası karşılaştırıldığında lenf nodu tutulumu olan over dokusunda tümör hücrelerinde, lenf nodu tutulumu olmayan over dokusu örneklerinden daha güçlü immünreaktivite gözlendi (Şekil 4.16). Lenf nodu tutulumu olan grubun lenf nodu örneklerinde de tümör hücrelerinde güçlü immünreaktivite saptandı. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0,000$) (Şekil 4.17).



Şekil 4.15. Tümör ve stromada ZEB2 immunreaktivitesi. A) Lenf nodu tutulumu olmayan over dokusu B) Lenf nodu tutulumu olan over dokusu C) Lenf nodu tutulumu olan lenf nodu. (indirekt immünperoksidaz- Hematoksilen A, B, C x100)



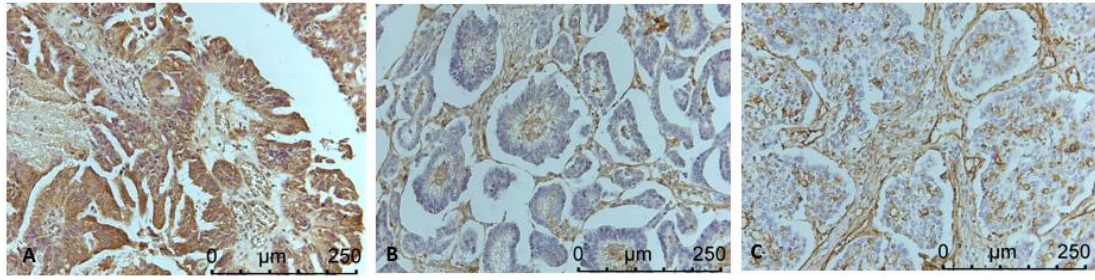
Şekil 4.16. ZEB2 immunreaktivitesinin gruplar arası karşılaştırılması A, B) Lenf nodu tutulumu olmayan over dokusu C, D) Lenf nodu tutulumu olan over dokusu E, F) Lenf nodu tutulumu olan lenf nodu (indirekt immünperoksidaz- Hematoksilen A, C, E x 40- B, D, F x 630)



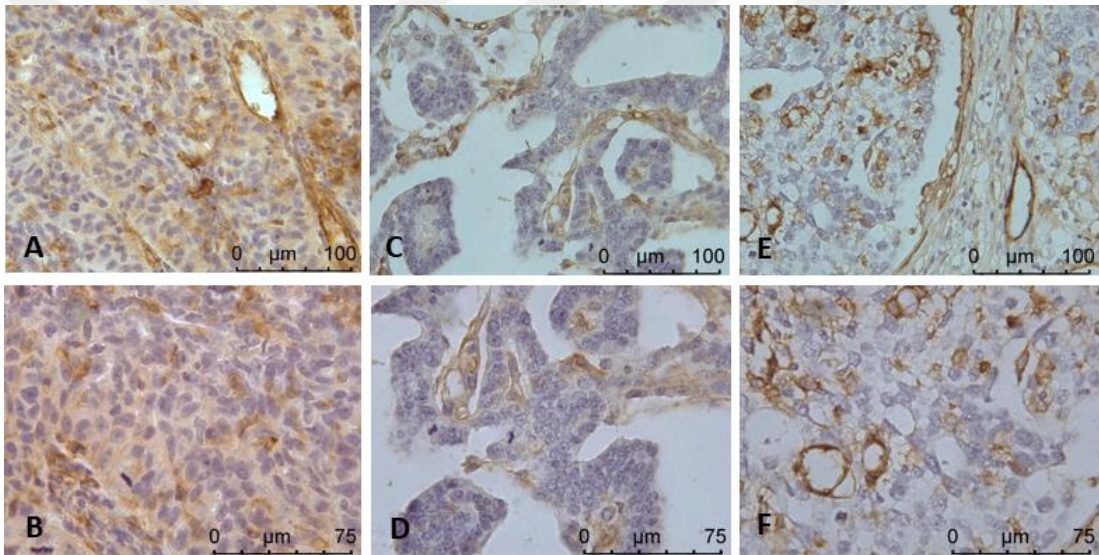
Şekil 4.17. ZEB2 immunreaktivitesinin gruplar arası karşılaştırılmasının istatistiksel değerlendirilmesi. Tümör hücrelerinde ZEB2 immünreaktivitesi lenf nodu tutulumu olan over dokusu ve lenf nodu dokusu örneklerinde, lenf nodu tutulumu olmayan over dokusu örneklerinden anlamlı olarak daha güçlü immünreaktivite gözlemlendi (* $p < 0,000$).

4.4.4 ITG $\alpha 5$ İmmünreaktivitesinin Gruplar Arası Karşılaştırılması

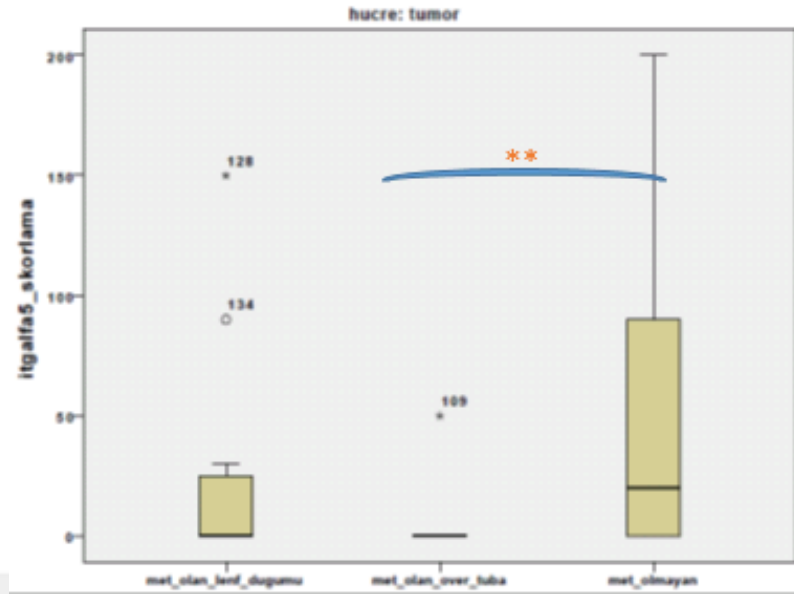
ITG $\alpha 5$ immünreaktivitesi üç grupta da tümör hücreleri membranında ve damar endotel hücrelerinde gözlemlendi. H-skor analizine göre tümör hücreleri ve stromada orta şiddette pozitif ITG $\alpha 5$ immünreaktivitesi izlendi (Şekil 4.18). Tümör hücrelerinde ITG $\alpha 5$ immünreaktivitesi H-skor analizi sonuçları gruplar arası karşılaştırıldığında lenf nodu tutulumu olmayan over dokusu örneklerinde, lenf nodu tutulumu olan over dokusu örneklerinden daha güçlü immünreaktivite saptandı ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,001$). Lenf nodu tutulumu olan over dokusu örnekleri ve lenf nodu tutulumu olan lenf nodu örnekleri karşılaştırıldığında, lenf nodu örneklerinde tümör hücrelerinde daha güçlü ITG $\alpha 5$ immünreaktivitesi saptandı, ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (Şekil 4.19) (Şekil 4.20).



Şekil 4.18. Tümör ve stromada ITG $\alpha 5$ immunreaktivitesi. A) Lenf nodu tutulumu olmayan over dokusu B) Lenf nodu tutulumu olan over dokusu C) Lenf nodu tutulumu olan lenf nodu. (indirekt immünperoksidaz-Hematoksilen A, B, C x100)



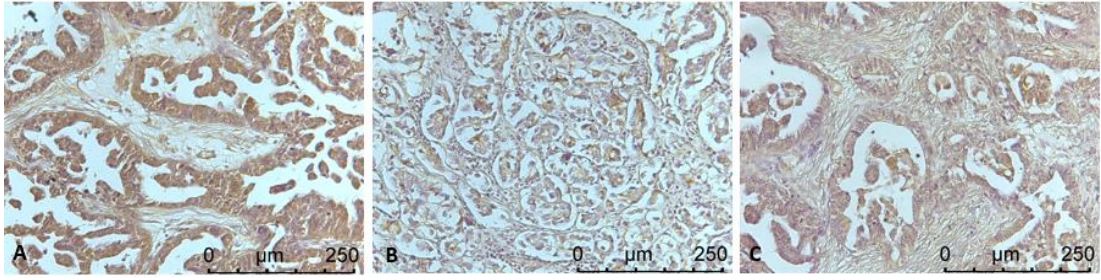
Şekil 4.19. ITG $\alpha 5$ immunreaktivitesinin gruplar arası karşılaştırılması. A, B) Lenf nodu tutulumu olmayan over dokusu C, D) Lenf nodu tutulumu olan over dokusu E, F) Lenf nodu tutulumu olan lenf nodu. (indirekt immünperoksidaz- A, C, E x 40- B, D, F x 630)



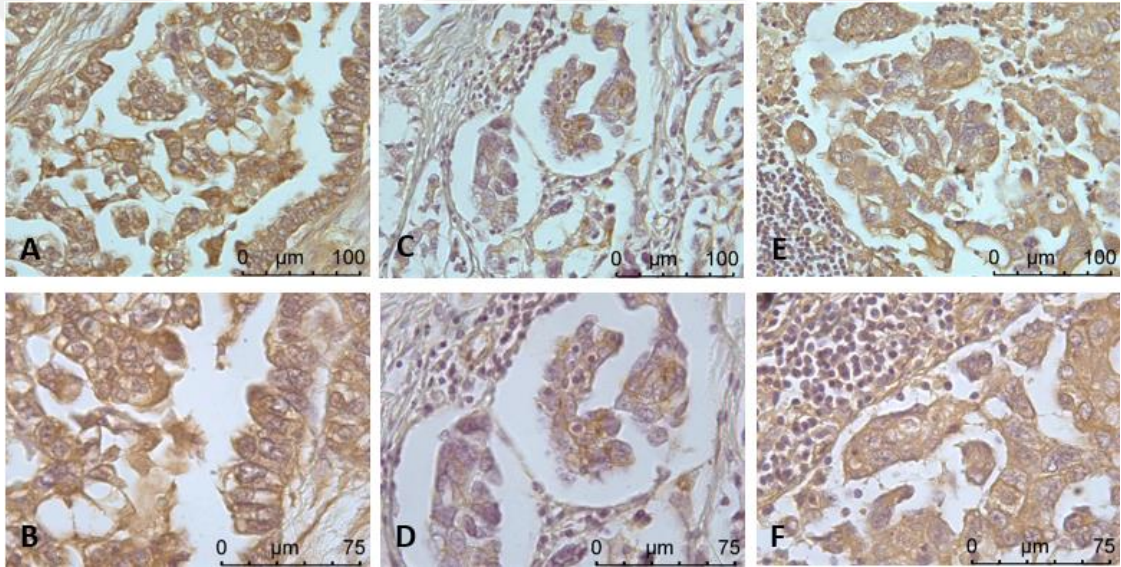
Şekil 4.20. ITG $\alpha 5$ immunreaktivitesinin gruplar arası karşılaştırılmasının istatistiksel değerlendirilmesi. Lenf nodu tutulumu olmayan over ile, lenf nodu tutulumu olan over dokusu örnekleri karşılaştırıldığında, lenf nodu tutulumu olmayan grupta tümör hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı güçlü ITG $\alpha 5$ immünreaktivitesi saptandı (** $p < 0,001$). Lenf nodu tutulumu olan over ve lenf nodu örnekleri tümör hücrelerinde ITG $\alpha 5$ immünreaktivitesi karşılaştırıldığında, lenf nodu örnekleri tümör hücrelerinde daha güçlü ITG $\alpha 5$ immünreaktivitesi saptandı ama bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi.

