

**ENDOMETRİYUM ADENOKARSİNOMA HEC1A HÜCRELERİNDE  
D VİTAMİNİNİN PROLİFERASYON, MİGRASYON VE İNVAZYON  
ÜZERİNE ETKİSİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**İBRAHİM DUMAN**

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TIBBİ FARMAKOLOJİ  
ANABİLİM DALI**

**MERSİN  
MAYIS- 2018**

**ENDOMETRİYUM ADENOKARSİNOMA HEC1A HÜCRELERİNDE  
D VİTAMİNİNİN PROLİFERASYON, MİGRASYON VE İNVAZYON  
ÜZERİNE ETKİSİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**İBRAHİM DUMAN**

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TIBBİ FARMAKOLOJİ  
ANABİLİM DALI**




**Danışman  
Doç. Dr. İsmail ÜN**

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından  
2015-TP2-1172 nolu proje olarak desteklenmiştir.

**MERSİN  
MAYIS - 2018**

## ONAY

İbrahim DUMAN tarafından Doç. Dr. İsmail ÜN danışmanlığında hazırlanan "Endometriyum Adenokarsinoma HEC1A Hücrelerinde D Vitamininin Proliferasyon, Migrasyon ve İnvazyon Üzerine Etkisi" başlıklı çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından 10 Mayıs 2018 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavı sonucunda oy birliği/çokluğu ile Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Görevi	Ünvanı, Adı ve Soyadı	İmza
Başkan	Prof.Dr. Ergin ŞİNGİRİK	
Üye	Prof.Dr. Kansu BÜYÜKAŞAR	
Üye (Danışman)	Doç.Dr. İsmail ÜN	

Yukarıdaki Jüri kararı Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 23.05.2018 tarih ve 2018/...157 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

  
Prof.Dr. Banu ÇOŞKUN YILMAZ  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



*Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, tablo ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.*

## ETİK BEYAN

Mersin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinde belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlâk kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak kullandığımı,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Mersin Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,
- Tezin tüm telif haklarını Mersin Üniversitesi'ne devrettiğimi beyan ederim.

## ETHICAL DECLARATION

This thesis is prepared in accordance with the rules specified in Mersin University Graduate Education Regulation and I declare to comply with the following conditions:

- I have obtained all the information and the documents of the thesis in accordance with the academic rules.
- I presented all the visual, auditory and written informations and results in accordance with scientific ethics.
- I refer in accordance with the norms of scientific works about the case of exploitation of others' works.
- I used all of the referred works as the references.
- I did not do any tampering in the used data.
- I did not present any part of this thesis as an another thesis at Mersin University or another university.
- I transfer all copyrights of this thesis to the Mersin University.

11 Mayıs 2018 / 11 May 2018

İmza

İbrahim DUMAN

## ÖZET

### ENDOMETRİYUM ADENOKARSİNOMA HEC1A HÜCRELERİNDE D VİTAMİNİN PROLİFERASYON, MİGRASYON VE İNVAZYON ÜZERİNE ETKİSİ

Endometriyum karsinoma günümüzde en sık rastlanan jinekolojik malignitedir ve endometriyum adenokarsinoma kadınlarda en yaygın görülen dördüncü kanser türüdür. Endometriyal kanser gelişme riskini etkileyen faktörler, yaş, diyet ve egzersiz, diyabet, hormon tedavisi, intuterin cihaz kullanımı, aile öyküsü, erken menarş, geç menapoz ve radyasyon tedavisidir. Bir seko-steroid hormon olan D vitamini, antiproliferatif ve immünomodülatör özelliklere sahiptir ve en önemli rolü kalsiyum ve fosfat mekanizması üzerinedir. D vitamini endometriyum kanseri dâhil çok sayıda kanser riskini azaltmak için önerilmiştir ve endometriyal dokuda D vitamini reseptörünün varlığı gösterilmiştir. D vitamininin aktif formu kalsitriol ( $1,25(OH)_2D_3$ ) ve analogları, kanser riskini ve prognozunu belirlemede rol oynayabilen birçok hücreyel yolları regüle eder. Bu çalışmada literatürde eksik olarak gördüğümüz endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde D vitamininin proliferasyon ve migrasyon üzerine etkilerini gösterdik. Çalışmada endometriyum adenokarsinoma HEC1A hazır hücre hattı kullanıldı. Kültüre edilen endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde al fakalsidol ve kalsitriolün proliferasyon, migrasyon ve invazyon üzerine etkisi gerçek zamanlı hücre analiz modeli ile gösterildi. Aynı zamanda endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde al fakalsidol ve kalsitriolün migrasyon üzerine etkisi yara iyileşme modeli ile de gösterildi. Çalışmamızda düşük konsantrasyon ( $10^{-9}$  -  $10^{-11}$  M) D vitamini kullanımının endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde hem proliferasyonu hem de migrasyonu azalttığını gösterdik. Yüksek konsantrasyon ( $10^{-6}$  -  $10^{-8}$  M) D vitamini kullanımı ise endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde proliferasyonu ve kısmen migrasyonu artırdığını gösterdik. Endometriyum kanserlerinin patogenezinin aydınlatılması, hastalığın progresyonunu önlenmesi ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlamak için D vitamininin proliferasyon, migrasyon ve invazyon üzerine etkileri ile ilgili daha fazla çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

**Anahtar Kelimeler:** D Vitamini, Endometriyum, Kanser, Adenokarsinoma, HEC1A,

**Danışman:** Doç. Dr. İsmail ÜN, Mersin Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Mersin.

## ABSTRACT

### EFFECTS OF VITAMIN D ON CELL PROLIFERATION, MIGRATION AND INVASION IN HEC1A ENDOMETRIAL ADENOCARCINOMA CELLS

Endometrium carcinoma is the most common gynecologic malignant and endometrium adenocarcinoma is the fourth most common type of cancer in women. Factors affecting risk of developing endometrial cancer are age, diet and exercise, diabetes, hormone therapy, intestinal device use, family history, early menarche, late menopause and radiation therapy. Vitamin D, a seco-steroid hormone, has antiproliferative and immunomodulatory properties and its most important role is on the mechanism of calcium and phosphate. Vitamin D is recommended to reduce the risk of multiple cancers including endometrial cancer and the presence of vitamin D receptor on endometrial tissue. The active form of vitamin D is calcitriol ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ) and its analogs regulate many cellular pathways that can play a role in determining cancer risk and prognosis. In this study, endometrial adenocarcinoma HEC1A cells, which we have seen as incomplete in the literature, showed effects on vitamin D proliferation and migration. Endometrial adenocarcinoma HEC1A pre-cell line was used in the study. The effect of alfacalcidol and calcitriol on proliferation, migration and invasion in cultured endometrial adenocarcinoma HEC1A cells was demonstrated by real-time cell analysis model. At the same time, the effect of alfacalcidol and calcitriol on migration of endometrial adenocarcinoma HEC1A cells was also demonstrated by the wound healing model. Our study also showed that the use of low concentration ( $10^{-9}$  -  $10^{-11}$  M) D vitamins reduces both proliferation and migration in endometrial adenocarcinoma cancer. The use of high concentration ( $10^{-6}$  -  $10^{-8}$  M) D vitamins has shown that proliferation and partial migration of endometrial adenocarcinoma cancer are increased. Further studies on the effects of vitamin D on proliferation, migration and invasion are needed to contribute to the development of new therapeutic strategies, prevent progression of the disease and clarify the pathogenesis of endometrial cancer.

**Keywords:** Vitamin D, Endometrium, Cancer, Adenocarcinoma, HEC1A,

**Advisor:** Assoc. Dr. İsmail ÜN, Department of Medical Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Mersin, Mersin.

## TEŞEKKÜR

Eğitim ve bilime önem veren, yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Kansu BÜYÜKAFŞAR 'a,

Tezim konusunda bilimsel ve tıbbi bilgisiyle bana ışık tutan, destek, hoşgörü ve yönlendirmesiyle hiçbir yardımı esirgemeyen, yüksek lisans eğitimime katkı sağlayan ve tıbbi bilgilerimi borçlu olduğum değerli tez danışmanım

Doç. Dr. İsmail ÜN 'e,

Tez çalışmamla ilgili bazı analizlerin yapılmasında bana yardımcı olan, eğitimime katkı sağlayan, ihtiyacım olduğunda karşılıksız yardım ve desteklerini benden esirgemeyen

Doktor Öğretim Üyesi Rukiye Nalan TİFTİK 'e

Yüksek lisans eğitimim boyunca beni anlayan, dinleyen, destek ve yardımlarını esirgemeyen Çocuk Acil ekibine ve kadim dostum Raziye Nurşen ÇAVDAR 'a

Bu mücadele ile dolu yüksek lisans eğitimim boyunca her zaman yanımda olan, sevgisinden güç aldığım, yüreğimin ikizi eşim Sara ve çocuklarım Yusuf Kutay ve Ömer Utkay 'a,

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

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
İÇ KAPAK	i
ONAY	ii
ETİK BEYAN	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
KISALTMALAR ve SİMGELER	xiii
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI</b>	<b>3</b>
2.1. Kanser	3
2.1.1. Kanserin Tanımı ve Önemi	3
2.1.2. Kanser Hücresinin Özellikleri	7
2.1.3. Bir Hücrenin Kanserli Hale Gelmesi	13
2.1.4. Risk Faktörleri	13
2.2. Endometriyum Kanseri	14
2.2.1. Endometriyum Kanseri	14
2.2.2. Endometriyum Kanserinin Sıklığı	17
2.2.3. Endometriyum Kanserinin Risk Faktörleri	17
2.3.D Vitamini	18
2.3.1. D Vitamini Tanımı	18
2.3.2. D Vitamini Kaynakları ve Metabolizması	19
2.3.3. D Vitamini Reseptörü	24
2.3.4. D Vitamini Düzeyi	24
2.3.5. D Vitamininin Genomik ve Non-Genomik Etkileri	26
2.3.6. D Vitamini Eksikliği ve Tedavisi	27
2.3.7. D Vitamini ve Kanser	28
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM</b>	<b>33</b>
3.1. Materyaller	33
3.1.1. Kullanılan Kimyasallar	33
3.1.2. Cihazlar ve Laboratuvar Gereçleri	33
3.2. Yöntem	34
3.2.1. Hücre Kültürü	34
3.2.2. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi	36
3.2.2.1. Deney Gruplarının Tasarlanması ve Kimyasalların Hazırlanması	40
3.2.2.2. HEC1A Hücrelerinde D Vitamininin Proliferasyon Üzerine Etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi ile Belirlenmesi	42
3.2.2.3. HEC1A Hücrelerinde D Vitamininin Migrasyon Üzerine Etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi ile Belirlenmesi	44
3.2.2.4. HEC1A Hücrelerinde D Vitamininin İnvazyon Üzerine Etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi ile Belirlenmesi	47
3.3. Yara İyileşme Modeli	50
3.3.1. HEC1A Hücrelerinde D Vitamininin İnvazyon Üzerine Etkisinin Yara İyileşme Modeli ile Belirlenmesi	50
3.4. İstatistik Analizleri	53



	<b>Sayfa</b>
<b>4. BULGULAR</b>	54
4.1. Endometriyum Adenokarsinoma HEC1A Hücrelerinde D Vitamininin Proliferasyon Üzerine Etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Analizi	54
4.1.1. Endometriyum Adenokarsinoma HEC1A Hücrelerinde Etanolün Proliferasyon Üzerine Etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Analizi	54
4.1.2. Endometriyum Adenokarsinoma HEC1A Hücrelerinde Alfakalsidol ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$ M) ve Kalsitriolün ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$ M) Proliferasyon Üzerine Etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Analizi	54
4.1.3. Endometriyum Adenokarsinoma HEC1A Hücrelerinde Alfakalsidol ( $10^{-9}$ - $10^{-11}$ M) ve Kalsitriolün ( $10^{-9}$ - $10^{-11}$ M) Proliferasyon Üzerine Etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Analizi	59
4.2. Endometriyum Adenokarsinoma HEC1A Hücrelerinde D Vitamininin Migrasyon Üzerine Etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Analizi	63
4.2.1. Endometriyum Adenokarsinoma HEC1A Hücrelerinde Etanolün Migrasyon Üzerine Etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Analizi	63
4.2.2. Endometriyum Adenokarsinoma HEC1A Hücrelerinde Alfakalsidol ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$ M) ve Kalsitriolün ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$ M) Migrasyon Üzerine Etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Analizi	64
4.2.3. Endometriyum Adenokarsinoma HEC1A Hücrelerinde Alfakalsidol ( $10^{-9}$ - $10^{-11}$ M) ve Kalsitriolün ( $10^{-9}$ - $10^{-11}$ M) Migrasyon Üzerine Etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Analizi	68
4.3. Endometriyum Adenokarsinoma HEC1A Hücrelerinde D vitamininin Migrasyon Üzerine Etkisinin Yara İyileşme Modeli İle Gösterilmesi	73
4.3.1. Endometriyum Adenokarsinoma HEC1A Hücrelerinde Etanolün Yara İyileşme Modeli Üzerine Etkisi	73
4.3.2. Endometriyum Adenokarsinoma HEC1A Hücrelerinde Alfakalsidol ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$ M) ve Kalsitriolün ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$ M) Yara İyileşme Modeli Üzerine Etkisi	74
4.3.3. Endometriyum Adenokarsinoma HEC1A Hücrelerinde Alfakalsidol ( $10^{-9}$ - $10^{-11}$ M) ve Kalsitriolün ( $10^{-9}$ - $10^{-11}$ M) Yara İyileşme Modeli Üzerine Etkisi	80
4.4. Endometriyum Adenokarsinoma HEC1A Hücrelerinde D Vitamininin İnvazyon Üzerine Etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Analizi	86
4.4.1. Endometriyum Adenokarsinoma HEC1A Hücrelerinde Etanolün İnvazyon Üzerine Etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Analizi	86
4.4.2. Endometriyum Adenokarsinoma HEC1A Hücrelerinde Alfakalsidol ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$ M) ve Kalsitriolün ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$ M) İnvazyon Üzerine Etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Analizi	87
4.5. Bulguların Değerlendirilmesi	88
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ</b>	89
KAYNAKLAR	95
ÖZGEÇMİŞ	103

## TABLULAR DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Tablo 2.1.1. Yaşa göre standardize edilmiş hız	6
Tablo 2.3.4. D vitamininin kanda ki 25(OH)D düzeyleri	25
Tablo 3.2.2.1. Gerçek zamanlı hücre analiz modelinde proliferasyon için E-plate, migrasyon ve invazyon için CIM-plate düzeneği	41
Tablo 3.2.2.2.A. Gerçek zamanlı hücre analiz modelinde proliferasyon için al fakalsidol ve kalsitriol ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$ M) E-plate düzeneği	42
Tablo 3.2.2.2.B. Gerçek zamanlı hücre analiz modelinde proliferasyon için al fakalsidol ve kalsitriol ( $10^{-9}$ - $10^{-11}$ M) E-plate düzeneği	42
Tablo 3.2.2.3.A. Gerçek zamanlı hücre analiz modelinde migrasyon için al fakalsidol ve kalsitriol ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$ M) CIM-plate düzeneği	44
Tablo 3.2.2.3.B. Gerçek zamanlı hücre analiz modelinde migrasyon için al fakalsidol ve kalsitriol ( $10^{-9}$ - $10^{-11}$ M) CIM-plate düzeneği	45
Tablo 3.2.2.4.A. Gerçek zamanlı hücre analiz modelinde invazyon için al fakalsidol ve kalsitriol ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$ M) CIM-plate düzeneği	47
Tablo 3.2.2.4.B. Gerçek zamanlı hücre analiz modelinde invazyon için al fakalsidol ve kalsitriol ( $10^{-9}$ - $10^{-11}$ M) CIM-plate düzeneği	48
Tablo 3.3.1.A. Yara iyileşme modeli, al fakalsidol ve kalsitriol ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$ M) 24 well plate düzeneği	51
Tablo 3.3.1.B. Yara iyileşme modeli, al fakalsidol ve kalsitriol ( $10^{-9}$ - $10^{-11}$ M) 24 well plate düzeneği	51
Tablo 4.5. Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde al fakalsidol ve kalsitriolün proliferasyon ve migrasyon üzerine etkilerine toplu bakış	88

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Şekil 2.1.1.A.2010-2014 Yılları Arasındaki Tüm Kanserler Yaşa Standardize İnsidans Hızlarının Cinsiyete Göre Dağılımı	5
Şekil 2.1.1.B.Erkeklerde en sık görülen kanserlerin yaşa göre standardize edilmiş hızları	5
Şekil 2.1.1.C. Kadınlarda en sık görülen kanserlerin yaşa göre standardize edilmiş hızları	6
Şekil 2.1.2.A. Bir tümör hücrenin mutasyon sonucu hücre klonu oluşturması	8
Şekil 2.1.2.B. Hücre döngüsü evreleri	9
Şekil 2.1.2.C. Kültür ortamında normal ve kanser hücrenin proliferasyonu	10
Şekil 2.1.2.D. Kanser hücrelerinde anjiogenezin gösterilmesi	11
Şekil 2.1.2.E. Kanser hücrenin temel özellikleri	12
Şekil 2.2.1.A. Rahmin yapısı	15
Şekil 2.3.2.A. D vitamininin deride sentezi	20
Şekil 2.3.2.B. D vitamini metabolizması	23
Şekil 2.3.7. Jinekolojik kanserlerde D vitamini ve D vitamini reseptörünün rolü	30
Şekil 3.2.2.A. xCELLingence sistemi RTCA DP cihazı ve kontrol ünitesi	37
Şekil 3.2.2.B. E-plate	38
Şekil 3.2.2.C. CIM-plate 16	39
Şekil 3.2.2.D. CIM-plate'de migrasyon ve invazyon analizi	39
Şekil 3.2.2.E. Migrasyon/invazyon gerçek zamanlı CIM-plate analizi	40
Şekil 3.3.1.A. 24 well plate	50
Şekil 3.3.1.B. Yara iyileşme modeli örneği	51
Şekil 3.3.1.C. Jiang ve arkadaşlarının yaptığı yara iyileşme modelinde 0., 24. ve 48. saatteki yaraların görüntüleri ve ölçümleri	53
Şekil 4.1.1.: Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde etanol ve kontrol grubunun proliferasyon üzerine etkisi	54
Şekil 4.1.2.A. Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde $10^{-6}$ M al fakalsidolün proliferasyon üzerine etkisi	55
Şekil 4.1.2.B. Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde $10^{-7}$ M al fakalsidolün proliferasyon üzerine etkisi	55
Şekil 4.1.2.C. Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde $10^{-8}$ M al fakalsidolün proliferasyon üzerine etkisi	56
Şekil 4.1.2.D. Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde al fakalsidolün ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$ M) proliferasyon üzerine etkisi	56
Şekil 4.1.2.E. Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde $10^{-6}$ M kalsitriolün proliferasyon üzerine etkisi	57
Şekil 4.1.2.F. Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde $10^{-7}$ M kalsitriolün proliferasyon üzerine etkisi	57
Şekil 4.1.2.G. Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde $10^{-8}$ M kalsitriolün proliferasyon üzerine etkisi	58
Şekil 4.1.2.H. Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde kalsitriolün ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$ M) proliferasyon üzerine etkisi	58
Şekil 4.1.3.A. Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde $10^{-9}$ M al fakalsidolün proliferasyon üzerine etkisi	59
Şekil 4.1.3.B. Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde $10^{-10}$ M al fakalsidolün proliferasyon üzerine etkisi	60
Şekil 4.1.3.C. Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde $10^{-11}$ M al fakalsidolün proliferasyon üzerine etkisi	60

	<b>Sayfa</b>
Şekil 4.1.3.D. Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde al fakalsidolün ( $10^{-9}$ - $10^{-11}$ M) proliferasyon üzerine etkisi	61
Şekil 4.1.3.E. Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde $10^{-9}$ M kalsitriolün proliferasyon üzerine etkisi	61
Şekil 4.1.3.F. Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde $10^{-10}$ M kalsitriolün proliferasyon üzerine etkisi	62
Şekil 4.1.3.G. Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde $10^{-11}$ M kalsitriolün proliferasyon üzerine etkisi	62
Şekil 4.1.3.H. Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde kalsitriolün ( $10^{-9}$ - $10^{-11}$ M ) proliferasyon üzerine etkisi	63
Şekil 4.2.1. Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde etanol ve kontrol grubunun migrasyon üzerine etkisi	64
Şekil 4.2.2.A. Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde $10^{-6}$ M al fakalsidolün migrasyon üzerine etkisi	65
Şekil 4.2.2.B. Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde $10^{-7}$ M al fakalsidolün migrasyon üzerine etkisi	65
Şekil 4.2.2.C. Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde $10^{-8}$ M al fakalsidolün migrasyon üzerine etkisi	66
Şekil 4.2.2.D. Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde al fakalsidolün ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$ M) migrasyon üzerine etkisi	66
Şekil 4.2.2.E. Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde $10^{-6}$ M kalsitriolün migrasyon üzerine etkisi	67
Şekil 4.2.2.F. Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde $10^{-7}$ M kalsitriolün migrasyon üzerine etkisi	67
Şekil 4.2.2.G. Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde $10^{-8}$ M kalsitriolün migrasyon üzerine etkisi	68
Şekil 4.2.2.H. Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde kalsitriolün ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$ M) migrasyon üzerine etkisi	68
Şekil 4.2.3.A. Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde $10^{-9}$ M al fakalsidolün proliferasyon üzerine etkisi	69
Şekil 4.2.3.B. Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde $10^{-10}$ M al fakalsidolün migrasyon üzerine etkisi	69
Şekil 4.2.3.C. Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde $10^{-11}$ M al fakalsidolün migrasyon üzerine etkisi	70
Şekil 4.2.3.D. Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde al fakalsidolün ( $10^{-9}$ - $10^{-11}$ M) migrasyon üzerine etkisi	70
Şekil 4.2.3.E. Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde $10^{-9}$ M kalsitriolün migrasyon üzerine etkisi	71
Şekil 4.2.3.F. Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde $10^{-10}$ M kalsitriolün migrasyon üzerine etkisi	71
Şekil 4.2.3.G. Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde $10^{-11}$ M kalsitriolün migrasyon üzerine etkisi	72
Şekil 4.2.3.H. Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde kalsitriolün ( $10^{-9}$ - $10^{-11}$ M) migrasyon üzerine etkisi	72
Şekil 4.3.1.A. Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde etanol ve kontrol grubunun 0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığı üzerine etkisi	73
Şekil 4.3.1.B. Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde etanol ve kontrol grubunun 0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığı üzerine etkisi	74
Şekil 4.3.2.A. Alfakalsidolün ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$ M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde 0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığı örnek görüntüleri	75
Şekil 4.3.2.B. Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde $10^{-6}$ M al fakalsidolün 0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığı üzerine etkisi	75
Şekil 4.3.2.C. Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde $10^{-7}$ M al fakalsidolün	76

	<b>Sayfa</b>
0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığı üzerine etkisi	
Şekil 4.3.2.D. Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde $10^{-8}$ M alfakasidolün	76
0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığı üzerine etkisi	
Şekil 4.3.2.E. Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde alfakasidolün	77
( $10^{-6}$ - $10^{-8}$ M) 0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığı üzerine etkisi	
Şekil 4.3.2.F. Kalsitriolün $10^{-6}$ - $10^{-8}$ M endometriyum adenokarsinoma HEC1A	78
hücrelerinde 0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığı örnek görüntüleri	
Şekil 4.3.2.G. Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde $10^{-6}$ M kalsitriolün	78
0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığı üzerine etkisi	
Şekil 4.3.2.H. Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde $10^{-7}$ M kalsitriolün	79
0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığı üzerine etkisi	
Şekil 4.3.2.I. Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde $10^{-8}$ M kalsitriolün 0.	79
saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığı üzerine etkisi	
Şekil 4.3.2.J. Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde kalsitriolün	80
( $10^{-6}$ - $10^{-8}$ M) 0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığı üzerine etkisi	
Şekil 4.3.3.A. Alfakaldisolün ( $10^{-9}$ - $10^{-11}$ M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A	81
hücrelerinde 0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığı örnek görüntüleri	
Şekil 4.3.3.B. Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde $10^{-9}$ M alfakasidolün	81
0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığı üzerine etkisi	
Şekil 4.3.3.C. Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde $10^{-10}$ M	82
alfakasidolün 0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığı üzerine etkisi	
Şekil 4.3.3.D. Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde $10^{-11}$ M	82
alfakasidolün 0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığı üzerine etkisi	
Şekil 4.3.3.E. Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde alfakasidolün	83
( $10^{-9}$ - $10^{-11}$ M) 0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığı üzerine etkisi	
Şekil 4.3.3.F. Kalsitriolün ( $10^{-9}$ - $10^{-11}$ M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A	84
hücrelerinde 0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığı örnek görüntüleri	
Şekil 4.3.3.G. Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde $10^{-9}$ M kalsitriolün	84
0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığı üzerine etkisi	
Şekil 4.3.3.H. Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde $10^{-10}$ M kalsitriolün	85
0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığı üzerine etkisi	
Şekil 4.3.3.I. Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde $10^{-11}$ M kalsitriolün	85
0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığı üzerine etkisi	
Şekil 4.3.3.J. Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde kalsitriolün	86
( $10^{-6}$ - $10^{-8}$ M) 0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığı üzerine etkisi	
Şekil 4.4.1. Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde etanol ve kontrol	87
grubunun invazyon üzerine etkisi	

## KISALTMALAR ve SİMGELER

Kısaltma/Simge	Tanım
ATP	Adenozin trifosfat
cAMP	Siklik adenozin monofosfat
CYP	Sitokrom P450
C/EBP $\beta$	Transkripsiyon (sitosin-sitozin-adenosin-adenosin-timidin) faktörü
CI	Hücre İndeksi
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DMSO	Dimetilsülfoksit
DMEM	Dulbecco'nun modifiye eagle medyumunu
DPBS	Dulbecco'nun fosfat-tamponlu tuz
EDTA	Etilendiamin ve klorasetik asit
FBS	Fetal sığır serumu
FGF23	Fibroblast büyüme faktörü 23
h	Saat
HCRR-1	Mitokondriyal protein
HEC-1-A	Human endometriyum adenokarsinoma
IFN- $\gamma$	İnterferon gama
IL-2	İnterlökin-2
IL-12	İnterlökin-12
IU	Uluslararası ünite
JAK/STAT	Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon proteinlerinin aktivatörü
kg	Kilogram
L	Litre
M	Molar
mcg	Mikrogram
ml	Mililitre
NF $\kappa$ B	Nükleer faktör kappa B
ng	Nanogram
nmol	Nanomol
PTH	Paratiroid hormonu
p21, p27	Sikline bağlı kinaz inhibitörleri
p38 MAPK	Mitojen aktif protein kinaz
RNA	Ribo nükleik asit
RNX	Retinoid asit-X reseptörü
RTCA DP	Real-time hücre analizi-Çift plate
rpm	Revolutions per minute
Th1/Th2	T hepler 1/ T hepler 2
TNF- $\alpha$	Tümör nekroz faktör alfa
UV	Ultraviyole
VEGF-A	Vasküler endotelial büyüme faktörü
VDR	D vitamini reseptörü
$\mu$ g	Mikrogram
$\mu$ l	Mikrolitre
$\mu$ m	Mikrometre
xCELLigence	Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi
24(S)-NH	Fenil sülfoksimin D-halkası

## 1. GİRİŞ

Endometriyum karsinoma günümüzde en sık rastlanan jinekolojik malignitedir ve en sık görülen genital sistemi infiltre eden tümörler arasındadır [1]. Çoğu endometriyum karsinomaları endometriyumdaki bez hücrelerinin kanseridir ve bunlar adenokarsinoma olarak isimlendirilir [2]. Endometriyum adenokarsinoma kadınlarda en yaygın görülen dördüncü kanser türüdür [3]. Endometriyal kanser gelişme riskini etkileyen faktörler, yaş, diyet ve egzersiz, diyabet, hormon tedavisi (tamoksifen kullanımı vb.), intuterin cihaz kullanımı, aile öyküsü, erken menarş, geç menapoz ve radyasyon tedavisidir [4]. Ancak, beslenme ve çevresel maruziyet gibi değiştirilebilir faktörlerin rolü tam olarak araştırılmamıştır. D vitamini endometriyum kanseri dâhil çok sayıda kanser oluşma riskini azaltmak için önerilmiştir [5-8].

Antiproliferatif ve immünomodülatör özellikleri olan D vitamini aslında bir seko-steroid hormondur ve en önemli etkisi kalsiyum ve fosfat mekanizması üzerinedir [9,10]. Kemik homeostazında önemli rolü olan ve yağda çözünen bir pro-hormon olan D vitamini, bu temel fonksiyonunun yanında hücre büyümesi modülasyonu ve nöromüsküler fonksiyonları da düzenler [11]. Buna ek olarak, çeşitli in vitro ve in vivo çalışmalar, D vitamini eksikliğinin kanser, otoimmün ve kardiyovasküler hastalık riskini artırabildiğini göstermiştir [11,12]. D vitamininin vitamin D<sub>2</sub> (ergokalsiferol) ve vitamin D<sub>3</sub> (kolekalsiferol) olmak üzere iki önemli formu vardır [13,14]. Yapılan çalışmalarda kalsitriol (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) ve analogları, D vitamini reseptörünün aracılık ettiği insan kanser hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiğini göstermiştir [15]. D vitamini reseptörü endotel, düz kas, kalp kası, beyin, meme, prostat, kolon hücreleri, immün hücreler gibi birçok dokuda bulunmaktadır. [16-18].

Son zamanlarda artan kanıtlar, D vitamini ve reseptörünün jinekolojik kanserlerin gelişiminde önemli bir rol oynadığını göstermektedir [19]. Endometriyal dokuda D vitamini reseptör varlığının gösterilmesi [2,3], aynı zamanda kalsitriolün kanser riskini ve prognozunu belirlemede rol oynayabilen birçok hücresel yolları regüle etmesi (4), D vitamininin endometriyum kanser etyolojisinde rol oynayabileceğini işaret etmiştir [15]. Yakın zamanda endometriyum kanser hücreleri üzerine paklitaksel ve karboplatinin etkisini gösteren bir çalışmada, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>'ün bu ajanların endometriyum kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisine katkıda bulunabileceği vurgulanmıştır [9].

Bu çalışmada literatürde eksik olarak gördüğümüz endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde D vitamininin proliferasyon, migrasyon ve invazyon üzerine etkilerini araştırmayı ve D vitamininin endometriyum kanserinin ilerlemesi ve yayılımı üzerindeki rolünü göstermeyi amaçladık. Bu çalışmanın sonuçları, kanser hücre/dokusunda bugüne kadar yapılmış in vitro ve in vivo çalışmalarla beraber, endometriyum kanserlerinin patogenezinin aydınlatılmasına ve hastalığın progresyonunu önlemek için yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlayabilir.





## **2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI**

### **2.1. Kanser**

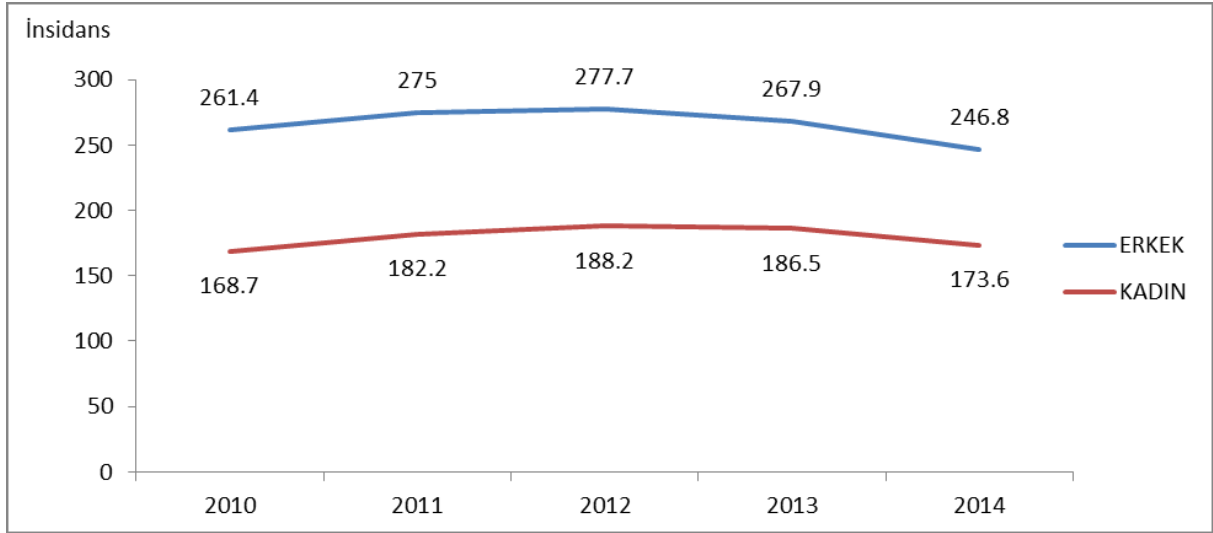
#### **2.1.1. Kanserin Tanımı ve Önemi**

Vücudumuzda tüm doku ve organlar hücrelerden oluşur ve hücreler belirli bir düzen içerisinde, belirli bir hızda ve kontrol altında çoğalırlar. Hücrelerin bu bölünerek çoğalabilme yetenekleri ölen hücrelerin yenilenmesi ve yaralanan dokuların onarılması içindir, ama bu yetenekleri de sınırlıdır ve sonsuza kadar bölünemezler. Kanser hücreleri ise kontrolsüz olarak bölünerek tümörleri veya kitleleri oluştururlar. Bu kontrolsüz çoğalma sırasında kanser hücresinde, sağlıklı hücrelere göre yapısal ve işlevsel farklılıklar ortaya çıkabilmektedir. Bu farklılıklar bazen hücrenin normalde yaptığı işlevini bozarken bazen de normalde olmayan bazı yeni işlevleri yapmaya başlamasıyla sonuçlanabilmektedir. Kanser hücreleri ise buldukları yerdeki doku ve organları işgal ederek işlevini engelleyebilmektedir. Bazen de kanser hücreleri buldukları yerden, kan ya da lenf dolaşımı aracılığı ile vücudun diğer bölgelerine gidebilmekte ve orada büyümeye devam edebilmektedir. Kanserin bu şekilde vücudun diğer bölgelerine yayılması olayına metastaz adı verilmektedir. Bir hastalık olarak kanser tablosu ortaya çıkıncaya kadar geçen kanser oluşum süresi, kanser cinslerine göre değişkenlik gösterebilmektedir. Kanserin cinsine göre belirti, bulgu ve tedavileri de değişkenlik göstermektedir [22,23].

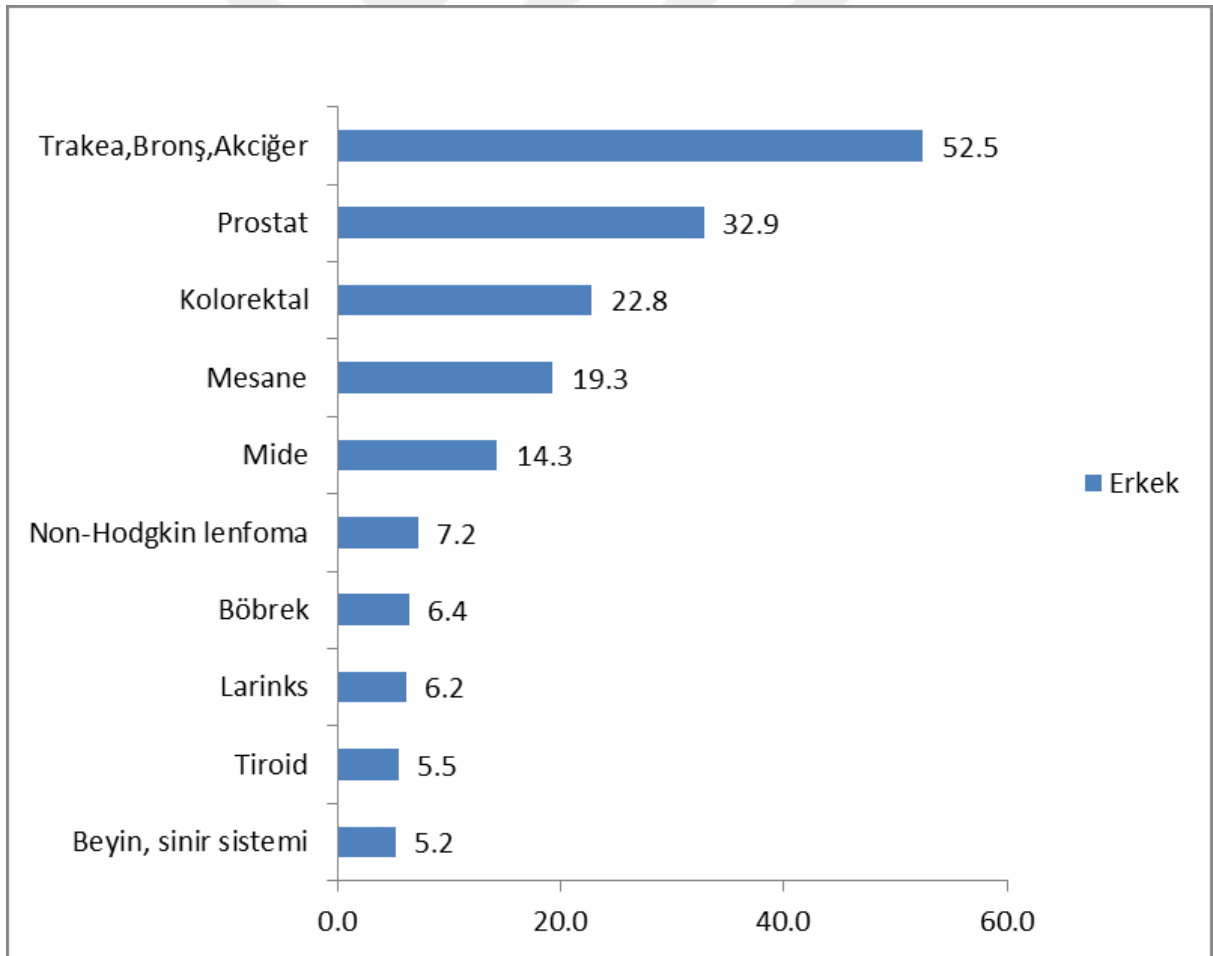
Dünya genelinde giderek artan kanserin bir sağlık problemi olduğu ve toplumlarda önemli bir sosyoekonomik yüke, insanlarda da maddi, manevi kayıp ve zorluklara yol açtığı bildirilmiştir. Dünya kanser istatistiklerinin yeni yayınlanan raporuna göre; ölüm nedenleri arasında kanserin ilk sırada yer aldığı bildirilmiştir. Dünyada toplam 14,1 milyon yeni kanser vakası tanısı konmuş ve 8,2 milyon kişi kansere bağlı yaşamını yitirmiştir. Kanserde prognoz böyle devam ettiği sürece 2030 yılında 22 milyon yeni vaka ortaya çıkması beklenmektedir. 2008 yılı verilerine göre ise yeni vakalarda %75 artış olması öngörülmektedir. Gelecek yıllarda gelişecek olan kanser vakalarının büyük bir kısmının gelişmiş ülkelere göre az gelişmiş ülkelerde ortaya çıkması beklenmektedir. 2011 yılında Birleşmiş Milletler çağımızın hastalığı olarak nitelendirdiği ve global bir sorunu olarak kabul ettiği kanser ile mücadele de, tüm dünya ülkelerine kendi ulusal kanser kontrol programları oluşturmalarını ve bu programları uygulamaya geçmeleri hususunda çağrıda bulunmuştur [24-27].

Türkiye Bilimler Akademisi 2014 yılı raporuna göre; kanser yaşam süresi ve sosyo-ekonomik gelişmişlik başta olmak üzere birçok parametrelerin etkisiyle toplumdan topluma sıklığı değişiklik gösteren bir hastalık grubudur. Dünyada kanserin görülme sıklığı 100-550/100.000 olduğu bildirmiştir. Her yıl dünyada 14 milyon yeni vaka ortaya çıkmakta ve 8 milyon insan kanserden dolayı hayatını kaybetmektedir. Genetik veya çevresel etkilerle ortaya çıkan kanser, ülkemizde yaklaşık yılda 162.000 yeni vakayla karşımıza çıkmakta ve yaklaşık 140.000 insanında bu nedenle öldüğü bir hastalıktır. Ülkemizde 2009 verilerine göre kanserin sıklığı kadınlarda ise 100 binde 173, erkeklerde 100 binde 270 olup ve toplam nüfusta 100 binde 222'dir. Bu değerler analiz edildiğinde çıkan sonuçların dünya ortalaması üstünde ve gelişmiş ülkelerde 2020 yıllarından sonra kansere bağlı ölümlerin birinci sıraya yükseleceği öngörülmektedir [28].

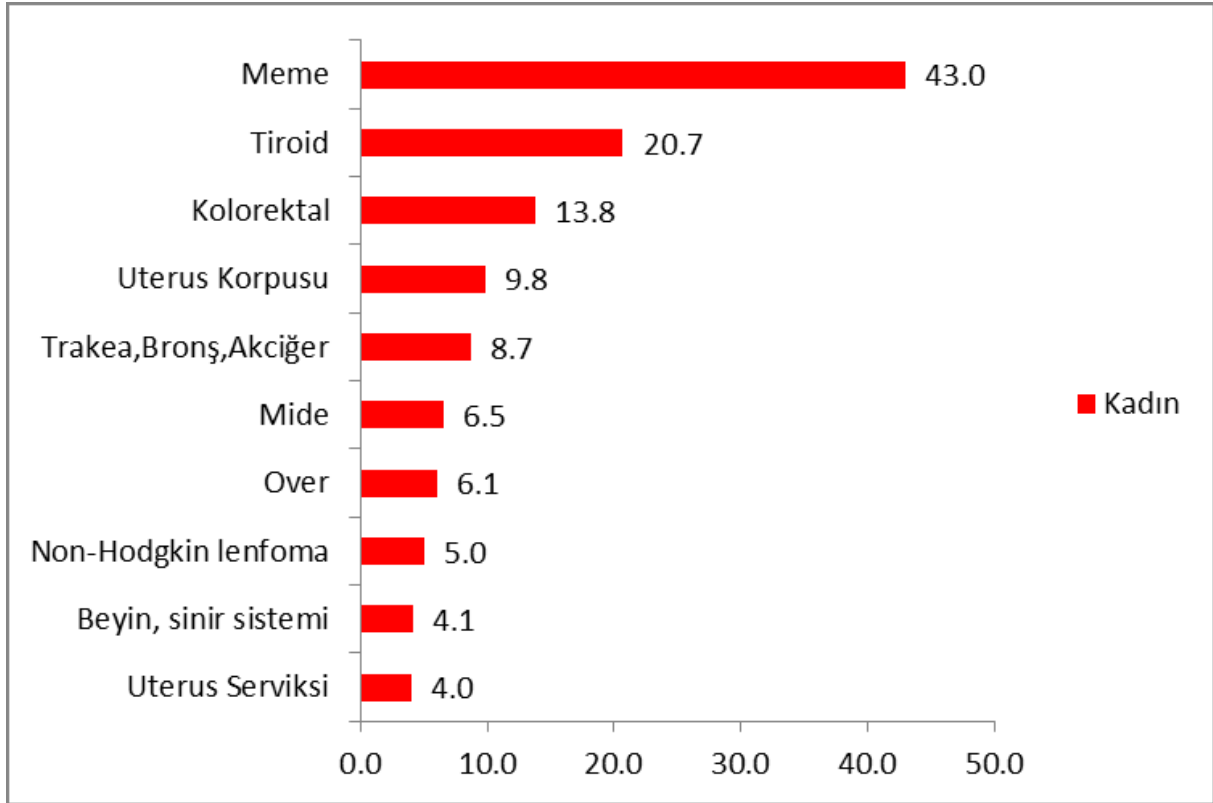
Türkiye kanser istatistikleri 2014 raporuna göre; Türkiye'de 2010-2014 yılları arasında yaşa standardize edilmiş kanser hızı kadınlarda 1736/100000, erkeklerde 246.8/100000, toplamda ise kanser insidansı yüz binde 210,2 olduğu bildirilmiştir (şekil 2.1.1.A.). Türkiye'de 2014 yılında toplam 163417 kişi yeni kanser teşhisi almıştır. 2010-2014 yılları arasındaki veriler değerlendirildiğinde; kadınlarda ve de erkeklerde kanser sıklığı açısından istatistiksel olarak son 5 yıl da herhangi bir fark olmadığı söylenebilir. Ülkemizde en sık görülen kanser türleri erkeklerde akciğer, prostat, kolorektal, mesane, mide, Non-Hodgkin Lenfoma, böbrek, larinks, tiroid ve beyin (şekil 2.1.1.B.); kadınlarda ise meme, tiroid, kolorektal, uterus korpusu, akciğer, mide, over, Non-Hodgkin Lenfoma, beyin ve uterus serviksi (şekil 2.1.1.C.) kanserleri olarak sıralanır. Dünya kanser istatistiklerine göre Türkiye'nin durumu Uluslararası kanser ajansı tarafından 2012 yılında yayınlanan GLOBOCAN verilerine göre kanserlerin (deri kanseri hariç) yaşa göre standardize edilmiş hızları erkeklerde yüz bin kişide 220,3 iken, kadınlarda ise yüz bin kişide 156,8 olarak bildirilmiştir (Tablo 2.1.1.) [25].



Şekil 2.1.1.A.: 2010-2014 yılları arasındaki tüm kanserlerin yaşa standardize insidans hızlarının cinsiyete göre dağılımı (Dünyada her 100.000 kişide) [25].



Şekil 2.1.1.B.: Erkeklerde en sık görülen kanserlerin yaşa göre standardize edilmiş hızları (Dünyada her 100.000 kişide) [25].



Şekil 2.1.1.C.: Kadınlarda en sık görülen kanserlerin yaşa göre standardize edilmiş hızları (Dünyada her 100.000 kişide)(25).

