



**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**MEME KANSERİNİN METASTAZINDA
SFİNGOZİN 1-FOSFAT VE RESEPTÖRLERİNİN ROLÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İBRAHİM UĞUR ÇALIŞ

DANIŞMAN

DOÇ. DR. DİDEM TURGUT COŞAN

OCAK-2016



**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**MEME KANSERİNİN METASTAZINDA
SFİNGOZİN 1-FOSFAT VE RESEPTÖRLERİNİN ROLÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İBRAHİM UĞUR ÇALIŞ

DANIŞMAN

DOÇ. DR. DİDEM TURGUT COŞAN

PROJE NO: 2015-467

KABUL VE ONAY SAYFASI

İBRAHİM UĞUR ÇALIŞ'ın Yüksek Lisans Tezi olarak hazırladığı "MEME KANSERİ METASTAZINDA SFİNGOZİN 1-FOSFAT VE RESEPTÖRLERİNİN ROLÜ" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "**KABUL**" edilmiştir.

Tarih
19 / 01 / 2016

Üye: Prof. Dr. Hasan Veysi GÜNEŞ

Üye: Prof. Dr. İrfan DEĞİRMENCI

Üye: Doç. Dr. Hülyam KURT

Üye: Doç. Dr. Didem TURGUT COŞAN

Üye: Yrd.Doç. Dr. Evrim METCALFE

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 21/01/2016 tarih ve 1675043 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hasan Veysi GÜNEŞ
Enstitü Müdürü

ÖZET

Sfingomyelin (SM), seramid, sfingozin ve sfingozin-1-fosfat (S1P) gibi hücre zarının akışkanlığının düzenlenmesinde önemli yapısal rol oynayan sfingoid tabanlı lipit ailesinin üyeleri olan sfingolipidler kanserin çeşitli aşamalarında etkili olmaktadır.

Meme kanseri kadınlar arasında görülen en ölümcül kanserlerden biridir. Kanser metastazı meme kanserli hastalarda kötü prognoz için önemli bir nedendir. Kanser, etrafını saran dokunun parçalanmasıyla kolaylaşan bölgesel invazyon, hücrelerin primer tümörden ayrılması, dolaşım (kan ve lenf) içine girmesi, ekstrasvazasyon, tekrar tutunma ve son olarak da anjiyogez gibi hücrel davranışların karmaşık serilerinden oluşur.

Bu tezde kullanılan MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri farklı karakterlere sahip hücrelerdir. Bu hücrelerden MCF-7 hücreleri östrojen duyarlı ve zayıf invaziv, diğer hücre dizisi MDA-MB-231 hücreleri ise östrojen duyarsız ve güçlü invaziv hücrelerdir. Bu farklı özellikleri nedeniyle, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri normal meme kanseri ve metastatik meme kanseri için model olarak seçilmiştir. Araştırmada MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinden 5'er grup oluşturuldu. Kontrol, non-target (hedefe yönelik olmayan siRNA, NT), S1P1'i susturulan grup, S1P3'ü susturulan grup ve S1P1 ile S1P3'ü birlikte susturulan gruplarda, uygulamanın 24,48 ve 72. saatlerindeki hücrelerin çoğalma (proliferasyon), tutunma (adezyon), canlılık (viability) ve lateral motiliteleri belirlendi.

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde tüm saatlerde S1P1 ile S1P3'ün tek tek ve birlikte susturması ile gruplardaki hücrelerin % canlılığının azaldığı gözlemlendi. MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunda önemli bir değişiklik belirlenmezken, MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyonunda S1P1 ile S1P3'ü birlikte susturulduğu grupta istatistiksel olarak anlamlı azalmalar tespit edildi. MCF-7 hücrelerinin adezyonunda S1P1 ile S1P3'ü birlikte susturulduğu grupta azalma gözlenirken, MDA-MB-231 hücrelerinde S1P1 ile S1P3'ü birlikte susturulduğu grup adezyonu artırmıştır. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin lateral motilitesi her iki hücrede her saatte S1P1'in, S1P3'ün ve S1P1 ile S1P3'ü birlikte susturulan gruplarda istatistiksel olarak azalttı.

S1P ve reseptörlerinin kanser ilerlemesi ve metastazında kritik rolleri vardır. Meme kanserinde bu moleküller arasındaki etkileşim, hasta sağkalım oranının düşmesi ve ilaç direnci gelişiminden sorumlu tutulmaktadır. Bu ilişkinin anlaşılmasıyla S1P ve reseptörlerini inhibe edici yeni terapötik ajanların keşfi kanser ve metastazına karşı yeni terapötik stratejiler için fırsat sunabilecektir.

Anahtar Kelimeler: S1P, S1P1, S1P3, siRNA, Meme Kanseri, MDA-MB-231, MCF-7

SUMMARY

Sphingolipids such as sphingomyelin (SM), ceramide, sphingosine and sphingosine-1-phosphate (S1P), which belong to the sphingoid based lipid family, have important structural functions in regulation of cell membrane fluidity, and they play role in various stages of cancer.

Breast cancer is one of the most lethal cancers of women. Cancer metastasis is an important cause of poor prognosis in patients with breast cancer. Cancer, separation of cells from the primary tumor involves a series of complex cellular behaviors such as local invasion facilitated by breakdown of surrounding tissue, entry into circulation (blood or lymph), search, extravasation, reattachment, and finally angiogenesis.

MCF-7 and MDA-MB-231 cells used in this thesis have different characteristics. MCF-7 cells are estrogen-sensitive and weakly invasive, while MDA-MB-231 cells are estrogen-non-sensitive and strongly invasive. Owing to their different properties, MCF-7 and MDA-MB-231 cells were selected as models for normal breast cancer and metastatic breast cancer. In this study five groups were created from each of MCF-7 and MDA-MB-231 cells. Control, non-target (non-targeted-siRNA, NT), S1P1 suppressed group, S1P3-suppressed group, S1P1 and S1P3-suppressed groups were examined for cellular proliferation, adhesion, viability and lateral motility at 24th, 48th and 72nd hours of application.

In MCF-7 and MDA-MB-231 cells, % viability of the cells in groups was found to be reduced at all hours, by suppression of S1P1 and S1P3 either alone or together. While there was no significant change in proliferation of MCF-7 cells, proliferation of MDA-MB-231 cells showed statistically significant reduction in the S1P1-and-S1P3-suppressed group. While there was reduction in adhesion of MCF-7 cells in S1P1-and-S1P3-suppressed group, adhesion of MDA-MB-231 cells was increased in S1P1-and-S1P3-suppressed group. Lateral motility of both MCF-7 and MDA-MB-231 cells was statistically reduced in S1P1-suppressed, S1P3-suppressed and S1P1-and-S1P3-suppressed groups at every hours.

S1P and its receptors have critical roles in cancer progression and metastasis. Interaction between these molecules is held responsible for reduced survival rates and development of drug resistance in breast cancer. Through understanding this interaction, discovery of new therapeutic agents to inhibit S1P and its receptors would provide opportunities for new therapeutic strategies against cancer and its metastasis.

Key Words: S1P, S1P1, S1P3, siRNA, Breast Cancer, MDA-MB-231, MCF-7

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iii
SUMMARY	v
TABLO DİZİNİ	viii
ŞEKİL DİZİNİ	ix
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanser.....	3
2.2 Meme Kanseri Epidemiyolojisi	15
2.3. Sfingolipitler	16
2.4. Sfingozin 1-Fosfat ve Kanser	23
2.5.Kodlamayan RNA'lar (Non-coding RNAs)	23
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	27
3.1. Hücrelerin Kültüre Edilmesi	27
3.2. Hücrelerde Standart Eğri Oluşturulması	27
3.3. Deney Gruplarının Oluşturulması.....	28
3.4. siRNA ile Gen Susturma İşlemi.....	28
3.5. Hücrelerden Total RNA İzolasyonu.....	28
3.6. Elde Edilen RNA'lardan cDNA Oluşturulması.....	29
3.7. qPCR.....	29
3.8. Canlılık belirlemeleri	30
3.9. XTT (2,3-Bis(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide	31
3.10. Çoğalma (Proliferasyon) Belirlemeleri	31

3.11. Tutunma (Adezyon) Belirlemeleri	31
3.12. Lateral Motilite (Wound Healing) Belirlenmesi	32
3.13. İstatiksel Analiz.....	33
4. BULGULAR.....	34
4.1. Hücrelerde S1P1 ve S1P3 Reseptörleri İçin siRNA ile	34
Gen Susturma İşleminin Doğrulanması.....	34
4.2. Standart Eğrileri	34
4.3. Hücrelerde Çoğalmanın (Proliferasyon) Belirlenmesi	36
4.4. Hücrelerde Tutunmanın (Adezyon) Belirlenmesi	40
4.5. Hücrelerde Lateral Motilitenin (Wound Healing) Belirlenmesi.....	44
4.6. Hücrelerde Canlılığın Belirlenmesi.....	49
5. TARTIŞMA	59
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	64
KAYNAKLAR DİZİNİ	65
KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR).....	66
KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR).....	67
KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR).....	68
KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR).....	69
KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR).....	70
KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR).....	71

TABLO DİZİNİ

Tablo 3.1 Kullanılan Gen Bölgeleri.....	29
Tablo 4.1 Susturma işlemi sonrasında MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücrelerinde Saatlere Göre S1P1 Gen Ekspresyon Seviyeleri.....	34
Tablo 4.2 Susturma işlemi sonrasında MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücrelerinde Saatlere Göre S1P3 Gen Ekspresyon Seviyeleri.....	34
Tablo 4.3 MCF-7 Hücrelerinde 24, 48 ve 72.Saatlerde Çoğalma (Proliferasyon).....	36
Tablo 4.4 MDA-MB-231 Hücrelerinde 24, 48 ve 72.Saatlerde Çoğalma (Proliferasyon).....	38
Tablo 4.5 MCF-7 hücrelerinde 24, 48 ve 72.Saatlerde Tutunma (Adezyon).....	40
Tablo 4.6 MDA-MB-231 Hücrelerinde 24, 48 ve 72.Saatlerde Tutunma (Adezyon).....	42
Tablo 4.7 24. Saat MCF-7 Hücrelerinde Canlılık.....	50
Tablo 4.8 48. Saat MCF-7 Hücrelerinde Canlılık.....	50
Tablo 4.9 72. Saat MCF-7 Hücrelerinde Canlılık.....	50
Tablo 4.10 24. Saat MDA-MB-231 Hücrelerinde Canlılık.....	55
Tablo 4.11 48. Saat MDA-MB-231 Hücrelerinde Canlılık.....	55
Tablo 4.12 72. Saat MDA-MB-231 Hücrelerinde Canlılık.....	55

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.1 Vaskülogenez ve Anjiyogenez Oluşum Mekanizmaları.....	6
Şekil 2.2 Endotel Hücrelerinin Anjiyojenik Sinyallere Oluşturduğu Yanıt	7
Şekil 2.3 Kanserde Metastaz Gelişimi	10
Şekil 2.4 Meme Kanseri Çeşitleri ve Oluştugu Yerler.....	13
Şekil 2.5 Hücre Zarı Lipit Bileşenleri ve Bunların Endoplazmik Retikulumdaki Sentezi.....	17
Şekil 2.6 Sfingolipit Metabolizması Şeması	17
Şekil 2.7 S1P Reseptörlerinin Sinyal Yolları Şematiği	21
Şekil 2.8 siRNA ile Gen Susturma İşleminin Şematik Gösterimi.....	25
Şekil 3.1 Çalışmamızda Kullanılan Meme Kanseri Hücreleri. A; MCF-7, B; MDA-MB-231.....	27
Şekil 3.2 Lateral Motilite İçin Petri Tabanı Çizimi.....	30
Şekil 4.1 MCF-7 Standart Eğri Grafiği	35
Şekil 4.2 MDA-MB-231 Standart Eğri Grafiği.....	35
Şekil 4.3 MCF-7 Hücrelerinde 24. saat Çoğalma (Proliferasyon)	37
Şekil 4.4 MCF-7 Hücrelerinde 48. Saat Çoğalma (Proliferasyon).....	37
Şekil 4.5 MCF-7 Hücrelerinde 72. Saat Çoğalma (Proliferasyon).....	37
Şekil 4.6 MDA-MB-231 Hücrelerinde 24. saat Çoğalma (Proliferasyon).....	39
Şekil 4.7 MDA-MB-231 Hücrelerinde 48. Saat Çoğalma (Proliferasyon)	39
Şekil 4.8 MDA-MB-231 Hücrelerinde 72. Saat Çoğalma (Proliferasyon)	39
Şekil 4.9 MCF-7 Hücrelerinde 24. saatte Tutunma (Adezyon)	41
Şekil 4.10 MCF-7 Hücrelerinde 48.Saat Tutunma (Adezyon).....	41
Şekil 4.11 MCF-7 Hücrelerinde 72.Saat Tutunma (Adezyon).....	41
Şekil 4.12 MDA-MB-231 Hücrelerinde 24.Saat Tutunma (Adezyon)	43

Şekil 4.13 MDA-MB-231 Hücrelerinde 48.Saat Tutunma (Adezyon)	43
Şekil 4.14 MDA-MB-231 Hücrelerinde 72.Saat Tutunma (Adezyon)	43
Şekil 4.15 MCF-7 Hücrelerinde 24.Saat Lateral Motilite	46
Şekil 4.16 MCF-7 Hücrelerinde 48.Saat Lateral Motilite	46
Şekil 4.17 MCF-7 Hücrelerinde 72.Saat Lateral Motilite	46
Şekil 4.18 MDA-MB-231 Hücrelerinde 24.Saat Lateral	48
Şekil 4.19 MDA-MB-231 Hücrelerinde 48.Saat Lateral Motilite	48
Şekil 4.20 MDA-MB-231 Hücrelerinde 72.Saat Lateral Motilite	48
Şekil 4.21 24. Saat MCF-7 Hücrelerinde Canlılık Sonuçları A:Kontrol Grubu B:NT Grubu C:S1P1'İ Susturulan Grup D: S1P3'ü Susturulan Grup E: S1P1 ile S1P3'ü Susturulan Grup.....	51
Şekil 4.22 48. Saat MCF-7 Hücrelerinde Canlılık Sonuçları A:Kontrol Grubu B:NT Grubu C:S1P1'İ Susturulan Grup D: S1P3'ü Susturulan Grup E: S1P1 ile S1P3'ü Susturulan Grup.....	52
Şekil 4.23 72. Saat MCF-7 Hücrelerinde Canlılık Sonuçları A:Kontrol Grubu B:NT Grubu C:S1P1'İ Susturulan Grup D: S1P3'ü Susturulan Grup E: S1P1 ile S1P3'ü Susturulan Grup.....	53
Şekil 4.24 24.Saat MDA-MB-231 Hücrelerinde Canlılık Sonuçları A:Kontrol Grubu B:NT Grubu C:S1P1'İ Susturulan Grup D:S1P3'ü Susturulan Grup E:S1P1 ile S1P3'ü Susturulan Grup	56
Şekil 4.25 48.Saat MDA-MB-231 Hücrelerinde Canlılık Sonuçları A:Kontrol Grubu B:NT Grubu C:S1P1'İ Susturulan Grup D:S1P3'ü Susturulan Grup E:S1P1 ile S1P3'ü Susturulan Grup	57
Şekil 4.26 72.Saat MDA-MB-231 Hücrelerinde Canlılık Sonuçları A:Kontrol Grubu B:NT Grubu C:S1P1'İ Susturulan Grup D:S1P3'ü Susturulan Grup E:S1P1 ile S1P3'ü Susturulan Grup	58

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

S1P	Sfingozin 1-Fosfat
S1PR	Sfingozin 1-Fosfat Reseptör
S1P1	Sfingozin 1-Fosfat Reseptör 1
S1P2	Sfingozin 1-Fosfat Reseptör 2
S1P3	Sfingozin 1-Fosfat Reseptör 3
S1P4	Sfingozin 1-Fosfat Reseptör 4
S1P5	Sfingozin 1-Fosfat Reseptör 5
CDK	Siklin Bağımlı Kinaz
CDI	Siklin Bağımlı İnhibitör
ERK	Ekstrasellüler Sinyal Düzenleyici Kinaz
DNA	Deoksiribonükleik Asit
SM	Sfingomiyelin
RNA	Ribonükleik Asit
PLC	Fosfolipaz C
IGF-1	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1
JAK/STAT	Janus Kinaz/Sinyal İletici Ve Transkripsyonu Aktive Edici
PI3K/AKT	Fosfatidilinositol-3-Kinaz/ V-Akt Mürin Timoma Viral Onkogen Homolog Kinaz
MAPK	Mitojenle Aktiflenen Protein Kinaz
PKC	Protein Kinaz
AKT/PKB	Serin/Treonin Spesifik Protein Kinaz
BRCA-2	Breast Cancer-2
PA	Fosfatidik Asit
miRNA	Mikro RNA
piRNA	PIWI-Interacting RNA
PTEN	Fosfat ve Tensin Homolog
HER-2	Human Epidermal Growth Factor 2
ER	Östrojen Reseptörü
LPA	Lizofosfatidik Asit
Ca⁺²	Kalsiyum
siRNA	Small İnterfering RNA
RNAi	RNA İnterferans
sRNA	Küçük RNA
dsRNA	Çift Sarmal RNA
snoRNA	Küçük Nükleolar RNA
RISC	RNA İndükleyen Susturma Kompleksi

mRNA	Mesajcı RNA
NF-kB	Nükleer Faktör Kappa Beta
SphK1	Sfingozin Kinaz 1
SphK2	Sfingozin Kinaz 2
SPL	Sfingozin 1-Fosfat Liyaz
EDG	Endotelyal Farklılaşma Geni
G-CSF	Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
IL-8	İnterlökin 8
TGF	Transforme Edici Büyüme Faktörü
MMP	Matriks Metalloproteinaz
E.R.	Endoplazmik Retikulum
FBS	Fetal Bovin Serum
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
ELISA	Enzim Bağlı İmmunosorbent Analizi
GAPDH	Gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenaz
ncRNAs	Kodlanmayan RNA
ACTB	Beta Aktin
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
PDGF	Platenet Kaynaklı Büyüme Faktörü
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Karsinogenez, tek bir hücre içinde genetik değişikliklerin birikmesi ile displastik hücre sel görünüme neden olan çok aşamalı bir süreçtir. Hücreler geçirdikleri bu süreç sonrasında normal hücrelere özgü bazı özelliklerini yitirerek, gerekli özel sinyallere ihtiyaç duymadan büyüme ve bölünmeye başlarlar. Bu süreç içerisinde hücreler, yeni enzimlerin üretimi ve hücre adezyonunun azalması gibi yeni karakterlere de sahip olurlar. Bu tür değişiklikler kanser hücrelerinin yayılmasına ve diğer dokuları işgal etmesine olanak sağlar. Meme dokusunda gelişen bir kanser olan meme kanseri en ölümcül kanserlerden biridir. Meme kanseri de dahil olmak üzere çeşitli kanserlerde etkili olabilen moleküllerden biri olan sfingozin-1-fosfat (S1P) sfingoid tabanlı lipit ailesinin üyesi olup, hücre zarının akışkanlığının düzenlenmesinde yapısal olarak önemli rol oynamaktadır (Furuya, 2011).

Kanser ve metastazındaki gizem hala sürmektedir. S1P ve reseptörlerinin çeşitli kanserlerdeki rolü araştırılmış olup, meme kanserinin metastazındaki durumları henüz tam olarak ortaya konmamıştır. Meme kanserlerinin yayılmasında bu moleküllerin yerinin ortaya konması için, S1P molekülü ile reseptörlerinin ilişkisinin belirlenmesi önem arz etmektedir.

Kanser ve metastazında farklı mekanizmalar bulunmaktadır. Moleküllerin kanserdeki miktarları metastazda farklılık gösterebildiğinden, sadece kanserdeki durumlarını bilmek metastaz hakkında bilgi vermeyebilir. Bilinmeyenlerin ortaya konması, kanserden sonra gelişen metastaz gibi daha kötü oluşumların gerçekleşebileceği ihtimalini bazı moleküllerin miktarına bakarak önceden belirlemek, hastaların hayat kalitesini ve yaşam süresini artırmak için önlem alınmasına katkı sağlayabilir.

Sunulan tezde S1P molekülü ile onun reseptörlerinden S1P1 ve S1P3'ün meme kanseri ve metastazındaki etkileşimleri belirlenecektir. Araştırmamızda kullanılacak olan MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri farklı karakterlere sahip hücrelerdir. Bu hücrelerden MCF-7 hücreleri östrojen duyarlı ve zayıf invaziv, MDA-MB-231 hücreleri ise östrojen duyarsız ve güçlü invaziv hücrelerdir. Bu farklı özellikleri nedeniyle, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri normal meme kanseri ve metastatik süreç için model olarak seçilmiştir.

Araştırmamızda farklı özelliklere sahip meme kanser hücreleri kùltùre edildikten sonra S1P1 ve S1P3 reseptörleri susturularak proliferasyon, adezyon ve migrasyon özellikleri açısından değerlendirilecektir. Böylece bu reseptörlerin meme kanser hücrelerinin metastaz ve invazyon potansiyellerine etkileri hakkında fikir edinilebilecektir.

Bu tezde ulaşılmak istenen hedef, S1P1 ve S1P3 kanal reseptörlerinin hem invaziv karakterli hem de invaziv karakterde olmayan meme kanser hücrelerinin davranışlarına olan etkilerini gözleyerek, bu reseptörlerin invazyon ve metastazdaki potansiyellerini belirlemektir. Böylece S1P reseptörlerinin meme kanserinde hücre davranışlarına olan etkileri ve etkileşim mekanizmalarının aydınlatılmasına katkı sağlanabilecektir. Bu sayede bir taraftan bu reseptörlerin molekùler hedefe yönelik spesifik tedavi stratejilerinin geliştirilebilmesinde etkili olup olamayacakları ortaya konarken, diğer taraftan da diagnostik ve terapötik potansiyelleri konusunda fikir edinilebilecektir.

Çeşitli bulgular temel alınarak yapılabilecek tedavi şekilleri ile kanser hastalarının hayat kalitesini artırmak mümkündür. Elde edilecek sonuçların, meme kanserinde uygulanan konvansiyonel tedavilerin verimliliğinin arttırılması için yeni bir strateji oluşması hakkında aydınlatıcı olabileceği düşün÷lmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Hücre homeostazisi, hücrelerinin ölümü ve hücrelerin onarımı arasındaki dengenin korunmasıdır. Tümörde, hücre ölümüyle hücrenin aşırı çoğalması arasında dengesizlik oluşur. Tümörlerin büyük çoğunluğu aynı anda bir dizi onkojenik dönüşüm sonrası ortaya çıkmaktadır. Bu hücrelerden sadece biri hayatta kalarak çoğalmaktadır (Baba, 2007).

Çok hücreli organizmalarda tüm hücreler, hücrelerin büyümesini ve çoğalmasını yönlendiren kurallara uygun bir şekilde işlev gösterir. Ama bazı hücreler bu kuralları ihlal ederek kontrolsüz bölünür, dokuları işgal eder ve genellikle yaşadığı konağı ölüme götürür ("Cell biology and Cancer," 2015).

Kanser, bir dizi moleküler değişim sonucunda hücrenin bazı normal özelliklerini yitilmesiyle oluşmaktadır.

Kanser hücrelerine özgü 6 özellik vardır. Bunlar;

- 1) Büyüme sinyallerinde kendi kendine yeterlilik
- 2) Büyüme baskılayıcı sinyallere karşı duyarsızlık
- 3) Programlanmış hücre ölümünden (apoptosis) kaçış
- 4) Sınırsız bölünme yeteneği
- 5) Damar oluşumunun (anjijogenez) gerçekleşmesi
- 6) Dokulara yayılım ve metastaz (Seyfried ve Shelton, 2010)

Kanser hücreleri bölünmek için gerekli olan büyüme faktörlerini kendisi de üretebilir. Bu durum kanser hücrelerinin normal dış kaynaklı büyüme sinyallerinden bağımsız çoğalmasına neden olmaktadır (Cooper ve Hausman, 2003).

Hücre döngüsü ya da hücre siklusu genellikle dinlenme (istirahat) ve bölünme evresinden oluşur. Dinlenme evresi, hücrenin metabolik olaylarını sürdürdüğü ve bölünme evresine nazaran daha uzun süren bir evredir. Bu evreye G0 fazı ismi verilmektedir. Bölünme evresi G1, S, G2 fazları (mitoza hazırlık fazları) ile mitoz bölünmenin gerçekleştiği M fazından meydana gelir. G1 fazında DNA replikasyonu ile bölünme için gerekli proteinlerin sentezi gerçekleştirilir. S fazında DNA diploid hale geçer, G2 fazındaysa bölünme için son hazırlıklar yapılır. M fazında birbiriyle özdeş iki hücre oluşur (Rieter, 2004).

Hücre döngüsü siklin proteinleri, siklin-bağımlı kinazlar (CDK) ve siklin-bağılı kinaz inhibitörleri (CKI) tarafından düzenlenir. Kansere hücrelerinde siklin proteinleri, siklin-bağımlı kinazlar (CDK) ve siklin-bağılı kinaz inhibitörleri (CKI) arasındaki denge bozulmuştur. Örneğin meme kanserinde Siklin D1 proteininin aşırı ekspresyonu meme epitel hücrelerinin malign hale geçmesinde belirteç olarak gösterilmektedir. Protoonkogen olarak kabul edilen Cdk4 ve siklin D1'in aşırı etkinleşmesi hücre bölünmesini teşvik eder (Güneş, 2013). Yine çoğu kanser türünde CDK'ların hiperaktivasyonu görülür (Chandar ve Viselli, 2012; Goodman, 2008).

Protoonkogenler, hücrenin çoğalmasını düzenleyen genlerdir. Protoonkogenlerde ortaya çıkan mutasyonlar sonucu hücrenin bölünmesi kontrol edilemez ve kanser gelişir. Mutasyona maruz kalan protoonkogenler, onkogenlere dönüşmektedir. Hücrenin büyümesi ve bölünmesini baskılayan genlere ise tümör baskılayıcı genler denir. Bu genlerden en önemlisi p53 genidir. Tüm kanser vakalarının %50'sinden fazlasında p53 mutasyonları görülmektedir (Chandar ve Viselli, 2012; Goodman, 2008).

Kanser hücreleri, hücrenin aşırı çoğalmasını ve dokuların işgalini önleyen kontrol sistemlerini devre dışı bırakır. Normalden farklı bu hücreler büyüme ve bölünme için gerekli olan özel sinyallere ihtiyaç duymadan büyümeye ve bölünmeye devam ederler. Tümörler, klonal bir yapıya sahip olmasına rağmen, yüksek genotipik ve fenotipik heterojenite gösteren neoplastik hücre popülasyonu ile oluşmaktadır. Bu heterojenite zamanla değişebilen dinamiğe sahiptir (Baba, 2007). Bu hücreler gelişirken, hücre yapısında meydana gelen değişiklikler, yeni enzimlerin üretimi ve hücre adezyonunun azalması gibi yeni karakterlere de sahip olurlar. Bu kalıtsal değişiklikler, komşu hücrelerin büyümesini inhibe eden normal hücrelerin mevcudiyetinde bile kanserli hücrelerin bölünmesine ve büyümesine olanak sağlar. Bu tür değişiklikler kanser hücrelerinin yayılmasına ve diğer dokuların işgaline olanak sağlar (Cell biology and Cancer, 2015).

Kanser hücrelerinde normal hücrelere göre hücre-hücre ve hücre-matris iletişimleri daha düzensizdir. Kanser hücrelerinde adezyon moleküllerinin üretiminin normal hücrelere nazaran daha az olması sonucu hücrelerin tutunma kabiliyeti azalır. Örneğin epitelyal kanserlerde E-kaderin üretimi durdurulmuştur (Baba, 2007).

Adezyon moleküllerinin azalması kanser hücrelerinin çevresinden kolay ayrılmasına olanak sağlar. Bu da kanserli hücrenin yayılması ve metastaz yapması için avantaj sağlar (Baba, 2007).

Bir glikoprotein olan laminin hücrenin bazal laminasında bulunur ve doku matrisi ile neoplastik hücrelerin bağlanmasını destekler. Normal hücrelere kıyasla tümör hücrelerinde kollajenaz daha yüksek miktardadır ve tümör hücrelerinin dokuya tutunmasını destekler. Neoplastik hücrelerde görülen temas inhibisyonu, bu hücrelerin hücre içi iletişimi için anomali olarak göze çarpmaktadır. Tümör hücreleri arasında temas noktasının yok olduğu tespit edilmiştir. Bu yüzden komşu hücrelerle iletişimleri kesilmiştir (Baba, 2007).

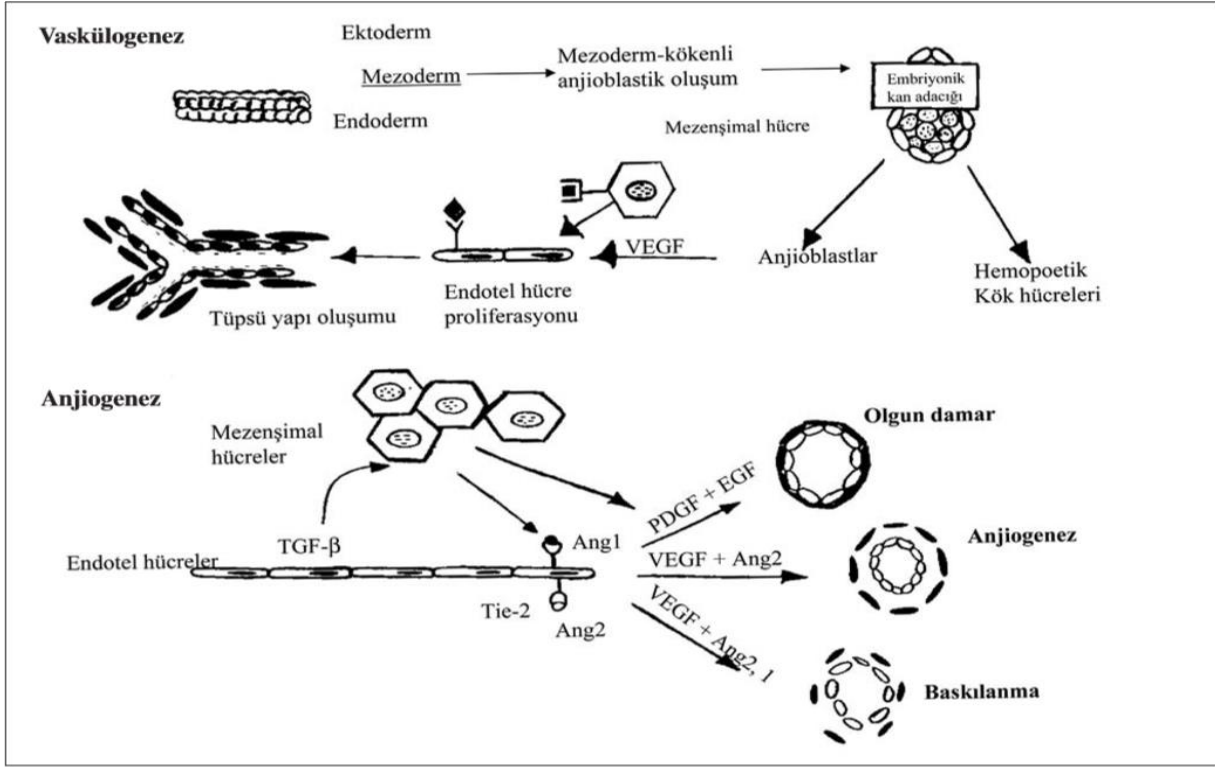
Kanser hücreleri normal bir biçimde farklılaşmazlar. Normal hücreler tam olarak farklılaştığında çoğalma durur. Kanser hücreleri programlı hücre ölümünden (apoptoz) kaçır. Normal hücrelerde DNA hasarı oluştuğunda hücre apoptoza giderken kanser hücreleri apoptoza gitmez. Ayrıca normal hücrelerdeki sınırlı bölünme kanser hücrelerinde görülen telomeraz aktivitesi nedeniyle sınırsız çoğalmayı sağlayan sebeplerden biridir (Cooper ve Hausman, 2003).

