T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARKLI KANSER HÜCRE HATLARINDA 1.25 DİHİDROKSİ VİTAMİN D3'ÜN APOPİTOZİS, ANJİOGENEZ VE VDR EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

TUĞBA FATSA

TIBBİ BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI

HAZİRAN 2022

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

Gazi

1926

FARKLI KANSER HÜCRE HATLARINDA 1.25 DİHİDROKSİ VİTAMİN D3'ÜN APOPİTOZİS, ANJİOGENEZ VE VDR EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Tuğba FATSA

YÜKSEK LİSANS TEZİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HAZİRAN 2022

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Tuğba FATSA

10/06/2022

FARKLI KANSER HÜCRE HATLARINDA 1.25 DİHİDROKSİ VİTAMİN D3'ÜN APOPİTOZİS, ANJİOGENEZ VE VDR EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Tuğba FATSA

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Mayıs 2022

ÖZET

Amaç: Meme, prostat ve kolon kanserleri dünyada en çok görülen kanser türleri arasında yer almaktadır. Vitamin D reseptörü (VDR), biyolojik olarak D vitamininin en aktif formu olan $1\alpha,25(OH)_2D_3$ (kalsitriol) ile kompleks oluşturarak farklı gen transkripsiyonlarını modüle eder. Amacımız MCF-7, CaCo-2 ve DU-145 hücre hatlarına uyguladığımız kalsitriolün hücrelerdeki antiproliferatif, apopitotik ve antianjiogenik etkilerin araştırılmasıdır. Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda meme kanseri hücre hattı (MCF-7), prostat kanseri hücre hattı (DU-145) ve kolon kanseri hücre hattı (CaCo-2) üzerine aynı şartlarda, aynı ortamda ve aynı dozlarda kalsitiriol uygulandı. Hücre hatlarına 24 ve 48 saat boyunca farklı dozlarda kalsitriol maruziyeti sonrası MTT sitotoksisite testi gerçekleştirildi. IC/50 (etkin doz) oranı belirlendi. Etkinliği belirlenen kalsitiriol dozları (100-1 000 ve 10 000 nM) ile 24 saat kalsitriol maruziyeti sonunda apopitoz ölçümleri ve Real Time PCR (RT-qPCR) analizi gerçekleştirildi. Kalsitriolün hücre içerisindeki; nükleer aktivitesi VDR, antiproliferatif etkisi Ki-67, anjiogenik etkisi VEGF ve EGFR m-RNA ekspresyon düzeylerinin ölçülmesiyle değerlendirildi. Sonuçlar kalsitriol uygulaması yapılmayan kontrol grupları ile karşılaştırıldı. Bulgular: 100 nM kalsitriol maruziyeti sonrası yapılan MTT testinde MCF-7'de canlılık %84±2,14; DU-145'te canlılık %87±3,12 ve CaCo-2'de canlılık %77,2±2,71 olarak belirlendi ($p<0.05$). 100 nM kalsitriol maruziyeti sonrası yapılan Annexin V testinde, apopitozis değerleri MCF-7'de %12,2±1,27; DU-145'te %4,8±0,13; CaCo-2'de %9,4±0,21 olarak belirlendi ($p<0.05$). 100 nM'lık kalsitriol uygulaması ile, 24 saat sonunda MCF-7, DU-145 ve CaCo-2 hücre hatlarında VDR ekspresyon düzeyinin, kontrol gruplarına göre arttığı, Ki-67, VEGF ve EGFR'nin ekspresyon düzeylerinin ise azaldığı saptandı. Sonuç: MCF-7, DU-145 ve CaCo-2 hücre hatlarında 100 nM kalsitriol uygulaması ile apopitozisde artış, anjiogenez ve proliferasyonda ise azalma saptanmıştır ($p<0.05$).

Bilim Kodu	: 1090
Anahtar Kelimeler	: Kanser, DU-145, MCF-7, Caco-2, Anjiyogenez, Vitamin D, VDR, Apopitozis
Sayfa Adedi	: 81
Danışman	: Doç. Dr. Canan YILMAZ

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF 1.25 DIHYDROXYVITAMIN D3 ON APOPTOSIS, ANGIOGENESIS AND VDR EXPRESSION IN DIFFERENT CANCER CELL LİNES

(M. Sc. Thesis)

Tuğba FATSA

GAZI UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

May 2022

ABSTRACT

Objective: Our aim is to investigate the antiproliferative, apoptotic and antiangiogenic effects of various calcitriol doses we applied on MCF-7, CaCo-2 and DU-145 cell lines. Materials and Methods: In our study, calcitriol was applied on the breast cancer cell line (MCF-7), prostate cancer cell line (DU-145) and colon cancer cell line (CaCo-2) under the same conditions, in the same medium and doses. MTT cytotoxicity test was performed after exposure to different doses of calcitriol for 24 and 48 hours. The IC/50 ratio was determined. Apoptosis measurements and Real Time PCR (RT-qPCR) analysis were performed after 24 hours of calcitriol exposure with calcitriol doses (100-1000 and 10000nM) whose effectiveness was determined. Calcitriol in the cell; Its nuclear activity was evaluated by measuring VDR, Ki-67, VEGF and EGFR m-RNA expression levels. The results were compared with the control groups. Results: In the MTT test performed after exposure to 100 nM calcitriol, the viability of MCF-7 was 84±2.14%; The viability was 87±3.12% in DU-145 and 77.2±2.71% in CaCo-2 ($p<0.05$). In the Annexin V test performed after 100nM calcitriol exposure, apoptosis values were 12% in MCF-7, 2±1.27; 4.8±0.13% in DU-145; It was determined as 9.4±0.21% in CaCo-2 ($p<0.05$). With 100nM calcitriol application, at the end of 24 hours VDR expression level in MCF-7, DU-145 and CaCo-2 cell lines increased compared to control groups, while expression levels of Ki-67, VEGF and EGFR were found to decrease. Conclusion: In MCF-7, DU-145 and CaCo-2 cell lines, 100nM calcitriol application increased apoptosis and decreased angiogenesis and proliferation ($p<0.05$).

Science Code : 1090

Key Words : Cancer, DU-145, MCF-7, Caco-2, Angiogenesis, Vitamin D, Apoptosis

Page Number : 81

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Canan YILMAZ

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve deneyimleri ile destek olan, yardımını esirgemeyen, tez danışmanım ve değerli hocam Gazi Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalın'da görev alan Doç. Dr. Canan YILMAZ'a şükran ve saygılarımı sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım boyunca bilgi, tecrübe ve desteğinden faydalandığım değerli hocam Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalın'da görev alan Dr. Öğretim Üyesi Tuğrul HOŞBUL'a şükran ve saygılarımı sunarım.

Çalışmalar yürütülürken harcadıkları emekten, paylaştıkları tecrübelerinden ve yararlandığım bilgi birikimlerinden dolayı değerli mesai arkadaşlarım Biyolog M. Pınar ELÇİ ve Biyolog Sema ÖREN'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Sağlık Bilimleri Enstitüsü ARGE Merkez Başkanlığı Laboratuvarlarında çalışmamın yapılmasına olanak sağlaması ve desteği nedeniyle değerli hocam ARGE Merkez Başkanı Prof. Dr. Ali ALBAY'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmanın gerçekleştirilmesi için kullanılan Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Sağlık Bilimleri Enstitüsü ARGE Merkez Başkanlığı laboratuvarlarının değerli yönetici ve tüm çalışanlarına teşekkür ederim.

Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2021-7107 proje numarası ile desteklenmiş olup desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince desteğini ve fedakarlığını her zaman yanımda hissettiğim canım annem Nursel ÇETİNKAYA ve babam Saim ÇETİNKAYA'ya, varlığıyla huzur bulduğum yaşam kaynağım canım oğlum Alp Giray FATSA'ya ve her daim desteklerinden dolayı eşim Osman FATSA'ya, sonsuz sevgi, saygı ve şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET iv

ABSTRACT v

TEŞEKKÜR vi

İÇİNDEKİLER viii

ÇİZELGELERİN LİSTESİ xi

ŞEKİLLERİN LİSTESİ xii

SİMGELER VE KISALTMALAR xiv

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 3

2.1. Vitamin D 3

2.2. Vitamin D Kaynakları 3

2.3. Vitamin D Sentezlenmesi 3

2.4. Vücutta Vitamin D Metabolizmasının Düzenlenmesi 4

2.5. Vitamin D Fonksiyonları 6

2.6. Vitamin D Reseptörü, Moleküler Etki Mekanizması ve Yolakları 7

2.7. Vitamin D Kanser İlişkisi 8

2.8. Kolon Meme ve Prostat Kanserlerinde Kalsitriol Etkisi 10

2.9. Kalsitiriolün Proliferasyon Üzerindeki Etki Mekanizması 11

2.10. Kalsitiriolün Apopitoz Üzerindeki Etki Mekanizması 12

2.11. Kalsitiriolün İnflamasyon Üzerindeki Etki Mekanizması 12

2.12. Kalsitiriolün Anjiyogenez Üzerindeki Etki Mekanizması 13

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER 15

3.1. Kullanılan Cihazlar 15

3.2. Kullanılan Kimyasal ve Sarf Malzemeleri 15

Sayfa

3.3. HUVEC Hücrelerin Eldesi ve Çoğaltılması 16

3.4. Caco-2 Hücrelerinin Eldesi ve Çoğaltılması 18

3.5. MCF-7 Hücrelerinin Eldesi ve Çoğaltılması 19

3.6. DU-145 Hücrelerinin Eldesi ve Çoğaltılması 20

3.7. Hücre Hattının Açılması 21

3.8. Hücrelerin Çoğaltılması 22

3.9. Hücrelerin Pasajlanması 22

3.10. Hücre Sayısının Belirlenmesi ve Canlılık Ölçümü 22

3.11. Hücrelerin Dondurulması 23

3.12. Kalsitiriol Reaktifin Hazırlanması 23

3.13. MTT Testi (3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide; Thiazolyl Blue) ile Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi 24

3.14. Flow Stometri ile Annexın Ölçümü 25

3.15. RT-qPCR İçin Hücrelerin Hazırlanması 27

3.16. RNA İzolasyonu, Ölçümü, cDNA Sentezi ve RT-qPCR Analizi 27

3.16.1. RNA izolasyonu 27

3.16.2. Total RNA izolasyonu kit protokolü 27

3.16.3. RNA saflığının belirlenmesi ve konsantrasyon hesaplanması 28

3.16.4. c-DNA sentezi 29

3.16.5. RT-qPCR analizi 30

3.16.6. RT-qPCR uygulamasında kullanılan primerler 32

3.16.7. RT-qPCR analiz yöntemi 32

3.16.8. Anjıogenez modeli 33

3.17. İstatiksel Analiz 33

4. BULGULAR 35

4.1. 1.25(OH)2D3 ‘ün MCF-7 Hücre Hattı Üzerindeki Etkisinin MTT Testi ile Belirlenmesi 35

Sayfa

4.2. MCF-7 Hücre Hattı İnvert Mikroskop Görüntüsü 36

4.3. Hücre Ölümü Değerlendirilmesi için Annexin V/ Propidium İyodür Apopitoz Testi MCF-7 Hücre Hattı Apopitoz Bulguları..... 37

4.4. MCF-7 Hücre Hattı RT-qPCR Gen Ekspresyonu Bulguları..... 39

4.5. 1.25(OH)2D3 ‘ün DU-145 Hücre Hattı Üzerindeki Etkisinin MTT Testi İle Belirlenmesi..... 42

4.6. DU-145 Hücre Hattı İnvert Mikroskop Görüntüsü..... 43

4.7. Hücre Ölümü Değerlendirilmesi için Annexin V/ Propidium İyodür Apopitoz Testi DU-145 Hücre Hattı Apopitoz Bulguları 44

4.8. DU-145 Hücre Hattı RT-qPCR Gen Ekspresyonu Bulguları 45

4.9. 1.25$(OH)_2D_3$ ‘ün Caco-2 Hücre Hattı Üzerindeki Etkisinin MTT Testi İle Belirlenmesi..... 48

4.10. CaCo-2 Hücre Hattı İnvert Mikroskop Görüntüsü..... 49

4.11. CaCo-2 Hücre Ölümü Değerlendirilmesi İçin Annexin V/Prodidium Iyodür Apopitoz Testi CaCo-2 Hücre Hattı Apopitoz Bulguları..... 50

4.12. CaCo-2 Hücre Hattı RT-qPCR Gen Ekspresyonu Bulguları 52

4.13. 1.25$(OH)_2D_3$ ‘ün HUVEC Hücre Hattı Üzerindeki Etkisinin MTT Testi ile Belirlenmesi..... 56

4.14. HUVEC Hücre Hattı İnvert Mikroskop Görüntüsü 57

4.15. Hücre Ölümü Değerlendirilmesi için Annexin V/ Propidium İyodür Apopitoz Testi HUVEC Hücre Hattı Apopitoz Bulguları..... 58

4.16. Anjiyogenez Bulguları 60

5. TARTIŞMA 63

6. SONUÇLAR..... 73

KAYNAKLAR 75

ÖZGEÇMİŞ 81

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 3.1. HUVEC hücre hattına ait künye bilgileri 17

Çizelge 3.2. Caco-2 hücre hattına ait künye bilgileri..... 18

Çizelge 3.3. MCF-7 hücre hattına ait künye bilgileri 19

Çizelge 3.4. DU-145 hücre hattına ait künye bilgileri 21

Çizelge 3.5. RNA saflık ve miktar tayin tablosu 29

Çizelge 3.6. cDNA sentez protokolü 29

Çizelge 3.7. cDNA sentez protokolü 29

Çizelge 3.8. cDNA sentez protokolü 30

Çizelge 3.9. RT-qPCR mix birleşimi..... 30

Çizelge 3.10. Kullanılan primer tablosu 32

Çizelge 4.1. MCF-7 RT-qPCR analizi sonuçları 40

Çizelge 4.2. DU-145 RT-qPCR analizi sonuçları..... 46

Çizelge 4.3. CaCo-2 RT-qPCR analizi sonuçları..... 54

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil **Sayfa**

Şekil 2.1. Vitamin D kaynakları, dönüşüm formları 4

Şekil 2.2. Vitamin D kalsiyum, fosfor ve PTH ilişkisi 5

Şekil 2.3. Vitamin D, FGF23 düzeyleri 6

Şekil 2.4. Hidroksilasyon sırasında kullanılan enzimler 7

Şekil 2.5. VDR yolağı 8

Şekil 2.6. Kalsitriolün proliferasyon, apopitoz ve anjiogenez etki yolakları 10

Şekil 3.1. HUVEC hücre hattı görüntüsü 17

Şekil 3.2. Caco-2 hücre hattı görüntüsü 19

Şekil 3.3. MCF-7 hücre hattı görüntüsü 20

Şekil 3.4. DU-145 hücre hattı görüntüsü 21

Şekil 3.5. Hücrelerin ekilmiş, MTT testinin uygulanmış olduğu 96'lık well plate görüntüsü 25

Şekil 3.6. Real-Time PCR'da gözlenen eşik değeri eğrileri 31

Şekil 3.7. Erime eğrisi analizi 31

Şekil 4.1. MCF-7 hücre hattı 24 saat kalsitriol uygulaması ile % hücre canlılığı 35

Şekil 4.2. MCF-7 hücre hattı 48 saat kalsitriol uygulaması ile % hücre canlılığı 36

Şekil 4.3. 24. saat sonunda MCF -7 hücre hattı invert mikroskop görüntüsü 37

Şekil 4.4. MCF-7 hücre hattı, yüzde (%) apopitoz düzeyleri 38

Şekil 4.5. MCF-7 Hücre Hattı 24 saat kalsitriol maruziyeti sonrası apopitoz düzeyleri 39

Şekil 4.6. MCF-7 Hücrelerinde 24 saat kalsitriol uygulaması sonrası VDR, Ki-67, VEGF, EGFR ekspresyon düzeyleri. 40

Şekil 4.7. DU-145 hücre hattı 24 saat kalsitriol uygulaması ile % hücre canlılığı 42

Şekil 4.8. DU-145 hücre hattı 48 saat kalsitriol uygulaması ile % hücre canlılığı 43

Şekil 4.9. 24. saat sonunda DU-145 hücre hattı invert mikroskop görüntüsü. 43

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.10. DU-145 hücre hattı, yüzde (%) apopitoz düzeyleri 44

Şekil 4.11. DU-145 hücre hattı 24 saat kalsitriol maruziyeti sonrası apopitoz düzeyleri 45

Şekil 4.12. DU-145 hücrelerinde 24 saat kalsitriol uygulaması sonrası VDR, Ki-67, VEGF, EGFR ekspresyon düzeyleri. 46

Şekil 4.13. CaCo-2 hücre hattı 24 saat kalsitriol uygulaması ile % hücre canlılığı..... 48

Şekil 4.14. CaCo-2 hücre hattı 48 saat kalsitriol uygulaması ile % hücre canlılığı..... 49

Şekil 4.15. 24. saat sonunda CaCo-2 hücre hattı invert mikroskop görüntüsü. 50

Şekil 4.16. CaCo-2 hücre hattı, yüzde (%) apopitoz düzeyleri..... 51

Şekil 4.17. CaCo-2 hücre hattı 24 saat kalsitriol maruziyeti sonrası apopitoz düzeyleri 52

Şekil 4.18. CaCo-2 hücrelerinde 24 saat kalsitriol uygulaması sonrası VDR, Ki-67, VEGF, EGFR ekspresyon düzeyleri. 53

Şekil 4.19. HUVEC hücre hattı 24 saat kalsitriol uygulaması ile % hücre canlılığı. 56

Şekil 4.20. HUVEC hücre hattı 48 saat kalsitriol uygulaması ile % hücre canlılığı. 57

Şekil 4.21. 24.saat sonunda HUVEC hücre hattı invert mikroskop görüntüsü..... 58

Şekil 4.22. HUVEC hücre hattı, yüzde (%) apopitoz düzeyleri 59

Şekil 4.23. HUVEC hücre hattı 24 saat kalsitriol maruziyeti sonrası apopitoz düzeyleri 60

Şekil 4.24. HUVEC hücre hattı üzerine uygulanmış kalsitriol dozları ile anjiogenez modeli 61

Şekil 4.25. HUVEC hücre hattı tüp formasyonu veri analizi 62

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	**Açıklamalar**
1α,25(OH)2D3	Kalsitriol
24,25(OH)$_2$D	24,25 Dihidroksi Vitamin D
25(OH)D$_2$	Ergokalsiferol
25(OH)D$_3$	Kolekalsiferol (Kalsidiol)
CT	Eşik Döngüsü
CYP24A1	24-Hidroksilaz
CYP27B1	1α-Hidroksilaz Enzimi
D2 ve D3	Kalsiol
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
nM	Nanomolar

Kısaltmalar	**Açıklamalar**
ATCC	American Type Culture Collection
cDNA	Komplementer DNA
COX	Siklooksijenaz
DMEM	Dulbecco’s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsülfoksit
dNTP	Deoksinükleosid Trifosfat
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
FBS	Fetal Bovine Serum
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase

HUVEC	Human Umblical Vein Endothelial Cells
mRNA	Mesajcı RNA
MTT	Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide
NF-KB	Nükleer Faktör Kabba B
PBS	Fosfat Buffered Saline
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PTH	Paratiroid Hormon
RNA	Ribonükleik Asit
RT-qPCR	Gerçek zamanlı Kantitatif Reverse Transkriptaz PCR
RXR	Retinoid X Reseptör
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VDR	Vitamin D Reseptörü
VDRE	Vitamin D Cevap Elemanı

1. GİRİŞ

İnsanların 17. yüzyılın ortalarında, kırsal tarım topluluklarından kentsel alanlara göç etmeye başlamasıyla, raşitizm küçük çocuklar için büyük bir sağlık sorunu olarak tanımlandı. Yaşam tarzı farklılığı, güneş ışığına maruz kalmayı sınırlayan çevresel değişiklikler getirdi. Raşitizm hastalığı olanlarda kafa büyümesi, uzun eklem kemikleri, göğüs kafesi, omurga ve uylukların eğriliği dahil olmak üzere genel kas zayıflığı ile birlikte iskelet deformiteleri gözlemlendi. Sanayi devrimi sırasında raşitizm insidansı arttı. Raşitizm, 19. yüzyılın başlarında Kuzey Avrupa'da ve ABD Birleşik Devletleri'nin sanayileşmiş kuzey bölgelerinde salgın olarak tanımlandı. 1822'de Sniadecki'nin, güneşe maruz kalmamanın raşitizm nedeni olabileceğine dair ilk gözlemi yayınladı. Polonya'da yaşayan çocukların kırsal kesimden hastalıksız olan çocuklara kıyasla raşitizm insidansının daha yüksek olduğunu buldu. 19. yüzyılın ortalarında, balık karaciğeri yağlarının raşitizmleri iyileştirdiği keşfedildi. Bu klinik gözlemler, birçok kişinin bir tür beslenme eksikliğinin raşitizme neden olduğuna inanmasına neden oldu. 1920'lere kadar D vitamini tanımlanmadı ve raşitizm ile bağlantı kurulamadı. D vitamini ve metabolitlerinin tutarlı ve doğru bir şekilde ölçülebilmesi için 50 yıl daha geçmesi gerekecekti [1].

D vitamini ilk defa; 20. yüzyıl başlarında biyokimyacı McCollum tarafından tanımlandı. McCollum tarafından gerçekleştirilmiş olan deneysel diyetlerdeki bitkilerin yetersizlikleri onu tesadüfi gözleme götürmüştür. 1918'de genç sıçanların, esas olarak tahıl tanelerinden oluşan ve orantısız kalsiyum-fosfor dengesi sağlayan diyetlerle beslendiklerinde, sıçanlarda kritik bir durum geliştiğini gözlemlemiştir. Kalsiyum-fosfor oranının zararlı etkisinin diyete eklenen az miktardaki morina karaciğeri yağı ile büyük ölçüde hafifletilebileceği belirtilmiştir [2].

D vitamininin keşfini ve ultraviyole ışığın neden olduğu deride D vitamini üretiminin tanımlanmasını, sağlıklı iskelet sisteminin ve fizyolojik düzeydeki eylemlerin açıklanmasına yönelik çalışmalar izledi. D vitaminin keşfi aynı zamanda raşitizmi ve onun yetişkinlerdeki karşılığı olan osteomalaziyi anlamaya yönelik çeşitli girişimlerle sonuçlandı [3].

1965'ten 1975'e kadar, D vitamini ile endokrin sistemin kalsiyum ve fosforu düzenleyen metabolizması netleşti. Bu sistemin nasıl işlediğini, bulunabilecek birçok ek düzenleyicinin neler olduğunu ve hedef genlerin transkripsiyonunu ve baskılanmasını düzenlemede nasıl

çalıştığını anlamak için birçok çalışma yapıldı. D vitamini eksikliği artan enfeksiyon, tip 1 ve tip 2 diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, obezite, astım, enflamatuar bağırsak hastalığı, kolon, meme, prostat ve yumurtalık kanseri ve bazı nörolojik hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. D vitamininin kanserin doğal seyrini etkilediği çeşitli mekanizmalar vardır. D vitamini apopitoz indüksiyonunda, hücre farklılaşmasının uyarılmasında, antienflamatuar ve antiproliferatif etkilerde, anjiyogenez, invazyon ve metastazın inhibisyonunda rol alır [4].

Özellikle, çok sayıda epidemiyolojik ve klinik kanıt, D vitamini eksikliği ile kanser gelişimi riski arasındaki yakın ilişkiyi ortaya çıkarmıştır. Örneğin, sadece serum kalsidiol konsantrasyonlarını yaklaşık 40-60 ng/ml'ye yükselterek dünya çapında her yıl 220.000'den fazla yeni meme ve kolorektal kanser vakasının önlenebileceği varsayılmıştır. Ayrıca, yüksek güneş ışığına maruz kalan enlemlerde kanser tümörlerinin insidansı daha düşüktür. D vitamininin bu koruyucu etkilerinin moleküler temelleri araştırılmaktadır [5].

Bu literatür bilgilerinin ışığında, çalışmamızda D vitamininin en aktif formu olan kalsitriolün in-vitro şartlarda, farklı kanser türleri üzerindeki antiproliferatif, apopitotik ve antianjiogenik aktivitesinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda prostat (DU-145), meme (MCF-7) ve kolon (CaCo-2) kanseri hücreleri üzerindeki kalsitriol maruziyetinin hücre canlılığına ve sitotoksisiteye olan etkisinin belirlenmesi için Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) testi, proliferatif etkinin kantitatif değerinin belirlenmesi için, kantitatif gerçek zamanlı (real-time) polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) ile Ki-67 mRNA ekspresyon ölçümü ve anjiogenez oluşumu üzerindeki etkisinin belirlenmesi için RT-PCR testi ile VEGF ve EGFR mRNA ekspresyon ölçümleri, hücre sağkalım oranının belirlenmesi için ise Annexin V / Propidium iyodür ile apopitoz testi yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Vitamin D

Pro hormon olarak vücutta güneş ışığının etkisi ile sentezlenen vitamin D aynı zamanda besin yolu ile de vücudumuza alınır. D vitamini kalsiyum/fosfor metabolizmasını düzenleyerek iskelet sistemine destek olur. Hücreler üzerinde de birçok enzimin aktivitesini düzenler. Güçlü bir steroid hormonunun öncüsü olan D vitamini, biyolojik olarak aktif bir form olan kalsitriol [$1.25(OH)_2D_3$] sentezlemek için karaciğer ve böbrekte iki aşamalı metabolizmaya uğrar. Aktif form olan kalsitriol, fizyolojik fonksiyonlarını etkinleştirmek için D vitamini reseptörüne (VDR) bağlanır. Aktif metabolit olarak hücre içerisine girdikten sonra VDR'ye duyarlı genlerin ekspresyonlarını düzenler. Hücrede oluşan proliferasyon, apopitoz, farklılaşma, anjiyogenez ve metastaz ile ilgili yolakların düzenlenmesinde görev alır [6].

2.2. Vitamin D Kaynakları

D vitamini, D_2 ergokalsiferol (bitkisel) ve D_3 kolekalsiferol (hayvansal) olmak üzere iki temel kaynaktan sağlanır. Maya, yosun ve mantarlar ergokalsiferol kaynağı olarak bilinmektedir. Sardalya, ringa balığı, ton balığı, uskumru, somon ve morina karaciğeri yağı, yumurta sarısı, karaciğer ise kolekalsiferol kaynaklarından bazılarıdır. Vitamin D güneş ışığı etkisi ile %95 oranında ciltte sentezlenirken %5 oranında besinlerle alınır. Güneş ışığı ile ciltte üretilen D vitamini vücutta daha aktif rol oynar. İnsan vücudunda 290-315 nm dalga boyundaki güneş ışığı etkisi ile epidermis tabakasında 7-dehidrokolestrol aktive olur ve pre-vitamin D_3, izomerize formu D_3 vitaminine dönüşür [7].

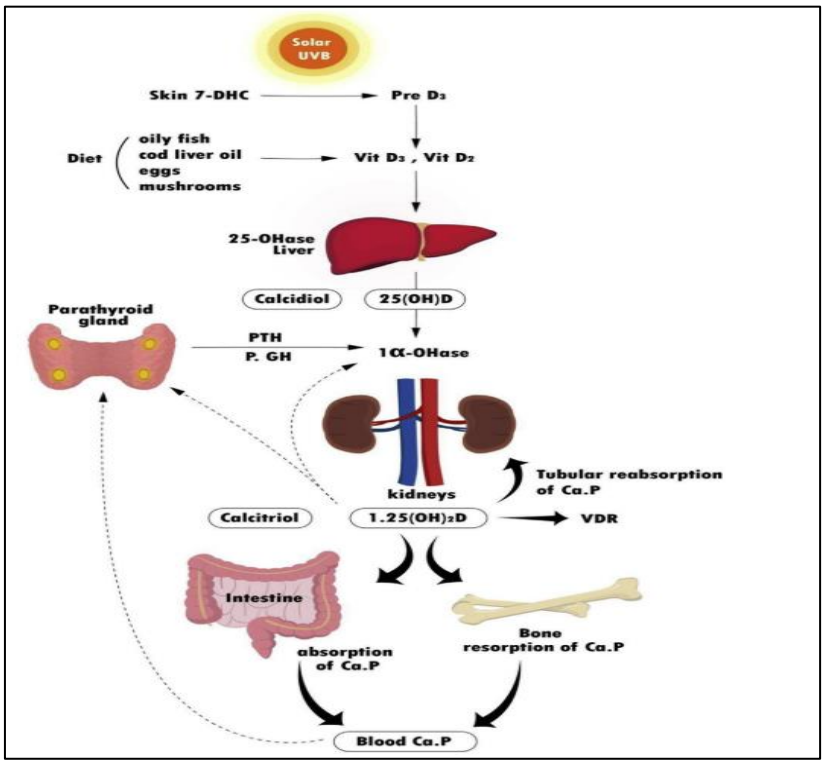
Hem D_2 vitamini hem de D_3 biyolojik olarak aktif değildir. Aktif formları için enzimatik dönüşüme ihtiyaçları vardır. İlk olarak vitamin D bağlayıcı proteinler aracılığı ile karaciğere taşınırlar. Bu süreç, paratiroid hormonu (PTH) tarafından yönetilir [7].

2.3. Vitamin D Sentezlenmesi

İnsan vücudunda D vitaminin ana sentez yeri derimizdir. Deride sentezlenen ya da besin ile alınan kolekalsiferol ya da ergokalsiferolden aktif metaboliti olan kalsitriol [$1.25(OH)_2D_3$]

iki dizi hidroksilasyon sonucunda oluşur. D vitamininin vücutta sentezlenen formu olan $1.25(OH)_2D_3$ organizmada hormon olarak etki gösterir [8].

İlk hidroksilasyon karaciğerde gerçekleşir. $25(OH)D_3$ (kalsidiol) oluşur. Bu form sonra 2. hidroksilasyon yeri olan böbrekte 1α-$25(OH)_2$ D_3 (kalsitriol)'e dönüşür. En aktif form budur. Hücre içerisine sadece aktif form girebilir. Hücre sitoplazmalarındaki reseptörlere bağlanarak etkisini gösterir. Kanda en aktif formun olmasına karşın yarı ömrü 3-4 saat gibi oldukça kısadır. Buna karşın, $25(OH)D_3$ ise yarı ömrü ortalama 3 haftadır ve yağlı dokuda da esas birikebilen form budur (Şekil 2.1) [9].

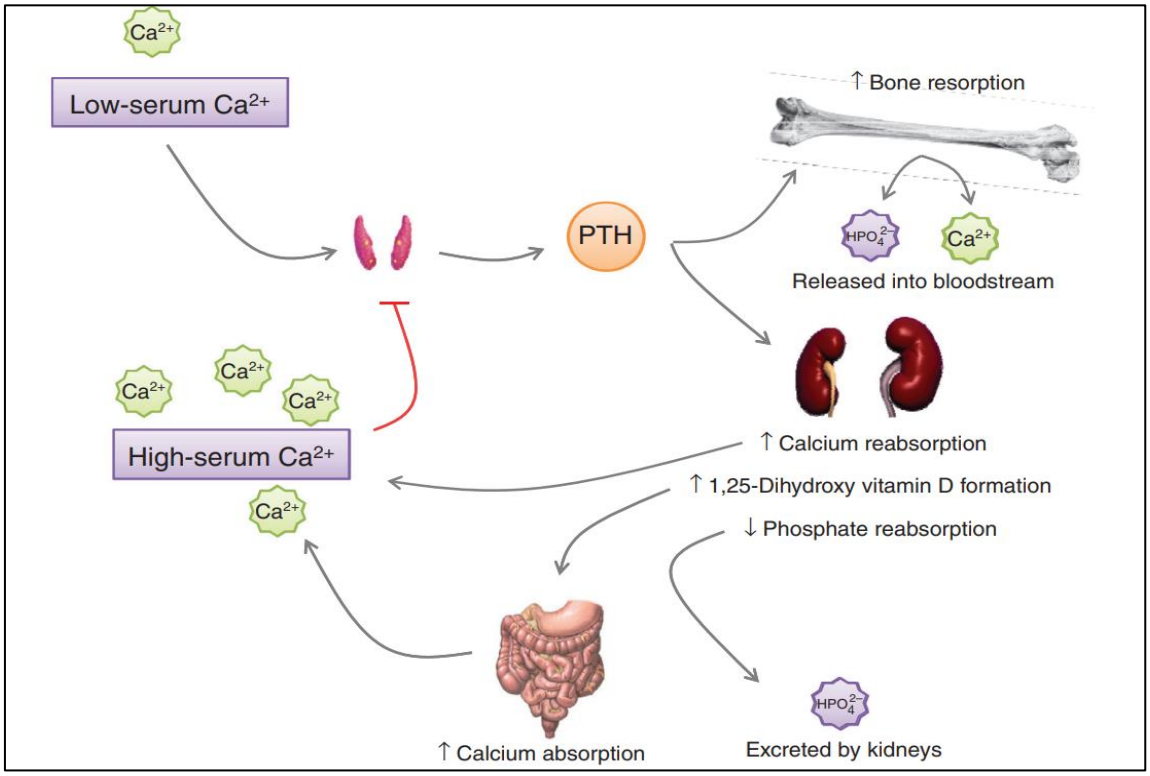


Şekil 2.1**.** Vitamin D kaynakları, dönüşüm formları [7]

2.4. Vücutta Vitamin D Metabolizmasının Düzenlenmesi

D vitamininin vücuttaki temel rolü kalsiyum ve fosfor homeostazının kontrolüdür. Vücutta D vitamini salınımı paratroid hormon (PTH) tarafından düzenlenir. Kandaki düşük kalsiyum düzeyi ile sentezi uyarılan PTH'ın 1α-hidroksilaz aktivitesini arttırması sonucunda kalsitriol oluşumu da artar. Kalsitriol kemik rezorpsiyonunu uyarır ve böbreklerden kalsiyum atılımını inhibe eder. Serum kalsiyum düzeyinin yüksek olması halinde PTH sekresyonu durur ve Vitamin D'nin 1,25 dihidroksi formu 24-25 dihidroksi şekline döner. $1\alpha,25(OH)_2D_3$ üretimi

paratiroid hormonu tarafından uyarılır ve kalsiyum miktarı arttığında azalır. Kalsitriol, kalsiyum homeostazının iyi bilinen bir endokrin düzenleyicisidir [10].



