



T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TR, Balıkesir University, Institute of Health Sciences



**BETÜLİNİK ASİTİN ENDOMETRİAL KANSER
HÜCRELERİNDE mTOR YOLAĞI ARACILI
OLASI ANTİKANSER ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GÖZDE KORKUSUZ

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Bilim Alan Kodu: 1033



BALIKESİR

2023

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BETÜLİNİK ASİTİN ENDOMETRİAL KANSER
HÜCRELERİNDE mTOR YOLAĞI ARACILI OLASI
ANTİKANSER ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GÖZDE KORKUSUZ

TEZ DANIŞMANI

DR. ÖĞR. ÜYESİ SEMA SERTER KOÇOĞLU

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Bilim Alan Kodu: 1033

Proje No: 2017/65 - Balıkesir Üniversitesi BAP

BALIKESİR

2023



T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ KABUL VE ONAY

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde **Gözde KORKUSUZ** tarafından yürütülmüş ve tamamlanmış olan

**“Betülinik Asitin Endometrial Kanser Hücrelerinde mTOR Yolağı Aracılı Olası
Antikanser Etkilerinin Araştırılması”**

başlıklı tez çalışması,
Balıkesir Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
ilgili maddeleri uyarınca aşağıdaki jüri tarafından

YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 14 /07 / 2023

TEZ SINAV JÜRİSİ

Doç. Dr. Nuriye Ezgi Bektur Aykanat
Atılım Üniversitesi
(**Başkan**)

Dr. Öğr. Üyesi Sema Serter Koçoğlu
Balıkesir Üniversitesi
Üye (**Danışman**)

Dr. Öğr. Üyesi Fatma Bahar Sunay
Balıkesir Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki Yüksek Lisans Tezi,
sınav jüri üyeleri tarafından imzalanarak 14 /08/2023 tarihinde teslim edilmiştir.

Prof. Dr. Ziha İlhan
Enstitü Müdürü

BEYAN

Balıkesir Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıpları kabullendiğimi **beyan ederim**.

.../.../20...

İmza

Gözde Korkusuz

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca tezimin planlanması, tez sonuçlarımın yorumlanmasında, tez çalışmaları boyunca uygun laboratuvar ortamının sağlanması gibi tezimin her aşamasında ve yüksek lisans eğitimim boyunca bana her türlü desteğini ve bilgi birikimini esirgemeyen tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Sema SERTER KOÇOĞLU'na,

Yüksek lisans eğitim boyunca bilgi birikimini benden esirgemeyen Anabilim dalı başkanımız Dr. Öğr. Üyesi Fatma Bahar SUNAY'a,

Laboratuvar çalışmaları sırasında deney aşamalarında bana yardımcı olan Arş. Gör. Ceren OY'a, Dr. Öğr. Üyesi Mücahit SEÇME'ye, Arş. Gör. Yasemin ŞAHİN'e,

Tez çalışmam boyunca laboratuvarlarını kullanmama izin veren Uludağ Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalına,

Hayatımın her aşamasında yanımda olan, maddi manevi desteklerini benden esirgemeyen aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

İÇİNDEKİLER.....	i
ÖZET.....	v
ABSTRACT	vi
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Uterus Anatomisi	3
2.2. Uterus Embriyolojisi	3
2.3. Uterus Histolojisi	4
2.3.1. Perimetrium	5
2.3.2. Miyometriyum	6
2.3.3. Endometriyum.....	6
2.4. Endometrial Hiperplazi	9
2.5. Endometrial Polipler	10
2.6. Endometrial Kanser.....	10
2.6.1. Endometrial Kanser İnsidansı	11
2.6.2. Endometrial Kanserin Histolojik Derecelendirmesi	11

2.6.3. FIGO Derecelendirme	14
2.6.4. Endometrial Kanserin Moleküler Patolojisi	16
2.6.5. Risk Faktörleri	18
2.6.6. Endometrial Kanser Prognostik Parametreler.....	21
2.7. Betülinik Asit.....	27
2.7.1. Betülinik Asit İzolasyonu	27
2.7.2. Betülinik Asit Çözücüleri	28
2.7.3. Betülinik Asit Kanser İlişkisi.....	28
2.7.4. Betülinik Asit'in Apoptoz Üzerindeki Etkileri.....	29
2.8. Apoptoz	30
2.8.1 Apoptozda İntrinsik Yol.....	30
2.8.2. Apoptozda Ekstrinsik Yol	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM	33
3.1. Hücre Kültürü	33
3.1.1. Hücre Besiyerinin Hazırlanması	33
3.1.2. FBS İnaktivasyonu	33
3.1.3. Dondurulmuş Hücrelerin Çözdürülmesi ve Ekimi.....	34
3.1.4. Hücrelerin Pasajlanması	34
3.1.5. Hücre Hatlarının Dondurularak Stoklanması	35
3.1.6. Hücre Sayımı	36
3.2. CCK8 Test	36
3.3. Western blot.....	37

3.3.1. Total Protein İzolasyonu.....	37
3.3.2. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ve Western Blot Analizi ...	38
3.4. Gerçek-Zamanlı PCR Analizi.....	42
3.4.1. Total RNA İzolasyonu.....	42
3.4.2. cDNA Sentezi	43
3.4.3. Gen Ekspresyonu Analizi	44
3.5. Apoptozun Belirlenmesi.....	46
3.6. İmmünohistokimyasal Analiz.....	48
3.7. İstatistiksel Analizler.....	51
4. BULGULAR.....	52
4.1. BA'nın Endometrial Kanser Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi	52
4.2. BA'nın Endometrial Kanser Hücrelerinde Apoptoz ve mTOR Yolağında Görevli Genlerin Ekspresyonu Üzerine Olan Etkisinin Kantitatif Gerçek-Zamanlı PCR Yöntemi İle Belirlenmesi	53
4.3. BA'nın Endometrial Kanser Hücrelerinde Apoptoz Üzerine Etkilerinin Annexin V İle Belirlenmesi.....	54
4.4. BA'nın Endometrial Kanser Hücrelerinde mTOR Yolağında Görevli Proteinler Üzerine Etkilerinin İmmünohistokimya İle Belirlenmesi	55
4.5. BA'nın Endometrial Kanser Hücrelerinde mTOR Yolağında Görevli Proteinler Üzerine Etkilerinin Western Blot İle Belirlenmesi.....	56
5. TARTIŞMA.....	58

6. SONUÇ VE ÖNERİLER	61
KAYNAKLAR.....	62
ÖZGEÇMİŞ	66

ÖZET

BETÜLİNİK ASİTİN ENDOMETRİAL KANSER HÜCRELERİNDE mTOR YOLAĞI ARACILI OLASI ANTİKANSER ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Endometrial kanser dünya çapında en yaygın jinekolojik kanserlerden biridir ve her yıl dünya çapında tahminen 42.000 kadın bu kanserden hayatını kaybetmektedir. Günümüzde endometrial kanser için kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi gibi tedavi yöntemleri kullanılmaktadır. Şu anda kemoterapi için kullanılan ilaçlar, iyileşme oranını arttırmada sınırlı bir başarıya sahiptir. Bu nedenle endometrial kanser tedavisinde kullanılacak doğal, zararsız ve maliyeti düşük bileşiklere acil ihtiyaç vardır. Lupan tipi triterpen olan ve bitkiler âleminde yaygın olarak bulunan betülinik asit tümör büyümesini seçici olarak inhibe edebilmesi ve hücre apoptozunu indükleyebilmesi gibi özellikleriyle son yıllarda kanser tedavisi için dikkat çekmektedir. Bu çalışmanın amacı betülinik asitin insan endometrial kanser hücrelerinde mTOR yolu aracılı anti kanser etkilerinin araştırılmasıdır. Betülinik asitin Ishikawa hücre canlılığı üzerine etkisi CCK-8 yöntemi ile, apoptoz ve mTOR yolağında görevli olan genlerin ekspresyonu üzerine etkisi gerçek zamanlı PCR, mTOR yolağında görevli proteinlerin ekspresyonu üzerine etkisi immünohistokimya ve Western blot ile apoptoz üzerine etkileri ise Annexin V ile belirlenmiştir. Betülinik asitin Ishikawa hücrelerinde IC₅₀ dozu 48. Saate 50 µM olarak belirlenmiştir. Betülinik asit uygulaması Ishikawa hücrelerinde Bcl2 (P=0.008) ekspresyonunun anlamlı azalmasına ve kaspaz 8 (P=0.001) ekspresyonunun artmasına neden olmuştur. Annexin V sonuçları ile betülinik asit uygulamasının Ishikawa hücrelerinde apoptozu tetiklediği desteklenmiştir. Betülinik asit uygulanan grupta apoptoza uğrayan hücrelerin oranı ortalama %22±3.23 (P=0.02) iken kontrol grubunda %2.31±0.2'dir. mTOR ile ilişkili genlere bakıldığında betülinik asit, AKT1 (P=0.0001) ekspresyonunun anlamlı azalmasına RAPTOR (P=0.00002) ekspresyonunun ise anlamlı artmasına neden olmuştur. Betülinik asit uygulaması mTOR yolağında görevli proteinlerinin ekspresyonunda da anlamlı bir azalmaya yol açmıştır. Ishikawa hücrelerinde p-PI3K, p-AKT ve p-mTOR pozitif hücre yüzdesi kontrol grubunda sırasıyla, %89.39 ± 5.19, %74.84 ± 5.07 ve %82.02 ± 6.14'tür. BA uygulanan grupta bu değerler sırasıyla %49.12 ± 19.12 (P=0.002), %44.46 ± 7.39 (P<0.001) ve %53.70 ± 8.94 (P<0.001)'tür. Çalışma sonuçlarımıza göre betülinik asitin Ishikawa hücrelerinde mTOR sinyal yolağını hedef alarak hücre proliferasyonunu azalttığı ve apoptozu tetiklediği, ayrıca betülinik asit endometrial kanser tedavisinde potansiyel bir anti-kanser ajan olabileceği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, Betülinik asit, Ishikawa, mTOR

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE POSSIBLE mTOR PATHWAY MEDIATED ANTICANCER EFFECTS OF BETULINIC ACID ON ENDOMETRIAL CANCER CELLS

Endometrial cancer is one of the most common gynecological cancers worldwide, and an average of 42,000 women die each year. Chemotherapy, radiotherapy, and surgery are among the treatments available for endometrial cancer. Currently, drugs used for chemotherapy have had limited success in increasing the cure rate. Betulinic acid, a lupane-type triterpene widely found in the plant kingdom, has attracted attention for cancer treatment in recent years due to its ability to inhibit tumor growth and induce cell apoptosis selectively. The aim of this study is to investigate the mTOR pathway-mediated anti-cancer effects of betulinic acid in human endometrial cancer cells. The effect of betulinic acid on Ishikawa cell viability was determined by the CCK-8 method, the effect on the expression of genes involved in apoptosis and mTOR pathway, real-time PCR, the effect on the expression of proteins in the mTOR pathway, immunohistochemistry, and Western blot, and the effects on apoptosis with Annexin V. The IC50 dose of betulinic acid in Ishikawa cells was determined as 50 μ M at 48th hour. Betulinic acid administration caused a significant decrease in Bcl2 ($P=0.008$) expression and increased caspase 8 ($P=0.001$) expression in Ishikawa cells. The results of Annexin V supported that betulinic acid administration triggered apoptosis in Ishikawa cells. The mean rate of apoptotic cells in the betulinic acid group was $22\pm 3.23\%$ ($P=0.02$), while it was $2.31\pm 0.2\%$ in the control group. Betulinic acid caused a significant decrease in the expression of AKT1 ($P=0.0001$) and a significant increase in the expression of RAPTOR ($P=0.00002$). Betulinic acid administration also significantly decreased the expression of proteins involved in the mTOR pathway. The percentage of p-PI3K, p-AKT, and p-mTOR positive cells in Ishikawa cells was $89.39 \pm 5.19\%$, $74.84\% \pm 5.07$, and $82.02\% \pm 6.14$ in the control group, respectively. In the betulinic acid group, these values were $49.12 \pm 19.12\%$ ($P=0.002$), $44.46 \pm 7.39\%$ ($P<0.001$), and $53.70 \pm 8.94\%$ ($P<0.001$), respectively. The results of this study showed that betulinic acid decreased cell proliferation and triggered apoptosis by targeting mTOR signaling pathway in Ishikawa cells, and betulinic acid may be a potential anti-cancer agent in the treatment of endometrial cancer.

Keywords: Apoptosis, Betulinic acid, Ishikawa, mTOR

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

APS	: Alüminyum Persülfat
BA	: Betülinik Asit
CCK-8	: Cell Counting Kit-8
CHCl ₃	: Kloroform
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	: Dimetilformamit
DMSO	: Dimetil sülfoksit
EH	: Endometrial Hiperplazi
EIN	: Endometrial İntraepitelyal Neoplazi
EK	: Endometrial Kanser
EWG	: Environmental Working Group (Avrupa Çalışma Grubu)
FBS	: Fetal Sığır Serumu
FIGO	: International Federation of Gynecology and Obstetric (Uluslararası Jinekologlar ve Obstetrisyenler Federasyonu)
MeOH	: Metanol
PBS	: Fosfat tamponlu salin
PFA	: Paraformaldehit
PVDF	: Polivinilidenflorit
RIPA	: Radioimmunoprecipitation assay buffer
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
VKİ	: Vücut Kitle İndeksi
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. İnsan Uterusunun Boyuna Kesiti	5
Şekil 2.2. Uterusun Endometriyum Tabakası	7
Şekil 2.3. Menstrual Siklusun Proliferasyon Fazı, Sekretuar Faz ve Menstrual Fazındaki Uterus Fotomikrografi	9
Şekil 2.4. Endometrial Kanserin Histolojik Olarak Derecelendirilmesi.....	12
Şekil 2.5. Endometrial Kanserin FIGO Derecelendirilmesinin Şematik Resmi	15
Şekil 2.6. Betülinik Asit Kimyasal Yapısı.....	28
Şekil 3.1. Western Blot Transfer Aşaması Temsili Şekli	41
Şekil 3.2. Apoptotik Hücre Oranı Deneyi İçin Oluşturulan Kontrol, Doz (BA 50 µM) ve Pozitif Kontrol Grubu.....	47
Şekil 3.3. Apoptotik Hücre Ölümünü Ölçmek İçin Kullanılan Muse Cell Analyzer Cihazı	48
Şekil 4.1. Betülinik Asidin Ishikawa Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri.....	52
Şekil 4.2. BA'nın Ishikawa Hücrelerinde Apoptoz Üzerine Etkilerinin Annexin V Boyama İle Değerlendirilmesi.....	54
Şekil 4.3. Ishikawa Hücrelerinde BA'nın PI3K, AKT ve mTOR Ekspresyonu Üzerine Etkilerinin İmmünohistokimya İle Araştırılması.....	55
Şekil 4.4. BA'nın Ishikawa Hücrelerinde PI3K, AKT ve mTOR Ekspresyonları Üzerine Etkilerinin İstatistiksel Analizi	56
Şekil 4.5. BA Uygulamasının Ishikawa Hücrelerinde PI3K/AKT/mTOR Ekspresyonu Üzerine Etkisinin Western Blot İle Gösterilmesi	57

TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Endometrial Kanseri Cerrahi Evrelemesi (Faria ve ark., 2019).....	15
Tablo 3.1. Western blot %12 ve %4'lük jel protokolü.....	39
Tablo 3.2. Running buffer hazırlama protokolü	40
Tablo 3.3. Transfer buffer hazırlama protokolü.....	41
Tablo 3.4. cDNA sentez karışımı.....	44
Tablo 3.5. RT-PCR karışımı.....	45
Tablo 3.6. RT-PCR 96'lı plaka yerleşimi.....	45
Tablo 4.1. Ishikawa hücrelerinde apoptoz ve mTOR ilişkili genlerin mRNA değışi klikleri	53

1. GİRİŞ

Endometrial kanser (EK) en yaygın jinekolojik malignitedir ve insidansı giderek artmaktadır (Njoku ve ark., 2020). Endometrium kanseri gelişmiş ülkelerde kadınlarda meme kanserinden sonra en çok rastlanan ikinci kanser türüdür. Kadınların yaklaşık %3'ünde yaşamlarının bir döneminde endometrial kanser gelişir ve insidansı giderek artmaktadır (Zhang ve ark., 2021). Tümör histolojik özellik, grade ve hormon reseptör ekspresyonuna göre sınıflara ayrılır. İki tipi vardır. Tip 1, endometrioid veya östrojen bağımlıken tip 2, endometrioid ve östrojen reseptör bağımlı değildir. Ek olgularının %75 ve 85'ini oluşturan Tip 1 postmenopozal kadınlarda görülür ve insülin direnci, tip 2 diyabet ve polikistik over sendromu ile ilişkili olup iyi prognozudur. Tip II sıklıkla metastaz ile ilişkili olan ve agresif kanser türüdür (Meireles ve ark., 2017). Kadınların çoğunda hastalık erken evredeyse tedavide çok başarılı sonuçlar elde edilmekte ancak hastalık ilerlemiş ve metastaz yapmışsa prognozu ve tedavi seçeneği azalmaktadır (Gómez-Raposo ve ark., 2021). Endometrial kanserin tedavisinde hastalığın evresine bağlı olarak cerrahi, kemoterapi, radyoterapi ve hormonal tedavi uygulanmaktadır. Şu anda kemoterapi için kullanılan ilaçlar, iyileşme oranını arttırmada sınırlı bir başarıya sahiptir (An ve ark., 2021). Bu nedenle endometrial kanser tedavisinde kullanılabilecek doğal, zararsız ve maliyeti düşük bileşiklere acil ihtiyaç vardır.

Betülinik asit (BA) genellikle huş ağacından 'birch tree' (*Betula sp.* Betulaceae) izole edilen, fakat birçok botanik kaynaktan da bulunabilen doğal olarak oluşan bir triterpenoiddir. BA antiviral, antitümör, antidiyabetik, antiinflamatuvar, antihiperlipidemik gibi çok sayıda biyolojik etkilere sahiptir (Ríos ve Máñez, 2018). Geleneksel Çin tıbbı, çeşitli hastalıklarda ilaç gelişimi için önemli katkılar sağlamıştır. Geleneksel Çin tıbbından türetilen bazı maddelerin antikanser etkileri vardır ve klinikte uygulamaya başlanmıştır. BA'nın Stearoyl-CoA Desaturase'yi baskılayarak safra kesesi kanseri hücrelerinin apoptozunu indüklediği gösterilmiştir (Wang ve ark., 2020). Diğer bir çalışmada BA'nın, spesifik protein transkripsiyon faktörlerinin hedeflenen degradasyonu yoluyla prostat kanseri büyümesini inhibe ettiği bildirilmiştir (Chintharlapalli ve ark., 2007). Majeed ve ark. (2016) BA'nın PI3K yolağını hedefleyerek kanser hücresi ölümünü indüklediği bildirmiştir. Ek olarak

BA'nın kardiyolipin modifikasyonunu düzenleyerek yeni bir hücre ölüm yolağını indüklediği de gösterilmiştir (Potze ve ark., 2016).

Literatürde BA'nın endometrial kanser hücrelerinde antikanser etkilerini ve olası moleküler etki mekanizmasını konu alan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu alışmada BA'nın endometrial kanser hücrelerinin proliferasyonu, apoptozu ve mTOR sinyal yolağı üzerine etkilerine ilk kez bakılmıştır ve zgndr.

Bu çalışmanın amacı, BA'nın endometrial kanser hücrelerinin mTOR yolağı aracılı hücre proliferasyon ve apoptozu üzerine etkilerini araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Uterus Anatomisi

Uterus anatomik olarak dişi pelvisinde mesanenin hemen arkasında ve rektumun önünde yer alan kalın kaslı bir duvara ve dar bir lümeneye sahip, 7,5 cm uzunluğunda, armut şekilli bir organdır (Ameer ve ark., 2017; Harold, 2011).

Uterus korpus, fundus, isthmus ve serviks olmak üzere dört ana anatomik bölüme ayrılır. Uterusun en büyük bölümü korpus (gövde) bölümüdür. Gövdenin tuba uterina bağlantısının üstünde genişleyen konveks kısmı fundus olarak adlandırılır. Rahim gövdesi, serviks olarak devam eden istmusa doğru daralır. Serviks uterusun altında bulunan silindirik biçimindeki kısımdır. İstmus ile korpus kısmından ayrılmaktadır. Serviks servikal kanal olarak adlandırılan lümeni her iki uç kısmında da internal os ve eksternal os olarak adlandırılan dar açıklıklara sahiptir. İnternal os uterin kaviteye açılırken, eksternal os ise vajinaya açılır. Nullipar kadınlarda dış os daireseldir, ancak doğumdan sonra ön ve arka dudaklı olan enine bir yarık haline gelir (Harold, 2011).

Utero-ovaryan ligament, yuvarlak ligament, geniş ligament, kardinal ligament ve uterosakral ligamentler dâhil olmak üzere çeşitli ligamentler uterusu destekler. Ayrıca pelvik diyafram, ürogenital diyafram ve perineal cisim tarafından (inferiorda) desteklenir. Erişkin kadınlarda rahim, yaklaşık 170°'lik bir açı (rahmin antefleksiyonu) oluşturacak şekilde iç os seviyesinde kendi üzerinde öne doğru bükülür. Serviks, vajina eksenine ile 90°'lik bir açı oluşturacak şekilde geriye doğru eğilir (uterusun anteversiyonu). Böylece rahim neredeyse yatay bir düzlemde uzanır hale gelir (Harold, 2011; Ameer ve ark., 2017).

2.2. Uterus Embriyolojisi

Dişilerde üreme organları gonadlar, üreme kanalları ve dış genital organlar olmak üzere üç ana gruba ayrılır. Dişi üreme sistemi embriyonik dönemde mezoderm, primordial germ hücreleri ve mezenkimden köken alırlar (Moncada-Madrado ve Valero, 2022).