Tablo 2.1.1.: Yaşa göre standardize edilmiş hız, (Dünyada her 100.000 kişide) [25]

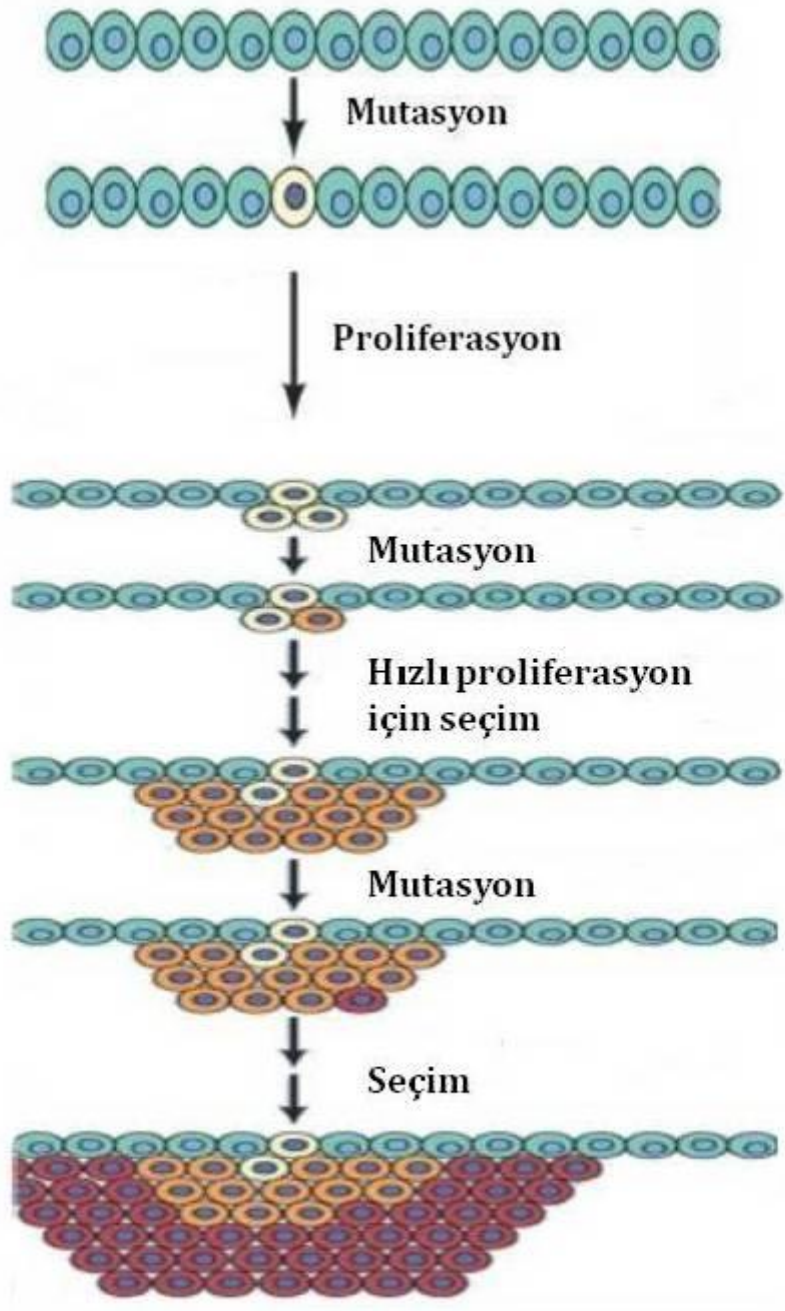
	Erkek	Kadın
Dünya	204,9	165,2
IARC'a üye 24 ülke	235,4	192,1
AB (28 ülke)	311,3	241,4
ABD	347,0	297,4
Türkiye	220,3	156,8

### 2.1.2. Kanser Hücresinin Özellikleri

Kontrolsüz hücre çoğalması olarak adlandırılan kanser, hücrenin normal davranışlarını düzenleyen mekanizmaların bozulması ile ortaya çıkar. Hücre çeşitliliğine bağlı olarak değişiklik gösteren yüzden fazla kanser türü vardır. Örneğin tümör (selim, malign), karsinoma, sarkom, lösemi, lenfoma, vb. tümörlerin gelişimi çok aşamalı bir süreç olduğundan birçok değişik faktör (radyasyon, kimyasallar, virüsler, hormonlar vb.) hücre çoğalmasını ve hücrelerin birbirleriyle olan ilişkilerini DNA hasarı yaparak, mutasyonların birikmesi ile kanserin ortaya çıkmasını tetikleyebilir [29].

Kanser hücresinin temel özelliklerinden biri tek hücreden çoğalmasıdır. Birçok tümörün tek hücreden X kromozomu inaktivasyonu ile türediği gösterilmiştir. X kromozomunun inaktivasyonu tümör gelişmeden önce tamamlanır ve tümörü oluşturan hücrelerinin hepsinin aynı hücreden tüvelendiği görülür [29]. Vücudumuzda kök hücresi dışındaki hücreler sınırlı sayıda bölünme yeteneğine sahiptirler ve belirli bir süre bölündükten sonra yaşlılık dönemine girerler [30]. Pek çok kanser türü ileri yaşlarda ortaya çıkmaktadır. Kanserin görülme sıklığının yaşla birlikte artması birden çok kanser türünün yıllar boyunca biriken çok sayıda anomalinin sonucu olabilir [29].

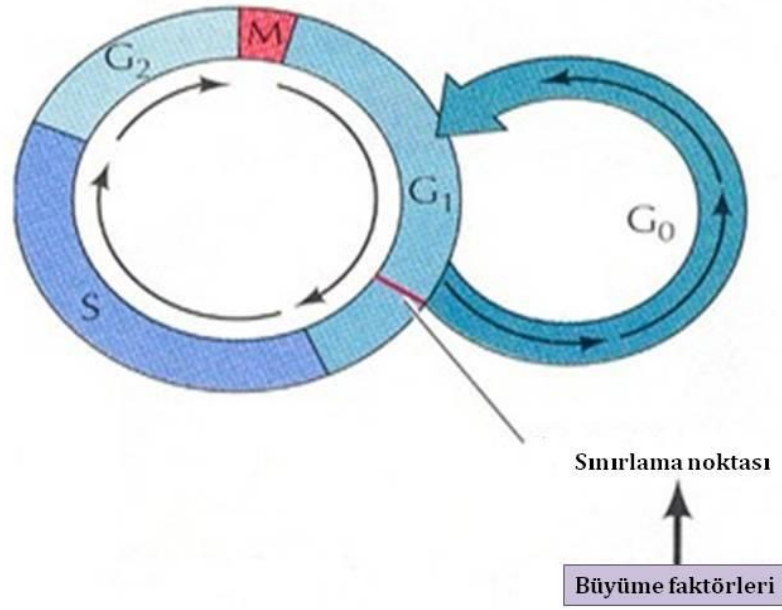
Kanser gelişiminde tümör başlangıcı bir tek hücrenin çoğalmasına neden olan genetik değişikliğin yani mutasyon oluşmasıdır. Tümör hücrelerinde oluşan hücre topluluğunun mutasyonlar sonucunda paralel olarak hücre çoğalmasının artması da tümörün ilerlemesini gösterir. Bazı mutasyonlar hücrelerde daha hızlı çoğalma gibi avantaj sağlayabilir ve tümör klonu içerisinde baskın hale gelebilirler [29]. Kanseri hücreleri geçirdikleri mutasyonlar sonucunda kendi büyüme faktörlerini (otokrin çoğalma uyarımı) üreterek daha hızlı çoğalırlar [30]. Bu hücrelerin hızlı çoğalma, invazyon, metastaz gibi özellikler kazanmasıyla yeni hücre klonu oluşturabilirler. Bu hücre klonu tümör gelişimi boyunca devam eder ve tümörler giderek daha hızlı çoğalıp malign özellik kazanabilirler (şekil 2.1.2.A.) [29]. Metastaz kansere bağlı yaşam kayıplarının % 90'ından sorumludur. Normal ve kanser hücreleri arasındaki en önemli farklarından biri de metastaz veya invazyondur [30].



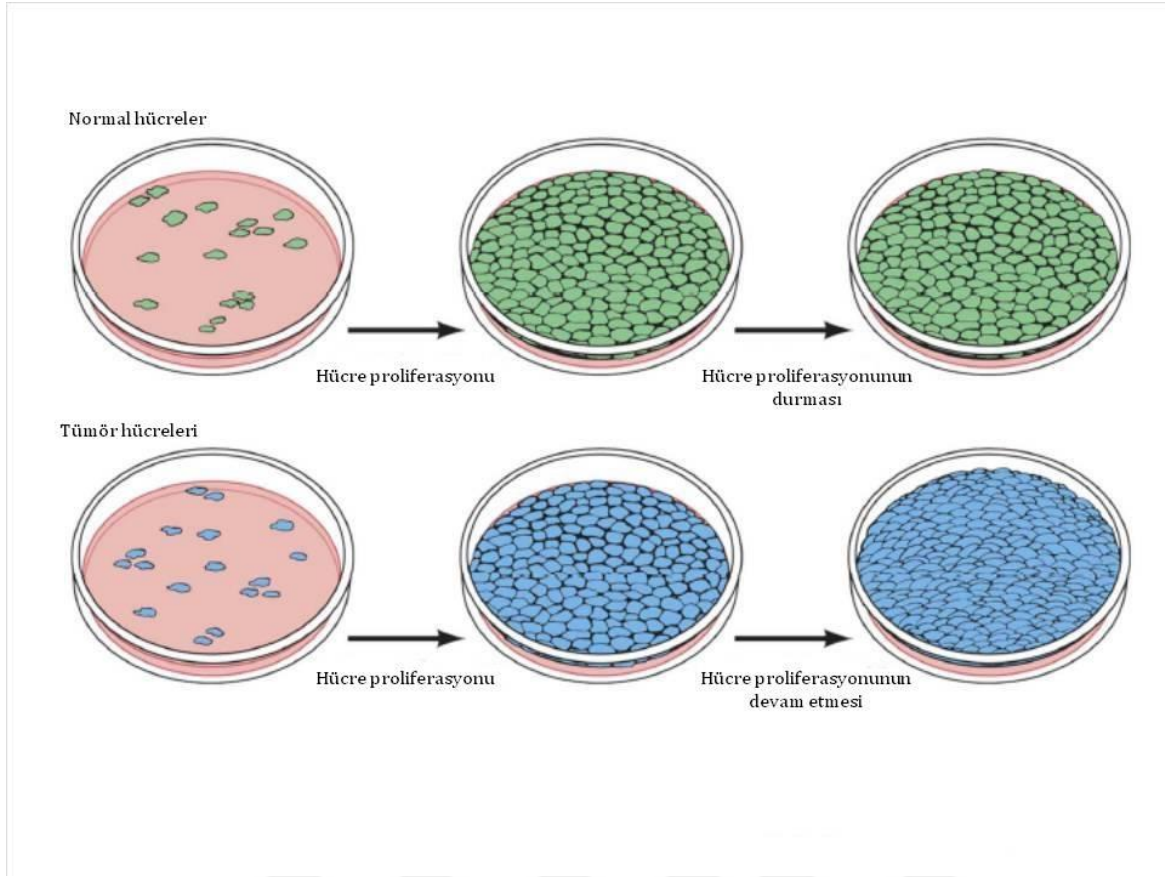
Şekil2.1.2.A.: Bir tümör hüresinin mutasyon sonucu hücre klonu oluşturması [29].

Kanser hüresinin bir özelliği de büyüme engelleyici faktörlerden kurtulmadır. Normal hücre döngüsünde hücreler belli bir büyüme kapasitesine ulaştıklarında dış ortamdan alınan bazı sinyaller ve büyüme faktörlerinin miktarına bağlı olarak çoğalmalarını  $G_0$  evrelerinde durdururlar (şekil 2.1.2.B).  $G_0$  evresinde hücreler metabolik olarak aktiftir fakat büyüme ve protein sentezinin oranı azalmıştır. Kanser hücreleri hücre kültüründe de kontrolsüz hücre çoğalmasını taklit eden hücrelerdir. Kültür ortamında kanser hücreleri normal hücre çoğalmasının yoğunluğa bağlı inhibisyonlardan etkilenmezler fakat normal hücreler bu

yoğunluktan etkilenerek çoğalmalarını  $G_0$  evresinde durdururlar. Kültür ortamında kanser ve normal hücrelerin hücre çoğalmasının arasındaki fark şekil 2.1.2.C.'de gösterilmiştir. Kanser hücresi ile normal hücre arasında ki bir önemli fark da kanser hücreleri çoğalmaları için büyüme faktörlerine daha az gereksinim duyarlar. Bu özellikleri nedeniyle hem in vivo hem in vitro ortamda kontrolsüz çoğalmalarını sağlar [29,30].



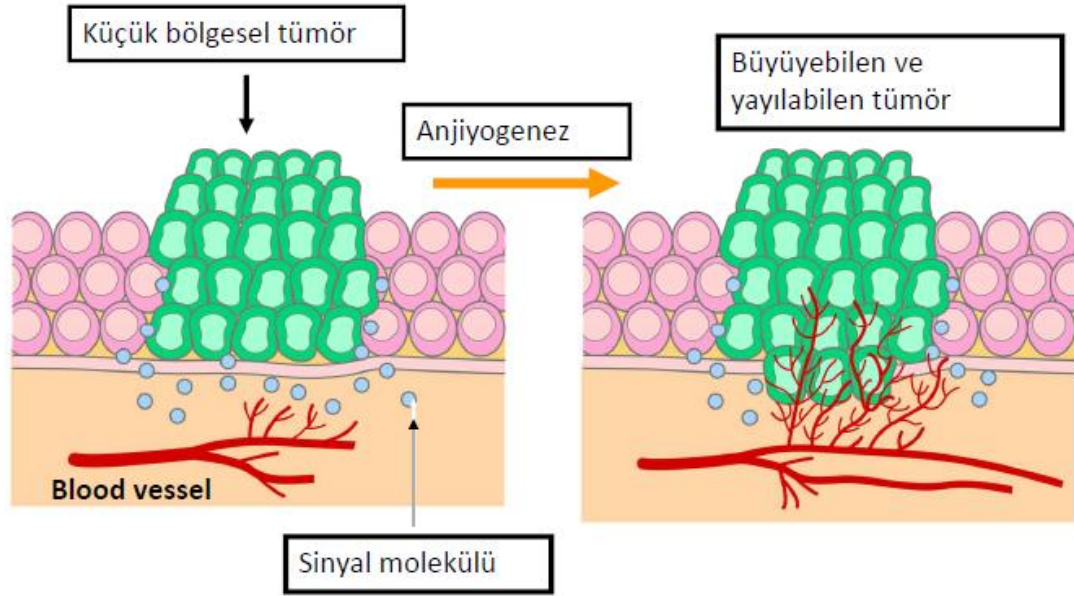
Şekil 2.1.2.B.: Hücre döngüsü evreleri [31].



Şekil 2.1.2.C.: Kültür ortamında normal ve kanser hücrelerinin proliferasyonu [32].

Kanser hücrelerinin bir özelliği de anjiogenez (yeni damar oluşturma) oluşumunu hızlandıran büyüme faktörleri salgılayabilmeleridir. Kanser hücreleri oksijen ve besin ihtiyacını karşılamak için daha fazla yeni damar oluşumlarına ihtiyaç duyar. Bu özellikleri nedeniyle kanser hücrelerinin dolaşıma girmelerine ve metastatik yayılımının başlamasına olanak sağlayabilir (şekil 2.1.2.D.). Anjiogeneze bağlı olarak tümör büyümesi birçok araştırmada gösterilmiştir. Anjiogenezin olmadığı durumlarda tümör büyümesi durur [29,30].

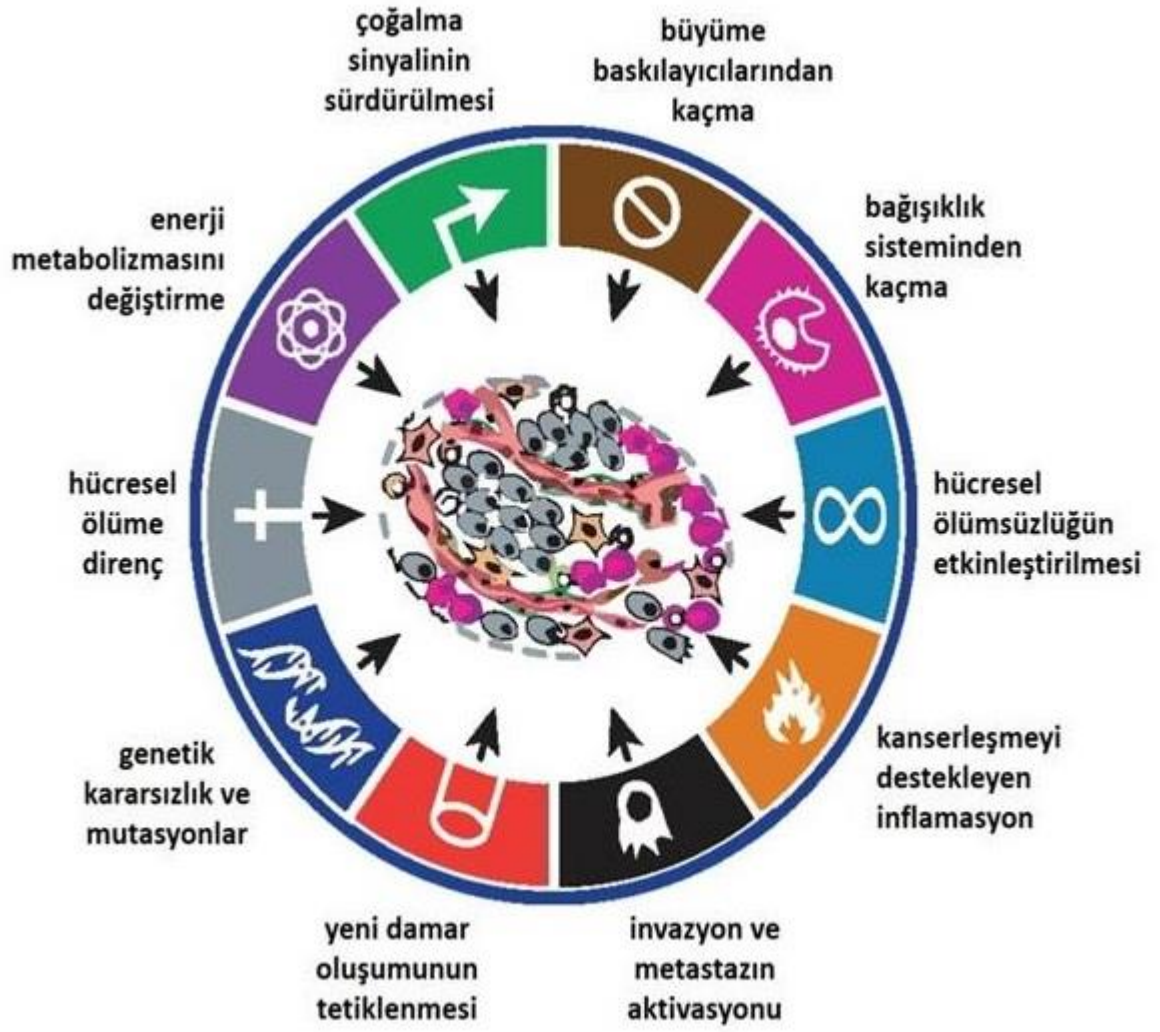




Şekil 2.1.2.D.: Kanser hücrelerinde anjiyogenezin gösterilmesi [29].

Kanser hücrelerinin bir özelliği de farklılaşmamasıdır. Normalde hücre farklılaştıktan sonra hücre çoğalmasını durdurur. Kanser hücrelerinin sürekli çoğalması devam ettiği için farklılaşmanın erken evresinde kalır. Normal hücre farklılaşmasının en önemli unsuru apoptoz veya programlı hücre ölümüdür. Kanser hücrelerinde farklılaşma görülmediği için apoptoz da görülmez, dolayısıyla kanser hücrelerinin sağ kalım süresi uzar. Kanser hücreleri hücre çoğalmasında azalan telomer kısalmasını engellemek için bazı (telomeraz) enzimlerin aktivitesini artırır. Böylece kontrolsüz hücre çoğalması yeteneğine sahip olurlar [29,30].

Kanser hücrelerinin temel özellikleri şekil 2.1.2.E.'de gösterilmiştir. Kanser araştırmalarındaki yeni yapılan çalışmalar da yeni özellikler keşfedilmektedir. Kanser ile mücadelede bu özelliklerin önemi büyüktür ve bu özellikleri ileride medikal tedaviye katkı sağlayabilir [30].



Şekil 2.1.2.E.: Kanser hücre sinim temel özellikleri [33].

### 2.1.3. Bir Hücrenin Kanserli Hale Gelmesi

Kanser, hücrelerin kontrolsüz, aşırı ve zamansız çoğalmalarına, immün sistemin denetiminden kurtulma ve sonuç da buldukları yerden uzaktaki dokuları da istila ederek metastazlar oluşturabilen metabolik ve davranışsal değişiklikler geçirdikleri çok basamaklı bir süreçten oluşur. Bir kanser hücresi sağlıklı bir hücrenin hayatını yöneten kurallardan kaçarak, bağımsız bir hayatta kalma avantajı elde eden “serseri bir hücre” olarak da tanımlanır. Deneysel çalışmalarda bir kanser hücresi gelişmesi için üç temel kuralı ihlal etmesi gerektiği bildirilmiştir [33,34]. Bunlar;

1. Hücrelerin doğru sinyal aldıklarında bölünmesidir.
2. Hücreler yanlış koşullarla karşılaştığında DNA replikasyonunu başlatmak. (kendini imha programı)
3. Normal hücrelerin sınırlı ve belirli sayıda bölünmesidir.

Birinci ve ikinci kural mutasyon sonucu ihlal edildiğinde hücreler bölünmekle kalmaz, hücreler programlanmış hücre ölümünü de devre dışı bırakmış olur ve bir tümör hücresinin oluşmasına izin vermiş olur. Sağlıklı hücrelerin belirli sayıda bölünmesi için bir hücre kromozomunun ucunda yer alan telomer adı verilen özel bir yapı vardır. Bir hücre kromozomun da yeralan telomer, bir hücre bölünmesinde kopup giden, küçük DNA dizilimi tekrarlarından oluşmasını sağlar. Bir hücre tüm tekrarlar bittiğinde hücre tekrar tekrar bölünemez hale gelir ve yaşlı hücre olur. Kanserli hücreler ise telomeraz enzimini salgılayarak hücrelerin tekrardan programlanmış olan sınırlı sayının ötesinde de bölünebilmesini sağlar. İşte bu üç temel kuralın ihlal edilmesi ile bir hücrenin kanserli hale gelmesi için yeterli olur [33,34].

### 2.1.4. Risk Faktörleri

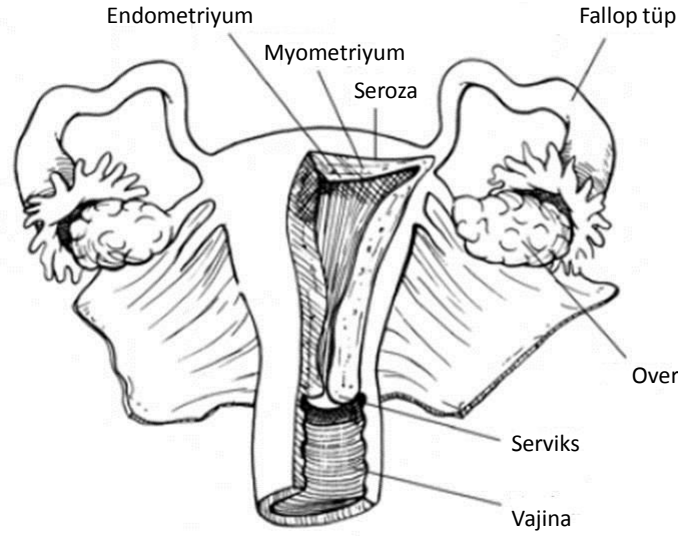
Türkiye kanser istatistikleri 2014 yılı raporunda çağımızın hastalığı olarak nitelendirildiği ve global bir sorun olarak adlandırılan kanser ile mücadele de, tüm dünya ülkelerinin ulusal kanser kontrol programlarını oluşturmalarını ve bu programları uygulamaya geçmeleri hususunda çağrıda bulunulduğu güncel bir gerçektir [25]. Yapılan araştırmalar, belirli risk faktörlerin kanser gelişme şansını artırdığını göstermiştir. Bu faktörlerin birçoğu önlenemez iken aile hikâyesi gibi faktörler ise önlenemez. Kanserden korunmada bilinen risk faktörlerinden uzak kalarak kişiler kendilerini koruyabilirler [35].

Kanser oluşumunda Dünya’da ve Türkiye’de güncel olarak tütün kullanımı, enfeksiyonlar, çevresel ve mesleki faktörler, obezite ve fiziksel hareket eksikliği öncelikli risk faktörleri olarak tanımlanmıştır [27].Kanser risk faktörleri arasında yaşlanma, alkol kullanımı, kötü beslenme, menopozal hormon tedavisi alma, ultraviyole (UV) radyasyon ve iyonize radyasyona maruziyet, bazı kimyasallar, ailede kanser hikâyesi, bazı virüsler ve bakteriler yer almaktadır [35].

## **2.2. Endometriyum Kanseri**

### **2.2.1. Endometriyum Kanseri**

Rahim boyut ve şekil olarak orta büyüklükte bir armuda benzeyen içi boş bir organdır (şekil 2.2.1.A.). Rahimin vajene uzanan alt ucuna serviks, üste uzanan kısmına korpus denir. Rahimin iki katmanı vardır; iç kısmını döşeyen zar tabakasına endometriyum, dış tabakasına da miyometriyum denir. Myometriyum doğum sırasında bebeği dışarıya itmek içindir. Rahimin kasının dışını seroza kaplar, seroza ise kadının menstrüel siklusünde hormon değişikliği sırasında endometriyumun değişmesine neden olur. Endometriyum tabakası iki bölümden oluşur. Endometriyumun altta kalan 1/3’lük kısım bazal tabakadır, yıkılmaz; üstteki 2/3’lük kısım ise fonksiyonel tabakadır, yıkılır. Menstrüel siklus başlangıcında ve ovulasyondan önce östrojen adı verilen hormonlar üretilir. Östrojen, eğer hamilelik gerçekleşirse embriyoyu besleyerek endometriyumun kalınlaşmasını sağlar, gebelik olmazsa ise östrojen daha az üretilir. Ovülasyondan sonra progesteron hormonu daha fazla salgılanır, bu hormon endometriyumun kalınlaşmasını engeller ve endometriyum dokuları artık büyümmez. Bu durum da yıkılan endometriyumun tabakasının dışarı atılır. Bu döngü kadının menopoza girinceye kadar yaşam boyu devam eder [2].



Şekil 2.2.1.A.: Rahimin yapısı [2].

Endometriyum karsinoma günümüzde en sık rastlanan jinekolojik malignitedir ve kadınlar da en sık görülen genital sisteme infiltre eden tümörler arasındadır [1]. Endometriyum kanseri rahimde başlar ve neredeyse bu kanserlerin tamamı karsinoma grubuna aittir. Çoğu endometriyum karsinomalar, endometriyuma ait olan bez hücrelerinin kanseridir. Bunlara adenokarsinoma denir. Endometriyal kanserin en yaygın türü endometriyoid adenokarsinom olarak da adlandırılır. Endometriyum kanserlerinin % 80'inden fazlası endometrioid olarak da bilinen tipik adenokarsinomlardır [2].

Endometriyal karsinomalar, hücrelerin histolojik tiplere göre farklı türlere ayrılabilir. Bunlar;

- Adenokarsinoma,
- Karsinosarkom,
- Skuamöz hücre karsinoması,
- Farklılaşmamış karsinom,
- Küçük hücreli karsinom,
- Geçiş karsinoması [2].

Berrak hücreli karsinom, müsinöz adenokarsinom ve papiller seröz adenokarsinom endometriyal adenokarsinomaların daha az yaygın tipidir. Bu türler, çoğu endometriyum

kanserlerinden daha agresif olma eğilimindedir. Hızlı bir şekilde büyüme eğilimindedirler ve teşhis anında uterusun dışında yayılmıştır [2].

Endometrioid kanserlerin pek çok alt tipleri vardır:

- Adenokarsinom, (skuamöz diferansiyasyon ile)
- Adenoakantoma,
- Adenoskuamöz,
- Sekonder karsinom,
- Silyer hücreli karsinom,
- Villoglandüler adenokarsinom [2].

Endometrioid kanser derecelendirmesinin temeli, kanserin normal sağlıklı endometriyumda bulunan (gland) bezleri ne kadar oluşturduğuna dayanır. Tümörün derecelendirilmesi ise;

- Grade 1: Tümörün %95 veya daha fazlası glandüler yapı oluşturur.
- Grade 2: Gland oluşturan tümör oranı % 50 ile % 90 arasındadır.
- Grade3: Gland oluşturan tümör oranı %50'nin altındadır. Grade 3 "yüksek dereceli" olarak adlandırılır, düşük dereceli kanserlere kıyasla agresif olma eğilimindedirler ve daha kötü prognoza sahiptirler [2].

Endometriyal kanserlerde hastalık evresi klinik evreleme ile belirlenir. Endometriyal kanserlerde klinik evreleme;

**Evre 0:** Bu aşama, yerinde karsinoma olarak da bilinir. Kanser hücreleri sadece endometriyum hücrelerinin yüzey tabakasında bulunur.

**Evre I:** Kanser sadece rahim de büyüme gösterir, ancak serviksin destekleyici bağ dokusunda (servikal stroma) büyümektedir. Kanser, lenf nodlarına veya uzak bölgelere metastaz yapmamıştır.

**Evre II:** Kanser hücresi uterusun korpusundan yayılmış ve serviksin destekleyici bağ dokusunda büyümektedir. Kanser, lenf nodlarına veya uzak bölgelere metastaz yapmamıştır.

**Evre III:** Kanser hücresi uterusun dışına veya pelvis bölgesindeki yakın dokulara yayılmıştır.

**Evre IV:** Kanser hücresi mesanenin iç yüzeyine veya rektuma, kasıktaki lenf düğümlerine ve/veya kemik, omentum veya akciğerler gibi uzak organlara metastaz yapmıştır [36].

Kanser hastalıklarında klinik evreleme tedavi algoritmasının oluşturulmasında önem arz etmektedir ve her evreye göre farklı tedavi algoritması (cerrahi tedavi, radyasyon ve kemoterapi tedavisi gibi) hastanın kliniği ve patolojisi değerlendirilerek oluşturulmaktadır. Kanser hücrelerinin uzak dokulara metastaz yapması hem tedavinin algoritmasını hem de hastanın sağ kalım süresini belirlemektedir. Bir hastada kanser hücresinin lenf yoluyla metastaz yapması nüks ihtimalini 6 kat artırmaktadır. Hastalarda lenf nodu pozitif olan hastada 5 yıllık sağ kalım %54 iken, negatif olan hastalarda bu oran %90'dır [36].

Endometriyum adenokarsinoma hastalarında 5 yıllık sağ kalım oranı; evre 0'da %90, evre I'de %75-88, evre II'de %58-69, evre III'de %47-58 ve evre IV ise %15-17 arasındadır. Sağ kalım oranı evre IV'de çok düşüktür, bu durum endometriyum adenokarsinoma hücrelerinin metastazının kötü olduğunu göstermektedir [2].

### **2.2.2. Endometriyum Kanserinin Sıklığı**

Endometriyum kanseri gelişmiş ülkelerdeki kadın üreme sisteminin en yaygın malign neoplazmidir. Hastalık vakaların % 75'in üstünde uterus ile sınırlıdır ve tipik olarak iyi bir prognozla seyreder, genel 5 yıllık sağkalım oranı ise % 75-80'dir [37]. Aynı zamanda Birleşik Devletlerde de endometriyum kanseri kadın üreme sisteminin en sık görülen kanseridir. Amerikan kanser derneği Amerika Birleşik Devletleri'nde uterus kanseri tahminlerini 2017 için;

- Yaklaşık 61.380 yeni rahim kanseri teşhisi konacak.
- Yaklaşık 10,920 kadın rahim kanserinden ölecek [38].

Endometriyal kanser başta postmenopozal kadınları etkilemektedir. Endometriyal kanser tanısı alan kadınların ortalama yaşı 60'tır. 45 yaşın altındaki kadınlarda nadir görülür. Bu kanser beyaz kadınlarda biraz daha yaygındır, ancak siyah kadınların kanserden ölme ihtimali daha yüksektir. Endometriyal kanserden sağ kurtulanların sayısı 600000'den fazladır [38].

### **2.2.3. Endometriyum Kanserinin Risk Faktörleri**

Farklı kanserler farklı risk faktörlerine sahiptir. Bazı risk faktörleri sigara, beslenme gibi faktörler değiştirilebilir, fakat yaş veya aile geçmişi gibi faktörler değiştirilemez. Bazı faktörler bir kadının endometriyum kanseri gelişme riskini arttırsa da, her zaman hastalığa neden olmaz.

Bir veya daha fazla risk faktörüne sahip birçok kadında endometriyal kanseri de gelişmeyebilir [4]. Endometriyal kanser gelişme riskini etkileyen birçok faktör vardır, bunlar;

- Hormon seviyelerini etkileyen faktörler: Menopozdan sonra östrojen, doğum kontrol hapları veya tamoksifen kullanımı gibi; adet döngüsü sayısı, gebelik, obezite, bazı yumurtalık tümörleri ve polikistik yumurtalık sendromu vb.,
- İntrauterin cihaz kullanımı,
- Yaş,
- Diyet ve egzersiz,
- Diyabet,
- Aile öyküsü (endometriyal veya kolorektal kanserli yakın akrabalara sahip olma),
- Geçmişte göğüs veya yumurtalık kanseri teşhisi alan,
- Geçmişte endometriyal hiperplazi tanısı alan,
- Başka bir kanseri tedavi etmek için pelvise radyasyon tedavisi alma, [4].

Endometriyal kanseri olan bir kadın bir veya daha fazla risk faktörü olsa bile, bu faktörlerin hangisinin kanserinden sorumlu olduğunu bilmek mümkün değildir [4]. Ancak, beslenme ve çevresel maruziyet gibi değiştirilebilir faktörlerin rolü tam olarak araştırılmamıştır, D vitamini endometriyum kanseri dâhil çok sayıda kanser riskini azaltmak için önerilmiştir [5-8].

## **2.3. D Vitamini**

### **2.3.1. D Vitamini Tanımı**

D vitamini, antiproliferatif ve immünomodülatör bir seko-steroid hormondur, en önemli etkisi kalsiyum ve fosfat mekanizması üzerinedir [9,10]. Aynı zamanda kemik homeostazında önemli rolü olan ve yağda çözünen bir pro-hormondur; bu temel fonksiyonun yanında, D vitamini inflamasyonun azaltılmasında, hücre büyümesi modülasyonu, nöromusküler ve bağışıklık fonksiyonunu düzenler [11]. Buna ek olarak, çeşitli in vitro ve in vivo çalışmalar, D vitamini eksikliğinin kanser, otoimmün ve kardiyovasküler hastalık riskini artırabildiğini göstermiştir [11,12]. D vitamini eksikliği dünyada küresel bir salgın olarak bildirilmiş ve osteoporoz, düşme, kırıklar için de bir risk faktörü olarak tanımlanmıştır [39].

Ayrıca, D vitamini kadın üreme sisteminde de önemli bir rol oynamaktadır, çünkü D vitamini reseptörü yumurtalık dokusunda, endometriyumda, fallop epitel hücrelerinde, desidua



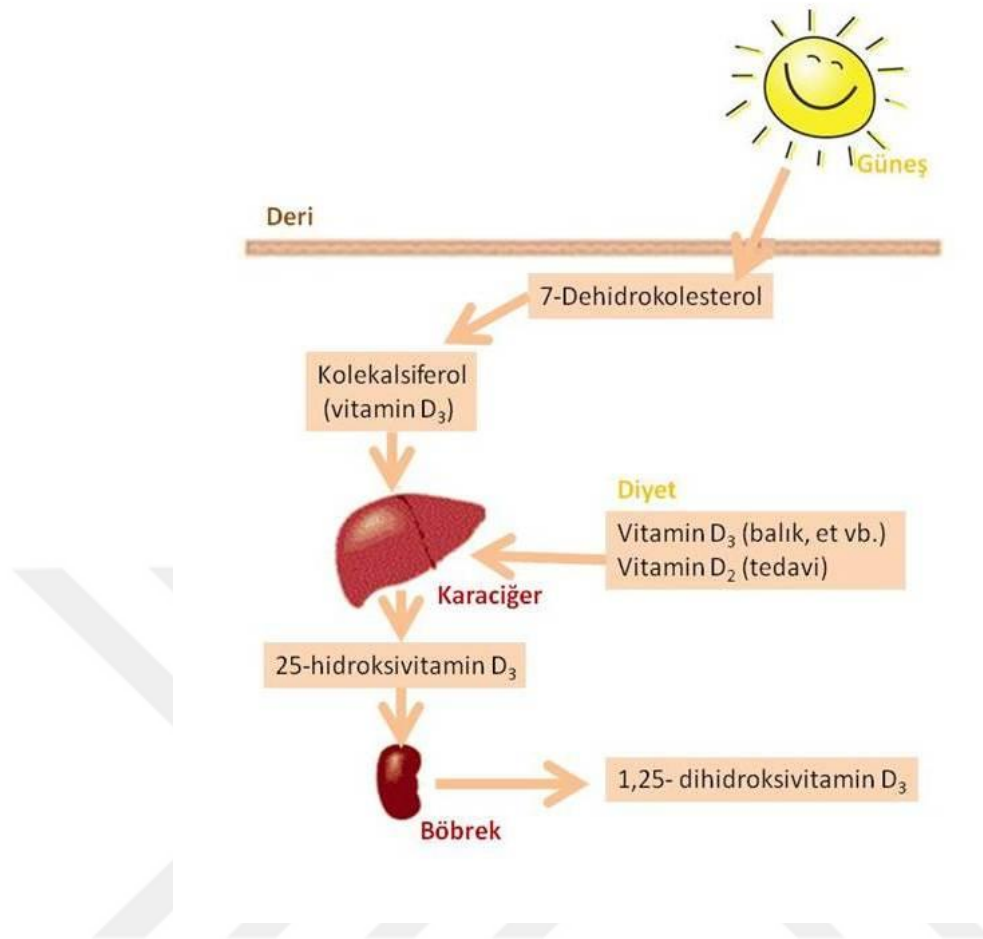
ve plasentada ekspre edildiği gösterilmiştir [11,40]. Son yıllarda D vitamini metabolizması ile endometriozis, uterin fibroidler ve polikistik over sendromu gibi bazı jinekolojik hastalıkların gelişimi arasında ki bağlantı ortaya koymak için araştırmacıları bu alanda araştırmalara yöneltmiştir [11].

D vitamininin antikanserojen bir rolü olduğu konusunda güçlü kanıtlar vardır [41]. Birçok doku ve hücre çekirdeğinde D vitamini öncüsünün aktif forma dönüştürülmesinden D vitamini reseptörü ve  $1\alpha$ -hidroksilaz enzimi sorumludur [11, 42]. D vitamini reseptörü bugün otuzdan daha fazla dokuda bulunduğu bilinmektedir, bu dokular; endotel, düz kas, kalp kası, beyin, meme, prostat, kolon hücreleri, immün hücreler vb. [16-18]. Ayrıca, kolorektal, göğüs, yumurtalık, prostat ve diğer kanserlerin gelişimine karşı D vitamininin koruyucu rolünü destekleyen çalışmalar epidemiyolojik araştırmalarda gösterilmiştir [11, 43, 44].

### **2.3.2. D Vitamini Kaynakları ve Metabolizması**

İnsanlar için D vitamininin temel kaynağı güneşe yeteri kadar maruziyettir. D vitamini hem diyet olarak alınabilir hem de endojen olarak vücutta yapılabilir. D vitamininin vitamin D<sub>2</sub> (ergokalsiferol) ve vitamin D<sub>3</sub> (kolekalsiferol) olmak üzere iki önemli formu vardır. Bitkilerde bulunan vitamin D<sub>2</sub> ve hayvan dokularında bulunan vitamin D<sub>3</sub>, diyet ile dışarıdan süt, yoğurt, ekmek, balık yağı, zenginleştirilmiş besinler ya da supplementler olarak alınabilir. Diyetle alınan D vitamini hem vitamin D<sub>2</sub> hem de vitamin D<sub>3</sub>'ü ifade eder [13,14].

Endojen olarak D vitamini epidermisin güneş ışındaki UV radyasyona (özellikle UV-B radyasyonu) maruziyeti sonucunda, prekürsör olan 7-dehidrokolesterol aktif olarak previtamin D<sub>3</sub> dönüşür. Previtamin D<sub>3</sub> karaciğere kan yolu ile taşınarak, karaciğerde 25-dehidroksivitamin D'ye hidroksillenir. Bu form kan yolu ile böbreğe gider ve orada D vitamininin aktif formu olarak bilinen kalsitriol yani  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  formuna yeniden hidroksillenir (şekil 2.3.2.A.) [45]. Aşırı vitamin D<sub>3</sub> alımı ve güneş ışığına maruz kalınması D vitamini intoksikasyonuna neden olmaz [14,46]. Bu nedenle birçok insan için güneş (UV-B) ışınları D vitamininin primer kaynağıdır [47]. Güneş ışınlarına 20 dakika (290-315 nm dalga boyunda ultraviyole ışınları) maruz kalan yüz ve kol bölgesine ait deri, günlük 200 IU D vitamini sentezleyebilmektedir [48]. Amerika Birleşik Devleti Ulusal Sağlık Akademisi tarafından 1-50 yaş arası bir kişide, güneş ışığına maruz kalmadığı takdirde günlük D vitamini ihtiyacı 200 IU/gün olarak bildirmiştir. Günlük yeteri kadar D vitamini almak için el ve yüz bölgesinin yazın 15 dakika, kışın 20 dakika kadar güneş ışığına maruz kalması gerekmektedir [14].



Şekil 2.3.2.A.: D vitamininin deride sentezi [49].

D vitamininin dışarıdan diyetle alımı sınırlı olup, en fazla D vitamini yağlı balıklar (somon, sardalya, uskumru) ve yumurta sarısında bulunur [47]. Diyetle alınan D vitamini formları ince bağırsakta absorpsiyona uğradıktan sonra, şilomikronlarla birleşerek lenfatik sisteme geçer ve venöz dolaşıma katılır. Endojen olarak yapılan veya diyet yoluyla alınan vitamin D<sub>2</sub> ve vitamin D<sub>3</sub> vücutta yağ hücrelerinde depolanır ve ihtiyaç durumun da dolaşıma salıverilir [46]. D vitamini ve metabolitlerinin atılımı tam olarak bilinmese de primer olarak feçes ve safra tuzları ile atılırken, az miktarda da idrarla atılır [50].

Diyetle alınan ve deride sentezlenen D vitamini inaktiftir. Dolaşım sisteminde D vitamini ve metabolitleri D vitamini bağlayıcı proteinine bağlı olarak dolaşır. Bu proteinler dolaşımında 25(OH)D, 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D ve 24,25(OH)<sub>2</sub>D'ye yüksek afinite gösterirler. D vitamini bağlayıcı proteine bağlanarak karaciğere taşınan D vitamini ve metabolitleri 25 hidroksilaz enzimi ile hidroksillenerek 25 hidroksivitamin D'ye yani 25(OH)D formuna dönüşür. D vitamininin aktif hale gelebilmesi için dolaşımdaki 25(OH)D formu sitokinlerin etkisi ile böbreklerde 1 alfa hidroksilaz enzimi tarafından hidroksillenerek 1,25(OH)<sub>2</sub>D'ye yani kalsitriole dönüşür [48]. D

vitamininin metabolizması şekil 2.3.2.B.'de gösterilmiştir [51]. D vitamini metabolizması 25-hidroksilasyon, 1 $\alpha$ -hidroksilasyon ve 24-hidroksilasyon sitokrom P450 (CYP) oksidazlar tarafından gerçekleştirilir [52]. D vitamininin sentezinde 1 alfa hidroksilazın önemli rolleri vardır. D vitamininin dolaşımdaki asıl formu 25(OH)D'dir. 25(OH)D konsantrasyonu 1,25(OH)<sub>2</sub>D'nin yaklaşık 1000 katıdır [46].

Hepatik 25-hidroksilazın başlangıç çalışmaları, hem mitokondriyal hem de mikrozomal fraksiyonlarda etkin bulunmuştur ve daha sonraki çalışmalar 25-hidroksilaz aktivitesi olan bir takım CYP'leri göstermiştir. CYP27A1, tek mitokondriyal 25 hidroksilazdır. CYP2R1 önemli bir 25-hidroksilazdır. Bunun dışında CYP2D25, CYP2C11, CYP3A4, CYP2J2 ve CYP2J3 enzimlerinin de 25-hidroksilaz aktivitesi var, fakat bu aktivasyon belirli bir dokudaki 25(OH)D düzeylerini etkileyebilir ve/veya dolaşımda ki 25(OH)D seviyelerine katkıda bulunabilir [52].

Dolaşımdaki 1,25(OH)<sub>2</sub>D'nin başlıca kaynağı böbrektir. 25-hidroksilasyonun aksine, 25(OH)D 1 $\alpha$ -hidroksilaz aktivitesine sahip olduğu kabul edilen sadece bir enzim vardır ve bu da CYP27B1'dir. Gen içindeki mutasyonların yetersiz 1,25(OH)<sub>2</sub>D üretimi nedeniyle ortaya çıkan psödovitamin D eksikliğinin altında yatan neden olduğu gösterilmiştir. CYP27B1, D vitamini metabolizmasına katılan diğer mitokondriyal enzimlerle yüksek bir homoloji derecesine sahiptir: CYP27A1 ve CYP24A1. 1,25(OH)<sub>2</sub>D ana kaynağı böbrek olmasına rağmen, birtakım diğer dokular da enzimi ifade etmektedir ve extrarenal CYP27B1'in regulasyonu renal CYP27B1'den farklıdır. Örnekler cilt, akciğerler, meme, bağırsak ve prostatta epitel hücreleri, paratiroid bezi, pankreatik adacıklar, tiroid, testisler, yumurtalıklar ve plasenta da dâhil olmak üzere endokrin bezleri, makrofajlar dâhil bağışıklık sisteminin hücreleri ve T ve B lenfositleri, dendritik hücreler, osteoblastlar, kondrositler ve bu hücrelerden türetilen çeşitli tümörler. Hepatik 25-hidroksilazların aksine, renal 1- $\alpha$  hidroksilaz öncelikle üç hormonu önemli şekilde düzenler: paratiroid hormonu (PTH), fibroblast büyüme faktörü 23 (FGF23) ve 1,25(OH)<sub>2</sub>D'nin kendisi. PTH uyarırken, FGF23 ve 1,25(OH)<sub>2</sub>D, CYP27B1'i inhibe eder. Yüksek kalsiyum CYP27B1'i esas olarak PTH'nin baskılaması yoluyla baskılar; yükselen fosfat öncelikle FGF23'ü uyararak CYP27B1'i baskılar, ancak bu iyonlar kendi başlarına böbrek CYP27B1 üzerinde doğrudan etkilere sahip olabilir. PTH ile stimülasyonunda siklik adenosin monofosfatı (cAMP) içerir, cAMP yanıt elementleri, CYP27B1 geninin proksimal promotöründe bulunur. Bu stimülasyonun mekanizması net değildir ve NR4A2 tek reseptörünün inhibisyonu olarak işlev gören transkripsiyon faktörü C/EBP $\beta$  içerebilir. Benzer şekilde, FGF23'ün CYP27B1'i inhibe ettiği mekanizma da hala net değildir. FGF23, yalnızca seçici FGF reseptörleri vasıtasıyla, koreseptör Klotho varlığında sinyal verir. Bu sinyalizasyon, mitojenle aktive olan protein kinaz kaskadını harekete geçirir, ancak CYP27B1 ekspresyonunun rolünü açıklığa kavuşturmamıştır.

1,25 (OH)<sub>2</sub>D, PTH'yi inhibe ederek CYP27B1 aktivitesini baskılar ve FGF23 üretimini arttırarak, katalitik enzim CYP24A1'i indükleyerek 1,25(OH)<sub>2</sub>D seviyelerini baskılar. Bununla birlikte, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, D vitamini reseptörü ve bir D vitamini inhibitör reseptörü içeren karmaşık bir mekanizma yoluyla böbrekte CYP27B1 ekspresyonunu doğrudan inhibe eder ve bu bir transkripsiyon mekanizmasıdır [52].