Şekil 2.2**.** Vitamin D kalsiyum, fosfor ve PTH ilişkisi [11]

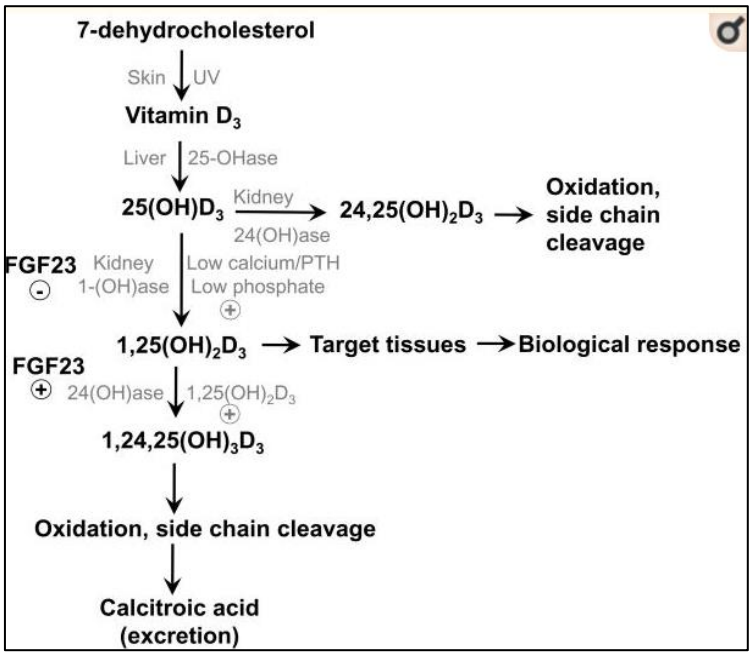
PTH ve Vitamin D, sıkı bir şekilde kontrol edilen bir geri besleme döngüsü oluşturur; PTH, böbrekte D vitamini sentezinin önemli bir uyarıcısıdır, D vitamini ise PTH salgılanması üzerinde negatif geribildirim uygular. PTH 'nin ana işlevi dolaşımdaki iyonize kalsiyumdur (Şekil 2.2). PTH vitamin D'de yakın zamanda keşfedilen FGF23 (fibroblast büyüme faktörü) ve klotho ile uyum içinde hareket eder, bu hormonlar ağırlıklı olarak fosfat metabolizmasında yer alır ve aynı zamanda bu geri besleme mekanizmasına katılır [11].

Kalsitriol, bağırsak ve kemikten fosforun emilimini artırır.PTH doğrudan fosforun kemikten rezorpsiyonunu artırır, proksimal tübülüsten emilimini azaltır. Dolaylı olarak kalsitriol üretimini uyarır. Bağırsaktaki fosfor emilimi $1\alpha,25(OH)_2D_3$ ile artar iken serum fosforundaki azalma $1\alpha,25(OH)_2D_3$ sentezini artırır [12].

FGF23 fosfatürik bir hormondur. Mineralize kemikte osteositler tarafından üretilir. FGF23 böbrekteki sodyum fosfor taşıyıcılarının ekspresyonunu azaltarak idrar ile fosfor atılımını

sağlar. İlaveten 1α-hidroksilaz enzimini inhibe eder, 24-hidroksilazı aktive eder. Böylece dolaşımdaki 1α,25$(OH)_2D_3$ düzeyi azalır. Klotho FGF23 için önemli bir koreseptördür [12].

FGF23 ekspresyonu vitamin D, fosfat ve PTH tarafından regüle edilir. Diyetteki fosforun artışı FGF23 ekspresyonunu uyarır, 1α-hidroksilazı inhibe ederek 1α,25$(OH)_2D_3$ düzeyini azaltır. Yüksek 1α,25$(OH)_2D_3$ doğrudan PTH sentezini inhibe eder, FGF23'ü uyarır (Şekil 2.3) [12].



Şekil 2.3**.** Vitamin D, FGF23 düzeyleri [13]

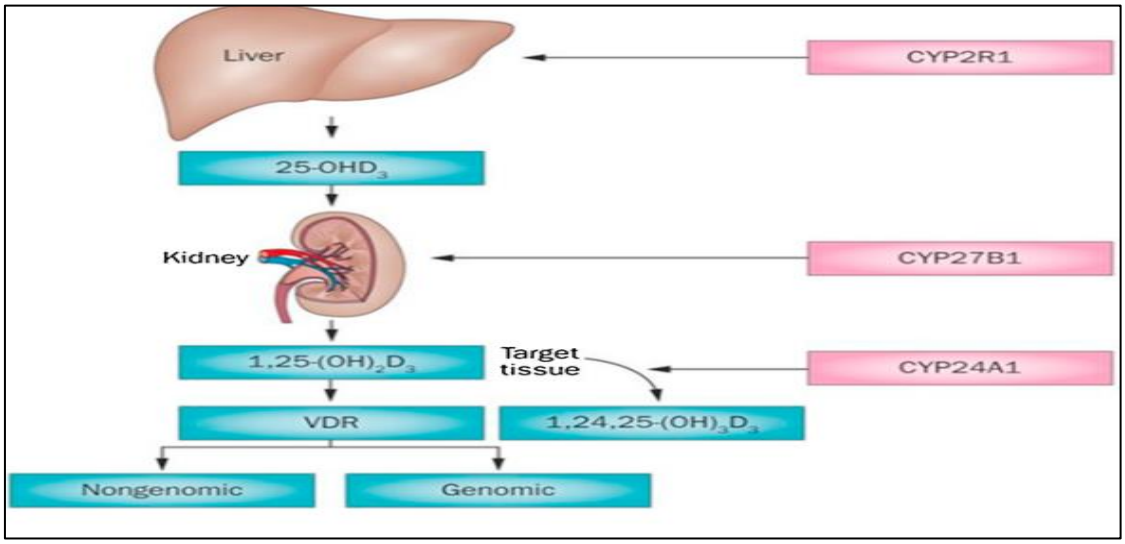
2.5. Vitamin D Fonksiyonları

Diyetten veya deriden gelen hem D_2 hem de D_3 vitamini (kalsiol) dolaşımda vitamin D bağlayıcı proteine (VDBP) bağlanır ve önce karaciğere ulaşır. Vitamin D karaciğerde 25 hidroksilaz (CYP2R1 ve CYP27A1) enzimleri ile metabolize olup kalsidiol 25$(OH)D_3$ formuna dönüşür. Kalsidiol formu serumda en yüksek düzeyde bulunan formudur. Bir kısmı yağ dokuda depolanırken bir kısım da safra yoluyla ince bağırsaklara iletilir. Vücutta gerekli görülen durumlarda ince bağırsaklardan tekrar geri emilir. [6,13]

Kalsidiol 25$(OH)D_3$, sonra ikinci hidroksilasyon yeri olan böbreklere taşınır. Burada 1α-hidroksilaz (CYP27B1) enzimi tarafından 1α,25-dihidroksivitamin D_3 (kalsitiriol)'e dönüştürülür. 1,25$(OH)_2D_3$, vitamin D'nin en aktif formu olarak kabul edilir. Kalsitiriol böylece VDBP aracılığı ile hedef doku ve organlara taşınır [6].

D vitamininin aktivitesi, CYP24A1 tarafından kodlanan ve daha sonra bir safra salgısı olan kalsitroik aside metabolize olan D vitamini katabolizmasından sorumlu olan katalitik enzim 24-hidroksilaz tarafından sonlandırılır. Bu enzimler sadece böbrekte değil, aynı zamanda meme dokusu da dahil olmak üzere diğer birçok dokuda aktiftir [14].

1α,25$(OH)_2D_3$ 24-hidroksilaz enzimini uyarır ve 24.pozisyonda hidroksilasyonla 24,25$(OH)_2D_3$ oluşur. 24- hidroksilaz aynı zamanda mitokondriyal bir enzim olan P450, böbrekte 1α,25$(OH)_2D_3$' ü, inaktif formu olan 24,25$(OH)_2D_3$ e dönüştürür (Şekil 2.4) [13].



Şekil 2.4**.** Hidroksilasyon sırasında kullanılan enzimler [15]

2.6. Vitamin D Reseptörü, Moleküler Etki Mekanizması ve Yolakları

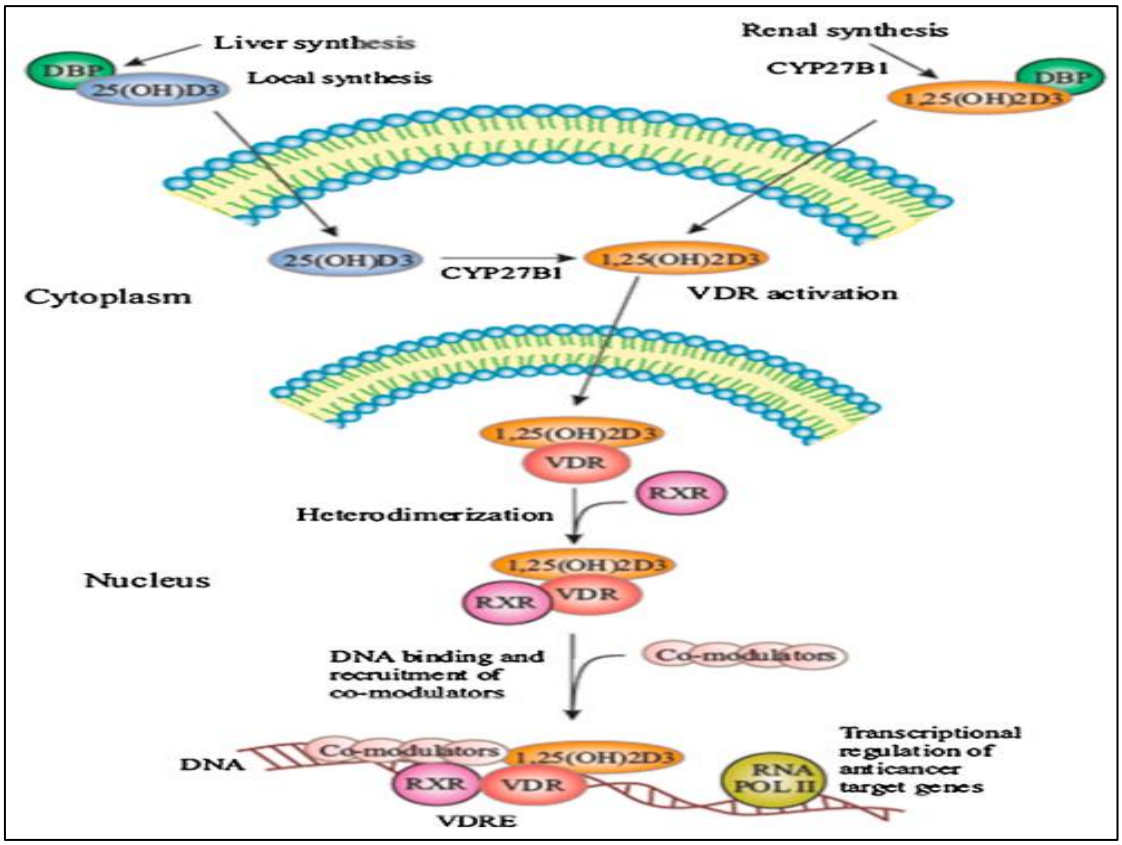
Vitamin D 'nin hücre üzerindeki etkisi aktif D vitamini olan kalsitriolün reseptör etkileşimi ile meydana gelmektedir. Bu etkileşim, steroid hormonların ve tiroid hormonlarının da kullandığı gibi direkt çekirdekte bulunan VDR üzerinden gen transkripsiyonunu düzenleyerek (genomik etki) ya da direkt hücre zarındaki VDR üzerinden (genomik olmayan etki) oluşmaktadır. Genomik olmayan etki çok kısa sürede gerçekleşirken, genomik etki için daha uzun süre gerekmektedir [13].

Hedef dokuya ulaşan kalsitriol hücre zarında bulunan VDR reseptörüne bağlanır. Genomik yoldan veya genomik olmayan yoldan olmak üzere iki şekilde hücrede transkripsiyonu düzenler. Genomik etki, VDR / RXR (retinoid X reseptör) /p62 (otofaji adaptör proteini) ile kompleks oluşturan kalsitriolün çekirdeğe taşınıp vitamin D yanıt elementi VDRE promotor

bölgesine bağlanarak; kalsiyum ve fosfor metabolizması desteği ile mRNA ekspresyonunu düzenlemesiyle gerçekleşir [16].

1α,25$(OH)_2D_3$'ün VDR'ye bağlanması ile birlikte retinoid X reseptör de (RXR) aktive olmaktadır. Bu aktivasyon işlemi ile RXR-VDR-ligand kompleksi şeklinde sitoplazmadan nükleusa geçmektedir. Nükleusa geçince bu kompleks gen transkripsiyonunu düzenlemektedir (Şekil 2.5) [17].

Genomik olmayan etkide hücre zarı üzerindeki VDR reseptörüne bağlanan kalsitriolün membranla ilişkili, hızlı yanıtlı steroid bağlayıcı protein (1,25D-MARRS) ile etkileşimi sonucu gerçekleşir. Hücre içersinde protein-protein etkileşimi yoluyla kalsiyum ve mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) ile de akut değişikliklere neden olur (Şekil 2.5) [16].



Şekil 2.5. VDR yolağı [15]

2.7. Vitamin D Kanser İlişkisi

Son zamanlarda, D vitamininin çeşitli hastalıkların seyrindeki ve kanser mortalitesindeki rolü epidemiyolojik ve preklinik çalışmalarda dikkat çekmiştir . Dolaşımdaki daha yüksek

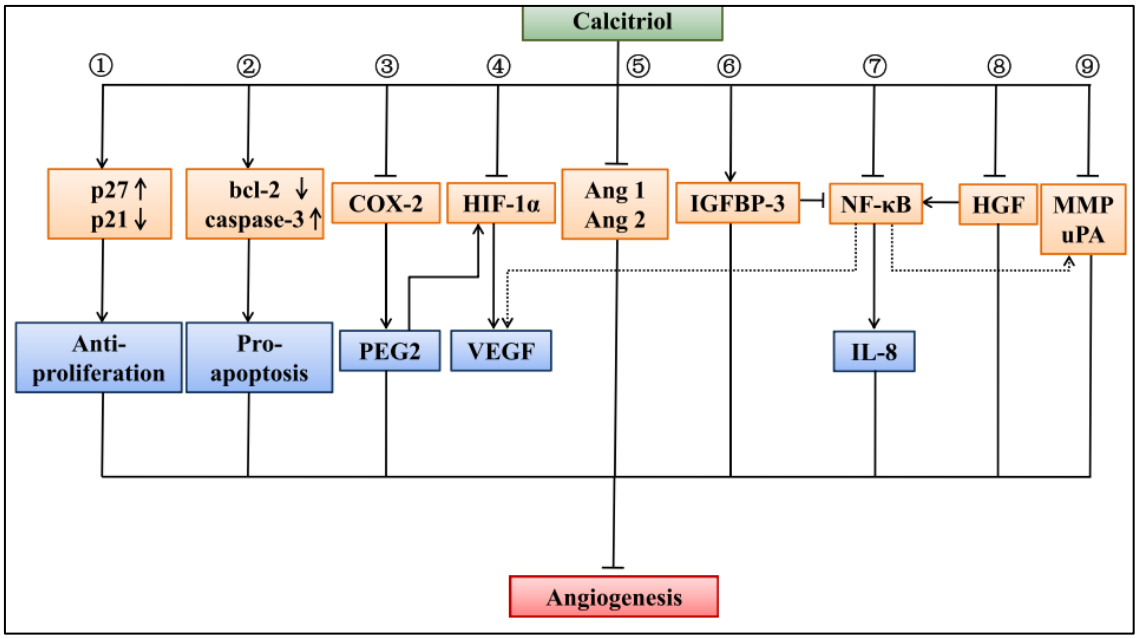
D vitamini seviyesi, çeşitli kanser türlerinin (mesane , meme, kolorektal, mide, yumurtalık, böbrek, hematolojik, akciğer, prostat, pankreas, karaciğer) ilerleme riskini azaltmakla güçlü bir şekilde ilişkilidir. D vitamininin tümör hücrelerinin çoğalmasını ve farklılaşmasını engelleyebildiği gösterilmiştir [15].

Doğal D vitamini ya da sentetik D vitamini bileşiklerinin kanser hücrelerinin apopitozunu indüklediği ve kanser tedavisinde umut verici bir rol oynadığı gösterilmiştir. Çok sayıda çalışma, özellikle meme ve kolorektal kanserde, serumdaki düşük D vitamini seviyeleri ile artan kanser riski arasında güçlü bir ilişki olduğunu öne sürmüştür. Ayrıca, yüksek düzeyde D vitamini alımı, daha düşük meme kanseri riski ile ilişkilendirilmiştir [15]. Yakın zamanlardaki çalışmalar 800-1000 IU/gün D vitamini veya 10 µg/gün kalsifediol ile D vitamini yetersizliğinin önlenmesi veya düzeltilmesinin güvenli olduğunu göstermiştir [18].

Normal bir hücrenin kanseröz olmasına neden olabilecek protein ürününe sahip olan onkogenler, hücrenin gerektiğinde çoğalması için gereken gen grubu olup hücreyi çoğalmaya zorlamaktadırlar. Öte yandan tümör baskılayıcı genler, onkogenleri dengeleyen ve hücrenin aşırı çoğalmasını engelleyen yine fizyolojik olarak bulunan gen gruplarıdır [19].

Kolon, meme ve prostat kanseri büyümesini sağlayan spesifik sinyal yollarının kalsitriol ile düzenlemesi incelendiğinde kalsitriolün birçok farklı kanser türünde, kanser hücreleri üzerinde geniş bir etki yelpazesine sahip olduğu görülmüştür [8].

D vitamini ve metabolitleri, tümör anjiyogenezini inhibe ederek, hücreler arası iletişimi güçlendirerek sıkı fiziksel temastan kaynaklanan proliferasyonun inhibisyonunu arttırarak birçok kanser türünün insidansını azaltır. D vitamini metabolitleri, kolon epitelyal keseciklerinde normal kalsiyum düzeyinin korunmasına yardımcı olur ve serumdaki yüksek 25(OH)D seviyeleri, kolonda kanserli olmayan ancak yüksek riskli epitelyal keseciklerin belirgin şekilde azalmış proliferasyonu ile ilişkilidir. $1\alpha,25(OH)_2D_3$ meme kanseri hücrelerinin mitozunu inhibe eder ve apopitozu arttırır [20].



Şekil 2.6. Kalsitriolün proliferasyon, apopitoz ve anjiogenez etki yolakları [21]

2.8. Kolon Meme ve Prostat Kanserlerinde Kalsitriol Etkisi

Kalsitiriol insan genomunun %3-%5 kadarını doğrudan ya da dolaylı olarak etkileyebilmektedir. Bu durum kanser de dahil olmak üzere birçok hastalığın seyrinde rol oynayabilmektedir. Kolon, meme ve prostat kanseri büyümesini sağlayan spesifik sinyal yollarının kalsitriol ile düzenlemesi sağlanabilmektedir. Kalsitriol birçok farklı kanser türünde kanser hücreleri üzerinde geniş bir etki yelpazesine sahiptir [8].

CYP24A1 (24-hidroksilaz olarak da bilinir); hem 1α,25$(OH)_2D_3$ hem de 25$(OH)D_3$ (kalsidiol)'ün bozulmasını katalize eden enzim olarak bilinmektedir. Aynı anda kendi inaktivasyonunu indüklediğinden, hormonun aktivitesi kendi kendini düzenler.

CYP24A1'in aşırı ekspresyonu, meme kanseri de dahil olmak üzere çeşitli insan kanseri türlerinde kötü prognoz ile ilişkilidir. CYP27B1 böbrekte D vitamini aktivasyonundaki hız sınırlayıcı adımı katalize eder. 1α,25$(OH)_2D_3$'ün hormonal olarak aktif formunu oluşturmak için 25$(OH)D_3$ hidroksilasyonunu katalize eder. CYP27B1'in ekspresyonu, aktif D vitamini ile antitümör etkileri arasındaki ilişki de merkezi bir mekanizma olarak kabul edilebilir [14].

D vitamini yanıtı ayrıca sitokrom P450 enzimleri CYP27B1 ve CYP24A1'in nispi aktivitesine de bağlıdır, çünkü 1α-hidroksilasyondaki azalma veya artan 24-hidroksilasyon aktivitesi, diyet ile alınan vitamin D'nin antikanser etki gösterme yeteneğini azaltır [8].

CYP27B1 ve CYP24A1'in her ikisi de iskelet homeostazında yer alan üç anahtar kalsiotropik hormon: kalsitriol, paratiroid hormonu (PTH) ve fibroblast büyüme faktörü 23 (FGF23) tarafından düzenlenir [8].

2.9. Kalsitiriolün Proliferasyon Üzerindeki Etki Mekanizması

Kalsitiriol, kanserli hücrelerde hücre döngüsü inhibitörleri olan p21 ve p27 ekspresyon düzeylerinde artışa sebep olarak, hücre döngüsünü G1 fazında istenmeyen ilerlemesini önler (Şekil 2.6) [22].

P21'in hücre büyümesinin durdurulmasında, P27'nin ise anti-mitojenik sinyallere karşı oluşan cevapta büyümenin düzenlenmesinde önemli bir molekül olduğu bilinmektedir [23].

Hücre siklusu siklinler (CYC), siklin bağımlı kinazlar (CDK) ve siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CDI) tarafından kontrol edilir. Bu proteinlerin düzeyleri hücre siklusunun farklı fazlarında farklılıklar gösterir. Retinoblastoma protein (Rb) miktarı hücrenin S fazına girip girmeyeceğini belirler [24].

D vitamini sinyali, epidermal farklılaşmayı ve hücre proliferasyonunu kontrol eden bir transkripsiyon faktörü olan c-myc tarafından düzenlenen genlerin ekspresyonunu baskılayabilir. c-Myc aktivitesi sıklıkla kanserde yükselir [25].

D vitamininin hücre döngüsü düzenleyicileri üzerindeki en iyi tanımlanmış doğrudan etkisi, D vitamininin G1/G0 hücre döngüsü durmasındaki rolüdür. G1/G0 hücre döngüsü durmasına ağırlıklı olarak siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CDKI)'ler, p21 ve p27'nin yukarı regülasyonu aracılık eder. Ayrıca, pRB ekspresyonunun indüklenmesi ve c-Myc ekspresyonunun inhibisyonu gibi diğer G1/G0 hücre döngüsü durdurma mekanizmalarına öncülük eder [22].

Vitamin D birçok farklı protoonkogen ve tümör süpresör geni düzenlemektedir. Bunların içinde en önemlisi büyüme faktörü hedef yolağında yer alan transforme edici büyüme faktör beta (tumour growth factor-beta: TGF-β)'nın epitelyal hücre proliferasyonu üzerindeki inhibe edici etkisi olarak bilinmektedir [22].

2.10. Kalsitiriolün Apopitoz Üzerindeki Etki Mekanizması

Vitamin D'nin kanserli hücre hatlarının apopitozisini aşağıdaki yolaklar ile inhibe ettiği gözlenmiştir.

Pro-apopitotik protein olan BAX ekspresyonu artarken,anti-apopitotik protein olan BCL2 ekspresyonunda azalış görülmektedir (Şekil 2.6) [26].

P53 hücre döngüsünü düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. Birçok organizmada kanserin baskılanmasında rolü olan çok önemli bir proteindir. Hücre büyümesinin durdurulması, programlanmış hücre ölümü, hücre farklılaşması ve DNA tamir mekanizmasının başlatılmasında da rol alır. Kanserli hücrelerde p53 aktivitesinin bozulduğu ekspresyon miktarının azaldığı vurgulanmıştır. Kalsitriolün p53 ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir [24].

2.11. Kalsitiriolün İnflamasyon Üzerindeki Etki Mekanizması

Kronik inflamasyon olan bölgelerde sitokin kaynaklı Siklooksijenaz-2 (COX–2) indüksiyonu sayesinde prostaglandinler (PGE) artar. Bu durumun kronik inflamasyonda kanser riskinin arttırmasının nedenlerinden birisi olduğunu düşündürtmektedir [27].

Kalsitiriol, PGE ve COX-2 ekspresyonlarında inhibisyona neden olur [28].

Siklooksijenazların COX-1 ve COX-2 olmak üzere iki farklı izo-enzimi bulunur. COX-2 indüklenebilir formdur. Mitojenik uyaranlar, büyüme faktörleri, sitokinler ve karsinojenler tarafından indüklenebilir. Birçok malignitede COX-2 overekspresyonu gösterilmiştir. COX-2, hücre proliferasyonunu, apopitoza direnci, anjiogenezi ve immünsupresyonu artırarak tümör oluşumuna katkıda bulunur [29].

COX, araşidonik asitten prostaglandin sentezini gerçekleştirir. COX enziminin karsinom gelişiminin başlangıcında veya ilerlemesinde rol oynadığı düşünülmektedir.

NF-KB (Nükleer Faktör Kappa B) proteini inflamatuar işlevlere katılır ve hücre döngüsü ile sağ kalımını düzenler. Hücre büyümesi, gelişmesi ve diferansiasyonundan sorumludur [30].

1,25$(OH)_2D_3$, VDR etkisi ile NF-KB aktivasyonunu inhibe ettiğini yeni bir mekanizma ile tanımlar. Bu nedenle, 1α,25$(OH)_2D_3$'ün, NF-KB aktivasyonunu engellenmesinde büyük bir biyolojik öenmi vardır [31].

2.12. Kalsitiriolün Anjiyogenez Üzerindeki Etki Mekanizması

Yara iyileşmesi ya da kanser gibi durumlarda, oksijen, karbondioksit ya da besin taşınmasını gerçekleştirmek için mevcut kan damarlarından yeni kan damarlarının gelişmesi demek olan anjiyogenez, vücutta doğal olarak ortaya çıkan bir süreçtir [32].

İnflamatuvar hastalıklarda, çeşitli kanserlerde (meme, prostat, kolon, akciğer, nöroblastoma) anjiyogenez patolojik olarak ortaya çıkmaktadır. Tümörün büyümesinde en önemli faktörlerden birisi kanlanmasıdır. Tümör hücreleri sentezledikleri vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) gibi faktörlerle kendi beslenmelerini kolaylaştırır [27].

Tümör anjiyogenezi, VEGF ve VEGF reseptör (VEGFR) eksenlerini, özellikle VEGF-A/VEGFR2 eksenini aşırı eksprese eder, anjiyogenezde çok önemli bir rol oynar. Endotel hücreleri, VEGF ve fibroblast büyüme faktörü (FGF) gibi büyüme faktörlerinin etkisiyle çoğalır [32].

1α,25$(OH)_2D_3$, VEGF aktivasyonunu baskılayarak hücre proliferasyonunu inhibe eder [33].

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamız *in vitro* koşullarda yapılmış deneysel bir çalışma olup, deneyler Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Sağlık Bilimleri Enstitüsü ARGE Merkez Başkanlığı Laboratuvarları ve Gazi Üniversitesi Tıbbi Biyokimya AD. Laboratuvarları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.1. Kullanılan Cihazlar

- +4 °C Buzdolabı (Nüve, Türkiye)
- -20 °C Buzdolabı (Electrolüx MF280, İsveç)
- -80 °C Buzdolabı (Sanyo, Japonya)
- İnvert Mikroskop (Leica DMIRB, Japonya)
- Biyogüvenlik Kabini (Seviye II) (Nüve MN120, Türkiye)
- Su Banyosu (Chicago Surgical and Electrical 1170)
- Santrifüj (Nüve NF815, Türkiye)
- CO_2 'li inkübatör (Sanyo MCO-18AIC, Japonya)
- Vorteks (Nüve NM10, Türkiye)
- Otomatik Pipetler (Eppendorf, Almanya)
- Hassas Terazi (Ohaus Adventurer Pro)
- Kuru Buz Makinası (AF 80/ Scatsman, Almanya)
- Eliza Plak Okuyucu (Biotek Synergy HT, ABD)
- RT-PCR Cihazı (ABI 7500, ABD)
- Thermal Cycler (BioRad T100, ABD)
- Santrifüj (Sigma 2-16 KL, Almanya)
- Serolojik Pipet Tabancası (Biologix, Çin)

3.2. Kullanılan Kimyasal ve Sarf Malzemeleri

- Dulbecco’s Modified Eagle Medium (DMEM) (Capricorn Scientific, Almanya)
- RPMI (Capricorn Scientific, Almanya)
- Fetal bovine serum (FBS) (Capricorn Scientific, FBS-HI11B, Almanya)
- L-Glutamine (Capricorn Scientific, GLN-B, Almanya)
- Penicilin (Capricorn Scientific, PS-B, Almanya)

- Phosphate Buffered Saline (PBS) (Sigma, Almanya)
- Tripan mavi solüsyonu (Sigma, Almanya)
- Tripsin (Capricorn Scientific, Almanya)
- Dimetilsülfoksit (DMSO) (Applichem)
- Hücre sayım lamı (Neubauer Haemocytometry)
- 6 ve 12 kuyulu well plate (Costar, ABD)
- 96 kuyulu well plate (Costar, ABD)
- 75 cm^2 hücre kültür kapları (Thermo Scientific, ABD)
- 25 cm^2 hücre kültür kapları (Thermo Scientific, ABD)
- Dondurma tüpleri (Croyogenic Vial Corning)
- 15 ml santrifüj tüpü kapaklı (Costar, ABD)
- 50 ml santrifüj tüpü kapaklı (Costar, ABD)
- 1,5 ml Eppendorf tüp kapaklı (Costar, ABD)
- Serolojik pipetler (5ml), tek kullanımlık (Greiner Cellstar, ABD)
- Serolojik pipetler (10ml), tek kullanımlık (Greiner Cellstar, ABD)
- Pipet ucu 1-200 µL (Ependorf, Almanya)
- Pipet ucu 100-1000 µL (Ependorf, Almanya)
- Şırınga filtreleri (0.22 µm) (Sartorius Minisart)
- Thiazoly Blue Tetrazolium Bromide (MTT) (Goldbıo St. Louis MO, ABD)
- Lam (Isotherm, Türkiye)
- Lamel (Isotherm, Türkiye)
- RNA izolasyon kiti (ELK Bıotechnology RNA, Çin)
- cDNA sentez kiti (ELK bıotechnology EntiLink™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit, Çin)
- Sybr Green Master Mix (ELK Bıotechnology, Çin)
- µ-Plate Angiogenesis 96 Well (Ibıdi, Almanya)
- Matrigel (Corning, ABD)
- Primerler

3.3. HUVEC Hücrelerin Eldesi ve Çoğaltılması

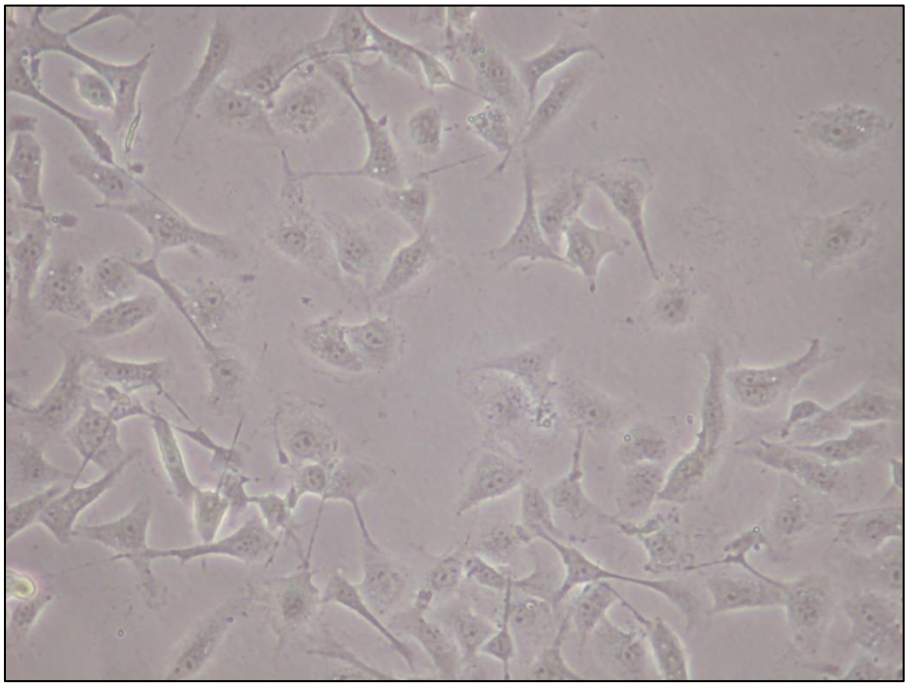
Çalışmamızda American Type Culture Collection (ATCC) standart Human Umblical Vein Endothelial Cells (HUVEC) hücre hattı kullanıldı. Endotel hücreleri tüm kan damarlarının iç lümenini döşeyen tek katlı yassı epitel hücrelerinden oluşan bir tabaka olması sebebiyle

kan ile damar duvarı arasındaki ana bariyeri meydana getirir. HUVEC de kök hücre yapısında olup, damar endotel hücrelerinin temel özelliklerini taşır ve bu nedenle anjiyogenez ile ilgili çalışmalarda örnek hücre modelidir (Çizelge 3.1).