2.1.1. Anjiyogenez

Doku ve organlardaki damar oluşumu vaskülogenez ve anjiyogenez ile meydana gelmektedir. Vaskülogenez, ilksel damar yapısının oluşumudur ve endotel hücre öncüleri sayılan anjiyoblastların farklılaşmasıyla oluşur.

Vaskülogenez erken embriyogenezde meydana gelir, mezodermden köken alan vasküler ağın oluşturulmasını ifade eder (Coffin ve Poole, 1988).

Vaskülogenez, prevasküler hücreler veya hemangioblastların kan adacıkları olarak bir araya gelip kümelenmesi ile başlar (Risau ve Flamme, 1995; Shalaby vd., 1995). Bu kan adacıkları vasküler ağı tanımlayan tüpsü yapıları oluşturacak ilksel kan hücreleri ve endotelyumdan oluşur (Flamme, Baranowski ve Risau, 1993; Noden, 1989; Risau ve Flamme, 1995)(Şekil 2.1).

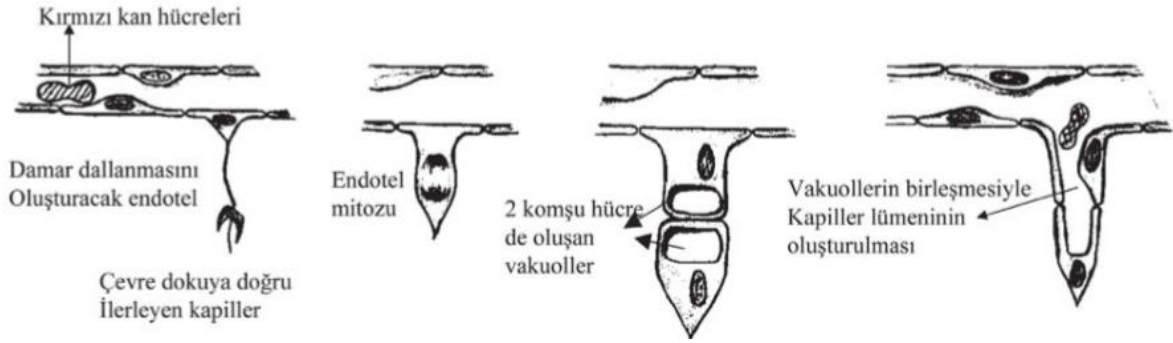


Şekil 2.1 Vaskülojeniz ve Anjiyogenez Oluşum Mekanizmaları (Kılıç vd.,2005 literatüründen alınmıştır)

Anjiyogenez ise vaskülojenizle oluşan damarlardan özgül sinyallerle, kapiller şeklinde yeni damarlar oluşturulması işlemine denir (Hanahan ve Folkman, 1996). Anjiyoblastların çoğalması ve birleşmesiyle primer kapiller pleksusu oluştururlar. Primer kapiller pleksustan yeni damarlar oluşur ve dallanır (Şekil 2.1). Embriyo gelişimin ilk haftalarında çevre dokulardan difüzyon ile beslenir. İleri dönemlerde besin ve oksijen ihtiyacı difüzyonla karşılanamaz. Bu nedenle üçüncü haftada anjiyogenez (kan damarı oluşumu) başlar. Anjiyogenez doku ve organların oluşumu için embriyonik dönemde gelişmektedir. Anjiyogenez sadece post-embriyonik doku gelişimi için değil aynı zamanda normal koşullarda karşılaşılan yaralanmalar ve doku hasarlarının iyileştirilmesi için de önemlidir. Ayrıca dişi üreme sisteminde folikül gelişimi, ovülasyon sırasında korpus luteum ve hamilelikte plasenta gelişimi anjiyogenezle bağlantılıdır (Demirer, Ayten ve Taş, 2014).

Endotel hücrelerinin anjiyojenik sinyallere oluşturduğu yanıt dört aşama içerir. Öncelikle endotel hücrelerin ana kapiller veya venülün bazal laminası boyunca ilerleyebilmesi, var olan kan damarını çevreleyen bazal laminada bir açıklık oluşturulmasını gerektirir; bazal membran ve ekstrasellüler matriksin yıkımı için proteazlar üretilir. İkinci aşama endotel hücrelerinin sinyal kaynağına doğru hareket etmeleridir. Bunu takiben endotel proliferasyonu görülür.

Dördüncü basamak ise tüpsü yapı oluşturma işlemidir. Proliferasyon durur, hücreler morfolojilerini değiştirerek bir lümen oluşturacak şekilde birbirlerine sıkıca tutunurlar. Çoğunlukla perisitlerin ve vasküler düz kas hücrelerin endotelyuma katılması ve yeni bazal membranın sentezlenmesi ile (Risau ve Flamme, 1995) anjiyogenez tamamlanır (Şekil 2. 2). VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), FGF (Fibroblast Growth Factor), EGF (Epidermal Growth Factor) ve PDGF (Platelet Derived Growth Factor) gibi anjiyogenik büyüme faktörleri dört aşamanın ortaya konmasını sağlar.



Şekil 2.2 Endotel Hücrelerinin Anjiyogenik Sinyallere Oluşturduğu Yanıt (Kılıç vd.,2005 literatüründen alınmıştır)

Vaskülogenez embriyonik gelişim evresiyle sınırlandırılmışken normal anjiyogenez oldukça sıkı kontrol altında yaşam boyu devam eder (Folkman, 1995; Hudlicka, Brown ve Egginton, 1992). Kontrolsüz anjiyogenez ise diyabetik retinopati, ateroskleroz ve solid tümör gelişiminde görülür (Pepper ve Mandriota, 1998; Waggner ve Beggs, 1975). Bunların dışında serebrovasküler malformasyonlarda da anjiyogenik faktörlerin anormal şekilde üretildiği görülmektedir (Hashimoto vd., 2000; Kılıç, 2005).

Tümör hücreleri damarlanma olmaksızın 2-3 mm³ büyüklüğe erişebilmektedir. Büyüyen tümör hücresi gelişimini sürdürebilmesi için daha fazla oksijen ve besine ihtiyaç duymaktadır. Tümör hücreleri daha fazla hacime damarlanma yoluyla ulaşabilmektedirler. Tümörde oluşan bu damarlar normal dokulardan oluşmaktadır. Eğer tümör hücreleri anjiyogenezde başarısız olursa uzun dönem sessizliğe bürünmektedir (Alison, 2001). Yeni damar oluşumu gerçekleştiremeyen tümörler herhangi bir bulgu göstermeksizin lezyonlar halinde görülürler. Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve reseptörleri (VEGFR), tümör anjiyogenez için son derece önemlidir. Tümörler epidermal büyüme faktörü, EGF; fibroblast büyüme faktörü; FGF, granülosit koloni uyarıcı faktör; G-CSF, interlökin-8; IL-8, hepatosit büyüme faktörü; HGF, transforme edici büyüme faktörü- α - β ; TGF- α , - β , vasküler-endotelial büyüme faktörü; VEGF gibi çoğu anjiyogenik faktörü üretebilirler.

Bunların çoğu komşu damarlara geçerek endotel hücrelerdeki reseptörlerine bağlanarak yeni damar oluşum sinyallerini oluşturarak nihayetinde anjiyogenez gerçekleşir (Aktaş ve Akbulut, 2014; Moserle ve Casanovas, 2013).

Solid tümör gelişimi, tümörün proliferatif aktivitesine olduğu kadar anjiyogenez oluşumuna da bağlıdır. Tümör gelişimi ve anjiyogenez arasındaki sıkı ilişkiyi ortaya koyan tümör implantasyonu deneylerinde, avasküler neoplastik hücre topluluklarının, en fazla 2-3 milimetre çapına kadar büyüebildikleri; yaklaşık 106 hücreli evreye kadar difüzyonla besin sağlayıp hücrel atıkları uzaklaştırılabildikleri görülmüştür. Besinlerin ulaştırılması ve hücrel atıkların uzaklaştırılması için bu büyüklüğün sınır teşkil ettiği gösterilmiştir. Yeni mikrovasküler gelişim başlatılmadığı sürece tümör gelişiminin süresiz şekilde değişmeyeceği söylenir. Hücreler oksijensiz kaldıklarında anjiyojenik faktörler salgılayarak, yeni kapillerlerin gelişimini teşvik ederler (Kılıç, 2005).

Tümör anjiyogenezindeki anjiyogenezi indükleyici mekanizmaların, tümör hücrelerinin kendileri tarafından aktive edildiği gösterilmiştir. Klinik veriler, damarlanma indeksi ile tümör agresifliği arasında ciddi bir ilişki olduğunu göstermektedir. Birçok tümör tipinde damar sayısı tümör karakterini ortaya koyan önemli bir belirleyicidir (Kılıç, 2005).

2.1.2. Metastaz

Primer (birincil) tümör; tümör ilerlemesinin başladığı ve kanserli kitlenin olduğu anatomik yerinde büyüyen bir tümördür. Birçok kanser primer yerinde gelişir ancak metastazla vücudun diğer bölümlerine yayılabilir. Bu tümörlere de sekonder (ikincil) tümör adı verilmektedir. Birçok kanser vücudun diğer bölgelerine yayılabilir, örneğin meme kanseri veya akciğer kanseri gibi, birincil bölgede oluşan tümörler, ikincil bölgelere sıçrayabilirler (metastatik bölge), ancak bazı sekonder bölgelerde bulunan tümörlerin primer kaynağı belirlenemeyebilir. Bu tip tümörler, primer tümör bölgesinin saptanamadığı metastatik hastalık olarak tanımlanmaktadır (Weinberg, 2007).

Metastaz ya da sekonder tümör belli bir mesafede göç eden, dokuya sabitlenen orijinal hücreden tamamen farklı karakterde neoplastik hücrelerden gelişen koloni olarak tanımlanır. Tümör hücrelerinin metastaz özellikleri 1970'li yılların sonlarında yapılan deneylerle ortaya çıkmıştır. Metastaz primer tümör ile aynı zamanda ya da daha sonra görülebilir. Primer tümörden önce görülen metastazlarda vardır. Örneğin melanomlar ve Malpighi karsinomlar (Weigelt, Peterse ve Van't Veer, 2005).

Malign hücreler (kötü huylu; kanser); hücre siklusunun hızlanması, genomik değişiklikler, invaziv büyüme, artan hücre hareketliliği, kemotaksi, hücre yüzeyinin değişmesi, litik faktörlerin salgılanması ile karakterizedir ve metastaz yeteneğine sahiptir (Baba, 2007).

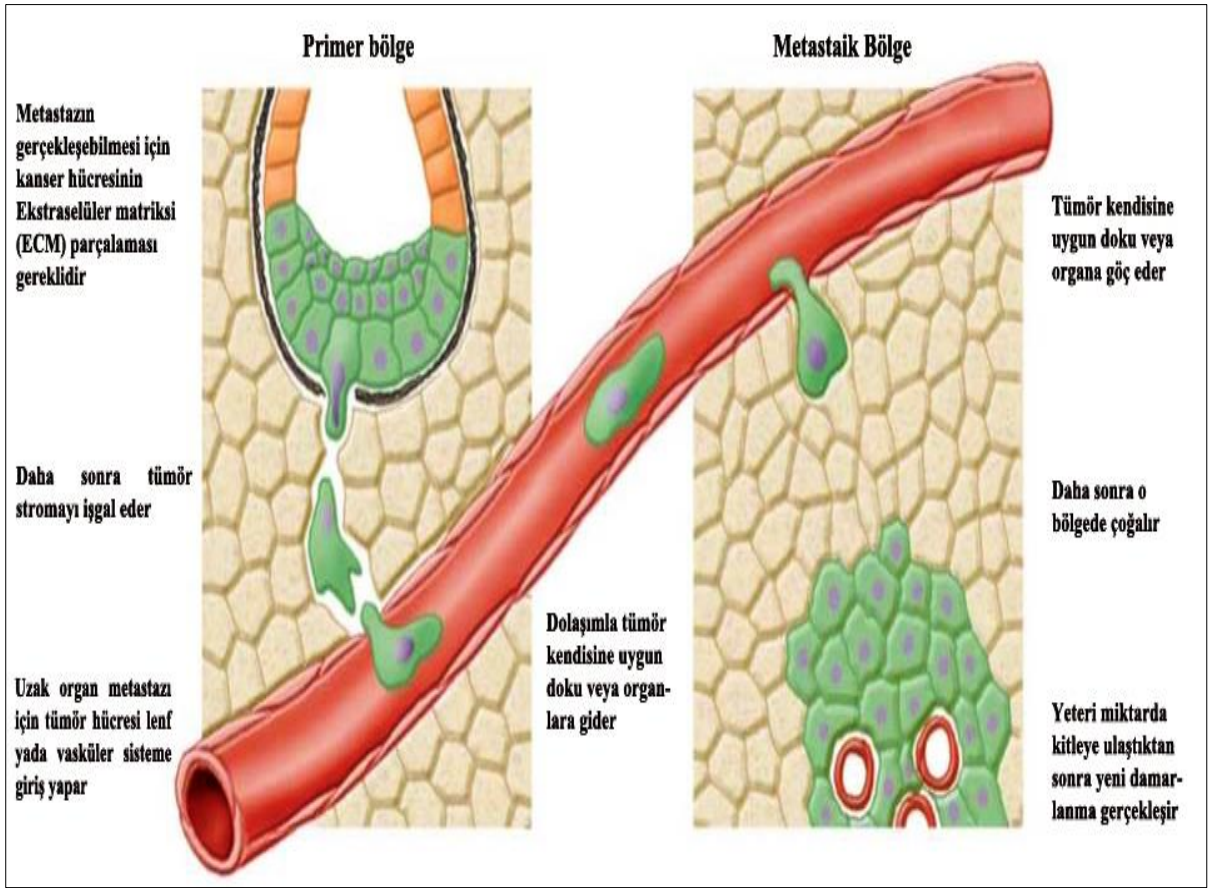
Metastazın oluşması için belirli bazı aşamaların aşılması gerekir. Kanseri hücreleri proteaz enzimleri salgılar ve bazal membranı parçalayarak yerel işgale (lokal invazyon) başlar. Tümör hücrelerinin kendi çevresindeki ekstrasellüler matrikste gelişebilmesi için, matriks metalloproteinazlar (MMP), protein kinazlar ve lizozomal enzimleri salgılar. Lokal işgal başarılıktan sonraki aşamada kanser hücrelerinin kan veya lenf damarlarının lümenine girmesi gereklidir (intravazasyon).

İntravazasyon bazı moleküllerle hızlandırılabilir. Örneğin; transformatör büyüme faktörü (TGF- β) meme kanseri intravazasyonunu artırmaktadır. Damar veya lenf içine giriş yapan 10.000 tümör hücrelerinden birisinin metastaz yapabilecek yeteneğe sahip olduğu gösterilmiştir. Tümör metastazında yeni oluşan damarların önemi büyüktür. Kan veya lenf lümeninde hayatta kalan hücreler tutunduğu yerdeki damar duvarını geçerek (ekstravazasyon) hedef dokuya yerleşir ve orada çoğalmaya devam eder. Kanseri hücreleri damara girdikten sonra dolaşımda bulunduğu halde, bazı kanser türleri genel olarak belli organlara metastaz gerçekleştirmektedir. Örneğin; mide kanseri daha çok karaciğere, meme kanseri kemiğe ve akciğere, kemik tümörleri akciğere metastaz yapar. Buna "Organ Seçiciliği" adı verilmektedir (Aliustaoğlu,2009; Valastyan ve Weinberg, 2011).

Kanserin hedef doku veya organına metastazını belirleyen başlıca faktörler; kanser hücrelerinin yüzey özellikleri, organın damar yapısı ve organların damar duvarındaki hücrelerin yüzey özellikleridir (Aliustaoğlu, 2009; Valastyan ve Weinberg, 2011). Metastaz kanserle ilişkili ölümlerin %90'ından sorumlu olup, kanser patogeneğinde en az anlaşılmiş evre olmaya devam etmektedir.

Metastaz aşamalarını özetleyecek olursak:

- 1) Tümör lokal olarak bir dokuyu işgal eder.
- 2) Tümör lenf veya kan sistemlerine (intravazasyon) mikrovasküler yoldan girer.
- 3) Kan veya lenf damarları içerisinde hayatta kalarak yer değiştirir.
- 4) Dolaşımdan çıkarak (ekstravazasyon) canlı kalabileceği mikroçevreye ulaşır.
- 5) Hücre çoğalmasını ve makroskobik ikincil tümör oluşumunu kolaylaştıran (kolonizasyon) bu yabancı mikroçevreye uyum sağlar (Chaffer, 2011) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 Kanserde Metastaz Gelişimi (Geho vd., 2005 yayınından alınmıştır)

2.1.2.1. Metastaz Modelleri

Metastaz için çeşitli modeller öne sürülmüştür.

- a. İlerleme modeli:** Primer tümör somatik mutasyonların birikimiyle daha metastatik bir hal alır.
- b. Geçici kompartıman modeli:** Bu modelde tüm canlı tümörler metastaz yapma kapasitesine sahiptir. Ancak hücrelerin büyük çoğunluğu rastgele epigenetik olaylardan dolayı metastaz yeteneğini kaybeder.
- c. Birleşme (Füzyon) modeli:** Tam olarak metastatik fenotip özelliği için bir tümör hücresinin, lenfoid hücrelerden damar içine girme ve dışına çıkma gibi özellikleri kazanması gerekir.
- d. Gen transfer modeli:** Bu modelde kötü huylu tümör DNA'sı kan dolaşımında mevcuttur. Bu DNA kanserle bağlantılı somatik mutasyonlar taşır ve primer bölgeden kan yoluyla ikincil bölgeye taşınır. Daha sonra, malign özelliklere sahip tümör DNA'sı uzak organdaki kök hücreleri tarafından emilir.

e. Erken onkojenez modeli: Herhangi bir birincil tümörün metastaz potansiyeli muhtemelen somatik mutasyonların sonucu olarak, erken gelişim döneminde ayarlanır. Dolayısıyla mikroarray gen ekspresyonu kullanılarak kanserin prognozunu tahmin etmek mümkündür.

f. Genetik yatkınlık modeli: Bireyin yapısal polimorfizme bağlı olarak tümör daha az veya daha çok yayılma gösterecektir. Böyle eşey hücre varyasyonları primer tümörün pro-metastatik genlerin ifadesiyle metastatik yolların tümünü etkiler (Hunter, Crawford ve Alsarraj, 2008).

2.1.3. Meme Kanseri

Kadınlarda meme, sütün üretilmesi için yapısal olarak farklılaşmalara uğramış bir ter bezidir. Bu bez yapısal olarak tübüloalveolar bir bez özelliği taşır. Meme, lobül ve duktus sistemlerinin bir araya gelmesiyle işlev kazanır. Lobül sistem süt üretimini gerçekleştirirken duktus sistemi sütün meme ucuna transferini sağlar. Zengin damarlanma, lenfatik ağ, bağ doku, yağ doku, sinirler ve deri memenin teşekkülünü sağlar.

Meme kanseri, en çok lobül ile terminal duktusun kesiştiği bölgede yer alan epitel dokudan türemiş olan bir adenokanserdir (Aydıntuğ, 2004). Meme kanseri erkeklerde nadir olarak görülür. Agresif seyir gösterir. Meme kanseri erkeklerde, tüm meme kanseri vakalarının %1'inden azını oluşturur (Akça vd., 2006).

Meme kanseri, genetik, biyolojik, çevresel ve sosyal faktörleri içeren kompleks bir etyolojiye sahiptir. Dünyada en sık görülen kanserler arasında akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır. Kadınlar arasında görülen en ölümcül kanserlerden biri olup, kanserin sebep olduğu ölümler arasında beşinci sıradadır (Hutchinson, 2010). Batıda kadınlarda en sık görülen malign hastalıktır. Özellikle 50 yaşın altındaki kadınlarda meme kanserinin insidansı artmaktadır (Lux, Fasching ve Beckmann, 2006).

Meme kanseri, halk sağlığı problemi olmaya devam etmektedir. Her 8 kadından birisi meme kanserine yakalanmaktadır (Matsen, 2013).

Meme kanserinin insidansı çoğu ülkede yükselmeye devam etmektedir ve bu kanseri önlemek için alınan tüm önlemlere rağmen önümüzdeki 20 yılda daha da artması beklenmektedir (Howell vd., 2014).

Kalıtsal meme kanseri etkileri de artmıştır. Örneğin, bir insan tümör supresör gen olan BRCA2 mutasyonları geçtiğimiz son yüzyılda dört kat artış göstermiştir. 70 ve üzeri yaşlarda ortaya çıkan sporadik meme kanseri kümülatif insidans penetransı da % 2.5'dan % 11'e ulaştığı tahmin edilmektedir. Obezite, alkol tüketimi, hareketsiz yaşam ve hormon replasman tedavileri de meme kanseri artışına neden olan diğer risk faktörleridir (Howell vd., 2014).

Meme kanseri, histopatolojik, biyolojik ve moleküler olmak üzere üç kategoride incelenir:

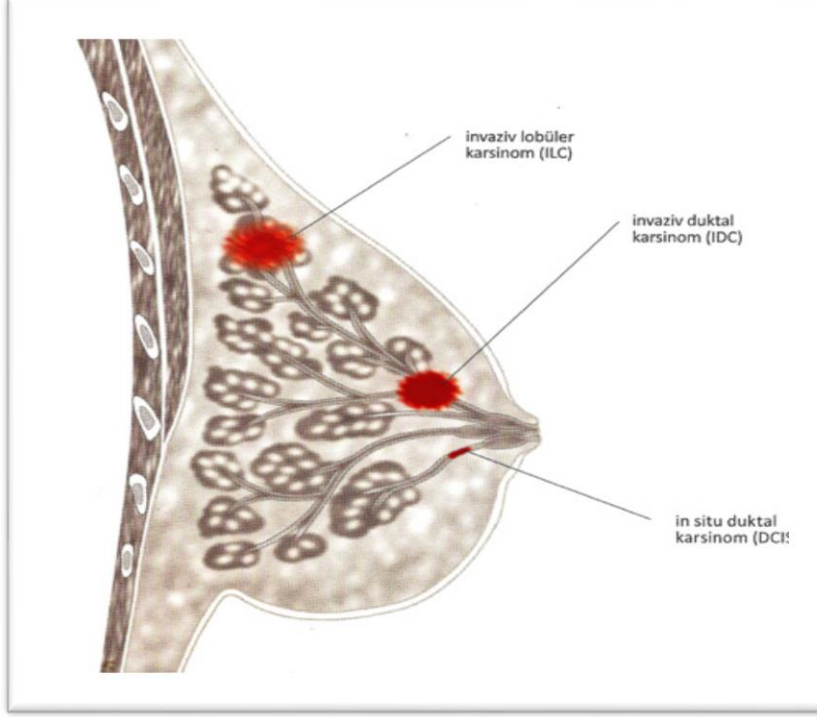
a. Histopatolojik sınıflamada; meme kanseri hücreleri, invaziv hücreler veya invaziv olmayan hücreler olmak üzere ikiye ayrılır:

1. İnvaziv kanser; invaziv ductal karsinoma (%80) ve invaziv lobüler karsinoma (%10)'ya ayrılmıştır ve bunlar 1 (düşük dereceli)'den 3 (yüksek dereceli)'e derecelendirilmiştir. Bu iki kanserinde metastaz yetenekleri vardır. Bir diğer invaziv meme kanseri tipi inflamatuvar meme kanseridir ve kanserin bu formu en agresif olanıdır. Meme kanseri vakalarının %1-%6'sını oluşturur (Şekil 2.4).

2. İnvaziv olmayan kanser lobüler karsinoma in situ ve ductal karsinoma in situ olarak tanımlanır. İn situ kavramı malign epitel hücrelerin çoğalmasının kendi sınırları içinde kaldığı, bazal membranı geçmediği ve stromayı işgal etmediğini gösteren patolojik bir durumdur.

b. Biyolojik sınıflandırma; Biyolojik sınıflandırma östrojen, progesteron ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) gibi hormon reseptörlerinin ekspresyonunu ifade eder. Bu daha yaygın olarak sistemik adjuvan tedavilerinde kullanılır.

c. Moleküler sınıflandırma; HER2 güçlendirici, lümen-tipi (alt tip A ve B) ve bazal benzeri olarak üç büyük moleküler grupta incelenirler bunların hepsi kendine özgü biyolojik ve klinik özelliklere sahiptirler (Cengiz, 2006; Keskin, 2011; Ng, 2014).



Şekil 2. 4 Meme Kanseri Çeşitleri ve Oluştığı Yerler

Kanserli hastalarda, ana ölüm nedeni primer tümörden ziyade tümörün uzak bölge metastazlarından kaynaklanmaktadır (Weigelt, Peterse ve Van't Veer, 2005). Meme kanseri en sık süt kanalları veya süt kanallarının kaynağını oluşturan lobüler iç astarda görülür (Sariago, 2010). Meme kanserinin metastazı primer tümör hücrelerin konak doku çevresindeki yerel işgali ile başlar. Tümör hücreleri, kan veya lenf damarlarının içine girmesiyle sıklıkla kemik ve akciğere giderken daha az olarak beyin ve karaciğere giderek metastazı oluştururlar (Scully, 2012).

Meme kanserinin teşhisinde hastaların kendilerini elle muayene etmesi önem teşkil etmektedir. Günümüzde meme kanseri teşhislerinde fiziksel muayene halen önemini korumaktadır (Parlar, Kaydul ve Ovayolu, 2005).

Memede kitle saptandığında kanser olup olmadığını anlamak için biyopsi yapılır. Meme kanseri tedavi açısından nispeten diğer kanserlere göre daha avantajlıdır. Tedavisinde birincil yöntem cerrahi müdahaledir, cerrahi tedavi genellikle meme dokusunun tümünün alınmasını teşkil eder. Koltuk altı lenf bezleri de çıkartılarak muhtemel yayılma engellenir. Tanıda koltuk altı (aksiller) lenf düğümü metastazlarının önemi büyüktür (Kierszenbaum, 2007; Matsen, 2013).

Kanser tedavisinde genel olarak uygulanan yöntemler; cerrahi girişim, ilaçla tedavi (kemoterapi), ışınla tedavi olarak sıralanabilir (Ölgen, 2002).

2.1.4. Araştırmamızda Kullanılan Kanseri Hücresi Dizileri

2.1.4.1. MCF-7 Hücresi Dizisi

MCF-7 hücresi dizisi, 69 yaşındaki bir Kafkas kadından 1970 yılında izole edilmiş bir meme kanseri hücresi dizisidir. MCF-7 hücresi dizisinin ismi Herbert Soule ve arkadaşları tarafından 1973 yılında Detroit'te kurulan Michigan Kanseri Vakfı-7'nin kısaltmasından oluşmaktadır (Soule, Vazquez, Long, Albert ve Brennan, 1973).

MCF-7 östrojen bağımlı, iyi huylu ve adeziv meme kanseri hücresi dizisidir. MCF-7 hücreleri in vivo ve in vitro olarak östrojen çalışmalarında model olarak kullanılmaktadır. Meme kanseri araştırmalarında MCF-7 hücresi dizisinin en önemli katkılarından biri, östrojen reseptörü alfa için kullanılması olmuştur. MCF-7 hücrelerinin tek hücre klonları östrojen yokluğunda büyüebilmektedir. MCF-7 hücreleri östrojen reseptörü pozitifken, insan epitel büyüme faktörü 2 (HER2) reseptörü negatiftir. Progesteron reseptörü hem pozitif hem de negatif olabilmektedir. Kemoterapiye yanıt verebilen hücrelerdir (Holliday ve Speirs, 2011; Lee, Oesterreich ve Davidson, 2015).

2.1.4.2. MDA-MB-231 Hücresi Dizisi

MDA-MB-231 meme kanseri hücresi dizisinin ismi izole edildiği MD Anderson kanseri enstitüsüne itafen konulmuştur (Cailleau, Olivé ve Cruciger, 1978). 51 yaşındaki Kafkas bir kadının meme bezinin metastatik adenokarsinomundan izole edilmiştir. Östrojen, MDA-MB-231 östrojen reseptör alfa, progesteron ve HER2 reseptörü negatif meme kanseri hücresi dizileridir. Kemoterapiye duyarlılığı farkları gösterir ve kemoterapiye orta derecede duyarlıdır (Holliday ve Speirs, 2011). Yapışkan ve metastatik epitel hücrelerdir. Agresif ve invaziv karakter göstermektedir. Diğer invaziv kanseri hücrelerine benzer şekilde ekstrasellüler matriksi proteolitik aktivitesiyle parçalama yeteneğine sahiptir (Yin, 2011). MDA-MB-231 hücreleri, zayıf tutunma özelliği gösterebilir. Hücrenin mikroskopta üzüm benzeri ya da yıldız şeklinde görülmektedir (Neve vd., 2006). Güçlü tümör oluşturma özelliğine sahiptirler. Metastatik hücrelerdir ve bu hücresi dizisinin en önemli özelliklerin birisidir (Burdall, Hanby, Lansdown ve Speirs, 2003).