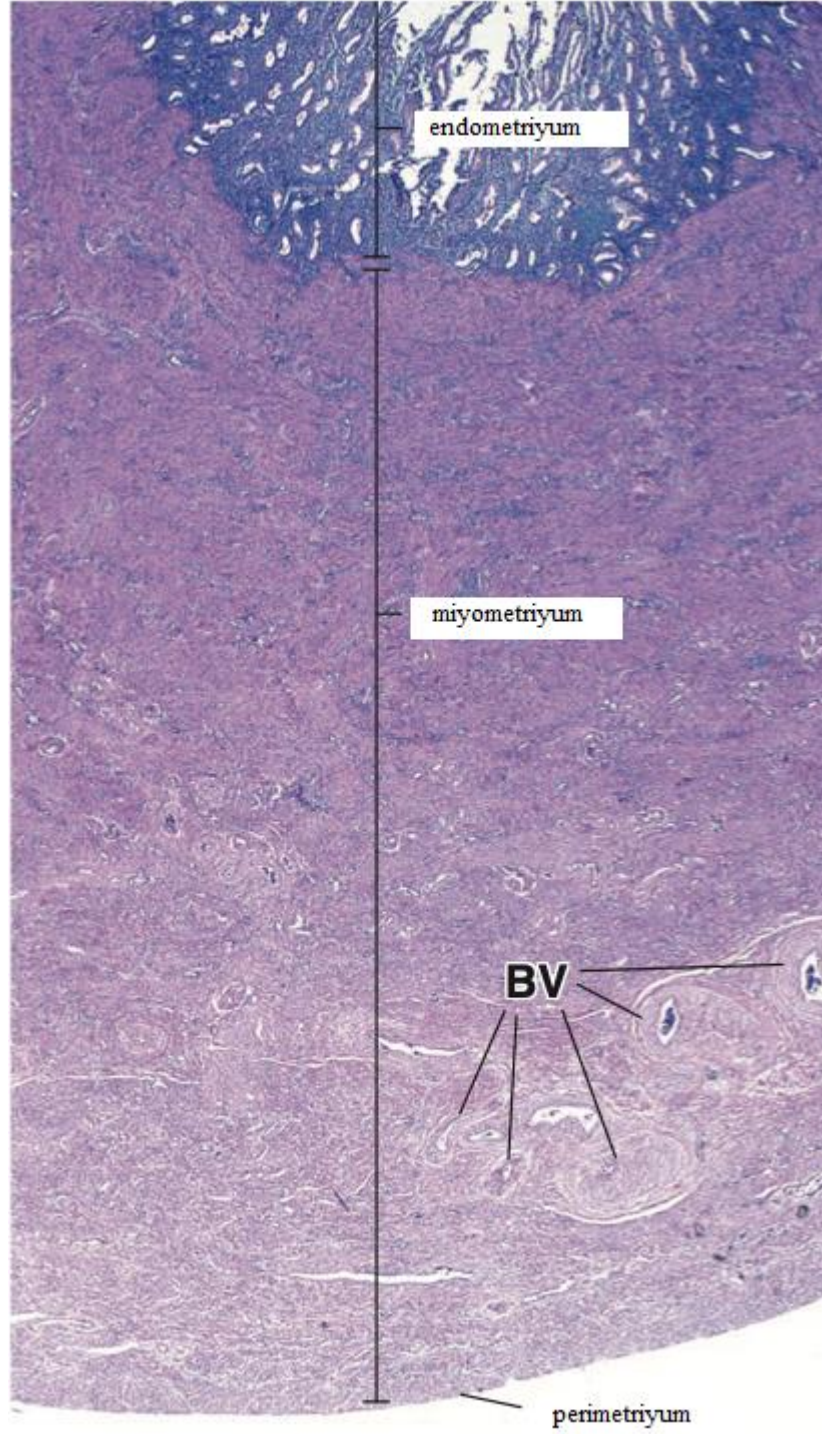
Dişi ve erkek embriyoların her ikisi de mezonefrik ve paramezonefrik olmak üzere iki çift genital duktusa sahiptir. Mezonefrik duktus erkek üreme sisteminin gelişiminde önemli rol oynarken, paramezonefrik duktus dişi üreme sistemi gelişiminde önemli rol oynamaktadır (Sadler, 2017).

Dişi embriyolarında testesteron olmadığı için mezonefrik duktuslar gerilerken müllerian inhibitör madde (MIS) yokluğundan dolayı paramezonefrik duktuslar gelişir. Embriyonik gelişim sırasında östrojen varlığı, testis ve anti müllerian hormon (AMH) yokluğu dişilerde paramezonefrik kanalların ana genital kanallara dönüşmesini sağlar. Başlangıçta paramezonefrik kanallar üç bölümden oluşur: karın boşluğuna açılan kranial vertikal parça, mezonefrik kanalları çaprazlayan horizontal kısım ve karşı taraftaki eşiyile birleşen kaudal vertikal kısım. Gelişimin ilerleyen aşamalarında overlerin aşağı inişiyile birlikte kranial vertikal parça ve horizontal kısımdan uterus tüpleri gelişir. Kaudal parçalar uterus kanalını oluşturmak üzere kaynaşır. Paramezonefrik kanallarının ikinci kısımları mediokaudale doğru yer değiştirmeleriyle ürogenital sırtlar transvers bir düzleme otururlar. Kanallar orta hatta birleştikten sonra pelvis içinde yatay bir katlantı oluşur. Birbiriyle kaynaşmış paramezonefrik kanalların lateralinde, pelvis duvarına doğru uzanan bu katlantı uterusun broad ligamentidir. Bu ligamentin üst sınırında uterus tüpleri, arka yüzeyinde ise overler yer almaktadır. Kaynaşan mezonefrik kanallardan uterusun korpusu, serviksi ve vajenin üst kısmı gelişir (Sadler, 2017).

Mezonefrik kanallar dişilerde testesteron olmadığından dolayı dejenere olurlar (Sadler, 2017).

2.3. Uterus Histolojisi

Uterus histolojik olarak en dışta perimetrium, ortada kalın bir düz kas tabakasından oluşan miyometriyum ve en içte endometriyum olmak üzere üç tabakadan oluşur (**Şekil 2.1**) (Pawlina ve Ross, 2014).



Şekil 2.1. İnsan uterusunun boyuna kesiti (Pawlina ve Ross, 2014).

2.3.1. Perimetriyum

Uterusu en dıştan saran yassı mezotelyal hücrelerden oluşan gevşek bağ dokusudur (Nergiz, 2022).

2.3.2. Miyometriyum

Uterusun orta tabakasında bulunan ve en kalın tabakası olan miyometriyum tabakası, esas olarak düz kas hücrelerinden oluşur (Maxey ve ark., 2021). Düz kas lifleri içte longitudinal, ortada sirküler ve dışta longitudinal olacak şekilde dizilim gösterirler (Nergiz, 2022). Miyometriyumun orta tabakasında arkuat arter dalları yayılmıştır ve burası “stratum vaskülar” olarak adlandırılmaktadır (Nergiz, 2022).

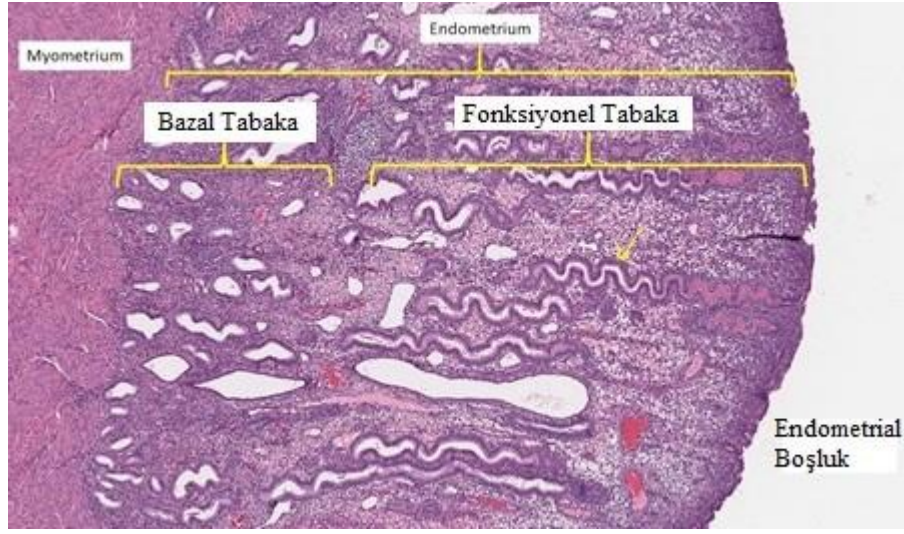
Menstruasyon döneminde miyometriyum tabakası kasılarak endometriyum tabakasının dışarı atılmasına yardımcı olur. Kasılmalar aynı zamanda yaygın olarak adet krampları olarak bilinen dismenore kaynağıdır (Maxey ve ark., 2021). Gebelik sürecinde ise miyometriyum, uterus duvarına dayanıklılık vermek için aşırı derecede büyüme sürecine girer. Bu süreç sonucunda kas hücrelerinin kollejen üretimi artar. Gebelik esnasında iyi gelişen uterus miyometriyumu doğum esnasında bebeği dışarı atmak için çok güçlü bir şekilde kasılır. Gebelik sonrasında ise düz kas hücrelerinin birçoğu apoptoza uğrar. Böylece gebelik esnasında üretilen fazla kollejenin ortadan kaldırılır ve uterus neredeyse gebelik öncesi boyutuna geri döner (Mescher, 2019).

2.3.3. Endometriyum

Endometriyum uterus duvarının en iç tabakasıdır ve uterus mukozasıdır. Epitel, uterus bezleri ve lamina propriyadan oluşmaktadır. Endometriyum salgı hücreleri ve silyumlu hücre içeren tek katlı prizmatik epitel ile döşelidir. Histolojik olarak endometriyum stroması fibroblastlar bakımından zengindir ve ara madde ile beraber demetler halinde bulunmayan tip III kollejen lifler içerir. Endometriyumu miyometriyumdan ayıran bir submukoza tabakası bulunmaz (Mescher, 2019; Nergiz, 2022).

Endometriyum, başarılı implantasyon sonucu doğuma kadar olan süreçte fetüsün büyümesi ve hayatta kalması için tek yer olmasının yanı sıra plasentanın geliştiği ve menstrual döngü ile ilgili bez ve damar değişimlerinin gözlemlendiği yerdir (Vilella ve ark., 2021; Nergiz, 2022).

Üreme çağındaki endometriyum yapısal ve fonksiyonel olarak iki farklı tabaka içermektedir. Bazal tabaka miyometriyuma komşu olan tabakadır ve lamina propriyaya daha fazla sayıda hücre içerir. Bazal tabakada ayrıca uterus bezlerinin derin bazal uçları yer almaktadır (Mescher, 2019). Bu tabaka düz arterle ile kanlanmaktadır. İşlevsel tabaka olarakta adlandırılan fonksiyonel tabaka ara maddeden zengin süngerimsi bir yapıya sahiptir. Bazal tabakanın aksine bu tabaka spiral arterler ile kanlanır (Şekil 2.2) (Mescher, 2019).



Şekil 2.2. Uterusun endometriyum tabakası
(<https://www.pathologyoutlines.com/topic/uterusnormal.html>).

Gebe olmayan bir kadında fonksiyonel tabaka menstrüasyon sırasında dökülür, bir miktar kanla beraber dışarı atılır. Geride kalan bazal tabaka fonksiyonel tabakanın yenilenmesi için gerekli olan hücreleri içerir ve fonksiyonel tabakanın yenilenmesinde görev alır (Nergiz, 2022; Mescher, 2019).

2.3.3.1. Menstrual Siklus

Üreme çağında endometriyum her ay kendisini olası bir gebelik durumu için embriyo implantasyonuna ve sonrasındaki embriyonik ve fetal gelişim olaylarına hazırlayan menstrual siklus olarak adlandırılan siklik bir değişime uğrar. Menstrual siklus sırasında endometriyumun salgı aktivitesindeki değişimler ovaryum foliküllerinin olgunlaşması ile ilişkilidir. Üreme çağındaki endometriyum yapısal ve fonksiyonel olarak iki farklı tabaka içermektedir. Stratum funkcionale ya da

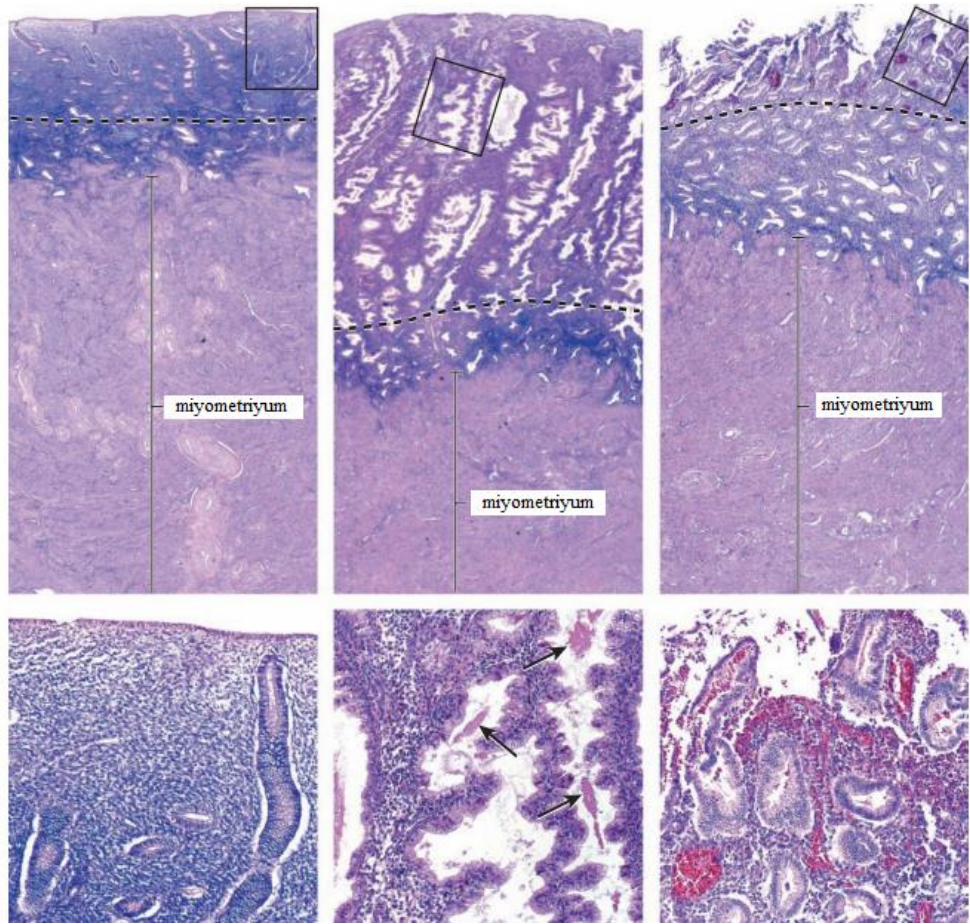
fonksiyonel tabaka endometriyumun kalın tabakasıdır siklus sırasında proliferere ve dejenere olan tabakasıdır. Menstrual siklusta bir miktar kanla beraber dışarı atılır. Stratum bazale ya da bazal tabaka ise menstrual siklus sırasında korunur yani dışarı atılmaz. Fonksiyonel tabakanın rejenerasyonunda görev alır (Pawlina ve Ross, 2014; Mescher, 2019).

Menstrual siklus gerçekleşirken endometriyum kalınlığı 1-6 mm değişiklik gösterir. Menstrula siklus sırasında endometriyumda meydana gelen değişiklikler şekil 2.3' te gösterilmiştir.

Menstrual siklus pitiüter bezin pars distalisinden salgılanan gonodotropinler tarafından kontrol edilir. Siklus 28 günde bir tekrar eder ve bu sırada endometriyumda fonksiyonel morfolojik değişimler meydana gelir. Siklus proliferasyon fazı, sekretuar fazı ve menstrual faz olmak üzere üç fazdan oluşur (Pawlina ve Ross, 2014; Mescher, 2019).

1. Proliferasyon fazı: Ovaryumda meydana gelen foliküler matürasyon ile eş zamanlı gerçekleşir. Bu faz ovarian östrojen salgılanmasından etkilenir. Artan östrojen ile proliferasyon fazı başlar. Stratum bazalede bulunan stromal, endotelial ve epitelyal hücreler hızlı bir şekilde proliferere olurlar. Stromal hücreler kollejen ve ara madde salgırlar. Proliferasyon fazının sonunda endometriyum yaklaşık 3 mm kalınlığa ulaşır. Epitelyal hücrelerin bazal kısımlarında glikojen birikimi gözlemlenir. Salgı bezleri dar bir lümeni vardır (Pawlina ve Ross, 2014; Mescher, 2019).
2. Sekretuar faz: Korpus luteumun fonksiyonel aktivitesi ile eş zamanlıdır. Progesteron salgısından etkilenir. Salgı bezlerinin lümenleri salgı ürünleri ile doludur (Pawlina ve Ross, 2014; Mescher, 2019).
Östrojen ve progesteron hormonlarının etkileri ile stromal hücreler desidual hücrelere dönüşürler. Bu hücreler büyük, soluk boyanan ve glikojen bakımından zengin hücrelerdir ve embriyonun beslenmesi için gerekli ortamı sağlarlar (Pawlina ve Ross, 2014; Mescher, 2019).

3. Menstrual faz: Fertilizasyon gerçekleşmezse korpus luteum yaklaşık 10 gün boyunca hormon üretmeye devam eder ve daha sonra dejenere olmaya başlar. Korpus luteumun dejenere olması ile ovaryumun hormon üretimi azalır. Ovaryumda östrojen ve progesteron seviyelerinin azalması sonucunda endometriyumda menstrual faz gerçekleşmeye başlar. Menstrual kanama yaklaşık olarak 5 gün sürer (Pawlina ve Ross, 2014; Mescher, 2019).



Şekil 2.3. Menstrual siklusun proliferasyon fazı, sekretuar faz ve menstrual fazındaki uterus fotomikrografı (Pawlina ve Ross, 2014).

2.4. Endometrial Hiperplazi

Gelişmiş ülkelerde endometrial kanser, kadın üreme sisteminin en yaygın malignitelerinden biridir. Endometrial kanserlerin çoğunluğunu oluşturan

endometriyumun endometrioid adenokarsinomu için öncü lezyon endometrial hiperplazidir. Endometrial hiperplazi, tek başına kadınlar için bir sağlık riski oluşturmamaktadır. Ancak endometrial hiperplazi, özellikle atipi varlığında, eş zamanlı endometrial kanser için hem bir öncü hem de bir belirteç olduğu için önemlidir. Endometrial hiperplazi tedavi edilmezse endometrial kansere dönüşme eğilimi göstermektedir (Sobczuk ve Sobczuk, 2017; Ring ve ark., 2022; Mills 2010).

2.5. Endometrial Polipler

Endometrial polipler endometrial stroma, bezler ve kan damarlarından oluşan lokalize endometrial büyümelerdir. Bu polipler için prevalansı çalışılan toplumlara göre değişiklik gösterebilir yapılan çalışmalarda %7.8 ile %34.9 arasında olduğu bildirilmiştir. Endometrial poliplerin çoğu asemptomatik olmasına rağmen bazı hastalarda semptomatik olarak anormal uterin kanama en sık görülen semptomdur. Endometrial polipler histolojik olarak, fibröz bir stromada iyi huylu sesil veya sapsil hiperplastik ve kistik dilate endometrial bez kitleleri olarak karakterizedir. Bu polipler içerisinde büyük damarlar mevcuttur. Hormon durumuna bağlı olarak polipler farklı şekillere sahip olabilirler. Endometrial poliplerin kansere dönüşme risk insidansı ise değişkendir (Davis, 2012; Namazov ve ark., 2019).

2.6. Endometrial Kanser

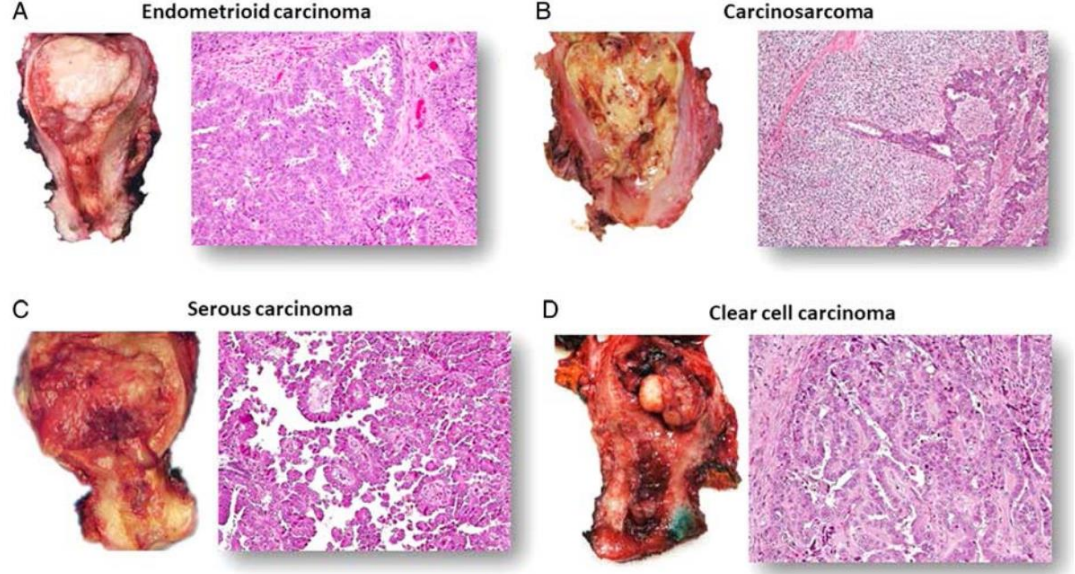
Endometrial kanser dünya çapında en yaygın jinekolojik kanserlerden biridir. Her yıl dünya çapında yaklaşık 142.000 kadına endometrial kanser teşhisi konmaktadır ve tahminen 42.000 kadın bu kanserden hayatını kaybetmektedir (Sorosky, 2008 ; Guleria ve ark., 2021). Endometrial kanser genellikle 50-65 yaş arası kadınlarda daha sık teşhis edilirken vakaların %90'ı 50 yaşından büyük kadınlarda görülmektedir. Endometrial kansere yakalanan kadınların %90'ı anormal uterin kanaması ile doktora başvururken yaklaşık %75'i ise endometrial kanserin erken aşamalarında doktora gitmektedirler. Endometrial adenokarsinom için ortalama yaş 61'dir. Kadınların yaklaşık %20'sinde menopozdan önce tanı konulduğu ve kadınların yaklaşık %5'inde 40 yaşından önce hastalık geliştiği bildirilmiştir. Endometrial kanserlerin yaklaşık % 72'si evre I, % 12'si evre II, % 13'ü evre III ve % 3'ü evre IV'tür (Sorosky, 2008).

2.6.1. Endometrial Kanser İnsidansı

Endometrial kanser insidansı bölgeler arasında farklılık göstermektedir. Daha az gelişmiş ülkelerde risk faktörleri daha az yaygındır ve spesifik mortalite daha yüksek olmasına rağmen endometrial kanser nadir görülmektedir. Kuzey Amerika ve Avrupa'da endometrial kanserin görülme sıklığı az gelişmiş ülkelere göre on kat daha fazladır ve bu bölgelerde endometrial kanser kadın genital sisteminde en sık görülen kanser türüdür ayrıca meme, akciğer ve kolorektal kanserlerden sonra en sık görülen dördüncü kanser çeşitidir. 3 milyondan fazla kadın nüfusuna sahip Belçika'nın Flaman bölgesinde 2000 yılında 743 kadına endometrial kanser teşhisi konmuştur. Flanders'da ise endometrial kanser kadın popülasyonunda meme ve kolon kanserlerinden sonra en sık görülen üçüncü kanser türüdür. Kuzey Amerika'da kadın popülasyonunda kanserden ölümlerin sekizinci en yaygın nedeni endometrial kanser olarak bildirilmiştir. Avrupa'da ise her yıl yaklaşık 9000 kadına endometrial kanserden hayatını kaybetmektedir. Erken teşhis ve tedavi yöntemleri mortalite üzerinde önemli bir etkisi olmadığı için, önümüzdeki birkaç yıl içinde endometrium kanseri insidansında ve mortalitesinde önemli düşüşler beklenmemektedir (Amant ve ark., 2005; Guleria ve ark., 2021; Sorosky, 2008; Makker ve ark., 2021).

2.6.2. Endometrial Kanserinin Histolojik Derecelendirmesi

Endometrial kanser, rahim iç zarından (endometriyumdan) kaynaklanan bir adenokarsinomdur ve tip 1 ve tip 2 olmak üzere iki ana histolojik tipe ayrılır. Bu iki gruptandırma, epidemiyoloji, histopatoloji, prognoz ve tedaviye göre farklılık göstermektedir. Tip 1 tümörler tüm endometrial kanserlerin ~%90'ını oluşturan endometrioid tipte olan karsinomlardır. Tip 2 tümörler ise tüm endometrial kanserlerin ~%10'unu oluşturan yüksek dereceli seröz veya berrak hücreli tipte olan karsinomlardır (Şekil 2.5) (Guleria ve ark., 2021).



Şekil 2.4. Endometrial kanserin histolojik olarak derecelendirilmesi

A) Endometrioid karsinoma B) Karsinosarkoma C) Seröz karsinoma D) Berrak hücreli karsinoma (Yen ve ark.,2019).

Prognoz açısından, tip 1 tümörler tip 2 tümörlerden daha iyi bir prognoza sahiptir, çünkü endometrial kanserlere bağlı tüm ölümlerin yaklaşık %40'ı tip II tümürlü vakalarda görülmektedir (Guleria ve ark., 2021).