Hücreler Dulbecco's Modified Eagle Medium (Capricorn Scientific, Germany) besiyeri içerisinde %10 fetal bovine serum (FBS) (Capricorn Scientific, FBS-HI11B, Germany), %1 L-glutamin (Capricorn Scientific, GLN-B, Germany) ve %1 penisilin-streptomisin (Capricorn Scientific, PS-B, Germany) eklenerek çoğaltıldı. Hücreler bu besi ortamını içeren küçük (25T cm^2) ve büyük (75T cm^2)'lik flasklarda, iç ortamı %5 CO_2, %95 hava karışımı ve nem içeren 37ºC olan inkübatör içinde tutularak ve haftada 3 kez rutin pasaj yapılarak üretildi. Hücre pasajları için laminar akım kabini, hücre kültürleri incelemeleri için inverted mikroskop, stokların depolanması için -80ºC derin dondurucu kullanıldı. (Şekil 3.1)

Çizelge 3.1. HUVEC hücre hattına ait künye bilgileri

ATTC®kodu	CRL-1730™
Adı	HUVEC
Büyüme özelliği	Adherent (Yapışarak Çoğalır)
Organizma	Human (İnsan)
Morfolojisi	Endotelial (Endotelyal)
Doku	Umbilical vein (Damar endoteli)
Hücre tipi	Endotelial Cell (Endotel Hücre)



Şekil 3.1. HUVEC hücre hattı görüntüsü

3.4. Caco-2 Hücrelerinin Eldesi ve Çoğaltılması

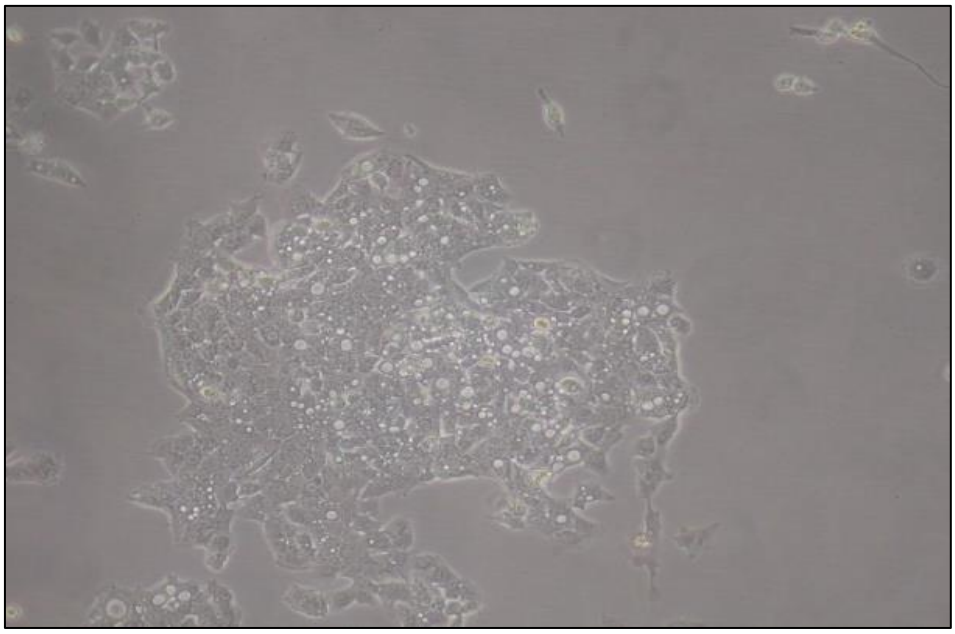
İnsan bağırsak adenokarsinomu hücre dizisi olan Caco-2; antioksidan, antiproliferasyon, antiinflamatuar ve apopitotik aktiviteleri incelemek için uygulanan ilaçların bağırsak epiteli boyunca emilim ve taşıma mekanizmalarını gözlemleyebilmek için kullanılmıştır. Caco-2 hücreleri, ince bağırsak hücrelerinin morfolojik ve fonksiyonel özelliklerini temsil eden epitel hücreleridir (Çizelge 3.2). İlaçların ve fonksiyonel gıda ekstraktların bağırsak lümeninden sistemik dolaşıma geçişini düzenleyen mekanizmanın anlaşılması için kullanılmaktadır [34].

Büyüme, farklılaşma bağırsak fizyolojisini inceleme amaçlı kullanılan hücre hattı FBS (Fetal bovine serum), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), L-glutamin, Penicillin - Streptomycin içeren besiyerleri kullanılarak üretilir [35].

Çalışmamızda ATCC, Caco-2 hücre hattı kullanılmıştır. İnsan kolon adenokarsinomundan elde edinilen hücre, tek katmanlı olarak ürer ve flask zemininin yüzeyine yapışarak çoğalır (Çizelge 3.2). Hücreler DMEM (Capricorn Scientific, Germany) besiyeri içerisinde %10 FBS (Capricorn Scientific, FBS-HI11B, Germany), %1 L-glutamin (Capricorn Scientific, GLN-B, Germany) ve %1 penisilin-streptomisin (Capricorn Scientific, PS-B, Germany) eklenerek çoğaltıldı. %5 CO_2 içeren 37ºC'lik inkübatörlerde ürettiğimiz hücreler 3 günde bir besiyeri değiştirilerek %80-90 doluluk oranına ulaştı (Şekil 3.2).

Çizelge 3.2. Caco-2 hücre hattına ait künye bilgileri

ATTC®kodu	HTB-37™
Adı	CACO-2
Büyüme özelliği	Adherent (Yapışarak çoğalır.)
Organizma	Human (İnsan)
Morfolojisi	Epithelial-like (Epitel)
Doku	Large intestine; Colon (Kolon)
Hücre tipi	Epithelial cell (Epitel)



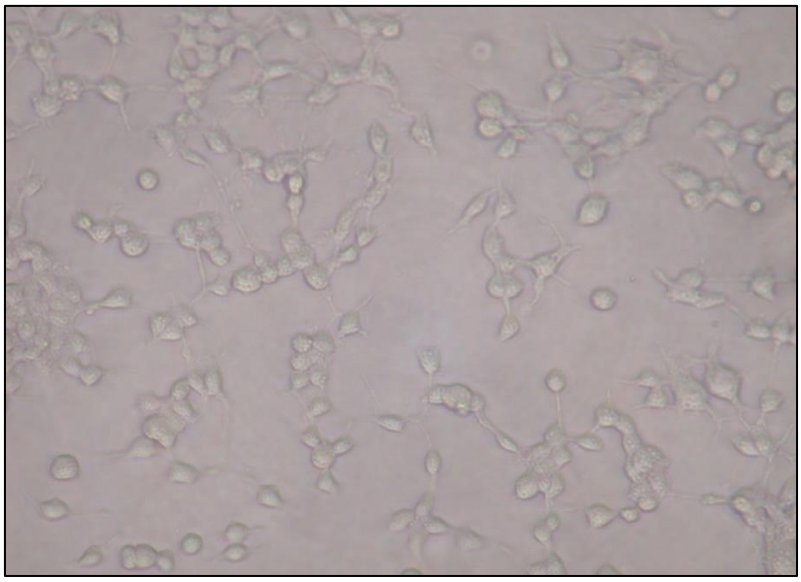
Şekil 3.2. Caco-2 hücre hattı görüntüsü

3.5. MCF-7 Hücrelerinin Eldesi ve Çoğaltılması

Çalışmamızda ATCC, MCF-7 hücre hattı kullanılmıştır. İnsan meme adenokarsinomundan elde edinilen hücreler üretilerek flask zemininin yüzeyine yapışarak çoğaldıkları mikroskop altında gözlendi (Çizelge 3.3). %90 RPMI 1640 (Capricorn Scientific, Germany) içinde, %10 FBS (Capricorn Scientific, FBS-HI11B, Germany), %1-2 L-glutamin (Capricorn Scientific, GLN-B, Germany) ve %1 penisilin-streptomisin (Capricorn Scientific, PS-B, Germany) kullanılarak hazırlanan besiyerinde ve %5 CO_2 içeren 37ºC lik inkübatörlerde ürettiğimiz hücreler 3 günde bir besiyerleri değiştirilerek %80-90 doluluk oranına ulaştı (Şekil 3.3).

Çizelge 3.3. MCF-7 hücre hattına ait künye bilgileri

ATTC®kodu	HTB-22™
Adı	MCF-7
Büyüme özelliği	Adherent (Yapışarak çoğalır)
Organizma	Human (İnsan)
Morfolojisi	Epithelial (Epitel)
Doku	Breast; Mammary gland (Meme Bezi)
Hücre tipi	Epithelial cell (Epitel)



Şekil 3.3. MCF-7 hücre hattı görüntüsü

3.6. DU-145 Hücrelerinin Eldesi ve Çoğaltılması

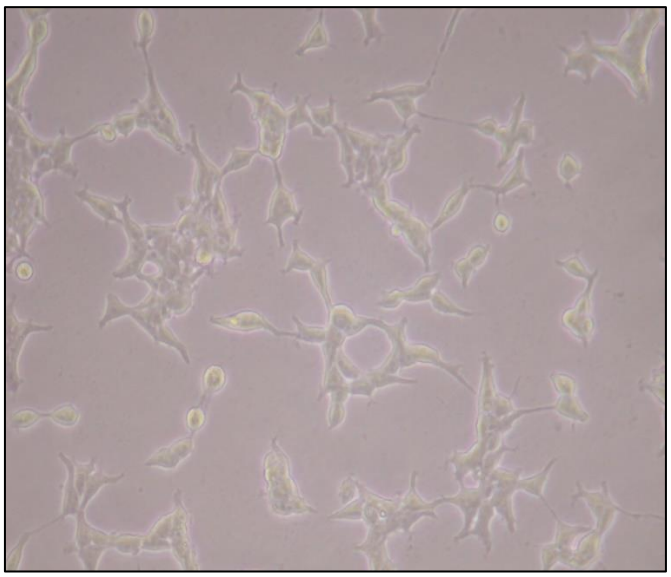
DU-145 prostat kanserinin fizyolojisini araştırmak için kullanılan hücre hatlarından biridir. Bu hücre dizileri sınırsız büyüme, yüksek verimli taramaya uygunluk ve in-vivo test için ksenograft tümör oluşumu gösterdiğinden, tedaviye yanıt ve direncin aşamalarını belirlemede önemli kaynaklardır. Tek katmanlı kültürler halinde üretilirler [36].

RPMI 1640 besiyeri içerisinde, % 10 FBS, %1 L-glutamin, 1% penicillin ve %5 CO_2 , 37 °C inkübatör içerisinde üretilirler [37].

Çalışmamızda ATCC, DU-145 hücre hattı kullanıldı. İnsan prostat adenokarsinomundan elde edinilen hücre, tek katmanlı olarak ve flask zemininin yüzeyine yapışarak çoğaltıldı (Çizelge 3.4). %90 RPMI 1640 (Capricorn Scientific, Germany) içinde, %10 FBS (Capricorn Scientific, FBS-HI11B, Germany), %1-2 L-glutamin (Capricorn Scientific, GLN-B, Germany) ve %1 penisilin-streptomisin (Capricorn Scientific, PS-B, Germany) kullanılarak hazırlanan besiyerinde ve %5 CO_2 içeren 37ºC lik inkübatörlerde ürettiğimiz hücreler 3 günde bir besiyerleri değiştirilerek %80-90 doluluk oranına ulaştı (Şekil 3.4).

Çizelge 3.4. DU-145 hücre hattına ait künye bilgileri

ATTC®kodu	HTB-81™
Adı	DU-145
Büyüme özelliği	Adherent (Yapışarak çoğalan)
Organizma	Human (İnsan)
Morfolojisi	Epithelial-like (Epitel)
Doku	Prostate (Prostat)
Hücre tipi	Epithelial cell (Epitel)



Şekil 3.4. DU-145 hücre hattı görüntüsü

3.7. Hücre Hattının Açılması

Hücreler üretici firma tarafından soğuk zincir prosedürüne uygun olarak laboratuvarımıza ulaştırıldı ve çözdürme işlemi uygulandı. -196°C sıcaklığındaki sıvı azot tankında kriyo tüpler içerisinde dondurulmuş şekilde saklanan hücreler ilk olarak çözünmesi sağlanana dek 37°C'lik su banyosunda tutuldu. Çözünen hücre süspansiyonu 15 ml'lik falkon tüpüne alınarak üzerine 5-6 ml %10 FBS besiyeri ilave edilerek 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra hücreyi dondurmak için kullanılan ve hücrede antifriz görevi üstlenen Dimetil Sülfoksit (DMSO)'nun etkisinden kurtarmak amacıyla tekrar 5-6 ml %10 FBS içeren besiyeri ile 1000 rpm'de 5 dk. daha santrifüj edildi. Pellete az miktar %10 FBS içeren besiyeri eklenerek toplam 7 ml besiyeri içerisinde, 25 cm^2'lik flasklara ekim yapıldı.

Üzerine hücre adı, açılma tarihi ve pasaj sayısı yazılan flasklar 37°C, %5 CO_2 içeren etüvlerde inkübe edildi. Hücrelerin yoğunluğu ve yüzeye tutunmaları invert mikroskop ile takip edildi. Hücreler %80-90 yoğunluğa ulaştıklarında pasajlama işlemi yapıldı.

Çalışmamızda kullandığımız tüm hücre hatları adherent (zemine yapışarak çoğalan) kültür özelliğinde olduğu için hücre kültür kapları yatay bir şekilde konumlandırılarak inkübe edildi.

3.8. Hücrelerin Çoğaltılması

Hücreler, 25 cm^2'lik flasklarda 7ml, 75 cm^2'lik flasklarda ise 14 ml, %10 FBS içeren DMEM besiyeri içerisinde %80-90 yoğunluğa geldiklerinde pasajlanmak suretiyle üretildi.

3.9. Hücrelerin Pasajlanması

Çoğalan hücreler %80-90 doluluk seviyesine ulaştıklarında pasajlanarak, hücrelere alan sağlandı. Hücrelerin içerisinde bulunduğu besiyeri pipet ile çekilerek uzaklaştırıldı. Hücrelerin üzerine ilk olarak %0,05'lik tripsinden, 25 cm^2'lik flasklara 1-2 ml, 75 cm^2'lik flasklara 3-5 ml eklenerek, 37°C'lik %5'lik CO_2'li etüvde 2-3 dakika bekletildi ve kontrollü olarak zeminden ayrılmaları sağladı. Yüzeyden ayrılan hücrelere tripsinle aynı miktarda FBS ilave ederek tripsinin etkisi bloke edildi ve santrifüj tüpüne toplanan hücreler 1000 rpm'de 5 dk. santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Bir miktar besiyeri ile süspanse edilen hücreler besiyeri içeren flasklara transfer edilerek 37°C'lik %5 CO_2'li etüvde inkübasyona bırakıldı. Hücrelerin üreme hızı her gün invert mikroskop ile takip edilerek, 3 günde bir besiyeri değişimi ve %80-90 doluluk seviyesine ulaştıklarında pasajlama işlemi tekrarlandı.

3.10. Hücre Sayısının Belirlenmesi ve Canlılık Ölçümü

İn-vitro hücre kültür çalışmamızın her aşamasında canlı hücreler sayılarak, ekilecek hücre miktarı belirlendi. Canlı ve ölü hücrelerin tayini için tripan mavisi kullanıldı. Ölü hücrelerin membran bütünlüğü bozulduğu için sitoplazmaları mavi ile boyandı ve mat bir görüntü elde edildi. Canlı hücreler ise boyayı hücre içine hapsedemediğinden boyanmadı ve parlak olarak görüntülendi. Hücrelerin sayımı, pasajlama ve ekilme işlemlerinden önce gerçekleştirildi. 10 µL tripan mavisi ve 10 µL hücre süspansiyonunu pipetaj yaparak karıştırıldı ve hazırlanan karışım Thoma lamının her iki bölmesine 10 µL olacak şekilde paylaştırıldı. İnvert mikroskop kullanılarak 16 eşit kareden oluşan Thoma lamının 4 bölmesinde bulunan hücrelerin ortalaması alınıp sayma işlemi gerçekleştirildi. Mililitredeki canlı hücre sayısı aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

mL' deki canlı hücre sayısı = (Ortalama Hücre Sayısı) x (10^4) x (Dilüsyon Faktörü)

3.11. Hücrelerin Dondurulması

Kullanılan hücreler çalışma bitmiş ya da tekrar kullanılmak üzere ara verilmiş ise dondurularak muhafaza edilir. Dondurma işlemi hücrelerin canlılığının devam etmesi açısından son derece önemlidir. Hücre dondurulması işlemi DMSO gibi maddeler kullanılarak yapılmaktadır. DMSO hücreler için bir nevi antifriz görevi görür. Fazla kullanılması hücre için toksik olmakla birlikte, yeterli miktarda kullanıldığında ısı değişimine karşı hücre zarının mekanik parçalanmadan korur. Hücrelerin çok hızlı ya da çok yavaş şekilde dondurulmasıyla oluşabilecek ani ısı değişimlerine karşı koruma sağlamaktadır. Kullandığımız tüm hücre hatları için ortak olmakla birlikte hücreleri dondurmak için, tripsinizasyon ile kaldırılan hücreler santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Elde edilen pellet, %90 FBS ve %10 DMSO içeren dondurma solüsyonunda, 1,5 ml.'lik -196 ^{0}C'ye dayanıklı steril kriyo tüplere paylaştırılarak saklandı. Dondurulan hücreler 1 saat boyunca +4 ^{0}C dolapta, sonra 3-4 saat -20 ^{0}C derin dondurucuda bir gece boyunca -80 ^{0}C derin dondurucuda ve 24. saatin sonunda da -196 ^{0}C'deki sıvı azot tanklarında muhafaza edildi.

3.12. Kalsitiriol Reaktifin Hazırlanması

Kalsitrıol (ıtem no:71820, Cayman) 5mg., 5 mikrolitre etanol ile kit protokolüne uygun olarak sulandırıldı. 2.4 µM.'lık stok solüsyon elde edildi.

Elde ettiğimiz stok solüsyon hücreye özgü besiyeri içerisinde seri dilüsyon yapılarak 0,5nM-1nM-10nM-100nM-200nM-250nM-500nM-1 000nM-10 000nM' lık dozlar halinde MCF-7, DU-145, CaCo-2 ve HUVEC hücre hatları üzerine 24 ve 48 saat boyunca uygulandı.

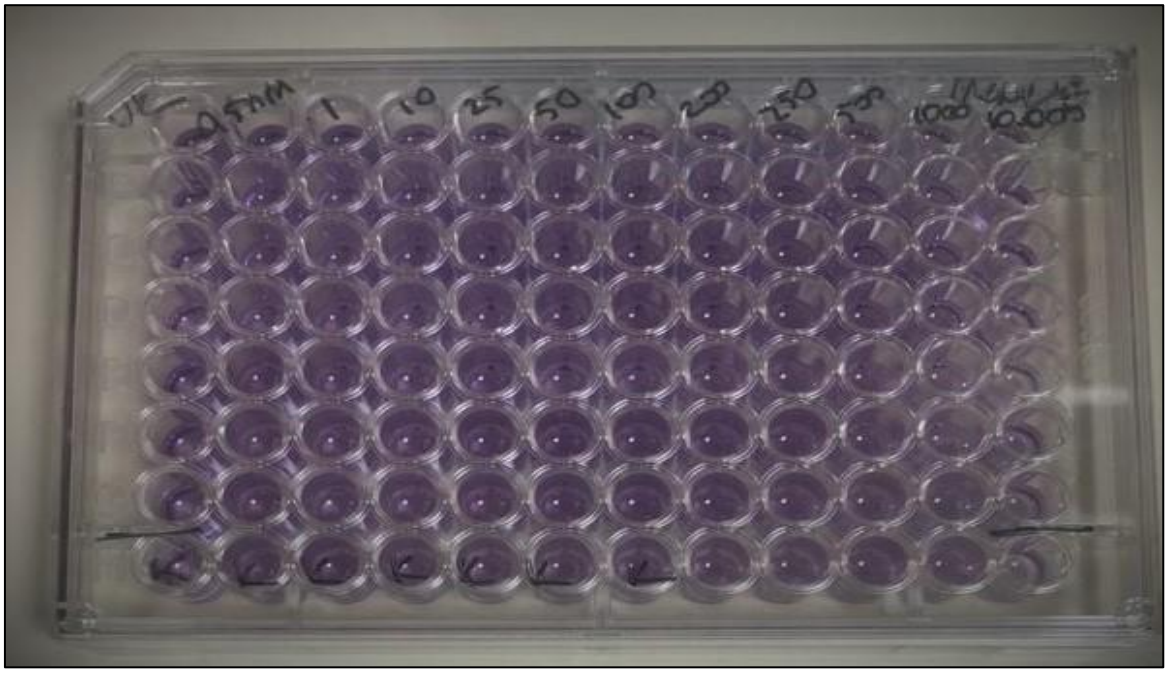
Khuzama ve arkadaşları 2021 yılında yaptıkları çalışma ile kalsitriolün ve kolekalsiferolün, zamana ve konsantrasyona bağlı antiproliferatif etkisi meme kanseri hücre hatları üzerinde karşılaştırılmıştır. Kalsitriolün IC50 değerleri 0.05-0.25 µM aralığında bulunmuştur.

3.13. MTT Testi (3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide; Thiazolyl Blue) ile Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi

MTT testi genellikle hücre proliferasyonu ve sitotoksitesinin kantitasyonunu belirlemede kullanılır. Tetrazolium tuzunun sadece metabolik aktivitesi olan hücreler tarafından renkli formazanlara indirgenmesinden dolayı bu yöntem sadece canlı hücreleri saptar. MTT içerisinde canlı hücreler renkli, suda çözünmez formazan tuzu tarafından indirgenir. Formazan kristalleri çözündükten sonra, mikroplate okuyucusunda $A_{570\,nm}$-A_{630nm} de miktarı belirlenebilir. Çoğalan hücreler prolifere olmayan hücrelerden metabolik olarak daha çok aktivite gösterdiği için, bu yöntemle sadece hücre canlılığı ve sitotoksite değil hücre aktivasyonu ve proliferasyonu da belirlenir. MTT (3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue) kültür ortamındaki mitokondrial aktivitesi devam eden canlı hücrelerin kantitasyonunu sağlar [38]. MTT suda çözünen bir tetrazolium tuzu olup fenol kırmızısı içermeyen medyum veya tuz solüsyonlarında hazırlandığında sarımtırak bir solüsyon oluşturur. Tetrazolium halkasının dehidrogenaz enzimlerince parçalanması sonucu MTT mor renkli çözünmez formazana dönüşür. Bu dönüşüm canlı hücrelerin mitokondrileri aracılığı ile olur. Oluşan bu formazan izopropanol veya başka bir çözücü yardımı ile çözünür hale getirilir ve oluşan renk reaksiyonu spektrofotometrik olarak kantite edilir [39,40].

Çalışmamıza ilk olarak tripsinizasyon ile kaldırdığımız hücrelerin sayımı ile başladık. 96'lık well platelerin her bir kuyucuğuna 100 µl (%10 FBS + medya içeren hücreli medya) içerisinde $1X10^4$ olacak şekilde hücre ekimi gerçekleştirildi ve 24 saat boyunca 37ºC'lik %5 CO_2 içeren etüvde inkübe edildi. 24. saatin sonunda her hücre hattına uygun olarak hazırladığımız kendi besiyeri içerisinde dilüe edilmiş olan kalsitriol dozları, 100 µl içerisinde 0.5nM -1nM-10nM-100nM-200nM-250nM-500nM-1000nM-10.000nM olacak şekilde 96 well platein dikey her bir sırasındaki toplan 8 kuyucuğa her doz 8 tekrarlı olarak ekildi (Şekil 3.5). Her hücre için 96'lık well platelerden biri 24 saat, diğeri 48 saat boyunca 37ºC'lik %5 CO_2 içeren etüvde inkübe edildi. Kontrol grubu olarak kullandığımız kuyucuğa sadece %10 FBS + medya içeren hücreli medya, veıchle kontrol olarak kullandığımız kuyucuğa ise kalsitiriolü ilk olarak çözerken kullandığımız etanol içeren besiyeri uygulanarak hücre canlılıkları üzerindeki etkisi hesaplandı. 24 ve 48 saat kalsitriol ile inkübasyon sonrası, MTT solüsyonu (Goldbıo St. Louis MO, USA) hacmi 5 ml olan steril medya içerisinde 5 mg/ml olacak şekilde çözüldü. Her bir kuyucuğa 20 µl. olacak şekilde dağıtıldı ve 3-4 saat boyunca

37ºC'lik %5 CO_2 içeren etüvde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda tüm kuyucukların içerikleri dikkalice çok kanallı pipetle uzaklaştırıldı. Her bir kuyucuğa 100 mikrolitre isopropil alkol pipetlendi. MTT solüsyonu ile hücrelerin reaksiyonu sonucu oluşan formazan kristalleri isopropil alkol ile çözünür hale getirildi. Hücreler yaklaşık 30 dakika oda ısısında inkübasyona bırakıldı. İşlem sonunda plate hafifçe çalkalanarak 570 nm dalga boyunda (Biotek Synergy HTX, USA) spektrofotometrik olarak okutuldu.



Şekil 3.5. Hücrelerin ekilmiş, MTT testinin uygulanmış olduğu 96'lık well plate görüntüsü

3.14. Flow Stometri ile Annexın Ölçümü

Floresein İzotiyosiyanat (FITC) etiketli Annexin V/Propidium iyodür akış sitometrisi ile, süspansiyon halindeki kültür koşullarında hücrelerin apopitozunun ölçümü için en hassas, en spesifik ve en kullanıcı dostu test olarak görünmektedir [41].

Apopitozun erken evrelerinde hücre yüzeyinde şimdiye kadar fark edilmesi zor olan değişiklikler meydana gelir. Bu plazma zarı değişikliklerinden biri, fosfatidilserinin (PS) plazma zarının iç tarafından dış katmana translokasyonudur, bu sayede hücrenin dış yüzeyinde PS açığa çıkar. Annexin V, PS için yüksek afiniteye sahip, Ca^{+2} bağımlı bir fosfolipid bağlayıcı proteindir. Dolayısıyla bu protein, hücre zarı üzerinde PS maruziyeti için hassas bir ölçüt olarak kullanılabilir. PS'nin dış hücre yüzeyine translokasyonu apopitoza özgü değildir, hücre nekrozu sırasında da meydana gelir. Bu iki hücre ölümü biçimi

arasındaki fark, apopitozun ilk aşamalarında hücre zarının bozulmadan kalmasıdır. Nekroz meydana geldiği anda hücre zarı bütünlüğünü kaybederek sızıntı yapar. Bu nedenle, apopitozun göstergesi olarak hücre yüzeyine bağlanan Annexin V'in ölçümü, hücre zarının bütünlüğünü belirlemek için bir boya çıkarma testi ile birlikte gerçekleştirilmelidir. Bütün hücreleri (FITC-/PI-), apopitotik hücreleri (FITC+/PI-) ve nekrotik hücreleri (FITC+/PI+) ayırt eder. Mevcut geleneksel testlerle karşılaştırıldığında, Annexin V testi hassastır ve gerçekleştirilmesi kolaydır [42].

Annexin V tahlili, hücre zarı bütünlüğünün kaybından önce apopitozun erken evrelerini saptama olasılığını sunar ve hücre döngüsüyle ilişkili olarak apopitotik ölümün kinetiğinin ölçülmesine izin verir [42].

Reaktifler

FITC Annexin V, diğer birçok fosfolipidden daha yüksek bir fosfatidilserin (PS) afinitesi ile negatif yüklü fosfolipid yüzeylere (~5 x 10^-2) bağlanan apopitotik hücreleri tanımlamak için hassas bir probdur. FITC Annexin V bağlanması kalsiyuma bağlıdır ve FITC Ek V boyama protokolünde açıklandığı gibi optimal boyama için tanımlanmış kalsiyum ve tuz konsantrasyonları gereklidir. Çalışmamızda BD Pharmingen™ FITC and PE Annexin V Apoptosis Detection Kits (Cat. Nos. 556570) içeriğine uygun olarak aşağıdaki adımlar uygulanarak kullanıldı.

1. FITC Ek V (bileşen no. 51-65874X): Test başına 5 µl kullanıldı.
2. Propidium İyodür (PI) (bileşen no. 51-66211E), kullanıma hazır bir nükleik asit boyasıdır. Test başına 5 µl kullanıldı.
3. 10X Annexin V Bağlama Tamponu (bileşen no. 51-66121E): 0.1 M Hepes/NaOH (pH 7.4), 1.4 M NaCl, 25 mM $CaCl_2$.

1X çalışma solüsyonu için, 10X Annexin V Bağlama Tamponunu 9 kısım saf su ile seyreltildi.

Boyama

1. Hücreler iki kez soğuk PBS ile yıkandı ve ardından hücreler $1x10^5$ hücre/ml konsantrasyonunda 1X Binding Buffer içinde süspanse edildi.

2. 100 µl solüsyon ($1x10^5$ hücre için) 5 ml'lik bir kültür tüpüne aktarıldı.
3. 5 µl FITC Annexin V ve 5 µl PI eklendi.
4. Hücreler hafifçe vortekslendi ve karanlıkta oda sıcaklığında (25°C) 15 dakika inkübe edildi.
5. Her tüpe 400 µl 1X Binding Buffer eklendi. 1 saat içinde akış sitometrisi ile analiz edildi.

3.15. RT-qPCR İçin Hücrelerin Hazırlanması

MTT testi ile her bir hücrenin ayrı ayrı IC_{50} oranı belirledi. Uygun dozdaki kalsitiriol 25 cm^2 flasklarda üretilen hücre hatlarının üzerine uyguladı. 24 saat kalsitriol maruziyeti sonunda hücreler tripsinizasyon yöntemi ile flask yüzeyinden kaldırıldı. 1 000 rpm'de 5 dakika santrifüj sonrası hücre pelleti 1 000 mikrolitre PBS içerisinde RNA izolasyonu için hazır hale geldi.

3.16. RNA İzolasyonu, Ölçümü, cDNA Sentezi ve RT- qPCR Analizi

3.16.1. RNA izolasyonu

RNA izolasyonu (ELK Bıotechnology RNA, Çin) kiti kullanılarak, kit içerisindeki protokole uygun olarak total mRNA izolasyonu gerçekleştirildi.

3.16.2. Total RNA izolasyonu kit protokolü

-20 ^{0}C'de sakladığımız örnekler oda ısısında çözüldükten sonra 300g'de 5 dakika santrifüj edildi.

1. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra 1.5 ml'lik ependorf tüp içerisindeki hücre pelletine 300 mikrolitre lysate REL ilave edilip pipetaj yapıldı.
2. Numunelerin üzerine 590 µL RNase-Free ddH2O ve 10 µL Proteinase K eklenip çalkalamalı su banyosunda 56 °C'de 10 dakika bekletildi.
3. Örnekler 5 dakika boyunca 12.000 rpm'de santrifüjlendikten sonra yeni bir 1.5 ml.lik ependorf tüpe süpernatant alındı.
4. Süpernatantın üzerine hacminin yarısı oranında etanol yavaşça eklendi. Dipte oluşan çökeltiler de dahil olmak üzere toplama (collection) tüpü içerisine yerleştirilmiş R

kolona aktarıldı. 10 000 rpm’de 1 dakika santrifüj yapıldıktan sonra, collection tüp içindeki sıvı ile atıldı.

5. Yeni bir collection tüpe aktarılan R kolon üzerine 500 mikrolitre de-proteinize RRPB eklenip 10 000 rpm’de 1 dakika santrifüj yapıldı.
6. DNase I çalışma solüsyonunun hazırlanması: Yeni bir RNase-Free ependorf tüpe 10 µl DNase I stok çözelti, 70 µl DNase I buffer RDB eklendi. (Çalışma anında hazırlanır.)
7. Hazırladığımız DNaseI çalışma solüsyonunu R kolonuna 80 µl eklendi ve oda ısısında 10 dakika bekletildi.
8. R kolon üzerine 500 µl deproteinize solüsyon RRPB eklendi ve 10 000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı.
9. RWB solüsyonu üzerine kullanmadan önce etanol eklendi. R sütununa 500 µl RWB yıkama solüsyonu konuldu. Oda ısısında 2 dakika bekletildikten sonra 12 000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi. R kolon yeni bir collection tüpe aktarıldı.
10. RWB solüsyonu üzerine kullanmadan önce etanol eklendi. R sütununa 500 µl RWB yıkama solüsyonu konuldu. Oda ısısında 2 dakika bekletildikten sonra 12 000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi. R kolon yeni bir collection tüpe aktarıldı.
11. R kolon temiz bir collection tüpe aktarıdı ve 2 dakika boyunca 12 000 rpm'de santrifüjlendi, collection tüp atıldı. R kolon temiz bir zeminde kuruması için bekletildi.
12. R kolonunu yeni bir RNase-Free ependorfa aktarılıp tam membranın ortasına 30 µl RNase-free ddH2O ekleyip 2 dk’a oda ısısında bekletildi ve 12 000 rpm’de 2 dk’a santrüfüj edildi.

Elde edilen örneklerin saflık ve miktar ölçümü yapıldıktan sonra, örnekler -20^{0}C derin dondurucuda saklandı.

3.16.3. RNA saflığının belirlenmesi ve konsantrasyon hesaplanması

RNA’dan cDNA sentezine başlamadan önce, çok modlu mikroplak okuyucu (Biotek Synergy HTX, ABD) kullanılarak 260nm/280nm dalga boyunda elde edilen RNA’nın saflığı ve miktarı ölçüldü. Saflık oranları 1,9 civarı olan RNA’lar çalışmada kullanıldı (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5. RNA saflık ve miktar tayin tablosu

Sample Read	Location	260/28	ng /µL
1	MCF-7 Kontrol	1.921	83.935
1	MCF-7 100 nM	1.991	73.889
1	MCF-7 1 000 nM	1.914	55.818
1	MCF-7 10 000 nM	1.995	44.875
1	Caco-2 Kontrol	1.896	76.067
1	Caco-2 100 nM	1.985	63.971
1	Caco-2 1 000 nM	1.816	55.015
1	Caco-2 10 000 nM	1.875	81.545
1	DU-145 Kontrol	1.958	65.437
1	DU-145 100 nM	1.82	52.445
1	DU-145 1 000 nM	1.938	73.247
1	DU-145 10 000 nM	1.811	61.634

3.16.4. cDNA sentezi

Saflık ve miktarı hesaplanan RNA izolasyonundan sonra kültüre edilmiş doku hücrelerinden elde edilen total RNA miktarları spektrofotometre kullanılarak 260/280 nm oranına göre hesaplandı ve sonuçlar ng/µl olarak bulundu. RNA örnekleri -80^{0}C derin dondurucuda saklandı. Çıkarılıp çözünen örneklerden (ELK Biyoteknology EntiLink 1st strand, Çin) kiti kullanılarak, protokole uygun olarak cDNA sentezlendi.