Ekstrarenal CYP27B1 regulasyonu farklıdır. Ekstrarenal CYP27B1'in düzenlenmesine ilişkin en dikkat çekici nokta keratinositler ve makrofajlar olmuştur. Keratinositler artmış 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> üretimi ile PTH'ye cevap verirler, ancak bu hücreler PTH reseptörüne sahip değildirler ve cAMP'ye cevap vermezler. PTH'nin bu hücrelerde 1,25 (OH)<sub>2</sub>D üretimini uyaran mekanizması açık değildir. FGF23'ün keratinosit CYP27B1 ekspresyonu veya fonksiyonu üzerindeki etkisi bildirilmemiştir. Böbreğin aksine 1,25(OH)<sub>2</sub>D, keratinositlerde doğrudan CYP27B1 ekspresyonunu etkilemez. Aksine 1,25(OH)<sub>2</sub>D, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> için katabolik enzim olan CYP24A1'i indükleyerek keratinositteki kendi seviyelerini düzenler. Öte yandan, tümör nekroz faktörü  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ve interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), keratinositte CYP27B1 aktivitesinin kuvvetli uyarıcısıdır [52].

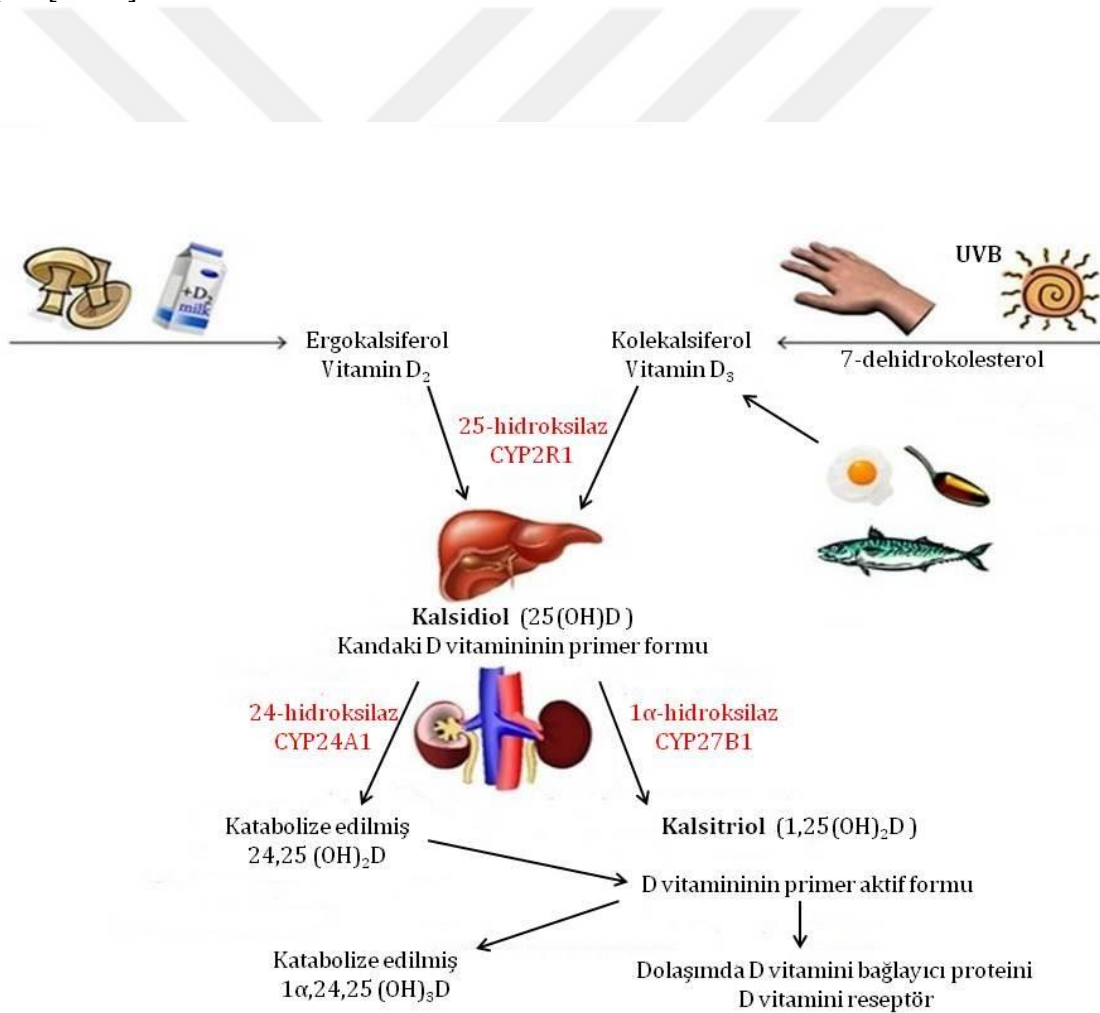
Dolaşımdaki monositler ile 1,25(OH)<sub>2</sub>D'nin üretimi, IFN- $\gamma$  ve diğer sitokinler TNF- $\alpha$ , inter-leukin-1 (IL-1) ve IL-2, JAK / STAT, p38 MAPK ve NF $\kappa$ B yolları tarafından stimüle edilebilir. PTH'nin makrofaj CYP27B1 aktivitesini değiştirdiği gösterilmemesine rağmen, FGF23'in yakın zamanda inhibe olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, paratiroid hücrelerde, FGF23'ün CYP27B1 ekspresyonunu uyardığı bulunmuştur [52].

CYP24A1'in D vitamini metabolizması ile ilişkisi sadece 24-hidroksilaztır. 1 $\alpha$ , 24,25(OH)<sub>3</sub>D, VDR için önemli afiniteye sahiptir ve bu nedenle biyolojik aktiviteye sahiptir. Kemik oluşumu için hem 1,25(OH)<sub>2</sub>D hem de 24,25(OH)<sub>2</sub>D'nin gerekli olduğu göz önüne alındığında, büyüme plağındaki 24,25(OH)<sub>2</sub>D için fizyolojik bir rolü olabilir ve kondrositlerdeki 24,25(OH)<sub>2</sub>D için özgül reseptör gücü artmaktadır. Dahası, son zamanlarda ciddi hiperkalsemi, hiperkalsüri ve nefrokalsinozite, azalmış PTH'ye, düşük 24,25(OH)<sub>2</sub>D'ye sahip idiopatik infantil hiperkalsemili çocuklarda CYP24A1'de inaktive mutasyonlar bulunmuştur. Bu nedenle, CYP24A1'in birincil fonksiyonunun toksik seviyelerde 1,25(OH)<sub>2</sub>D ve 25(OH)D birikimini önlemek olduğu bildirilmiştir [52].

Ashında sentezlendiği tüm hücrelerde CYP24A1, 1,25(OH)<sub>2</sub>D ile kuvvetli bir şekilde indüklenir ve genellikle bu hücrede 1,25(OH)<sub>2</sub>D yanıtının bir markeri olarak görev yapar. PTH,

CYP24A1 mRNA'sının cAMP/PKA yolunun bozunmasını artırarak  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  tarafından CYP24A1'in indüksiyonunu kısmen baskılar[52].

CYP24A1'in temel rolünün dokulardaki  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  seviyelerini kontrol etmek olduğu ve bazı malignitelerin CYP24A1 ekspresyonunu arttırdığı göz önüne alındığında,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 'nin bu hücrelerde antiproliferatif/prodiferansiyone edici etkilerini artırma umuduyla, tümörlerde endojen  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  seviyesini arttırmak için CYP24A1 inhibitörlerini geliştirmeye yönelik çalışmalar yapılmıştır. Daha yakın zamanlarda, fenil sülfoksimin D-halkası (24(S)-NH) yan zincirine sahip bir D vitamini analogu olan CTA091, VDR bağlanması olmadan geliştirildi, ancak CYP24A1 inhibisyonu için son derece seçicidir. CTA018 gibi diğer D vitamini analogları, CYP24A1 ekspresyonu için hem VDR agonist aktivitesi hem de selektif anta-gonist aktiviteye sahiptir [52,53].



Şekil 2.3.2.B.: D vitamini metabolizması [51].

D vitamini metabolizması özetlenirse, D vitamininin sentezinde 1 alfa hidroksilaz kilit noktadır. 1 alfa hidroksilaz enzim aktivitesinin düzenlenmesinde PTH, kalsiyum, fosfor ve FGF23 rol oynar ve kandaki kalsiyum ve fosfor düzeylerinin düşmesi ve PTH düzeyi D vitamini üretimini artırır. Fakat FGF23, 1,25(OH)<sub>2</sub>D sentezini baskılar ve 24 hidroksilaz enzim aktivasyonunu sağlayarak, 1,25(OH)<sub>2</sub>D'nin inaktif forma dönüşmesine neden olur [54].

### 2.3.3. D Vitamini Reseptörü

D vitamini reseptör ekspresyonu yağ dokusu, beyin, göğüs kanseri hücreleri, kolon, karaciğer, akciğer, kas, yumurtalık, pankreas, prostat, deri, mide ve tiroit de dâhil olmak üzere çeşitli doku tiplerinde gösterilmiştir [55]. D vitamini reseptörleri geniş bir doku dağılımına sahiptir, bu dokular vasküler düz kas, endotel ve kardiyomiyositleri kapsar [56]. Ayrıca 25(OH)D'nin 1,25(OH)<sub>2</sub>D'ye dönüşmesi hem vasküler düz kas hem de endotel hücrelerinde olabilmektedir [57]. Dolaşım sistemindeki D vitamini ve metabolitleri D vitamini bağlayıcı proteinine bağlı olarak dolaşır. Bu proteinler dolaşımında 25(OH)D, 1,25(OH)<sub>2</sub>D ve 24,25(OH)<sub>2</sub>D'ye yüksek afinite gösterirler. 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> hücreye girer ve nükleer D vitamini reseptörüne bağlanır. D vitamini reseptörü ve 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> kompleksi, retinoid asit-X (RXR) reseptörü ile heterodimer oluşturur ve ilgili gen üzerindeki D vitamini duyarlı elemente bağlanarak protein sentezini (kalsiyum bağlayıcı protein veya osteokalsin) indükleyen nükleer transkripsiyon faktörü olarak davranır. Nükleer D vitamini reseptörü deri, kas, hematolenfopoiyetik ve sinir doku, üreme ile endokrin sistem dokularında mevcut iken, osteoklast hücrelerinde bulunmaz. Bu nedenle 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> bu hücreleri indirekt yahut non-genomik bir mekanizma ile etkilemektedir [48]. 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> reseptörü birçok doku da mevcut olduğu gibi benign, hiperplastik ve malign epitelyal ve fibroblastik dokularda da mevcuttur. 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> direkt veya indirekt olarak insülin üretimi, renin üretimi, sitokin salınımı, kardiyomiyosit ve vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonun ve büyümelerini içeren yaklaşık iki yüz geni regüle eder [57].

### 2.3.4. D Vitamini Düzeyi

İnsanlarda D vitamini düzeyini değerlendirmek için kanda 25(OH)D düzeyine bakılır. 25(OH)D düzeyi vücutta hem diyetle alınan hem de endojen olarak yapılan D vitamininin göstergesidir. 25(OH)D'nin yarılanma ömrü 2-3 hafta iken, 1,25(OH)<sub>2</sub>D'nin yarılanma ömrü ise 4-6 saattir. Aynı zamanda 1,25(OH)<sub>2</sub>D'nin dolaşımdaki düzeyi 25(OH)D düzeyinden 1000 kat daha düşüktür, bu nedenle dolaşımdaki D vitamininin en iyi göstergesi 25(OH)D'dir [39].

Yapılan araştırmalarda D vitamininin kandaki güncel 25(OH)D düzeyleri değerlendirildiğinde 25(OH)D düzeyi; 5 ng/mL'den düşük olması ağır D vitamini eksikliği, 5-10 ng/mL arasında olması D vitamini eksikliği, 10-20 ng/mL arasında olması D vitamini yetersizliği, 20-30 ng/mL arasında olması D vitamininin sınırı, 30-60 ng/mL arasında olması D vitamini için tercih edilen aralığı, 150 ng/mL'den yüksek olması D vitamini intoksikasyonu olarak tanımlanmıştır. Yapılan araştırmalarda ki D vitamininin kanda güncel 25(OH)D düzeyleri tablo 2.3.4.'de verilmiştir [58].

Tablo2.3.4.:D vitamininin kanda ki 25(OH)D düzeyleri [58].

D Vitamini Tanımları	25 (OH)D Düzeyi	
	ng/mL	nmol/L
Ağır D Vitamini Eksikliği	<5	<12
D Vitamini Eksikliği	5-10	12-25
D Vitamini Yetersizliği	10-20	25-50
D Vitamini Sınırı	20-30	50-75
D Vitamini Yeterliliği	30-60	75-150
D Vitamini Toksisitesi	>150	>375

Günlük önerilen D vitamini miktarı 800-1000 IU olarak belirtilmiştir, bu miktar D vitamini seviyesini kanda 30-60 ng/mL arasında tutmayı amaçlar. Aynı zamanda araştırmacılar günde 100 IU (2.5 mcg) D vitamini, 2-3 ay sonra sadece serum 25 (OH)D düzeyini 1 ng/mL veya 2,5 nmol/L artırabileceğini bildirmiştir. Yapılan çalışmalarda 100 IU ile 2000 IU arasındaki miktarlarda alınan D vitamini miktarının 2-3 ay sonra kanda D vitamini düzeyini aynı orantılarda artırmıştır [59]. Creighton Üniversitesi'nde Dr. Robert Heaney ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda tüm yetişkinlerin yaklaşık 75 nmol/L D vitamini (kalsidiol) seviyesine sahip olması gerektiğini bildirmektedir [60].

D vitamini intoksikasyonu sağlıklı bir bireye üç aydan fazla günde 10.000 IU verilmesi halinde ortaya çıkacağı bildirilmiştir. Yapılan araştırmalar, D vitamininin yüksek doz alımının kanser riskini azaltabileceği gibi, böbrek ve karaciğer üzerine zarar verebileceğini de göstermiştir [48]. Kişilerde D vitamini intoksikasyonun belirtileri; kusma, iştahsızlık, baş ağrısı, yüksek tansiyon, aritmi, hiperkalsemi, fiperfosfatemi, hiperkalsiüri, damar kalfisikasyonu, nefrokalsinoz görülebilir ve böbrek yetmezliği gelişebilir [54].

### 2.3.5. D Vitamininin Genomik ve Non-Genomik Etkileri

D vitamininin temel fonksiyonu plazma kalsiyum düzeyini sürdürmek ve kemik mineralizasyonunu sağlamaktır.  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  ileumdan fosfar, duodenumdan kalsiyum absorpsiyonunu artırır, böbrekte ise kalsiyum kaybını azaltır. Aynı zamanda 200'den fazla geni kontrol eden  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ , hücre proliferasyonu, diferansiasyonu, apoptozis ve anjiogenezisi üzerine odaklanır, PTH salınımı ve salgısını azaltır, insülin yapımını ve myokardiyal kontraktiletiyi artırır ve iyi bir immünomodülatördür [54].

D vitamini VDR aracılı gen transkripsiyonu ve VDR bağımsız non-genomik etki mekanizması olmak üzere iki farklı yolla etki gösterir.  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 'nin tüm genomik etkilerine VDR aracılık eder. VDR, bir transkripsiyon faktörüdür ve steroid hormon nükleer reseptör ailesinin üyesidir. D vitamini kompleksi genellikle RNX ile heterodimer oluşturarak ilgili gen üzerindeki D duyarlı elementine bağlanır. Bu kompleksler hem gen hem de hücreye spesifik olabilir,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  hareketinin hücre tipinden hücre tipine seçiciliğini sağlar. Bu kompleksler, çoğunlukla bir LXXLL motifi vasıtasıyla VDR'ye direkt olarak bağlanan bir alt birimi, histon asetil transferazları, deasetilazları, metil transferazları ve demetilazları, ATP'yi nükleozomal-yeniden şekillendirici aktivite olarak içeren enzim aktivitesi ve RNA'ya bağlanan polimeraz II içerir [52].

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  birçok gen fonksiyonu düzenlemektedir, örnek olarak osteopontin, osteokalsin, kalbindin, 24-hidroksilaz, karbonik anhidraz verilebilir. D vitamini metabolitleri tarafından da, IL-2 ve IL-12 gibi inflamatuvar markerları azaltarak, antiproliferatif etki göstermektedirler. D vitamini T hücresi gelişimi için regülör görev yapar. Bu görevini T hepler 1 (Th1) hücrelerini negatif yönde düzenlerken, T helper 2 (Th2) hücrelerini ise pozitif yönde düzenler. Bu regülör görev sayesinde Th1 ve Th2 hücreleri arasındaki denge sağlanmış olur.  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  T hücrelerinde, Th1 hücrelerinin proliferasyonunu düşürür ve sitokin sekresyonu azaltır.  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  formunun hücre döngüsünün G1 fazını etkileyerek hücre döngüsünün düzenlenmesinde görev aldığı düşünülmektedir. Birçok siklin ve siklin bağımlı kinaz  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  formuna karşılık bir cevap vermekte yahut transkripsiyon faktörlerinin etkisini düşündürmektedir [48].

D vitamininin non-genomik etkileri; hormon sekresyonunun düzenlenmesi, immün fonksiyonların düzenlenmesi, hücre proliferasyon ve farklılaşmasının düzenlenmesi olarak tanımlanabilir [61].  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  non-genomik etkilerini genomik etkilerden çok daha hızlı gösterir. Bu etkilerden birincisi, D vitamini bağırsaklardan kalsiyum taşınmasının hızla



uyarılmasını sağlar. 1,25(OH)<sub>2</sub>D reseptörünü tanınması, nongenomik VDR agonistleri ve membrana duyarlı steroid bağlayıcı protein olan ERp57/GRp58/ERp60 olarak da bağlanmayı sağlamak için farklı bir konfigürasyonda olsa da VDR'nin kendisine odaklanmıştır. Bu reseptörler kinazları, fosfatazları ve iyon kanallarını harekete geçirmek için büyük miktarlarda caveolae/lipid membranında bulunur [48].

### 2.3.6. D Vitamini Eksikliği ve Tedavisi

D vitamini son 15 yıldır bilimsel ve tıbbi toplulukların, düzenleyici kurumların, gıda endüstrisinin ilgisini çeken konudur. Bu konu, bilimsel literatürde yapılan araştırmaların yoğunlaşması, bazı ülkelerde hastalarda D vitamini düzeyi için talep edilen testlerde önemli bir artış, kanıtlanmış bazı beslenme tavsiyeleri ve D vitamini takviyeleri satışı ve D vitamini kullanım sayısının artması ile kanıtlanmaktadır. Avrupa ülkelerinde D vitamini eksikliği için doğrudan ve dolaylı maliyetlerin yüzlerce milyar Avro'ya ulaştığı tahmin edilmektedir [62]. Dünyada D vitamini eksikliği veya yetersizliği 1 milyar kişide olduğu tahmin edilmektedir [54]. D vitamini eksikliğini ülkemizdeki durumu, 26. Ulusal Endokrin Kongresinde Doç. Dr. Emek Kocatürk Göncü tarafından bazı bölgelerde yapılan çalışmalarda D vitamini eksikliğini yaklaşık %80 olarak tespit edildiğini bildirmiştir [63]. Yine yapılan başka bir çalışmada, ülkemizde her 10 kişiden dokuzunda D vitamini eksikliği görüldüğü ve yetişkin kadınlarda daha yaygın olduğu bildirilmiştir [64].

D vitamini düzeyi bazı etmenlere bağlı değişiklik gösterse de, 25(OH)D'nin 20 ng/mL'den düşük olması D vitamini eksikliği olarak tanımlanmıştır. D vitamini eksikliği kemik mineralizasyonun bozulmasına yol açarak, çocuklarda raşitizm, yetişkinlerde ise osteomalazi ve osteoporozu neden olabilir [14, 52, 62]. D vitamini eksikliğini belirtileri halsizlik, yorgunluk, depresyon eğilimi, vücutta kramp hissi ve güneş enerjisinden yeterli faydalanılmamasıdır [65]. D vitamini eksikliğini risk faktörleri ise; kutuplara yakın bölgelerde yaşama, güneşe maruziyetin azlığı, koyu cilt, ileri yaş, obezite, güneş koruyucu kremler, D vitamini metabolizmasının artması (lenfoma, hiperparatiroidi), malabsorbsiyon, kronik böbrek yetmezliği ve antikonvülzan gibi ilaçlar olarak sayılabilir [66].

Global bir sağlık sorunu olarak kabul edilen D vitamini eksikliğini karşı önlem almak gerekmektedir [67]. Yapılan son çalışmalarda D vitamini eksikliğini yaygınlığı göz önüne alındığında, D vitamini eksikliğini önlenmesinde hem halk sağlığı hem de klinik çalışmaların stratejilerinin önemi vurgulanmıştır [62]. D vitamini eksikliğini önlenmesine yönelik risk

grubundaki kişilerde mutlaka serum 25(OH)D düzeyi bakılmalıdır [65]. D vitamini eksikliğinin önlenmesine yönelik tedavi önerileri;

- Saat 10.00 ile 15.00 arasında yüz ve kolların güneş ışığına direkt maruz bırakılması, (açık tenli kişilerin yaklaşık 15 dakika, koyu ciltlerde ise yaklaşık bu sürenin 3-4 katı)
- Kemik ve kas sağlığı için gerekli minimum günlük D vitamini ihtiyacı 0-1 yaş arası bebeklerde 400 IU/gün, 1-70 yaş arasında 600 IU/gün, 70 yaş üzerindeki kişilerde ise 800 IU /gün'dir.
- D vitamini eksikliği açısından riskli bireyler (antikonvülzan, glukokortikoidler gibi ilacı kullananlar, obez, vb.) kendi yaş grubu için günlük önerilen D vitamini miktarının en az 2-3 kat daha fazlasını almalıdır.
- 25(OH)D düzeyi 20 ng/mL altında olan yetişkinlere yükleme olarak, iki ay boyunca haftada bir kez 50000 IU D vitamini verildikten sonra, 1500-2000 IU/gün idame olarak devam etmesi gerekmektedir [65].

D vitamini eksikliği tanısı konmuş ve tedavi başlamış bireylerde serum 25(OH)D düzeyine 3-6 hafta sonra mutlaka bakılması gerekmektedir. Eğer serum 25(OH)D düzeyi hedef düzeye ulaşmamışsa tekrardan ek doz verilmesi gerekebilir [65].

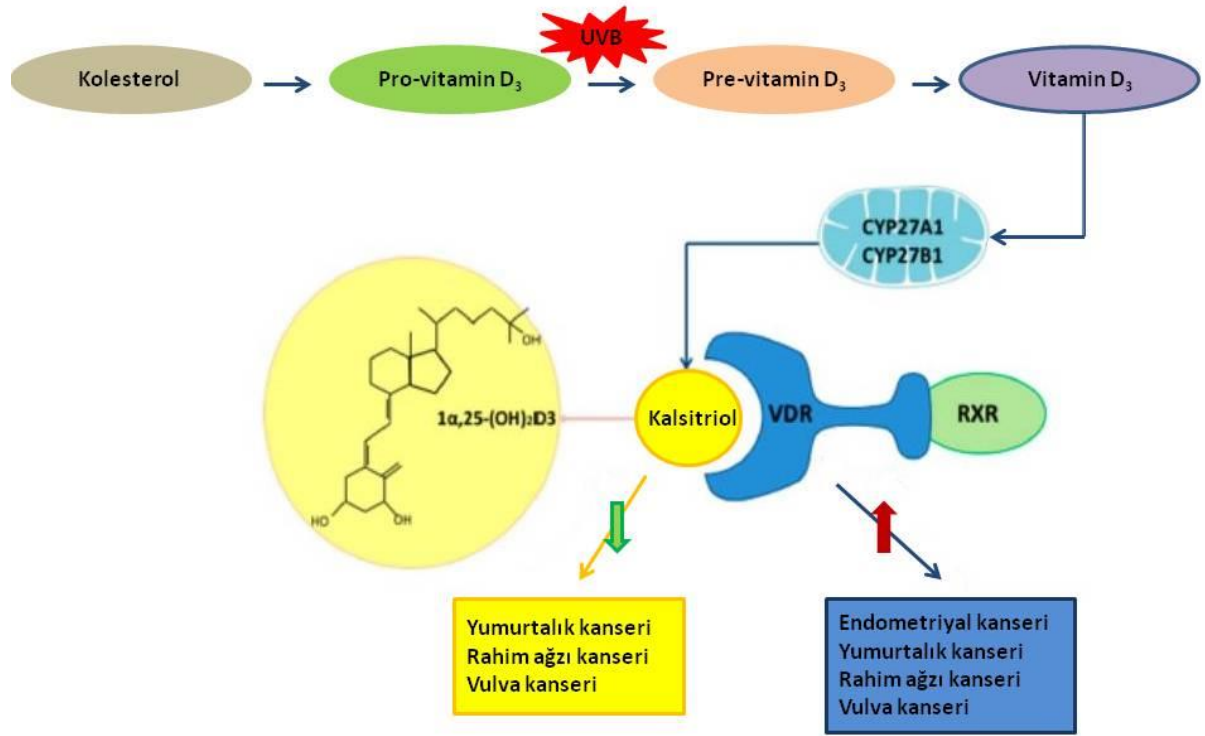
### 2.3.7. D Vitamini ve Kanser

D vitamininin antikanserojen etkisi ilk olarak Apperly'nin Kuzey Amerika'da kanser mortalitesi ve solar radyasyon arasındaki ilişki ile gözlemlemesiyle ortaya konmuştur [68]. Yapılan araştırmalar kuzey kutuplarda yaşayan populasyonda kanser görülme oranını, güney kutuplarda yaşayan populasyondan daha yüksek olduğunu göstermiştir [69]. D vitamininin olası antikanserojen etkisinin ortaya çıkabilmesi için serum 25(OH)D değeri 30 ng/mL'dan yüksek olması gerekmektedir ve 1,25(OH)<sub>2</sub>D ise antikanserojen özelliktedir. 1,25(OH)<sub>2</sub>D'nin kanser hücrelerinde proliferasyon, metastaz, invazyon ve anjiogenez üzerine azaltıcı, apoptozis ve diferansiyasyon üzerine de artıcı etkileri vardır [70]. D vitamini kanser üzerindeki etki mekanizması; hücre büyümesini inhibe eden sinyalleri ve hücre farklılaşmasını artırır, hücre büyümesini tetikleyen sinyalleri, hücre proliferasyonunu, metastazı ve anjiogenezi inhibe etmesi olarak açıklanabilir [14]. Yine başka bir çalışmada 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ve analogları, D vitamini reseptörünün aracılık ettiği insan kanser hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiğini göstermiştir [15]. D vitamini reseptörü bugün otuzdan daha fazla dokuda bulunmaktadır; endotel, düz kas, kalp kası, beyin, meme, prostat, kolon hücreleri, immün hücreler vb. [16-18]. Yapılan çalışmalar,

D vitamininin ve reseptörünün jinekolojik kanserlerin gelişiminde önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir [19].

Endometriyal kanserlerin erken dönemde teşhis edilen hastalarda, beş yıllık sağkalım oranı %74 ile %91 arasında değişmektedir. Endometriyal kanser gelişimi için sorumlu faktörler yaşlılık, nulliparite, diyabet, östrojen hormonu replasman tedavisi ve obezite olarak sıralanabilir. Son yıllarda yapılan çalışmalar göğüs, kolorektal ve akciğer kanseri gibi bazı kanser türlerinin patogeneğinde D vitamininin rolü üzerinde ilişkisini ortaya koymaktadır. Aynı zamanda endometriyal, ovarian, servikal, vulvar ve vajinal kanserlerde D vitamini ve D vitamini reseptörünün etkisini sistematik olarak analiz eden çok sayıda çalışma vardır. Literatür de, D vitamini seviyelerinin ve D vitamini ile ilişkili yolların jinekolojik kanser riskini etkilediğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Çok sayıda ekolojik çalışma, UV-B maruziyeti ile jinekolojik kanser riski arasındaki ters ilişki hakkında kanıt sunmaktadır [19].

Jinekolojik kanserlerde D vitamini ve D vitamini reseptörünün rolü: D vitamininin endojen sentezi, pro-vitamin D<sub>3</sub> ile sonuçlanan kolesterolün oksidasyonu ile başlar. D vitamini 25-hidroksilazlar (CYP27A1) ve böbrek mitokondrial 1-hidroksilaz (CYP27B1) enzimleri tarafından iki hidroksilasyon sonucunda 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>'e dönüşür. Jinekolojik kanser dokusu kadar farklı dokular da kalsitriol sentezleyebilir. 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, nükleer reseptör ailesine ait olan ve genleri regüle eden RXR ile kompleks oluşturan D vitamini reseptörüne bağlanır. D vitamini ve reseptörü, jinekolojik kanserlerde koruyucu bir role sahiptir. Düşük D vitamini seviyeleri, yumurtalık, servikal ve vulvar kanserlerinde bulunmuştur. Birçok in vivo ve in vitro çalışma, inflamasyon, insülin benzeri büyüme faktörü sinyali ve östrojen ile ilişkili yollarda VDR'nin bir arabalucu olarak önemini ortaya koymuştur. Dahası VDR, önemli miktarda tümör dokusunda eksprese edilir ve bu da reseptörün kanser etyolojisini etkilediğini gösterir. VDR polimorfizmlerinin D vitamini-VDR kompleksinin aktivitesini değiştirdiği gösterilmiştir. Kansere bir yanıt olarak, D vitamini reseptörünün ekspresyonu endometriyal, over, servikal ve vulvar kanserlerinde upregüle olarak etkiler. VDR/RXR'nin endometriyal, servikal, vulvar veya vajinal kanser hastalarının hayatta kalması üzerindeki rolü hakkında sınırlı bilgi olmasına rağmen, bazı çalışmalar her iki reseptörün sağ kalımı etkilediğini göstermiştir. Bu nedenle, daha ileri çalışmaların jinekolojik kanserlerde D vitamini ve onun hetero-dimer reseptörü RXR üzerinde yoğunlaşması gerektiğini önermektedirler. Jinekolojik kanserlerde D vitamini ve D vitamini reseptörünün rolü şekil 2.3.7.'de gösterilmiştir [19].



Şekil 2.3.7.: Jinekolojik kanserlerde D vitamini ve D vitamini reseptörünün rolü (↓:down regüle, ↑ : up regüle) [19].

Çok sayıda çalışma D vitamini ve D vitamininin kaynağı güneş ışınlarının (UVB) kansere karşı koruyucu olduğunu gösterir, aynı zamanda güneş ışınlarına maruziyetin melanom gelişim riskini arttırdığını gösteren ve hatta melanomlu hastalarda survival oranlarında artış sağlayabileceğini gösteren çalışmalar da mevcuttur. Yine güneş ışınlarına maruziyetin cilt kanserine yol açtığını da gösteren çalışmalar vardır. Bu nedenle D vitamini için önemli bir kaynak olan UV-B ışınına gün içerisinde, doğru saatlerde yeteri kadar, kontrollü ve uyarılara uygun şekilde maruz kalmak gerekmektedir [14].

D vitamini eksikliği veya yetersizliği de hem ülkemizde hem dünyada yaygın olarak görülmektedir [39, 64]. D vitamini eksikliği ile kanser arasında ilişkiyi gösteren çok sayıda çalışma vardır. Çalışmalar güney kutubuna kıyasla kuzey kutubunda yaşayan kişilerde pankreas, prostat, kolon, hodgkin lenfoma ve akciğer kanserlerine yakalanma oranı ve bu kanserlere bağlı ölüm oranlarının arttırdığını göstermiştir [54]. Epidemiyolojik çalışmalar düşük D vitamini düzeyinin prostat, meme ve kolorektal kanser riskinin artışı ile ilişkili olduğunu göstermiştir [71-76]. Yine başka bir çalışma da 25(OH)D düzeylerinin 20 ng/mL'nin altına

düştüğünde kolon, pankreas, prostat, meme kanseri insidansının %30-50 arttığı ve bu kanserlere bağlı mortalitenin de arttığını göstermiştir [77].

D vitamini ile kolorektal kanserleri arasındaki ilişkiyi birçok çalışma günlük olarak alınan D vitamini alımının kolorektal kanser gelişim riskini anlamlı olarak azalttığını gösteren çalışmalar vardır. 3 farklı kohort çalışmasında alınan D vitamini dozu yükseldikçe kolorektal kanser gelişme riskinin azaldığı gösterilmiştir. 2011 yılında yayınlanan bir meta-analizde ise, yüksek serum 25(OH)D düzeyinin kolorektal kansere karşı koruyucu özellik sağladığı bildirilmiştir. Aynı zamanda bu çalışmalarda kolorektal kanserlerin erkeklerle sınırlı olduğu da vurgulanmıştır. Yine yapılan çalışmalarda postmenapozal kadınlarda D vitamini replasmanının invaziv kolorektal kanseri gelişim riskinde azalmaya yol açmadığı da bildirilmiştir [14]. Düşük D vitamini durumu uzun süredir kolorektal karsinogenezle ilişkilendirildiği gösterilmiştir. D vitamini alımı ile erkeklerde kolorektal kanser arasında doğrudan bir ilişki olduğu ve riskin D vitamini alımı arttıkça azaldığı gösterilmiştir [78]. Yapılmış büyük gözlemsel çalışmanın sonuçları, batı avrupa popülasyonlarında pre-diagnostik 25(OH)D konsantrasyon seviyeleri ve kolorektal kanser riski seviyeleri arasında güçlü ters bir ilişki olduğunu ortaya koymaktadır [79].

D vitamini ile meme kanseri arasındaki ilişki tartışmalıdır. 25(OH)D düzeyi ile ilişki gösteren ve gösteremeyen; D vitamini alımına olumlu yanıt alan ve alamayan çalışmalar mevcuttur. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada serum 25 (OH)D düzeyleri 20ng/mL'den düşük ve kalsiyum düzeyleri 10,5 mg/dl'den düşük olanlarda meme kanseri olma ihtimali yüksek olduğu gösterilmiştir [80]. İki farklı kohort çalışmalarında ise premenapozal dönemdeki kadınlarda yüksek doz D vitamini alımı ile meme kanseri gelişim riskinde istatistiksel olarak anlamlı azalma izlendiği gösterilmiş, ancak benzer koruyucu etki postmenapozal dönemdeki kadınlarda izlenmemiştir. Yine yapılan çalışmalarda postmenapozal kadınlarda D vitamini replasmanının invaziv kolorektal kanseri gelişim riskinde azalmaya yol açmadığı da bildirilmiştir [14]. Başka bir meta-analiz çalışmasında, premenapozal dönemde değil ama postmenapozal dönemde D vitamini 25(OH)D düzeyi ile meme kanseri arasında ters ilişki saptanmıştır. Bu çalışmaya göre özellikle 27-35 ng/ml arasındaki seviyelerde, her 5 ng/ml artış, kanser riskini %12 kadar azaltmış; 35 ng/mL'nin üstündeki dozlarda bu ilişkinin zayıfladığı bildirilmiştir [81]. Buna karşılık bir çalışmada ise postmenapozal dönemde 7 yıl takip edilen 36282 kadının, günde 1000 mg kalsiyum ve 400 IU D vitamini desteği alınmasının, plasebo alanlara göre invazivmeme kanseri riskinde bir fark yaratmadığı gösterilmiştir [82].

D vitamini durumu ile pankreas kanseri riski arasındaki ilişki tam olarak net değildir. Yakın zamanda yapılan çalışmada 11 tane D vitamini ilişkili gen ile pankreatik adenokarsinoma ile ilişkileri incelenmiş, fakat bulgular D vitamini ilişkili genler ile pankreatik kanser riski arasındaki ilişkiyi desteklememiştir [83]. Pankreas kanseri dokusunda D vitamini reseptörü gösterilmiştir, ancak kalsitriol analogları doğrudan pankreas dokusunu etkilememektedir. Pankreas kanserinde kalsitriol analoglarının kullanımı büyük ölçüde yetersizdir ve bu nedenle daha ileri klinik araştırmaları ihtiyaç vardır [84].

D vitamini ve akciğer kanseri arasındaki ilişki; son yıllarda, göğüs, kolorektal ve akciğer kanseri gibi bazı kanser türlerinin patogeneğinde D vitamininin rolü üzerinde yoğun bir çalışma yapılmaktadır [19]. Önceki çalışmalar, dolaşımdaki 25(OH)D düzeyinin akciğer kanseri hastalarının prognozu üzerine muhtemel bir etkisini önerdi ancak çelişkili bulgular da bildirilmiştir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada dolaşımdaki 25(OH)D düzeyi ile genel sağkalım arasında bir korelasyon olduğunu göstermektedir. D vitamini ile akciğer kanseri arasındaki ilişkiyi ortaya konması için daha fazla çalışma gerekmektedir [85].

D vitamini ve prostat kanseri arasındaki ilişkisi tam olarak aydınlatılmış değildir. Epidemiyolojik çalışmalar düşük D vitamini düzeyinin prostat, meme ve kolorektal kanser riskinin artışı ile ilişkili olduğunu göstermiştir [71-76]. Fakat başka bir kohort çalışmasında D vitamini alımının prostat kanseri gelişimi üzerinde koruyucu etki göstermediği bildirilmiştir [14]. Son zamanlarda yapılan çalışmalar D vitamini takviyesinin prostat, göğüs ve kolorektal kanserler ve melanom üzerine etkisine odaklanmış ve bu çalışmalarda, beyaz ve siyah hastalar arasında farklılıkların olduğunu bildirmiştir. Bu nedenle D vitamini ile prostat kanseri arasındaki ilişkiyi ortaya konması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır [86].

### **3. MATERYAL METOD**

#### **3.1. Materyaller**

##### **3.1.1. Kullanılan Kimyasallar**

- Alfakalsidol (Sigma 17946)
- Kalsitriol (Sigma D1530)
- McCoy's 5A Medium (Lozan)
- L-glutamin (PAN Biological)
- Tripsin-EDTA (Biological Industries)
- Penisilin/streptomisin(Biological Industries)
- Fetal bovin serum (Biological Industries)
- Dulbecco's MEM (Biochrom)
- Etanol (Alko-kim)
- Trypan blue (Roche)
- %0.9 Serum Fizyolojik (Eczacıbaşı)
- Matrigel (Sigma)

##### **3.1.2. Cihazlar ve Laboratuvar Gereçleri**

- xCELLingence Cihazı
- E-plate (Acea)
- CIM-plate (Acea)
- Laminar akımlı kabin
- CO<sub>2</sub> inkübatörü
- Santrifüj
- İnverted mikroskop
- Buzdolabı (+4, -20°C ve -80 °C)
- Hücre sayım cihazı (Roche)
- Smart Slides (Roche)
- Flask (15-75'lik)
- 24 Well Cell Culture Plate (Costar)
- Falcon tüp
- Serolojik pipet ve mikropipet
- Pastör pipeti

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Hücre Kültürü

Hücre kültürü canlı bir doku ya da organdan alınan küçük bir parçanın kontrollü koşullar altında in vitro olarak büyütülmesi ve çoğaltılması işlemi olarak tanımlanır. Hücre kültüründe dikkat edilmesi gereken kuralların başında titizlik ve sterilizasyon koşullarına uyum gelir [87]. Günümüzde hücre kültürü sitogenetik, biyokimyasal ve moleküler biyolojik çalışmalarda tanı ve araştırma amacıyla yoğun olarak kullanıldığından önemi büyüktür [88].

Bu çalışmada endometriyum adenokarsinoma HEC1A (ATCC'den alındı) hazır hücre hattı kullanıldı. Yapılmış daha önceki çalışmalarda HEC1A reseptif olmayan endometriyumun bir modeli olarak kullanılmıştır [89-92]. Endometriyum adenokarsinoma ile ilgili çalışmalar birçok hücre tipinde olduğu gibi primer hücre izolasyonunun ve hücre karakterizasyonunun zorluğu nedeniyle klon hücre hatları ile yapılmaktadır. Bu amaçla; HEC-1A, HEC-1B, Ishikawa hücreleri, RL95-2, KLE ve AN-3 endometrial karsinoma hücre hatları kullanılmaktadır [93]. Deney aşaması boyunca hazır endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinin çoğaltılması, pasajlanması, dondurularak saklanması, hücre sayımı ve canlılık testi gibi işlemler gerçekleştirilerek hücre kültür çalışmalarının temel aşamaları yapıldı. Dondurulmuş endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinin çözülmesi aşağıdaki protokole göre yapıldı.

1. -80°C'den dondurulmuş hücre hattı bulunan dondurulmuş tüp çıkartıldı ve hemen buz üzerine kondu.
2. Daha önceden 37°C'de hazırlanan su banyosunun içerisine dondurulmuş tüp kondu ve 1-2 dakika beklendi
3. Su banyosundan dondurulmuş tüp alındı ve çevresi kurulandı.
4. Dondurulmuş tüp etrafı alkollenip steril kabine alındı.
5. Bir falcon tüp içine 7-9 ml besiyeri kondu ve dondurulmuş tüp içindeki hücre karışımı sıvı çekilip tüpe kondu.
6. 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
7. Santrifüj sonrası tüpün üstündeki süpernatant pastör pipeti ile çekilip atıldı.
8. Tüpün dibindeki pellet üzerine besi yeri eklendi ve pipetaj yapıldı.
9. Tüpte oluşan hücre ve besi yeri karışımı pipet yardımı ile flask içine ekildi.
10. Mikroskopta incelendikten sonra flask inkübatöre yerleştirildi.



Flask içine ekim yapılan endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücreleri bir hafta içinde 2 veya 3 kez besi yeri değiştirildikten sonra konfluent olduktan sonra (flaskın tamamına yakın kısmını kapladıklarında) 1:3 ya da 1:6 oranında pasajlanarak yeni kültür kaplarına ekim yapıldı. Hücreler 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde çoğaltıldı. Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinin pasajlama işlemi aşağıdaki protokole göre yapılmıştır.

1. Tamamıyla konfluent olmuş flasklar alkollenerek steril kabine alındı.
2. Flask içindeki besi yeri pipet yardımı ile çekilerek atık kabına atıldı.
3. Serum Fizyolojik ile 2 kez flastaki hücreler yıkandı.
4. Yıkama işleminden sonra flaska 3 ml tripsin-EDTA eklendi ve 10 dakika beklemesi için inkübatöre kondu.
5. Hücrelerin kalktığı mikroskop da görüldükten sonra flask tekrar steril kabine alındı.
6. Pipet yardımı ile flask içindeki karışım 15'lik falcon tüpe kondu ve üzerine aynı miktarda besi yeri eklendi.
7. 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
8. Santrifüj sonrası tüpün üstündeki süpernatant pastör pipeti ile çekilip atıldı.
9. Tüpün dibindeki pellet üzerine besi yeri eklendi ve pipetaj yapıldı.
10. Eş zamanlı olarak trypan blue ile canlılık kontrolü yapıldı.
11. Tüpte oluşan hücre ve besi yeri karışımı pipet yardımı ile flask içine ekildi.
12. Mikroskopta incelendikten sonra flask inkübatöre yerleştirildi.

Hücreler pasajlanırken, bir kısım hücre ileri çalışmalarda tekrar kullanılabilmesi amacıyla dondurularak saklandı. Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinin dondurma işlemi aşağıdaki protokole göre yapılmıştır.

1. Tamamıyla konfluent olmuş, flasklar alkollenerek steril kabine alındı.
2. Flask içindeki besi yeri pipet yardımı ile çekilerek atık kabına atıldı.
3. Serum fizyolojik ile 2 kez flastaki hücreler yıkandı.
4. Yıkama işleminden sonra flaska 3 ml tripsin-EDTA eklendi ve 10 dakika beklemesi için inkübatöre kondu.
5. Hücrelerin kalktığı mikroskop da görüldükten sonra flask tekrar steril kabine alındı.
6. Pipet yardımı ile flask içindeki karışım 15'lik falcon tüp kondu ve üzerine aynı miktarda besi yeri eklendi.
7. 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.

8. Santrifüj sonrası tüpün üstündeki süpernatant pipeti ile çekilip atıldı.
9. Pellet, dondurma çözeltilisinde (%0.01 DMSO) süspansiyon edilerek son hacim yaklaşık  $5 \times 10^6 - 2 \times 10^7$  hücre/ ml olacak şekilde ayarlandı.
10. Eş zamanlı olarak trypan blue ile canlılık kontrolü yapıldı.
11. Bu karışımdan 1 ml'lik viallere konuldu ve dondurma tüpüne bu vialler yerleştirildi.
12. Dondurma tüpü 3 saat  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de ve 12 saat  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de bekletildikten sonra  $-80^{\circ}\text{C}$  buzdolabına yerleştirildi.

Çalışmada hücre popülasyon miktarlarının belirlenmesine ihtiyaç olduğundan hücre sayımı yapılmıştır. Hücre sayımı aşağıdaki protokole göre yapılmıştır.

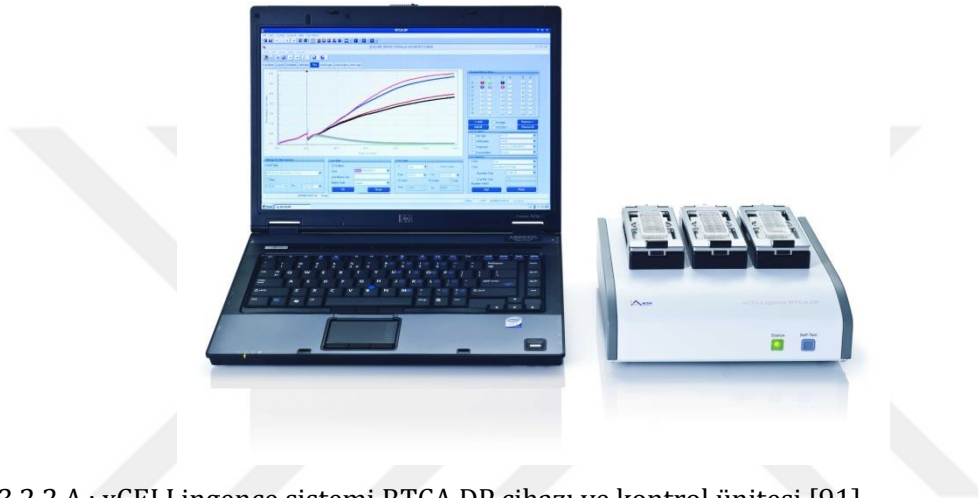
1. Hücreler tripsin-EDTA ile muamele edilip tutundukları yüzeyden kaldırıldı ve 15'lik falkon tüpüne alındı.
2. 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
3. Pellet üzerindeki süpernatant atıldı ve kalan pelletin üzerine 1 ml besi yeri eklenip, pipetaj yapıldı.
4. Bu karışımdan 20  $\mu\text{l}$  alınarak eppendorf tüpüne kondu ve eppendorf içine 1:1 oranında dilüe edilmiş tripan blue eklendi.
5. Karışım pipetaj yapılarak homojen hale getirildi.
6. Cihazın Smart Slides adı verilen özel lama 20  $\mu\text{l}$  eklendi.
7. Hücre sayım cihazı ve cihazın yazılımını taşıyan ünite açıldı.
8. Lam cihaza yerleştirildi, hücre sayımı ve canlılığı belirlendi.