Tip 1 endometrial kanserin östrojene bağımlı olduğu, nispeten daha genç kadınlarda ortaya çıktığı ve genellikle endometrial hiperplaziden önce geliştiği öne sürülürken, tip 2 endometrial kanserin östrojene daha az bağımlı olduğu, daha yaşlı kadınlarda ortaya çıktığı ve genellikle endometriyumdaki prekanseröz bir insitu lezyondan geliştiği belirtilmektedir (Guleria ve ark., 2021).

2.6.2.1. Tip 1 Karsinom

Tip 1 endometrial karsinomlar birincil olarak derece I veya derece II endometrioid adenokarsinomlardan oluşan endometrioid histolojiye sahiptir (Makker ve ark., 2021). "Tip 1" karsinomlar veya endometrioid endometrial kanserler, endometrial kanserlerin %70 ila %80'ini oluştururlar. Tip 1 karsinomlar % 5'den daha az solid bileşene sahiptirler. İyi farklılaşma gösterirler, normal dokuya daha çok

benzerler ve tipik olarak iyi bir prognoza sahiptirler (Amant ve ark., 2005; Amant ve ark., 2007; Passarello ve ark., 2019).

Tip 1 tümörler, genellikle peri-menopozal kadınlarda gelişen ve kompleks ve atipik endometrial hiperplazi ile birlikte görülen veya öncesinde görülen düşük dereceli östrojenle ilişkili endometrioid karsinomlardır. Tip I karsinomlar genel olarak K-ras, b-katenin, mikrosatellit instabilitesi ve mutasyonları, PTEN kaybı ve PIK3CA mutasyonları ile karakterizedir (Slomovitz ve Coleman, 2012).

Endometrial intraepitelyal neoplazi (ayrıca bilinen kompleks atipik endometrial hiperplazi), tip I tümörlerin öncü lezyonları olarak kabul edilir ve sıklıkla kalınlaşmış bir endometrium ile ilişkilidir (Sorosky, 2012).

Tip 1 karsinomlar genç, obez ve perimenopozal kadınlarda daha sık görülmektedir (Passarello ve ark., 2019). Endometrioid karsinomlar orta derecede farklılaşma gösterirler yani düşük dereceye sahip olan tümörlerdir ve endometrial hiperplazinin arka planında ortaya çıkarlar. Bu tümörler, erken teşhis edildiğinde, tip 1 endometrium kanseri olumlu bir prognoz gösterir ve %20 gibi düşük nüks oranlarına sahiptirler. 5 yıllık sağkalım oranları evre I ve evre II'de sırasıyla %97 ve %80'den fazladır (Slomovitz ve Coleman, 2012; Amant ve ark., 2005; Amant ve ark., 2007; Passarello ve ark., 2019).

2.6.2.2. Tip 2 Karsinom

Endometrial kanserlerin yaklaşık %10'u ise tip 2 yani yüksek dereceli lezyonlardır. Tip 2 karsinom, atrofik endometriyum veya endometrial poliplerden kaynaklanan “seröz endometrial intraepitelyal karsinom” ile birlikte ortaya çıkabilir. Tip II karsinomlar seröz karsinomları (%10) ve berrak hücreli karsinomları (<%5) içerirler (Slomovitz ve Coleman, 2012).

Östrojenden bağımsızdırlar ve sıklıkla p53, HER2/neu, p16 ve E-cadherin'de genetik değişikliklerle karakterize edilirler (Slomovitz ve Coleman, 2012). Tip 2 endometrial kanserler genellikle tip 1 endometrial kanserlerden daha kötü prognoza sahiptirler ve daha az yaygın olmasına rağmen, endometrial kansere bağlı ölümlerin

%44'ünü oluşturmaktadırlar. Tip 2 tümörler agresif olarak kabul edilirler (Slomovitz ve Coleman, 2012).

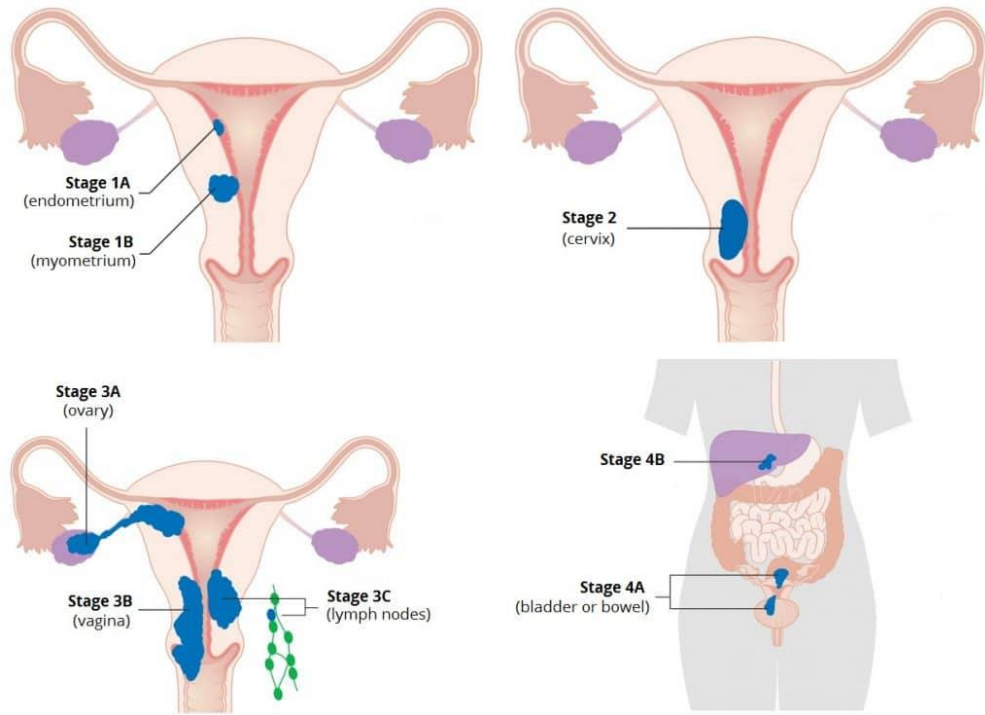
Tip 1 karsinoma kıyasla daha düşük 5 yıllık genel sağ kalım (%55) ile daha yüksek nüks oranlarına (yaklaşık %50) sahiptir. Çoğu durumda miyometriyal invazyon belirgindir ve vasküler invazyon yaygındır (Amant ve ark., 2005; Amant ve ark., 2007; Passarello ve ark., 2019). Tip 2 tümörler genellikle yaşlı kadınları etkilemektedir ve ince, atrofik bir endometriyumda gelişebilen Afrikalı-Amerikalı kadınlarda daha sık rastlanmaktadır (Amant ve ark., 2005; Amant ve ark., 2007; Passarello ve ark., 2019). Tip II endometrial kanser hastalığı olan kadınların epidemiyolojik profili kesin değildir (Amant ve ark., 2005; Amant ve ark., 2007; Passarello ve ark., 2019).

2.6.3. FIGO Derecelendirme

Endometrial kanserin cerrahi evrelemesi ilk olarak 1988 yılında önerilmiş ve Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Federasyonu (FIGO) sistemine göre evrelendirilmiştir. Evreleme 2009 yılında güncellenmiştir. Bu evreleme sistemine göre Evre I, uterus korpusu ile sınırlı olan endometrial kanser için kullanılır. Evre I ayrıca evre IA (miyometrial invazyon yok veya %50'den az) ve IB (%50'den fazla miyometrial invazyon) olarak ikiye ayrılmaktadır. Bu derecelendirme sisteme göre servikal stromayı invaze eden ancak uterus ile sınırlı kalan tümörler evre II olarak tanımlanır. Evre III, uterus ile sınırlı kalmayan, uterus ötesine yayılan ancak gerçek pelvisin dışına çıkmayan tümörü temsil etmektedir. Evre III tümörler ayrıca evre IIIA (uterus serozasını invaze eden), evre IIIB (parametrium ve/veya vajinal tutulum sergileyen) ve evre IIIC1 (pozitif pelvik nodlar) ve IIIC2 (pozitif paraaortik lenf nodları) olarak alt sınıflara ayrılmaktadır. Evre IV ise iki alt sınıfa ayrılır: Evre IVA mesane veya bağırsak mukozasını invaze eden tümörleri ve Evre IVB uzak metastazlı tümörleri içermektedir (Faria ve ark., 2019).

Tablo 2.1. Endometrial Kanser Cerrahi Evrelemesi (Faria ve ark., 2019).

Evre I	
Evre IA	Miyometriyal invazyon yok veya %50 den az
Evre IB	%50'den fazla miyometrial invazyon
Evre II	Servikal stromayı invaze eden ancak uterus ile sınırlı kalan
Evre III	
Evre IIIA	Uterus serozasını invaze eden
Evre IIIB	Parametrium ve/veya vajinal tutulum
Evre IIIC1	Pozitif pelvik nodlar
Evre IIIC2	Pozitif paraaortik lenf nodları
Evre IV	
Evre IVA	Mesane veya bağırsağa mukozasını invaze eden
Evre IVB	Uzak metastazlı tümörleri



Şekil 2.5. Endometrial kanserin FIGO derecelendirilmesinin şematik resmi

(<https://teachmeobgyn.com/gynaecology/uterine/endometrial-cancer/>).

2.6.4. Endometrial Kanserin Moleküler Patolojisi

Endometriyum, adet döngüsü sırasında östrojen ve progesteron dalgalanmalarına yanıt olarak yapısal modifikasyona ve özel hücrelerde değişikliklere uğrar. Endometriumun uzun süreli aşırı östrojene maruz kalması endometrial hiperplaziye yol açar, bu da atipik hiperplazi ve sonunda tip-1 endometrial kansere yakalanma riskini artırır (Amant ve ark., 2007; Matias-Guiu ve Prat, 2013).

Tip 1 karsinomlarının gelişiminde rol oynayan moleküler değişiklikler tip 2 karsinomlarından farklıdır. Tip 1 karsinomlarda mikrosatellit instabilitesi (MI) ve PTEN, K-RAS, PIK3CA ve CTNNB1 (beta-katenin) genlerinde mutasyonlar görülürken, tip 2 karsinomlar p53 değişiklikleri, birkaç kromozomda heterozigotluk kaybı (LOH) ve diğer moleküler değişiklikler (STK15, p16, E-cadherin ve c-erb-B2) görülmektedir (Matias-Guiu ve Prat, 2013).

Mikrosatellit instabilitesi, kalıtsal polipozis dışı kolon kanseri (HNPCC) ile ilişkili endometrial kanserin %75'inde ve aynı zamanda sporadik endometrial kanserin %25-30'unda gösterilmiştir. Sporadik endometrial kanserde mikrosatellit instabilitesi, tip 1 karsinomlarda tip 2 karsinoma göre daha sık görülmektedir (Matias-Guiu ve Prat, 2013).

Kromozomun 10q23.3 üzerinde bulunan PTEN, östrojen açısından zengin bir ortamda en yüksek oranda eksprese edilen bir tümör baskılayıcı genidir. Progesteranlar PTEN ekspresyonunu etkiler ve çeşitli histopatolojik ortamlarda PTEN'le mutasyona uğramış endometrial hücrelerin involüsyonunu teşvik eder. PTEN, tip 1 endometrial kanserde en sık değişime uğrayan genidir, tip 2 endometrial kanserde sıklıkla mutasyona uğrar ve atipili veya atipisiz endometrial hiperplazilerde de yaygın olarak görülür. PTEN bölgesindeki heterozigotluk kaybı (LOH), endometrial kanser vakalarının %40'ında görülmektedir. Somatik PTEN mutasyonları ağırlıklı olarak tip 1 karsinomda bulunur ve vakaların %37-61'inde görülmektedir. Tip 1 endometrial kanserlerde tipik olarak görülen PTEN mutasyonlarının yanı sıra, tip 1 ve tip 2 kanserlerine özgü, ikili bir endometrial karsinogenez modelini destekleyen başka gen değişiklikleri de vardır (Amant ve ark., 2005; Amant ve ark., 2007; Matias-Guiu ve Prat,2013).

2.6.4.1. Endometrial Kanser PI3K/AKT Sinyal Yolağı

Kromozomda 3q26.32 üzerinde bulunan PIK3CA geni, PI3K'nın p110 katalitik alt birimini kodlar. PIK3CA'daki mutasyonlar endometrial kanserde PI3K-AKT sinyal yolunun değişmesine yol açmaktadır. Son zamanlarda yayınlanan makalelerde endometrial kanserde PIK3CA geninde mutasyon görölme sıklığının arttığı bildirilmiştir. Mutasyonlar ağırlıklı olarak helikal (ekzon 9) ve kinaz (ekzon 20) alanlarında yer alır, ancak ekzon 1-7'de de görülebilir. PIK3CA mutasyonları vakaların %24-39'unda ve sıklıkla PTEN mutasyonları ile birlikte görölmektedir. PIK3CA mutasyonları, özellikle ekzon 20'de ve miyometriyal invazyon gibi olumsuz prognostik faktörlerle ilişkilendirilmiştir. PIK3CA mutasyonları ilk olarak tip 1 karsinomlarda tanımlanmasına rağmen, tip 2 karsinom ve mix endometrial karsinomlarda da görölmektedir (Matias-Guiu ve Prat, 2013).

PI3K (phos-phatidylinositol 3-kinase) katalitik alt birim (p110) ve düzenleyici alt birimden (p85) oluşan heterodimerik bir enzimdir. Farklı yapıya, substrat özgülüğüne ve lipid ürünlerine sahip 3 tane PI3K sınıfı vardır. Sınıf IA PI3K'ler en çok çalışılanlardır ve geniş çapta kanserle ilişkilendirilirler. Sınıf IA PI3K, reseptör tirozin kinazlar (RTK), G proteinine bağlı reseptörler ve RAS gibi bazı onkogenler tarafından aktive edilir. Aktive edilmiş PI3K, fosfatidilinositol 4,5-bisfosfatı [PI(4,5)P₂] fosforile eder ve onu fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfata [PI(3,4,5)P₃] dönüştürür. PI(3,4,5)P₃, PDK1 ve AKT gibi proteinlerin plekstrin homoloji alanına bağlanır ve onları plazma zarına alır. Bu süreç, PI(3,4,5)P₃'ü tekrar PI(4,5)P₂'ye ve PI(3,4)P₂'yi tekrar PI(3)P'ye dönüştüren tümör baskılayıcılar PTEN ve INPP4B tarafından negatif olarak düzenlenir. AKT, plazma zarına geldiğinde, sırasıyla 308 ve 473 pozisyonlarındaki serin ve treonin kalıntılarının fosforilasyonu yoluyla aktive edilir. Aktive edilmiş AKT, hücrel büyüme, metabolizmayı, proliferasyonu, göçü, apoptozu ve anjiyogenezi destekleyen bir aşığı akış sinyal olayları dizisini başlatır. PI3K/ AKT/ mTOR artışına yol açan genetik değişiklikler sinyali hem tip 1 hem de tip II endometrial kanserde yaygındır. AKT mutasyonları da, tip I endometrial kanserin yalnızca %2'sinde tanımlanmıştır. RTK'lardaki değişiklikler de endometrial kanserde siktir ve HER2'nin amplifikasyonunu, fibroblast büyüme faktörü reseptörü 2'nin (FGFR2) mutasyonunu, EGF reseptörünün aşırı ekspresyonunu ve kompleks, atipik

hiperplazi ve tip I endometrial kanserde insülin benzeri büyüme faktörü reseptörü 1'in aşırı ekspresyonunu içerir (Matias-Guiu ve Prat, 2013).

KRAS'taki aktive edici mutasyonlar da ağırlıklı olarak tip 1 endometrial kanserde tanımlanmıştır ve doğrudan PI3K'nın p110 alt birimini aktive eder (Matias-Guiu ve Prat, 2013).

2.6.5. Risk Faktörleri

Risk faktörü, bir hastalığa yakalanma olasılığını artıran nitelikler ve özelliklerdir. Endometrial kanser söz konusu olduğunda, en önemli risk faktörleri arasında yaş, ırk, metabolik sendrom, aşırı östrojen maruziyeti ve endometrial kansere genetik yatkınlık yer almaktadır (Guleria ve ark., 2021; Makker ve ark., 2021).

2.6.5.1. Yaş

Endometrial kanser, sıklıkla menopoz sonrası kadınları etkileyen, tanı anında ortalama yaş 60 olan bir hastalıktır. En yüksek yaşa özgü insidans 75 ila 79 yaş arasındadır ve vakaların %85'i 50 yaşından sonra ve sadece %5'i 40 yaşından önce meydana gelmektedir (Guleria ve ark., 2021; Makker ve ark., 2021).

2.6.5.2. Irk

Endometrial kanserin ülkelere göre oranları Kuzey Amerika ve Kuzey Avrupa'da en yüksek, Doğu Avrupa ve Latin Amerika'da daha düşük ve Asya ve Afrika'da en düşük olduğu için, kadın ırklarının endometrial kanser gelişiminde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Bu oranlara katkıda bulunabilecek faktörler arasında nüfusun genel yaşlanmasına ek olarak obezite prevalansı, metabolik sendromlar ve hormon replasman tedavisi sayılabilir. Amerika Birleşik Devletleri'nde, beyaz kadınların yaşam boyu endometrial kanser geliştirme riski Afrikalı ve Amerikalı kadınlardan daha yüksektir (sırasıyla %2.88 ve %1.69). Bununla birlikte, Afrikalı ve Amerikalı kadınların, beyaz kadınlara kıyasla tanı anında tip 2 tümörlere ve ileri evreye sahip olma olasılığı daha yüksektir (Guleria ve ark., 2021; Makker ve ark., 2021).

2.6.5.3. Metabolik Sendrom

Metabolik sendrom için risk faktörleri arasında yüksek tansiyon, yüksek trigliseritler, düşük HDL kolesterol, merkezi obezite yani karın çevresinde aşırı yağlanma ve yüksek kan şekeri yer almaktadır. Tip 2 diyabet ve hipertansiyon, epidemiyolojik olarak artan endometrial kanser riski ile ilişkilendirilmiştir; ancak bu riskin eşzamanlı obezite ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Raglan ve ark., 2019; Setiawan, 2013; Makker ve ark., 2021).

2.6.5.4. Aşırı Östrojene Maruz Kalma

Uzun süre aşırı östrojene maruz kalma (östrojen replasman tedavisi, kronik anovülasyon veya tamoksifen tedavisi gibi) ve ≥ 55 yaş endometrial kanser vakaları için çok iyi bilinen risk faktörüdür (Makker ve ark., 2021). Östrojene maruz kalma hem eksojen hem de endojen formlardan gelebilir. Hormon replasman tedavisi östrojene eksojen maruz kalma iken endojen östrojene maruz kalma, kronik anovülasyon, östrojen üreten tümörler ve obezite ile ortaya çıkabilir (Dossus ve ark., 2010; Raglan ve ark., 2019; Setiawan, 2013; Makker ve ark., 2021).

Hormon Replasman Tedavisi

Menopoz semptomlarını kontrol etmek için ilaç yoluyla östrojenin yerine konması, eksojen östrojen maruziyetine örnekler arasında yer almaktadır. Karşılıksız östrojen replasmanı endometrial kanser gelişme riskini 20 kata kadar artırabilir. Bu risk, progestinlerin eş zamanlı kullanımıyla önemli ölçüde azalmaktadır (Guleria ve ark., 2021; Passarello ve ark., 2019; Makker ve ark., 2021).

2.6.5.5. Genetik yatkınlık

Bazı germ hattı mutasyonları EK riskini artırır ve bunlar arasında en güçlü ilişki Lynch sendromunda görülmektedir. Bu otozomal dominant sendrom, yanlış eşleşme onarımı (MMR) genlerinden birinde germ hattı mutasyonu ile karakterizedir. Germ hattı mutasyonlarının meydana geldiği MMR genleri ise; MLH1 (MutL homologue 1'i kodlayan), MSH2 (MutS homolog 2'yi kodlayan), MSH6 (MutS homolog 6'yı kodlayan) veya PMS2 (postmeiotic segregation

increased 2'yi kodlayan)' dir. EK'lerin yaklaşık %3'ü Lynch sendromuna bağlıdır. 44 ve 70 yaşına kadar tahmini yaşam boyu EK riski MLH1 mutasyonu olan kadınlar için ~%46-54, MSH2 mutasyonu olan kadınlar için %21-51, MSH6 mutasyonu olan kadınlar için %16-49 ve PMS2 mutasyonu olan kadınlar için %13-24'tür (Dossus ve ark., 2010; Raglan ve ark., 2019; Setiawan, 2013; Makker ve ark., 2021).

Endometrial kanser hastalarında sıklıkla görülen bir diğer mutasyon ise PTEN geninde meydana gelen mutasyonlardır. PTEN'deki somatik mutasyonlar sporadik EK'de yaygınken, germline PTEN mutasyonları nadirdir ve Cowden sendromu ile ilişkilidir. Cowden sendromu, diğer hastalıkların yanı sıra meme kanseri, tiroid kanseri ve EK riskinde artış ile karakterizedir. Cowden sendrom'lu kadınlarda yaşam boyu EK riski ise 28'e kadar yükselmiştir (Dossus ve ark., 2010; Raglan ve ark., 2019; Setiawan, 2013; Makker ve ark., 2021).

BRCA germline mutasyonları ile EK riski arasındaki ilişki, özellikle seröz karsinomlar için tartışmalı olmaya devam etmektedir. Küçük, retrospektif çalışmalarda BRCA1 mutasyonları ile uterus seröz kanseri arasında bir bağlantı olduğu öne sürülürken, diğer çalışmalarda böyle bir risk tespit edilmemiştir. Buna ek olarak, birçok çalışma yalnızca Aşkenaz Yahudi popülasyonunu içerdiğinden veya tamoksifen maruziyeti ile karıştırıldığından, sonuçların yorumlanması zordur. Yapılan başka bir çalışmada, histerektomi olmaksızın risk azaltıcı salpingo-ooforektomi uygulanan BRCA1-pozitif hastalarda seröz ve seröz benzeri EK riskinde artış saptanmıştır. BRCA1 mutasyonu olan 627 hastanın 4'ünde seröz veya seröz benzeri EK gelişmiştir (70 yaşına kadar bu karsinomların gelişme riski %2,6-4,7'dir). Ancak, bu veriler yalnızca dört vakaya dayandığından, BRCA mutasyonu taşıyıcılarında risk azaltıcı histerektominin kullanımına ilişkin kesin önerilerde bulunmak mümkün değildir. EK'lı 1.170 kadın üzerinde germline panel testi yapılan başka bir çalışmada ise, dört kadında BRCA1 mutasyonu (biri seröz karsinomlu ve biri karsinosarkomlu) ve üçünde BRCA2 mutasyonu (hepsi endometrioid histolojili) saptanmıştır. Bu bulgular, EK'lı seçilmemiş hastalardan oluşan bu kohortta germline BRCA mutasyonlarının düşük insidansına işaret etmekte ve BRCA mutasyonları olan hastalarda profilaktik histerektomileri haklı

çıkarmak için yeterli veri sağlamamaktadır (Dossus ve ark., 2010; Raglan ve ark., 2019; Setiawan, 2013; Makker ve ark., 2021).

2.6.5.6. Obezite

Obezite, endometriyumun malign karsinomuna dönüşen hiperplazi için en belirgin risk faktörüdür. Obezitenin, adipoz hücrelerde androjenlerin östrona aşırı periferik dönüşümü nedeniyle endometrial kanser riskine katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Bu ek östrojen, endometrial astarın artmış proliferasyonuna neden olur ve sıklıkla karsinogenezise yol açmaktadır. Ayrıca, obez, premenopozal kadınların endometrial kanser için başka bir risk faktörü olan kronik anovülasyondan muzdarip olma olasılığı daha yüksektir (Passarella ve ark., 2019).