1.Aşama:

Çizelge 3.6. cDNA sentez protokolü

5×gDNA Eraser	2.0 µL
gDNA Eraser	1,0 µL
Template RNA	0,5-5 µg
RNase-Free Water	10,0 µL

Her bir örnek için bu miktarlar (Çizelge 3.6) ısıya dayanıklı 0,5 µl.lik termal tüpler içerisinde 42°C'de 2 dakika boyunca T100 PCR sistem (Bio- Rad, Hercules, CA, USA) kullanılarak inkübasyona bırakıldı.

2.Aşama:

Çizelge 3.7. cDNA sentez protokolü

Reaction solution	10,0 µL
RT Primer Mix or Gene Specific Primers (10 µM)	2,0 µL or 1,0 µL
dNTPs (10mM each)	1,0 µL
RNase-Free ddH2O	15,0 µL

Bu karışım (Çizelge 3.7) 1. aşamadaki reaktiflerin üzerine eklenerek 70°C'de 5 dakika süresince T100 PCR sistem (Bio- Rad, Hercules, CA, USA) kullanılarak inkübasyona bırakıldı. Sonrasında soğuması için hızla buz üzerine yerleştirildi.

3.Aşama:

Çizelge 3.8. cDNA sentez protokolü

5×RT Buffer	4,0 µL
Reverse Transcriptase	1,0 µL
RNase Inhibitor	1,0 µL

Tüpler içerisine bu üç reaktif (Çizelge 3.8) eklenip vortekslendi. T100 PCR termal döngü (Bio- Rad, Hercules, CA, USA) kullanılarak 37°C'de 60 dakika, 95°C'de 5 dakika inkübasyona bırakıldı, ardından buz üzerinde soğutuldu ve RT-PCR için için -80°C'de saklandı.

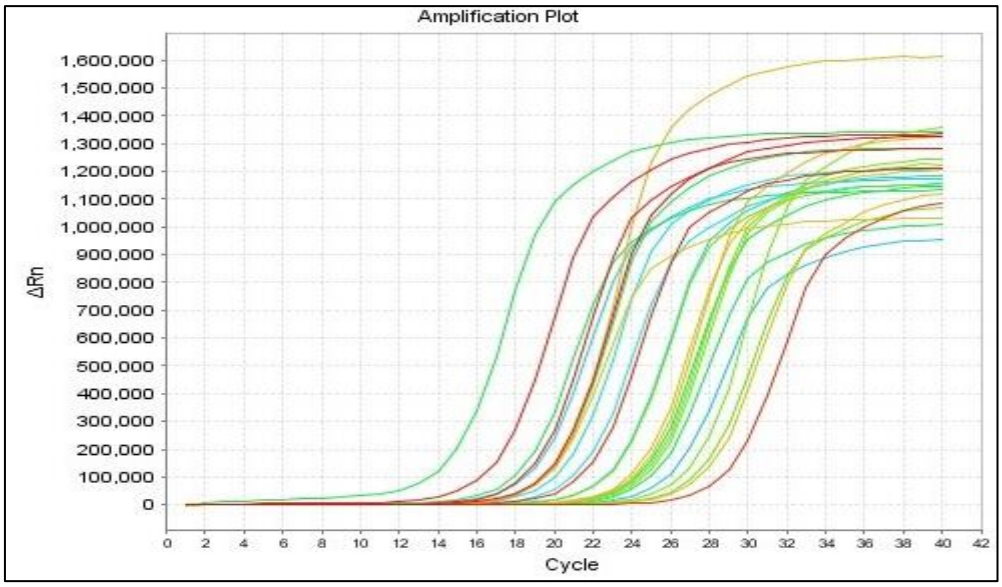
3.16.5. RT-qPCR analizi

mRNA sentezi kantitatif analizi üretici firma (ELK Bıotechnology Enturbo Sybrgreen PCR Supermix, Çin) protokolüne uygun olarak ve termal döngü cihazı (Applied Biosystem, Foster City, CA, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. c-DNA sentezi yapılan örnekler çalışmadan 10 dakika önce oda ısısında bekletildi. Çalışmada GAPDH geni kontrol (housekeeping) gen olarak kullanıldı. SYBR Green Master Mix, Primer F, Primer R PCR Grade H_2O ve cDNA reaktifleri (Çizelge 3.9) her bir örnek için aşağıdaki miktarlarda olmak üzere 8'li PCR strip tüpler içerisine alındı. ABI 7500 Real-Time PCR cihazı ile örnekler: 95°C'de 3 dakika, 95°C'de 5 sn 60°C'de 30 sn 72°C'de 30 sn, 40 siklus olacak şekilde amplifiye edildi (Şekil 3.6). Erime ısısı analizi; 70°C ve 95°C arasındaki sıcaklıklarda, ısı miktarı 2 saniyede 0,1°C artırılarak ve bu süre içerisinde zamana bağlı olarak oluşan floresan miktarının erime eğrisi değerlendirilerek yapıldı (Şekil 3.7).

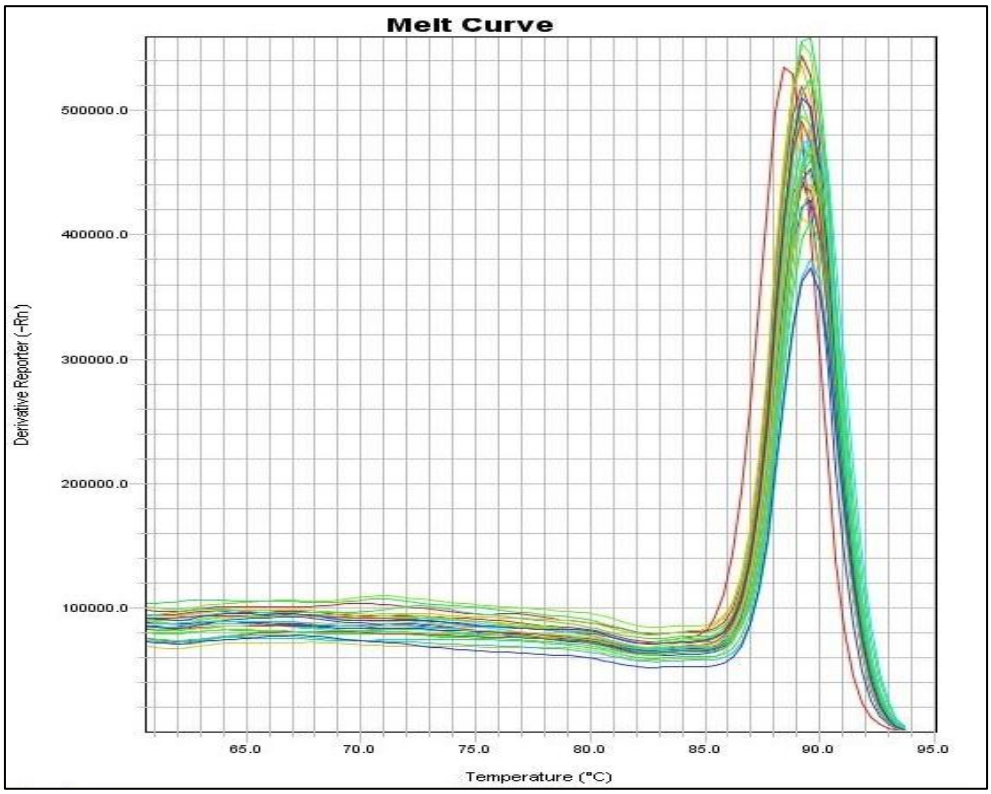
Çizelge 3.9. RT-qPCR mix birleşimi

SYBR Green Master Mix (10X)	10,0 µL
Primer F (10 pM):	1,0 µL
Primer R (10 pM):	1,0 µL
PCR Grade H_2O	3,0 µL
c-DNA (500ng / µl) :	1,0 µL

Ekspresyon aşamasında kullanılan reaktifler:



Şekil 3.6. Real-Time PCR'da gözlenen eşik değeri eğrileri (Ct)



Şekil 3.7. Erime eğrisi analizi

3.16.6. RT-qPCR uygulamasında kullanılan primerler

Primer tasarımları Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi [National Center for Biotechnology Information Gen-Bank (NCBI-Gen Bankası)] veri tabanı üzerinde bulunan primer-BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool) dizi eşleştirme analizi ile tasarlandı ve Prımer3 (https://primer3.ut.ee/) programı ile tasarlanarak değerlendirildi (Çizelge 3.10).

Çizelge 3.10. Kullanılan primer tablosu

Gen (Transkript)	Primer Sekansları (5'-3')
EFGF	**F:** GACAGGCCACCTCGTCG
EFGF	**R:** TGCGTGAGCTTGTTACTCGT
VEGF	**F**: CTCGGATGCTGGAGATGAC
VEGF	**R**: GGCTGGGGAAGAGTTTGTT
Kİ67	**F**: GTGGTTCGACAAGTGGCCTT
Kİ67	**R:** AGTTGGGTCTCCCCCTGTAA
VDR	**F**: TCTCCTGCCTACTCACGATAA
VDR	**R:** GCTACTGCCCGTGAGAATATAA
GAPDH	**F:** GAAGGTGAAGGTCGGAGTCAAC
GAPDH	**R**: CAGAGTTAAAAGCAGCCCTGGT

3.16.7. RT-qPCR analiz yöntemi

Çalışmamızda kullandığımız genlerin farklı örnekleri arasında mRNA miktarı ve kalitesinde meydana gelebilecek değişiklikleri standardize etmek için referans gen olarak GAPDH kullanıldı. Böylece farklı örnekler arasında genlerin ifadesinin karşılaştırılması sağlandı. Gen ifadesini ölçmek için standardize Ct değeri (amplifikasyon eğrisinin eşik değeri aştığı döngü sayısı) ΔCt değeri hesaplandı (Şekil 3.6). Kalsitriol dozları uygulanan örneklerin Ct değerlerinden referans gen ct değerleri çıkarılarak, doz uygulaması yapılan örneklerin ΔCt değerleri hesaplandı. Kontrol örneklerinin Ct değerlerinden referans gen Ct değerleri çıkarılarak, kontrol örneklerinin ΔCt değerleri hesaplandı. Kalsitriol uygulanan örneklerin, kontrol örneklerine göre ekspresyon seviyesini belirlemek için Δct değerleri kullanılarak $2^{-\Delta\Delta}$Ct değeri hesaplandı. $2^{-\Delta\Delta}$Ct değeri hesaplamaları sonucunda çıkan 2 üzerindeki değer anlamlı ve kontrole göre artmış regülasyonu ifade ederken, 1 ve 2 arası değer anlamsız regülasyonu, 0 ve 1 arası değer ise azalmış regülasyonu ifade etmektedir. İfadesi azalmış regülasyonun anlamlı veya anlamsız olduğunu belirlemek amacıyla -1/$2^{-\Delta\Delta}$Ct yapılır. -1 ile -2 arası anlamsız düşük regülasyonu ifade ederken, -2 veya -2’ den küçük değerler anlamlı azalmış regülasyonu ifade etmektedir [43].

Kalsitriol uyguladığımız hücre örneklerinin RT-qPCR uygulamasında elde edilen amplifikasyon eğrilerinin Ct değerlerinden, $2^{-\Delta\Delta}$Ct değerleri hesaplandı.

3.16.8. Anjiogenez modeli

HUVEC hücreleri besiyerinde ml'de 20 000 hücre olacak şekilde bir adet 15 ml'lik falkon tüpe ayrılarak inkübatörde bekletildi. Bu sırada üç gün $+4^0$C'de bekletilmekte olan Corning Matrigel jel solüsyonu ile 12 saat önceden 37ºC'lik inkübatöre konmuş olan Ibıdı M-Slide Anjiyogenesis ve Ibıdı M-Plate Anjiyogenesis tüp formasyonu plateleri ise inkübatörden çıkarılarak laminar flow kabin içerisinde her bir kuyucuğa 10 µl jel solüsyonu kuyucukların tam ortasına eklendi. Sonrasında plateler 10 dakika kadar jelin stabil katı hale gelmesi için inkübatörde bekletildi. Bu süre zarfında hücre süspansiyonları hazırlanarak kuyucuklarda stabil hale gelmiş matrijel üzerine ekimi yapıldı. Kuyucuklara 50'şer µl besiyeri içerisinde uygun kalsitriol dozları ilave edilerek ilk fotoğraf çekimi yapıldı. 18. saat içinde sonuçlar 40x'lik ve 100x'lik büyütme yapılarak faz kontrast mikroskobu ile görüntülenerek tüp uzunluğu, sayısı ve yoğunluğu dikkate alınarak analizi yapıldı.

3.17. İstatiksel Analiz

Tanımlayıcı istatistik olarak sürekli veriler için ortalama ve standart sapma (ort±ss) kullanılmıştır. Sürekli verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile kontrol edilmiştir.

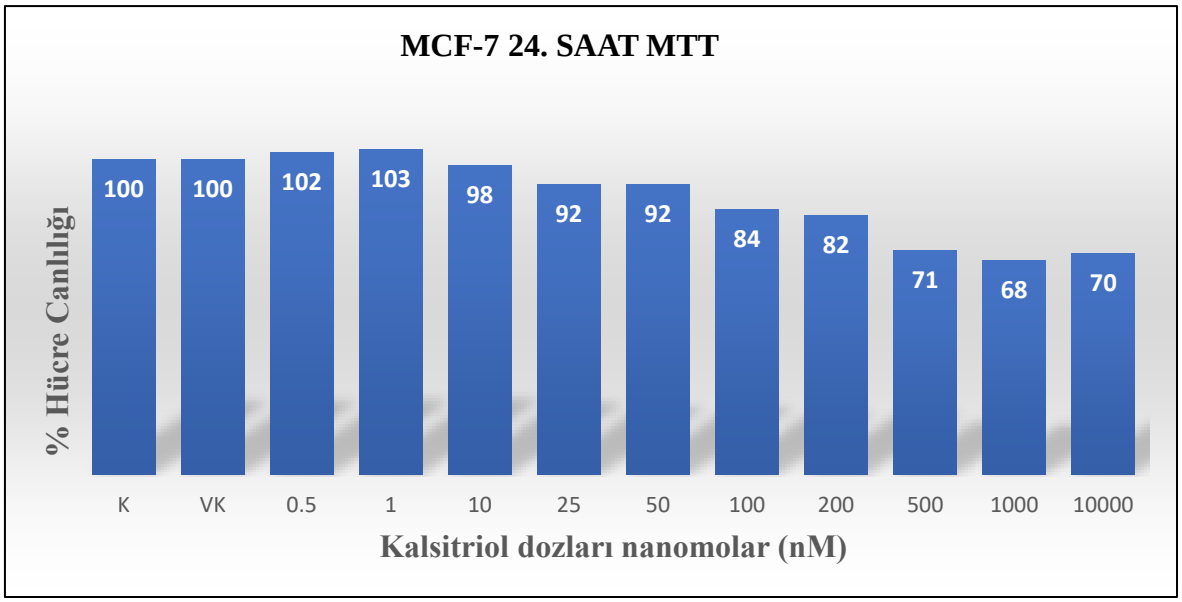
Kontrol Grubu bağımsız değişkenlerinin sonuç değişkenlerine etkisi tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) ile belirlenmiştir
Analiz sonucunda etkileşim etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunduğunda farkın kaynağını bulmak için Bonferroni düzeltmeli Simple Effect analizi kullanılmıştır.

Veriler IBM SPSS 26 (IBM SPSS Inc, Chicago, IL) paket programı ile analiz edilmiştir. İstatistiksel anlamlılık seviyesi 0,05 olarak alınmıştır.

4. BULGULAR

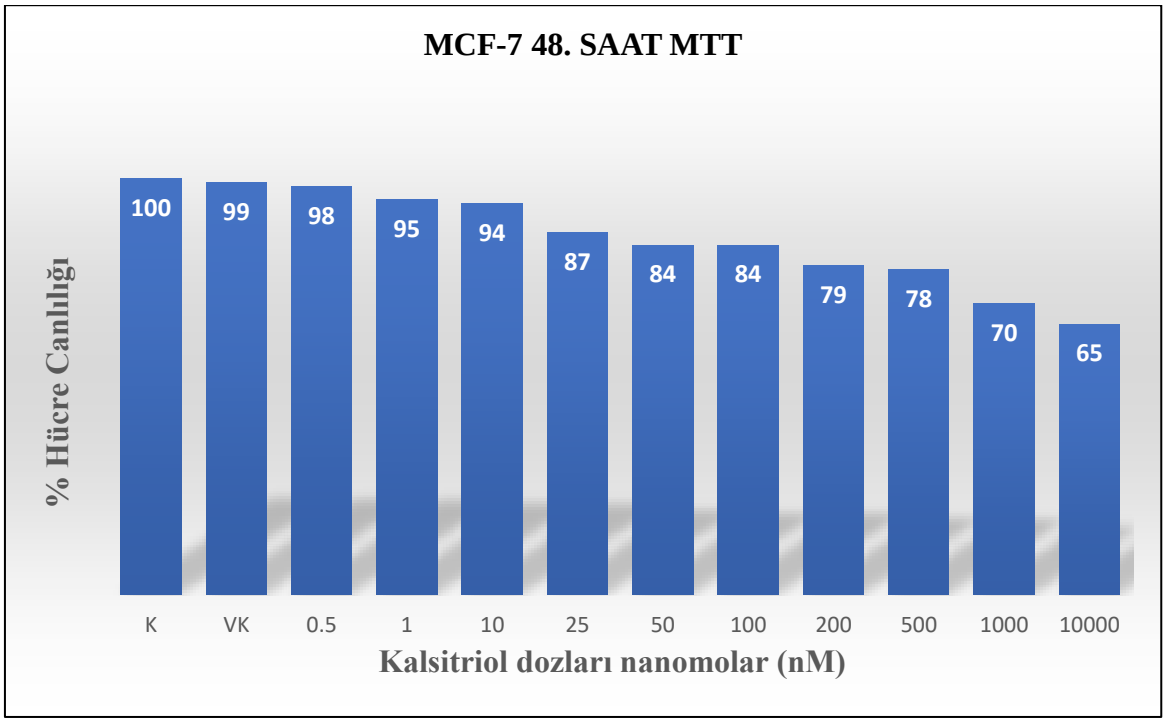
4.1. 1.25(OH)2D3 ‘ün MCF-7 Hücre Hattı Üzerindeki Etkisinin MTT Testi ile Belirlenmesi

Kalsitriol’ün MCF-7 hücre hattı üzerindeki 24 saatlik maruziyeti sonrası proliferasyonun azalması anlamlı olarak 100 nM seviyesinde başladığı görüldü. Kontrol grubuna göre 100 nM kalsitriol MCF-7 hücre canlılığını %100±1,22’den (p<0,001) %84±2,14’e (p<0,001); 200 nM kalsitriol %82±2,47’e (p<0,001); 500nM kalsitriol %71±2,17’e (p<0,001); 1000 nM kalsitriol ve 10000 nM kalsitriol ise %68±1,33’e (p<0,001) ve %70±2,17’e (p<0,001) düşürmüştür (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. MCF-7 hücre hattı 24 saat kalsitriol uygulaması ile yüzde (%) hücre canlılığı. VK (Kalsitiriolü çözerken kullandığımız etanol miktarı olup direk hücre üzerine uygulanmıştır.) Dozlar nanomolar olarak hazırlanmıştır

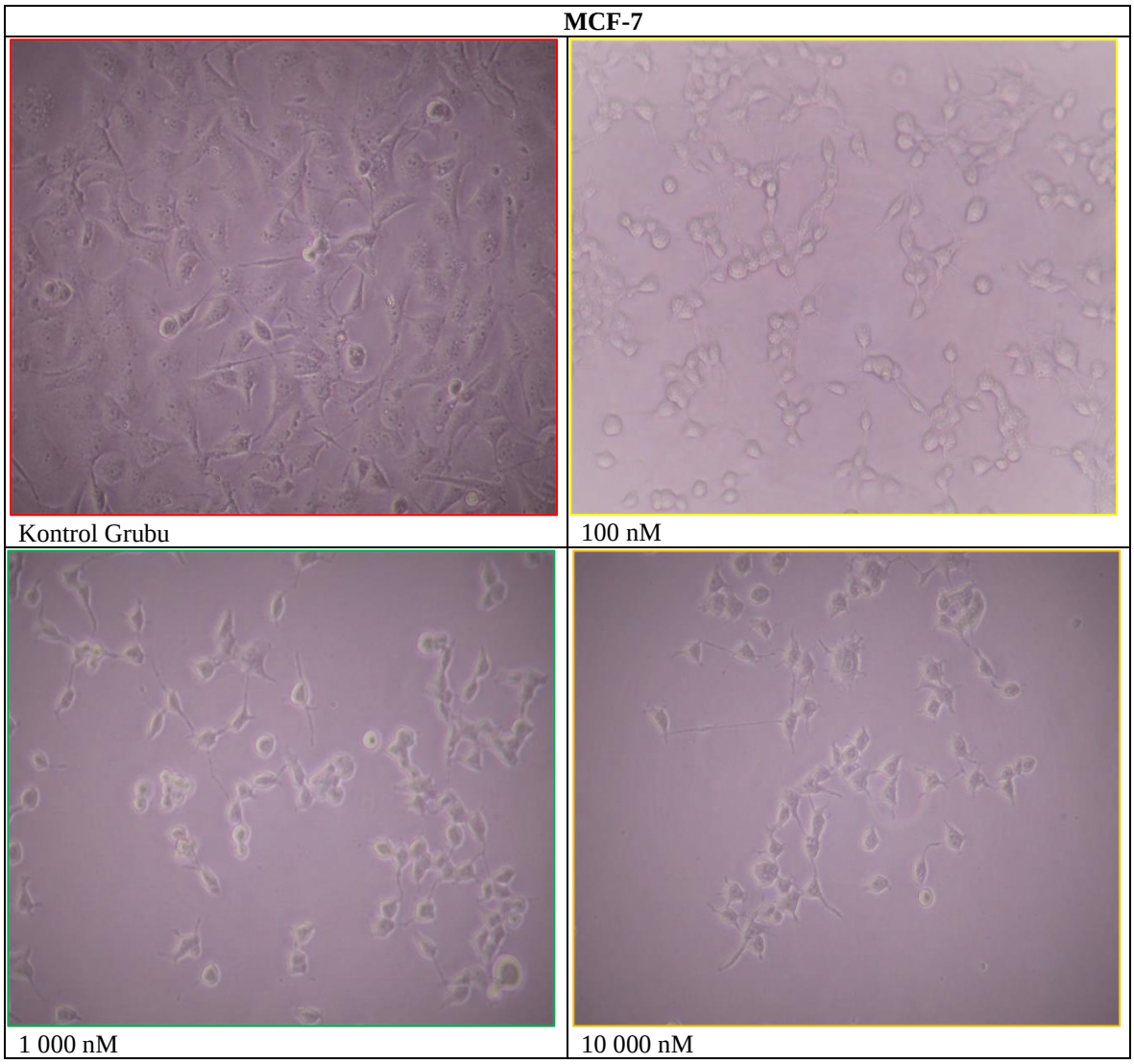
Kalsitriolün MCF-7 hücre hattı üzerindeki 48 saatlik maruziyeti sonrası proliferasyonun azalması anlamlı olarak 50 nM seviyesinde başlamıştır. Kontrol grubuna göre 50 nM kalsitriol hücre canlılığını %100±3,52'den (p<0,001); %87±3,02'ye (p<0,001); 100 nM %84±3,53'e (p<0,001); 200 nM kalsitriol %79 ±2,41'a (p<0,002); 500 nM kalsitriol %78±2,26'e (p<0,002); 1.000 nM kalsitriol %70±2,18'e (p<0,001); 10.000 nM kalsitriol %65±2,48'e (p<0,001) düşürmüştür (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. MCF-7 hücre hattı 48 saat kalsitriol uygulaması ile yüzde (%) hücre canlılığı. VK (Kalsitiriolü çözerken kullandığımız etanol miktarı olup direk hücre üzerine uygulanmıştır.) Dozlar nanomolar olarak hazırlanmıştır

4.2. MCF-7 Hücre Hattı İnvert Mikroskop Görüntüsü

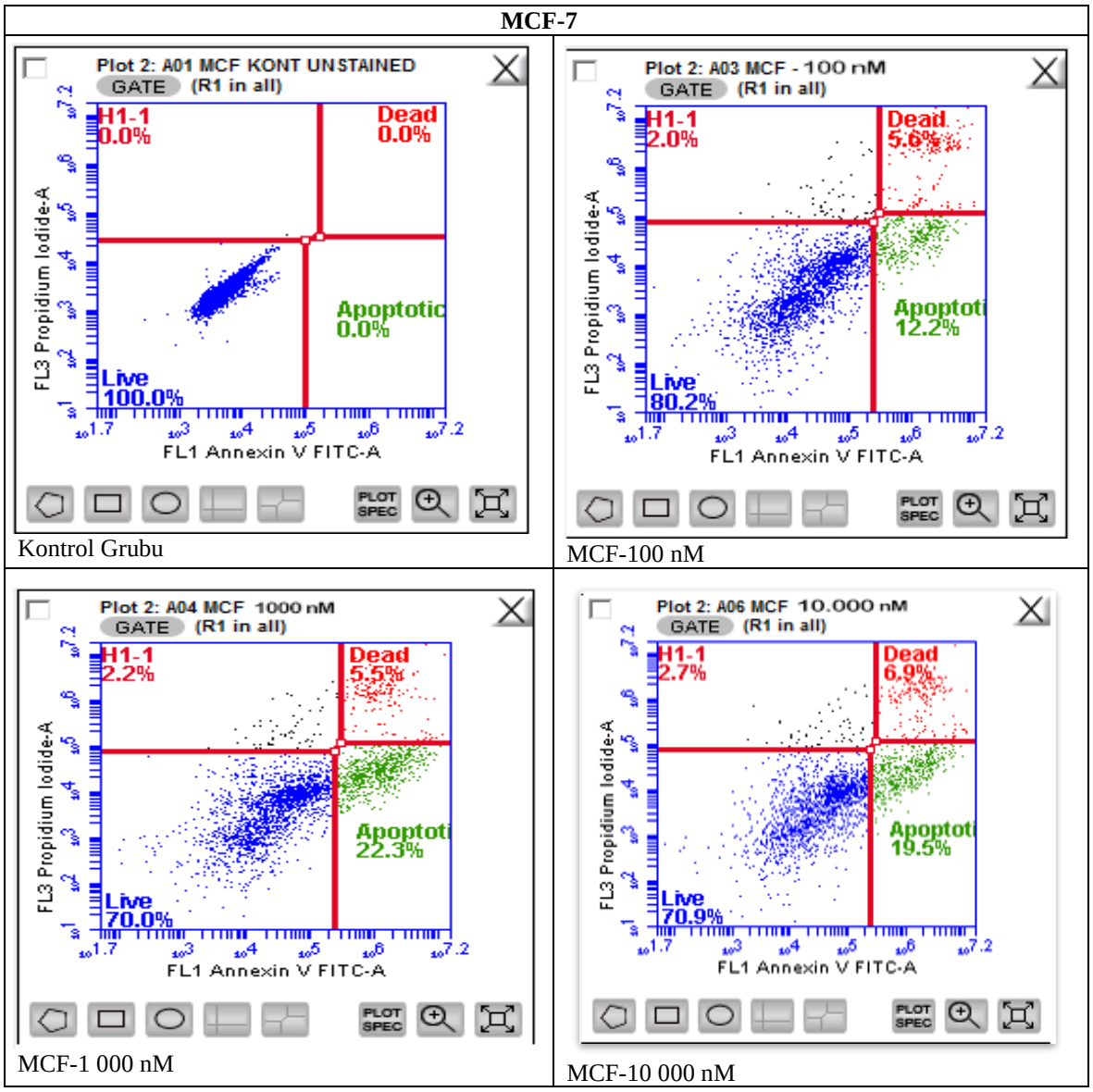
24 saatlik kalsitriol maruziyeti sonrası MCF-7 hücrelerinin trinoküler invert mikroskop (Olympus CKX41, Japonya) ile görüntüleri alındı (Şekil 4.3). Elde edilen görüntüler kontrolle karşılaştırılarak mikroskop altında görsel olarak değerlendirildi. MCF-7 hücreleri üzerinde 100 nM, 500 nM, 1 000 nM ve 10 000 nM 'de doz artışı ile uyumlu hücre azalışı gözlenmiştir.



Şekil 4.3. 24. saat sonunda MCF-7 hücre hatları üzerine kalsitiriol uygulanan ve uygulama yapılmayan gruplara ait invert mikroskop görüntüsü. Kontrol grubu, 100 nanomolar, 1 000 nanomolar, 10 000 nanomolar konsantrasyonda kalsitiriol uygulanan grup

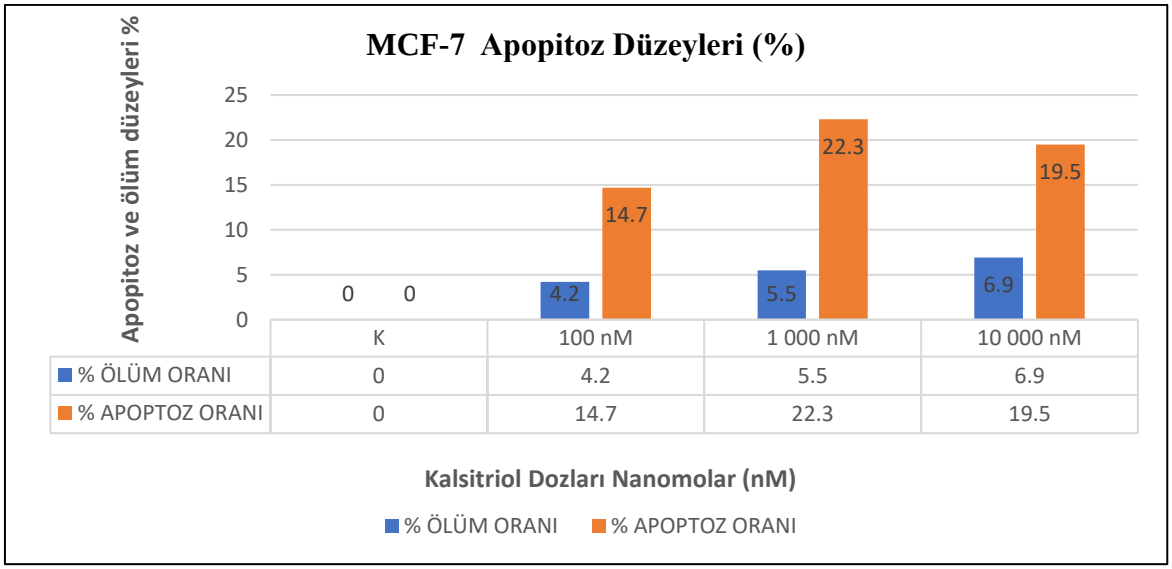
4.3. Hücre Ölümü Değerlendirilmesi için Annexin V/ Propidium İyodür Apopitoz Testi MCF-7 Hücre Hattı Apopitoz Bulguları

Anneksin V testi için, kontrol grubunda yaşam değeri %100 iken,24. saat kalsitriol uygulaması sonucunda MCF-7 hücre hattı için 100 nM,1 000 nM ve 10 000 nM'da sırası ile %80,2, %70,0 ve %70,9 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. MCF-7 hücre hattı, yüzde (%) apopitoz düzeyleri

Anneksin V testi için, kontrol grubunda ölüm ve apopitoz değeri %0 iken, 24 saat kalsitriol maruziyeti sonrasında MCF-7 hücre hattı için 100 nM'de ölüm değeri %4,2, apopitoz değeri %12,2; 1 000 nM'de ölüm değeri %5,6, apopitoz değeri %22,3; 10 000 nM'de ölüm değeri %6,9, apopitoz değeri %19,5 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. MCF-7 Hücre Hattı 24 saat kalsitriol maruziyeti sonrası apopitoz yüzde (%) düzeyleri

4.4. MCF-7 Hücre Hattı RT-qPCR Gen Ekspresyonu Bulguları

RT-qPCR yöntemi ile 24 saat kalsitriole maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinde VDR, Ki-67, VEGF, EGFR ekspresyon ölçümleri değerlendirilmiştir. Hedef genlerin ifade düzeyleri GAPDH mRNA ifade düzeyi baz alınarak normalize edilmiştir. Hedef genlerin ekspresyonunu tespit etmek için $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi uygulanmıştır.

