

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
MERAM TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

RESVERATROLÜN ISHİKAWA ENDOMETRİYAL KANSER
HÜCRELERİNDEKİ APOPTOZİS VE OTOFAJİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Dr. Mediha GÜL TOL

UZMANLIK TEZİ

KONYA, 2023

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
MERAM TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

RESVERATROLÜN ISHİKAWA ENDOMETRİYAL KANSER
HÜCRELERİNDEKİ APOPTOZİS VE OTOFAJİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Dr. Mediha GÜL TOL

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Prof. Dr. S. Serpil KALKAN

KONYA, 2023

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitim sürem boyunca beraber olduğum saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Aydan Özgörgülü, Prof. Dr. Selçuk Duman, Prof. Dr. Tahsin Murad Aktan, Öğretim Görevlisi Dr. Burcu Gültekin ve mesai arkadaşlarıma,

Uzmanlık eğitimim süresince desteklerini esirgemeyen danışman hocam ve aynı zamanda Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı olan Prof. Dr. S.Serpil Kalkan'a ve çalışmama sağladığı katkılardan dolayı hocam Doç. Dr. Gökhan Cüce'ye,

Hayatımın her anında yanımda olan, sevgilerini ve desteklerini benden esirgemeyen sevgili annem, babam, kardeşlerim, değerli eşim Dr. Fatih Tol ve canım oğlum Ahmet Yiğit'e teşekkür ederim.

Bu zorlu süreçte sabır ve anlayışla bana destek olan eşime ayrıca teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün desteği ile gerçekleştirilmiş ve Prof. Dr. S.Serpil Kalkan gözetiminde hazırlanmış olup, Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Dekanlığı'na bitirme tezi olarak sunulmuştur.

Dr. Mediha GÜL TOL

ÖZET

RESVERATROLÜN ISHIKAWA ENDOMETRİYAL KANSER HÜCRELERİNDEKİ APOPTOZİS VE OTOFAJİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Mediha Gül Tol, Tıpta Uzmanlık Tezi, Konya 2023

Endometriyum kanseri, kadınlarda jinekolojik kanserler içinde birinci sırada yer alan bir kanser tipidir. Tanı ve tedavi aşaması üzerine olan çalışmalar son zamanlarda önem kazanmıştır. Mevcut tedavi seçeneklerine ek olarak geleneksel ilaçlar geliştirilmeye çalışılmaktadır.

Resveratrol, antiinflamatuvar, antikanser etki gibi birçok biyolojik etkisi olan bir fitoaleksindir. Resveratrol'ün kanserdeki terapötik etkisini hücre ölüm mekanizmaları yoluyla gösterdiği düşünülmektedir. Ancak bu etkilerinin mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Bu çalışmada Resveratrol'ün endometrial kanser hücre hattı olan Ishikawa hücreleri üzerindeki doz bağımlı etkilerini araştırmak amaçlanmıştır.

Resveratrol'ün Ishikawa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi MTT testi ile belirlendi. IC50 dozu ile RT-qPCR ile Apoptoz ve Otofaji ilişkili Genlerin mRNA Ekspresyon Analizi gerçekleştirildi. IC50 dozu uygulandıktan sonra immunoflorasan boyama yapıldı. Resveratrol'ün, Ishikawa hücrelerinin proliferasyonunu doza bağlı bir şekilde inhibe ettiği görüldü. IC50 doz grubu, kontrol grubu hücreleri ile mRNA ekspresyon düzeylerine göre karşılaştırıldığında Beclin-1, LC3-I, LC3-II, Casp-7, Casp-8, Casp-9, CycS ve FADD düzeylerinde anlamlı bir artış gözlemlendi.

Çalışmamızda, Resveratrol'ün apoptozisi ve otofajiyi indüklemesi kanser tedavisinde kullanılabilecek bir ajan olabileceğini düşündürmüştür. Resveratrol'ün anti kanser özelliklerinin klinik çalışmalarla da değerlendirilmesi; yeni tedavi stratejileri geliştirmek için önem arz etmektedir.

Anahtar kelimeler: Ishikawa hücreleri, hücre ölüm mekanizmaları, Resveratrol

NEÜ BAP Destek numarası: 221518010

ABSTRACT

EFFECTS OF RESVERATROL ON APOPTOSIS AND AUTOPHAGY IN ISHIKAWA ENDOMETRIAL CANCER CELLS

Mediha Gül Tol, Tıpta Uzmanlık Tezi, Konya 2023

Endometrial cancer is the first type of cancer among gynecological cancers in women. Studies on diagnosis and treatment phase have gained importance recently. In addition to existing treatment options, traditional medicines are being developed.

Resveratrol is a phytoalexin with many biological effects such as anti-inflammatory and anticancer effects. Resveratrol is thought to exert its therapeutic effect in cancer through cell death mechanisms. However, the mechanism of these effects is not fully understood. In this study, it was aimed to investigate the dose-dependent effects of Resveratrol on Ishikawa cells, an endometrial cancer cell line.

The cytotoxic effect of resveratrol on Ishikawa cells was determined by MTT test. mRNA Expression Analysis of Apoptosis and Autophagy Associated Genes by RT-qPCR with IC₅₀ dose was performed. After the IC₅₀ dose was applied, immunofluorescent staining was performed. Resveratrol appeared to inhibit the proliferation of Ishikawa cells in a dose-dependent manner. When the IC₅₀ dose group was compared with the control group cells according to their mRNA expression levels, a significant increase was observed in the levels of Beclin-1, LC3-I, LC3-II, Casp-7, Casp-8, Casp-9, CycS and FADD.

In our study, Resveratrol's induction of apoptosis and autophagy suggested that it may be an agent that can be used in cancer treatment. Evaluation of the anti-cancer properties of resveratrol in clinical studies; It is important to develop new treatment strategies.

Keywords: Ishikawa cells, cell death mechanisms, Resveratrol

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
KISALTMA VE SİMGELER	viii
TABLolar.....	xi
ŞEKİLLER	xii
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. DIŞI GENİTAL SİSTEM.....	3
2.1.1. Dışi Genital Sistem Embriyolojisi.....	3
2.1.2. Dışi Genital Sistem Histolojisi	5
2.1.2.1. Ovaryumlar.....	5
2.1.2.2. Tuba Uterina	6
2.1.2.3. Vajina	7
2.1.2.4. Uterus	7
2.2. APOPTOZİS.....	11
2.2.1. İntrinsik yolak.....	13
2.2.2. Ekstrinsik yolak	14
2.3. OTOFAJİ.....	16
2.3.1. Otofaji ve Apoptosis İlişkisi.....	21
2.3.2. Otofaji ve Kanser.....	22
2.4. ENDOMETRİYUM KANSERİ.....	23
2.5. RESVERATROL	25

2.5.1. Resveratrol ve Kanser.....	25
2.6. ISHİKAWA HÜCRELERİ.....	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	28
3.1. Kimyasallar.....	28
3.2.Hücre Kültürü ve MTT Analizi	28
3.3. RT-qPCR (Gerçek Zamanlı-kantitatif PCR) ile Genlerin Ekspresyon Analizi.....	29
3.4. İmmunoflorasan Boyama	30
3.5. Yara İyileşme Testi.....	31
3.6. İstatistiksel Analiz	31
4.BULGULAR	32
4.1. Hücre canlılığı ve MTT Analizi	32
4.2. İmmunoflorasan Boyama	33
4.3. Gen Ekspresyon Sonuçları	36
4.4. Yara İyileşme Testi.....	37
5.TARTIŞMA.....	38
6.SONUÇ VE ÖNERİLER	41
7. KAYNAKLAR.....	42
8. EKLER	49

KISALTMA VE SİMGELER

AIF	: Apoptoz indükleyici faktör
AMP	: Adenozin Monofosfat
AMPK	: AMP ile aktive olan protein kinaz
APAF-1	: Apoptotik proteaz aktivasyon faktörü-1
ATG	: Otofajiyle ilgili genler
ATP	: Adenozin trifosfat
BAD	: Bcl-2 ilişkili ölüm organizatörü
BAK	: Bcl-2 homolog antagonisti
BAX	: Bcl-2 ilişkili x proteini
BCL-2	: B-hücre lenfoması 2
BCL-X	: Bcl-2 homolog protein
CAD	: Kaspaz aktive edici DNaz
Casp	: Kaspaz
CSF	: Koloni uyarıcı faktörler
DAPI	: 4'-6-diamidino-2-fenilindol
DISC	: Ölüm tetikleyici sinyal kompleksi
DMEM	: Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
Endo-G	: Endonukleaz-G
FADD	: Fas ile ilişkili ölüm alanı
FAS	: CD95, apo-1
FBS	: Fötal bovin serum

HSC : Isı şok proteinleri

IAPs : Apoptoz protein inhibitörleri

ICAD : İnaktif kaspaz aktive edici DNaz

IGF : İnsülin benzeri büyüme faktörü

IFN γ : İnterferon Gama

IL-2 : İnterlökin -2

KFER Q : K, lizin; F, fenilalanin; E, glutamik asit; R, arginin; Q, glutamin amino asiti

LAMP : Lizozomal ilişkili protein

LC 3 : Hafif zincir 3

mTOR : Memeli rapamisin hedefi

MTT : 3-[4,5-dimetil-2-tiazolil]-2,5-difenil tetrazolyum bromid

PAS : Fagofor oluşum bölgesi

PE : Fosfotidil etonolamin

PI3K : Fosfoinositol 3 fosfat kinaz

RNA : Ribonükleik asit

RT-PCR: Revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu

SIRT 1 : Sirtuin 1

TNF : Tümör nekroz faktör

TNFR : Tümör nekroz faktör reseptör

ULK 1 : Unc-51 benzeri kinaz 1

°C : Santigrat derece

µl : Mikrolitre

dk : Dakika

g : Gram

mg : Miligram

ml : Mililitre

nm : Nanometre

sa : saat

sn : saniye

TABLÖLAR

Tablo 1: Anti Beclin-1 immünohistokimya boyama basamakları ve süreleri

Tablo 2: Anti-Beclin-1 antikor skörlama sonuçları

ŞEKİLLER

Şekil 1: Dişi genital sistem iç organları

Şekil 2: Ovaryum foliküllerinin gelişimi

Şekil 3: Uterus duvarı proliferatif (foliküler) faz

Şekil 4: Uterus duvarı sekresyon (luteal) fazı

Şekil 5: Apoptozis intrinsik yolak

Şekil 6: Apoptozis ekstrinsik yolak

Şekil 7: Apoptozis ile ilişkili moleküller

Şekil 8: Makrotofajide gözlenen olaylar

Şekil 9: Otofajide otofagozom oluşum aşamaları

Şekil 10: Otofagozom oluşumu ve ilgili proteinler

Şekil 11: 24 saat Resveratrol dozunun MTT test sonuçları

Şekil 12: 48 saat Resveratrol dozunun MTT test sonuçları

Şekil 13: Kontrol grubu Anti Beclin-1 immün floresan boyaması

Şekil 14: Resveratrol grubu Anti Beclin-1 immün floresan boyaması

Şekil 15: Resveratrol grubu Anti Beclin-1 immün floresan boyaması

Şekil 16: Ishikawa hücrelerine uygulanan Resveratrol'ün apoptozis ve otofaji-ilişkili genlerin mRNA Ekspresyonları üzerindeki etkisi

Şekil 17: Yara İyileşme Testi

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Kadınlarda en sık görülen ilk beş kanser türü meme, tiroit, kolon, akciğer ve uterus korpus kanserleridir. Endometriyum kanseri, uterus korpus kanserleri arasında yer alır ve özellikle 50-69 yaş grubundaki kadınlarda endometriyum kanseri görülme oranı % 8,1'dir (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2017). Jinekolojik maligniteler arasında ise en sık olan endometriyum kanseridir ve genç yaşlarda bile artan morbidite ile ilişkilidir. Bundan dolayı tanı ve tedavi aşaması üzerine olan çalışmalar son zamanlarda önem kazanmıştır (Globocan, 2020).

Son yıllarda, kanser ile ilgili araştırmalar, sitogenetik çalışmalar, aşı ve ilaç geliştirme çalışmalarında hücre kültürleri yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Hücre kültürlerinde, kısa zaman aralığında incelenmek istenip, in vivo şartlarda kısa sürede gerçekleştirilmesi mümkün olmayan, çeşitli fiziksel veya kimyasal etkenler incelenebilir. Hücre kültürleri, dokuların vücut dışında da canlılığını korumasının sağlandığı, sürekli üretimi ve gelişimini sürdürdüğü alanları ifade eder. Canlı dokulardan elde edilen hücreler, vücut ısılarında kültüre edilip; hücrelerin yaşayabileceği özgün fizyolojik vücut durumunu taklit eden besleyici sıvılarda beslenerek çoğaltılmaktadırlar. Bu sayede gerek normal durumlar olsun veya gerek patolojik durumlar olsun canlı hücre düzeyinde gözlenip, değerlendirilmekte ve üzerinde çalışılabilme fırsatı sunmaktadır (Oncology. ASoC., 2009).

Resveratrol, birçok bitki türünde bulunan özellikle de antikanser etkisi olan bir fitoaleksindir. Resveratrol' ün antikanser etkisine, apoptozis ve otofaji yoluyla kanser hücresi ölümünü indüklemeye ve ayrıca metastaz ve anjiyogenezi inhibe etme yeteneği dahil olmak üzere çok çeşitli mekanizmaların katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Resveratrol' ün promiyelositik lösemi, meme, over, prostat, akciğer kanseri, rabdomyosarkom ve kolon kanseri hücreleri gibi kanser hücre hatlarındaki etkilerine yönelik bazı çalışmalar mevcuttur (Alkhalaf, 2007; Bishayee, 2009; Malhotra ve ark., 2011; Leon ve ark., 2012; Miki ve ark., 2012; Singh ve ark. 2014).

Apoptozis, canlıda homeostatik bir mekanizma olarak ortaya çıkan programlanmış bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Ayrıca apoptozis bir savunma mekanizması olarak veya hücreler hastalık ve zararlı maddeler tarafından hasar gördüğünde ortaya çıkar (Elmore S., 2007). Apoptozis, fizyolojik ve patolojik koşullarda meydana gelen düzenlenmiş bir

hücrel süreçtir. Apoptozisin altta yatan mekanizmasının anlaşılması, birçok hastalığın patogeneğinde çok önemli bir rol oynadığı için önemlidir. Apoptozisin mekanizması karmaşıktır ve birçok yolu içerir. Bu yolların herhangi bir noktasında meydana gelen kusurlar, etkilenen hücrelerin kötü huylu transformasyonuna, tümör metastazına ve antikanser ilaçlara direnç yol açar. Apoptozis, birçok tedavi stratejisinin popüler hedefi olduğundan kanser tedavisinde önemli bir rol oynar (Wong RS., 2011). Resveratrolün genel olarak kanser üzerindeki apoptozise bağlı etkileri mevcut çalışmalarla öngörölmele birlikte endometrium kanser hücre hattındaki etkileri üzerindeki çalışmalar sınırlıdır. Ayrıca Resveratrol ile indüklenen apoptozisin kesin mekanizması da hala iyi tanımlanamamıştır.

Otofaji, ökaryotik hücrelerde protein homeostazını sürdürmek ve organellerin geri dönüşümünü sağlamak için meydana gelen katabolik bir süreçtir (Kroemer ve ark., 2010). Açlık ve hipoksi gibi stres dönemlerinde güçlenir, hücrenin hayatta kalmasına yardımcı olur ve apoptozis ve antijen ekspresyonu gibi hücrel mekanizmalarla bağlantılıdır (Abdel Karim ve ark., 2019). Otofajinin kanserdeki rolü önemlidir. Premalign lezyonlar üzerine yapılan birçok çalışma, otofaji indükleyicilerin kanser gelişimini önleyebileceğini göstermektedir. Tersine, ileri evre kanserlerde hem otofajiyi güçlendiren hem de inhibe eden terapötik stratejiler önerilmiştir (Amaravadi ve ark., 2016). Otofaji regülasyonu kanser tedavilerinde önemli bir rol oynar ve otofajinin işlevini modüle etmek için çeşitli yaklaşımların geliştirilmesi kritik önem taşır (Levine ve ark., 2007). Resveratrolün kanser üzerindeki etkisine yönelik çalışmalar olsa da otofaji üzerine olan etkileri belirsizliğini korumaktadır.

Amacımız, endometriyum kanseri hücre hattı olan Ishikawa hücrelerine Resveratrol uygulaması yapmak ve Resveratrol' ün apoptozis veya otofaji aracılı etkisini gözlemlemektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. DIŞI GENİTAL SİSTEM

2.1.1. Dişi Genital Sistem Embriyolojisi

Genital kanalların gelişimi sırasında ilk başta hem erkek hem dişi embriyolarda mezonefrik (Wolffian duktus) ve paramezonefrik (Müllerian duktus) kanallar birlikte bulunur. Genital sistemin erken dönemi her iki cinsiyette benzer olduğundan dolayı bu dönem ‘seksüel gelişmenin farklanmamış safhası’ olarak adlandırılır (Young, 2000). Paramezonefrik kanal (Müllerian duktus) dişi üreme sisteminin, Mezonefrik kanal (Wolffian duktus) erkek üreme sisteminin gelişiminde rol alır. Gonadların ve mezonefrik kanalların lateralinde gelişen paramezonefrik kanallar (Müllerian duktus), dişi üreme sisteminin gelişiminde rol oynar (Moore, 2016).

Mezonefrozların lateral kısımlarında, mezotelin longitudinal invajinasyonlarının kenarlarının birbirleriyle kaynaşmasıyla Mezonefrik ve Paramezonefrik duktuslar oluşurlar. Paramezonefrik kanalların kranial uçları periton boşluğuna açılırlar, embriyonun pelvik bölgesine ulaşana kadar mezonefrik kanallara paralel olarak uzanırlar. Pelvik bölgeye ulaştıklarında yani 8.haftada, mezonefrik kanalları ventralde çaprazlayıp orta hatta birbirleriyle birleşirler ve Y şeklindeki uterovajinal primordiyumu meydana getirirler. Ürogenital sinüsün dorsal duvarının içine uzanan bu tübüler yapı burada bir kabarıklık oluşturur. 9. haftada oluşan bu kabarıklığa müllerian tüberkül adı verilir (Gray ve ark.,1973; Jones SW ve ark., 1981).

Dişi embriyolarında testosteron olmadığından dolayı mezonefrik kanallar geriler ve Müllerian inhibitör madde olmadığı için paramezonefrik kanallar ana genital kanal haline gelir. Her kanalın başlangıçta kranial vertikal parça, horizontal parça ve kaudal vertikal parça olmak üzere üç bölümü vardır. Birleşmemiş kranial vertikal parça ve horizontal parçadan fallopi tüpleri gelişir. Paramezonefrik kanalların kaudal parçaları ise kaynaşarak uterovajinal primordiyumu oluştururlar. Maternal overler ve plasentadan üretilen östrojenler, uterin tüplerin, uterusun ve vajinanın üst kısmının gelişimini uyarır. Kaynaşan paramezonefrik kanallardan korpus uteri, serviks uteri ve vajenin üst kısmı gelişir. Bunların etrafı mezenşim tabakasıyla sarılıdır. Mezenşim tabakası uterusun muskuler tabakasını (miyometriyum) ve peritoneal örtüsünü (perimetrium) meydana getirir (Moore, 2016; Sadler, 2017).