2.6.6. Endometrial Kanser Prognostik Parametreler

2.6.6.1. Yaş

Endometrial kanserli genç hastalarda sıklıkla over disfonksiyonu, kronik anovülasyon, infertilite, obezite ve polikistik over sendromu gibi östrojen veya hormonla ilişkili bozukluklar görülmesinden dolayı yaşlı kadınlara göre daha iyi prognoza sahip olma eğilimi gösterirler. Yaş > 63 olan endometrial kanserli hastalarda genel sağkalım oranı daha düşüktür. Yaşlı hastalarda kötü prognoz, derece 3 tümörlerin veya elverişsiz histolojik alt tiplerin daha yüksek oranda görülmesiyle ilişkilidir (Uharček, 2008).

2.6.6.2. Parite

Obezite, doğum yapmama ve geç menopoz klasik olarak endometrial kanser ile ilişkilidir. Bir hasta nullipar ve obez ise ve 52 yaşında veya daha sonra menopoza girerse, endometrial kanser gelişme riskinin beş kat arttığı görülmektedir. Doğum yapmamış kadınlarda 5 yıllık sağkalımda %57'lik bir azalma bildirilmiştir, bu oran bir veya daha fazla doğum yapmış hastalarda %81'dir, ancak bu verileri destekleyen başka bir çalışma bulunmamaktadır (Uharček, 2008).

2.6.6.3. Histolojik Tip

Endometrial kanser temelde iki grup olacak şekilde tanımlanmıştır. İlk grup olan tip 1, yaklaşık %80'i iyi sınırlı olan ve iyi, farklılaşmış tümörlerle karakterizedir. Bu hastalar genellikle olumlu sonuçlara sahiptir; evre 1 hastalık için 5 yıllık sağkalım oranı %86'dır. Buna karşılık, ikinci grup yani tip 2 endometrial kanserler daha agresif tümörlerdir ve erken dönemde myometriyum ve vasküler boşluklara invazyon ve buna bağlı olarak ileri evre hastalık ve yüksek tümör dereceli nonendometrioid histoloji; ve yüksek mortalite oranı taşırlar (Uharček, 2008).

Skumöz diferansiyasyonlu adenokarsinom (endometrial kanserlerin yaklaşık %25'i) endometrioid karsinomun bir varyantıdır ve glandüler komponentin derecesi bu tümörler için prognostik bir göstergedir. Villoglandüler adenokarsinomlar, davranışta önemli bir fark olmaksızın endometrioid adenokarsinomun başka bir varyantını temsil eder. Müsinöz karsinomlar genellikle düşük dereceli ve minimal invazivdir ve iyi bir prognoza sahiptirler (Uharček, 2008).

2.6.6.4. Histolojik Derece

Endometrial kanserin histolojik olarak derecesi, prognoz, evre, lenf düğümü metastazı ve miyometrial invazivite ile güçlü bir şekilde ilişkilidir. Endometrioid olmayan karsinomlar yüksek dereceli tümörler olarak kabul edilir ve bu nedenle derecelendirilmeleri gerekmez. Derece, tedaviye yönelik klinik kararlarda uygulanan prognostik faktörlerden biridir. En sık kullanılan derecelendirme kriterleri FIGO ve Dünya Sağlık Örgütü'nün kriterleridir. 1. derece tümörlü hastalarda %94, 2. derece tümörlü hastalarda %84 ve 3. derece tümörlü hastalarda %72 beş yıllık sağkalım oranları bildirilmiştir (Uharček, 2008).

2.6.6.5. Myometrial İnvazyon

Myometrial invazyon, sonucun bağımsız bir belirleyicisidir ve derin myometrial invazyon kötü sağkalım oranı ile ilişkilidir (Uharček, 2008).

Klinik evre I endometrioid karsinomlu 400' den fazla hasta üzerinde yapılan bir çalışmada, tümör endometriyumla sınırlı olduğunda 5 yıllık sağkalım %94, tümör

miyometriyumun iç üçte birine yayıldığında %91, tümör miyometriyumun orta üçte birine yayıldığında %84'tür. Tümör miyometriyumun dış üçte birine yayıldığında ise 5 yıllık sağkalım %59 olarak bulunmuştur (Uharček, 2008).

2.6.6.6. Vasküler İnvazyon

Uterusun lenfatik veya vasküler boşluklarında metastaz varlığı, lenfovasküler boşluk tutulumu (LVSI), hastalığın nüksetmesi ve kötü sağkalım için önemli bir prognostik faktördür ve histolojik derece veya miyometriyal invazyon derinliğinden bağımsızdır. LVSI'nin endometrium kanserli hastalarda pelvik lenf nodu metastazları için de önemli bir prognostik faktör olduğu gösterilmiştir. LVSI varlığı, tüm FIGO dereceleri ve myometrial invazyon derinlikleri için LVSI olmayan kanserlere kıyasla pelvik lenf nodu metastazı oranını önemli ölçüde artırmaktadır (Uharček, 2008).

2.6.7. Endometrial Kanser Teşhis ve Tedavisi

Endometrial kanser şüphesi olan kadınlarda iki tetkik zorunludur: transvajinal ultrason taraması ve endometrial biyopsi. Transvajinal ultrason taraması endometrial kanser için doğru ve kesin bir tarama yöntemidir. Transvajinal ultrason ile endometrium kalınlığının hesaplanmasının transabdominal ultrasona göre daha kolay olduğu 339 hasta üzerinde yapılan retrospektif bir çalışmada ortaya konmuştur. Anormal endometrium kalınlaşmasını tanımlamak için 5 mm eşik değerini kullanan 35 çalışmanın meta-analizi, kanserli kadınların %96'sında endometrium kalınlığı 5 mm'den büyüktür; çalışmada negatif olasılık oranı 0,08 olarak bildirilmiştir. Transvajinal ultrason, karsinomatöz hastalığı olması muhtemel olmayan (endometrium kalınlığı <5 mm) vajinal kanaması olan postmenopozal kadınları belirlemede de oldukça güvenilir bir yöntemdir. Bu da gereksiz endometrial örneklemeden kaçınılabileceği anlamına gelir. Endometrial patoloji varlığında 4-5 mm' den az endometrial kalınlığın çok düşük ancak ihmal edilemeyecek bir malignite riski oluşturduğu sonucuna varılmış olsa da, 9031 hastadan elde edilen verilerin meta-analizi, bu durumun meme karsinomu nedeniyle düzenli HRT veya tamoksifen kullanan hastalar için geçerli olmadığı sonucuna varmıştır. Yakın zamanda yapılan bir meta-analiz, HRT kullanan hastalarda anormal transvajinal ultrason sonucunun özgüllüğünün %92'den %77'ye düştüğünü göstermiştir. Bu hastalar için üst endometrial kalınlık sınırı asemptomatikse 8 mm'dir, ancak hastada vajinal kanama

varsa ve endometrium kalınlığı 5 mm'den fazlaysa hastadan biyopsi örneği alınmalıdır (Amant ve ark., 2007; Braun ve Grumbo, 2016; Guleria ve ark., 2021).

Endometrial kanserin kesin tanısı histolojik olarak yapılmaktadır. Endometrial doku örneği ya jinekoloji polikliniğinde Pipelle küreti kullanılarak ya da genel anestezi altında histeroskopi ve dilatasyon ve küretaj ile elde edilebilir. 13 tanısal değerlendirmenin sistematik bir incelemesi, yeterli örnek elde edildiğinde Pipelle biyopsisinin genel olarak yüksek tanısal doğruluğa yol açtığını göstermiştir (test sonrası endometrial kanser olasılığı; pozitif bir test için %81.7 ve negatif bir test için %0.9). Bu bulgular, biyopsi sonucunun negatif olmasına rağmen semptomların devam ettiği anormal uterin kanama vakalarında ileri değerlendirmeyi teşvik etmektedir. Anormal uterin kanaması olan kadınlarda endometrial kanser ve hiperplazi tanısında histeroskopinin doğruluğu, 26.346 kadına ait verilerin sistematik olarak gözden geçirilmesiyle belirlenmiştir. Pozitif histeroskopi sonucu (olabilirlik oranı %60.9), test öncesi %3.9 olan kanser olasılığını %71.8'e yükseltirken, negatif histeroskopi sonucu (olabilirlik oranı %0.15) kanser olasılığını %0.6'ya düşürmüştür. İlginç bir şekilde, postmenopozal kadınlar arasında ve ayakta tedavi ortamında endometrial kanser için tanısal doğruluk daha yüksek olma eğilimindedir (Amant ve ark., 2007; Braun ve Grumbo, 2016; Guleria ve ark., 2021).

Kılavuzlarda belirtildiği üzere, endometriyum kanseri teyit edilen hastaların derhal uzmanlaşmış bir jinekolojik onkoloji merkezine sevk edilmesi gerekmektedir. Bu merkezlerde, bilgisayarlı tomografi ve manyetik rezonans görüntüleme (MRG) gibi ileri görüntüleme yöntemleri uygulanarak hastalığın boyutu değerlendirilir ve evrelemeye göre en uygun yönetim planlanır. Uzman bir ekip tedavi türünü (cerrahi veya cerrahi olmayan yaklaşım) seçecek ve görüntüleme sonuçlarına dayanarak adjuvan tedavinin uygunluğuna karar verecektir. MRG, myometrial invazyonun derinliğini, pelvik lenf nodu büyümesini ve servikal invazyon varlığını değerlendirebilir. Endometrial kanserin evrelendirilmesinde bilgisayarlı tomografi, ultrason ve MRG'nin kullanılılığını karşılaştıran 47 çalışmanın meta-analizi, kontrastlı dinamik MRG'nin tümör metastazı riski yüksek hastaları ve lokal lenfadenopati varlığını belirlemede en güvenilir yöntem olduğunu ortaya koymuştur. Bilgisayarlı tomografi esas olarak pelvis dışındaki hastalığı tespit etmek için kullanılır (Amant ve ark., 2007; Braun ve Grumbo, 2016; Guleria ve ark., 2021).

2.6.7.1. FIGO evre I Tedavi

Hastaların yaklaşık %80'i evre I hastalıkla başvurur ve cerrahi olarak total abdominal histerektomi ve bilateral salpingo-ooforektomi ile tedavi edilebilir. Para-aortik ve pelvik lenf nodlarının palpasyonu ve görüntülenmesi tümör yayılımını değerlendirebilir. Jinekolojik onkoloji grubu tarafından yapılan bir çalışmada 621 hastanın histopatolojisi incelenmiş ve klinik olarak endometrial kanseri rahimle sınırlı olan kadınların yaklaşık %10' unda lenf nodu metastazı bulunmuştur (Amant ve ark., 2007; Braun ve Grumbo, 2016; Guleria ve ark., 2021).

Birleşik Krallık'ta, evre I hastalığı olan kadınlarda total abdominal histerektomi ve bilateral salpingo-ooforektomi ile birlikte pelvik lenfadenektomi rutin olarak uygulanmamaktadır. Bu durumu, iki randomize kontrollü çalışmadan elde edilen verileri bir araya getiren ve evre I hastalığı olan kadınlarda lenfadenektominin değerini daha derinlemesine inceleyen Cochrane Collaboration incelemesi tarafından desteklenmektedir. Lenfadenektomi yapılmaması sonucunda sağkalım faydası veya hastalığın nüksetme riskinde azalma olduğunu destekleyen bir kanıt bulunamamıştır (Amant ve ark., 2007; Braun ve Grumbo, 2016; Guleria ve ark., 2021). Ancak Amerika Birleşik Devletleri'nde bunun tam tersi geçerlidir ve pelvik lenfadenektomi rutin olarak total abdominal histerektomi ve bilateral salpingo-ooforektomi ile birlikte uygulanmaktadır. 1988-2001 yılları arasından yapılan, 39.396 hastayı kapsayan geniş bir retrospektif gözlemsel çalışmada lenfadenektomi yapılan hastalarla yapılmayanlar karşılaştırılmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen veriler lenfadenektominin evre I derece 3 hastalık ve daha ileri endometrioid uterus kanserleri için tavsiye edilebilir olduğunu göstermektedir (Amant ve ark., 2007; Braun ve Grumbo, 2016; Guleria ve ark., 2021).

Birleşik Krallık yaklaşımını iki randomize kontrollü çalışmadan elde edilen ancak toplamda sadece 1945 hastayı kapsayan verilere dayandırırken, ABD'nin argümanı daha zayıf bir tasarıma sahip olan ancak çok daha fazla sayıda hastanın sonuçlarını içeren bir çalışmadan elde edilen bulgulara dayanmaktadır. Cochrane Collaboration derlemesinin sonuçlarına göre, lenfadenektomi önemli ölçüde kısa ve uzun vadeli morbidite ile ilişkilidir. İntraoperatif süreyi uzatır, dolayısıyla derin venöz tromboz ve pulmoner emboli riskini artırır ve lenfödem ve pelvik lenfokist oluşumu

riskini artırır. Bununla birlikte, faydalı prognostik bilgiler sağlar ve lenf nodu örneklemesinin varsa faydalarını değerlendirmek için daha fazla randomize çalışmaya ihtiyaç vardır (Amant ve ark., 2007; Braun ve Grumbo, 2016; Guleria ve ark., 2021).

2.6.7.2. FIGO evre II-IV Tedavi

Evre II hastalığın tedavisi genişletilmiş veya modifiye radikal histerektomi, bilateralalpingo-oferektomi ve lenf nodu diseksiyonu ile yönetilir. Maksimal cerrahi sitoredüksiyon, sağkalım avantajı sağladığı için cerrahi için uygun aday olan hastalara önerilmektedir. ESMO (Avrupa Tıbbi Onkoloji Derneği)' ya göre, yalnızca pozitif peritoneal sitoloji temelinde evre III hastalığı olan hastalar, diğer klinikopatolojik verilere dayanarak evre I veya II hastalığı olan hastalar gibi tedavi edilir, çünkü pozitif sitolojinin bağımsız bir prognostik gösterge olduğu bulunmamıştır (Amant ve ark., 2007; Braun ve Grumbo, 2016; Guleria ve ark., 2021).

2.6.7.3. Endometrial Kanserde Cerrahi Tedavi

Endometrial kanserin cerrahi tedavisi total abdominal histerektomi, bilateralalpingo ooferektomi ve periton yıkamalarını içermektedir. Bazı durumlarda pelvik ve para-aortik lenfadenektomi ve omentektomi yapılabilir. Cerrahi açık, laparotomi (transvers veya orta hat insizyonu ile giriş) veya laparoskopik (normal veya robot yardımlı) olabilir. İki kapsamlı meta-analiz ve bir nicel inceleme, bu iki cerrahi seçenek arasında nüks ve sağkalım açısından anlamlı bir fark olmadığını göstermiştir (Amant ve ark., 2007; Braun ve Grumbo, 2016; Guleria ve ark., 2021).

2.6.7.4. Endometrial Kanserde Radyoterapi ve Kemoterapi

Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen verilere göre genel fikir birliği, radyoterapinin erken evre düşük riskli hastalık için etkin bir rolü olmadığı yönündedir. Geleneksel olarak, eksternal pelvik radyoterapi, genellikle vajinal brakiterapi ile birlikte, erken evre yüksek riskli hastalığı olan hastalar için tercih edilen adjuvan tedavi olmuştur. ASTEC/EN tarafından yapılan 5 çalışma grubu tarafından yapılan ve GOG (392 hasta) ve PORTEC (714 hasta) çalışmaları olmak üzere iki randomize kontrollü çalışmadan elde edilen verileri analiz eden bir meta-analiz, adjuvan eksternal ışın radyoterapisi alan erken endometrium kanserli (FIGO evre IA-C, herhangi bir

derece ve histolojik alt tip) hastalar için genel, hastalığa özgü ve hastalığa özgü nüksüz sağkalım açısından hiçbir fayda sağlamadığını bildirmiştir. Bu bulgular, evre IC ve evre 3 hastalık gibi birden fazla yüksek risk özelliği olan hastalarda radyoterapi kullanımını destekleyen meta-analizlerden ve kantitatif analizlerden elde edilen sonuçlara dayanan önceki eğilimleri kesin olarak çürütmektedir (Amant ve ark., 2007; Braun ve Grumbo, 2016; Guleria ve ark., 2021).

Evre I hastalıkta kemoterapinin etkisi henüz net değildir. Evre I veya II hastalığı olan hastalarla yapılan farklı çalışmalardan (prospektif, retrospektif ve randomize kontrollü çalışma) elde edilen son veriler, kemoterapinin yüksek dereceli hastalık, lenfovasküler alan tutulumu veya %50'den fazla miyometriyal invazyon gibi yüksek risk özellikleri olanlarda sağkalımı artırabileceğini düşündürmektedir. Erken evre yüksek riskli hastalık için radyoterapi ve kemoterapi arasında fark olmadığı 345 hastayı kapsayan randomize kontrollü bir çalışmada bildirilmiştir, ancak çalışma hastalarının sadece üçte birinde erken evre hastalık olduğu için bu tartışmalı bir bulgudur (Amant ve ark., 2007; Braun ve Grumbo, 2016; Guleria ve ark., 2021).

2.7. Betülinik Asit

Betülinik asit, molekül ağırlığı 456.3603 olan $C_{30}H_{48}O_3$ moleküler formülüne sahip triterpen grubunun bir üyesidir (Cichewicz ve Samir, 2004).

Lupan tipi triterpen olan betülinik asit, bitkiler âleminde yaygın olarak bulunmaktadır. Doğada hem betülinik asidin hem de betulinin en yaygın olarak bildirilen kaynaklarından biri beyaz huş ağacıdır. Huş ağacı dışında bilinen diğer betülinik asit kaynakları arasında *Ziziphus* spp. (Rhamnaceae), *Syzygium* spp. (Myrtaceae), *Diospyros* spp. (Ebenaceae) ve *Paeonia* spp. (Paeoniaceae) yer almaktadır (Cichewicz ve Samir, 2004).

2.7.1. Betülinik Asit İzolasyonu

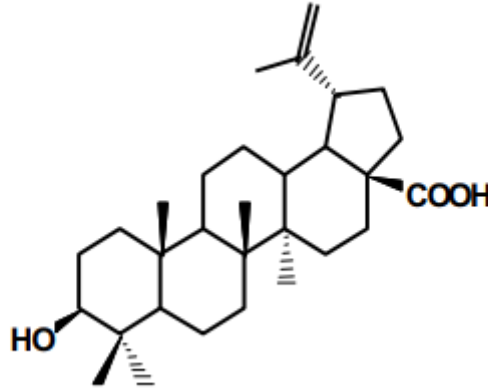
Betülinik asit (BA) ve diğer ilgili triterpenoidlerin elde edilmesi için çok sayıda ekstraksiyon ve izolasyon şeması kullanılmaktadır. Genel olarak ekstraksiyon için, kuru bitki materyali $CHCl_3$ (aglikonlar için), MeOH (hem aglikonlar hem de glikosile

türevler için) veya H₂O ile ekstrakte edilir. Polar olmayan maddeleri uzaklaştırmak için ekstraksiyondan önce bitki hekzan ile yağdan arındırılmalıdır. Elde edilen ekstraktlar kurutulabilir ve diğer çözücülerle daha fazla ekstrakte edilebilir veya doğrudan kolon kromatografisine tabi tutulabilir (Cichewicz ve Samir, 2004).

Diğer BA kaynaklarına kıyasla bitki kabuğunda düşük miktarda BA içeriği nedeniyle, BA'nın bitkilerden ekstraksiyon oranı sadece %2'dir (Jiang ve ark., 2021).

2.7.2. Betülinik Asit Çözücülleri

BA, metanol, etanol, kloroform ve eter gibi organik alkollerde sınırlı çözünlük gösteren beyaz kristalli yapıda bir katıdır (Şekil 2.4). BA; H₂O, petrol eteri, DMF, DMSO ve benzende düşük çözünlüğe sahiptir. BA piridin ve asetik asitte yüksek oranda çözünür (Cichewicz ve Samir, 2004).



Şekil 2.6. Betülinik asit kimyasal yapısı (Fulda 2008).

2.7.3. Betülinik Asit Kanseri İlişkisi

BA tümör büyümesini seçici olarak inhibe edebilmesi ve hücre apoptozunu indükleyebilmesi gibi özellikleriyle son yıllarda dikkat çekmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda BA'nın kolorektal kanser hücrelerinde otofajinin bir düzenleme faktörü olan AKT-mTOR'un fosforilasyonunu inhibe ettiği ve kolorektal kanser hücre ölümünü indüklediği gösterilmiştir. Safra kesesi kanseri NOZ hücre hattına BA eklendiğinde, stearil CoA desatürasyon enzimi 1'in mRNA ve protein seviyelerinin

doza bağılı bir şekilde aşağı regüle edildiği gösterilmiştir. Araştırmacılar HeLa hücrelerini taramak için ubikitin dizileri kullanmış ve BA'nın 49 farklı proteinin dokuzunda ubikitinasyon seviyelerini azaltabildiğini ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), glukoz taşıyıcı 1 ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü gibi hipoksi ile indüklenebilir faktör-1'in hedef genlerinin ekspresyonunu baskıladığını bulmuşlardır (Fulda, 2008; Jiang ve ark., 2021; Mullauer ve ark., 2011).

Zhang ve ark. (2016) BA'nın kanser tedavisinde umut verici bir antitümör reaktifi olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca normal hücelere ve dokulara karşı sitotoksikite olmaksızın seçici hücre ölümüne aracılık ettiğini göstermişlerdir.

Mullauer ve ark. (2011) BA'yı denek hayvanına lipozomlar içinde vermişler ve BA'nın sistemik toksisiteye neden olmadan insan akciğer ve kolon kanserlerinin büyümesini azalttığını göstermişlerdir.

Yapılan bir araştırmaya göre, aşırı östrojen seviyesi meme kanserinin birincil etiyolojisidir ve östrojen sinyali meme kanseri hücrelerinin büyümesi için önemlidir. ER (östrojen resöptörü), meme kanserinin erken evrelerinde sıklıkla aşırı eksprese edilir. Luo ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada, BA'nın ER-pozitif meme kanseri MCF-7 hücre hattında östrojen sinyalini bloke etmek için östrojen reseptörünü inhibe ettiğini göstermişlerdir.

2.7.4. Betülinik Asit'in Apoptoz Üzerindeki Etkileri

Mitokondri, hücre proliferasyonu ve apoptoz ile yakından ilişkili olan önemli bir hücre içi reaktif oksijen türü (ROS) kaynağıdır. Aşırı ROS üretimi oksidatif strese yol açarak DNA'ya, proteinlere veya lipitlere zarar verebilir ve apoptotik veya nekrotik hücre ölümüne yol açabilir. Güncel çalışmalar ROS'un kanser, nörodejeneratif hastalıklar ve inflamasyon gibi birçok hastalıkla ilişkili olduğunu göstermiştir. BA, ROS üretir ve mitokondriyal membran potansiyelini azaltır; mitokondriyal membranın mitokondriyal geçirgenlik geçiş gözenağı, ROS'un apoptoz sinyal iletiminde önemli rol oynar. Mitokondriyal membran depolarizasyonu sonunda apoptotik sinyal yolunu aktive edebilir (Jiang ve ark. 2021).

2.8. Apoptoz

Apoptoz, embriyogenez ve yetişkin doku homeostazı gibi fizyolojik süreçlerde kilit bir rol üstlenen, aynı zamanda tümör baskılayıcı bir mekanizma rolüyle de tanınan, sıkı bir şekilde düzenlenmiş ve evrimsel olarak korunmuş bir hücre ölüm programını temsil etmektedir (Kaczanowski, 2016; Peña-Blanco ve García-Sáez, 2018).