4.4.5 ITG $\beta 1$ İmmünreaktivitesinin Gruplar Arası Karşılaştırılması

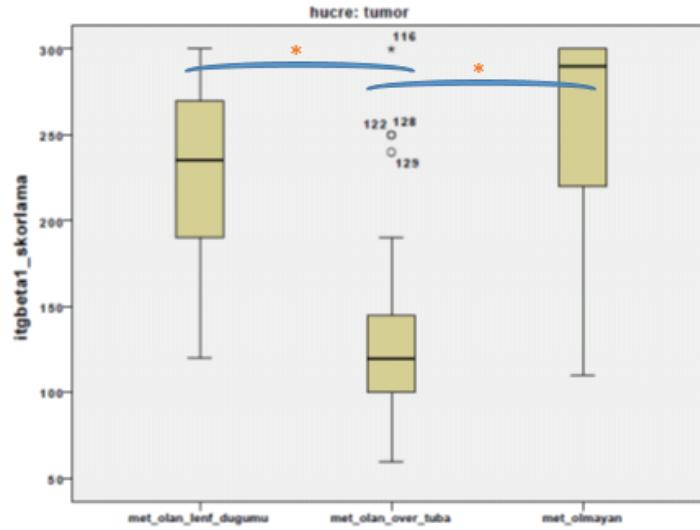
ITG $\beta 1$ immünreaktivitesi üç grupta da tümör hücreleri membranında ve damar endotel hücrelerinde gözlemlendi. H-skor analizine göre tümör hücrelerinde güçlü ve stromada zayıf immünreaktivite izlendi (Şekil 4.21). Tümör hücrelerindeki ITG $\beta 1$ immünreaktivitesi H-skor analizi sonuçları gruplar arası karşılaştırıldığında lenf nodu tutulumu olmayan over dokusu örneklerinde, lenf nodu tutulumu olan over dokusu örneklerinden istatistiksel olarak daha güçlü ITG $\beta 1$ immünreaktivitesi saptandı ($p < 0,000$). Lenf nodu tutulumu olan over dokusu örnekleri, lenf nodu örnekleri ile karşılaştırıldığında, lenf nodu örneklerinin tümör hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı daha güçlü ITG $\beta 1$ immünreaktivitesi saptandı ($p < 0,000$) (Şekil 4.22) (Şekil 4.23).



Şekil 4.21. Tümör ve stromada ITG $\beta 1$ immunreaktivitesi. A) Lenf nodu tutulumu olmayan over dokusu B) Lenf nodu tutulumu olan over dokusu C) Lenf nodu tutulumu olan lenf nodu. (indirekt immünperoksidaz- Hematoksilen A, B, C x100)



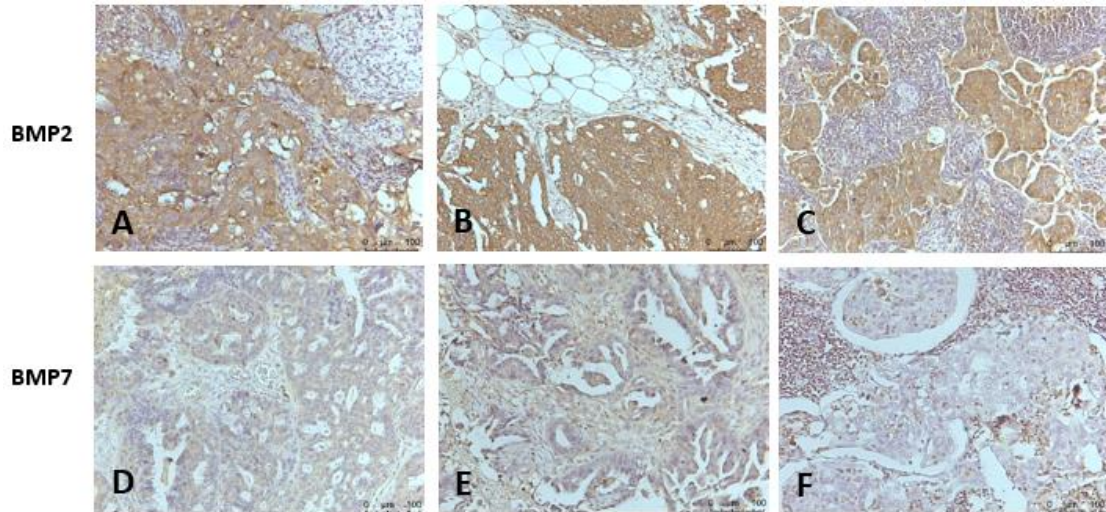
Şekil 4.22. ITG $\beta 1$ immunreaktivitesinin gruplar arası karşılaştırılması. A, B) Lenf nodu tutulumu olmayan over dokusu C, D) Lenf nodu tutulumu olan over dokusu E, F) Lenf nodu tutulumu olan lenf nodu. (indirekt immünperoksidaz- A, C, E x40- B, D, F x630)



Şekil 4.23. ITG β 1 immunreaktivitesinin gruplar arası karşılaştırılmasının istatistiksel değerlendirilmesi. Lenf nodu tutulumu olmayan over dokusu örneklerinde, lenf nodu tutulumu olan over dokusu örneklerinden daha güçlü immunreaktivite saptandı ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (* $p<0,000$). Lenf nodu tutulumu olan over dokusu örnekleri ve lenf nodu tutulumu olan lenf nodu örnekleri karşılaştırıldığında, lenf nodu örneklerinde istatistiksel olarak anlamlı daha güçlü immünreaktivite saptandı (* $p<0,000$).

4.5 BMP-2 Ve BMP-7 İmmunreaktivitelerinin Karşılaştırılması

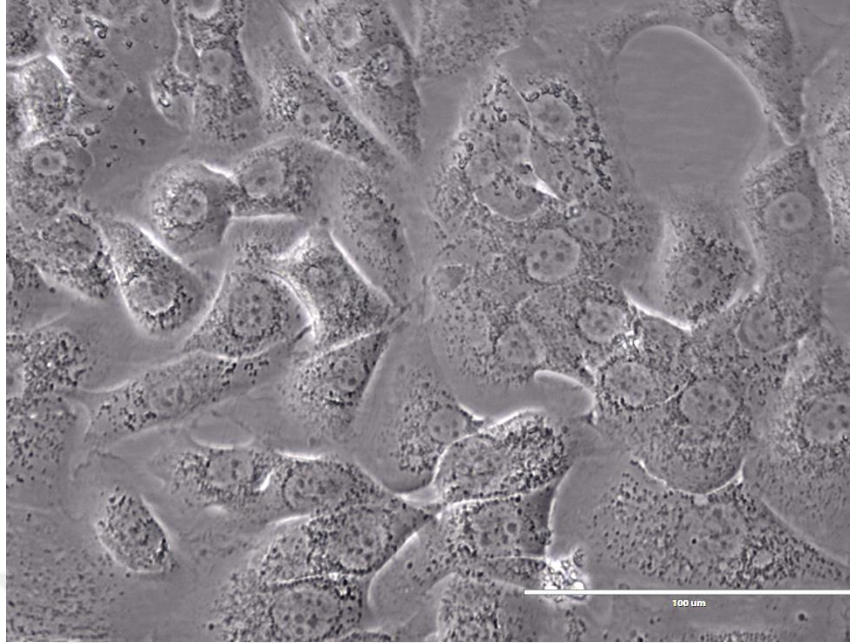
H-skor analizinde BMP-2 immünreaktivitesi, lenf nodu tutulumu olmayan ve olan over dokusu örnekleri ve lenf nodu tutulumu olan grubun lenf nodu örneklerinin tümör hücrelerinde her 3 grupta da güçlü immünreaktivite izlendi. Her 3 grupta H-skor analizi ile tümör hücrelerinde zayıf BMP-7 immünreaktivitesi saptandı. Üç grupta tümör hücrelerinde BMP-2 ve BMP-7 immunreaktiveleri karşılaştırıldığında, birbirleri ile ters korelasyon gösterdiği saptandı (Şekil 4.24).



Şekil 4.24. BMP-2 ve BMP-7 immünreaktivitesinin gruplar arası karşılaştırılması. A, B, C) BMP-2 immünreaktivitesi D, E, F) BMP-7 immünreaktivitesi A, D) Lenf nodu tutulumu olmayan over dokusu B,E) Lenf nodu tutulumu olan over dokusu C,F) Lenf nodu tutulumu olan lenf nodu dokusu. (indirekt immünperoksidaz- A, B, C, D, E, F x630)

4.6 SKOV-3 Hücre Hattı Kültürü

Over adenokarsinom hücre hattı SKOV-3 hücreleri 37° C, %5 CO₂ li nemli ortamda üretildi (Şekil 4.25). Kültür ortamında uygun şartlarda üretilen hücreler 4.pasaja geldiğinde BMP-2, BMP-7, ZEB2, ITG α 5 ve ITG β 1 ile immünperoksidaz ve immünofloresan işaretlemeler gerçekleştirildi.



Şekil 4.25. SKOV-3 hücreleri kültür kabının tabanına tutunmuş olarak görülmekte ve konfluent hücreler kaldırım taşı görüntüsüne sahip olduğu gözlenmektedir (fazkontrast görüntü X400).

4.7 SKOV-3 Over Adenokarsinoma Hücre Hattına ait Hücrelerde İmmünperoksidaz ve İmmü Floresan İşaretleme Yöntemlerinin Değerlendirilmesi

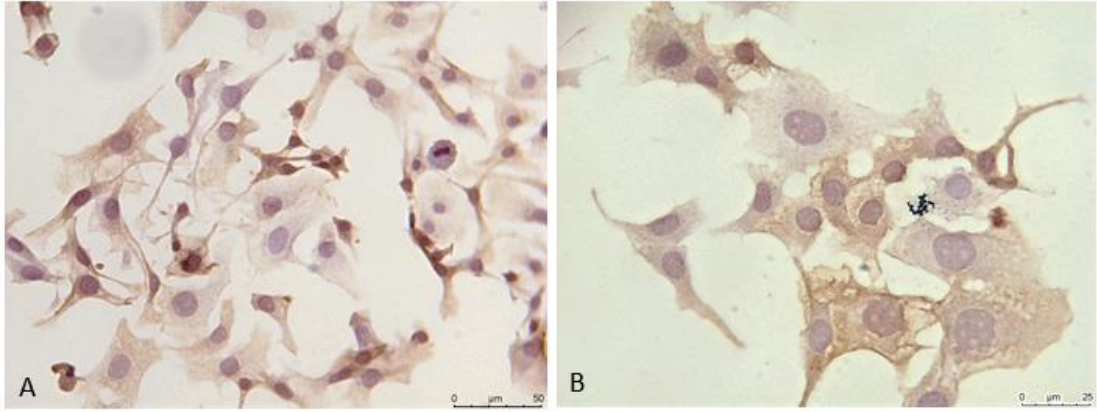
SKOV-3 hücre hattında, BMP-2 ve BMP-7 immünreaktivitesi hücrelerin sitoplazmasında gözlemlendi (şekil 4.26-4.29). H-skor analizi ile SKOV-3 hücre hattına ait hücrelerde BMP-2 ile orta, BMP-7 ile zayıf immünreaktivite saptandı.

ZEB2 immünreaktivitesi SKOV-3 hücrelerinin hem sitoplazma hem çekirdeklerinde tespit edildi (şekil 4.30-4.31). H-skor analizinde SKOV-3 hücre hattına ait hücrelerde orta derecede ZEB2 immünreaktivitesi saptandı.

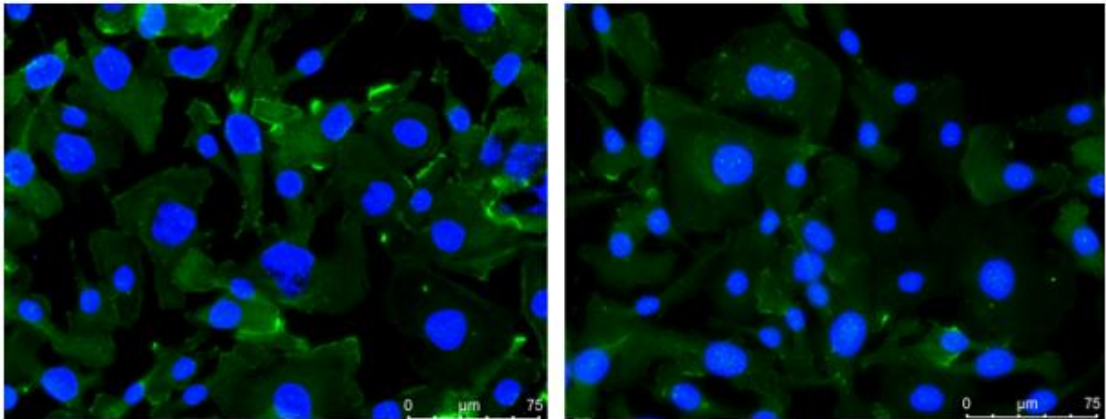
ITG $\alpha 5$ ve ITG $\beta 1$ immünreaktiviteleri SKOV-3 hücrelerinin membranı, sitoplazması ve hücrelerin sitoplazmik hücre uzantılarında (lamellipodia ve filopodiada) gözlemlendi (şekil 4.32-4.35).

Ayrıca ITG $\beta 1$ immünreaktivitesi SKOV-3 hücre hattında fokal noktasal biçimde perinükleer alanda izlendi (şekil 4.36).