### 3.2.2. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi

xCELLigence sistemi gerçek zamanlı hücre analiz sistemi olarak adlandırılır ve herhangi bir işaretleme yapmadan hücresel biyolojik olayları gerçek zamanlı olarak analiz eden sistemdir [94]. Bu sistem, iyi tasarlanmış plakaların altına yerleştirilen mikro elektrodlar aracılığıyla elektronik empedansı ölçmektedir. Elektronik empedans ölçümü, hücre sayısı, canlılık, morfoloji ve hareket gibi hücrelerin biyolojik durumu hakkında niceliksel bilgi verir. xCELLigence sistemi aracılığıyla geleneksel yöntem ile elde edilemeyen verileri elde etmek kolay bir şekilde elde edilebilmektedir [95].

Real-Time Hücre Analizi-Çift Plate (RTCA DP) cihazı, xCELLigence serisinin bir parçasıdır. RTCA DP sistemi herhangi bir işaretleme yapmadan hücre çoğalması, invazyon,

migrasyon ve sitotoksitenin gerçek zamanlı olarak analiz eden sistemdir. Bu sistem, aynı anda veya farklı zamanlarda üç kullanıcıya kadar bağımsız olarak çalıştırılabilen 3 modül içerir. RTCA DP cihazı inkübatör içerisine plate'lerin yerleştirildiği bir ana ünite ve bir data kablosu ile doğrudan yazılım programını çalıştıran kontrol ünitesinden meydana gelir (şekil 3.2.2.A.). RTCA DP sisteminde hücre poliferasyonu için 16 kuyulu elektronik plaka E-plate, hücre migrasyonu ve invazyonu için 16 kuyu elektronik plaka CIM-plate kullanır [96].



Şekil 3.2.2.A.: xCELLingence sistemi RTCA DP cihazı ve kontrol ünitesi [91].

RTCA DP cihazı, %80 alkol ile kendi temizleme kiti ile temizlendi ve 45 dakika laminar kabinde ultra viyole ışığına maruz bırakılarak steril edilip inkübatöre yerleştirildi. RTCA DP cihazı üç kızıklıdır, bu kızaklara standardizasyon plate yerleştirilip standardizasyon işlemi yapıldı. Sistemin çalışma mekanizması şu şekilde özetlenebilir: cihazın güç düğmesi açılıp, yazılım açıldıktan sonra plate'ler cihaza yerleştirildi ve "Message" kısmından kontrol edildi. Deney bilgileri "Experiment Notes" sekmesine ve plate düzeninin girişi "Layout" sekmesine girildi. Deney aşamaları için "Schedule" sekmesinde "SweepsInterval" olarak tasarlandı. Sweep x 1 interval ölçümü için yaklaşık 1 dakika süren "Background", Sweep x 2 interval ölçümü 15 dakika arayla ölçüm alınmak sureti ile manuel olarak istenilen saat aralığı ayarlandı. "Plot" sekmesinden çalışılacak olan kuyular eklendi ve ölçüm başlatıldıktan sonra hücre titrasyon eğrisine "Hücre İndeksi (CI)" sekmesinde izlendi.

Bu sistemde hücre proliferasyonunu belirlemek özel olarak tasarlanmış üç adet 16 plakalı E-plate (şekil3.2.2.B.) kullanılmaktadır. Bu plate'ler tek kullanım için uygundur. Plate'lerdeki kuyuların tabanı altın mikroelektrodlarla birleştirilmiştir. Kuyuların tabanında%

70 elektrot ile kaplıdır. Bu sensör elektrotlarının elektronik empedansı, hücredeki değişiklikleri izlemek içindir. Elektrik empedansındaki değişiklikler, CI olarak adlandırılan birimsiz bir parametre ile sunulmaktadır. Kuyular da hücre yokken, elektrot empedansı ve CI sıfırdır. Plate'deki kuyulara hücre ekimi yapıldıktan sonra CI artar. CI'nin artışı, eklenen hücre sayısındaki artış ile ilişkilidir. E-Plate görünümünün yüzeyine daha fazla hücre bağlandığında, CI yükselir. Buna ek olarak, hücre sayısı yerine hücre yaşayabilirliği ve hücre yapışmasının gücü, CI'de değişikliğe neden olabilir [95].

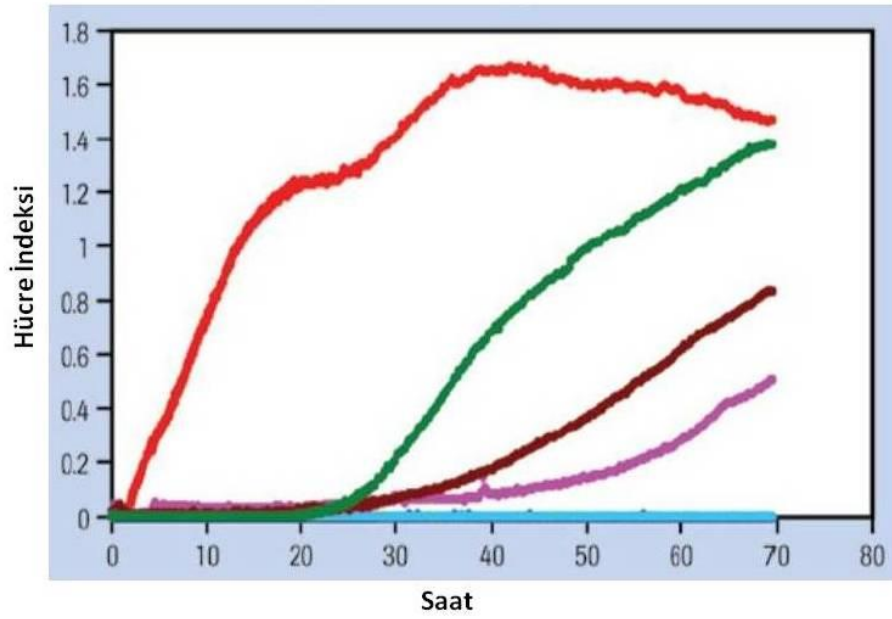


Şekil 3.2.2.B.: E-plate 16 [95].

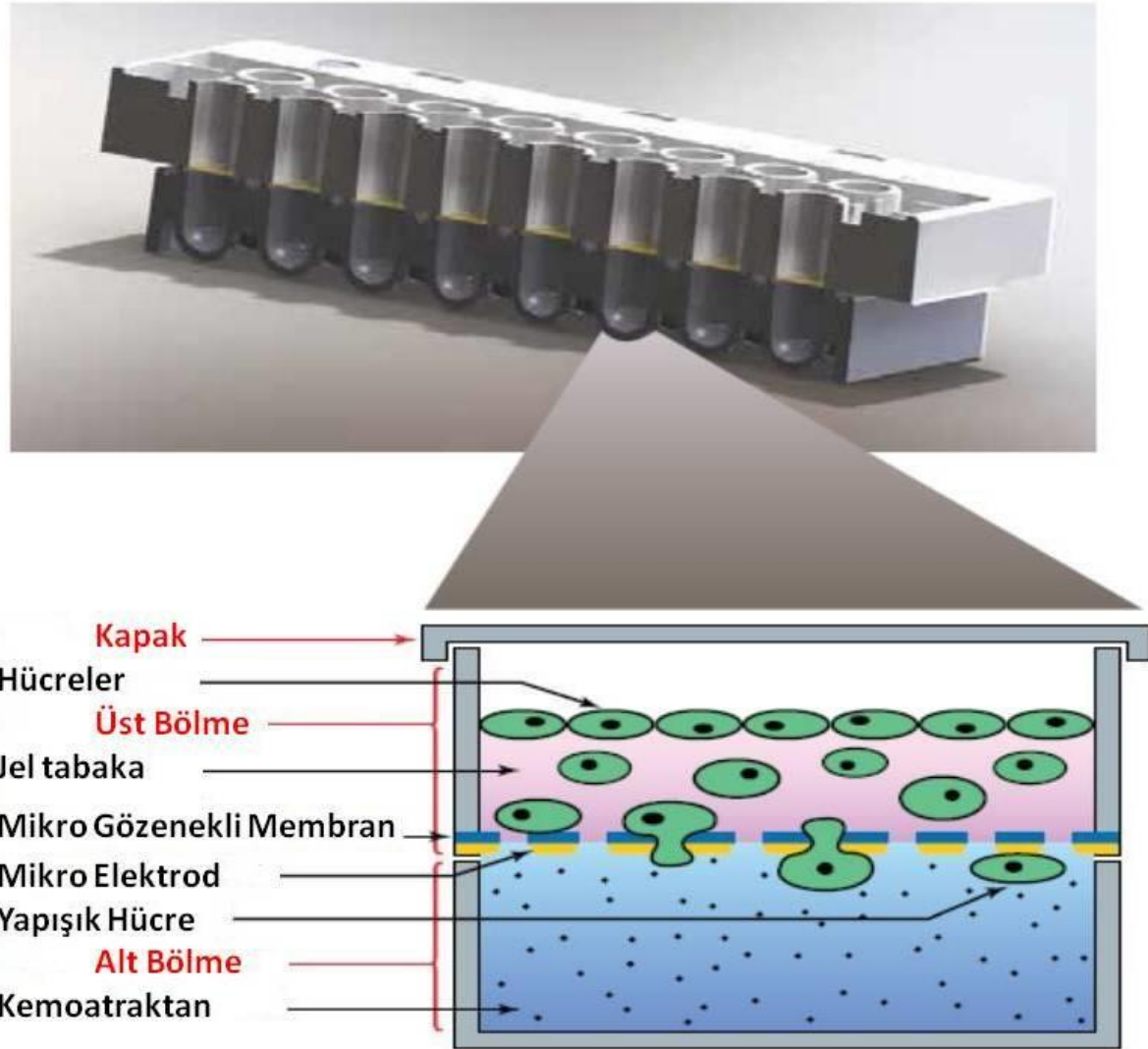
RTCA DP cihazında migrasyon ve invazyon için özel tasarlanmış 16 plakalı CIM-plate, bir üst plak, bir üst plak kapağı ve bir alt plak olmak üzere üç parçadan oluşur (şekil 3.2.2.C.). Üst plak ile alt plak mükemmel şekilde birbiri ile kenetlenir. Üst plak kuyularının alt tarafına geçişte basınca duyarlı halka contaları ile mükemmel bir şekilde sızdırmazlık sağlar. Üst plak kuyularının alt kısmı mikro-gözenekli bir polietilen tereftalat membran ile kaplanır. Gözenekler, hücrelerin üst kısmından zarın alt kısmına veya alt tarafına fiziksel translokasyonuna izin verir. Membranın alt tarafında bulunan altın mikro elektrod sensörleri, göç edilen hücrelere bağlanan bir sinyal, bir empedans sinyali üretir. Elektrik empedansındaki değişiklikler, "Hücre İndeksi" olarak adlandırılan birimsiz bir parametre ile sunulmaktadır (şekil 3.2.2.D.). CIM-plate'de migrasyon/invazyonun gerçek zamanlı analizi şekil 3.2.2.E.'de gösterilmiştir [96].



Şekil 3.2.2.C.: CIM-plate 16[96].



Şekil 3.2.2.D.: CIM-plate'de migrasyon ve invazyon analizi [96].



Şekil 3.2.2.E.: Migrasyon/invazyon gerçek zamanlı CIM-plate analizi [96].

### 3.2.2.1. Deney Gruplarının Tasarlanması ve Kimyasalların Hazırlanması

Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerindeD vitamininin proliferasyon, migrasyon ve invazyon üzerine etkisi; al fakalsidol ve kalsitriolün yüksek dozu ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$  M) ile düşük dozu ( $10^{-9}$ - $10^{-11}$  M) olmak üzere iki farklı deneyde gerçekleştirildi. Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerindeD vitamininin proliferasyon, migrasyon ve invazyon üzerine etkisine bakmak için deney gruplarının platelere yerleştirme düzeni aynı olacak şekilde tasarlandı. Al fakalsidol ve kalsitriolün yüksek dozu ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$  M) ile düşük dozu ( $10^{-9}$ - $10^{-11}$  M) E-plate ve CIM-plate düzeneği tablo 3.2.2.1.'deki gibidir. Proliferasyon, migrasyon ve invazyon parametrelerinin analizi, al fakalsidol ve kalsitriolün yüksek dozu ile düşük dozları cihaz kapasitesinin sınırlı olması nedeniyle farklı plate'lerde ve zamanlarda gerçekleştirildi.

Tablo 3.2.2.1.: Gerçek zamanlı hücre analiz modelinde proliferasyon için E-plate, migrasyon ve invazyon için CIM-plate düzeneği. (Alfakalsidol ve kalsitriol %0.05 etanolde çözülmüştür)

Yüksek doz E-plate/CIM-plate düzeneği			Düşük doz E-plate/CIM-plate düzeneği		
	1	2		1	2
<b>A</b>	Kontrol	Kontrol	<b>A</b>	Kontrol	Kontrol
<b>B</b>	%0.05 etanol	%0.05 etanol	<b>B</b>	%0.05 etanol	%0.05 etanol
<b>C</b>	10 <sup>-6</sup> M alfakalsidol	10 <sup>-6</sup> M alfakalsidol	<b>C</b>	10 <sup>-9</sup> M alfakalsidol	10 <sup>-9</sup> M alfakalsidol
<b>D</b>	10 <sup>-7</sup> M alfakalsidol	10 <sup>-7</sup> M alfakalsidol	<b>D</b>	10 <sup>-10</sup> M alfakalsidol	10 <sup>-10</sup> M alfakalsidol
<b>E</b>	10 <sup>-8</sup> M alfakalsidol	10 <sup>-8</sup> M alfakalsidol	<b>E</b>	10 <sup>-11</sup> M alfakalsidol	10 <sup>-11</sup> M alfakalsidol
<b>F</b>	10 <sup>-6</sup> M kalsitriol	10 <sup>-6</sup> M kalsitriol	<b>F</b>	10 <sup>-9</sup> M kalsitriol	10 <sup>-9</sup> M kalsitriol
<b>G</b>	10 <sup>-7</sup> M kalsitriol	10 <sup>-7</sup> M kalsitriol	<b>G</b>	10 <sup>-10</sup> M kalsitriol	10 <sup>-10</sup> M kalsitriol
<b>H</b>	10 <sup>-8</sup> M kalsitriol	10 <sup>-8</sup> M kalsitriol	<b>H</b>	10 <sup>-11</sup> M kalsitriol	10 <sup>-11</sup> M kalsitriol

Alfakalsidol ve kalsitriol çözücüsü olan etanol içerisinde çözülmüştür. Alfakalsidol ve kalsitriolün yüksek dozu (10<sup>-6</sup>-10<sup>-8</sup> M) ve düşük dozu (10<sup>-9</sup>-10<sup>-11</sup> M) konsantrasyonları %0.05 etanol içeren serum fizyolojik çözücüsü içinde hazırlanmıştır, bu durum tüm dozlarda etanolün konsantrasyonunu eşitlemek içindir. Alfakalsidol ve kalsitriol çözünürken ve doz konsantrasyonları buz üzerinde ve ışıktan korunarak hazırlanmıştır. Kısa yarı ömre sahip D vitamininin aktif formlarını ölçmek zor olduğu için, vücutta D vitamininin göstergesi daha uzun ömürlü inaktif metabolit olan 25(OH)D kabul edilir ve normal sınırı 75-100 nmol/L arasındadır [58]. Aynı zamanda günde 100 IU (2,5 mcg) D vitamini serum 25(OH)D düzeyini 1 ng/mL veya 2,5 nmol/L artırır [58]. Creighton Üniversitesi'nde Dr. Robert Heaney ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda tüm yetişkinlerin yaklaşık 75 nmol/L D vitamini (kalsidiol) seviyesine sahip olduğunu bildirilmiştir [60]. Bu nedenle bizde çalışmamızda D vitamini değerini 75 nmol/L olarak kabul ederek, alfakalsidol ve kalsitriolün kullandığımız dozları kendi içinde yüksek doz (10<sup>-6</sup>-10<sup>-8</sup> M) ve düşük doz (10<sup>-9</sup>-10<sup>-11</sup> M) olarak belirledik. D vitamininin dolaşımdaki asıl formu 25(OH)D olup konsantrasyonu 1,25(OH)<sub>2</sub>D'nin yaklaşık 1000 katıdır [46]. Bu hesaplama göre vücutta ölçülmeyen normal aktif D vitamini düzeyi yaklaşık olarak 10<sup>-10</sup> M civarındadır.

Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde D vitamininin invazyon üzerine etkisini belirlemek için CIM-Plate'de matrigel ile kaplanmıştır. Matrigel, epitel hücrelerinin altında yatan temel membranı taklit eden hücrelerarası matriks proteinleri ve büyüme faktörlerinin bir ağısı yapısıdır ve hücre invazyonunu, özellikle de kanser hücresi invazyonunu in vitro değerlendirmek için yaygın olarak geniş çapta kullanılır [91].

### 3.2.2.2. HEC1A Hücrelerinde D Vitamininin Proliferasyon Üzerine Etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi ile Belirlenmesi

Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde D vitamininin proliferasyon üzerine etkisi, al fakalsidol ve kalsitriolün yüksek dozu ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$  M) ve düşük dozu ( $10^{-9}$ - $10^{-11}$  M) olmak üzere iki farklı deneyde gerçekleştirildi. İlk olarak HEC1A hücrelerinde al fakalsidol ve kalsitriolün yüksek dozunun proliferasyon üzerine etkisi bakıldı, daha sonra al fakalsidol ve kalsitriolün düşük dozunun proliferasyon üzerine etkisine bakıldı. Daha önceden pasajlanan HEC1A hücreleri konfluent olduktan sonra proliferasyon deneyi gerçekleştirildi. Deney başlamadan önce deney grupları oluşturuldu ve plate düzeneği tablo 3.2.2.2.A. ve 3.2.2.2.B.'deki gibidir.

Tablo 3.2.2.2.A.: Gerçek zamanlı hücre analiz modelinde proliferasyon için al fakalsidol ve kalsitriol ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$  M) E-plate düzeneği (her bir grup için n=6)

	A	B	C	D	E	H	G	H
<b>1</b>	saline	%0.05	$10^{-6}$ M	$10^{-7}$ M	$10^{-8}$ M	$10^{-6}$ M	$10^{-7}$ M	$10^{-8}$ M
	+	+	+	+	+	+	+	+
	hücre	hücre	hücre	hücre	hücre	hücre	hücre	hücre
	+	+	+	+	+	+	+	+
	besi yeri	besi yeri	besi yeri	besi yeri	besi yeri	besi yeri	besi yeri	besi yeri
<b>2</b>	saline	%0.05	$10^{-6}$ M	$10^{-7}$ M	$10^{-8}$ M	$10^{-6}$ M	$10^{-7}$ M	$10^{-8}$ M
	+	+	+	+	+	+	+	+
	hücre	hücre	hücre	hücre	hücre	hücre	hücre	hücre
	+	+	+	+	+	+	+	+
	besi yeri	besi yeri	besi yeri	besi yeri	besi yeri	besi yeri	besi yeri	besi yeri

Tablo 3.2.2.2.B.: Gerçek zamanlı hücre analiz modelinde proliferasyon için al fakalsidol ve kalsitriol ( $10^{-9}$ - $10^{-11}$  M) E-plate düzeneği (her bir grup için n=6)

	A	B	C	D	E	H	G	H
<b>1</b>	saline	%0.05	$10^{-9}$ M	$10^{-10}$ M	$10^{-11}$ M	$10^{-9}$ M	$10^{-10}$ M	$10^{-11}$ M
	+	+	+	+	+	+	+	+
	hücre	hücre	hücre	hücre	hücre	hücre	hücre	hücre
	+	+	+	+	+	+	+	+
	besi yeri	besi yeri	besi yeri	besi yeri	besi yeri	besi yeri	besi yeri	besi yeri
<b>2</b>	saline	%0.05	$10^{-9}$ M	$10^{-10}$ M	$10^{-11}$ M	$10^{-9}$ M	$10^{-10}$ M	$10^{-11}$ M
	+	+	+	+	+	+	+	+
	hücre	hücre	hücre	hücre	hücre	hücre	hücre	hücre
	+	+	+	+	+	+	+	+
	besi yeri	besi yeri	besi yeri	besi yeri	besi yeri	besi yeri	besi yeri	besi yeri



RTCA DP yazılımı açıldı ve 3 kızaklı (3 plate kapasiteli) cihaza yüklenecek 3 adet E-plate belirlendi. "Experiment Notes" sekmesine deney adı ve E-plate'in seri numara bilgileri girildi. "Layout" sekmesine plate düzeninin girişi yapıldı. "Schedule" sekmesine planlanan deney aşamaları; "Back ground" ölçümü ile her 15 dakika da 24 saat süreyle ve de 24 sonrasında devamlı ölçüm alınması için manuel olarak istenilen saat aralığı tasarlandı.

E-plate'lerin her bir kuyucuğuna 100 µl besi yeri konuldu. E-plate'ler cihaza yerleştirildi ve "Back ground" ölçümü yapıldı. Ekim için %70-80 konfluent olan HEC1A hücreleri kullanıldı. Hücreler tripsinize edildi ve pellet 1 ml serumsuz (FBS içermeyen) besi yeri ile resüspanse edilerek canlı hücrelerin sayılması gerçekleştirildi. Her kuyuya 10000 HEC1A hücresi 90 µl besi yeri içerisinde yüklendi. Bu yükleme sırasında hava kabarcığı ve aşırı köpürtme yapılmamasına dikkat edildi. Yükleme işleminin ardından oda sıcaklığında 30 dakika hücrelerin tabana çökmesi ve tutunması için bekletildikten sonra E-plate'ler cihaza yerleştirildi. Her 15 dakika da empedans ölçümü için 24 saatlik ölçüm başlatıldı.

Belirlenen inkübasyon süresi (yaklaşık 24 saat) sonunda al fakalsidol ve kalsitriolün farklı dozları uygulanmıştır. E-plate kuyu son hacmi 200 µl olacak şekilde (10 µl hacim içinde ilaç uygulandı) ayarlandı. Farklı dozlarda ilaç uygulaması sırasında kuyuya tutunan hücrelerin kalmaması için dikkatli şekilde pipetaj yapmadan ve hava kabarcığı oluşturmadan uygulandı. Kontrol grubu olan A1 ve A2 kuyularına 10 µl salin konuldu. D vitamininin çözücüsü olan etanol ise B1 ve B2 kuyularına 10 µl hacim içerisinde verilerek nihai konsantrasyonun %0.05 etanol olması sağlanmıştır. Al fakalsidol ve kalsitriolün yüksek doz deneyi yapılırken C1 ve C2 kuyularına 10 µl  $10^{-6}$  M al fakalsidol; D1 ve D2 kuyularına 10 µl  $10^{-7}$  M al fakalsidol; E1 ve E2 kuyularına 10 µl  $10^{-8}$  M al fakalsidol konuldu. Aynı zamanda F1 ve F2 kuyularına 10 µl  $10^{-6}$  M kalsitriol; G1ve G2 kuyularına 10 µl  $10^{-7}$  M kalsitriol; H1 ve H2 kuyularına 10 µl  $10^{-8}$  M kalsitriol konuldu. Al fakalsidol ve kalsitriolün düşük doz deneyi yapılırken C1 ve C2 kuyularına 10 µl  $10^{-9}$  M al fakalsidol; D1 ve D2 kuyularına 10 µl  $10^{-10}$  M al fakalsidol; E1 ve E2 kuyularına 10 µl  $10^{-11}$  M al fakalsidol konuldu. Aynı zamanda F1 ve F2 kuyularına 10 µl  $10^{-9}$  M kalsitriol; G1ve G2 kuyularına 10 µl  $10^{-10}$  M kalsitriol; H1 ve H2 kuyularına 10 µl  $10^{-11}$  M kalsitriol konuldu. Al fakalsidol ve kalsitriolün yüksek ve düşük doz deneylerinin E-plate'lerin ilaç yüklenmiş hali tablo 3.2.2.2.A. ve 3.2.2.2.B.'de gösterilmiştir. Farklı dozlardaki ilaç yüklemesi yapıldıktan sonra E-plate'ler inkübatördeki cihaza yerleştirildi ve her 15 dakikada empedans ölçümü olacak şekilde süresiz ölçüm başlatıldı. Hücrelerdeki proliferasyon logaritmik fazı takiben plato fazına ulaştıktan sonra deneyler sonlandırıldı.

### 3.2.2.3. HEC1A Hücrelerinde D Vitamininin Migrasyon Üzerine Etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi ile Belirlenmesi

Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde D vitamininin migrasyon üzerine etkisi, al fakalsidol ve kalsitriolün yüksek dozu ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$  M) ve düşük dozu ( $10^{-9}$ - $10^{-11}$  M) olmak üzere iki farklı deneyde gerçekleştirildi. İlk olarak HEC1A hücrelerinde al fakalsidol ve kalsitriolün yüksek dozunun migrasyon üzerine etkisine bakıldı, daha sonra al fakalsidol ve kalsitriolün düşük dozunun migrasyon üzerine etkisine bakıldı. Deney başlamadan önce deney grupları oluşturuldu ve plate düzeneği tablo 3.2.2.3.A. ve 3.2.2.3.B.'deki gibidir.

Tablo 3.2.2.3.A.: Gerçek zamanlı hücre analiz modelinde migrasyon için al fakalsidol ve kalsitriol ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$  M) CIM-plate düzeneği (her bir grup için n=6)

	A	B	C	D	E	H	G	H	
1	saline	%0.05	$10^{-6}$ M	$10^{-7}$ M	$10^{-8}$ M	$10^{-6}$ M	$10^{-7}$ M	$10^{-8}$ M	Üst plaka
	+	+	+	+	+	+	+	+	
	hücre	hücre	hücre	hücre	hücre	hücre	hücre	hücre	
	+	+	+	+	+	+	+	+	
serumsuz besiyeri	serumsuz besiyeri	serumsuz besiyeri	serumsuz besiyeri	serumsuz besiyeri	serumsuz besiyeri	serumsuz besiyeri	serumsuz besiyeri	serumsuz besiyeri	Alt plaka
serumlu besiyeri	serumlu besiyeri	serumlu besiyeri	serumlu besiyeri	serumlu besiyeri	serumlu besiyeri	serumlu besiyeri	serumlu besiyeri	serumlu besiyeri	
2	saline	etanol	alfakalsidol	alfakalsidol	alfakalsidol	kalsitriol	kalsitriol	kalsitriol	Üst plaka
	+	+	+	+	+	+	+	+	
	hücre	hücre	hücre	hücre	hücre	hücre	hücre	hücre	
	+	+	+	+	+	+	+	+	
serumsuz besiyeri	serumsuz besiyeri	serumsuz besiyeri	serumsuz besiyeri	serumsuz besiyeri	serumsuz besiyeri	serumsuz besiyeri	serumsuz besiyeri	serumsuz besiyeri	Alt plaka
serumlu besiyeri	serumlu besiyeri	serumlu besiyeri	serumlu besiyeri	serumlu besiyeri	serumlu besiyeri	serumlu besiyeri	serumlu besiyeri	serumlu besiyeri	

Tablo 3.2.2.3.B.: Gerçek zamanlı hücre analiz modelinde migrasyon için al fakalsidol ve kalsitriol ( $10^{-9}$ - $10^{-11}$  M) CIM-plate düzeneği (her bir grup için n=6)

	A	B	C	D	E	H	G	H	
1	saline + hücre +	%0.05 etanol + hücre +	$10^{-9}$ M alfakalsidol + hücre +	$10^{-10}$ M alfakalsidol + hücre +	$10^{-11}$ M alfakalsidol + hücre +	$10^{-9}$ M kalsitriol + hücre +	$10^{-10}$ M kalsitriol + hücre +	$10^{-11}$ M kalsitriol + hücre +	Üst plaka
	serumsuz besi yeri	serumsuz besi yeri	serumsuz besi yeri	serumsuz besi yeri	serumsuz besi yeri	serumsuz besi yeri	serumsuz besi yeri	serumsuz besi yeri	Alt plaka
2	saline + hücre +	%0.05 etanol + hücre +	$10^{-9}$ M alfakalsidol + hücre +	$10^{-10}$ M alfakalsidol + hücre +	$10^{-11}$ M alfakalsidol + hücre +	$10^{-9}$ M kalsitriol + hücre +	$10^{-10}$ M kalsitriol + hücre +	$10^{-11}$ M kalsitriol + hücre +	Üst plaka
	serumsuz besi yeri	serumsuz besi yeri	serumsuz besi yeri	serumsuz besi yeri	serumsuz besi yeri	serumsuz besi yeri	serumsuz besi yeri	serumsuz besi yeri	Alt plaka

Deneyden 16 saat önce %80 konfluent olan HEC1A hücrelerinin üzerindeki serumlu besi yeri alınıp atıldı, yerine serumsuz (FBS içermeyen) besi yeri eklendi. Deney günü RTCA DP yazılımı açıldı ve 3 kızaklı cihaza yüklenecek 3 adet CIM-plate belirlendi. “Experiment Notes” sekmesine deney adı ve CIM-plate’in seri numara bilgileri girildi. “Layout” sekmesine plate düzeninin girişi yapıldı. “Schedule” sekmesine planlanan deney aşamaları; “Back ground” ölçümü ile her 15 dakikalık süreyle devamlı ölçüm alınması için manuel olarak istenilen saat aralığı tasarlandı.

CIM-plate’lerin alt plakalarının her bir kuyusuna 160  $\mu$ L %20 FBS (FBS: üst kuyucuklara yerleştirilen hücreler için kemoatraktan etki yapması amacıyla kullanıldı) içeren serumlu besi yeri eklendi. Bu işlem sırasında kuyulardabaloncuk olmasını önlemek için pipetle tüm besi yeriverilirken, pipete tam bas yarıya kadar bırak tekniği uygulandı. Kabarcık oluştuğunda nazikçe pipet veya iğne ile patlatıldı. Üst plaka alt plakanın üzerine gelecek şekilde yerleştirildi. Üst plakanın her kuyusuna 90  $\mu$ l serumsuz(FBS içermeyen) besi yeri konduve üst plakadaki kuyuların tabanını besi yerinin ıslatması amacıyla 37°C’de 1 saat inkübe edildi. Bir saatlik inkübasyondan sonra CIM-plate’ler cihaza yerleştirildi ve 1 dakikalık “Back gorund” okuma gerçekleştirildi.

Bir saat inkübasyon süresi sırasında 16 saat önce serumsuz (FBS içermeyen) besi yerine bırakılan HEC1A hücrelerinin üzerinde ki besi yeri alınıp atıldı, üzerine kalsiyum magnezyum içermeyen PBS koyulup iki kez yıkama yapıldı. Flaska yeteri kadar tripsin-EDTA eklendi ve

hücreler kalkınca flaska aynı miktarda FBS eklenip, 800 rpm devirde 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpün üstündeki süpernatant pastör pipeti ile çekilip atıldı. Pellet 1 ml serumsuz (FBS içermeyen) besi yeri ile resüspanse edilerek hücrelerin sayılması gerçekleştirildi. 100 µl serumsuz (FBS içermeyen) besi yeri içerisinde her kuyuda sabit 30000 hücre, üst plakanın kuyucuklarına yüklendi. Bu yükleme sırasında hava kabarcığı ve aşırı köpürtme yapılmamasına dikkat edildi.

Kuyulara hücre yüklemesi yapıldıktan hemen sonra al fakalsidol ve kalsitriolün farklı dozları uygulandı. CIM-plate üst plakanın kuyu son hacmi 200 µl olacak şekilde (10 µl hacim içinde ilaç uygulandı) ayarlandı. Farklı dozlarda ilaç uygulaması sırasında kuyuya tutunan hücrelerin kalmaması için dikkatli şekilde pipetaj yapmadan ve hava kabarcığı oluşturmadan uygulanmıştır. Kontrol grubu olan A1 ve A2 kuyularına 10 µl salin konuldu. B1 ve B2 kuyularına 10 µl hacim içerisinde verilerek nihai konsantrasyonun %0.05 etanol olması sağlanmıştır. Al fakalsidol ve kalsitriolün yüksek doz deneyi yapılırken C1 ve C2 kuyularına 10 µl  $10^{-6}$  M al fakalsidol; D1 ve D2 kuyularına 10 µl  $10^{-7}$  M al fakalsidol; E1 ve E2 kuyularına 10 µl  $10^{-8}$  M al fakalsidol konuldu. Aynı zamanda F1 ve F2 kuyularına 10 µl  $10^{-6}$  M kalsitriol; G1 ve G2 kuyularına 10 µl  $10^{-7}$  M kalsitriol; H1 ve H2 kuyularına 10 µl  $10^{-8}$  M kalsitriol konuldu. Al fakalsidol ve kalsitriolün düşük doz deneyi yapılırken C1 ve C2 kuyularına 10 µl  $10^{-9}$  M al fakalsidol; D1 ve D2 kuyularına 10 µl  $10^{-10}$  M al fakalsidol; E1 ve E2 kuyularına 10 µl  $10^{-11}$  M al fakalsidol konuldu. Aynı zamanda F1 ve F2 kuyularına 10 µl  $10^{-9}$  M kalsitriol; G1 ve G2 kuyularına 10 µl  $10^{-10}$  M kalsitriol; H1 ve H2 kuyularına 10 µl  $10^{-11}$  M kalsitriol konuldu. Al fakalsidol ve kalsitriolün yüksek ve düşük doz deneylerinin CIM-plate'lerin ilaç yüklenmiş hali tablo 3.2.2.3.A. ve 3.2.2.3.B.'de gösterilmiştir.

CIM-plateler inkübatördeki cihaza yerleştirildi ve her 15 dakikada empedans ölçümü olacak şekilde süresiz ölçüm başlatıldı. Hücrelerdeki migrasyon logaritmik fazı takiben plato fazına ulaştıktan sonra deneyler sonlandırıldı.  $CI > 0,2$ 'den büyük olması pozitif migrasyon olarak kabul edildi [96].

### 3.2.2.4. HEC1A Hücrelerinde D Vitamininin İnvazyon Üzerine Etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi ile Belirlenmesi

Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde D vitamininin al fakalsidol ve kalsitriolün yüksek dozunun ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$  M) invazyon üzerine etkisine bakıldı. Deney başlamadan önce deney grupları oluşturuldu ve plate düzeneği tablo 3.2.2.4.A. ve 3.2.2.4.B.'deki gibidir.

Tablo 3.2.2.4.A.: Gerçek zamanlı hücre analiz modelinde invazyon için al fakalsidol ve kalsitriol ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$  M) CIM-plate düzeneği (her bir grup için n=6)

	A	B	C	D	E	H	G	H	
<b>1</b>	saline + hücre + serumsuz besi yeri + matrigel	%0.05 etanol + hücre + serumsuz besi yeri + matrigel	$10^{-6}$ M alfakalsidol + hücre + serumsuz besi yeri + matrigel	$10^{-7}$ M alfakalsidol + hücre + serumsuz besi yeri + matrigel	$10^{-8}$ M alfakalsidol + hücre + serumsuz besi yeri + matrigel	$10^{-6}$ M kalsitriol + hücre + serumsuz besi yeri + matrigel	$10^{-7}$ M kalsitriol + hücre + serumsuz besi yeri + matrigel	$10^{-8}$ M kalsitriol + hücre + serumsuz besi yeri + matrigel	Üst plaka
	Serumlu besi yeri	Serumlu besi yeri	Serumlu besi yeri	Serumlu besi yeri	Serumlu besi yeri	Serumlu besi yeri	Serumlu besi yeri	Serumlu besi yeri	Alt plaka
<b>2</b>	saline + hücre + serumsuz besi yeri + matrigel	%0.05 etanol + hücre + serumsuz besi yeri + matrigel	$10^{-6}$ M alfakalsidol + hücre + serumsuz besi yeri + matrigel	$10^{-7}$ M alfakalsidol + hücre + serumsuz besi yeri + matrigel	$10^{-8}$ M alfakalsidol + hücre + serumsuz besi yeri + matrigel	$10^{-6}$ M kalsitriol + hücre + serumsuz besi yeri + matrigel	$10^{-7}$ M kalsitriol + hücre + serumsuz besi yeri + matrigel	$10^{-8}$ M kalsitriol + hücre + serumsuz besi yeri + matrigel	Üst plaka
	Serumlu besi yeri	Serumlu besi yeri	Serumlu besi yeri	Serumlu besi yeri	Serumlu besi yeri	Serumlu besi yeri	Serumlu besi yeri	Serumlu besi yeri	Alt plaka

Tablo 3.2.2.4.B.: Gerçek zamanlı hücre analiz modelinde invazyon için alfakalsidol ve kalsitriol ( $10^{-9}$ - $10^{-11}$  M) CIM-plate düzeneği (her bir grup için n=6)

	A	B	C	D	E	H	G	H	
1	saline	%0.05 etanol	$10^{-9}$ M alfakalsidol	$10^{-10}$ M alfakalsidol	$10^{-11}$ M alfakalsidol	$10^{-9}$ M kalsitriol	$10^{-10}$ M kalsitriol	$10^{-11}$ M kalsitriol	Üst plaka
	+	+	+	+	+	+	+	+	
	hücre	hücre	hücre	hücre	hücre	hücre	hücre	hücre	
	+	+	+	+	+	+	+	+	
2	serumsuz besi yeri	serumsuz besi yeri	serumsuz besi yeri	serumsuz besi yeri	serumsuz besi yeri	serumsuz besi yeri	serumsuz besi yeri	serumsuz besi yeri	Alt plaka
	+	+	+	+	+	+	+	+	
	matrigel	matrigel	matrigel	matrigel	matrigel	matrigel	matrigel	matrigel	
	serumlu besi yeri	serumlu besi yeri	serumlu besi yeri	serumlu besi yeri	serumlu besi yeri	serumlu besi yeri	serumlu besi yeri	serumlu besi yeri	

Deneyden 16 saat önce %80 konfluent olan HEC1A hücrelerinin üzerindeki serumlu besi yeri alınıp atıldı, yerine serumsuz (FBS içermeyen) besi yeri eklenip inkübatöre konuldu ve aynı zamanda matrigel uygulaması hazırlığı için pipet uçları, eppendorf tüpleri ve CIM-plate'nin üst kısmı 4°C buzdolabına konuldu. Ayrıca, matrigel -80°C dondurucudan 4°C buzdolabına aktarıldı. Deneyden 4 saat önce önceden soğutulmuş matrigel'i, buz üzerinde 800 µg/ml konsantrasyonda olacak şekilde soğuk serumsuz besi yeri ile matrigel seyreltildi ve polimerizasyonu önlemek için seyreltme işlemi sırasında kullanılan malzemeler ve matrigel buz üzerinde muhafaza edildi. Matrigel'in verilen kuyuyu kaplaması için CIM-plate'in üst plakanın her kuyusuna 50 µl matrigel solüsyonu ilave edildi ve her kuyudan 30 µl matrigel solüsyonu geri alındı. Matrigel'in kuyularda eşit olarak kaplaması için 30 µl'lik Matrigel'i çıkartırken membrana dokunmadan kuyunun dibine kadar pipet ucu ile girildi ve yavaş yavaş 30 µl'lik Matrigel çekildi. Bu adımda herhangi bir kabarcık oluşturulmadan tamamlandı. Matrigel'in kuyunun yüzeyini iyi bir şekilde kaplaması için CIM-plate'in üst plakaları 4 saat boyunca 37°C inkübatörde bekletildi. 4 saat sonra RTCA DP yazılımı açıldı ve 3 kızaklı cihaza yüklenecek 3 adet CIM-plate belirlendi. "Experiment Notes" sekmesine deney adı ve CIM-plate'in seri numara bilgileri girildi. "Layout" sekmesine plate düzeninin girişi yapıldı. "Schedule" sekmesine planlanan deney aşamaları; "Background" ölçümü ile her 15 dakikalık süreyle devamlı ölçüm alınması için manuel olarak istenilen saat aralığı tasarlandı.

CIM-plate'lerin alt plakalarının her bir kuyusuna 160 µL %20 FBS (kemoatraktan olarak) içeren serumlu besi yeri eklendi. Bu işlem sırasında kuyulardabaloncuk olmasını önlemek için pipetle tüm besi yeriverilirken, pipete tam bas yarıya kadar bırak tekniği uygulandı. Kabarcık oluştuğunda nazıkçe pipet veya iğne ile patlatıldı. Üst plaka alt plakanın üzerine gelecek şekilde yerleştirildi. Üst plakanın her kuyusuna 70 µl serumsuz (FBS içermeyen) besi yeri konduve üst plakadaki kuyuların tabanını besi yerinin ıslatması amacıyla 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Bir saatlik inkübasyondan sonra CIM-plate'ler cihaza yerleştirildi ve 1 dakikalık "Back gorund" okuma gerçekleştirildi.

Bir saat inkübasyon süresi sırasında 16 saat önce serumsuz (FBS içermeyen) besi yerine bırakılan HEC1A hücrelerinin üzerinde ki besi yeri alınıp atıldı, üzerine kalsiyum magnezyum içermeyen PBS koyulup iki kez yıkama yapıldı. Flaska yeteri kadar tripsin-EDTA eklendi ve hücreler kalkınca flaska aynı miktarda FBS eklenip, 800 rpm devirde 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpün üstündeki süpernatant pastör pipeti ile çekilip atıldı. Pellet 1 ml serumsuz (FBS içermeyen) besi yeri ile resüspanse edilerek hücrelerin sayılması gerçekleştirildi. 100 µl serumsuz (FBS içermeyen) besi yeri içerisinde her kuyuda sabit 30000 hücre, üst plakanın kuyucuklarına yüklendi. Bu yükleme sırasında hava kabarcığı ve aşırı köpürtme yapılmamasına dikkat edildi.

Kuyulara hücre yüklemesi yapıldıktan hemen sonra al fakalsidol ve kalsitriolün farklı dozları uygulandı. CIM-plate üst plakanın kuyu son hacmi 200 µl olacak şekilde (10 µl hacim içerisinde ilaç uygulandı) ayarlandı. Farklı dozlarda ilaç uygulaması sırasında kuyuya tutunan hücrelerin kalmaması için dikkatli şekilde pipetaj yapmadan ve hava kabarcığı oluşturmadan uygulanmıştır. Kontrol grubu olan A1 ve A2 kuyularına 10 µl salin konuldu. B1 ve B2 kuyularına 10 µl hacim içerisinde verilerek nihai konsantrasyonun %0.05 etanol olması sağlanmıştır. C1 ve C2 kuyularına 10 µl 10<sup>-6</sup> M al fakalsidol; D1 ve D2 kuyularına 10 µl 10<sup>-7</sup> M al fakalsidol; E1 ve E2 kuyularına 10 µl 10<sup>-8</sup> M al fakalsidol konuldu. Aynı zamanda F1 ve F2 kuyularına 10 µl 10<sup>-6</sup> M kalsitriol; G1ve G2 kuyularına 10 µl 10<sup>-7</sup> M kalsitriol; H1 ve H2 kuyularına 10 µl 10<sup>-8</sup> M kalsitriol konuldu. Al fakalsidol ve kalsitriolün yüksek deneyinin CIM-plate'lerin ilaç yüklenmiş hali tablo 3.2.2.4.A. ve 3.2.2.4.B.'de gösterilmiştir.

CIM-plate'ler inkübatördeki cihaza yerleştirildi ve her 15 dakikada empedans ölçümü olacak şekilde süresiz ölçüm başlatıldı. Hücrelerdeki migrasyon logaritmik fazı takiben plato fazına ulaştıktan sonra deneyler sonlandırıldı. CI>0,2'den büyük olması pozitif invazyon olarak kabul edildi [96].

### 3.3.Yara İyileşme Modeli

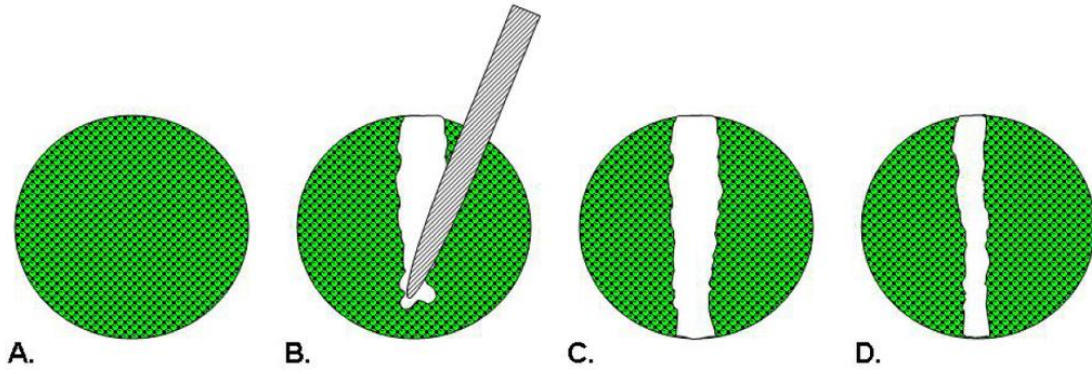
#### 3.3.1. HEC1A Hücrelerinde D Vitamininin Migrasyon Üzerine Etkisinin Yara İyileşme Modeli ile Belirlenmesi

Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde D vitamininin migrasyon üzerine etkisi, al fakalsidol ile kalsitriolün yüksek dozu ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$  M) ve düşük dozu ( $10^{-9}$ - $10^{-11}$  M) olmak üzere yara iyileşme (Wound Healing) modeli ile bakılarak gerçekleştirildi. İlk olarak HEC1A hücrelerinde al fakalsidol ve kalsitriolün yüksek dozlarının daha sonra al fakalsidol ve kalsitriolün düşük dozlarının migrasyon üzerine etkisine yara iyileşme modeli ile bakıldı. Deneyde 2 adet 24 well plate kullanıldı ve 24 well plate şekil 3.3.1.A.'da gösterilmiştir. Bir yara iyileşme modeli örneği olarak da şekil 3.3.1.B.'de gösterilmiştir. Deney başlamadan önce deney grupları oluşturuldu ve bu deney grupları tablo 3.3.1.A. ve 3.3.1.B.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.3.1.A.: 24 well plate [97].





Şekil 3.3.1.B.: Yara iyileşme modeli örneği. Şekilde konfluent olan hücreler (A), konfluent olan hücrelerde yara oluşturulması için bir materyal ile çizilmesi (B), kuyularda oluşturulmuş yaranın ilk hali (C) ve hücrelerde içeri doğru göçün gösterilmesi (D) olarak verilmiştir [98].