Apoptoz mekanizması hücrede membran kanaması, hücre boyutunda azalma, nükleer parçalanma, kromatin yoğunlaşması, hücre yüzeyinde fosfatidilserin açığa çıkması ve apoptotik cisim oluşumu gibi morfolojik değişikliklere neden olmaktadır. Apoptozun başlamasından hücrenin tamamen yok olmasına kadar geçen süre saatler (16-24 saat) hatta günler olabilir. İndükleme mekanizmasındaki uyarının konsantrasyonundaki ve hücre tipindeki farklılıklar apoptotik zaman dilimini kısaltabilir (Kaczanowski, 2016; Peña-Blanco ve García-Sáez, 2018).

Apoptoz hem fizyolojik hem de patojen kaynaklı çeşitli uyarılar ve koşullar tarafından indüklense bile genel olarak ya intrinsik ya da ekstrinsik bir yolla başlatılır (Kaczanowski, 2016; Peña-Blanco ve García-Sáez, 2018).

2.8.1 Apoptozda İntrensik Yol

Apoptozun mitokondriyal yolu olarak da bilinen intrinsik yolda, hücre büyüme faktörü veya besin yoksunluğu, DNA hasarı ve endoplazmik retikulum stresi gibi hücre içi stres faktörlerini algılar ve mitokondriyal dış membran permeabilizasyonunu (MOMP) içeren bir süreçle kendini öldürür. Bu süreç omurgalılarda Bcl-2 protein ailesi tarafından kontrol edilir ve düzenlenir (Kaczanowski, 2016; Peña-Blanco ve García-Sáez, 2018).

MOMP, kaspaz kaskadını aktive etmek amacıyla sitokrom ve SMAC/DIABLO gibi proapoptotik faktörlerin mitokondriden sitozole salınmasına izin verir. MOMP genellikle apoptotik yolda geri dönüşü olmayan nokta olarak kabul edilmektedir (Biermann ve ark., 2016; Peña-Blanco ve García-Sáez, 2018). MOMP'den sonra, kaspaz aktivasyonu genellikle dakikalar içinde gerçekleşir ve böylece hücre ölümüne

yol açar (Biermann ve ark., 2016; Peña-Blanco ve García-Sáez, 2018). Mitokondriden sitozole salınan sitokrom C apoptotik proteaz aktive edici faktör 1'in (APAF-1) heptamerik bir forma oligomerizasyonunu teşvik eder. APAF-1, sitokrom c, APAF-1 ve prokaspaz-9'dan oluşan büyük bir kompleks olan apoptozomu oluşturmak için prokaspaz-9'un CARD'ı ile etkileşime giren bir kaspaz güçlendirme alanı (CARD) içerir. Apoptozom içinde, apoptoz başlatıcısı pro-kaspaz-9, kaspaz-9' a aktive olur ve apoptotik yürütücü işlevlerini serbest bırakarak prokaspaz-3 ve pro-kaspaz-7' yi keser. Sonuç olarak apoptotik hücre ölümüne yol açan kaspaz-3 ve kaspaz-7 aktive olur (Kaczanowski, 2016; Peña-Blanco ve García-Sáez, 2018).

2.8.2. Apoptozda Ekstrinsik Yol

Apoptozu başlatan ekstrinsik sinyal yolları, transmembran reseptör aracılı etkileşimleri içermektedir. Bunlar, tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör gen süper ailesinin üyeleri olan ölüm reseptörlerini içerir. TNF reseptör ailesinin üyeleri benzer sitin bakımından zengin hücre dışı alanları paylaşır ve "ölüm alanı" olarak adlandırılan yaklaşık 80 amino asitlik bir sitoplazmik alana sahiptir. Bu ölüm alanı, ölüm sinyalinin hücre yüzeyinden hücre içi sinyal yollarına iletilmesinde kritik bir rol oynar. Bugüne kadar en iyi karakterize edilen ligandlar ve bunlara karşılık gelen ölüm reseptörleri FasL/FasR, TNF- α /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 ve Apo2L/DR5'tir (Elmore, 2007).

Apoptozun ekstrinsik fazını tanımlayan olaylar dizisi en iyi FasL/FasR ve TNF- α /TNFR1 modelleri ile karakterize edilir. Bu modellerde reseptörlerin kümelenmesi ve homolog trimerik ligand ile bağlanması söz konusudur. Fas ligandının Fas reseptörüne bağlanması adaptör protein FADD' nin bağlanmasıyla sonuçlanır ve TNF ligandının TNF reseptörüne bağlanması adaptör protein TRADD'nin bağlanmasına neden olur. Sonuç olarak FADD ve RIP bağlanır. FADD daha sonra ölüm efektör alanının dimerizasyonu yoluyla prokaspaz-8 ile birleşir. Bu noktada, prokaspaz-8'in oto-katalitik aktivasyonu ile sonuçlanan bir ölüm indükleyici sinyal kompleksi (DISC) oluşur. Kaspaz-8 aktive olduğunda, apoptoz tetiklenir (Elmore, 2007).

BA'nın endometrial kanser hücrelerinin apoptozu üzerine etkilerini konu alan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmanın temel amaçlarından biri de BA'nın Ishikawa hücrelerinde apoptoz üzerine etkilerini araştırmaktır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü

Bu çalışmada, Ishikawa hücre hattı (ATCC, ABD) kullanılmıştır. Hücreler penisilin (20 units/mL), streptomisin (20µg/mL), 2 mM L-glutamin ve %10 fetal sıgır serumu (FBS) içeren DMEMF12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 75 cm²'lik flask kültür ortamına ekilerek %95 O₂ ve %5 CO₂ basıncı altında 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. BA ticari olarak elde edilmiştir (Sigma-Aldrich, ABD) ve DMSO (Dimetil Sülfoksit) içerisinde çözülmüştür. Endometrial kanser hücreleri; 25 µM, 50 µM, 75 µM, 100 µM BA ile 24, 48 ve 72. saatler için doz ve zaman-bağımlı olarak inkübe edilmiştir.

3.1.1. Hücre Besiyerinin Hazırlanması

Tam besiyeri hazırlanmadan önce 37 °C'ye ayarlanan su banyosunda; glutamin içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), fetal sıgır serumu (FBS) ve Penisilin/Streptomisin uygun sıcaklığa gelene kadar bekletilmiştir. Şişeler flow kabin içerisine alınmadan önce %70'lik etanol ile sterilize edilmiş ve kabine konulmuştur. 500 ml DMEM içerisinden 50 ml ayrı bir falkona alınmış daha sonra kalan 450 ml DMEM içerisine inaktive edilmiş %10 FBS ve %1 Penisilin/Streptomisin eklenerek besiyeri homojen hale getirilmiştir. Hazırlanan tam besiyeri +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.1.2. FBS İnaktivasyonu

-20 °C'de muhafaza edilen serumların kullanılmadan önce inaktive edilmesi ve 50 ml 'lik falkonlara aliquotlanması gerekmektedir. Serum inaktivasyonu için -20 °C'de muhafaza edilen serumlar bir gece önceden +4 °C'ye alınarak buzunun çözülmesi sağlanmıştır. Ertesi gün su banyosu 56-57 °C'ye ayarlanmıştır. Su banyosu uygun sıcaklığa geldiğinde buzu eriyen FBS su banyosuna konulmuş ve 30 dakika bekletilerek serum inaktif hale getirilmiştir. İnaktif hale gelen serumlar daha sonraki kullanılacak miktarlara göre aliquotlanmıştır. Uzun süreli kullanımlar için -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.1.3. Dondurulmuş Hücrelerin Çözdürülmesi ve Ekimi

Uzun süre muhafaza edilmek için dondurulan ve donmuş halde bulunan hücre hatları dondurma materyali içerisinde -80 veya -196 °C'deki ortamlarda uzun süre saklanabilirler. Hücre hatlarını kullanmadan önce çözündürme işlemi yapılmalıdır. Cryo tüp içerisinde dondurulmuş olarak bulunan hücre hatları 37 °C'ye ayarlanan su banyosu kullanılarak hızlıca çözündürülmüştür. Cryo tüp %70'lik etanol ile silinerek sterilize edilmiş ve daha sonra kabine alınmıştır. Cryo tüp içeriği mikropipet kullanılarak 15 ml falkon tüpüne alınmış ve üzerine 4 ml besiyeri eklenmiştir. Hücreleri dondurmada kriyoprotektan ajan olarak kullanılan dimetilsülfoksitin (DMSO) uzaklaştırılması amacıyla 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılarak hücreler çöktürülmüştür. Çöktürme işleminin ardından üst kısımda kalan süpernatant uzaklaştırılmıştır. Kalan pelletin üzerine 2 ml besiyeri eklenerek hücrelerin besiyeri ile homojen bir şekilde dağılması için pipetaj yapılmıştır. İçerisinde 3-4 ml besiyeri bulunan 25 cm² flasklara serolojik pipet yardımıyla hücreler bırakılmıştır. Flasklar hafifçe sallanarak besiyerinin flasklara eşit şekilde dağılması sağlanmıştır. Flasklardaki toplam hacim 25 cm² flasklar için 5-7 ml, 75 cm² flasklar için ise 12-14 ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Flaskların üzerine hücre hattının adı, hücre ekim tarihi ve pasaj numarası yazılarak etiketleme işlemi yapılmıştır. İnkübatöre kaldırılmadan önce flasklardaki hücre yoğunluğu stereo mikroskopla incelendikten sonra inkübatöre kaldırılmıştır. Hücrelerin canlılığı, morfolojik görüntüleri ve çoğalma hızları her gün düzenli olarak kontrol edilmiştir.

3.1.4. Hücrelerin Pasajlanması

Pasajlama için kullanılacak olan besiyeri ve Tripsin-EDTA 37 °C'ye ayarlanan su banyosunda uygun sıcaklığa gelene kadar ısıtılmış ve %70'lik etanol ile silinerek sterilize edildikten sonra kabin içerisine alınmıştır. Hücrelerin büyümesi, morfolojik görüntüleri ve canlılıkları düzenli olarak stereo mikroskop altında takip edilmiştir. Flasklar içindeki hücreler %80-90 oranında yoğunluğa ulaştıklarında hücreler pasajlanmıştır. Kabin içerisinde yapılan işlemlerde flask dik konuma getirilmiş ve flaskların tabanına serolojik pipet değdirilmeden alt köşesinden serolojik pipet ile besiyeri yavaşça aspire edilmiştir. Flask yine dik konumdayken yeni ve steril serolojik pipet ile flasklara 4 ml PBS eklenmiştir. Flasklar yatay konuma getirilmiş, hafif

hareketlerle sallanarak flask yüzeyinin yıkanması sağlanmış ve daha sonra serolojik pipet ile PBS geri çekilmiştir. Yeni ve steril bir serolojik pipet kullanılarak hücreler üzerine 2 ml Tripsin-EDTA eklenmiştir. Flaskların kapakları kapatılıp 5 dakika inkübatörde bekletilmiştir. İnkübasyon süresi dolunca inkübatörden alınan flasklar içindeki hücrelerin durumu mikroskop altında incelenmiştir. Flask içindeki hücrelerin serbestleşip serbestleşmediği kontrol edilerek tekrar kabin içerisine alınmıştır. Tripsin-EDTA'nın etkisini inhibe etmek amacıyla 4-6 ml besiyeri (eklenen Tripsin-EDTA hacminin yaklaşık 2 katı kadar) eklenmiş ve flask içeriği serolojik pipet yardımıyla 15 ml'lik falkon tüpüne aktarılmıştır. Denge durumu gözetilerek santrifüje yerleştirilen falkon tüpleri 1300-1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant pipet ile dikkatlice alınarak, kalan pelet üzerine 2-4 ml taze besiyeri eklenmiştir. Hücrelerin homojen bir şekilde dağılması için 1000 ml'lik otomatik pipet ile pipetaj yapılmıştır. Pipetaj sonrasında herbir flaska belirli oranda hücre ekimi yapılması için hücre sayımı yapılmış ve belirlenen hücre yoğunluğuna göre hücre süspansiyonu belirli oranda ve eşit bir şekilde yeni flasklara aktarılmıştır. Flaskların üzerine yapılan etiketlemede hücre hattının adı, hücre pasaj tarihi ve pasaj numarası yazılmıştır. Pasajlama sonrasında flask içerisindeki hücreler mikroskop altında tekrar kontrol edilmiş ve hücreler CO₂ inkübatöre yerleştirilmiştir.

3.1.5. Hücre Hatlarının Dondurularak Stoklanması

Hücreler ekildikten sonra morfolojilerini toparlamaları için yaklaşık bir hafta bekletilmiş ve daha sonra hücre hatları stoklanmıştır. Hücreleri dondurmak için tam besiyeri içerisinde %10 DMSO taze olarak hazırlanmıştır. Flasklara tutunarak büyüyen hücreler 1-2 ml tripsin enzimi kullanılarak kaldırılmıştır. Flasklara daha sonra FBS içeren besiyeri konulmuş ve flask içeriği steril ve yeni serolojik pipet ile toplanarak 15 ml'lik falkon tüplere alınmıştır. Flask içeriği 1500 rpm' de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüjlenen falkon tüp içerisindeki süpernatant kısmı serolojik pipet ile dikkatli bir şekilde peletten uzaklaştırılmış ve kalan pelet üzerine 9:1 oranında besiyeri ve DMSO içeren karışım eklenmiştir. Hücre süspansiyonu pipetaj yapılarak homojen hale getirilmiş ve her bir cryo tüpe yaklaşık 2 ml konulmuştur. Cryo tüp üzerine hücre adı, dondurma tarihi ve son pasaj numarası yazılarak etiketleme yapılmıştır. Hazırlanan cryo tüp içerisindeki hücreler -80 °C'de dondurucuya kaldırılmıştır.

3.1.6. Hücre Sayımı

Hücreler kültür flasklarında tripsinizasyon işlemi ile kaldırılmış ve 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı atılmış ve hücrelerin üzerine 1-5 ml tam besiyeri eklenerek mikropipet ile homejen hale getirilmiştir. Steril bir ependorf içerisine 100 µl hücre süspansiyonundan, 100 µl tripan mavisini boyası eklenerek mikropipet ile homojen haline getirilmiştir. Boya-hücre homejanatından mikropipet ile 10 µl çekilmiş ve hücre sayım lamına yüklenmiştir. Mikroskop altında hücre sayımı yapılmıştır. Hücre sayımı için 4 farklı bölge içindeki canlı hücreler sayılmıştır. Karelerin üzerinde bulunan ve tamamen mavi ile boyanan hücreler sayıma dâhil edilmemiştir. Karelerin ortasında bulunan ve mavi ile boyanmayan yani boya almamış hücreler sayılmıştır. Dört farklı alandan sayılan hücreler toplanıp 4'e bölünerek ortalama hücre sayısı hesaplanmıştır. Hücre konsantrasyonu aşağıdaki formüle öre hesaplanmıştır.

$$\text{Hücre Konsantrasyonu} = \text{Ortalama Hücre Sayısı} \times \text{Dilüsyon Faktörü} \times 10^4 / \text{ml}$$

3.2. CCK8 Test

BA'nın Ishikawa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini belirlemek, zamana ve doza bağımlı olarak hücre canlılığını nasıl etkilediğini öğrenmek için kalorimetrik bir yöntem olan CCK-8 (Cell Counting Kit-8) kiti kullanılmıştır. CCK8 (Abbkine, Çin) kiti ticari olarak elde edilmiş ve deneyler ilgili firmanın önerdiği protokole göre gerçekleştirilmiştir.

Deney aşamasında, Ishikawa hücreleri 96 kuyucuklu plakalara her bir kuyucuğa 100 µL'lik bir hacimde 1×10^4 yoğunlukta ve 3 tekrarlı olacak şekilde ekilmiştir. Hücreler plakaların tabanına yapıştıktan sonra kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırılmıştır. Kuyucuklara tam besiyeri eklenerek kontrol grubu, 25 µM, 50 µM, 75 µM, 100 µM BA ile doz grupları oluşturulmuştur. 24, 48 ve 72 saat olmak üzere hücreler inkübasyona bırakılmıştır. Her bir inkübasyon süresi sonunda karanlık ortamda kuyucuklar içerisindeki sıvı kısım uzaklaştırılmadan her bir kuyucuğa 10 µl CCK8 solüsyonu eklenmiştir. Plakalar, 4 saat inkübasyona bırakılmış ve mikroplaka

okuyucuda 450 nm'de okutulmuştur. Elde edilen sonuçlar ile yüzde ölüm ve IC₅₀ değeri hesaplanmıştır.

% Hücre Canlılığı = Doz grubu optik dansite değeri/Kontrol optik dansite değeri X 100

3.3. Western blot

BA'nın Ishikawa hücrelerinde mTOR/PI3K/AKT sinyal yolağı üzerine etkileri protein düzeyinde western blot ile değerlendirildi.

3.3.1. Total Protein İzolasyonu

Total protein hesabı yapmak için hücreler 75 cm²'lik kültür flasklarına ekilmiştir. Hücreler %80 yoğunluğa ulaştıklarında kontrol ve doz grubu oluşturulmuştur. Kontrol grubu tam besiyeri ile doz grubu ise BA (IC₅₀ değeri) eklenerek oluşturulmuştur. Hücreler 48 saat boyunca %95 O₂ ve %5 CO₂ basıncı altında 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon süresi bitiminde hücreler Tripsin-EDTA ile tripsinizasyon yapılarak 15 ml'lik falkon tüplere alınmıştır. 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Dikkatli bir şekilde süpernatant atılmıştır. Pellet üzerine 5-7 ml PBS eklenerek dikkatli bir şekilde pipetaj yapılmıştır. 1500 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Tekrardan dikkatli bir şekilde süpernatant kısmı atılmış ve pellet üzerine 5-7 ml PBS eklenerek 1500 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiştir.

Son santrifüj işleminden sonra cihazın soğuması için cihaz boşken 1400 rpm'de +4 °C 'de 15 dakikaya ayarlanıp cihaz çalıştırılmıştır.

Kontrol ve doz grubu için her bir falkona 500 µl RIPA eklenecek şekilde RIPA solüsyonu tripsinizasyon öncesi hazırlanmış ve +4 °C 'de bekletilmiştir. Hazırlanan RIPA solüsyonu her 500 µl RIPA için 445 µl RIPA buffer (ABT, Türkiye), 50 µl proteaz ve 5 µl fosfataz eklenerek hazırlanmıştır. PBS ile santrifüj edilen hücrelerin üzerinden süpernatant kısmı atılmış ve falkonlar buz içerisine yerleştirilerek her bir falkona 500 µl RIPA eklenmiştir. 30 dakika boyunca her 10 dakikada pipetaj işlemi

yapılmıştır. Süre bitiminde falkon tüpler 1400 rpm’de +4 °C ‘de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı pellete değmeyecek şekilde dikkatlice toplanmış ve steril ependorflara aktarılmıştır. Proteinler kullanılana kadar -80 °C ‘de saklanmıştır.

Kontrol ve doz gruplarının protein konstrasyonlarını ölçmek için ‘BCA Protein Assay Kit’ (ABP Biosciences, ABD) kullanılmış, deneyler ilgili firmanın önerdiği protokole göre gerçekleştirilmiştir. Protokole göre 96 kuyucuklu plakalara 20 µl BCA standartları ve kontrol ve doz gruplarından elde edilen protein örnekleri 3 tekrarlı olacak şekilde kuyucuklara konulmuştur. Her bir kuyucuğun üstüne BCA Reaktif A ve BCA Reaktif B solüsyonları 50:1 oranında olacak şekilde kullanılmadan hemen önce taze olarak hazırlanarak 200 µl her kuyucuğun üzerine eklenmiştir. Plaka karanlık ortamda ve 37 °C ‘de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi bitiminde plaka mikropilaya okuyucuda 562 nm’de okutulmuştur.

3.3.2. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ve Western Blot Analizi

Jel elektroforezi, protein analizi için kullanılan önemli bir metottur. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE), %12 ‘lik ve %4’lük jeller kullanılarak yapılmıştır.

Jeller dökülmeden önce ilk olarak jel aparatı hazırlanmıştır. Camlardan düz cam arka tarafa gelecek şekilde, diğer cam ise ön tarafa gelecek şekilde üst üste getirilmiş ve jel dökme aparatına yerleştirilmiştir. Aparat sıkıştırılmıştır. Camlar aparata takıldıktan sonra camların arasından sızıntı olup olmadığını kontrol etmek için serolojik pipet ile camların arasına bir miktar su konulmuş ve bir süre beklenilmiştir. Eğer camlardan sızdırma olmuyorsa cihazın özel tarağı camlar arasına yerleştirilmiş ve %4’lük jelin döküleceği kısım kalem yardımıyla işaretle işlemi yapılmıştır.

İki ayrı falkon tüp alınarak tablo 3.1’de verilen protokol izlenerek %12 ve %4’lük jeller hazırlanmıştır.

Tablo 3.1. Western blot %12 ve %4'lük jel protokolü.

16 ml %12 Seperating Jel	10 ml %4 Stacking Jel
5.3 ml ddH ₂ O	6 ml ddH ₂ O
6.4 ml %30 Acrylamide/bis	1.33 ml %30 Acrylamide/bis
4 ml 1.5 M Tris Ph:8.8	2.5 ml 0.5 M Tris Ph:6.8
160 µl %10 SDS	100 µl %10 SDS
160 µl %10 APS	100 µl %10 APS
16 µl TEMED	10 µl TEMED

APS (alüminyum persülfat), jelleri hazırlamadan önce taze olarak ependorf tüpte hazırlanmıştır. Cam aparatlara hazırlanan jeller alta %12 'lik, üst tarafa %4'lük jel olacak şekilde iki katmanlı dökülmüştür. İlk olarak %12 'lik jel hazırlanmıştır. %12'lik jel için ddH₂O, %30 Acrylamide/bis, 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8, 10 % SDS uygun miktarlarda 15 ml'lik falkon tüpe konulmuştur. Taze olarak hazırlanan APS eklenmiş ve en son olarak TEMED (tetrametilendiamin) eklenip falkon yavaşça alt üst edilerek karıştırılmıştır. TEMED eklendikten sonra jelin falkon tüp içerisinde donmaması için hızlı bir şekilde serolojik pipet jel aparatına dökülmüştür. Daha önceden belirlenen hizaya kadar jel döküldükten sonra jelin üzerinde hava kabarcığı kalmaması için ve jelin düz bir şekilde donması için jelin üzerine %100'lük etanol pipet ile gezdirilmiştir. 30 dakika jelin donması beklenmiştir. %12'lik jel iyice donduktan sonra %4'lük jel hazırlanmıştır. %4'lük jel için ddH₂O, %30 Acrylamide/bis, 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 10 % SDS uygun miktarlarda 15 ml'lik falkon tüpe konulmuştur. Taze olarak hazırlanan APS eklenmiş ve en son olarak TEMED eklenip falkon yavaşça alt üst edilerek karıştırılmıştır. TEMED eklendikten sonra jelin falkon tüp içerisinde donmaması için hızlı bir şekilde serolojik pipet donmuş olan %12'lik jelin üzerine dökülmüş ve tarak takılarak 30 dakika jelin donması beklenmiştir.

SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi ile analiz edilecek proteinler 4X laemmlı buffer ile 3:1 oranında (3 protein ve 1 tampon) seyreltilmiş ve hazırlanan karışım 95 °C' de kaynar suda 5 dakika kaynatılmış ve proteinler denatüre edilmiştir.

Proteinler jele yüklenmeden önce elektroforez tankının içine tablo 3.2’de açıklanan protokole göre 10X şeklinde running buffer hazırlanmış daha sonra 10x running buffer distile su kullanılarak 1X’e seyreltilmiş ve jellerin kurumaması için running buffer tanka dökülmüştür.

Tablo 3.2. Running buffer hazırlama protokolü.