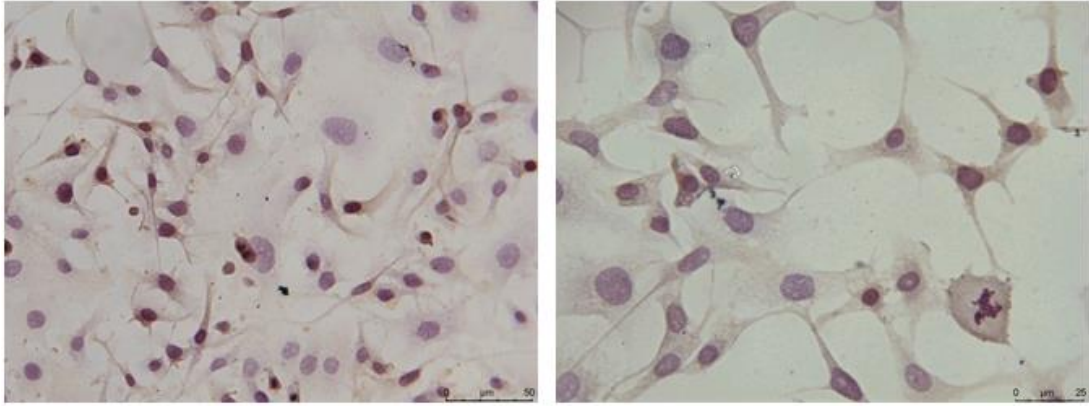
H-skor analizinde SKOV-3 hücre hattına ait hücrelerde orta derecede ITG $\alpha 5$ ve güçlü ITG $\beta 1$ immünreaktivitesi saptandı.



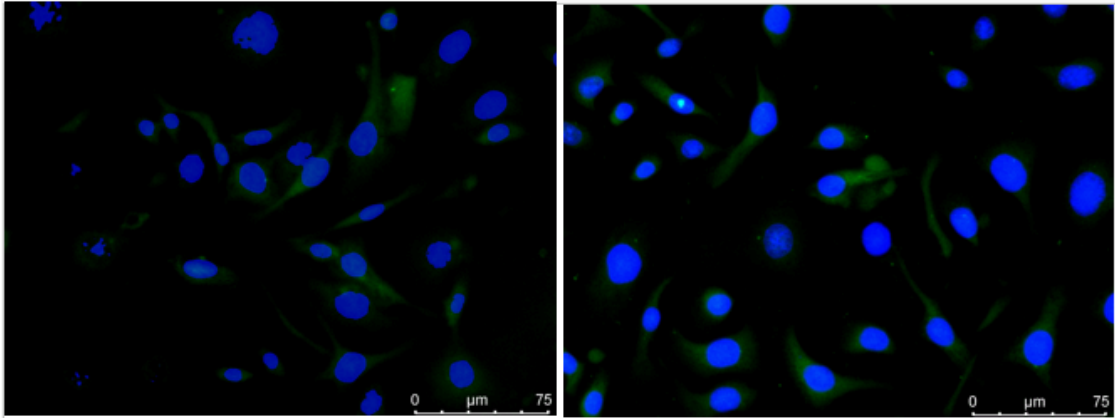
Şekil 4.26. SKOV-3 over adenokarinom hücre hattında sitoplazmik orta derecede BMP-2 immünreaktivitesi gözlenmektedir (indirek immünperoksidaz-Hematoksilen, A X 400- B X 630)



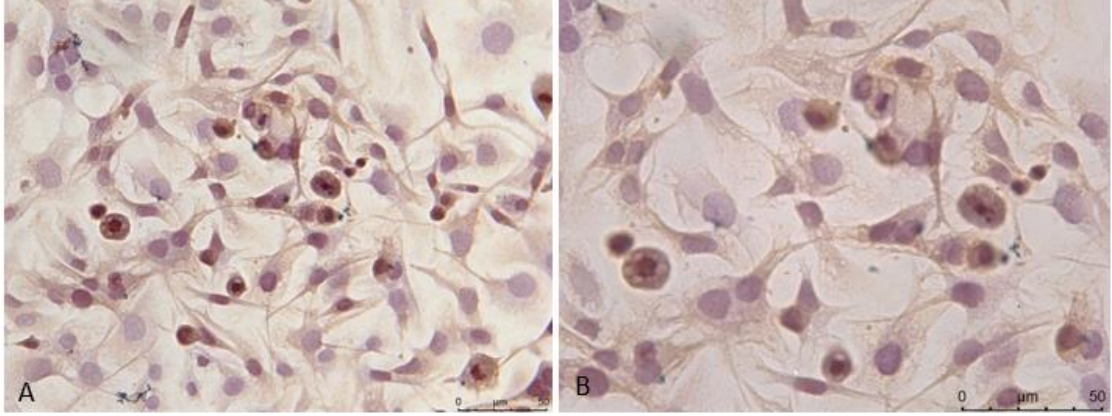
Şekil 4.27. SKOV-3 over adenokarinom hücre hattında BMP-2 ile sitoplazmik immünofloresan işaretleme gözlenmektedir (indirekt immünofloresan-DAPI X 630)



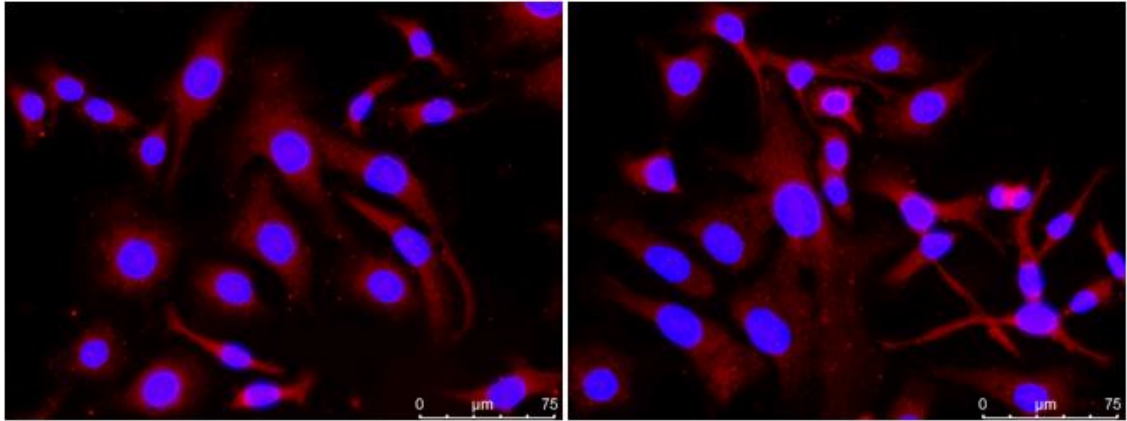
Şekil 4.28. SKOV-3 over adenokarinom hücre hattında sitoplazmik zayıf BMP-7 immünreaktivitesi gözlenmektedir (indirekt immünperoksidaz-Hematoksilen, A X 400- B X 630)



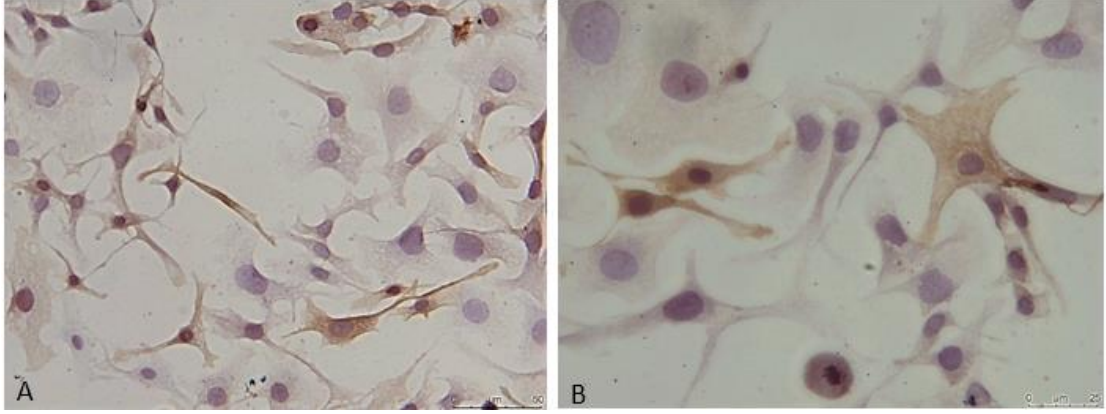
Şekil 4.29. SKOV-3 over adenokarinom hücre hattında BMP-7 ile sitoplazmik immünofloresan işaretleme gözlenmektedir (indirekt immünofloresan-DAPI X 630)



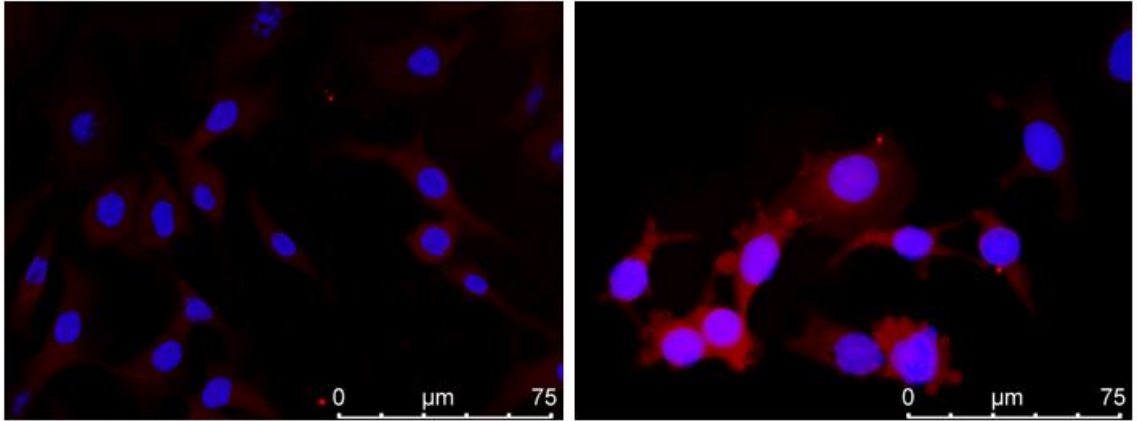
Şekil 4.30. SKOV-3 over adenokarinom hücre hattında çekirdek ve sitoplazmada orta derecede ZEB2 immünreaktivitesi gözlenmektedir (indirekt immünperoksidaz- Hematoksilen, A X 400- B X 630)



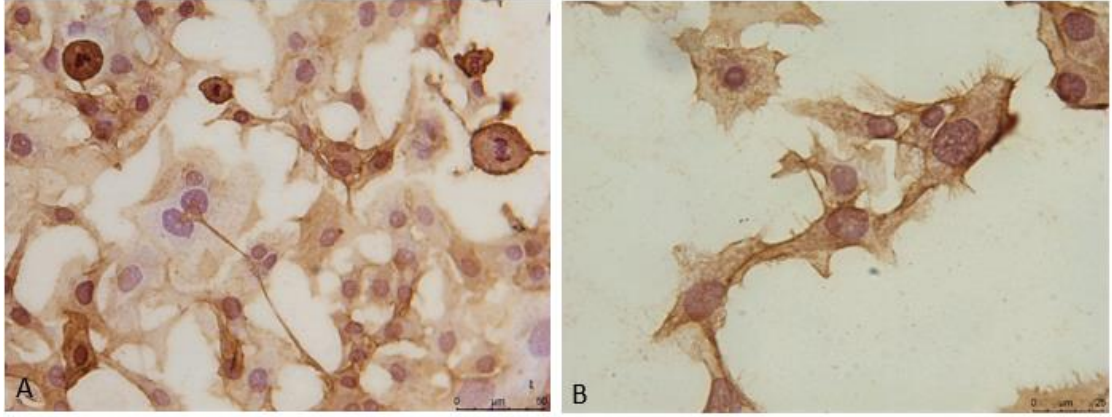
Şekil 4.31. SKOV-3 over adenokarinom hücre hattında ZEB2 ile sitoplazmik immünofloresan işaretleme gözlenmektedir (indirekt immünofloresan-DAPI X 630)



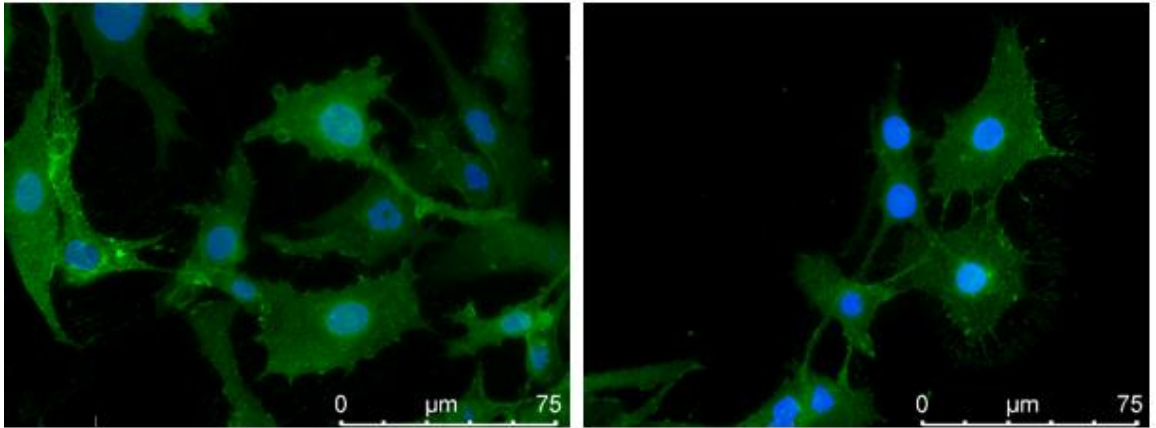
Şekil 4.32. SKOV-3 over adenokarinom hücre hattında sitoplazmik orta derecede ITG $\alpha 5$ immünreaktivitesi gözlenmektedir (indirek immünperoksidaz-Hematoksilen, A X 400- B X 630)