Tablo 3.3.1.A.: Yara iyileşme modeli, al fakalsidol ve kalsitriol ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$  M) 24 well plate düzeneği (her bir grup için n=6)

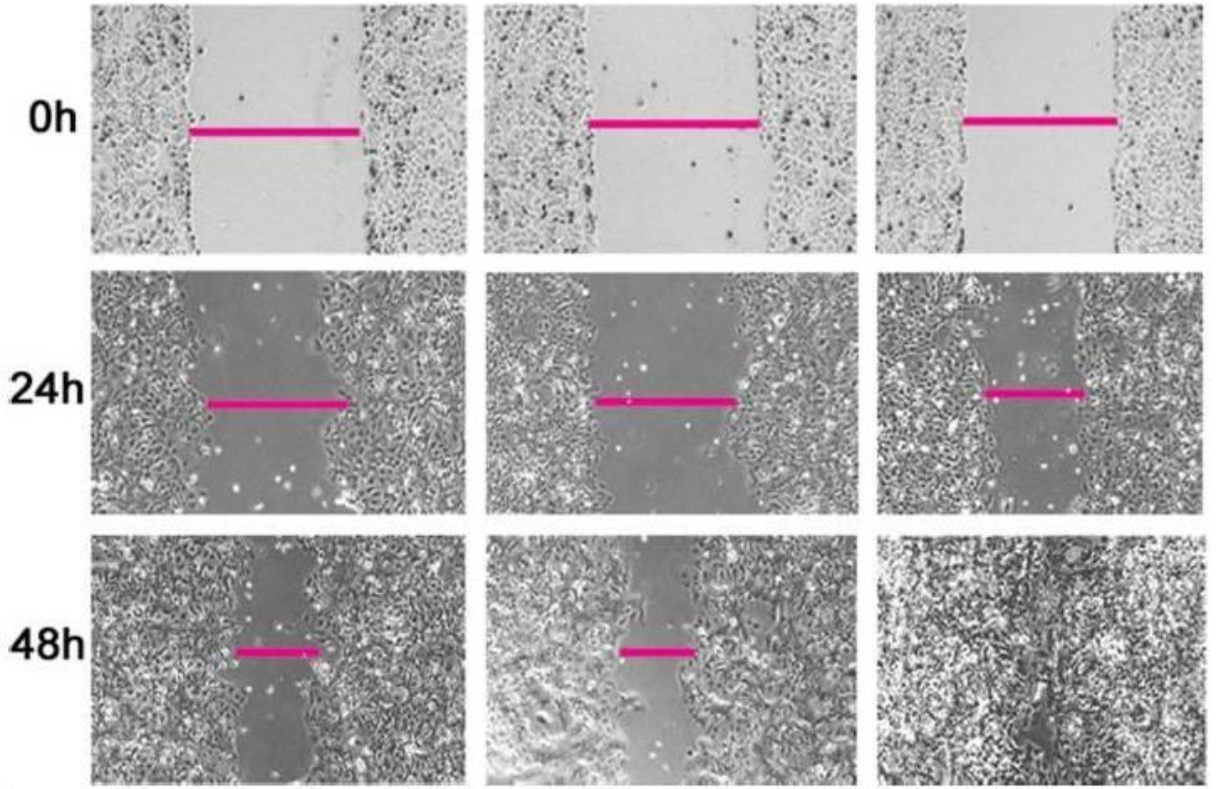
	1	2	3	4
A	Kontrol	$10^{-6}$ M al fakalsidol	$10^{-6}$ M al fakalsidol	$10^{-6}$ M al fakalsidol
B	Kontrol	$10^{-7}$ M al fakalsidol	$10^{-7}$ M al fakalsidol	$10^{-7}$ M al fakalsidol
C	Kontrol	$10^{-8}$ M al fakalsidol	$10^{-8}$ M al fakalsidol	$10^{-8}$ M al fakalsidol
D	%0.05 etanol	$10^{-6}$ M kalsitriol	$10^{-6}$ M kalsitriol	$10^{-6}$ M kalsitriol
E	%0.05 etanol	$10^{-7}$ M kalsitriol	$10^{-7}$ M kalsitriol	$10^{-7}$ M kalsitriol
F	%0.05 etanol	$10^{-8}$ M kalsitriol	$10^{-8}$ M kalsitriol	$10^{-8}$ M kalsitriol

Tablo 3.3.1.B.: Yara iyileşme modeli, al fakalsidol ve kalsitriol ( $10^{-9}$ - $10^{-11}$  M) 24 well plate düzeneği (her bir grup için n=6)

	1	2	3	4
A	Kontrol	$10^{-9}$ M al fakalsidol	$10^{-9}$ M al fakalsidol	$10^{-9}$ M al fakalsidol
B	Kontrol	$10^{-10}$ M al fakalsidol	$10^{-10}$ M al fakalsidol	$10^{-10}$ M al fakalsidol
C	Kontrol	$10^{-11}$ M al fakalsidol	$10^{-11}$ M al fakalsidol	$10^{-11}$ M al fakalsidol
D	%0.05 etanol	$10^{-9}$ M kalsitriol	$10^{-9}$ M kalsitriol	$10^{-9}$ M kalsitriol
E	%0.05 etanol	$10^{-10}$ M kalsitriol	$10^{-10}$ M kalsitriol	$10^{-10}$ M kalsitriol
F	%0.05 etanol	$10^{-11}$ M kalsitriol	$10^{-11}$ M kalsitriol	$10^{-11}$ M kalsitriol

Hücre kültürü ortamında daha önceden pasajlanıp konfluent olan hazır endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücreleri kullanıldı. Konfluent olan hücre flaskına yeteri kadar tripsin-EDTA eklendi ve hücreler kalkınca flaska aynı miktarda FBS eklenip, 800 rpm devirde 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpün üstündeki süpernatant pastör pipeti ile çekilip atıldı. Pellet 1 ml besi yeri ile resüspanse edilerek hücrelerin sayılması gerçekleştirildi. Her kuyunun besi yeri hacmi 500 µl olarak belirlendi. 24 well plate'lerin her kuyusuna 400 µl besi yeri kondu ve üzerine 100 µl besi yeri içerisinde 30000 hücre/well olacak şekilde ekildi. Kuyulardaki hücreler konfluent olana kadar yaklaşık 48 saat inkübe edildi. Konfluent olan hücrelerin üzerindeki medium alınıp atıldı ve DPBS ile 3 kez yıkandı ve 500 µl serumsuz besi yeri eklenerek, 24 saat inkübatörde bekletildi. 24 saat sonra kuyulardaki serumsuz besi yeri alınıp atıldı ve 20 µl pipet ucu kullanılarak, kuyularda birbirine paralel olacak şekilde aynı yönde yara (çizgi) açıldı. Pipet ucu ortalama 45 derecelik eğim ve eşit birkuvvet uygulanarak yaralar oluşturuldu. Her kuyuda açılan yara açıklığı ortalama 600-1000µm arasında gerçekleşti. Bunlar arasından yara açıklığı eşit olanlar seçilerek çalışmaya bunlarla devam edildi. Kuyular da yaralar açıldıktan sonra 3 kez DPBS ile yıkama yapıldı ve kuyulara 475 µl %1 FBS'li besi yeri eklendi. Daha sonra her kuyunun 0. saat görüntüsü alınarak kaydedildi ve hemen sonrasında kuyularadeney grubuna göre belirlenen ilaç dozları 25µl hacim içerisinde ilave edildi. 0. saatten itibaren 48. saate kadar her 12 saatte kuyuların görüntüsü alınarak kayıt edildi. 0. dakika da alınan yara görüntüsünün yeri işaretlenerek daha sonraki görüntüler hep aynı noktadan alındı. Kuyularda belirlenen yerlerdeki yara açıklığı mesafesi µm olarak ölçülmüştür.

Yara iyileşme modelinde hücre migrasyonunun belirlenmesi kuyularda 0. Saatteki görüntünün 24. saatteki görüntüsü ile karşılaştırılması ile belirlenir. Burada yarada meydana gelen iyileşme mesafesi ölçülerek karşılaştırılabilir. Jiang ve arkadaşlarının yaptığı yara iyileşme modelinde kuyularda meydana gelen 0., 24. ve 48. saatteki yaraların görüntüleri ve ölçümleri Şekil 3.3.1.E.'de gösterilmiştir [99].



Şekil 3.3.1.C.: Jiang ve arkadaşlarının yaptığı yara iyileşme modelinde 0., 24. ve 48. saatteki yaraların görüntüleri ve ölçümleri [99].

### 3.4. İstatistik Analizleri

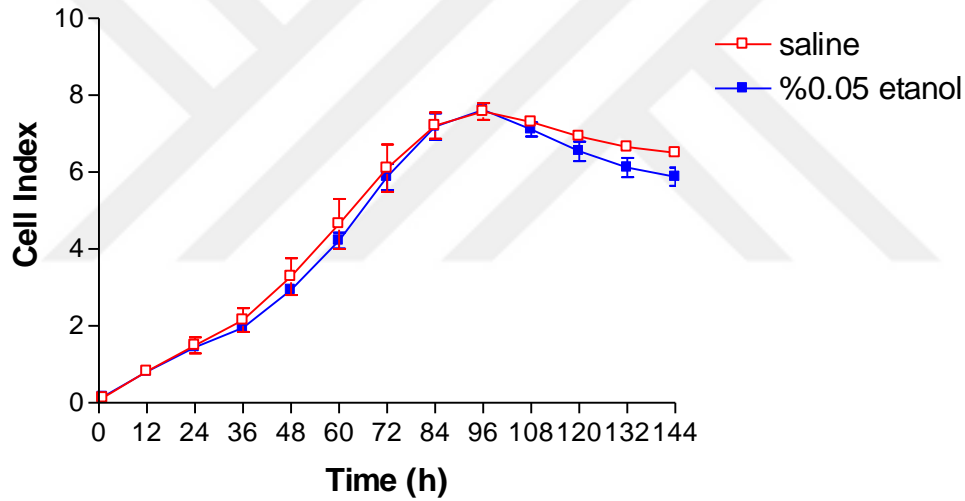
Çalışmada hem al fakalsidol hemde kalsitriolün proliferasyon, migrasyon ve invazyon analizlerinde Endometriyum Adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde meydana gelen değişimler, xCELLingence sisteminde elektronik empadans oluşturularak hücre indeksi olarak elde edildi.  $CI > 0.2$  olması pozitif olarak kabul edildi [91]. HEC1A hücrelerinde Al fakalsidol ve kalsitriolün proliferasyon, migrasyon ve invazyon analizlerinde elde edilen veriler kontrol grubunun oluşturduğu standart eğriyi baz alarak diğer grupların bu eğri ile olan ilişkisi karşılaştırılarak yapıldı. Veriler ortalama  $\pm$  standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel değerlendirilme için ANOVA ve t testi kullanıldı.  $P < 0.05$  olan değerler anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Endometriyum Adenokarsinoma HEC1A Hücrelerinde D Vitamininin Proliferasyon Üzerine Etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Analizi

#### 4.1.1. Endometriyum Adenokarsinoma HEC1A Hücrelerinde Etanolün Proliferasyon Üzerine Etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Analizi

Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde D vitamininin çözücüsü etanol ile kontrol grubu arasındaki ilişki araştırıldı (şekil 4.1.1.). Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde etanol (n=6) ve kontrol (n=6) grubu arasında proliferasyon açısından üzerine anlamlı bir fark bulunamadı ( $p>0.05$ ).

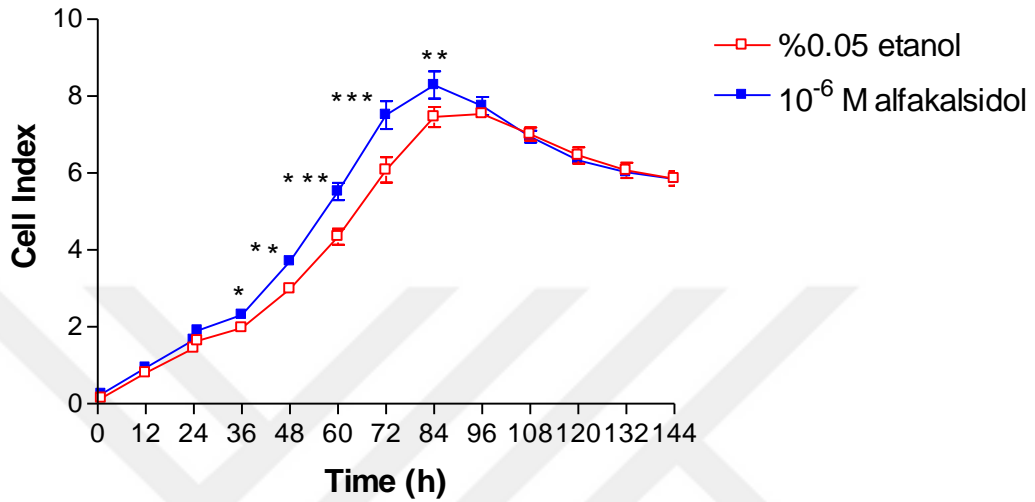


Şekil 4.1.1.: Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde etanol ve kontrol grubunun proliferasyon üzerine etkisi (n=6) ( $p>0.05$ ).

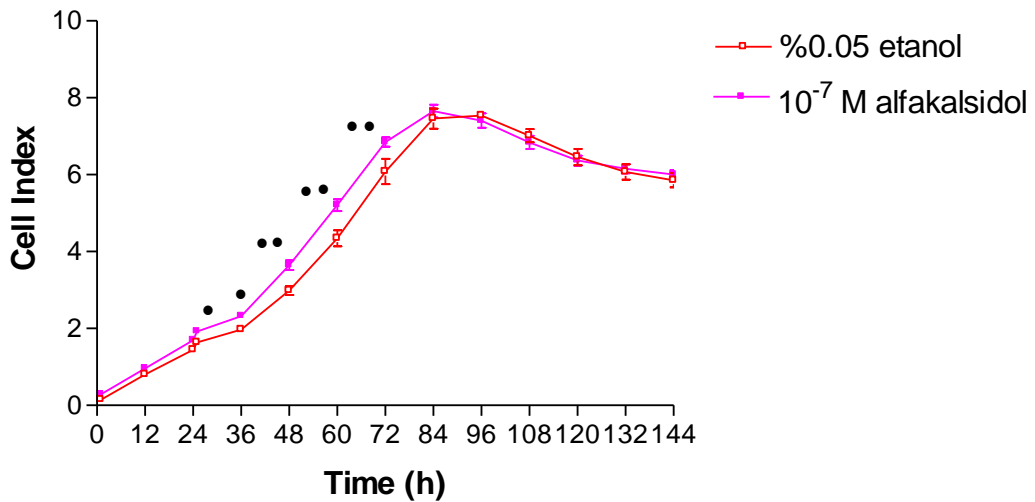
#### 4.1.2. Endometriyum Adenokarsinoma HEC1A Hücrelerinde Al fakalsidol ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$ M) ve Kalsitriolün ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$ M) Proliferasyon Üzerine Etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Analizi

Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde al fakalsidolün ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$  M) ile kalsitriol ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$  M) proliferasyon üzerine etkisi araştırıldı. Al fakasidol ( $10^{-6}$  M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde proliferasyonu ilk saatten 96'ncı saate kadar artırmış, bu artışın 36 ile 88'inci saat arası istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (şekil 4.1.2.A.). Al fakasidol ( $10^{-7}$  M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde proliferasyonu ilk saatten 84'üncü saate kadar artırmış, bu artışın 24 ile 80'inci saat arası

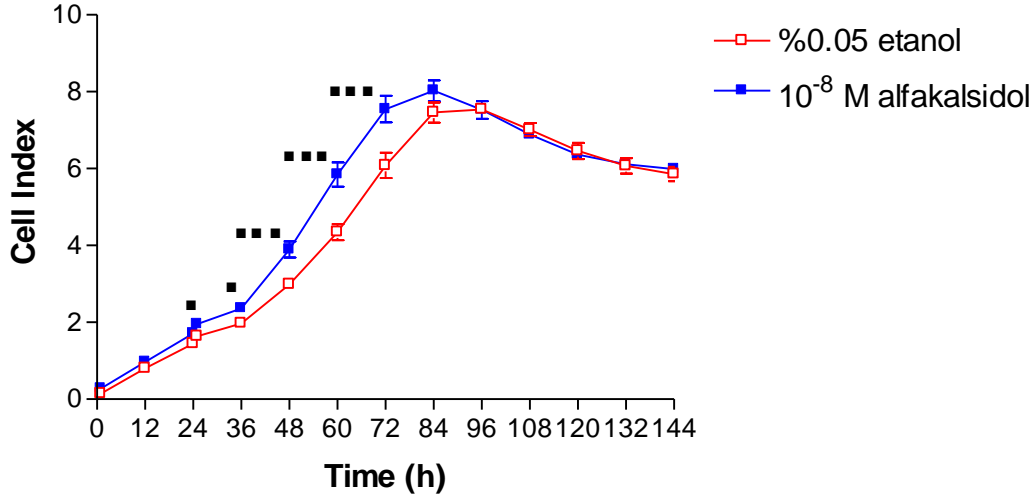
istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (şekil 4.1.2.B.). Alfakasidol ( $10^{-8}$  M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde proliferasyonu ilk saatten 96'ncı saate kadar artırmış, bu artışın 24 ile 84'üncü saat arası istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (şekil 4.1.2.C.). Alfakaldisolün ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$  M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde proliferasyon üzerine etkisi toplu olarak şekil 4.1.2.D.'de gösterilmiştir.



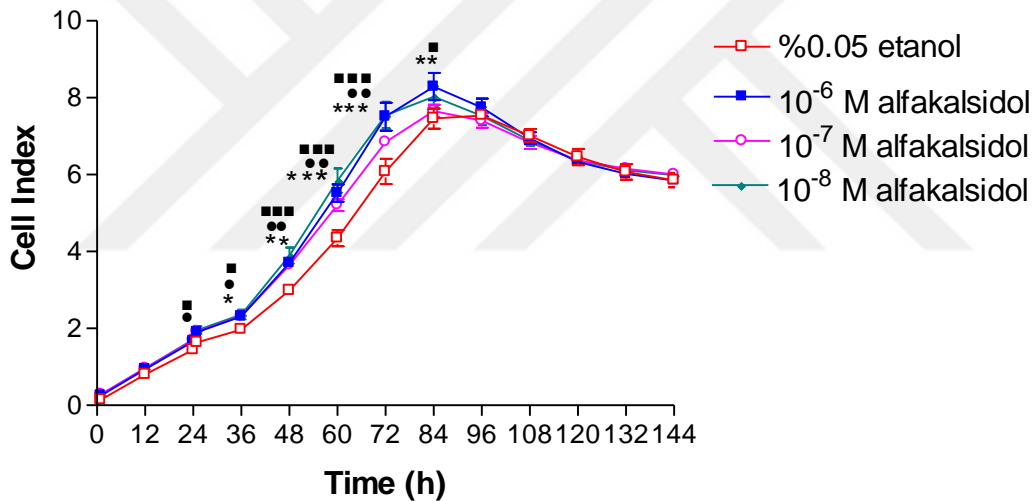
Şekil 4.1.2.A.: Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde  $10^{-6}$  M alfakalsidolün proliferasyon üzerine etkisi (n=5) (\*: p<0.05, \*\*: P<0.01, \*\*\*:P<0.001).



Şekil 4.1.2.B.: Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde  $10^{-7}$  M alfakalsidolün proliferasyon üzerine etkisi (n=5) (●: p<0.05, ●●: P<0.01).



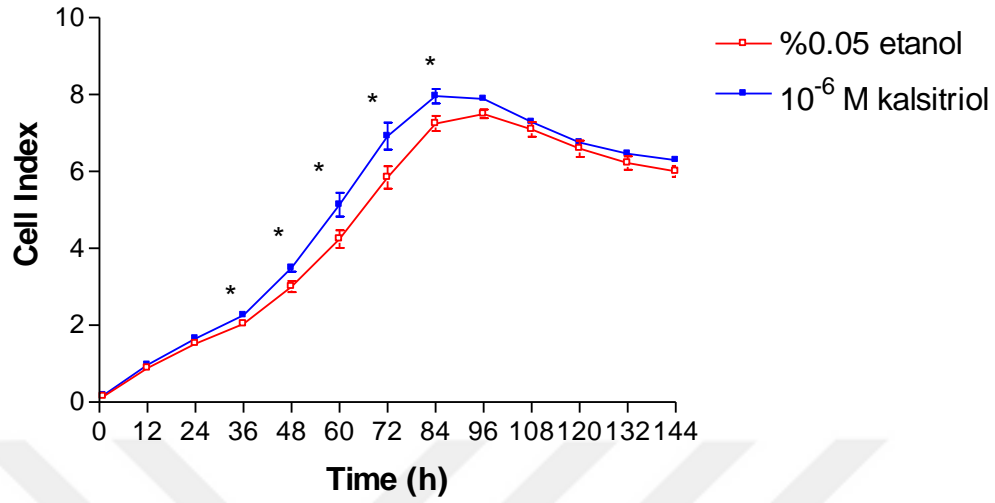
Şekil 4.1.2.C.: Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde 10<sup>-8</sup> M alfakalsidolün proliferasyon üzerine etkisi (n=5) (■: P<0.05, ■■: P<0.01, ■■■: P<0.001).



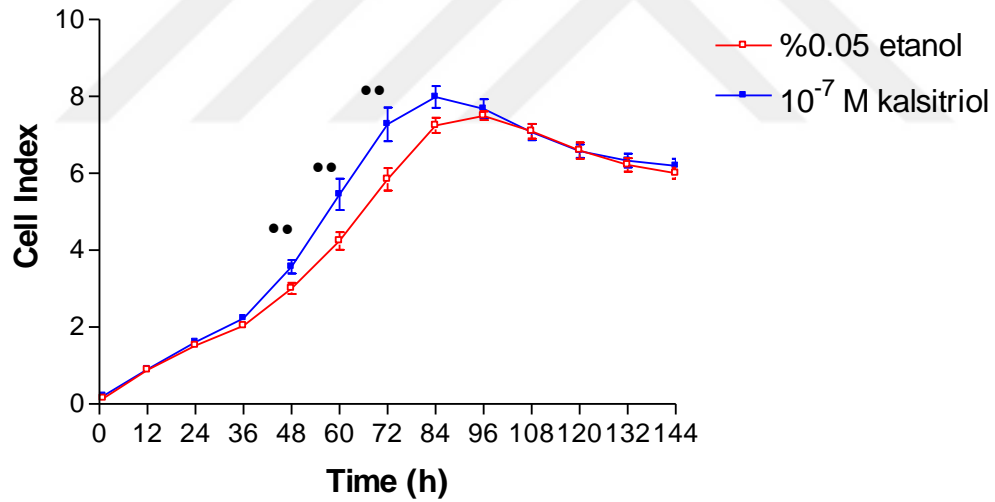
Şekil 4.1.2.D.: Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde alfakalsidolün (10<sup>-6</sup>-10<sup>-8</sup> M) proliferasyon üzerine etkisi (n=5) (\*;etanol ile 10<sup>-6</sup> M alfakalsidolün karşılaştırılması, ●;etanol ile 10<sup>-7</sup> M alfakalsidolün karşılaştırılması, ■: etanol ile 10<sup>-8</sup> M alfakalsidolün karşılaştırılması).

Kalsitriol (10<sup>-6</sup> M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde proliferasyonu 12'nci saatten 96'nci saate kadar artırmış, bu artışın 36 ile 84'üncü saat arası istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (şekil 4.1.2.E.). Kalsitriol (10<sup>-7</sup> M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde proliferasyonu 24'üncü saatten 96'nci saate kadar artırmış, bu artışın 48 ile 72'nci saat arası istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (şekil 4.1.2.F.). Kalsitriol (10<sup>-8</sup> M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde proliferasyonu 12'nci saatten 96'nci saate kadar artırmış, bu artışın 72 ile 96'nci saat arası istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (şekil

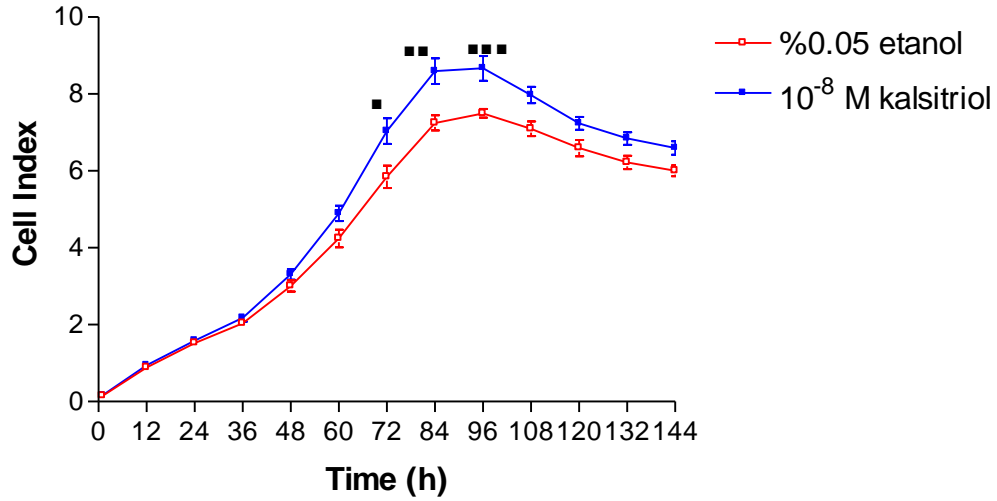
4.1.2.G.). Kalsitriolün ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$  M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde proliferasyon üzerine etkisi toplu olarak şekil 4.1.2.H.'de gösterilmiştir.



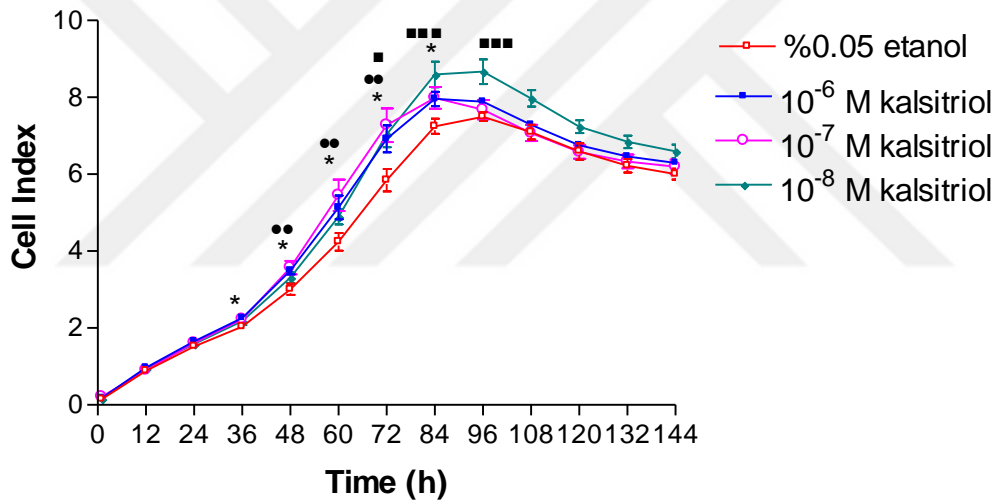
Şekil 4.1.2.E.: Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde  $10^{-6}$  M kalsitriolün proliferasyon üzerine etkisi (n=4) (\*: p<0.05).



Şekil 4.1.2.F.: Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde  $10^{-7}$  M kalsitriolün proliferasyon üzerine etkisi (n=4) (●●: P<0.01).



Şekil 4.1.2.G.: Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde  $10^{-8}$  M kalsitriolün proliferasyon üzerine etkisi (n=4) (■:  $P < 0.05$ , ■■■:  $P < 0.001$ ).

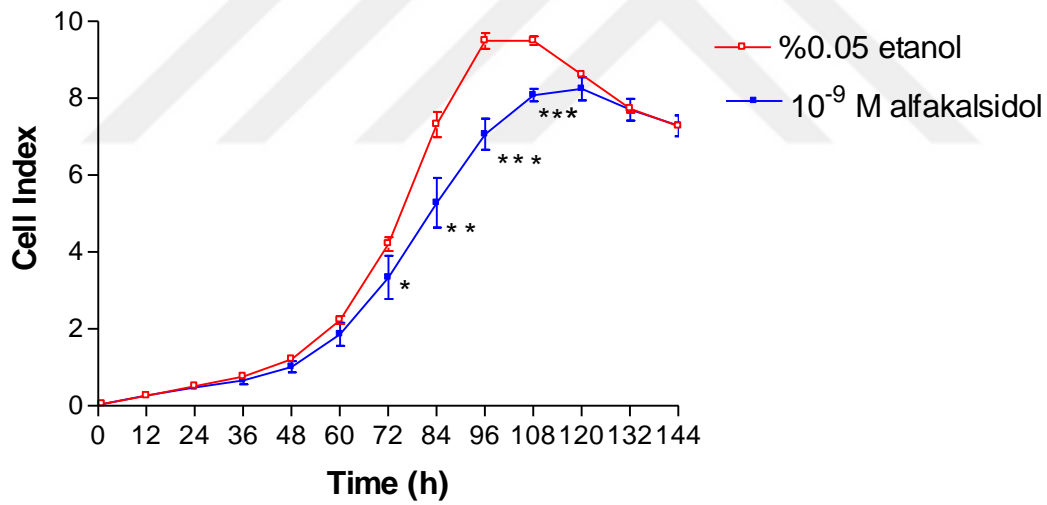


Şekil 4.1.2.H.: Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde kalsitriolün ( $10^{-6}$ -  $10^{-8}$  M) proliferasyon üzerine etkisi (n=5) (\*;etanol ile  $10^{-6}$  M kalsitriolün karşılaştırılması, •;etanol ile  $10^{-7}$  M kalsitriolün karşılaştırılması, ■: etanol ile  $10^{-8}$  M kalsitriolün karşılaştırılması).

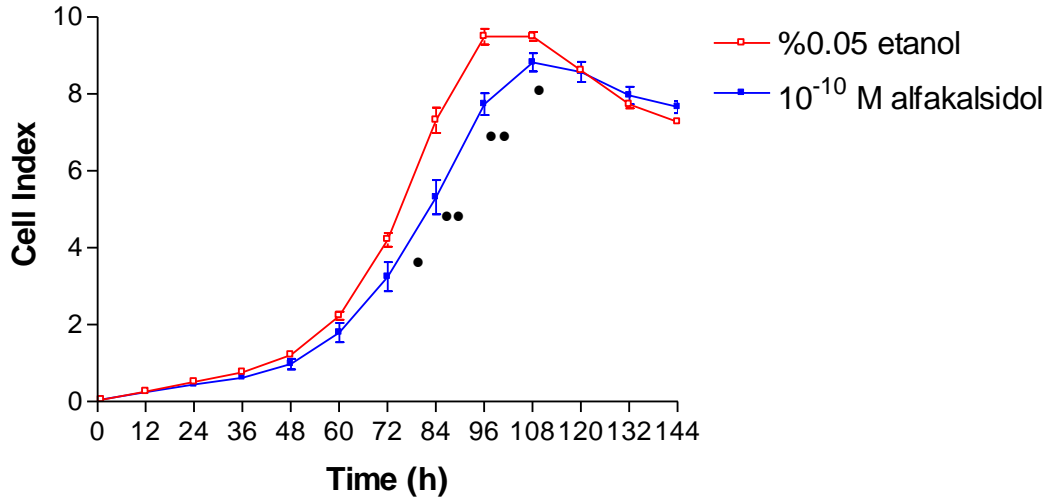


#### 4.1.3. Endometriyum Adenokarsinoma HEC1A Hücrelerinde Alfakalsidol ( $10^{-9}$ - $10^{-11}$ M) ve Kalsitriolün ( $10^{-9}$ - $10^{-11}$ M) Proliferasyon Üzerine Etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Analizi

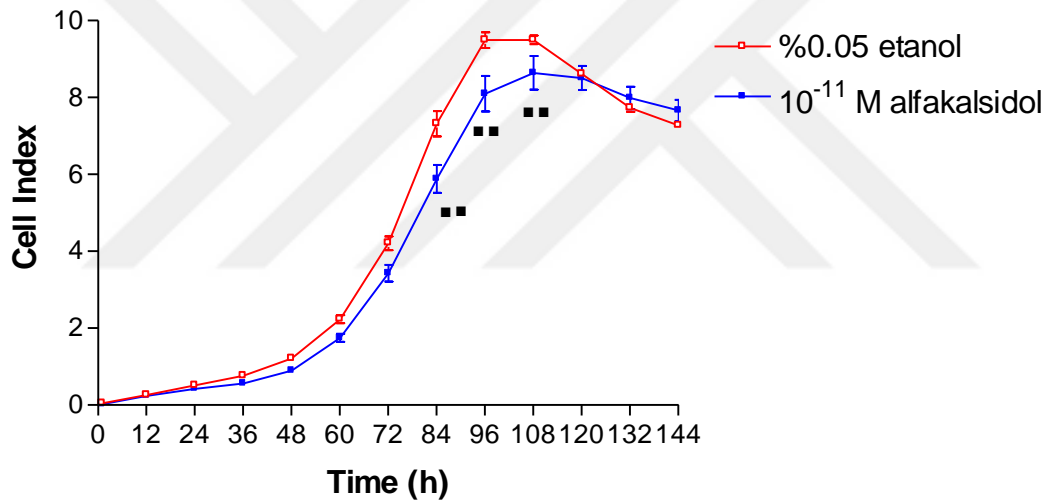
Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde alfakalsidolün ( $10^{-9}$ - $10^{-11}$  M) ile kalsitriol ( $10^{-9}$ - $10^{-11}$  M) proliferasyon üzerine etkisi araştırıldı. Alfakalsidol ( $10^{-9}$  M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde proliferasyonu 36'ncı saatten 120'nci saate kadar azaltmış, bu azalmanın 78 ile 115'inci saat arası istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (şekil 4.1.3.A.). Alfakalsidol ( $10^{-10}$  M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde proliferasyonu 24'üncü saatten 120'nci saate kadar azaltmış, bu azalmanın 76 ile 108'inci saat arası istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (şekil 4.1.3.B.). Alfakalsidol ( $10^{-11}$  M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde proliferasyonu 24'üncü saatten 120'nci saate kadar azaltmış, bu azalmanın 83 ile 110'uncu saat arası istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (şekil 4.1.3.C.). Alfakalsidolün ( $10^{-9}$ - $10^{-11}$  M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde proliferasyon üzerine etkisi toplu olarak şekil 4.1.3.D.'de gösterilmiştir.



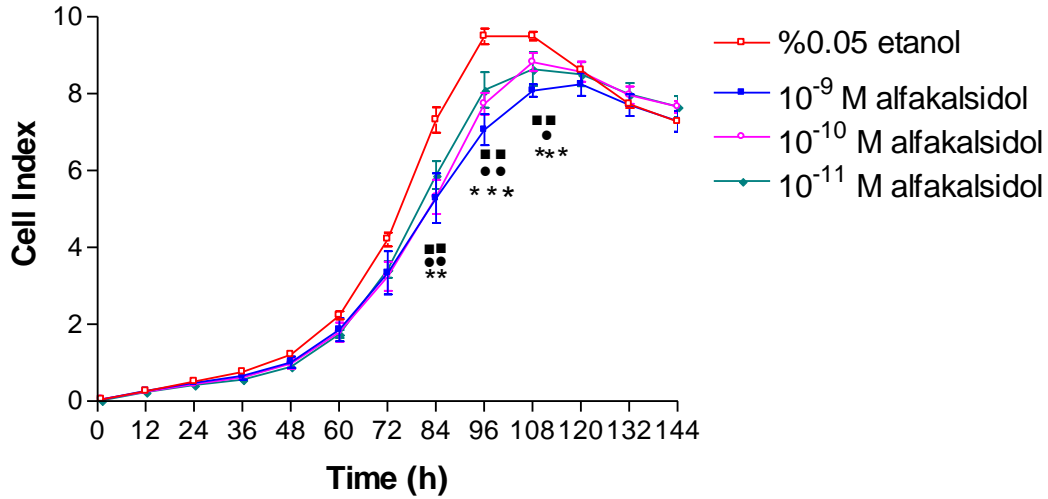
Şekil 4.1.3.A.: Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde  $10^{-9}$  M alfakalsidolün proliferasyon üzerine etkisi (n=4) (\*: p<0.05, \*\*: P<0.01, \*\*\*:P<0.001).



Şekil 4.1.3.B.: Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde 10<sup>-10</sup> M alfakalsidolün proliferasyon üzerine etkisi (n=4) (●: p<0.05, ●●: P<0.01).

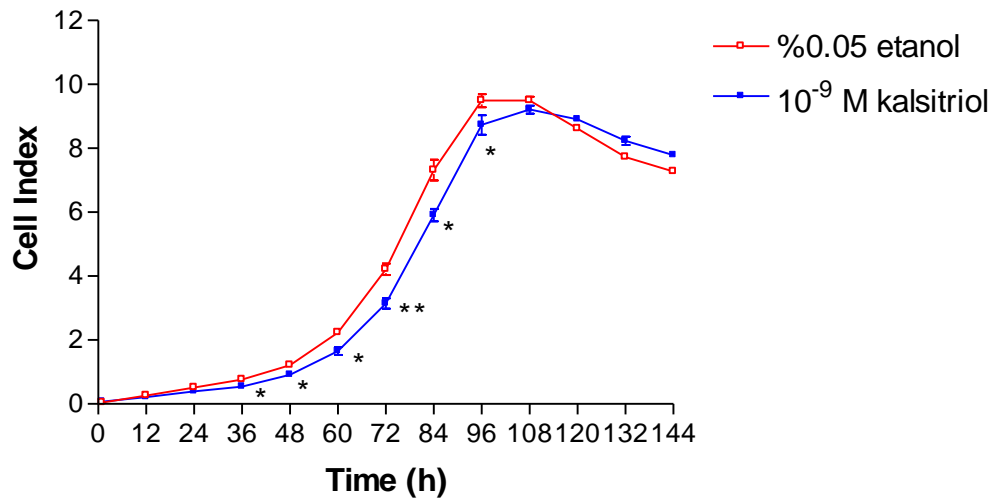


Şekil 4.1.3.C.: Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde 10<sup>-11</sup> M alfakalsidolün proliferasyon üzerine etkisi (n=4) (■: P<0.05, ■■: P<0.01, ■■■: P<0.001).

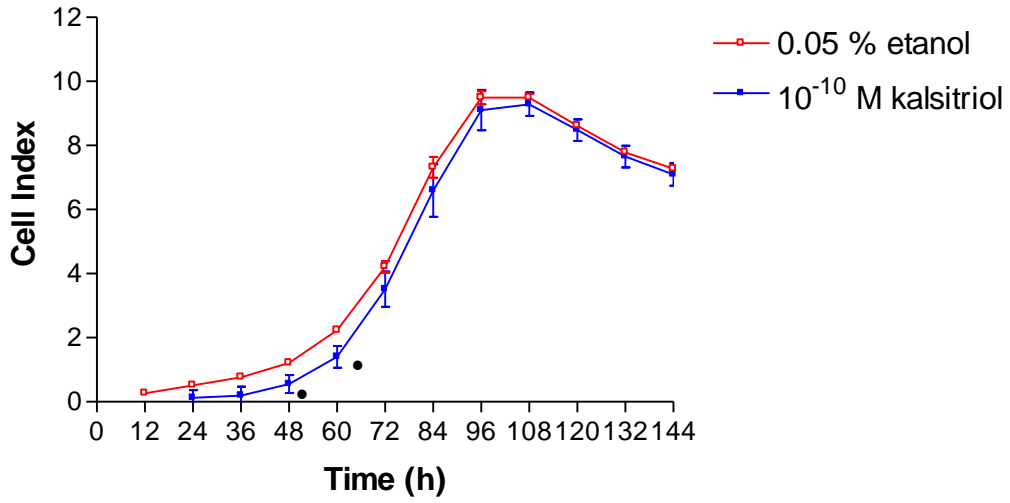


Şekil 4.1.3.D.:Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde alfakalsidolün ( $10^{-9}$ - $10^{-11}$  M) proliferasyon üzerine etkisi (n=4) (\*; etanol ile  $10^{-9}$  M alfakalsidolün karşılaştırılması, ●; etanol ile  $10^{-10}$  M alfakalsidolün karşılaştırılması, ■: etanol ile  $10^{-11}$  M alfakalsidolün karşılaştırılması).

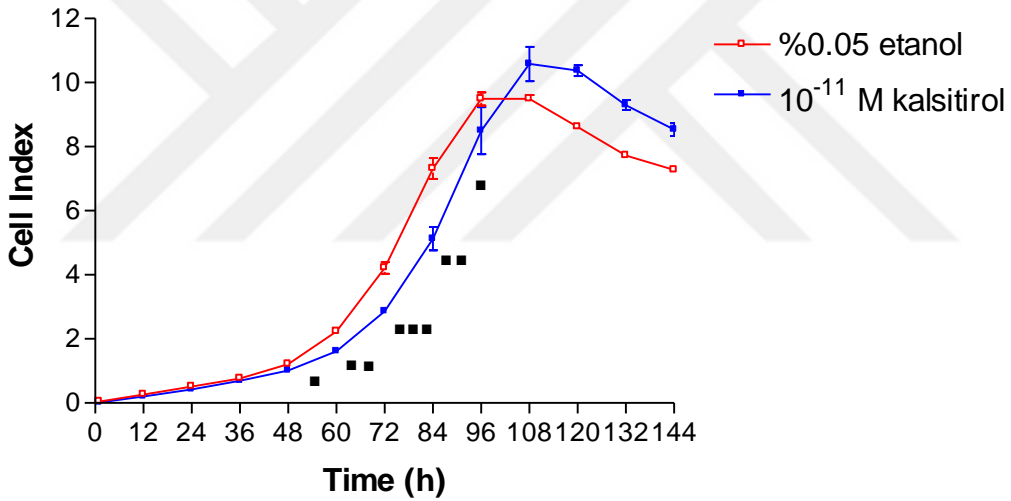
Kalsitriol ( $10^{-9}$  M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde proliferasyonu 24'üncü saatten 108'inci saate kadar azaltmış, bu azalmanın 36 ile 90'uncü saat arası istatikselsel olarak anlamlı bulunmuştur (şekil 4.1.3.E.) . Kalsitriol ( $10^{-10}$ M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde proliferasyonu 24'üncü saatten 108'inci saate kadar azaltmış, bu azalmanın 48 ile 60'uncü saat arası istatikselsel olarak anlamlı bulunmuştur (şekil 4.1.3.F.). Kalsitriol ( $10^{-11}$ M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde proliferasyonu 12'inci saatten 100'üncü saate kadar azaltmış, bu azalmanın 53 ile 90'uncü saat arası istatikselsel olarak anlamlı bulunmuştur (şekil 4.1.3.G.). Kalsitriolün ( $10^{-9}$ M- $10^{-11}$ M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde proliferasyon üzerine etkileri toplu olarak şekil 4.1.3.H.'de gösterilmiştir.



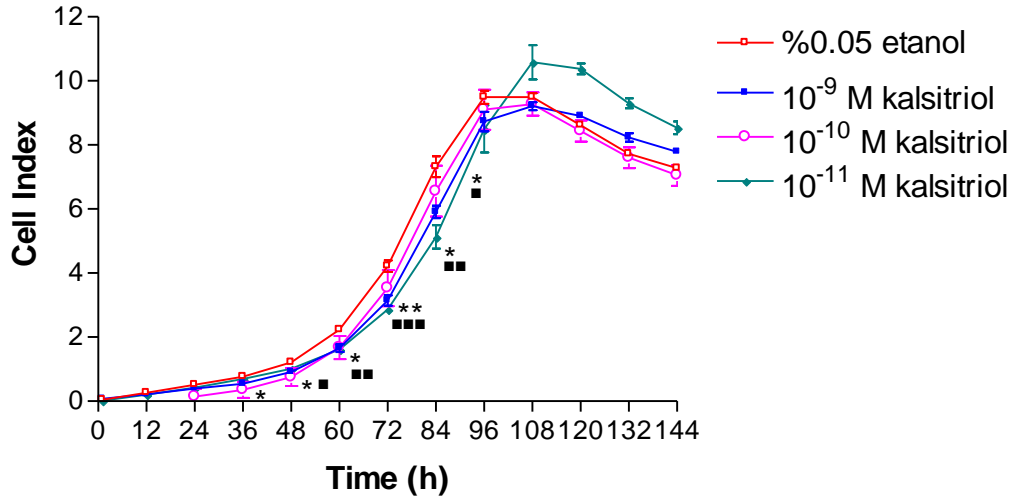
Şekil 4.1.3.E.: Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde  $10^{-9}$  M kalsitriolün proliferasyon üzerine etkisi (n=4) (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.001$ ).



Şekil 4.1.3.F.: Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde 10<sup>-10</sup> M kalsitriolün proliferasyon üzerine etkisi (n=4)(●: p<0.05).



Şekil 4.1.3.G.: Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde 10<sup>-11</sup> M kalsitriolün proliferasyon üzerine etkisi (n=4) (■: P<0.05, ■■: P<0.01, ■■■: P<0.001).

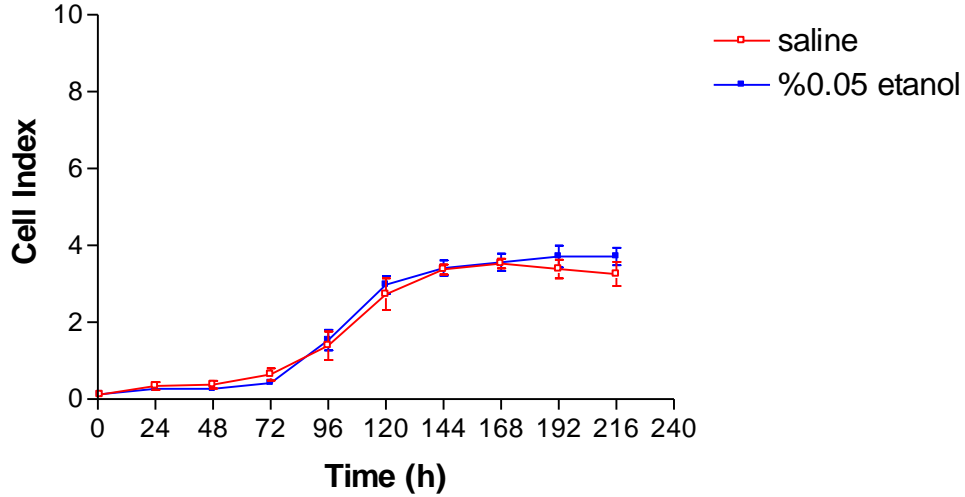


Şekil 4.1.3.H.: Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde kalsitriolün ( $10^{-9}$ - $10^{-11}$  M) proliferasyon üzerine etkisi (n=4) (\*;etanol ile  $10^{-9}$  M kalsitriolün karşılaştırılması, ●;etanol ile  $10^{-10}$  M kalsitriolün karşılaştırılması, ■: etanol ile  $10^{-11}$  M kalsitriolün karşılaştırılması).

## 4.2. Endometriyum Adenokarsinoma HEC1A Hücrelerinde D Vitamininin Migrasyon Üzerine Etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Analizi

### 4.2.1. Endometriyum Adenokarsinoma HEC1A Hücrelerinde Etanolün Migrasyon Üzerine Etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Analizi

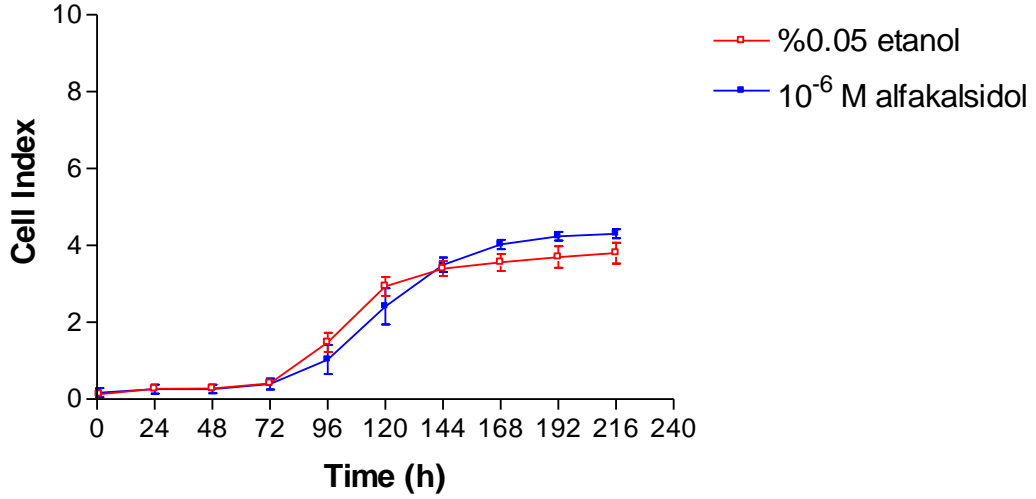
Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde D vitamininin çözücüsü etanol ile kontrol grubu arasındaki ilişki araştırıldı (şekil 4.2.1.). Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde etanol ve kontrol grubu arasında migrasyon açısından anlamlı bir fark bulunamadı (n=6) ( $p>0.05$ ).