Gebeliğin yaklaşık 10. haftasında endometriyumda gland yapıları oluşmaya başlar. Endometriyum ve miyometriyum, gelişmesini doğuma kadar sürdürür. Doğumda anneden kaynaklanan hormonal etkiyle sekretuar veya proliferatif aktivite gösterebilse de yaklaşık bir ay sonra bu aktivite sona erer ve puberteye kadar atrofik olarak kalır (Kayalı ve ark., 1992; Atasii ve ark., 1996).

Yaklaşık 5. haftada gonadal gelişimin ilk safhaları ortaya çıkar. Gonadlar seks hücrelerini üretirler ve posterior abdominal duvarın mezodermal epiteli, altındaki mezankimal doku ve primordiyal germ hücreleri olmak üzere üç kaynaktan köken alırlar (Young, 2000).

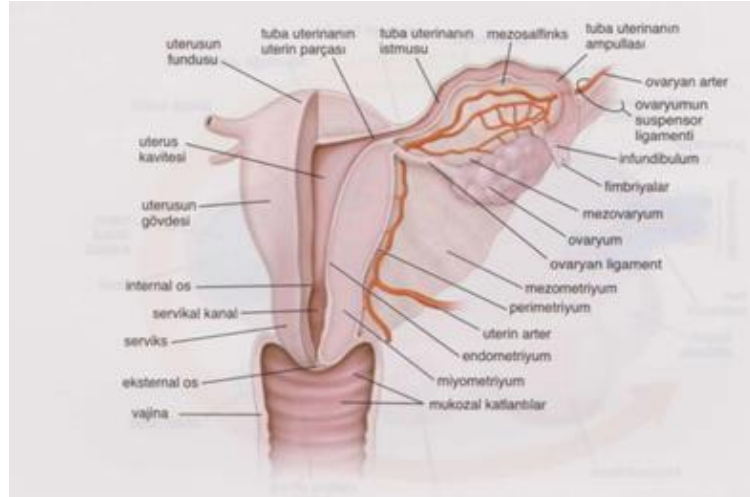
Gonadların gelişimi gonadal veya genital sırt denilen bir çift uzunlamasına yapı şeklinde başlar. Bu yapılar epitelin proliferasyonu ve altındaki mezenşimin yoğunlaşmasıyla oluşur. Gonadların over veya testis yönünde farklılaşmasını indükleyen primordiyal germ hücreleri, gelişimin 6. haftasında genital sırtlara ulaşır. Germ hücrelerinin genital sırtlara ulaşması önemlidir çünkü bu hücreler genital sırtlara ulaşamazsa gonadların gelişimi olmaz. Primordiyal germ hücreleri genital sırta ulaştığında buradaki epitel hücreleri de proliferasyon olarak mezenşime gömülürler ve primitif cinsiyet kordonlarını meydana getirirler. Dişi embriyolarda primitif cinsiyet kordonları, primitif germ hücresi grupları içeren düzensiz hücre kümelerine ayrılır. Bu hücre kümeleri çoğunlukla overin meduller bölgesine yerleşmişlerdir. Daha sonra hücre kümeleri kaybolur ve yerini vasküler yapıdaki stromaya bırakılır. Erkek embriyodakinin aksine dişi embriyolarında gonadın yüzey epiteli çoğalmaya devam ederek kortikal kordonları oluşturur. Kortikal kordonlardaki hücre kümeleri proliferasyon olurlar ve her oogonyumun çevresini foliküler hücre tabakasıyla sararlar. Böylece foliküler hücreler ve oogonyumlar birlikte primordiyal folikülü oluştururlar (Eşrefoğlu, 2016; Sadler, 2017).

Dış genital yapıların gelişimi 7. haftanın sonuna kadar her iki cinsde benzerdir. 9. haftada cinsiyet farklılaşması ortaya çıkar fakat yine de 12. haftaya kadar farklılaşma tam değildir (Moore, 2016). Gelişimin 3. haftasında mezenşim hücreleri, kloakal katlantıları oluşturmak üzere kloakal membranın çevresine göç ederler. Kloakal katlantılar birleşerek kranialde genital tüberkülü oluşturur. Kaudalde ise yaklaşık 6. haftada, önde üretral katlantıyı, arkada anal katlantıyı oluşturacak biçimde ikiye bölünür (Sadler, 2017).

Dişi embriyolarda dış genital organların gelişimi östrojenlerle bağlantılıdır. Genital tüberkülden klitoris, üretral katlantılardan labia minör, genital şişliklerden labia majör gelişir. (Moore, 2016; Sadler, 2017)

2.1.2. Dişi Genital Sistem Histolojisi

Dişi üreme sistemi uterus, bir çift ovaryum, fallopi tüpleri (ovidukt veya tuba uterina), vajina ve dış genital yapılardan oluşur. Dış genital yapılar; mons pubis, labia minör, labia majör, klitoris ve vajina vestibülüdür. Dişi üreme sistemi, cinsiyet hormonlarının (östrojen ve progesteron) salınımı, oositin gelişimi, fertilizasyon için ve fetusun gelişimi için uygun ortamın sağlanması gibi birçok işlevi yerine getirir. Dişi genital sistemde menstrüel siklus adı verilen döngüyle hem yapısal hem fonksiyonel olarak aylık değişimler gözlenir (Eroschenko, 2016).



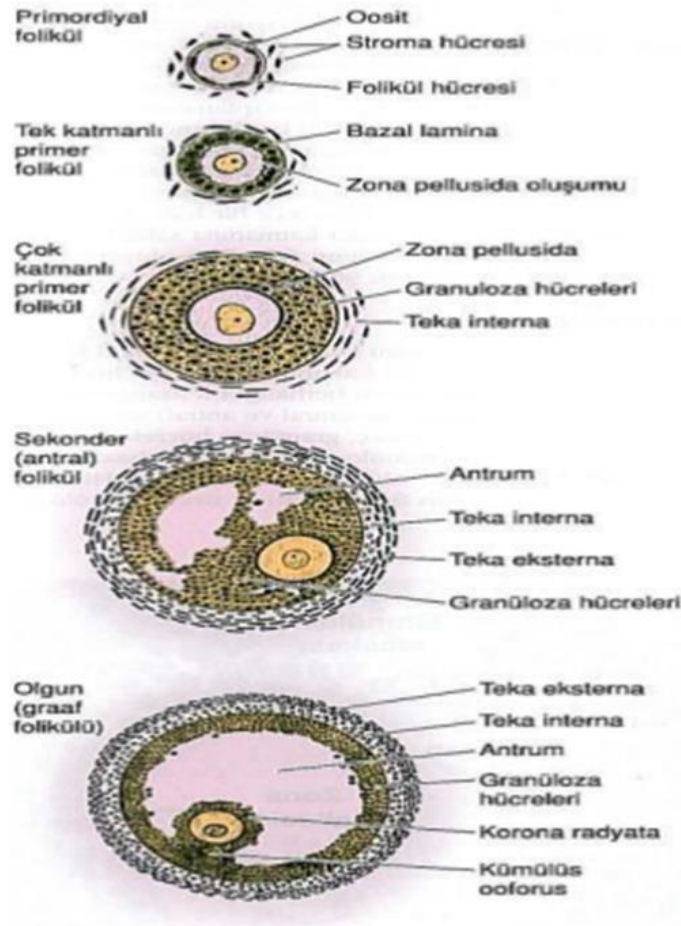
Şekil 1: Dişi genital sistem iç organları (Ross, 2013)

2.1.2.1. Ovaryumlar

Uterusun her iki yanında yerleşmiş badem şeklinde iki organ olan ovaryumlar, gamet üretiminden dolayı ekzokrin, steroid yapıdaki hormonları salgılamasından dolayı endokrin bez fonksiyonu görür.

Ovaryumun yüzeyini tek katlı kübik bazı bölgelerde de tek katlı yassı bir epitel olan germinal epitel örter. Bu yüzey epitelinin altında sıkı bir bağ doku tabakası olan tunika albuginea bulunur. Ovaryum, aralarında keskin bir sınır olmamakla birlikte, dışta korteks içte medulla olmak üzere iki bölümden meydana gelir. Korteks tabakasında foliküller görülür.

Foliküller histolojik olarak, primordiyal folikül, primer folikül, sekonder folikül ve tersiyer (olgun-graaf) folikül olarak sınıflanmıştır. Tek sıra yassı hücrelerden oluşan, primer oositi içeren, gelişimin ilk aşamasındaki foliküller primordiyal foliküllerdir. Folikül geliştikçe yassı hücreler önce kübik daha sonra prizmatik epitele dönüşür; primer folikül haline gelir. Primer folikülde hücre tabakası arttıkça hücreler arasında sıvı dolu boşluklar meydana gelmeye başlar. Bu boşluklar birleşerek antrum dediğimiz boşluğu oluşturur. Bu folikül sekonder folikül olarak isimlendirilir. Folikül geliştikçe antrum daha da genişler, oosit kenara itilir. Ovulasyona hazırlanan oositin görüldüğü bu folikül tersiyer foliküldür. Folikülleri içermeyen, çok sayıda damar ve sinir lifi içeren gevşek bağ dokusu yapısındaki içteki bölüm ise ovaryumun medullasıdır (Eşrefoğlu, 2016; Mescher, 2016).



Şekil 2: Ovaryum foliküllerinin gelişimi (Junqueira, 2003)

2.1.2.2. Tuba Uterina

Tuba uterinalar (ovidukt), uterustan ovaryumlara doğru bilateral olarak uzanan yaklaşık 10-12 cm uzunluğunda tüp şeklindeki organlardır. Anatomik olarak infundibulum,

ampulla, istmus ve intramural (interstisyel) olmak üzere dört bölüme ayrılır. İnfundibulum, tüpün ovaryuma komşu huni biçimli kısmıdır. Fimbriya adı verilen, oositin alınmasını sağlayan çok sayıda parmaklı çıkıntı içerir. Tüpün en uzun kısmı olan, fertilizasyonun da gerçekleştiği bölümü ampulladır (Ross, 2013).

Tuba uterinanın duvarı histolojik olarak üç tabakadan oluşmaktadır:

Tunika mukoza: En içte olan mukoza tabakası epitel ve lamina propriadan oluşur ve plika denilen uzunlamasına katlantılar oluşturur. Epiteli tek katlı silindirik (prizmatik) epiteldir, uterusu doğru hareketi sağlayan silyumlu hücreler ve salgı görevi olan silyumsuz hücreleri (Peg hücreleri) içerir.

Tunika muskularis: İçte sirküler dışta ise uzunlamasına kas tabakası içeren orta tabakadır. Uterusa doğru bu kas tabakasının kalınlığında artma gözlenir.

Tunika seroza: Mezotel ile döşeli en dış tabakadır (Eşrefoğlu, 2016).

2.1.2.3. Vajina

Vajina, serviksten vestibüle kadar uzanarak iç üreme organlarını dış ortama bağlayan fibromusküler bir kanaldır. Duvarı histolojik olarak mukoza, muskuler tabaka ve adventisyadan oluşur ve bez yapısı içermez. Mukoza epiteli çok katlı yassı epiteldir. Mukoza lamina propriası elastik liflerden zengindir. Muskuler tabakası içte sirküler dışta uzunlamasına iki düz kas tabakasından meydana gelir. Adventisyası içte elastik liflerden zengin, dış tabakası ise damar ve sinirlerden zengindir ve vajinayı çevre dokulara bağlar (Mescher, 2016).

2.1.2.4. Uterus

Uterus, pelviste mesane ile rektum arasında bulunan içi boş, armut şeklinde bir organdır. Dişi genital sistemin en kalın duvarlı organı olan uterus, her menstrüel siklusta endokrin sistemin de kontrolüyle çeşitli mukozal değişikliklere uğrar. Ayrıca gebelik sürecinde embriyonik ve fetal gelişime paralel olarak önemli değişiklikler geçiren bir organdır (Eşrefoğlu, 2016).

Anatomik olarak; fundus, korpus, istmus ve serviks bölümlerinden oluşur. Fundus, gövdenin uterin tüplerle olan bağlantısının üstünde kalan yuvarlak parçasıdır. Korpus, uterusun büyük üst gövde kısmıdır. Ön yüzeyi neredeyse düzken, arka yüzeyi konvektir. Serviks, uterusun vajinaya komşu, alttaki silindirik biçimli kısmıdır ve istmus tarafından

uterusun gövdesinden ayrılmaktadır. Servikal kanal denin lümeni, her iki ucunda ostium denilen dar açıklıklara sahiptir. İnternal os (iç ostium), uterin kaviteye; eksternal os (dış ostium) ise vajinaya açılır (Ross, 2013).

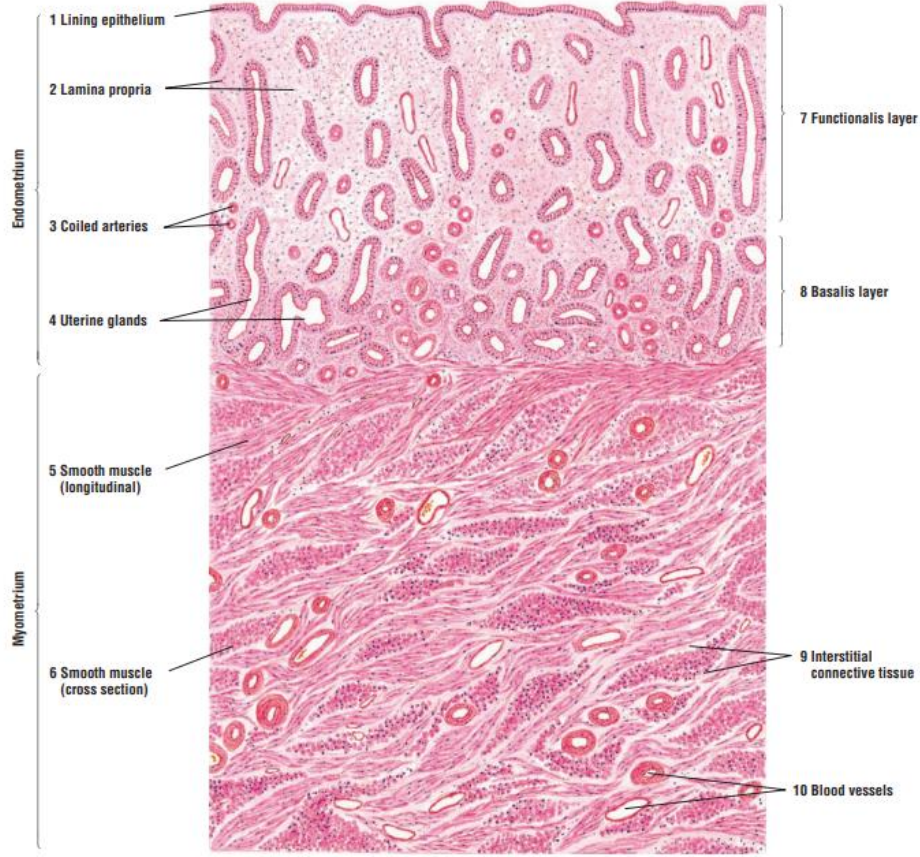
Uterusun duvarı histolojik olarak üç tabakadan oluşmaktadır. İçten dışa doğru bu tabakalar; tunika mukoza (endometriyum), tunika muskularis (miyometriyum) ve tunika serozadır (perimetriyum).

Tunika mukoza (endometriyum): Üreme çağında endometriyum, her ay kendisini embriyo implantasyonuna ve sonrasında gelen embriyonik ve fetal gelişim olaylarına hazırlayan, ovaryum foliküllerinin olgunlaşmaları ile de paralel bir seyir gösteren siklik değişimlere uğrar. Endometriyum, tek katlı silindirik epitel ile döşeli bir epitel tabakasından ve lamina propriyadan oluşur. Endometriyum stroması bol miktarda fibroblast ve tip III kollajen lifler içerir. Endometriyumun tek katlı silindirik epitel örtüsünde, titretilmiş tüylü hücreler ve salgılayıcı hücreler bulunur. Bu salgılayıcı hücreler çok sayıda uterus bezini döşer. Endometriyumda derin yerleşimli bazal tabaka ve yüzeysel yerleşimli işlevsel (fonksiyonel) tabaka olmak üzere iki bölüm bulunur. Bazal tabakası miyometriyuma komşudur, menstrüasyon sonrası endometriyumun rejenerasyonundan sorumlu rezerv tabakadır, uterus bezlerinin derin bazal uçlarını içerir ve lamina propriyası daha hücrelidir. Fonksiyonel tabakası ara maddeden daha zengindir ve yüzeysel epitelinin yanısıra bezlerin büyük bölümünü de içerir. Endometriyumun kalınlığı ve yapısı menstrüel döngüde hormonların seviyesindeki değişimlerden etkilenir. Bu değişimde esas olarak etkilenen tabaka işlevsel (fonksiyonel) tabakadır. Bazal tabaka ise nispeten değişmeden kalır. Endometriyal stroma, menstrüel siklus boyunca görünümünü değişen endometriyal stromal hücreler ve spiral arterioller, T lenfosit ve makrofajlardan oluşan stromal granülositler ve lipid içeren değişken stromal köpüksü hücreleri içerir. Endometriyum eşsiz bir kan damarları sistemine sahiptir ve endometriyumun damar ağı da her menstrual siklusa proliferasyon ve dejenerasyon olmaktadır (Rosai, 2004; Mescher, 2016).

Endometriyum, menstrüel siklusa ovaryum fonksiyonuyla ilişkili olarak morfolojik değişiklikler gösterir. Bu değişiklikler üç belirgin dönemde incelenir: Proliferatif (foliküler-çöğalma) fazı, sekresyon (luteal) fazı, menstrüel faz (Eroschenko, 2016).

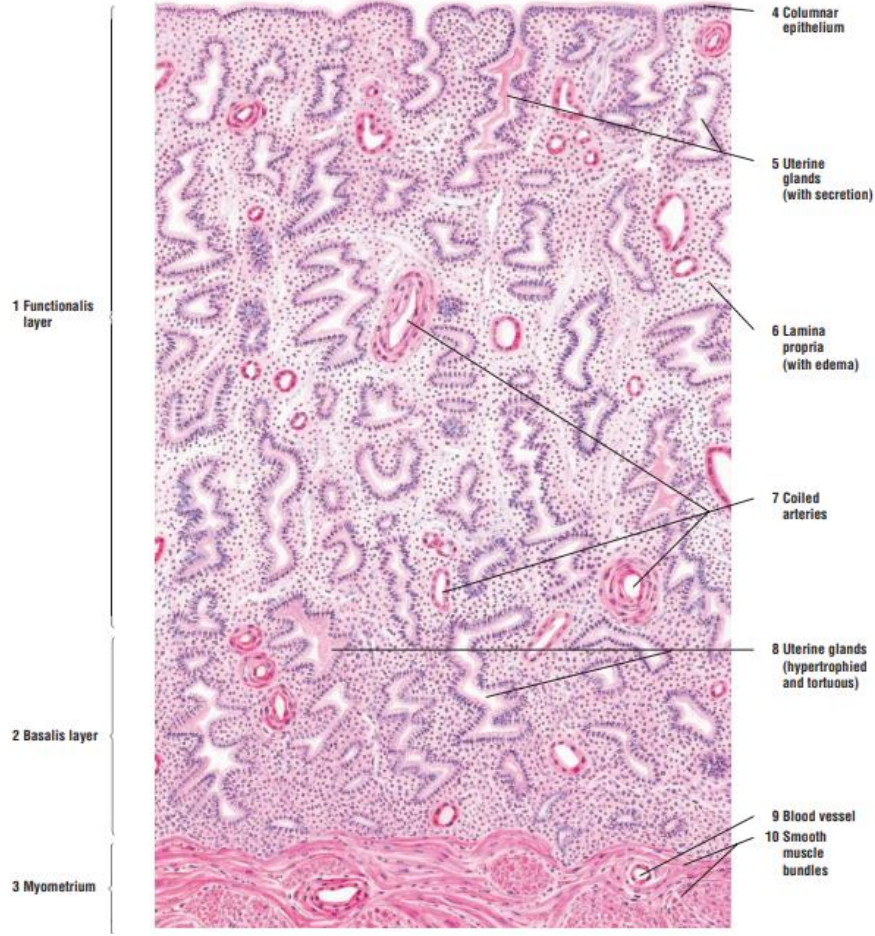
Proliferatif faz: Menstrüel faz sonrasında başlar ve yaklaşık 14. güne kadar sürer. Bu fazda mitotik aktivite artmıştır, bir rejenerasyon söz konusudur. Ovaryumdan salınan

östrojenlerin etkisi altındaki endometriyumda fonksiyonel tabaka kalınlaşır, Uterus bezleri uzar ve yüzeye doğru ilerler. Endometriyumun derin bölgelerinde spiral arterler görülür.