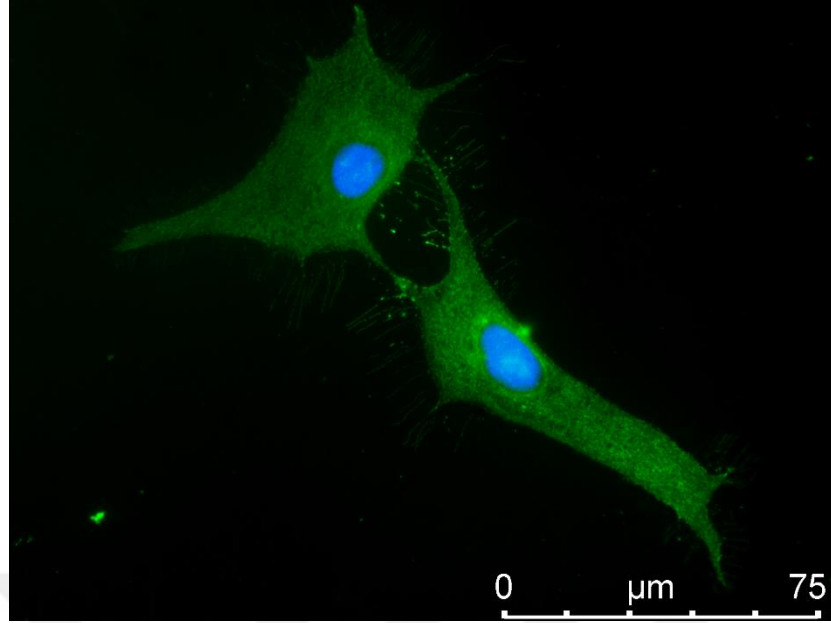
Şekil 4.33. SKOV-3 over adenokarinom hücre hattında ITG $\alpha 5$ ile sitoplazmik immünofloresan işaretleme gözlenmektedir (indirekt immünofloresan-DAPI X 630)



Şekil 4.34. SKOV-3 over adenokarinom hücre hattında hücre membranı ve sitoplazmasında güçlü ITG $\beta 1$ immünreaktivitesi gözlenmektedir (indirek immünperoksidaz-Hematoksilen, A X 400- B X 630)



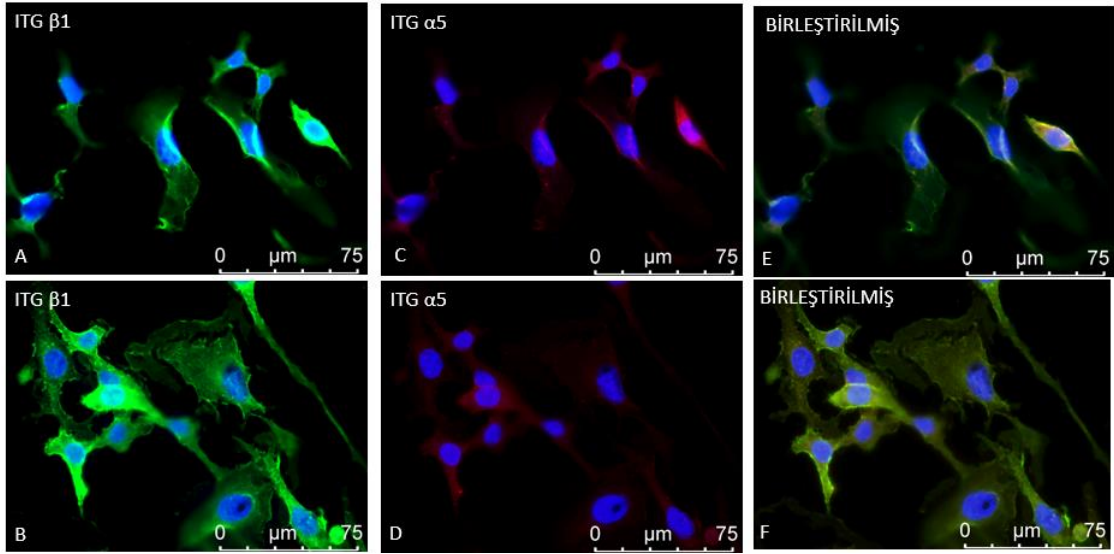
Şekil 4.35. SKOV-3 over adenokarinom hücre hattında ITG $\beta 1$ ile sitoplazmik immünofloresan işaretleme gözlenmektedir (indirekt immünofloresan-DAPI X 630)



Şekil 4.36. SKOV-3 over adenokarinom hücre hattında ITG β 1 immünreaktivitesi fokal noktasal biçimde perinükleer alanda izlenmektedir (indirekt immünofloresan-DAPI X 630)

4.8 SKOV-3 over adenokarsinoma hücre hattı hücrelerinde ITG α 5, ITG β 1'in çift immünofloresan işaretlemesi

SKOV-3 hücre hattı hücrelerinde ITG α 5 ve ITG β 1 lokalizasyonlarını belirlemek için hücrelerde çift immünofloresan işaretleme yapıldı. Sonuçlar her iki integrininde hücre membran ve sitoplazmasında birlikte aynı yerde olduklarını gösterdi (Şekil 4.37).

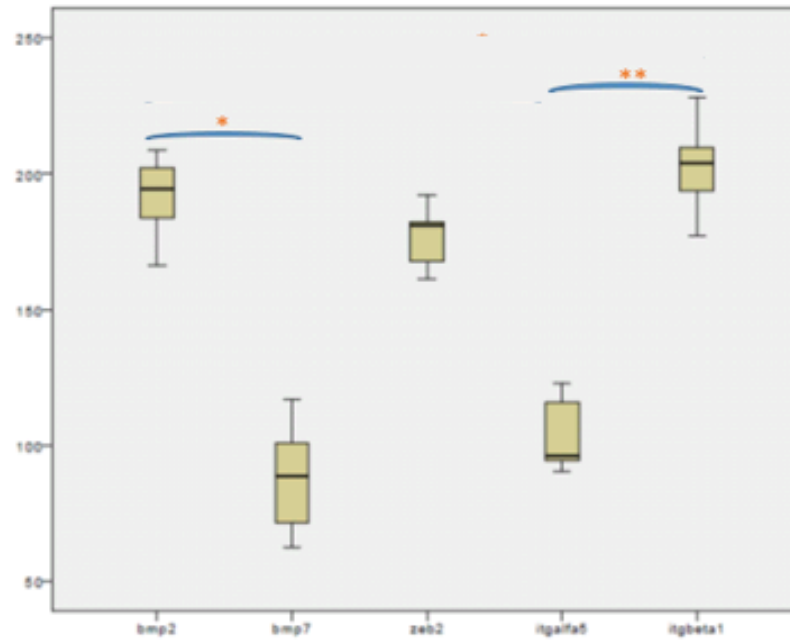


Şekil 4.37. SKOV-3 over adenokarsinoma hücre hattına ait hücrelerde ITG $\alpha 5$ ve ITG $\beta 1$ ile çift immüno Floresan işaretlenmesi. ITG $\alpha 5$ ve ITG $\beta 1$ hücre sitoplazması ve membranında aynı yerde immüno Floresan işaretlenmesi göstermektedir. A, B) ITG $\beta 1$ C, D) ITG $\alpha 5$ E, F) Birleştirilmiş (indirekt immüno Floresan-DAPI x630)

4.9 SKOV-3 Over Adenokarsinoma Hücre Hattına Ait Hücrelerde

İmmünperoksidaz ve İmmün Floresan İşaretlemelerin H-skor ve İstatistiksel Analiz Değerlendirilmesi

SKOV-3 hücre hattında gerçekleştirilen immüno sitokimyasal işaretlemelere ait H-skor analizleri, immunohistokimya H-skor sonuçları ile uyumlu olarak BMP-2 immünreaktivitesi hücrelerde orta derece pozitif ve BMP-7 immünreaktivitesi zayıf pozitif olarak saptandı. SKOV-3 hücrelerinde BMP-2 ve BMP-7 immünreaktiviteleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p < 0,004$) (Şekil 4.38). SKOV-3 hücre hattı hücrelerinde H-skor analizi sonucu ZEB2, ITG $\alpha 5$ immünreaktiviteleri orta derecede pozitif ve ITG $\beta 1$ immünreaktivitesi güçlü pozitif olarak saptandı. ITG $\beta 1$ immünreaktivitesi, ITG $\alpha 5$ ile karşılaştırıldığında, istatistiksel anlamlı fark tespit edildi ($p < 0,023$) (Şekil 4.38).



Şekil 4.38. SKOV-3 Over Adenokarsinoma Hücre Hattı Hücrelerinde İmmünperoksidaz ve İmmünfloresan İşaretlemelemlerin istatistiksel Değerlendirilmesi. SKOV-3 hücre hattı hücrelerinde BMP-2 ve BMP-7 immünreaktivitesi H-skor analiz sonuçları karşılaştırıldığında, BMP-2 immünreaktivitesi istatistiksel anlamlı olarak daha güçlü saptandı (* $p<0,004$). ITG $\alpha 5$, ITG $\beta 1$ mmünreaktivitesi H-skor analiz sonuçları karşılaştırıldığında, ITG $\beta 1$ immünreaktivitesinin daha güçlü olduğu saptandı ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (** $p<0,023$)

5. TARTIŞMA

Over kanserlerinin %70 ini oluşturarak en yaygın çeşidi olan yüksek dereceli over seröz karsinomları peri ve postmenapozal kadınlarda görülmektedir. Çalışmamızda da lenf nodu tutulumu olan grup da yaş ortalaması $58,619 \pm 11,170$, lenf nodu tutulumu olmayan grup da yaş ortalaması $58,838 \pm 10,178$ olarak saptandı. Lenf nodu tutulumu olan ve olmayan gruplar arasında yaş ortalamasında fark bulunmadı.

Over kanseri hücre hatlarında BMP'lerin mRNA ifadelerini saptamak amacı ile yapılan çok sayıda çalışma bulunmasına rağmen [87], over kanserinde BMP'lerin işlevi iyi bilinmemektedir. BMPler ile ilgili yapılan çalışmaların çoğunluğu, BMP-2 ve BMP4 üzerinedir. Over malign tümöründe, BMP-2 ve reseptörleri BMPRII ve BMPRII'nin mRNA seviyeleri, benign tümörler ve normal over dokusuna oranla daha düşük olduğu saptanmıştır [50]. Bu durum BMP-2 artışının metastazdan koruyucu olduğunu akla getirmektedir. Bu bulguların aksine, son yıllarda yapılan çalışmalarda; over kanseri hastalarında BMP-2 tedavisinin, EMT'yi arttırdığı ve kötü prognoz ile korele olduğu gösterilmiştir [51]. Epitelial over kanserlerinde yapılan çalışmada BMP-2 ifadesindeki değişikliklerin tümör hücrelerinin motilite ve adezyonunu değiştirdiğini ve BMP-2 ifadesindeki artışın sağ kalımla ters korelasyon içinde olduğunu ve kötü prognoz göstergesi olduğunu öne sürmektedir [88]. Seröz over kanseri progenitör hücrelerinde (OCSPC ler) yenilenme ve multipotent farklanma kapasitesinin artışı, BMP-2, BMP-4 ve TGF- β seviyelerinde artış ile seyrettiği bildirilmiştir [52]. Over kanserlerinde Page ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, tümör hücrelerinde yüksek BMP-2 mRNA ekspresyonu ve tümör dokusu örneklerinde güçlü immünohistokimyasal boyama saptanmıştır [88].

Bizim çalışmamızda da Page ve arkadaşları ile uyumlu şekilde tümör hücrelerinde BMP-2 immünreaktivitesi güçlü pozitif olarak saptandı. Yaptığımız çalışmada BMP-2 immünreaktivitesi ilk defa lenf nodu tutulumu olan ve olmayan yüksek dereceli seroz over kanserlerin tümör hücrelerinde karşılaştırıldı ve lenf nodu tutulumu olan grupta tümör hücrelerinde daha güçlü immünreaktivite saptandı.