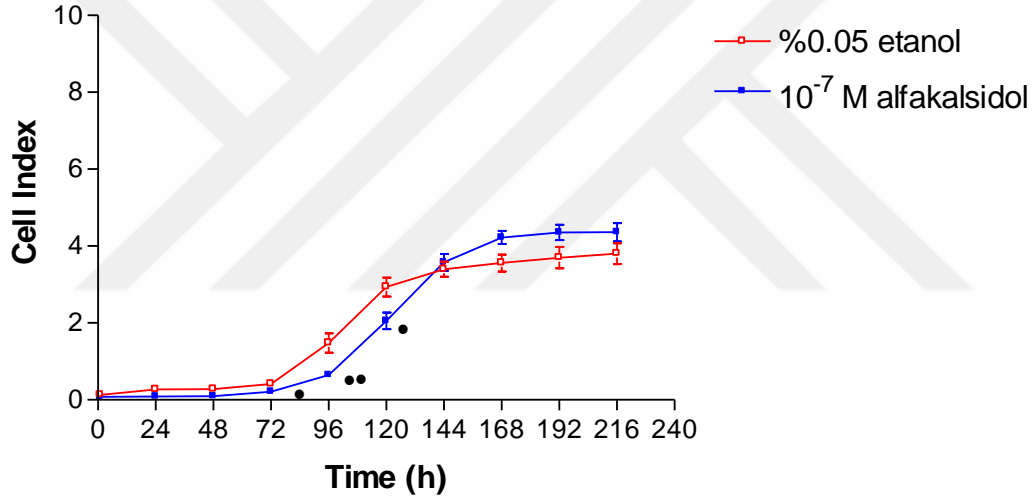
Şekil 4.2.1.: Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde etanol ve kontrol grubunun migrasyon üzerine etkisi (n=6) ( $p>0.05$ ).

#### 4.2.2. Endometriyum Adenokarsinoma HEC1A Hücrelerinde Alfakalsidol ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$ M) ve Kalsitriolün ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$ M) Migrasyon Üzerine Etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Analizi

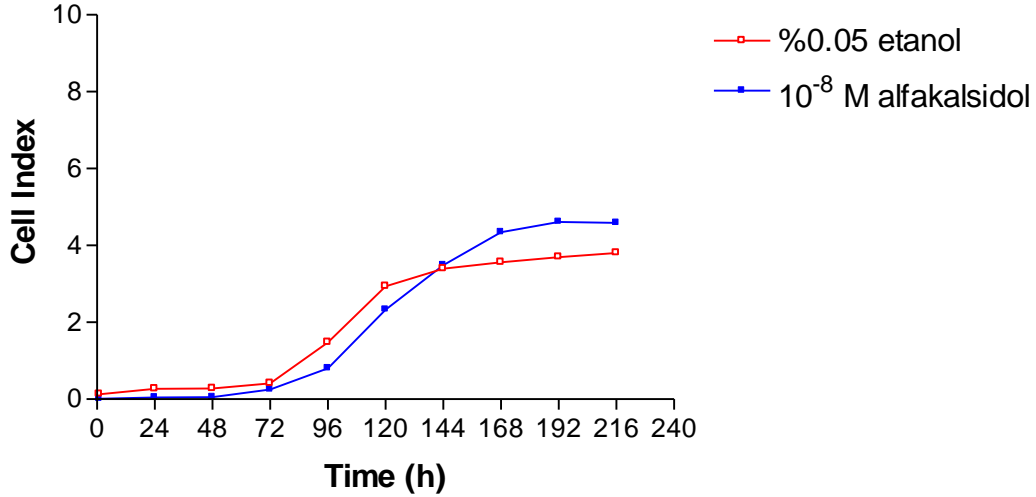
Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde alfakalsidolün ( $10^{-6}$ -  $10^{-8}$  M) ile kalsitriol ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$  M) migrasyon üzerine etkisi araştırıldı. Alfakalsidol ( $10^{-6}$  M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde migrasyonu 72'nci saatten 140'ıncı saate kadar bir azalma eğilimi gözlenmekle birlikte bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (şekil 4.2.2.A.). Alfakalsidol ( $10^{-7}$  M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde migrasyonu ilk saatten 140'ıncı saate kadar azaltmış, bu azalmanın 75 ile 121'inci saat arası istatistiksel olarak anlamlı tespit edilmiştir (şekil 4.2.2.B.). Alfakalsidol ( $10^{-8}$  M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde migrasyonu ilk saatten 140'ıncı saate kadar bir azalma gözlenmekle birlikte bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (şekil 4.2.2.C.). Alfakalsidolün ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$  M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde migrasyonu üzerine etkileri toplu olarak şekil 4.2.2.D.'de gösterilmiştir.



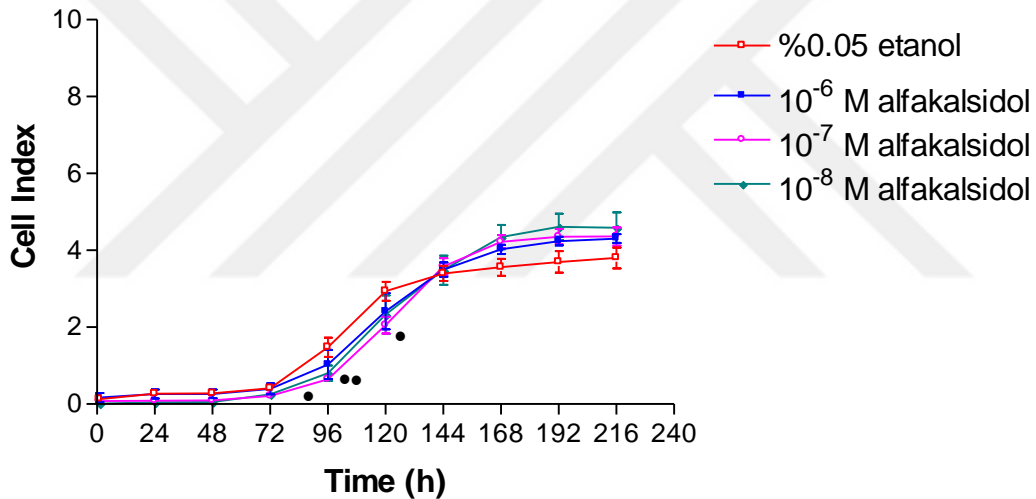
Şekil 4.2.2.A.: Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde 10<sup>-6</sup> M alfakalsidolün migrasyon üzerine etkisi (n=4) ( p>0.05).



Şekil 4.2.2.B.: Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde 10<sup>-7</sup> M alfakalsidolün migrasyon üzerine etkisi. (n=4) (●: p<0.05, ●●: P<0.01)



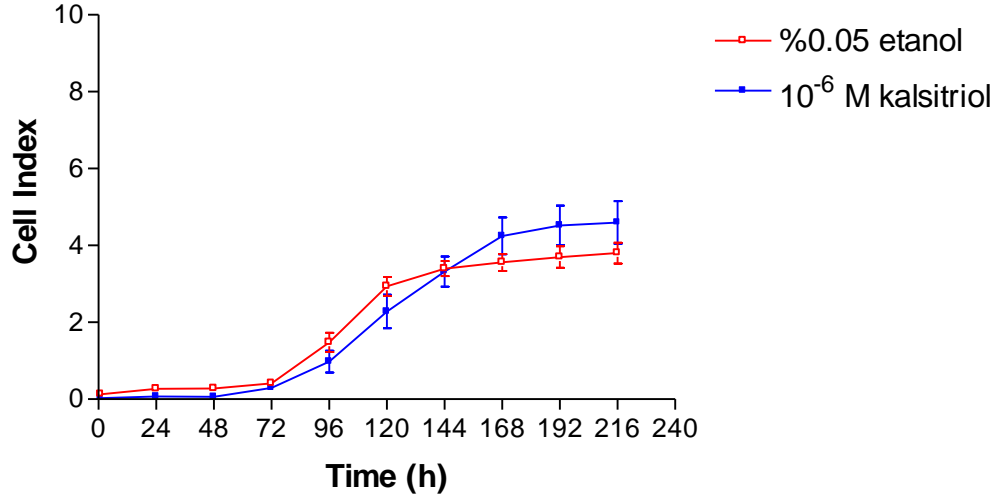
Şekil 4.2.2.C.: Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde  $10^{-8}$  M alfacalcidolün migrasyon üzerine etkisi. (n=4) ( $P>0.05$ )



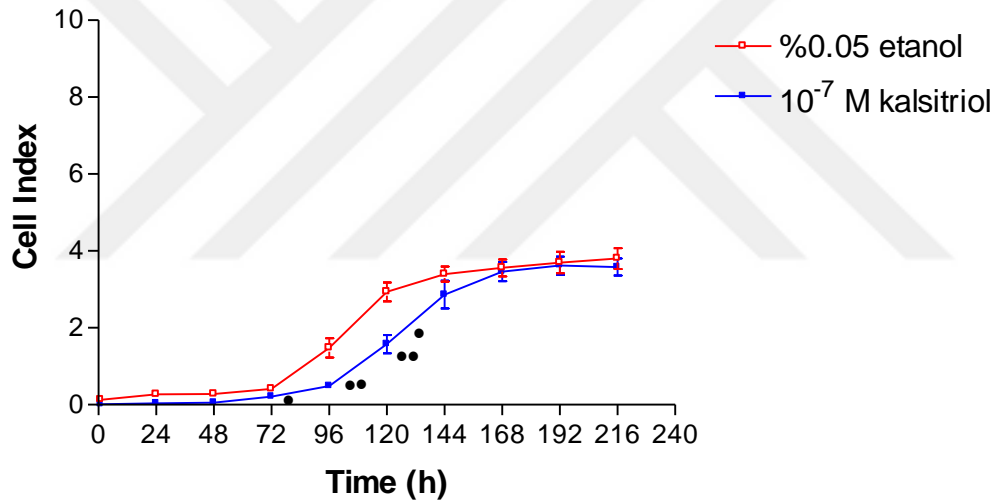
Şekil 4.2.2.D.: Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde alfacalcidolün ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$  M) migrasyon üzerine etkisi. (n=4) (●: etanol ile  $10^{-7}$  M alfacalcidolün karşılaştırılması)

Kalsitriol ( $10^{-6}$  M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde migrasyonu ilk saatten itibaren 144'üncü saate kadar azaltmış, fakat bu azalma istatikselsel olarak anlamlı bulunmamıştır (şekil 4.2.2.E.). Kalsitriol ( $10^{-7}$  M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde ilk saatten itibaren 168'inci saate kadar azaltmış, bu azalmanın 73 ile 132'nci saat arası istatikselsel olarak anlamlı olarak bulunmuştur (şekil 4.2.2.F.). Kalsitriol ( $10^{-8}$  M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde migrasyonu ilk saatten 168'inci saate kadar azaltmış, bu azalmanın 73 ile 105'inci saat arası istatikselsel olarak anlamlı bulunmuştur (şekil 4.2.2.G.). Kalsitriolün ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$  M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde migrasyonu azalttığı saatler toplu olarak grafikte şekil 4.2.2.H.'de gösterilmiştir.

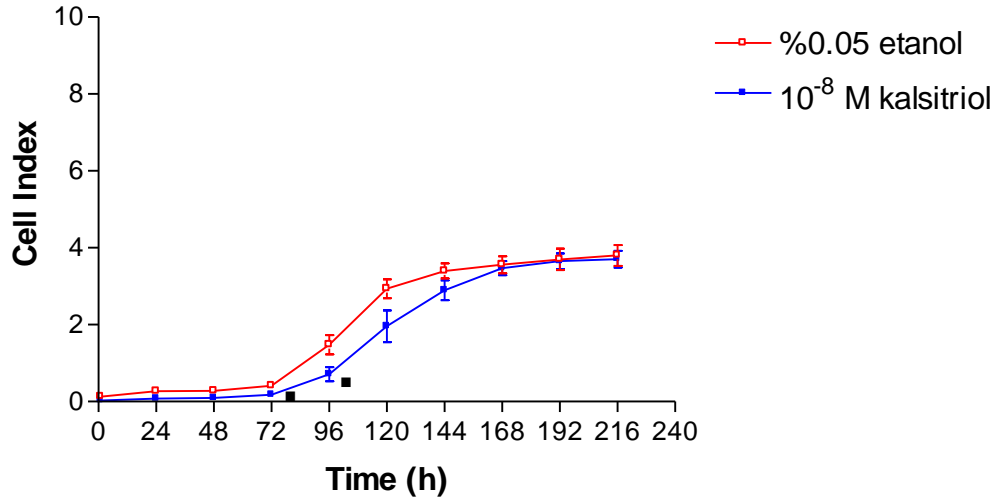




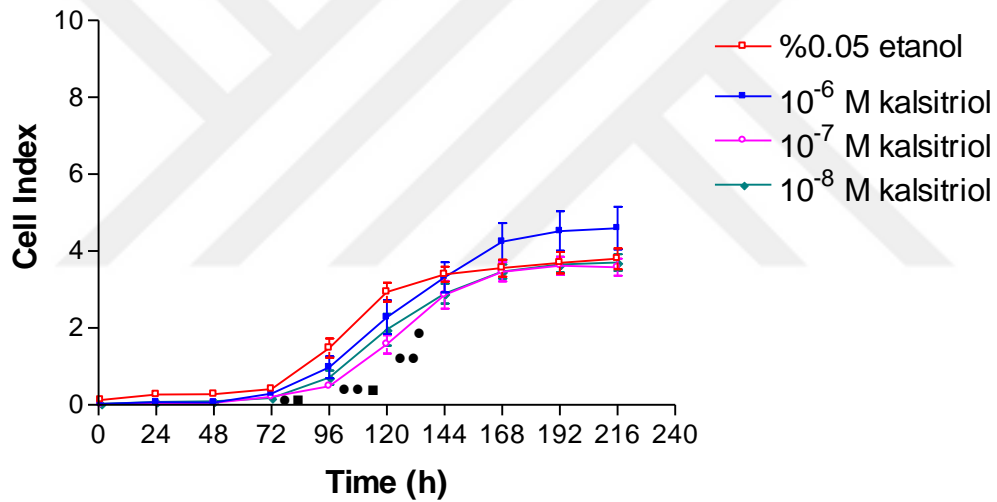
Şekil 4.2.2.E.: Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde 10<sup>-6</sup> M kalsitriolün migrasyon üzerine etkisi (n=4) (P>0.05).



Şekil 4.2.2.F.: Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde 10<sup>-7</sup> M kalsitriolün migrasyon üzerine etkisi (n=4) (●: P<0.05, ●●: P<0.01).



Şekil 4.2.2.G.: Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde  $10^{-8}$  M kalsitriolün migrasyon üzerine etkisi (n=4) (■: P<0.05).

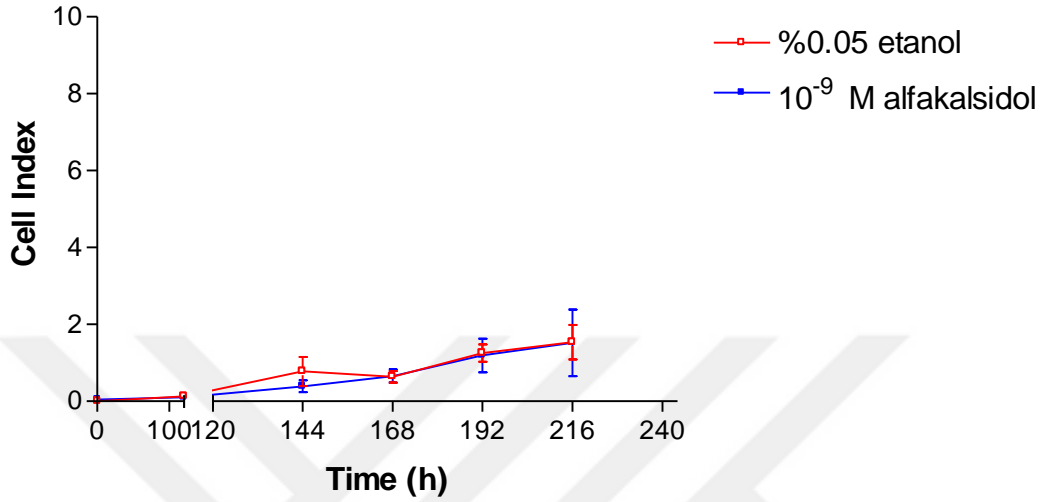


Şekil 4.2.2.H.: Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde kalsitriolün ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$  M) migrasyon üzerine etkisi (n=5) (●; etanol ile  $10^{-7}$  M kalsitriolün karşılaştırılması, ■: etanol ile  $10^{-8}$  M kalsitriolün karşılaştırılması).

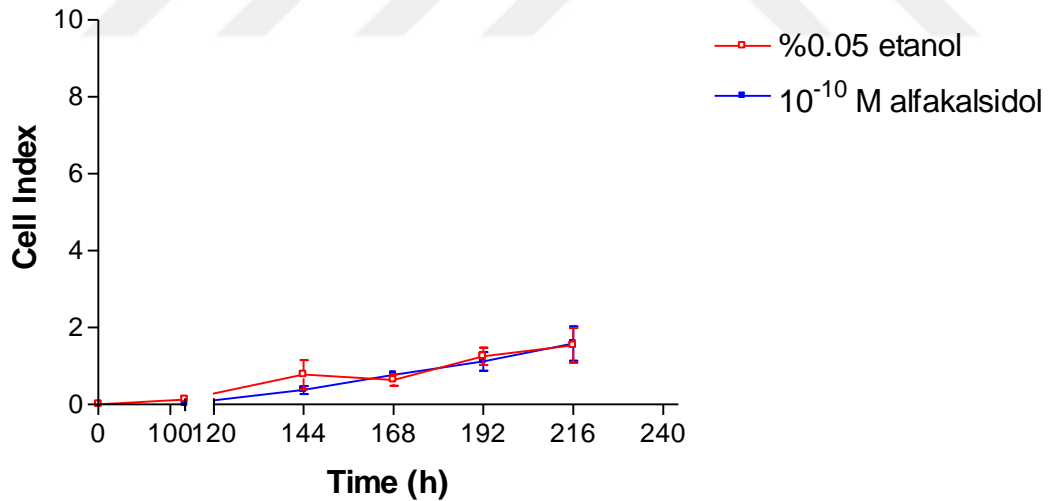
#### 4.2.3. Endometriyum Adenokarsinoma HEC1A Hücrelerinde Alfakalsidol ( $10^{-9}$ - $10^{-11}$ M) ve Kalsitriolün ( $10^{-9}$ - $10^{-11}$ M) Migrasyon Üzerine Etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Analizi

Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde alfakalsidolün ( $10^{-9}$ - $10^{-11}$  M) ile kalsitriol ( $10^{-9}$ - $10^{-11}$  M) migrasyon üzerine etkisi araştırıldı. Alfakalsidol ( $10^{-9}$  M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde migrasyonu 120'nci saatten 168'inci saate kadar azaltmış, fakat bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir (şekil 4.2.3.A.). Alfakalsidol ( $10^{-10}$  M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde migrasyonu 138'inci saatten 160'uncü saate kadar azaltmış, fakat bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir (şekil 4.2.3.B.).

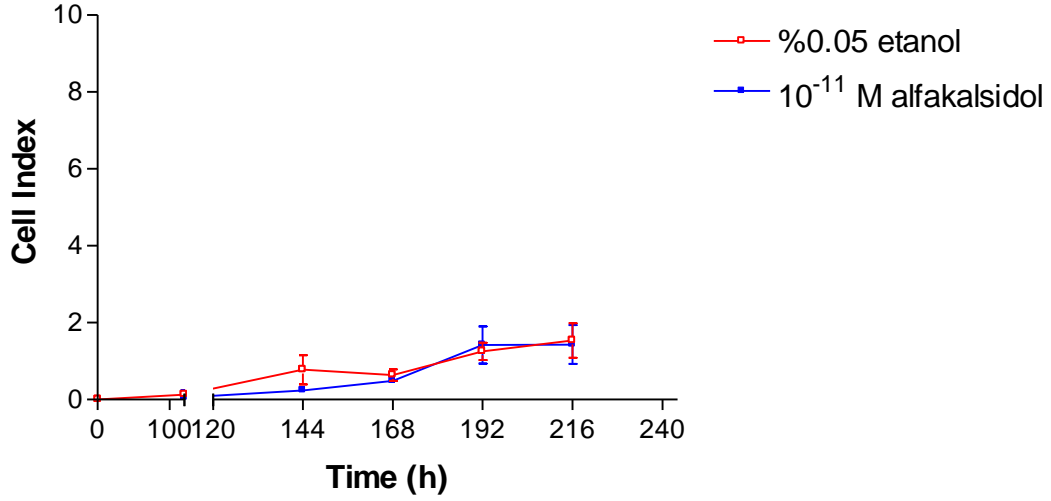
Alfakasidol ( $10^{-11}$  M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde migrasyonu 121'inci saatten 186'nci saate kadar azaltmış, fakat bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir (şekil 4.2.3.C.). Alfakalsidolün ( $10^{-9}$ - $10^{-11}$  M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde migrasyonu azalttığı toplu olarak grafikte gösterilmiştir (şekil 4.2.3.D.).



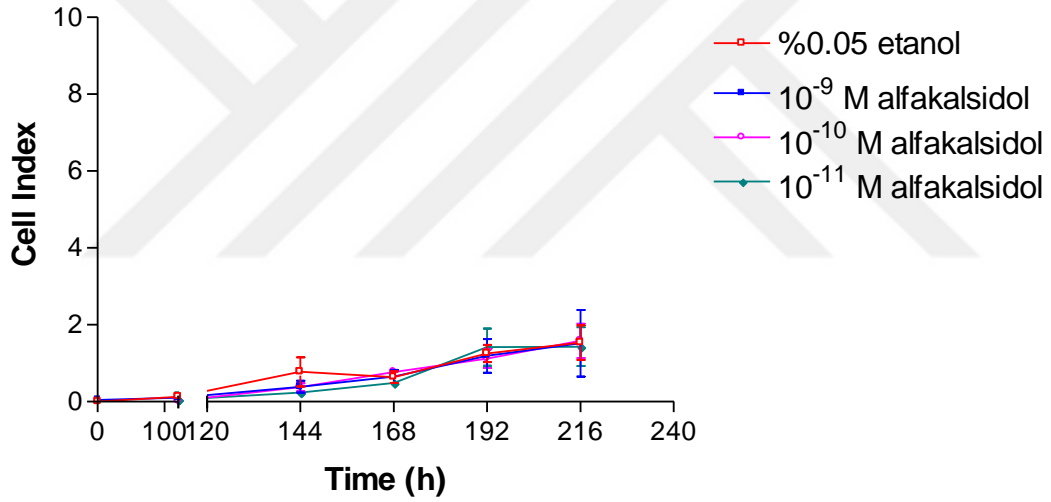
Şekil 4.2.3.A.: Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde  $10^{-9}$  M alfakalsidolün migrasyon üzerine etkisi (n=4) ( $P>0.05$ ).



Şekil 4.2.3.B.: Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde  $10^{-10}$  M alfakalsidolün migrasyon üzerine etkisi (n=4) ( $P>0.05$ ).

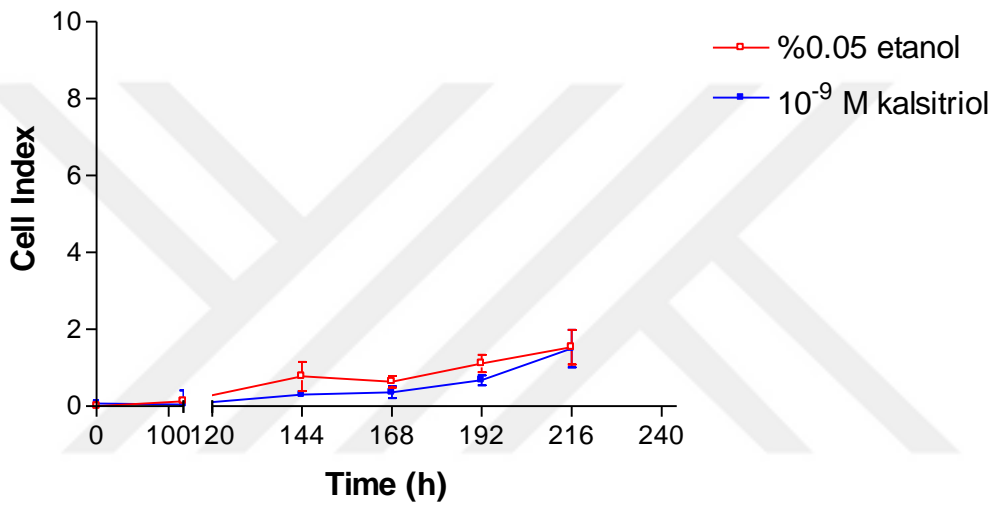


Şekil 4.2.3.C.: Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde  $10^{-11}$  M alfakalsidolün migrasyon üzerine etkisi (n=4) ( $P>0.05$ ).

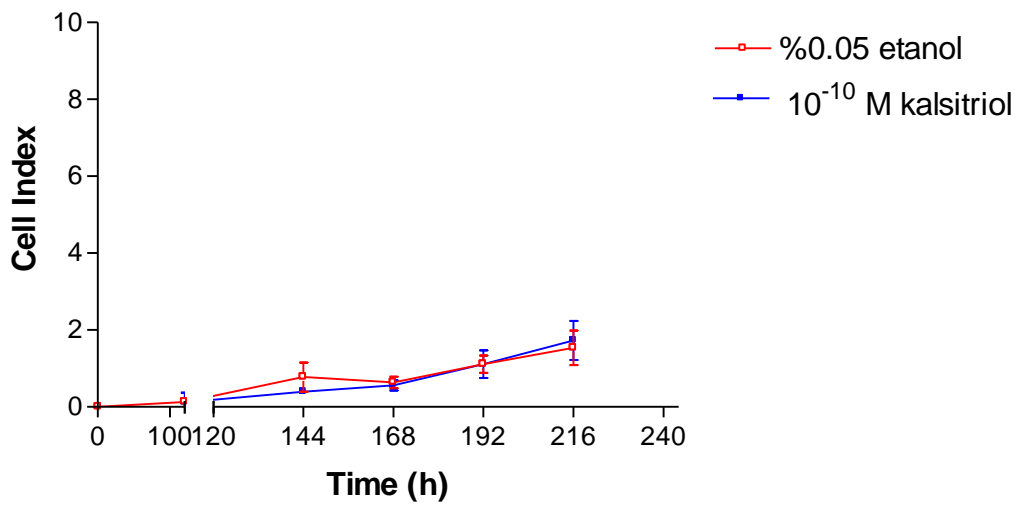


Şekil 4.2.3.D.: Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde alfakalsidolün ( $10^{-9}$ - $10^{-11}$  M) migrasyon üzerine etkisi (n=4) ( $P>0.05$ ).

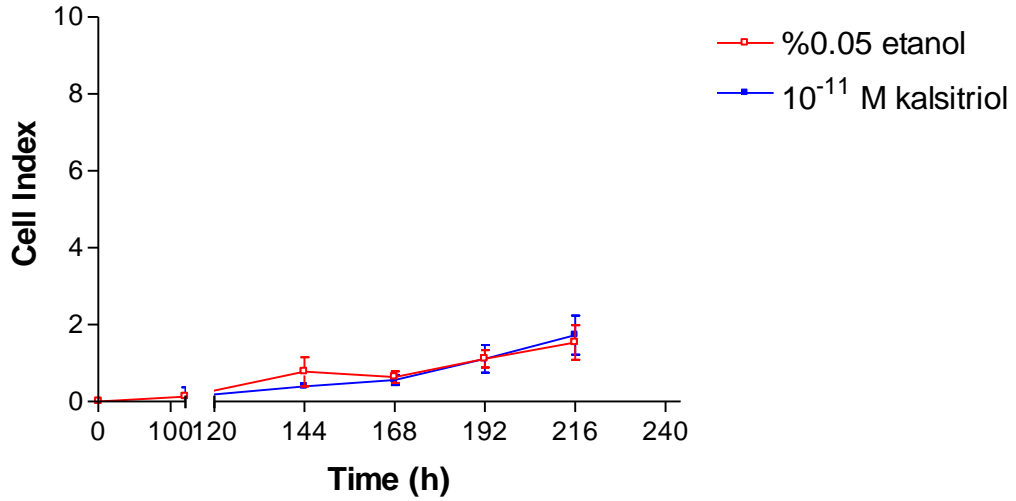
Kalsitriol ( $10^{-9}$  M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde migrasyonu 120'nci saatten 216'nci saate kadar azaltmış, fakat bu azalma istatikselsel olarak anlamlı değildir (şekil 4.2.3.E.). Kalsitriol ( $10^{-10}$  M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde migrasyonu 120'nci saatten 168'inci saate kadar azaltmış, fakat bu azalma istatikselsel olarak anlamlı değildir (şekil 4.2.3.F.). Kalsitriol ( $10^{-11}$  M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde migrasyonu 120'nci saatten 168'inci saate kadar azaltmış, fakat bu azalma istatikselsel olarak anlamlı değildir (şekil 4.2.3.G.). Kalsitriolün ( $10^{-9}$ - $10^{-11}$  M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde migrasyon üzerine etkisi toplu olarak şekil 4.2.3.H.'de gösterilmiştir.



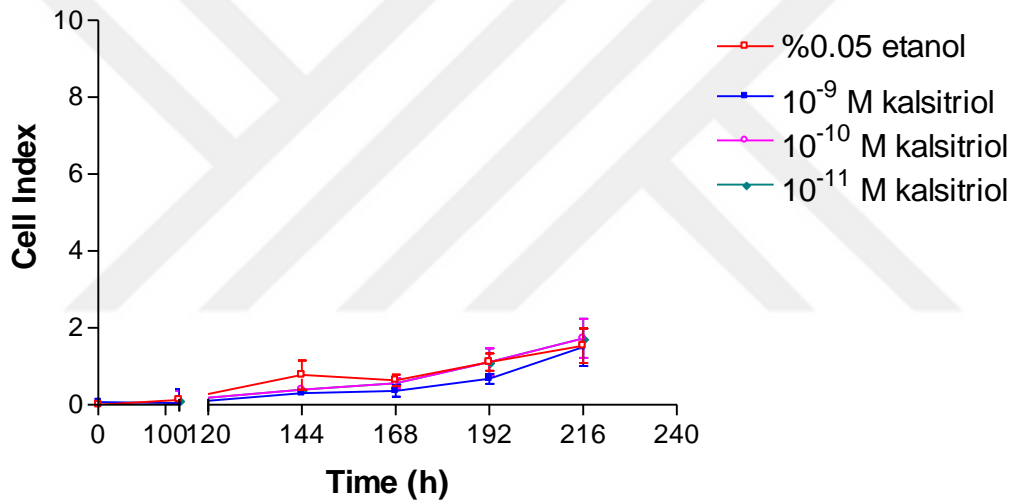
Şekil 4.2.3.E.: Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde  $10^{-9}$  M kalsitriolün migrasyon üzerine etkisi (n=4) ( $P>0.05$ ).



Şekil 4.2.3.F.: Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde  $10^{-10}$  M kalsitriolün migrasyon üzerine etkisi (n=4) ( $P>0.05$ ).



Şekil 4.2.3.G.: Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde  $10^{-11}$  M kalsitriolün migrasyon üzerine etkisi (n=4) ( $P>0.05$ ).

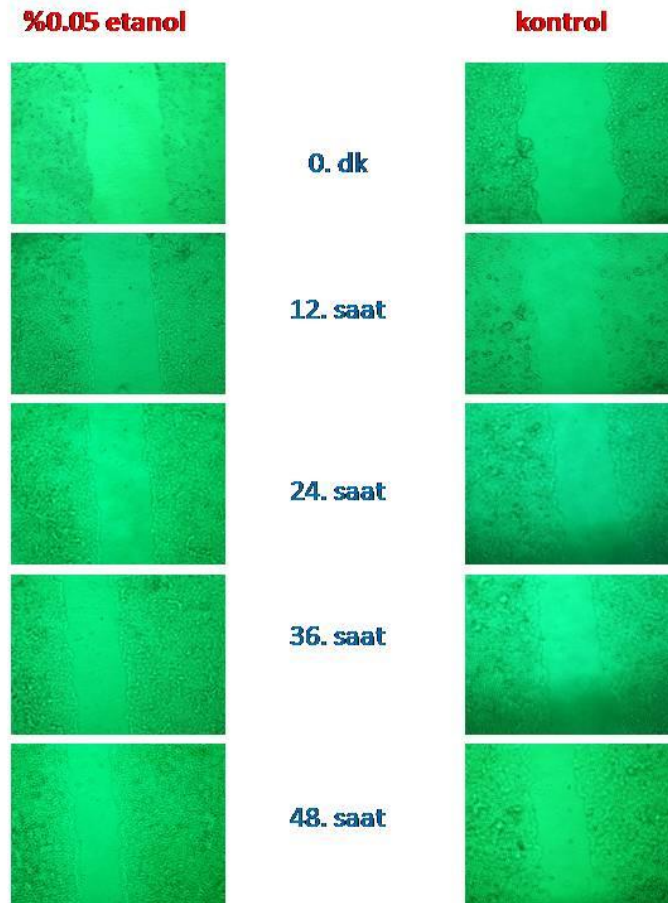


Şekil 4.2.3.H.: Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde kalsitriolün ( $10^{-9}$ - $10^{-11}$  M) migrasyon üzerine etkisi (n=4) ( $P>0.05$ ).

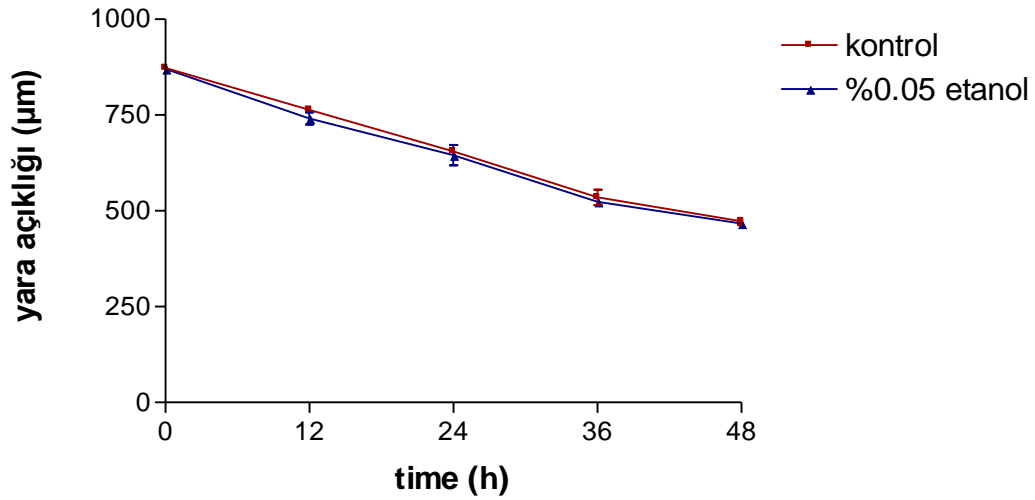
### 4.3. Endometriyum Adenokarsinoma HEC1A Hücrelerinde D vitamininin Migrasyon Üzerine Etkisinin Yara İyileşme Modeli İle Gösterilmesi

#### 4.3.1. Endometriyum Adenokarsinoma HEC1A Hücrelerinde Etanolün Yara İyileşme Modeli Üzerine Etkisi

Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde D vitamininin çözücüsü etanol ile kontrol grubu, yara iyileşme modeli üzerinde araştırıldı. Etanol ve kontrol grubunda oluşturulan yaralar yaklaşık 48 saat sonra açılan yaranın yarısından fazlası kapanmıştır. Her iki grupta 0. saatten 48. saat arasındaki örnek yara açıklığı görüntüleri şekil 4.3.1.A.'da gösterilmiştir. Aynı zamanda bu gruplarda 0. saatten 48. saat arasındaki yara açıklığı mesafe ölçümleri şekil 4.3.1.B.'de gösterilmiştir. Etanol yara iyileşme hızını değiştirmemiştir (n=4) ( $P>0.05$ ).



Şekil 4.3.1.A.: Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde etanol ve kontrol grubunun 0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığı üzerine etkisi.



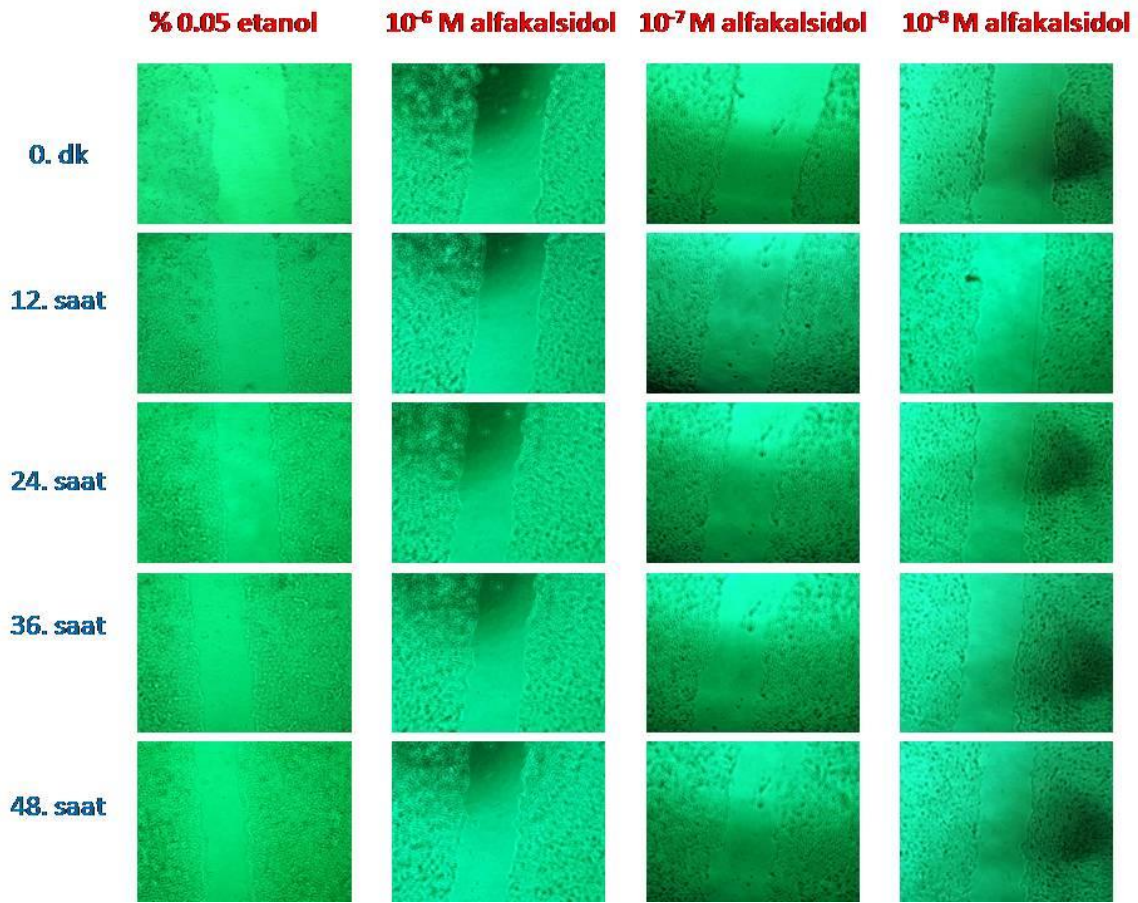
Şekil 4.3.1.B.: Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde etanol ve kontrol grubunun 0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığı üzerine etkisi. Etanol yara iyileşme hızını değiştirmemiştir (n=4) (P>0.05).

#### 4.3.2. Endometriyum Adenokarsinoma HEC1A Hücrelerinde Alfakalsidol ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$ M) ve Kalsitriolün ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$ M) Yara İyileşme Modeli Üzerine Etkisi

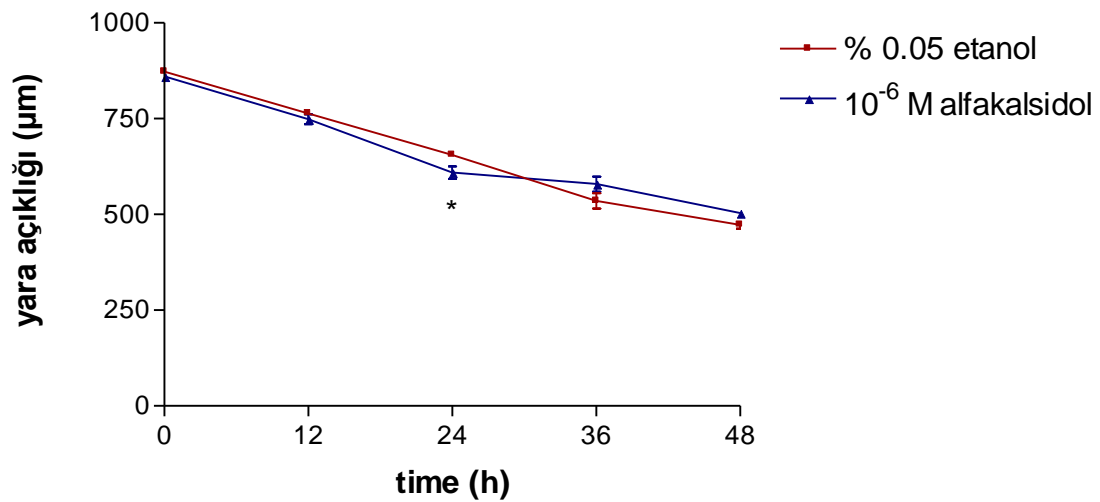
Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde alfakalsidolün ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$  M) yara iyileşme modeli ile migrasyon üzerine etkisi araştırıldı. Alfakalsidolün ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$  M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde 0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığı örnek görüntüleri şekil 4.3.2.A.'da gösterilmiştir. Alfakalsidol ( $10^{-6}$  M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde 0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığını 24. saatte istatistiksel olarak anlamlı olarak azaltmıştır (P<0.0351), aynı zamanda  $10^{-6}$  M alfakalsidol yara iyileşme açıklığını 36. saatten sonra artırmıştır fakat bu artma istatistiksel olarak anlamlı değildir (şekil4.3.2.B.). Alfakalsidol ( $10^{-7}$ M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde 0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığını 12. saatte azaltmıştır, bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (P<0.0041), aynı zamanda 24. saatte de yara iyileşme açıklığını azaltmıştır fakat bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (şekil4.3.2.C.). Yine  $10^{-7}$  M alfakalsidol yara iyileşme açıklığını 36. saatten sonra artırmıştır, bu artışın 48'inci saati istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (P<0.047) (şekil4.3.2.C.). Alfakalsidol ( $10^{-8}$  M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde 0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığını 12. saatte ve 24. saatte de azaltmıştır, bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (şekil4.3.2.D.). Aynı zamanda  $10^{-8}$  M alfakalsidol yara iyileşme açıklığını 36. saatten sonra artırmıştır, fakat bu artma istatistiksel olarak anlamlı değildir (şekil4.3.2.D.). Alfakalsidolün ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$  M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A



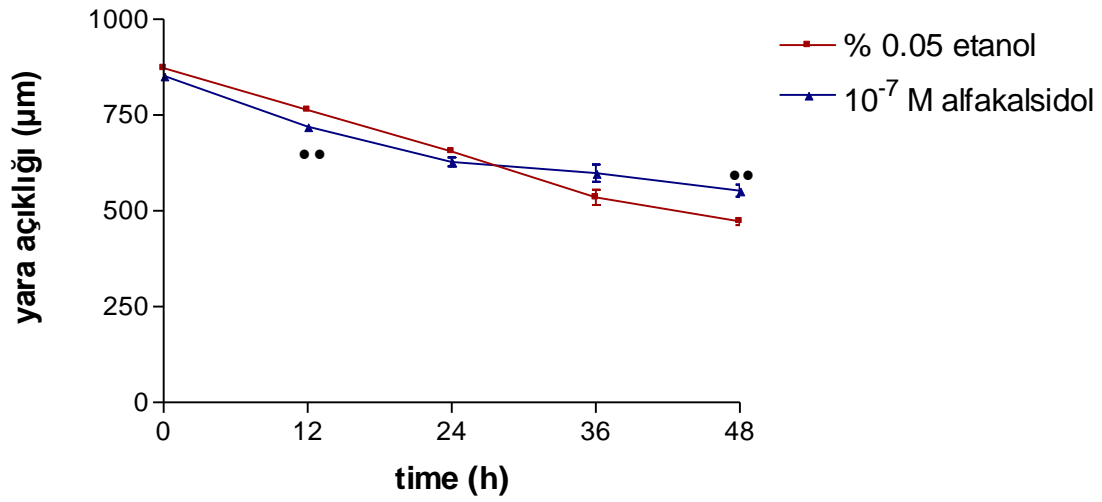
hücrelerinde 0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığı üzerindeki etkisi toplu olarak şekil 4.3.2.E.'de gösterilmiştir.



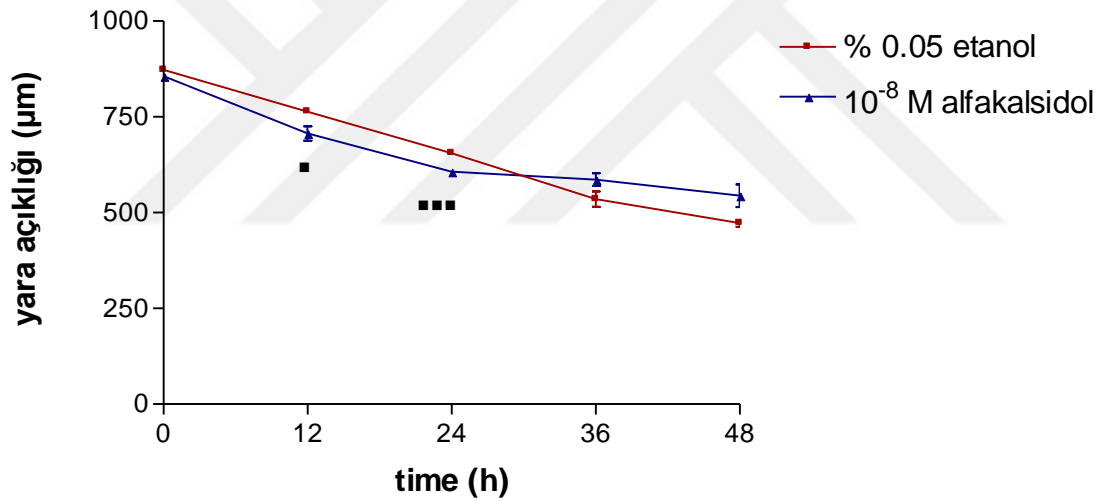
Şekil 4.3.2.A.: Alfakalsidolün ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$  M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde 0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığı örnek görüntüleri.