Şekil 3: Uterus duvarı proliferatif (foliküler) faz (Eroschenko, 2016)

Sekresyon fazı: Ovulasyondan sonra başlar ve bu dönemde endometriyum, korpus luteumdan salınan progesteronun etkisi altındadır. Bu dönemde, bezlerdeki hipertrofi ve oluşan ödem nedeniyle fonksiyonel ve bazal tabakalar kalınlaşır. Uterus bezleri kıvrıntılıdır ve glikojenden zengin sekresyon yaparlar. Spiral arterler daha da kıvrılır ve endometriyumun üst bölümlerine doğru uzanır.



Şekil 4: Uterus duvarı sekresyon (luteal) fazı (Eroschenko, 2016)

Menstrüel faz: Fertilizasyon ve implantasyon oluşmamışsa başlayan fazdır. Östrojen ve progesteron düzeyleri azalır, spiral arterlerin duvarında büzülme meydana gelir. Fonksiyonel tabakaya giden kan akışının azalmasıyla iskemi ve sonrasında bu tabakada dejenerasyon meydana gelir. Arterlerin duvarında uzun süren kasılmalar damar duvarında yırtılmaya sebep olur ve kanamayla sonuçlanır. Fonksiyonel tabaka nekroza uğrayarak dökülür (Eroschenko, 2016; Eşrefoğlu, 2016).

Tunika muskularis (miyometriyum): Uterus duvarının bağ dokusu ile birbirinden ayrılan kas liflerinden oluşan, uterusun en kalın tabakasıdır. Uterin tüpler ve vajinanın kas tabakası ile devamlılık gösterir. Sınırları birbirinden ayırt edilemeyen üç düz kas tabakasından oluşur. Bunlardan orta kas tabakası, çok sayıda büyük kan damarları (venöz pleksuslar) ve lenfatikler içermektedir ve bu tabakaya stratum vaskulare adı verilir. En kalın tabakadır ve spiral bir örüntü ile hizalanmış iç içe geçen düz kas demetlerine sahiptir. İç ve dış tabakalarda bulunan düz kas demetleri uterusun uzun eksenine paralel şekilde yerleşmişlerdir.

Tunika seroza (perimetriyum): Uterusun dıştaki bağ doku tabakasıdır. Bazı bölgeleri adventisya özelliği gösterirken bazı bölgeleri seroza özelliğindedir (Ross 2013).

2.2. APOPTOZİS

Sonbaharda ağaçların yapraklarının dökülmesi anlamındaki Yunanca bir sözcük olan apoptozis, embriyo döneminden ölüme kadar pek çok fizyolojik veya patolojik olayda görülebilen programlanmış bir hücre ölümü şeklidir (Cinel ve ark., 2002).

Apoptozis, embriyolojik gelişimde (organogenezis ve gelişim sürecinde parmakların ayrılması, damağın birleşmesi, sinir sisteminin gelişimi sırasında nöronların sayısının azaltılmasında görüldüğü gibi) ve yetişkin dokularda (overlerde foliküler atrezi, barsak epitel hücrelerinin yenilenmesi, immun sistem hücrelerinin seçilmesi gibi) hücre ölümünün fizyolojik olarak gerçekleştiği önemli bir rol üstlenir.

Hücrelerde yapım (mitoz) ve yıkım (apoptozis) arasında kontrollü bir denge vardır. Organizmada bu homeostatik dengenin korunması için hücrelerin doğru zamanda ve doğru miktarda apoptozise gitmesi gerekir. Bu dengenin apoptozis lehine veya aleyhine bozulması birçok önemli hastalığın patogenezinde rol alır. Eğer denge apoptozis lehine bozulmuşsa AIDS, hepatit C gibi hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar, aplastik anemi, enfarktüsler oluşur. Apoptozis aleyhine bir bozulma söz konusu olduğunda ise çeşitli otoimmun hastalıklar ve kanserler ortaya çıkar (Hotchkiss ve ark., 2009; Nagata ve ark., 2017).

Hücreler kendilerinde kodlanmış hücre ölüm programlarının aktivasyonu ile kendi ölümlerini başlatabilirler. Bu durum, apoptoziste hücrelerin kendi ölümlerinde pay sahibi olduğu anlamına gelir ve ayrıca hücrenin ölümü çeşitli iç veya dış sinyallerle uyarılabilir. Kaspazlar, Tümör Nekroz Faktör ailesi (TNF), Bcl-2 ailesi, apoptoz protein inhibitörleri (IAPs), p53 gibi birçok faktör apoptozisin düzenlenmesinde rol alır. Hücreye gelen çeşitli sinyaller kaspazları aktive etmektedir. Kaspazlar, apoptozisin gerçekleşmesini sağlayan ana moleküllerdir ve kaspazlar bir hücre içi proteaz sistemidir (Gupta ve ark., 2006; Muganda 2016).

Hücre dışı uyaranlar arasında; tümör nekroz faktörü (TNF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), koloni uyarıcı faktörler (CSF), IL-2 gibi maddelerin azalması, radyasyon, çeşitli toksinler, antijenler, glukokortikoidler, otoimmun hastalık gelişiminde rolü olduğu belirtilen Fas/FasL proteinleri, virüsler (influenza virüsü TNF reseptörü, HIV gp120 proteini üzerinden) yer alır (Erdoğan 2003, Gürbilek ve ark., 2004).

Hücre içi uyaranlar arasında; sitokinler, bir tümör baskılayıcı gen olan p53'ün aktive olması, DNA hasarı, hücre içi kalsiyum miktarında artış, bazı enfeksiyonlar, glukokortikoidler ve onkojenler, hücre içi pH'da düşme yer almaktadır. Bcl-2 ailesinden bazı genler (BHRL-1, Bcl-xl, Bcl-w, Bfl-1), c-abl geni, ras onkogeni, çözünebilir fas gibi genler apoptozisi baskımlarken; c-myc, p53, p21, fas (CD95/APO1), Bcl-2 ailesinden Bad, Bax, Bak, Bcl-xS, Bid gibi genler apoptozisin uyarılmasında rol alır (Öktem ve ark., 2004).

Apoptozise uğrayan hücreler, morfolojik ve biyokimyasal olarak bazı değışiklikler gösterir. Apoptoziste temel morfolojik olay, nükleusun yoğunlaşması ve daha sonra parçalara ayrılmasıdır (Galle, 1997).

DNA fragmentasyonu: Nüklear endonükleazlar DNA'yı seçici olarak kırarlar ve küçük fragmentasyonlar oluştururlar. Sonrasında nüklear kromatin kümelenir ve piknotik bir görünüm alır, nükleus nüklear zarf tarafından sınırlandırılmış parçalara bölünür.

Hücre hacminde azalma: Hücrelerin su kaybetmesiyle sitoplazma büzülür ve hücre hacminde azalma meydana gelir. Hücre iskeleti elemanları hücre yüzeyine paralel demetler halinde yeniden düzenlenir. Organeller birbirlerine yaklaşırlar.

Mitokondriyal fonksiyon kaybı: Mitokondriyal kanallardaki geçirgenlik artışından dolayı mitokondrinin bütünlüğü bozulur. Mitokondriyal membranlar arasından sitokrom c gibi proteinlerin salıverilmesiyle proteolitik enzimler olan kaspazlar aktive olur. Sitokrom c'nin düzenli bir şekilde salıverilmesi, mitokondrinin Bcl-2 proteinlerinin etkisi altında apoptozisi başlatmada karar verici olduğunu düşündürmektedir.

Membran kabarcıklanması: Apoptoziste hücre membranında da fiziksel ve kimyasal değışiklikler meydana gelir. Hücreler mikrovillus gibi yüzey yapılarını ve diğer hücrelerle temas yüzeylerini kaybederler. Hücrede membran bütünlüğü kaybolmaksızın, membranda kabarcıklandırmalar görülür.

Apoptotik cisimciklerin oluşumu: Apoptozisin son basamağında apoptotik cisimcikler dediğimiz membranla sınırlı veziküller oluşur. Bu apoptotik cisimciklerde, hücre membranının iç tabakasında yer alan fosfatidilserin, aminofosfolipid transferaz enzimiyle membranın dış yüzüne göç eder. Bu sayede apoptotik cisimcikler komşu hücreler tarafından tanınarak fagositozla ortadan kaldırılır ve bu fagositoz olayı, hücre içeriğinin dışarıya sızmasına bile zaman kalmadan hızla gerçekleştiği için apoptoziste enflamasyon görülmez. Apoptozis mitozdan 20 kattan daha fazla hızda meydana geldiğinden rutin Hematoksilen-

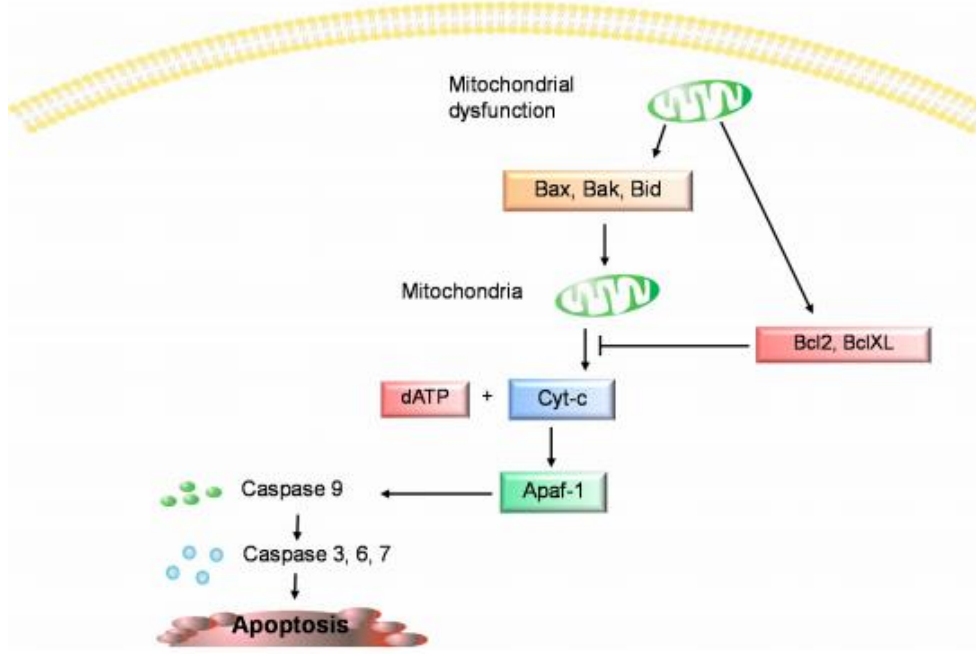
Eozin preparatlarında apoptotik hücre bulmak zordur (Galle, 1997; Robbins, 2014; Ross, 2016).

Apoptoziste hücre ölümü; enerji harcanarak ve enflamasyon olmaksızın, ustaca gerçekleşir. Bu programlanmış hücre ölümünün, bütün çok hücreli canlılarda, gelişmedeki ve homeostazisin sürdürülmesindeki rolü oldukça önemlidir (Guimaraes ve ark., 2004).

Apoptozis temel olarak intrinsik (mitokondriyal) ve ekstrinsik (ölüm reseptör yolağı) yolak olmak üzere iki yolağı içerir. Son yıllarda Endoplazmik Retikulum Aracılı olduğu düşünülen üçüncü bir yolağın da üstünde durulmaktadır. Bu yolaklar birbirinden çok da farklı mekanizmalar olmamakla birlikte sonuçta bazı ortak moleküllerin aktivasyonu ile hücreyi apoptozise götürürler (Van Cruchten ve Van Den Broeck, 2002.).

2.2.1. İntrinsik yolak

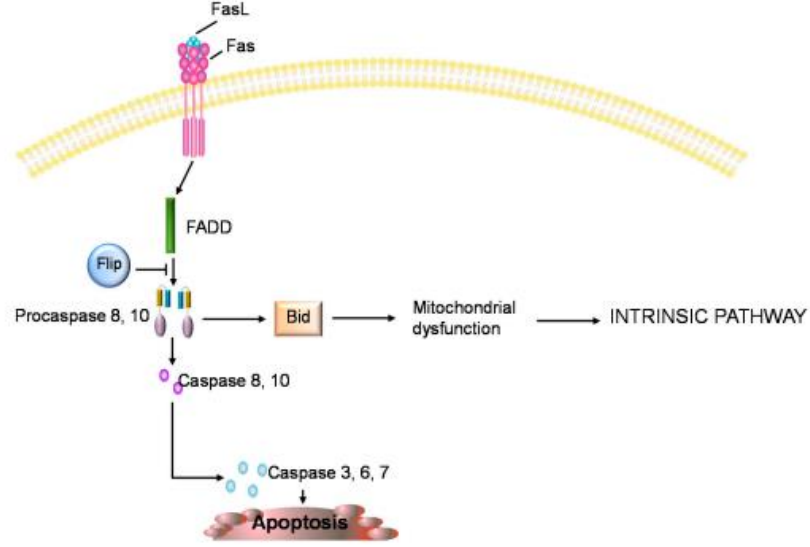
İntrinsik yolak, hücre içinde başlatılan ve temel düzenleyici organelin mitokondri olduğu yolaktır. Büyüme faktör eksikliği, onkogen aktivasyonu, DNA hasar ajanları, reaktif oksijen türleri, ısı şoku, aşırı sitozolik kalsiyum ve diğer hücresel stresler gibi etkenlerle aktive olmaktadır. Bu yolaktaki asıl olay, mitokondriyal dış membran geçirgenliğinde artıştır ve bu olay, Bcl-2 grubu tarafından düzenlenmektedir (Hockenbery, 2016). Büyüme faktörleri eksikliği, hatalı katlanmış protein birikimi veya DNA hasarı gibi apoptotik uyarılara yanıt olarak, Bcl-2 ailesinin antiapoptotik üyelerinin bazıları inaktive olurlar. Proapoptotik proteinlerden Bid; Bax ve Bak'ı aktifleştirir. Aktifleşen Bax ve Bak dimerize olup mitokondri membranına girerler ve mitokondriyon membranında permeabilizasyonu uyarırlar. Böylelikle sitokrom c, Endo-G (Endonukleaz-G), kalsiyum ve AIF (Apoptoz indükleyici faktör) gibi proapoptotik proteinler porlardan sitozole geçer. Sitokrom c'nin mitokondri matriksinden sitozole salınımı Apaf-1 (Apoptotik proteaz aktivasyon faktörü-1) ile birlikte, ATP'yi de içeren 'apoptozom' olarak bilinen kaspaz-aktive edici kompleksi oluşturur. Bir diğer deyişle sitoplazmaya çıkan Sitokrom c, apoptozisi başlatan enzim olan Kaspaz'ı aktive eder. Apoptozom kaspaz-9'u keserek aktifleştirir. Kaspaz-9, prokaspaz-3'ü aktif kaspaz-3 haline getirir. Aktif kaspaz-3 de İnaktif kaspaz aktive edici DNaz (ICAD)'ı inaktifleştirerek, Kaspaz aktive edici DNaz (CAD)'ı serbestleştirir. CAD ise nükleusta kromatinin yoğunlaşmasına ve DNA'nın nükleozomal alt birimler halinde parçalanmasına yol açar (Adams ve ark., 2001; Gökhan ve ark., 2020).



Şekil 5: Apoptozis intrinsik yolak (Musumeci ve ark., 2015)

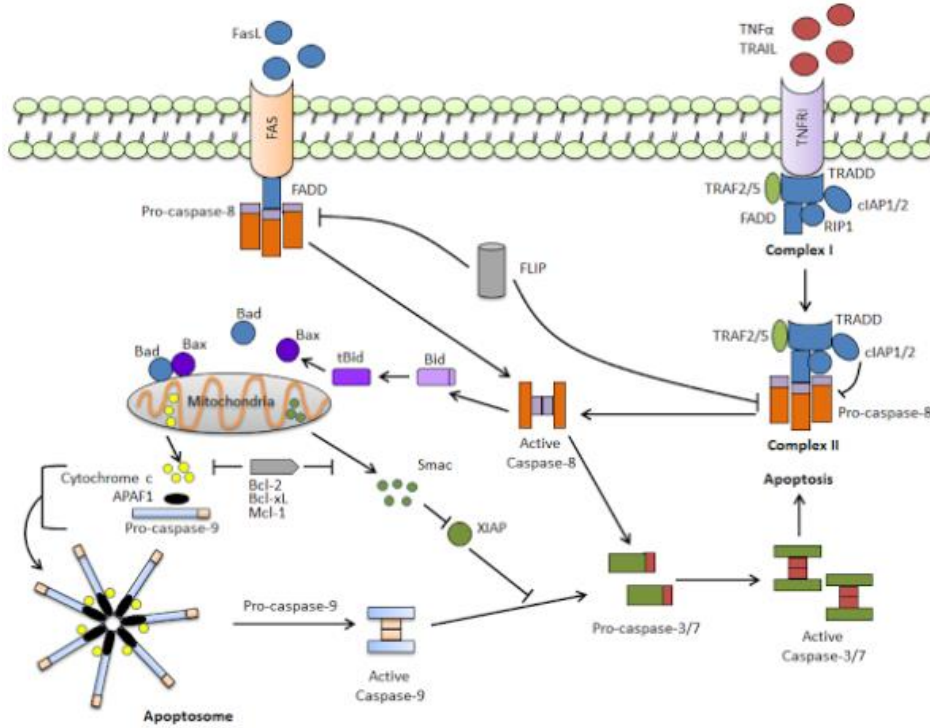
2.2.2. Ekstrinsik yolak

Ekstrinsik yolda, hücre yüzeyindeki Fas (CD 95), TNFR (Tümör Nekroz Faktör Reseptör), DR5 gibi ölüm reseptörlerine ölüm sinyallerinin (FasL, TNF-alfa, TRAIL) bağlanmasıyla ölüm reseptörleri trimerik bir yapı kazanır. Trimerik yapı kazanan bu reseptörler, prokaspazla ve adaptör moleküllerle birleşerek DISC (ölüm tetikleyici sinyal kompleksi) denilen yapıyı oluşturur. Oluşan bu yapıyla prokaspaz-8'in aktif kaspaz-8'e dönüşmesi sağlanır. Kapsaz-8 ya direkt kaspaz-3'ü aktive eder veya da Bid'i keserek dolaylı olarak instrinsik yolaktaki kaspaz-9'u aktive ettikten sonra kaspaz-3'ü aktive eder. Aktif kaspaz-3, CAD aktivasyonu ile DNA fragmentasyonuna yol açar (Spierings ve ark., 2004; Curtin ve ark., 2013.). Ekstrinsik yolak, bireyin kendi dokularına reaksiyon gösteren lenfositlerin ortadan kaldırılmasında rol alır (Robbins 2014).



Şekil 6: Apoptozis ekstrinsik yolak (Musumeci ve ark., 2015)

Endoplazmik Retikulumu aracılı yolakta, hücre içi kalsiyum artışıyla Endoplazmik retikulum membranında yer alan kaspaz-12 aktive olur. Aktive olan kaspaz-12 de kaspaz 9 üzerinden kaspaz kaskadının aktivasyonunu sağlar (Szegezdi ve ark., 2006).



Şekil 7: Apoptozis ile ilişkili moleküller (Xu ve ark., 2016).

Apoptozisin gerçekleşmesinde rolü olan biyokimyasal ve genetik komponentlerin araştırılmasıyla birlikte, apoptozisin aktivasyon ya da inhibisyonuna yönelik çalışmalar; kanserler, bazı otoimmün hastalıklar, AIDS ve nörodejeneratif hastalıklar gibi pek çok hastalıkta alternatif tedavi olanaklarını geliştirme açısından önem arz etmektedir (Estaquier ve ark., 1994).

2.3. OTOFAJİ

Kelime anlamı ‘kendi kendini (auto) yeme (phagy)’ olan otofaji, ökaryotik hücrelerde protein hemostazını sürdürmek ve organellerin geri dönüşümünü sağlamak için meydana gelen katabolik bir süreçtir. Otofaji, açlık ve hipoksi gibi stres dönemlerinde güçlenir, hücrenin hayatta kalmasına yardımcı olur ve apoptozis ve antijen ekspresyonu gibi önemli hücresel süreçlerle de bağlantılıdır (Abdel Karim ve ark., 2019).

Otofaji ile yıkıma uğrayan proteinler canlıda ATP sentezi ve yeni proteinlerin üretimi için kullanılırlar. Böylece, hücreler otofaji sayesinde metabolik stres durumlarında canlı kalabilirler. Yani otofaji, besin yokluğu ve büyüme faktör eksikliği gibi nedenlerle ortaya çıkan metabolik streslere bir tür adaptasyon cevabıdır (Shintani ve Klionsky, 2004).

Otofaji, hasarlı organel ve proteinlerin yıkımında etkin bir rol almasının yanı sıra normal hücre içeriğinin tekrar düzenlenmesinde de görev almaktadır. Bu yüzden otofaji eksikliğinde hatalı katlanmış proteinlerin ve hasarlı organellerin birikmesi sonucu hücrede dejenerasyon görülebilir. Otofaji mekanizmasında kusur olursa söz konusu proteinler örneğin; nöronlarda birikerek sinir hücresi ölümüne ve nörodejeneratif hastalıklara yol açabilir (Martinez ve Cuervo, 2007).

Son yıllarda yapılan çalışmalar otofajinin; hücre farklılaşması, morfogenez, hücre metabolizmasının düzenlenmesi, yaşlanma, hücre ölümü ve immün sistemde hücre içi patojenlerin yıkımında da etkin bir rol aldığını ortaya koymuştur. Ayrıca otofajideki anormalliklerin, kanser, çeşitli enfeksiyon hastalıkları ve nörodejeneratif hastalıklar gibi önemli hastalıkların da etyolojisinde yer aldığını gösteren çalışmalar vardır (Shintani ve Klionsky, 2004; Rubinsztein ve ark., 2007; Mizushima ve ark., 2008).

Otofaji, hücre gelişiminde de önemli bir mekanizmadır. Örneğin, mayalarda otofaji spor oluşumuna katılırken, bir tür nematod olan *Caenorhabditis elegans*'da oosit döllenmesinden sonra maternal mitokondrinin ortadan kaldırılmasında rolü olduğu tespit edilmiştir (Al Rawi ve ark., 2011; Sato M. ve Sato K., 2011). Ayrıca otofaji, embriyo

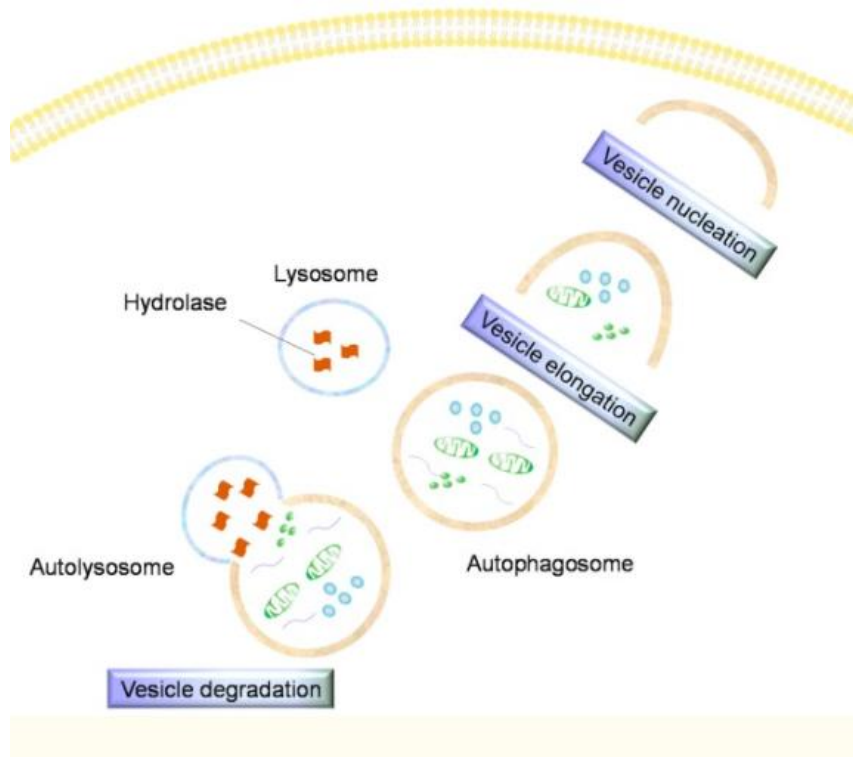
gelişimi, hücre farklılaşması ve organogenez için de önemlidir (Di Bartolomeo ve ark., 2010). Eritropoezde de otofaji görülür. Olgun eritrositlerde mitokondri, ribozom ve diğer organellerin eliminasyonu otofajiyle sağlanır (Mortensen ve ark., 2010).

Memeli hücrelerinde üç otofaji biçimi tanımlanmıştır. Bunlar: mikrootofaji, şaperon aracılı otofaji ve makrootofajidir.

Mikrootofaji: Normal fizyolojik koşullar altında sitoplazmik proteinlerin yavaş ve sürekli bir şekilde yıkılmakta olduğu nonspesifik bir süreçtir. Lizozomların küçük sitozolik bileşenleri pinositozla doğrudan ortadan kaldırdığı süreci tanımlar (Ross, 2013).

Şaperon aracılı otofaji: Diğerlerine göre daha seçici bir süreç olan şaperon aracılı otofajide, parçalanacak sitozolik proteinler özellikle HSC70 içeren şaperon kompleksler tarafından tanınır. KFERQ benzeri pentapeptid motifleri, HSC70 şaperon komplekslerle işaretlenir ve lizozom membranına taşınırlar. Lizozomal membran üzerindeki LAMP-2A, şaperon-KFERQ kompleksini tanır ve HSC70'in de katkısıyla bu proteinleri parçalanacak lümen içine çeker. Lizozomda yıkım gerçekleşir. Protein, lizozom membranından lizozomal HSC70 yardımıyla geçerek lizozomda yıkıma uğratılır. Şaperon aracılı otofajide, membran oluşumu ve içeriğin membran sistemi içinde hapsedilmesi gibi basamaklar yoktur. Karaciğer ve böbrek gibi organlardaki sitoplazmik proteinlerin yaklaşık % 30'unun yıkımında şaperon aracılı otofaji rol alır (Arias ve Cuervo, 2011; Mijaljica ve ark., 2011; Ross, 2013).

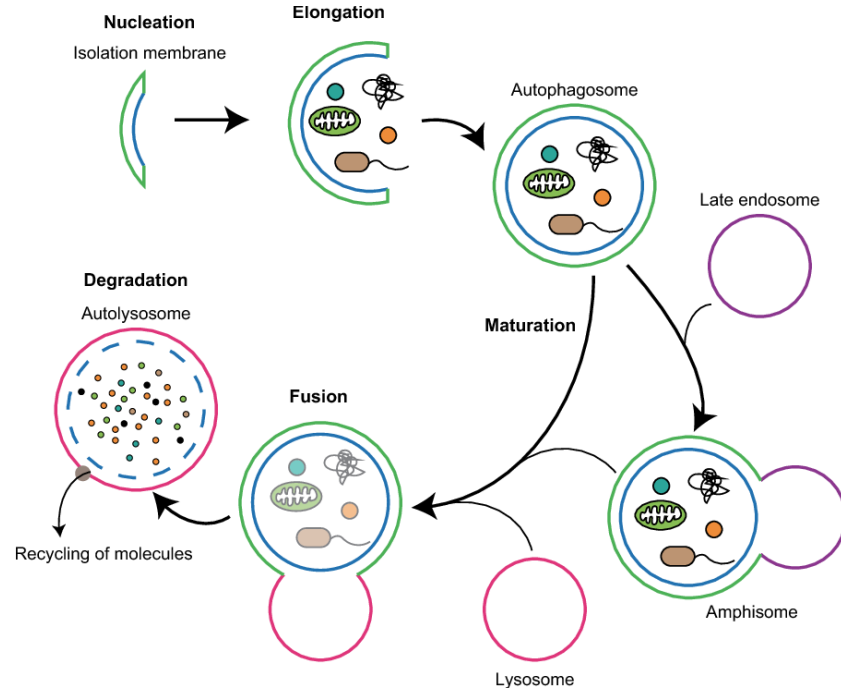
Makrootofaji: Besin yoksunluğu gibi olumsuz koşullara adaptif bir yanıt olarak gelişen, lizozomlar vasıtasıyla oldukça sıkı kontrol altında olan bir kendini yeme (self-eating) sürecidir. 'Otofagozom' adı verilen çift membranlı veziküller makrootofajide esas rol alır. Yıkıma uğratılacak uzun ömürlü proteinler, karbonhidrat, lipid ve RNA'lar, hasar görmüş mitokondriyon ve peroksizom gibi organeller ile istilacı patojenler otofagozomların içine hapsedilip lizozomlara taşınırlar. Lizozomlarda bu maddeler, asit hidrolaz enzimleri tarafından parçalanırlar. Makrootofaji, karaciğerde açlığın ilk evreleri sırasında meydana gelmektedir. (He C. Ve Klionsky D., 2009; Ross, 2013).



Şekil 8: Makrotofajide gözlenen olaylar (Musumeci ve ark., 2015).

Otofaji, son derece iyi düzenlenmiş sinyallerle kontrol edilir, tüm hücrelerde bazal bir seviyede oluşur ayrıca çeşitli sinyaller ve açlık, hipoksi gibi hücrel stresler tarafından da uyarılır. Otofajinin uyarılması için en iyi karakterize edilen tetikleyiciler; amino asit yoksunluğu altında memeli rapamisin hedefi kompleksi 1'in (mTORC1) inaktive olması ve enerji açlığından kaynaklanan AMP: ATP oranındaki değişiklikleri algılayan AMP ile aktive olan protein kinazın (AMPK) aktive olmasıdır (Huang ve ark., 2018).

Makrotofajide otofagozomun oluşumu, ayrı ATG genleri tarafından kodlanan proteinlerin yardımıyla gerçekleşmektedir. ATG (otofajiyle ilgili genler) adı verilen genlerin çoğu ilk olarak, mayada yapılan çalışmalar sonucunda bulunmuştur. Makrotofajide otofagozomun oluşumu farklı aşamalara ayrılır. Bunlar; otofagozomun başlaması, çekirdeklenmesi, otofagozom zarının genişlemesi ve uzaması, lizozomla birleşme ve son olarak intraveziküler ürünlerin yıkımı aşamalarıdır.



Şekil 9: Otofajide otofagozom oluşum aşamaları (Nakamura ve Yoshimori, 2017).

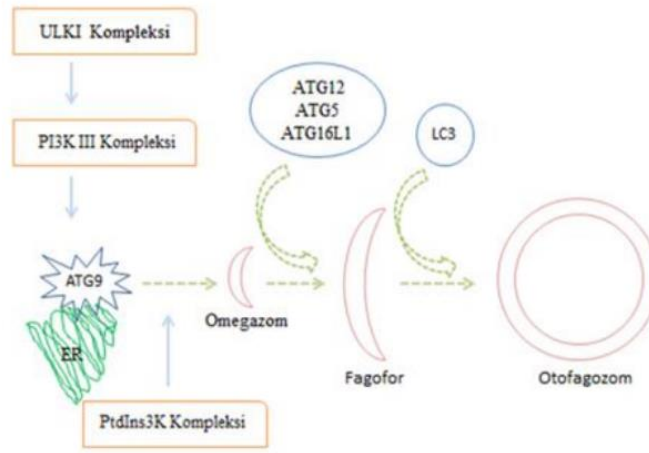
Otofagozomun başlaması, sınıf III fosfoinositol 3 fosfat kinaz (PI3K) kompleksinin aktivasyonu ile gerçekleşir. ATG6 (memelilerdeki Beclin-1) proteini, sınıf III PI3K Vps34'ün aktivitesini düzenleyen bir proteindir. PI3K, vezikül oluşumunda rol oynayan proteinleri kendisine bağlayıp, otofaji oluşum merkezine yönlendirir.

Çekirdeklenme aşamasında; otofajiyi düzenleyen ve FIP200, ATG13, ATG101 ile tetramerik bir kompleks oluşturan ULK1 kompleksi, Sınıf III-PI3K kompleks I (VPS34, VPS15, ATG14, Beclin1)'i aktive ederek vezikül çekirdeğini uyarır. Bu şekilde otofagozom membranının çekirdeği oluşturulmuş olur.

Otofagozom membranını genişletmek için; ATG5-ATG12 ile ATG16 kompleks konjugatları, LC3 (ATG8) ve GABARAP protein ailelerinin üyeleri, lipid fosfatidiletanolamine (PE) konjuge edilir ve membrana alınır. ATG4B, ATG7 ile birlikte LC3-I ve PE'yi birleştirerek LC3-II'yi (MAP1LC3B olarak da bilinir) oluşturur. Bu LC3 formu genellikle bir otofagozom belirteci olarak işlev görür. ATG komplekslerinin fagofor oluşum bölgesinde (PAS'da) toplanmasıyla, PAS Endoplazmik Retikulum'un proksimal bölgesine lokalize olur ve burada 'omegazom' adını alır. Fagofor oluşumunda birçok organel zarının rol aldığına dair görüşler de vardır (Axe ve ark., 2008; Biazik ve ark., 2015).

Disk benzeri yapıda genişleyen fagoforun kendi çevresinde kapanarak otofagozom haline gelmesinde COPII kaplı veziküller rol almaktadır. Fagoforun kapanmasından sonra,

ATG proteinlerinin uzaklaştırılması ile 'otofagozomlar' olgunlaşır. Otofagozomlar daha sonra geç endozomlarla birleşerek 'amfizomu' veya doğrudan lizozomlarla kaynaşarak 'otolizozomları' oluştururlar. Sonuç olarak, otofagozom içeriği bu bölgelerde yıkıma uğrar. İçeriğin (proteinler, organeller vb.) yıkımı ile ortaya çıkan yapıtaşları (örn. aminoasitler, yağ asitleri, vb.) tekrar kullanılmak üzere hücreye kazandırılmış olur. Otofagozomlara ve LC3II'ye spesifik substratları hedefleyen adaptör protein sektozom 1 (p62 olarak da bilinir), diğer kargo proteinleri ile birlikte bozular ve p62 de otofajik bir belirteç olarak kullanılabilir (Glick ve ark., 2010; Levy ve ark., 2017)



Şekil 10: Otofagozom oluşumu ve ilgili proteinler (Şahin ve Yıldız, 2017).

Otofajinin düzenlenmesinde rol alan bazı sinyal yolları vardır: Sınıf I fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K) / protein kinaz B /Akt yolağı otofajiyi baskılayan bir yoldur. Çünkü aktif haldeki Akt, otofajinin inhibisyonunda rol oynayan TOR protein kompleksini aktive eder. PTEN, tümör supressör bir gendir ve PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağını inhibe ederek hücrelerin otofajiye girmesine neden olur (Song ve ark., 2005)

TOR, hücrelerde protein sentezi, hücre büyümesi, hücre döngüsü, besinlerin hücre içine alımı ve otofajiyi düzenleyen bir serin/treonin protein kinazdır. Transplant hastalarında bağışıklık sistemini baskılamak için kullanılmış makrolid grubu bir antibiyotik olan rapamisinin hedef molekülü, memeli hücrelerinde mTOR olarak tanımlanmıştır. Açlık ve hipoksi gibi stres durumlarında mTOR baskılanır. mTOR' un baskılanması ise otofajiyi aktive eder (Fimia ve ark., 2010).

2.3.1. Otofaji ve Apoptozis İlişkisi

Yapılan son çalışmalarda otofaji ve apoptozis arasında karmaşık bir ilişkinin olduğu düşünülmektedir. Otofajideki ölüm sürecinde inflamasyonun görülmemesi ve ATP tüketimi gibi bazı özellikler apoptozisle benzerlik gösterir. Ancak apoptozis gelişim ve doku homeostazında kritik rol oynayan önemli bir fizyolojik süreçken, otofaji çoğu durumda hücreleri stres koşullarına adapte ederek hücrelerin hayatta kalmasını sağlayan bir süreçtir. Ayrıca bu süreç bazı çalışmalarda apoptotik olmayan bir hücre ölüm programı olarak da kabul edilmiştir (Almonte-Becerril ve ark., 2010).

Apoptoziste kromatin yoğunlaşması görülürken, otofajide bu olay görülmez. Apoptoziste mitokondriyal şişme nadir görülürken, otofajide geç evre mitokondriyal şişlik görülür (Musumeci ve ark., 2015).

Apoptozis ve otofaji arasındaki ilişkiye dair bazı farklı görüşler vardır. Bazı araştırmacılara göre otofaji, apoptotik hücre ölümünün baskılandığı koşullarda, hücreleri ölüme götüren bir mekanizmadır (Xue ve ark., 1999).

Farklı bir görüş otofajinin apoptozise paralel olarak hücre ölümüne yol açabileceğini savunmaktadır. Bazı hücrelerde apoptozis ve otofajinin koordineli çalışarak hücre ölümünde ortak roller aldığını savunan görüşler yaygınlaşmaktadır. Apoptozis özellikle çekirdek değişiklikleri ve kromatinin yıkımıyla giderken, otofaji sitoplazmik materyallerin yıkımıyla başlamaktadır. Bu yüzden organellerden zengin ve büyük çekirdeği olan hücrelerde apoptozis ve otofajinin birlikte çalışarak hücreyi ölüme götürmeleri anlamlıdır. Bu görüşü destekleyen çalışmalarda Beklin-1 upregülasyonu ile hem otofajik hem de apoptotik hücre ölümünün aktive olduğu gösterilmiştir (Qian ve ark., 2007).

Bir diğer görüş, otofajinin apoptozu baskılayarak hücrenin hayatta kalmasını sağladığını savunmaktadır. Yani otofajinin hücre ölümünden bir kaçış mekanizması olduğu ifade edilmektedir. Otofaji çeşitli stres durumlarında anormal ve hasarlı hücre elemanlarının yıkımını sağlayarak veya ortaya çıkardığı metabolitlerle malign hücrelerin beslenmesi için yapıtaşları sağlayarak hücrenin ölüme gitmesini engellemektedir. Diğer yandan otofaji inhibe edildiğinde ise hücrelerde apoptotik hücre ölümü artmaktadır (Bauvy ve ark., 2001).

Bir diğer görüşe göre, otofaji apoptozis için bulunması gerekli olan bir ön koşuldur. Bu görüşe göre otofaji kendi başına ölüme yol açmamakta, apoptozise yardım etmektedir. Otofaji, hücre zarı tomurcuklanması, apoptozom kompleksinin oluşumu gibi ATP

gereksinimi duyan bazı olaylara besin yokluğunda ATP sağlamaktadır. CD4 hücrelerinin HIV ile enfeksiyonu üzerine yapılan bir çalışmada otofajinin apoptotik kaspaz aktivasyonu için gerekli olduğu gösterilmiştir (Espert ve ark., 2006).

Otofaji, çeşitli iç ve dış faktörlere bağlı olarak, bireyin dostu veya düşmanı gibi davranış gösterebilmektedir.

Yapılan son çalışmalarda otofaji ve apoptozisin moleküler olarak bağlantılı olduğu, otofaji ve apoptozisi negatif olarak etkileyen birçok ortak molekül olduğu gösterilmiştir. Örneğin; çeşitli moleküller üzerinden mTOR'u aktive eden ve otofajiyi baskılayan Akt/PKB yolağı, apoptoziste bcl-2 proteinlerinden olan Bad'ı fosforilleyerek apoptozisi de baskılar. Anti-apoptotik proteinler olan Bcl-2 ve Bcl-xL apoptozisi inhibe ettiği gibi otofajiyi de inhibe edebilmektedir. Otofagozomların olduğu aşamada görevli olan Beklin-1, antiapoptotik Bcl-2 ailesinin üyeleri tarafından inhibe edilmektedir (Eisenberg-Lerner ve ark., 2009)

2.3.2. Otofaji ve Kanser

Daha önce de bahsedildiği gibi otofaji, sağlıklı dokularda hasar görmüş organelleri temizleyerek işlev görür. Ancak, kanser hücrelerinde hücrel mikroy ortama bağılı olarak kanser hücrelerinin büyümesini baskılayabildiği veya indükleyebildiği karmaşık bir süreçtir (Lang ve ark., 2015).

Otofajinin tümör oluşumunu baskıladığı gösterilmiş olmasına rağmen, etkisi içeriğe bağılıdır. Bir tümör oluştuğunda, tümör hücreleri otofajiyi hayatta kalmak için kullanabilir ve tümör büyümesini sürdürmek için otofajik substratları kullanabilir. İnsan meme kanserinde aday tümör baskılayıcı gen olarak ATG geninin keşfi, otofaji mekanizması ile insan kanseri arasındaki ilk spesifik bağlantıdır. Kritik otofaji geni beclin 1'in, insan prostat, meme ve yumurtalık kanserlerinin %40 ile %75' inde mono-allelik olarak kaybolduğı bildirilmiştir, bu da otofajinin tümör baskılama mekanizmasında önemli rol oynadığını göstermektedir (Tian ve ark., 2019) Yine bazı çalışmalarda bozulmuş otofajiye bağılı anormal p62 birikiminin, p62 tarafından düzenlenen sinyal yolunu aktive ederek tümöral gelişimi artırabileceğı ileri sürülmüştür (Mathew ve ark., 2009). Bunların tersine bazı çalışmalarda, kanser oluşumu başladıktan sonra artan otofajik hareketlerin genellikle tümör hücrelerinin hayatta kalmasını ve büyümesini sağladığı yönünde görüş bildirilmiştir (Hashimoto ve ark., 2014; Amaravadi ve ark., 2016)

Kanser hücrelerinde otofajinin artırılması ya da azaltılmasına mı yönelik tedavi protokolleri belirlenmesi gerektiği belirsizliğini korumaktadır. Ancak birçok kanıt, premalign lezyonlarda otofaji artırıcıların kanser gelişimini önleyebileceğini göstermektedir. Tersine, ileri evre kanserlerde, otofajiyi hem güçlendiren hem de inhibe eden terapötik stratejiler önerilmiştir (Levy ve ark., 2017).

2.4. ENDOMETRİYUM KANSERİ

Kadınlarda en sık görülen kanser tipleri meme, tiroit, akciğer ve kolon kanserleri olsa da endometriyum kanseri, jinekolojik maligniteler içinde en sık görülen tiptir (Globocan, 2020). Risk faktörleri arasında; karşılanmamış östrojen tedavisi, erken menarş, geç menopoz, tamoksifen tedavisi, nulliparite, infertilite veya ovulasyon yetersizliği ve polikistik over sendromu dahil olmak üzere endometriyumun östrojene aşırı maruz kaldığı durumlar yer alır. Ek risk faktörleri ise ileri yaş, obezite, hipertansiyon, diabetes mellitus ve kalıtsal poliposiz kolorektal kanserdir (Braun ve ark., 2016).

Endometriyum adenokarsinomu, uterus korpus kanserleri içinde yer alır ve uterus korpus kanserleri arasında en sık görülenidir. Ayrıca tüm kadın kanserlerinin % 5,9'unu oluşturur. Bir kadının yaşamı boyunca endometriyum adenokarsinomuna yakalanma riski gelişmiş ülkelerde % 2.5-3 civarındadır, bu risk gelişmekte olan ülkelerde % 1'in altındadır (Globocan, 2020).

T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'nun 2017 verilerine göre uterus korpus kanserinin ülkemizdeki insidansı 100.000'de 10,7'dir. Kadın kanserleri arasında 5. sırada, jinekolojik kanserler arasında ise ilk sırada yer alır. En çok 60-69 yaş aralığında tanı almaktadır.

Endometrium kanseri tanısında kullanılan yöntemler; Pap smear testi, transvaginal ultrasonografi, salin infüzyon sonografi, histereskopi ve endometrial örneklemedir (Şencan, 2011).

Endometriyum kanseri kliniğinde, genellikle postmenopozal kanama veya menstrüasyonda düzensizlik ilk belirtidir. Pelvik bölgede ağrı, rahatsızlık veya baskı hissi, karında şişkinlik, açıklanamayan kilo kaybı, genital bölgede kitle, ileri dönemlerde hastada anemi, mesanede ve bağırsakta sorunlar görülür (Coşkun, 2012; Kanser Daire Başkanlığı).

Endometriyum kanseri, histopatolojik özellikler ve prognozlarına göre temel olarak iki alt tipe ayrılır. Endometrioid tip (tip 1) histoloji olguların % 80'ini oluşturmakta iken, tip

2 kanserler (seröz, berrak hücreli ve karsinosarkom) olguların % 20'sini oluşturmaktadır. Tip 1 Endometriyum kanserli olgularda tümör grade'i düşüktür, hormon reseptörü pozitifdir, diploid karyotipe sahiptir ve genellikle atipik endometriyal hiperplazi zemininde gelişirler. Tip 1 Endometriyum kanseri genellikle iyi prognozlu endometrioid adenokarsinomları içermektedir. Tip 2 Endometriyum kanserli olgularda ise tümör grade'i yüksektir, hormon reseptörü negatifdir, anöplid karyotipe sahip ve p53 mutasyonu görülen kanserlerdir. Bu grup kötü prognozlu non-endometrioid histolojik alt tipleri içermektedir (Brinton ve ark., 2013).

Endometriyum kanserinde prognoz, genel olarak iyi olmakla beraber, seröz papiller tip ve berrak hücreli gibi non-endometrioid histolojiye sahip, derin invazyonun görüldüğü veya yüksek tümöral grade'i olan hastalarda nüks riski artmakta ve prognoz kötü olabilmektedir. Erken evre hastalarda 5 yıllık sağ kalım oranları % 95'lerde iken lokal yayılımı olan hastalarda % 68, uzak metastazı olan hastalarda ise % 17 sağ kalım oranları görülmektedir. Endometriyum kanseri için bilinen prognostik faktörler: yaş, ırk, grade, evre, invazyon derinliği, plöidi, primer tümör çapı, hormon reseptör varlığı ve hücre tipi olarak sayılabilir (Creasman ve ark., 1987; Türk Jinekolojik Onkoloji Derneği, 2017).

Endometriyum kanseri tedavi seçenekleri, cerrahi tedavi, kemoterapi, radyoterapi, hormonal tedavi veya bunların kombinasyonlarını içerir. I ve II. evrede genellikle total abdominal histerektomi ve bilateral salpingoooferektomi (TAH+BSO) uygulanır. Geleneksel kanser tedavilerinin terapötik etkinliğinin ciddi yan etkileri ve sınırları; tamamlayıcı ve alternatif ilaçların yaygın olarak tercih edilmesine yol açmaktadır. Bu çeşitli tedavi yöntemleri arasında kanıtlanabilir antitümör aktivitesi olan geleneksel ilaçlar önem kazanmaktadır.

Jinekolojik maligniteler içinde en sık olan endometriyum kanseri, genç yaşlarda bile artan morbidite ile ilişkilidir. Bundan dolayı tanı ve tedavi aşaması üzerine olan çalışmalar son zamanlarda önem kazanmıştır. Bu çalışmalarda, endometriyum kanseri gelişimindeki sinyal yolları hedef alınmaya çalışılmaktadır. PI3K/AKT/mTOR ve RAS/RAF/MAPK yolağı gibi sinyal yolları, birçok kanser türünde önemli olduğu gibi endometriyum kanseri için de önemlidir. Dolayısıyla çeşitli bitkisel ürünler ve gıdaların, kemoterapi ve radyoterapiye ek olarak kullanımı ve aktive ettikleri yollar araştırılmaktadır (Bireller ve ark., 2015).

2.5. RESVERATROL

Resveratrol , üzüm, çilek, yer fıstığı, dut gibi meyve ve sebzeler de dahil olmak üzere 70'den fazla bitki türünde bulunan bir fitoaleksindir (Kundu ve Surh,2008). Fitoaleksinin (Phytoalexin), Yunanca bir terim olup 'bitki (phyton), koruyucu (alexin)' anlamına gelir ve patojen enfeksiyonlarına karşı koymak için bitkiler tarafından de novo sentezlenir. Özellikle renkli üzüm çeşitlerinin kabuklarında yüksek miktarda (0,30-14,10 mg/g yaş ağırlık; 9,30-78,5 mg/g kuru ağırlık) Resveratrol sentezlenmektedir (Keskin ve ark., 2009; Singh ve ark., 2015).

Resveratrol, trans-resveratrol ve cis-resveratrol olmak üzere doğada iki formda bulunmaktadır. Tüm izomerleri biyolojik olarak aktif formdadır ancak resveratrolün biyolojik fonksiyonları, daha stabil form olan trans-resveratrolle ilişkilendirilmektedir (Saldanha ve ark., 2013). Resveratrol, ısıya dayanıklı olmasından dolayı birçok yiyecek türünde aktif formunu koruyabilir. Ağız yoluyla alındıktan sonra hemen sindirilip, hızla kana karışma özelliğindedir (Keskin ve ark., 2009).

Resveratrol, polifenolik bileşimi nedeniyle antioksidan özelliklere sahip genel bir yaşlanma önleyici madde olarak kabul edilir. Resveratrol, antioksidan özellikleri yanı sıra antiinflamatuar, antikanser, kardiyoprotektif, nöroprotektif ve antidiyabetik aktiviteleri de içeren çok çeşitli biyolojik etkilere sahiptir. Daha ileri çalışmalar, Resveratrol'ün, vasküler endotelial koruyucu ve lipid metabolizmasını düzenleyici etkilerini ortaya koymuştur (Marques ve ark., 2009; P Jara ve ark., 2018).

Resveratrol çok sayıda reseptörle ve enzimlerle etkileşim içindedir, bu durum Resveratrol' ün biyolojik etkilerindeki temel mekanizmayı oluşturur. Resveratrol' ün, siklooksijenaz, TNF - α , NF - κ B, IFN - γ ve IL - 1, IL - 4 ve IL - 6 gibi çeşitli inflamatuvar / immünoregülatör sitokinlerin ve enzimlerin ekspresyonu /aktivitesine müdahale ettiği bulunmuştur (Han ve ark., 2008). Yapılan in vivo çalışmalar, Resveratrol'ün Sirtuin 1 (SIRT1) ve Adenosin Monofosfat Aktive Protein Kinaz (AMPK) aktivasyonunu artırdığını da göstermiştir (Smoliga ve ark.,2011; Widlund ve ark., 2013).

2.5.1. Resveratrol ve Kanser

Resveratrol'ün sağlık üzerindeki etkileri pek çok alanda araştırılmış olup, antikanser özelliği de çalışmalarda çokça yer bulmuştur. Resveratrol'ün karsinogenez ile ilgili birçok

hücrel olayda düzenleyici bir role sahip olduğu gösterilmiştir ancak bu etkilerin mekanizması iyi tanımlanmamıştır (Yuan ve ark., 2015).

Resveratrol'ün direkt olarak deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asite (RNA) bağlanarak, anti-oksidan enzimleri aktive ettiğini, inflamasyonu önlediğini ve malign hücrelere özgü olarak genetik bütünlüğü sağlayan DNA hasarını kontrol eden kinazları stimüle ettiği öne sürülmektedir. Bununla birlikte, terapötik etkilerini açıklamak için birkaç moleküler hedeften bahsedilmektedir. Resveratrol'ün kemopreventif etkisinin, enflamasyonu bastırma, reaktif oksijen ürünlerini ortadan kaldırma, prokanserojenleri devre dışı bırakma ve kalori kısıtlaması durumunu taklit etme yeteneğiyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Shrotriya ve ark., 2015; Elshaer ve ark., 2018).

Resveratrol'ün kanserdeki terapötik etkisine, kanser büyümesini baskılama, apoptozis ve otofaji yoluyla kanser hücresi ölümünü indükleme ve ayrıca metastaz ve anjiyogenezi inhibe etme özelliği dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar katkıda bulunur. Resveratrol ile indüklenen apoptozisin kesin mekanizması hala iyi tanımlanmamasına rağmen, mevcut veriler Resveratrol'ün birkaç apoptotik yolu tetiklediğini göstermektedir: Resveratrol, Bax, NOXA, BUMA gibi bazı proapoptotik proteinlerin p53'e bağımlı aktivasyonu yoluyla apoptozisle kanser hücresi ölümünü indükler. Ayrıca Resveratrol, SIRT1 ve AMPK'nın upregülasyonuna yol açarak ve AKT/mTOR yolağı üzerinden otofajiyi indükleyerek otofaji üzerinden de kanser hücresi ölümünü indükler (Wang ve ark., 2017; Elshaer ve ark., 2018).

Resveratrol'ün promiyelositik lösemi, akciğer, meme, prostat ve kolon kanseri hücreleri dahil kanser hücre hatlarında büyümeyi inhibe ettiği ve yukarıda da bahsedildiği gibi apoptozisi indüklediği bildirilmiştir (Alkhalaf, 2007; Bishayee, 2009; Malhotra ve ark., 2011; Leon ve ark., 2012; Miki ve ark., 2012; Singh ve ark. 2014).

Resveratrol, bazı sitotoksik maddelerin anti-kanser aktivitesini iyileştirebilecek bir P-gp (P glikoprotein) bloke edici etkiye sahiptir. Ayrıca Resveratrol, antioksidan özellikleri nedeniyle kötü huylu tümörlere karşı kombinasyon tedavisi için potansiyel olarak başarılı bir adjuvan aday olabilir (Alfaras ve ark., 2010; Mikstacka ve ark., 2010).

2.6. ISHİKAWA HÜCRELERİ

Son yıllarda, kanser ile ilgili araştırmalarda hücre kültür çalışmaları yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Hücre kültürlerinde, kısa zaman aralığında incelenmek istenen

çeşitli etkenler için çalışılabilir. Hücre kültürleri, dokuların vücut dışında da canlılığını korumasının sağlandığı, sürekli üretimi ve gelişimini sürdürdüğü alanları ifade eder (Oncology. ASoC., 2009).

Ishikawa hücreleri, östrojen ve progesteron reseptörü içeren ve bu yüzden de iyi diferansiye endometriyal adenokarsinom hücrelerinin, fizyolojik ve fizyopatolojik değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılan, insan uterus epitel hücreleridir. Ishikawa hücreleri, endometriyumun normal yapısındaki aynı enzimleri ve yapısal proteinleri bulundurlar. Ve ayrıca günümüzde insan endometriyum kanserinin özelliklerini en iyi karakterize eden hücrelerdir. Östrojen içermeyen ortamlarda da gelişimlerini sürdürebilirler (Heneweer ve ark., 2005; Uchida ve ark., 2005)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

‘Resveratrolün Ishikawa Endometriyal Kanser Hücrelerindeki Apoptozis ve Otofaji Üzerine Etkileri’ başlıklı bu çalışma Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kurulu'nun 04.06.2021 tarihli ve 2021/3289 karar sayılı izniyle gerçekleştirildi. Bu proje, Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğünce 221518010 nolu kararla desteklenmiştir.

Hücrelerin ekilmesi, doz uygulamaları, MTT Testi, İmmünohistokimyasal boyama ve değerlendirmesi, DAPI immünofloresan boyaması ve yara iyileşme testi Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında; ekilen ve doz uygulaması yapılan hücreler gerçek zamanlı-kantitatif PCR (RT-qPCR) ile apoptozis ve otofaji ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi çalışması Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Kimyasallar

Çalışmamızda Ishikawa İnsan Endometriyal kanser hücre hattı kullanıldı. Resveratrol 99%(HPLC) SIGMA R5010- 100 mg'lık şişe (228,24 g/mol), Fetal Bovin Serum (FBS) Gibco (Gaithersburg, MD, ABD), RPMI- 1640 with L- Glutamine (Lonza), Trypsin / EDTA (Multicell, Wisent Inc., Quebec, Canada), Tiazolil mavisi tetrazolyum bromür (MTT) Amresco (USA) kullanıldı.

3.2.Hücre Kültürü ve MTT Analizi

Hücre kültürü için başlangıçta -80°C'de bulunan Ishikawa hücre hattı çıkarılıp 37°C'de çözdürüldü. Hücreler kültür flasklarına ekilerek sonraki takiplerde konfluens %80-90'a ulaşana kadar çoğaltılması sağlandı. Daha sonra hücreler, Tripsin uygulanarak flasklardan kaldırıldı ve hücre sayımı yapıldı.

Hücre kültür hattında Resveratrol'ün Ishikawa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) testi ile belirlendi. Yapılan MTT analizi ile yaşayan hücrelerde formazan tuzu oluşumunun, kolorimetrik düzeyde değerlendirilmesiyle, hücre canlılığı seviyesi belirlendi.

Hücreler 96 kuyulu hücre plakalarına 5×10^3 hücre/kuyu sayısında olacak şekilde ekildi ve sonra hücrelerin yapışması için 37°C'de, %5'lik CO₂ içeren nemli ortamda 24 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyonun ardından hücreler, Resveratrol'ün 25,50,100,250,300,350,400,450,500,1000 µM olacak şekilde 10 farklı konsantrasyonuyla

24, 48 ve 72 saatlik olacak şekilde muamele edildi. 24, 48 ve 72 saatlik her bir muamelenin ardından hücreler 20 µl MTT solüsyonu ile 4 saat inkübe edildi. Sonrasında formazan kristalleri 100 µl DMSO'da çözdürüldü. 96 kuyulu hücre plaklarındaki her bir kuyudaki absorbans, mikroparka elisa okuyucuda 570 nm'de ölçüldü. Deney sonucunda sitotoksik düzeyleri aşağıdaki formül ile hesaplandı ve MTT analizi 3 kez tekrarlandı.

Deney sonunda tüm konsantrasyonlar % canlılığı formülü ($\% \text{ Canlılık} = \text{Doz kuyucuğunun absorbansı} / \text{kontrol kuyucuğunun absorbansı} \times 100$) ile hesaplandı.

3.3. RT-qPCR (Gerçek Zamanlı-kantitatif PCR) ile Genlerin Ekspresyon Analizi

MTT hücre canlılık testi sonuçlarına göre, hücrelerin % 50'sini öldüren, hücreler için sitotoksik olduğu belirlenen zamana bağlı IC50 dozunun, apoptozis ve otofaji ölüm yollarıyla ilişkili genlerin ekspresyonu üzerindeki etkisini belirlemek için gerçek zamanlı-qPCR analizi yapıldı.

Bu yöntemin aşamaları şu şekildedir:

Ishikawa hücreleri, 5×10^5 hücre/kuyu hücre yoğunluğunda 6 kuyulu hücre plakalarına ekildikten sonra hücrelerin yapışması için 24 saat inkübe edildi.

İnkübasyon süresinden sonra hücreler, 48 saat süreyle IC50 dozunda Resveratrol ile muamele edildi.

Total RNA, Resveratrol ile muamele edilmiş Ishikawa hücrelerinden TRIzol reaktifi ile izole edildi.

Total RNAlar, DNaz I ile işlendikten sonra, üreticinin talimatlarına göre iScript™ cDNA Sentez Kiti (BIO-RAD, ABD) ile cDNA sentezi gerçekleştirildi.

Brightgreen 2X qPCR Mastermix (Applied Biological Materials, Kanada) PCR kiti kullanılarak BIO-RAD CFX Connect Real-Time PCR Detection sisteminde, gerçek zamanlı qPCR ile hedef genlerin (Beclin, LC3-I, LC3-II, Bcl-2, BAX, Casp-3,7,8,9, CycS, FAS, FADD) mRNA seviyesinin analizi yapıldı. 95°C'de 4 dakika, ardından 40 döngü 95°C'de 10 saniye, 60°C'de 60 saniye tavlama ve 72°C'de 4 dakika uzatma ile gerçekleştirildi. GAPDH ve β -Actin, normalizasyon için referanslar olarak kullanıldı.

3.4. İmmunoflorasan Boyama

Her bir cover slipe hücre ekildi, 48 saat süreyle Resveratrolün IC50 dozu ile muamele edildi ve daha sonra antikorlarla inkübe edildi. Apoptozisi ve otofajiyi incelemek için apoptozis ve otofaji primer antikor boyalarının değerlendirilmesi cover slip üzerindeki alanlarda yapıldı. Çalışmada immünohistokimyasal boyama yöntemiyle ABCAM firmasının ab217179 Beclin1 katalog numaralı Markeri kullanıldı. Ayrıca çekirdek boyaması için DAPI kullanıldı.

20'lik büyütmede 7 alan üzerinde ekspresyon değerlendirildi.

0: Boyama yok

1: Zayıf boyama

2: Orta derecede boyama

3: Güçlü boyama olarak değerlendirildi.

İmmünohistokimya boyama yöntemi basamakları ve bunlara ait uygulama süreleri Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1: Anti Beclin1 immünohistokimya boyama basamakları ve süreleri

İşlem	Süresi
Yıkama- PBS ile	5 dk
Fiksasyon- %4 Paraformaldehit ile	30 dk
Yıkama- PBS ile	5 dk
%3’ lük hidrojen peroksit	5 dk
Yıkama- PBS ile	5 dk 3 kez
%0.1 Triton-X 100	15 dk
Yıkama- PBS ile	5 dk 3 kez
Blok solüsyonu	1 sa
Primer Antikor	4°C de 1 gece
Yıkama- PBS ile	5 dk 3 kez
Sekonder antikor	30 dk
Avidin-biotin kompleksi	30 dk
Yıkama- PBS ile	5 dk 3 kez
DAB kromojen	5 dk

Distile su	10 dk
Zıt boya olarak Mayer's Hematoksilen	5 dk
Yıkama- PBS ile	5 dk 3 kez
Özel kapatma maddesi ile kapatma	

DAPI çekirdek boyası ve Anti Beclin1 immunofloresan boyaması ile 48 saatlik uygulama sonucu, belirlenen IC50 değerlerine denk gelen doz aralığında DAPI boyaması yapılarak apoptozise giren çekirdekler ve Anti Beclin1 immunofloresan boyaması ekspresyonu gösterildi.

3.5. Yara İyileşme Testi

Yara iyileşmesi testi için hücreler 60X15 mm hücre flaskına ekildi. % 80 konfluense ulaşıldıktan sonra 200 µL'lik steril pipet ucu ile düz bir çizgi oluşturuldu. 48 saatlik IC50 dozunda Resveratrol eklenerek 0, 24 ve 48. saatlerde fotoğraf çekilerek Resveratrol'ün Ishikawa hücre göçü üzerine etkisi gözlemlendi.

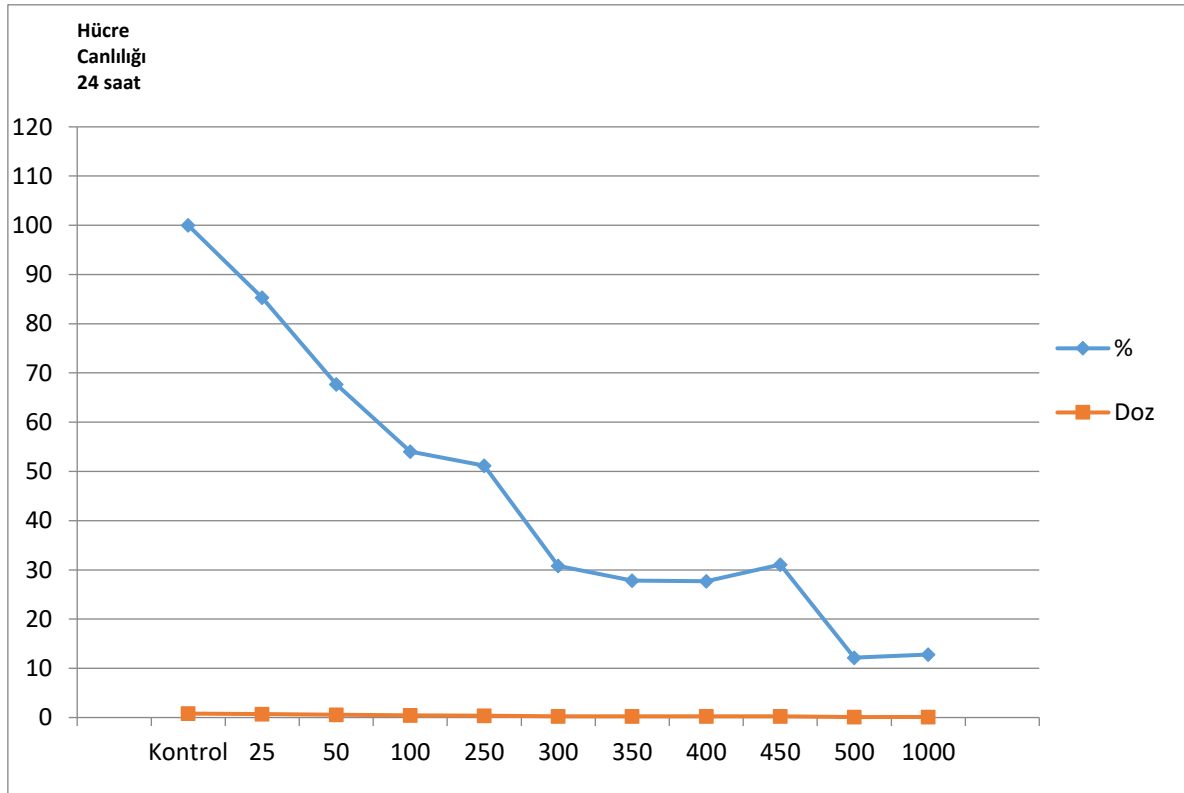
3.6. İstatistiksel Analiz

% canlılık, yukarıda yöntemde belirtilen formülle hesaplandı. İmmunohistokimyasal boyama, DAPI boyası ve yara iyileşmesi testi verileri için istatistiksel analiz yapılmadı gözlemlere göre değerlendirme yapıldı. Doz ve kontrol grubu arasındaki gen ifadesi farklılıklarının istatistiksel analizleri için online tabanlı "RT² Profiler PCR Data Analysis" programı kullanıldı.

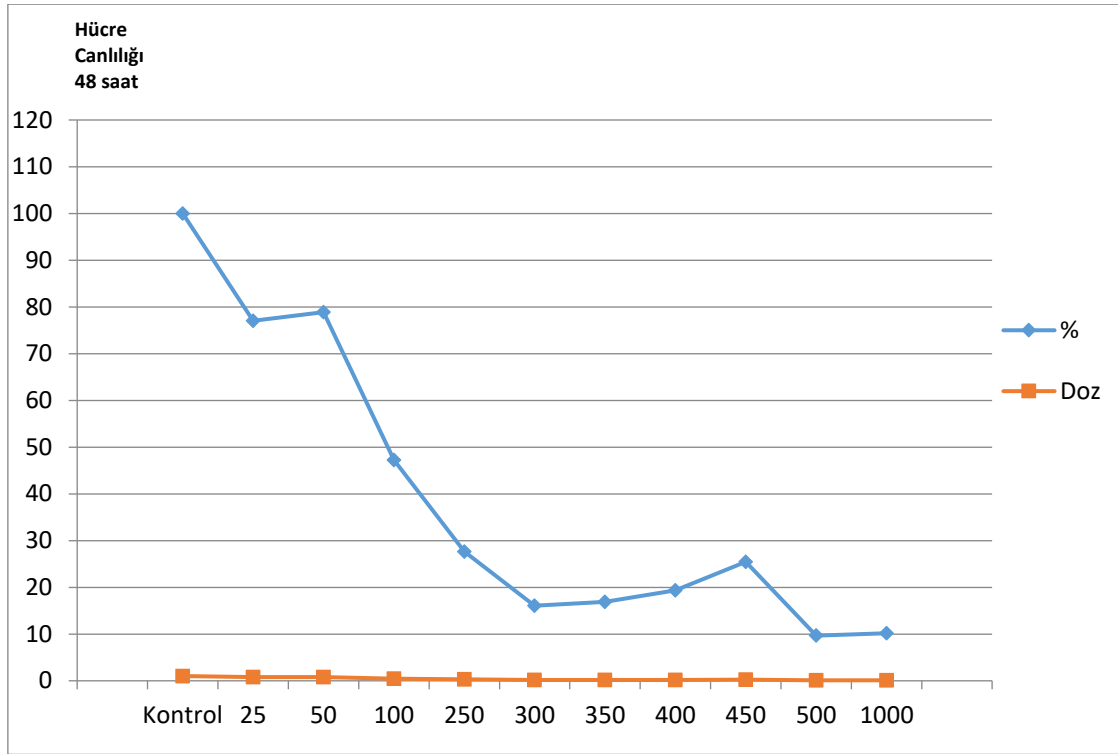
4.BULGULAR

4.1. Hücre canlılığı ve MTT Analizi

Ishikawa hücre canlılığına Resveratrol'ün etkisi MTT testi ile değerlendirildi. Hücre popülasyonu, Resveratrol konsantrasyonlarına göre kademeli olarak azaldı. Resveratrol, Ishikawa hücrelerinin proliferasyonunu doza bağlı bir şekilde inhibe etti.



Şekil 11: 24 saat Resveratrol dozunun MTT test sonuçları



Şekil 12: 48 saat Resveratrol dozunun MTT test sonuçları

Ishikawa hücre canlılığına Resveratrol'ün etkisi MTT testi ile değerlendirildi. Hücre popülasyonu, Resveratrol konsantrasyonlarına göre kademeli olarak azaldı (Şekil 11 ve Şekil 12). Grafik sonuçlarının değerlendirilmesinde 24 saat IC50 dozu 255,6 µM ve 48 saat IC50 dozu 86,09 µM olarak hesaplanmıştır.

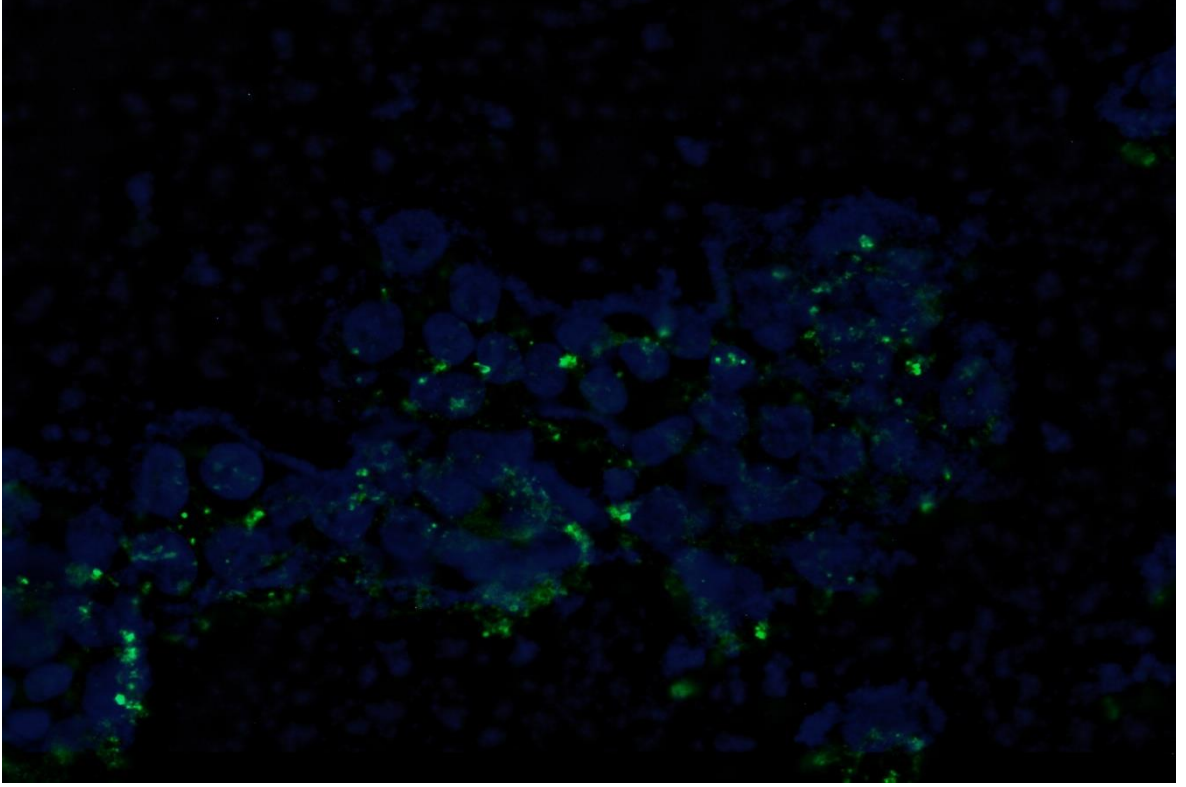
4.2. İmmunoflorasan Boyama

Gözlemsel ölçülen Floresan Yoğunluğu skora istatistik sonuçlarına göre Resveratrol grubunda kontrol grubuna göre Anti-Beclin-1 (Tablo 2) floresan yoğunluğunun istatistiksel olarak anlamlı azalış gösterdiği tespit edildi.

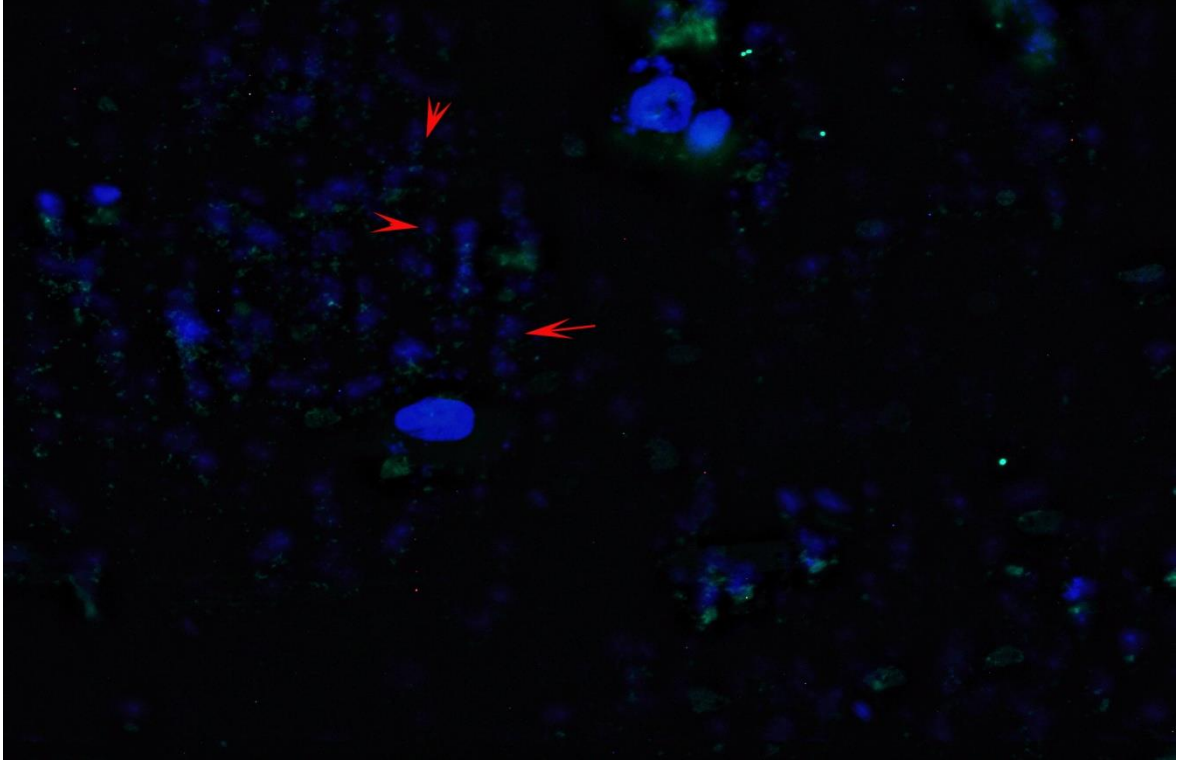
Tablo2: Anti-Beclin-1 antikoru skora istatistik sonuçları, $p < 0,005$

Grup	Min	Max	25th	75th	P
Kontrol	1	3	1	3	
Resveratrol	1	2	1	2	0,001

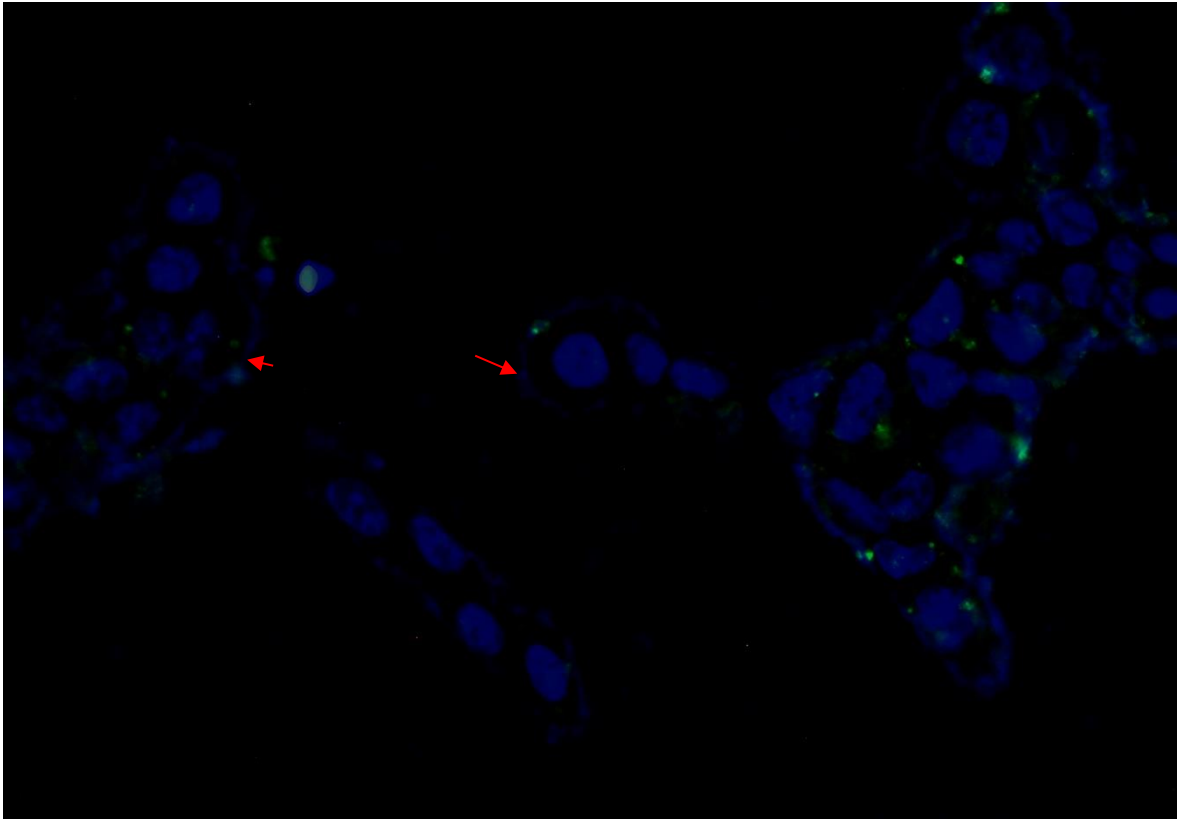
Çekirdekleri DAPI ile boyanan hücrelerin değerlendirmesinde kontrol hücrelerine göre IC50 dozu uygulanan hücrelerde apoptotik çekirdekler gözlendi (oklar).



Şekil 13: Kontrol grubu Anti Beclin-1 immün floresan boyaması



Şekil 14: Resveratrol grubu Anti Beclin-1 immün floresan boyaması, kırmızı oklar apoptotik çekirdekler

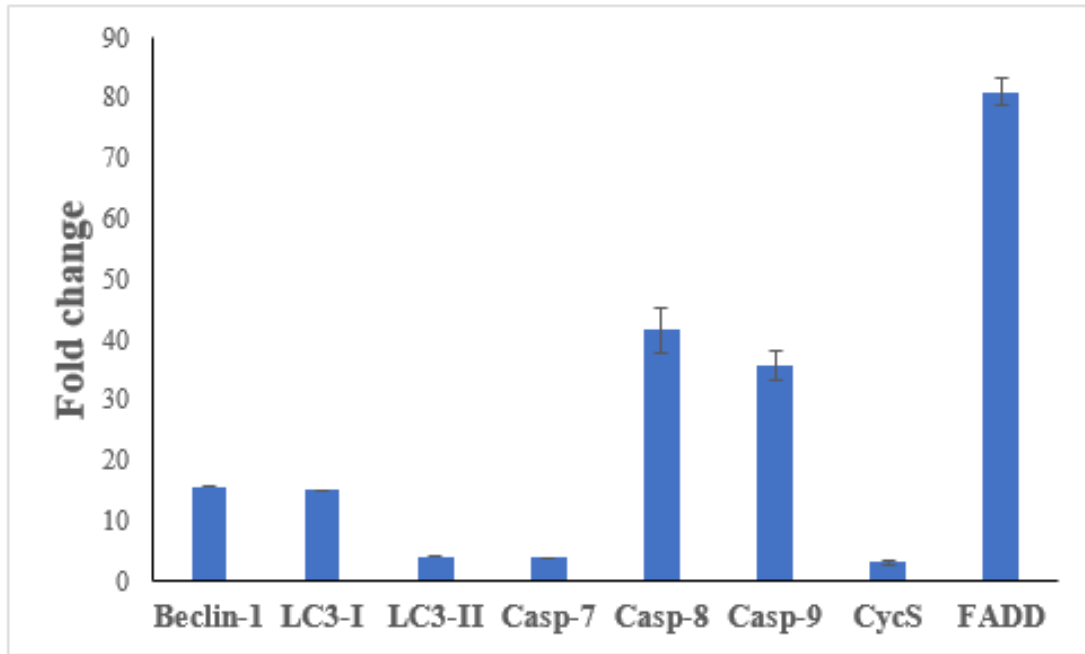


Şekil 15: Resveratrol grubu Anti Beclin-1 immün floresan boyaması, kırmızı oklar apoptotik çekirdekler

4.3. Gen Ekspresyon Sonuçları

Otofaji ve apoptozis ile ilgili hedef genlerin mRNA ekspresyon seviyeleri, web tabanlı “RT² Profiler PCR Data Analysis” programı kullanılarak RT- qPCR ile hesaplandı. Elde ettiğimiz sonuçlara göre Resveratrol doz grubu Ishikawa hücrelerinde, kontrol grubuna göre gen ekspresyonlarına bakıldığında;

Beclin-1'in 15.67, LC3-I' in 15.03, LC3-II' nin 4.01, Casp-7' nin 3.76, Casp-8' in 41.5, Casp-9' un 35.55, CycS' nin 3 ve FADD'ın 81.01 kat anlamlı olarak arttığı görüldü. Diğer genlerin mRNA ifadelerinde anlamlı bir fark saptanmadı (Şekil 15).



Şekil 16: Ishikawa hücrelerine uygulanan Resveratrol'ün apoptozis ve otofaji-ilişkili genlerin mRNA Ekspresyonları üzerindeki etkisi

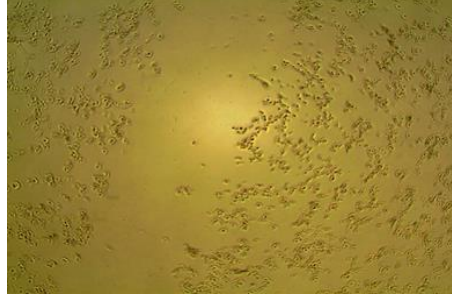
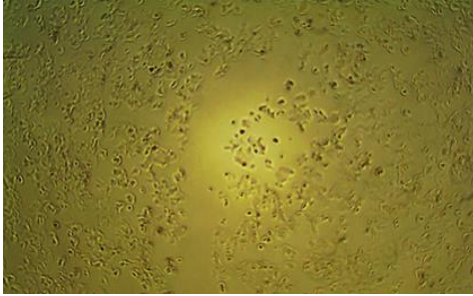
4.4. Yara İyileşme Testi

KONTROL

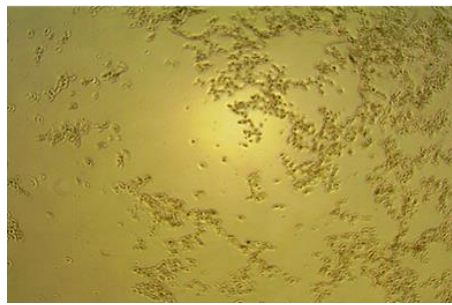
RESVERATROL



0. SAAT



24. SAAT



48. SAAT

Şekil 17: Yara İyileşme Testi

Resveratrol IC50 dozunun Ishikawa hücrelerinde kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında hücre ölümünün ve hücreler arası mesafenin arttığı görüldü.

Resveratrol'ün kontrol grubuna kıyasla hücre göçünü azalttığı gözlemlendi.

5.TARTIŞMA

Kadınlarda jinekolojik maligniteler içinde en sık görülen tip endometriyum kanseridir. Kadın kanserlerinin % 5.9'unu oluşturan Endometriyum adenokarsinomu, uterus korpus kanserleri içinde yer alır ve uterus korpus kanserleri arasında en sık görülenidir. (Globocan 2020). Cerrahi tedavi, kemoterapi, radyoterapi, hormonal tedavi veya bunların kombinasyonları tedavi seçenekleri arasında yer alır. Geleneksel kanser tedavilerinin getirdiği ciddi yan etkiler ve sınırları; tamamlayıcı ve alternatif ilaçların yaygın olarak tercih edilmesine yol açmaktadır. Bu çeşitli tedavi yöntemleri arasında kanıtlanabilir antitümör aktivitesi olan geleneksel ilaçlar önem kazanmaktadır.

Çilek, üzüm ve yer fıstığı gibi birçok bitki türünde bir fitoaleksin olarak bulunan Resveratrol'un sağlık üzerindeki etkileri pek çok alanda araştırılmış olup, antikanser özelliği de çalışmalarda çokça yer bulmuştur. Resveratrol'un karsinogenez ile ilgili birçok hücresel olayda düzenleyici bir role sahip olduğu gösterilmiştir ancak bu etkilerin mekanizması hala iyi tanımlanamamıştır (Yuan ve ark., 2015).

Promiyelositik lösemi, akciğer, meme, prostat ve kolon kanseri hücreleri dahil kanser hücre hatlarında yapılan çalışmalarda Resveratrol'un büyümeyi inhibe ettiği, apoptozisi indüklediği bildirilmiştir (Alkhalaf, 2007; Bishayee, 2009; Malhotra ve ark., 2011; Leon ve ark., 2012; Miki ve ark., 2012; Singh ve ark. 2014).

Meme kanser hücre hattında yapılan çalışmada Resveratrol p53 aktivasyonu ile apoptozisi tetiklemiştir (Alkhalaf, 2007). Çalışmamızda ise kaspaz aktivasyonu ile apoptozisi tetikleyebileceğini bulduk.

Opipari ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Resveratrol'un over kanser hücrelerinde otofajiyi tetikleyerek etki ettiği gösterilmiştir (Opipari ve ark., 2004). Resveratrol'un endometriyum kanseri dahil olmak üzere endokrin ilişkili kanserlerde antitümör rolü olduğunu bildiren çalışmalar olsa da antiproliferatif etkisinin altında yatan mekanizma halen tartışılmaktadır (Singh ve ark., 2014).

Resveratrol'un apoptozise olan etkisinin mekanizması halen kesin belli olmamakla birlikte, bazı proapoptotik proteinlerin p53'e bağımlı aktivasyonu yoluyla apoptozisi indüklediği düşünülmektedir. Resveratrol'un otofajiye etkileri de kanser çalışmalarında

önemli yer tutmaktadır. Yapılan bazı çalışmalarda Resveratrol, AKT/mTOR yolu üzerinden etki ederek otofaji indüklemiştir (Wang ve ark., 2017; Elshaer ve ark., 2018).

Resveratrol'ün multipl miyelom hücrelerinde yapılan çalışmada AMPK düzeylerini artırarak ve mTOR inhibisyonu yaparak otofaji ve apoptozu indüklediği tespit edilmiştir (Ma R ve ark., 2021).

Fukuda ve arkadaşlarının 2016 yılında yaptıkları çalışmada Resveratrol'ün Ishikawa hücrelerinin proliferasyonunu baskıladığı gösterilmiş. Ishikawa endometriyal kanser hücrelerinde Resveratrol için IC50 değerini 20 µM olarak bulmuşlar ve bu değerin servikal, mesane, meme ve karaciğer kanseri hücrelerinininkinden daha düşük olduğunu göstermişlerdir. Dolayısıyla endometriyum kanser hücrelerinin diğer bazı kanser türlerine göre Resveratrol'e daha duyarlı olabileceğini belirtmişlerdir. Çalışmamızda bulduğumuz IC50 değeri bu çalışmanın aksine diğer hücrelerle benzerdir. 24 saat IC50 dozu 255,6 µM ve 48 saat IC50 dozu 86,09µM olarak bulunmuştur.

Son zamanlarda Endometriyum kanseri tedavisinde otofaji modülasyonunun potansiyel terapötik faydasını belirlemek için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Ishikawa hücreleri üzerine yapılan bazı çalışmalarda Sisplatin (Sun M ve ark., 2017), Bortezomib (Kao C ve ark., 2014), Metformin (Takahashi ve ark., 2014), Sorafenib (Eritja ve ark., 2017) gibi ilaçların otofaji üzerine etkisi araştırılmıştır. Biz de çalışmamızda, Resveratrol'ü kullandık.

T-hücreli akut lenfoblastik lösemi (T-ALL) hücrelerinde yapılan çalışmada, Resveratrol'ün Bcl-2 gibi antiapoptotik proteinlerin ekspresyonunu azalttığını ve Bax, Bim ve Bad gibi proapoptotik proteinlerin ekspresyonunu arttırdığını ayrıca otofaji ile ilişkili olan LC3-II/LC3-I ve Beclin 1 oranında da önemli artışa yol açtığını tespit etmişlerdir (Ge ve ark., 2013). Çalışmamızda Resveratrol'ün LC3-I'i 15.03 ve LC3-II'yi 4.01 ve Beclin 1'i 15.67 kat artırdığını gözlemledik.

Endometriyum kanser hücre hattında Resveratrol ile yapılan çalışma sayısı oldukça sınırlıdır. Ayrıca Resveratrol'ün apoptozis ve otofaji indüklediğini gösteren çalışmalar olsa da bunun etki mekanizması tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir.

Apoptozis intrinsik yolda başlatıcı kaspaz olarak kaspaz 9, ekstrinsik yolda ise başlatıcı kaspaz olarak kaspaz 8 rol alır (Robbins 2014; Gökhan ve ark., 2020).

Çalışmamızda Resveratrol'ün kaspaz 8 ve kaspaz 9 aktivasyonu ile apoptozisin hem ekstrinsik hem intrinsik yolağını indükleyebileceğini düşünmekteyiz.

Makrotofaji, otofagozom adı verilen çift membranlı veziküllerin esas rol aldığı bir otofaji sürecidir. Yıkıma uğratılacak uzun ömürlü proteinler, karbonhidrat, lipid ve RNA'lar, hasar görmüş mitokondriyon ve peroksizom gibi organeller ile istilacı patojenler otofagozomların içine hapsedilip lizozomlara taşınırlar. Lizozomlarda bu maddeler, asit hidrolaz enzimleri tarafından parçalanırlar. Otofagozomun başlaması, çekirdeklenmesi, otofagozom zarının genişlemesi ve uzaması, lizozomla birleşme ve intraveziküler ürünlerin yıkımı gibi otofagozom oluşum aşamaları söz konusudur. LC3 protein ailelerinin üyeleri de bu süreçte rol alır (Axe ve ark., 2008; Biazik ve ark., 2015). Bulgularımıza göre; Resveratrol'ün LC3-I ve LC3-II'yi artırarak otofagozom oluşumuna katkı sağlayarak otofajiyi tetikleyebileceğini düşünmekteyiz.

Otofajinin apoptozise paralel olarak hücre ölümüne yol açabileceğini savunan görüşler vardır. Bazı hücrelerde apoptozis ve otofajinin koordineli çalışarak hücre ölümünde ortak roller aldığını savunan görüşler yaygınlaşmaktadır. Apoptozis özellikle çekirdek değişiklikleri ve kromatinin yıkımıyla giderken, otofaji sitoplazmik materyallerin yıkımıyla başlamaktadır. Bu yüzden organellerden zengin ve büyük çekirdeği olan hücrelerde apoptozis ve otofajinin birlikte çalışarak hücreyi ölüme götürmeleri anlamlıdır. Bu görüşü destekleyen çalışmalarda Beklin-1 upregülasyonu ile hem otofajik hem de apoptotik hücre ölümünün aktive olduğu gösterilmiştir (Qian ve ark., 2007). Çalışmamızda Resveratrol doz grubu Ishikawa hücrelerinde, kontrol grubuna göre Beclin-1'in gen ekspresyonunda anlamlı düzeyde bir artış görüldü. Dolayısıyla Resveratrol, sağladığı Beclin 1 artışıyla apoptozis ve otofajiyi birlikte tetikleyebilir.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, çalışmamızda Resveratrol'ün apoptozisi ve otofajiyi indükleyerek hücre canlılığını etkilemesi ve hücre göçünü azaltması, kanser tedavisinde kullanılabilecek bir ajan olabileceğini düşündürmüştür. Ancak bu sonuçlar laboratuvar ortamında yapılan çalışmalara dayanmaktadır.

Resveratrol'ün anti kanser özelliklerinin klinik çalışmalarla da değerlendirilmesi; yeni tedavi stratejileri geliştirmek için daha fazla araştırmanın önünü açacak ve bilgi birikimi sağlayacaktır.

7. KAYNAKLAR

- Abdel Karim N, Gaber O, Aljohani HM, Eldessouki I, Bahassi EM, Morris J. Exosomes as a Surrogate Marker for Autophagy in Peripheral Blood, Correlative Data from Phase I Study of Chloroquine in Combination with Carboplatin/Gemcitabine in Advanced Solid Tumors. *Asian Pac J Cancer Prev*.2019 Dec 1;20(12):3789-3796.
- Adams JM, Cory S. Life or death decions by the Bcl-2 family. *Trends. Biochem Sci* 2001;26:61-6.
- Alfaras I, Pérez M, Juan ME, Merino G, Prieto JG, Planas JM et al. (2010) Involvement of breast cancer resistance protein (BCRP1/ABCG2) in the bioavailability and tissue distribution of trans-resveratrol in knockout mice. *J. Agric. Food. Chem.* 58, 4523–4528.
- Alkhalaf M. Resveratrol-induced apoptosis is associated with activation of p53 and inhibition of protein translation in T47D human breast cancer cells. *Pharmacology*. 2007;80(2-3):134-43.
- Alkhalaf M. Resveratrol-induced growth inhibition in MDA-MB-231 breast cancer cells is associated with mitogen-activated protein kinase signaling and protein translation. *Eur J Cancer Prev*2007;16:334–341.
- Almonte-Becerril M., Navarro-Garcia F., Gonzalez-Robles A., Vega-Lopez M.A., Lavalle C., Kouri J.B. Cell death of chondrocytes is a combination between apoptosis and autophagy during the pathogenesis of Osteoarthritis within an experimental model. *Apoptosis*. 2010;15:631–638.
- Al Rawi S, Louvet-Vallee S, Djeddi A, ve ark. 2011. Postfertilization autophagy of sperm organelles prevents paternal mitochondrial DNA transmission. *Science*. 334: 1144-1147.
- Amaravadi R, Kimmelman AC, White E. Recent insights into the function of autophagy in cancer. *Genes Dev*. 2016;30:1913–1930.
- Arias E, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy in protein quality control. *Curr Opin Cell Biol*. 2011;23:184–9.
- Axe EL, Walker SA, Manifava M, ve ark. 2008. Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol*. 182:685- 701.
- Bauvy C, Gane P, Arico S, Codogno P, Ogier-Denis E. 2001. Autophagy delays sulindacsulfide-induced apoptosis in the human intestinal colon cancer cell line HT-29. *Exp Cell Res*. 268:139-149.
- Biazik J, Yla-Anttila P, Vihinen H, ve ark. 2015. Ultrastructural relationship of the phagophore with surrounding organelles. *Autophagy*. 11: 439-51.
- Bireller, E.,   in  in, Z,   akmako  lu, B. "Endometrium Kanseri ve Geli  imi   zerinde Etkili PI3K/AKT/mTOR ve RAS/RAF/MAPK Sinyal İletim Yolakları". *Deneyisel Tıp Ara  tırma Enstit  s   Dergisi* 5 (2015): 42-50
<https://dergipark.org.tr/en/pub/iudtaed/issue/28605/112016>>
- Bishayee A. Cancer prevention and treatment with resveratrol: from rodent studies to clinical trials. *Cancer Prev Res (Phila)*2009;2:409–418.

- Braun MM, Overbeek-Wager EA, Grumbo RJ. Diagnosis and Management of Endometrial Cancer. *Am Fam Physician*. 2016 Mar 15;93(6):468-74.PMID: 26977831
- Brinton LA, Felix AS, McMeekin DS, et al. Etiologic heterogeneity in endometrial cancer: evidence from a Gynecologic Oncology Group trial. *Gynecol Oncol* 2013;129:277–84
- Cinel L, Polat A, Aydin O, Dusmez D, Egilmez R. Bcl-2, iNOS, p53 and PCNA expression in normal, disordered proliferative, hyperplastic and malignant endometrium. *Pathol Int* 2002;52:384-389.
- Coşkun A. Kadın Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği El Kitabı. Koç Üniversitesi Yayınları, Inc.2012, İstanbul, p:526-527
- Creasman WT, Morrow CP, Bundy BN, Homesley HD, Graham JE, Heller PB. Surgical pathologic spread patterns of endometrial cancer. A Gynecologic Oncology Group Study. *Cancer* 1987;60:2035–41.
- Curtin JF, Cotter TG. Live and let die: regulatory mechanism in Fas mediated apoptosis. *Cell Signal* 2003;15:983-92.
- Di Bartolomeo S, Nazio F, Cecconi F. 2010. The role of autophagy during development in higher eukaryotes. *Traffic*. 11(10): 1280–1289.
- Eisenberg-Lerner A, Bialik S, Simon H-U, Kimchi A. 2009. Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death Differ*. 16:966-975.
- Elmore S. 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*. 35: 495–516.
- Elshaer M, Chen Y, Wang XJ, Tang X. Resveratrol: An overview of its anti-cancer mechanisms. *Life Sci*. 2018 Aug 15;207:340-349.
- Erdoğan BB (2003): Apoptozis mekanizmaları: tümör gelişiminde fas-fasl bağımlı apoptozis. *Akciğer Arşivi*, 4: 165-174.
- Eritja N, Chen B-J, Rodríguez-Barrueco R, et al. Autophagy orchestrates adaptive responses to targeted therapy in endometrial cancer. *Autophagy*. 2017;13(3):608–624.
- Eroschenko, V. P. Di Fiore Histoloji Atlası Fonksiyonel İlişkileriyle (On İkinci Baskı). 2016. Palme Yayıncılık.s505.
- Espert L, Denizot M, Grimaldi M, Robert-Hebmann V, Gay B, Varbanov M, Codogno P, Biard-Piechaczyk M. 2006. Autophagy is involved in T cell death after binding of HIV envelope proteins to CXCR4. *J Clin Invest*. 116: 2161-2172.
- Estaquier J, Idziorek T, Bels F D, Sinoussi F B, Hurtrel B, Aubertin A M (1994): Programmed cell death and AIDS; significance of T-cell apoptosis in pathogenic and nonpathogenic primate lentiviral infections. *Immunology*; 91: 9431-9435.
- Eşrefoğlu M. Özel Histoloji. 2. Baskı İstanbul Tıp Kitabevi, 2016;291-325.
- Fimia GM, Piacentini M. 2010. Regulation of autophagy in mammals and its interplay with apoptosis. *Cell. Mol. Life Sci*. 67:1581–1588.

- Fukuda T, Oda K, Wada-Hiraike O, Sone K, Inaba K, Ikeda Y, Makii C, Miyasaka A, Kashiwayama T, Tanikawa M, Arimoto T, Yano T, Kawana K, Osuga Y, Fujii T. Autophagy inhibition augments resveratrol-induced apoptosis in Ishikawa endometrial cancer cells. *Oncol Lett*. 2016 Oct;12(4):2560-2566.
- Galle PR (1997): Apoptosis in liver disease. *Journal of Hepatology*, 27: 405-412.
- Ge J, Liu Y, Li Q, Guo X, Gu L, Ma ZG, Zhu YP. Resveratrol induces apoptosis and autophagy in T-cell acute lymphoblastic leukemia cells by inhibiting Akt/mTOR and activating p38-MAPK. *Biomed Environ Sci*. 2013 Nov;26(11):902-11.
- Glick D, Barth S, Macleod KF. 2010. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol*. 221:3–12.
- GLOBOCAN 2020, Cancer Incidence and Mortality Worldwide, Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <http://globocan.iarc.fr>.
- Gökhan A, Kılıç KD, Güllü K, Uyanıkgil Y, Çavuşoğlu T. Apoptotic Pathways and Targeted Therapies. *Med J SDU* 2020; 27(4): 565-573.
- Guimaraes C A, Linden R (2004): Programmed cell death; apoptosis and alternative deathstyles. *Eur. J. Biochem.*, 271: 1638–1650.
- Gupta S, Agrawal A, Agrawal S, Su H, Gollapudi S. 2006. A paradox of immunodeficiency and inflammation in human aging: lessons learned from apoptosis. *Immun Ageing*. 3:5.
- Gürbilek M, Dağlar C, Aköz M, Topçu C (2004): Diabetes mellituslu hastalarda hastalık süresinin eritrosit membranı Na⁺/K⁺-ATPaz enzim aktivitesi, lipid peroksidasyonu ve DHEA(S), glukoz, lipid düzeyleri üzerine etkisi. *Turkish Journal of Biochemistry*, 29 (3): 237-242.
- Han J, Liu W, Bi Y (2008) Advances in resveratrol studies. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 24, 1851–1859.
- Hashimoto D, Bläuer M, Hirota M, et al. Autophagy is needed for the growth of pancreatic adenocarcinoma and has a cytoprotective effect against anticancer drugs. *Eur J Cancer*. 2014;50:1382–90.
- He C, Klionsky D. 2009. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu. Rev. Genet*. 43: 67–93.
- Heneweer C, Schmidt M, Denker HW, Thie M. Molecular mechanisms in uterine epithelium during trophoblast binding: the role of small GTPase RhoA in human uterine Ishikawa cells. *J Exp Clin Assist Reprod*. 2005, 2(1): 4.
- Huang T, Song X, Yang Y, Wan X, Alvarez AA, Sastry N, Feng H, Hu B, Cheng SY. Autophagy and Hallmarks of Cancer. *Crit Rev Oncog*. 2018;23(5-6):247-267.
- Hockenbery DM. Mitochondria and Cell Death. Humana Press, Inc 2016, New York, USA
- Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. 2009. Cell Death, *N Engl J Med*. 361:1570-1583.
- Junquera L, Carneiro J. Temel Histoloji, çev. Editörleri: Yener Aytekin, Seyhun Solakoğlu. Nobel tıp kitabevi, İstanbul 2003:449-465

- Kao C, Chao A, Tsai C-L, et al. Bortezomib enhances cancer cell death by blocking the autophagic flux through stimulating ERK phosphorylation. *Cell Death Dis.* 2014;5(11):e1510–e1510.
- Keskin N, Noyan T, Kunter B. Resveratrol ile üzümde gelen sağlık. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 29: 1273-1279, 2009.
- Kroemer G, Mariño G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell.* 2010;40:280–93.
- Kumar V, Abbas A, Aster J. Robbins Temel Patoloji, Çev. Editörleri: Sıtkı Tuzlalı, Mine Güllüoğlu, Uğur Çevikbaş. 9. Baskı. Nobel tıp kitabevi, İstanbul 2013:18-22
- Kundu JK, Surh YJ. Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol: mechanistic perspectives. *Cancer Lett* 2008;269:243–261.
- Lang F, Qin Z, Li F, Zhang H, Fang Z, Hao E. Apoptotic Cell Death Induced by Resveratrol Is Partially Mediated by the Autophagy Pathway in Human Ovarian Cancer Cells. *PLoS One.* 2015 Jun 11;10(6):e0129196.
- Leon-Galicia I, Diaz-Chavez J, Garcia-Villa E, Uribe-Figueroa L, Hidalgo-Miranda A, Herrera LA, et al. Resveratrol induces downregulation of DNA repair genes in MCF-7 human breast cancer cells. *Eur J Cancer Prev* 2012;22:11–20.
- Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell.* 2008;132(1):27–42.
- Levy JMM, Towers CG, Thorburn A. Targeting autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2017 Sep;17(9):528-542. doi: 10.1038/nrc.2017.53. Epub 2017 Jul 28.
- Ma R, Yu D, Peng Y, Yi H, Wang Y, Cheng T, Shi B, Yang G, Lai W, Wu X, Lu Y, Shi J. Resveratrol induces AMPK and mTOR signaling inhibition-mediated autophagy and apoptosis in multiple myeloma cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2021 May 21;53(6):775-783.
- Malhotra A, Nair P, Dhawan DK. Curcumin and resveratrol synergistically stimulate p21 and regulate COX-2 by maintaining adequate zinc levels during lung carcinogenesis. *Eur J Cancer Prev* 2011;20:411–416.
- Martinez-Vicente M, Cuervo AM. 2007. Autophagy and neurodegeneration: when the cleaning crew goes on strike. *Lancet Neurol.* 6:352-361.
- Marques FZ, Markus MA, Morris BJ (2009) Resveratrol: cellular actions of a potent natural chemical that confers a diversity of health benefits. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 2125–2128.
- Mathew R, Karp CM, Beaudoin B, et al. Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell.* 2009;137(6):1062–1075.
- Mescher Anthony L. Junqueira Temel Histoloji Atlas Kitap. Çev. Seyhun Solakoğlu. Nobel Tıp Kitabevi. İstanbul 2016
- Mijaljica D, Prescott M, Devenish R J. Microautophagy in mammalian cells: Revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy.* 2011;7:673–82.
- Miki H, Uehara N, Kimura A, Sasaki T, Yuri T, Yoshizawa K, Tsubura A. Resveratrol induces apoptosis via ROS-triggered autophagy in human colon cancer cells. *Int J Oncol.* 2012 Apr;40(4):1020-8.

- Mikstacka R, Rimando AM, Ignatowicz E (2010) Antioxidant effect of trans resveratrol, pterostilbene, quercetin and their combinations in human erythrocytes in vitro. *Plant Foods Hum. Nutr.* 65, 57–63.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M. and Klionsky, D.J. (2008) Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 451, 1069- 1075.
- Moore Keith L., TVN Persaud, Mark G. Torchia. Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi. Çev. Hakkı Dalçık. 10. baskı, Nobel Tıp Kitabevi. İstanbul 2016: p 13
- Mortensen M, Ferguson DJ, Edelmann M, ve ark. 2010. Loss of autophagy in erythroid cells leads to defective removal of mitochondria and severe anemia in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107(2): 832–837.
- Muganda PM. Apoptosis Methods in Toxicology. Humana Press, Inc 2016, 1st Edition, New York, USA
- Musumeci G, Castrogiovanni P, Trovato FM, Weinberg AM, Al-Wasiyah MK, Alqahtani MH, Mobasher A. Biomarkers of Chondrocyte Apoptosis and Autophagy in Osteoarthritis. *Int J Mol Sci.* 2015 Aug 31;16(9):20560-75.
- Nagata S, Nakana H. In Apoptotic and Non-apoptotic Cell Death. Springer, Inc 2017
- Nakamura, Shuhei and Tamotsu Yoshimori. New insights into autophagosome–lysosome fusion. *Journal of Cell Science* 130 (2017): 1209 - 1216.
- Natasha C. Chang. Autophagy and Stem Cells: Self-Eating for Self-Renewal, *Front. Cell Dev. Biol.*, 2020
- Oncology. ASoC. Major Research Advances in Cancer Treatment, Prevention and Screening. *Clinical Cancer Advances* 2009.
- Opipari AW, Tan L, Boitano AE, Sorenson DR, Aurora A, Liu JR. Resveratrol-induced autophagy in ovarian cancer cells. *Cancer Res.* 2004;64:696–703.
- Öktem S., Özhan M., Özol D. 2001. Apoptozisin Önemi,, *Toraks Dergisi*, 2(1):91-95
- P. Jara, J. Spies, C. Cárcamo, Y. Arancibia, G. Vargas, C. Martin, M. Salas, C. Otth, A. Zambrano The effect of resveratrol on cell viability in the Burkitt's lymphoma cell line Ramos *Molecules*, 23 (2018), p. 14
- Ross HM, Pawlina W. Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas İlişkili Hücre Biyolojisi ve Moleküler Biyoloji ile Çeviri Editörü: Barış Baykal 6. baskı. 2017: 830-861.
- Rosai J. Female reproductive system. In: Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. St Louis: Mosby-Year Book; 2004. p.1569- 1635.
- Rubinsztein DC, Gestwicki JE, Murphy LO, Klionsky DJ. 2007. Potential therapeutic applications of autophagy. *Nat Rev Drug Discov.* 6:304-312.
- Sadler TW. Langman Medikal Embriyoloji. Çev A.Can Basaklar. 13. baskı, Palme yayıncılık, Ankara 2017: 261-270.
- Saldanha FJ, Leal OV, Stenvinkel P, et al. Resveratrol : why is it a promising therapy for chronic kidney disease patients?. *Oxid Med Cell Longev* 963217- 6, 2013.
- Sato M, Sato K. 2011. Degradation of paternal mitochondria by fertilization-triggered autophagy in *C. elegans* embryos. *Science.* 334: 1141-1144.

- Shintani T, Klionsky, D.J. (2004) Autophagy in health and disease: a double-edged sword. Science New York, N.Y, 306, 990-995.
- Shrotriya S, Agarwal R, Sclafani RA. A perspective on chemoprevention by resveratrol in head and neck squamous cell carcinoma. Adv Exp Med Biol 815: 333-48, 2015
- Singh CK, Ndiaye MA, Ahmad N. Resveratrol and cancer: Challenges for clinical translation. Biochim Biophys Acta. 2015 Jun;1852(6):1178-85.
- Singh CK, Pitschmann A, Ahmad N. Resveratrol-zinc combination for prostate cancer management. Cell Cycle. 2014; 13:1867–1874.
- Smoliga MJ, Baur AJ, Hausenblas AH. Resveratrol and health- a comprehensive review of human clinical trials. Mol Nutr Food Res 55: 1-13, 2011.
- Song G, Ouyang G, Bao S. 2005. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. J Cell Mol Med. 9:59–71.
- Spierings DC, de Vries EG, Vellenga E. et al: Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. J Histochem Cytochem 52(6): 821-831; 2004.
- Sun M-Y, Zhu J-Y, Zhang C-Y, et al. Autophagy regulated by lncRNA HOTAIR contributes to the cisplatin-induced resistance in endometrial cancer cells. Biotechnol Lett. 2017;39(10):1477–1484.
- Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. 2006. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. EMBO Rep. 7:880-885.
- Şahin Y, Yıldız D.K. 2017. Memeli Hücrelerinde Otofajinin Moleküler Mekanizması. MAKÜ Sag. Bil. Enst. Derg. 5(2): 205-218.
- Şencan M. Ishikawa Endometriyum Epiteli Devamlı Hücre Kültürlerinde Klorimipramin'in Karboplatin Stotoksitesi Üzerine Etkisi, İstanbul Üniversitesi Sağlık bilimleri Enstitüsü. Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul 2011, (Tez Danışmanı Prof. Dr. Ayhan Bilir)
- Takahashi A, Kimura F, Yamanaka A, et al. Metformin impairs growth of endometrial cancer cells via cell cycle arrest and concomitant autophagy and apoptosis. Cancer Cell Int. 2014;14(1):53.
- Tian Y, Song W, Li D, Cai L, Zhao Y. Resveratrol As A Natural Regulator Of Autophagy For Prevention And Treatment Of Cancer. Onco Targets Ther. 2019 Oct 17;12:8601-8609.
- T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Kanseri Dairesi Başkanlığı
<https://hsgm.saglik.gov.tr/kanser-turleri/rahim-endometrium-kanseri.html>
- T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Kanseri Dairesi Başkanlığı
<https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kanser-istatistikleri.html>
- Türk Jinekolojik Onkoloji Derneği. Jinekolojik Kanserlerin Yönetimi Kılavuzu “Endometrium Kanseri”, 2017. <https://trsgo.org/files/yonetim-kilavuzlari/Endometrium-Kanseri.pdf>

- Uchida H, Maruyama T, Nagashima T, Asada A, Yoshimura Y. Histone deacetylase inhibitors induce differentiation of human endometrial adenocarcinoma. *Endocrinology*. 2005;146(12):5365-73.
- Xu YZ, Kanagaratham C, Youssef M, Radzioch D. New Frontiers in Cancer Chemotherapy — Targeting Cell Death Pathways. In: Kanagaratham C, editor. *Cell Biology - New Insights*. Rijeka: InTech; 2016. p. Ch. 4
- Xue L, Fletcher GC, Tolkovsky AM. 1999. Autophagy is activated by apoptotic signalling in sympathetic neurons: an alternative mechanism of death execution. *Mol Cell Neurosci*. 14:180-198.
- Qian W, Liu J, Jin J, Ni W, Xu W. 2007. Arsenic trioxide induces not only apoptosis but also autophagic cell death in leukemia cell lines via up-regulation of Beclin-1. *Leuk Res*. 31:329–339
- Wang WR, Li TT, Jing T, Li YX, Yang XF, He YH, Zhang W, Lin R, Zhang JY. SIRT1 Regulates the Inflammatory Response of Vascular Adventitial Fibroblasts through Autophagy and Related Signaling Pathway. *Cell Physiol Biochem*. 2017;41(2):569-582.
- Widlund AL, Baur JA, Vang O. mTOR: more targets of resveratrol. *Expert Rev Mol Med* 15: 10-25, 2013.
- Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res*. 2011 Sep 26;30(1):87.
- Van Cruchten S, Van Den Broeck W. 2002. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol*. 31:214-223.
- Young B, JW Heaty. Wheater's Functional Histology A Text Atlas; 40th edition, 2000.
- Yuan L, Zhang Y, Xia J, et al. Resveratrol induces cell cycle arrest via a p53- independent pathway in A549 cells. *Mol Med Rep* 11(4): 2459-2464, 2015.