BMP-2 immünreaktivitesinin lenf nodu tutulumu olan grupta artışı over kanserlerinde EMT süreci ve hücre göçünde rolü olabileceğini düşündürmektedir.

BMP-7 için yapılan literatür taramasında sınırlı sayıda çalışmaya rastlanmaktadır. Hibbs ve arkadaşlarının 2004'de over kanserinde yaptıkları çalışmada, BMP-7 mRNA ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Bu çalışmada immünohistokimyasal işaretleme ile BMP-7 nin tümör hücrelerinde az, tümör hücrelerini çevreleyen stromal hücrelerde fazla miktarda eksprese edildiği gösterilerek, tümör hücrelerinin etrafındaki stromal hücrelerin bazı faktörleri eksprese ederek invazyona ve metastaza katkı sağladığı şeklinde yorumlanmıştır [89]. Bizim çalışmamızda da Hibbs ve arkadaşları ile uyumlu olarak, tümör hücrelerinde BMP-7 immünreaktivitesi zayıf, tümör stromasındaki hücrelerde güçlü olarak izlendi. Stromada işaretlenen hücreler infiltratif hücreler (makrofaj, lenfosit, dendritik hücre), fibroblast veya stromadaki tümör hücreleridir. Bu hücrelerin hangi hücreler olduğunu saptamak için hücre belirteçleri kullanarak daha spesifik işaretleme sonrası daha detaylı bir yorumda bulunulabilir.

Başka bir çalışmada, over kanserleri, normal over dokusu ile karşılaştırıldığında kanser dokusunda BMP-7 ekspresyon artışının TGF- β yolağının baskılanmasına ve proliferasyonda artmaya sebep olduğu gösterilmiştir [90]. TGF- β yolağının proliferasyonu baskıladığı, hücre göçü ve invazyonu tetiklediği bilinmektedir. Yapılan bu çalışmada BMP-7 ekspresyon artışının, TGF- β yolağının baskılanmasına sebep olması aynı zamanda hücre invazyon ve göçünde negatif yönde etki ettiğini de akla getirmektedir. Bizim çalışmamızda lenf nodu tutulumu olan ve olmayan yüksek dereceli over seröz kanserler karşılaştırıldığında lenf nodu tutulumu olan grupta BMP-7 nin daha düşük ifade edildiği saptanmıştır. Sunde ve arkadaşları normal over dokusu ile karşılaştırdıklarında over kanserinde BMP-7 ifadesinin yüksek olduğunu saptamışlardır ama over kanseri alt tipi belirtilmemiştir. Çalışmada bakılan over kanseri metastatik tümör olmayabilir ve tümörün başlangıç evrelerine bakılmış olabilir.

Sunde ve arkadaşlarının bulgusu ve çalışmamızın sonuçları, over kanseri başlangıcında BMP-7 ifadesi artışı olduğu ve TGF- β yolağını baskılayarak

antiproliferatif etkisini ortadan kaldırdığı ve kanser hücre proliferasyonuna sebep olduğu şeklinde yorumlanabilir, sonrasında daha ileri evrede metastaz sırasında BMP-7 ifadesi düşer, TGF- β yolağını üzerindeki baskılayıcı etki ortadan kalkar, hücre proliferasyonu baskılanır ve TGF- β yolağı hücre invazyonu ve göçünü tetikler şeklinde yorumlanabilir [53, 54]. Buda BMP-7'nin kanserde bifazik etkisi olabileceğini düşündürmektedir.

2015 senesinde Hover ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre 3 ayrı over kanseri hücre hattında BMP-7 geni, BMP ligandlarından en fazla (%17) amplifiye olan gen olarak bulunmuştur [91].

Çalışmalarda farklı sonuçların bildirilmesi, aynı ligandın kanser türüne bağlı farklı çalışabileceğini ve BMP ailesindeki çeşitli üyelerin etkisinin eşit olmadığı ve ayrı ayrı ele alınıp çalışmaları gerektiğini göstermektedir. Ayrıca, aynı kanser tipindeki aynı BMP ligandının, çalışmaya bağlı olarak farklı şekilde çalışması muhtemeldir[84]. Çalışmalarda sadece bir hücre hattına dayanan sonuçlar çok basit kalıp güvenilir olmayabilir, bu nedenle çok çeşitli kanser hücre hatları veya farklı tümör türleri kullanılmalıdır. Buna dayanarak biz çalışmamıza hem patoloji arşivinden alınan parafin bloklardaki over kanseri tümör örneklerini, hem de SKOV-3 over adenokarsinom hücre hattını dahil edip sonuçlarımızı doğrulamaya çalıştık. Fikir birliği, BMP'lerin kanser gelişiminde hem tümör baskılayıcı hem de onkogen olarak rol oynayabileceği yönündedir [85,86].

Çalışmamızda ilk defa tümör hücrelerinde BMP-2 ve BMP-7 immünreaktiviteleri lenf nodu tutulumu olan ve olmayan yüksek dereceli over seröz kanserlerinde karşılaştırıldı. BMP-2 güçlü pozitif olarak gözlenirken, BMP-7 immünreaktivitesi zayıf olarak gözlemlendi. SKOV-3 hücre hattı hücrelerinde de sonuçlarımızı destekler şekilde BMP-2 immünreaktivitesi güçlü pozitifken, BMP-7 immünreaktivitesinde zayıf olarak saptandı. Bu bulgular hipotezimi doğrulamakta ve BMP-2 ve BMP-7 ifadelerinin ters korelasyon içinde olduklarını göstermektedir.

BMP-7 immünreaktivitesi, lenf nodu tutulumu olmayan over dokusu örneklerinde lenf nodu tutulumu olan over dokusu örneklerinden daha güçlü olarak saptandı ama bu immünreaktivite farkı istatistiksel olarak anlamlı değildi. Çalışma

için seçtiğimiz gruplar göz önüne alınanda her 3 grup yüksek dereceli seröz over kanser örnekleri olduğundan, bu durum BMP-7 immünreaktivitelerinin aralarındaki farkın anlamlı olmamasına sebep olmuş olabilir. Karşılaştırmalar düşük dereceli ve yüksek dereceli over kanserlerde değerlendirildiğinde farkın daha anlamlı olabileceği ve BMP-7 immünreaktivitesini düşük dereceli over kanserlerinde daha güçlü olabileceği düşünülmektedir.

EMT sürecinde aktif rol oynayan bir transkripsiyon faktörü olan ZEB2, TGF- β sinyal yollarında görev almaktadır. Çalışmalarda ZEB2'nin EMT'yi aktive ederek tümör başlangıcı ve gelişiminde anahtar rol oynadığı ve prognozu kötü etkilediği gösterilmiştir. Over kanser hücre hatları, OVCAR3 ve SKOV3, üzerinde yapılan çalışmada, mir200 artışının, ZEB1/pSMAD3 yolağı üzerinden, ZEB1 ekspresyonunu azalttığı dolayısı ile de kanser hücre invazyonunun ve metastazı azalttığı gösterilmiştir [63]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, over kanserlerinde, ZEB2 ifadesinin normalde sitoplazmada lokalize iken invazyon EMT sırasında, çekirdek içinde, kanser dokusunun ön kısmında lokalize olduğu, EMT ve invazyonu arttırdığı gösterilmiştir [62]. Çalışmamızda ZEB2 immünreaktivitesi, SKOV-3 hücre hattında, Prislei ve arkadaşlarının gözlemleri ile uyumlu olarak hücrelerin hem çekirdek hem de sitoplazmasında gözlemlendi. Çekirdekte ZEB2 immünreaktivitesi izlenen hücreler bağlantılarını koparmış uzantıları olmayan daha yuvarlak hücreler olarak görülmekteydi, bu da bu hücrelerin göç eden hücreler olabileceğini düşündürmektedir. Hasta dokularında ZEB2 lenf nodu tutulumu olan grupta daha güçlü bulundu. Transkripsiyon faktörü olarak ZEB2 ifadesinin lenf nodu tutulumu olan grup da daha güçlü olması, EMT yi tetiklediği fikrini desteklemektedir.

Hücreler tutunmaya bağımlı olarak büyür, proliferer olur ve hayatta kalırlar [58]. Bu durumu oluşturan ana etmen integrinler ve onların hücre içi sinyal yollarıdır. Hücrelerin tutunma bağımlılıklarındaki mutasyonlar, onların bağımsız şekilde göç edip, çoğalıp; kansere dönüşümlerine neden olur. Yapılan çalışmalarda integrinlerin artışı veya azalmasının birçok kanser dokusunun invazyon ve metastazında rol oynadığı gösterilmiştir. Over kanserlerinde yapılan çalışmalarda; α v β 6, β 1, α 5 β 1, β 4 integrinlerin metastaz ve invazyonda rol oynadıkları gösterilmiştir

[78]. Epitelyal over kanserlerinde $\beta 1$ -integrin artışı kanser hücrelerinin metastazında artış ile ilişkilendirilmiştir. $\beta 1$ integrinin inhibisyonunun, hücre motilitesini azalttığı aynı çalışmada gösterilmiştir [84]. Over kanseri hücre hatlarında (HO-8910 ve HO-8910PM), $\beta 1$ -integrinin artışı gösterilmiştir. Bu integrinin siRNA ile susturulmasının apoptozu artırdığı, adhezyon ve göçü azalttığı bildirilmiştir [85]. Over kanserlerinde yapılan başka bir çalışmada, $\alpha 5\beta 1$ -integrinin, c-Met/FAK/Src yolağı aktivasyonu ile metastaz ve invazyonu arttırdığı bildirilmiştir [86].

Çalışmamızda ITG $\alpha 5$ ve ITG $\beta 1$ lenf nodu tutulumu olan ve olmayan yüksek dereceli over seröz kanserlerde primer ve sekonder tümör odakları incelendi. Tümör hücrelerinde lenf nodu tutulumu olan grupta, over dokusunda integrin immünreaktivitesinin daha zayıf olması, tümör hücrelerinin primer odak olan over dokusundan ayrılmak ve EMT sürecini başlatmak için integrin bağlantılarını kopardıkları ve dolayısı ile integrin immünreaktivitesinin daha zayıf olduğunu düşündürmektedir. Sekonder odak olan lenf nodu tutulumu olan lenf nodu örneklerinde, immünreaktivitenin güçlü olması, göç eden hücrelerin sekonder odakta MET'e uğrayarak tekrar integrin aracılığı ile tutundukları dolayısı ile integrin immünreaktivitesinin arttığı şeklindedir.

SKOV-3 hücre hattında ITG $\alpha 5$ ve ITG $\beta 1$, genel olarak hücre uzantıları üzerinde göç sırasında oluşan lamellipodiyum ve filopodiyumlarda görüldü. ITG $\beta 1$ bazı hücrelerde perinükleer alanlarda da gözlenmekteydi. Bu alanların çekirdek etrafında integrin yapımında görev alan Golgi kompleksleri oldukları düşünülmektedir. Bu bulguya dayanarak bir sonraki adımda Golgi işaretleyicileri kullanarak integrinlerin yapım aşamaları detaylandırılabilir.

6. SONUÇLAR

1. Çalışmamızda lenf nodu tutulumu olan ve olmayan grup da yaş ortalaması yaklaşık 59 olarak saptandı. Gruplar arasında yaş ortalamasında fark bulunmadı. Çalışmamıza dahil edilen gruplardaki, yüksek dereceli over seröz kanser tanısını ilk kez alan ve ileri evre (Evre III ve IV'e ait) lenf nodu tutulumu olan ve olmayan hastaların postmenapozal döneme rastladığı saptandı.
2. Çalışmamızda, BMP-2 ile üç grupta da tümör hücreleri, stromadaki hücreler ve damar endotel hücrelerinin sitoplazmasında pozitif immunreaktivitesi saptandı. BMP-2 immünreaktivitesi tümör hücrelerinde güçlü, stromada zayıf olarak belirlendi. Tümör hücrelerinde BMP-2 immünreaktivitesi gruplar arası karşılaştırıldığında lenf nodu tutulumu olan over dokusu ve lenf nodu örneklerinde, lenf nodu tutulumu olmayan over dokusu örneklerinden daha güçlü immünreaktivite gözlemlendi ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,000$). BMP-2 immünreaktivitesinin lenf nodu tutulumu olan grupta daha yüksek saptanması over kanserlerinde EMT süreci ve hücre göçünde rolü olabileceğini düşündürmektedir.
3. BMP-7 ile yapılan immun işaretlemeye, her üç grupta da tümör hücreleri ve damar endotelinde zayıf, stromadaki infiltratif hücrelerde güçlü immünreaktivite izlendi. Stromada işaretlenen hücreler; infiltratif hücreler (makrofaj, lenfosit, dendritik hücre), fibroblast veya stromadaki tümör hücreleridir. Bu hücrelerin hangi hücreler olduğunu saptamak için hücre belirteçleri kullanarak daha spesifik işaretleme sonrası daha detaylı bir yorumda bulunulabilir.
4. BMP-7 immünreaktivitesi lenf nodu tutulumu olmayan ile olan over dokusu örneklerinde karşılaştırıldığında lenf nodu tutulumu olmayan over dokusu örneklerinde daha güçlü immünreaktivite gözlemlendi, ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Çalışma için seçtiğimiz gruplar lenf nodu tutulumu açısından farklı olsa da tüm gruplardaki örnekler metastazı olan yüksek dereceli seröz over kanser örnekleridir. Bu durum BMP-7 immünreaktivitelerinin aralarındaki farkın anlamlı olmamasına sebep olmuş olabilir. Karşılaştırmalar düşük dereceli ve yüksek dereceli over kanserleri veya evre I/II yüksek dereceliler

ile evre III/IV arasında değerlendirilseydi farkın daha anlamlı olabileceği ve BMP-7 immünreaktivitesini düşük dereceli over kanserlerinde daha güçlü olabileceği düşünülmektedir.