10X Running Buffer	1X Running Buffer
30 gr TrisBase	100 ml 10X Running Buffer
144 gr Glisin	900 ml dH ₂ O
10 gr SDS	
dH ₂ O ile 1 lt’ye tamamlanır	

Jel aparatından taraklar dikkatli bir şekilde çıkarıldıktan sonra aparat tanka yerleştirilmiş ve jellerin üzerini geçecek şekilde running buffer dökülmüştür. Kuyucukların içinde hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilmiştir. Eğer hava kabarcığı kalmışsa pipet ile dikkatli bir şekilde hava kabarcıkları ortamdan uzaklaştırılmıştır.

Marker ve proteinler %4’lük jele yüklenme işlemi yapılmıştır. Marker 5 µl olacak şekilde ilk kuyucuğa yüklendikten sonra diğer kuyucuklara kontrol ve doz gruplarının protein örnekleri belirlenen miktarlarda yüklenmiştir. Örnekler SDS-PAGE’e yüklendikten sonra cihaz 175 V’a ayarlanmış ve yüklenen örnekler 60 dakika boyunca yürütülmüştür.

Yürütme bitiminde proteinler poliviniliden florür (PVDF) membrana (EMD Millipore) aktarılması gerekir. PVDF membrana aktarılmadan önce, PVDF membranlar jele göre uygun boyutlarda kesilerek 5-10 dk metanolde aktive edilmiştir. Aktive olduktan sonra membranlar TBS-t’ ye alınmıştır.

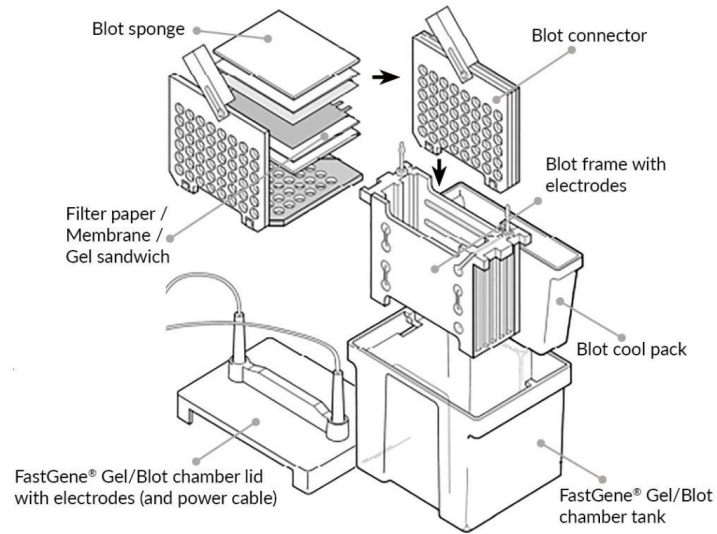
Yürütme bitiminde tanktan çıkartılan cam aparatlar dikkatli bir şekilde açılmıştır. %4 ‘lük jel kısmı kesilerek atılmıştır. Proteinlerin bulunduğu %12 ‘lik jel tablo 3.3’te verilen protokole göre transfer buffer hazırlanmıştır. Jel hazırlanan transfer buffer içerisine alınarak 15 dakika bekletilmiştir. Bu sırada tranfer için kullanılacak sünger ve kurutma kağıtları başka bir kaba alınmıştır ve transfer buffer ile sünger ve

kurutma kağıtlarında kuru bir yer kalmayacak şekilde iyice ıslatılmıştır. Sünger ve kurutma kağıtları transfer işlemine kadar transfer buffer içinde bekletilmiştir.

Tablo 3.3. Transfer buffer hazırlama protokolü.

10X Transfer Buffer	1X Transfer Buffer
30.2 gr TrisBase	100 ml 10X Transfer Buffer
144 gr Glisin	100 ml metanol
dH ₂ O ile 1 lt'ye tamamlanır	800 ml dH ₂ O

15 dakika dolunca transfer buffer konulan bir kabın içerisinde sırasıyla siyah plaka, iki adet sünger, kurutma kağıdı, jel, PVDF membran, tekrardan kurutma kağıdı, 2 sünger ve son olarak en üstte kırmızı plaka yerleştirilerek bir sandwich hazırlanmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Western blot transfer aşaması temsili şekli (<https://www.bulldog-bio.com/product/fastgene-western-blot-system/>).

Hazırlanan sandwichler transfer tankına yerleştirilmiş ve tank transfer buffer ile doldurulmuştur. Tank buzlu su dolu başka bir kap içerisine alınarak transfer işlemi

gerçekleştirilmiştir. Cihaz 400 A'e ayarlanarak 60 dakika boyunca transfer işlemi yapılmıştır.

Transfer işlemi bitince PVDF membranlar TBS-T' ye alınarak 3 tekrarlı olacak şekilde 5'er dakika boyunca yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Yıkama işlemi bitiminde primer antikolar ile muamele edilirken istenmeyen bağlanmaların önüne geçmek için PVDF membranlar 30 dakika boyunca %5'lik yağsız süt tozuna alınarak blocking işlemi uygulanmıştır.

Blocking işlemi bitince bloklama tamponu dökülmüştür. PVDF membranlar belirlenen oranlarda TBS-T ile dilüe edilerek hazırlanan primer antikor içeren kaplara alınmış ve +4 °C'de bir gece çalkalayıcı üzerinde inkübe edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan primer antikolar; mTOR (1:2000, kat. no. BT-AP05644, BTLab), p-Mtor (1:2000, kat. no. BT-PHS00176, BTLab), PI3K (1:2000, kat. no. BT-PHS00765, BTLab), p-PI3K (1:2000, kat. no. BT-PHS00765, BTLab), AKT (1:2000, kat. no. BT-AP00334, BTLab), p-AKT (1:2000, kat. no. BT-PHS00006, BTLab).

Ertesi gün PVDF membranlar TBS-T' ye alınarak 3 tekrarlı olacak şekilde 5'er dakika boyunca yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Yıkama işleminin hemen ardından PVDF membranlar anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated sekonder antikolar (1:20000; BTLab) ile oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Proteinler, dijital tarayıcı (C-Digit Blot Scan-ner; Licor Biosciences, Lincoln, NE, USA) da görünür hale gelmesi için WesternBright ECL HRP substrate kit (Advansta, ABD) kullanılmıştır. Işık görmeyen ortamda PVDF membranlar 10 sn boyunca WesternBright ECL HRP substrate kit solüsyonu içerisinde bekletilmiştir. Daha sonra dijital tarayıcıya alınarak görüntüleme işlemi yapılmıştır.

3.4. Gerçek-Zamanlı PCR Analizi

3.4.1. Total RNA İzolasyonu

Gen düzeyinde ekspresyon analizi yapabilmek için kontrol ve doz gruplarında RNA izolasyonu Trizol Reagent kullanılarak yapılmıştır.

Ishikawa hücre hattı ekim işlemi için 6 kuyucuklu steril hücre kültürü kapları kullanılmıştır. Kontrol ve doz grubu üç tekrarlı olacak şekilde ve her bir kuyucuğa 10^6 yoğunluğunda ekim işlemi yapılmıştır. Hücreler belirli yoğunluğa ulaştıkları zaman hücre kültürü kaplarında bulunan hücrelerin besiyeri çekilmiş kontrol ve doz grupları (50 μ M BA) oluşturulmuştur. 48 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda hücre kültürü kaplarında bulunan hücrelerin besiyeri dikkatli bir şekilde çekilmiştir. Kuyucuk başına 500 μ L Trizol eklenmiş ve kültür kapları hafifçe sallanarak oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyon bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda kazıyıcı kullanılarak hücrelerin tamamen kalkması sağlanmış ve mikropipet ile steril ependorf tüplerine alınmıştır. Daha sonra her bir ependorf tüpüne 200 μ l kloroform eklenmiş ve iyice pipetaj işlemi yapıldıktan sonra tekrar oda sıcaklığında 15 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi bitiminde ependorflar soğutmalı santrifüj cihazı ile +4 °C’de 15.000 rpm’de 20 dk santrifüj edilmiş ve renksiz olan üst faz toplanarak temiz ependorf tüplere aktarılmıştır. Aktarılan üst fazın üzerine 500 μ l izopropanol eklenmiş ve dikkatli bir şekilde pipetaj yapılmıştır. 10 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi bitiminde ependorf tüpler santrifüj cihazına yerleştirilmiş ve +4 °C’de 15.000 rpm’de 30 dk santrifüj edilmiştir. Ependorftaki sıvı kısım dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmıştır. Dipte kalan pelletin üzerine %70’lik etanol konulmuş ve +4 °C’de 12.000 rpm’de 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminin sonunda süpernatant atılmış ve pellet kısa bir süre hava ile kurutulmuştur. Son olarak pellete 40 μ l RNase-DNase free su eklenmiş ve pelletin tekrardan çözünmesi sağlanmıştır. İzole edilen RNA’nın konstrasyonu ve saflığı Nanodrop cihazı (Termo) ile ölçülmüştür.

Nanodrop cihazı ile RNA örneklerinin ölçülebilmesi için kontrol ve doz grupları sulandırılarak cihazın ölçebileceği RNA konstrasyon aralığına (cihazın ölçebileceği RNA konsantrasyon aralığı 2-3000 48 ng/ μ l'dir) getirilmiştir. Hazırlanan RNA örnekleri 230, 260, 280 nm’de okutulmuştur.

3.4.2. cDNA Sentezi

Elde edilen total RNA’lardan cDNA sentezi ise ‘Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (ABD, Cat. No: 4368814) ile üreticinin talimatlarına göre gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.4). Kit protokolüne göre cDNA sentez karışım prosedürü

total RNA son konsantrasyon 2 µg olacak şekilde ayarlanmıştır. Karışım hazırlandıktan sonra kit protokolü doğrultusunda, cDNA sentezi için 25 °C'de 10 dakika, 37 °C'de 120 dakika inkübe edilmiş ve süre sonunda, enzimi inhibe etmek için 85 °C'de 5 dakika bekletilmiştir. Sentezlenen cDNA'lar hücre hattındaki gruplar arasındaki mRNA ekspresyon değişimini tespit etmek amacıyla Real-Time PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yapmak üzere -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Tablo 3.4. cDNA sentez karışımı.

	Hacim
Total RNA	Değişken
10X Random Primers	2 µl
25X dNTP karışımı	0.8 µl
10X RT tamponu	2 µl
RNAaz içermeyen su	Değişken
MultiScribe TM Reverse Transcritase	1 µl
Toplam Hacim	20 µl

3.4.3. Gen Ekspresyonu Analizi

Apoptoz ve mTOR yolağında görevli olan genlerin mRNA düzeyindeki ekspresyon seviyeleri Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ile belirlenmiştir.

RT-PCR hassas bir metottur ve ayrıca nükleik asitlerin spesifik ve tekrarlanabilir miktar tayinine izin vermektedir. RT-PCR ile PCR sürecinin her döngüsü sırasında üretilen ürünler güvenilir şekilde saptanabilir ve ölçülebilmektedir (Arya ve ark., 2014). Aynı zamanda RT-PCR kullanılarak ürünlerin analizi reaksiyon esnasında yapılabilmektedir. Bu çalışmada da 96 kuyucuklu mikropłaka okuyabilen RT-PCR sistemi kullanılmıştır.

RT-PCR için reaksiyon koşulları her bir kuyucukta 5.5 µl syber green (ABT 2X qPCR-SYBBR Green-Master Mix (Cat No: Q03-02*05), 6.5 µl nükleaz içermeyen su, 2 µl (1Reverse+1 forward) primer ve 1µl cDNA olacak şekilde 96-kuyucuklu

plakada kurulmuştur (Tablo 3.5). Daha sonra plakanın yüzeyi şeffaf yapışkan etiketle (Applied Biosystems™ 96-Well Reaction Plate seal) kapatılmıştır. Plaka yerleşimi tablo 3.6’da şematik olarak gösterilmiştir. StepOne Plus gerçek-zamanlı PCR cihazına yüklenen plaka, 1 döngü 95 °C’de 10 dk ilk denatürasyon, 40 döngü 95 °C’de 15 sn ve 60 °C’de 1 dk olacak şekilde, amplifiye edilmiştir.

Tablo 3.5. RT-PCR karışımı.

RT-PCR için hazırlanan karışım (96 kuyucuklu plaka için; bir reaksiyon)	
Sybr Green Master Mix	528 µl
CDNA	96 µl
Nükleaz İçermeyen Su	624 µl
Primer	192 µl
Son Hacim	1440 µl

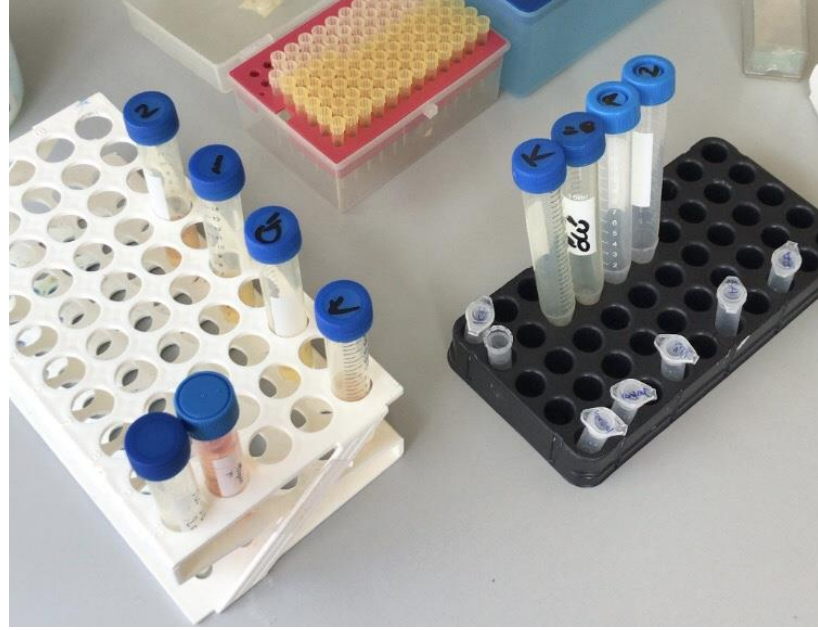
Tablo 3.6. RT-PCR 96’lı plaka yerleşimi (pembe kutucuklar kontrol grubuna, yeşil kutucuklar BA grubuna aittir).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	β-aktin	β-aktin	β-aktin	β-aktin	β-aktin	β-aktin	PIK3C3	PIK3C3	PIK3C3	PIK3C3	PIK3C3	PIK3C3
B	Casp3	Casp3	Casp3	Casp3	Casp3	Casp3	RAPTOR	RAPTOR	RAPTOR	RAPTOR	RAPTOR	RAPTOR
C	Casp8	Casp8	Casp8	Casp8	Casp8	Casp8	RICTOR	RICTOR	RICTOR	RICTOR	RICTOR	RICTOR
D	Casp9	Casp9	Casp9	Casp9	Casp9	Casp9	-	-	-	-	-	-
E	Casp7	Casp7	Casp7	Casp7	Casp7	Casp7	-	-	-	-	-	-
F	Bax	Bax	Bax	Bax	Bax	Bax	-	-	-	-	-	-
G	Bcl2	Bcl2	Bcl2	Bcl2	Bcl2	Bcl2	-	-	-	-	-	-
H	AKT1	AKT1	AKT1	AKT1	AKT1	AKT1	-	-	-	-	-	-

3.5. Apoptozun Belirlenmesi

Ishikawa hücre hattı ekim işlemi için 6 kuyucuklu steril hücre kültürü kapları kullanılmış ve kontrol ve doz grubu üç tekrarlı olacak şekilde her bir kuyucuğa 10^6 yoğunluğunda ekim işlemi yapılmıştır. Pozitif kontrol için wellerden bir tanesi H_2O_2 grubu olarak planlanmıştır. Hücrelerin kültür plakasının yüzeyine tutunması için 24 saat inkübasyon bırakılmıştır. Hücreler kültür plakasının yüzeyine tutundukları zaman kuyucuklardaki besiyeri dikkatli bir şekilde aspire edilmiştir. Kontrol, doz (BA 50 μM) ve pozitif kontrol grubu oluşturulmuştur. 48 saat boyunca %95 O_2 ve %5 CO_2 basıncı altında 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. Deneye başlamadan 24 saat önce pozitif kontrol grubuna H_2O_2 eklenmiştir.

Hücrelerin apoptotik hücre ölümünün belirlenmesi Luminex Anneksin V-Dead Cell kit protokolüne göre yapılmıştır. Deney protokolüne göre; kuyucuklardaki besiyeri aspire edilmiş ve 15 ml’lik falkonlara toplanmıştır (Şekil 3.2). Wellerin tabanına yapışan hücreleri toplamak için her bir welle 400 μl Tripsin-EDTA eklenmiştir. Plakaları inkübatöre koymadan önce oda sıcaklığında 5 dakika boyunca plakalar hafifçe sallanarak inkübasyon işlemi yapılmıştır. Tripsin-EDTA ile hücreler tutundukları yüzeyden kaldırıldıktan sonra kültür kaplarında bulunan Tripsin-EDTA’nın etkisini inhibe etmek amacıyla 800 μl tam besiyeri eklenmiştir. Her kuyucukta bulunan kuyucuk içeriği kendine ait falkon tüpüne aktarılmıştır. Hazırlanan tüpler 1500 rpm’de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant kısmı atılmamış, temiz ve steril ayrı bir falkona alınmıştır.



Şekil 3.2. Apoptotik hücre oranı deneyi için oluşturulan kontrol, doz (BA 50 μ M) ve pozitif kontrol grubu.

Santrifüj sonrası dibe çöken pellet üzerine 200 μ l %3 FBS içeren PBS eklenmiş ve hücrelerin homajen bir şekilde dağılması için pipetaj yapılmıştır. Pipetaj işleminden sonra mikroskop altında hücre yoğunluğuna bakılmıştır. Hücre sayısının cihazın okuyabileceği aralıkta (cihaz 70-100 hücreyi sorunsuz bir şekilde okumaktadır) olup olmadığına bakılmıştır.

Her bir falkondan 100 μ l örnek alınarak temiz ve steril ependorf tüpelerine aktarılmıştır. Daha sonra santrifüj tüplerinin üzerine 100 μ l “Luminex Annexin V” solüsyonundan eklenmiştir (hücre solüsyon oranı 1:1 olacak şekilde ayarlandı). Santrifüj tüpleri folyoya sarılarak 30 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon süresi sonunda analizler 3 tekrarlı olacak şekilde Muse Cell Analyzer cihazı kullanılarak yapılmıştır (Şekil 3.3). Muse Cell Analyzer cihazı analiz öncesinde tamamen temizlenmiş ve analizler arasında ise kısa süreli olarak temizleme suyu ile temizlenmiştir.



Şekil 3.3. Apoptotik hücre ölümünü ölçmek için kullanılan Muse Cell Analyzer cihazı.

3.6. İmmunohistokimyasal Analiz

İmmunohistokimyasal boyama için hücreler 8 kuyucuklu plakalara 5×10^4 yoğunlukta olacak şekilde ekilmiştir (Şekil 3.4). Hücrelerin plaka yüzeyine tutunması için 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi bitiminde plakalar doz (BA $50 \mu\text{M}$) ve kontrol grubu olacak şekilde iki gruba ayrılmıştır. Hücreler 48 saat boyunca %95 O_2 ve %5 CO_2 basıncı altında 37°C 'de inkübasyona bırakılmıştır.



Şekil 3.4. İmmünohistokimyasal boyama için hücrelerin ekildiği 8 kuyucuklu plakalar.

İnkübasyon süresi bitiminde aşağıda belirtilen immunohistokimyasal boyama prosedürü izlenmiştir:

1. Kuyucuklardaki besiyeri dikkatli bir şekilde aspire edilerek ortamdan uzaklaştırılması
2. Hava ile kuyucukların kurutulması
3. Hücreler %4 PFA ile 1 saat fikse edilmesi
4. PBS ile yıkama (2 x 5dk)
5. Kültürdeki endojen peroksidaz aktivitesi taze olarak hazırlanan % 30'luk H_2O_2 :Metanol (1:9) ile 10 dakika bekletilerek ortadan kaldırılması
6. PBS ile yıkama (2 x 5dk)
7. Large V Block (Thermo Scientific, UK) ile 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyon
8. Hücreler üzerine belirlenen primer antikorlar ilave edilerek 1 gece +4 °C ' de bekletilmesi (Bu çalışmada p-mTOR, p-PI3K ve p-AKT primer antikorları 1:200 oranında dilüe edilerek kullanılmıştır)
9. PBS ile yıkama (2 x 5dk)
10. Her bir kuyucuğa 2-3 damla "Biyotinli Goat-Anti Polyvalent (Thermo Scientific, UK)" eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmesi

11. PBS ile yıkama (2 x 5dk)
12. Her bir kuyucuğa 2-3 damla “Streptavidin Peroxidase (Thermo Scientific, UK)” eklenerek 10 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletilmesi
13. PBS ile yıkama (2 x 5dk)
14. DAB ile boyama
15. PBS ile yıkama (2 x 5dk)

Bu çalışmada DAB boyaması ile birlikte zıt boyama yapılmıştır ve zıt boyama için aşağıdaki boyama protokolü izlenmiştir.

1. Lamların distile suda yıkanması
2. Hematoksilen 1 dips
3. Su berraklaşınca kadar akan musluk suyunda yıkama
4. Asit-alkol 1 dips
5. Musluk suyu 1 dips
6. Amanyaklı su 1 dips
7. Musluk suyu 1 dips
8. %70 - %90 ve % 96’lık alkol serilerinden geçirme
9. Kurutma
10. Ksilol I 10 dakika
11. Ksilol II 10 dakika
12. DPX ile kapama

DAB yöntemi ile işaretlenen kesitlerin incelemesi Olympus BX–FLA Reflected Light Fluorescence Attachment adapte edilmiş Olympus BX50 mikroskopla 40X objektif kullanılarak dijital kamera (Olympus DP71 CCD renkli kamera, 1,5 million pixel) ile bilgisayar ekranına alınan görüntüler üzerinde gerçekleştirilmiştir. Her gruptan, ışık mikroskobu ile 200x büyütmede rastgele beş farklı alan fotoğraflanmış ve p-mTOR, p-PI3K ve p-AKT pozitif Ishikawa hücrelerinin yüzdesi hesaplanmıştır.