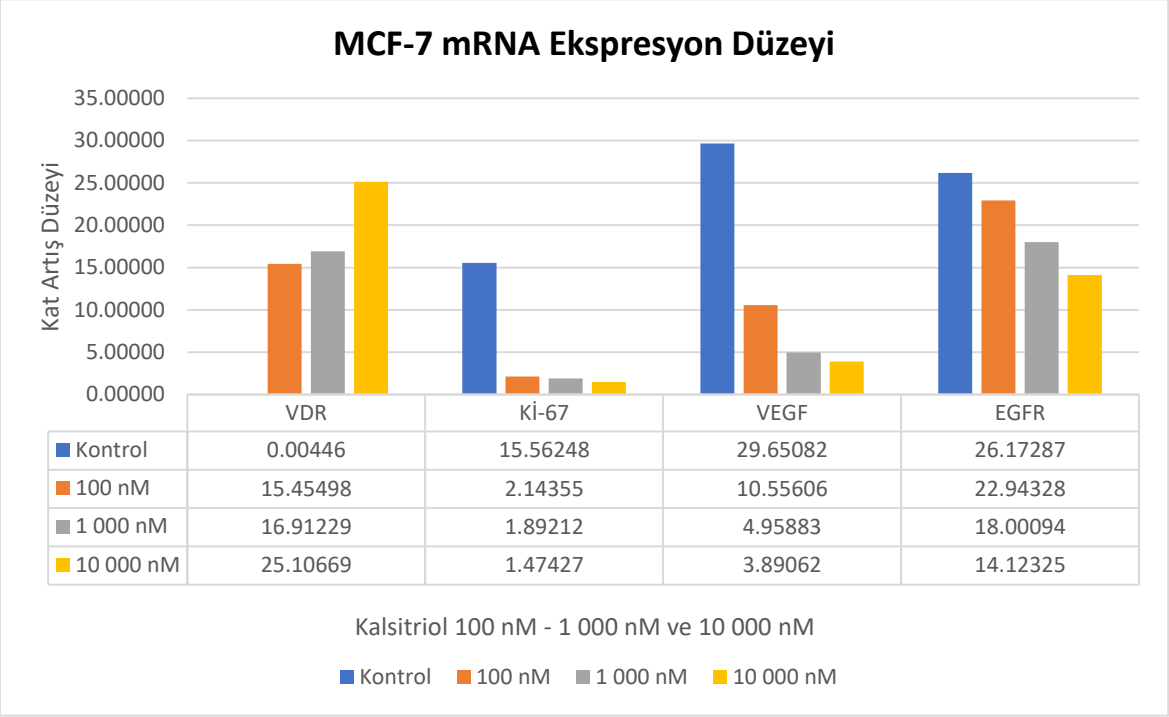
VDR ekspresyon düzeyi MCF-7 hücre hattı için kontrol grubunda 0,004±0,02; 100 nM'de 15,455±0,03; 1 000 nM'de 16,912±0,23; 10 000 nM'de 25,107±2,62 olarak bulunmuştur (Şekil 4.6).

Ki-67 ekspresyon düzeyi MCF-7 hücre hattı için kontrol grubunda 15,562±0,63; 100 nM'de 2,144±0,04; 1 000 nM'de 1,892±0,05; 10 000 nM'de 1,474±1,03 olarak bulunmuştur (Şekil 4.6).

VEGF ekspresyon düzeyi MCF-7 hücre hattı için kontrol grubunda 29,651±1,19; 100 nM'de 10,556±2,07; 1 000 nM'de 4,959±1,04; 10 000 nM'de 3,891±0,11 olarak bulunmuştur (Şekil 4.6).

EGFR ekspresyon düzeyi MCF-7 hücre hattı için kontrol grubunda 26,173±2,07; 100 nM'de

22,943±3,52; 1 000 nM'de 18,001±3,06; 10 000 nM'de 14,123±1,13 olarak bulunmuştur (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. MCF-7 Hücrelerinde 24 saat kalsitriol uygulaması sonrası VDR, Ki-67, VEGF, EGFR ekspresyon düzeyleri. Hedef genlerin ifade düzeyleri GAPDH mRNA ifade düzeyi baz alınarak normalize edildi

Çizelge 4.1. MCF-7 RT-qPCR analizi sonuçları

MCF	Kontrol Grubu	100 nM	1000 nM	10000 nM
	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD
VDR	0,004±0,02	15,455±0,03[a]	16,912±0,23[a]	25,107±2,62[a,b,c]
Kİ-67	15,562±0,63	2,144±0,04 [a]	1,892±0,05 [a]	1,474±1,03[a]
VEGF	29,651±1,19	10,556±2,07 [a]	4,959±1,04 [a,b]	3,891±0,11 [a,b]
EGFR	26,173.± 2,07	22,943±3,52[a]	18,001±3,06[a]	14,123±1,13 [a,b]

[a] :p<0,05 Kontrol Grubu ile 100 ,1 000 ve 10 000 nM 'lik dozların karşılaştırılmasından elde edilen anlamlılık düzeyi.
[b] :p<0,05 100 nM'lik doz ile 1 000 ve 10 000 nM 'lik dozların karşılaştırılmasından elde edilen anlamlılık düzeyi.
[c] :p<0,05 1 000 nM'lik doz ile 10 000 nM 'lik dozun karşılaştırılmasından elde edilen anlamlılık düzeyi.

MCF-7 hücre hattında;

VDR mRNA ekspresyon düzeyi 100 nM'lık dozda kontrol grubuna göre yaklaşık 15 kat artmıştır ($p<0,05$). 1 000 nM'lık dozda kontrol grubuna göre yaklaşık 16 kat artmıştır ($p<0,05$). 10 000 nM'lık dozda kontrol grubuna göre ortalama 25 kat artmıştır ($p<0,05$). 100 nM'lık doz ile 1 000 nM'lık dozu kıyasladığımızda; istatistiksel anlamda bir artış ya da azalış gözlemlenmemiştir ($p>0,05$). 100 nM ile 10 000 nM kıyaslandığında, 10 000 nM'de VDR mRNA ekspresyon düzeyi 1,6 kat artmıştır ($p<0,05$). 1 000 nM ile 10 000 nM kıyaslandığında ise 10 000 nM'de VDR mRNA ekspresyon düzeyi yak1aşık 1,5 kat artmıştır (Çizelge 4.1) ($p<0,05$).

Ki-67 mRNA ekspresyon düzeyi 100 nM'lık dozda kontrol grubuna göre yaklaşık 7,5 kat azalmıştır ($p<0,05$). 1 000 nM'lık dozda kontrol grubuna göre yaklaşık 8 kat azalmıştır ($p<0,05$). 10 000 nM'lık dozda kontrol grubuna göre yaklaşık 10 kat azalmıştır ($p<0,05$). 100 nM'lık doz ile 1 000 nM'lık dozu kıyaslandığında; istatistiksel anlamda bir artış ya da azalış gözlemlenmemiştir ($p>0,05$). 100 nM ile 10 000 nM lık dozu kıyaslandığında istatistiksel anlamda bir artış ya da azalış gözlemlenmemiştir ($p>0,05$). 1 000 nM ile 10 000 nM lık dozu kıyaslandığında istatistiksel anlamda bir artış ya da azalış gözlemlenmemiştir (Çizelge 4.1) ($p>0,05$).

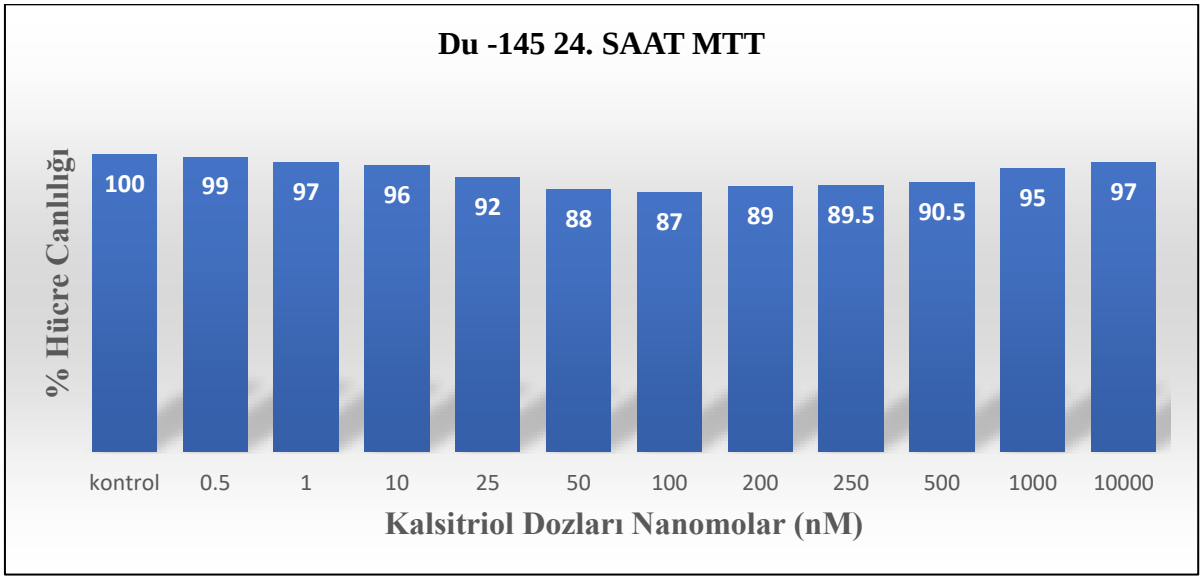
VEGF mRNA ekspresyon düzeyi 100 nM'lık dozda kontrol grubuna göre yaklaşık 2,9 kat azalmıştır ($p<0,05$). 1 000 nM'lık dozda kontrol grubuna göre yaklaşık 5,9 kat azalmıştır ($p<0,05$). 10 000 nM'lık dozda kontrol grubuna göre yaklaşık 7,6 kat azalmıştır ($p<0,05$). 100 nM ile 1 000 nM kıyaslandığında 1 000 nM'de VEGF mRNA ekspresyon düzeyi yaklaşık 2 kat azalmıştır ($p<0,05$). 100 nM ile 10 000 nM kıyaslandığında 10 000 nM'de VEGF mRNA ekspresyon düzeyi yaklaşık 2,7 kat azalmıştır ($p<0,05$). 1 000 nM ile 10 000 nM'lık dozu kıyaslandığında istatistiksel anlamda bir artış ya da azalış gözlemlenmemiştir (Çizelge 4.1) ($p>0,05$).

EGFR mRNA ekspresyon düzeyi 100 nM'lık dozda kontrol grubuna göre ortalama 1,1 kat azalmıştır ($p<0,05$). 1 000 nM'lık dozda kontrol grubuna göre ortalama 1,4 kat azalmıştır ($p<0,05$). 10 000 nM'lık dozda kontrol grubuna göre ortalama 1,8 kat azalmıştır ($p<0,05$). 100 nM'lık doz ile 1 000 nM'lık dozu kıyasladığımızda istatistiksel anlamda bir artış ya da azalış gözlemlenmemiştir ($p>0,05$). 100 nM ile 10 000 nM kıyaslandığında, 10 000 nM'de

EGFR mRNA ekspresyon düzeyi 1,5 kat azalmıştır (p<0,05). 1 000 nM ile 10 000 nM lık dozu kıyaslandığında, istatistiksel anlamda bir artış ya da azalış gözlemlenmemiştir (Çizelge 4.1) (p>0,05).

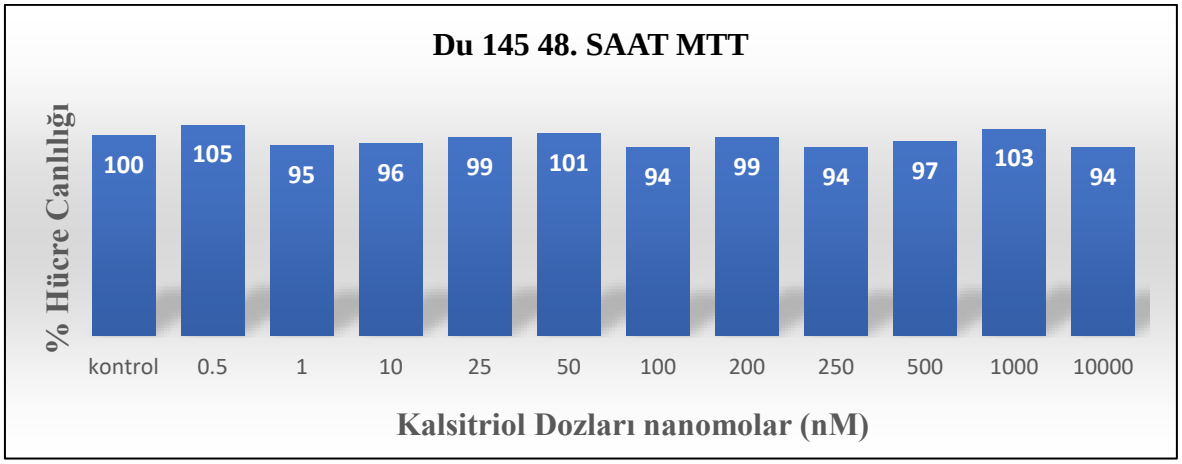
4.5. 1.25(OH)$_2$D$_3$ 'ün DU-145 Hücre Hattı Üzerindeki Etkisinin MTT Testi ile Belirlenmesi

Kalsitriol'ün DU-145 hücre hattı üzerindeki 24 saatlik maruziyeti sonrası proliferasyonun azalması anlamlı olarak 50nM ve 100 nM seviyesinde gözlemlenmiştir. Kontrol grubuna göre 50 nM kalsitriol DU-145 hücre canlılığını %100±2.32'den (p<0,002); %88±3.27'e (p<0,002); 100 nM kalsitriol %87±3.12'ye (p<0,002) düşürmüştür (Şekil 4.7). 1000 nM kalsitriol ile %95±0,93 (p<0,001); 10 000 nM kalsitriol ile %97±2,11 (p<0,001) canlılık yüzdesi saptanmıştır.



Şekil 4.7. DU-145 hücre hattı 24 saat kalsitriol uygulaması ile yüzde (%) hücre canlılığı. Dozlar nanomolar olarak hazırlanmıştır

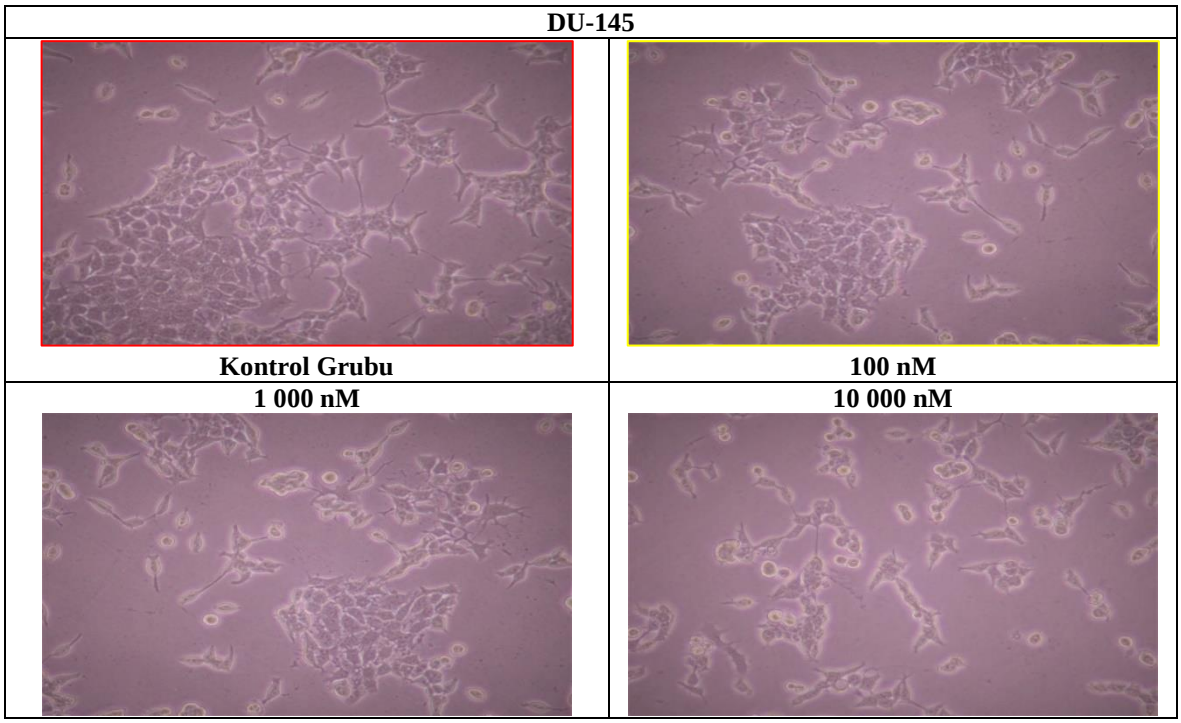
Kontrol grubuna göre 50 nM kalsitriol ile hücre canlılığı %100±1,12 (p<0,001); 100 nM kalsitriol ile hücre canlılığı %94±1,23 (p<0,001); 200 nM kalsitriol ile hücre canlılığı %99 ±2,01 (p<0,001); 500 nM kalsitriol ile hücre canlılığı %97±0,96 (p<0,001); 1 000 nM kalsitriol ile hücre canlılığı %103±1,82 (p<0,001); 10 000 nM kalsitriol ile hücre canlılığı %94±1,62 (p<0,001) olarak belirlenmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. DU-145 hücre hattı 48 saat kalsitriol uygulaması ile yüzde (%) hücre canlılığı. Dozlar nanomolar olarak hazırlanmıştır

4.6. DU-145 Hücre Hattı İnvert Mikroskop Görüntüsü

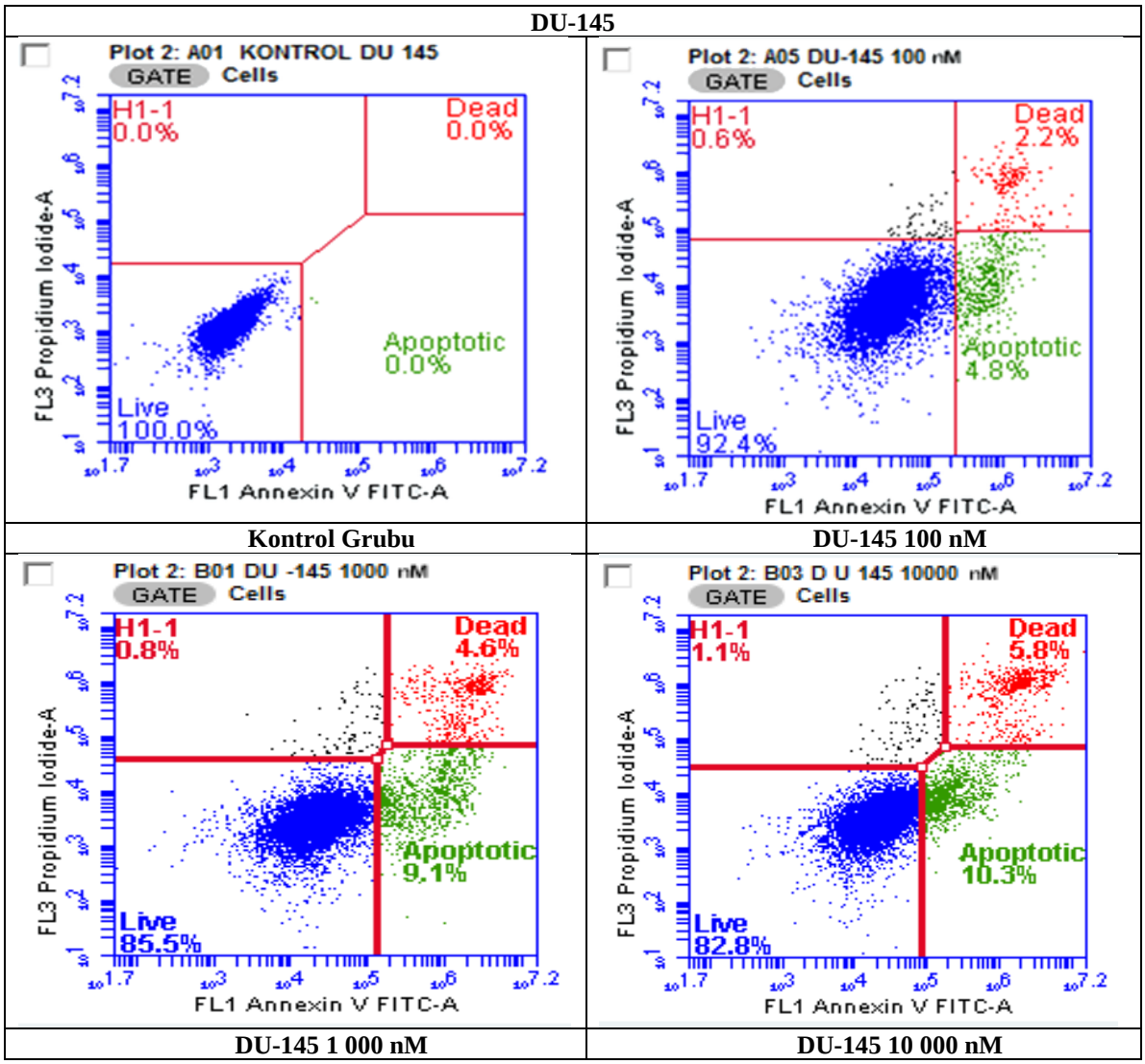
24 saatlik kalsitriol maruziyeti sonrası DU-145 hücrelerinin inverted mikroskop altında fotoğrafları çekilerek görüntüler elde edildi. Elde edilen görüntüler kontrolle karşılaştırılarak mikroskop altında görsel olarak değerlendirildi. DU-145 hücreleri üzerinde artan doz oranı ile orantılı olarak anlamlı fark gözlemlenmemiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. 24. saat sonunda DU-145 hücre hatları üzerine kalsitiriol uygulanan ve uygulama yapılmayan gruplara ait invert mikroskop görüntüsü. Kontrol grubu, 100 nanomolar, 1 000 nanomolar, 10 000 nanomolar konsantrasyonda kalsitiriol uygulanan grup

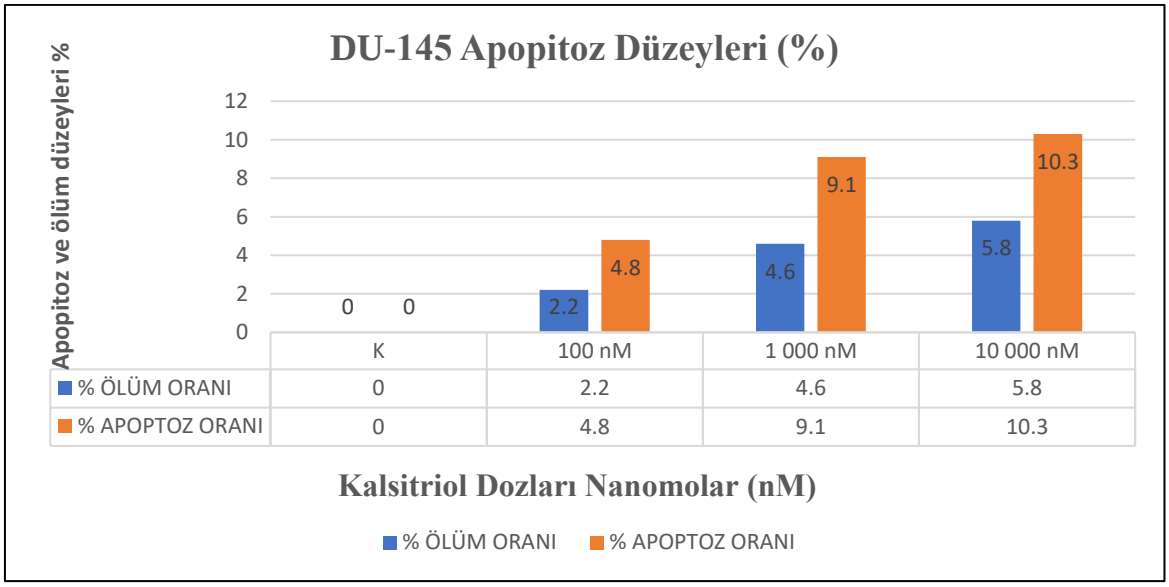
4.7. Hücre Ölümü Değerlendirilmesi için Annexin V/ Propidium İyodür Apopitoz Testi DU-145 Hücre Hattı Apopitoz Bulguları

Anneksin V testi için, kontrol grubunda yaşam değeri %100 iken, 24. saat kalsitriol uygulaması sonucunda DU-145 hücre hattı için yaşam değeri 100 nM, 1 000 nM ve 10 000 nM kalsitriol uygulanması sonucu sırası ile %92,4, %85,5 ve %82,8 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10**.** DU-145 hücre hattı, yüzde (%) apopitoz düzeyleri

Anneksin V testi için, kontrol grubunda ölüm ve apopitoz değeri %0 iken, 24 saat kalsitriol maruziyeti sonrasında DU-145 hücre hattı için 100 nM'de ölüm değeri %2,2, apopitoz değeri %4,8; 1 000 nM'de ölüm değeri %4,6, apopitoz değeri %9,1; 10 000 nM'de ölüm değeri %5,8, apopitoz değeri %10,3 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. DU-145 hücre hattı 24 saat kalsitriol maruziyeti sonrası apopitoz yüzde (%) düzeyleri

4.8. DU-145 Hücre Hattı RT-qPCR Gen Ekspresyonu Bulguları

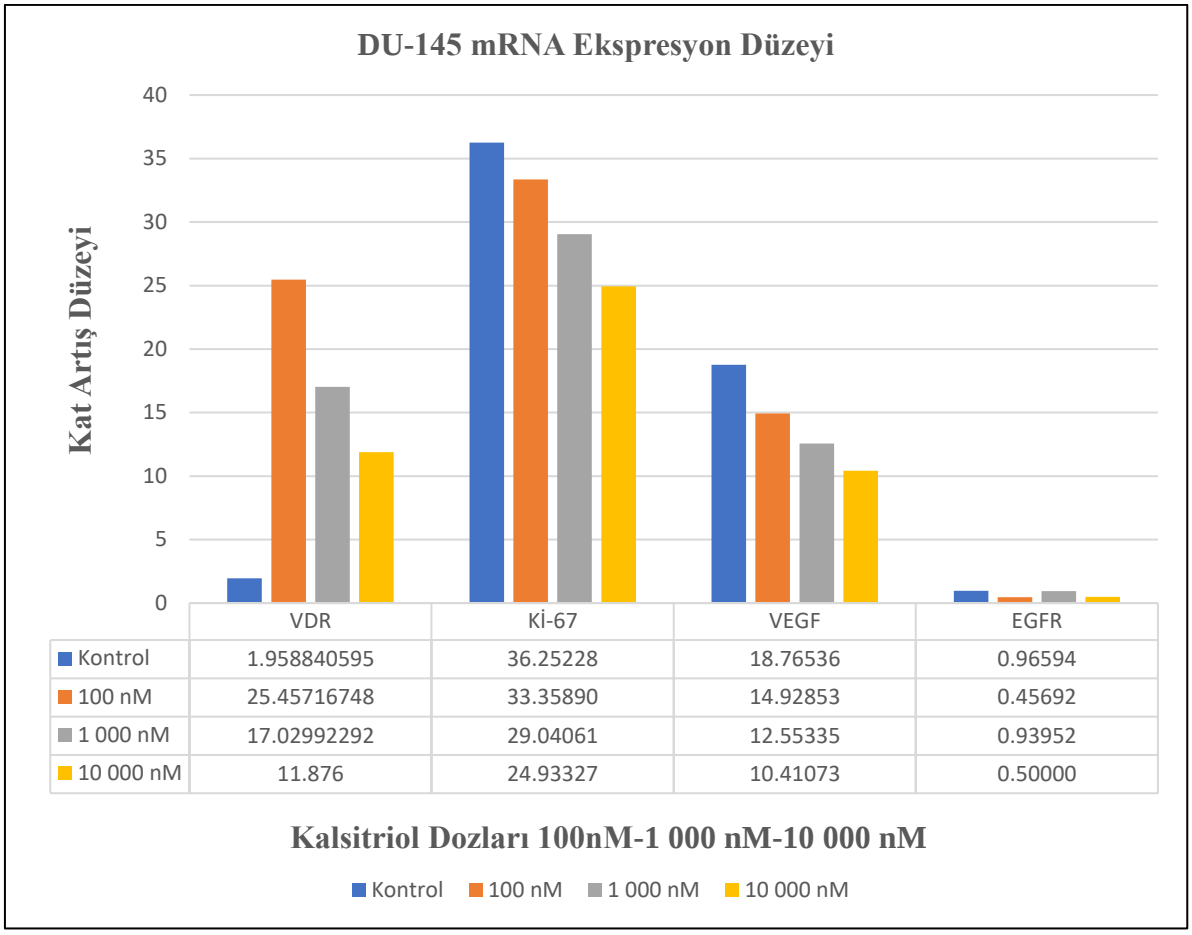
RT-qPCR yöntemi ile 24 saat kalsitriole maruz bırakılan DU-145 hücrelerinde VDR, Ki-67, VEGF, EGFR ekspresyon ölçümleri değerlendirilmiştir. Hedef genlerin ifade düzeyleri GAPDH mRNA ifade düzeyi baz alınarak normalize edilmiştir. Hedef genlerin ekspresyonunu tespit etmek için $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi uygulanmıştır.

VDR ekspresyon düzeyi DU-145 hücre hattı için kontrol grubunda 1,959±1,07; 100 nM'de 25,452±0,03; 1 000 nM'de 17,021±0,49; 10 000 nM'de 11,876±0,03 olarak bulunmuştur (Şekil 4.12).

Ki-67 ekspresyon düzeyi DU-145 hücre hattı için kontrol grubunda 36,252±1,13; 100 nM'de 33,359±0,04; 1 000 nM'de 29,041±0,05; 10 000 nM'de 24.933±1,27 olarak bulunmuştur (Şekil 4.12).

VEGF ekspresyon düzeyi DU-145 hücre hattı için kontrol grubunda 18,765±1,31; 100 nM'de 14,929±1,75; 1 000 nM'de 12,553±1,38; 10 000 nM'de 10,411±1,15 olarak bulunmuştur (Şekil 4.12).

EGFR ekspresyon düzeyi DU-145 hücre hattı için kontrol grubunda 0,966±2,36; 100 nM'de 0,457±0,79; 1 000 nM'de 0,940±1,90; 10 000 nM'de 0,500±0,13 olarak bulunmuştur (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. DU-145 hücrelerinde 24 saat kalsitriol uygulaması sonrası VDR, Ki-67, VEGF, EGFR ekspresyon düzeyleri. Hedef genlerin ifade düzeyleri GAPDH mRNA ifade düzeyi baz alınarak normalize edildi

Çizelge 4.2. DU-145 RT-qPCR analizi sonuçları

DU-145	Kontrol gRUBU	100 nM	1000 nM	10000 nM
	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD
VDR	4,199±1,07	7,945±0,03[a]	9,781±0,49[a]	11,876±0,03[a]
Kİ-67	36,252±1,13	33,359±0,04	29,041±0,05[a]	24.933±1,27[a]
VEGF	18,765±1,31	14,929±1,75[a]	12,553±1,38[a]	10,411±1,15[a,b]
EGFR	0,966±2,36	0,457±0,79	0,940±1,90	0,500±0,13

[a] :p<0,05 Kontrol Grubu ile 100 ,1 000 ve 10 000 nM 'lik dozların karşılaştırılmasından elde edilen anlamlılık düzeyi.
[b] :p<0,05 100 nM'lik doz ile 1 000 ve 10 000 nM 'lik dozların karşılaştırılmasından elde edilen anlamlılık düzeyi.
[c] :p<0,05 1 000 nM'lik doz ile 10 000 nM 'lik dozun karşılaştırılmasından elde edilen anlamlılık düzeyi.

DU-145 hücre hattında;

VDR mRNA ekspresyon düzeyi 100 nM'lık dozda kontrol grubuna göre ortalama 1,9 kat artmıştır ($p<0,05$). 1 000 nM'lık dozda kontrol grubuna göre ortalama 2,3 kat artmıştır ($p<0,05$). 10 000 nM'lık dozda kontrol grubuna göre ortalama 2,8 kat artmıştır ($p<0,05$). 100 nM'lık doz ile 1 000 nM'lık dozu kıyasladığımızda; istatistiksel anlamda bir artış ya da azalış gözlemlenmemiştir ($p>0,05$). 100 nM ile 10 000 nM kıyaslandığında; istatistiksel anlamda bir artış ya da azalış gözlemlenmemiştir ($p>0,05$). 1 000 nM ile 10 000 nM kıyaslandığında istatistiksel anlamda bir artış ya da azalış gözlemlenmemiştir (Çizelge 4.2) ($p>0,05$).

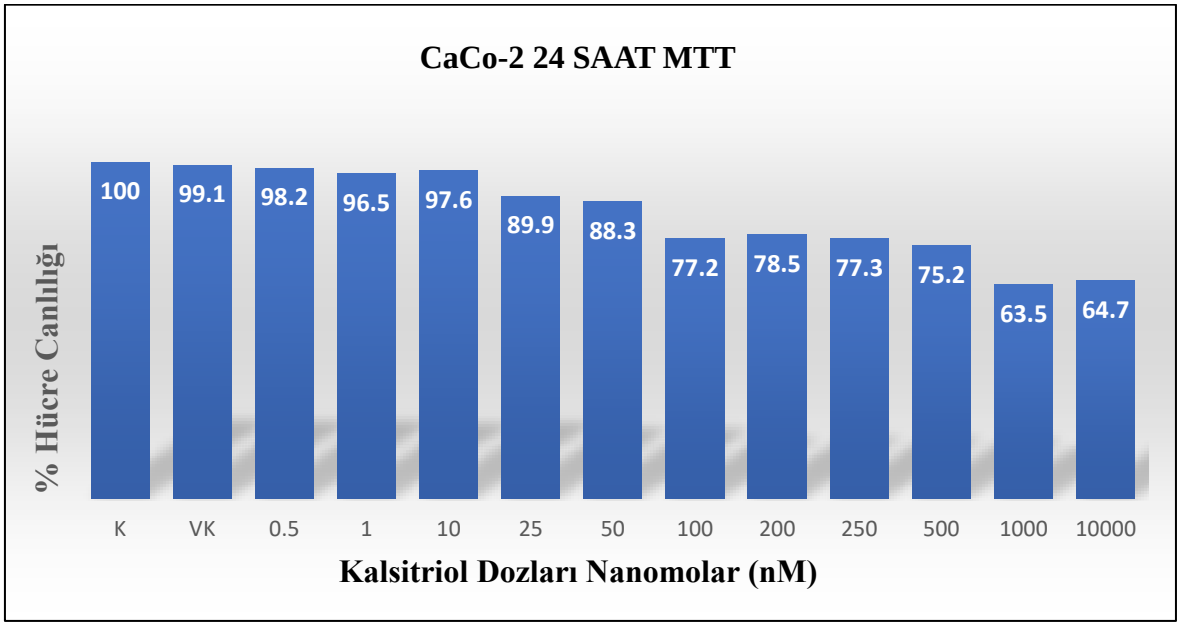
Ki-67 mRNA ekspresyon düzeyi 100 nM'lık dozda kontrol grubuna göre; istatistiksel anlamda bir artış ya da azalış gözlemlenmemiştir ($p>0,05$). 1 000 nM'lık dozda kontrol grubuna göre ortalama 1,2 kat azalmıştır ($p<0,05$). 10 000 nM'lık dozda kontrol grubuna göre ortalama 1,4 kat azalmıştır ($p<0,05$). 100 nM'lık doz ile 1 000 nM'lık dozu kıyaslandığında; istatistiksel anlamda bir artış ya da azalış gözlemlenmemiştir ($p>0,05$). 100 nM ile 10 000 nM lık dozu kıyaslandığında; istatistiksel anlamda bir artış ya da azalış gözlemlenmemiştir ($p>0,05$). 1 000 nM ile 10 000 nM lık dozu kıyaslandığında; istatistiksel anlamda bir artış ya da azalış gözlemlenmemiştir (Çizelge 4.2) ($p>0,05$).