5. Çalışmamızın in vivo ve in vitro sonuçlarında tümör hücrelerinde BMP-2 nin güçlü pozitif olarak gözlenirken, BMP-7 immünreaktivitesinin zayıf olarak gözlenmesi hipotezimizi doğrulamaktadır. BMP-2 ve BMP-7 ifadelerinin ters korelasyon içinde olduklarını göstermektedir.
6. ZEB2 immünreaktivitesi, her üç grupta da tümör hücreleri, stromadaki hücreler ve damar endotel hücrelerinin sitoplazması ve yer yer çekirdeklerinde pozitif olarak izlendi. ZEB2 immünreaktivitesi her üç grupta da tümör hücrelerinde güçlü ve stromada zayıf immünreaktivite izlendi. ZEB2 immünreaktivitesi gruplar arası karşılaştırıldığında lenf nodu tutulumu olan over dokusunda tümör hücrelerinde, lenf nodu tutulumu olmayan over dokusu örneklerinden daha güçlü immünreaktivite gözlemlendi. Lenf nodu tutulumu olan grubun lenf nodu örneklerinde de tümör hücrelerinde güçlü immünreaktivite saptandı. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,000$). Transkripsiyon faktörü olarak ZEB2 ifadesinin lenf nodu tutulumu olan grup da daha güçlü olması, EMT sürecinde rol aldığı fikrini desteklemektedir.
7. Çalışmamızda ZEB2 immünreaktivitesi, SKOV-3 hücre hattında da immünohistokimya sonuçlarımızla uyumlu olarak hücrelerin hem çekirdek hem de sitoplazmasında gözlemlendi. Çekirdekte ZEB2 immünreaktivitesi izlenen hücreler bağlantılarını koparmış uzantıları olmayan daha yuvarlak hücreler olarak görülmekteydi, bu da bu hücrelerin göç eden hücreler olabileceğini düşündürmektedir.
8. ITG $\alpha 5$ ve ITG $\beta 1$ immünreaktivitesi, üç grupta da tümör hücreleri membranında ve damar endotel hücrelerinde pozitif olarak gözlemlendi. ITG $\alpha 5$ immünreaktivitesi üç grupta da tümör hücreleri ve stromada orta şiddette pozitif olarak izlendi. Tümör hücrelerinde ITG $\alpha 5$ immünreaktivitesi gruplar arası karşılaştırıldığında lenf nodu tutulumu olmayan over dokusu örneklerinde, lenf nodu tutulumu olan over dokusu örneklerinden daha güçlü immünreaktivite saptandı ve bu fark

istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$). Lenf nodu tutulumu olan over dokusu örnekleri ve lenf nodu tutulumu olan lenf nodu örnekleri karşılaştırıldığında, lenf nodu örneklerinde tümör hücrelerinde daha güçlü ITG $\alpha 5$ immünreaktivitesi saptandı, ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi.

9. ITG $\beta 1$ immünreaktivitesi üç grupta da tümör hücrelerinde güçlü ve stromada zayıf olarak izlendi. Tümör hücrelerindeki ITG $\beta 1$ immünreaktivitesi gruplar arası karşılaştırıldığında lenf nodu tutulumu olmayan over dokusu örneklerinde, lenf nodu tutulumu olan over dokusu örneklerinden istatistiksel olarak daha güçlü ITG $\beta 1$ immünreaktivitesi saptandı ($p<0,000$). Lenf nodu tutulumu olan over dokusu örnekleri, lenf nodu örnekleri ile karşılaştırıldığında, lenf nodu örneklerinin tümör hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı daha güçlü ITG $\beta 1$ immünreaktivitesi saptandı ($p<0,000$).
10. Çalışmamızda ITG $\alpha 5$ ve ITG $\beta 1$ lenf nodu tutulumu olan ve olmayan yüksek dereceli over seröz kanserlerde primer ve sekonder tümör odakları incelendi. Tümör hücrelerinde lenf nodu tutulumu olan grupta, over dokusunda integrin immünreaktivitesinin daha zayıf olması, tümör hücrelerinin primer odak olan over dokusundan ayrılmak ve EMT sürecini başlatmak için integrin bağlantılarını kopardıkları ve dolayısı ile integrin immünreaktivitesinin daha zayıf olduğunu düşündürmektedir. Sekonder odak olan lenf nodu tutulumu olan lenf nodu örneklerinde, immünreaktivitenin güçlü olması, göç eden hücrelerin sekonder odakta MET'e uğrayarak tekrar integrin aracılığı ile tutundukları dolayısı ile integrin immünreaktivitesinin arttığı şeklindedir.
11. SKOV-3 hücre hattında ITG $\alpha 5$ ve ITG $\beta 1$, genel olarak hücre uzantıları üzerinde göç sırasında oluşan lamellipodiyum ve filopodiyumlarda görüldü. ITG $\beta 1$ bazı hücrelerde perinükleer alanlarda da gözlenmekteydi. Bu alanların çekirdek etrafında integrin yapımında görev alan Golgi kompleksleri oldukları düşünülmektedir. Bu bulguya dayanarak bir sonraki adımda Golgi işaretleyicileri kullanarak integrinlerin yapım aşamaları detaylandırılabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. (2014). Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*, 64, 9-29.
2. Sun ZL, Tang YJ, Wu WG, Xing J, He YF, Xin DM, Yu YL, Yang Y, Han P (2013). AZD1480 can inhibit the biological behavior of ovarian cancer SKOV3 cells in vitro. *Asian Pac J Cancer Prev*, 14, 4823-7.
3. Vaughan S, Coward JI, Bast RC Jr, Berchuck A, Berek JS, Brenton JD, Coukos G, Crum CC, Drapkin R, Etemadmoghadam D, Friedlander M, Gabra H, Kaye SB, Lord CJ, Lengyel E, Levine DA, McNeish IA, Menon U, Mills GB, Nephew KP, Oza AM, Sood AK, Stronach EA, Walczak H, Bowtell DD, Balkwill FR, (2011). Rethinking ovarian cancer: recommendations for improving outcomes. *Nat Rev Cancer*, 11, 719-25.
4. Arian SK, Kasap B, Yetimlar H, Yildiz A, Sakarya DK, Tatar S. (2014). Impact of prognostic factors on survival rates in patients with ovarian carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15, 6087-94.
5. Chen Y, Liu ZJ, Liu J, Liu LK, Zhang ES, Li WL (2014). Inhibition of metastasis and invasion of ovarian cancer cells by crude polysaccharides from *rosa roxburghii* trutt in vitro. *Asian Pac J Cancer Prev*.15(23):10351-4.
6. Vergara D, Merlot B, Lucot JP, Collinet P, Vinatier D. (2010) Epithelialmesenchymal transition in ovarian cancer. *Cancer Lett* 291: 59–66
7. Pon YL, Zhou HY, Cheung AN, Ngan HY, Wong AS (2008) p70 S6 kinase promotes epithelial to mesenchymal transition through snail induction in ovarian cancer cells. *Cancer Res* 68: 6524–6532
8. Haiying Niu, Wei Zhou, Yingxi Xu, Zhiqi Yin, Wenzhi Shen, Zhen Ye, Yanhua Liu, Yanan Chen, Shuang Yang, Rong Xiang, Lina Wang and Pengpeng Qu. (2017) Silencing PPA1 inhibits human epithelial ovarian cancer metastasis by suppressing the Wnt/ β -catenin signaling pathway.
9. Can A. (2014) Kök hücre biyolojisi, Türleri ve Tedavide Kullanımları
10. Urist, M.R. (1965) Bone: formation by auto induction. *Science* 150, 893–899.
11. Guo, X, and Wang, X.F. (2009) Signaling cross-talk between TGF-beta/BMP and other pathways. *Cell Res*. 19, 71–88.
12. Hardwick, J.C., Kodach, L.L., Offerhaus, G.J., and van den Brink, G.R. (2008) Bone morphogenetic protein signalling in colorectal cancer. *Nat. Rev. Cancer* 8, 806–812.
13. Rahman, M.S., Akhtar, N., Jamil, H.M., Banik, R.S., and Asaduzzaman, S.M. (2015) TGF-b/BMP signaling and other molecular events: regulation of osteoblastogenesis and bone formation. *Bone Res*. 3, 15005.

14. Wang, R.N., Green, J., Wang, Z., Deng, Y., Qiao, M., Peabody, M., Zhang, Q., Ye, J., Yan, Z., Denduluri, S. (2014) Bonemorphogenetic protein (BMP) signaling in development and human diseases. *Genes Dis.* 1, 87–105.
15. Silvia Prislei, Enrica Martinelli, Gian Franco Zannoni, Marco Petrillo, Flavia Filippetti, Marisa Mariani, Simona Mozzetti, Giuseppina Raspaglio, Giovanni Scambia, Cristiano Ferlini (2015) Role and prognostic significance of the epithelial-mesenchymal transition factor ZEB2 in ovarian cancer *Oncotarget.* 6(22): 18966–18979
16. Berrier AL, Yamada KM. (2007) Cell-matrix adhesion. *J Cell Physiol* 213:565-73;
17. Kirat Kumar Ganguly, Sekhar Pal, Shuvojit Moulik, Amitava Chatterjee (2013) Integrins and metastasis *Cell Adhesion & Migration* 7:3, 251–261;
18. Tingulstad S, Skjeldestad FE, Halvorsen TB, Hagen B. (2003) Survival and prognostic factors in patients with ovarian cancer. *Obstet Gynecol.* ; 101:885–891.
19. Zhang GY, Ahmed N, Riley C, Oliva K, Barker G, Quinn MA, Rice GE. (2005) Enhanced expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in epithelial ovarian carcinoma. *Br J Cancer.* ; 92:113–119.
20. Choi JH, Wong AS, Huang HF, Leung PC. (2007) Gonadotropins and ovarian cancer. *Endocr Rev.* ; 28:440–461.
21. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. (2013) Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin.* ; 63:11-30.
22. Linah Al-Alem, Thomas E. Curry Jr. (2016) Ovarian Cancer: Involvement of the Matrix Metalloproteinases Reproduction. 150(2): R55–R64.
23. Yilmaz M, Christofori G. (2009) EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev.* ; 28:15-33.
24. Sleeman JP, Thiery JP. (2011) SnapShot: the epithelial-mesenchymal transition. *Cell.* ; 145:162.e161.
25. Hay ED. (1995) An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat.* 154:8
26. Lamouille S, Xu J, Derynck R. (2014) Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* ;15(3):178-96.
27. Stéphanie Gout, Jacques Huot (2008) Role of Cancer Microenvironment in Metastasis: Focus on Colon Cancer. *Cancer Microenvironment* 1:69–83
28. Thiery JP, Sleeman JP. (2006) Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nature Review Mol. Cell Biol.*; 7:131–142.
29. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. (2009) Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell.* ; 139:871–890