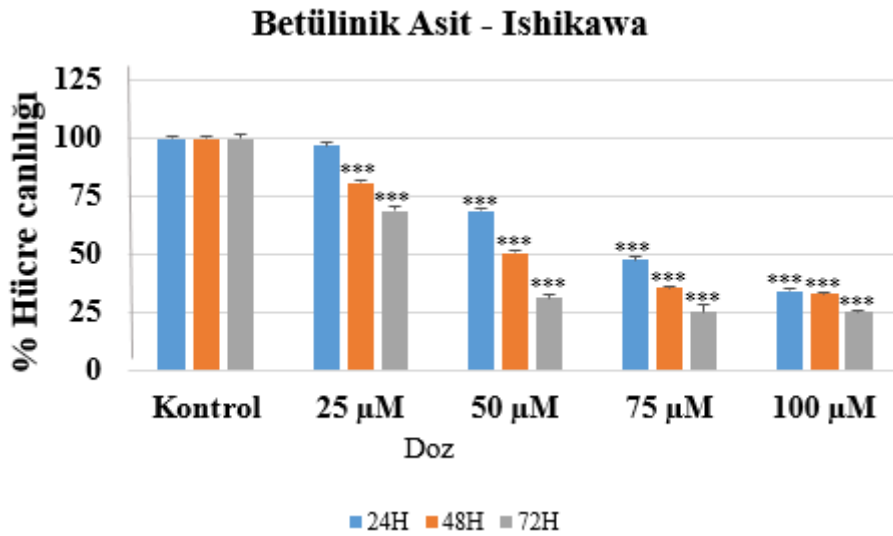
3.7. İstatistiksel Analizler

RT-PCR analizi için $\Delta\Delta CT$ yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Kat değişiklikleri ve kat düzenlemeleri “GeneGlobe RT² Profiler™ PCR Dizi Veri Analizi” programı ile değerlendirilmiştir. Diğer deneyler için SPSS 23 istatistiksel yazılımı kullanılmıştır. İkili veri seti karşılaştırılmasında Independent t-testi, çoklu veri seti karşıştırmalarında ise ANOVA, Tukey veya Tamhane post-hoc karşılaştırma testleri ile değerlendirilmiştir. Gruplar arası fark değerlendirilirken $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. BA'nın Endometrial Kanser Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi

Betülinik asidin endometrial kanser hücre canlılığı üzerine etkileri 24, 48 ve 72 saatlerde doz ve zaman bağılı olarak CCK8 (cell counting kit 8) yöntemi ile değerlendirilmiştir. BA 24, 48 ve 72 saatlerde Ishikawa hücre canlılığını doz ve zaman bağımlı azaltmıştır. Ishikawa hücrelerinde BA'nın IC₅₀ değeri 48 saatte 50 µM olarak hesaplanmıştır. 25, 50, 75 ve 100 µM BA 24 saatte hücre canlılığını sırasıyla %96 (P=0.934), 68 (P<0.001), 47 (P<0.001), ve 34 (P<0.001),'e kadar düşürmüştür (Şekil 4.1). 48 saatte 25 µM BA hücre canlılığını %81'e 50 µM %50'e 75 µM %35'e 100 µM ise %32'ye düşürmüştür (P<0.001) (Şekil 4.1). 72 saatte 50 ve 100 µM arasında BA dozları hücre canlılığını %50'nin altına düşürmüştür. 50, 75 ve 100 µM BA hücre canlılığını sırasıyla, %31, 25 ve 25'e kadar azaltmıştır (P<0.001) (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Betülinik asidin Ishikawa hücre canlılığı üzerine etkileri. Farklı dozlarda BA ile muamele edilen Ishikawa hücre canlılığı yüzdesi CCK8 metodu ile belirlenmiştir. Ishikawa hücrelerinde BA'nın IC₅₀ değeri 48 saatte 50 µM olarak hesaplanmıştır. Data ortalama±SD olarak sunulur. ***, kontrol grubu hücreleri ile karşılaştırıldığında p<0.001'lik istatistiksel farklılıkları gösterir.

4.2. BA'nın Endometrial Kansere Hücrelerinde Apoptoz ve mTOR Yolağında Görevli Genlerin Ekspresyonu Üzerine Olan Etkisinin Kantitatif Gerçek-Zamanlı PCR Yöntemi İle Belirlenmesi

BA'nın Ishikawa hücrelerinde apoptoz ve mTOR yolağında genlerin ekspresyonu üzerindeki etkileri ve kat değişimleri RT-PCR ile belirlenmiştir. Analiz edilen genler, kat değişimleri ve P değerleri Tablo 4.1'de verilmiştir. Apoptoz ile ilişkili *Bax*, *Bcl2*, *kaspaz 3*, *kaspaz 8*, *kaspaz 9*, *kaspaz 10*; mTOR yolağı ile ilişkili olarak ise *Akt1*, *PIK3C3*, *RAPTOR* ve *RICTOR* genlerinin ekspresyon profili değerlendirilmiştir. BA apoptoz ve mTOR ilişkili genlerin ekspresyonunda değişikliğe neden olmuştur. BA uygulaması Ishikawa hücrelerinde *Bcl2* (P=0.008) ekspresyonunun anlamlı azalmasına ve *kaspaz 8* (P=0.001) ekspresyonunun artmasına neden olmuştur. mTOR ile ilişkili genlere bakıldığında BA, *AKT1* (P=0.0001) ekspresyonunun anlamlı azalmasına *RAPTOR* (P=0.00002) ekspresyonunun ise anlamlı artmasına neden olmuştur (Tablo 4.1).

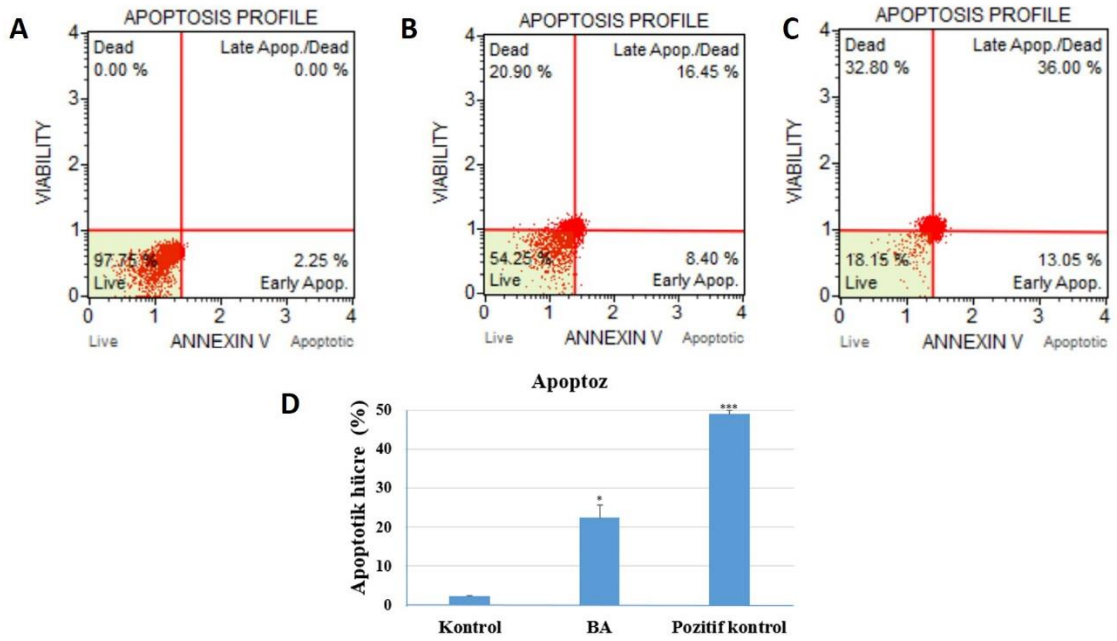
Tablo 4.1. Ishikawa hücrelerinde apoptoz ve mTOR ilişkili genlerin mRNA değişiklikleri.

Gen	Kat değişimi	P-değeri
<i>CASPASE-3</i>	1.27	0.21
<i>CASPASE-8</i>	23.30	0.001
<i>CASPASE-9</i>	-1.02	0.61
<i>CASPASE10</i>	1.82	0.98
<i>BAX</i>	-1.01	0.93
<i>BCL2</i>	-1.60	0.008
<i>AKT1</i>	-61.54	0.0001
<i>RAPTOR</i>	38.19	0.00002
<i>RICTOR</i>	1.89	0.27
<i>PIK3C3</i>	3.55	0.126
<i>GAPDH</i>	1	

BAX (*Bcl-2*-ilişkili *X* proteini), *Bcl-2* (*B*-hücreli lenfoma 2), *GAPDH* (gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz), *RICTOR* (*MTOR* kompleksi 2'nin *RPTOR* bağımsız tamamlayıcısı), $P < 0,05$ istatistiksel farklılıkları gösterir.

4.3. BA'nın Endometrial Kanser Hücrelerinde Apoptoz Üzerine Etkilerinin Annexin V İle Belirlenmesi

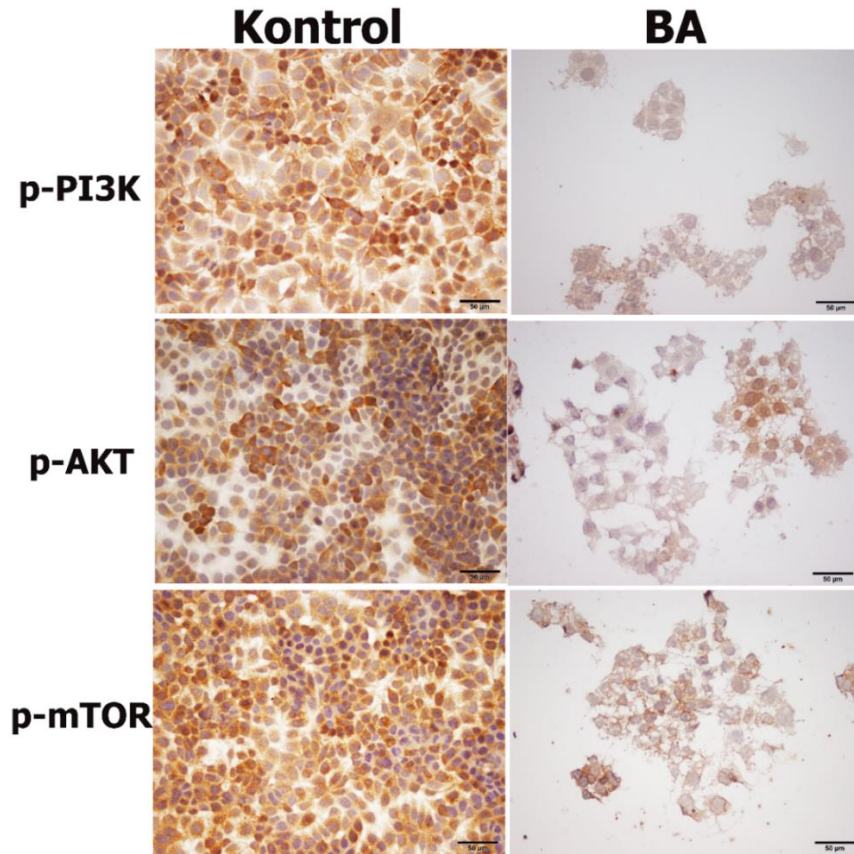
BA'nın Ishikawa hücrelerinde apoptoz üzerine etkileri Annexin V ile değerlendirilmiştir. Annexin V sonuçları ile BA uygulamasının Ishikawa hücrelerinde apoptozu tetiklediği gösterilmiştir. Annexin V uygulaması ile ölü, erken ve geç apoptoz giren Ishikawa hücreleri belirlenmiştir. BA ile muamele edilen grupta kontrol grubuyla kıyaslandığında apoptotik hücrelerin oranında anlamlı artış gözlenmiştir. BA uygulanan grupta apoptozu uğrayan hücrelerin oranı ortalama 22 ± 3.23 ($P=0.02$) iken kontrol grubunda 2.31 ± 0.2 , pozitif kontrol grubunda ise 49 ± 1.00 ($P=0.001$) bulunmuştur (Şekil 4.2). Ishikawa hücrelerinde 48 saat BA ile inkübasyon apoptotik hücrelerin oranında anlamlı bir artışa neden olurken canlı hücrelerin oranının da azalmasına yol açmıştır (Şekil 4.2).



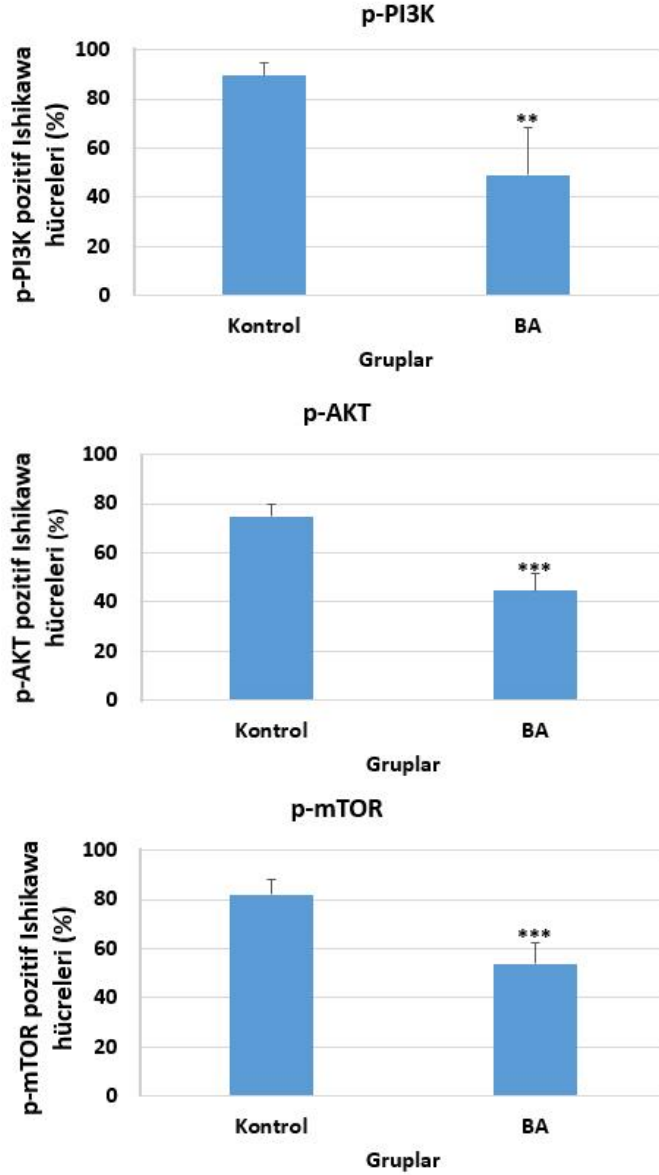
Şekil 4.2. BA'nın Ishikawa hücrelerinde apoptoz üzerine etkilerinin Annexin V boyama ile değerlendirilmesi. A) kontrol B) BA ile muamele edilen grup C) H₂O₂ uygulanan pozitif kontrol grubu. D) Ishikawa hücrelerinde total apoptotik hücrelerin istatistiksel karşılaştırılması. (* $p < 0.05$ ve *** $p < 0.001$).

4.4. BA'nın Endometrial Kanser Hücrelerinde mTOR Yolağında Görevli Proteinler Üzerine Etkilerinin İmmünohistokimya İle Belirlenmesi

BA'nın Ishikawa hücrelerinde mTOR yolağında görevli proteinler üzerine etkisi immünohistokimya ile incelenmiştir. BA uygulaması mTOR yolağında görevli proteinlerinin ekspresyonunda anlamlı bir azalmaya yol açmıştır. p-mTOR, p-PI3K ve p-AKT Ishikawa hücrelerinin sitoplazmasında yoğun bir şekilde eksprese edilmiştir (Şekil 4.3). Ishikawa hücrelerinde p-PI3K, p-AKT ve p-mTOR pozitif hücre yüzdesi kontrol grubunda sırasıyla, 89.39 ± 5.19 , 74.84 ± 5.07 ve 82.02 ± 6.14 'tür. BA uygulanan grupta bu değerler sırasıyla 49.12 ± 19.12 ($P=0.002$), 44.46 ± 7.39 ($P<0.001$), ve 53.70 ± 8.94 ($P<0.001$)'tür (Şekil 4.4).



Şekil 4.3. Ishikawa hücrelerinde BA'nın PI3K, AKT ve mTOR ekspresyonu üzerine etkilerinin immünohistokimya ile araştırılması. PI3K, AKT ve mTOR Ishikawa hücrelerinin sitoplazma, membran ve sitoplazmik uzantılarında eksprese edilmektedir. Bar: 50µm.

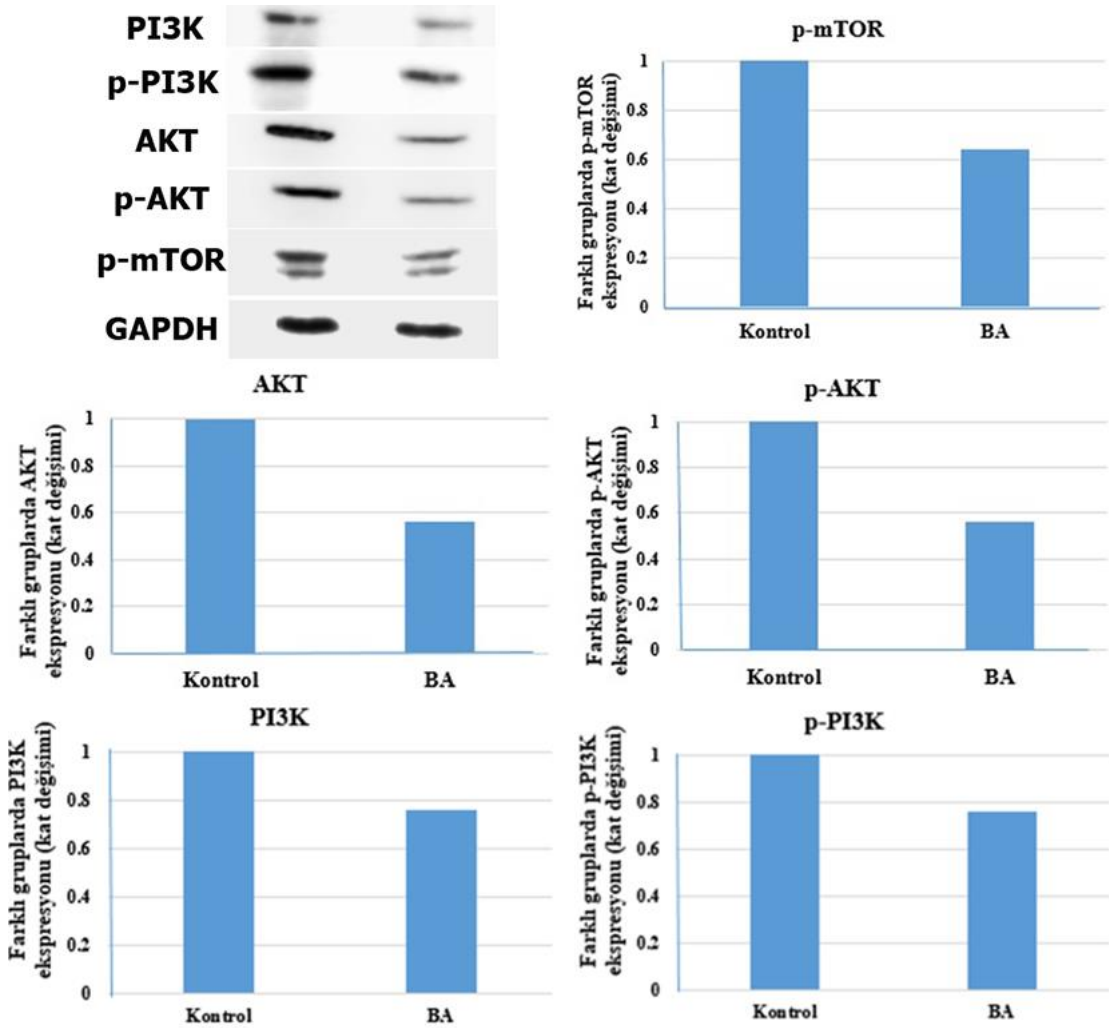


Şekil 4.4. BA'nın Ishikawa hücrelerinde PI3K, AKT ve mTOR ekspresyonları üzerine etkilerinin istatistiksel analizi. Kontrol ve BA grupları arasında anlamlı farklılıklar bulunmuştur. Data ortalama \pm SD olarak sunulur, n=3. ** p < 0.01, *** p < 0.001.

4.5. BA'nın Endometrial Kanseri Hücrelerinde mTOR Yolağında Görevli Proteinler Üzerine Etkilerinin Western Blot İle Belirlenmesi

BA'nın Ishikawa hücrelerinde mTOR yolağında görevli proteinler üzerine etkisini desteklemek için Western blot yapılmıştır. BA Ishikawa hücrelerinde mTOR yolağında görevli protein ekspresyonlarında azalışa neden olmuş ve

immünohistokimya sonuçları desteklenmiştir (Şekil 4.5). BA uygulanan grupta kontrol grubuyla kıyaslandığında PI3K/AKT/mTOR ekspresyonları azalmıştır.



Şekil 4.5. BA uygulamasının Ishikawa hücrelerinde PI3K/AKT/mTOR ekspresyonu üzerine etkisinin Western Blot ile gösterilmesi.

5. TARTIŞMA

BA, *Betula platyphylla*'nın kabuğundan izole edilen doğal bir pentasiklik terpendir. BA'nın prostat, meme, kolon, cilt ve akciğer kanseri gibi çeşitli malignitelerde hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve apoptozu tetiklediği gösterilmiştir (Jiao ve ark., 2019). Ancak, BA'nın endometrial kanser hücrelerinde antikanser etkilerini ve olası moleküler mekanizmalarını konu alan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Biz bu çalışmada BA'nın Ishikawa hücrelerinde mTOR sinyal yolağını hedef alarak hücre proliferasyonunu azalttığını ve apoptozu tetiklediğini ilk kez gösterdik.

Hücre canlılığı bir örnekteki canlı hücrelerin sayısı olarak tanımlanır. Hücre canlılığını göstermek için kullanılan yöntemler, hücre proliferasyonunu göstermek içinde kullanılırlar. Hücre sitotoksitesi ve proliferasyon deneyleri genellikle, test moleküllerinin hücre proliferasyonu üzerinde etkisinin olup olmadığını veya doğrudan sitotoksik etkiler gösterip göstermediğini tespit etmek için ilaç taraması için kullanılır (Adan ve ark., 2016). Bizim çalışmamızda BA'nın Ishikawa hücre canlılığı üzerine etkilerini test etmek için CCK8 değerlendirilmesi yapılmıştır. BA'nın 24, 48 ve 72 saatlerde hücre canlılığını doz ve zaman bağlı düşürdüğü belirlenmiş ve IC₅₀ dozu 48 saatte 50 µM bulunmuştur. Zhao ve ark. (2020) 10 µM BA nanopartiküllerinin akciğer kanser hücre proliferasyonunu %33'e düşürdüğünü göstermişlerdir. Wang ve ark. (2020) BA'nın safra kesesi kanseri hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini göstermişlerdir. Diğer bir çalışmada BA'nın insan kolorektal kanser hücrelerinde doz ve zaman bağımlı anti-proliferasyon etkisi gösterilmiştir (Zeng ve ark., 2019). Bizim çalışmamızın sonuçları kanser hücrelerinde BA'nın anti-proliferasyon etkisini desteklemekte ve Ishikawa hücrelerinin proliferasyonunu azalttığını ilk kez göstermektedir.

Apoptoz 1970'lerde keşfedilen ve piknotik çekirdek, kromatin parçalanması, sitoplazmik yoğunlaşma gibi hücre morfolojisindeki değişiklikler ile karakterize olan bir hücre ölüm yolağıdır (Kinloch ve ark., 1999). Apoptoz bir kez aktifleştğinde başlatıcı kaspazlar (*kaspaz 2, 8, 9 ve 10*) efektör kaspazları (*kaspaz 3, 6 ve 7*) aktive eder. Bunların arasında *kaspaz 3*, apoptozun ana yürütücüsüdür (Jiao ve ark., 2019).

BA'nın mesane kanserinde kaspaz bağımlı apoptozu aktive ettiği gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2021). Diğer bir çalışmada BA'nın ovaryan kanser hücrelerinde *kaspaz-3,-8,-9* ve *Bax* ekspresyonunu arttırarak ve *Bcl2* ekspresyonunu azaltarak apoptozu neden olduğu gösterilmiştir (Lee ve ark., 2019). Guo ve ark. (2020) pankreas kanserinde BA'nın *Bax*, *kaspaz-3*, *-8* ekspresyonunu arttırarak ve *Bcl2* ekspresyonunu azaltarak apoptozu tetiklediğini bildirmişlerdir. Yurasakpong ve ark. (2021) kolorektal kanserde pro-apoptotik faktörler olan *Bax*, *kaspaz-3,-9* ekspresyonunu artırarak anti-apoptotik faktör *Bcl2* ekspresyonunu azaltarak apoptozu aktive ettiğini göstermişlerdir. Biz BA'nın endometrial kanser hücrelerinde apoptozu tetikleyip tetiklemediğini araştırdık. Bu amaçla BA ile muamele edilen Ishikawa hücreleri Annexin V ile boyanmış ve apoptoz oranları flow sitometrik olarak değerlendirilmiştir. Bu analiz, BA'nın apoptozu anlamlı olarak yaklaşık 11 kat arttırdığını göstermiştir. RT-PCR analizi ile ise anti-apoptotik faktör *Bcl2*'nin ekspresyonunun anlamlı azaldığı pro-apoptotik faktör olan *kaspaz 8*'in ise ekspresyonunun anlamlı arttığı gösterilmiş ve apoptoz gen ekspresyonu seviyesinde desteklenmiştir. *Kaspaz 3* ve *kaspaz 10* ekspresyon seviyelerinde ise sırasıyla, 1.27 ve 1.82 katlık artış olmuş, fakat anlamlı bulunmamıştır. Bu durum yalnızca gen seviyesinde ekspresyona bakılmasından kaynaklı olabilir. Transkripsiyonel ve translasyonel değişikliklerden dolayı protein seviyesinde bu genlerin ekspresyonlarında anlamlı bir artış olabileceği düşünülmektedir.