2.2 Meme Kanseri Epidemiyolojisi

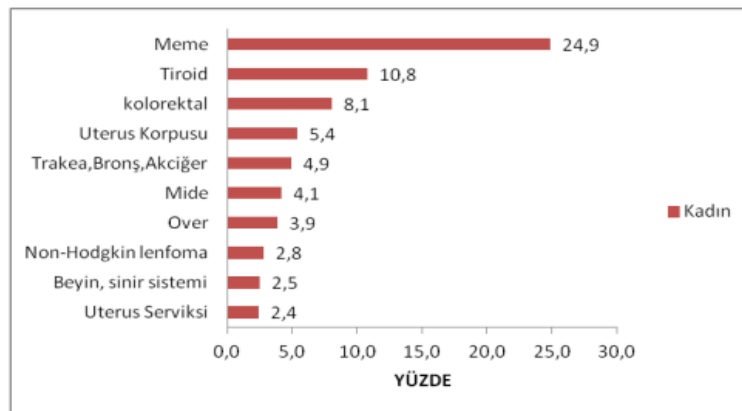
2.2.1. Dünyada Meme Kanseri Epidemiyolojisi

Meme kanseri, Avrupa ve Kuzey Amerika'daki tüm kadınların % 12'sini etkileyen, dünyada en çok kadınlarda görülen bir kanser tipidir (Pollán, 2010). Amerikan Kanser Topluluğu'nun 2011 yılında yayınladığı rapora göre dünya genelinde meme kanserine yakalanan kadınların tahmini sayısı 1.383.500 kişi ve meme kanserinden ölen kadınların tahmini sayısı 458.400 kişi olarak hesaplanmıştır. Yine aynı rapora göre gelişmiş ülke ve gelişmekte olan ülkelerde bu sayılar şu şekilde açıklanmıştır: Gelişmiş ülkelerde meme kanserine yakalanan kadın sayısı tahmini olarak 692.200 kişiyken gelişmekte olan ülkelerde bu rakam 691.300 kişi, gelişmiş ülkelerde meme kanserinden ölen kadınların tahmini sayısı 189.500 kişi iken gelişmekte olan ülkelerde bu rakam 268.900 kişi olarak rapor edilmiştir (Center, 2011).

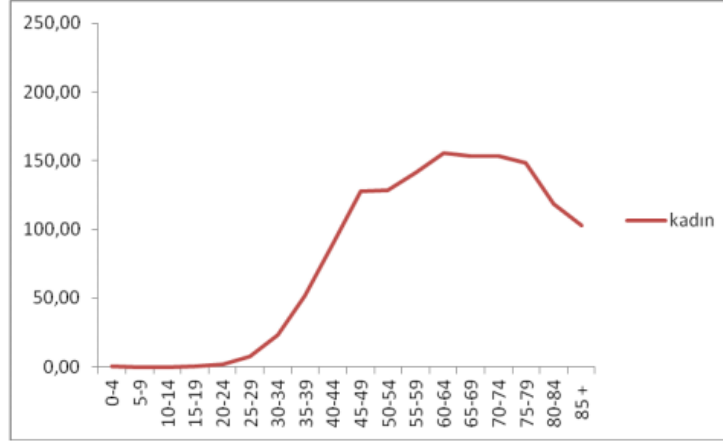
Avrupa'da yaklaşık 450.000 kadına meme kanseri teşhisi konulmuş ve bunlardan 140.000 kadın hayatını kaybetmiştir. Afrika'da ise yaklaşık 68.000 kadına meme kanseri teşhisi koyulurken bunlardan 37.000 kadın hayatını kaybetmiştir (Abdulrahman ve Rahman, 2012).

2.2.2. Türkiye'de Meme Kanseri Epidemiyolojisi

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'nun 2014 yılında yayınladığı Türkiye Kanser İstatistikleri Raporuna göre 2014 yılında Türkiye'de kadınlar arasında en sık görülen kanser tipi meme kanseridir. Kadınlarda 35 yaşından sonra meme kanserine yakalanma oranı yüksek oranda artmaktadır ve en yüksek risk grubu 60-64 yaş olarak belirtilmiştir (Grafik 1 ve Grafik 2). Erkeklerde bu oran oldukça düşüktür ve en yüksek oranda görülen yaşın 70-74 yaş aralığında olduğu anlaşılmaktadır (Gültekin, 2014).



Grafik 2.1 Tüm Yaş Gruplarındaki Kadınlarda En Sık Görülen Bazı Kanserlerin Bu Grup İçindeki Yüzde Dağılımları (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2012)



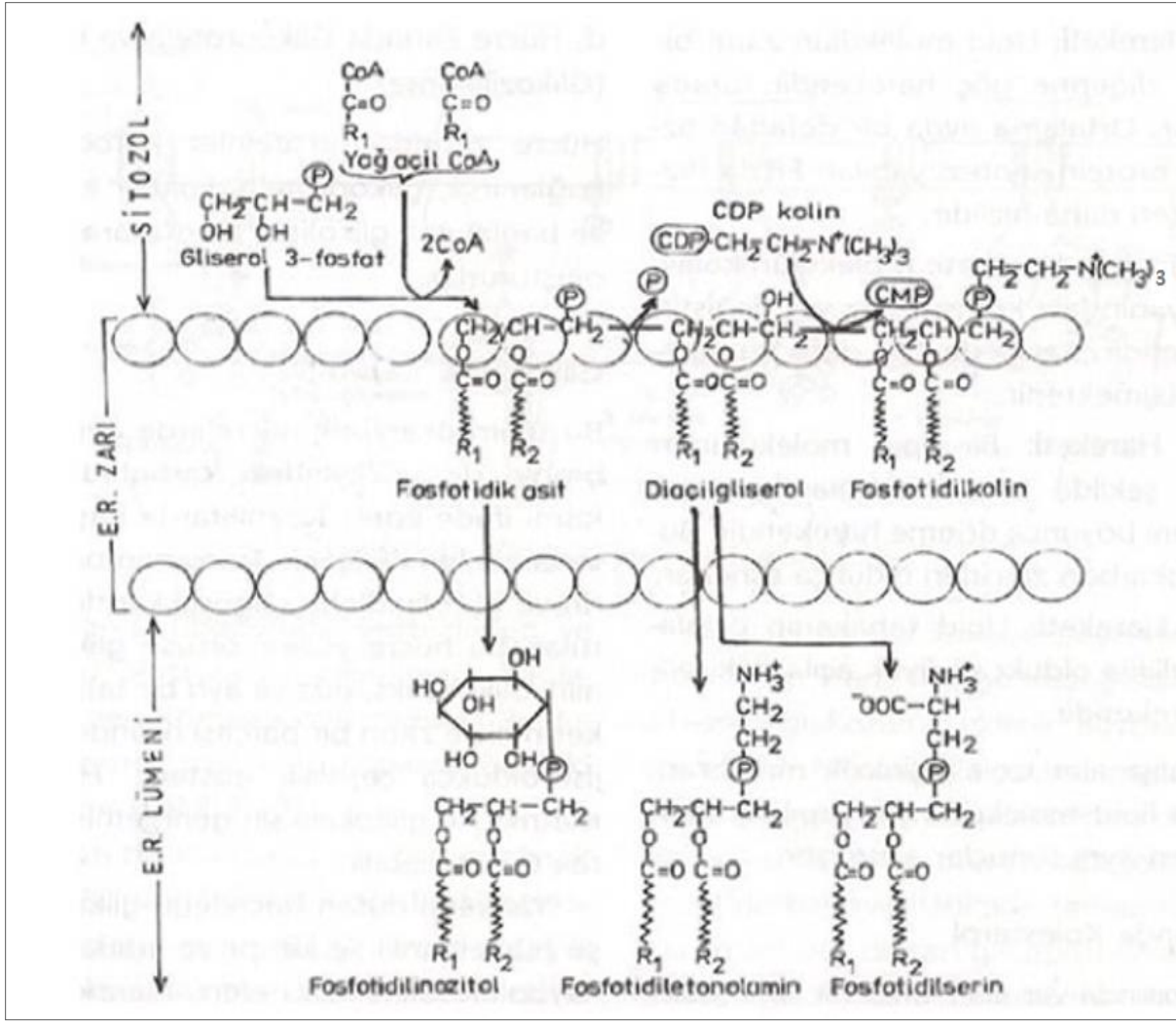
Grafik 2.2 Meme Kanserinin Kadınlarda Yaş Özel Hızları (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2012)

Uluslararası Kanser Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan Globocan 2012 verilerine göre kadınlarda en sık görülen ilk beş kanser içinde meme kanseri Türkiye’de, Dünya’da, IARC’de (24 üye ülke), AB’de (28 ülke) ve ABD’de olmak üzere ilk sırada yer almaktadır (Ferlay vd., 2013).

2.3. Sfingolipitler

Sfingomiyelin (SM), seramid, sfingoizin ve sfingoizin-1-fosfat (S1P) gibi hücre zarının akışkanlığının düzenlenmesinde önemli yapısal rol oynayan sfingolipitler, sfingoid tabanlı lipit ailesinin üyeleri olup kanserin çeşitli aşamalarında etkili olabilmektedir. Fosfolipitler alkol kısmında bulunan moleküle göre isimlendirilir.

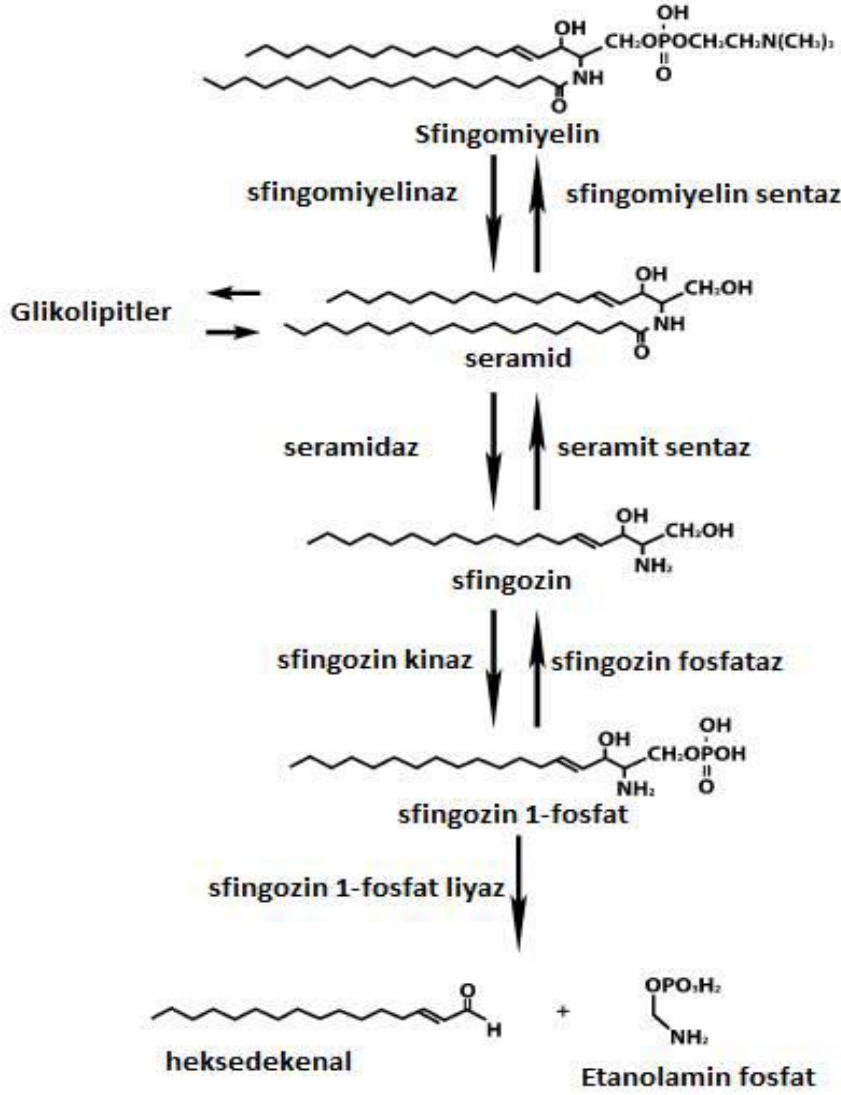
Hayvan hücre zarında genelde dört tip fosfolipit bulunur. Bunlar fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin ve sfingomiyelindir. Fosfolipitlerin sentezlenmesi belirli bir sıraya göre olur, önce yapısında CoA bulunan iki yağ asidi gliserol 3-fosfat ile birleşerek fosfatidik asit molekülünü meydana getirir. Diaçilgliseroletanolamin ile bağlanarak fosfatidik etanolamin ya da serin ile bağlanarak fosfatidik serin oluşur (Başaran, 2010) (Şekil 2.5).



Şekil 2. 5 Hücre Zarı Lipit Bileşenleri ve Bunların Endoplazmik Retikulumdaki Sentezi

Hücre zarı fosfolipitlerinden sfingomiyelin oluşumunda gliserol yer almaz. Sfingomiyelin, sfingozin, fosforik asit ve kolinin birleşmesiyle oluşur. Sfingozine endoplazmik retikulumda bir yağ asidi bağlanmasıyla seramid oluşur (Başaran, 2010) (Şekil 2.6).

Sfingolipidler tüm ökaryotik plazma zarlarının yapı parçalarıdır ve onların yaygın olarak lipid tabakanın mekanik stabil ve kimyasal olarak dirençli bir dış yapı oluşturmasını sağlayarak hücre yüzeyini koruduğuna inanılmaktadır. Seramidten seraminidaz yardımıyla oluşturulan sfingozin, protein kinaz C aktivitesini önleyen endojen bir lipid olarak karakterize edilmiştir (Şekil 2.6). Ancak sonraki çalışmalar sfingozinin fibroblastların çoğalmasında tetiklediği ve hücre içi kalsiyum seviyelerini düzenlediği gösterilmiştir (Hla, 2001).



Şekil 2.6 Sfingolipit Metabolizması Şeması (Furuya, 2011 literatüründen alınmıştır)

Sfingolipitlerden biri olan ve sfingoziin kinaz aracılığıyla oluşan sfingoziin 1-fosfat (S1P), hücrenin büyümesi, hayatta kalması, hareketinin düzenlenmesi gibi faaliyetlerinin yanında invazyon, anjiyogenez, vasküler olgunlaşma, lenfosit hareketleri ve bağışıklığı da düzenler. Dahası, artan S1P üretimi çoklu skleroz, kanser, alerji, ateroskleroz ve otoimmün hastalıkları gibi çeşitli patofizyolojik süreçlerden sorumlu tutulmuştur. S1P üretilmesi için sfingoziini fosforile eden iki enzim tanımlanmıştır. Bunlar sfingoziin kinaz (SphK)'ın iki izotipi olan sfingoziin kinaz 1 (SphK1) ve sfingoziin kinaz 2 (SphK2)'dir. SphK1'in tümör ilerlemesinde fonksiyonları tanımlanmıştır ancak SphK2'in fonksiyonları daha az bilinmektedir (Kim, 2009).

2.3.1. Sfingozin 1-Fosfat

Sfingozin 1-fosfat, sfingozin kinaz 1 (SphK1) ve sfingozin kinaz 2 (SphK2) izoenzimleri tarafından sentezlenen bioaktif bir moleküldür. S1P, G proteine bağlı beş hücre yüzey reseptörünün bir ligandıdır ve S1P reseptörlerine bağlanarak büyüme, sağkalım, hücre iskeleti ve hareketi gibi kanser için önemli hücre fonksiyonları düzenlemektedir. S1P'nin aynı zamanda, hücre yüzeyi reseptörlerinden bağımsız fonksiyonları olarak hücre büyümesi ve sağkalım üzerinde etkileri bildirilmiştir. Epidermal büyüme faktörü (EGF), insan meme kanserinin invazyonu ve tümör gelişimin ilerlemesinde önemli bir rol oynamaktadır. EGF, MCF-7 hücrelerinin plazma membranında SphK1 translokasyonunu ve aktivasyonunu indüklemektedir. EGF'nin varlığında, SphK1 hızla hücre zarına özellikle lamellipodia içine transloke olmaktadır (Sarkar, 2005).

S1P'nin hücre içi miktarı iki enzim tarafından kontrol edilir, sfingosin kinaz (SK) ve sfingosin-1-fosfat liyaz (SPL). SK, S1P oluşturmak üzere sfingozini fosforlarken, SPL ise S1P'den geri dönüşümsüz olarak etanolamin ve heksadesanolünü oluşturur (Şekil 2.6). Bu iki enzim hücre içi S1P miktarını belirleyerek hücrenin kaderini etkiler. Özellikle hücre streseyken bu iki enzimin ekspresyonunun artması hücrenin çoğalmasını ve apoptozunu etkileyebilir. SPL'nin aşırı ekspresyonu hücre içi S1P ve sfingozin seviyelerini azaltır ve apoptoz ile sonuçlanan, seramid düzeylerini yükseltir. SK fazla sentezlenmesi S1P miktarını artırırken hücrenin büyümesine, çoğalmasına ve tümör oluşumuna neden olur. SK ve SPL'nin karşılaştırmalı ekspresyonları hücrenin sağkalımı ve çoğalmasını etkileyerek kanser gelişimini tetikleyebilir (Ling, 2011). Çeşitli hücre tiplerinde S1P'nin çeşitli fonksiyonlara aracılık etmesinde sorumlu olan S1PR1, S1PR2 ve S1PR3 yaygın olarak bulunan S1P reseptör alt tipleridir. Diğer S1P reseptörleri olan S1PR4 ve S1PR5'in sentezlenmesi bağışıklık ve sinir sistemi ile sınırlıdır (Takuwa, 2011).

S1P, adenilat siklaz, fosfatidilinositol 3-kinaz, Ras-MAPK, fosfolipaz C, Akt/PKB, c-Src tirozin kinaz, küçük GTPazlar, Rac ve Rho, fosfolipaz D ve fokal adezyon kinaz p125'i içeren sinyal kaskadlarını uyarır. Bu sinyal yolları normal hücre fonksiyonları için önemli pek çok olayı, tümör invazyonu ve metastazı kontrol edebilmektedir. S1P, hücrenin yaşam sinyallerini uyarır, endotel hücre hareketini ve tüp oluşumunu uyararak anjiyogenezi teşvik edebilirken bazı tümörleri ve lökosit hücre göçlerini engelleyebilmektedir (Geho, 2005).

2.3.2. Sfingozin 1-Fosfat Reseptörleri

S1P reseptörleri hücre yüzeyinde, sitoplazmada ve çekirdekte bulunur. S1P reseptörleri düşük nM konsantrasyonlarda ligandlarıyla bağlanabilmektedir. S1P reseptörlerine sfingosin, seramid, sfingomiyelin, dimetil sfingosin gibi diğer sfingolipit ailesinin üyeleri bağlanamaz (Hla, 2001; Taha, Argraves ve Obeid, 2004; Watson vd., 2010).

Sfingozin 1-fosfat molekülünün şimdiye kadar (Im, Clemens, Macdonald ve Lynch, 2001) G protein bağlı 5 reseptörü tanımlanmış ve karakterize edilmiştir. Bunlar; sfingozin 1-fosfat reseptör 1 (S1PR1/EDG-1), sfingozin 1-fosfat reseptör 2 (S1PR2/EDG-5), sfingozin 1-fosfat reseptör 3 (S1PR3/EDG-3), sfingozin 1-fosfat reseptör 4 (S1PR4/EDG-6), sfingozin 1-fosfat reseptör 5 (S1PR5/EDG-8)'tir (Im vd., 2001).

Sfingozin 1-fosfat reseptör 1 (S1PR1/EDG-1), önceden endotel farklılaşma geni olarak bilinen (EDG-1) endotel hücrelerinde forbol miristat asetat yanıtı veren gen olarak 1990'lı yıllarda klonlandı. Reseptör klonlandıktan sonra S1PR1'in ligandı tam 8 yıl tanımlanmadan kalmıştır. Lee ve arkadaşları S1P'nin bu reseptör için güçlü ve spesifik bir ligand olduğunu buldular. İkinci S1P reseptörü 1993 de sıçan aortik düz kas hücreleri içinden klonlandı ve S1PR2 (EDG-5) olarak adlandırıldı. S1PR3 (EDG-3) Yamaguchi ve arkadaşları tarafından 3 yıl sonra klonlandı (Adada, 2013). S1PR4 (EDG-6), 1998'de farklılaşmış insan dendritik hücreleri ve sıçan cDNA kütüphanesinden in vitro olarak klonlandı (Gräler, 1998). S1PR5 (EDG-8) 2000 yılında fare beyni sfingosin 1-fosfat reseptörü olarak klonlandı (Im vd., 2000).

S1PR1 Gi'ye bağlanır ve Ras/ERK ve PI3-kinaz/Akt yollarını, Rho ailesi küçük GTPaz Rac'ı ve mitojenik, hayatta kalma sinyalinin uyarır. S1PR1 bu şekilde yönlendirilmiş hücre göçünü veya kemotaksisi düzenler. S1PR1 aynı zamanda Gi üzerinden fosfolipaz C (PLC) ve buna bağlı Ca^{2+} mobilizasyonunu aktive edebilir. Gi aracılığıyla sinyalizasyonda Ras/ ERK yolu da dahil olmak üzere birden fazla sinyal yolu uyarılarak hücre çoğalmasına, PI3K/Akt yolağının aktivasyonu sonucu apoptozun bloke olması ve PI3K/Rac yolunun aktivasyonu ile de hücre göçünün oluştuğu gözlenmiştir (Hisano, Nishi ve Kawahara, 2012).

S1PR1'den farklı olarak S1PR2 çoklu heterotrimerik G proteinlerine bağlanır. Kemotaktik büyüme faktörleri ve kemokinlere karşı hücre göçü inhibasyonu ile sonuçlanan Rac GAP aktivitesiyle Rac üzerinde güçlü önleyici etkisi olan $G_{12/13}$ -RhoA S1PR2 akışında kullanılır. $G_{12/13}$ bağlanmış RhoA aktivasyonunda Akt'nin güçlü inhibasyonunu düzenleyen S1PR2 hücre çoğalmasını inhibe eder. S1PR2 ile Akt'nin önlenmesi ve hücre çoğalması muhtemelen Rho kinaz aracılı fosforilasyonu ve PTEN aktivasyonu ile sağlanır. Fakat hücre göçünün S1PR2 aracılı inhibasyonunu

Chinese hamster ovary (CHO) hücreleri ve B16 melanoma hücrelerinde, Rho kinaz bağımsızdır. S1PR2 ayrıca, Gq aracılığıyla S1P ile uyarılmasıyla PLC ve Ca^{+2} mobilizasyonu düzenlerken Gi aracılığıyla Ras / ERK aktivasyon ve PI3-kinaz yollarını düzenler (Takuwa, 2011).

Lipid fosfatazın PTEN Rho-bağımlı regülasyonu fibroblastlar ve endotel hücrelerinin göçünün S1P2 aracılı engellenmesi için gerekli olduğu gösterilmiştir. S1P2 PTEN-negatif glioma hücrelerinin göçünü bloke edebilmektedir. Rho hücreSEL S1P2 bağlı anti-göç etkisine aracılık edebilmektedir (Van Brocklyn, 2010).

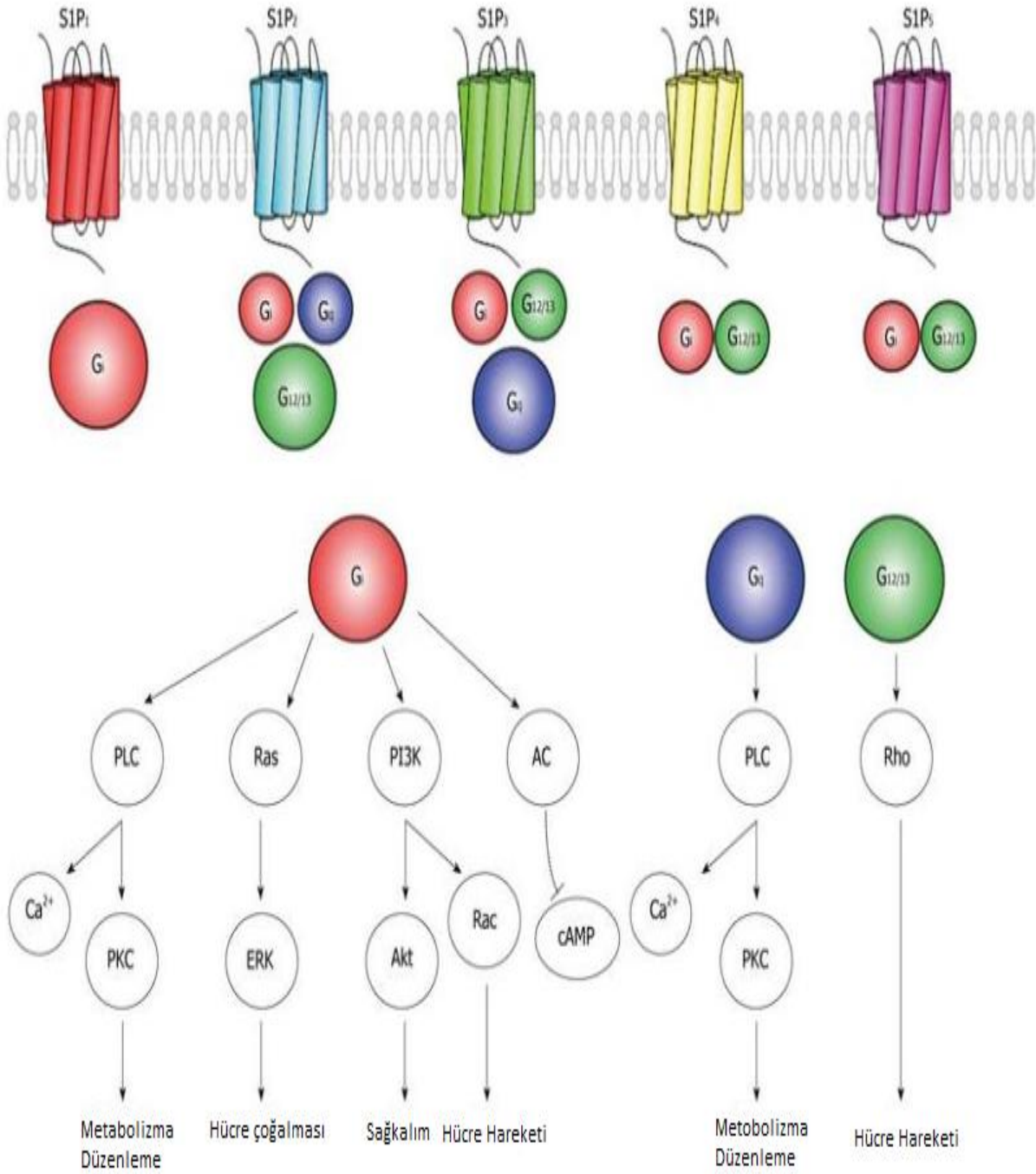
S1PR3, aynı anda birden fazla G proteinine bağlanarak potansiyel olarak PLC / Ca mobilizasyonunu Gq aracılığıyla aktive edebilir. Ek olarak Ras / ERK, PI3-kinaz ve Rac'ı Gi vasıtasıyla mitojenik / sağkalım ve S1P'nin kemotaktik etkilerini düzenleyebilir. S1PR2 karşılaştırıldığında daha düşük bir ölçüde de olsa S1PR3 aynı zamanda $G_{12/13}$ Rho da bağlanabilir (Takuwa, 2011). S1PR3'ün NF-kB aktivasyonunun ve adezyon moleküllerinin ekspresyonunda aracılık ettiği düşünülmektedir (Maceyka, Harikumar, Milstien ve Spiegel, 2012).

S1P2 reseptörünü eksprese eden B16/F10 melanoma hücrelerinde Rho aktivasyonu ve stres fibrilleri indüksiyonu yoluyla hücre göçü azalır. S1P2 anti-göç etkisinin aksine, S1P1 ve S1P3 hücre göçünü teşvik eder. S1P reseptör ifadesi profilinde hücrelerde eğer S1P2 hakimse mide kanseri hücrelerinde göçün bloklanması S1P2 tarafından gerçekleştirilir. Benzer bir ilişki glioblastoma hücre hatlarında görülmüştür. S1P2'nin ekspresyonunun glioma hücrelerinin göçünü önlediği bulunmuştur. S1P2'nin siRNA'nın tarafından susturulmasıyla S1P1 ve S1P3 hücre göçünü teşvik etmiştir. S1P2 hücre göçü bloklama mekanizması hakkında bazı belirsizlikler hala devam etmektedir (Van Brocklyn, 2010).

S1P1, S1P2 ve S1P3 hemen hemen her yerde eksprese olan reseptörlerdir (Yamashita vd., 2006).

S1PR4 ve S1PR5 ise daha sınırlı eksprese olur. S1PR5 beyin ve deride bulunurken, S1PR4, lenfoid doku ve akciğerde ifade edilir. S1PR4 ve S1PR5 Gi ve $G_{12/13}$ ile bağlantılıdır (Hisano vd., 2012).

S1PR4 nötrofil trafiğinde rol oynar. S1PR5'in ekspresyonu doğal öldürücü hücrelerinin lenf organlarından çıkması için gereklidir (Maceyka vd., 2012).



PLC: Fosfolipaz C, PKC: Protein Kinaz, ERK: Ekstrasellüler Sinyal Düzenleyici Kinaz

Şekil 2.7 S1P Reseptörlerinin Sinyal Yolları Şematiği (Kawabori vd., 2013 Literatüründen alınmıştır)

2.4. Sfingozin 1-Fosfat ve Kanser

Meme kanserinde S1P reseptörlerinin ekspresyonu ve S1P'ye olan cevapla hücre çoğalmasının artırdığına dair kanıtlar gösterilmiştir. SphK1 hastadan alınan meme tümörü biyopsilerde upregüle olduğu bildirilmiştir ve ksenograft fare modelinde etkinleştirilebilir. İlginç bir şekilde, çeşitli kanıtlar SphK1 östrojenler ve meme kanseri hücrelerinin sinyalizasyonu ile büyüme faktörü arasındaki çapraz-bağı gösterdi. SphK1 meme kanserini östrojen bağımlı tümöre teşvik eder. Buna ek olarak, östrojen SphK1'in güçlü bir aktivatörüdür. 17β -Estradiol (E2) SphK1 aktivitesini iki kat artırma etkisi vardır. E2 ile uyarılan SphK1 en hızlı aktivasyonu, bilgilere göre, Gi proteinleri ile birlikte zara bağlı ER tarafından aracılık ederken nükleer ER α transkripsiyonal aktivitesinin gecikmesine dayanır. Son zamanlarda, SphK1/S1P yolu karsinogenez de dahil olmak üzere akciğer ile ilişkili EGFR E2 ile indüklenen transaktivasyonunu bildirildi. Bir çalışmada, E2 ABCC1 ve ABCG2 transporterler aracılığıyla meme kanseri hücreleri S1P salgılanmasını uyardığı, bu nedenle, anti-kanser tedavisi için önemli bir hedef olarak sfingolipid metabolizması önem kazandı ve bildirilmektedir (Furuya, 2011).

Kanser oluşumunda, SphK1 aktivasyonu ile S1P'nin üretilmesi apoptozu engellenerek kanser hücrelerinin hayatta kalmasını, gelişmesini, anjiyogenez ve metastazı kolaylaştırmaktadır (Pyne ve Pyne, 2010). Meme, kolon, akciğer, yumurtalık, mide, uterus, böbrek ve rektum kanserinde SphK1'in aşırı ifade edildiği rapor edilmiştir (Huang, Nagahashi, Terracina ve Takabe, 2013). SphK1, S1P ve S1PR1'in kanserde bir transkripsiyon faktörü olan sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 3 (STAT 3) ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Bu nedenle S1P'nin hücre içinde NF- κ B ile ilişkili olabileceği ve kanser gelişimini tetikleyebileceği düşünülmüştür (Huang vd., 2013).