VEGF mRNA ekspresyon düzeyi 100 nM'lık dozda kontrol grubuna göre ortalama 1,2 kat azalmıştır ($p<0,05$). 1 000 nM'lık dozda kontrol grubuna göre ortalama 1,5 kat azalmıştır ($p<0,05$). 10 000 nM'lık dozda kontrol grubuna göre ortalama 1,8 kat azalmıştır ($p<0,05$). 100 nM ile 1 000 nM kıyaslandığında istatistiksel anlamda bir artış ya da azalış gözlemlenmemiştir ($p>0,05$). 100 nM ile 10 000 nM kıyaslandığında ;10 000 nM'de VEGF mRna ekspresyon düzeyi 1,4 kat azalmıştır ($p<0,05$). 1 000 nM ile 10 000 nM'lık dozu kıyaslandığında istatistiksel anlamda bir artış ya da azalış gözlemlenmemiştir (Çizelge 4.2) ($p>0,05$).

EGFR mRNA ekspresyon düzeyinde hiçbir dozda istatistiksel olarak anlamlı bir artış ya da azalış gözlemlenmemiştir (Çizelge 4.2) ($p>0,05$).

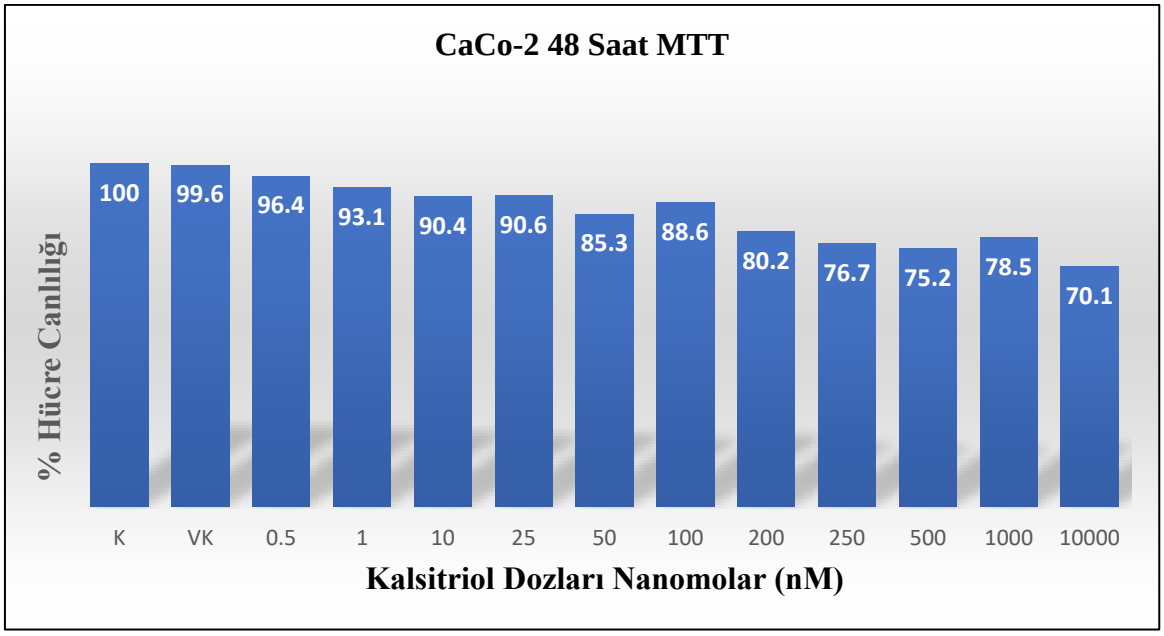
4.9. 1.25(OH)2D3 'ün Caco-2 Hücre Hattı Üzerindeki Etkisinin MTT Testi İle Belirlenmesi

Kalsitriol'ün CaCo-2 hücre hattı üzerindeki 24 saatlik maruziyeti sonrası proliferasyonun kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalması 100 nM düzeyinde başlamıştır. 100 nM kalsitriol hücre canlılığını %100±2.83'den (p<0,001) %77,2 ±2.71'ye (p<0,001); 200 nM kalsitriol %78,5±3.01'e (p<0,002); 250 nM kalsitriol %77,3±1.84'ye (p<0,002); 500 nM kalsitriol %75,2±2.56'e (p<0,003); 1.000 nM kalsitriol %63,5±3.14'e (p<0,001); 10.000 nM kalsitriol %64,7±1.98'e (p<0,001) düşürmüştür (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. CaCo-2 hücre hattı 24 saat kalsitriol uygulaması ile yüzde (%) hücre canlılığı. VK (Kalsitiriolü çözerken kullandığımız etanol miktarı olup direk hücre üzerine uygulanmıştır.) Dozlar nanomolar olarak hazırlanmıştır

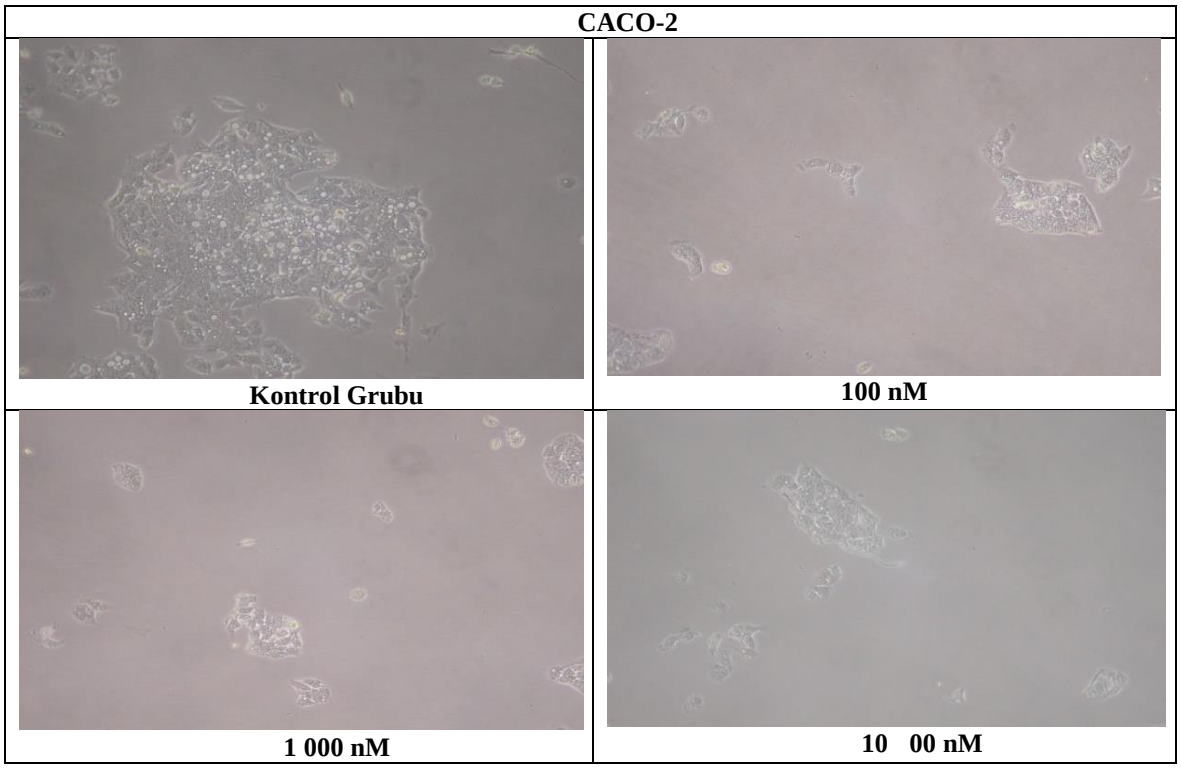
Kalsitriol'ün CaCo-2 hücre hattı üzerindeki 48 saatlik maruziyeti sonrası proliferasyonun kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalması 50 nM düzeyinde başlamıştır. 50 nM kalsitriol hücre canlılığını %100±3,22'den (p<0,001) %85,3 ±1,96'e (p<0,001); 100 nM kalsitriol %88,6 ±2,31'e (p<0,001); 200 nM kalsitriol %80,2±2,67'e (p<0,002); 250 nM kalsitriol %76,7±2,17' ya (p<0,003); 500 nM kalsitriol %75,2±3.37'e (p<0,005); 1.000 nM kalsitriol %78,5±2.47'e (p<0,005); 10.000 nM kalsitriol %70,1±2.43'e (p<0,005) düşürmüştür (Şekil 4.13).



Şekil 4.14. CaCo-2 hücre hattı 48 saat kalsitriol uygulaması ile yüzde (%) hücre canlılığı. VK (Kalsitiriolü çözerken kullandığımız etanol miktarı olup direk hücre üzerine uygulanmıştır.) Dozlar nanomolar olarak hazırlanmıştır

4.10. CaCo-2 Hücre Hattı İnvert Mikroskop Görüntüsü

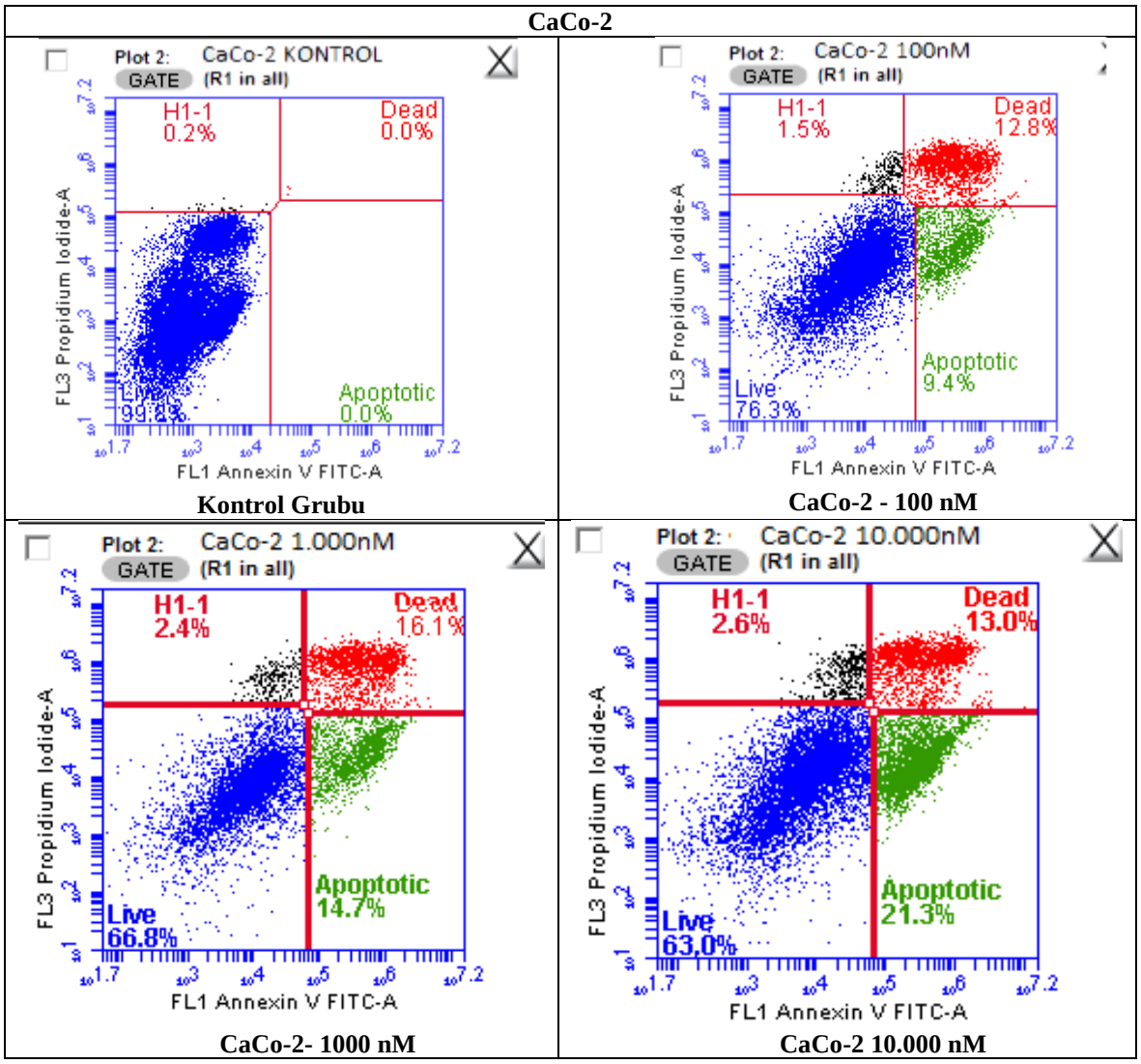
24 saatlik kalsitriol maruziyeti sonrası CaCo-2 hücrelerinin inverted mikroskop altında fotoğrafları çekilerek görüntüler elde edildi (Şekil 4.15). Elde edilen görüntüler kontrolle karşılaştırılarak mikroskop altında görsel olarak değerlendirildi. CaCo-2 hücreleri üzerinde 100 nM, 1000 nM ve 10000 nM'de doz artışı ile uyumlu olarak hücre sayısında azalış gözlemlendi.



Şekil 4.15**.** 24. saat sonunda CaCo-2 hücre hatları üzerine kalsitiriol uygulanan ve uygulama yapılmayan gruplara ait invert mikroskop görüntüsü. Kontrol grubu, 100 nanomolar, 1 000 nanomolar, 10 000 nanomolar konsantrasyonda kalsitiriol uygulanan grup

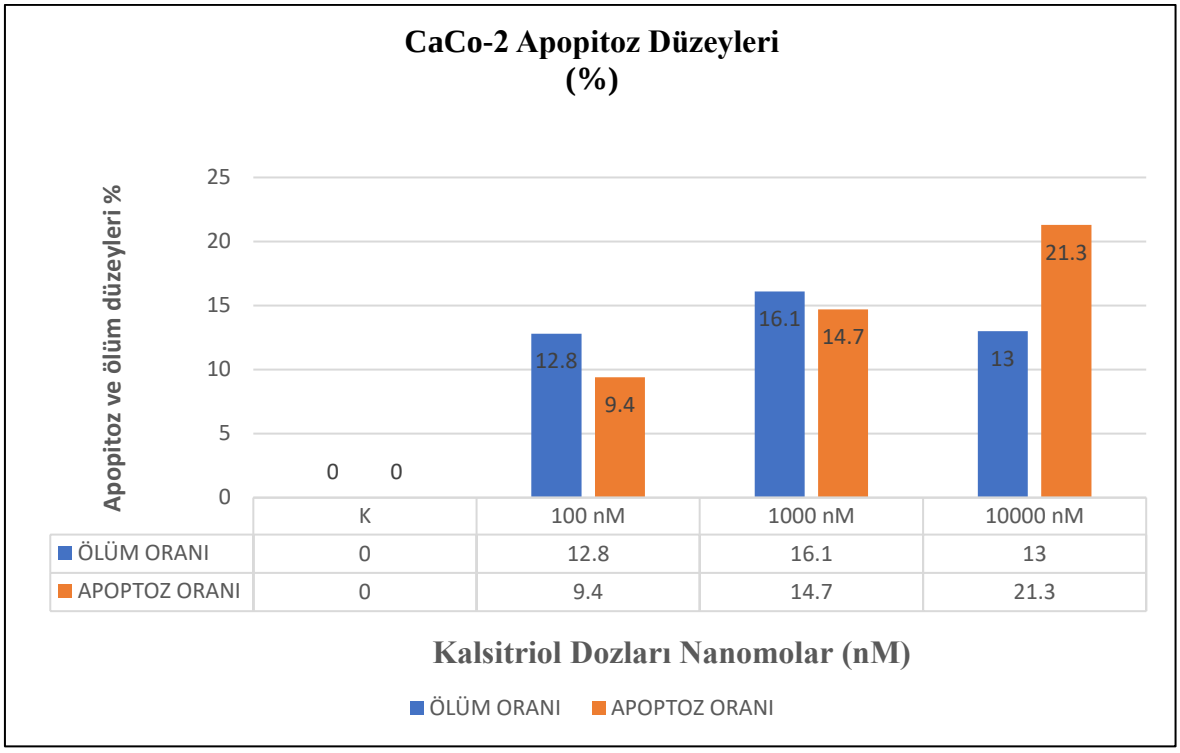
4.11. CaCo-2 Hücre Ölümü Değerlendirilmesi İçin Annexin V/Prodidium İyodür Apopitoz Testi CaCo-2 Hücre Hattı Apopitoz Bulguları

Anneksin V testi için, kontrol grubunda yaşam değeri %99,8 iken, 24. saat kalsitriol uygulaması sonucunda CaCo-2 hücre hattı için 100 nM,1 000 nM ve 10 000 nM'da sırası ile %76,3, %66,8 ve %63,0 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.16).



Şekil 4.16**.** CaCo-2 hücre hattı, yüzde (%) apopitoz düzeyleri

Anneksin V testi için, kontrol grubunda ölüm ve apopitoz değeri %0 iken, 24 saat kalsitriol maruziyeti sonrasında CaCo-2 hücre hattı için 100 nM'de ölüm değeri %12,8, apopitoz değeri %9,4; 1 000 nM'de ölüm değeri %16,1, apopitoz değeri %14,7; 10 000 nM'de ölüm değeri %13, apopitoz değeri %21,3 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. CaCo-2 hücre hattı 24 saat kalsitriol maruziyeti sonrası apopitoz yüzde (%) düzeyleri

4.12. CaCo-2 Hücre Hattı RT-qPCR Gen Ekspresyonu Bulguları

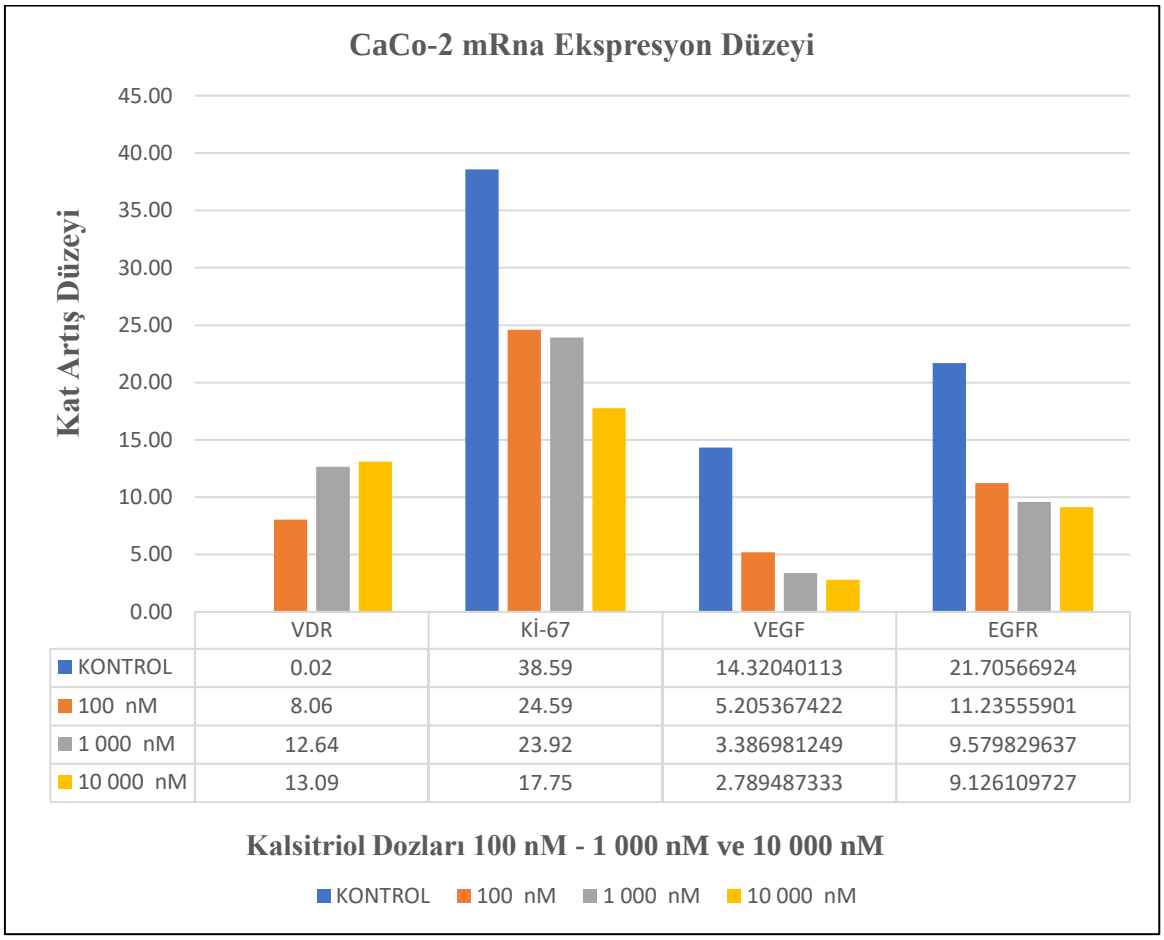
RT-qPCR yöntemi ile 24 saat kalsitriole maruz bırakılan CaCo-2 hücrelerinde VDR, Ki-67, VEGF, EGFR ekspresyon ölçümleri değerlendirilmiştir. Hedef genlerin ifade düzeyleri GAPDH mRNA ifade düzeyi baz alınarak normalize edilmiştir. Hedef genlerin ekspresyonunu tespit etmek için $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi uygulanmıştır.

VDR ekspresyon düzeyi CaCo-2 hücre hattı için kontrol grubunda 0,024±0,23; 100 nM'de 8,056±0,54; 1 000 nM'de 12,641±1,53; 10 000 nM'de 13,086±1,53 olarak bulunmuştur (Şekil 4.18).

Ki-67 ekspresyon düzeyi CaCo-2 hücre hattı için kontrol grubunda 38,586±2,54; 100 nM'de 24,590±0,14; 1 000 nM'de 23,918±0,05; 10 000 nM'de 17,753±2,03 olarak bulunmuştur (Şekil 4.18).

VEGF ekspresyon düzeyi CaCo-2 hücre hattı için kontrol grubunda 14,320±1,12; 100 nM'de 5,205±2,01±1,75; 1 000 nM'de 3,387±1,40; 10 000 nM'de 2,789±0,19 olarak bulunmuştur (Şekil 4.18).

EGFR ekspresyon düzeyi CaCo-2 hücre hattı için kontrol grubunda 21,706±2,43; 100 nM'de 11,236±1,98; 1 000 nM'de 9,580±0,47; 10 000 nM'de 9,126±2,08 olarak bulunmuştur (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. CaCo-2 hücrelerinde 24 saat kalsitriol uygulaması sonrası VDR, Ki-67, VEGF, EGFR ekspresyon düzeyleri. Hedef genlerin ifade düzeyleri GAPDH mRNA ifade düzeyi baz alınarak normalize edildi

Çizelge 4.3. CaCo-2 RT-qPCR analizi sonuçları

CACO2	Kontrol	100 nM	1000 nM	10000 nM
	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD
VDR	0,024±0,23	8,056±0,54[a]	12,641±1,53 [a,b]	13,086±1,53 [a,b]
Kİ-67	38,586±2,54	24,590±0,14[a]	23,918±0,05[a]	17,753±2,03 [a,b,c]
VEGF	14,320±1,12	5,205±2,01[a]	3,387±1,40 [a,b]	2,789±0,19 [a,b]
EGFR	21,706±2,43	11,236±1,98[a]	9,580±0,47[a]	9,126±2,08[a]

[a] :p<0,05 Kontrol Grubu ile 100, 1 000 ve 10 000 nM'lik dozların karşılaştırılmasından elde edilen anlamlılık düzeyi.
[b] :p<0,05 100 nM'lik doz ile 1 000 ve 10 000 nM 'lik dozların karşılaştırılmasından elde edilen anlamlılık düzeyi.
[c] :p<0,05 1 000 nM'lik doz ile 10 000 nM'lik dozun karşılaştırılmasından elde edilen anlamlılık düzeyi.

CaCo-2 hücre hattında;

VDR mRNA ekspresyon düzeyi 100 nM'lık dozda kontrol grubuna göre ortalama 8 kat artmıştır (p<0,05). 1 000 nM'lık dozda kontrol grubuna göre ortalama 12 kat artmıştır (p<0,05). 10 000 nM'lık dozda kontrol grubuna göre ortalama 13 kat artmıştır (p<0,05). 100 nM'lık doz ile 1 000 nM'lık dozu kıyasladığımızda 1 000 nM'de VDR mRNA ekspresyon düzeyi 1,5 kat artmıştır (p<0,05). 100 nM ile 10 000 nM kıyaslandığında, 10 000 nM'de VDR mRNA ekspresyon düzeyi 1,6 kat artmıştır (p<0,05). 1 000 nM ile 10 000 nM kıyaslandığında ise istatistiksel anlamda bir artış ya da azalış gözlemlenmemiştir (Çizelge 4.3) (p>0,05).

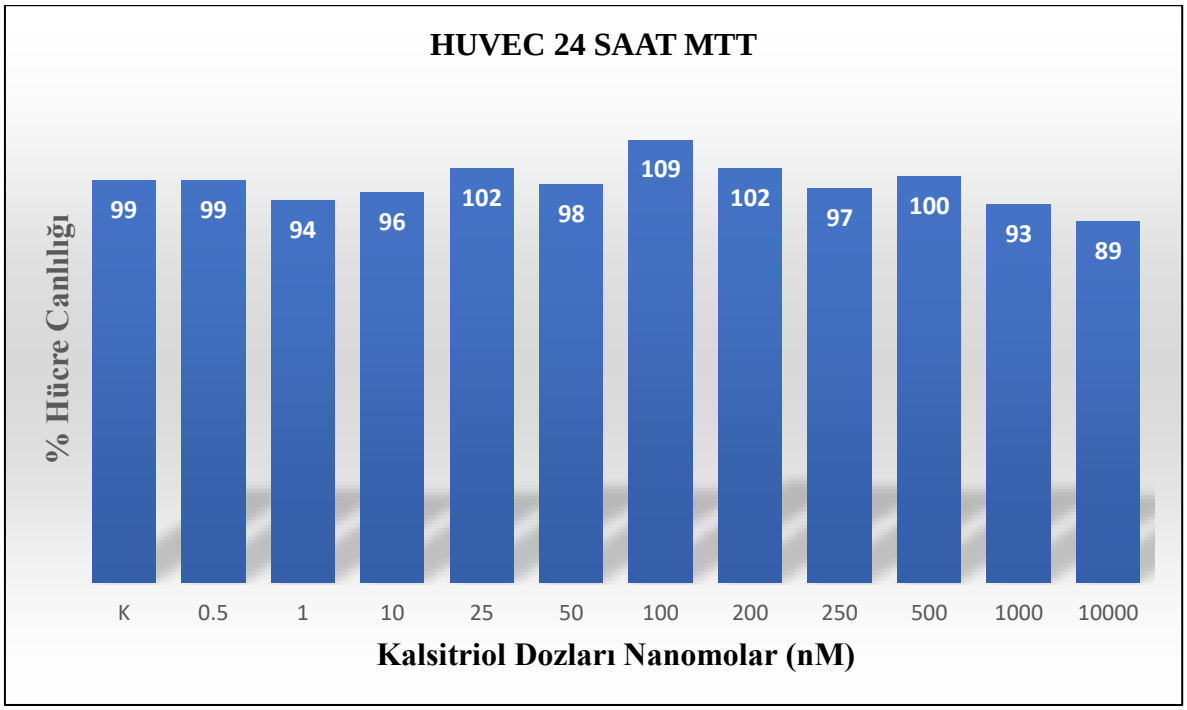
Ki-67 mRNA ekspresyon düzeyi 100 nM'lık dozda kontrol grubuna göre ortalama 1,5 kat azalmıştır (p<0,05). 1 000 nM'lık dozda kontrol grubuna göre ortalama 1,6 kat azalmıştır (p<0,05). 10 000 nM'lık dozda kontrol grubuna göre ortalama 2,2 kat azalmıştır (p<0,05). 100 nM'lık doz ile 1 000 nM'lık dozu kıyaslandığında istatistiksel anlamda bir artış ya da azalış gözlemlenmemiştir (p>0,05). 100 nM ile 10 000 nM lık dozu kıyaslandığında, 10 000 nM'de Ki-67 mRNA ekspresyon düzeyi 2,2 kat azalmıştır (p<0,05). 1 000 nM ile 10 000 nM lık dozu kıyaslandığında, 10 000 nM'de Ki-67 mRNA ekspresyon düzeyi 1,3 kat azalmıştır (Çizelge 4.3) (p<0,05).

VEGF mRNA ekspresyon düzeyi 100 nM'lık dozda kontrol grubuna göre ortalama 2,8 kat azalmıştır ($p<0,05$). 1 000 nM'lık dozda kontrol grubuna göre ortalama 4,6 kat azalmıştır ($p<0,05$). 10 000 nM'lık dozda kontrol grubuna göre ortalama 7 kat azalmıştır ($p<0,05$). 100 nM ile 1 000 nM kıyaslandığında, 1 000 nM'de VEGF mRNA ekspresyon düzeyi yaklaşık 1,6 kat azalmıştır ($p<0,05$). 100 nM ile 10 000 nM kıyaslandığında, 10 000 nM'de VEGF mRNA ekspresyon düzeyi 2 kat azalmıştır ($p<0,05$). 1 000 nM ile 10 000 nM lık dozu kıyaslandığında istatistiksel anlamda bir artış ya da azalış gözlemlenmemiştir (Çizelge 4.3) ($p>0,05$).

EGFR mRNA ekspresyon düzeyi 100 nM'lık dozda kontrol grubuna göre ortalama 1,9 kat azalmıştır ($p<0,05$). 1 000 nM'lık dozda kontrol grubuna göre ortalama 2,3 kat azalmıştır ($p<0,05$). 10 000 nM'lık dozda kontrol grubuna göre ortalama 2,3 kat azalmıştır ($p<0,05$). 100 nM'lık doz ile 1 000 nM'lık dozu kıyasladığımızda istatistiksel anlamda bir artış ya da azalış gözlemlenmemiştir ($p>0,05$). 100 nM ile 10 000 nM kıyaslandığında istatistiksel anlamda bir artış ya da azalış gözlemlenmemiştir ($p>0,05$). 1 000 nM ile 10 000 nM lık dozu kıyaslandığında istatistiksel anlamda bir artış ya da azalış gözlemlenmemiştir (Çizelge 4.3) ($p>0,05$).