Kanser hücrelerinde reseptör tirozin kinazlar aktive olduklarında sitoplazmik kinazları tetikleyen sinyal iletim mekanizmasını içerir. mTOR hücre sinyal iletim mekanizmasında merkezde yer alan sitoplazmik bir protein kinazdır (serin/tirozin kinaz). Fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K)/AKT/mTOR sinyal yolu çeşitli kanser türlerinde yüksek derecede eksprese olur ve canlılık, proliferasyon, büyüme, anjiyogenez, metabolizma, metastaz gibi hücrel olayları düzenler (Ersahin ve ark., 2015). Hücrel büyüme ve hayatta kalmada önemli bir rol oynayan PI3K/AKT/mTOR yolunun aşırı aktivasyonu, son zamanlarda endometrial kanser patogeneğinde yer alır ve bu nedenle, PI3K/AKT/mTOR yolunun inhibisyonu terapötik açıdan önemlidir (Slomovitz ve Coleman, 2012). PI3K/AKT/mTOR aktivasyonu, endometriyum kanseri de dâhil olmak üzere birçok kanserde bildirilmiştir. Akt, proapoptotik genlerin önlenmesiyle düzenlenen hücre sağkalımını arttırır (Qu ve ark., 2022). Uyarılan Akt, hücre döngüsü, metabolizma, çoğalma,

anjiyogenez, apoptoz ve göç gibi zorunlu hücrel olayları düzenleyen mTOR proteinlerini tetikler. Endometrial kanser, katı tümörler arasında en fazla tekrarlayan PI3K/AKT/mTOR mutasyon oranına sahiptir. PI3K/AKT/mTOR inhibitörleri, mitokondriyal membran potansiyelini azaltarak tümör hücrelerinin apoptozunu tetikleyebilir (Qu ve ark., 2022).

Ataş ve ark. (2022) BA'nın renal hücreli kanserde AKT1 gen ekspresyonunu azalttığını ve mTOR/AKT yolağının renal hücreli kanser tedavisinde umut edici bir antikanser ajanı olabileceğini göstermişlerdir. Guo ve ark. (2020) BA'nın mTOR yolağını hedef alarak pankreas kanserini inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise BA'nın mTOR yolağında görevli olan p-mTOR, p-PI3K ve p-AKT proteinlerinin ekspresyonunda anlamlı bir azalmaya yol açtığı gösterilmiştir.

Elde etmiş olduğumuz tüm verilere dayanak, BA'nın endometrial kanserde apoptozu tetikleyerek mTOR sinyal yolağını inhibe etmiş olabileceği düşünülmektedir. Sonuç olarak çalışmamız BA'nın endometrial kanserde apoptozu tetiklediği ve hücre proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Ek olarak BA uygulaması mTOR/PI3K/AKT ekspresyonunun azalmasına neden olmuştur. Sonuç olarak BA uygulaması kaspaz/Bcl2 apoptoz yolağını hedef alarak mTOR yolağını inhibe etmiş olabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında betülinik asitin endometrial kanser hücre hattı olan Ishikawa hücre hattı üzerindeki mTOR yolağı aracılı olası antikanser etkilerini incelenmiştir. Bu çalışmanın sonuçları ve öneriler aşağıda sıralanmıştır.

BA Ishikawa hücre proliferasyonunu doz ve zaman bağımlı olarak azaltır. BA'nın IC50 dozu 48 saatte 50 µM'dır.

BA uygulaması Ishikawa hücrelerinde Bcl2 ekspresyonunu azaltarak ve kaspaz 8 ekspresyonunun arttırarak apoptozu tetikler.

BA mTOR ilişkili genlerden, AKT1 ekspresyonunun anlamlı azalmasına RAPTOR ekspresyonunun ise anlamlı artmasına neden olmuştur.

BA uygulaması mTOR yolağında görevli olan p-mTOR, p-PI3K ve p-AKT proteinlerinin ekspresyonunda anlamlı bir azalmaya yol açmıştır.

Sonuçlarımız BA'nın endometrial kanserde apoptozu tetikleyerek mTOR sinyal yolağını inhibe etmiş olabileceği düşündürmektedir. Bu çalışmadan elde edilen bulgular betülinik asitin endometrial kanser tedavisinde de umut verici bir terapötik ajan olabileceğini göstermiştir. Yapılan bu çalışma sadece *in vitro* deneyler ile sınırlı kalmıştır. Daha güvenilir sonuçlar için betülinik asitin *in vivo* ve klinik etkilerinin incelendiği ileri düzey çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

- Adan, A., Kiraz Y., & Baran Y. (2016). Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 17 (14), 1213–21. <https://doi.org/10.2174/1389201017666160808160513>.
- Amant, F., Moerman, P., Neven P., & Timmerman, D. Endometrial Cancer (2005). *The Lancet*. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673605670638?casa_token=2jOCqHsv-RQAAAAA:cts-P7pOEIVDpnU-409dtvWldRPQLM1TaPMQLqpKhqeAfmOc-Lz2wQcXfsDh6mF7jUu9gRYgqc8.
- Amant, F., Moerman, P., Neven, P., Timmerman, D., Limbergen, V., & Vergote, I. (2007). Treatment modalities in endometrial cancer. *Current opinion in oncology*, 19 (5), 479-485.
- Ameer, M.A., Fagan S.E., Sosa-Stanley, JN., & Peterson, D.C.(2017). Anatomy, Abdomen and Pelvis, Uterus. *StatPearls*. <http://europepmc.org/books/NBK470297>.
- An, J., Lifei, L., & Xuehong, Z. (2021). Curcucosone C Induces Apoptosis in Endometrial Cancer Cells via Mitochondria-Dependent Apoptotic and ERK Pathway. *Biotechnology Letters*, 43 (1), 329–38. <https://doi.org/10.1007/S10529-020-03027-4>.
- Arya, M., Iqbal, S., Shergill, M.W., Gommersall, I., Arya, N. & Patel, H.R. (2014). Basic Principles of Real-Time Quantitative PCR. <https://doi.org/10.1586/14737159.5.2.209>.
- Ataş, M.N., Ertuğrul, B., Sinemiplik, E., Çakmakoglu, B., & Ergen, A. (2022). Effects of Betulinic Acid on AKT/MTOR Pathway in Renal Cell Carcinoma. *Turkish Journal of Urology*, 48 (1), 58. <https://doi.org/10.5152/TUD.2022.21276>.
- Braun, M.M., Grumbo, R.J., & Overbeek-Wager, E.A. (2016). Diagnosis and Management of Endometrial Cancer. *American Family Physician*. www.aafp.org/afp.
- Chintharlapalli, S., Sabitha, P., Shashi, K. R., & Stephen, S. (2007). Betulinic Acid Inhibits Prostate Cancer Growth through Inhibition of Specificity Protein Transcription Factors. *Cancer Research*, 67 (6), 2816–23. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3735>.
- Cichewicz, R. H., & Samir, A. K. (2004). Chemistry, Biological Activity, and Chemotherapeutic Potential of Betulinic Acid for the Prevention and Treatment of Cancer and HIV Infection. *Medicinal Research Reviews*, 24 (1), 90–114. <https://doi.org/10.1002/MED.10053>.
- Davis, B. (2012). Endometrial Stromal Polyps in Rodents: Biology, Etiology, and Relevance to Disease in Women. *Toxicologic Pathology*, 40 (3), 419–24. <https://doi.org/10.1177/0192623311431466>.
- Dossus, L., Naomi, A., Rudolf, K., Kjersti, B., Eiliv, L., Anne, T., Anja, O., & (2010). Reproductive Risk Factors and Endometrial Cancer: The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Wiley Online Library*, 22 (2), 442–51. <https://doi.org/10.1002/ijc.25050>.
- Elmore, S., (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35 (4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>.
- Ersahin, T., Tuncbag, N., & Cetin-Atalay, R. (2015). The PI3K/AKT/MTOR Interactive Pathway. *Molecular BioSystems*, 11 (7), 1946–54. <https://doi.org/10.1039/C5MB00101C>.
- Faria, S. C., Devine, C. E., Rao, B., Sagebiel, T., & Bhosale, P. (2019). Imaging and Staging of Endometrial Cancer. *Seminars in Ultrasound, CT and MRI*, 40 (4), 287–94. <https://doi.org/10.1053/J.SULT.2019.04.001>.
- Fulda, S. (2008). Betulinic acid for cancer treatment and prevention. *International journal of molecular sciences*, 9(6), 1096-1107.
- Gómez-Raposo, C., Merino Salvador, M., Aguayo Zamora, C., García de Santiago, B. & Casado Sáenz, E. (2021). Immune Checkpoint Inhibitors in Endometrial Cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. <https://doi.org/10.1016/J.CRITREVNOC.2021.103306>.

- Guleria, S., Jensen, A., Albieri, V., Nøhr, B., Frederiksen, K. & Kjær, S. K. (2021). Endometrial Cancer Risk after Fertility Treatment: A Population-Based Cohort Study. *Cancer Causes and Control*, 32 (2), 181–88. <https://doi.org/10.1007/S10552-020-01372-3>.
- Guo, Y., Zhu, H., Weng, M., Wang, C. & Sun, L. (2020). Chemopreventive Effect of Betulinic Acid via MTOR -Caspases/Bcl2/Bax Apoptotic Signaling in Pancreatic Cancer. *BMC Complementary Medicine and Therapies* 20 (1), 178. <https://doi.org/10.1186/S12906-020-02976-7>.
- Harold, E. (2011). Anatomy of the Uterus. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*, 12 (3), 99–101. <https://doi.org/10.1016/J.MPAIC.2010.11.005>.
- Jiang, W., Li, X., Dong, S., & Zhou, W. (2021). Betulinic Acid in the Treatment of Tumour Diseases: Application and Research Progress. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2021.111990>.
- Jiao, L., Wang, S., Zheng, Y., Wang, N., Yang, B., Wang, D., & Wang, Z. (2019). Betulinic acid suppresses breast cancer aerobic glycolysis via caveolin-1/NF- κ B/c-Myc pathway. *Biochemical Pharmacology*, 161, 149-162.
- Kaczanowski, S. (2016). Apoptosis: its origin, history, maintenance and the medical implications for cancer and aging. *Physical Biology*. <https://doi.org/10.1088/1478-3975/13/3/031001>.
- Kinloch, R. A., Treherne, J.M., Furness, L.M. & Hajimohamadreza, I. (1999). The Pharmacology of Apoptosis. *Trends in Pharmacological Sciences*, 20 (1), 35–42. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(98\)01277-2](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(98)01277-2).
- Lee, D., Lee, S.R., Kang, K.S., Ko, Y., Pang, C., Yamabe, N. & Kim, K.H. (2019). Betulinic Acid Suppresses Ovarian Cancer Cell Proliferation through Induction of Apoptosis. *Biomolecules*, 9 (7),257. <https://doi.org/10.3390/BIOM9070257>.
- Luo, R., Fang, D., Chu, P., Wu, H., Zhang, Z. & Tang, Z. (2016). Multiple Molecular Targets in Breast Cancer Therapy by Betulinic Acid. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 84 (12), 1321–30. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2016.10.018>.
- Majeed, R., Hussain, A., Sangwan, P. L, Chinthakindi, P. K., Khan, I., Sharma, P. R., Koul, S., Saxena, A.K., & Hamid, A. (2016). PI3K Target Based Novel Cyano Derivative of Betulinic Acid Induces Its Signalling Inhibition by Down-Regulation of PGSK3 β and Cyclin D1 and Potentially Checks Cancer Cell Proliferation. *Molecular Carcinogenesis*, 55 (5), 964–76. <https://doi.org/10.1002/MC.22339>.
- Makker, V., MacKay, H., Ray-Coquard, I., Levine, D. A., Westin, S. N., Aoki, D., & Oaknin, A. (2021). Endometrial cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 7 (1), 88.
- Matias-Guiu, X., Prat, J. (2013). Molecular Pathology of Endometrial Carcinoma. *Histopathology*, 62 (1), 111–23. <https://doi.org/10.1111/his.12053>.
- Maxey, A.P., McCain, M.L. (2021). Tools, Techniques, and Future Opportunities for Characterizing the Mechanobiology of Uterine Myometrium. *Experimental Biology and Medicine*. <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/1535370221989259>.
- Meireles, C. G., Pereira, S. A., Valadares, L. P., Rêgo, D. F., Simeoni, L. A., Guerra, E.N. & Lofrano-Porto, A. (2017). Effects of Metformin on Endometrial Cancer: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gynecologic Oncology*, 147 (1), 167–80. <https://doi.org/10.1016/J.YGYNO.2017.07.120>.
- Mills, A.M., Longacre, T.A (2010). Endometrial Hyperplasia. *Seminars in Diagnostic Pathology*. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740257010000997>.
- Mescher, L.M. (2019). *Junqueira Temel Histoloji(14.Baskı)*. Güneş Tıp Kitapevleri. <https://www.google.com/search?q=junqueira+histology+16th+edition+pdf&oq=janquera+histology+&aqs=chrome.1.69i57j0i13i512l4j0i22i30i5.12308j0j1&sourceid=chrome&ie=UTF-8>.
- Mescher, L.M. (2019). *Junqueira Temel Histoloji(14.Baskı)*. Güneş Tıp Kitapevleri. <https://www.google.com/search?q=junqueira+histology+16th+edition+pdf&oq=janquera+histology+&aqs=chrome.1.69i57j0i13i512l4j0i22i30i5.12308j0j1&sourceid=chrome&ie=UTF-8>.
- Moncada-Madrado, M. ve Valero, C.R. (2022). “Embryology, Uterus.” *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547748/>.

- Mullauer, F.B., Bloois, L.V., Daalhuisen, J.B., Brink, T., Storm, G., Medema, J.P., Schiffelers, R.M. & Kessler, J. H. (2011). Betulinic Acid Delivered in Liposomes Reduces Growth of Human Lung and Colon Cancers in Mice without Causing Systemic Toxicity. *Anti-Cancer Drugs*, 22 (3), 223–33. <https://doi.org/10.1097/CAD.0B013E3283421035>.
- Namazov, A., Gemer, O., Ben-Arie, A., Israeli, O., Bart, O., Saphier, O., & Silberstein, T. (2019). Endometrial polyp size and the risk of malignancy in asymptomatic postmenopausal women. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada*, 41 (7), 912-915.
- Nergiz, Y. (2017). Puberte: Erkek ve dişilerde üreme sistemi histolojisi. *Orient yayınları*. https://www.researchgate.net/profile/YusufHaspolat/publication/351415429_Puberte/links/60a0e2eaa6fdcccac5a1d64/Puberte.pdf#page=31.
- Njoku, K., Abiola, J., Russell, J., & Crosbie, E. J. (2020). Endometrial Cancer Prevention in High-Risk Women. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 65 (5), 66–78. <https://doi.org/10.1016/J.BPOBGYN.2019.12.005>.
- Passarello, K., Kurian, S., & Villanueva V. (2019). Endometrial Cancer: An Overview of Pathophysiology, Management, and Care. *Seminars in oncology nursing*. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0749208119300130?casa_token=U-N_JMVtHr4AAAAA:b2ttN7GGveXfyZy_6LprgJ0zi2ZYxZnFnsYSpbIF1t8eV3IE1kIXF5CnIdg2xLAKPggQDt5hE64.
- Pawlina W., Ross M.H. (2014). *Histoloji konu anlatımı ve atlas (6.baskı)*. Palme yayıncılık.
- Peña-Blanco, A., & García-Sáeza A.J. (2018). Bax, Bak and beyond — Mitochondrial Performance in Apoptosis. *FEBS Journal*, 285 (3), 416–31. <https://doi.org/10.1111/FEBS.14186>.
- Potze, L., Di Franco, S., Grandela, C., Pras-Raves, M. L., Picavet, D. I., Van Veen, H. A., Van Lenthe, H. & (2016). Betulinic Acid Induces a Novel Cell Death Pathway That Depends on Cardiolipin Modification. *Oncogene*, 35 (4), 427–37. <https://doi.org/10.1038/ONC.2015.102>.
- Raglan, O., Kalliala, I., Markozannes, G., Cividini, S., Gunter, M. J., Nautiyal, J., Gabra, H. & (2019). Risk Factors for Endometrial Cancer: An Umbrella Review of the Literature. *Wiley Online Library*, 145 (7), 1719–30. <https://doi.org/10.1002/ijc.31961>.
- Ring, K.L., Mills, A.M., & Modesitt, S.C. (2022). Endometrial Hyperplasia. *Obstetrics & Gynecology*. https://journals.lww.com/greenjournal/Fulltext/2022/12000/Endometrial_Hyperplasia.23.aspx?casa_token=HmSWcqFUxJ4AAAAA:iqo2izC4mo0__1P2I5CAzVah7sESW2B8kTSboJ0pvlxik6RLMMYQgJXR3H9rVvy3s0XGSHHcyT5d5U_jmJILWYy.
- Ríos, J. L. ve Máñez, S. (2018). New Pharmacological Opportunities for Betulinic Acid. *Planta Medica*, 84(1), 8–19. <https://doi.org/10.1055/S-0043-123472>.
- Sadler, T.M. (2017). Longman Medikal Embriyoloji (13.baskı). *Palme Yayıncılık*.
- Setiawan, V. W., Yang, H. P., McCann, M. C., Yu, S. E., & Xiang, H. (2013). Type I and II endometrial cancers: have they different risk factors?. *Journal of Clinical Oncology*, 31(20), 2607.
- Sorosky, J.I. (2008). Endometrial Cancer. *Obstetrics & Gynecology. Journals*. https://journals.lww.com/greenjournal/Fulltext/2008/02000/Endometrial_Cancer.27.aspx?casa_token=-CDoAsCLF9kAAAAA:yOqm0QLn5XIC0yswaEHYAZpyUqwjaHjECBMBCoJ0zJNIsesxcC6jrUOkCgUmbc3iCNHgvQGopoBhokLFhH4oSU0.
- Sorosky, J.I. (2012). Endometrial Cancer. *Obstetrics & Gynecology. Journals.Lww.Com*. https://journals.lww.com/greenjournal/Fulltext/2012/08000/Endometrial_Cancer.30.aspx?casa_token=VpppfK_0iWkAAAAA:gBR0jtAB0EvNq4hNURQX3yeoozr_HDjvq5F7BVgcnN85M0aUkV7olP8FAk4NzDr76-IOVPMaB4qx77DSsIX83Ng.
- Slomovitz, B. M., ve Coleman, R. L. (2012). The PI3K/AKT/MTOR Pathway as a Therapeutic Target in Endometrial Cancer. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 18 (21), 5856–64. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0662>.

- Sobczuk, K., ve Sobczuk, A. (2017). New Classification System of Endometrial Hyperplasia WHO 2014 and Its Clinical Implications. *Menopause Review/Przegląd Menopauzalny*. <https://doi.org/10.5114/pm.2017.70589>.
- Qu, J., Sun, Y., Yang, L., Niu, X. & Li, L. (2022). Fucoxanthin Prevents Cell Growth and Induces Apoptosis in Endometrial Cancer HEC-1A Cells by the Inhibition of the PI3K/Akt/MTOR Pathway. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 36 (6), e23027. <https://doi.org/10.1002/JBT.23027>.
- Uharček, P. (2008). Prognostic Factors in Endometrial Carcinoma. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 34 (5), 776–83. <https://doi.org/10.1111/J.1447-0756.2008.00796.X>.
- Vilella, F., Wang, W., Moreno, I., Quake, S. R., & Simon, C. (2021). Understanding the human endometrium in the 21st century. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 225 (1), 1-2. [https://www.ajog.org/article/S0002-9378\(21\)00453-1/abstract](https://www.ajog.org/article/S0002-9378(21)00453-1/abstract).
- Wang, H., Dong, F., Wang, Y., Wang, X., Hong, D., Liu, Y. & Zhou, J. (2020). Betulinic Acid Induces Apoptosis of Gallbladder Cancer Cells via Repressing SCD1. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 52 (2), 200–206. <https://doi.org/10.1093/ABBS/GMZ148>.
- Yen, T. T., Wang, T. L., Fader, A. N., Shih, I. M., & Gaillard, S. (2020). Molecular classification and emerging targeted therapy in endometrial cancer. *International journal of gynecological pathology: official journal of the International Society of Gynecological Pathologists*, 39(1), 26.
- Yurasakpong, L., Nantasenamat, C., Nobsathian, S., Chaithirayanon, K. & Apisawetakan, S. (2021). Betulinic Acid Modulates the Expression of HSPA and Activates Apoptosis in Two Cell Lines of Human Colorectal Cancer. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26216377>.
- Zeng, A., Hua H., Liu, L. & Zhao, J. (2019). Betulinic Acid Induces Apoptosis and Inhibits Metastasis of Human Colorectal Cancer Cells in Vitro and in Vivo. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 27 (12), 2546–52. <https://doi.org/10.1016/J.BMC.2019.03.033>.
- Zhang, M., Lu, Q., Hou, H., Sun, D., Chen, M., Ning, F., Wu, P. &. (2021). Garcinol Inhibits the Proliferation of Endometrial Cancer Cells by Inducing Cell Cycle Arrest. *Oncology Reports*, 45 (2), 630–40. <https://doi.org/10.3892/OR.2020.7900>.
- Zhang, X., Hu, J. & Chen, Y. (2016). Betulinic Acid and the Pharmacological Effects of Tumor Suppression (Review). *Molecular Medicine Reports*, 14 (5), 4489–95. <https://doi.org/10.3892/MMR.2016.5792>.
- Zhang, Y., He, N., Zhou, X., Wang, F., Cai, H., Huang, S.H., Chen, X., Hu, Z. & Jin, X. (2021). Betulinic Acid Induces Autophagy-Dependent Apoptosis via Bmi-1/ROS/AMPK-MTOR-ULK1 Axis in Human Bladder Cancer Cells. *Aging*, 13 (17), 21251. <https://doi.org/10.18632/AGING.203441>.
- Zhao, H., Mu, X., Zhang, X. & You, Q. (2020). Lung Cancer Inhibition by Betulinic Acid Nanoparticles via Adenosine 5'-Triphosphate (ATP)-Binding Cassette Transporter G1 Gene Downregulation. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 26 (4), e922092-1. <https://doi.org/10.12659/MSM.922092>.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Gözde KORKUSUZ
Eğitim	
Lise	Bursa ÖZEL BEYAZIT KAMPÜS TEMEL LİSESİ (2016)
Lisans	Bursa Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi (2016-2020)
Yüksek Lisans	Balıkesir Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı (2021-...)
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce	Orta derecede (Yökdil: 66, Eylül 2022)
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	
Kuruluş Adı	Türk Histoloji ve Embriyoloji Derneği



Eğitimde, bilimde, sanatta çağdaş...



Balıkesir Üniversitesi
Tıp Fakültesi Dekanlık Binası
Çağış Yerleşkesi/BALIKESİR



(0 266) 612 14 62
sagbilen@balikesir.edu.tr
<http://www.balikesir.edu.tr>