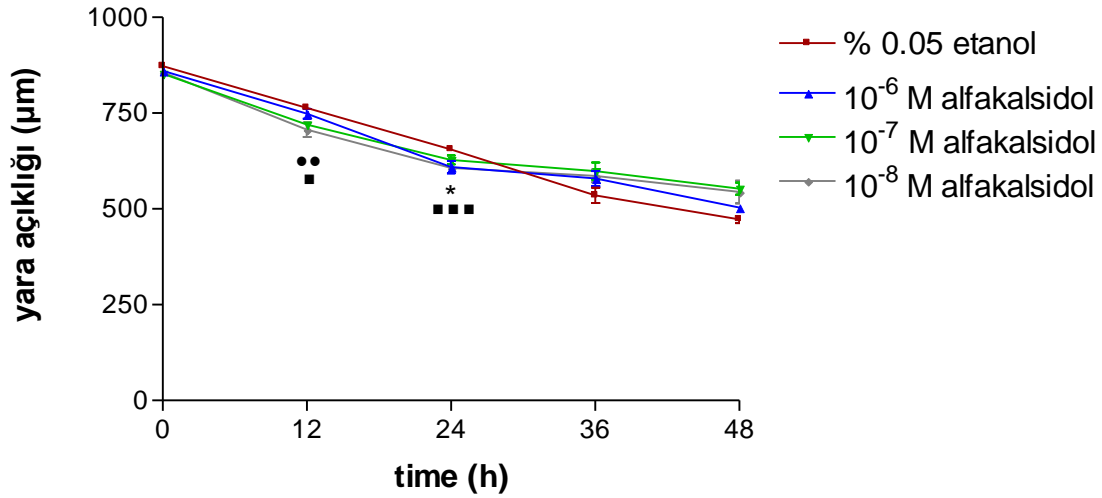
Şekil 4.3.2.B.: Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde  $10^{-6}$  M alfakalsidolün 0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığı üzerine etkisi (n=4) (\*: p<0.05).



Şekil 4.3.2.C.: Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde 10<sup>-7</sup> M alfakalsidolün 0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığı üzerine etkisi (n=4) (●●: P<0.01).

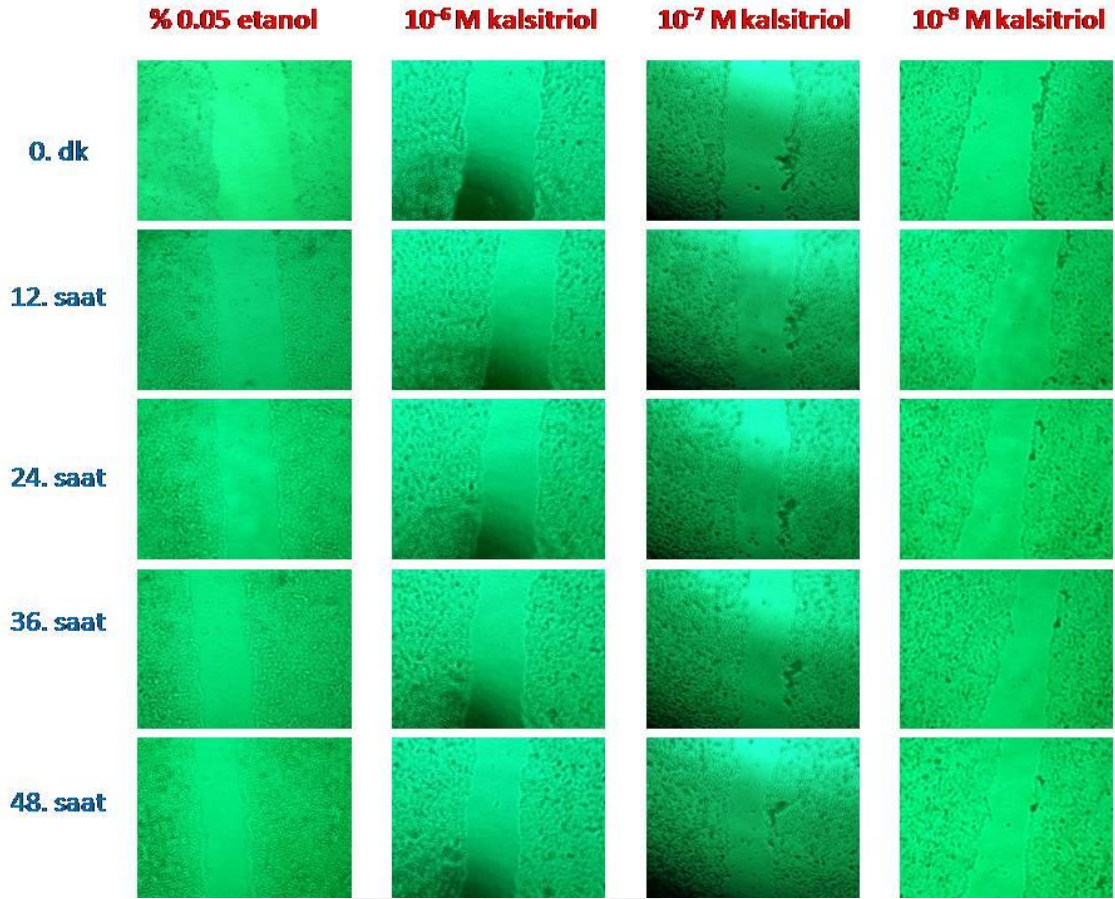


Şekil 4.3.2.D.: Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde 10<sup>-8</sup> M alfakalsidolün 0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığı üzerine etkisi (n=4) (■: P<0.05, ■■■: P<0.001).

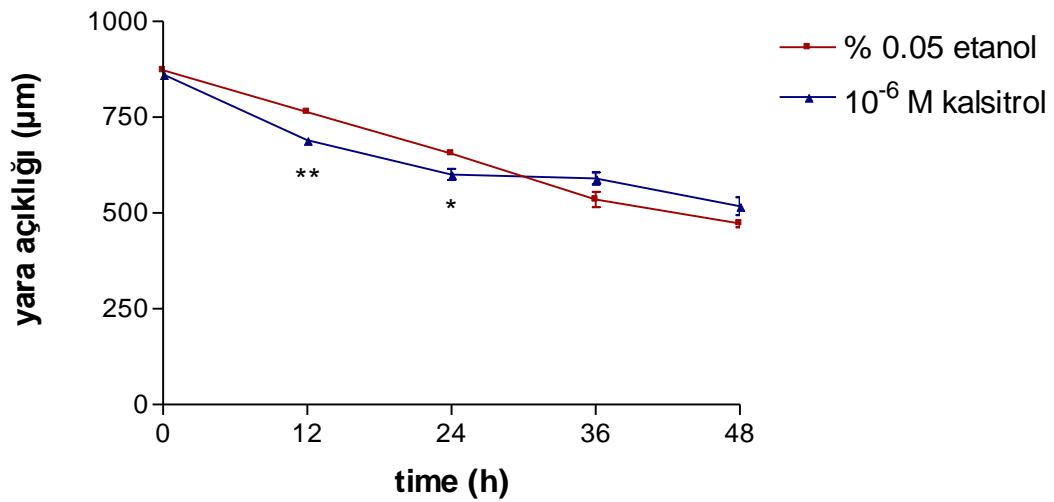


Şekil 4.3.2.E.: Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde alfacalcidolün ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$  M) 0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığı üzerine etkisi (n=4) (\*; etanol ile  $10^{-6}$  M alfacalcidolün karşılaştırılması, ●; etanol ile  $10^{-7}$  M alfacalcidolün karşılaştırılması, ■; etanol ile  $10^{-8}$  M alfacalcidolün karşılaştırılması)

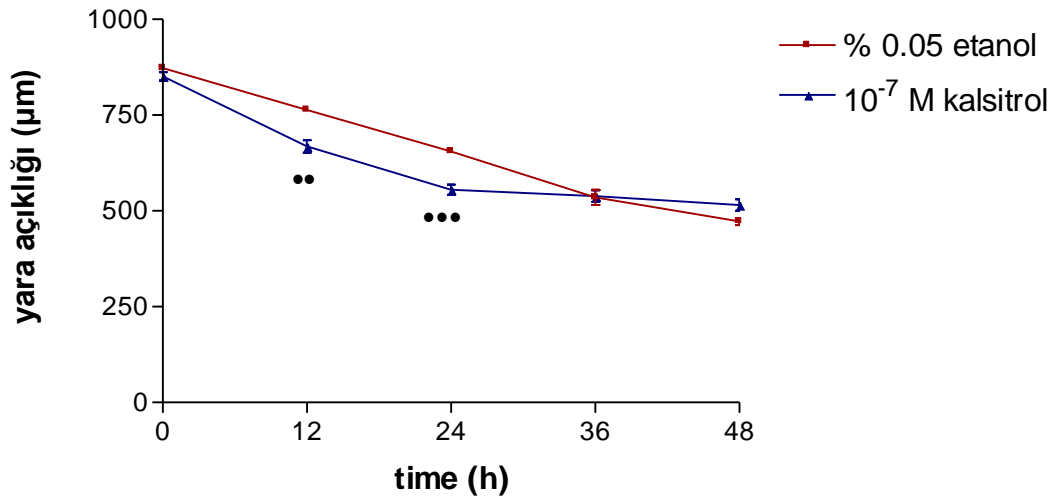
Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde kalsitriol ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$ M) yara iyileşme üzerine etkisi araştırıldı. Kalsitriolün ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$  M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde 0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığı örnek görüntüleri şekil 4.3.2.F.'de gösterilmiştir. Kalsitriol ( $10^{-6}$  M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde 0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığını 12'nci (p<0.0011) ve 24'üncü saatte (P<0.0117) azaltmıştır, bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Yine  $10^{-6}$  M kalsitriol 36. saatten sonra yara iyileşme açıklığını artırmıştır, fakat bu artma istatistiksel olarak anlamlı değildir (şekil4.3.2.G.). Kalsitriol ( $10^{-7}$  M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde 0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığını 12'nci (P<0.0015) ve 24'üncü saatte (P<0.0005) azaltmıştır, bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Yine  $10^{-7}$  M kalsitriol 36. saatten sonra yara iyileşme açıklığını artırmıştır, fakat bu artma istatistiksel olarak anlamlı değildir (şekil4.3.2.H.). Kalsitriol ( $10^{-8}$  M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde 0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığını 12'nci (P<0.0013) ve 24'üncü saatte (P<0.0012) azaltmıştır, bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (şekil4.3.2.I.). Aynı zamanda kalsitriol ( $10^{-8}$ M) yara iyileşme açıklığını 36. saatten sonra artırmaya başlamıştır, bu artışın 48'inci saati istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (P<0.0077) (şekil4.3.2.I.). Kalsitriolün ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$  M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde 0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığı üzerine etkisi toplu olarak şekil 4.3.2.J.'de gösterilmiştir.



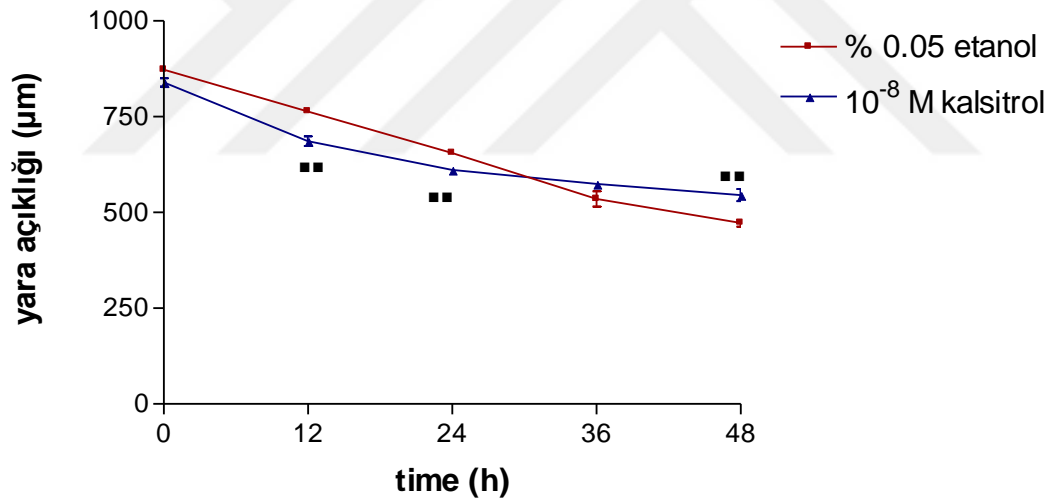
Şekil 4.3.2.F.: Kalsitriolün ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$  M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde 0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığı örnek görüntüleri.



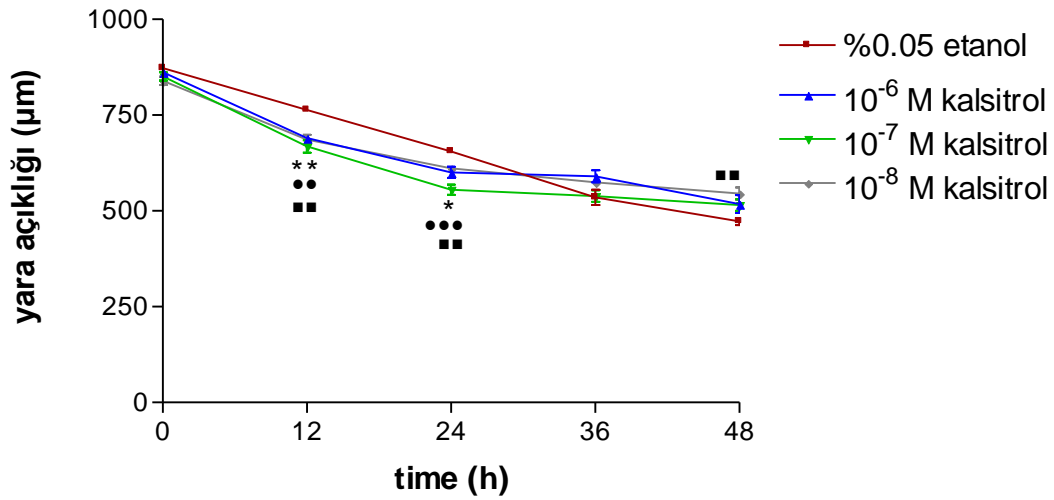
Şekil 4.3.2.G.: Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde  $10^{-6}$  M kalsitriolün 0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığı üzerine etkisi (n=4) (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.05$ ).



Şekil 4.3.2.H.: Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde 10<sup>-7</sup> M kalsitriolün 0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığı üzerine etkisi (n=4) (●●: P<0.01, ●●●: P<0.001).



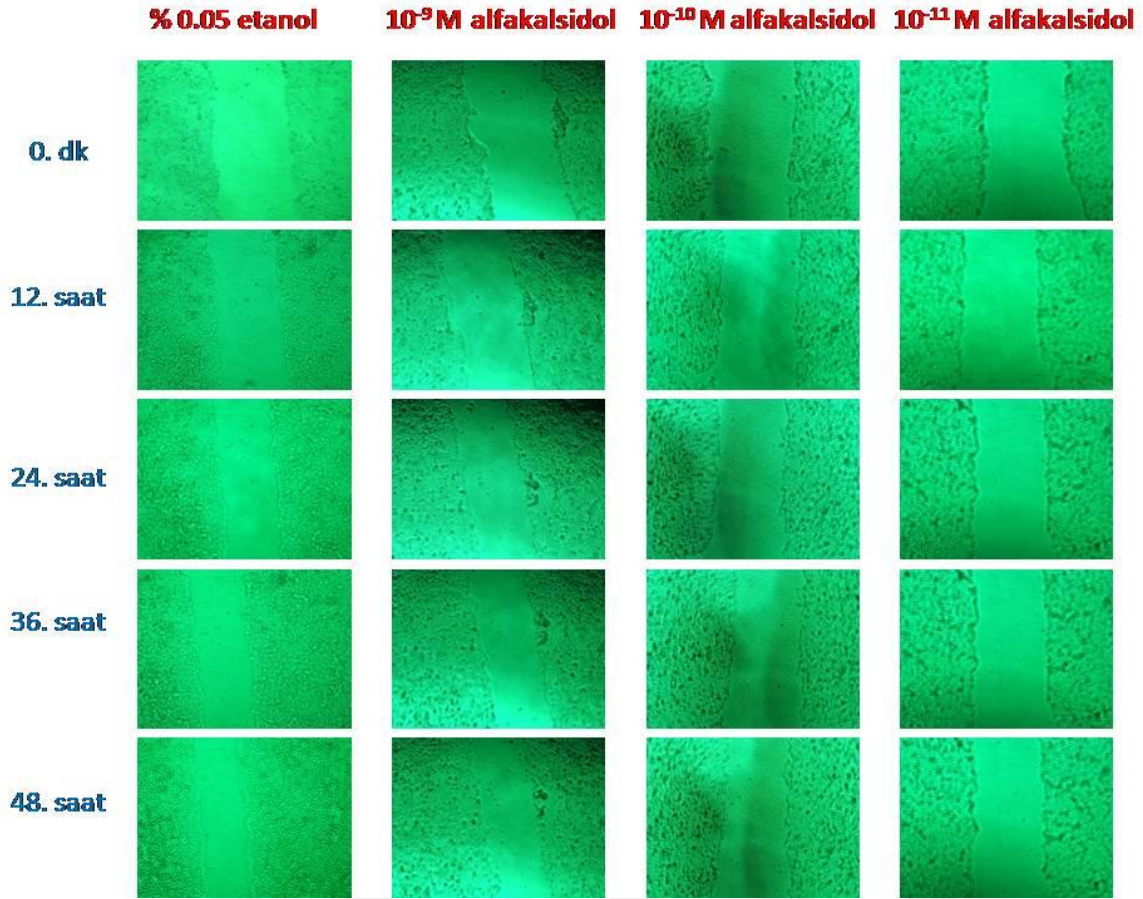
Şekil 4.3.2.I.: Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde 10<sup>-8</sup> M kalsitriolün 0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığı üzerine etkisi (n=4). (■■: P<0.01)



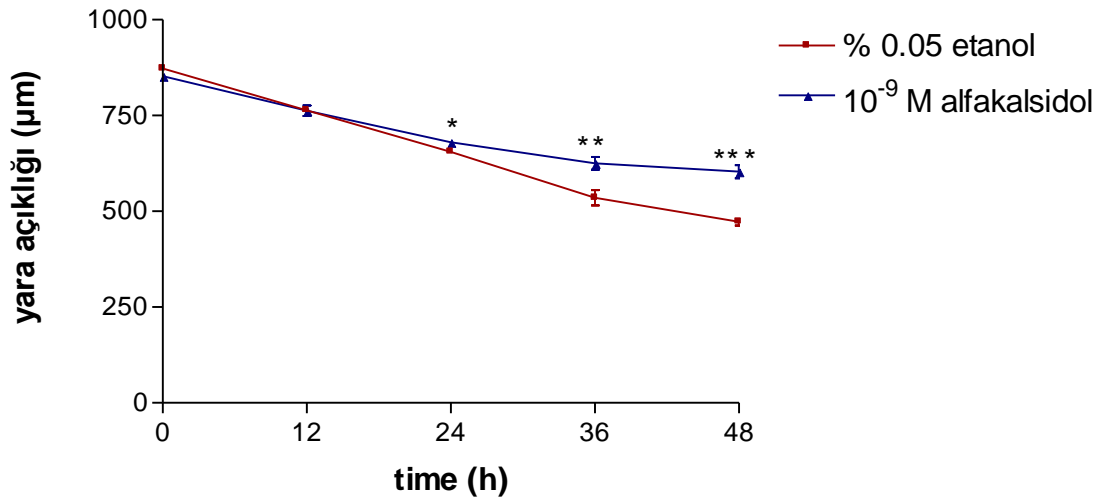
Şekil 4.3.2.J.: Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde kalsitriolün ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$  M) 0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığı üzerine etkisi (n=4) (\*; etanol ile  $10^{-6}$  M kalsitriolün karşılaştırılması, ●; etanol ile  $10^{-7}$  M kalsitriolün karşılaştırılması, ■; etanol ile  $10^{-8}$  M kalsitriolün karşılaştırılması)

#### 4.3.3. Endometriyum Adenokarsinoma HEC1A Hücrelerinde Alfakalsidol ( $10^{-9}$ - $10^{-11}$ M) ve Kalsitriolün ( $10^{-9}$ - $10^{-11}$ M) Yara İyileşme Modeli Üzerine Etkisi

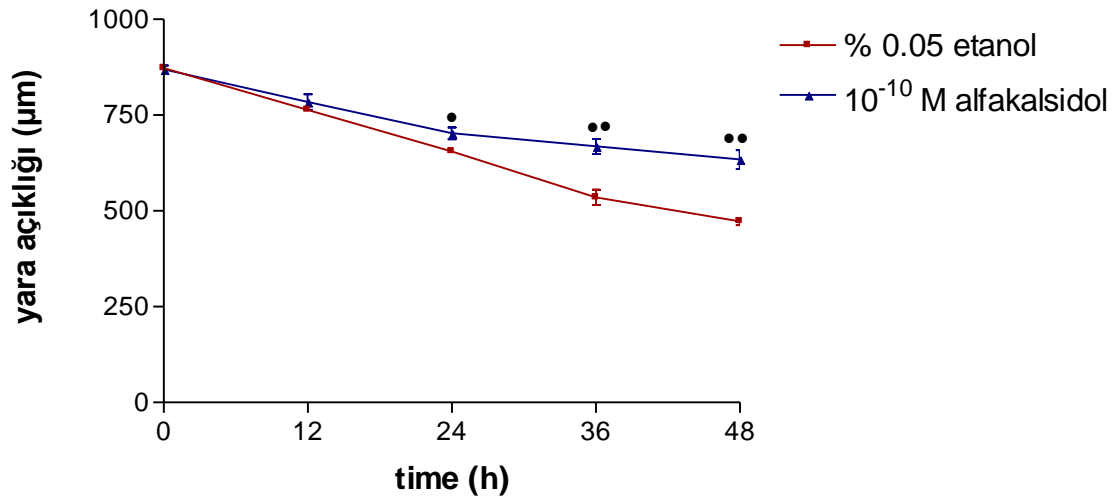
Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde alfakalsidolün ( $10^{-9}$ - $10^{-11}$  M) yara iyileşme üzerine etkisi araştırıldı. Alfakalsidolün ( $10^{-9}$ - $10^{-11}$  M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde 0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığı örnek görüntüleri şekil 4.3.3.A.'da gösterilmiştir. Alfakalsidol ( $10^{-9}$  M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde 0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığını 24. saatte ( $P<0.0141$ ), 36. saatte ( $P<0.0141$ ) ve 48. saatte ( $P<0.0005$ ) artırmıştır, bu artma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (şekil4.3.3.B.). Alfakalsidol ( $10^{-10}$  M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde 0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığını 24. saatte ( $P<0.0263$ ), 36. saatte ( $P<0.0033$ ) ve 48. saatte ( $P<0.001$ ) artırmıştır, bu artma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (şekil4.3.3.C.). Alfakalsidol ( $10^{-11}$  M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde 0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığını 24. saatten itibaren artırmaya başlamıştır, bu artış 36. saat ( $P<0.0114$ ) ve 48. saatte ( $P<0.0006$ ) istatistiksel olarak anlamlı tespit edilmiştir (şekil4.3.3.D.). Alfakalsidolün ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$  M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde 0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığı üzerine etkisi toplu olarak şekil 4.3.3.E.'de gösterilmiştir.



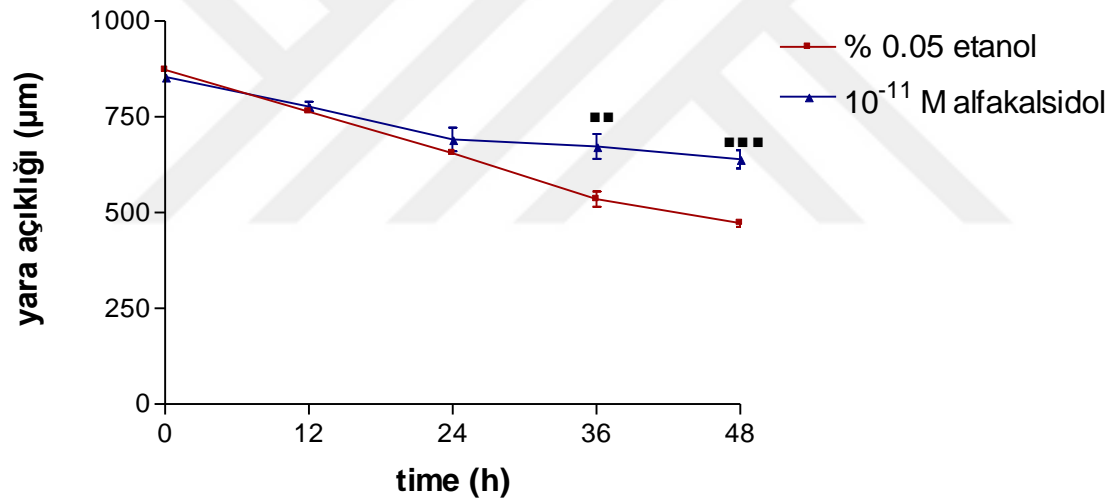
Şekil 4.3.3.A.: Alfakalsidolün ( $10^{-9}$ - $10^{-11}$  M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde 0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığı örnek görüntüleri.



Şekil 4.3.3.B.: Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde  $10^{-9}$  M alfakalsidolün 0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığı üzerine etkisi (n=4) (\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ , \*\*\*:  $P < 0.001$ ).

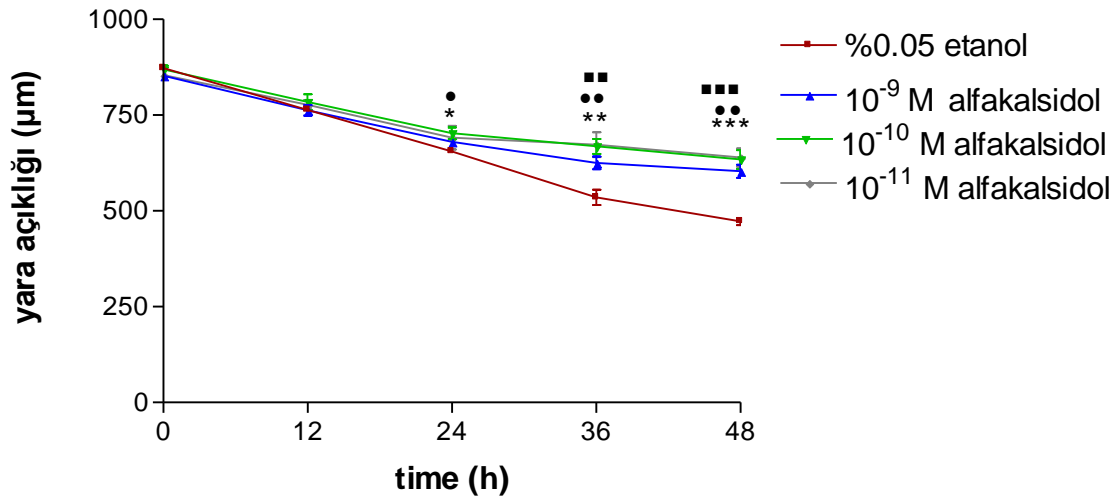


Şekil 4.3.3.C.: Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde 10<sup>-10</sup> M alfakalsidolün 0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığı üzerine etkisi (n=4) (●: P<0.05, ●●: P<0.01).



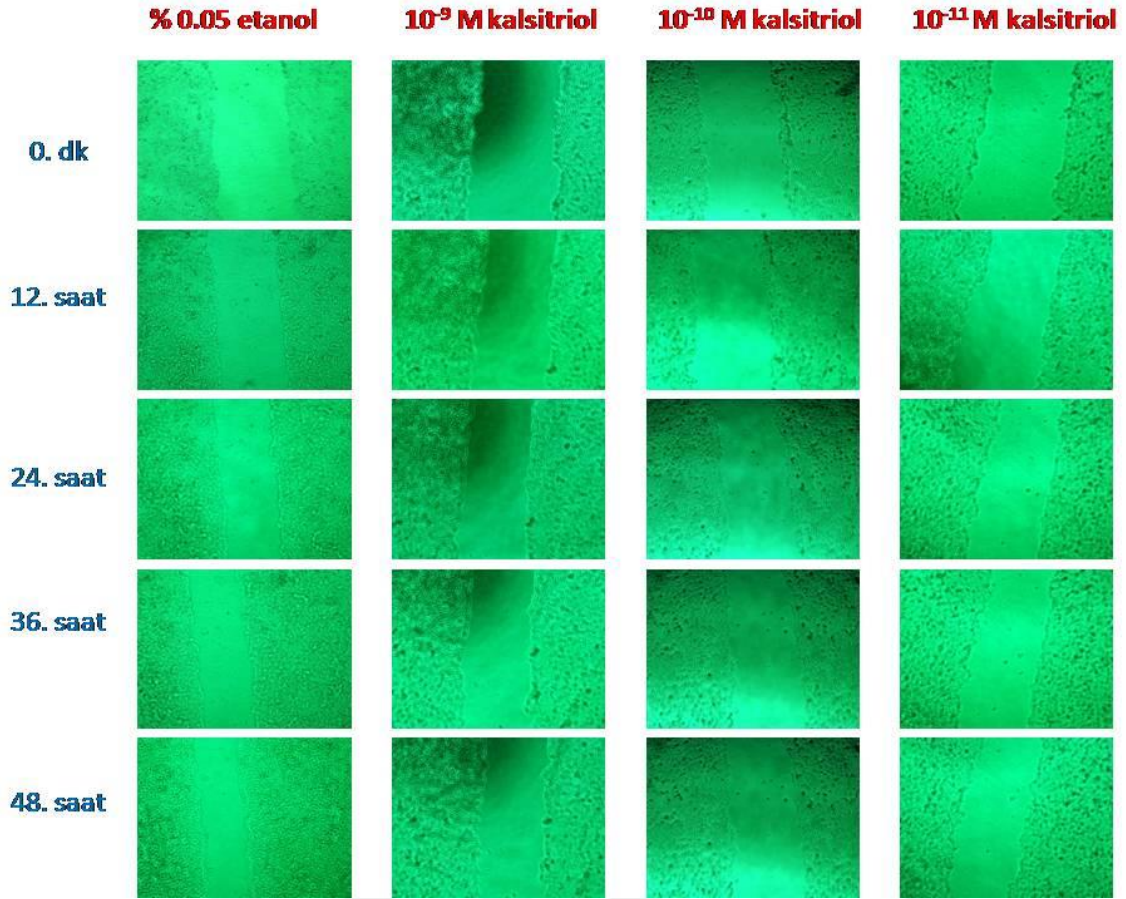
Şekil 4.3.3.D.: Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde 10<sup>-11</sup> M alfakalsidolün 0. saatten 48. saat arasındaki yaraiyileşme açıklığı üzerine etkisi (n=4) (■■: P<0.01, ■■■: P<0.001).



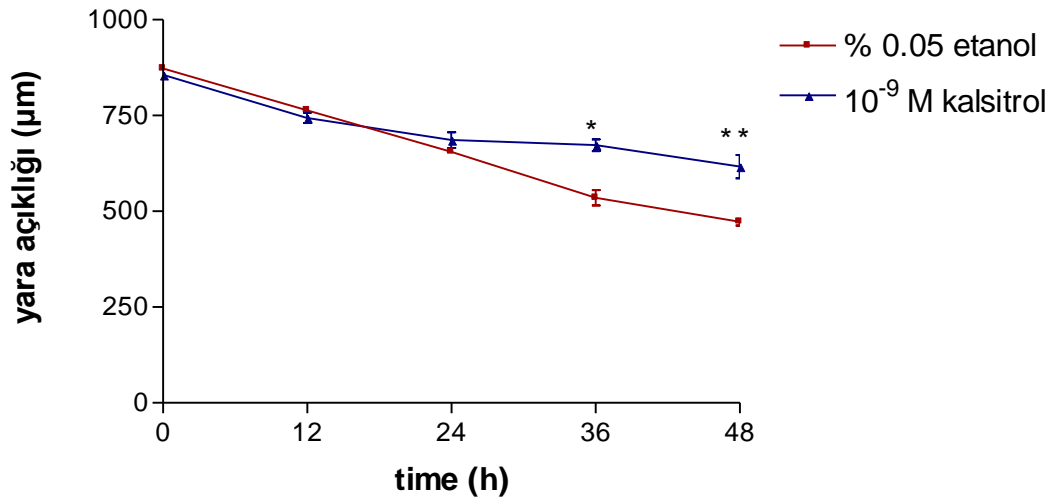


Şekil 4.3.3.E.: Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde alfacalsidolün ( $10^{-9}$ - $10^{-11}$ M) 0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığı üzerine etkisi (n=4) (\*; etanol ile  $10^{-9}$  M alfacalsidolün karşılaştırılması, ●; etanol ile  $10^{-10}$  M alfacalsidolün karşılaştırılması, ■; etanol ile  $10^{-11}$  M alfacalsidolün karşılaştırılması)

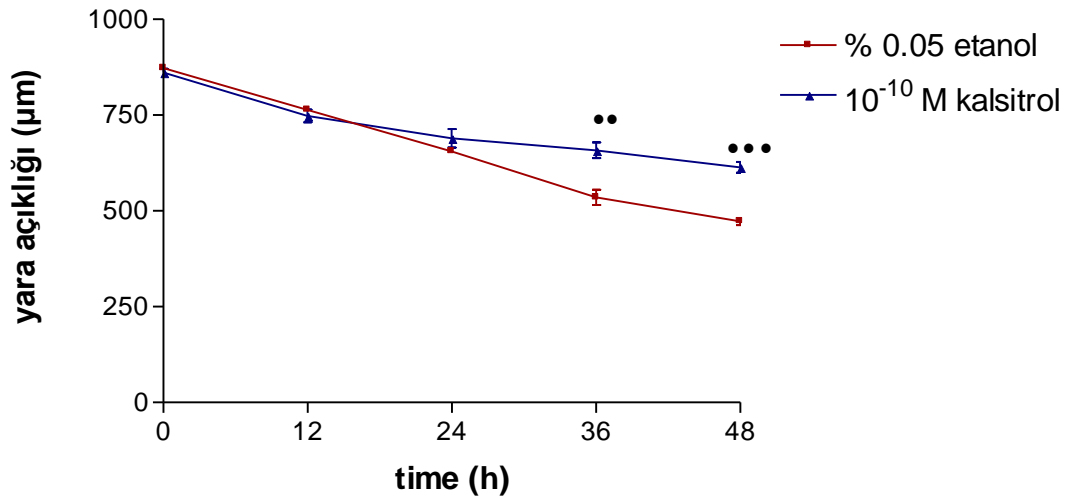
Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde kalsitriol ( $10^{-9}$ - $10^{-11}$  M) yara iyileşme üzerine etkisi araştırıldı. Kalsitriolün ( $10^{-9}$ - $10^{-11}$  M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde 0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığı örnek görüntüleri şekil 4.3.2.F.'de gösterilmiştir. Kalsitriol ( $10^{-9}$  M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde 0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığını 24. saatten itibaren artırmıştır, bu artışın 36. (p<0.0113) ve 48. saati (P<0.0040) istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (şekil4.3.3.G.). Kalsitriol ( $10^{-10}$  M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde 0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığını 24. saatten itibaren artırmıştır, bu artışın 36. (p<0.0051) ve 48. saati (P<0.0004) istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (şekil4.3.3.H.). Kalsitriol ( $10^{-11}$  M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde 0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığını 24. saatte (P<0.0087), 36. saatte (P<0.0016) ve 48. saatte (P<0.0001) artırmıştır, bu artma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (şekil4.3.3.I.). Kalsitriol ( $10^{-9}$ - $10^{-11}$  M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde 0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığı üzerine etkisi toplu olarak şekil 4.3.3.J.'de gösterilmiştir.



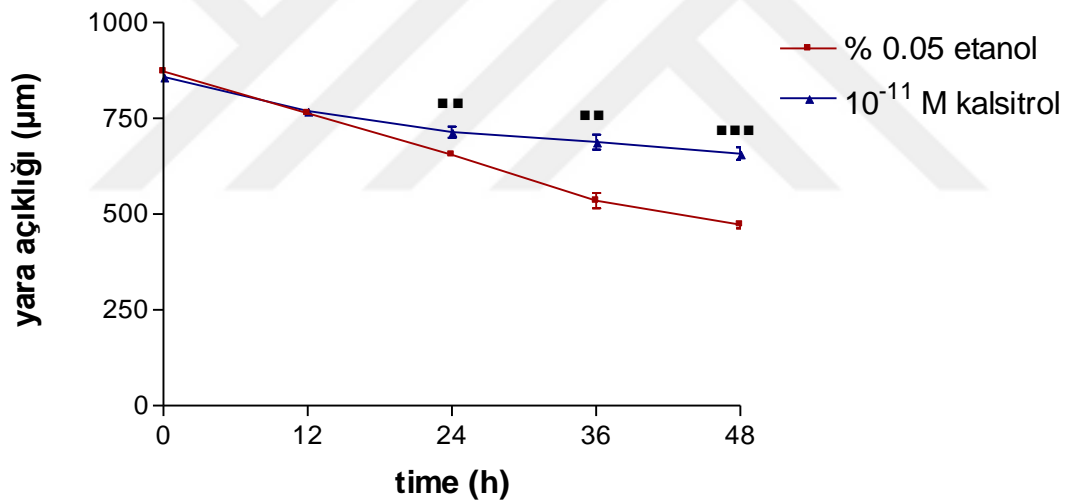
Şekil 4.3.3.F.: Kalsitriolün ( $10^{-9}$ - $10^{-11}$  M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde 0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığı örnek görüntüleri.



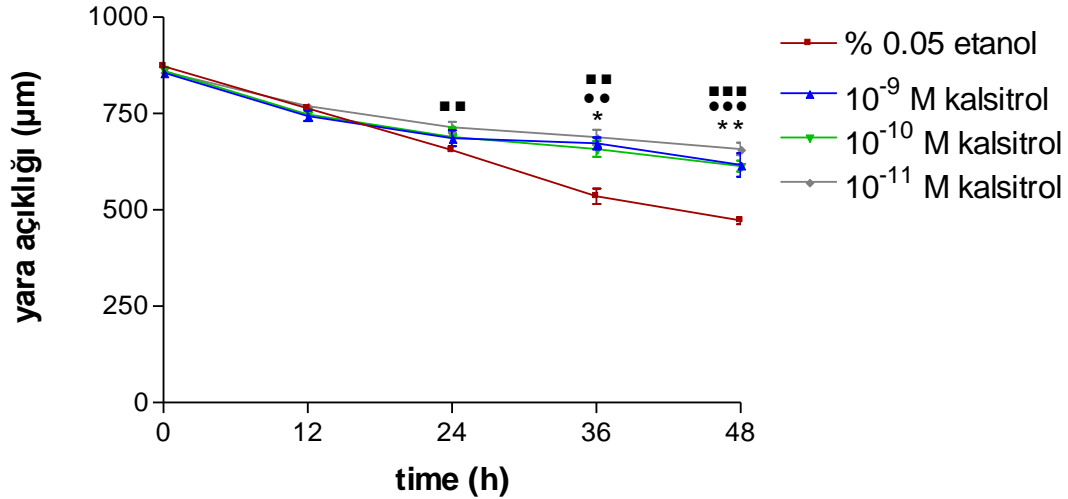
Şekil 4.3.3.G.: Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde  $10^{-9}$  M kalsitriolün 0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığı üzerine etkisi (n=4) (\*:  $p<0.05$ , \*\*:  $p<0.05$ ).



Şekil 4.3.3.H. Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde 10<sup>-10</sup> M kalsitriolün 0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığı üzerine etkisi (n=4) (●●: P<0.01, ●●●: P<0.001).



Şekil 4.3.3.I.: Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde 10<sup>-11</sup> M kalsitriolün 0. saatten 48. saat arasındaki yaraiyileşme açıklığı üzerine etkisi (n=4). (■■: P<0.01)

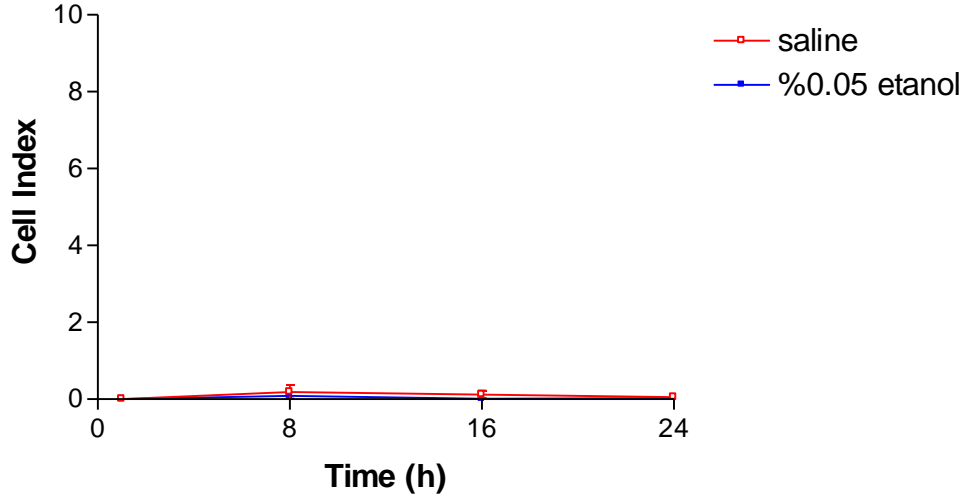


Şekil 4.3.3.J.: Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde kalsitriolün ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$  M) 0. saatten 48. saat arasındaki yara iyileşme açıklığı üzerine etkisi (n=4) (\*; etanol ile  $10^{-9}$  M kalsitriolün karşılaştırılması, ●; etanol ile  $10^{-10}$  M kalsitriolün karşılaştırılması, ■; etanol ile  $10^{-11}$  M kalsitriolün karşılaştırılması)

#### 4.4. Endometriyum Adenokarsinoma HEC1A Hücrelerinde D Vitamininin İnvazyon Üzerine Etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Analizi

##### 4.4.1. Endometriyum Adenokarsinoma HEC1A Hücrelerinde Etanolün İnvazyon Üzerine Etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Analizi

Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde D vitamininin çözücüsü etanol ile kontrol grubu arasındaki ilişki araştırıldı (şekil 4.4.1.). Endometriyum HEC1A hücrelerinde etanol ve kontrol grubunun invazyon üzerine etkisi 216 saat izlenmiştir, bunun sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadığından ilk 24 saati gösterilmiştir.



Şekil 4.4.1.: Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde etanol ve kontrol grubunun invazyon üzerine etkisi (n=4) ( $p>0.05$ ).

#### 4.4.2. Endometriyum Adenokarsinoma HEC1A Hücrelerinde Al fakalsidol ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$ M) ve Kalsitriolün ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$ M) İnvazyon Üzerine Etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Analizi

Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde al fakalsidolün ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$  M) ile kalsitriol ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$  M) invazyon üzerine etkisi araştırıldı. Al fakalsidolün ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$  M) ile kalsitriol ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$  M) invazyon üzerine etkisi endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde 216 saat izlenmiştir, bu izlem sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunamamıştır. Bu nedenle veriler gösterilmemiştir.

#### 4.5. Bulguların Değerlendirilmesi

Çalışmamızda elde ettiğimiz endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde alfakalsidol ve kalsitriolün proliferasyon ve migrasyon üzerine etkilerinin toplu sonuçları tablo 4.5.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.5.: Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde alfakalsidol ve kalsitriolün proliferasyon ve migrasyon üzerine etkilerine toplu bakış.

		Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Modeli				Yara İyileşme Modeli	
		Proliferasyon		Migrasyon		Migrasyon	
		Alfakalsidol	Kalsitriol	Alfakalsidol	Kalsitriol	Alfakalsidol	Kalsitriol
Yüksek Doz	$10^{-6}M$	36h-88h ↑	36h-84h ↑	72h-140h ↓	1h-144h ↓	24.h ↑ 36.h ↓	12.h, 24.h ↑ 36.h ↓
	$10^{-7}M$	24h-80h ↑	48h-72h ↑	1h-140h ↓ 75h-121h ↓	1h-168h ↓ 73h-132h ↓	12.h ↑ 24.h ↑ 36.h ↓ 48.h ↓	12.h, 24.h ↑ 36.h ↓
	$10^{-8}M$	24h-84h ↑	72h-96h ↑	1h-140h ↓	1h-168h ↓ 73h-105h ↓	12.h, 24.h ↑ 36.h ↓	12.h, 24.h ↑ 48.h ↓
Düşük Doz	$10^{-9}M$	78h-115h ↓	36h-90h ↓	120h-168h ↓	120h-216h ↓	24.h, 36.h, 48.h ↓	36.h, 48.h ↓
	$10^{-10}M$	76h-108h ↓	48h-60h ↓	138h-160h ↓	120h-168h ↓	24.h, 36.h, 48.h ↓	36.h, 48.h ↓
	$10^{-11}M$	83h-110h ↓	53h-90h ↓	121h-186h ↓	120h-168h ↓	36.h, 48.h ↓	24.h, 36.h, 48.h ↓

(↓; istatikselsel olarak anlamlı azalma, ↓; istatikselsel olarak anlamlı olmayan azalma, ↑; istatikselsel olarak anlamlı artma, ↑; istatikselsel olarak anlamlı olmayan artma).

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde D vitamininin proliferasyon, migrasyon ve invazyon üzerine etkileri araştırıldı. D vitamininin proliferasyon üzerine etkileri; al fakalsidol ve kalsitriol'ün yüksek dozları ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$  M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde proliferasyonu artırırken, al fakalsidol ve kalsitriol'ün düşük dozları ( $10^{-9}$ - $10^{-11}$  M) endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde proliferasyonu azaltmıştır. Al fakalsidol'ün ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$  M) poliferatif etkileri kalsitriol'den daha erken (24h karşı 36h) başlamıştır. Buna karşılık, kalsitriol'ün ( $10^{-9}$ - $10^{-11}$  M) de antipoliferatif etkileri al fakalsidol'den daha erken (36h karşı 83h) başlamıştır. D vitamininin migrasyon üzerine etkileri gerçek zamanlı hücre analizi ve yara iyileşme modeli üzere iki farklı yöntem ile araştırıldı. Gerçek zamanlı hücre analizi modelinde endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde migrasyonu al fakalsidol ve kalsitriol'ün yüksek dozları ile düşük dozları bir azaltma eğilimi göstermektedir, ancak bu azalmanın al fakalsidol için sadece  $10^{-7}$  M ve kalsitriol'ün  $10^{-7}$  M ve  $10^{-8}$  M konsantrasyonları istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Gerçek zamanlı hücre analizi modelinde, al fakalsidol ve kalsitriol'ün yüksek dozlarının migrasyon üzerine etkilerine yönelik deney çalışması yapılırken yaşanan doğal afet nedeniyle uzun süreli elektrik kesintisi olmuştur, verilemez bu durumdan etkilenmiş olabilir. Bu nedenle D vitamininin migrasyon üzerine etkileri yara iyileşme modeli ile de araştırıldı. Yara iyileşme modelinde D vitamininin migrasyon üzerine etkileri; al fakalsidol ve kalsitriol'ün yüksek dozları yara iyileşme açıklığını ilk 24 saate kadar azaltırken (migrasyon artışı), 36. saatten itibaren artırmıştır. Al fakalsidol düşük dozları ise yara iyileşme açıklığını 24. saatten, kalsitriol'ün düşük dozları yara iyileşme açıklığını ise 36. saatten (migrasyon azalması) itibaren artırmıştır. Yara iyileşme modelinde endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde D vitamininin migrasyon üzerine etkisinde, al fakalsidol'ün kalsitriole göre daha hızlı başlayan antimigratuvar etkileri gözlemlendi. Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde D vitamininin invazyon üzerine etkileri denenmiş, deney verilerimizin tutarsızlığı nedeniyle sonuç elde edilememiştir. Bütçe kısıtlılığı nedeniyle de deney çalışması tekrarlanamamıştır.