Kanser hücreleri, S1P salgılar ve bu S1P kanser hücre zarında bulunan reseptörlerine bağlanarak (otokrin) kanser hücrelerinin gelişmesine, hayatta kalmasına, hareket etmesine ve metastatik özellik kazanmasına yol açar. S1P'nin parakrin olarak salgılanmasıyla endotel adezyon moleküllerinin üretilmesi ve anjiyogenezini teşvik eder (Anelli, Gault, Snider ve Obeid, 2010; Salas vd., 2011).

2.5. Kodlamayan RNA'lar (Non-coding RNAs)

Son zamanlarda önem kazanan kodlamayan (ncRNAs) RNA'ların çoğu hücrede genel işleyişin düzenlenmesinde görev alır. Kodlamayan RNA'lar protein çevirimi yer almamakla birlikte yaşamsal fonksiyonlardan hücresel bağışıklığa, hücrenin gelişiminden hücresel cevaplara uzanan çeşitli görevlere sahiptir.

ncRNA'ların diğer fonksiyonel özellikleri arasında transkripsiyon ve transkripsiyon sonrası (post-transkripsiyon) gen susturma ve kromozomların yeniden düzenlenmesi de sayılabilmektedir. Çoğu ncRNA'lar kısa düzenleyici RNA'lardan meydana gelmektedir. Bu RNA'lar, RNA interference (RNAi) mekanizması ile gen susturumunun gerçekleştirdiği moleküllerdir.

Ribozomal RNA (rRNA), taşıyıcı RNA (tRNA), small interfering RNA (siRNA), mikro RNA (miRNA), small nükleolar RNA (snoRNA), small nükleer RNA (snRNA), piwi interacting RNA (piRNA), extrasellüler RNA (exRNA) gibi çeşitli RNA'lar kodlamayan RNA'lar kapsamında incelenmektedir (Akkaya ve Dİnçer, 2013; Birney vd., 2007; Mattick ve Makunin, 2006; Morris, 2012). RNAi mekanizması gelişim, farklılaşma, hücre çoğalması ve apoptoz gibi kritik hücreysel olaylarda görev almaktadır. Kısa düzenleyici RNA'ların uzunlukları 15-40 baz çifti arasında değişmektedir. Bunlara örnek olarak siRNA (small interfering RNA), mikro RNA (miRNA) ve PIWI (P-element induced wimpy testis) proteini ile etkileşimi olan RNA (piRNA) verilebilir. Transkripsiyon sonrası modifikasyonlar veya DNA'nın kopyalanmasında yer alan, orta uzunlukta olan ncRNA'lar ise küçük nükleolar RNA (snRNA), küçük nükleolar RNA (snoRNA), rehber RNA (gRNA), ribonükleaz P (RNaz P) ve telomeraz RNA'dır. Bu RNA'lar 40-200 baz çifti uzunluğundadır.

2.5.1. Antisens Oligonükleotidler

Antisens oligonükleotidler, 1978 yılında Zamecnik ve Stephenson tarafından hücre kültüründe viral replikasyonun engellenmesi ile gösterilmiştir. Bu çalışmada oncovirüs olan Rous Sarcoma virusün (RSV) 21 nükleotidlik tekrarlayıcı sekanslarının belirlenmesinin ardından, bu sekansların komplementeri olan oligonükleotidler sentezlenmiştir. Sentezlenen bu sentetik oligonükleotidlerin RSV ile enfekte edilmiş tavuk fibroblast hücre kültürlerine uygulandığında, viral replikasyonun büyük bir kısmının inhibe olduğunu fark etmişlerdir (Zamecnik ve Stephenson, 1978).

Antisens oligonükleotitler, hedef mRNA dizilerine bağlanan 15-20 nükleotitten oluşur. İki önemli basamak içerir. Birincisi çoğu antisens oligonükleotitler hedef mRNA'yı parçalayan ribonükleaz (RNAaz) H'yi aktive etmek için tasarlanmıştır. İkincisi translasyonda kendisine özgül mRNA'ya bağlanarak ribozomun inhibisyonunu gerçekleştirerek protein sentezini bloke eder (Jens, 2003).

2.5.2. RNA interferans (RNAi)

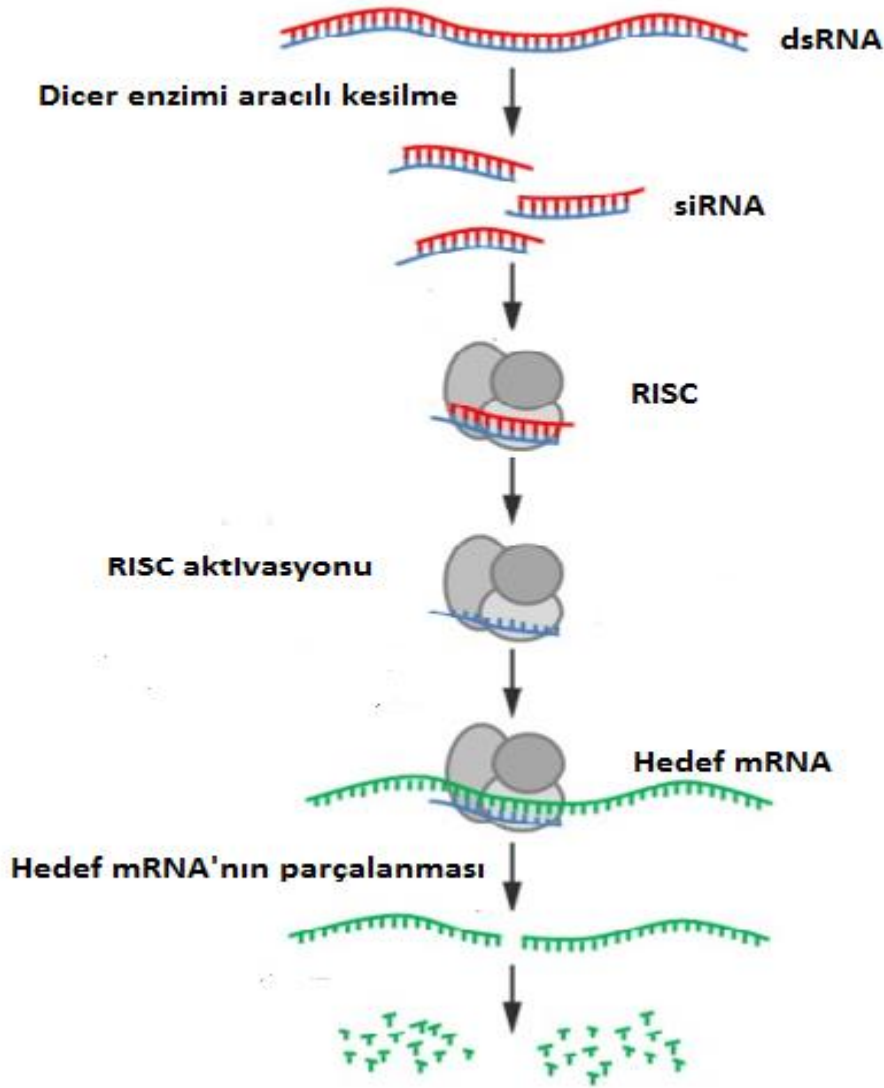
RNA interferans (RNAi), çift zincirli (ds) RNA'nın, transkripsiyon sonrasında hücreye girdiği zaman, hücrenin komplementer mRNA'sının parçalanmasıyla sonuçlanan ya da hedef mRNA'ya bağlanarak translasyonun engellenmesine yol açan gen susturma işlemidir (Bodur ve Demirpençe, 2010; Gündoğdu, 2009). Bu sırada mRNA'nın köken aldığı genin transkripsiyon hızı veya şeklinde bir değişiklik olmamakta, sentezlenmiş olan mRNA'ya küçük ve kodlamayan bir RNA zincirinin bağlanması sonucu protein ifadesi baskılanmaktadır. RNAi çalışmaları, Fire ve ark. 1998 yılında bir nematod olan *Caenorhabditis elegans*'ın spesifik genlerini susturmayı başararak başlamıştır. Bu çalışmada çift iplikli RNA'nın embriyoya enjekte edilmesiyle bazı proteinlerin sentezinin bloke olduğu ve kas defektlerinin ortaya çıktığı gözlenmiştir (Fire vd., 1998).

2.5.3. Küçük Engelleyici RNA (Short Interfering/Silencing RNA ,siRNA) Oluşumu

siRNA'lar 20-25 baz çifti uzunluğunda çift ipliğe sahip dsRNA'dan oluşmaktadır. 5' - fosfat uç ve 3' - hidroksil uca sahiptirler. 3' - hidroksil ucunda 2 nükleotidlik çıkıntı bulunur. Bu RNA'lar kendi baz dizilişine uygun gen bölgelerini tanıyarak o genin düzenlenmesinde rol oynarlar. Transkripsiyon sonrasında oluşan mRNA'ların yıkımının gerçekleştirilmesinde rol alırlar (Agrawal vd., 2003).

2.5.4. RNAi Mekanizması

RNAi mekanizması, gen ekspresyonunun susturulmasını small interfering RNA (siRNA) ve mikro RNA (miRNA) olarak isimlendirilen kodlamayan RNA'lar tarafından gerçekleştirilir (Bodur ve Demirpençe, 2010). Ökaryot canlılar ve insanlar içinde büyük bir kısmı korunmuş, doğal olarak oluşan biyolojik bir süreçtir. Hücrede oluşan öncül çift iplikli RNA molekülü ilk olarak, Dicer endonükleazın aktivitesi sonucu 21-23 nükleotidlik kısa fragmentlere parçalanır. Dicer, çift iplikli RNA'ya özgü RNA polimeraz III ailesine ait bir endonükleazdır (Bernstein, Caudy, Hammond ve Hannon, 2001). Dicer'in fragmentlere böldüğü RNA'lar siRNA (short interfering RNA; küçük engelleyici RNA) olarak adlandırılır. siRNA'lar, RNA uyarıcı protein kompleksi (RNA inducing silencing protein kompleks; RISC) ile aktifleşir. Bu protein kompleksi, çift iplikli olan siRNA'nın bir ipliğini kullanarak, özgül sekanslara bağlanır ve hedef RNA'ları keser. siRNA molekülleri, sentetik olarak sentezlenip dışarıdan hücrelere verildiğinde, hücresel RISC kompleksi oluşur ve siRNA'ya komplementer olan hedef RNA'ların parçalanmasını gerçekleştirir (Karaboz, 2007) (Şekil 2.8).



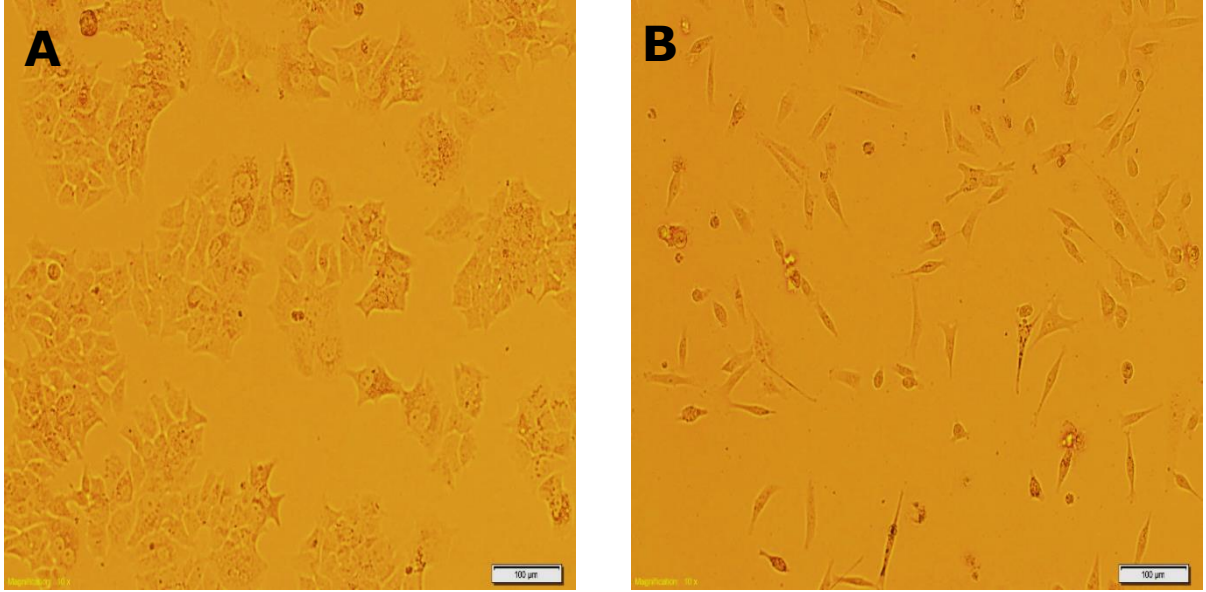
Şekil 2.8 siRNA ile Gen Susturma İşleminin Şematik Gösterimi.

RNA girişimi olarak adlandırabileceğimiz RNA interferans (RNAi) canlı hücreler içinde yer alan ve hangi genlerin nasıl aktif olacağını belirleyen, kontrol sistemidir. siRNA'ların dahil olduğu bu sistem gen ifadesi üzerine seçici ve güçlü etkiye sahiptir. Hem oluşturulan bir hücre kültürünün, hem de yaşayan organizmaların incelenmesi için hücre içine aktarılan sentetik siRNA'ların ilgilenilen belirli bir gen bölgesini baskılayabilmesi onları değerli bir araştırma aracı yapar. Hücredeki her geni sistemik olarak kilitleyebilmesi nedeniyle biyoteknoloji ve tıp alanında gelecek vaat etmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Hücrelerin Kültüre Edilmesi

Meme kanseri dizileri MCF-7 ve MDA-MB-231 (Şekil 3.1; A ve B) (ATCC, Washington D.C., ABD) laboratuvarımızda, 25 ve 75 cm²'lik flasklar (Thermo Fisher Scientific, ABD) içerisinde, %10 Fetal Bovin Serum (FBS; Gibco, UK), Penisilin/streptomisin (100 unite/ml) ve 2 mM L-glutamin içeren, fenol redsiz DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Gibco, UK) besiyerinde, 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde (Sanyo, Japonya) kültüre edilerek çoğaltıldı.



Şekil 3.1 Çalışmamızda Kullanılan Meme Kanseri Hücreleri. **A**; MCF-7, **B**; MDA-MB-231

3.2. Hücrelerde Standart Eğri Oluşturulması

Hücreler istenilen miktara ulaştıktan sonra tripsinle (Sigma, Almanya) kaldırıldı. Hücreler Neubauer lamında (Marienfeld, Almanya) sayıldıktan sonra her bir kuyucukta 48000, 24000, 12000, 6000, 3000, 1500, 750 ve 0 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu plakelere (Orange Scientific, Brainel'Alleud, Belçika) her biri 7 tekrarlı olacak şekilde dağıtıldı. Daha sonra hücreler 8 saat 37°C'de %5 CO₂'li ortamda inkübe edildi. 8 saatlik inkübasyonun ardından karanlık ortamda XTT (Biological Industries, İsrail) uygulanıp 2 saat XTT ile reaksiyona bırakıldı. 450 nm'de absorbans değerleri ölçüldü. Bu sonuçlara dayanarak standart eğrileri oluşturulup absorbans değerlerine göre hücre sayısını belirleyen formüller elde edildi.

3.3. Deney Gruplarının Oluşturulması

Deneyler hem MCF-7 hem de MDA-MB-231 hücreleri için ayrı ayrı kuruldu. Deney gruplarından biri olan kontrol grubuna sadece transfeksiyon ajanı, non-target grubuna belirli bir hedefe yönelik olmayan siRNA, S1P1 grubuna S1P1 reseptörünü susturmaya yönelik siRNA, S1P3 grubuna S1P3 reseptörünü susturmaya yönelik siRNA ve S1P1 ve S1P3 grubuna her iki reseptöre ait siRNA'nın transfeksiyon işlemi gerçekleştirildi. Transfeksiyon işleminden sonraki 24, 48 ve 72. saatlerde hücrelerde belirlemeler yapıldı.

3.4. siRNA ile Gen Susturma İşlemi

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerine, S1PR1 ve S1PR3 reseptörlerine özgü gen susturma işlemi siPORT Transfection kitinin – siRNA Transfection Protokolü (Ambion, Carlsbad, ABD) uygulandı. siRNA transfeksiyonlarının metastatik hücre davranışlarına etkilerini incelemek için hücrelerde çoğalma, tutunma, canlılık ve lateral motilite deneyleri yapılmıştır. Kit yöntemine göre uygun konsantrasyonlarda S1PR1 ve S1PR3 siRNA'ları ile besiyeri, transfeksiyon ajanı ile besiyeri ayrı ayrı 10 dk inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda birleştirildi ve üzerine kit prosedürüne uygun miktarda besiyeri ilave edilerek, daha önceden sayılarak ekimi yapılmış hücrelerin bulunduğu 96'lık kuyucuklara aktarıldı.

3.5. Hücrelerden Total RNA İzolasyonu

Bu aşamada ilk başta kültürden elde edilen hücreler tripsinle flask tabanından ayrıldı ve sayılarak her bir kuyucukta 500.000 hücre olacak şekilde, 6 kuyucuklu plateletlere ekildi. 24 saat inkübasyondan sonra uygun siRNA'ların transfeksiyon işlemi uygulandı. Transfeksiyonun 24, 48 ve 72. saatinde hücreler tripsinlenerek flask tabanından kaldırıldı. 4 ml fetal bovin serumsuz besiyeri ile 2500 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj işlemine tabi tutuldu. Sonraki tüm aşamalar total RNA izolasyon kit (Macherey-Nagel, Duren, Almanya) yöntemine göre gerçekleştirildi. Yönteme uygun olarak ilk süpernatant atılıp, hücre pelletinin üzerine eş miktarda 350 µl liziz buffer RA1 ve 3.5 µl β-merkaptotanol eklenip düzgün bir şekilde karıştırıldı. Bu karışımın tümü filtre ve toplama tüpüne (2 ml) aktarıldı. 1 dakika boyunca 11000 xg' de santrifüjlendi. Filtre atıldı. 300 µl % 70 etanol (Merck, ABD) eklenip pipetlendi ve tekrar düzgün bir şekilde karıştırıldı. Lizatın tamamı pipetlenerek yeni bir filtre ve toplama tüpüne (2 ml) aktarıldı. 30 saniye boyunca 11000 xg' de santrifüjlendi. 350 µl Membran Desalting Buffer eklenerek 1 dakika boyunca 11000 xg' de santrifüjlendi. Daha önce 10 µl rDNaz ve 90 µl rDNaz reaksiyon tamponundan hazırlanan DNaz reaksiyon karışımından 95 µl uygulandı ve 15 dakika oda ısısında inkübe edildi.

Daha sonra bu karışıma 200 µl buffer RAW2 eklenerek 30 saniye boyunca 11000 xg' de santrifüjlendi. Lizat atılarak yeni bir toplama tüpüne alındı 600 µl buffer RA3 eklendi ve 30 saniye boyunca 11000 xg' de santrifüjlendi. Lizat dökülerek 250 µl tekrar buffer RA3 eklendi. 2 dakika boyunca 11000 xg' de santrifüjlendi. Filtre 1.5 ml'lik toplama tüpüne alındı. 60 µl Rnase-free H₂O (kit içinde bulunmaktadır) eklenerek 1 dakika boyunca 11000 xg' de santrifüjlendi. Filtre atılıp, izole edilen RNA nanodropta (Multiskan GO, Thermo Scientific, ABD) ölçülüp RNA miktarları belirlendikten sonra -80°C derecede saklandı.

3.6. Elde Edilen RNA'lardan cDNA Oluşturulması

Hücrelerden elde edilen RNA'lardan cDNA sentezi gerçekleştirildi. Kit yöntemine uygun olarak (New England Bio-Labs, Beverly, MA, USA), örnek başına 200 ng total RNA, Random primer ve Nükleaz free su 8 µl olacak şekilde mikrofüj tüpünde karıştırıldı. Daha sonra reaksiyon mix'ten 10 µl ve enzim mix'ten 2 µl konularak toplam hacim 20 µl'ye tamamlandı. 42 °C'de 1 saat inkübe edildi. Enzimlerin inaktivasyonu için 80°C' de 5 dakika bekletildi. Elde edilen cDNA'lar -20°C'de saklandı.

3.7. qPCR

Sentezlenen cDNA'lar uygun primer-problarla (Tablo 3.1) karıştırılarak hücrelerdeki S1PR1 ve S1PR3 gen ekspresyon seviyelerini belirlemek üzere Real Time PCR işlemine tabi tutuldu.

Gen Bölgeleri	Kod	Marka
S1PR1 (EDG-1)	Hs 01922614-s1	Ambion
S1PR3 (EDG-3)	Hs 00245464-s1	Ambion
Beta actin (ACTB)	Hs99999903_m1	Ambion
GAPDH	Hs02758991_g1	Ambion

Tablo 3.1 Kullanılan Gen Bölgeleri

siRNA transfeksiyonu yapılan gruptaki ekspresyon tayininde kontrol grubu kalibratör olarak kullanıldı. Transfeksiyon etkinliği bu gruba göre değerlendirildi. Tüm qPCR işlemlerinde normalizatör olarak house keeping genler olan Beta actin (ACTB), GAPDH ve 18SRNA'lar kullanıldı. İşlemler karşılaştırılmalı olarak yapıldı ve qRT-PCR Cihazı (Stratagene MX3000P Real time PCR, ABD) cihazında elde edilen Ct değerleri kullanılarak hesaplandı (Schmittgen, TD. ve Livak, KJ., 2008). Gen ekspresyon karşılaştırma ve değerlendirmeleri okuma sonrası cihazda analiz edilerek verilerin ilişkileri grafiklerle ortaya kondu. Real time PCR'a her bir örnek için en az 3 kuyucuk yüklendi ve cihazın yazılımına göre bu kuyucuklar ilişkilendirilerek okuma yapıldı.

3.8. Canlılık belirlemeleri

Canlılığın belirlenmesi için tripan blue yöntemi kullanıldı. Hücreler tripsinlenerek flask tabanından kaldırıldı ve sonra 10 µl tripan blue (Gibco, UK) boyasıyla 10 µl hücre örneği karıştırıldı. JuLI™ Br (Nanoentek Inc. Seul, Kore) başlangıç kiti içerisinde bulunan slayta aktarıldı. Sonuçlar JuLI™ Br cihazında analiz edilerek % canlı hücreler belirlendi (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 Çalışmamızda Kullanılan Hücre Sayım Cihazı JuLI™ Br ve Ekipmanları

3.9. XTT (2,3-Bis(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide

XTT'nin temel çalışma prensibi, çoğalan hücrelerde artan dehidrojenaz enzim aktivitesi ile tetrazolyumun kullanılması ve formazan boya üretilmesi sonucu renk değişiminin absorbandsın spektrofotometre ile ölçülmesine dayanır (Terzioğlu, Keskin ve Demirel, 2013).

Çalışmamızda içerisinde 7×10^3 hücre bulunan 6'şar kuyucuk kullanıldı XTT ölçümü yapılmak üzere 100 µl aktivasyon solüsyonu eklenen 5ml reaksiyon buffer solüsyonundan, içerisinde 100'er µl taze besiyeri bulunan kuyucuklara 50µl eklenerek 2 saat sonra ölçüme alındı. Kit prosedürüne uygun şekilde ELISA cihazında 450nm dalga boyunda yapılan ölçüm sonrasında alınan absorbands cinsinden ham veriler standart eğrilerden çıkan formülde yerine konarak proliferasyon ve adezyonu belirlemede kullanıldı. Böylece her bir grup için 7 kuyucuktan elde edilen sonuçların ortalaması alındı.

3.10. Çoğalma (Proliferasyon) Belirlemeleri

Hücrelerde çoğalma miktarının tayini için XTT kiti kullanıldı. Bu deneyde, metabolik olarak aktif hücrelerin mitokondri enzimlerinin hücre ölümünden kısa bir süre sonra inaktive olma etkinliği üzerine kuruludur. Tetrazolium tuzuna dayalı bir kolorimetrik yöntem olan XTT yöntemi hücrelerin canlılığının ölçülmesi ve değerlendirilmesini kolaylaştıran bir yöntemdir. Hücrelere hormon uygulandıktan sonra ön çalışmalar ile belirlenen saatlerde XTT ölçümü yapıldı. XTT ölçümü için 100 µl aktivasyon solüsyonu içeren 5 ml reaksiyon solüsyonu, içerisinde 100'er µl taze besiyeri bulunan kuyucukların her birine 50 µl eklendi. 2 saat inkübe edildikten sonra ölçüme alındı. Her grup için deneyler en az 3 kez tekrar edilip her bir tekrar için içerisinde 7×10^3 hücre bulunan 7'şer kuyucuk kullanıldı. Kit protokolüne uygun şekilde Enzim Bağlı İmmunosorbent Analizi (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay; ELISA) cihazında (Labsystems Diagnostics, Finlandiya) 450 nm dalga boyunda yapılan ölçüm sonrasında alınan absorbands cinsinden ham veriler standart eğrilerden çıkan formülde yerine konarak hücresel çoğalmayı (proliferasyonu) belirlemede kullanıldı.

3.11. Tutunma (Adezyon) Belirlemeleri

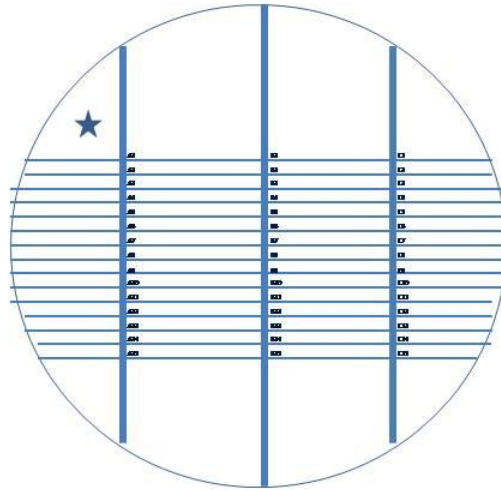
Flask tabanından tripsin ile kaldırılan hücreler sayılarak 96'lı flaslara 7.10^3 olacak şekilde her hücre tipi için biri adezyon uygulanacak diğeri kontrol olacak şekilde her grup için ayrı 7 kuyucuğa aktarıldı.

24 saat tutunmaları sağlandı ve daha sonra adezyon için ayrılan kuyucuklardaki hücrelere transfeksiyon işlemi yapıldıktan 3 kez PBS ile yıkandı ve XTT yöntemi uygulandı. Sonuçlar formülde yerine konarak adezyon belirlendi.

Formül:[1-(yıkınmamış kuyucuk absorbansı-yıkınmış kuyucuk)]/yıkınmamış kuyucuk]

3.12. Lateral Motilite (Wound Healing) Belirlenmesi

Lateral Motilite (Wound Heal Assay) için; 9 mm³ doku kültür petrileri kullanıldı. Petrinin tabanına cam kalemi ile 15 doğru ve bu doğruya dikey 3 doğru çizildi (Şekil 3.3). Motilite (migrasyon) için önce hücreler petrilerde 5.10⁵ hücre olacak şekilde dağıtıldı. 24 saat sonra inkübatörde tutulan petrilerin tabanındaki 3 çizgiyi takip ederek 1 ml'lik pipet ucu ile 3 yara oluşturuldu. Takiben petriler besiyeri ile yıkandı. siRNA transfeksiyon işlemi yapıldı. 1 saat inkübatörde tutulduktan sonra her bir petri için tüm çizgi kesişmelerindeki yara genişliği mikroskopta mikrometre ölçekli cetvel ile belirlenen ilk ölçümler kaydedildi. Takip eden günlerde 24, 48 ve 72. Saatler için aynı şekilde işlem tekrar edildi. Hücrelerin bu alana göçleri bir örnek için her defasında 45 farklı alanda yapılan ölçümlerle belirlendi. Sonuçlar formülde yerine konarak lateral motilite hesaplandı.



Şekil 3.3 Lateral motilite için petri tabanı çizimi.

Elde edilen rakamlar aşağıdaki formülde yerine konarak hesaplandı.

$$MI = 1 - (W_t / W_0)$$

MI = Motilite İndeksi

W_t = 24/48/72. Saatlerde belirlenen yara genişliği

W_0 = Başlangıçtaki yara genişliği

MI 1 = tam kapanma, MI 0 = kapanma yok

3.13. İstatiksel Analiz

Sürekli değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi kullanılarak gerçekleştirildi. Gruplar arasında farklılığa göre normal dağılım gösterenler tek yönlü varyans analizi uygulanarak (OneWay ANOVA) analiz edildi. Çoklu karşılaştırmalar ise Tukey HSD testi ile gerçekleştirildi. Normal dağılım göstermeyen değişkenlerin gruplar arası karşılaştırmaları Kruskal-Wallis testi ile yapıldı. Normal dağılım göstermeyen lateral motilite değerleri tekrarlı ölçümler varyans analizi SigmaStat programı ile gerçekleştirildi. Tablo ve grafiklerde ortalama \pm standart sapma kullanıldı. $p < 0,05$ önemlilik düzeyi * ile, $p < 0,01$ önemlilik düzeyi ** ile ve $p < 0,001$ önemlilik düzeyi *** ile gösterildi. Lateral motilite değerleri hariç tüm analizler IBM SPSS Statistics 21.0 paket programı ile analiz edildi.

4. BULGULAR

4.1. Hücrelerde S1P1 ve S1P3 Reseptörleri İçin siRNA ile Gen Susturma İşleminin Doğrulanması

Hücrelerde S1P1 ve S1P3 reseptörleri uygun siRNA'lar aracılığıyla susturuldu. Susturulmanın başarılı bir şekilde gerçekleştiği, reseptörlerin Real-Time PCR'da gen ekspresyonu analizi ile doğrulandı. Buna göre her iki hücrede yapılan susturulmalar öncesi ve sonrası gen ekspresyon düzeyleri belirlendi (Tablo 4.1) (Tablo 4.2).