30. Chapman HA. (2011) Epithelial-mesenchymal interactions in pulmonary fibrosis. *Annu. Rev. Physiol.* ; 73:413–435.
31. Eastham AM, Spencer H, Soncin F, Ritson S, Merry CL, Stern PL, Ward CM. (2007) Epithelial-mesenchymal transition events during human embryonic stem cell differentiation. *Cancer Res.* 1;67(23):11254-62.
32. Kalluri R, Weinberg RA. (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* ; 119:1420–1428.
33. Huang RY, Guilford P, Thiery JP. (2012) Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition. *J. Cell Science*; 125:4417–4422.
34. Yilmaz M, Christofori G. (2009) EMT, The cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Review*; 28:15–33.
35. Yilmaz M, Christofori G. (2010) Mechanisms of motility in metastasizing cells. *Mol. Cancer Res.* ; 8:629–642.
36. Ridley AJ. (2011) Life at the leading edge. *Cell.* ; 145:1012–1022.
37. Bastida MF, Sheth R, Ros MA. (2009) A BMP-Shh negative-feedback loop restricts Shh expression during limb development. *Development.* Nov;136(22):3779-89.
38. Guo, X., Wang, X.F. (2009). Signaling cross-talk between TGF-beta/BMP and other pathways. *Cell Research* 19, 71–88.
39. Hardwick, J.C., Kodach, L.L., Offerhaus, G.J., Van den Brink, G.R. (2008) Bone morphogenetic protein signalling in colorectal cancer. *Nat. Rev. Cancer* 8, 806–812.
40. Bragdon B., Moseychuk O., Saldanha S., King D., Julian J., Nohe, A. (2011) Bone morphogenetic proteins: a critical review. *Cell. Signal.* 23, 609–620.
41. Duc-Hiep Bach, Hyen Joo Park, Sang Kook Lee. (2017) The Dual Role of Bone Morphogenetic Proteins in Cancer. *Mol. Ther. Oncolytics.* 24;8:1-13
42. Ali I.H.A., Brazil D.P. (2014). Bone morphogenetic proteins and their antagonists: current and emerging clinical uses. *Br. J. Pharmacol.* 171, 3620–3632.
43. Salazar V.S., Gamer L.W., Rosen V. (2016). BMP signalling in skeletal development, disease and repair. *Nat. Rev. Endocrinol.* 12, 203–221.
44. Avsian-Kretchmer O., Hsueh A.J. (2004). Comparative genomic analysis of the eight-membered ring cystine knot-containing bone morphogenetic protein antagonists. *Mol. Endocrinol.* 18, 1–12.
45. Rosen V. (2006). BMP and BMP inhibitors in bone. *Ann. N Y Acad. Sci.* 1068, 19–25.
46. Valenzuela D.M., Economides A.N., Rojas E., Lamb T.M., Nunez L., Jones P., Lp N.Y., Espinosa R., Brannan C.I., Gilbert D.J. (1995). Identification of

- mammalian noggin and its expression in the adult nervous system. *J. Neurosci.* 15, 6077–6084.
47. Yan K., Wu Q., Yan D.H., Lee C.H., Rahim N., Tritschler I., DeVecchio J., Kalady M.F., Hjelmeland A.B., Rich, J.N. (2014) Glioma cancer stem cells secrete Gremlin1 to promote their maintenance within the tumor hierarchy *Genes Dev.* 28, 1085–1100.
 48. Cyr-Depauw C., Northey J.J., Tabariès S., Annis M.G., Dong Z., Cory S., Hallett M., Rennhack J.P., Andrechek E.R., Siegel P.M. (2016) Chordin-like 1 suppresses bone morphogenetic protein 4-induced breast cancer cell migration and invasion. *Mol. Cell. Biol.* 36, 1509–1525.
 49. Cipriano S.C., Chen L., Kumar T.R., Matzuk M.M. (2000) Follistatin is a modulator of gonadal tumor progression and the activin-induced wasting syndrome in inhibin-deficient mice *Endocrinology* 141, 2319–2327.
 50. Ma Y, Ma L, Guo Q, Zhang S. (2010) Expression of bone morphogenetic protein-2 and its receptors in epithelial ovarian cancer and their influence on the prognosis of ovarian cancer patients. *J Exp Clin Cancer Research* 30;29:85.
 51. Mandal C, Rahman M, Nag A (2015) An Update of Bone Morphogenetic Proteins as Biomarker and Therapy for Cancer. *J Carcinog Mutagen* 6:e114. doi: 10.4172/2157-2518.1000e114.
 52. Ho CM, Shih DT, Hsiao CC, Huang SH, Chang SF, Cheng WF. *J Transl Med.* (2015) Nov 23;13:367. doi: 10.1186/s12967-015-0722-7.
 53. Ying X, Sun Y, He P. *Cell Physiol Biochem.* 2015;37(4):1271-8. doi: 10.1159/000430249. Epub 2015 Oct5. PMID:26431436
 54. Naber HP, Wiercinska E, Pardali E, van Laar T, Nirmala E, Sundqvist A, van Dam H, van der Horst G, van der Pluijm G, Heckmann B, Danen EH, Ten Dijke P. *Cell Oncol (Dordr).* 2012 Feb;35(1):19-28. doi: 10.1007/s13402-011-0058-0. Epub 2011 Sep 21.
 55. Zabkiewicz C, Resaul J, Hargest R, Jiang WG, Ye L. (2017) Bone morphogenetic proteins, breast cancer, and bone metastases: striking the right balance. *Endocr Relat Cancer.* 24(10):R349-R366.
 56. Sakai H, Furihata M, Matsuda C, Takahashi M, Miyazaki H, Konakahara T, Imamura T, Okada T. (2013) Augmented autocrine bone morphogenic protein (BMP) 7 signaling increases the metastatic potential of mouse breast cancer cells. *Clin. Exp. Metastasis.* 29(4):327-38.
 57. McNiven MA. (2013) Breaking away: matrix remodeling from the leading edge. *Trends Cell Biol.*; 23:16–21.
 58. Peinado H, Olmeda D, Cano A. (2007) Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nature Rev. Cancer* ; 7:415–428.

59. Xu J, Lamouille S, Derynck R. (2009) TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res.* ; 19:156–172.
60. Nam EH, Lee Y, Park YK, Lee JW, Kim S. (2012) ZEB2 upregulates integrin $\alpha 5$ expression through cooperation with Sp1 to induce invasion during epithelial-mesenchymal transition of human cancer cells. *Carcinogenesis*. 2012 Mar;33(3):563-71.
61. Nam EH, Lee Y, Zhao XF, Park YK, Lee JW, Kim S. (2014) ZEB2-Sp1 cooperation induces invasion by upregulating cadherin-11 and integrin $\alpha 5$ expression. *Carcinogenesis*. 35(2):302
62. Prislei S, Martinelli E, Zannoni GF, Petrillo M, Filippetti F, Mariani M, Mozzetti S, Raspaglio G, Scambia G, Ferlini C. (2014) Sox9 and Hif-2 α regulate TUBB3 gene expression and affect ovarian cancer aggressiveness. *Oncotarget*. 7;6(22):18966-79.
63. Sun N, Zhang Q, Xu C, Zhao Q, Ma Y, Lu X, Wang L, Li W. (2014) Molecular regulation of ovarian cancer cell invasion; *Tumour Biology*. 35(11):11359-66.
64. Zaidel-Bar R, Itzkovitz S, Ma'ayan A, Iyengar R, Geiger B. (2007) Functional atlas of the integrin adhesome. *Nat Cell Biol* 9:858-67
65. Molecular Biology of THE CELL. (2014) Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, David Morgan, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter ISBN 978-0-8153-4464-3
66. Berrier AL, Yamada KM. (2007) Cell-matrix adhesion. *J Cell Physiol* 213:565-73
67. Shattil, S. J., Kim, C., Ginsberg, M. H. (2010) The final steps of integrin activation: the end game. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 288–30
68. Kim, C., Ye, F. & Ginsberg, M. H. (2011) Regulation of integrin activation. *Annual Review Cell Developmental Biology* 27, 321–345
69. Kim C., Ye F., Hu X., Ginsberg M. H. (2012) Talin activates integrins by altering the topology of the β -transmembrane domain. *J. Cell Biol.* 197, 605–611
70. Wehrle-Haller, B. (2012) Assembly and disassembly of cell matrix adhesions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 24, 569–581
71. Springer, T. A. & Dustin, M. L. (2012) Integrin inside–out signaling and the immunological synapse. *Curr. Opin. Cell Biol.* 24, 107–115
72. Chang, D. D., Wong, C., Smith, H. & Liu, J. (1997) ICAP-1, a novel $\beta 1$ integrin cytoplasmic domain-associated protein, binds to a conserved and functionally important NPXY sequence motif of $\beta 1$ integrin. *J. Cell Biol.* 138, 1149–1157
73. Kiema T, Lad Y, Jiang P, Oxley CL, Baldassarre M, Wegener KL, Campbell ID, Ylännä J, Calderwood DA. (2006) The molecular basis of filamin binding to integrins and competition with talin. *Mol. Cell* 21, 337–347

74. Rantala JK, Pouwels J, Pellinen T, Veltel S, Laasola P, Mattila E, Potter CS, Duffy T, Sundberg JP, Kallioniemi O, Askari JA, Humphries MJ, Parsons M, Salmi M, Ivaska J. (2011) SHARPIN is an endogenous inhibitor of $\beta 1$ -integrin activation. *Nature Cell Biol.* 13, 1315–1324
75. Feng X, Gao X, Kang T, Jiang D, Yao J, Jing Y, Song Q, Jiang X, Liang J, Chen J. (2010) Mammary-derived growth inhibitor (MDGI) interacts with integrin α -subunits and suppresses integrin activity and invasion. *Oncogene* 29, 6452–663
76. Pouwels, J., Nevo, J., Pellinen, T., Ylanne, J. & Ivaska, J. (2012) Negative regulators of integrin activity. *J. Cell Science* 125, 3271–3280
77. Bouvard D, Pouwels J, De Franceschi N, Ivaska J. (2013) Integrin inactivators: balancing cellular functions in vitro and in vivo. *Nat Rev Mol Cell Biology* 14(7):430-42
78. Ganguly K, Sen T, Pal S, Biswas J, Chatterjee A. (2012) Studies on Focal Adhesion Kinase in human breast cancer cell MDA-MB-231 *Advances in Biological Chemistry* 2:29-42
79. Ahmed N, Pansino F, Clyde R, Murthi P, Quinn MA, Rice GE, Agrez MV, Mok S, Baker MS. (2002) Overexpression of $\alpha v \beta 6$ integrin in serous epithelial ovarian cancer regulates extracellular matrix degradation via the plasminogen activation cascade *Carcinogenesis*. 23(2):237-44.
80. Hu Z, Gao S, Gao J, Hou R, Liu C, Liu J, Li B, Liu D, Zhang S, Lin B. (2012) Elevated levels of Lewis y and integrin $\alpha 5 \beta 1$ correlate with chemotherapeutic drug resistance in epithelial ovarian carcinoma. *International Journal Molecular Science*. 23;13(12):15588-600
81. Gao J, Hu Z, Liu D, Liu J, Liu C, Hou R, Gao S, Zhang D, Zhang S, Lin B. (2013) Expression of Lewis y antigen and integrin αv , $\beta 3$ in ovarian cancer and their relationship with chemotherapeutic drug resistance. *Journal Experienced Clinical Cancer Research* 1;32:36
82. Sawada K, Mitra AK, Radjabi AR, Bhaskar V, Kistner EO, Tretiakova M, Jagadeeswaran S, Montag A, Becker A, Kenny HA, Peter ME, Ramakrishnan V, Yamada SD, Lengyel E. (2008) Loss of E-cadherin promotes ovarian cancer metastasis via $\alpha 5$ -integrin, which is a therapeutic target *Cancer Research* 1;68(7):2329-39
83. Nam EH, Lee Y, Zhao XF, Park YK, Lee JW, Kim S. (2014) ZEB2-Sp1 cooperation induces invasion by upregulating cadherin-11 and integrin $\alpha 5$ expression. *Carcinogenesis*. 35(2):302-14.
84. Chen CH, Shyu MK, Wang SW, Chou CH, Huang MJ, Lin TC, Chen ST, Lin HH, Huang MC (2016) MUC20 promotes aggressive phenotypes of epithelial ovarian cancer cells via activation of the integrin $\beta 1$ pathway. *Gynecol Oncology* 140(1):131-7

85. Zhang L, Zou W. (2015) Inhibition of integrin $\beta 1$ decreases the malignancy of ovarian cancer cells and potentiates anticancer therapy via the FAK/STAT1 signaling pathway. *Molecular Medical Reproduction* 12(6):7869-76.
86. Mitra AK, Sawada K, Tiwari P, Mui K, Gwin K, Lengyel E. (2011) Ligand-independent activation of c-Met by fibronectin and $\alpha(5)\beta(1)$ -integrin regulates ovarian cancer invasion and metastasis. *Oncogene* 31;30(13):1566-76.
87. F. Moll, C. Millet, D. Noel, B. Orsetti, A. Bardin, D. Katsaros, C. Jorgensen, M. Garcia, C. Theillet, P. Pujol, V. Francois, (2006) Chordin is underexpressed in ovarian tumors and reduces tumor cell motility, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20 240-250
88. C. Le Page, V. Ouellet, J. Madore, F. Ren, T.J. Hudson, P.N. Tonin, D.M. Provencher, A.M. Mes-Masson, (2006). Gene expression profiling of primary cultures of ovarian epithelial cells identifies novel molecular classifiers of ovarian cancer, *British journal of cancer*, 94 436-445.
89. Hibbs K, Skubitz KM, Pambuccian SE, Casey RC, Burleson KM, Oegema TR Jr, Thiele JJ, Grindle SM, Bliss RL, Skubitz AP. (2004). Differential gene expression in ovarian carcinoma: identification of potential biomarkers. *Am J Pathol.* 165(2):397-414.
90. Sunde JS, Donninger H, Wu K, Johnson ME, Pestell RG, Rose GS, Mok SC, Brady J, Bonome T, Birrer MJ. (2006) Expression profiling identifies altered expression of genes that contribute to the inhibition of transforming growth factor-beta signaling in ovarian cancer. *Cancer Res.* Sep 1;66(17):8404-12.
91. Hover LD, Young CD, Bhola NE, Wilson AJ, Khabele D, Hong CC, Moses HL, Owens P. (2015) "Small molecule inhibitor of the bone morphogenetic protein pathway DMH1 reduces ovarian cancer cell growth." *Cancer Lett.* Nov 1;368(1):79-87.

8. EKLER

EK-1. Tez Çalışması İle İlgili Etik Kurul İzni



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557 - 747

Konu :

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 13 TEMMUZ 2016 ÇARŞAMBA
Toplantı No : 2016/14
Proje No : GO 16/479(Değerlendirme Tarihi : 13.07.2016)
Karar No : GO 16/479- 52

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Naciye Dilara ZEYBEK'in sorumlu araştırmacı olduğu, Prof. Dr. Alp USUBÜTÜN, Doç. Dr. Ayşen ÖZCAN, Doç. Dr. Ebru BODUR, Yrd. Doç. Dr. Anıl DOLGUN, Arş. Gör. Müslüm GÖK, Arş. Gör. Burcu ŞAHAN ve Arş. Gör. Elif TAŞER ile birlikte çalışacakları, Arş. Gör. Elham BAHADOR'un Doktora tezi olan, GO 16/479 kayıt numaralı ve **"Over Kanserlerinde Bmp-7 Ve Bmp-2 Nın İnvasyon Ve Metastazdaki Etkisi"** başlıklı proje önerisi araştırmanın gerekece, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur,

- | | |
|--|---|
| 1. Prof. Dr. Sevdâ F. MÜFTÜOĞLU (Başkan) | 10 Prof. Dr. Oya Nuran EMİROĞLU (Üye) |
| 2. Prof. Dr. Nürten AKARSU (Üye) | 11 Yrd. Doç. Dr. Özay GÖKÖZ (Üye) |
| 3. Prof. Dr. M. Yıldırım BAYRA (Üye) | 12. Doç. Dr. Güzde GİRGIN (Üye) |
| 4. Prof. Dr. Necdet SAĞLAM (Üye) | 13. Doç. Dr. Fatma Visal OKUR (Üye) |
| 5. Prof. Dr. Hatice Doğan BUZOĞLU (Üye) | 14. Yrd. Doç. Dr. Can Ebru KURT (Üye) |
| 6. Prof. Dr. R. Koksai ÖZGÜL (Üye) | 15. Yrd. Doç. Dr. H. Hüseyin TURNAĞÖL (Üye) |
| 7. Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN (Üye) | 16. Öğr. Gör. Dr. Müge DEMİR (Üye) |
| 8. Prof. Dr. Elmas Ebru YALÇIN (Üye) | 17. Öğr. Gör. Meltem ŞENGEL (Üye) |
| 9. Prof. Dr. Mintaze Kerem GÜNEL (Üye) | 18. Av. Meltem ÖNURLU (Üye) |

9. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyad: Elham Bahador Zırh

Doğum Tarihi / Yer: 18.12.1980/ Urmia Iran

Görev Yeri: Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji AbD, Doktora öğrencisi

Yabancı Dil: İngilizce (ETS TOEFL Total Score 98, 16 Haziran 2010)
Farsca (Iran Eğitim Dili)
Azerice (Ana Dilim)

ETS GRE(ALES eş değeri sınav) : Verbal Score 560 (%78), Quantitive Score 800 (%94),
Şubat 2

E-posta : elhambahador1969@gmail.com

Telefon : 0 507 738 1169

ÖĞRENİM DURUMU:

2000-2007 Urmia Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi

2007-2010 Veterinerlik Mecburi Hizmet Marivan, İran

2011- Halen Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji AbD,
Doktora öğrencisi

Tez Başlığı: Over kanserlerinde BMP-7 ve BMP-2'nin invazyon ve metastazdaki etkisi

Tez Danışmanı: Doç Dr. Dilara Zeybek

Doktora muhtemel bitirme tarihi: 30.06.2018

Türk vatandaşlığına geçiş tarihi: 17.12. 2019

BİLİMSEL KURULUŞLARA ÜYELİKLER :

- Türk Elektron Mikroskopi Derneği
- Türk Histoloji ve Embriyoloji Derneği
- European Microscopy Society (EMS) - (Avrupa Mikroskopi Derneği)
- International Federation of Societies for Microscopy (IFSM) - (Uluslararası Mikroskop Dernekleri Federasyonu)
- International Federation of Societies for Histochemistry and Cytochemistry (IFSHC) - Uluslararası Histokimya ve Sitokimya Dernekleri Federasyonu

ULUSLARARASI HAKEMLİ DERGİLERDE YAYINLANAN MAKALELER

1. Kan B, Sencimen M, Bayar GR, Korkusuz P, Coskun AT, Korkmaz A, **Bahador E**, Zereener T. Histomorphometric and microtomographic evaluation of the effects of hyperbaric oxygen and systemic ozone, used alone and in combination, on calvarial defect healing in rats. J Oral Maxillofac Surg. 2015 Jun;73(6):1231.e1-10. doi: 10.1016/j.joms. 2015.02.018. Epub 2015 Feb 26.
2. Ankay Yilbas A, Akca B, Buyukakkus B, **Bahador Zirh E**, Zeybek D, Uzumcuoglu F, Saricaoglu F. Procaine and saline have similar effects on articular cartilage and synovium in rat knee. BMC Anesthesiol. 2018 May 9;18(1):51. doi: 10.1186/s12871-018-0513-9.

ULUSAL BİLİMSEL TOPLANTILARDA SUNULAN BİLDİRİLER

1. **Zirh EB**, Usubütün A, Taşer E, Dolgun NA, Zeybek ND. Metastazı Olan ve Olmayan Over Kanselerinde BMP-7 Ve BMP-2, ZEB2 ve İntegrinlerin İmmunreaktivitesinin İn vivo ve İn vitro Değerlendirilmesi. 14. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi 10-13 Mayıs 2018, Antalya – Türkiye (Sözlü sunum)
2. Özdemir S, Çelik H, Cengiz C, Zeybek ND, **Zirh EB**, Aslan N. Septoplasti Tekniklerinin Tavşan Nazal Septum Mukozasında Işık ve Elektron Mikroskop Düzeyinde İncelenmesi. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi 10-13 Mayıs 2018, Antalya – Türkiye (Poster bildirisi)
3. Palabiyik S.S., Zeybek N.D., Akpınar E, **Zirh EB**, Sipahi H, Halici Z. Neuroprotective Effect of EGCG on Aluminum Altered Hippocampal NMDA Receptor 1 and 2A/2B

Expression in Rats. 57th Annual Meeting and ToxExpo™, San Antonio, Texas March 11–15, 2018 (Sözlü sunum)

4. Akça B, Ankay Yılbaş A, Üzümcügil F, Büyükkakuş B, **Bahador E**, Zeybek ND, Sarıcaoğlu F “Do we cause harm using dexmedetomidine on articular cartilage and synovium in rat knee?” 36th Annual ESRA Congress 2017, European Society of Regional Anesthesia Congress 2017, 42(5), 60-61, 13-16 Ekim 2017 (Sözlü sunum)
5. Akça B, Ankay Yılbaş A, Üzümcügil F, Büyükkakuş B, **Bahador E**, Zeybek ND, Sarıcaoğlu F. intraartiküler deksmedetomidin kullanımının rat eklem kartilajı ve synovium üzerine etkilerinin incelenmesi. TARD Ulusal kongresi, 26-27. Antalya, Türkiye, 25-29 Ekim 2017 (Sözlü Sunum)
6. Özdemir S, Çelik H, Cengiz C, Zeybek ND, **Bahador E**, Arslan N. “Septoplasti tekniklerinin nazal septum mukozası üzerindeki histopatolojik etkileri: deneysel çalışma.” 39. Türk Ulusal Kulak Burun Boğaz ve Baş Boyun Cerrahisi kongresi, Kongre kitabı s72-73, SB118. Antalya, Türkiye, 8-12 Kasım 2017 (Sözlü Sunum)
7. Palabiyik SS, Zeybek ND, Akpınar E, **Zirh EB**, Sipahi H, Halici Z. The protective role of epigallocatechin-3- gallate in aluminum induced neurotoxicity in rats: focus on apoptosis. 15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, Antalya, 18-21 Mayıs 2017
8. Ankay Yılbaş A, Akca B, Büyükkakuş B, **Bahador E**, Zeybek ND, Sarıcaoğlu F. Prokain ve serum fizyolojik eklem kıkırdığı ve sinovyum üzerinde benzer etki gösterir. XIII. Uluslararası Katılımlı Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, İzmir, 30 Nisan -3 Mayıs 2016. Cell & Tissue Biology Research Suppl 5 suppl: 660-661, 2016. (Poster bildirisi)
9. Kan B, Sencimen M, Bayar GR, Korkusuz P, Coskun AT, Korkmaz A, **Bahador E**, Zeren T. Histomorphometric and Microtomographic Evaluation of the Effects of Hyperbaric Oxygen and Systemic Ozone, Used Alone and in Combination, on Calvarial Defect Healing in Rats, 22nd Electron Microscopy Congress (EMK 2015), İstanbul, 2-4 Eylül 2015. (Poster bildirisi)

KATKIDA BULUNULAN BİLİMSEL KİTAPLAR:

1. Histology Laboratory Guide Book, 2nd Edition, 2015 Hacettepe University Faculty of Medicine Department of Histology and Embryology

PROJELERDE YAPTIĞI GÖREVLER:

1. “Over kanserlerinde BMP-7 ve BMP-2’nin invazyon ve metastazdaki etkisi”
Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi Proje no: TSA-2017-13046 Araştırmacı, 22.02.2017-devam ediyor

SERTİFİKALAR

1. Deney Hayvanlarını Kullanım Sertifikası, Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu, Ankara, kurs süresi: 10 ekim- 5 ocak, Sertifika sınıfı: B
Belge no: 363 Sertifika alım tarihi: 26 Şubat 2016
2. Temel İş Sağlığı ve Güvenliği Eğitimi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara, 12-16 Aralık 2014

KONGRELER ve EĞİTİMLER:

1. XIII. Ulusal Histoloji ve Embryoloji Kongresi, Antalya, 10-13 Mayıs 2018
2. Akım Sitometri Tekniğinin Üreme Biyoteknolojisinde Kullanım Alanları Kursu, 5 Ocak 2018
3. 23. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi (Uluslararası Katılımlı), Antalya, 19-21 Mayıs 2017
4. 15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, Antalya, 18-21 Mayıs 2017
5. XIII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, İzmir, 30 Nisan Mayıs 2016
6. Kök Hücre Günü 2016 Kalıtsal Hastalıklarda kök Hücre Biyolojisi ve Uyarılmış Puliripotent Kök (IPS) Hücre, Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi PEDİ-STEM, Ankara, 22 Kasım 2016

- 7.** Türk Kalp ve Damar Cerrahisi Derneği, Kardiyovasküler Temel Bilimler Çalışma Grubu, Ankara, 02 Şubat 2016
- 8.** TÜBA- Kök Hücre Tedavilerine Güncel Yaklaşımlar Sempozyumu, Ankara, 20 Ekim 2015
- 9.** I. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Lisansüstü Eğitim Çalıştayı, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara, 2-3 Ekim 2015
- 10.** 22nd Electron Microscopy Congress (EMK 2015), Sabancı Üniversitesi, İstanbul, 2-4 Eylül 2015
- 11.** Kök Hücre Günü 2014 Toplantısı, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara, 19 Kasım 2014
- 12.** Asistan Etik Eğitimi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara, 30-31 Ekim 2014
- 13.** I. Hacettepe Writing Workshop, THED, Ankara, 1-2 Ekim 2014
- 14.** Sağlık Bilimlerinde Bilimsel Proje Hazırlama Kursu, THED, Ankara, 30 Mayıs-1 Haziran 2014
- 15.** Biyoistatistiksel Çözümleme Kursu, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara, 26 Mayıs 2014
- 16.** XII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, Ankara Tıp Fakültesi, Ankara, 27-30 Mayıs 2014