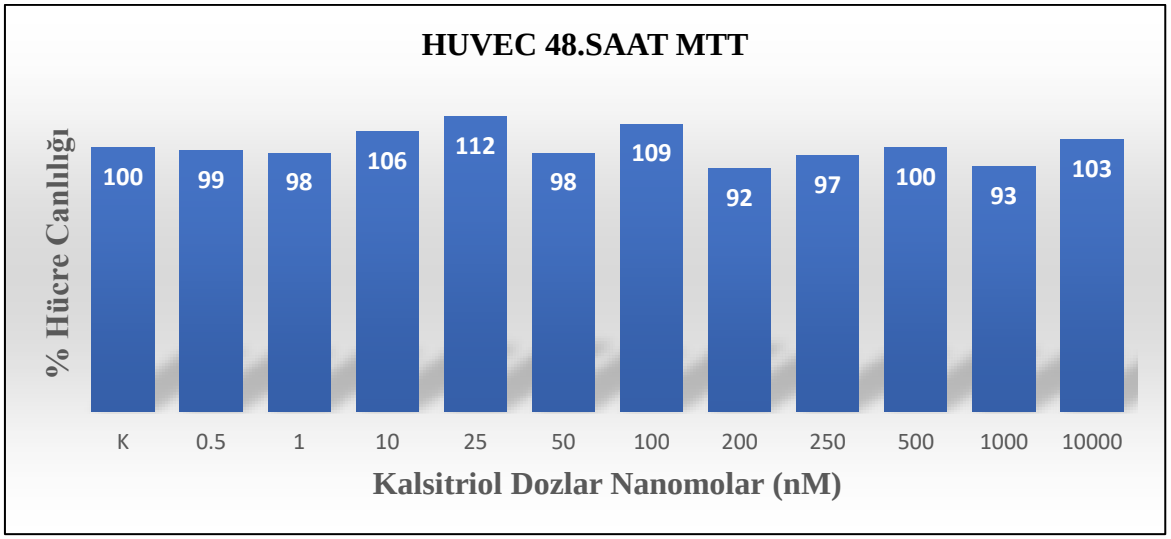
4.13. 1.25(OH)$_2$D$_3$ 'ün HUVEC Hücre Hattı Üzerindeki Etkisinin MTT Testi ile Belirlenmesi

Kalsitriolün HUVEC hücre hattı üzerindeki 24 saatlik maruziyeti sonrası proliferasyonun azalması anlamlı olarak 10 000 nM seviyesinde başladığı görüldü. Kontrol grubuna göre 10 000 nM kalsitriol hücre canlılığını %100±2.12'den ($p<0,002$); %89±1.73'e ($p<0,002$); düşürdüğü tespit edildi (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. HUVEC hücre hattı 24 saat kalsitriol uygulaması ile % hücre canlılığı. VK (Kalsitiriolü çözerken kullandığımız etanol miktarı olup direk hücre üzerine uygulanmıştır.) Dozlar nanomolar olarak hazırlanmıştır

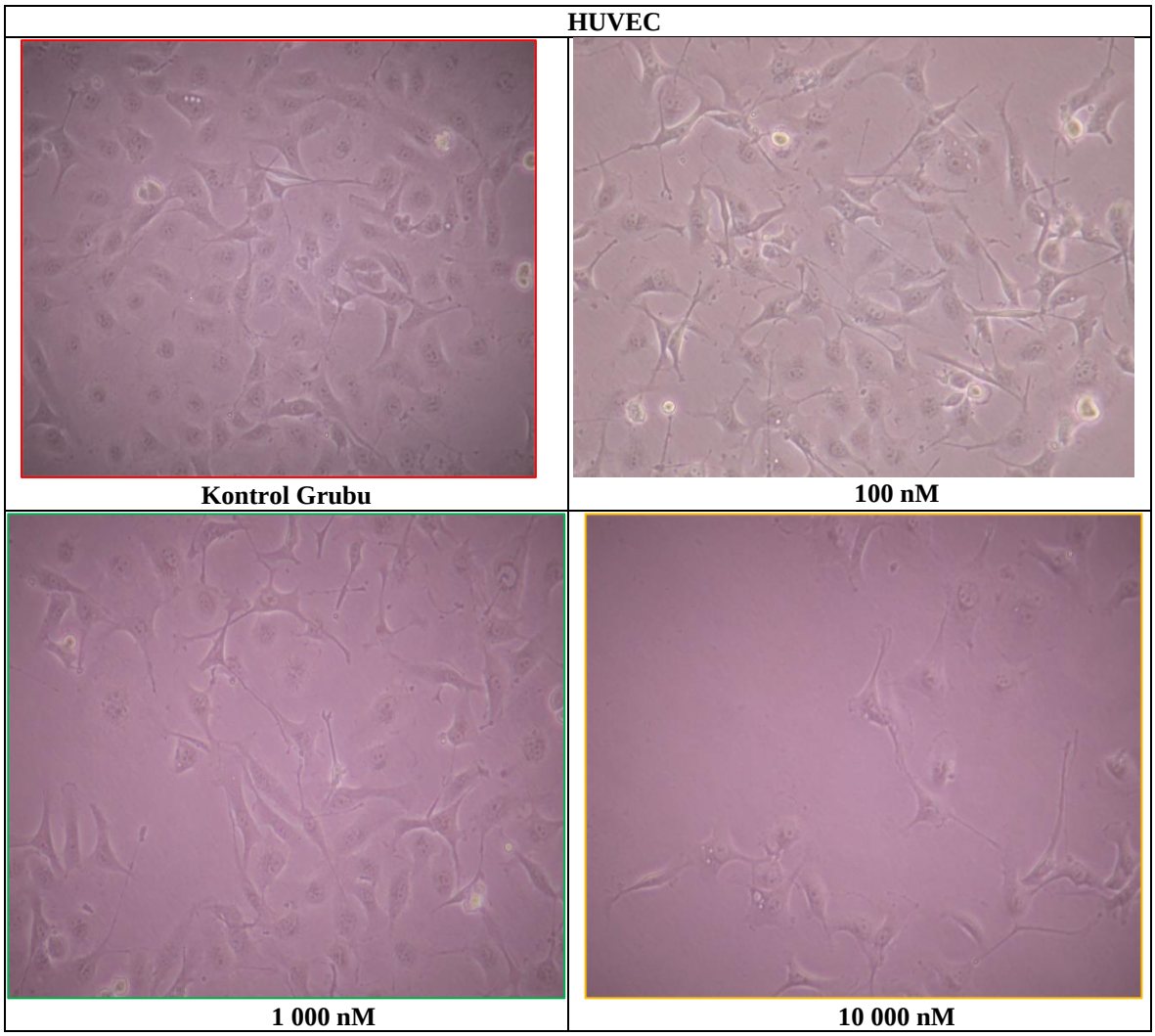
Kalsitriolün HUVEC hücre hattı üzerindeki 48 saatlik maruziyeti sonrası proliferasyonun azalması gözlemlenmemiştir (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. HUVEC hücre hattı 48 saat kalsitriol uygulaması ile yüzde (%) hücre canlılığı. Dozlar nanomolar olarak hazırlanmıştır

4.14. HUVEC Hücre Hattı İnvert Mikroskop Görüntüsü

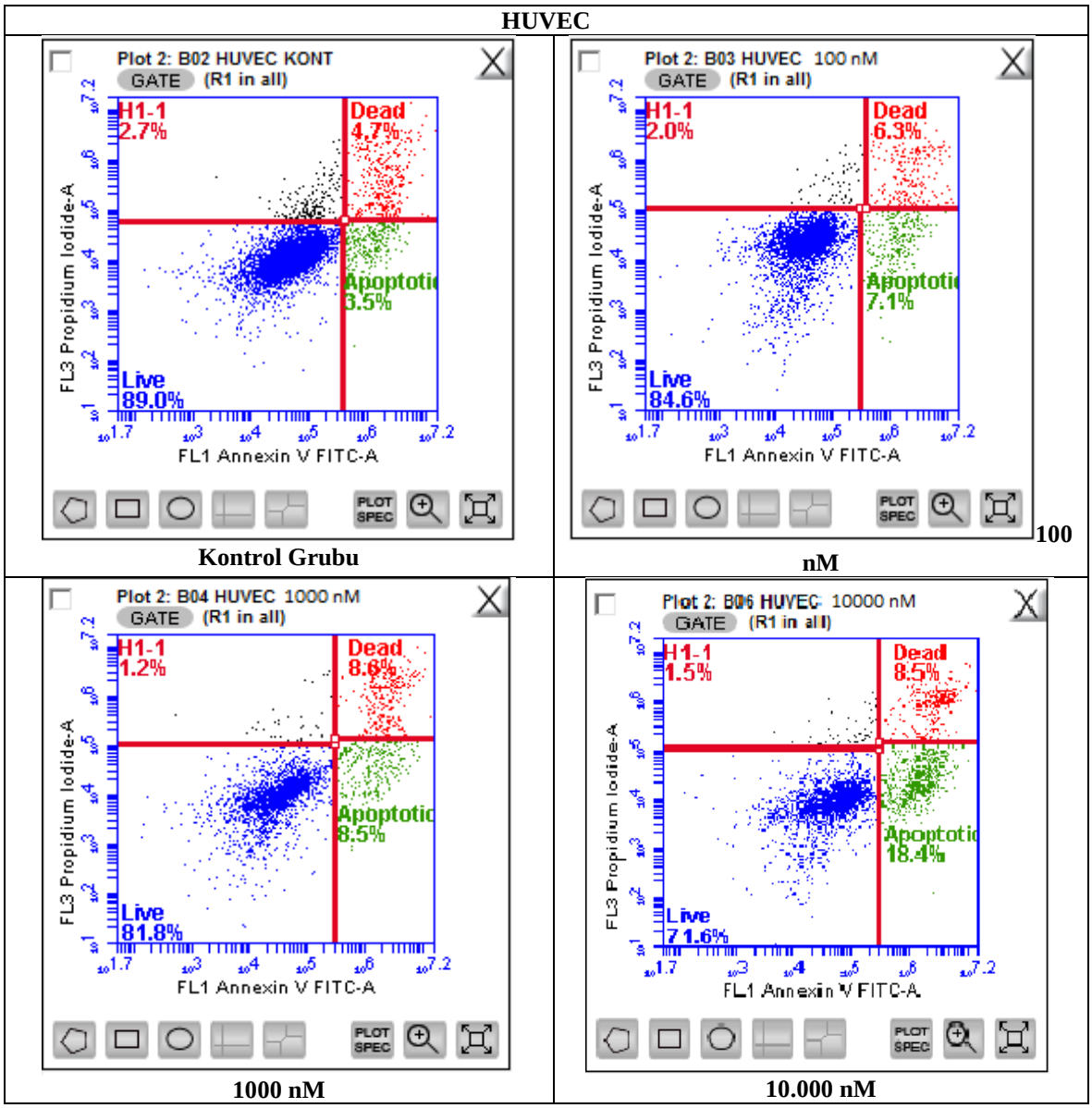
24 saatlik kalsitriol maruziyeti sonrası HUVEC hücrelerinin inverted mikroskop altında fotoğrafları çekilerek görüntüler elde edildi (Şekil 4.21). Elde edilen görüntüler kontrolle karşılaştırılarak değerlendirildi. HUVEC hücreleri üzerinde 10 000 nM ‘de anlamlı azalış gözlemlendi.



Şekil 4.21. 24.saat sonunda HUVEC hücre hatları üzerine kalsitiriol uygulanan ve uygulama yapılmayan gruplara ait invert mikroskop görüntüsü. Kontrol grubu, 100 nanomolar, 1 000 nanomolar, 1000 nanomolar, 10 000 nanomolar konsantrasyonda kalsitiriol uygulanan grup

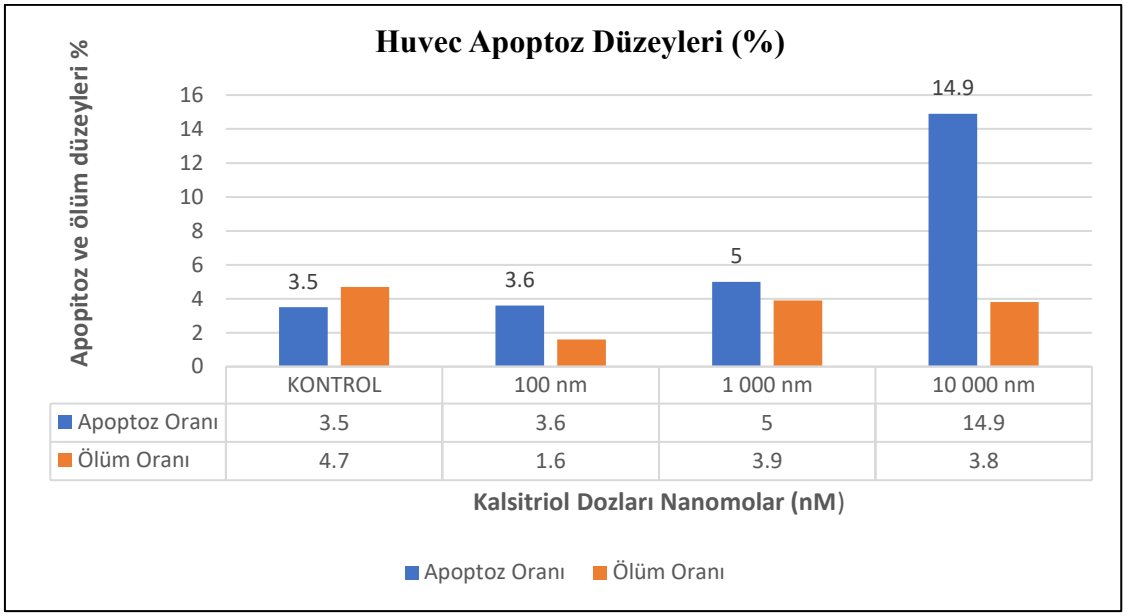
4.15. Hücre Ölümü Değerlendirilmesi için Annexin V/ Propidium İyodür Apopitoz Testi HUVEC Hücre Hattı Apopitoz Bulguları

Anneksin V testi için, kontrol grubunda yaşam değeri %89 iken, 24. saat kalsitriol uygulaması sonucunda HUVEC hücre hattı için 100 nM, 1 000 nM ve 10 000 nM'da sırası ile %84,6, %81,8 ve %71,6 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.22).



Şekil 4.22**.** HUVEC hücre hattı, yüzde (%) apopitoz düzeyleri

Anneksin V testi için, kontrol grubunda apopitoz değeri %3,5 iken, ölüm değeri %4,7'dir. 24. saat kalsitriol uygulaması sonucunda HUVEC hücre hattı için 100 nM'de ölüm değeri %1,6, apopitoz değeri %3,6; 1 000 nM ölüm değeri %3,9, apoptoz değeri %5,0; 10 000 nM ölüm değeri %3,8, apopitoz değeri %14,9 olarak bulundu (Şekil 4.23).

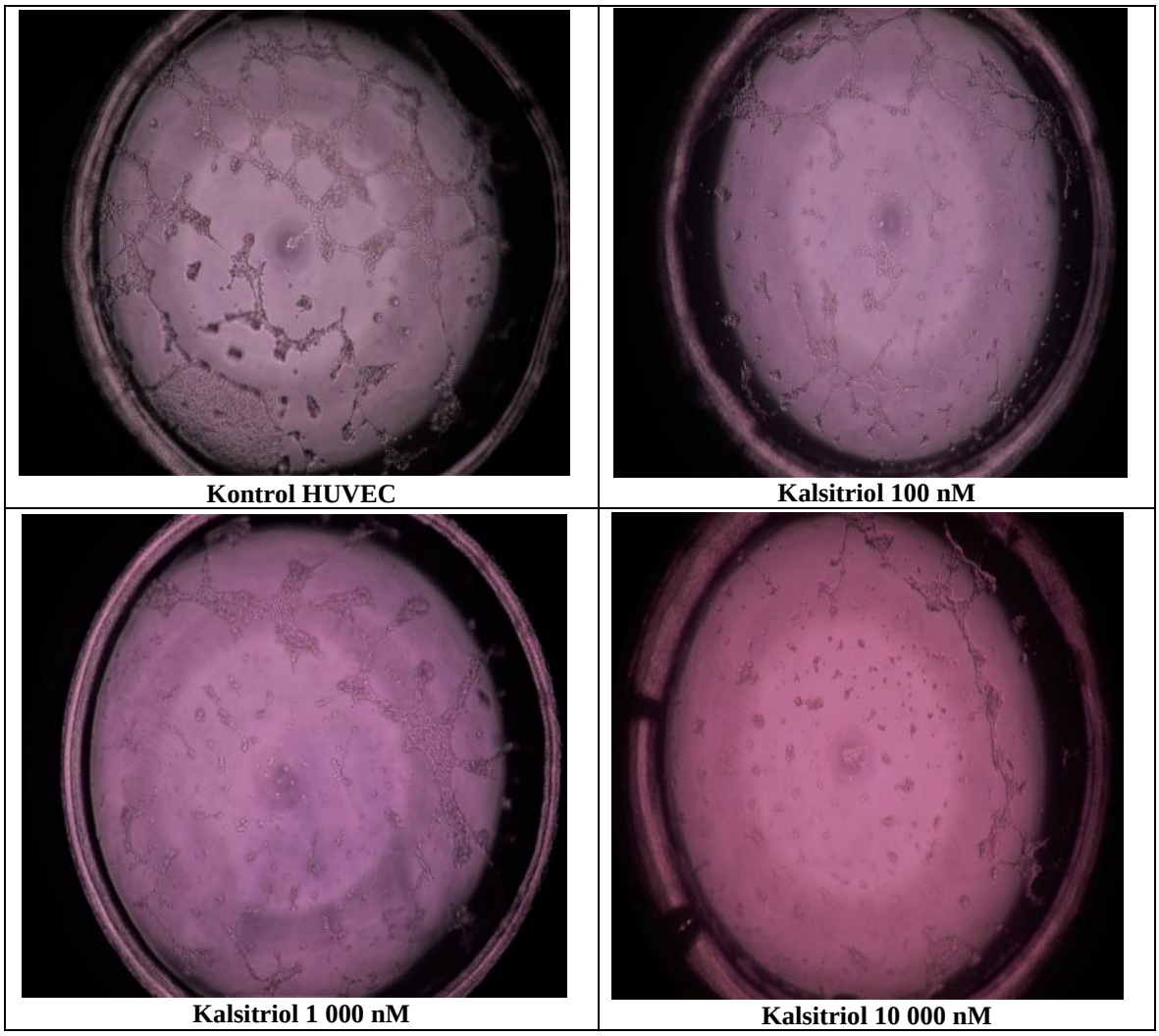


Şekil 4.23**.** HUVEC hücre hattı 24 saat kalsitriol maruziyeti sonrası apopitoz yüzde (%) düzeyleri

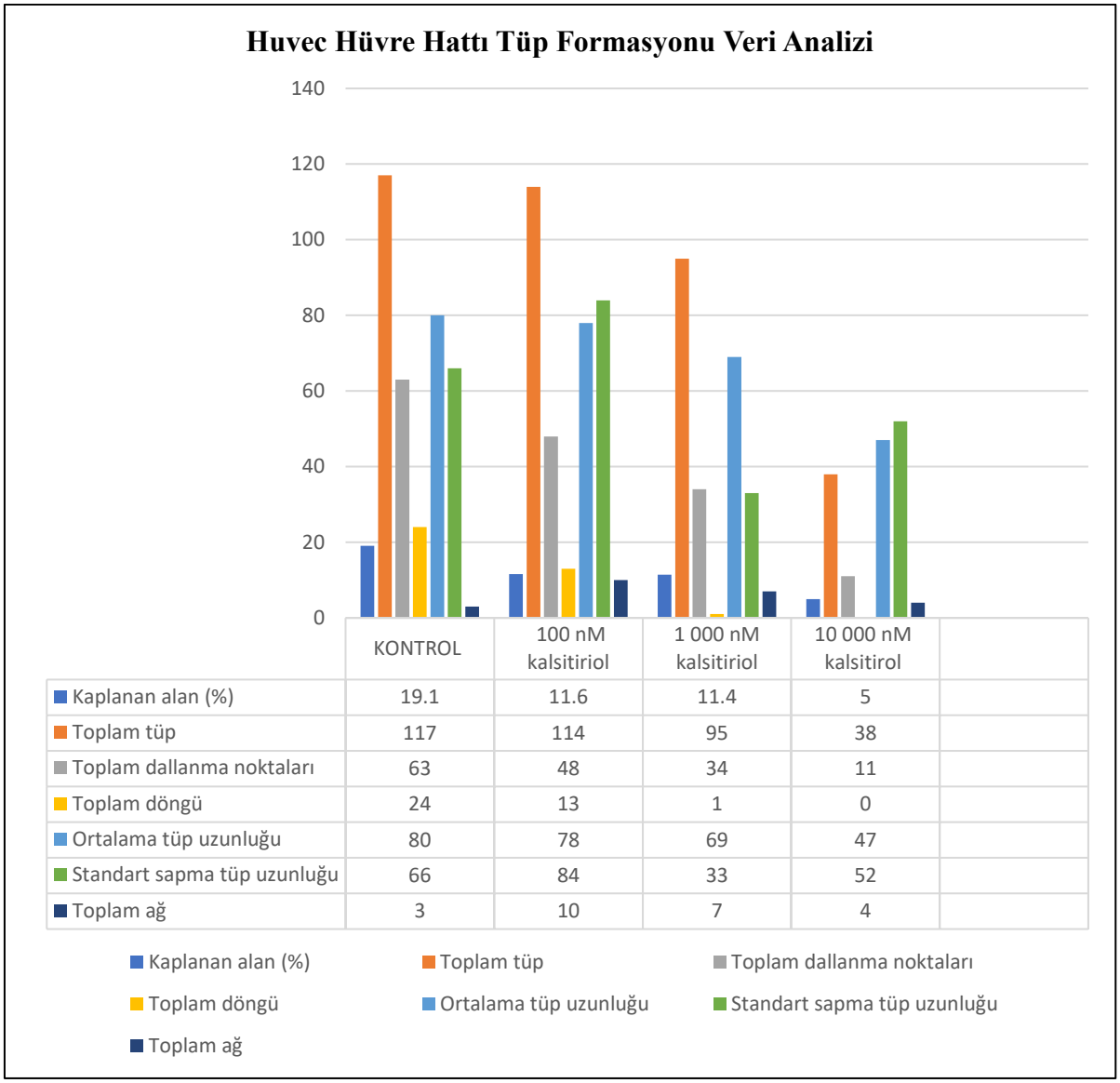
4.16. Anjiyogenez Bulguları

HUVEC hücre hattında, kalsitriol maruziyeti işlemin 18. saatinde tüp oluşumu etkisi tüp oluşum analizi kullanılarak değerlendirildi. İnvert mikroskop altında fotoğrafları çekilerek görüntüler alındı (Şekil 4.24).

Görüntü sonuçları Wimasis görüntüleme analizi tarafından değerlendirildi. (*https://www.wimasis.com/en/WimTube*). Uygulanan tüm dozlarda kaplanan alan, total tüp uzunluğu, total tüp başlıklarında istatistiksel anlamda anlamlı farklar bulundu (Şekil 4.25).



Şekil 4.24**.** HUVEC hücre hattı üzerine uygulanmış kalsitriol dozları ile anjiogenez modeli



	KONTROL	100 nM kalsitiriol	1 000 nM kalsitiriol	10 000 nM kalsitirol
Kaplanan alan (%)	19.1	11.6	11.4	5
Toplam tüp	117	114	95	38
Toplam dallanma noktaları	63	48	34	11
Toplam döngü	24	13	1	0
Ortalama tüp uzunluğu	80	78	69	47
Standart sapma tüp uzunluğu	66	84	33	52
Toplam ağ	3	10	7	4

Şekil 4.25**.** HUVEC hücre hattı tüp formasyonu veri analiz

5. TARTIŞMA

Vitamin D, hücre büyümesini düzenleyen en güçlü hormonlardan biridir ve VDR içeren birçok hücre tipi keşfedilmiştir. Bu reseptörler, 1α,25$(OH)_2D_3$ ile aktive edilebilirler ve normal işleyen hücrelerin farklılaşmasını indüklerler. Hücrenin proliferasyon, anjiyogenez ve metastatik faaliyetlerini inhibe ederler. Akciğer, kolon, böbrek, meme ve prostat gibi kanser modellerinde, vitamin D'nin antiproliferatif bir rol oynadığı belirtilmiştir [44].

Garland ve arkadaşları 2006 yılında ABD'de yaptıkları bir çalışmada prostat, göğüs ve kolon kanserlerinin rastlanma sıklığının enlem ve ırka göre değişiklik gösterdiğini, yeterli vitamin D miktarı ile düşük kanser riski arasında bir ilişki bulunduğunu açıklamışlardır [20].

Epidemiyolojik ve klinik öncesi çalışmalar, D vitamini serum konsantrasyonları ile meme kanserinin gelişimi ve ilerlemesi arasında ters bir ilişki olduğunu göstermektedir. Erken evre meme kanserli hastalarda D vitamini eksikliği de kötü prognozla ilişkilidir [45].

Meme kanseri, kadınlar için kansere bağlı ölümler listesinde ikinci sırada yer almaktadır. Multidisipliner tedavi altında bile, meme kanserli hastaların %25-50'sinde sonuçta metastaz gelişir ve bu da kötü prognoza yol açar [46]. Meme kanseri, dünya çapında kadınlarda en yaygın ve sıklıkla teşhis edilen malignite olmaya devam etmektedir. Son yirmi yılda, erken tanı ve tedavi stratejilerindeki ilerlemeler, genel meme kanseri mortalitesini %30'dan fazla azaltmıştır. Ancak metastazlar geliştikten sonra prognoz kötüdür [45].

Zheng ve arkadaşlarının MCF-7 hücre hattı üzerinde yaptıkları çalışmada, D vitamini veya agonistlerinin hücre hattı üzerine uygulanması sonucunda artmış VDR ifadesi ile karşılaşılmıştır. Artan VDR ekspresyonu hücre büyümesi ve proliferasyonundan sorumlu olan Wnt/β-katenin sinyalini inhibe etmiş ve böylece hücrenin kanser ilacı olarak kullanılan tamoxifene duyarlılığı arttırılmış ve düşük dozla tedavinin önü açılmıştır. Ayrıca tümörijenezi ve metastazı inhibe etmeye veya negatif olarak düzenlemeye yardımcı olan bu yöntem gelecekte meme kanseri kök hücreleri üzerinde vitamin D uygulamasının klinikte kullanımı için yararlı bir yaklaşım olabileceği düşüncesini akla getirmiştir [47].

Çalışmamızda MCF-7 hücreleri üzerine uyguladığımız 1α,25$(OH)_2D_3$'e 24 saat maruziyeti sonrası MTT hücre canlılığı testinde 100 nM'lık kalsitriol hücre canlılığını %84'e; 1 000 nM kalsitriol %68 ve 10 000 nM kalsitriol ise ve %70'e düşürmüştür. 48 saat maruziyet sonrası

ise 100 nM-1 000 nM ve 10 000 nM kalsitriol sırası ile hücre canlılığını %84'e, %70'e ve %65'e düşürmüştür. Sonuçlarımız Zheng ve arkadaşlarının bulgularını destekler nitelikte olup, kalsitriolün neden olduğu antiproliferatif etkiyi göstermektedir.

2018 yılında Zheng W. ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 1α,25$(OH)_2D_3$'ün 0,001 ve 0,1 µM'lık dozlarının MCF-7 hücreleri üzerinde VDR ekspresyonunu aktif hale getirip hücre içerisinde miktarının arttığı, böylece hücre döngüsünü G0/G1 fazında durdurduğu ve hücre proliferasyonunu inhibe ettiği, hücrede apopitozu teşvik ettiği gözlenmiştir [47].

Apopitoz, çok hücreli organizmalardaki istenmeyen veya hasarlı hücreleri inflamatuar olmayan bir şekilde ortadan kaldıran iyi tasarlanmış doğal bir süreçtir [48].

Gharagozloo ve arkadaşları 2015 yılında insan meme kanseri hücre hattı olan MCF-7 üzerine 1α,25$(OH)_2D_3$ uygulayarak yaptıkları çalışmada, IC_{50} oranını 145 µM olarak belirmiş ve vitamin D'nin MCF-7 meme kanseri hücre dizisi üzerindeki metabolik etkisini vurgulanmak istemişlerdir. D vitamininin antiproliferatif etkisinin olduğunu gözlemlemiş ve bu durumun hücre büyümesini ve proliferasyonunu inhibe ederek apopitozu arttırdığını vurgulamışlardır. 24. saatte %18, 48. saatte sırasıyla %28, 72. saatte %38,5 artan apopitoz değerini gözlenmişlerdir [48].

MCF-7 hücreleri üzerinde yaptığımız çalışmamızda 24. saat sonundaki apopitoz değerlerini, 100 nM'lık kalsitiriol ile %12,2; 1 000 nM kalsitiriol ile %22,3; 10 000 nM kalsitiriol ile %19,5 olarak belirledik. Bu durum bize kalsitriolün MCF-7 hücrelerinin apopitozunu indüklediğini ve hücre proliferasyonunu azalttığını göstermektedir. Bulgularımız, Gharagozloo ve arkadaşlarının doz artışı ile artan apopitozis bulgularını doğrular niteliktedir.

D vitamini, VDR'nin aktivasyonu ve klasik nükleer sinyal yolakları ile meme kanseri büyümesini engeller. Trivedi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre sitoplazmada biriken VDR miktarı da hücre çeperindeki VDR ligandından bağımsız hücre proliferasyonunu engeller ve hücrenin apopitoza sürüklenmesine öncülük eder [45].

VDR ekspresyonu ayrıca tümör gelişimi ile negatif korelasyon gösterir. Malign olmayan dokuda nispeten yüksek VDR konsantrasyonları bulunurken, malign büyümede genellikle VDR ekspresyonunun azalması veya tamamen kaybı görülmektedir [45].

Çalışmamızda kontrol grubu olarak kullandığımız, üzerine hiçbir doz uygulaması yapmadığımız meme kanseri hücre hattı olan MCF-7 ile 100 nM'lık kalsitiriol uyguladığımız MCF-7 hücrelerindeki VDR ekspresyon düzeyini karşılaştırdığımızda, kalsitriolün VDR ekspresyonunu 15 kat kadar arttığı saptanmıştır. Kalsitiriol dozu 1 000 nM uygulandığında kontrol grubuna göre 16 kata varan bir artış saptanmıştır. Doz artış oranı ile ekspresyon düzeyinin doğru orantılı olarak artmamasının nedeni VDR'nin 100 nM'ın üzerindeki dozlarda reseptör düzeyinde bağlanma için doygunluk seviyesine ulaşılmış olduğunu işaret etmektedir. Bu dozlarda proliferasyon markırı olarak kullandığımız Ki-67 ölçümlerini değerlendirdiğimizde, kontrol grubuna göre 100 nM ve 1 000 nM'lık kalsitriol maruziyeti olan dozlarda yaklaşık 7 katlık bir azalma saptanmıştır. Bu da kalsitriolün 100 nM'lık etkin dozunun MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerindeki antiproliferatif etkisi lehine bir bulgu olarak değerlendirilmiştir.

D vitamini, hücre proliferasyonunu, farklılaşmasını ve apopitozu etkileyen genlerin ekspresyonunu düzenleyerek doku homeostazında kritik bir rol oynar. 24-hidroksilaz CYP24A1 enzim aktivitesi, D vitamini hedef dokularında D vitamininin hormonal formunu bozmak için işlev görür. Düzensiz CYP24A1 ekspresyonuna ilişkin mevcut bilgiler, onun varsayılan bir onkogen olarak adaylığını desteklemektedir [49].

2018 yılında Kun-Chun ve arkadaşları yaptığıkları çalışma sonucunda, vasküler endotelyal büyüme faktörü-A'nın (VEGF-A) kanser hücresi metastatik potansiyelini doğrudan arttırdığını ve VEGF-A'nın aşırı ekspresyonunun, meme kanserinin daha yüksek invazivliği ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Hem D vitamininin aktif formları olan $1\alpha,25(OH)_2$ D_3 ve MART-10 ile hem de bunların analoglarını kullanarak MCF-7 hücreleri üzerinde VEGF-A etkilerini bloke etmişlerdir. Aynı zamanda VEGF ile ilişkili olup iltihaplanma, bağışıklık, hücre büyümesi ve kanser metastazı ile ilgisi bulunan çeşitli genlerin ekspresyonlarının düzenlenmesinde yer aldığı düşünülen NF-κB'nin ekspresyon düzeyinde de önemli ölçüde bir azalma gözlemlemişlerdir. NF-κB sinyalinin anormal aktivasyonu, bir dizi kanser gelişimi ve ilerlemesi ile bağlantılı olup NF-κB 'nin aktivasyonu, esas olarak hücreler sitokinler ve stres gibi bir dizi sinyal aldığında gerçekleşir yargısına varmışlardır [46].

Çalışmamızda 24 saat boyunca 100 nM-1 000 nM ve 10 000 nM'lık kalsitiriol maruziyeti sonrası, MCF-7 hücreleri üzerinde VEGF ekspresyonu ölçümlerinde doza bağlı azalış saptanmıştır. VEGF ekspresyon düzeyinin kontrol grubuna göre yaklaşık olarak 100 nM'lık

dozda 2,9 kat, 1 000 nM'lık dozda 6 kat ve 10 000 nM'lık dozda 8 kat azalttığını tespit ettik. Sonuçlarımız kanserde istenmeyen bir durum olan anjiogenezin kalsitiriol uygulanması sonrası sınırlandırılabildiğini düşündürmektedir.

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR); hücrelerde proliferasyonu ve apopitozisi düzenleyen sinyal ileti yollarının kontrolünü sağlayan hücre yüzey reseptörü olarak bilinmektedir. Meme kanseri hücrelerinde EGFR ekspresyonu üzerindeki D vitamini etkisinin, D vitaminine duyarlı bir promotör dizisi aracılığıyla transkripsiyonel olarak gerçekleştiği bilinmektedir. Ayrıca D vitamini ve retinoidler tarafından büyüme inhibisyonu ve EGFR ekspresyonunun azalması bazı meme kanseri hücreleri ile ilişkililendirilmiştir [50].

Mcgaffin KR ve arkadaşları 1α,25$(OH)_2D_3$'ün**,** kanser hücre hatları olan MCF-7, T47D ve BT549 üzerindeki etkilerini araştıran bir çalışmada, kalsitriol etkisi ile hücrelerde 2 saat içinde EGFR mRNA'da %50'lik bir azalmanın olduğunu, bu azalmanın 72. saate kadar devam ettiğini ifade edilmişlerdir [50].

MCF-7 hücrelerine uyguladığımız 1α,25$(OH)_2D_3$'ün 24. saat sonrasında EGFR ekspresyon düzeyindeki etkisine baktığımızda, kontrol grubuna göre 100 nM'lık dozda EGFR ekspresyon düzeyinin 1,1 kat , 1 000 nM'lık dozda 1,4 kat ve 10 000 nM'lık dozda 1,8 kat azalmış olduğunu gözlemledik. Sonuçlarımız Mcgaffin KR ve arkadaşlarının bulgularını doğrular niteliktedir.

Sonuç olarak, MCF-7 hücre hattı üzerinde 100 nM'lık 1α,25$(OH)_2D_3$'e 24 saat maruziyet sonrası VDR, VEGF, EGFR ve Ki-67 ekspresyon düzeyleri bakılmış kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı farklar bulunmuştur. Kalsitriolün VDR, VEGF, EGFR ve Ki-67 sinyal yolunu düzenlediği gözlemlenmiştir. 100 nM-1 000 nM-10 000 nM kalsitiriol uygulanmış olan gruplarda, apopitozis artmış, proliferasyon ve anjiogenez azalmıştır.

Prostat kanseri dünyada erkeklerde akciğer kanserinden sonra en sık rastlanan kanser türüdür. Prostat kanseri görülme oranı yaş ile birlikte artmakla beraber vakaların %10'unda genetik geçiş görülmektedir [51].

DU-145 ile yapılan çalışmalarda 1α,25$(OH)_2D_3$ affinitesinin düşük olduğu ve proliferasyonu istenilen düzeyde engelleyemediği savunulmuştur. Sebebi ise hücre hattı üzerinde bulunan düşük VDR reseptör sayısı olarak açıklanmıştır [51].