Tablo 4.1 Susturma işlemi sonrasında MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde saatlere göre S1P1 gen ekspresyon seviyeleri

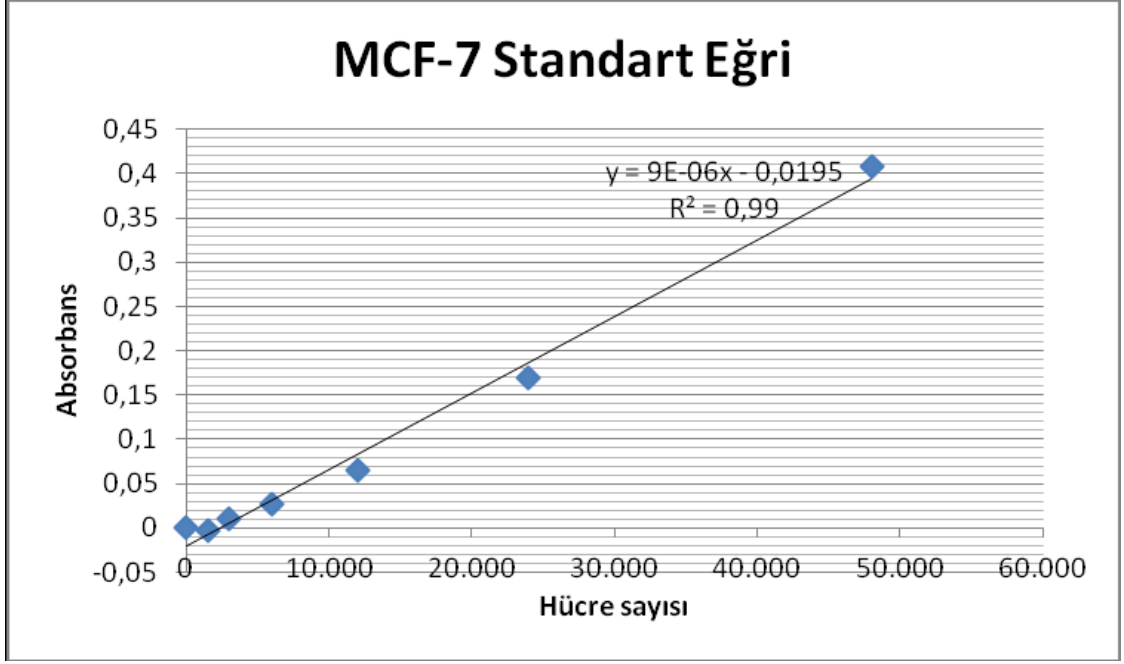
Susturulan Gen	Hücre	Saat	S1P1 Ekspresyonu
S1P1	MCF-7	24.saat	0,014378
		48.saat	0,773782
		72.saat	0,131215
	MDA-MB-231	24.saat	0,000188
		48.saat	0,271684
		72.saat	0,188156

Tablo 4.2 Susturma işlemi sonrasında MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde saatlere göre S1P3 gen ekspresyon seviyeleri

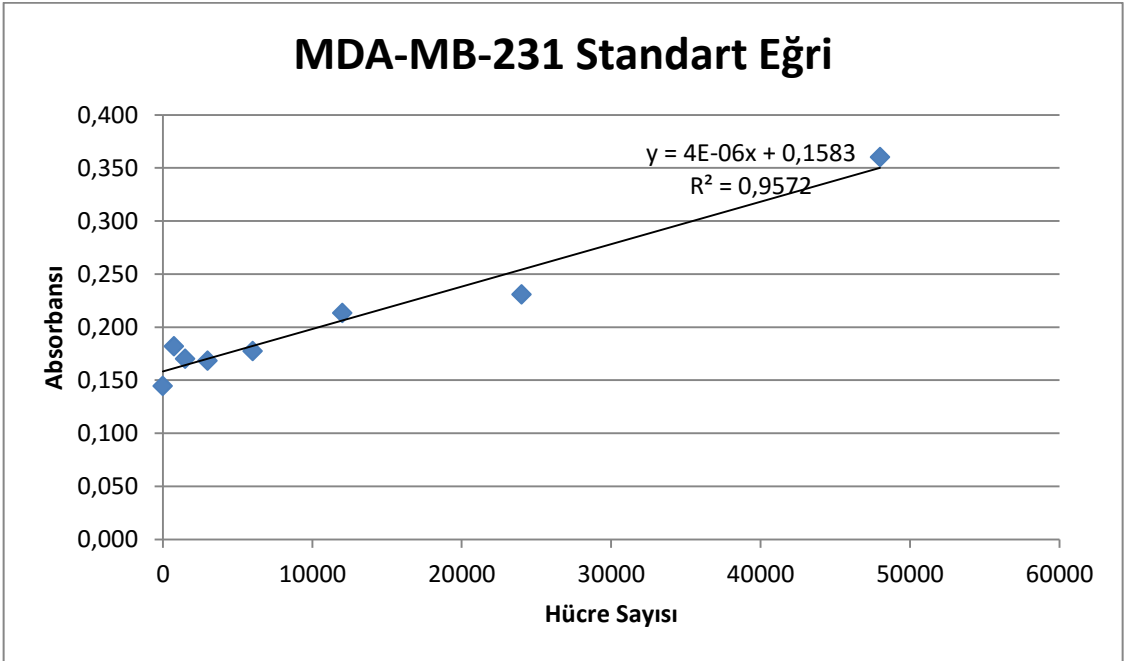
Susturulan Gen	Hücre	Saat	S1P3 Ekspresyonu
S1P3	MCF-7	24.saat	0,414660
		48.saat	0,024689
		72.saat	0,351111
	MDA-MB-231	24.saat	0,299370
		48.saat	0,281265
		72.saat	0,336808

4.2. Standart Eğrileri

Araştırmanın ilk aşaması olarak hücrelerde standart eğri oluşturuldu. Bunun için gerekli ölçümler 3 kez tekrarlandı, her ölçüm için 7 kuyucuk kullanıldı (n=7) ve elde edilen sonuçlara göre standart eğri çizildi. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri için standart eğriler Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de verildi. Her bir kuyucukta 48×10^3 , 24×10^3 , 12×10^3 , 6×10^3 , 3×10^3 , $1,5 \times 10^3$, 750 ve 0 hücre konulduktan sonra kolorometrik ölçüm yöntemine dayalı XTT yöntemiyle her grubun absorbansı ölçüldü. Elde edilen absorbans değerleri her hücrenin kendi standart eğri grafiğinden oluşturulan formülde yerine konarak çoğalma (proliferasyon) ve tutunma (adezyon) deneylerinde örneklerin absorbansına karşılık gelen hücre sayısı hesaplandı.



Şekil 4.1. MCF-7 Standart Eğri Grafiği



Şekil 4.2. MDA-MB-231 Standart Eğri Grafiği

4.3. Hücrelerde Çoğalmanın (Proliferasyon) Belirlenmesi

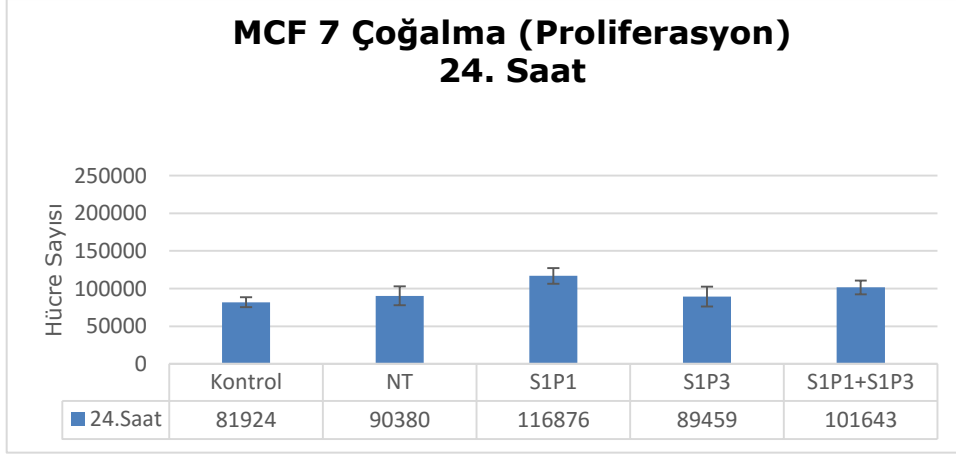
4.3.1. MCF-7 Hücrelerinde Çoğalmanın (Proliferasyon) Belirlenmesi

MCF-7 hücrelerinde 24. saatte gruplar arasında istatistiksel olarak fark bulundu ($p < 0,001$). Kontrol grubuna (81924 ± 6685) göre S1P1'nin susturulduğu (116876 ± 10320) grupta artış gözlemlendi ($p < 0,001$). Yine aynı saatte kontrol grubuna (81924 ± 6685) göre S1P1 ile S1P3'ün birlikte susturulduğu (101643 ± 9056) grupta artış gözlemlendi ($p = 0,026$) (Şekil 4.3). MCF-7 hücrelerinde 48. ve 72. saatlerde gruplar arasında istatistiksel olarak fark gözlemlenmedi (Sırasıyla, $p = 0,143$, $p = 0,092$) (Şekil 4.4) (Şekil 4.5) (Tablo 4.1).

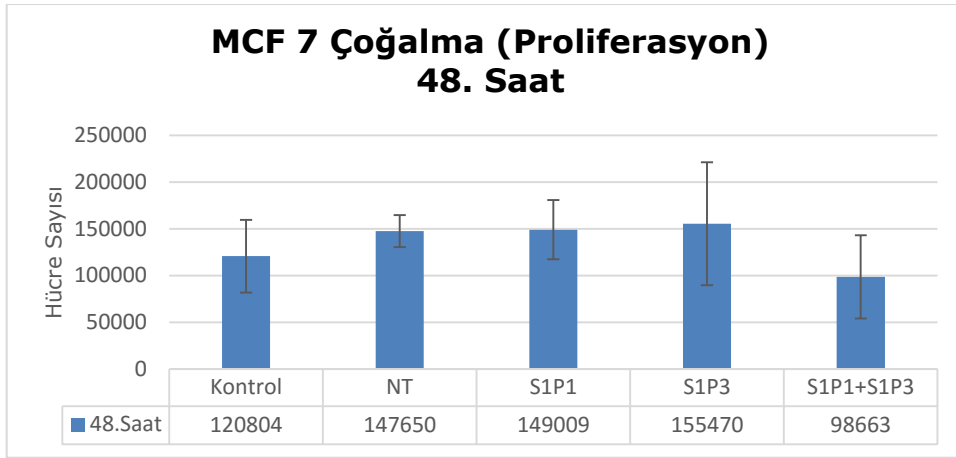
Tablo 4.3 MCF-7 Hücrelerinde 24, 48 ve 72.Saatlerde Çoğalma (Proliferasyon)

SAAT	KONTROL	NT	S1P1	S1P3	S1P1+S1P3
24	81924±6685	90380±12506	***116876±10320	89459±13112	*101643±9056
48	120804±38778	147650±17092	149009±31666	155470±65592	98663±44515
72	116570±4697	129283±24853	139920±31115	154544±24290	111679±42999

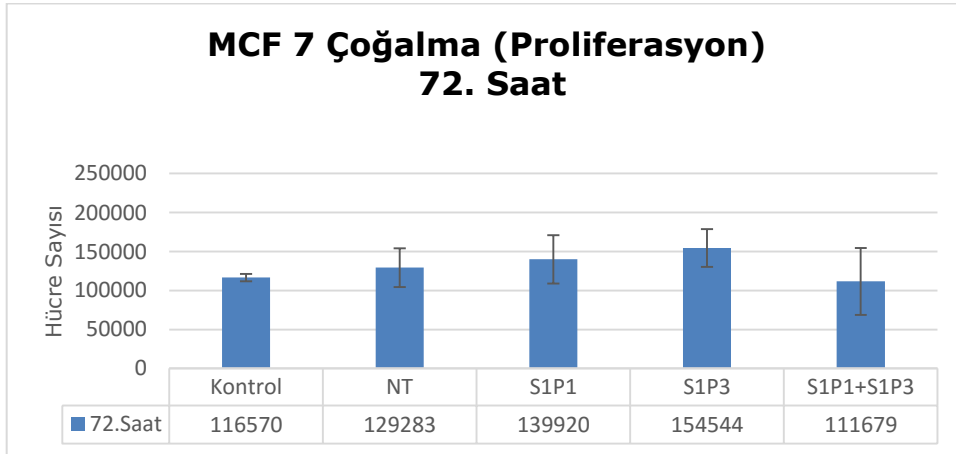
* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, değer ortalama±standart sapma olarak verilmiştir



Şekil 4.3 MCF-7 Hücrelerinde 24. Saat Çoğalma (Proliferasyon)



Şekil 4.4 MCF-7 Hücrelerinde 48. Saat Çoğalma (Proliferasyon)



Şekil 4.5 MCF-7 Hücrelerinde 72. Saat Çoğalma (Proliferasyon)

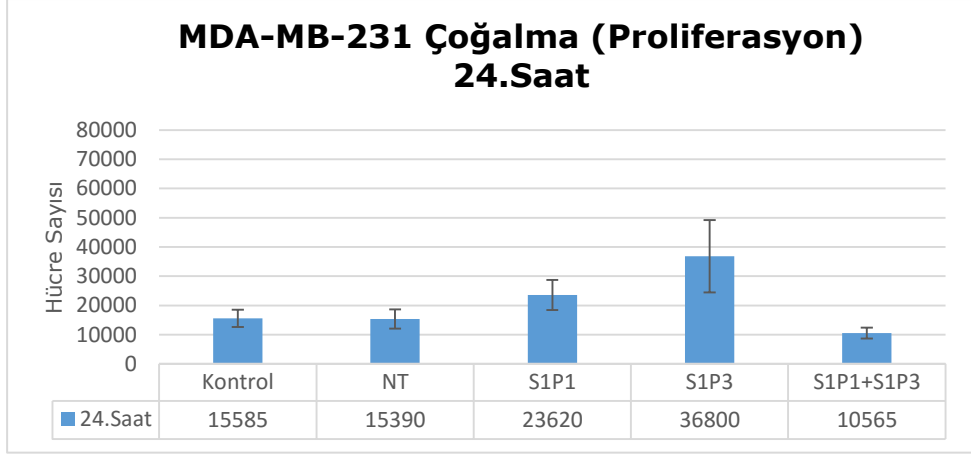
4.3.2. MDA-MB-231 Hücrelerinde Çoğalmanın (Proliferasyon) Belirlenmesi

MDA-MB-231 Hücrelerinde 24. saatte gruplar arasında istatistiksel olarak fark bulundu ($p=0,001$). S1P1'in susturulduğu (23620 ± 5129) gruba göre S1P1 ile S1P3'ün birlikte susturulduğu (10565 ± 1866) grupta azalma gözlemlendi ($p=0,013$) (Şekil 4.6). 48. saatte gruplar arasında istatistiksel olarak fark bulundu ($p=0,001$). S1P1'in susturulduğu (54225 ± 2389) gruba göre S1P1 ile S1P3'ün birlikte susturulduğu (28405 ± 13318) grupta azalma gözlemlendi ($p=0,001$) (Şekil 4.7). 72. saatte gruplar arasında istatistiksel olarak fark bulundu ($p=0,001$). Non target siRNA uygulanan NT (20425 ± 1273) grubuna göre S1P1 ile S1P3'ün birlikte susturulduğu (6855 ± 4400) grupta istatistiksel olarak azalma gözlemlendi ($p=0,040$). Yine aynı saatte S1P1'in susturulduğu (26775 ± 10239) gruba göre S1P1 ile S1P3'ün birlikte susturulduğu (6855 ± 4400) grupta azalma gözlemlendi ($p=0,006$) (Şekil 4.8) (Tablo 4.4).

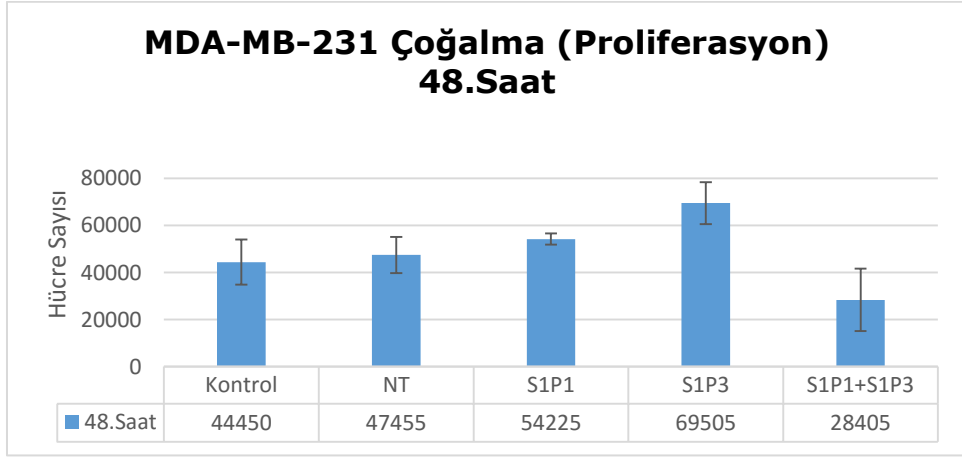
Tablo 4.4 MDA-MB-231 Hücrelerinde 24, 48 ve 72.Saatlerde Çoğalma (Proliferasyon)

SAAT	KONTROL	NT	S1P1	S1P3	S1P1+S1P3
24	15585±2955	15390±3267	23620±5129	36800±12359	10565±1866
48	44450±9641	47455±7724	54225±2389	69505±8873	28405±13318
72	13770±936	20425±1273	26775±10239	23070±3987	6855±4400

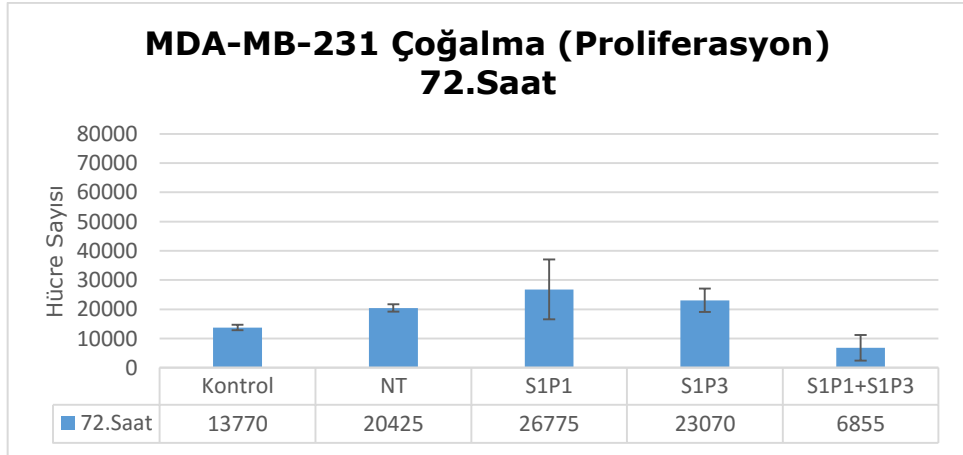
* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, değer ortalama±standart sapma olarak verilmiştir



Şekil 4.6 MDA-MB-231 Hücrelerinde 24. saat Çoğalma (Proliferasyon)



Şekil 4.7 MDA-MB-231 Hücrelerinde 48. Saat Çoğalma (Proliferasyon)



Şekil 4.8 MDA-MB-231 Hücrelerinde 72. Saat Çoğalma (Proliferasyon)

4.4. Hücrelerde Tutunmanın (Adezyon) Belirlenmesi

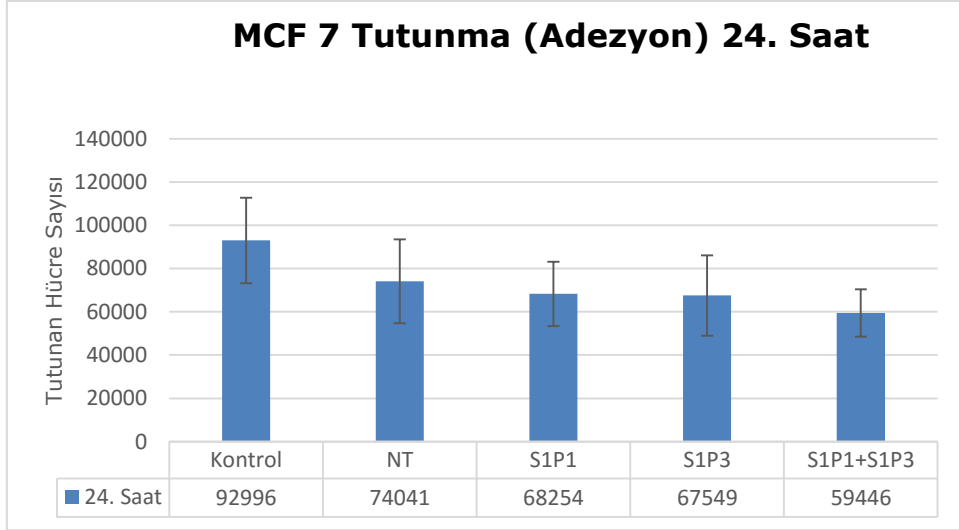
4.4.1 MCF-7 Hücrelerinde Tutunmanın (Adezyon) Belirlenmesi

MCF-7 hücrelerinde 24. saatte gruplar arasında istatistiksel olarak fark bulundu ($p=0,013$). Kontrol grubuna (92996 ± 19749) göre S1P1 ile S1P3'ün birlikte susturulduğu (59446 ± 10991) grupta azalış gözlemlendi ($p=0,008$) (Şekil 4.9). MCF-7 hücrelerinde 48. ve 72. saatlerde gruplar arasında fark gözlemlenmedi (Sırasıyla, $p=0,444$, $p=0,115$) (Şekil 4.10) (Şekil 4.11).

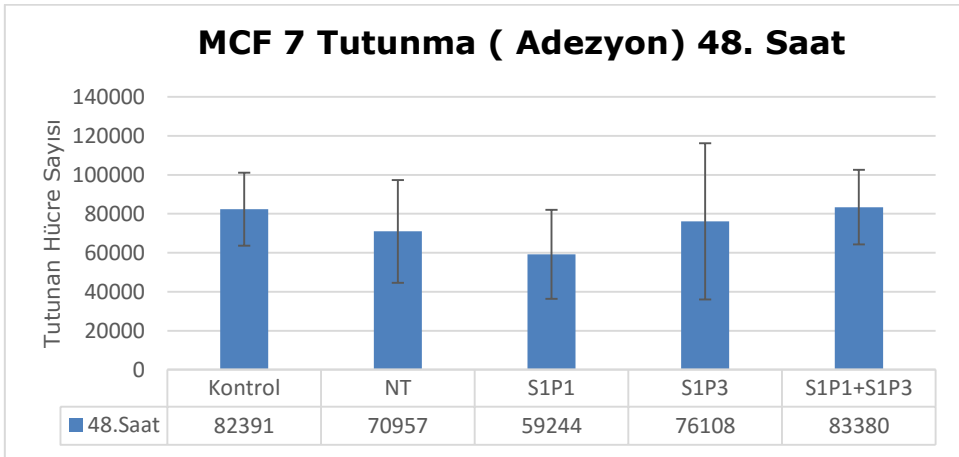
Tablo 4.5 MCF-7 Hücrelerinde 24, 48 ve 72.Saatlerde Tutunma (Adezyon)

SAAT	KONTROL	NT	S1P1	S1P3	S1P1+S1P3
24	92996±19749	74041±19384	68254±14907	67549±18572	**59446±10991
48	82391±18768	70957±26419	59244±22816	76108±40113	83380±19140
72	77001±17714	80426±14345	72014±18785	64391±10956	96014±37167

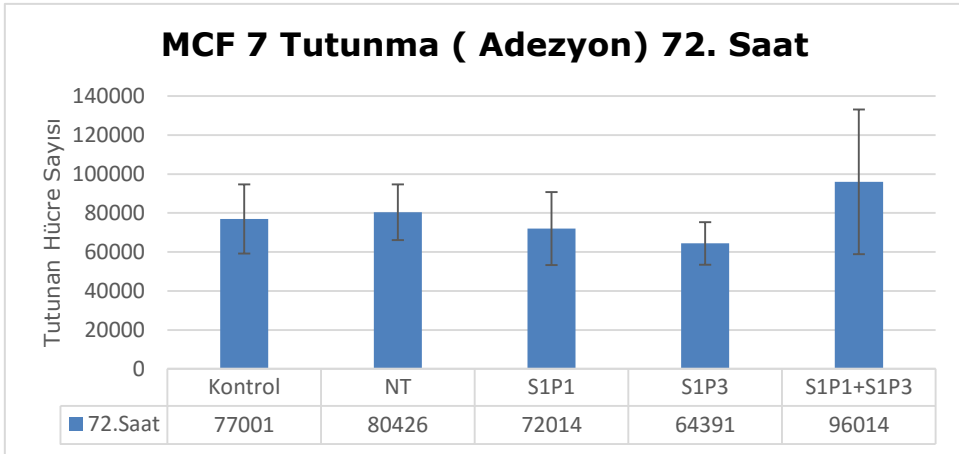
* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, değer ortalama±standart sapma olarak verilmiştir



Şekil 4.9 MCF-7 Hücrelerinde 24. Saat Tutunma (Adezyon)



Şekil 4.10 MCF-7 Hücrelerinde 48.Saat Tutunma (Adezyon)



Şekil 4.11 MCF-7 Hücrelerinde 72.Saat Tutunma (Adezyon)

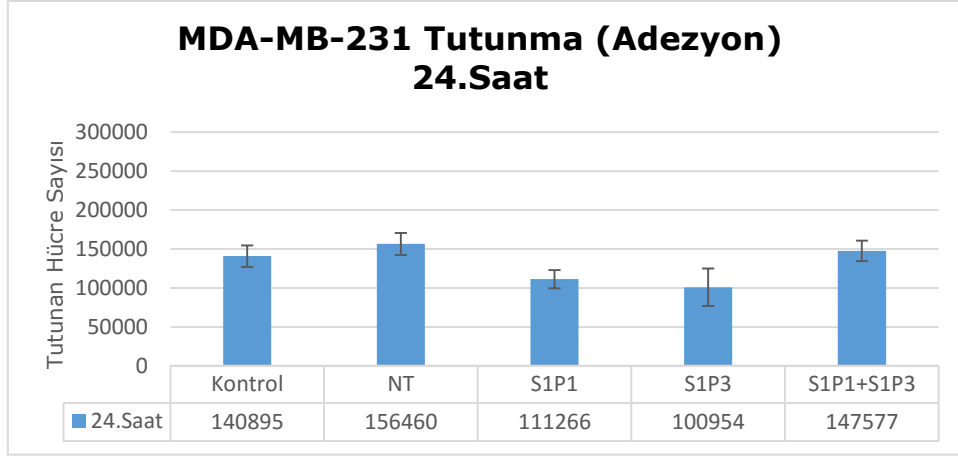
4.4.2. MDA-MB-231 Hücrelerinde Tutunmanın (Adezyon) Belirlenmesi

MDA-MB-231 hücrelerinde 24. saatte gruplar arasında istatistiksel olarak fark bulundu ($p < 0,001$). Kontrol (140895 ± 13679) grubuna göre S1P1 (111266 ± 11829) ($p = 0,027$) ve S1P3'ün susturulduğu (100954 ± 23881) gruplarda azalma gözlemlendi ($p = 0,002$). Non target siRNA uygulanan NT (156460 ± 14111) grubuna göre S1P1 (111266 ± 11829) ($p < 0,001$) ve S1P3'ün susturulduğu (100954 ± 23881) gruplarda istatistiksel olarak azalma gözlemlendi ($p < 0,001$). S1P1'in susturulduğu (111266 ± 11829) gruba göre S1P1 ile S1P3'ün birlikte susturulduğu (147577 ± 13144) grupta istatistiksel olarak artış gözlemlendi ($p = 0,013$) (Şekil 4.12). MDA-MB-231 hücrelerinde 48. ve 72. saatlerde gruplar arasında istatistiksel olarak fark gözlemlenmedi (Sırasıyla, $p = 0,063$, $p = 0,117$) (Tablo 4.6) (Şekil 4.13) (Şekil 4.14).

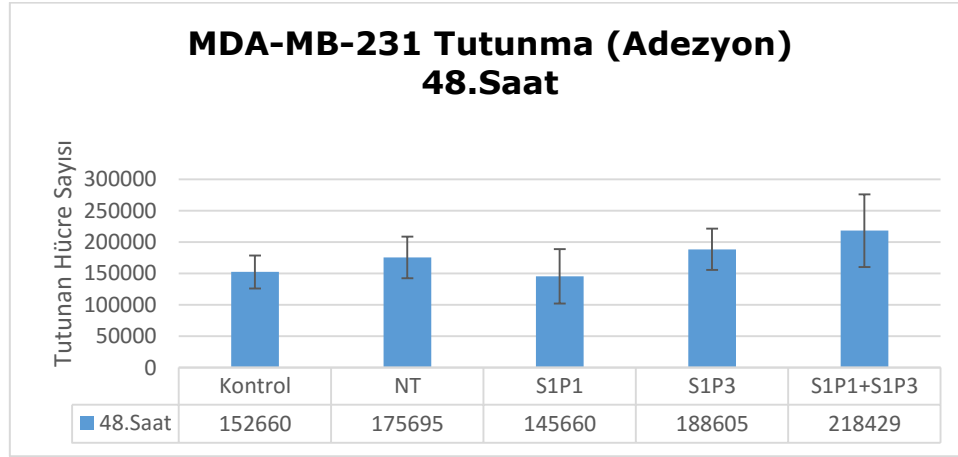
Tablo 4.6 MDA-MB-231 Hücrelerinde 24, 48 ve 72.Saatlerde Tutunma (Adezyon)

SAAT	KONTROL	NT	S1P1	S1P3	S1P1+S1P3
24	140895±13679	156460±14111	*111266±11829	**100954±23881	147577±13144
48	152660±26282	175695±33333	145660±43316	188605±32748	218429±57830
72	178251±15690	160454±10578	178714±67781	129588±16532	167719±26614

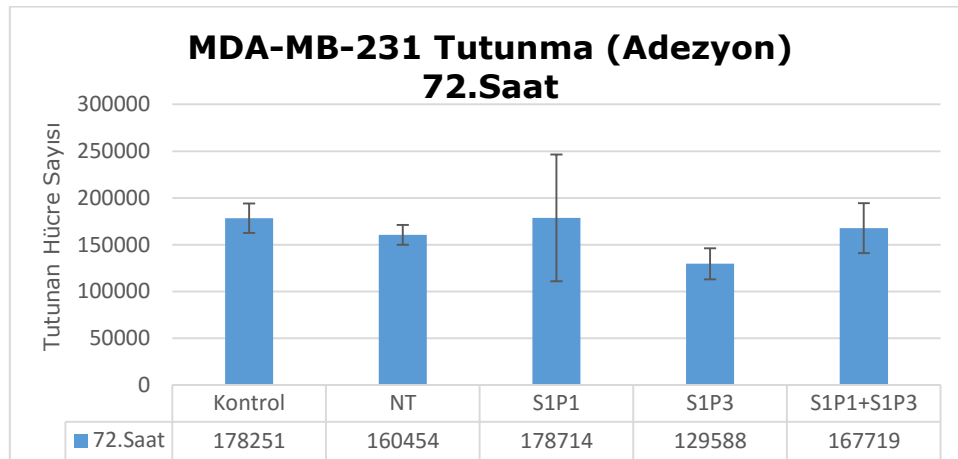
* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, değer ortalama±standart sapma olarak verilmiştir



Şekil 4.12 MDA-MB-231 Hücrelerinde 24.Saat Tutunma (Adezyon)



Şekil 4.13 MDA-MB-231 Hücrelerinde 48.Saat Tutunma (Adezyon)



Şekil 4.14 MDA-MB-231 Hücrelerinde 72.Saat Tutunma (Adezyon)

4.5. Hücrelerde Lateral Motilitenin (Wound Healing) Belirlenmesi

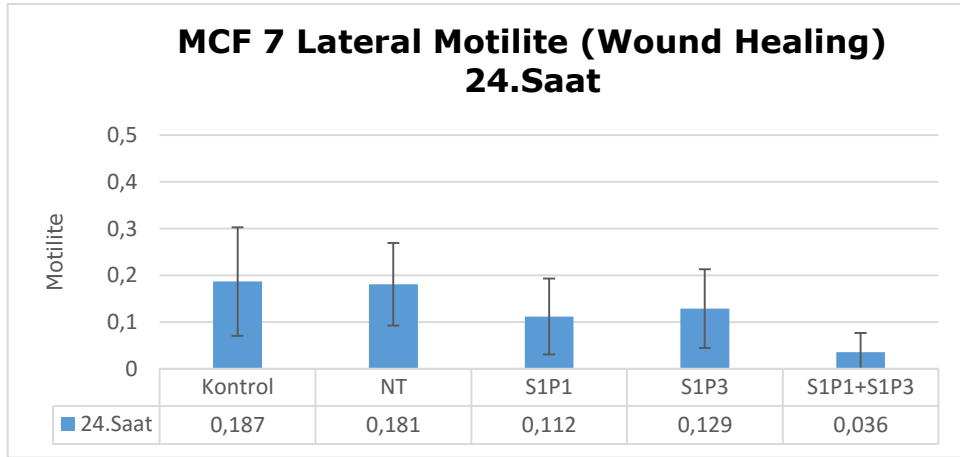
4.5.1. MCF-7 Hücrelerinde Lateral Motilitenin (Wound Healing) Belirlenmesi

MCF-7 hücrelerinde 24, 48 ve 72. saatlerde gruplar arasında istatistiksel olarak fark bulundu ($p < 0,001$).

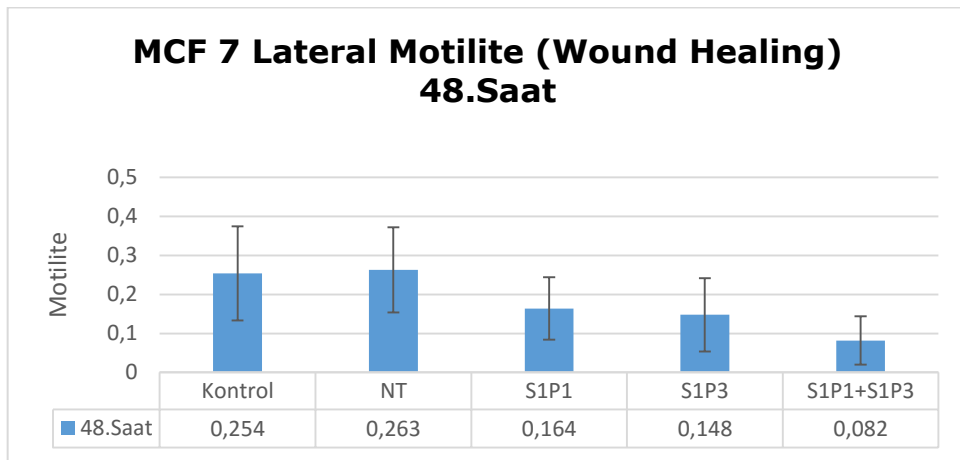
MCF-7 hücrelerinde 24. saatte kontrol grubuna $[0,150 (0,095-0,255)]$ göre S1P1 $[0,110 (0,060-0,150)]$ ($p < 0,001$), S1P3 $(0,129 \pm 0,085)$ ($p = 0,004$) ve S1P1 ile S1P3'ün birlikte susturulduğu $[0,000 (0,000-0,625)]$ gruplarda lateral motilitenin istatistiksel olarak azaldığı gözlemlendi ($p < 0,001$). Aynı saatte non target siRNA uygulanan NT $(0,181 \pm 0,088)$ grubuna göre, S1P1 $[0,110 (0,060-0,150)]$ ($p < 0,001$), S1P3 $(0,129 \pm 0,085)$ ($p = 0,011$) ve S1P1 ile S1P3'ün birlikte susturulduğu $[0,000 (0,000-0,625)]$ gruplarda lateral motilitenin istatistiksel olarak azaldığı gözlemlendi ($p < 0,001$). Yine aynı saatte S1P1'in susturulduğu $[0,110 (0,060-0,150)]$ gruba göre S1P1 ile S1P3'ün birlikte susturulduğu $[0,000 (0,000-0,625)]$ grupta lateral motilitenin istatistiksel olarak azaldığı gözlemlendi ($p < 0,001$). S1P3'ün susturulduğu $(0,129 \pm 0,085)$ gruba göre S1P1 ile S1P3'ün birlikte susturulduğu $[0,000 (0,000-0,625)]$ grupta lateral motilitenin istatistiksel olarak azaldığı gözlemlendi ($p < 0,001$) (Şekil 4.15).

MCF-7 hücrelerinde 48. saatte kontrol grubuna $(0,254 \pm 0,121)$ göre S1P1 $(0,164 \pm 0,080)$ ($p < 0,001$), S1P3 $(0,148 \pm 0,094)$ ($p < 0,001$) ve S1P1 ile S1P3'ün birlikte susturulduğu $[0,070 (0,060-0,130)]$ gruplarda lateral motilitenin istatistiksel olarak azaldığı gözlemlendi ($p < 0,001$). Aynı saatte non target siRNA uygulanan NT $(0,263 \pm 0,109)$ grubuna göre, S1P1 $(0,164 \pm 0,080)$ ($p < 0,001$), S1P3 $(0,148 \pm 0,094)$ ($p < 0,001$) ve S1P1 ile S1P3'ün birlikte susturulduğu $[0,070 (0,060-0,130)]$ gruplarda lateral motilitenin istatistiksel olarak azaldığı gözlemlendi ($p < 0,001$). Yine aynı saatte S1P1'in susturulduğu $(0,164 \pm 0,080)$ gruba göre S1P1 ile S1P3'ün birlikte susturulduğu $[0,070 (0,060-0,130)]$ grupta lateral motilitenin istatistiksel olarak azaldığı gözlemlendi ($p < 0,001$). S1P3'ün susturulduğu $(0,148 \pm 0,094)$ gruba göre S1P1 ile S1P3'ün birlikte susturulduğu $[0,070 (0,060-0,130)]$ grupta lateral motilitenin azaldığı gözlemlendi ($p = 0,003$) (Şekil 4.16).

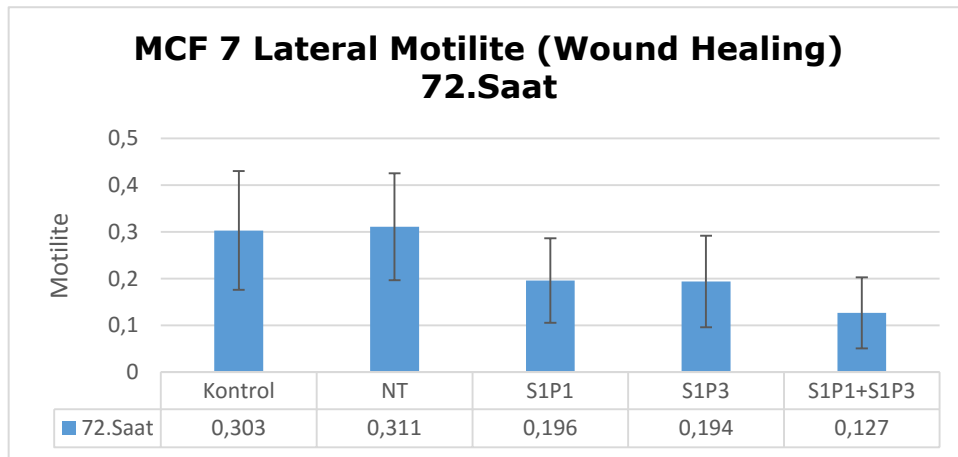
MCF-7 hücrelerinde 72. saatte kontrol grubuna ($0,303\pm0,127$) göre S1P1 ($0,196\pm0,090$) ($p<0,001$), S1P3 ($0,194\pm0,098$) ($p<0,001$) ve S1P1 ile S1P3'ün birlikte susturulduğu ($0,129\pm0,076$) gruplarda lateral motilitenin istatistiksel olarak azaldığı gözlemlendi ($p<0,001$). Aynı saatte non target siRNA uygulanan NT ($0,311\pm0,114$) grubuna göre, S1P1 ($0,196\pm0,090$) ($p<0,001$), S1P3 ($0,194\pm0,098$) ($p<0,001$) ve S1P1 ile S1P3'ün birlikte susturulduğu ($0,129\pm0,076$) gruplarda lateral motilitenin istatistiksel olarak azaldığı gözlemlendi ($p<0,001$). Yine aynı saatte S1P1'in susturulduğu ($0,196\pm0,090$) gruba göre S1P1 ile S1P3'ün birlikte susturulduğu ($0,129\pm0,076$) grupta lateral motilitenin azaldığı gözlemlendi ($p<0,001$). S1P3'ün susturulduğu ($0,194\pm0,098$) gruba göre S1P1 ile S1P3'ün birlikte susturulduğu ($0,129\pm0,076$) grupta lateral motilitenin azaldığı gözlemlendi ($p=0,003$) (Şekil 4.12).



Şekil 4.15 MCF-7 Hücrelerinde 24.Saat Lateral Motilite



Şekil 4.16 MCF-7 Hücrelerinde 48.Saat Lateral Motilite



Şekil 4.17 MCF-7 Hücrelerinde 72.Saat Lateral Motilite

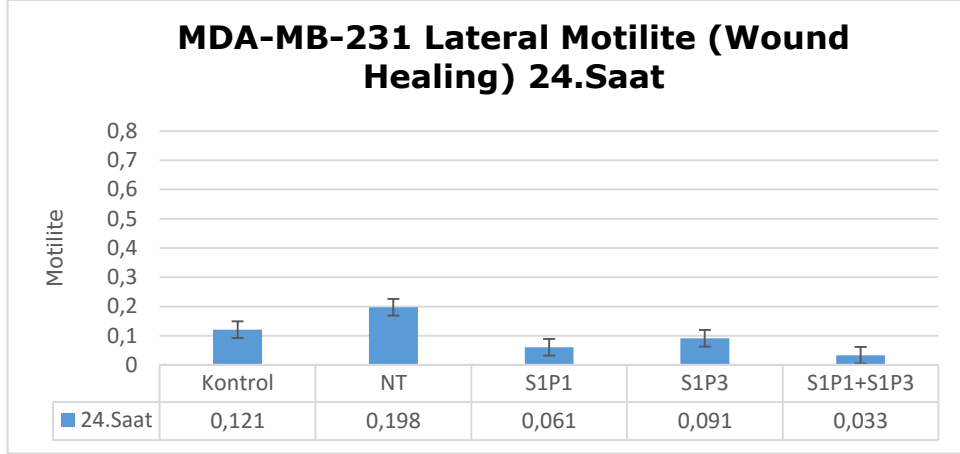
4.5.2. MDA-MB-231 Hücrelerinde Lateral Motilitenin (Wound Healing) Belirlenmesi

MDA-MB-231 hücrelerinde 24, 48 ve 72. saatlerde gruplar arasında istatistiksel olarak fark bulundu ($p < 0,001$).

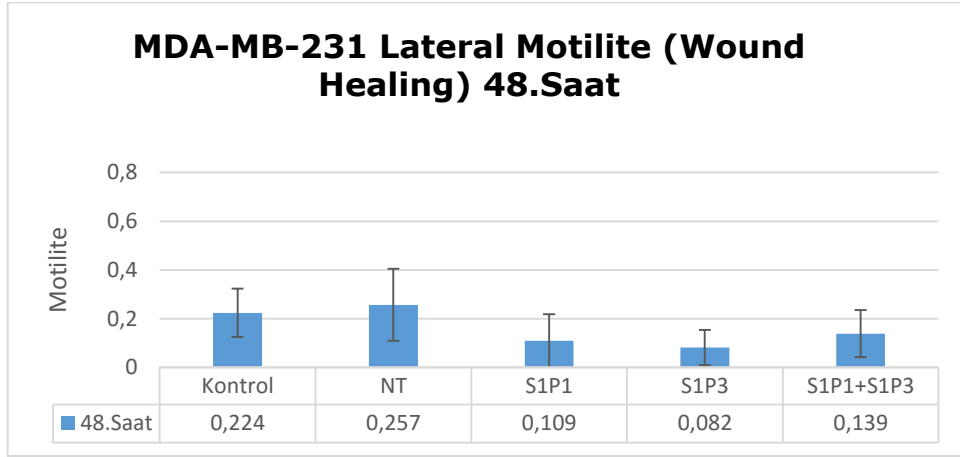
MDA-MB-231 hücrelerinde 24. saatte kontrol grubuna ($0,121 \pm 0,076$) göre S1P1 ile S1P3'ün birlikte susturulduğu [$0,000$ ($0,000-0,074$)] grupta lateral motilitenin istatistiksel olarak azaldığı gözlemlendi ($p < 0,001$). Aynı saatte non target siRNA uygulanan NT ($0,198 \pm 0,110$) grubuna göre, S1P1 [$0,000$ ($0,000-0,133$)] ($p < 0,001$), S1P3 [$0,056$ ($0,000-0,133$)] ($p < 0,001$) ve S1P1 ile S1P3'ün birlikte susturulduğu [$0,000$ ($0,000-0,074$)] gruplarda lateral motilitenin azaldığı gözlemlendi ($p < 0,001$) (Şekil 4.18).

MDA-MB-231 hücrelerinde 48. saatte kontrol grubuna [$0,235$ ($0,143-0,308$)] göre S1P1 susturulduğu [$0,133$ ($0,000-0,160$)] ($p < 0,001$), S1P3 [$0,077$ ($0,000-0,133$)] ($p < 0,001$) ve S1P1 ile S1P3'ün birlikte susturulduğu [$0,125$ ($0,069-0,191$)] grupta lateral motilitenin istatistiksel olarak azaldığı gözlemlendi ($p < 0,001$). Aynı saatte non target siRNA uygulanan NT ($0,257 \pm 0,148$) grubuna göre, S1P1 [$0,133$ ($0,000-0,160$)] ($p < 0,001$), S1P3 [$0,077$ ($0,000-0,133$)] ($p < 0,001$) ve S1P1 ile S1P3'ün birlikte susturulduğu [$0,125$ ($0,069-0,191$)] gruplarda lateral motilitenin azaldığı gözlemlendi ($p < 0,001$) (Şekil 4.19).

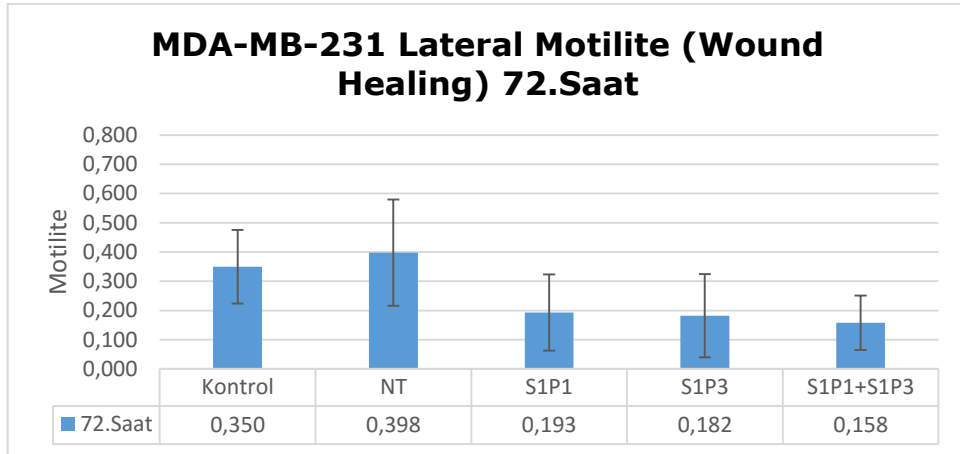
MDA-MB-231 hücrelerinde 72. saatte kontrol grubuna ($0,350 \pm 0,126$) göre S1P1 [$0,214$ ($0,087-0,286$)] ($p < 0,001$), S1P3 [$0,158$ ($0,067-0,286$)] ($p < 0,001$) ve S1P1 ile S1P3'ün birlikte susturulduğu ($0,158 \pm 0,093$) gruplarda lateral motilitenin istatistiksel olarak azaldığı gözlemlendi ($p < 0,001$). Aynı saatte non target siRNA uygulanan NT ($0,398 \pm 0,182$) grubuna göre, S1P1 [$0,214$ ($0,087-0,286$)] ($p < 0,001$), S1P3 [$0,158$ ($0,067-0,286$)] ($p < 0,001$) ve S1P1 ile S1P3'ün birlikte susturulduğu ($0,158 \pm 0,093$) gruplarda lateral motilitenin azaldığı gözlemlendi ($p < 0,001$) (Şekil 4.20).



Şekil 4.18 MDA-MB-231 Hücrelerinde 24.Saat Lateral Motilite



Şekil 4.19 MDA-MB-231 Hücrelerinde 48.Saat Lateral Motilite



Şekil 4.20 MDA-MB-231 Hücrelerinde 72.Saat Lateral Motilite

4.6. Hücrelerde Canlılığın Belirlenmesi

4.6.1. MCF-7 Hücrelerinde Canlılığın Belirlenmesi

MCF-7 hücrelerinde 24. saatte kontrol grubuna (%74,32) göre S1P1 (%71,13), S1P3 (% 64,36) ve S1P1 ile S1P3'ün birlikte susturulduğu gruplarda (%64,39) yüzde canlılık oranı azalmıştır. Yine aynı saatte non target siRNA uygulanan NT grubuna (%78,36) göre S1P1 (%71,13), S1P3 (% 64,36) ve S1P1 ile S1P3'ün birlikte susturulduğu gruplarda (%64,39) yüzde canlılık oranı azalmıştır (Şekil 4.21) (Tablo 4.7). MCF-7 hücrelerinde 48.saatte kontrol grubuna (%71,82) göre S1P1 (%62,79), S1P3 (% 62,39) ve S1P1 ile S1P3'ün birlikte susturulduğu gruplarda (%59,26) yüzde canlılık oranı azalmıştır. Yine aynı saatte non target siRNA uygulanan NT grubuna (%72,38) göre S1P1 (%62,79), S1P3 (% 62,39) ve S1P1 ile S1P3'ün birlikte susturulduğu gruplarda (%59,26) yüzde canlılık oranı azalmıştır (Şekil 4.22) (Tablo 4.8). MCF-7 hücrelerinde 72.Saatte kontrol grubuna (%72,42) göre S1P1 (%66,67), S1P3 (% 67,76) ve S1P1 ile S1P3'ün birlikte susturulduğu gruplarda (%65,93) yüzde canlılık oranı azalmıştır. Yine aynı saatte non target siRNA uygulanan NT grubuna (%73,44) göre S1P1 (%66,67), S1P3 (% 67,76) ve S1P1 ile S1P3'ün birlikte susturulduğu gruplarda (%65,93) yüzde canlılık oranı azalmıştır (Şekil 4.23) (Tablo 4.9).

Tablo 4.7 24.Saat MCF-7 Hücrelerinde Canlılık

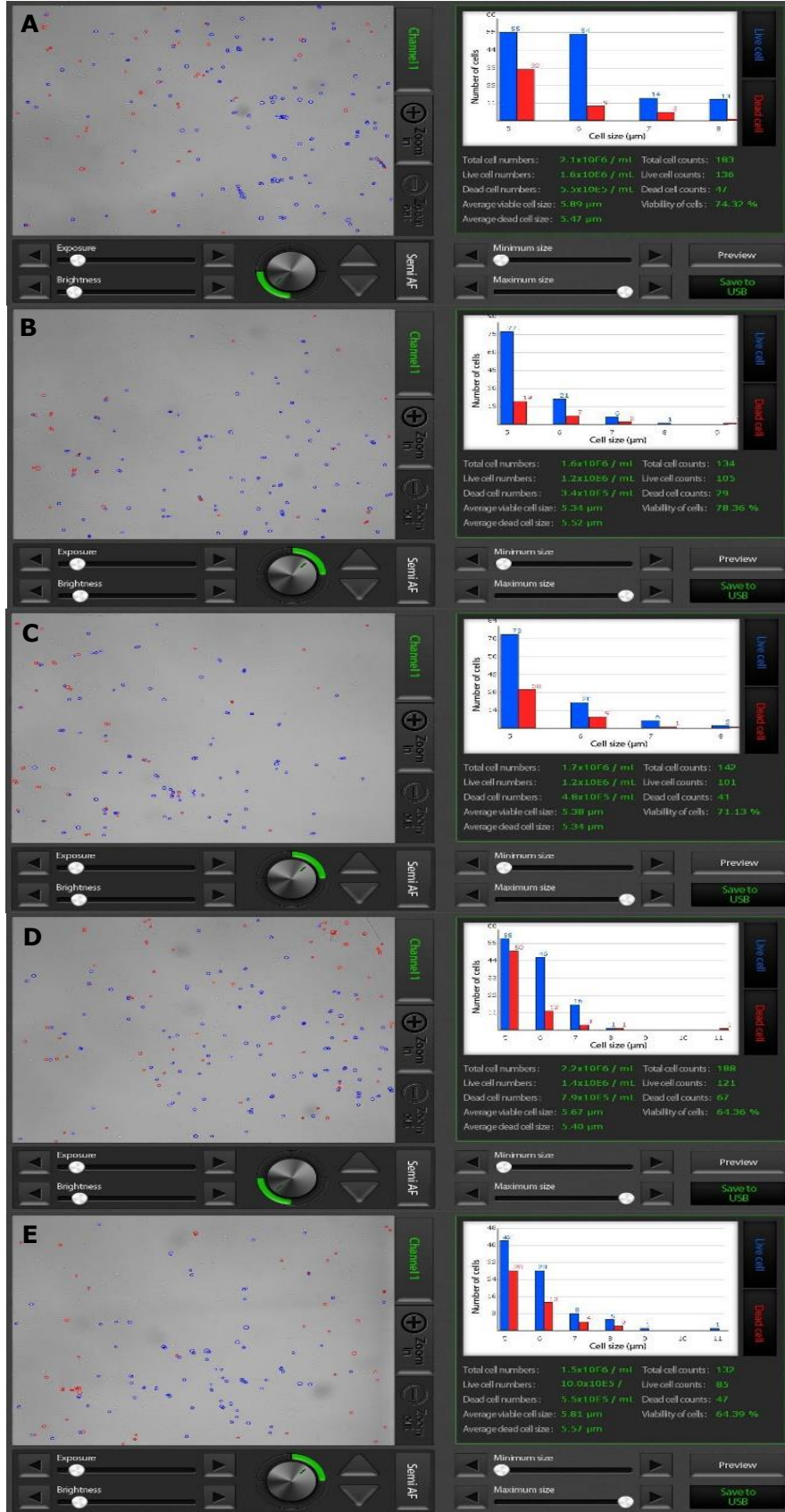
24. Saat GRUPLAR	% Canlılık
KONTROL	74,32
NT	78,36
S1P1	71,13
S1P3	64,36
S1P1+S1P3	64,39

Tablo 4.8 48.Saat MCF-7 Hücrelerinde Canlılık

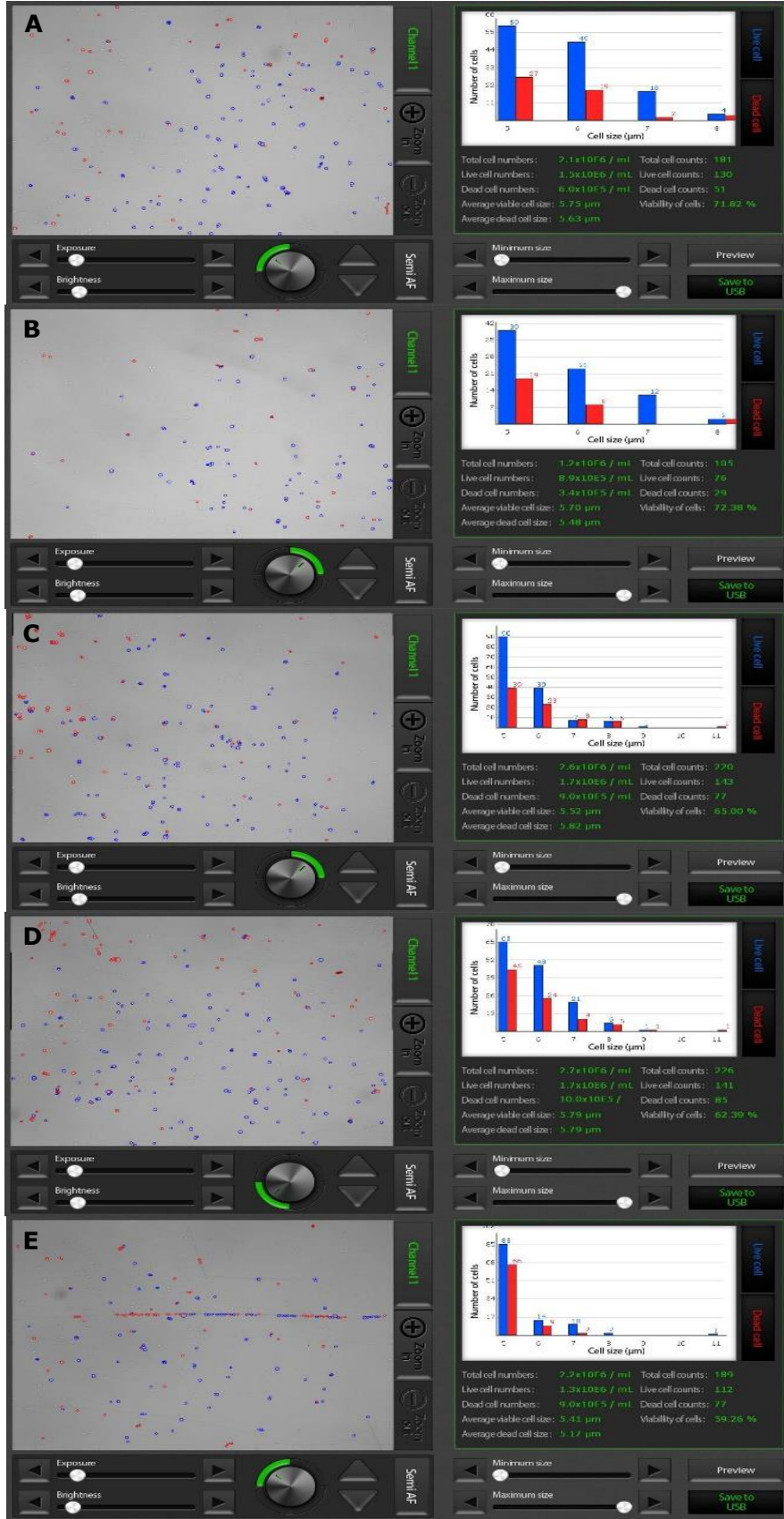
48.Saat GRUPLAR	% Canlılık
KONTROL	71,82
NT	72,38
S1P1	62,79
S1P3	62,39
S1P1+S1P3	59,26

Tablo 4.9 72.Saat MCF-7 Hücrelerinde Canlılık

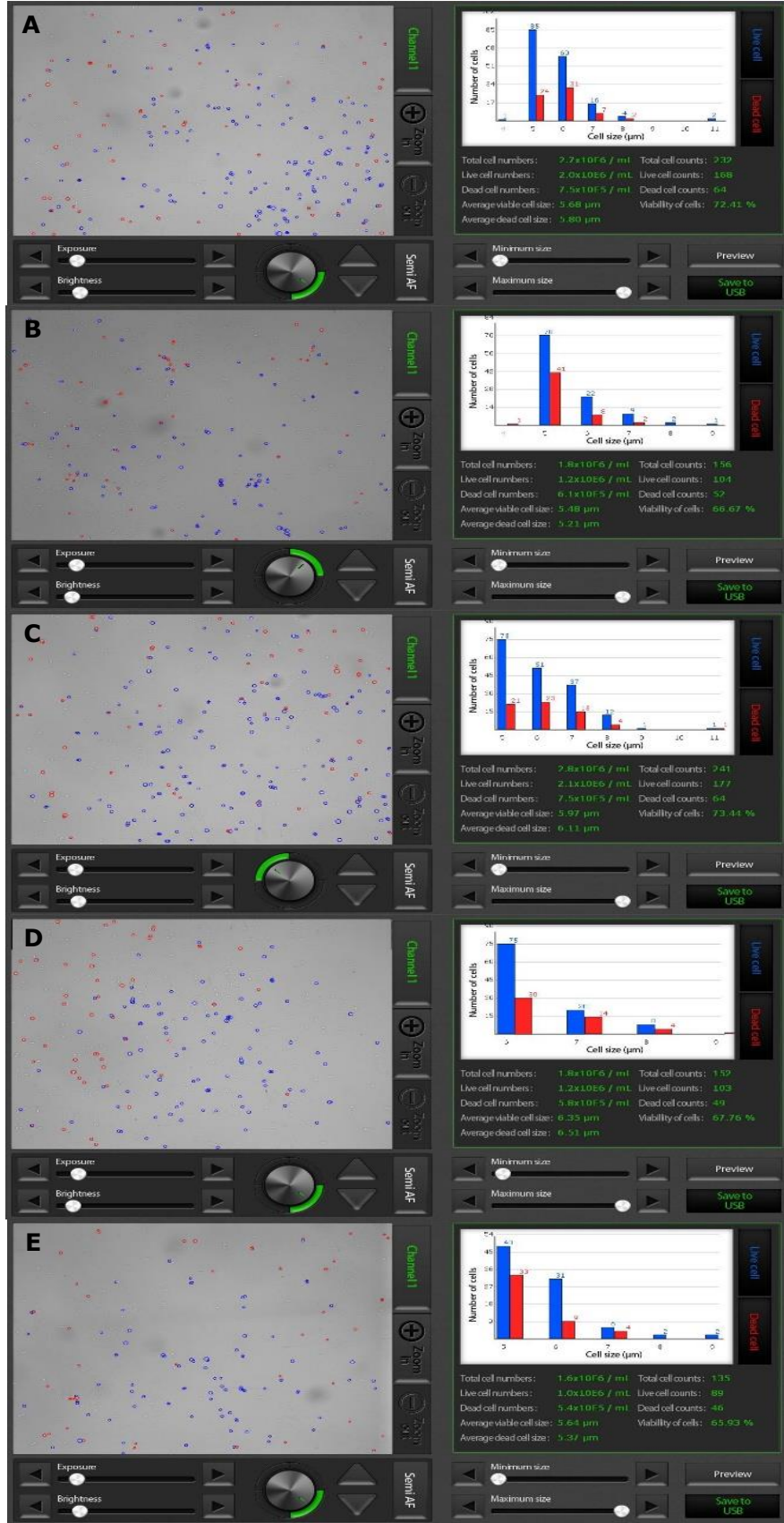
72.Saat GRUPLAR	% Canlılık
KONTROL	72,42
NT	73,44
S1P1	66,67
S1P3	67,76
S1P1+S1P3	65,93



Şekil 4.21 24.Saat MCF-7 Hücrelerinde Canlılık Sonuçları **A:**Kontrol Grubu **B:**NT Grubu **C:**S1P1'ı susturulan grup **D:** S1P3'ü susturulan grup **E:** S1P1 ile S1P3'ü Susturulan Grup



Şekil 4.22 48. Saat MCF-7 Hücrelerinde Canlılık Sonuçları **A:**Kontrol Grubu **B:**NT Grubu **C:**S1P1'i susturulan grup **D:** S1P3'ü susturulan grup **E:** S1P1 ile S1P3'ü Susturulan Grup



Şekil 4.23 72. Saat MCF-7 Hücrelerinde Canlılık Sonuçları **A:**Kontrol Grubu **B:**NT Grubu **C:**S1P1'i susturulan grup **D:** S1P3'ü susturulan grup **E:** S1P1 ile S1P3'ü Susturulan Grup

4.6.2. MDA-MB-231 Hücrelerinde Canlılığın Belirlenmesi

MDA-MB-231 hücrelerinde 24. saatte kontrol grubuna (%73,56) göre S1P1 (%64,94), S1P3 (%64,79) ve S1P1 ile S1P3'ün birlikte susturulduğu gruplarda (%51,32) yüzde canlılık oranı azalmıştır. Yine aynı saatte non target siRNA uygulanan NT grubuna (%74,36) göre S1P1 (%64,94), S1P3 (%64,79) ve S1P1 ile S1P3'ün birlikte susturulduğu gruplarda (%51,32) yüzde canlılık oranı azalmıştır (Şekil 4.24) (Tablo 4.12). MDA-MB-231 hücrelerinde 48.Saatte kontrol grubuna (%77,55) göre S1P1 (%64,94), S1P3 (%64,79) ve S1P1 ile S1P3'ün birlikte susturulduğu gruplarda (%47,15) yüzde canlılık oranı azalmıştır. Yine aynı saatte non target siRNA uygulanan NT grubuna (%70,43) göre S1P1 (%64,94), S1P3 (%64,79) ve S1P1 ile S1P3'ün birlikte susturulduğu gruplarda (%47,15) yüzde canlılık oranı azalmıştır (Şekil 4.25) (Tablo 4.13). MDA-MB-231 hücrelerinde 72.Saatte kontrol grubuna (%64,39) göre S1P1 (%60,64) ve S1P1 ile S1P3'ün birlikte susturulduğu gruplarda (%59,18) yüzde canlılık oranı azalmıştır. Yine aynı saatte non target siRNA uygulanan NT grubuna (%68,04) göre S1P1 (%60,64), S1P3 (%67,76) ve S1P1 ile S1P3'ün birlikte susturulduğu gruplarda (%59,18) yüzde canlılık oranı azalmıştır (Şekil 4.26) (Tablo 4.14).

Tablo 4.10 24.Saat MDA-MB-231 Hücrelerinde Canlılık

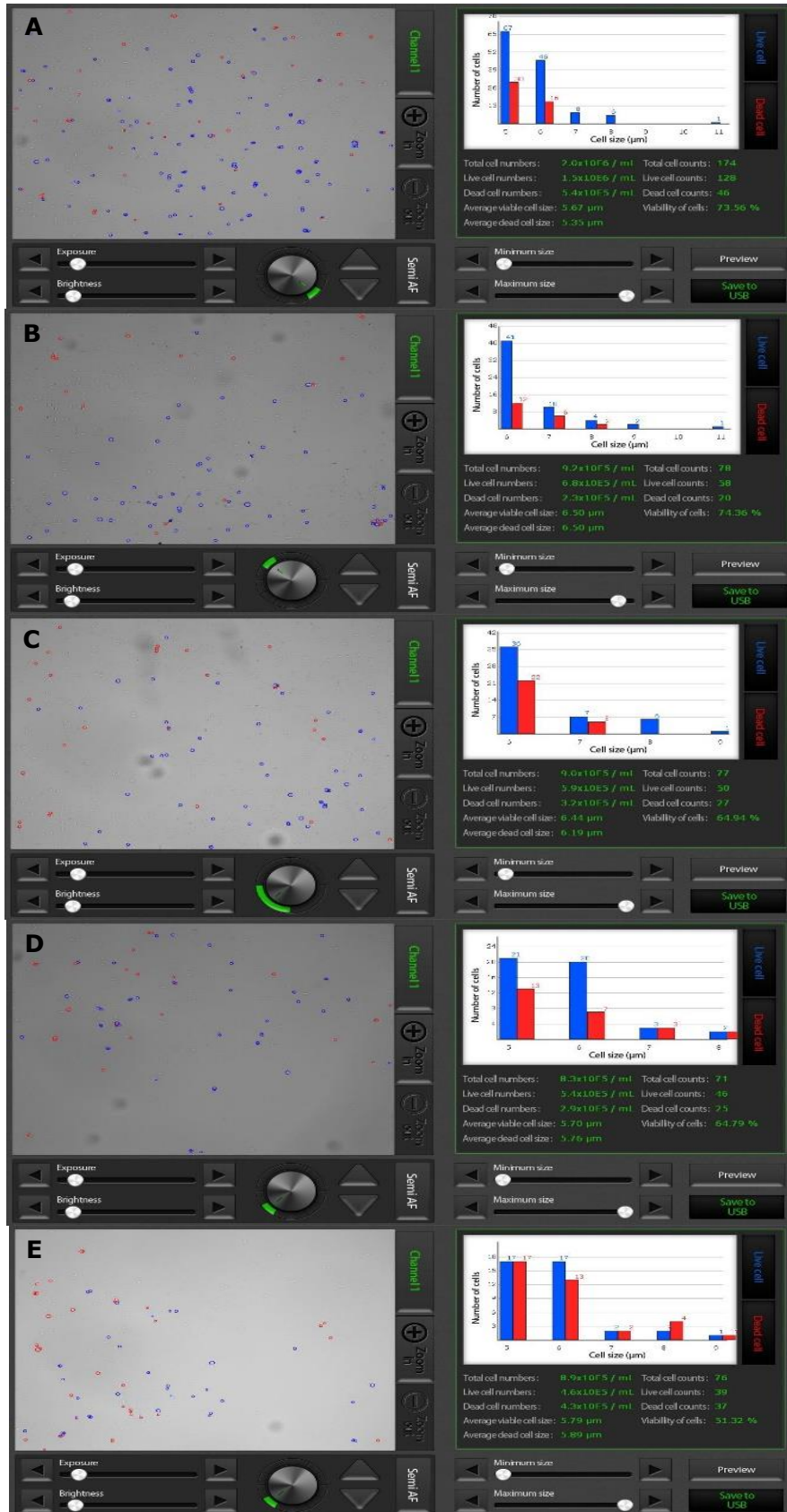
24. Saat GRUPLAR	% Canlılık
Kontrol	73,56
NT	74,36
S1P1	64,94
S1P3	64,79
S1P1+S1P3	51,32

Tablo 4.11 48.Saat MDA-MB-231 Hücrelerinde Canlılık

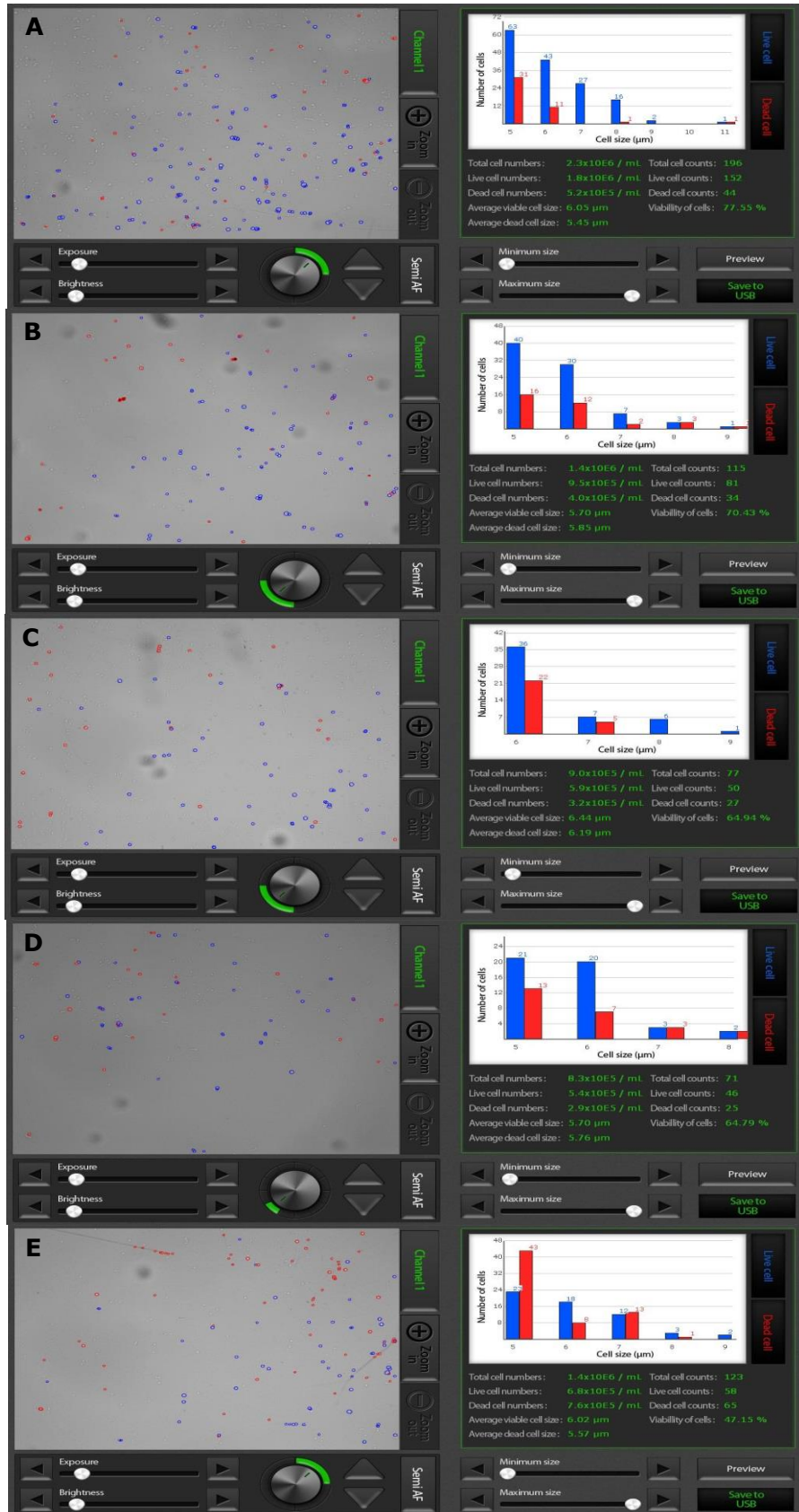
48. Saat GRUPLAR	% Canlılık
Kontrol	77,55
NT	70,43
S1P1	64,94
S1P3	64,79
S1P1+S1P3	47,15

Tablo 4.12 72.Saat MDA-MB-231 Hücrelerinde Canlılık

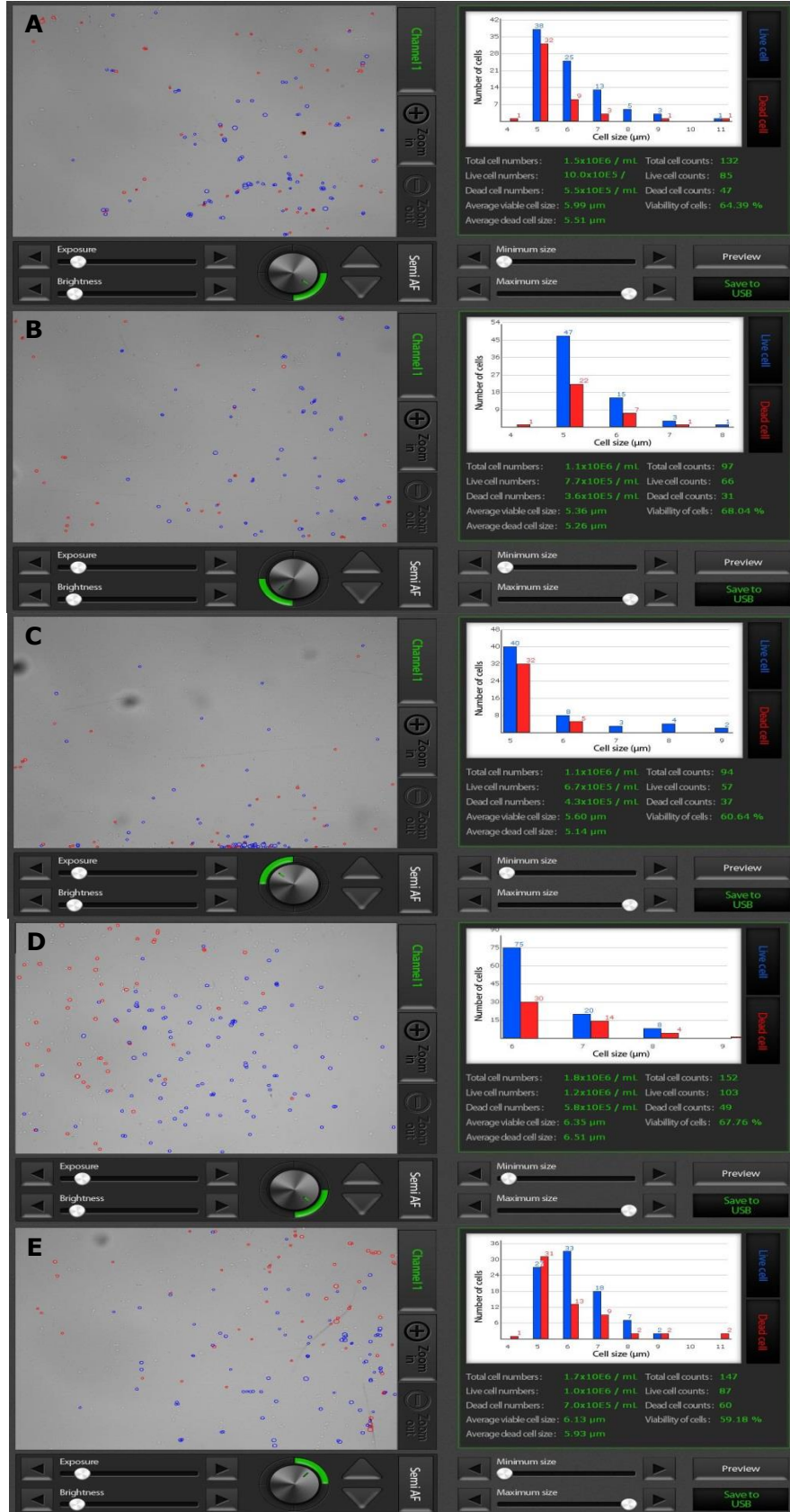
72. Saat GRUPLAR	% Canlılık
Kontrol	64,39
NT	68,04
S1P1	60,64
S1P3	67,76
S1P1+S1P3	59,18



Şekil 4.24 24.Saat MDA-MB-231 Hücrelerinde Canlılık Sonuçları **A:**Kontrol Grubu **B:**NT Grubu **C:**S1P1'i susturulan grup **D:**S1P3'ü susturulan grup **E:**S1P1 ile S1P3'ü Susturulan Grup



Şekil 4.25 48.Saat MDA-MB-231 Hücrelerinde Canlılık Sonuçları **A:**Kontrol Grubu **B:**NT Grubu **C:**S1P1'i susturulan grup **D:**S1P3'ü susturulan grup **E:**S1P1 ile S1P3'ü Susturulan Grup



Şekil 4.26 72.Saat MDA-MB-231 Hücrelerinde Canlılık Sonuçları **A:**Kontrol Grubu **B:**NT Grubu **C:**S1P1'i susturulan grup **D:**S1P3'ü susturulan grup **E:**S1P1 ile S1P3'ü Susturulan Grup

5. TARTIŞMA

Günümüzde kanser ve metastazı en önemli sağlık sorunlarından biridir. S1P ve reseptörlerinin bazı kanserler ve metastazındaki durumları araştırılmış olup, meme kanserinin metastazındaki rolü henüz tam olarak ortaya konmamıştır. Meme kanserlerinin yayılmasında bu moleküllerin yerinin ortaya konması için, S1P ile reseptörlerinin ilişkisinin belirlenmesi önemlidir. Bu nedenle reseptörlerden kanser ve metastazında rol oynayan S1P1 ve S1P3 araştırma konusu olarak seçilmiştir.

Yapılan çalışmalar, sfingozin 1-fosfat (S1P)'ın hücrenin büyümesi, hayatta kalması, hareketinin düzenlenmesi gibi faaliyetlerinin yanında invazyon, anjiyogenez ve vasküler olgunlaşma gibi olaylarda etkili olduğunu göstermektedir (Kim vd., 2009).

Sfingozin 1-fosfat molekülünün şimdiye kadar G proteinine bağlı 5 reseptörü tanımlanmış ve karakterize edilmiştir. Bunlar; sfingozin 1-fosfat reseptör 1, sfingozin 1-fosfat reseptör 2, sfingozin 1-fosfat reseptör 3, sfingozin 1-fosfat reseptör 4, sfingozin 1-fosfat reseptör 5'tir (Im vd., 2001). Çeşitli hücre tiplerinde S1P'nin çeşitli fonksiyonlara aracılık etmesinde sorumlu olan S1P1 ve S1P3 yaygın olarak bulunan S1P reseptör alt tipleridir (Takuwa, 2011).

S1P1 ve S1P3 hücre göçünü teşvik eder. S1P2'nin hücre göçü bloklama mekanizması hakkında bazı belirsizlikler hala devam etmektedir (Van Brocklyn, 2010). S1P4 ve S1P5 ise normal dokularda daha sınırlı eksprese olur (Hisano vd., 2012). Bununla birlikte Long ve arkadaşları MDA-MB-453 hücreleriyle yaptığı bir çalışmada kanserde etkili olmadığı düşünülen ve lenfoid hücrelerde ifade edilen S1P4 reseptörünün S1P aracılı ve EGF reseptör tirozin kinazın dahil olmadığı bir mekanizmayla ERK 1/2'yi stimüle ettiğini göstermiştir. Bu çalışmanın sonucunda, S1P'e yanıt olarak üretilen ERK-1/2 yolu üzerinde sinyal alımı bir onkogen olan HER2'nin östrojen negatif meme kanseri hücrelerinde artışına sebep olabileceği bildirilmiştir (Long vd., 2010).

Bu reseptörlerden S1P1 ve S1P3'ün invaziv ve invaziv olmayan meme kanser hücrelerinde sessizleştirilmesi ile hücrelerin davranışlarına olan etkilerinin gözlemlendiği çalışmamızda değerli olabileceğini düşündüğümüz bazı bulgulara ulaşıldı. Reseptörler hakkında ulaştığımız bu bulgular S1P ve reseptörleri hakkında yapılan araştırmalarla birlikte tartışılarak değerlendirilecektir.

Yapılan çalışmalar S1P'nin kemokinetik/kemotaktik hareketliliği ve vasküler endotelial hücrelerin çoğalmasında yardımcı olduğunu bildirmektedir. Ayrıca, bilinen anjiyogenik faktör olan bFGF'ye benzer şekilde, in vitro koşullarda anjiyogenezi de stimüle etmektedir. S1P ve bFGF, endotelial hücrelerin kollajen jelleri istila etmesi ile kapiler benzeri tüplerin oluşumunda ilave etkilere sahip olduğu için, spesifik bir anjiyogenik faktör olabileceği bildirilmiştir (Wang vd., 1999).

İntravasküler sıvının damar dışına kaçması (ekstravazasyon) ile aktive olmuş pıhtı hücreleri tarafından S1P'nin lokal üretimi artırılabilir. Bu artışın anjiyogenezi ve yara iyileşmesini teşvik etmesi ile normal kan damarı oluşumunda veya yaralanmada rol oynaması mümkündür (Wang vd., 1999). S1P'nin hücre göçünü ve anjiyogenezi stimüle etmesi ile ilgili moleküler mekanizmalarının aydınlatılması, GPCR'nin EDG ailesini hedef alarak bu proseslerin ya teşvik edilmesi ya da bloklanması için yeni terapötik ajanların geliştirilmesi hususunda ipuçları sağlayabilir.

Bununla birlikte bazı çalışmalarda S1P'nin hücre hareketliliğini azalttığı yolunda sonuçlarda mevcuttur. Wang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, dışarıdan S1P verilen MDA-MB-231 ve BT 549 hücreleri ve MCF-7, ZR-75-1 hücrelerine olan etkileri gözlenmiştir. Araştırmaya göre, hücrelere yüksek dozlarda uygulanan S1P'nin hücrelerin kemotaktik hareketini engellediği bulunmuştur. Çalışma S1P'nin hücrelerin kemotaktik hareketleri üzerindeki etkisinin hücreler içi yolla mı yoksa yeni bulunan endotelial farklılaşım geni ailesinin (Endothelial Differentiation Gene; EDG, S1PR) G proteini ile birleştirilmiş S1P reseptörleri yoluyla mı olduğunu konusunun ilgi çekici olduğunu bildirmektedir. Hücrelerde yapılan Real-time PCR analizlerinin sonucu, S1P1 reseptörüne ait gen ekspresyonunun tespit edilmediği, S1P3 reseptör ekspresyonunun olduğu ancak hücrelere dışarıdan uygulanan S1P'nin gen ekspresyonlarına etkisinin olmadığı belirtilmiştir. Yapılan ayrıntılı araştırmaların sonucu, dışarıdan uygulanan S1P'nin düşük dozlarda meme kanseri hücrelerinin kemotaktik hareketliliğine olan inhibitör etkisinin, hücre yüzey reseptörleri yoluyla olmaktan çok, S1P'nin hücre içi hareketleri nedeniyle olabileceğini düşündürmüştür. Daha ileri analizlerden elde edilen bazı kanıtlar S1P'nin MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinin kemotaktik hareketliliğini hücre yüzey reseptörleri aracılığıyla olmaktan çok, hücre içi hareket yoluyla durdurduğuna işaret etmiştir. Çünkü S1P aynı zamanda hücre içi olarak kalsiyum immobilizasyonu, hücre çoğalması ve canlılığını düzenleyen ikinci bir haberci gibi de görev yapmaktadır (Ling vd., 2011). Bu yüzden, S1P'nin bu hücrelerin hareketliliğini hücre yüzeyi reseptörleri aracılığıyla durdurmadığı sonucuna yoğunlaşmıştır (Wang vd., 1999).

Benzer bir sonuç da Sliva ve arkadaşları tarafından sunulmuştur. Çalışmada fosfatik asitin (PA), MDA-MB-231 hücrelerinin önemli ölçüde hareketini sağladığı, lipofosfatik asit (LPA) ve S1P'nin, MDA-MB-231 hücrelerinin göçünü inhibe ettiği bildirilmektedir. PA, LPA ve S1P MCF-7 hücrelerinin göçünü etkilememiştir. PA, LPA ve S1P, meme kanseri hücreleri BT-20 ve CAMA-1 ve insan embriyonik böbrek hücresi HEK293 gibi hücre dizilerinde göçü etkilememiştir. PA'nın dozunun MDA-MB-231 hücre göçüne etkisi de araştırılmıştır. LPA ve S1P'nin az ve fazla dozlarında MDA-MB-231 hücrelerinin göçünü engellediği bildirilmiştir (Sliva vd., 2000).

S1P'nin, melanoma, osteosarkoma ve meme kanseri hücrelerinin göçünü engellediğini bildiren çalışmalar da mevcuttur. S1P'nin bu etkiyi S1P reseptörleri sayesinde gerçekleştirdiği düşünülmektedir. Bununla birlikte farklı S1P reseptörleri hücre göçüne karşı farklı cevaplar vermektedir (Sadahira vd., 1992; Spiegel vd., 1994). Örneğin, duyarlı B16 melanoma hücrelerinde S1P2'nin aşırı ifadesi S1P varlığında rac aktivasyonunu ve hücre göçünü engellediği bildirilmektedir (Arikawa vd., 2003). Yapılan bir başka çalışmada, B16 melanoma hücrelerinin fare kuyruk venine enjeksiyonu ile akciğerde 3 hafta sonunda metastatik nodüller oluşturulmuştur. İntravenöz olarak S1P uygulandığında, S1P'nin dozuna bağlı olarak maksimum % 40'a varan metastatik nodüllerin azaldığı gözlenmiştir (Yamaguchi vd., 2003).

MCF-7 meme kanseri hücrelerinde HER2 yokluğunda S1P3, sfingozin kinaz-1 bağımlı bir mekanizmayla göç eden bir fenotipi uyarır. Bu mekanizma S1P'nin birikmesiyle fosforlanan ERK 1/2 lamellipod oluşumunu ve hücre göçünü uyarır. MCF-7 hücrelerinde EGFR ailesinden olan HER2'nin aşırı ifadesi SphK 1'in ifadesini artırırken p21 aktive protein kinaz (PAK1)'in ifadesini azaltır. Bu da MCF-7 hücrelerinde S1P aracılı migrasyonu azaltır. Long ve arkadaşları yaptıkları bu çalışmada MCF-7 hücrelerinde S1P1'nin eksprese olmadığını bildirmişlerdir (Long vd., 2010).

Çeşitli kanserlerde farklı S1P reseptörlerinin araştırıldığı çalışmalar literatürde mevcuttur. Araştırmalar S1P1 ve S1P3'ün farklı kanserlerde hücrelerin göçü, invazyonu ve anjiyogenezi artırdığı yolundadır.

U-118 MG glioma hücrelerinde S1P2'nin aşırı ifadesi hücre migrasyonunu azaltırken invazyonu artırmıştır (Young vd., 2009). GNS-334 glioblastoma hücrelerinde S1P2 migrasyonu inhibe etmiştir. S1P1 ise fibrosarkoma hücrelerinde hücre göçünü stimüle etmiştir (Pyne vd., 2012).

S1P, MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde de EGFR'yi transaktive ederek hücre migrasyonunu teşvik etmektedir (Hart vd., 2005). S1P, S1P3 sinyal yoluyla mide kanserinde EGFR, HER2, ovaryum kanserinde PDGF reseptörlerini transaktive eder (Baudhuin vd., 2004; Shida vd., 2005).

Tiroid kanseri üzerine yapılan bir çalışmada S1P1 ve S1P3'ün hücre göçünü uyardığı, S1P2'nin ise hücre göçünü engellediği gösterilmiştir (Balthasar vd., 2006).

Ovaryum kanseri hücresi OVCAR3 üzerinde yapılan bir çalışmada S1P1 ve S1P3 reseptörlerine spesifik ve antagonisti olan VPC 23019 ile muamele edildiğinde OVCAR 3 hücrelerinin invazyonu ve migrasyonunun inhibe edildiği rapor edilmiştir (Park vd., 2007).

Wit49 Wilms tümör hücreleriyle yapılan bir çalışmada, S1P1 Gi sinyal yolu vasıtasıyla Wit49 Wilms tümör hücrelerinin invazyonunu teşvik ettiği gösterilmiştir. Li ve arkadaşları Wilms tümöründe S1P1'i hedefleyen terapötik ajanların bu tümörün tedavisinde kullanılabileceğini iddia etmektedir (Li vd., 2009).

Chae ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, akciğer karsinoma hücrelerinde S1P1'in susturulmasının tümör büyümesi ve yeni kan damarı oluşumu engellediği gösterilmiştir (Chae vd., 2004).

Yamashita ve arkadaşlarının mide kanseri hücreleriyle yaptığı çalışmada Northern blot analizlerine göre MKN1 ve HCG-27 hücrelerinde S1P3'ün baskın olarak eksprese olduğunu göstermişlerdir. Bu hücrelerde S1P3'ün hücre göçünü artırıcı etki gösterdiğini bildirmişlerdir (Yamashita vd., 2006).

Çalışmamızda yukarıda bildiren araştırmaların sonuçlarını destekler nitelikte S1P1 ve S1P3 reseptörleri susturulmadan önce hücrelerde yüksek olan lateral motilitenin S1P1 ve S1P3 reseptör susturmaları sonrası her iki hücre tipinde de azaldığı gözlenmiştir. Bununla birlikte her iki tip hücrenin adezyonlarında fazla değişikliğe neden olmadığı tespit edildi.

S1P1 mitojenik ve hayatta kalma sinyalini uyarır. Birden fazla sinyal yolu uyarılarak hücre çoğalması, apoptozun bloke olması ve hücre göçüne neden olduğu gözlenmiştir (Hisano vd., 2012). S1P3 hücrede mitojenik, sağkalım ve kemotaktik etkileri düzenleyebilir. (Takuwa, 2011). S1P3'ün NF-kB aktivasyonunun ve adezyon moleküllerinin ekspresyonunda aracılık ettiği düşünülmektedir (Maceyka vd.,2012).

Araştırmamızda kullandığımız hücrelerden MDA-MB-231 hücreleri östrojen reseptörü bulunmayan hücrelerdir. Bu hücrelerde her iki reseptörün susturulması ile hücrelerde proliferasyonun azaldığı gözlemlendi. Diğer hücre dizisi östrojen pozitif olan MCF-7 hücrelerinde susturmalar sonrası beklenen proliferasyon azalışı gözlemlenmedi. Bu sonuç bu hücrelerde bulunan östrojen reseptörleri aracılı bir mekanizmanın devreye girmesi ile ilişkili olabilir. Nitekim Sukocheva ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada MCF-7 meme kanseri hücrelerinde östrojenin kendi reseptörüne bağlanarak SphK1'i aktive ettiğini bildirmiştir. Aktive olan SphK1 aracılığıyla S1P'nin üretildiğini, oluşan S1P'nin, S1P3'e bağlanarak aktive olmasıyla S1P3'ün hücrenin büyümesini bölünmesini sağlayan epidermal büyüme faktörü reseptörünü (EGFR) transaktive ettiğini ve sinyal aktivasyonunu artırdığını bildirmişlerdir (Sukocheva vd., 2006). Çalışmamızda MCF-7 hücrelerinde her ne kadar proliferasyon açısından susturmalar etkili bulunmuş olmasada MDA-MB-231 hücrelerindeki benzer şekilde ölü hücre sayısının fazla olduğu gözlemlendi.

Watson ve arkadaşları östrojen pozitif meme kanserine sahip 304 hastayla yaptığı bir çalışmada meme tümörlerinde membran S1P1'in yüksek olması hastalığın nüks etmesini hızlandırdığını, yüksek sitoplazmik S1P1, S1P3 ve ERK 1/2 ifadesininse kanserin tedavisinde kullanılan tamoksifen direnci oluşmasında sebep olduğunu bildirmişlerdir. Bu nedenle S1P1, S1P3 ve ERK 1/2 arasındaki etkileşimin meme kanserinin ilerlemesinde ve ilaç direncinde etkili olabileceğini vurgulamışlardır. Yüksek sitoplazmik S1P1 ve S1P3 östrojen pozitif meme kanseri hastalarında hayatta kalma oranını azaltmaktadır. Bu çalışmada S1P reseptörlerinin tümör membranında, sitoplazmasında ve çekirdeğinde bulunduğu da gösterilmiştir (Watson vd., 2010). Bu durum yukarıda bahsedilen Wang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada bildirilen S1P'nin meme kanser hücrelerindeki kemotaktik hareketliliğin hücre yüzey reseptörleri aracılığıyla olmaktan çok, hücre içi hareket yoluyla olması ile ilişkili olabilir. Bu araştırmanın sonucu da hücrelerde östrojen reseptörlerinin olup olmamasına bağlı sonuçlarda farklılık görülebileceğine dair bir örnek olarak sunulabilir.

Sunulan araştırmalar S1P1 ve S1P3 reseptörlerinin bir çok kanser türünde gösterdikleri bu etkilerinden dolayı tedavi için önemli bir hedef olabileceğine vurgu yapmaktadır. Nitekim bir araştırmada meme kanserine karşı yaygın olarak kullanılan ve çok güçlü bir kemoterapötik ajan olan doksorubisinin MCF-7 hücrelerine muamelesi seramid ve sfingozin düzeylerini artırdığı ve apoptozun uyarıldığı bildirilmektedir. Bunun aksine MCF-7 hücrelerinde SphK1'in fazla sentezlenmesi S1P seviyelerini yükseltirken hücre proliferasyonunu ve DNA sentezini artırır (Kim vd., 2009).

S1P ve reseptörlerinin kanser ilerlemesi ve metastazında kritik rolleri vardır. Meme kanserinde bu moleküller arasındaki etkileşim, hasta sağkalım oranının düşmesi ve ilaç direnci gelişiminden sorumlu tutulmaktadır. Bu ilişkinin anlaşılmasıyla S1P ve reseptörlerini inhibe edici yeni terapötik ajanların keşfi kanser ve metastazına karşı yeni terapötik stratejiler için fırsat sunabilecektir. Çalışmamızda en dikkat çekici bulgu tüm saatlerde reseptörlerin ayrı ayrı susturulmasından çok birlikte susturulmasının daha etkili sonuçlar verebileceği yönündedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Araştırmanın sonuçları maddeler halinde özetlendiğinde;

1. S1P1 ve S1P3'ün tek tek ya da birlikte susturulması hücrelerin canlılığında azalmaya neden olduğu görüldü.
2. Reseptör susturmalarının hücrelerin tutunma özellikleri üzerine etkili olmadığı belirlendi.
3. Reseptörlerin tek tek ya da birlikte susturulması her iki hücre tipinde lateral motilitenin azalmasını sağladı.
4. Hücrelerde çoğalma üzerine farklı sonuçlar elde edildi. S1P1 ve S1P3 birlikte susturulması MDA-MB-231 hücrelerinde etkiliyken MCF-7 hücrelerinde çoğalma üzerine etkili olmadığı belirlendi.

En dikkat çekici bulgu tüm saatlerde reseptörlerin ayrı ayrı susturulmasından çok birlikte susturulmasının canlılığı etkili bir şekilde azaltmasıdır.

Araştırmamızda kullandığımız hücrelerden MDA-MB-231 hücreleri östrojen reseptörü bulunmayan hücrelerdir. Bu hücrelerde her iki reseptörün susturulması ile hücrelerde proliferasyonun azaldığı gözlemlendi. Diğer hücre dizisi östrojen pozitif olan MCF-7 hücrelerinde susturmalar sonrası beklenen proliferasyon azalışı gözlemlenmemesinin nedeni bu hücrelerde bulunan östrojen reseptörleri aracılı bir mekanizmanın devreye girmesi ile ilişkili olabilir. Kanseri ve metastazında S1P ve reseptörlerinin rolünün iyi olarak anlaşılması gelecekte kanser ve metastazına karşı yeni terapötik ajanların keşfine ışık tutacaktır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abdulrahman, G. O., ve Rahman, G. A. (2012). Epidemiology of breast cancer in Europe and Africa. *Journal of cancer epidemiology*, 2012.
- Adada, M., Canals, D., Hannun, Y.A., ve Obedid, L.M. (2013). Sphingosine-1-phosphate receptor 2. *Febs Journal*, 280, 6354-6366. doi: 10.1111/febs.12446
- Agrawal, N., Dasaradhi, P., Mohmmed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R. K., ve Mukherjee, S. K. (2003). RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiology and molecular biology reviews*, 67(4), 657-685.
- Akça, T., Altun, U., Apaydın, D., Polat, A., ve Aydın, S. (2006). Nadir görülen bir lezyon: Erkek meme kanseri: Olgu sunumu. *Meme sağlığı dergisi*, 2(1), 37-39.
- Akkaya, Z., ve DİNÇER, P. (2013). Tedavi yaklaşımlarında yeni bir dönem: Kodlamayan RNA'lar ve hastalıklar. *Marmara Medical Journal*, 26(1).
- Aktaş, S. H., ve Akbulut, H. (2014). Kolorektal kanserde anjiyogenez ve anti-anjiyogenik tedaviler. *Turkish Journal of Oncology/Türk Onkoloji Dergisi*, 29(2).
- Alison, M. (2001). Cancer. *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES*, 1-8.
- Aliustaoğlu, M. (2009). Temel Kanser Fizyopatolojisi. *Klinik Gelişim Dergisi*, 22.
- Anelli, V., Gault, C. R., Snider, A. J., ve Obeid, L. M. (2010). Role of sphingosine kinase-1 in paracrine/transcellular angiogenesis and lymphangiogenesis in vitro. *The FASEB Journal*, 24(8), 2727-2738.
- Aydıntuğ, S. (2004). Meme kanserinde erken tanı. *Sted*, 13(6), 226-229.
- Baba, A. I., ve Catoi, C. (2007). *Comparative Oncology*. Romania: The Publishing House of the Romanian Academy.
- Başaran, A. (2010). *Tıbbi Biyoloji*. Ankara: Pelikan Yayıncılık.
- Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M., ve Hannon, G. J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *nature*, 409(6818), 363-366.
- Birney, E., Stamatoyannopoulos, J. A., Dutta, A., Guigó, R., Gingeras, T. R., Margulies, E. H., . . . Thurman, R. E. (2007). Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *nature*, 447(7146), 799-816.
- Bodur, E., ve Demirpençe, E. (2010). Kodlamayan RNA'lar ve gen susturumu. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 41, 82-89.
- Burdall, S. E., Hanby, A. M., Lansdown, M., ve Speirs, V. (2003). Breast cancer cell lines: friend or foe? *Breast Cancer Research*, 5(2), 89-89.
- Cailleau, R., Olivé, M., ve Cruciger, Q. V. (1978). Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In vitro*, 14(11), 911-915.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

- Cell biology and Cancer. (2015). *Rediscovering Biology*. from https://www.learner.org/courses/biology/textbook/cancer/cancer_2.html
- Cengiz, A. (2006). *İn Situ Meme Kanserinde Cerrahi Tedavi*. Paper presented at the İ. Ü. Cerrahpafla Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, İstanbul.
- Center, M., Siegel, R., Jemal, A. (2011). Global Cancer Facts ve Figures 2nd Edition. from <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveilance/documents/document/acspsc-027766.pdf>
- Chaffer, C. L., ve Weinberg, R.A (2011). A Perspective on Cancer Cell Metastasis. *Science*, 331, 1559-1564. doi: 10.1126/science.1203543
- Chandar, N., ve Viselli, S. (2012). *Cell and Molecular Biology*: Lippincott Williams ve Wilkins.
- Coffin, J., ve Poole, T. (1988). Embryonic vascular development: immunohistochemical identification of the origin and subsequent morphogenesis of the major vessel primordia in quail embryos. *Development*, 102(4), 735-748.
- Cooper, G., ve Hausman, R. (2003). *The Cell: A Molecular Approach*: Sinauer Associates.
- Demirer, E., Ayten, Ö., ve Taş, D. (2014). Angiogenesis and Anti-Angiogenic Treatments. *Journal of Clinical and Analytical Medicine*, 5(1), 75-79.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., . . . Bray, F. (2013). GLOBOCAN 2012 v1. 0, cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase No. 11 [internet]. International Agency for Research on Cancer, Lyon. *globocan. iarc. fr* (accessed 10 October 2014).
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., ve Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *nature*, 391(6669), 806-811.
- Flamme, I., Baranowski, A., ve Risau, W. (1993). A new model of vasculogenesis and angiogenesis in vitro as compared with vascular growth in the avian area vasculosa. *The Anatomical Record*, 237(1), 49-57.
- Folkman, J. (1995). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature medicine*, 1(1), 27-30.
- Furuya, H., Shimizu, Y., ve Kawamori, T. (2011). Sphingolipids in Cancer. *Cancer Metastasis Review*, 30, 567-576.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

- Geho, D. H., Bandle, R.W., Clair, T., Liotta, L.A. (2005). Physiological Mechanisms of Tumor-Cell Invasion and Migration. *Physiology*, 20, 194-200. doi: 10.1152/physiol.00009.2005
- Goodman, S. (2008). *Medical Cell Biology* (third ed.): Elsevier.
- Gräler, M. H., Bernhardt, G., Lipp, M. (1998). EDG6, a novel G-protein-coupled receptor related to receptors for bioactive lysophospholipids, is specifically expressed in lymphoid tissue. *Genomics*, 53 (2), 164–169. doi: 10.1006/geno.1998.5491
- Gültekin, M., Boztaş, G. (2014). Türkiye Kanser İstatistikleri.
- Gündoğdu, R., Çelik, V. (2009). RNA İnterferans (RNAi). *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 25, 34-47.
- Güneş, H. (2013). *Moleküler Hücre Biyolojisi: İstanbul Tıp Kitabevleri*.
- Hanahan, D., ve Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 86(3), 353-364.
- Hashimoto, T., Emala, C. W., Joshi, S., Mesa-Tejada, R., Quick, C. M., Feng, L., . . . Young, W. L. (2000). Abnormal pattern of Tie-2 and vascular endothelial growth factor receptor expression in human cerebral arteriovenous malformations. *Neurosurgery*, 47(4), 910-919.
- Hisano, Y., Nishi, T., ve Kawahara, A. (2012). The functional roles of S1P in immunity. *Journal of biochemistry*, 152(4), 305-311.
- Hla, T. (2001). Sphingosine 1-phosphate receptors. *Prostaglandins ve other lipid mediators*, 64(1), 135-142.
- Holliday, D. L., ve Speirs, V. (2011). Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res*, 13(4), 215.
- Howell, A., Anderson, A. S., Clarke, R. B., Duffy, S. W., Evans, D. G., Garcia-Closas, M., . . . Harvie, M. N. (2014). Risk determination and prevention of breast cancer. *Breast Cancer Research*, 16(5), 446.
- Huang, W.-C., Nagahashi, M., Terracina, K. P., ve Takabe, K. (2013). Emerging role of sphingosine-1-phosphate in inflammation, cancer, and lymphangiogenesis. *Biomolecules*, 3(3), 408-434.
- Hudlicka, O., Brown, M., ve Egginton, S. (1992). Angiogenesis in skeletal and cardiac muscle. *Physiological reviews*, 72(2), 369-417.
- Hunter, K. W., Crawford, N., ve Alsarraj, J. (2008). Mechanisms of metastasis. *Breast Cancer Res*, 10(Suppl 1), S2.
- Hutchinson, L. (2010). Breast Cancer: Challenges, controversies, breakthroughs. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 7, 669-670.
- Im, D.-S., Clemens, J., Macdonald, T. L., ve Lynch, K. R. (2001). Characterization of the human and mouse sphingosine 1-phosphate receptor, S1P5 (Edg-8): structure-activity relationship of sphingosine1-phosphate receptors. *Biochemistry*, 40(46), 14053-14060.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

- Im, D.-S., Heise, C. E., Ancellin, N., O'Dowd, B. F., Shei, G.-j., Heavens, R. P., . . . McAllister, G. (2000). Characterization of a novel sphingosine 1-phosphate receptor, Edg-8. *Journal of Biological Chemistry*, 275(19), 14281-14286.
- Jens, K. (2003). Antisense technologies Improvement through novel chemical modification. *Eur J Biochem*, 270, 1628-164420.
- Karaboz, İ., Çolak,C. (2007). Antisens Teknoloji. 05, 14-37. <http://www.mikrobiyoloji.org/pdf/702070203.pdf>
- Keskin, S., ve Saip,P. (2011). İnflamatuvar meme kanseri. *Türk Onkoloji Dergisi*, 26(2), 94-99. doi: 10.5505/tjoncol.2011.422
- Kierszenbaum, A. L. (2007). *Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology*: Mosby Elsevier.
- Kılıç, T., Yıldırım, Ö., Şahin, S., Pamir, MN. (2005). Angiogenesis of Glial Tumors. *Türk Nöroşirürji Dergisi*, 15 (1), 1-9.
- Kim, R. H., Takabe, K., Milstien, S., Spiegel, S. (2009). Export and functions of sphingosine-1-phosphate. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1791, 692-696. doi: 10.1016/j.bbali.2009.02.011
- Lee, A. V., Oesterreich, S., ve Davidson, N. E. (2015). MCF-7 Cells— Changing the Course of Breast Cancer Research and Care for 45 Years. *Journal of the National Cancer Institute*, 107(7), djv073.
- Ling, B., Chen, L., Alcorn, J., Ma, B., ve Yang, J. (2011). Sphingosine-1-phosphate: a potential therapeutic agent against human breast cancer. *Invest New Drugs*, 29, 396-399. doi: 10.1007/s10637-009-9375-9
- Long, J. S., Edwards, J., Watson, C., Tovey, S., Mair, K. M., Schiff, R., . . . Pyne, S. (2010). Sphingosine kinase 1 induces tolerance to human epidermal growth factor receptor 2 and prevents formation of a migratory phenotype in response to sphingosine 1-phosphate in estrogen receptor-positive breast cancer cells. *Molecular and Cellular Biology*, 30(15), 3827-3841.
- Long, J. S., Fujiwara, Y., Edwards, J., Tannahill, C. L., Tigyi, G., Pyne, S., & Pyne, N. J. (2010). Sphingosine 1-phosphate receptor 4 uses HER2 (ERBB2) to regulate extracellular signal regulated kinase-1/2 in MDA-MB-453 breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 285(46), 35957-35966.
- Lux, M. P., Fasching, P. A., ve Beckmann, M. W. (2006). Hereditary breast and ovarian cancer: review and future perspectives. *Journal of Molecular Medicine*, 84(1), 16-28.
- Maceyka, M., Harikumar, K. B., Milstien, S., ve Spiegel, S. (2012). Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease. *Trends in cell biology*, 22(1), 50-60.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

- Matsen, C. N., LA. (2013). Breast cancer: a review for the general surgeon. *JAMA Surg*, 148(10), 971-979. doi: 10.1001/jamasurg.2013.3393
- Mattick, J. S., ve Makunin, I. V. (2006). Non-coding RNA. *Human molecular genetics*, 15(suppl 1), R17-R29.
- Morris, K. V. (2012). *Non-coding RNAs and epigenetic regulation of gene expression: Drivers of natural selection*: Horizon Scientific Press.
- Moserle, L., ve Casanovas, O. (2013). Anti-angiogenesis and metastasis: a tumour and stromal cell alliance. *Journal of internal medicine*, 273(2), 128-137.
- Neve, R. M., Chin, K., Fridlyand, J., Yeh, J., Baehner, F. L., Fevr, T., . . . Tong, F. (2006). A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer cell*, 10(6), 515-527.
- Ng, V. V. (2014). Clinical Review: Breast cancer. Retrieved 21 october, 2015, from http://www.gponline.com/clinical-review-breast-cancer/cancer/womens/article/1316469#disqus_thread
- Noden, D. M. (1989). Embryonic Origins and Assembly of Blood Vessels1-3. *Am Rev Respir Dis*, 140, 1097-1103.
- Ölgen, S., Bıçak ,I., Nebioğlu, D. (2002). ANGIOGENEZ VE KANSER TEDAVİSİNDE YENİ YAKLAŞIMLAR. *Ankara Ecz. Fak. Derg*, 31 (3), 193-214.
- Parlar, S., Kaydul, N., ve Ovayolu, N. (2005). Meme kanseri ve kendi kendine meme muayenesinin önemi. *Journal of Anatolia Nursing and Health Sciences*, 8(1).
- Pepper, M. S., ve Mandriota, S. J. (1998). Regulation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1) expression in vascular endothelial cells. *Experimental cell research*, 241(2), 414-425.
- Pollán, M. (2010). Epidemiology of breast cancer in young women. *Breast cancer research and treatment*, 123(1), 3-6.
- Pyne, N. J., ve Pyne, S. (2010). Sphingosine 1-phosphate and cancer. *Nature reviews cancer*, 10(7), 489-503.
- Rieter, P. (2004). The biology of cancer *Genetics Seminars Oncology Nursing*, 20, 145-154.
- Risau, W., ve Flamme, I. (1995). Vasculogenesis. *Annual review of cell and developmental biology*, 11(1), 73-91.
- Salas, A., Ponnusamy, S., Senkal, C. E., Meyers-Needham, M., Selvam, S. P., Saddoughi, S. A., . . . Gault, C. R. (2011). Sphingosine kinase-1 and sphingosine 1-phosphate receptor 2 mediate Bcr-Abl1 stability and drug resistance by modulation of protein phosphatase 2A. *Blood*, 117(22), 5941-5952.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

- Sariego, J. (2010). Breast cancer in the young patient. *The American Surgeon*, 76(12), 1397-1401
- Sarkar, S., Maceyka, M., Hait, N.C., Paugh, S.W., Sankala, H., Milstien, S., Spiegel, S. (2005). Sphingosinekinase 1 is required for migration, proliferation and survival of MCF-7 human breast cancer cells. *FEBS Letters*, 579, 5313-5317.
- Scully, O. J., Bay, B.H., Yip, G., ve Yu, Y. (2012). Breast Cancer Metastasis
Cancer Genomics ve Proteomics, 9, 311-320. doi: 10.1007/s10555-011-9304-1
- Seyfried, T. N., ve Shelton, L. M. (2010). Cancer as a metabolic disease. *Nutr Metab (Lond)*, 7(7), 269-270.
- Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T. P., Gertsenstein, M., Wu, X.-F., Breitman, M. L., ve Schuh, A. C. (1995). Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *nature*, 376(6535), 62-66.
- Sliva, D., Mason, R., Xiao, H., ve English, D. (2000). Enhancement of the migration of metastatic human breast cancer cells by phosphatidic acid. *Biochemical and biophysical research communications*, 268(2), 471-479.
- Soule, H., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., ve Brennan, M. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 51(5), 1409-1416.
- Taha, T. A., Argraves, K. M., ve Obeid, L. M. (2004). Sphingosine-1-phosphate receptors: receptor specificity versus functional redundancy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1682(1), 48-55.
- Takuwa, N., Du, W., Kaneko, E., Okamoto, Y., Yoshioka, K., Takuwa, Y. (2011). Tumor suppressive sphingosine-1-Phosphate receptor-2 counteracting tumor promoting sphingosine-1-phosphate receptor-1 and sphingosine kinase 1. *Am J Cancer Res*, 1 (4), 460-481.
- Terzioğlu, G., Keskin, A., ve Demirel, G. (2013). Hücre Proliferasyonu Ölçüm Yöntemleri ve Çeşitli Ticari Proliferasyon Kitlerinin Karşılaştırılması
Turkish Journal of Immunology
1(3), 74-89
- Valastyan, S., ve Weinberg, R. A. (2011). Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*, 147(2), 275-292.
- Van Brocklyn, J. R. (2010). Regulation of cancer cell migration and invasion by sphingosine-1-phosphate. *World journal of biological chemistry*, 1(10), 307.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

- Waggener, J. D., ve Beggs, J. L. (1975). Vasculature of Neural Neoplasms. *Advances in neurology*, 15, 27-49.
- Watson, C., Long, J. S., Orange, C., Tannahill, C. L., Mallon, E., McGlynn, L. M., . . . Edwards, J. (2010). High expression of sphingosine 1-phosphate receptors, S1P1 and S1P3, sphingosine kinase 1, and extracellular signal-regulated kinase-1/2 is associated with development of tamoxifen resistance in estrogen receptor-positive breast cancer patients. *The American journal of pathology*, 177(5), 2205-2215.
- Weigelt, B., Peterse, J. L., ve Van't Veer, L. J. (2005). Breast cancer metastasis: markers and models. *Nature reviews cancer*, 5(8), 591-602.
- Weigelt, B., Peterse, J. L., ve Van't Veer, L. J. (2005). Breast Cancer Metastasis: Markers And Models. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 5, 591-602. doi: 10.1038/nrc1670
- Weinberg, R. A. (2007). The biology of cancer. *New York: Garland Science*, 1.
- Yamashita, H., Kitayama, J., Shida, D., Yamaguchi, H., Mori, K., Osada, M., . . . Nagawa, H. (2006). Sphingosine 1-Phosphate Receptor Expression Profile in Human Gastric Cancer Cells: Differential Regulation on the Migration and Proliferation 1. *Journal of Surgical Research*, 130(1), 80-87.
- Yin, K. (2011). *The Mesenchymal-Like Phenotype of the MDA-MB-231 Cell Line, Breast Cancer - Focusing Tumor Microenvironment, Stem cells and Metastasis*, Prof. Mehmet Gunduz (Ed.) Retrieved from <http://www.intechopen.com/books/breast-cancer-focusing-tumor-microenvironment-stem-cells-and-metastasis/the-mesenchymal-like-phenotype-of-the-mda-mb-231-cell-line> doi:DOI: 10.5772/20666
- Zamecnik, P. C., ve Stephenson, M. L. (1978). Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75(1), 280-284.

ÖZGEÇMİŞ

ADI-SOYADI: İBRAHİM UĞUR ÇALIŞ

UYRUĞU: T.C

DOĞUM YERİ: DENİZLİ

DOĞUM TARİHİ: 06/07/1987

MEDENİ DURUM: EVLİ

MEZUN OLDUĞU İLKÖĞRETİM: TEVFİK İLERİ İLKÖĞRETİM OKULU (1994-2001)

MEZUN OLDUĞU LİSE: ANKARA KURTULUŞ LİSESİ (2001-2004)

MEZUN OLDUĞU ÜNİVERSİTE: ANKARA ÜNİVERSİTESİ

MEZUN OLDUĞU FAKÜLTE: FEN FAKÜLTESİ (2006-2011)

MEZUNİYET DERESESİ: 3.53/89.03

ÇALIŞTIĞI YER: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi (2013-)

E-MAİL: ugur0620@gmail.com

ADRES: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD. 26480 Eskişehir/Türkiye

YABANCI DİL BİLGİSİ: İngilizce (ÜDS 86.25)

BİLGİSAYAR: İşletmen (2011)

KATILDIĞIM TOPLANTI VE SEMPOZYUMLAR:

- Klinik Örnekten Sonuç Raporuna: İdrar Örneklerine Yaklaşım Toplantısı (Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi 26 Nisan 2012 Ankara).
- II. Ulusal HPV ve Kanser Sempozyumu (Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi 30 Nisan 2012 Ankara).
- Eleştirel ve Yaratıcı Düşünme Sempozyumu (Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi 1-2 Haziran 2012 Ankara).
- Batı Nil Virüsü Sempozyumu (Türkiye Halk Sağlığı Kurumu 20-21 Eylül Ankara).
- Türkiyedeki Zoonoz Hastalıkların Dünü, Bugünü ve Yarını (Gümüşhane Üniversitesi 27-28 Eylül Gümüşhane).

KATILDIĞIM ULUSAL KONGRELER:

- 7.Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi (Swissotel 5-8 Haziran 2012 Ankara).
- XXXV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi (Pine Bay Otel 3-7 Kasım 2012 Kuşadası).
- Lisanüstü Öğrenci Kongresi ve Kök Hücre Sempozyumu (Celal Bayar Üniversitesi 6-7 Nisan 2013 Çeşme).
- XIII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi (Pine Bay Otel 27-30 Ekim 2013 Kuşadası).
- XIV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi (Liberty Hotels Lykia 27-30 Ekim 2015, Fethiye).

KATILDIĞIM KURS VE EĞİTİMLER:

- Real-Time PCR (RT) Uygulamaları Kursu (Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi 4-5 Haziran 2012 Ankara)
- Mikoloji Laboratuvarında Tanımlama Kursu (Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi 2-3 Kasım 2012 İzmir)
- MALDI-TOF-MS Kursu (XXXV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi 6 Kasım 2012 Kuşadası)
- Gıda ve Su Kaynaklı Enfeksiyon Etkenleri Eğitimi (Türkiye Halk Sağlığı Kurumu 3-7 Aralık 2012 Ankara)
- Biyoinformatik 'omik' veri analiz yöntemleri ve kişisel tıp uygulaması (Liberty Hotels Lykia 26 Ekim 2015, Fethiye).

ULUSLARARASI KONGRELERDE SUNULAN POSTER ÇALIŞMALARI:

Dinc B, Altay A, **Calis U**, Ekinci O, Durmuslu Ao, Leventoglu S, Dursun A, Secil O, Bozdayi G. Hpv Dna And Hpv Type 16 Detection in Colon, Rektum And Rectosigmoid Adenocancers By Real Time Pcr (15th Annual Meeting Of The European Society For Clinical Virology And Joint Meeting With The European Society For Veterinary Virology P-195 4-7 September 2012 Madrid Spain).

Bozdayi G, Dinc B, Meral M, Altay A, **Calis U**, Yildiz BD, Dalgic B, Kamruddin A. Genotyping Of Rotaviruses By Nested Rt Pcr Method Between 0-5 Years Old Children in Ankara (15th Annual Meeting of the European Society For Clinical Virology and Joint Meeting With The European Society For Veterinary Virology P-189 Madrid Spain 4-7 September 2012).

Soyocak A, Kurt H, Ozdemir Z, Saydam F, **Calis IU**, Kolac U, Turgut Coşan D, Değirmenci I, Sahin Mutlu F, Guneş HV. "The Relationship Between Tannic Acid and Myeloperoxidase Enzyme Activity in the Inflamed Paw Tissue Formed by Formalin Injection in Rats" (5. Uluslararası Hücre Zarları ve Oksidatif Stres Kongresi, Isparta, 9 12 Eylül 2014).

Calis IU, Turgut Coşan D, Saydam F, Kolaç U, Soyocak A, Ozdemir Z, Kurt H, Guneş HV, Sahin Mutlu F, Değirmenci İ. "The Effect of Tannic Acid in the Monosodium Glutamate Induced Oxidative Stress in Rats" (5. Uluslararası Hücre Zarları ve Oksidatif Stres Kongresi, Isparta, 9 12 Eylül 2014).

ULUSAL KONGRELERDE SUNULAN POSTER ÇALIŞMALARI:

Bozdayı G, Dinç B, Meral M, Altay A, **Çalış U**, Yıldız BD, Dalgıç B, Kamruddin A. Ankara'da 0-5 Yaş Arası Çocuklarda Nested Rt-PCR Yöntemi İle Rotavirus Genotiplerinin Belirlenmesi (7. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi S:203 5-8 Haziran 2012 Ankara).

Altay A, **Çalış İU**, Ekinci Ö, Durmuşlu AÖ, Leventoğlu S, Dursun A, Özkan S, Bozdayı G. Real Time PCR Yöntemi Kullanılarak Kolon, Rektum ve Rektosigmoid Bölge Tümörlerinde HPV DNA ve HPV Tip 16 DNA'sının Karşılaştırılması. (7. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi S:299 5-8 Haziran 2012 Ankara).

Çalış İU, Altay A, Ekinci Ö, Durmuşlu AÖ, Leventoğlu S, Dursun A, Özkan S, Bozdayı G. Kolon, Rektum Ve Rektosigmoid Bölge Tümör Gelişmesinde Human Papilloma Virüsün Rolü Var Mıdır? (XXXV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi S.314 Kuşadası 3-7 Kasım 2012).

Soyocak A, Kurt H, Özdemir Z, Saydam F, **Çalış İU**, Kolaç U, Coşan DT, Değirmenci İ, Mutlu FŞ, Güneş HV. Formalin İndüklü Pence Ödeminde Tannik Asidin Miyeloperoksidaz Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi. (XIII. Ulusal Tıbbi Biyoloji Ve Genetik Kongresi S.292 Kuşadası 27-30 Ekim 2013).

Çalış İU, Coşan DT, Saydam F, Kolaç U, Soyocak A, Özdemir Z, Kurt H, Güneş HV, Mutlu FŞ, Değirmenci İ. Monosodyum glutamat Kan Glukozu Ve Tannik Asit. (XIII. Ulusal Tıbbi Biyoloji Ve Genetik Kongresi S.292 Kuşadası 27-30 Ekim 2013).

Soyocak A, Kurt H, Özdemir Z, Saydam F, **Çalış İU**, Kolaç U, Turgut Coşan D, Değirmenci İ, Mutlu ŞF, Güneş HV. "Kongre özet kitabı" bildiri kitapçığındaki "Formalin indüklü pence ödeminde tannik asidin miyeloperoksidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi", 293 pp. (XIII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi 27-30 Ekim 2013, Kuşadası).

Çalış İU, Turgut Coşan D, Saydam F, Kolaç U, Soyocak A, Özdemir Z, Kurt H, Güneş HV, Mutlu ŞF, Değirmenci İ. "Kongre özet kitabı" bildiri kitapçığındaki "Monosodyum glutamat kan glukozu ve tannik asit", 344 pp. (XIII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi 27-30 Ekim 2013, Kuşadası).

Çalış İU, Turgut Coşan D, Saydam F, Kolaç KU, Soyocak A, Özdemir Z, Kurt H, Güneş HV, Mutlu ŞF, Değirmenci İ. "Kongre özet kitabı" bildiri kitapçığındaki "Oksidatif Hasara Çin Tuzu ve Tannik Asitin Etkileri", 742 pp. (22. Ulusal Biyoloji Kongresi 23-27 Haziran 2014, Eskişehir).

Soyocak A, Kurt H, Özdemir Z, Saydam F, **Çalış İU**, Kolaç U, Turgut Coşan D, Değirmenci İ, Mutlu ŞF, Güneş HV. "Kongre özet kitabı" bildiri kitapçığındaki "Ödem İnhibisyonunda Tannik Asidin Önemi" 692 pp. (22. Ulusal Biyoloji Kongresi 23-27 Haziran 2014, Eskişehir).

Çalış İU, Coşan DT, Soyocak A, Dal A, Kurt H, Çolak E, Güneş HV, Değirmenci İ. İnsan Eritrosit Paketinde H₂O₂ İle İndüklenen Oksidatif Strese Karşı Tannik Asit Ve Sarı Kantaron (Hypericum perforatum) Yağının Antioksidatif Etkinliklerinin Araştırılması (XIV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi (Liberty Hotels Lykia 27-30 Ekim 2015, Fethiye).