D vitamini anti-proliferatif ve pro-differansiye edici etkiler gösterir. Birçok çalışma, over kanserinde D vitamininin fonksiyonel yolağı üzerine yoğunlaşmıştır. Son zamanlarda yapılan çalışmada Thill ve arkadaşları kalsitriol'ün ( $5 \times 10^{-5}$  M -  $10^{-8}$  M) over kanseri hücre yolağında proliferasyonunu inhibe ettiğini, 25(OH)D'nin de yumurtalık karsinom hücrelerinde hücre döngüsünün durmasına neden olabileceğini ve proliferasyonu inhibe ettiğini göstermiştir. Aynı zamanda Thill ve arkadaşları over kanseri hücrelerini (haftada 0,15 µg/kg) kalsitriol

uygulamasının proliferasyonu güçlü bir şekilde inhibe ettiğini de göstermiştir [100]. Gonzalez-Duarte ve arkadaşlarının vitro çalışmalarda SiHa serviks kanseri hücrelerinde  $10^{-6}$  M kalsitriolün proliferasyonu inhibe ettiğini çeşitli fonksiyonel yollar (DDX5 gen indüksiyonu) ile olduğunu göstermiştir [101, 102]. Wang ve arkadaşları, 6 gün boyunca  $10^{-7}$  M kalsitriol uygulanan serviks kanseri HeLa S3 hücrelerinde antiproliferatif etki göstermiştir. Wang ve arkadaşları bu etkiyi  $10^{-7}$  M kalsitriolün HCCR-1 azaltarak ve p21 ekspresyonunu arttırarak HeLa S3 hücrelerinde proliferasyonu inhibe ettiğini ve böylece hücre döngüsünün G1'de durmasına yol açtığını gösterdi [103]. Avila ve arkadaşları, SiHa serviks kanseri hücrelerinde  $10^{-7}$  M kalsitriolün insan eteri-go-go-1 potasyum kanalları (EAG1) üzerindeki inhibitör etkisini göstermiş ve serviks kanseri için terapötik bir seçenek olarak D vitamini önermiştir [104].  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , kanser hücresi gelişimini düzenleme kabiliyeti nedeniyle potansiyel bir antitümör ajan olarak önerilmiştir. Yabushita ve arkadaşları 6 gün boyunca  $5 \times 10^{-8}$  M  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  uygulamasının endometriyal kanser hücresi (RL95-2) proliferasyonunu inhibe ettiğini göstermişlerdir. Bunun için  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'nin endometriyal adenokarsinom ve endometriyal kanserin tedavisinde hücre farklılaşmasını indükleyici bir ajan olarak işlev gören bir hedef olduğunu önermişlerdir [105]. Bizim bulgularımıza göre aynı konsantrasyondaki D vitamini kullanımı endometriyum HEC1A hücrelerinde proliferasyonu arttırmaktadır. Bu farklı sonuçların nedeni endometriyum adenokarsinoma ve over kanseri arasındaki farklara ve deney dizaynındaki farklılıklara bağlı olabilir.

VDR için ligand olan  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , hem normal hem de transforme edilmiş meme epitelyal hücrelerinin bir negatif büyüme düzenleyicisidir. Zinser ve Welsh yaptığı çalışmada  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'nin meme kültüründe karsinojen kaynaklı preneoplastik lezyonların gelişmesini engellediğini ve baskılanmış VDR aktivitesinin  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  duyarsızlığına ve hızlanan tümör oluşumuna yol açabileceğini bildirmiştir [106]. Normal ve malign endometriyal hücreler de dâhil olmak üzere birçok farklı hücre tipi, aktif  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'ü sentezlemek için 1 alfa hidroksilaz ve VDR ekspres eder [107, 108].  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , VDR aracılı apoptozdan sorumludur ve çeşitli kanser tiplerinde anjiyogenez ve farklılaşmayı inhibe eder [109, 19-114]. D vitamininin antiproliferatif ve antineoplastik aktiviteleri hem genomik hem de nongenomik mekanizmaları içerebilmektedir. Klasik genomik yanıtın D vitamini etkisinden en fazla sorumlu olduğuna inanılmaktadır ve D vitamininin genomik etkileri VDR aracılığıyla ile olduğu bildirilmiştir. VDR over, endometrial, serviks, meme ve kolorektal kanser dâhil olmak üzere çok sayıda tümör dokusunda da yüksek oranda eksprese edilir. Agic ve arkadaşları yaptığı çalışmada, endometriyozis hastalarının hem endometriyum hem de yumurtalıklarında VDR ekspresyonunun orta düzeyde olduğunu, bu düzeyin kanserli hastaların VDR ekspresyonu ile sağlıklı kontroller arasındaki bir düzey olduğunu ortaya koymuştur. Yine Agic ve arkadaşları



endometriyal kanserli hastalarda VDR'nin, sağlıklı kontrol hastalarına göre daha yüksek olduğunu göstermiştir, fakat bu yüksekliğin istatistiksel olarak anlamlı olmadığını bildirmişlerdir [115]. Yine yakın zamanda yapılan bir çalışmada Lee ve arkadaşları progesteron ( $2 \times 10^{-5}$  M), kalsitriol ( $10^{-7}$  M) ve bunların kombinasyonunun insan endometriyum epitel hücreleri ve endometriyal kanser hücreleri üzerindeki etkileri araştırmış; her iki ajanla birlikte kombinasyon tedavisi, VDR'yi arttırmış, kaspaz-3 aktivasyonu ve G0-G1 hücre döngüsü (siklin D1, D3 ve p27 indüksiyonunun down regülasyonu) tutuklanmasının uyarılması yoluyla hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini göstermiştir [110]. Bu çalışmamızda proliferasyon üzerine ortaya çıkan etkilerin başlama süreleri göz önüne alınarak D vitamininin kanserdeki proliferasyon üzerine olan etkilerinin hem genomik hemde non-genomik etkileri birlikte içerebileceğini öneriyoruz. Ancak bu durumun tam olarak ortaya konulması için daha detaylı araştırmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

Yapılan araştırmalarda D vitamininin vitro kanser modellerinde antineoplastik aktivitesi için çeşitli mekanizmalar önerilmiştir, antineoplastik aktivitenin mekanizmaları arasında apoptozis indüksiyonu, hücre döngüsü tutulumu yoluyla proliferasyonun inhibisyonu, farklılaşma indüksiyonu, invazyon ve motilitenin inhibisyonu ve anjiyogenezin azaltılması yer alır [115].  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'ün migrasyon ve invazyon üzerindeki rolü tam olarak bilinmemektedir. 2018 yılının başlarında Chen ve arkadaşları  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ( $10^{-8}$  M), spontan tümör gelişimini engellediğinden (tümörigenezin başlamasını ve ilerlemesini engeller) yaşlanan bir organizmada tümör oluşumunu önlemek için  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'ün gerekli ana faktör olduğunu bildirmiştir [116]. 2017 yılında Chiang ve arkadaşları 24 saat  $2 \times 10^{-8}$  M VEGF-A, 48 saat  $10^{-7}$  M/ $10^{-8}$  M  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ve analogu olan MART-10 uygulanan pankreas nöroendokrin tümör (RIN-m) hücresinde,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ve MART-10'ün VEGF-A baskılayarak migrasyon ve invazyonu inhibe ettiğini göstermiştir. MART-10'ün anti-metastatik etkisi nedeniyle pankreas nöroendokrin tümörleri tedavisinde umut verici bir ilaç olarak görülebileceğini bildirmiştir [117]. Yine başka bir çalışmada 2017 yılında, Yingyu ve arkadaşlarının 4 farklı düşük dozda özellikli insan mesane kanseri hücresinde endojen ve indüklenebilir VDR'yi göstermiş ve  $5 \times 10^{-7}$  M  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'ün metastatik insan mesane kanseri hücre hatları 253J-BV ve TCCSUP'da hücre hareketliliği ve invazyonu engellediğini göstermiştir. Yingyu ve arkadaşları  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ( $5 \times 10^{-7}$  M), miR-101-3p'nin indüksiyonu yoluyla mesane kanseri hücresi migrasyonu ve invazyonunu farklı şekilde baskıladığını ve  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ( $5 \times 10^{-7}$  M) tedavisinin düşük dozda özellikli insan mesane kanseri hücre dizileri 253J ve T24'te migrasyon ve invazyona etkisinin olmadığını da göstermiştir [118]. Bizim bulgularımıza göre aynı konsantrasyondaki D vitamini kullanımı endometriyum HEC1A hücrelerinde migrasyonu hem gerçek zamanlı hücre analiz modelinde hem de yara iyileşme modelinde (ilk 24 saat sonrası) azaltmaktadır. Sadece yara iyileşme modelinde al fakalsidol ve

kalsitriolün yüksek dozlarının ilk 24 saatinde (non-genomik etkilere bağlı olabilir) migrasyonu artıyor olmasının nedeni endometriyum adenokarsinoma ve diğer kanser hücresi arasındaki farklara ve deney dizaynındaki farklılıklara bağlı olabilir. Bizim bulgularımız Chiang, Yingyu ve arkadaşlarının bulgularını desteklemektedir.

D vitamini düzeyi ile kanser arasında ilişkiyi gösteren çok sayıda çalışma vardır. Dolaşımdaki yüksek D vitamini seviyeleri, bazı kanser türlerinin (göğüs, kolorektal, mide, hematolojik, baş ve boyun, böbrek, akciğer, yumurtalık, pankreas karaciğeri, prostat ve deri kanseri) gelişme riskinin azalması ile ilişkilidir. D vitamininin in vitro ve in vivo olarak karsinom hücrelerinin farklılaşmasına indüklediği ve proliferasyonu baskıladığı başka çalışmalarda da gösterilmiştir (19). Yine Amir ve arkadaşları yaptığı çalışmada, metastatik meme kanserinde kemik metastazı bulunan hastalarda, daha yüksek dozda D vitamini (10000 IU/gün) takviyesi için genel bir ihtiyaç olduğunu bildirmiştir [119]. Buna karşılık Penna ve arkadaşları tümör taşıyan hayvanlara veya artritli sıçanlara D vitamini takviyesinin tamamen etkisiz olduğunu göstermiştir ve bu bağlamda, kanserli kaşeksi veya diğer kronik hastalıkları olan hastalarda D vitamini tedavisinin benimsenmesi, özellikle de rejeneratif bir süreç söz konusuysa dikkatle değerlendirilmesi gerektiğini bildirmiştir [120].

Çalışmamızın sonuçlarına göre endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücreleri için proliferasyonun belirlenmesinde gerçek zamanlı hücre analiz modelini önermekteyiz. Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi herhangi bir işaretleme yapmadan hücre çoğalması, invazyon, migrasyon ve sitotoksiteyi gerçek zamanlı olarak analiz eden sistemdir (96). Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücreleri için migrasyonu gerçek zamanlı hücre analiz modelinde anlamlı olarak en erken 73. saatten sonra gözlemledik, ancak yara iyileşme modelinde literatür ile uyumlu olarak 24.-48. saatler arasında anlamlı değişiklikler gözlemledik. Bu sonuçlara göre endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücreleri için migrasyonun değerlendirilmesinde yara iyileşme modelinin daha uygun olduğunu öneririz. Buna ilaveten yara iyileşme modeli gerçek zamanlı hücre analiz modeline kıyasla daha ucuz ve tekrarlanabilir bir yöntemdir. Gerçek zamanlı hücre analiz sisteminde migrasyon ve invazyon protokollerinin her ikisinde CIM-plate kullanılmakta olup çok benzerdir. Migrasyon ve invazyon prtokolleri arasındaki en önemli fark “üst kuyucuğun” invazyon için matrigel ile kaplanmasıdır. Yaptığımız çalışmada invazyon denemelerinde sinyal alamadık. Buna göre gerçek zamanlı sistemin endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde migrasyon ve invazyon bakılması için uygun olmadığını alternatif olarak diğer yöntemlerin denenmesi gerektiğini öneririz. Endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücreleri için migrasyon ve invazyon çalışmaları yapılacak ise güçlü

kemoatraktan kullanılması ve bizim kullandığımız matrigelden daha dilüe matrigel kullanılmasını öneririz.

Non-genomik etkiler genellikle ajanların yüksek dozlarda kullanımıyla ortaya çıkmakta ve genomik etkilere göre daha erken dakika ve saatler içerisinde gözlenmektedir [121]. Bu çalışmada test ettiğimiz her iki D vitamini preparatının da yüksek dozlardaki proliferasyonu artırıcı etkileri erken saatlerde başlar iken, düşük dozlardaki antiproliferatif etkileri daha geç olarak başlamıştır. Bu sonuçlara göre D vitamininin yüksek dozlardaki proliferasyonu artırıcı etkilerine daha çok non-genomik mekanizmaların, düşük dozlardaki proliferasyonu azaltıcı etkilerine ise genomik mekanizmaların aracılık ettiğini öneririz. Yara iyileşme modelinde al fakalsidol ve kalsitriolün yüksek dozları kullanıldığında erken saatlerde (12-24 h) migrasyonu artırdıkları ilerleyen saatlerde ise (36-48 h) migrasyonu azalttıkları görülmüştür. Düşük doz uygulamasında ise bütün zamanlarda migrasyonu azaltmışlardır. Buradan yola çıkarak erken dönemdeki yüksek doz etkisine bağlı migrasyon artışına non-genomik mekanizmaların, geç dönemde ve düşük dozlarda ortaya çıkan migrasyon azlamasına ise daha ziyade genomik mekanizmaların katkıda bulunabileceğini düşündük.

Çalışmamızın sonuçlarına yönelik düşük doz kalsitriolün antiproliferatif etkisi düşük doz al fakalsidole göre daha erken başlamış olmasına rağmen, antimigratif etkisi ise al fakalsidolden daha sonra başlamıştır. Bu nedenle yara iyileşme açıklığı modelinde gösterdiğimiz antimigratif etki de hücre proliferasyonu rolünün olmadığını düşündük. Aynı zamanda al fakalsidol ve kalsitriolün antiproliferatif ve antimigratif etkisi üzerindeki etkilerin farklı zamanlarda başlamış olması, D vitamini preparatlarının (al fakalsidol ve kalsitriol) genomik ve nongenomik etkilerin incelenen etkiye göre (proliferasyon, migrasyon) farklı şekillerde rol oynayabileceğini düşündürdü. Çalışmamızda D vitamininin endometriyum kanserinde invazyon üzerine etkileri bütçe yetersizliği nedeniyle gösterilemedi. Endometriyum kanserlerinin patogenezinin aydınlatılması, hastalığın progresyonunu önlenmesi ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlamak için D vitamininin proliferasyon, migrasyon ve invazyon üzerine etkileri ile ilgili daha fazla çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır. Özellikle tekrarlanan dozlarda uzun süreli D vitamini uygulaması ve şeklindeki in vivo ve in vitro çalışmaların yapılmasına ve bu etkilerin aracılık eden moleküler çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Bu çalışmada literatürde eksik olarak gördüğümüz endometriyum adenokarsinoma HEC1A hücrelerinde D vitamininin proliferasyon ve migrasyon üzerine etkilerini gösterdik. Çalışmamızda düşük doz D vitamini kullanımının endometriyum adenokarsinoma kanserinde hem proliferasyonu hem de migrasyonu azalttığını gösterdik. Yüksek doz D vitamini kullanımı ise endometriyum adenokarsinoma kanserinde proliferasyonu ve kısmen migrasyonu artıracak ve diğer yan etkilere neden olabileceği için; yüksek doz D vitamini kullanımının rasyonel olmayacağını önermekteyiz. İlaçların doz cevap ilişkisi yorumlanmasında ajanların hormetik davranışları göz önüne alınmalı ve Paraselsus'un "Tüm maddeler zehirdir, ilacı zehirden ayıran dozudur" sözünü bu çalışmanın sonuçları için de kullanabiliriz.



## 6. KAYNAKLAR

- [1]. Pillozzi, S., Fortunato, A. ve diğerleri. (2013). Over-expression of the LH receptor increases distant metastases in an endometrial cancer mouse model. *Frontiers in Onkology*, fronc.2013.00285.
- [2]. What is Endometrial Cancer, American Cancer Society. (2016). 18.12.2017 tarihinde <https://www.cancer.org/cancer/endometrial-cancer/about/what-is-endometrial-cancer.html> adresinden erişildi.
- [3]. Horner, M.J., Krapcho, M. ve diğerleri. (2009). 18/12/2017 tarihinde [https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975\\_2006/](https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2006/) adresinden erişildi.
- [4]. Endometrial Cancer Risk Factors, American Cancer Society. (2016). 18.12.2017 tarihinde <https://www.cancer.org/cancer/endometrial-cancer/causes-risks-prevention/risk-factors.html> adresinden erişildi.
- [5]. Mohr, S.B., Garland, C.F. ve diğerleri. (2007). Is ultraviolet B irradiance inversely associated with incidence rates of endometrial cancer: an ecological study of 107 countries. *Prev Med* 2007, 45:327–31.
- [6]. Salazar-Martinez, E., Lazcano-Ponce, E. ve diğerleri. (2005). Dietary factors and endometrial cancer risk. Results of a case-control study in Mexico. *Int J Gynecol Cancer* 2005;15:938–45.
- [7]. Thorne, J. ve Campbell, M.J. (2008). The vitamin D receptor in cancer. *Proc Nutr Soc* 2008;67:115–27.
- [8]. Giovannucci, E. (2005). The epidemiology of vitamin D and cancer incidence and mortality: a review (United States). *Cancer Causes Control* 2005; 16:83–95.
- [9]. Kuitinen, T., Rovio, P. ve diğerleri. (2017). Paclitaxel, Carboplatin and 1,25-D3 Inhibit Proliferation of Endometrial Cancer Cells In Vitro. *Anticancer Research* 37: 6575-6581 (2017).
- [10]. Lungchukiet, P., Sun, Y. ve diğerleri. (2015). Suppression of epithelial ovarian cancer invasion into the omentum by 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 and its receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2015 April; 148: 138–147.
- [11]. Buggio, L., Roncella, E., Somigliana, E. ve Vercellini, P. (2016). Vitamin D and benign gynaecological diseases: a critical analysis of the current evidence. *Gynecol Endocrinol*, 2016; 32(4): 259–263.
- [12]. Holick, MF. (2007). Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007;357:266–81.
- [13]. Whyne, T.F. (2011). Vitamin D. Popular Cardiovascular Supplement But Benefit Must Be Evaluated. *International Journal of Angiology*, 2011;20:63-71.
- [14]. Gültekin, M., Hacikamiloğlu, E. (2013). D Vitamini Güneş Işınları, UVB ve Kanser. 20.12.2017 tarihinde <http:kanser.gov.tr/bilgi-dokumanlarraporlar801-d-vitamini-g%C3%BCne%C5%9F-i%C5%9F%C4%B1nlar%C4%B1,-uvb-ve-kanser.html> adresinden erişildi.
- [15]. Urbschat, A.; Paulus, P. ve diğerleri. (2013). Vitamin D hydroxylases CYP2R1, CYP27B1 and CYP24A1 in renal cell carcinoma. *Eur J Clin Invest*. 2013 Dec;43(12):1282-90.

- [16]. Nemere, I., Carson, F. (1998). Membrane receptors for steroid hormones: a case for specific cell surface binding sites for vitamin D metabolites and estrogens. *Biochem Biophys Res Com* 1998; 248:442-9.
- [17]. Norman AW. (1998). Receptors for 1,25(OH)2D3: past, present and future. *J Bone Miner Res* 1998;13:1360-9.
- [18]. De Luca, H.F., Cantorna, M.T. (2001). Vitamin D: its role and uses in immunology. *FASEB J* 2001; 15:2579-85.
- [19]. Deuster, E., Jeschke, U., Ye, Y., Mahner, S. ve Czogalla B. (2017). Vitamin D and VDR in Gynecological Cancers. A Systematic Review. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18, 2328.
- [20]. Vigano, P., Lattuada, D., Mangioni, S., et al. Cycling and early pregnant endometrium as a site of regulated expression of the vitamin D system. *J Mol Endocrinol.* 2006;36(3):415-424.
- [21]. Vienonen, A., Miettinen, S., Blauer, M. ve diğerleri. (2004). Expression of nuclear receptors and cofactors in human endometrium and myometrium. *J Soc Gynecol Investig.* 2004;11(2):104-112.
- [22]. Kutluk, T., Kars, A. (1992) Kanser konusunda genel bilgiler. *Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu Yayınları*, Ankara.
- [23]. Ata, N. (2005). Kanser hakkında bilmeniz gerekenler. *Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi Dergisi. İmpress Baskı Tesisleri.* 2005; 5-15.
- [24]. Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., Bray, F. (2013). *Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 11.* Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. 16/01/2017 tarihinde <http://globocan.iarc.fr> adresinden erişildi.
- [25]. Türkiye Kanser İstatistikleri (2017). 17.12.2017 tarihinde [http://kanser.gov.tr/Dosya/ca\\_istatistik/2014-RAPOR\\_uzun.pdf](http://kanser.gov.tr/Dosya/ca_istatistik/2014-RAPOR_uzun.pdf) adresinden erişildi.
- [26]. Bray, F., Znaor, A., Cueva, P., Korir, A., Swaminathan, R., Ullrich, A., Wang, S.A., Parkin, D.M. *Planning and Developing Population-Based Cancer Registration in Low- and Middle-Income Settings IARC Technical Publication No. 43.* 17/12/2017 tarihinde [http://www.iarc.fr/en/publications/pdfonline/treportpub/treportpub43/IARC\\_Technical\\_Report\\_No43\\_1.pdf](http://www.iarc.fr/en/publications/pdfonline/treportpub/treportpub43/IARC_Technical_Report_No43_1.pdf) adresinden erişildi.
- [27]. Türkiye BilimLer Akademisi. Çağın hastalığı kanser. 17/12/2017 tarihinde <http://www.tuba.gov.tr/> adresinden erişildi.
- [28]. Demirer, T., Olgun, N., Özet, A. (2014). TÜBA Ulusal Kanser Politikaları Çalıştay Raporu. (2014, Haziran 27-28).
- [29]. Arıcan, E. Kanser Biyolojisi. (2013). 17.12.2017 tarihinde <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:aXzDAnTqlDsJ:aves.istanbul.edu.tr/ImageOfByte.aspx%3FResim%3D8%26SSNO%3D40%26USER%3D2222+&cd=1&hl=tr&ct=clnk&gl=tr> adresinden erişildi.
- [30]. Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, (2011, March 4).

- [31]. Molecular Biology of The Cell. Fifth Edition. (2008). 17.12.2017 tarihinde <http://slideplayer.biz.tr/slide/2540273/> adresinden erişildi.
- [32]. The Cell. Third Edition. Figure 15.8 (2003).
- [33]. Çetin, A. (2013). Kanser Tedavisinde Yeni Yaklaşımlar. Yayınlanmış Farmasötik Kimya Anabilim Dalı Bitirme Ödevi. Erciyes Üniversitesi, Kayseri.
- [34]. Hanahan, D. ve Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. Cell 2000; 100: 57-70.
- [35]. Değişli, C. M. (2010) Kemik Metastazı Olan Meme Manserli Hastalarda Verilen D Vitamini Tedavisinin Dolaşımdaki HSP-90 ve CK-18 Düzeyleri Üzerine Etkisi. Yayınlanmış Doktora Tezi. Selçuk Üniversitesi, Konya.
- [36]. Kotil, G. (2005). Benign ve malign endometrial patolojilerde power doppler ultrasonografi ile mikrodamar yoğunluğunun korelasyonu. Dr. Lütfi Kırdar Kartal eğitim ve araştırma hastanesi.Yayınlanmış uzmanlık tezi.
- [37]. Gizzo, S., Patrelli, T.S. ve diğerleri. (2016).Coexistence of adenomyosis and endometrioid endometrial cancer: Role in surgical guidance and prognosis estimation. Oncology Letters 11: 1213-1219, 2016.
- [38]. How common is endometrial cancer? American Cancer Society. 18.12.2017 tarihinde <https://www.cancer.org/cancer/endometrial-cancer/about/key-statistics.html> adresinden erişildi.
- [39]. Fidan, F., Alkan, B.M. ve Tosun, A. (2014). Çağın Pandemisi: D Vitamini Eksikliği ve Yetersizliği. Türk Osteoporoz Dergisi 2014;20: 71-4.
- [40]. Sharan, C., Halder, S.K., Thota, C., ve diğerleri. (2011). Vitamin D inhibits proliferation of human uterine leiomyoma cells via catechol-O-methyltransferase. Fertil Steril 2011;95:247-53
- [41]. Liu, J.J., Bertrand, K.A. ve diğerleri. (2013). Prospective analysis of vitamin D and endometrial cancer risk. Annals of Oncology 24: 687-692, 2013
- [42]. Hossein-Nezhad, A., Holick, M.F. (2013). Vitamin D for health: a global perspective. Mayo Clin Proc 2013;88:720-55.
- [43]. Garland, C.F., Gorham, E.D. ve diğerleri. (2006). The role of vitamin D in cancer prevention. Am J Public Health 2006; 96: 252-261.
- [44]. Garland, C.F., Gorham, E.D., Mohr, S.B. ve diğerleri. (2009). Vitamin D for cancer prevention: global perspective. Ann Epidemiol 2009; 19: 468-483.
- [45]. Heath, K.M., Elovic, E.P. (2006). Vitamin D Deficiency: Implications in the Rehabilitation Setting. Am J PhysMedRehabil, 2006;85:916-923.
- [46]. Holick, M.F. (2007). Vitamin D Deficiency Medical Progress. N Engl J Med 2007;357:266-81
- [47]. Holick, M.F. (2006). High Prevalence of Vitamin D Inadequacy and Implications for Health. Mayo ClinProc. 2006;81:353-373.

- [48]. Gökalp Özkorkmaz, E. (2009). Vitamin D ve Biyolojik Önemi. *Biyoloji BilimLeri Araştırma Dergisi* 2 (2): 11-15, 2009.
- [49]. Vitamin-D-metabolism. 20.12.2017 tarihinde <https://gettingstronger.org/2012/11/why-i-dont-take-vitamin-d-supplements/vitamin-d-metabolism/> adresinden erişildi.
- [50]. Zempleni, J. ve diğerleri. (2008). *Handbook of vitamins*. 4th ed. CRC Press. New York. 608 p.
- [51]. Vitamin D metabolic pathways. 20.12.2017 tarihinde [https://www.researchgate.net/figure/Vitamin-D-metabolism-pathway-Proteins-with-genetic-polymorphisms-associated-with-vitamin\\_264631440](https://www.researchgate.net/figure/Vitamin-D-metabolism-pathway-Proteins-with-genetic-polymorphisms-associated-with-vitamin_264631440) tarihinde erişildi.
- [52]. Bikle, D. (2014). Vitamin D Metabolism, Mechanism of Action, and Clinical Applications. *Chem Biol*. 2014 March 20; 21(3): 319-329.
- [53]. Posner, G.H., Helvig, C., Cuerrier, D., Collop, D., Kharebov, A., Ryder, K., Epps, T., Petkovich, M. (2010). Vitamin D analogues targeting CYP24 in chronic kidney disease. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*. 2010; 121:13-19.
- [54]. Öngen B, Kabaroğlu C, Parıldar Z. (2008). D Vitamini'nin Biyokimyasal ve Laboratuvar Değerlendirmesi. *Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Türk Klinik Biyokimya Dergisi* 2008; 6: 23-31.
- [55]. Wang, Y., Zhu, J., DeLuca, H.F. (2012). Where is the vitamin D receptor? *Arch Biochem Biophys* 2012;523:123-133.
- [56]. Wang, T.J., Pencina, M.J., Booth, S.L. ve diğerleri. (2008). Vitamin D Deficiency and Risk of Cardiovascular Disease, *Circulation*. 2008;117:503-511
- [57]. Lee, J.H., O'Keefe, J.H., Bell, D., Hensrud, D.D., Holick, M.F. (2008). Vitamin D Deficiency- An Important, Common, and Easily Treatable Cardiovascular Risk Factor? *J Am Coll Cardiol*. 2008; 52:1949-56
- [58]. Contribution Of vitamin D To Good Health. 22.12.2017 tarihinde [https://www.vitaminwiki.com/tiki-download\\_wiki\\_attachment.php?attId=435](https://www.vitaminwiki.com/tiki-download_wiki_attachment.php?attId=435) adresinden erişildi.
- [59]. Vitamin D: A Rapid Review. 22.12.2017 tarihinde [https://www.medscape.com/viewarticle/589256\\_8](https://www.medscape.com/viewarticle/589256_8) adresinden erişildi.
- [60]. International Meeting of Vitamin D Scientists Reveals Most Not Getting Enough to Maintain Health. 22.12.2017 tarihinde <http://newsroom.ucr.edu/1321> adresinden erişildi.
- [61]. Kıldır, V. (2013). D Vitamininin kardiyovasküler ve metabolik etkileri. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*. 2013; 4 (3): 398-404
- [62]. Cashman, K.D. ve diğerleri. (2016). Vitamin D deficiency in Europe: pandemic?. *Am J Clin Nutr* 2016;103:1033-44.
- [63]. Türkiye'de D vitamini eksikliği var. 23.12.2017 tarihinde <http://aa.com.tr/tr/saglik/turkiyede-d-vitamini-eksikligi-var/669650> adresinden erişildi.
- [64]. Satman, İ., Özbey, N. C. Ve diğerleri. (2011). Prevalence of Vitamin D Deficiency and Associated Factors in Turkey. *The Endocrine Society. J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96:1911.



- [65]. Osteoporoz ve Diğer Metabolik Kemik Hastalıkları Çalışma Grubu. (2012). Metabolik Kemik Hastalıkları Tanı ve Tedavi Kılavuzu. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği.
- [66]. Lavie, C.J., Lee, J.H., Milani, R.V. (2011). Vitamin D and Cardiovascular Disease Will It Live Up to its Hype? *Journal of the American College of Cardiology*, 2011; 58:1547-56.
- [67]. Wacker, M., Holick, M.F. (2013). Vitamin D-Effects on Skeletal and Extraskeletal Health and the Need for Supplementation. *Nutrients* 2013;5:111-48.
- [68]. Apperly, F.L. (1941). The relation of solar radiation to cancer mortality in North American. *Cancer Res* 1941;1;191-195
- [69]. Garland, F.C. (1980). Do sunlight and vitamin D reduce the likelihood of colon cancer? *Int J epidemiol* 1980;9:227-231
- [70]. Larsen, E.R., Mosekilde, L., Foldspang, A. (2004). Vitamin D and calcium supplementation prevents osteoporotic fractures in elderly community dwelling residents:a pragmatic population-based 3-year intervention study. *J Bone Miner Res* 2004; 19: 370.
- [71]. Ahonen, M.H., Tenkanen, L., Teppo, L., Hakama, M., Tuohimaa, P. (2000). Prostate cancer risk and prediagnostic serum 25-hydroxyvitamin D levels (Finland). *Cancer Causes Control* 2000;11:847-52.
- [72]. Bertone-Johnson, E.R., Chen, W.Y., Holick, M.F., Hollis, B.W., Colditz, G.A., Willett, W.C. ve diğerleri. (2005). Plasma 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:1991-7.
- [73]. Garland, C.F., Comstock, G.W., Garland, F.C., Helsing, K.J., Shaw, E.K., Gorham, E.D. (1989). Serum 25-hydroxyvitamin D and colon cancer: eightyyear prospective study. *Lancet* 1989;2:1176-8.
- [74]. Garland, C.F., Gorham, E.D., Mohr, S.B., Garland, F.C. (2009). Vitamin D for cancer prevention: global perspective. *Ann Epidemiol* 2009;19:468-83.
- [75]. Lappe, J.M., Travers-Gustafson, D., Davies, K.M., Recker, R.R., Heaney, R.P. (2007). Vitamin D and calcium supplementation reduces cancer risk: results of a randomized trial. *Am J Clin Nutr* 2007;85:1586-91.
- [76]. Burgi, A.A., Gorham, E.D., Garland, C.F., Mohr, S.B., Garland, F.C., Zeng, K. ve diğerleri. (2011). High serum 25-hydroxyvitamin D is associated with a low incidence of stress fractures. *J Bone Miner Res* 2011;26:2371-7.
- [77]. Sözen T. (2011). D Hormonu: Güncel Gelişmeler, *Hacettepe Tıp Dergisi* 2011; 42:14-27
- [78]. Wu, K., Feskanich, D., Fuchs, C.S., Willett, W.C., Hollis, B.W., Giovannucci, E.L. (2007). A nested case control study of plasma 25 hydroxyvitamin D concentrations an risk of colorectal cancer. *J Natl Cancer Ins* 2007; 99:1120-9.
- [79]. Jenab, M., Bueno-de-Mesquita, H.B., Ferrari, P., Van Duijnhoven, F.J., Norat, T., Pischon, T. Ve diğerleri. (2010). Association between pre-diagnostic circulating vitamin D concentration and risk of colorectal cancer in European populations:a nested case-control study. *BMJ*. 2010 Jan 21;340:b5500.

- [80].Sofi, N.Y. ve diğerleri. (2017). Reproductive factors, nutritional status and serum 25(OH)D levels in women with breast cancer: A case control study. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2018 Jan;175:200-204.
- [81]. Bauer, S.R., Hankinson, S.E., Bertone-Johnson, E.R., Ding, E.L. (2013). Plasma vitamin D levels, menopause, and risk of breast cancer: dose-response meta-analysis of prospective studies. *Medicine.* 2013 May;92(3):123-31.
- [82].Chlebowski, R.T., Johnson, K.C., Kooperberg, C., Pettinger, M., Wactawski-Wende, J., Rohan, T., Rossouw, J., Lane, D., O'Sullivan, M.J., Yasmeen, S., Hiatt, R.A., Shikany, J.M., Vitolins, M., Khandekar, J., Hubbell, F.A. (2008). Women's Health Initiative Investigators. Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2008 Nov 19;100(22):1581-91.
- [83]. Arem, H. ve diğerleri. (2015). Vitamin D metabolic pathway genes and pancreatic cancer risk. *PLoS One.* 2015 Mar 23;10(3):e0117574.
- [84].Barreto, S.G. ve Neale, R.E. (2015). Vitamin D and pancreatic cancer. *Cancer Lett.* 2015 Nov 1;368(1):1-6.
- [85].Huang, J.D., Dong, C.H. ve diğerleri. (2017). Circulating 25-hydroxyvitamin D level and prognosis of lung cancer patients: A systematic review and meta-analysis. *Bull Cancer.* 2017 Jul - Aug;104(7-8):675-682.
- [86].Pandolfi, F. ve diğerleri. (2017). Immune Modulation by Vitamin D: Special Emphasis on Its Role in Prevention and Treatment of Cancer. *Clin Ther.* 2017 May;39(5):884-893.
- [87]. Baysal, K., Serhatlı, M., Adıgüzel, Z., ve diğerleri. (2008). İleri moleküler hücre biyolojisi teknikleri eğitimi. TÜBİTAK MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, Kocaeli, 12-16 Mayıs 2008; 5-14.
- [88]. Tiftik, R.N. (2005). Sıçan koroner mikrovasküler endotel hücre kültüründe rho/rho kinazyolağı ve nitrik oksid ilişkisi. Yayınlanmış yüksek lisans tezi, Mersin.
- [89]. Tamm, K., Room, M. Ve diğerleri. (2009). Genes targeted by the estrogen and progesterone receptors in the human endometrial cell lines HEC1A and RL95-2. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2009, 7:150.
- [90]. Harduf, H., Goldman, S., Shalev, E. (2007). Human uterine epithelial RL95- 2 and HEC-1A cell-line adhesiveness: the role of plexin B1. *Fertil Steril* 2007, 87(6):1419-1427.
- [91]. Harduf, H., Goldman, S., Shalev, E. (2009). Progesterone receptor A and c- Met mediates spheroids-endometrium attachment. *ReprodBiol Endocrinol* 2009, 7:14.
- [92]. Cong, L., Gasser, J. ve diğerleri. (2007). Human adiponectin inhibits cell growth and induces apoptosis in human endometrial carcinoma cells, HEC-1-A and RL95-2. *Endocrine-Related Cancer* (2007) 14 713–720.
- [93]. Yaginuma, Y., Westphal, H. (1991). Analysis of the p53 gene in human uterine carcinoma cell lines. *Cancer Res.* 15;51(24): 6506-9, 1991.
- [94]. Ken, N., Wang, X., Xu, X., Abassi, Y. (2011). The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability. *Methods Mol Biol* 2011;740: 33-43.

- [95]. Özdemir, A., Ark, M. (2013). xCELLigence Real Time Cell Analysis System: A New Method for Cell Proliferation and Cytotoxicity. *Niche*, 2013; 2: 15-7.
- [96]. xCELLigence RTCA Systems. 25/03/2017 tarihinde <https://aceabio.com/products/xcelligence-rtca/> adresinden erişildi.
- [97]. 23/05/2017 tarihinde [https://catalog2.corning.com/lifeSciences/enUS/Shopping/ProductDetails.aspx?productid=3524\(lifesciences\)](https://catalog2.corning.com/lifeSciences/enUS/Shopping/ProductDetails.aspx?productid=3524(lifesciences)) adresinden erişildi.
- [98]. Keren, I., Hulkower, R.L. (2011). Herber. Cell Migration and Invasion Assays as Tools for Drug Discovery. *Pharmaceutics* 2011, 3(1), 107-124;
- [99]. Jiang, F., Liu, T., He, Y., Yan, Q., Chen, X., Wang, H., Wan, X. (2011). MiR-125b promotes proliferation and migration of type II endometrial carcinoma cells through targeting TP53INP1 tumor suppressor in vitro and in vivo. *BMC Cancer* 2011;11:425.
- [100]. Thill, M. ve diğerleri. 2015. Vitamin D Inhibits Ovarian Cancer Cell Line Proliferation in Combination with Celecoxib and Suppresses Cyclooxygenase-2 Expression. *Anti Cancer Research* 35: 1197-1204 (2015).
- [101]. Gonzalez-Duarte, R.J. ve diğerleri. 2015. The expression of rna helicase ddx5 is transcriptionally upregulated by calcitriol through a vitamin D response element in the proximal promoter in siha cervical cells. *Mol. Cell. Biochem.* 2015, 410, 65–73.
- [102]. Gonzalez-Duarte, R.J. ve diğerleri. 2015. Calcitriol increases dicer expression and modifies the micrnas signature in siha cervical cancer cells. *Biochem. Cell Biol.* 2015, 93, 376–384.
- [103]. Wang, G. ve diğerleri. 2014. Calcitriol inhibits cervical cancer cell proliferation through downregulation of hccr1 expression. *Oncol. Res.* 2014, 22, 301–309.
- [104]. Avila, E., Garcia-Becerra, R. ve arkadaşları. 2010. Calcitriol down-regulates human ether a go-go 1 potassium channel expression in cervical cancer cells. *Anticancer. Res.* 2010, 30, 2667–2672.
- [105]. Yabushita, H., Hirata, M., Noguchi, M. and Nakanishi, M. 1996. Vitamin D receptor in endometrial carcinoma and the differentiation inducing effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on endometrial carcinoma cell lines. *Obstet Gynaecol Res* 22: 529-539, 1996.
- [106]. Zinser GM and JE Welsh: Vitamin D receptor status alters mammary gland morphology and tumorigenesis in MMTV-neu mice. *Carcinogenesis* 25: 2361-2372, 2204
- [107]. Becker, S. ve diğerleri. 2007. Expression of 25 hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase in human endometrial tissue. *J Steroid Biochem Mol Biol* 103: 771-775, 2007.
- [108]. Vienonen, A. ve diğerleri. 2004 Expression of nuclear receptors and cofactors in human endometrium and myometrium. *J Soc Gynecol Investig* 11: 104-112, 2004.
- [109]. Wu, G., Fan, R.S., Li, W., Ko, T.C. and Brattain, M.G. 1997. Modulation of cell cycle control by vitamin D3 and its analogue, EB1089, in human breast cancer cells. *Oncogene* 15: 1555-1563, 1997.
- [110]. Welsh, J., Simboli-Campbell, M., Narvaez, C.J. and Tenniswood, M. 1995. Role of apoptosis in the growth inhibitory effects of vitamin D in MCF-7 cells. *Adv Exp Med Biol* 375: 45-52, 1995.

- [111]. Lee, L.R. ve diğerleri. (2013). Progesterone enhances calcitriol antitumor activity by up-regulating vitamin D receptor expression and promoting apoptosis in endometrial cancer cells. *Cancer Prev Res (Phila)* 6: 731-743, 2013.
- [112]. Trump, D.L. ve diğerleri. 2004. Anti-tumor activity of calcitriol: pre-clinical and clinical studies. *J Steroid Biochem Mol Biol* 89-90: 519-526, 2004
- [113]. Ylikomi, T. ve diğerleri. 2002. Antiproliferative action of vitamin D. *Vitam Horm* 64: 357-406, 2002.
- [114]. Simboli-Campbell, M. ve diğerleri. 1997. Comparative effects of 1,25(OH)2D3 and EB1089 on cell cycle kinetics and apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 42: 31-41, 1997.
- [115]. Agic, A. ve diğerleri. 2007. Relative Expression of 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Receptor, Vitamin D 1 $\alpha$ -Hydroxylase, Vitamin D 24 Hydroxylase, and Vitamin D 25 Hydroxylase in Endometriosis and Gynecologic Cancers. *Reproductive Sciences* Vol. 14 No. 5 July 2007 486-497.
- [116]. Chen, L. Ve diğerleri. 2018. 1,25-Dihydroxy vitamin D prevents tumorigenesis by inhibiting oxidative stress and inducing tumor cellular senescence in mice. *Int J Cancer*. 2018 Feb 14.
- [117]. Chiang, K.C. ve diğerleri. 2017. 1 $\alpha$ ,25(OH)2D3 Analog, MART-10, Inhibits Neuroendocrine Tumor Cell Metastasis After VEGF-A Stimulation. *Anticancer Res*. 2017 Nov;37(11):6215-6221.
- [118]. Yingyu, M. Ve diğerleri. 2017. 1,25D3 differentially suppresses bladder cancer cell migration and invasion through the induction of miR-101-3p. *Oncotarget*. 2017 Jul 27;8(36):60080-60093.
- [119]. Amir, E. ve diğerleri. 2010. A Phase 2 Trial Exploring the Effects of High-Dose (10,000 IU/Day) Vitamin D3 in Breast Cancer Patients With Bone Metastases. *Cancer* 2010;116:284-91.
- [120]. Penna, F. Ve diğerleri. 2017. The role of vitamin D in cancer cachexia. *Curr Opin Support Palliat Care*. 2017 Dec;11(4):287-292.
- [121]. Tunç, M. 2011. Yüksek doz metilprednizolon alan akutidiyopatik trombositopenik purpuralı hastalarda yüksek doz steroidinkardiyovasküler etkileri. Yayınlanmış uzmanlık tezi, Malatya.

**ÖZGEÇMİŞ**

**Adı ve Soyadı** :İbrahim DUMAN  
**Doğum Tarihi** :22.11.1985  
**Cep Telefonu** :0 (555) 8054691  
**E-mail** : ibrahimduman@mersin.edu.tr

**Öğrenim Durumu** :

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Sağlık Memurluğu	Celal Bayar Üniversitesi	2004-2008
Yüksek Lisans	Tıbbi Farmakoloji	Mersin Üniversitesi	2013-2018

**Görevler** :

Görev Ünvanı	Görev Yeri	Yıl
Klinik Hemovijilans Sorumlusu	Çocuk Acil Servisi	2018- Halen
Kuduz Saha Rehberi Uygulayıcısı	Çocuk Acil Servisi	2015- Halen
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği Klinik Rehber Eğitmeni	Meü. Sağlık Yüksekokulu/ Meü. Hastanesi Çocuk Acil	2014-Halen
Sorumlu Hemşire	Çocuk Acil Servisi	2014- Halen
Yaşlı Bakımı Programı Rehber Eğitmeni	Meü. Sağlık Meslek Hizmetleri Yüksekokulu/Meü. Hastanesi	2013- Halen
Süpervisior	Meü. Hastanesi Başhemşirelik	2012-2014

**Dersler** :

Ders Kodu	Ders	Yüksekokul/Üniversite	Bölüm	Yıl
HEM432 HEM312	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği Klinik Uygulamaları	Meü. Sağlık Yüksekokulu /Meü. Hastanesi	Hemşirelik Bölümü	2014- Halen
YAS214 YAS215	Yaşlı Bakım Uygulamaları	Meü. Sağlık Meslek Hizmetleri Yüksekokulu /Meü. Hastanesi	Yaşlı Bakım Bölümü	2013- Halen

**Seminer** :

Adı	Kurum	Yıl
Kalite Yönetim sistemi Temel Eğitimi	Türk Standartları Enstitüsü TS EN ISO 9001	20/06/2012
Kalite Yönetim sistemi Dokümantasyon Eğitimi	Türk Standartları Enstitüsü TS EN ISO 9001	05/06/2013
Kalite Yönetim sistemi İç Tetkik Eğitimi	Türk Standartları Enstitüsü TS EN ISO 9001	06/06/2013
Klinik Uygulamalarda Rehberlik	Meü. Sağlık Yüksekokulu	01/10/2015
Reiki	Gülüm Omay	21/11/2015
Masör-Masöz	Milli Eğitim Bakanlığı	22/04/2016
Türk İşaret Dili	Milli Eğitim Bakanlığı,	12/07/2017

**Katılım** :

<b>Adı</b>	<b>Kurum</b>	<b>Yıl</b>
20. Mersin Pediatri Günleri	Mersin Üniversitesi	30/03/2018
Kateter Bakım Sanatı	Meü. Sağlık Yüksekokulu	07/03/2017
19. Mersin Pediatri Günleri	Mersin Üniversitesi	25/03/2017
7. Uluslararası Farmakoloji Kongresi	EPHAR2016	26/06/2016
Nitel araştırma Kursu	Meü. Sağlık Yüksekokulu	03/03/2016
5. Ulusal Kök Hücre Öğrenci Kongresi	Mersin Üniversitesi	27/02/2016
IV. Temel Sağlık H. Sempozyumu	Celal Bayar Üniversitesi	13/04/2008