Yapılan çalışmalar sonucunda VDR'nin hem normal hem de kanserli prostat hücresinde varlığı tespit edilmiştir. VDR ve ligandı olan 1α,25$(OH)_2D_3$'ün antiproliferatif etki gösterdiği ve hücre döngüsünü yavaşlatarak apopitozisi arttırdığı öne sürülmüştür. D vitamini metabolizmasının ve VDR ekspresyonunun ileri kanserlerde görevini yerine getiremediği belirtilmiştir [52].

Çalışmamızda, DU-145 hücrelerinde 1α,25$(OH)_2D_3$'ün en etkin olduğu zaman ve doz miktarını 24. saat sonrası 100 nM'lık doz olarak saptadık. 100 nM'lık kalsitriolün 24. saat sonrası hücre canlılığının %87'lere varan oranda azalttığını gözlemledik. Fakat 48. saat MTT sonrası hücrenin toparlanmış olduğunu ve % hücre canlılığında herhangi bir azalma olmadığını saptadık. Bulgularımızı destekler nitelikte çalışmalar bulunsa da farklı verilere sahip çalışmalarda mevcuttur.

Skowronski J ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışma bizim bulgularımızdan farklı olup yüksek afiniteli VDR'nin varlığına rağmen, DU-145 hücrelerinin proliferasyonu, test edilen dozlarda 1α,25$(OH)_2D_3$ tarafından inhibe edilmemiştir [53].

Hormon bağımsız prostat hücre hattı olan DU-145'e uyguladığımız kalsitiriol dozlarına göre; D vitamininin antiproliferatif etkilerinin MCF-7 hücre hattı ile kıyaslandığında daha dirençli olduğunu gözlemledik.

1999 yılında Ly ve arkadaşları 1α,25$(OH)_2D_3$ 'ün DU-145 hücrelerinde proliferasyonu engelleyememe sebebini, hücre içerisindeki 24-hidroksilaz ekspresyonunun yüksek düzeyinden kaynaklanabileceği hipotezini öne sürmüştür. Bu P450 enzimin 1α,25$(OH)_2D_3$ katabolizmasını başlattığından, 1α,25$(OH)_2D_3$'ün antiproliferatif etkisini sınırlayabileceğini varsaymışlardır. Bunu engellemek içinde P450 enzim aktivitesini sınırlandıran imidizol türevli bir ilaç ile 1α,25$(OH)_2D_3$ kombine şekilde uygulandığında 1α,25$(OH)_2D_3$'ün yarı ömrünü artıracağını öne sürmüşlerdir. Sonuçta hem DU-145 hücreleri üzerinde antiproliferatif etki hem de VDR ekspresyon düzeyinde artış yakalamışlardır [54].

DU-145 hücreleri üzerinde yaptığımız çalışmamızda 24. saat sonundaki apopitoz değerlerini 100 nM'de %4,8; 1 000 nM'de %9,1; 10 000 nM %10,3 olarak belirledik. Çalışmamızda tespit ettiğimiz doz artışı ile uyumlu apopitozis artışı, literatürdeki araştırmalarda gösterilen kalsitriolün DU-145 hücreleri üzerindeki apopitotik etkinliğini desteklemektedir.

Çalışmamızda VDR ekspresyon düzeyinde kontrol grubuna göre 100 nM'lık dozda VDR ekspresyon düzeyinin yaklaşık olarak 13 kat, 1 000 nM'lık dozda 8,5 kat ve 10 000 nM'lık dozda 5,5 kat artmış olduğu gözlenmiştir. Proliferasyon ölçümü için kullandığımız Ki-67 mRNA ekspresyon düzeyinde ise kontrol grubuna kıyasla 100 nM'lık dozda 1, 1 000 nM'lık dozda 1,2 kat ve 10 000 nM'lık dozda 1,4 kat azalış saptadık. Kalsitriol doz atışı ile uyumlu olarak artan VDR ekspresyon düzeyi, yine doz artışı ile uyumlu olarak Ki-67 ekspresyon düzeyinde azalışa sebep olmuştur. Bu da bize kalsitriolün DU-145 hücre hattı üzerindeki antiproliferatif etkisini göstermektedir.

Tümör hücresi mortalitesi ve istilası, hem epidermal büyüme faktörü reseptöründen (EGFR) hem de ürokinaz tipi plazminojen aktivatöründen (uPAR) gelen artış gösteren sinyallerle bağlantılıdır [55].

Çalışmamızda, $1\alpha,25(OH)_2D_3$'ün VEGF mRNA ekspresyon düzeyini kontrol grubuna kıyasla yaklaşık olarak 100 nM'lık dozda 1,2 kat ;1 000 nM'lık dozda 1,5 kat ve 10 000 nM'lık dozda 1,8 kat azalttığı saptandı. DU-145 hücrelerine uyguladığımız $1\alpha,25(OH)_2D_3$'ün 24. saat maruziyet sonrasında EGFR ekspresyon düzeyindeki etkisine baktığımızda, kontrol grubuna göre 100 nM'lık dozda EGFR ekspresyon düzeyinin 2,2 kat azaldığı, 1 000 nM'lık dozda değişmediği, 10 000 nM'lık dozda 1,8 kat azaldığı tespit edildi. Bu da bize kalsitriolün DU-145 hücre hattı üzerinde tümör büyüme ve gelişmesini azalttığını göstermektedir.

Sonuç olarak, DU-145 hücre hattı üzerinde 100 nM lık $1\alpha,25(OH)_2D_3$ 24 saatlik maruziyeti sonrası VDR, Ki-67, VEGF ve EGFR ekspresyon düzeyleri bakılmış olup kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı farklar bulundu. Kalsitriol VDR, Ki-67, VEGF ve EGFR sinyal yolunu düzenlemektedir. 100nM-1 000 nM-10 000 nM kalsitiriol uygulanmış olan gruplarda, apopitozis artmış, proliferasyon ve anjiogenez azalmıştır.

Kolorektal kanser (CRC), yüksek morbidite ve mortalite oranları ile dünya çapında en yaygın gastrointestinal kanserlerden biridir. Küçük moleküllü antikanser reaktiflerinin keşfi, kanser tedavisini önemli ölçüde etkilemiştir. Bununla birlikte, bu tedavilerin antikanser etkileri, CRC'yi tamamen iyileştirmek için yeterli değildir [56].

D vitamini ve kalsiyum; inflamasyon, tümör büyümesi ve karsinojenez ile ilgili immün yolakları etkiler. Ayrıca epidemiyolojik kanıtlar, kalsiyum ve D vitamininin kolorektal adenom ve kanser riskini azaltabileceğini göstermektedir.

İnflamasyon, kolorektal kanserin etiyolojisi ile karmaşık bir şekilde bağlantılıdır. Ayrıca kalsiyum ve D vitamini kolorektal kanser riskinin azaltılmasını sağlayan mekanizmaları anlamada bir anahtar olabilir. Crohn hastalığı ve ülseratif kolit gibi inflamatuar durumlar, kolorektal kanser için belirlenmiş risk faktörleridir [57].

Kolorektal kanserde, VDR varlığını, VDR konsantrasyonundaki değişiklikleri ve affiniteyi belirlemek amacıyla yapılan çalışmalardaki bulgular, $1\alpha,25(OH)_2D_3$'ün farklılaşmış ve farklılaşmamış Caco-2 hücrelerindeki VDR'nin işlevsel olduğunu göstermiştir. Caco-2 hücreleri, memeli enterositlerinde D vitamini tarafından düzenlenen işlevleri incelemek için benzersiz bir in vitro model sağlar [58].

CaCo-2 hücreleri üzerine uyguladığımız $1\alpha,25(OH)_2D_3$'ün 24 saat maruziyeti sonrası MTT sonuçlarına baktığımızda 100-1 000 ve 10 000 nM'lık dozlarda hücre canlılığının sırası ile %77,2'ye, %63,5'e ve %64,7'lere varan oranda azaldığını saptadık. 48 saat maruziyet sonrası MTT sonuçlarında ise 100, 1 000 ve 10 000 nM'lık kalsitriol hücre canlılığını sırası ile %88,6 ya, %78,5'e ve %70,1'lere varan oranda azalttı. MCF-7 hücre hattında da gözlemlediğimiz gibi kalsitriol CaCo-2 hücrelerinde de canlılığı doz artışı ile orantılı olarak azalttı. 24. saat ile 48. saat verilerini kıyasladığımızda ise 48. saatte tüm dozlarda proliferasyonun 24. saate oranla artış gösterdi. Bunu da kalsitriolün yarılanma süresi etkisi olarak yorumluyoruz.

Gastrointestinal bariyerin bileşeni olan müsinlerin azalması, kronik bağırsak iltihabına katkıda bulunur. Kalsiyum, bağırsak hücreleri tarafından eksprese edilen negatif yüklü müsinlerin stabilize edilmesinde önemli bir rol oynar. D vitamini de nükleer VDR aracılığıyla bağırsaktan kalsiyum emilimini düzenler. Barella ve arkadaşlarının VDR

ekspresyonu eksikliğinin bağırsak epitel hücrelerinde müsin ekspresyonunu bozacağını varsayarak yaptıkları çalışmada, D vitamininin müsin ekspresyonunu ve homeostazı teşvik ederek bağırsak epitel bariyeri üzerinde koruyucu bir etkiye sahip olduğunu öne sürmüşlerdir [59].

CaCo-2 hücreleri üzerinde yaptığımız çalışmamızda 24. saat sonundaki apopitoz değerleri 100 nM' de %9,4; 1 000 nM' de %14,7; 10 000 nM' de %21,3 olarak belirlenmiştir. Bu durum bize kalsitriolün CaCo-2 hücrelerinin apopitozunu indüklediğini ve hücre proliferasyonunu azalttığını göstermektedir.

Beildeck ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptıkları çalışma şunları göstermiştir. D vitamini reseptörü (VDR) yolu, birçok kanserin önlenmesinde ve potansiyel olarak tedavisinde önemlidir. VDR etkisinin önemli bir mekanizması, Wnt/β-katenin yolu ile etkileşimi ile ilgilidir. Agonist bağlı VDR, doğrudan β-katenin ile etkileşime girerek ve bazı hücrelerde kaderin ekspresyonunu artırarak onkojenik Wnt/β-katenin/TCF yolunu inhibe eder. [60]

CaCo-2 hücrelerine uyguladığımız $1,25(OH)_2D_3$'ün 24. saat sonrasında VDR ekspresyon düzeyindeki etkisine baktığımızda, kontrol grubuna göre 100 nM'lık dozda VDR ekspresyon düzeyinin yaklaşık 8 kat artmış;1 000 nM'lık dozda 12 kat artmış ;10 000 nM'lık dozda 13 kat artmış olduğunu gözlemledik. Sonuçlarımız artan VDR ekspresyonu ile azalan hücre canlılığını ve proliferasyonunu doğrular niteliktedir.

Bu dozlarda proliferasyon markırı olarak kullandığımız Ki-67 ölçümlerini değerlendirdiğimizde kontrol grubuna göre 100 nM ve 1 000 nM'lık dozlarda yaklaşık 1,6 katlık bir azalma; 10 000 nM'lık dozda ise kontrol grubuna kıyasla 2 katlık bir azalma saptadık.

CaCo-2 hücrelerine uyguladığımız $1,25(OH)_2D_3$'ün 24. saat sonrasında VEGF ekspresyon düzeyindeki etkisine baktığımızda, kontrol grubuna göre 100 nM'lık dozda VEGF ekspresyon düzeyinin 2,8 kat azalmış, 1 000 nM'lık dozda 4,2 kat azalmış, 10 000 nM'lık dozda 5,1 kat azalmış olduğunu saptadık.

Dougherty ve arkadaşları, VDR(+) / VDR(-) fareler üzerinde yaptıkları çalışma sonucunda VDR ekspresyonu ile EGFR düzeyi arasında negatif bir mekanizma olduğunu

gözlemlemişlerdir. VDR susturulmuş farelerde EGFR'nin aktivasyonunu artmış olarak ölçümlendirmişlerdir. VDR silinmesi, tümörijenezi, aktive EGFR ve β-katenin sinyalini ve renin ve anjiyotensin II dahil olmak üzere kolonik RAS bileşenlerini önemli ölçüde arttırdı [61].

CaCo-2 hücrelerine uyguladığımız 1α,25$(OH)_2D_3$'ün 24. saat sonrasında EGFR ekspresyon düzeyindeki etkisine baktığımızda, kontrol grubuna göre 100 nM'lık dozda EGFR ekspresyon düzeyinin 2 kat azalmış;1 000 nM'lık dozda 2,2 kat azalmış ;10 000 nM'lık dozda 2,3 kat azalmış olduğunu saptadık. Sonuçlarımız Dougherty ve arkadaşlarının bulgularını doğrular niteliktedir.

Bu bulgular, kalsitriolün gastrointestinal sistemdeki epitel hücre döngüsünün kontrolünde rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Caco-2 hücrelerinde kalsitriol apopitozu indükledi, proliferasyonu ve anjiogenezi azalttı.

Çalışmamızı sağlıklı hücre hattı HUVEC ile de gözlemledik. 24 saat kalsitriol maruziyeti sonrası MTT canlılık testinde 10 000 nM'lık dozda hücre canlılığı %89'a düşmüş olup bu dozun sağlıklı hücre hattı üzerinde canlılığı azalttığını gözlemledik.

48. saatte ise proliferasyon devam etmiş herhangi bir lethal etki gözlemlenmemiştir.

HUVEC hücreleri üzerinde yaptığımız çalışmamızda 24. saat sonundaki apopitoz değerleri 100 nM'de %3,6; 1 000 nM'de %5,0; 10 000 nM'de %14,9 olarak belirlenmiştir. 10 000 nM'lık doz MTT bulgularıyla uyumlu bir şekilde, diğer dozlara oranla toksik etkiye neden olmuştur.

Çalışmamızda, kalsitriolün 100, 1 000 ve 10 000 nM 'lık dozlarının HUVEC hücrelerine uygulaması sonrası, 18.saatte tüp formasyonunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Değerlendirilen program verilerine göre, kaplanan alan (%), toplam tüp uzunluğu, toplam tüp, toplam dallanma noktaları kontrol grubuna göre 100 nM,1 000 nM'lık ve 10 000 nM'lık dozlarda doz artışı ile uyumlu azalış göstermiştir.

Bu sonuçlar aynı zamanda CaCo-2, MCF-7 ve DU-145 hücre hatları VEGF ve EGFR mRNA ekspresyon bulguları ile uyumludur.

Aynı şartlar ,aynı dozlar ve aynı malzemeler kullanılarak eş zamanlı yapmış olduğumuz çalışmamızın sonucunda gözlemledik ki, farklı kanser türlerinde in-vitro ortamda uygulamış olduğumuz kalsitiriol her grupta genel anlamda aynı etkiyi yapmış olsa da kantitatif olarak ölçüldüğünde rakamlar birbirinden olçukça bağımsızdır.

Kalsitriol kanser hücrelerinde proliferasyonu azaltmış, apopitozu arttırmış, anjiogenezi sınırlandırmıştır [62].

Burada bulduğumuz veriler ışığında, tüm hücrelerin kalsitriole aynı şekilde tepki vermemesi dikkate değerdir. Genel olarak, kalsitriolün antikanser etkilerinin gerçekleşmesi için VDR'nin ifadesi ve işlevselliği zorunludur.

6. SONUÇLAR

Çalışmamızda kalsitriolün etkinliğinin hücre türüne göre farklılık gösterdiği saptanmıştır. Hücre hattında kalsitriol maruziyeti sonrasında çoğalma ve hücre sayısını arttırma kabiliyetlerinde azalma, doz artışı ile uyumlu apopitotik etki, VDR mRNA ekspresyon düzeyinde artma, Ki-67, VEGF ve EGFR ekspresyon düzeylerinde ise azalma saptanmıştır. MCF-7 ve CaCo-2 hücre hatları kalsitriole daha etkin cevap verirken, DU-145 hücre hattında antiproliferatif ve apopitotik etkiye karşı direnç gözlemlenmiştir.

Sağlıklı hücre hattı olan HUVEC üzerinde kalsitriolün oluşturduğu etki incelendiğinde kullanılan dozlardan sadece 10 000 nM' ın toksik etkiye neden olduğu gözlemlenmiştir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler ışığında kalsitiriolün karsinogenezde yer alan temel süreçlerin anlaşılmasına ve potansiyel olarak tümörün durumuna dayalı kişiselleştirilmiş tedavi stratejilerini geliştirilmesine yardımcı olabileceği gösterilmiştir. Kalsitriol işlev gösterdiği yolaklar ile genomik olarak kanser gelişimine etki edebilmektedir.

KAYNAKLAR

[1] C. L. Wagner, S. N. Taylor, and B. W. Hollis, "Does vitamin D make the world go round" *Breastfeed. Med.*, vol. 3, no. 4, pp. 239–250, 2008, doi: 10.1089/bfm.2008.9984.

[2] E. Mccollum, Rider, A. A.: Elmer Verner McCollum ñ a Biographical Sketch, Journal of Nutrition 100, 1ñ10 (1970). "1879—1967," 1974.

[3] H. F. DeLuca, "History of the discovery of vitamin D and its active metabolites," *Bonekey Rep.*, vol. 3, no. January, pp. 1–8, 2014, doi: 10.1038/bonekey.2013.213.

[4] M. de La Puente-Yagüe, M. A. Cuadrado-Cenzual, M. J. Ciudad-Cabañas, M. Hernández-Cabria, and L. Collado-Yurrita, "Vitamin D: And its role in breast cancer," *Kaohsiung J. Med. Sci.*, vol. 34, no. 8, pp. 423–427, 2018, doi: 10.1016/j.kjms.2018.03.004.

[5] L. Díaz, M. Díaz-Muñoz, A. C. García-Gaytán, and I. Méndez, "Mechanistic effects of calcitriol in cancer biology," *Nutrients*, vol. 7, no. 6, pp. 5020–5050, 2015, doi: 10.3390/nu7065020.

[6] S. M. Jeon and E. A. Shin, "Exploring vitamin D metabolism and function in cancer," *Exp. Mol. Med.*, vol. 50, no. 4, 2018, doi: 10.1038/s12276-018-0038-9.

[7] S. W. Chang and H. C. Lee, "Vitamin D and health - The missing vitamin in humans," *Pediatr. Neonatol.*, vol. 60, no. 3, pp. 237–244, 2019, doi: 10.1016/j.pedneo.2019.04.007.

[8] D. Feldman, A. V. Krishnan, S. Swami, E. Giovannucci, and B. J. Feldman, "The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 14, no. 5, pp. 342–357, 2014, doi: 10.1038/nrc3691.

[9] E. Şenkal, E. Ünüvar, L. Seren, C. Göl, and F. Durankuş, "Necessity of verifying and interpretation of the serum vitamin D levels," *J. Child*, vol. 18, no. 3, pp. 97–102, 2018, doi: 10.5222/j.child.2018.79037.

[10] S. Kabadere *et al.*, "Türk Tıp Öğrencileri Araştırma Dergisi Derleme Review D vitamini: Yapısı, Sentezi ve Çeşitli Hastalıklardaki Önemi Vitamin D: Structure, Synthesis and İmportance in Various Diseases," vol. 1, no. 1, pp. 1–6, 2019.

[11] S. J. Khundmiri, R. D. Murray, and E. Lederer, "PTH and vitamin D," *Compr. Physiol.*, vol. 6, no. 2, pp. 561–601, 2016, doi: 10.1002/cphy.c140071.

[12] H. Önal, "Phosphate Metabolism," *J. Child*, vol. 19, no. 3, pp. 105–115, 2019, doi: 10.5222/j.child.2019.43650.

[13] S. Christakos, D. V. Ajibade, P. Dhawan, A. J. Fechner, and L. J. Mady, "Vitamin D: Metabolism," *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, vol. 39, no. 2, pp. 243–253, 2010, doi: 10.1016/j.ecl.2010.02.002.

[14] N. Zhalehjoo, Y. Shakiba, and M. Panjehpour, "Gene expression profiles of

CYP24A1 and CYP27B1 in malignant and normal breast tissues," no. 14, pp. 467–473, 2017, doi: 10.3892/mmr.2016.5992.

[15] N. Fathi *et al.*, "Role of vitamin D and vitamin D receptor (VDR) in oral cancer," *Biomed. Pharmacother.*, vol. 109, no. October 2018, pp. 391–401, 2019, doi: 10.1016/j.biopha.2018.10.102.

[16] M. R. Haussler, P. W. Jurutka, M. Mizwicki, and A. W. Norman, "Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of 1α,25(OH) 2 vitamin D 3 : Genomic and non-genomic mechanisms," *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 25, no. 4, pp. 543–559, 2011, doi: 10.1016/j.beem.2011.05.010.

[17] M. Sezgin Pepeler, B. Savaş, M. Pamukcuoğlu, M. Törüner, and H. Akbulut, "Kolorektal kanserlerde vitamin D reseptör ekspresyonunun kolorektal kanserlerde evre ile ilişkili ve prognoz üzerine etkisi," *Akad. Gastroenteroloji Derg.*, no. 3, pp. 1–5, 2019, doi: 10.17941/agd.601187.

[18] R. Rizzoli, "Vitamin D supplementation: upper limit for safety revisited?," *Aging Clin. Exp. Res.*, vol. 33, no. 1, pp. 19–24, 2021, doi: 10.1007/s40520-020-01678-x.

[19] S. Gedikli Melatoninin Mcf-7 Hücre Kültüründeki Apoptoz Aktivasyonunun ve Sitotoksisitesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Pcr), Mtt Hücre Canlılık Testi Ve İmmunsitokimya Yöntemleriyle Araştırılması, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi," 2013.

[20] C. F. Garland *et al.*, "The role of vitamin D in cancer prevention," *Am. J. Public Health*, vol. 96, no. 2, pp. 252–261, 2006, doi: 10.2105/AJPH.2004.045260.

[21] J. Xu *et al.*, "Vitamin D - Pivotal Nutraceutical in the Regulation of Cancer Metastasis and Angiogenesis," *Curr. Med. Chem.*, vol. 20, no. 33, pp. 4109–4120, 2013, doi: 10.2174/09298673113209990194.

[22] S. Bhoora and R. Punchoo, "Policing cancer: Vitamin d arrests the cell cycle," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 23, pp. 1–20, 2020, doi: 10.3390/ijms21239296.

[23] M. E. Ay, O. Terzİoğlu, C. Terzİ, and Ö. İ. Ay, "inhibitör geni (CDKI) ekspresyonlarının değerlendirilmesi *," vol. 5, no. 1, pp. 20–25, 2006.

[24] H. Cabadak, "Hücre siklusu ve kanser," ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi; 9(3) pp: 51- 61 June, 2008.

[25] R. Salehi-Tabar *et al.*, "Vitamin D receptor as a master regulator of the c-MYC/MXD1 network," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, no. 46, pp. 18827–18832, 2012, doi: 10.1073/pnas.1210037109.

[26] M. Ben-Eltriki, S. Deb, and E. S. T. Guns, "1α,25-Dihydroxyvitamin D3 synergistically enhances anticancer effects of ginsenoside Rh2 in human prostate cancer cells," *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 209, no. January, p. 105828, 2021, doi: 10.1016/j.jsbmb.2021.105828.

[27] A. T. İnce and O. Övünç, "Cyclooxygenase–2 ve Karsinogenez," *Güncel Gastroenteroloji*, vol. 9, no. 1, pp. 70–77, 2005.

[28] M. Thill *et al.*, “Prostaglandin metabolising enzymes and PGE2 are inversely correlated with vitamin D receptor and 25(OH)2D3 in breast cancer,” *Anticancer Res.*, vol. 30, no. 5, pp. 1673–1679, 2010.

[29] N. Hashemi Goradel, M. Najafi, E. Salehi, B. Farhood, and K. Mortezaee, “Cyclooxygenase-2 in cancer: A review,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 234, no. 5, pp. 5683–5699, 2019, doi: 10.1002/jcp.27411.

[30] C.-Y. Bilimleri, V. E. Biyoteknoloji, K. Gelişiminde, and İ. Rolü, “Eskişehir teknik üniversitesi bilim ve teknoloji dergisi c- yaşam bilimleri ve biyoteknoloji,” vol. 8, no. 1, pp. 121–140, 2019, doi: 10.18036/aubtdc.412520.

[31] Y. Chen, J. Zhang, X. Ge, J. Du, D. K. Deb, and Y. C. Li, “Vitamin D Receptor Inhibits Nuclear Factor □ B Activation by Interacting with I □ B Kinase □ Protein *,” vol. 288, no. 27, pp. 19450–19458, 2013, doi: 10.1074/jbc.M113.467670.

[32] R. Eguchi and I. Wakabayashi, “HDGF enhances VEGF-dependent angiogenesis and FGF-2 is a VEGF-independent angiogenic factor in non-small cell lung cancer,” *Oncol. Rep.*, vol. 44, no. 1, pp. 14–28, 2020, doi: 10.3892/or.2020.7580.

[33] S. H. Kim, Q. M. Pei, P. Jiang, M. Yang, X. J. Qian, and J. B. Liu, “Effect of active vitamin d3 on vegf-induced adam33 expression and proliferation in human airway smooth muscle cells: Implications for asthma treatment,” *Respir. Res.*, vol. 18, no. 1, pp. 1–11, 2017, doi: 10.1186/s12931-016-0490-9.

[34] M. Iftikhar, A. Iftikhar, H. Zhang, L. Gong, and J. Wang, “Transport, metabolism and remedial potential of functional food extracts (FFEs) in Caco-2 cells monolayer: A review,” *Food Res. Int.*, vol. 136, no. December 2019, p. 109240, 2020, doi: 10.1016/j.foodres.2020.109240.

[35] M. Natoli, B. D. Leoni, I. D’Agnano, F. Zucco, and A. Felsani, “Good Caco-2 Cell Culture Practices,” *Toxicol. Vitr.*, vol. 26, no. 8, pp. 1243–1246, 2012, doi: 10.1016/j.tiv.2012.03.009.

[36] S. Advantages, C. Lines, T. Namekawa, K. Ikeda, K. Horie-inoue, and S. Inoue, “Application of Prostate Cancer Models for Preclinical,” 2019, doi: 10.3390/cells8010074.

[37] D. Baci *et al.*, “Acetyl-L-Carnitine downregulates invasion (CXCR4/CXCL12, MMP-9) and angiogenesis (VEGF, CXCL8) pathways in prostate cancer cells: rationale for prevention and interception strategies,” *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, vol. 38, no. 1, pp. 1–17, 2019, doi: 10.1186/s13046-019-1461-z.

[38] I. Mitra *et al.*, “Benzimidazole based Pt(II) complexes with better normal cell viability than cisplatin: Synthesis, substitution behavior, cytotoxicity, DNA binding and DFT study,” *RSC Adv.*, vol. 6, no. 80, pp. 76600–76613, 2016, doi: 10.1039/c6ra17788c.

[39] E. Yaka *et al.*, “Biochemical markers in cerebrospinal fluid (CSF) and evaluation of the effect of CSF on PC12 cell line viability in Alzheimer’s disease,” *Turk Geriatr. Derg.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–7, 2006.

[40] P. Erkekoğlu and T. Baydar, “Güncel in vitro sitotoksisite testleri,” *Hacettepe Univ.*

J. Fac. Pharm., vol. 41, no. 1, pp. 45–63, 2021.

[41] R. Overbeeke, H. Steffens-Nakken, I. Vermes, C. Reutelingsperger, and C. Haanen, "Early features of apoptosis detected by four different flow cytometry assays," *Apoptosis*, vol. 3, no. 2. pp. 115–121, 1998, doi: 10.1023/A:1009649025439.

[42] M. Utsuro, "Neutron spin interference visibility in tunneling transmission through magnetic resonators," *Phys. B Condens. Matter*, vol. 358, no. 1–4, pp. 232–246, 2005, doi: 10.1016/j.physb.2005.01.398.

[43] K. J. Livak and T. D. Schmittgen, "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method," *Methods*, vol. 25, no. 4, pp. 402–408, 2001, doi: 10.1006/meth.2001.1262.

[44] S. Yanık," Vitamin D'nin Biyolojik Önemi ve Diş Hekimliği İle Olan İlişkisi," Atatürk Üniv. Diş Hek. Fak. Derg. Cilt:25, Sayı: 1, Yıl: 2015, Sayfa: 128-134.

[45] T. Trivedi *et al.*, "The vitamin D receptor is involved in the regulation of human breast cancer cell growth via a ligand-independent function in cytoplasm," *Oncotarget*, vol. 8, no. 16, pp. 26687–26701, 2017, doi: 10.18632/oncotarget.15803.

[46] C. Kun-Chun *et al.*, "MART-10, a 1α,25(OH)2D3 analog, potently represses metastasis of ER+ breast cancer cells with VEGF-a overexpression," *Anticancer Res.*, vol. 38, no. 7, pp. 3879–3887, 2018, doi: 10.21873/anticanres.12672.

[47] W. Zheng *et al.*, "Vitamin D-induced vitamin D receptor expression induces tamoxifen sensitivity in MCF-7 stem cells via suppression of Wnt/-catenin signaling," *Biosci. Rep.*, vol. 38, no. 6, pp. 1–10, 2018, doi: 10.1042/BSR20180595.

[48] M. Gharagozloo *et al.*, "Clınıcal Study Immune-mediated cochleovestibular disease," *Bratisl. lek??rske List.*, vol. 116, no. 5, pp. 296–301, 2015, doi: 10.4149/BLL.

[49] M. Osanai and G. H. Lee, "CYP24A1-induced Vitamin D insufficiency promotes breast cancer growth," *Oncol. Rep.*, vol. 36, no. 5, pp. 2755–2762, 2016, doi: 10.3892/or.2016.5072.

[50] K. R. Mcgaffin, L. E. Acktinson, and S. A. Chrysogelos, "Growth and EGFR regulation in breast cancer cells by vitamin D and retinoid compounds," pp. 55–73, 2004.

[51] M. Nordqvist, "Effects Of 25-Hydroxyvıtamın D3 And Dıgıtoxın In Prostate," University of Skövde, Bachelor Degree Project in Biomedicine 30 hp Autumn term 2016.

[52] A. B. Ç *et al.*, "Rapamisinin prostat kanseri hücre hatlarındaki etkisi The effect of rapamycin in prostate cancer cell lines," *Araştırma Makal. / Res. Pap. Ege Tıp Derg. / Ege J. Med.*, vol. 52, no. 1, pp. 7–14, 2013.

[53] J. Skowronski and M. Peehl, "Vitamin D and prostate cancer: 1,25 dihydroxyvitamin D3 receptors and actions in human prostate cancer cell lines.: Endocrinology: Vol 132, No 5," vol. 132, no. 5, pp. 1952–1960, 2014, [Online]. Available: http://press.endocrine.org/doi/pdf/10.1210/endo.132.5.7682937.

[54] L. H. Ly, “Liarozole Acts Synergistically with 1 ,25-Dihydroxyvitamin D3 to Inhibit Growth of DU 145 Human Prostate Cancer Cells by Blocking 24-Hydroxylase Activity,” *Endocrinology*, vol. 140, no. 5, pp. 2071–2076, 1999, doi: 10.1210/en.140.5.2071.

[55] A. Mamoune *et al.*, “DU145 human prostate carcinoma invasiveness is modulated by urokinase receptor (uPAR) downstream of epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling,” *Exp. Cell Res.*, vol. 299, no. 1, pp. 91–100, 2004, doi: 10.1016/j.yexcr.2004.05.008.

[56] A. Nagano-Matsuo *et al.*, “PBK expression predicts favorable survival in colorectal cancer patients,” *Virchows Arch.*, vol. 479, no. 2, pp. 277–284, 2021, doi: 10.1007/s00428-021-03062-0.

[57] M. H. Hopkins *et al.*, “Effects of supplemental vitamin D and calcium on biomarkers of inflammation in colorectal adenoma patients: A randomized, controlled clinical trial,” *Cancer Prev. Res.*, vol. 4, no. 10, pp. 1645–1654, 2011, doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-11-0105.

[58] M. H. Hopkins *et al.*, “Effects of supplemental vitamin D and calcium on biomarkers of inflammation in colorectal adenoma patients: A randomized, controlled clinical trial,” *Cancer Prev. Res.*, vol. 4, no. 10, pp. 1645–1654, 2011, doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-11-0105.

[59] Barella, “Escuela de Graduados en Administración y Dirección de Empresas (EGADE) del Tecnológico de Monterrey en Monterrey, N. L., 27 al 30 de abril de, 2010.

[60] M. E. Beildeck, M. Islam, S. Shah, J. E. Welsh, and S. W. Byers, “Control of TCF-4 expression by VDR and vitamin D in the mouse mammary gland and colorectal cancer cell lines,” *PLoS One*, vol. 4, no. 11, 2009, doi: 10.1371/journal.pone.0007872.

[61] U. Dougherty *et al.*, “The renin-angiotensin system mediates egf receptor- Vitamin d receptor cross-talk in colitis-associated colon cancer,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 20, no. 22, pp. 5848–5859, 2014, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0209.

[62] C. Carlberg and A. Muñoz, “An update on vitamin D signaling and cancer,” *Semin. Cancer Biol.*, no. May, pp. 1–14, 2020, doi: 10.1016/j.semcancer.2020.05.018.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : FATSA, Tuğba

Uyruğu : T.C.

Doğum tarihi ve yeri

Medeni hali

E-mail

Eğitim Derecesi	**Eğitim Birimi**	**Mezuniyet Tarihi**
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi / Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı	Devam ediyor
Lisans	Gazi Üniversitesi / Fen Edebiyat Fakültesi/ Biyoloji Ana Bilim Dalı	2009
Lise	Ankara Anadolu Lisesi	2004

İş Deneyimi, Yıl	**Çalıştığı Yer**	**Görev**
2014-	Sağlık Bilimleri Üniversitesi	Biolog

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

Overview of the angiogenic effect of probiotics (Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus rhamnosus) at human umbilical vein endothelial cells

GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR...