

**PERİFOSİN VE D VİTAMİNİ KOMBİNASYONUNUN  
ENDOMETRİYUM KANSERİ HÜCRE HATTI (HEC1A) ÜZERİNE  
ETKİSİ**

**DOKTORA TEZİ**

**ARŞ. GÖR. MERYEM İLKAY KARAGÜL**

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI**

**MERSİN  
TEMMUZ - 2019**

**PERİFOSİN VE D VİTAMİNİ KOMBİNASYONUNUN  
ENDOMETRİYUM KANSERİ HÜCRE HATTI (HEC1A) ÜZERİNE  
ETKİSİ**

**DOKTORA TEZİ**

**ARŞ. GÖR. MERYEM İLKAY KARAGÜL**

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI**

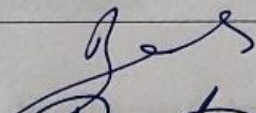
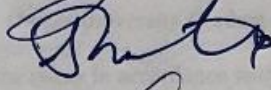
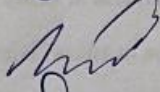
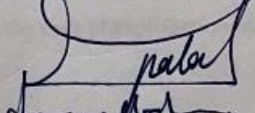
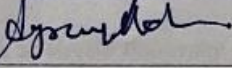
**Danışman  
Prof. Dr. Savaş AKTAŞ**

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından  
2016-2-TP3-1888 nolu proje olarak desteklenmiştir.

**MERSİN  
TEMMUZ - 2019**

## ONAY

Meryem İlkay KARAGÜL tarafından Prof. Dr. Savaş AKTAŞ danışmanlığında "Perifosin ve D Vitamini Kombinasyonunun Endometriyum Kanseri Hücre Hattı (HEC1A) Üzerine Etkisi" başlıklı bu çalışmada aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından 08 Temmuz 2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavı sonucunda oy birliği ile Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Görevi	Ünvanı, Adı ve Soyadı	İmza
Başkan	Prof. Dr. Banu COŞKUN YILMAZ	
Üye	Prof. Dr. Savaş AKTAŞ	
Üye	Prof. Dr. İsmail ÜN	
Üye	Prof. Dr. Sait POLAT	
Üye	Prof. Dr. Ayşe YILDIRIM	

Yukarıdaki jüri kararı Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 18.07.2019 tarih ve 16/280... sayılı kararıyla onaylanmıştır.



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

### ETİK BEYAN

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

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

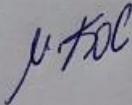
### ETHICAL DECLARATION

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

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

08 Temmuz 2019 / 08 July 2019

İmza / Signature



Meryem İlkay KARAGÜL

## ÖZET

### Perifosin ve D Vitamini Kombinasyonunun Endometriyum Kanseri Hücre Hattı (HEC1A) Üzerine Etkisi

Endometriyum kanseri kadın üreme sisteminde en sık görülen kanserdir. Perifosin protein kinaz B (AKT) fosforilasyonunu inhibe ederek çeşitli kanserlerde bir anti-kanser aktivitesi göstermektedir. D vitamininin aktif metaboliti olan kalsitriolün anti-proliferatif ve pro-apoptotik ilaç olarak kanser tedavisinde etkili olduğu ileri sürülmektedir. Spesifik ilaçlarla yapılan kombinasyon tedavileri kanser için hedefe yönelik tedavi olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bu çalışmada, perifosin, D vitamini ve perifosin+D vitamini kombinasyonlarının endometriyum kanseri hücre hattı (HEC1A) üzerindeki anti-proliferatif ve apoptotik etkilerini araştırmayı amaçladık. HEC1A hücrelerine 48 ve 72 saat boyunca perifosin (10 µM, 30 µM, 50 µM), D vitamini (50 nM, 200 nM) ve perifosin+D vitamini kombinasyonları (10 µM+50 nM, 10 µM+200 nM, 30 µM+50 nM, 30 µM+200 nM, 50 µM+50 nM ve 50 µM+200 nM) uygulandı. xCELLigence ile hücre proliferasyonunun zamana bağlı değerlendirilmesi yapıldı. RT-qPCR kullanılarak hücrelerde BCL2, BAX ve P53 mRNA ekspresyon seviyeleri saptandı. Apoptotik hücre oranları APC Anneksin V kiti kullanılarak akım sitometri ile belirlendi. HEC1A hücreleri transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ile incelendi. Perifosin+D vitamini kombinasyonunun (48. saatte 30 µM+200 nM ve 72. saatte 10 µM+200 nM) HEC1A hücrelerindeki anti-proliferatif ve apoptotik etkilerinin sadece perifosin ve sadece D vitamini uygulamalarına göre daha fazla olduğu görüldü. Perifosinin doza bağlı olarak HEC1A hücrelerinde BCL2, BAX mRNA ekspresyonunu arttırdığı saptandı. D vitamini ve perifosin+D vitamini kombinasyonlarının ise HEC1A hücrelerinde P53 mRNA ekspresyonunu artırırken BCL2, BAX mRNA ekspresyonlarında herhangi bir değişikliğe neden olmadığı gözlemlendi. HEC1A hücrelerinin TEM incelemelerinde, perifosinin otofajik hücre ölümüne, D vitamininin paraptosis benzeri hücre ölümüne, perifosin+D vitamini kombinasyonlarının ise apoptotik ve apoptotik olmayan (paraptotik, otofajik ve nekrotik) hücre ölümüne neden olduğu saptandı. Bu nedenle, endometriyum kanseri tedavisinde her iki ilacın kombine edilerek kullanılmasının, kanser hücrelerinde apoptotik ve apoptotik olmayan hücre ölüm mekanizmalarını aktive ederek alternatif ve etkili bir tedavi seçeneği olabileceği düşünülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Endometriyum kanseri, perifosin, D vitamini, xCELLigence, apoptoz, BCL2, BAX, P53.

**Danışman:** Prof. Dr. Savaş AKTAŞ, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Tıp Fakültesi, Mersin Üniversitesi, Mersin.

## ABSTRACT

### The Effect of Perifosine and Vitamin D Combination on Endometrial Cancer Cell Line (HEC1A)

Endometrial cancer is the most common cancer of the female reproductive system. Perifosine shows an anti-cancer activity in a variety of cancers by inhibiting of protein kinase B (AKT) phosphorylation. It has been suggested that calcitriol, an active metabolite of vitamin D, is effective as an anti-proliferative and pro-apoptotic drug in cancer treatment. Combination treatment with specific drugs has been widely used as targeted therapy for cancer. In this study, we aimed to investigate anti-proliferative and apoptotic effects of differential concentrations of perifosine and vitamin D on endometrial cancer cell line (HEC1A). HEC1A cells were exposed to perifosine (10  $\mu$ M, 30  $\mu$ M, 50  $\mu$ M), vitamin D (50 nM, 200 nM) and perifosine+vitamin D combinations (10  $\mu$ M+50 nM, 10  $\mu$ M+200 nM, 30  $\mu$ M+50 nM, 30  $\mu$ M+200 nM, 50  $\mu$ M+50 nM ve 50  $\mu$ M+200 nM) for 48 h and 72 h. Evaluation of cell proliferation in a time-dependent manner was performed with the xCELLigence. Levels of BCL2, BAX and P53 mRNA expression were examined by RT-qPCR. Apoptotic cell rates were determined by flow cytometry using APC Annexin V kit. HEC1A cells were analyzed by transmission electron microscopy (TEM). The anti-proliferative and apoptotic effects of the perifosine+vitamin D combination (30  $\mu$ M+200 nM at 48 h and 10  $\mu$ M+200 nM at 72 h) on HEC1A cells were higher than in perifosine and vitamin D alone. It is observed that perifosine has increased the expression of BCL2, BAX mRNA in HEC1A cells in a dose-dependent manner. While vitamin D and perifosine+vitamin D combinations increased P53 mRNA expression in HEC1A cells, BCL2, BAX mRNA expression did not show any significant change. In TEM examinations of HEC1A cells, perifosine appeared to lead autophagic cell death, whereas vitamin D caused paraptosis-like cell death and combination of perifosine+vitamin D caused apoptotic and non-apoptotic (paraptotic, autophagic and necrotic) cell death. Therefore, it is considered that the combination of both drugs in the treatment of endometrial cancer might be an alternative and effective treatment option through activating the apoptotic and non-apoptotic cell death mechanisms in cancer cells.

**Keywords:** Endometrial cancer, perifosine, vitamin D, xCELLigence, apoptosis, BCL2, BAX, P53.

**Advisor:** Prof. Dr. Savaş AKTAŞ, Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Mersin University, Mersin.

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince, her konuda yardım ve desteğini eksik etmeyen, akademik anlamda bana yol gösteren danışman hocam Prof. Dr. Savaş AKTAŞ'a teşekkür ederim.

Anabilim dalımızın değerli hocaları; Prof. Dr. Banu COSKUN YILMAZ'a, Prof. Dr. Ebru BALLI'ya ve Prof. Dr. Ş. Necat YILMAZ'a doktora eğitimim boyunca yaptıkları bilimsel ve akademik katkılarından dolayı teşekkür ederim. Aynı zamanda tez izleme komitemde yer alan ve fikirleriyle tezime katkı sunan Prof. Dr. İsmail ÜN'e teşekkür ederim.

İstatistiksel analizlerin yapılmasında yardımcı olan Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı'ndan Arş. Gör. Havva Didem ÇELİKCAN'a, deneylerim aşamasında verdiği destek için Derya YETKİN'e, doktora tezimin makale yazım aşamasında verdiği destek için değerli arkadaşım Özge Selin ÇEVİK'e ve her türlü desteklerini benden esirgemeyen çalışma arkadaşlarıma teşekkür ediyorum. Doktora eğitimim boyunca destek ve yardımlarını benden esirgemeyen bölüm sekreterimiz Ümmü DOĞAN'a ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü şefi Selime ZİYLAN'a teşekkür ediyorum.

Tüm eğitim hayatım boyunca her konuda benden desteklerini esirgemeyen, beni yetiştiren annem ve babama, bütün mutluluklarımı ve üzüntülerimi paylaştığım, hep yanımda olan kız kardeşlerime sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Hayatımı birleştirmekten onur duyduğum, her şartta gösterdiği sevgi ve sabır için sevgili eşim Sermet KARAGÜL'e, hayatımıza renk katan oğlum Çınar'a teşekkür ediyorum.

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	i
ONAY	ii
ETİK BEYAN	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
KISALTMALAR ve SİMGELER	xi
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI</b>	<b>3</b>
2.1. Uterus Histolojisi	3
2.2. Endometriyum Kanseri	5
2.2.1. Etiyolojisi	6
2.2.2. Klinik Semptomlar ve Tanı	7
2.2.3. Sınıflandırma ve Evreleme	7
2.2.4. Tedavi Yöntemleri	8
2.2.4.1. Cerrahi Tedavi	8
2.2.4.2. Adjuvan Tedavi	9
2.2.4.2.1. Radyoterapi	9
2.2.4.2.2. Kemoterapi	9
2.2.5. Endometriyum Kanseri Oluşumunda Etkili Moleküler Mekanizmalar	10
2.2.6. Endometriyum Kanserinde PTEN/PI3K/AKT Sinyal Yolağı	11
2.3. Perifosin	13
2.3.1. Perifosinin Anti-kanser Etkinliğı	15
2.4. D Vitamini	16
2.4.1. D Vitamininin Anti-kanser Etkinliğı	18
2.5. Apoptoz	19
2.5.1. Apoptozun Hücreyel Düzenlenme Mekanizmaları	20
2.5.1.1. BCL2 Süper Ailesi	20
2.5.1.2. P53	21
2.5.2. Apoptozun Moleküler Mekanizması	21
2.5.2.1. İntrinsik Apoptoz Yolağı	22
2.5.2.2. Ekstrinsik Apoptoz Yolağı	22
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM</b>	<b>24</b>
3.1. Materyaller	24
3.1.1. Cihazlar	24
3.1.2. Sarf ve Kimyasal Malzemeler	24
3.2. Yöntem	25
3.2.1. Hücre Kültürü	25
3.2.1.1. Hücre Kültür Medyumunun Hazırlanışı	26
3.2.1.2. Hücrelerin İnkübe Edilmesi	26
3.2.1.3. Hücrelerin Çözülmesi ve Çoğaltılması	26
3.2.1.4. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması	27
3.2.2. Deney Gruplarında Kullanılan İlaçların Doz Ayarlamaları	27
3.2.2.1. Perifosinin Hazırlanması	27
3.2.2.2. D Vitamininin Hazırlanması	27
3.2.2.3. HEC1A Hücrelerine Perifosin, D Vitamini ve Her İkisinin Kombinasyonunun Uygulanması	28
3.2.3. xCELLigence ile Hücre Proliferasyon Eğrilerinin Belirlenmesi	28



---

3.2.4. Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR (RT-qPCR) Analizleri	30
3.2.4.1. RNA İzolasyonu	30
3.2.4.2. Total RNA'dan cDNA Elde Edilmesi	31
3.2.4.3. Gerçek Zamanlı PCR (RT-PCR) Aşaması	31
3.2.5. Akım Sitometrik Analiz	32
3.2.5.1. APC Anneksin V-PI Boyama Protokolü	32
3.2.6. Hücrelerin Elektron Mikroskopik Takibi	33
3.3. İstatistiksel Analiz	34
<b>4. BULGULAR</b>	35
4.1. xCELLigence ile Hücre Proliferasyon Analizi	35
4.2. BCL2, BAX ve P53 mRNA Ekspresyon Analizi	38
4.2.1. BCL2 mRNA Ekspresyon Düzeyi	38
4.2.2. BAX mRNA Ekspresyon Düzeyi	40
4.2.3. P53 mRNA Ekspresyon Düzeyi	42
4.3. Akım Sitometri ile Apoptoz Analiz Sonuçları	44
4.4. Elektron Mikroskopik İncelemeler	49
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ</b>	53
KAYNAKLAR	61
ÖZGEÇMİŞ	72

---

## TABLolar DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
<b>Tablo 3.1.</b> Deney grupları ve kullanılan doz miktarları	28
<b>Tablo 3.2.</b> cDNA sentezi reaksiyon karışımı	31
<b>Tablo 4.1.</b> HEC1A hücrelerinde BCL2 mRNA ekspresyon düzeyleri	39
<b>Tablo 4.2.</b> HEC1A hücrelerinde BAX mRNA ekspresyon düzeyleri	41
<b>Tablo 4.3.</b> HEC1A hücrelerinde P53 mRNA ekspresyon düzeyleri	43
<b>Tablo 4.4.</b> HEC1A hücrelerinde 48. saatteki canlı, erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik hücre ortalamaları	45
<b>Tablo 4.5.</b> HEC1A hücrelerinde 72. saatteki canlı, erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik hücre ortalamaları	48

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
<b>Şekil 2.1.</b> Serviks, uterus ve tuba uterinanın yapısı	5
<b>Şekil 2.2.</b> PTEN/PI3K/AKT yolağı	13
<b>Şekil 2.3.</b> Perifosinin AKT aktivasyonu ve potansiyel inhibitör mekanizmaları	15
<b>Şekil 2.4.</b> D vitamini metabolizması	18
<b>Şekil 4.1.</b> 96 saat boyunca HEC1A hücre proliferasyonunun hücre indeks değerleri	35
<b>Şekil 4.2.</b> HEC1A hücrelerinde perifosin (10 µM, 30 µM, 50 µM) ve perifosin+D vitamini kombinasyonlarının (10 µM+50 nM, 10 µM+200 nM, 30 µM+50 nM, 30 µM+200 nM, 50 µM+50 nM ve 50 µM+200 nM) hücre indeks değerlerinin zamana bağlı değişim grafiğı	37
<b>Şekil 4.3.</b> HEC1A hücrelerinde D vitamini (50 nM, 200 nM) ve perifosin+D vitamini kombinasyonlarının (10 µM+50 nM, 10 µM+200 nM, 30 µM+50 nM, 30 µM+200 nM, 50 µM+50 nM ve 50 µM+200 nM) hücre indeks değerlerinin zamana bağlı değişim grafiğı	38
<b>Şekil 4.4.</b> HEC1A hücrelerinde BCL2 mRNA ekspresyon düzeylerinin bar grafiğı	40
<b>Şekil 4.5.</b> HEC1A hücrelerinde BAX mRNA ekspresyon düzeylerinin bar grafiğı	41
<b>Şekil 4.6.</b> HEC1A hücrelerinde P53 mRNA ekspresyon düzeylerinin bar grafiğı	43
<b>Şekil 4.7.</b> Akım sitometrik analiz ile HEC1A hücrelerinde 48. saatteki canlı (Q3), erken apoptotik (Q4), geç apoptotik (Q2) ve nekrotik (Q1) hücrelerin kadran istatistiğı grafiğı	45
<b>Şekil 4.8.</b> Akım sitometrik analiz ile HEC1A hücrelerinde 48. saatteki canlı, erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik hücre ortalamalarının bar grafiğı	46
<b>Şekil 4.9.</b> Akım sitometrik analiz ile HEC1A hücrelerinde 72. saatteki canlı (Q3), erken apoptotik (Q4), geç apoptotik (Q2) ve nekrotik (Q1) hücrelerin kadran istatistiğı grafiğı	48
<b>Şekil 4.10.</b> Akım sitometrik analiz ile HEC1A hücrelerinde 72. saatteki canlı, erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik hücre ortalamalarının bar grafiğı	49
<b>Şekil 4.11.</b> Kontrol grubu HEC1A hücrelerinin normal ultrastrüktürel görüntüsü	49
<b>Şekil 4.12.</b> Perifosin gruplarında HEC1A hücrelerinin ultrastrüktürel görüntüsü	50
<b>Şekil 4.13.</b> D vitamini gruplarında HEC1A hücrelerinin ultrastrüktürel görüntüsü	51
<b>Şekil 4.14.</b> Perifosin+D vitamini kombinasyon gruplarında HEC1A hücrelerinin ultrastrüktürel görüntüsü	52
<b>Şekil 4.15.</b> Perifosin+D vitamini kombinasyon gruplarında HEC1A hücrelerinin ultrastrüktürel görüntüsü	52

## KISALTMALAR ve SİMGELER

Kısaltma/Simge	:Tanım
ACTB	:Beta-aktin
AIF	:Apoptoz indükleyici faktör
AKT	:Protein kinaz B
APAF-1	:Apoptotik proteaz aktive edici faktör
APC	:Allofikosiyenin
APL	:Alkil fosfolipid
BAX	:BCL2 bağlantılı X proteini
BRCA	:Meme kanseri duyarlılık
CAD	:Kaspaz aktive edici DNaz
CDK	:Siklin bağımlı kinaz
DISC	:Ölüm indüklü sinyal kompleksi
dk	:Dakika
DMSO	:Dimetilsülfoksit
DNA	:Deoksiribonükleik asit
CO <sub>2</sub>	:Karbondiyoksit
DR	:Ölüm reseptörü
EBRT	:Eksternal beam radyoterapi
EDTA	:Etilendiamintetraasetikasit
ER	:Endoplazmik retikulum
FBS	:Fetal sığır serumu
FSH	:Folikül stimüle edici hormon
GOG	:Jinekolojik onkoloji grubu
HEC1A	:İnsan endometriyum kanseri hücre hattı
HDACI	:Histon deasetilaz inhibitörleri
JNK	:c-Jun N-terminal kinaz
LH	:Luteinize edici hormon
MAPK	:Mitojen aktif protein kinaz
MEK	:Mitojen ile aktive edilmiş protein kinaz
MEK-ERK 1/2	:MEK-ekstrasellüler sinyal düzenlenmiş kinaz 1/2
mg	:Miligram
ml	:Mililitre
MM	:Multipl miyelom
mRNA	:Messenger RNA
MSI	:Mikrosatellit instabilitesi
mTOR	:Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi
mTORC1	:mTOR kompleksi 1
mTORC2	:mTOR kompleksi 2
NSCLC	:Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri
nM	:Nanomolar
nmol	:Nanomol
OHT	:4-hidroksitamoksifen
PBS	:Fosfat tampon solüsyonu

---

PCR	:Polimeraz zincir reaksiyonu
PDK-1	:Fosfoinositid bağımlı kinaz-1
PTEN	:Fosfatidilinositol 3 kinaz
PI	:Propidium iodide
PI3K	:Fosfatidilinositol 3 kinaz
PIP2	:Fosfatidilinositol-4,5-bifosfat
PIP3	:Fosfatidilinositol-3,4,5-fosfat
RNA	:Ribonükleik asit
ROS	:Reaktif oksijen türevleri
RTCA DP	:Gerçek zamanlı hücre analizi-çift plate
RT-PCR	:Gerçek zamanlı PCR
RT-qPCR	:Kantitatif gerçek zamanlı PCR
T-ALL	:T hücreli akut lenfoblastik lösemi
TNF	:Tümör nekroz faktörü
TNF-R	:TNF reseptörü
TRAIL	:Tümör nekroz faktörü-ilişkili apoptoz-indükleme ligandı
TVU	:Transvajinal ultrasonografi
UVB	:Ultraviyole B
VDR	:D vitamini reseptörü
WM	:Waldenström'un makroglobulinemi
xCELLigence	:Gerçek zamanlı hücre elektronik algılama sistemi
1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	:1,25-Dihidroksivitamin D <sub>3</sub>
25(OH)D	:25-hidroksi D vitamini
°C	:Santigrat derece
µl	:Mikrolitre
µM	:Mikromolar

---

## 1. GİRİŞ

Uterus fundus, korpus ve istmus bölümlerinden oluşan bir iç genital organdır [1]. Uterus histolojik olarak endometriyum, miyometriyum ve perimetriyum olarak isimlendirilen üç tabakadan oluşur. Endometriyum, fonksiyonel ve bazal tabaka olmak üzere iki işlevsel tabakadan oluşmaktadır [2]. Fonksiyonel tabaka ile proliferasyon, sekresyon ve dejenerasyon gerçekleştirilirken, bazal tabaka ile menstruasyon sonrası kaybolan fonksiyonel tabakanın yenilenmesi sağlanır [3, 4]. Endometriyum tabakalarında, östrojen ve progesteron önemli etkilere sahiptir. Östrojen, menstruasyon sırasında dökülen endometriyumun yeniden oluşmasını sağlamaktadır. Progesteron ise endometriyal bezlerin sayılarını ve salgı aktivitelerini artırırken, fertilizasyon sonrasında embriyo implantasyonu için endometriyumun hazırlanmasında görev almaktadır [2, 5].

Endometriyum kanseri kadın üreme sisteminde en sık görülen kanserdir [6]. Genellikle 50 yaşın üzerindeki post-menapozal kadınlarda ortaya çıkmaktadır [7]. Endometriyum kanseri gelişiminde etkili birçok risk faktörü belirlenmiştir. Bunların çoğu ya hormonal durum değişikliğine neden olarak indirekt yolla ya da endometriyal epiteli etkileyerek direkt yolla etki etmektedir [8]. Endometriyum kanserinde en önemli prognostik faktör hastalığın evresidir. Bunun yanında hastanın yaşı, tümörün histopatolojik tipi ve evresi, uterus dışına yayılımın klinik ve cerrahi bulguları, hormon-reseptör durumu ve DNA ploidi gibi diğer faktörler de prognoz üzerine etkilidir [9, 10].

D vitamini hormon benzeri fonksiyonları olan bir grup steroldür [11]. D vitamini ergosterol (D<sub>2</sub>, bitkisel kökenli) ve deride 7-dehidrokolesterolden türeyen kolekalsiferol (D<sub>3</sub>, hayvansal kökenli) şeklinde sınıflandırılmaktadır. Bu vitaminler aynı yolla metabolize edilir ve karaciğerde 25-(OH)D<sub>3</sub>'e, ardından böbreğe taşınarak D vitamininin aktif formu olan 1,25-dihidroksivitamin D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>)'e dönüştürülmektedir [12]. Kalsitriol (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) D vitamininin hormonal aktif formu olup anti-kanser etkinliğine sahip olduğu gösterilmiştir [13]. Kalsitriolün prostat, meme, kolon ve deri kanseri gibi farklı kanser tiplerinde hücre siklusu arresti, apoptoz ve diferansiyasyonun indüksiyonu gibi birçok hücrel mekanizma aracılığıyla anti-proliferatif etkisi olduğu bilinmektedir [14, 15, 16]. Kalsitriolün hücre siklusunun G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> arrestini indüklediği, G<sub>1</sub> arrestiyle ilişkili siklin bağımlı kinaz (CDK) inhibitörleri olan p21 ve p27'yi modüle ettiği, kaspaz bağımlı mitojen ile aktive edilmiş protein kinaz (MEK)'ı ve kaspaz-3'ü uyardığı ortaya konulmuştur [17]. Ek olarak, kalsitriolün protein kinaz B (AKT)'nin fosforilasyon ve ekspresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir [18]. Kalsitriolün hücrel büyüme ve proliferasyonda inhibe edici etkisi kanser gelişimine karşı potansiyel olarak koruma sağlamaktadır [19, 20]. Pre-klinik ve klinik çalışmalarda kalsitriolün anti-kanser etkisi gösterilmesine rağmen, doz-sınırlayıcı kalsemik etkisinin olması kemoterapötik ilaç olarak

kullanılmasını büyük ölçüde sınırlamaktadır. Bu nedenle, kalsitriolün toksisiteyi azaltmaya yönelik düşük konsantrasyonda kullanımı ve anti-kanser etkinliğini arttırmak için diğer ilaçlar ile kombine edilerek uygulanan tedavi yaklaşımları çalışılmaya başlanmıştır [21, 22].

Anti-kanser etkisi bilinen perifosin bir alkil fosfolipid (APL) analogudur [23, 24]. İn vivo ve in vitro çalışmalarda farklı kanser tiplerinde perifosinin AKT yolağı aktivasyonunu inhibe ederek anti-kanser aktivitesi gösterdiği kanıtlanmıştır [25, 26]. Ayrıca, fosfoinositid bağımlı kinaz-1 (PDK-1) inhibitörü olan UCN-01, histon deasetilaz inhibitörleri ve kemoterapötik ilaç etoposid gibi diğer anti-kanser ilaçlar ile kombinasyonunda perifosin sinerjik anti-kanser etkiler göstermektedir [27, 28]. İnsan endometriyum kanseri hücre hatlarında (Ishikawa ve HEC1A) ise perifosinin doza bağlı olarak AKT'nin fosforilasyonunu inhibe ettiği ve hücre siklusu arrestine neden olan p21 ekspresyonunu indüklediği bildirilmiştir [29, 30].

Kalsitriol ve AKT inhibitörlerinin kombine edilerek uygulandığı bir çalışmada, prostat kanseri hücrelerinin büyümesinin inhibe edildiği raporlanmıştır [27]. Yapılan başka bir çalışmada, kalsitriol ve AKT inhibitör MK-2206'nın steroid dirençli T hücreli akut lenfoblastik lösemi (T-ALL) hücrelerinin apoptozunu arttırdığı gösterilmiştir [31]. Ancak endometriyum kanserinde kalsitriol ve AKT inhibitörü olan perifosinin birlikte kullanıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle D vitamini (kalsitriol) ve perifosin kombinasyonunun endometriyum kanseri tedavisi için alternatif tedavi seçeneklerinin geliştirilmesinde yeni bir bakış açısı sağlayacağı düşünülmektedir.

## **2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI**

### **2.1. Uterus Histolojisi**

Pelvis boşluğunda mesane ile rektum arasında yer alan uterus fundus, korpus ve istmus bölümlerinden oluşan bir iç genital organdır [1]. Anatomik olarak uterus iki bölgeye ayrılmaktadır. Uterusun büyük üst kısmı gövde iken alttaki silindirik biçimli kısım servikstir. Serviksin servikal kanal denilen lümeni uterin kaviteye internal os ile vajinaya ise eksternal os ile açılır [33]. Uterus histolojik olarak endometriyum, miyometriyum ve perimetriyum olarak isimlendirilen üç tabakadan oluşur (Şekil 2.1) [2]. Endometriyum tek katlı prizmatik epitel ve epitelin altındaki lamina propriyadan oluşur. Epitelde hem silli hücreler hem de salgı hücreleri bulunurken, lamina propriyada çok sayıda kan damarları ve endometriyal bezler bulunmaktadır [32, 33]. Endometriyum, fonksiyonel tabaka ve bazal tabaka olmak üzere iki işlevsel tabakadan oluşur [2]. Fonksiyonel tabaka proliferasyon, sekresyon ve dejenerasyonun gerçekleştiği bölümdür, bazal tabaka ise menstruasyon sonrası dökülen fonksiyonel tabakanın yenilenmesini sağlar [3, 4]. Bu nedenle menstrual siklus sırasında endometriyal kalınlık 1-6 mm arasında değişir. Proliferasyon, anjiyogenez, vaskülogenez, hücre farklılaşması ve hücre-dışı matriksin yeniden yapılanması gibi bir takım olaylar sonucu endometriyal kalınlık yeniden düzenlenir [34]. Serviksin endometriyumu ise uterusun geri kalan kısmından farklıdır. Serviksin servikal kanal denilen endoserviks bölgesi tek katlı prizmatik epitel ile dölşeliyken vajinaya çıkıntı yapan ektoserviks denilen bölgesi ise çok katlı yassı epitel ile dölşelidir [33].

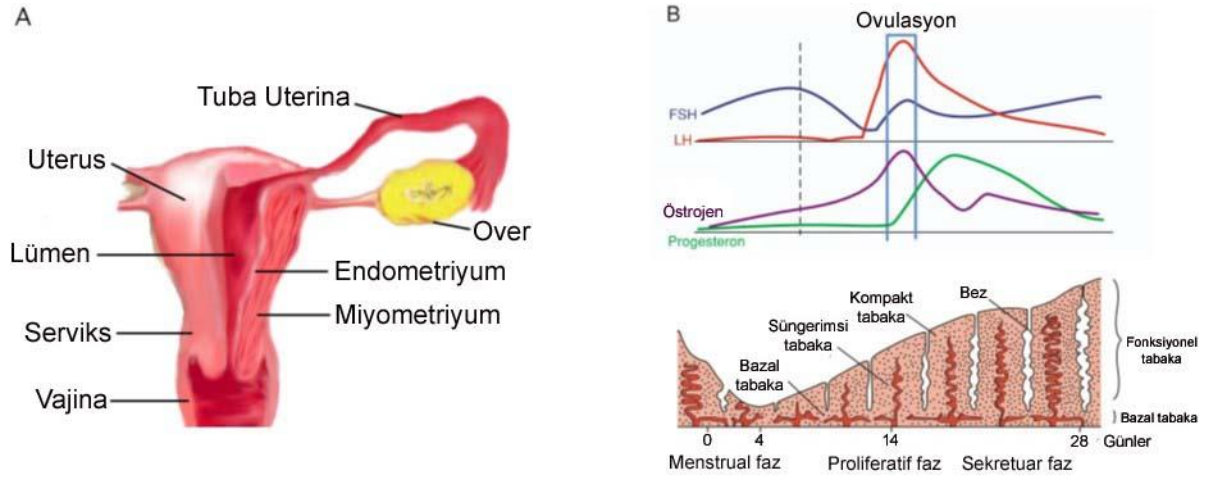
Endometriyum yapısı her ay hormonal değişikliklere bağılı olarak siklik değişiklik gösterir. Mensrual siklus sırasında endometriyumdaki siklik değişimler proliferasyon fazı, sekretuar faz ve menstrual faz olarak tanımlanmaktadır (Şekil 2.1) [33]. Bu endometriyal siklik değişimler hipotaloma-hipofizer-ovaryan aks ile düzenlenmektedir [35]. Bu kompleks mekanizmada steroid yapıdaki seks hormonlarına ek olarak birçok büyüme faktörü, sitokin ve sinyal molekülleri rol almaktadır [36]. Normal mensrual siklusta, menstruasyon sırasında dökülen endometriyumun yeniden oluşması östrojenik uyarıyla sağlanır. Bu dönemde, folikül stimüle edici hormon (FSH) seviyesinde meydana gelen artış overlerde folikül gelişimine neden olur ve gelişen foliküller östrojen hormonu sentezler [33]. Östrojen hormonunun konsantrasyonunun artması iki fazda gerçekleşir. Proliferasyon fazında, östrojen büyüyen foliküllerden sentezlenirken, ovulasyondan sonraki luteal fazda ise gelişen korpus luteum tarafından sentezlenir [34]. Proliferasyon fazı boyunca, endometriyal bezler büyür ve epitel hücrelerinin aktif proliferasyonu sonucu kıvrıntılı hale gelir. Endometriyal epitel hücrelerinde bulunan östrojen reseptörleri hormonal uyarılara bağılı olarak hücrenin yapısal ve fonksiyonel değişikliğe uğramasından sorumludur. Buna bağılı olarak hücrelerin çekirdekleri ökromatik hale



gelirken, sitoplazmalarında protein üretimi ile ilgili organellerin sayısında artış gözlenir. Östrojenik etkiye bağlı olarak, bezlerin sayısı ve kıvrılmaları artarken, stromal hücrelerde artmış mitotik aktivite gözlenir [36]. Bu dönemde artan östrojen seviyesi FSH salgısını baskılar, ancak östrojen belli bir seviyeye gelince luteinize edici hormon (LH) salgısını uyarır ve 24-36 saat sonra ovulasyon meydana gelir [33]. Endometriyal siklik değişimde etkinliği ve miktarı değişen diğer önemli hormon progesterondur [34]. Progesteron, ovulasyon sonrası endometriyumun proliferatif aktivitesini inhibe ederken, bez epiteli hücrelerinde glikojen ve salgı granüllerinin artmasına yol açarak bu hücrelerin salgı fonksiyonlarının uyarılmasını sağlar. Progesteronun luteal fazdaki diğer önemli etkisi ise endometriyal bağ dokudaki arteriyollerin sayısında ve kıvrılmalarında artışa neden olmasıdır. Progesterona bağlı olarak fonksiyonel tabakadaki tüm bu değişiklikler fertilizasyonun gelişmesi durumunda oluşan zigotun endometriyal implantasyonu ve gelişiminde çok önemli rollere sahiptir [33, 36, 37]. Ovulasyondan sonra progesteron seviyesindeki artış FSH ve LH düzeylerini inhibe eder. Fertilizasyon gerçekleşmezse overlerden progesteron ve östrojen salgılanmasının azalması sonucunda menstrual faz meydana gelir. Hormon seviyelerinin ani düşüşü ile endometriyumun fonksiyonel tabakasındaki spiral arterlerin periyodik kasılmaları kan akımının değişmesine neden olur. Bu durum fonksiyonel tabakanın iskemik hale gelmesiyle sonuçlanır ve bezlerin salgı aktiviteleri durur. Uzun süreli arteriyel kasılma nedeniyle yüzey epitelinde bozulma ve kan damarlarında rüptür meydana gelir. Kan, uterin sıvı ve fonksiyonel tabakadan dökülen stromal ve epitelyal hücreler vajinal akıntıyı oluşturur. Endometriyumdan doku parçaları ayrıldıkça venlerin, arterlerin ve bezlerin kopmuş uçları ortaya çıkar. Arteriyel kan akımı spiral arterlerin duvarının gevşediği kısa periyotlar dışında sınırlandırılmıştır, venlerin açık uçlarından devamlı olarak kan sızmaktadır. Kanın pıhtılaşması bu dönemde inhibe edilmektedir. Düz arterlerdeki kan akımı bazal tabakayı korumaktadır [33].

Uterusun miyometriyum tabakası ise kalın bir kas tabakasından oluşur. Miyometriyumun üçte birlik iç kısmında (subendometriyal miyometriyum tabakası) kas lifleri sirküler olarak düzenlenirken, dış kısmında (subserozal stratum supravaskülare tabakası) longitudinal olarak düzenlenmiştir. Her iki kas tabakası arasındaki orta kısımda (stratum vaskülare) ise kas demetleri üç boyutlu ağ şeklinde olup, bol miktarda kan damarları içerir [38]. Fizyolojik koşullar altında uterin peristaltik hareketler miyometriyumun sadece subendometriyal tabakasında gerçekleşir. Overden sentezlenen östrojen ve progesteronun subendometriyal tabakadaki kas hücrelerinin kasılma yanıtını oluşturmada önemli rolleri vardır [38, 39]. Miyometriyal fonksiyon sperm, embriyo transferi ve implantasyon gibi fizyolojik süreçlerde ayrıca endometriozis, dismenore gibi hastalıklarda hayati önem taşımaktadır [40]. Uygun olmayan veya düzensiz uterus aktivitesi infertilite, anormal implantasyon, erken doğum ve doğum sırasında zayıf uterin kasılmalar gibi patolojik bozukluklara sebep olabilir.

Perimetriyum tabakası ise uterusu kaplayan visseral periton tabakasıdır. Pelvik ve abdominal periton ile devam eder. Mezotelden ve ince gevşek bağ dokusu tabakasından meydana gelir. Mezotel altında belirgin bir elastik doku tabakası bulunur. Perimetriyum anterior yüzeyin bir kısmını kaplarken, posterior yüzeyin tamamını kaplar. Anterior yüzeyin kalan kısmı adventisya ile kaplıdır [32, 33].



**Şekil 2.1.** Serviks, uterus ve tuba uterinanın yapısı. (A) Uterus duvarının perimetriyum, miometriyum ve endometriyum tabakaları. (B) Menstrual siklus sırasındaki sıklık değişiklikler [41].

## 2.2. Endometriyum Kanseri

Endometriyum kanseri hormonal etkiler sonucu ortaya çıkmaktadır. Overlerden sentezlenen östrojen ve progesteron hormonlarının dengesindeki dalgalanmalar, endometriyumda bir takım değişikliklere neden olmaktadır. Östrojen miktarını arttıran ancak progesteronun seviyesini yükseltmeyen polikistik over sendromu, obezite, diyabet gibi hastalıklar ya da menopoza sonra östrojen ve progesteron içeren hormon ilaçları kullanmak endometriyum kanseri riskini arttırmaktadır [42]. Endometriyumda karşılanmamış östrojen proliferatif endometriyum, endometriyal hiperplazi ve endometriyum kanseri gibi birbirinden çok farklı klinik tablolara sebep olabilmektedir. Endometriyal hiperplazinin hormonal tedavi sonrasında ortaya çıkabilmesi, östrojen üreten kanserlerle ilişkili olabilmesi ve endometriyal malign kanser tiplerine dönüşebilmesi açısından önemlidir [43].

Endometriyal hiperplazi, endometriyumun endojen ve ekzojen kaynaklı karşılanmamış östrojenlere maruz kalmasından kaynaklanan anormal glandüler proliferasyondur. Endometriyal hiperplazi; basit hiperplazi, kompleks hiperplazi ve atipik hiperplazi olarak 3 ana tipe ayrılmıştır:

•Basit hiperplazi, minimal endometriyal bezlerin sayısının artması ile karakterizedir, sitolojik atipi yoktur ve endometriyum kanserine ilerleme riski düşüktür.

•Kompleks hiperplazi, endometriyal bezlerin lümene ve stromaya doğru dallanmalar ve tomurcuklanmalar göstermesi ile karakterizedir ve ilerleme riski orta derecedir.

•Atipik hiperplazi, artan kompleks yapıdaki bezlerin sayısı ile karakterizedir, hücrel atipi vardır, bezler yoğunlaştığı için stroma azalmıştır ve endometriyum kanserine ilerleme riski yüksektir. Karşılanmamış östrojen endometriyum kanseri oluşması ve progresyonunda önemli rol oynamaktadır [44].

Endometriyum kanseri kadınlarda yaygın olarak görülen jinekolojik malignitedir (16). Kadınlarda akciğer, meme ve barsak kanserinden sonra dördüncü sırada yer alan endometriyum kanserinin sağkalım oranı oldukça yüksektir [7].

### **2.2.1. Etiyolojisi**

Endometriyum kanserinin oluşmasında etkili birçok risk faktörü belirlenmiştir. Yüksek seviyelerde uzun süreli östrojen maruziyetinin progesteron varlığıyla dengelenememesi endometriyum kanseri etiyojisinde en yaygın kabul edilen hipotezdir [45]. Östrojen maruziyetini önemli ölçüde arttıran faktörler arasında östrojen replasman tedavisi (progestin kullanılmadan) ve obezite yer alır [46]. Buna ek olarak bilinen risk faktörleri nulliparite, anovuluar sikluslar, erken menarş (menstrüasyon başlangıcı), geç menapoz, diyabet, tamoksifen (östrojen reseptör antagonisti) tedavisi, atipik endometriyal hiperplazi, Lynch II sendromu (kalıtsal non-polipozis kolorektal kanser), progesteron ile karşılanmamış östrojen tedavisidir [47]. Tek başına östrojen tedavisi de endometriyal hiperplazi veya kanser riskini artırır. Tek başına östrojen tedavisinden bir yıl sonra kadınların %20-50'sinde endometriyal hiperplazi, %11-15'inde endometriyum kanseri tanımlanmıştır [47, 48]. Risk faktörlerinin çoğu ya östrojen seviyeleri üzerine ya da direkt endometriyal epitel üzerine etki etmektedir [8].

Lynch II sendromlu kadınlarda endometriyum, over ve kolon kanseri gelişme riski yüksektir. Lynch II sendromu çeşitli DNA tamir genlerinden (MLH1, MSH2, PMS2 veya MSH6) birinde germline mutasyonunun neden olduğu otozomal dominant bir hastalıktır. Bu hastalarda endometriyum kanseri gelişme riski %27-71'dir [49].

Meme kanseri duyarlılık (BRCA) geni mutasyonu olan kadınlarda over ve meme kanseri riski yüksektir, ancak bazı verilerde BRCA1 mutasyonlarının endometriyum kanseri ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [50]. Bu hastalarda endometriyal seröz karsinomunun daha sık görüldüğü rapor edilmiştir [51].

Endometriyum kanserinin gelişmesinde diğer bir risk etmeni fosfotaz ve tensin homoloğu (PTEN) genindeki somatik mutasyonlardır. PTEN genindeki mutasyona bağlı otozomal dominant

olarak ortaya çıkan Cowden Sendromunda da endometriyum kanseri riskinin arttığı bildirilmiştir [52].

### **2.2.2. Klinik Semptomlar ve Tanı**

Anormal uterin kanama endometriyum kanserinde en sık görülen semptomdur. Bunun dışında erken dönemde görülen semptomlar ise abdominal dolgunluk, pelvik bölgede ağrıdır [53]. İleri evre hastalarda ise menometroraji görülür [46, 54]. Hiperplazi veya endometriyum kanseri için risk faktörleri (polikistik over, obezite, hormon replasman tedavisi, tamoksifen kullanımı) ile ilişkili anormal uterin kanaması olan postmenopozal kadınlar risk grubu olduklarından daha ileri tanı için endometriyal tetkikler yapılmalıdır. Postmenopozal kanama ile başvuran kadınlarda endometriyum kanseri olasılığı %5-10'dur, ancak yaş ve risk faktörlerinin artması ile bu oran artmaktadır [53].

Endometriyum kanseri için kabul edilebilir, uygun bir tarama testi yoktur. Endometriyum kanseri tanısı klinik muayene ile nadiren konulabilir [53]. Transvajinal ultrasonografi (TVU) ve endometriyal sitolojik inceleme, asemptomatik bir popülasyonda endometriyum kanseri tanısı için sınırlı bir doğruluk göstermektedir [55]. Çoğunlukla endometriyal biyopsilerin histopatolojik incelenmesi ile tanı konulmaktadır [53]. Ayrıca endometriyal lezyonların büyümesini önlemek için tamoksifen tedavisine başlamadan önce ultrasonografik tarama yapılması önerilmektedir [55]. Endometriyal biyopsi örnekleri normal olmasına rağmen anormal TVU bulguları saptandığında histeroskopi uygulanması gerekmektedir [56].

Endometriyum kanseri tanısında, endometriyal sürüntü materyalinin incelenmesi endometriyal biyopsi materyalinin incelenmesine göre daha düşük bir hassaslığa sahiptir. Normal bir servikal smear endometriyum kanseri olasılığını ortadan kaldırmak için yeterli değildir [53].

### **2.2.3. Sınıflandırma ve Evreleme**

Endometriyum kanseri insidanslarına, klinikopatolojik özelliklerine ve östrojen-progesterona verdikleri yanıtı göre tip I ve tip II karsinom olarak iki ana tipe ayrılmaktadır.

•Tip I karsinomlar hormonal dengesizliklerle güçlü bir ilişkisi bulunan ve östrojen hormonuna bağımlı endometriyal hiperplazi yoluyla gelişen karsinomlardır. Endometrioid ve müsinöz karsinomlar tip I karsinom olarak kabul edilir [53, 57]. Tüm endometriyum kanserlerinin %80-85'ini tip I karsinomlar oluşturur ve prognozları iyidir. Bu karsinomların sıklıkla uzamış ve beklenmedik endojen veya ekzojen östrojen stimülasyonuna yanıt olarak gelişebileceği gösterilmiştir [58].

•Tip II karsinomlar ise östrojenden bağımsız olarak atrofik endometriyum yapısından gelişirler. Seröz, papiller, skuamoz hücreli veya berrak hücreli karsinomlar tip II karsinomların alt tiplerini oluşturmaktadır [57, 59]. Endometriyum kanserlerinin %10-15'ini oluşturan tip II karsinomların prognozları kötüdür. Tip I karsinomlu hastalarda obezite, hiperlipidemi, hiperöstrojenizm bulguları gözlenirken, tip II karsinomlu hastalarda bu gibi risk faktörleri ve semptomlar genellikle gözlenmemektedir. Tip II karsinomlar tip I karsinoma göre daha az diferansiye olup, derin invazyona meyillidir. Bu kanserlerin pelvik lenf nodu metastazları yüksek oranda gözlenmekle birlikte, progesteronlara yanıtları yetersizdir [53, 58].

Endometriyum kanserinde en önemli prognostik faktörler; hastanın yaşı, tümörün büyüklüğü, histopatolojik tipi ve evresi, periton sitolojisi, uterus dışına yayılımın klinik ve cerrahi bulguları, hormon reseptör durumu, DNA ploidi, kanserin cerrahi evrelenme ve tedavi tipi olarak sıralanmaktadır [8, 9, 60, 61]. Endometriyum kanserinde açıklanamayan hastalık nükleleri nedeniyle bilinen prognostik faktörlere ek olarak yeni prognostik belirleyiciler araştırılmaya başlanmıştır [62].

## **2.2.4. Tedavi Yöntemleri**

### **2.2.4.1. Cerrahi Tedavi**

Endometriyum kanserinin tedavisi önceki yıllarda, histerektomi ve intrakaviter radyoterapiden oluşmaktaydı. Günümüzde ise radyasyon maruziyetinin azaltılması gerektiği düşünülerek bu tedavi yaklaşımı yerini cerrahi evrelemeye bırakmıştır. Günümüzde yapılan cerrahi prosedür histerektomi ve bilateral salpingo-ooferektomidir. Basit histerektomi çoğu vaka için yeterlidir, ancak primer tümörün orijininin ayırt edilemediği durumlarda radikal histerektomi de yapılmaktadır. Endometriyum kanseri tedavisinde overlerin korunup korunmayacağı, lenfadenektomi endikasyonları, omentektomi ve ek cerrahi girişimlerin değerlendirilmesi ve adjuvan tedavinin koordine edilmesi gibi konular oldukça önemlidir [63].

Yapılan cerrahi evrelemeye göre; evre I endometriyum kanseri için standart cerrahi yaklaşım lenfadenektomi yapılarak veya yapılmadan total histerektomi ve bilateral salpingo-ooferektomidir [64]. Lenfadenektomi, hastanın prognozunun belirlenmesinde ve adjuvan tedavilerin uyarlanmasında oldukça önemli olabilir. Bu nedenle, orta-yüksek risk endometrioid kanserde (evre IA G3 ve IB) lenfadenektomi ile birlikte tam bir cerrahi evreleme önerilmektedir. Evre II endometriyum kanserinde cerrahi yaklaşım, para-aortik lenfadenektomi yapılarak ya da yapılmadan bilateral salpingo-ooferektomi, sistematik pelvik lenfadenektomi ve radikal histerektomiden oluşur. Bu evrede lenfadenektomi, cerrahi evreleme ve adjuvan tedaviyi yönlendirmek için önerilmektedir [63].

Evre III ve IV endometriyum kanserli hastalarda, kitlenin cerrahi olarak küçültülme (debulking) işlemi uygulanmaktadır. Uzak organ metastazı olan olgularda ise palyatif cerrahi bir seçenek olarak değerlendirilmektedir. Tıbbi kontrendikasyonlar nedeniyle ameliyat mümkün olmadığında (hastaların %5-%10'u) uterus ve vajinaya intrakaviter brakiterapili ya da intrakaviter brakiterapisiz eksternal radyasyon tedavisi bireysel klinik kullanım için uygundur [63].

#### **2.2.4.2. Adjuvan Tedavi**

##### **2.2.4.2.1. Radyoterapi**

Evre 1 ve 2 endometriyum sınırlı tümörü olan hastalar çok iyi prognoza sahip oldukları için düşük risk olarak değerlendirilir. Bu hastalarda adjuvan tedavi prognozun iyi olması nedeniyle ilk aşamada düşünülmemektedir [63]. Evre I endometriyum kanserli hastalarda, eksternal beam radyoterapi (EBRT)'nin etkinliğini değerlendiren randomize çalışmalar ve meta-analizler yayınlanmıştır [64-66]. Cerrahi işlem sonrasında vajinal brakiterapi almış evre I endometriyum kanserli 540 hastaya ek olarak EBRT verilen ya da sadece gözlem yapılan gruplara ayrılıp değerlendirilmiştir. Bu çalışmada, vajinal ve pelvik nüks EBRT verilen grupta belirgin olarak az bulunmasına rağmen sağkalım oranlarının benzer olduğu bulunmuştur. Öte yandan, evre III ve >%50 miyometriyal invazyonu olan hastalarda EBRT ile daha iyi sağkalım oranları sağlanmıştır [66].

Pelvik radyoterapi, bölgesel nüks riskini azaltmaya yönelik uygulanmaktadır ve pelvik radyoterapi ile ilişkili morbiditeyi azaltmak için günümüzde orta-risk endometriyum kanserli hastalarda vajinal brakiterapi yaygın olarak kullanılmaktadır [66]. Bu hastalarda tüm pelvik radyoterapi ve vajinal brakiterapi arasında sağkalım açısından bir fark saptanmamıştır. Vajinal nüks oranları benzerken, pelvik nüks oranı brakiterapi hastalarında daha fazla görülmüştür [63].

##### **2.2.4.2.2. Kemoterapi**

Erken evre endometriyum kanserinde cerrahi sonrası kemoterapi yüksek-orta riskli gruplardaki endometriyum kanserli hastalarda evre IB, grade 3 ve lenfovasküler invazyon varlığında önerilmektedir. Yüksek riskli endometriyum kanserinde ise yüksek lokal nüks ve uzak metastaz riski nedeni ile kemoterapinin sistemik etkilerini ve radyoterapinin lokal kontrol etkisini birleştiren kombinasyon tedavi yöntemleri kullanılmaktadır. Tekrarlayan endometriyum kanserli hastalar, cerrahi ve radyoterapi için uygun değilse kemoterapi ile tedavi edilmesi önerilmektedir [67].

Faz II denemelerinde tekrarlayan hastalığı olan endometriyum kanserli hastalarda doksorubisin, paklitaksel ve platin ilaçları (sisplatin, karboplatin) en aktif ilaçlar olarak tanımlanmıştır. Evre I ile III arası, nüks etme riski taşıyan 382 hastada yapılan bir çalışmada doksorubisin+sisplatin, paklitaksel+doksorubisin+sisplatin, paklitaksel+sisplatin+epirubisin, paklitaksel+platinum kombinasyonları kullanılmıştır. Kemoterapi uygulanan hastalarda ilerlemesiz sağkalımda %7 düzelme gözlenirken genel sağkalımda anlamlı fark gözlenmemiştir [68]. Başka bir çalışmada ise, tek ilaç doksorubisin ile karşılaştırıldığında ilerlemesiz sağkalım ve genel sağkalım üzerinde daha az etkili olmasına rağmen, sisplatin ve doksorubisin kombinasyonu ile daha yüksek bir yanıt oranı elde edilmiştir [69]. Bazı kemoterapi ilaçları veya rejimleri ile cevap ya da remisyon elde edilmesi mümkün olmakla birlikte; cevap ve sağkalım sürelerinin oldukça kısa olduğu bildirilmiştir. Üç haftada bir 50-60 mg/m<sup>2</sup> dozunda doksorubisin uygulanması ile yaklaşık %25, 50-60 mg/m<sup>2</sup> dozunda sisplatin uygulanması ile %21 cevap alınırken, haftalık 350-400 mg/m<sup>2</sup> dozunda karboplatin uygulaması ile de %24 cevap alınabilmiştir. Cevapların büyük çoğunluğu kısımidir ve ortalama sağkalım oranı 4 ile 8 ay arasında değişmektedir. Doksorubisin+sisplatin veya siklofosfamid+doksorubisin+sisplatin ile %38-76 cevap alınabilmekte fakat bu hastalarda da ortalama sağkalım süresi 12 ayı geçmemektedir [70, 71]. İleri evre hastalarda (evre III ve IV), genellikle farklı tedavi yöntemleri birlikte kullanılmaktadır. Yapılan bir çalışmada, bu hastalarda tüm abdominal radyoterapi ve sisplatin+doksorubisin kemoterapisi karşılaştırılmıştır ve kemoterapinin daha üstün olduğu gösterilmiştir. 5 yıllık sağkalım oranı kemoterapi için %53 iken radyoterapi için %42 olarak bulunmuştur [72]. Jinekolojik onkoloji grubu (GOG) tarafından yapılan 122 çalışmada evre III ve metastatik olmayan evre IV hastalarda abdominopelvik radyoterapi ile doksorubisin ve sisplatin bazlı kemoterapi karşılaştırılmıştır. Bu çalışmalarda, kemoterapi yapılan hastalarda anlamlı şekilde ilerlemesiz sağkalımda ve genel sağkalımda düzelme gözlenirken, toksisite ve pelvik başarısızlık oranlarının arttığı, 60 aylık takip sonucunda sağkalım oranının kemoterapi uygulanan hastalarda %55 olduğu, abdominopelvik radyoterapi uygulanan hastalarda ise %42 olduğu raporlanmıştır [72]. Bunlara ek olarak, adjuvan tedavi olarak radyoterapi ve doksorubisin+sisplatin kombinasyonuna, paklitaksel eklenmesinin sağkalım üzerine bir etkisinin olmadığı ve toksisiteyi arttırdığı da bildirilmiştir [73].

### **2.2.5. Endometriyum Kanseri Oluşumunda Etkili Moleküler Mekanizmalar**

Endometriyum kanserinin oluşumu tümör supresörleri, transkripsiyon regülatörleri, hücre siklus proteinleri, kinaz ve fosfatazların yanı sıra sinyalizasyon araçları, steroid reseptörleri ve membran reseptörleri gibi çok sayıda moleküllerin rol oynadığı kompleks bir süreçtir. Tip I karsinom (endometrioid karsinom) oluşumunda k-RAS,  $\beta$ -katenin ve PTEN

genlerinin mutasyonlarını ve mikrosatellit instabilitesi (MSI)'ni içeren 4 farklı moleküler değişikliğin meydana geldiği raporlanmıştır. MSI'nın düzenlenmesinde meydana gelen replikasyon hataları onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerde mutasyonların birikimine neden olurken PTEN, k-RAS,  $\beta$ -katenin genlerindeki anormallikler ise farklı sinyal iletim mekanizmalarını değiştirerek kanser oluşumunu uyardığı bildirilmiştir [74].

Tip II karsinom oluşumunun ise bazı kromozomlarda heterozigotluğun kaybı, HER-2/neu (erbB-2) amplifikasyonu ve P53 mutasyonlarıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir [58, 75, 76]. HER-2/neu proto-onkogeni (c-erbB2, neu ve HER2 olarak da bilinir), epidermal büyüme faktör reseptörüne benzeyen, intrinsik tirozin kinaz aktivitesine sahip 185-kDa'lık bir transmembran glikoproteini kodlamaktadır. HER-2/neu'nun ekspresyonunun artması endometriyum kanserinde kötü prognostik faktördür. Aşırı HER-2/neu amplifikasyonunun, vasküler ya da lenfatik yayılımı olan agresif endometriyum kanseri grubunu belirlemede rol oynayabileceği rapor edilmiştir. Buna ek olarak, P53 ve tümör baskılayıcı genlerin aşırı ekspresyonu gibi diğer moleküler değişikliklerin de endometriyum kanserli hastalarda kötü prognoz ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür [62, 77].

### **2.2.6. Endometriyum Kanserinde PTEN/PI3K/AKT Sinyal Yolağı**

PTEN, 10q23 üzerinde bulunan bir tümör supresör genidir ve bu gendeki değişiklikler, farklı kanser tiplerinde tanımlanmıştır [78-80]. PTEN geni hücre siklusunun G1 fazından S fazına ilerlemesini bloke etme, apoptozu indüklemeye ve fosfatidilinositol 3 kinaz (PI3K)/AKT yolağını negatif olarak düzenleme fonksiyonuna sahiptir [81]. PI3K/AKT yolağının kanser oluşum mekanizmasında özellikle hücrelerin malign transformasyon göstermesi ve apoptotik direnç oluşturmalarında etkili olduğu bildirilmiştir [82]. PTEN'in endometriyum kanseri vakalarının %30-50'sinde mutasyona uğradığı gösterilmiştir. PTEN mutasyonları ayrıca endometriyum kanseri öncüsü olan endometriyal hiperplazi vakalarının yaklaşık %20'sinde görülmektedir [83].

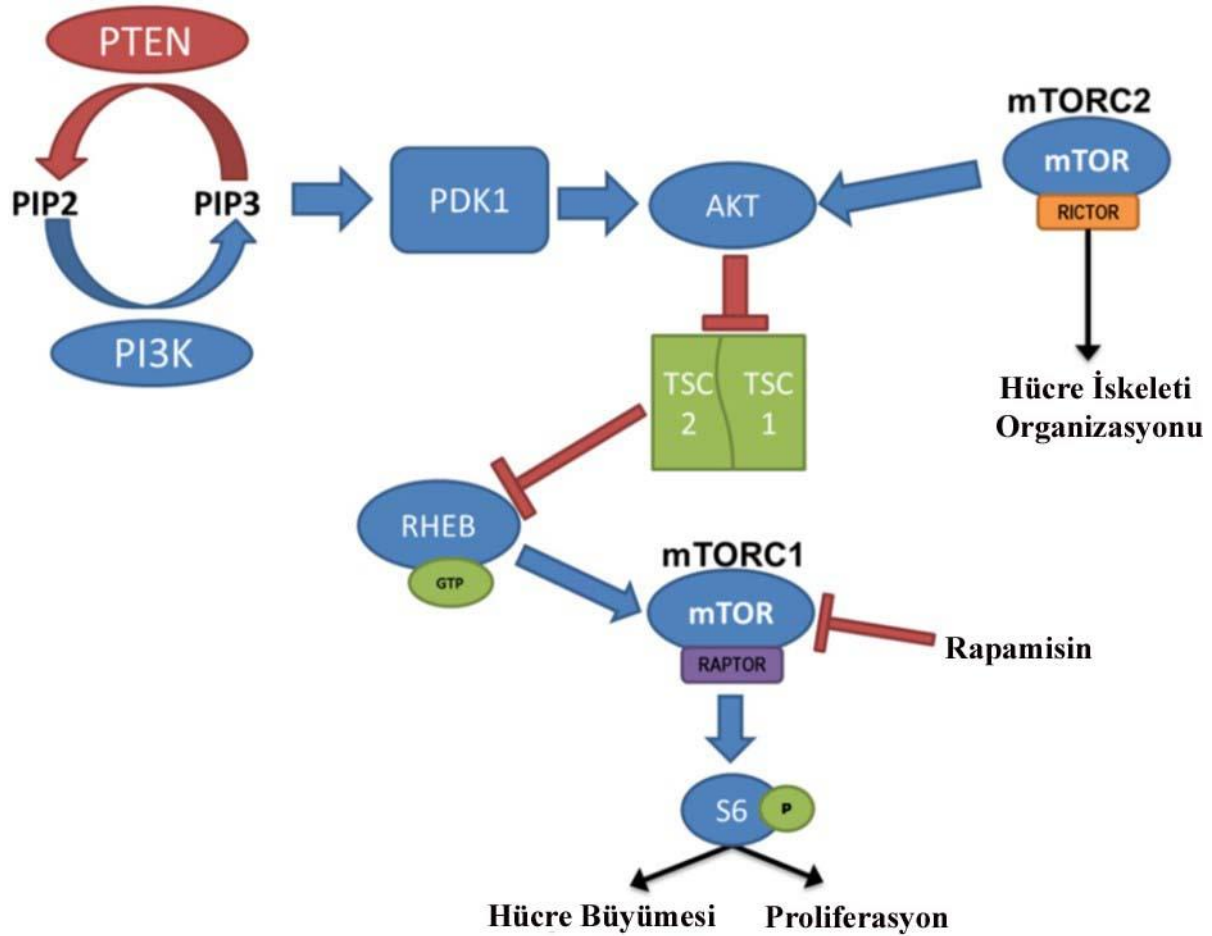
PI3K ailesi hayatta kalma, hücre adezyonu, hücre motilitesi, hücre çoğalmasında rol oynayan sinyal iletim yolları ve hücreler arası trafiği düzenleyen lipid kinaz ailesidir [84]. PI3K'lar farklı düzenleyici ve katalitik alt birimlerden oluşmaktadır [85, 86]. Büyüme faktörleri veya insülin gibi uyarılar insülin reseptörü üzerinde bulunan tirozin bölgelerine bağlanarak PI3K'nın düzenleyici alt birimi P85 proteinini etkinleştirmesi ile PI3K katalitik alt birimi P110 proteinini fosfatidilinositol-4,5-bifosfat (PIP2)'i fosfatidilinositol-3,4,5-fosfat (PIP3)'a dönüştürür [87]. Daha sonra, serin/tironin kinaz AKT ve diğer aşağı sinyal yolağı efektörleri aktive olur (Şekil 2.2) [81].

AKT, PI3K ve PDK-1 içeren bir mekanizma tarafından sitokinler ve büyüme faktörlerine cevap olarak aktive edilen bir serin/treonin kinazdır [88, 89]. AKT'nin üç izo formu vardır: AKT1



(PKB $\alpha$ ), AKT2 (PKB $\beta$ ) ve AKT3 (PKB $\gamma$ ). Bu izoformlar %85'den fazla sekans benzerliğine ve aynı yapısal organizasyona sahiptir [90]. AKT, hücre büyümesi, bölünmesi, sağ kalımı ve göç, apoptoz, epitelyal-mezenkimal dönüşüm, anjiyogenez gibi kanserle ilişkili hücre süreçlerini düzenleyen bir aktiviteye sahiptir. AKT, Bad, glikojen sentez kinaz-3, forkhead transkripsiyon faktörü ve kaspaz-9'un fosforilasyonu ile apoptoz mekanizmalarını inhibe eder [91-93]. AKT sinyalinin bloke edilmesi artmış apoptoz ve kanser hücrelerinin büyümesinin inhibisyonu ile sonuçlanır [88, 89, 94]. AKT yolağındaki değişiklikler, endometriyum kanseri dahil olmak üzere farklı birçok kanser tipinde tespit edilmiştir [95]. Bu nedenle, AKT yolağı inhibitörleri kanser tedavisi için umut verici bir ilaç hedefi haline gelmiştir.

PI3K/AKT yolağının en önemli aşağı sinyal yolağı efektörü, fosforillenmiş rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi (mTOR)'dir [96, 97]. mTOR proteini hücre büyümesinin düzenlenmesi, hücre proliferasyonu, hücre siklusunun ilerlemesi ve sağkalımı kontrol eden 289-kDa'lık bir serin/treonin kinazdır. mTOR, mTOR kompleksi 1 (mTORC1) ve mTOR kompleksi 2 (mTORC2) olmak üzere multiprotein komplekslerinden oluşmaktadır [97, 98]. mTOR tirozin kinaz reseptörlerinin aktivasyonu ve bunu izleyen PI3K/AKT fosforilasyonu ile aktive edilebilir. 70 kD ribozomal S6 kinaz (p70S6K) ve ökaryotik translasyon başlatma faktörü 4E bağlayıcı protein 1 mTORC1'un aşağı sinyal yolağı efektörleri olarak işlev görür [97]. Bu efektörler hücre siklusunun düzenlenmesini sağlar ve protein sentezini uyarır. mTOR inhibitörleri, hücre siklusu için gerekli olan proteinlerin translasyonunu ve hücre siklusunun G1 fazından S fazına geçişini engeller [97, 99]. Son yıllarda PI3K/AKT yolağı inhibitörleri (perifosin, idelalisib, imanitib, trastuzumab, gefitinib, pertuzumab ve lapatinib) ile ilgili çalışmaların sayısı artış göstermektedir.



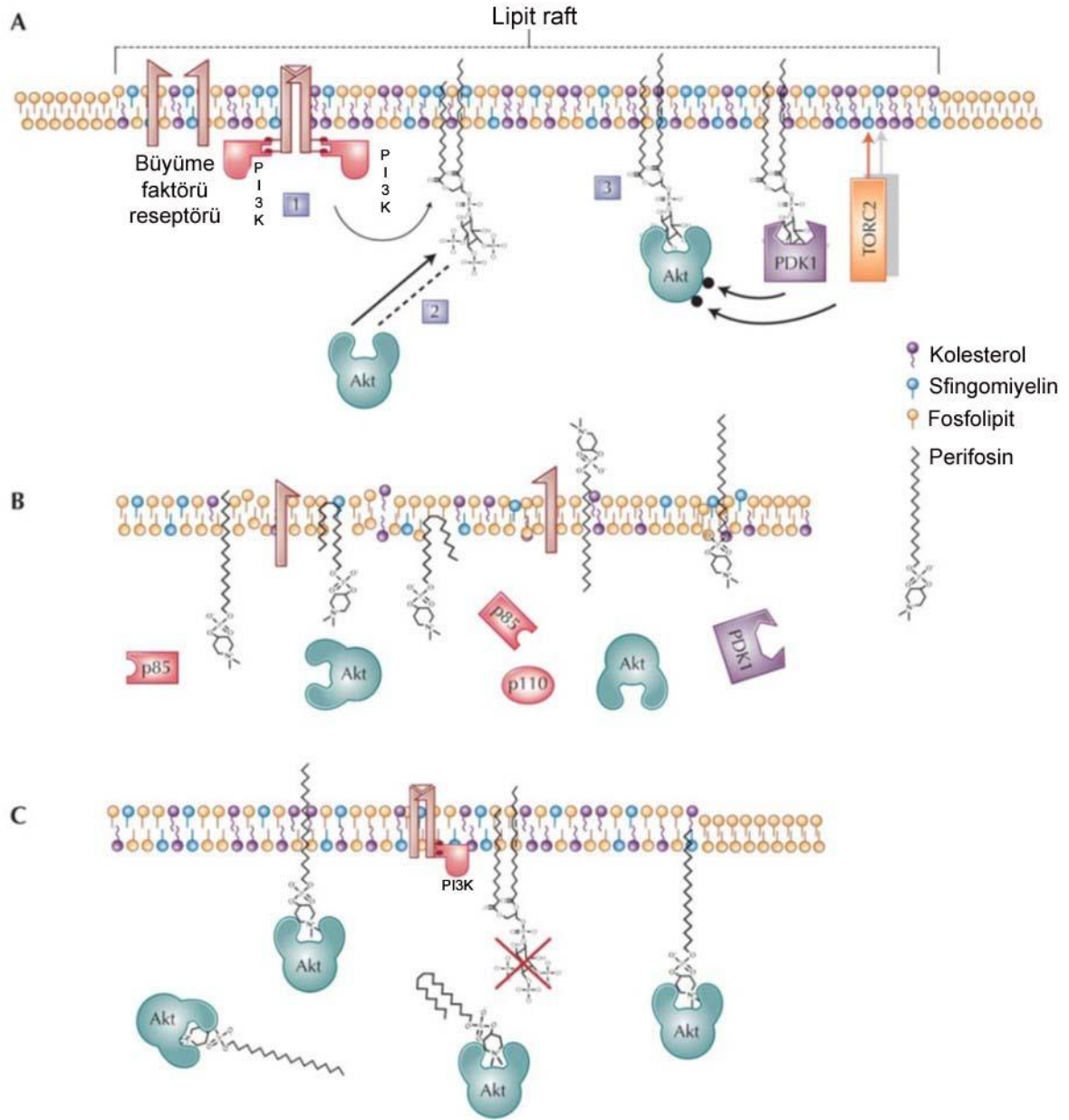
**Şekil 2.2.** PTEN/PI3K/AKT yolağı. PTEN, PI3K/AKT yolağının negatif düzenleyicisidir. Hücre büyümesini ve proliferasyonu düzenleyen mTOR, PI3K/AKT yolağı tarafından aktive edilir. Fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K), fosfatidilinositol-4,5-bifosfat (PIP2), fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfat (PIP3), fosfoinositid bağımlı kinaz-1 (PDK1), rapamisinin memeli hedefi (mTOR), tuberöz skleroz kompleksi (TSC1, TSC2), GTP-bağlı Ras homoloğu (RHEB), ribozomal protein S6 (S6) [100].

### 2.3. Perifosin

Perifosin, AKT aktivasyonunu inhibe eden sentetik bir APL'dir (Şekil 2.3) [24]. APL'lerin apoptozu indüklediği, neovaskülarizasyonu inhibe ettiği ve kanser hücresi farklılaşmasını uyardığı, invazyonunu inhibe ettiği raporlanmıştır [101]. Sentetik olarak üretilen ilk fosfolipid bileşikler, edelfosin ve miltefosin denilen lizofosfatidilkolinlerin analoglarıdır [102]. Bu sınıfın prototipi olarak üretilen miltefosinin, farklı kanser hücre hatlarında in vitro anti-kanser aktivitesi göstermiştir [23]. Miltefosinin majör metaboliti olan fosfokolin, asetilkolininkine benzeyen bir yapıya sahiptir, bunun da oral tedavide gözlenen ciddi gastrointestinal rahatsızlıkların nedeni olabileceği düşünülmüştür. Bu nedenle miltefosinden daha iyi sistemik bir terapötik indeksi olan bileşiklerin üretilmesi için yapılan analog araştırmalar sonucunda perifosin üretilmiştir

(Oktadesil (1,1-dimetil-4-piperidyl) fosfat) [103]. Perifosin ise fosfokolin üretmediği için daha iyi tolere edilebilmektedir [104].

Perifosin, doza bağımlı bir şekilde AKT'nin indüklenabilir fosforilasyonunu inhibe eder, böylece AKT etkinliğini engeller [105]. AKT, fosforilasyon ile aktive edilir, bu nedenle AKT fosforilasyonu bu enzimin aktivasyonu için bir belirteçtir. Bazı hücre tiplerinde AKT'nin inhibisyonuna ek olarak perifosin, anti-apoptotik MEK-ekstrasellüler sinyal düzenlenmiş kinaz 1/2 (MEK-ERK 1/2) yolağını down regüle eder ve proapoptotik c-Jun N-terminal kinaz (JNK) ağını aktive eder, böylece hayatta kalma ve ölüm sinyalizasyon kaskadları arasındaki dengeyi modüle eder ve apoptozu indükler [60, 61]. Perifosin, farklı kanser tiplerinde klinik çalışmalarda değerlendirilmiştir. Renal hücre karsinomu ve Waldenström'un makroglobulinemisi (WM) hariç, tek ilaç olarak kullanımında sınırlı sonuçlar elde edilmiştir. Bununla birlikte, ilerlemiş kolorektal kanser ve multipl miyelom (MM)'da diğer ilaçlarla kombine edilmesinin tedavide başarılı sonuçların elde edilmesini sağlamıştır [23]. Yapılan in vitro çalışmalarda perifosinin melanoma, sinir sistemi, akciğer, prostat, kolon ve meme kanseri üzerinde anti-kanser etkilerinin olduğu gösterilmiştir [24, 27, 106]. Buna ek olarak perifosinin, doza bağımlı bir şekilde, insan lösemi hücrelerinde apoptozu uyardığı bildirilmiştir [26].



**Şekil 2.3.** Perifosinin AKT aktivasyonu ve potansiyel inhibitör mekanizmaları. (A) Lipid raftlarda AKT aktivasyonu. 1) Ligand bağlanması ile büyüme faktörü reseptörü aktivasyonu, PI3K'nın aktifleşmesine neden olur. 2) AKT'nin plekstrin-homoloji domaini, membranda PIP3'e bağlanır. 3) AKT PDK-1 ve TORC2 kompleksi ile fosforile edilerek membranda aktive edilir. (B ve C) Perifosinin olası etki mekanizmaları. (B) Perifosin, lipid raftların yapısını bozarak AKT'nin membrana tutunmasını önler. (C) Perifosin doğrudan AKT'nin plekstrin-homoloji alanına bağlanır ve onu inhibe eder [102].

### 2.3.1. Perifosinin Anti-kanser Etkinliği

İn vitro çalışmalarda, perifosin UCN-01, histon deasetilaz inhibitörleri, etoposid, tümör nekroz faktörü-ilişkili apoptoz-indükleme ligandı (TRAIL), erlotinib, setuksimab, 17-DMAG, deksametazon, doksorubisin, melfalan ve bortezomib ile başarılı bir şekilde kombine edilerek

kullanılmıştır [25-28, 106-110]. Perifosin ve TRAIL'in kombine edildiği bir çalışmada apoptotik mekanizma aktivasyonunun, kanser hücrelerinde ölüm reseptörü (DR)-4 ve DR-5 ekspresyonuyla ilişkili olduğu gösterilmiştir [110].

Preklinik çalışmalarda, klinik denemeler için maksimum tolere edilen günlük perifosin dozunun 200 mg/kg olduğu bildirmiştir [111]. Faz I deneme çalışmalarında, perifosin uygulanması ile küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) olan bir hastada kısmi yanıtlar kaydedilmiştir [112]. Karışık sarkomlu hastalarda yapılan iki adet faz II çalışmanın birinde, perifosin uygulanması ile 23 hastanın sadece 1'inde kısmi remisyona gözlenirken, diğerinde ise 19 hastanın 4'ünde semptomların gerilemesine rağmen hastalığın stabil kaldığı görülmüştür [113, 114]. Faz I ve II çalışmalarından oluşan meta-analiz çalışmasında perifosinin sarkomlu hastalarda klinik faydanın %50 olduğu raporlanmıştır [115]. Kondrosarkomu ve alveolar yumuşak doku sarkomu ile sınırlı faz II çalışmalarında 59 hastanın 6'sında kısmi yanıt elde edilirken 13'ünde hastalığın stabil kaldığı gözlenmiştir [116]. İleri renal hücreli karsinom, sarkom ve WM olan hastalarda tek ilaç olarak kullanımında objektif yanıtlar bildirilmiştir [111, 117, 118]. Bu sonuçlara karşın prostat, meme, pankreas ve baş-boyun kanserleri ile ilgili faz II çalışmalarında perifosin etkinliği gösterilemezken, en umut verici kombinasyon sonuçları miyelomda olmuştur [119, 120].

Son yıllarda yapılan faz III çalışmalarında refrakter kolorektal kanserli, relaps/refrakter MM'li hastalarda perifosinin diğer ilaçlarla (kapesitabin, bortezomib ve deksametazon) kombine edilerek uygulanmasının tedavi etkinliği araştırılmaktadır [23]. Sisplatin ve perifosin kombinasyonu, endometriyum kanseri hücrelerinde artmış anti-kanser aktivitesi göstermiştir. Bu nedenle, endometriyum kanserli hastalarda faz II çalışmaları ile perifosinin tek ilaç ve platin türevleri ile kombinasyonunun etkili tedavi alternatifi olabileceği ileri sürülmüştür [29]. Başka bir çalışmada, insan endometriyum kanseri hücre hatları üzerine 4-hidroksitamoksifen (OHT), fulvestrant, gefitinib, everolimus ve perifosin uygulanmıştır. Bu çalışmada gefitinib, everolimus ve perifosin tüm hücre hatlarında proliferasyonu inhibe ederken sadece perifosinin apoptozu indüklediği raporlanmıştır [121]. Bu nedenle son yıllarda endometriyum kanserli hastalarda yapılan çalışmalarda perifosin ile çeşitli ilaçlar kombine edilerek anti-kanser tedavi alternatifleri gösterilmeye çalışılmaktadır.

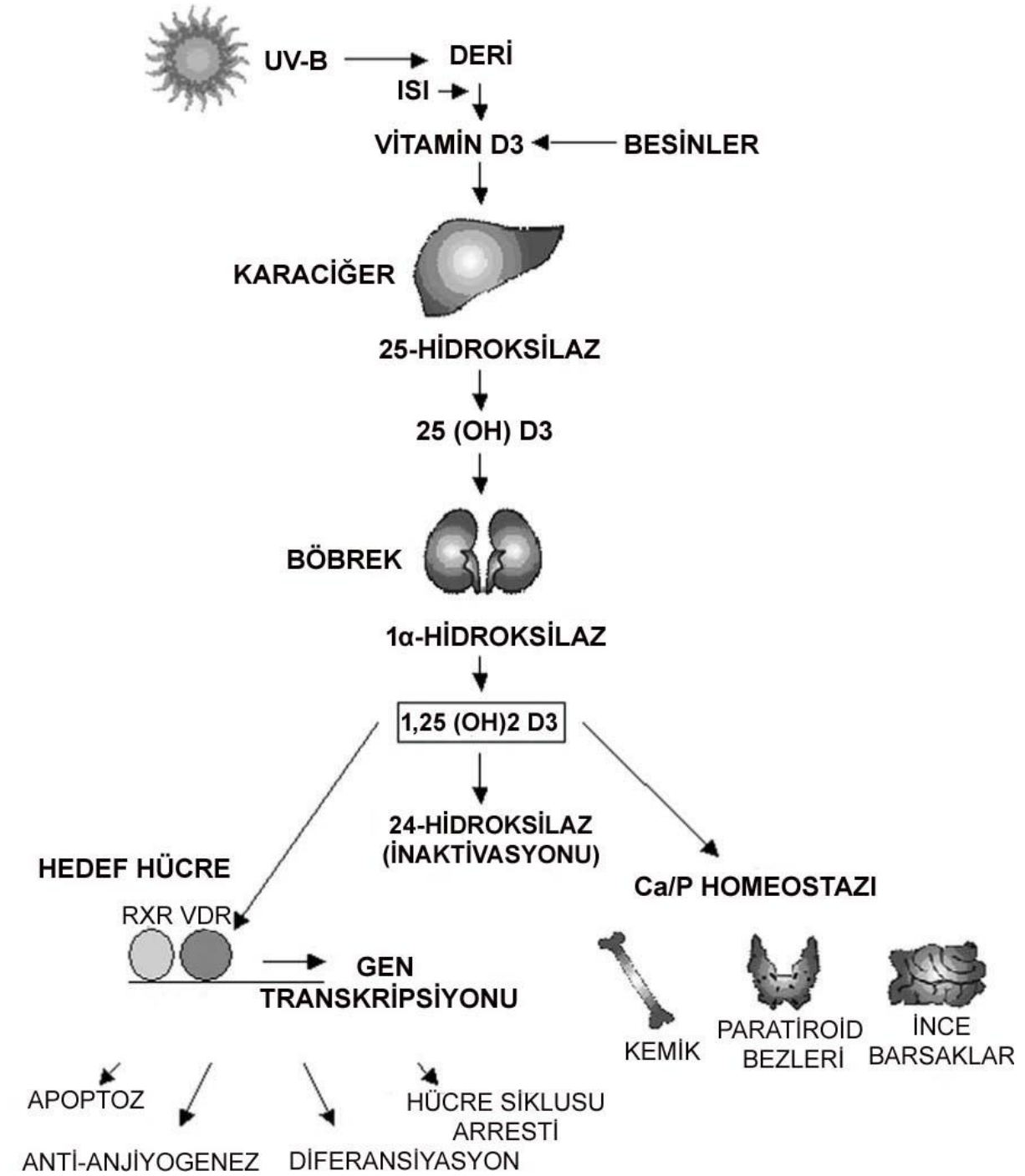
#### **2.4. D Vitamini**

D vitamini hormon benzeri fonksiyonları olan bir grup steroldür [11]. Kolekalsiferol (D3 vitamini) gıdalardan elde edilebilir, ancak D3 vitamininin başlıca kaynağı deri olup, burada prekürsör 7-dehidrokolesterol solar ultraviyole B (UVB) radyasyona maruz kalmasından sonra D3 vitaminine dönüştürülür. D vitamini ve metabolitleri öncelikle dolaşımdaki D vitamini-

bağlayıcı protein tarafından taşınır. D vitamini iki adet hidroksilasyon süreciyle biyoaktif hale gelir. İlk hidroksilasyon karaciğerde gerçekleşir, enzim 25-hidroksilaz D3 vitaminini 25-hidroksi D vitamini (25(OH)D)'ne (D3 vitamininin dolaşımdaki büyük formu) dönüştürür. 25(OH)D enzim 1 $\alpha$ -hidroksilaz tarafından böbrekte ikinci kez hidroksillenerek, hücre çekirdeğindeki D vitamini reseptörü (VDR)'ne bağlanan, fizyolojik açıdan aktif 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> formunu oluşturur. Böbrek 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> üretiminin primer bölgesi iken, 1 $\alpha$ -hidroksilaz 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>'ün lokal olarak sentezine izin veren ekstrarenal bölgelerde de eksprese edilir. 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 24-hidroksilaz ile etkisiz hale getirilir (Şekil 2.4). Kalsiyum metabolizması ile ilişkili olmayan vücudun çeşitli yerlerinde bulunan hücreler VDR'leri içerir ve 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>'ü lokal olarak sentezler, bu farklı hücre türleri için, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> proliferasyonu inhibe eder ve diferansiyasyonu destekler [6, 122].

1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>'ün biyolojik etkileri, ligandla aktive olan transkripsiyon faktörlerinin nükleer reseptör süper ailesinin bir üyesi olan VDR aracılığı ile sağlanır. VDR hormonal olarak aktif D vitamini ile kompleks içinde, birçok hücre tipinin kalsiyum homeostazı, büyüme kontrolü, diferansiyasyon, apoptoz, immün yanıtların ve anjiyogenezin düzenlenmesi gibi geniş bir fizyolojik fonksiyon serisinde yer alan 900'den fazla genin ekspresyonunu düzenleyen nükleer ligand-indükleyici bir transkripsiyon faktörüdür [123]. VDR normal olarak çekirdekte bulunur. 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>'ün VDR'ye bağlanması üzerine çekirdeğe translokasyon yapar, retinoid X reseptörü ile dimerize olur, D vitamini yanıt elementleri diye adlandırılan DNA bölgeleriyle etkileşime girer ve hedef gen transkripsiyonunun düzenlenmesine yardımcı olan ko-aktivatörleri modüle eder [122, 124].

D vitaminin kalsiyum ve fosfat homeostazının düzenlenmesinde önemli rolleri bilinirken, çok sayıda in vitro ve in vivo çalışmada da D vitamininin meme, prostat, kolon, deri, beyin kanserlerinde ve miyeloid lösemide kanserli hücre proliferasyonunu güçlü bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir [125, 126]. D vitamininin aktif metaboliti (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> veya kalsitriol) anti-proliferatif ve pro-apoptotik özelliklere sahiptir [127, 128]. Genellikle in vitro kanser modellerinde yapılan araştırmalara dayanarak, kalsitriolün anti-neoplastik aktivitesi için çeşitli mekanizmalar önerilmiştir. Anti-neoplastik etkinlik mekanizmaları apoptozun indüksiyonu, hücre siklusu arresti aracılığı ile proliferasyonun inhibisyonu, diferansiyasyonun indüksiyonu, invazyon ve hareketliliğin inhibisyonu ve anjiyogenezin azaltılmasını içerir [129].



Şekil 2.4. D vitamini metabolizması [122].

#### 2.4.1. D Vitamininin Anti-kanser Etkinliği

Endometriyum kanseri dahil olmak üzere farklı kanser tiplerinin önlenmesinde D vitamininin profilaktik olarak kullanılmasının etkili olacağını ileri süren epidemiyolojik çalışmaların sayısı artış göstermektedir [11]. D vitamininin hormonal aktif formu olan kalsitriolün etki mekanizması, kanser hücrelerinin invazyon ve göç potansiyelini inhibe etmenin

yanı sıra, hücre siklusu arrestinin indüklenmesi, diferansiyasyonu arttırması, proliferasyonu inhibe etmesi gibi önemli etkileri içermektedir [130]. Kalsitriolün prostat, meme, kolon, deri kanseri ve lösemi hücrelerini içeren farklı kanser tiplerinde hücre siklus arrestine yol açtığı, apoptoz ve diferansiyasyon indüksiyonu yaparak anti-proliferatif etki gösterdiği bildirilmiştir [14, 15, 16]. Kalsitriolün G0/G1 arrestini indüklediği, G1 arrestiyle ilişkili CDK inhibitörleri, p21 ve p27'yi modüle ettiği, kaspaz bağımlı olarak MEK ve kaspaz-3'ün bölünmesini uyardığı ortaya konulmuştur [17]. Bunlara ek olarak, kalsitriolün AKT'nin fosforilasyon ve ekspresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir [18]. Birçok pre-klinik ve klinik çalışmada kalsitriolün etkili olduğu bulunmasına rağmen, doz-sınırlayıcı kalsemik etkiler nedeniyle kemoterapötik ve kemopreventif ilaç olarak bu bileşimin kullanılmasında büyük bir engel olduğu raporlanmıştır. Bu nedenle kalsitriolün toksisitesinin azaltılmasına yönelik düşük konsantrasyonda kullanımı ve anti-kanser etkinliğini arttırmak için diğer ilaçlar ile kombine edilerek uygulanmasının etkinliği ile ilgili çalışmaların sayısı artış göstermiştir [21, 22].

## **2.5. Apoptoz**

Hücrenin yeniden yapımı ve yıkımının bir düzen içinde olması proliferasyon ve programlanmış hücre ölümü (apoptoz) dengesinin sağlıklı bir şekilde sürdürülmesine bağlıdır [131, 132]. Apoptoz, Kerr ve ark. tarafından 1972 yılında hücrelerin kendilerini kontrollü olarak yok etmeleri olarak tanımlanmıştır [133]. Yunanca, apo (= ayrı) ve ptosis (= düşen) kelimelerinin birleştirilmesi ile oluşmuş ağaçtan düşen yaprak veya çiçekten ayrılan petal anlamına gelir [134]. Apoptoz aktif, genlerle düzenlenen, programlı, RNA, protein sentezi ve enerjiye gereksinim duyan, organizmada homeostazı koruyan düzenlenmiş bir hücre ölüm sürecidir [135]. Hücrenin yaşam döngüsü boyunca yapım-yıkım dengesinin sürdürülmesini sağlar, bu nedenle apoptoz hızının yavaşladığı veya arttığı hallerde çeşitli hastalıklar ortaya çıkmaktadır [136, 137]. Embriyolojik gelişim sürecinde ve erişkin dokulardaki hücrelerin yaşamlarının sürdürülmesinde anahtar rol oynamaktadır. Biyolojik görevini tamamlamış veya hasarlı hücreler apoptoz ile genetik olarak kontrol edilerek ortadan kaldırılır ve böylece çeşitli dokularda homeostazın geliştirilmesi ve sürdürülmesi sağlanır [138].

Yaşayan organizmada apoptoz ve nekroz olmak üzere iki temel hücre ölümü gerçekleşir. Apoptoz, belli bir bölgedeki tüm hücreleri etkilemek yerine tek tek hücrelerde ortaya çıkar ve tipik olarak enflamatuar değişikliklere neden olmamaktadır. Apoptoz sinyali alındıktan sonra hücrede birçok morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler gözlenir. Kromatin değişikliklerinin başlamasından kısa bir süre önce, kalsiyumun hücre içi miktarında artış meydana gelir. Bu artış endonükleaz ve transglutaminaz gibi bazı enzimleri aktive ederek yapısal değişikliklere neden olur [139, 140]. Kromatin çekirdek zarının altında yoğunlaşarak değişik boyutta yarım ay



şeklinde yoğun kitleler haline gelmeye başlar. Çekirdek merkezinde çekirdekçik kromatini dağıtır. Çekirdekte meydana gelen değişikliklere endojen kalsiyum-magnezyum bağımlı nükleazların aktivasyonu neden olur. Bu nükleazlar nükleozomlar arasında kromatini böler ve DNA'yı hepsinin uzunluğu 180-200 çifti ve katları olan parçalara ayırır [141]. Bu süreçte, hücre hacmi azalır, sitoplazmik organeller yoğunlaşır, düz endoplazmik retikulum (ER) genişler ve hücre yoğunluğu artar. Yoğunlaşmış sitoplazmada vakuoller oluşur. Genişleyen sisternalar plazma membranı ile birleşerek hücre yüzeyine doğru tomurcuklanır. Bununla birlikte, plazma membranında bulunan iyon kanalları ve pompaların aktivasyonu bozulur, mikrovilluslar gibi yüzey özelleşmeleri kaybolur. Plazma membranındaki değişiklikler apoptotik hücrelerin tanınmasını sağlar. Normalde plazma membranının iç tabakasında bulunan fosfatidilserin, aminofosfolipid transferaz enzimiyle membranın dış tabakasına göç eder. Fagositik hücrelerin vitronektin, lektin özelliğindeki reseptörleri fosfatidilserin ile bağlanarak fagositozu uyarır. Hücre, sitoplazma ile çevrilmiş kromatin parçalarından oluşan apoptotik cisimciklere parçalanır [142]. Apoptotik cisimcikler, makrofajlar ya da komşu hücreler tarafından fagosite edilirken sitokin salgılanmasına ve inflamasyon oluşmasına neden olmamaktadır [133, 143, 144]. Diğer bir hücre ölüm şekli olan nekroz ise hücre şişmesi ve hücre parçalanması ile karakterize, ağır iskemi, mekanik travma gibi büyük çevresel değişikliklerin neden olduğu pasif ve patolojik bir süreçtir. Nekroz da hücre içi denetim mekanizmaları rol oynamamaktadır [145].

### **2.5.1. Apoptozun Hücresel Düzenlenme Mekanizmaları**

Apoptoz çok sayıda mediatör tarafından düzenlenir. Özellikle kalsiyum, BCL2 süper ailesi, seramid gibi moleküller, kaspazlar, P53, sitokrom-c gibi proteinler ve mitokondriyonlar rol oynar. Apoptotik süreç boyunca hücre içine giren kalsiyum iyonları gen regülasyonunda, proteaz, endonükleaz ve transglutaminaz aktivasyonunda ve hücre iskeleti organizasyonunda rol oynamaktadır. Apoptozun düzenlenmesini BCL2/BCL2 bağlantılı X proteini (BAX) gen ailesi sağlamaktadır. Bu ailenin bazıları apoptozu inhibe ederken (anti-apoptotik genler) bazıları da apoptozu uyarmaktadır (pro-apoptotik genler) [146, 147].

#### **2.5.1.1. BCL2 Süper Ailesi**

Büyük bir protein ailesi olan BCL2 süper ailesinin bir kısmı anti-apoptotik, bir kısmı da pro-apoptotiktir. Yapılarında merkezi konumda hidrofobik olan bir alfa heliks ve bunu çevreleyen amfipatik olan beş adet alfa heliks yapısı bulunmaktadır. BCL2 ailesi proteinlerinin 4'e kadar numaralanan BCL2 homoloji (BH) bölgeleri bulunmaktadır. BCL2 süper ailesi proteinleri yapısal ve işlevsel durumlarına göre BCL2, BAX ve Bik olmak üzere 3 grup altında sınıflandırılır [148,

149]. BCL2 alt grubu BCL2, Bcl-xl ve Bcl-w'dan oluşmaktadır ve hepsi anti-apoptotik aktiviteye sahiptir. Proteinler mitokondriyonun dış zarına yerleşirler. BAX alt grubu BAX, Bad ve Bak 'dan oluşmaktadır ve hepsi pro-apoptotiktir. Bik alt grubu, proapoptotik etkili Bik, Bid ve Bim'den oluşmaktadır. Bu grubun en belirgin özellikleri heterodimerler oluşturarak eşlerinin aktivitelerini düzenlemeleridir [150]. BAX, BCL2 ile heterodimerize ve kendisi ile homodimerize olur. Mitokondriyal membran porlarının iyon transportunu düzenleyen BCL2 sitokrom-c ve apoptoz indükleyici faktör (AIF)'lerin salınımını bloke ederek apoptozu inhibe etmektedir. Pro-apoptotik üyeler (BAX, Bad, Bid, Bak) sitokrom-c ve AIF salınımını arttırarak apoptozu indüklemektedir. Bcl-xl ise kaspaz-9'un aktif kaspaz-9'a dönüşmesini önlemektedir [151-153]. BAX hücrede aşırı eksprese edildiğinde apoptoz artarken BCL2 aşırı eksprese edildiğinde BAX ile heterodimerize olur ve apoptoz inhibe edilir [154]. Normalde sitozolde bulunan BAX apoptotik sinyal alındıktan sonra mitokondriyal membrana bağlanıp membranda küçük porlar açılmasını sağlayarak iyon geçirgenliğini bozar. Mitokondriyondan sitokrom-c ve AIF'nin sitozole geçmesine neden olmaktadır ve bunun sonucunda kaspaz aktivasyonunu düzenlemektedir [155]. Sitozole geçen sitokrom-c burada apoptotik proteaz aktive edici faktör (APAF-1) ile birleşir. Sitokrom-c ve APAF-1'in oluşturduğu bu komplekse ATP ve prokaspaz-9 eklenir ve kaspaz-9 aktifleşir. Aktif kaspaz-9 kaspaz-3'ü aktive eder ve apoptoz gerçekleşir [147].

### **2.5.1.2. P53**

P53 proteini hücrede DNA hasarına yanıt olarak hücre siklusunu G1 fazında durdurup hücreye DNA tamiri için zaman veren bir transkripsiyon faktörüdür [156]. Hücre siklusunun kontrolü, hücre farklılaşması, DNA sentezi ve tamiri, genomik şekillenme ve apoptozda görev almaktadır. DNA hasarı olan hücrelerde inaktif olan P53 geni aktive olur ve p21 genini aktifleştirir. p21 geni, hücrenin G1 fazından S fazına geçmesini inhibe ederek hücre siklusunu bloke eder. Bu dönemde DNA tamirinin hücre siklusunun S fazına geçmeden tamamlanması gerekir [157, 158]. Genom hasarı çok büyük ise hücre apoptozu gider. Hasar tamir edilemeyecek durumda ise P53 geni BAX'ı aktive ederek veya Fas ve tümör nekroz faktörü (TNF) reseptörü (TNF-R) gibi ölüm reseptörlerini indükleyerek apoptozu başlatır [156].

### **2.5.2. Apoptozun Moleküler Mekanizması**

Apoptozun sinyal ağında görev alan bileşenler genomda kodlanmıştır ve ölüm sinyali tarafından aktive edilmek üzere hazır halde bulunur. DNA hasarı, apoptozu teşvik edici sitotoksik ilaçlar, hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerinin uyarılması, radyasyon ve yaşam sinyallerinin yokluğu ölüm sinyalleri olarak sayılır [134]. Bu sinyaller DNA hasarı, pH'ın azalması, hücre içi

kalsiyum düzeyinin artması, metabolik veya hücre siklus bozuklukları ve hipoksi apoptozu tetikleyen hücre içi sinyalleri olarak tanımlanmaktadır. Hücre dışı sinyaller ise ölüm reseptörlerinin aktivasyonu (FAS-FAS ligand, TNF), sitotoksik T lenfosit, büyüme ve üreme faktörlerinin yetersizliği ve dış etkenler (toksinler, UV, iskemi, kemoterapötik ilaçlar, radyasyon)'dir. Kaspazlar her iki yolda da görev alır [159-161]. Tüm bu sinyaller apoptotik yolların oluşmasını sağlar ve apoptotik mekanizmayı tetikler [134]. Apoptotik mekanizma stresle indüklenen ve mitokondriyondaki değişikliklerle devam eden intrinsik yol ve hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerinin aktivasyonu ile başlayan ekstrinsik yol olmak üzere iki ana yol üzerinden gerçekleşir [162].

1. İnstrinsik Apoptoz Yolağı
2. Ekstrinsik Apoptoz Yolağı
  - Direkt mekanizma
  - İndirekt mekanizma

#### **2.5.2.1. İntrinsik Apoptoz Yolağı**

Apoptoz bazı durumlarda hücrel stres sonrasında üretilen intrinsik sinyaller ile başlatılmaktadır. Bu sinyaller hücrel stres, büyüme faktörünün eksikliği, viral enfeksiyonlar, oksidatif stres, radyasyon veya kimyasallarla oluşabilir. Makrofaj aktivasyonunu takiben gelişen reaktif oksijen türevleri (ROS), IFN-g sekresyonu, nitrik oksit, sitotoksik T-hücrelerinin perforin sekresyonu, bakteriyel toksinler ve kemoterapötikler mitokondriyonlar üzerinde etkilidir [163]. Bu yolla apoptotik uyarı alınmasından sonra, proapoptotik protein olan Bid, BCL2 (anti-apoptotik protein)'yi inaktive eder, BAX ve Bak'ı aktifleştirir. Aktifleşen BAX ve Bak mitokondriyal membranda por oluşumunu indükledikten sonra membran potansiyelini değiştirir. Bu değişiklik mitokondriyondan sitokrom-c, Smac (sekonder mitokondriyon-kaynaklı kaspaz aktivatörü), endonukleaz-G, AIF ve kalsiyum salınımını uyarır. Sitokrom-c, APAF-1'e bağlanır ve sitozolde apoptozom denen bir kompleks oluşturur. Daha sonra prokaspaz-9 ile etkileşime girerek kaspaz-9'u aktive eder. Aktifleşen kaspaz-9, prokaspaz-3'ü aktif kaspaz-3 haline getirir. Aktif kaspaz-3 de kaspaz aktive edici DNaz (CAD)'ı serbestleştirir. CAD'da çekirdekte kromatin yoğunlaşmasına ve DNA'nın nükleozomal alt birimler halinde fragmente olmasına neden olur [161, 164].

#### **2.5.2.2. Ekstrinsik Apoptoz Yolağı**

Bu yolak, hücre yüzeyinde bulunan ölüm reseptörleri aracılığı ile uyarılır. Ölüm reseptörleri, apoptozun indüklenmesinde rol oynayan TNF/sinir büyüme faktörü ( NGF) ailesine

ait hücre yüzey reseptörleridir. Bu ailenin üyeleri, hücre proliferasyonu ve apoptozu denetleyen transmembran proteinleridir. Fas reseptör, TNF-R1 ve TRAIL reseptörleri (TRAIL R1, R2), T-hücresi apoptozunun başlatılmasında etkili olduğu bilinen ölüm reseptörleridir. Büyüme faktörlerindeki eksiklik, hücre yaşlanması, adezyon kaybı, hipoksi, kemoterapi, radyasyon gibi ilaçların TNF-R gibi ölüm reseptörlerini aktive etmesi ile hücre uyarılır [162]. FAS, DR-3, DR-6, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TNF-R1, p75-NGFR ve ektodisplazin-A reseptörü (EDAR) olmak üzere sekiz adet ölüm reseptörü tanımlanmıştır [165].

Ölüm reseptörleri (Fas ve TNF-R1) ilgili ligandları (FasL ve TRAIL) ile etkileşime girdiğinde reseptörler trimerik bir yapı kazanır. Bu trimerik yapı kazanan reseptörler adaptör molekülleri ve prokaspazla birleşerek ölüm indüklü sinyal kompleksi (DISC) adı verilen yapıyı meydana getirir. DISC içinde inaktif durumda bulunan prokaspaz-8'in uzun ve kısa kolları kesilerek aktif kaspaz-8'e dönüşümü tetiklenir. Aktif kaspaz-8 iki yolla kaspaz-3'ü aktive eder. Bu etki kaspaz-8'in kaspaz-3'ü direkt aktive etmesiyle veya indirekt olarak instrinsik mekanizmada kaspaz-9'u aktive ettikten sonra kaspaz-3'ü aktive etmesiyle meydana gelir. Her iki yolla da aktive olan kaspaz-3 yine CAD aktivasyonu ile DNA fragmantasyonuna neden olur [165].

Apoptozun indüksiyonu ya apoptotik uyarıların yüzey reseptörlerine ölüm indükleyici ligandların bağlanması gibi ekstrinsik sinyallerden ya da sitotoksik T lenfositlerle sağlanmış olur. T lenfositler hasara uğramış veya virüslerle enfekte olmuş hücreleri tanıyıp ve hasarlı hücreleri neoplastik hücre oluşumundan ya da virüsle enfekte hücrelerle enfeksiyonlarının yayılmasını önlemek için apoptozu başlatır [166]. Granzim perforin sistemi virüsle enfekte hücreler ve kanser hücrelerinin ortadan kaldırılmasında etkili bir yoldur. Granzim B ve perforinler sitotoksik T lenfositlerin ve natural killer hücrelerin salgı granülleri içinde bulunan birer serin proteazdır. Sitotoksik T lenfositler hedef hücreye bağlandığında ortama perforinler salınır ve bu durum hedef hücre üzerinde dairesel bir por oluşumuna neden olur. Bu perforin poru hücre içine kalsiyum girişine neden olur. Artan kalsiyum vezikülden Granzim B'nin serbest kalmasını sağlar. Granzim B'de kaspaz aktivasyonunun ardından DNA fragmantasyonu sonucu apoptoza neden olur [167].

### **3. MATERYAL ve YÖNTEM**

#### **3.1. Materyaller**

##### **3.1.1. Cihazlar**

- Etüv (5040 BP, Elektro-mag Wise Cuba)
- Laminar akımlı kabin (LF-CA 04002, Helfer)
- CO<sub>2</sub> inkübatörü (MLAC 17, Sanyo)
- Santrifüj (Mikro 22 R, Hettich)
- İverted mikroskop (TS-100, Nikon)
- Buzdolabı (Ariston)
- Derin dondurucu (Bosch)
- Hücre sayım cihazı (Roche)
- Hassas terazi (Sartorius)
- Manyetik karıştırıcı (Yellow Line)
- Mikropipet seti (Eppendorf)
- Mikrosantrifüj (NF-048, Nüve)
- xCELLingence cihazı (Roche Diagnostics GmbH)
- FACSAria akım sitometri cihazı (BD Biosciences)
- Elektron mikroskobu (JEM-1011, Jeol)
- Ultramikrotom (UCT125, Leica)
- Lightcycler 480 II cihazı (Roche)

##### **3.1.2. Sarf ve Kimyasal Malzemeler**

- E-plate (5469830, Acea)
- T25 flask (430639, Corning)
- 15 ml'lik falkon tüp (078.02.007, Isolab)
- 5 ml serolojik pipet (861253001, Sarstedt)
- 10 ml serolojik pipet (861254001, Sarstedt)
- Pastör pipeti (LP135138, LP Italiana)
- Kalsitriol (D1530, Sigma-Aldrich)
- Perifosin (SML0612, Sigma-Aldrich)
- McCoy's 5A medium (16600082, Thermo)
- Etanol (Alko-kim)

- L-glutamin (K0283, Biochrom)
- Tripsin-EDTA (17-161E, Lonza)
- Penisilin/streptomisin (A2213, Biochrom)
- Amfoterisin (A2612, Biochrom)
- Fetal sığır serumu (FBS, S181G-100, Biowest)
- Dimetilsülfoksit (AI0231, Amresco)
- Fosfat tampon solüsyonu (PBS)
- DPBS-10X (14080-055, Thermo)
- Pipet ucu 0,5-10 µl'lik (T-300, Axygen)
- Pipet ucu 1-200 µl'lik (T-200-Y, Axygen)
- Pipet ucu 1-1000 µl'lik (T-1000-B, Axygen)
- APC Anneksin V / PI apoptoz belirleme kiti (556547, BioLegend)
- High pure RNA izolasyon kiti (1828665, Roche)
- Transcriptor first strand cDNA kiti (4896866, Roche)
- Lightcycler 480 multiwell plate 96 (04729692001, Roche)
- Master mix; lightcycler 480 probe master (04707494001, Roche)
- Human P53 real time ready designer assay (05532957001, Roche)
- Human BCL2 real time ready catalog assay (05532957001, Roche)
- Human BAX real time ready catalog assay (05532957001, Roche)
- Human beta-aktin (ACTB) real time ready catalog assay (05532957001, Roche)
- Epoksi rezin (13940, Electron Microscopy Sciences)
- 300 mesh formvuarsız bakır grid (EMS300-Cu, Electron Microscopy Sciences)
- Osmium tetroxide (19110, Electron Microscopy Sciences)
- Gluteraldehit (104239, Merck)
- Uranil asetat (10915, PubChem)
- Kurşun sitrat (15326-25G, Sigma-Aldrich)

## **3.2. Yöntem**

### **3.2.1. Hücre Kültürü**

Bu çalışmada insan endometriyum kanseri hücre hattı (HEC1A, ATCC® HTB-112™, Manassas, USA) kullanıldı. Bu hücre hattı evre IA, tip II endometriyal adenokarsinomali bir hastadan izole edilmiştir. Deney süresince HEC1A hücrelerinin çoğaltılması, pasajlanması, dondurularak saklanması, sayımı ve canlılık testleri işlemleri hücre kültürü laboratuvarında yapıldı.

### **3.2.1.1. Hücre Kültür Medyumunun Hazırlanışı**

Aşağıdaki malzemeler kullanılarak 100 ml hücre kültürü medyumunu hazırlandı.

- 88 ml McCoy's 5A hücre kültürü medyumunu
- 10 ml FBS
- 1 ml Penisilin+Streptomisin
- 1 ml Amfoterisin

### **3.2.1.2. Hücrelerin İnkübe Edilmesi**

HEC1A hücrelerinin T25 flasklarda katkılı McCoy's 5A hücre kültürü medyumunu içerisinde 37 °C sıcaklık ve %5 CO<sub>2</sub> ortamında inkübe edilerek çoğalması sağlandı.

### **3.2.1.3. Hücrelerin Çözülmesi ve Çoğaltılması**

Dondurulmuş HEC1A hücrelerinin çözülmesi aşağıdaki protokole göre yapıldı.

1. -80 °C'den dondurulmuş HEC1A hücrelerinin bulunduğu vial çıkartılarak buz aküsü üzerine konuldu.
2. Vial 37 °C'de hazırlanan su banyosunun içerisine konularak 1-2 dk beklendi.
3. Vial içerisindeki hücre karışımı medyum eridikten sonra vial su banyosundan çıkarıldı.
4. Laminar akımlı kabin içerisinde 15 ml'lik falkon tüp içine 7-9 ml katkılı medyum konuldu ve vial içindeki hücre süspansiyonlu medyum falkon tüp içerisine eklendi.
5. Elde edilen hücre süspansiyonu 125 x g'de 5 dk santrifüj edildi.
6. Santrifüj sonrası süpernatant pastör pipeti ile çekilip atıldı. Geriye kalan pellet üzerine daha önceden hazırlanmış katkılı medyum eklendi ve pipetaj yapıldı.
7. HEC1A hücrelerini içeren medyum pipet yardımı ile T25 flask içine ekildi.
8. Mikroskopta incelendikten sonra T25 flask 37 °C sıcaklık ve %5 CO<sub>2</sub> ortamında inkübe edildi ve 3 güne bir medyum yenilendi.
9. Çoğalan HEC1A hücreleri %80-90 doyumluğa ulaşınca hücreler pasajlandı.
10. Bu amaçla üremekte olan hücreler istenen çoğunluğa ulaştığında üzerlerindeki medyum pipetle alınarak 2 ml steril PBS ile yıkandı.
11. PBS pastör pipetiyle uzaklaştırıldıktan sonra hücrelerin kaldırılması için hücrelerin üzerine 2,5 ml tripsin-EDTA solüsyonu ilave edilerek etüvde 5-7 dk bekletildi.

12. Hücrelerin tutunduğu yüzeyden kalkmasının ardından süspansiyon halindeki hücre tripsin-EDTA solüsyonu 15 ml'lik falkon tüp içerisine alınarak üzerine tripsinin inhibisyonu için tripsin hacminin 2 katı kadar katkılı medyum eklendi.
13. Tüpe alınan süspansiyon 125 x g'de 5-10 dk santrifüj edilerek tripsin-EDTA solüsyonu uzaklaştırıldı. Hücreler katkılı medyum ile süspanse edilerek 3 adet T25 flaska bölünerek pasajlandı ve T25 flasklar 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub> ortamında inkübe edildi.

#### **3.2.1.4. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması**

1. Çoğalan HEC1A hücreleri %80-90 doyumluğa ulaşınca hücrelerin üzerlerindeki medyum pipetle alınarak 2 ml steril PBS ile yıkandı.
2. PBS pastör pipetiyle uzaklaştırıldıktan sonra hücrelerin kaldırılması için 2,5 ml tripsin-EDTA solüsyonu ilave edilerek etüvde 5-7 dk bekletildi.
3. Hücrelerin tutunduğu yüzeyden kalkmasının ardından süspansiyon halindeki hücre tripsin-EDTA süspansiyonu 15 ml'lik falkon tüp içerisine alınarak üzerine tripsinin inhibisyonu için tripsin hacminin en az 2 katı kadar katkılı medyum eklendi.
4. Tüpe alınan süspansiyon 125 x g'de 5-10 dk santrifüj edilerek tripsin-EDTA solüsyonu uzaklaştırıldı.
5. Elde edilen hücre pelleti 900 µl katkılı medyum ile sulandırılarak hücre sayımı yapıldı.
6. Dondurma viallerinin içerisine 50 µl dimetilsülfoksit (DMSO) ve 950 µl katkılı medyum ile süspanse edilen HEC1A hücreleri eklendi.
7. Vialler -80 °C'de derin dondurucuda gerektiğinde kullanılmak üzere saklandı.

#### **3.2.2. Deney Gruplarında Kullanılan İlaçların Doz Ayarlamaları**

##### **3.2.2.1. Perifosinin Hazırlanması**

Perifosin DMSO içerisinde çözülerek 10 mM'lık bir stok hazırlandı ve -20 °C'de saklandı. Daha sonra 10 mM'lık stok katkılı McCoy's 5A hücre kültürü medyumunu ile seyreltilerek 10 µM, 30 µM ve 50 µM'lık konsantrasyonlarda perifosin solüsyonları hazırlandı.

##### **3.2.2.2. D Vitamininin Hazırlanması**

Kalsitriol %99,8'lik etil alkolle son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde çözdürülerek bir stok hazırlandı ve -20 °C'de saklandı. Daha sonra katkılı McCoy's 5A hücre kültürü medyumunu ile seyreltilerek 50 nM ve 200 nM'lık konsantrasyonlarda D vitamini solüsyonları hazırlandı.



### 3.2.2.3. HEC1A Hücrelerine Perifosin, D Vitamini ve Her İkisinin Kombinasyonun Uygulanması

Gerçek zamanlı hücre elektronik algılama sistemi (xCELLigence) ile hücre proliferasyonunun analizi için kullanılacak olan kontrol, perifosin, D vitamini ve perifosin+D vitamininin kombinasyon grupları Tablo 3.1’de verilmiştir. Bu deneyin sonucuna göre diğer analizler için kullanılacak dozlara karar verilmiştir. Çalışmamızda kontrol, perifosin, D vitamini ve perifosin+D vitamini kombinasyonları HEC1A hücreleri üzerine 48 ve 72 saat uygulanarak değerlendirildi.

**Tablo 3.1.** Deney grupları ve kullanılan doz miktarları

<b>Gruplar</b>	<b>Kullanılan dozlar</b>
Kontrol	Sadece katkılı McCoy’s 5A hücre kültürü medyumu
Perifosin	10 $\mu$ M
Perifosin	30 $\mu$ M
Perifosin	50 $\mu$ M
D vitamini	50 nM
D vitamini	200 nM
Perifosin+D vitamini	10 $\mu$ M+50 nM
Perifosin+D vitamini	10 $\mu$ M+200 nM
Perifosin+D vitamini	30 $\mu$ M+50 nM
Perifosin+D vitamini	30 $\mu$ M+200 nM
Perifosin+D vitamini	50 $\mu$ M+50 nM
Perifosin+D vitamini	50 $\mu$ M+200 nM

Ayrı flaklarda ekimi yapılan HEC1A hücrelerinin üzerine perifosin (10  $\mu$ M, 30  $\mu$ M, 50  $\mu$ M), D vitamini (50 nM ve 200 nM) ve perifosin+D vitamini kombinasyonları (10  $\mu$ M+50 nM, 10  $\mu$ M+200 nM, 30  $\mu$ M+50 nM, 30  $\mu$ M+200 nM, 50  $\mu$ M+50 nM, 50  $\mu$ M+200 nM) eklendi. Her bir doz için hücreler 48 ve 72 saat inkübe edildi. xCELLigence ile hücre proliferasyon analizi sonrasında diğer analizlere 10  $\mu$ M, 30  $\mu$ M perifosin ve 50 nM, 200 nM D vitamini dozları ve bunların kombinasyonları ile devam edildi.

### 3.2.3. xCELLigence ile Hücre Proliferasyon Eğrilerinin Belirlenmesi

Bu çalışmada, xCELLigence ile HEC1A hücrelerinin normal proliferasyon eğrisi ve uygulanacak olan perifosin, D vitamini ve perifosin+D vitamini kombinasyonlarının HEC1A hücreleri üzerine anti-proliferatif etkileri çalışıldı. Proliferasyon çalışmasında altın elektrot kaplı E-plateler kullanıldı. Çalışmamızda xCELLigence analizi için n=4 tekrar yapıldı. Deney protokolümüz aşağıdaki gibidir.

1. Flask içerisindeki medyum uzaklaştırılarak hücreler 3 ml 1X DPBS ile 3 kez yıkandı.
2. Son yıkamada kullanılan DPBS çekildikten sonra hücrelere 2 ml %0,05 tripsin-EDTA eklenerek 10 dk boyunca 37 °C'de inkübe edildi.
3. Tripsin inaktivasyonunu sağlamak için flaska 2 ml katkılı medyum eklendi ve flaskadaki hücre süspansiyonu 15 ml'lik falkon tüpüne aktarıldı.
4. Elde edilen hücre süspansiyonu 125 x g'de 5-10 dk santrifüj edilen tüpten süpernatant uzaklaştırılarak, pellet 1 ml katkılı medyum ile resüspanse edildi.
5. 16 kuyulu E-plate'lerin her bir kuyusuna yaklaşık  $2 \times 10^5$  hücre ekilmesi planlandığı için hücre süspansiyonu dilüsyon oranları hesaplandı.

xCELLigence verilerinin gerçek zamanlı hücre analizi-çift plate (RTCA DP) programında işlenmesi ve hücre analiz grafiklerinin çıktısı aşağıdaki aşamalar takip edilerek yapıldı.

1. RTCA programı başlatıldı. Program otomatik olarak RTCA kontrol ünitesine bağlı RTCA DP cihazını tanıyarak uygun kullanıcı arayüzünü başlattı.
2. Expnote, Layout ve Schedule öğelerini içeren deney tasarısı sayfaları dolduruldu. Schedule için izlenen aşamalar: kör okuma aşaması, hücre izleme aşaması ve bileşik aktivitesi izleme aşaması şeklindedir. İstatistiksel analizlerde kullanılacak olan her bir uygulamada, 4 tekrar olacak şekilde kuyucukların kodlaması yapıldı. Totalde kontrol, perifosin (10  $\mu$ M, 30  $\mu$ M, 50  $\mu$ M), D vitamini ( 50 nM, 200 nM) ve altı adet perifosin+D vitamini kombinasyon gruplarından oluşan 12 adet deney grubu ve her grup için 4 tekrar yapıldığından 48 adet kuyu kullanıldı.
3. Tüm ayarlamalar yapıldıktan sonra E-plate'lerin her bir kuyusuna 100  $\mu$ l katkılı medyum eklenerek plateler inkübatör içerisindeki enstrümanına yerleştirildi. Bu şekilde deney başlatılarak ilk okuma (kör okuma) alındı.
4. Kör okuma tamamlandıktan sonra E-plate'ler inkübatörden çıkarılarak laminar akımlı kabine alındı. Kuyulara 90  $\mu$ l hacimde  $2 \times 10^5$  hücre içeren hücre süspansiyonu tüm kuyucuklara son hacim 190  $\mu$ l olacak şekilde eklendi.
5. İnkübatöre geri alınan E-plate'ler için hücre izleme aşaması başlatıldı ve 24 saat beklendi.
6. İkinci aşamanın bekleme süresince, uygulanacak maddeler için gerekli konsantrasyonlar ependorf tüpler içerisinde hazırlanarak kodlarına uygun etiketlendi.
7. Hücre izleme aşaması bitmeden 1 saat önce, kullanılacak tüplerin 37 °C'ye gelmesi sağlandı. 24 saat sonunda bu aşama beklemeye alındı (pause). E-plate'ler inkübatörden alınarak laminar kabine aktarıldı. Plate'ler için önceden belirlenmiş kuyucuk kodlarına

göre uygun konsantrasyonlarda ilaç stoklarından 10 µl kullanılarak kuyucuklardaki son hacimler 200 µl'ye tamamlandı.

8. E-plate'ler tekrar inkübatöre alınarak bileşik aktivitesi izleme aşaması başlatıldı. Bu aşama uygulanan bileşik ve hücre hattına bağlı olarak 48-72 saat arası sürdürülmektedir. Hücre sayısındaki değişiklikler, 96 saat boyunca her 15 dk'da bir inkübatör içindeki xCELLigence cihazı ile gözlemlendi.

### **3.2.4. Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR (RT-qPCR) Analizleri**

Perifosin, D vitamini ve perifosin+D vitamini kombinasyonu uygulamalarının HEC1A hücre hattında farklılaştıracağı gen ekspresyon düzeylerinin gösterilmesi için öncelikle örneklerden total RNA izolasyonu high pure RNA izolasyon kiti kullanılarak, firmanın öngördüğü protokol ile yapıldı. Bu şekilde nükleaz enzimlerinin inhibe edildiği ortamda total RNA'nın mümkün olan en saf haliyle DNA ve proteinlerden ayrılması amaçlandı.

#### **3.2.4.1. RNA İzolasyonu**

1. Hücreler 48 ve 72 saat inkübasyon süreleri dolduğunda tripsinize edilerek toplandı ve  $1 \times 10^6$  hücre/ml konsantrasyonunda olacak şekilde PBS ile resüspanse edildi.
2. Üzerine 400 µl liziz/bağlama solüsyonu konularak vortekste karıştırıldı. Daha sonra spin atılarak üzerine 500 µl etanol eklendi ve karışması sağlandı. Karışım filtreli toplama tüpüne alınarak 15587 x g'de 30 sn.ye santrifüj edildi.
3. Filtre yeni bir toplama tüpüne aktarıldı, üzerine 500 µl yıkama solüsyonu eklendi ve 15 sn 8000 x g'de santrifüj edildi.
4. Filtre yeni bir toplama tüpüne aktarıldı. Her bir örneğe 90 µl DNase inkübasyon solüsyonu + 10 µl DNase I eklendi. 15 dk 25 °C inkübasyona bırakıldı.
5. Filtreli tüplerin içerisine 500 µl yıkama solüsyonu-I koyup 15 sn 8000 x g'de çevrildi. Toplama tüpleri boşaltıldı. Filtreli tüpler bu toplama tüplerine aktarıldı.
6. Filtreli tüplerin içerisine 500 µl yıkama solüsyonu-II koyup 15 sn 8000 x g'de çevrildi. Toplama tüpleri boşaltıldı. Filtreli tüpler bu toplama tüplerine aktarıldı.
7. Filtreli tüplerin içerisine 200 µl yıkama solüsyonu-II koyup 2 dk 15587 x g'de çevrildi. Toplama tüpleri atıldı. Filtreli tüpler kapaklı 1,5 ml'lik ependorf tüplere aktarıldı.
8. Her örneğe 50-100 µl elution solüsyonu eklendi. 1 dk 8000 x g'de çevrildi.
9. Elde edilen RNA'lar -80 °C'de saklandı.

### 3.2.4.2. Total RNA'dan cDNA Elde Edilmesi

Elde edilen RNA'ları komplementer DNA'ya çevirmek için transcriptor first strand cDNA kiti kullanıldı. cDNA sentezi 2 basamakta tamamlandı. Her bir örnek için ters transkriptaz (reverse transkriptase) reaksiyon karışımı Tablo 3.2'de belirtildiği gibi hazırlandı.

#### 1. Basamak:

Her örnek için ayrı ayrı 0,2 ml'lik PCR tüpleri kullanıldı. Tablo 3.2'de belirtilen 1. mix hazırlandı. Bu karışım 65 °C'de 10 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra 2. basamağa geçildi.

#### 2. Basamak:

Tablo 3.2'de belirtilen 2. mix hazırlandı. Hazırladığımız 2. mix inkübasyondan çıkan 1. mix'in üzerine aktarıldı. Daha sonra mix'in son hali Termal Cyclers'da işleme sokuldu. cDNA örnekleri -20 °C'de muhafaza edildi.

**Tablo 3.2.** cDNA sentezi reaksiyon karışımı

<b>İçerik</b>	<b>Hacim</b>
<b>1. mix:</b>	
Total RNA veya poly (A) mRNA	9 µl
Random primer	2 µl
Su, PCR grade	2 µl
Total hacim	13 µl
<b>2. mix:</b>	
Transcriptor Reverse Trascriptase Reaction Buffer 5x conc.	4 µl
Protector Rnase Inhibitor	0,5 µl
Deoxynukleotid Mix	2 µl
Transcriptor Reverse Trascriptase enzim	0,5 µl
Total hacim	7 µl

### 3.2.4.3. Gerçek Zamanlı PCR (RT-PCR) Aşaması

#### RT-PCR'da kullanılan karışım;

- 4 µL distile su
- 10 µL reaksiyon enzimi (Probe master mix)
- 1 µL her bir primer için (P53, BCL2, BAX ve ACTB)
- 5 µL cDNA

### **RT-PCR protokolünün aşamaları;**

1. İnkübasyon aşaması; 95 °C'de 10 dk DNA polimerazın aktive olması için bekletildi.
2. Amplifikasyon aşaması; 3 aşamada gerçekleştirildi, aşağıdaki döngü 45 defa tekrarlandı.
  - 1. basamak; 95 °C'de 10 sn bekletilerek DNA'nın çift iplikli yapıdan tek iplikli yapıya geçmesi (denatürasyon)
  - 2. basamak; 60 °C'de 30 sn bekletilerek çoğaltılması istenilen spesifik bölgeye uygun primerlerin bağlanması (annealing)
  - 3. basamak; 72 °C'de 1 sn bekletilerek DNA zincirinin uzaması (elongation) sağlandı.
3. Soğutma aşaması; 40 °C'de 30 sn bekletildi.

RT-PCR çalışması için her bir örnek için önceden PCR tüplerine hazırlanmış olan 10 µL RNA'dan elde edilen cDNA'lar -20 °C'den çıkartılarak oda ısısına getirildi. RT-PCR çalışması için reaksiyonda kullanılacak olan karışım 1,5 ml'lik eppendof tüpleri içerisinde hazırlandı. Çalışma sonunda çıkan sonuçların amplifikasyon eğrileri gözlemlenerek kantitatif modda crossing point (Cp) değerleri belirlendi. Kontrole göre gen ekspresyon değişimleri  $2^{-\Delta\Delta CT}$  yöntemi kullanılarak hesaplandı.

### **3.2.5. Akım Sitometrik Analiz**

Perifosin, D vitamini ve perifosin+D vitamini kombinasyonu uygulanmasının HEC1A hücrelerinde oluşturduğu apoptozu saptamak amacıyla propidium iodide (PI)'li allofikosiyanın (APC) anneksin V apoptoz belirleme kiti kullanıldı. APC Anneksin V ve PI boyaması ile canlı hücreler (Anneksin V-/PI-), erken apoptotik hücreler (Anneksin V+/PI-), geç apoptotik hücreler (Anneksin V+/PI+) ve nekrotik hücreler (Anneksin V-/PI+) ayırt edildi.

#### **3.2.5.1. APC Anneksin V-PI Boyama Protokolü**

1. T25 flasklara  $2 \times 10^6$  hücre/ml ekim yapıldı. %10 FBS içeren medyumda inkübasyonları gerçekleştirildi.
2. 24 saat sonra flasklara belirlenen konsantrasyonlarda perifosin, D vitamini ve her ikisinin kombinasyonu eklendi. 48 ve 72 saat inkübasyonları gerçekleştirildi.
3. Hücreler tripsinize edilerek tutundukları yüzeyden kalkmaları sağlandı ve hücre süspansiyonu 15'lik falkon tüplere aktarıldı.

4. Elde edilen hücre süspansiyonu 125 x g'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve her bir pellet APC Anneksin V Apoptoz belirleme kiti içerisinde olan 1 ml 1X bağlanma tamponu ile süspansiyon edildi. Her bir tüpten 100'er µl ayrı bir tüpe aktarıldı.
5. 5 µl APC Anneksin V boyama solüsyonu ve 5 µl PI boyama solüsyonu eklendi.
6. 15'lik falkon tüpler karanlıkta 15 dk oda sıcaklığında bekletildi.
7. Her bir tüpe 400'er µl 1X bağlanma tamponu ilave edildi. Akım sitometrisinde APC anneksin-V için FL1 paneli ve PI için FL2 panelinde okuma gerçekleştirildi.
8. Analizler akım sitometri cihazında kadran istatistiği yapılarak canlı, erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik hücreler % olarak belirlendi.
9. HEC1A hücreleri FACSAria akım sitometri cihazında 1 saat içerisinde analiz edildi ve analizi için FACSDiva versiyon 1.2.1 software kullanıldı.

### **3.2.6. Hücrelerin Elektron Mikroskopik Takibi**

Flasktan medyum uzaklaştırıldı ve üzerine 2,5 ml tripsin eklenerek 5 dk inkübatörde bekletildi. Hücreler tutunduğu yüzeyden kaldırıldıktan sonra 15 ml'lik falkon tüpüne aktararak santrifüj edildi. Daha sonra hücre hacminin 5 katı %2,5'luk gluteraldehit solüsyonu ile pellet resüspansiyon edildi. Hücre süspansiyonu eppendorf tüpe aktarıldı ve 10 dk oda ısısında bekletildi. Daha sonra maksimum 31514 x g'de 3-5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve pellet üzerine 1 ml %2,5'luk gluteraldehit solüsyonu eklendi. 20 dk sonra pellet tüpten çıkarılarak 1 mm<sup>3</sup>'lük parçalara bölündü. Daha sonra PBS ile yıkanan pellet parçaları aşağıdaki takip protokolüne göre hazırlandı.

1. %1'lik osmium tetraoksitte ikinci tespit 1 saat
2. PBS ile yıkama 3 kez 5'er dk
3. %50 etil alkolde 15 dk
4. %60 etil alkolde 15 dk
5. %70 etil alkolde 15 dk
6. %80 etil alkolde 15 dk
7. %90 etil alkolde 15 dk
8. %96 etil alkolde 15 dk
9. %96 etil alkolde 15 dk
10. %96 etil alkolde 15 dk
11. %96 etil alkolde 15 dk
12. Propilen oksitte 15 dk
13. Propilen oksitte 15 dk

14. Propilen oksit + epoksi rezinde 30 dk
15. Propilen oksit + epoksi rezinde 30 dk
16. Epoksi rezinde 16-24 saat

Bu işlemlerden sonra hücre parçaları epoksi rezine gömülerek 60 °C'lik etüvde 18 saat süreyle polimerize edildi. Elde edilen bloklardan ultramikrotom ile 70 nm kalınlığında kesitler, 300 gözenekli bakır gridlere alındı ve uranil asetat ve kurşun sitrat ile kontrastlandı. Kontrastlama işlemi için;

1. Kesitler uranil asetatda 5 dk bekletildi.
2. Distile su ile yıkandı.
3. Kurşun sitratta 5 dk bekletildi.
4. Distile su ile yıkandı.
5. Kurutma kağıdı ile kurutuldu.

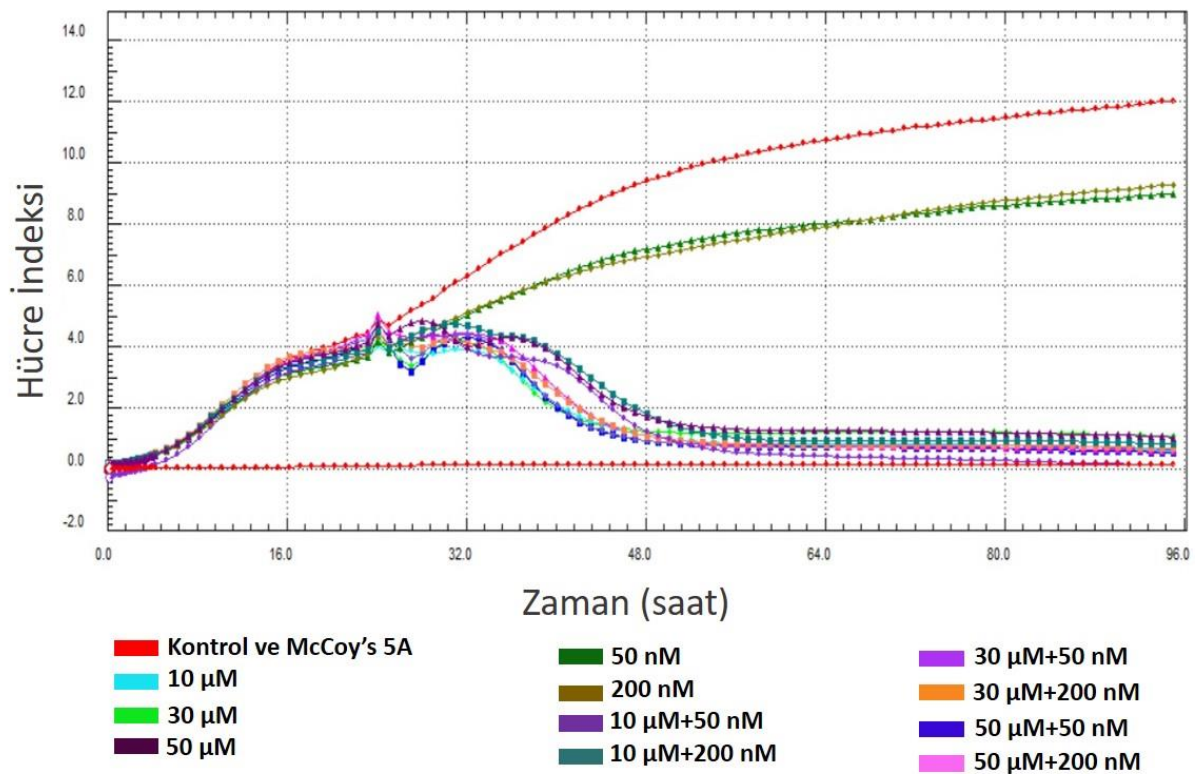
### **3.3. İstatistiksel Analiz**

“Perifosin ve D vitamini Kombinasyonunun Endometriyum Kanseri Hücre Hattı (HEC1A) Üzerine Etkisi” başlıklı bu çalışmaya ait verilerin istatistiksel analizi Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Bilişim Anabilim Dalı'ndan danışmanlık alınarak yapıldı. İstatistiksel hesaplamalar STATISTICA version 13.3 yazılımı kullanılarak yapıldı. Tüm in vitro çalışmalar üç kopya halinde yapıldı ve özet istatistik olarak ortalama ve standart sapma değerleri verildi. Grup ve zaman etkileşimleri arasındaki istatistiksel farkları karşılaştırmak için çoklu karşılaştırma testleri olarak ANOVA testi kullanıldı. Gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılık, post-hoc çoklu karşılaştırmalar için Tukey-HSD testi ile değerlendirildi.  $P < 0,05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. xCELLigence ile Hücre Proliferasyon Analizi

Perifosin (10  $\mu$ M, 30  $\mu$ M ve 50  $\mu$ M), D vitamini (50 nM ve 200 nM) ve perifosin+D vitamini kombinasyonlarının (10  $\mu$ M+50 nM, 10  $\mu$ M+200 nM, 30  $\mu$ M+50 nM, 30  $\mu$ M+200 nM, 50  $\mu$ M+50 nM, 50  $\mu$ M+200 nM) HEC1A hücre proliferasyonu üzerine doz ve zaman bağımlı etkisi xCELLigence ile analiz edildi. Hücre proliferasyonu, hücre indeks (cell index, CI) değerlerine göre bilgisayar bağlantılı sistemle eş zamanlı olarak 96 saat boyunca izlendi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. 96 saat boyunca HEC1A hücre proliferasyonunun hücre indeks değerleri.

Tüm zaman dilimlerinde McCoy's 5A grubu ve diğer tüm gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlıydı (tüm karşılaştırmalarda  $p < 0,05$ ), (Şekil 4.2, Şekil 4.3).

24-36 saat zaman aralığında alınan ölçümlerde; 10  $\mu$ M perifosin, 30  $\mu$ M perifosin, 30  $\mu$ M+50 nM, 30  $\mu$ M+200 nM ve 50  $\mu$ M+50 nM kombinasyon gruplarında hücre proliferasyonu kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gösterdi (tüm karşılaştırmalarda  $p < 0,05$ ), (Şekil 4.2).

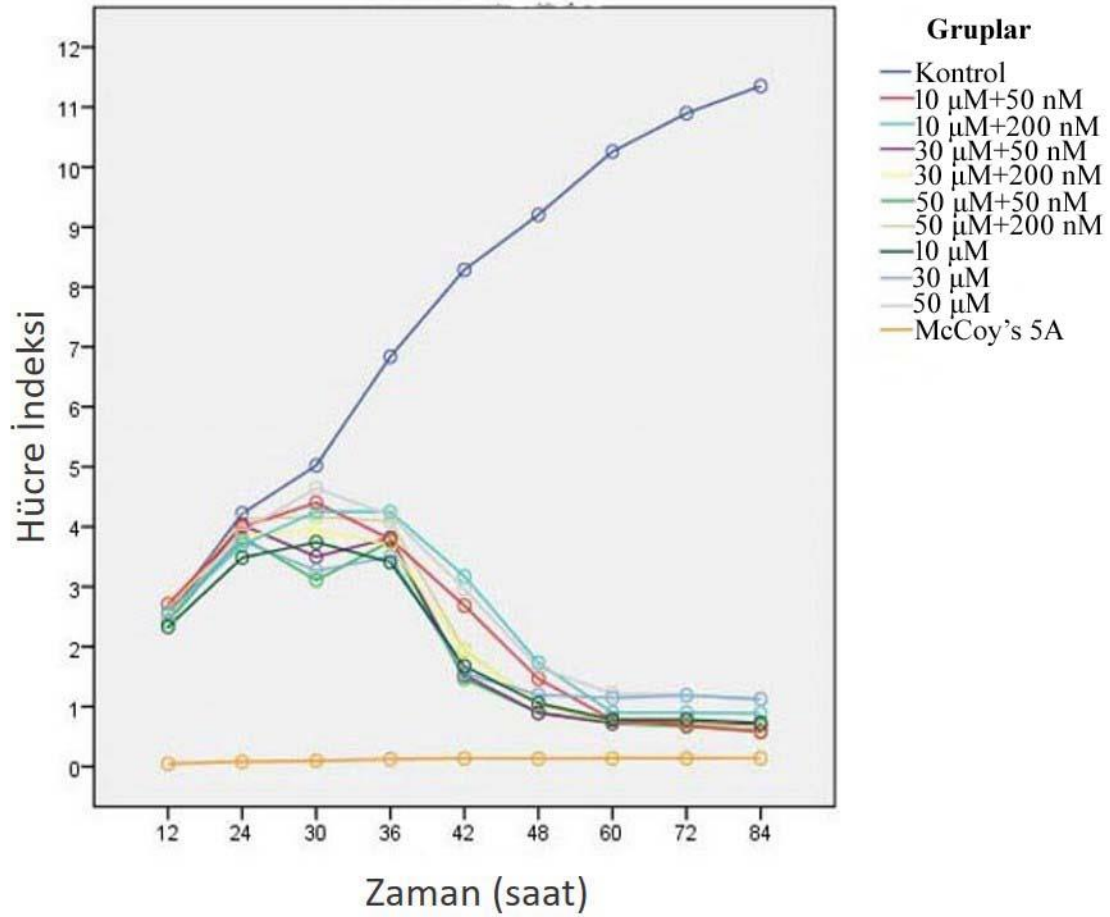
36-48, 48-72 ve 72-96 saat zaman aralıklarında; tüm perifosin, D vitamini ve perifosin+D vitamini kombinasyon gruplarında hücre proliferasyonu kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gösterdi (tüm karşılaştırmalarda  $p < 0,05$ ), (Şekil 4.2, Şekil 4.3).



24-36 saat zaman aralığında; 10 µM perifosin grubu ile perifosin+D vitamini kombinasyon grupları karşılaştırıldığında hücre proliferasyonunun anlamlı bir farklılık göstermediği saptandı (tüm karşılaştırmalarda  $p>0,05$ ), (Şekil 4.2). 30 µM perifosin grubunun hücre proliferasyonu ile karşılaştırıldığında 10 µM+50 nM ve 10 µM+200 nM kombinasyon gruplarındaki hücre proliferasyonunun anlamlı olarak arttığı görüldü (tüm karşılaştırmalarda  $p<0,05$ ), (Şekil 4.2). 50 µM perifosin grubunun hücre proliferasyonu ile karşılaştırıldığında 30 µM+50 nM ve 50 µM+50 nM kombinasyon gruplarındaki hücre proliferasyonunun anlamlı olarak azaldığı görüldü (tüm karşılaştırmalarda  $p<0,05$ ), (Şekil 4.2).

36-48 saat zaman aralığında; 10 µM perifosin ve 30 µM perifosin grupları ile karşılaştırıldığında 10 µM+50 nM ve 10 µM+200 nM kombinasyon gruplarındaki hücre proliferasyonunun anlamlı olarak arttığı görüldü (tüm karşılaştırmalarda  $p<0,05$ ), (Şekil 4.2). 50 µM perifosin grubu ile karşılaştırıldığında 30 µM+50 nM, 30 µM+200 nM, 50 µM+50 nM ve 50 µM+200 nM kombinasyon gruplarındaki hücre proliferasyonunun anlamlı olarak azaldığı görüldü (tüm karşılaştırmalarda  $p<0,05$ ), (Şekil 4.2).

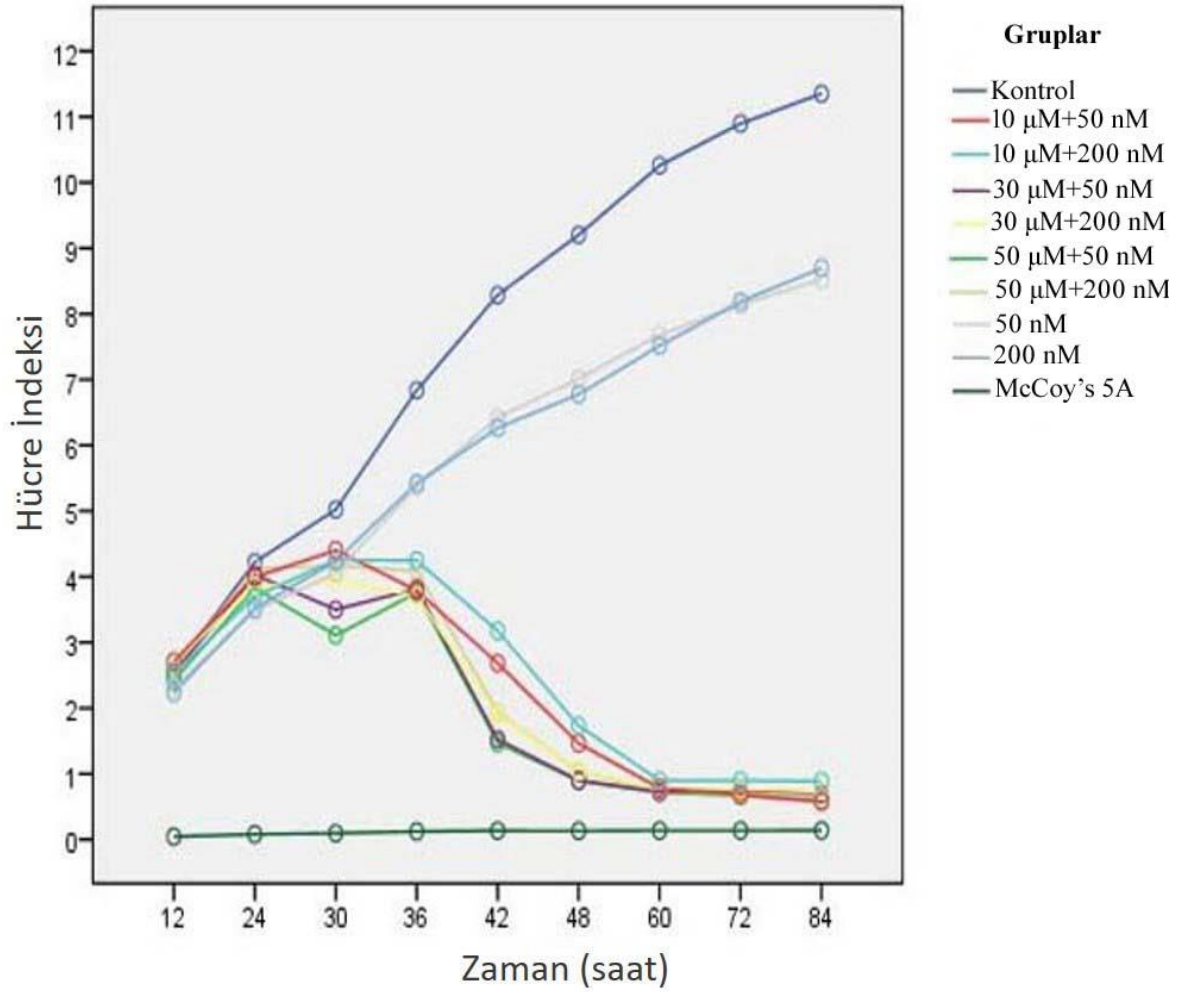
48-72 ve 72-96 saat zaman aralıklarında; 10 µM perifosin, 30 µM perifosin ve 50 µM perifosin grupları ile tüm perifosin+D vitamini kombinasyon grupları karşılaştırıldığında hücre proliferasyonunun anlamlı bir farklılık göstermediği saptandı (tüm karşılaştırmalarda  $p>0,05$ ), (Şekil 4.2).



**Şekil 4.2.** HEC1A hücrelerinde perifosin (10 µM, 30 µM, 50 µM) ve perifosin+D vitamini kombinasyonlarının (10 µM+50 nM, 10 µM+200 nM, 30 µM+50 nM, 30 µM+200 nM, 50 µM+50 nM ve 50 µM+200 nM) hücre indeks değerlerinin zamana bağlı değişim grafiği.

24-36 saat zaman aralığında; 50 nM ve 200 nM D vitamini grupları ile perifosin+D vitamini kombinasyon grupları karşılaştırıldığında hücre proliferasyonunun anlamlı bir farklılık göstermediği saptandı (tüm karşılaştırmalarda  $p>0,05$ ), (Şekil 4.3).

36-48, 48-72 ve 72-96 saat zaman aralıklarında; 50 nM ve 200 nM D vitamini grupları ile karşılaştırıldığında tüm perifosin+D vitamini kombinasyon gruplarındaki hücre proliferasyonunun anlamlı olarak azaldığı görüldü (tüm karşılaştırmalarda  $p<0,05$ ), (Şekil 4.3).



**Şekil 4.3.** HEC1A hücrelerinde D vitamini (50 nM, 200 nM) ve perifosin+D vitamini kombinasyonlarının (10 µM+50 nM, 10 µM+200 nM, 30 µM+50 nM, 30 µM+200 nM, 50 µM+50 nM ve 50 µM+200 nM) hücre indeks değerlerinin zamana bağlı değişim grafiği.

#### 4.2. BCL2, BAX ve P53 mRNA Ekspresyon Analizi

Perifosin, D vitamini ve perifosin+D vitamini kombinasyonlarının HEC1A hücrelerine uygulanması sonrasında 48. ve 72. saatlerde RT-qPCR ile HEC1A hücrelerinin BCL2, BAX ve P53 mRNA ekspresyon düzeyleri analiz edildi.

##### 4.2.1. BCL2 mRNA Ekspresyon Düzeyi

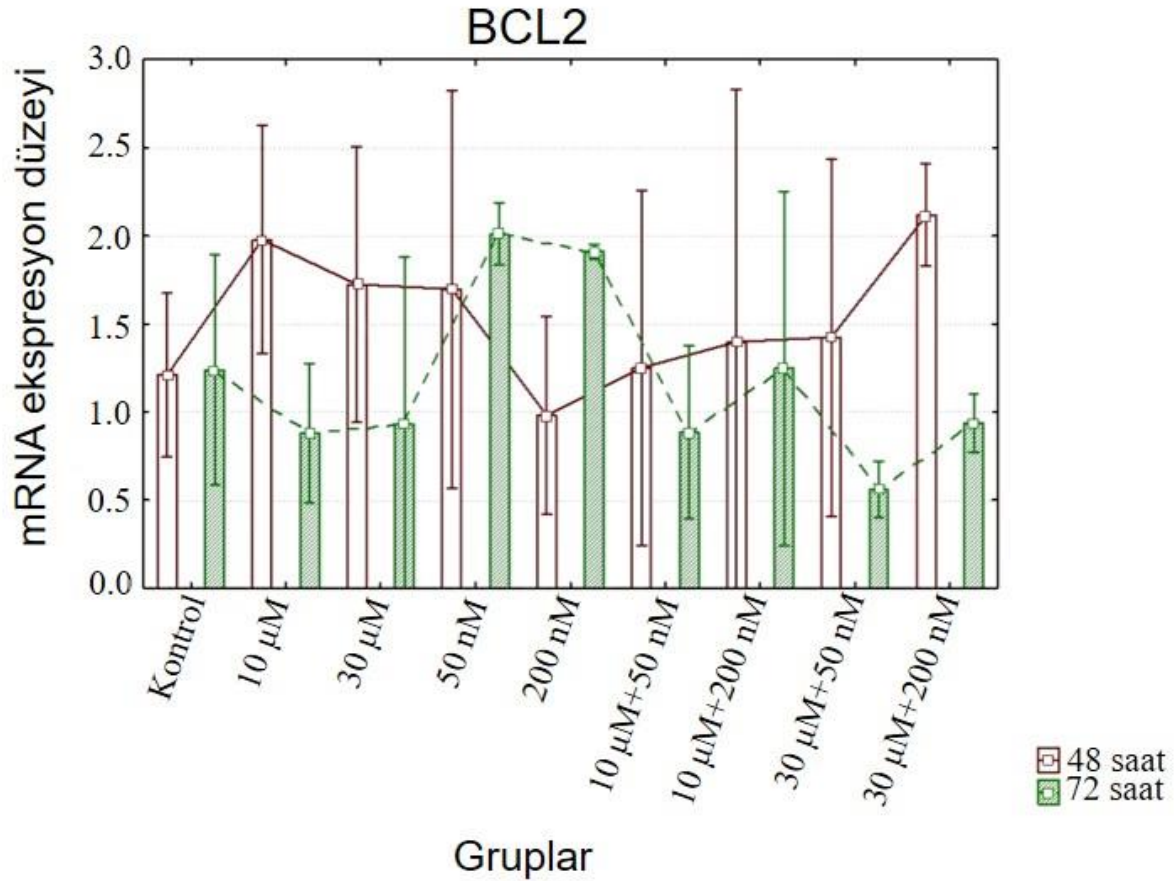
48. saatte; kontrol grubu hücreleri ile perifosin, D vitamini ve perifosin+D vitamini kombinasyonu uygulanmış hücreler karşılaştırıldığında, BCL2 mRNA ekspresyonunun anlamlı bir farklılık göstermediği saptandı (tüm karşılaştırmalarda  $p > 0,05$ ), (Tablo 4.1, Şekil 4.4). Ancak 30 µM+200 nM ( $2,11 \pm 0,11$ ) kombinasyon grubundaki BCL2 mRNA ekspresyon düzeyi 200 nM D vitamini ( $0,98 \pm 0,22$ ) grubundakine göre anlamlı olarak artmıştı ( $p < 0,05$ ), (Tablo 4.1, Şekil 4.4).

72. saatte; kontrol grubu ile perifosin, D vitamini ve perifosin+D vitamini kombinasyonu uygulanmış hücreler karşılaştırıldığında, BCL2 mRNA ekspresyonunun anlamlı bir farklılık göstermediği saptandı (tüm karşılaştırmalarda  $p>0,05$ ) (Tablo 4.1, Şekil 4.4). 10  $\mu\text{M}$  perifosin ( $0,88\pm0,16$ ), 30  $\mu\text{M}$  perifosin ( $0,93\pm0,38$ ), 10  $\mu\text{M}$ +50 nM ( $0,88\pm0,19$ ), 30  $\mu\text{M}$ +50 nM ( $0,55\pm0,06$ ) ve 30  $\mu\text{M}$ +200 nM ( $0,93\pm0,06$ ) kombinasyon gruplarında BCL2 mRNA ekspresyon düzeyi 50 nM D vitamini ( $2,01\pm0,07$ ) grubundaki ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak azalmıştı (tüm karşılaştırmalarda  $p<0,05$ ). 10  $\mu\text{M}$  perifosin ( $0,88\pm0,16$ ), 10  $\mu\text{M}$ +50 nM ( $0,88\pm0,19$ ) ve 30  $\mu\text{M}$ +50 nM ( $0,55\pm0,06$ ) kombinasyon gruplarında BCL2 mRNA ekspresyon düzeyi 200 nM D vitamini ( $1,91\pm0,01$ ) grubundaki ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak azaldığı görüldü (tüm karşılaştırmalarda  $p<0,05$ ), (Tablo 4.1, Şekil 4.4).

**Tablo 4.1.** HEC1A hücrelerinde BCL2 mRNA ekspresyon düzeyleri.

<b>Gruplar (n=4)</b>	<b>48. saat</b>	<b>72. saat</b>
Kontrol	1,21 $\pm$ 0,18	1,23 $\pm$ 0,26
10 $\mu\text{M}$	1,97 $\pm$ 0,26	0,88 $\pm$ 0,16 <sup>a, b</sup>
30 $\mu\text{M}$	1,72 $\pm$ 0,31	0,93 $\pm$ 0,38 <sup>a</sup>
50 nM	1,69 $\pm$ 0,45	2,01 $\pm$ 0,07
200 nM	0,98 $\pm$ 0,22	1,91 $\pm$ 0,01
10 $\mu\text{M}$ +50 nM	1,25 $\pm$ 0,40	0,88 $\pm$ 0,19 <sup>a, b</sup>
10 $\mu\text{M}$ +200 nM	1,39 $\pm$ 0,57	1,24 $\pm$ 0,40
30 $\mu\text{M}$ +50 nM	1,42 $\pm$ 0,40	0,55 $\pm$ 0,06 <sup>a, b</sup>
30 $\mu\text{M}$ +200 nM	2,11 $\pm$ 0,11 <sup>b</sup>	0,93 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>

Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. P için anlamlı değer  $<0,05$  olarak kabul edilmiştir. <sup>a</sup>50 nM D vitamini grubu ile karşılaştırıldığında  $p<0,05$ , <sup>b</sup>200 nM D vitamini grubu ile karşılaştırıldığında  $p<0,05$ .

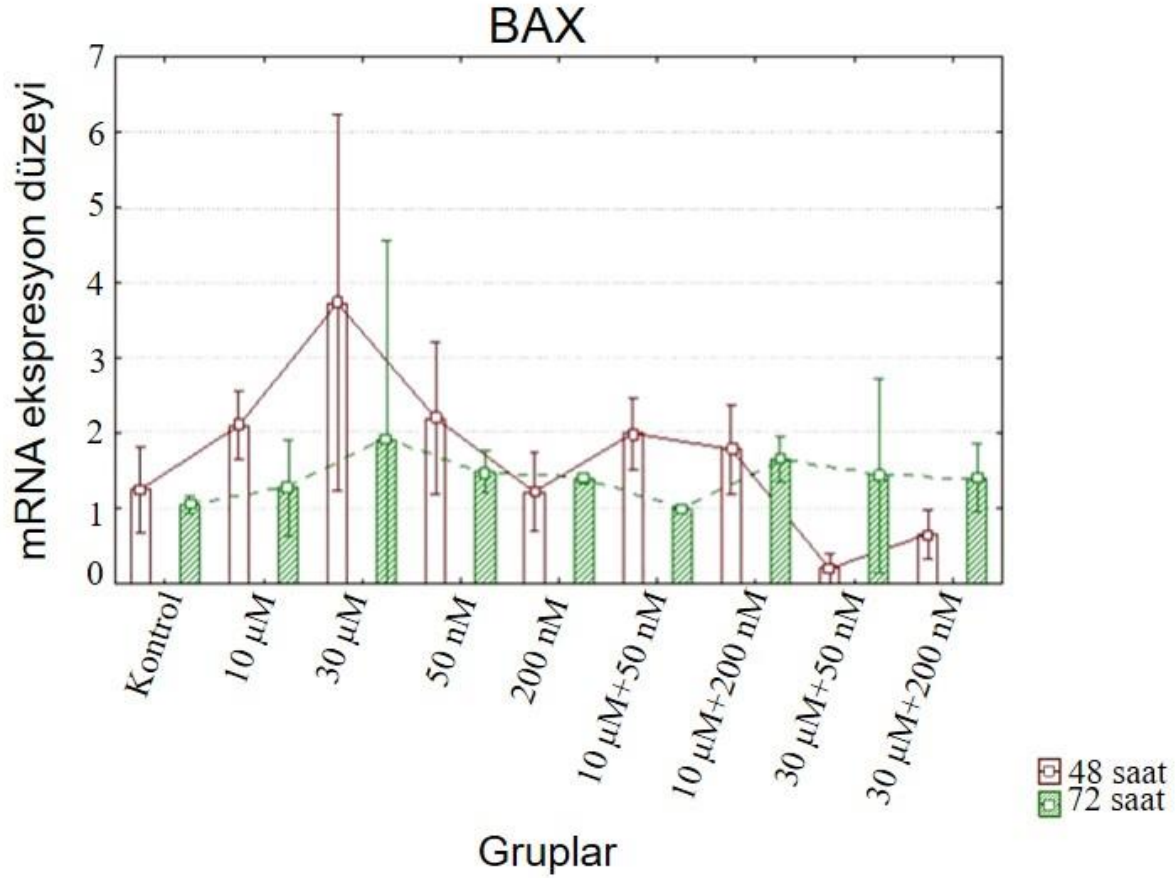


Şekil 4.4. HEC1A hücrelerinde BCL2 mRNA ekspresyon düzeylerinin bar grafiği.

#### 4.2.2. BAX mRNA Ekspresyon Düzeyi

48. saatte; perifosin, D vitamini ve perifosin+D vitamini kombinasyonu uygulanmış hücreler kontrol grubundaki hücrelerle karşılaştırıldığında, sadece 30 µM perifosin ( $3,73 \pm 1,0$ ) grubunda BAX mRNA ekspresyon düzeyinin kontrol grubundakine ( $1,24 \pm 0,23$ ) göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı saptandı (tüm karşılaştırmalarda  $p < 0,05$ ), (Tablo 4.2, Şekil 4.5). 30 µM+50 nM ( $0,19 \pm 0,08$ ) ve 30 µM+200 nM ( $0,65 \pm 0,13$ ) kombinasyon uygulanmış gruplarda BAX mRNA ekspresyon düzeyinin 10 µM perifosin ( $2,10 \pm 0,17$ ), 30 µM perifosin ( $3,73 \pm 1,0$ ) ve 50 nM D vitamini ( $2,19 \pm 0,40$ ) gruplarındakine göre anlamlı olarak azaldığı belirlendi (tüm karşılaştırmalarda  $p < 0,05$ ), (Tablo 4.2, Şekil 4.5).

72. saatte; kontrol grubu hücreleri ile perifosin, D vitamini ve perifosin+D vitamini kombinasyonu uygulanmış hücreler karşılaştırıldığında BAX mRNA ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak herhangi bir farklılık saptanmadı (tüm karşılaştırmalarda  $p > 0,05$ ) (Tablo 4.2, Şekil 4.5).



**Şekil 4.5.** HEC1A hücrelerinde BAX mRNA ekspresyon düzeylerinin bar grafiği.

**Tablo 4.2.** HEC1A hücrelerinde BAX mRNA ekspresyon düzeyleri.

Gruplar (n=4)	48. saat	72. saat
Kontrol	1,24±0,23	1,05±0,04
10 µM	2,10±0,17	1,27±0,26
30 µM	3,73±1,0 <sup>a</sup>	1,91±1,06
50 nM	2,19±0,40	1,48±0,11
200 nM	1,22±0,20	1,40±0,02
10 µM+50 nM	1,99±0,19	0,99±0,02
10 µM+200 nM	1,78±0,24	1,65±0,12
30 µM+50 nM	0,19±0,08 <sup>b, c, d</sup>	1,43±0,52
30 µM+200 nM	0,65±0,13 <sup>b, c, d</sup>	1,40±0,18

Veriler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir. P için anlamlı değer <0,05 olarak kabul edilmiştir. <sup>a</sup>Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında p<0,05, <sup>b</sup>10 µM perifosin grubu ile karşılaştırıldığında p<0,05, <sup>c</sup>30 µM perifosin grubu ile karşılaştırıldığında p<0,05, <sup>d</sup>50 nM D vitamini grubu ile karşılaştırıldığında p<0,05.

#### **4.2.3. P53 mRNA Ekspresyon Düzeyi**

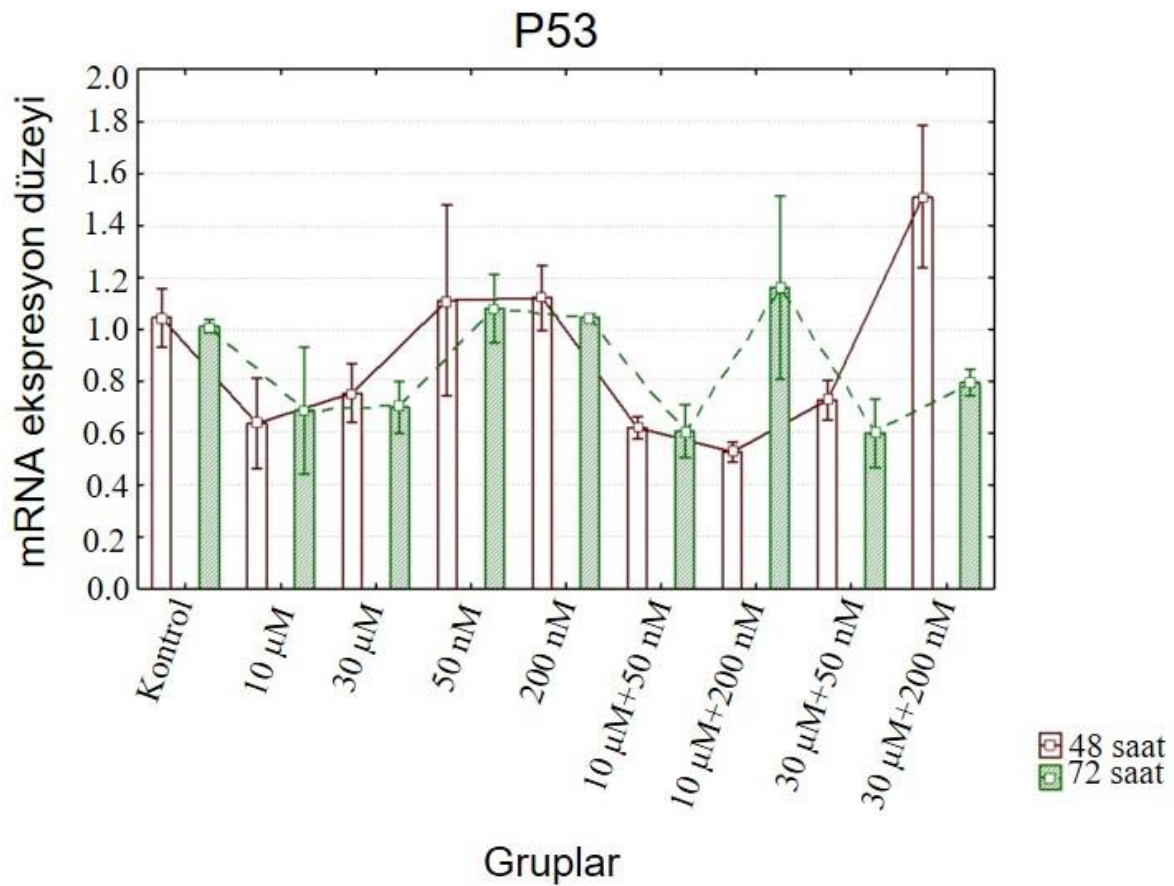
48. saatte; kontrol grubu ( $1,04 \pm 0,04$ ) ile karşılaştırıldığında  $10 \mu\text{M}$  perifosin ( $0,63 \pm 0,07$ ),  $30 \mu\text{M}$  perifosin ( $0,75 \pm 0,04$ ),  $10 \mu\text{M}+50 \text{ nM}$  ( $0,62 \pm 0,01$ ),  $10 \mu\text{M}+200 \text{ nM}$  ( $0,52 \pm 0,01$ ) ve  $30 \mu\text{M}+50 \text{ nM}$  ( $0,72 \pm 0,03$ ) kombinasyon gruplarında P53 mRNA ekspresyon düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalırken,  $30 \mu\text{M}+200 \text{ nM}$  ( $1,51 \pm 0,11$ ) kombinasyon grubunda P53 mRNA ekspresyon düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı saptandı (tüm karşılaştırmalarda  $p < 0,05$ ), (Tablo 4.3, Şekil 4.6).  $10 \mu\text{M}$  perifosin ( $0,63 \pm 0,07$ ) grubu ile karşılaştırıldığında  $50 \text{ nM}$  D vitamini ( $1,11 \pm 0,14$ ),  $200 \text{ nM}$  D vitamini ( $1,12 \pm 0,05$ ) ve  $30 \mu\text{M}+200 \text{ nM}$  ( $1,51 \pm 0,11$ ) kombinasyon gruplarında da P53 mRNA ekspresyon düzeylerinin anlamlı olarak arttığı belirlendi (tüm karşılaştırmalarda  $p < 0,05$ ), (Tablo 4.3, Şekil 4.6).  $30 \mu\text{M}$  perifosin ( $0,75 \pm 0,04$ ) grubu ile karşılaştırıldığında  $10 \mu\text{M}+200 \text{ nM}$  ( $0,52 \pm 0,01$ ) kombinasyon grubunda P53 mRNA ekspresyon düzeylerinin anlamlı olarak azalırken,  $50 \text{ nM}$  D vitamini ( $1,11 \pm 0,14$ ),  $200 \text{ nM}$  D vitamini ( $1,12 \pm 0,05$ ) ve  $30 \mu\text{M}+200 \text{ nM}$  ( $1,51 \pm 0,11$ ) kombinasyon gruplarında P53 mRNA ekspresyon düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı saptandı (tüm karşılaştırmalarda  $p < 0,05$ ), (Tablo 4.3, Şekil 4.6).  $50 \text{ nM}$  D vitamini ( $1,11 \pm 0,14$ ) ve  $200 \text{ nM}$  D vitamini ( $1,12 \pm 0,05$ ) grupları ile karşılaştırıldığında  $10 \mu\text{M}+50 \text{ nM}$  ( $0,62 \pm 0,01$ ),  $10 \mu\text{M}+200 \text{ nM}$  ( $0,52 \pm 0,01$ ) ve  $30 \mu\text{M}+50 \text{ nM}$  ( $0,72 \pm 0,03$ ) kombinasyon gruplarında P53 mRNA ekspresyon düzeyinin anlamlı olarak azaldığı,  $30 \mu\text{M}+200 \text{ nM}$  ( $1,51 \pm 0,11$ ) kombinasyon grubunda ise anlamlı olarak arttığı belirlendi (tüm karşılaştırmalarda  $p < 0,05$ ), (Tablo 4.3, Şekil 4.6).

72. saatte; kontrol grubu ( $1,01 \pm 0,01$ ) ile karşılaştırıldığında  $10 \mu\text{M}$  perifosin ( $0,68 \pm 0,09$ ),  $30 \mu\text{M}$  perifosin ( $0,70 \pm 0,04$ ),  $10 \mu\text{M}+50 \text{ nM}$  ( $0,60 \pm 0,04$ ),  $30 \mu\text{M}+50 \text{ nM}$  ( $0,60 \pm 0,05$ ) ve  $30 \mu\text{M}+200 \text{ nM}$  ( $0,79 \pm 0,02$ ) kombinasyon gruplarında P53 mRNA ekspresyon düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı saptandı (tüm karşılaştırmalarda  $p < 0,05$ ), (Tablo 4.3, Şekil 4.6).  $10 \mu\text{M}$  perifosin ( $0,68 \pm 0,09$ ) ve  $30 \mu\text{M}$  perifosin ( $0,70 \pm 0,04$ ) grupları ile karşılaştırıldığında  $50 \text{ nM}$  D vitamini ( $1,08 \pm 0,05$ ),  $200 \text{ nM}$  D vitamini ( $1,04 \pm 0,00$ ) ve  $10 \mu\text{M}+200 \text{ nM}$  ( $1,16 \pm 0,14$ ) kombinasyon gruplarında P53 mRNA ekspresyon düzeyinin istatistiksel olarak arttığı belirlendi (tüm karşılaştırmalarda  $p < 0,05$ ), (Tablo 4.3, Şekil 4.6).  $50 \text{ nM}$  D vitamini ( $1,08 \pm 0,05$ ) ve  $200 \text{ nM}$  D vitamini ( $1,04 \pm 0,00$ ) grupları ile karşılaştırıldığında  $10 \mu\text{M}+50 \text{ nM}$  ( $0,60 \pm 0,04$ ),  $30 \mu\text{M}+50 \text{ nM}$  ( $0,60 \pm 0,05$ ) ve  $30 \mu\text{M}+200 \text{ nM}$  ( $0,79 \pm 0,02$ ) kombinasyon gruplarında P53 mRNA ekspresyon düzeyinin anlamlı olarak azaldığı görüldü (tüm karşılaştırmalarda  $p < 0,05$ ) (Tablo 4.3, Şekil 4.6).

**Tablo 4.3.** HEC1A hücrelerinde P53 mRNA ekspresyon düzeyleri.

Gruplar (n=4)	48. saat	72. saat
Kontrol	1,04±0,04	1,01±0,01
10 µM	0,63±0,07 <sup>a</sup>	0,68±0,09 <sup>a</sup>
30 µM	0,75±0,04 <sup>a</sup>	0,70±0,04 <sup>a</sup>
50 nM	1,11±0,14 <sup>b, c</sup>	1,08±0,05 <sup>b, c</sup>
200 nM	1,12±0,05 <sup>b, c</sup>	1,04±0,00 <sup>b, c</sup>
10 µM+50 nM	0,62±0,01 <sup>a, d, e</sup>	0,60±0,04 <sup>a, d, e</sup>
10 µM+200 nM	0,52±0,01 <sup>a, c, d, e</sup>	1,16±0,14 <sup>b, c</sup>
30 µM+50 nM	0,72±0,03 <sup>a, d, e</sup>	0,60±0,05 <sup>a, d, e</sup>
30 µM+200 nM	1,51±0,11 <sup>a, b, c, d, e</sup>	0,79±0,02 <sup>a, d, e</sup>

Veriler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir. P için anlamlı değer <0,05 olarak kabul edilmiştir. <sup>a</sup>Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında p<0,05, <sup>b</sup>10 µM perifosin grubu ile karşılaştırıldığında p<0,05, <sup>c</sup>30 µM perifosin grubu ile karşılaştırıldığında p<0,05, <sup>d</sup>50 nM D vitamini grubu ile karşılaştırıldığında p<0,05, <sup>e</sup>200 nM D vitamini grubu ile karşılaştırıldığında p<0,05.



**Şekil 4.6.** HEC1A hücrelerinde P53 mRNA ekspresyon düzeylerinin bar grafiği.



### **4.3. Akım Sitometri ile Apoptoz Analiz Sonuçları**

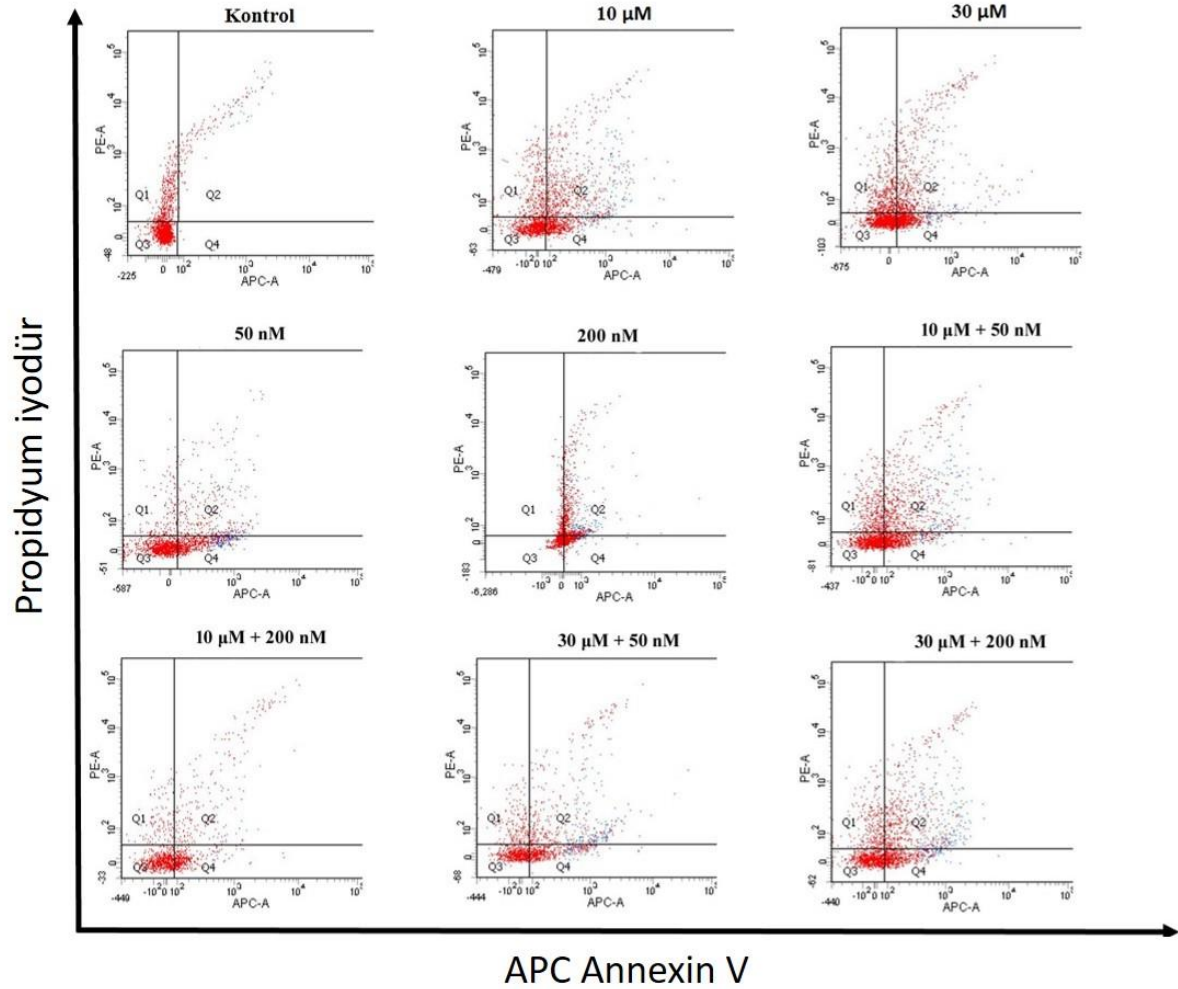
Perifosin (10 µM ve 30 µM), D vitamini (50 nM ve 200 nM) ve perifosin+D vitamini kombinasyonlarının (10 µM+50 nM, 10 µM+200 nM, 30 µM+50 nM ve 30 µM+200 nM) HEC1A hücrelerine uygulanmasından 48 ve 72 saat sonra, hücrelerin canlılık, erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz oranları akım sitometri ile değerlendirildi (Şekil 4.7 ve 4.9).

48. saatte ortalama canlı hücre yüzdesi; tüm perifosin, D vitamini ve perifosin+D vitamini kombinasyonu uygulanmış gruplarda kontrol grubundakine göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştı (tüm karşılaştırmalarda  $p<0,05$ ), (Tablo 4.4, Şekil 4.7 ve 4.8). Perifosin, D vitamini ve perifosin+D vitamini kombinasyon grupları birbirleriyle karşılaştırıldığında, sadece 10 µM+200 nM (%73,47±%5,57) kombinasyon grubunun ortalama canlı hücre yüzdesinin 10 µM perifosin (%65,95±%3,17) grubundakine göre anlamlı olarak arttığı görüldü ( $p<0,05$ ), (Tablo 4.4, Şekil 4.7 ve 4.8).

48. saatte ortalama erken apoptotik hücre yüzdesi; tüm perifosin, D vitamini ve perifosin+D vitamini kombinasyonu uygulanmış gruplarda kontrol grubundakine göre anlamlı olarak artmıştı (tüm karşılaştırmalarda  $p<0,05$ ), (Tablo 4.4, Şekil 4.7 ve 4.8).

48. saatte ortalama geç apoptotik hücre yüzdesi; 10 µM perifosin (%8,30±%2,27) ve 10 µM+50 nM (%8,32±%1,90) kombinasyon uygulanmış gruplarda kontrol grubundakine (%1,32±%0,79) göre anlamlı olarak artmıştı (tüm karşılaştırmalarda  $p<0,05$ ), (Tablo 4.4, Şekil 4.7 ve 4.8).

48. saatte ortalama nekrotik hücre yüzdesi; 10 µM perifosin (%3,20±%0,40), 30 µM perifosin (%5,05±%2,67), 10 µM+50 nM (%3,97±%0,37), 30 µM+200 nM (%4,17±%1,49) kombinasyon uygulanmış gruplarda kontrol grubundakine (%0,32±%0,38) göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştı (tüm karşılaştırmalarda  $p<0,05$ ), (Tablo 4.4, Şekil 4.7 ve 4.8). Perifosin, D vitamini ve perifosin+D vitamini kombinasyon grupları birbirleriyle karşılaştırıldığında; 50 nM D vitamini (1,47±0,37), 200 nM D vitamini (2,12±0,39) ve 10 µM+200 nM (1,42±0,35) kombinasyon gruplarında ortalama nekrotik hücre yüzdesi, 30 µM (5,05±2,67) perifosin grubundakine göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştı (tüm karşılaştırmalarda  $p<0,05$ ), (Tablo 4.4, Şekil 4.7 ve 4.8).

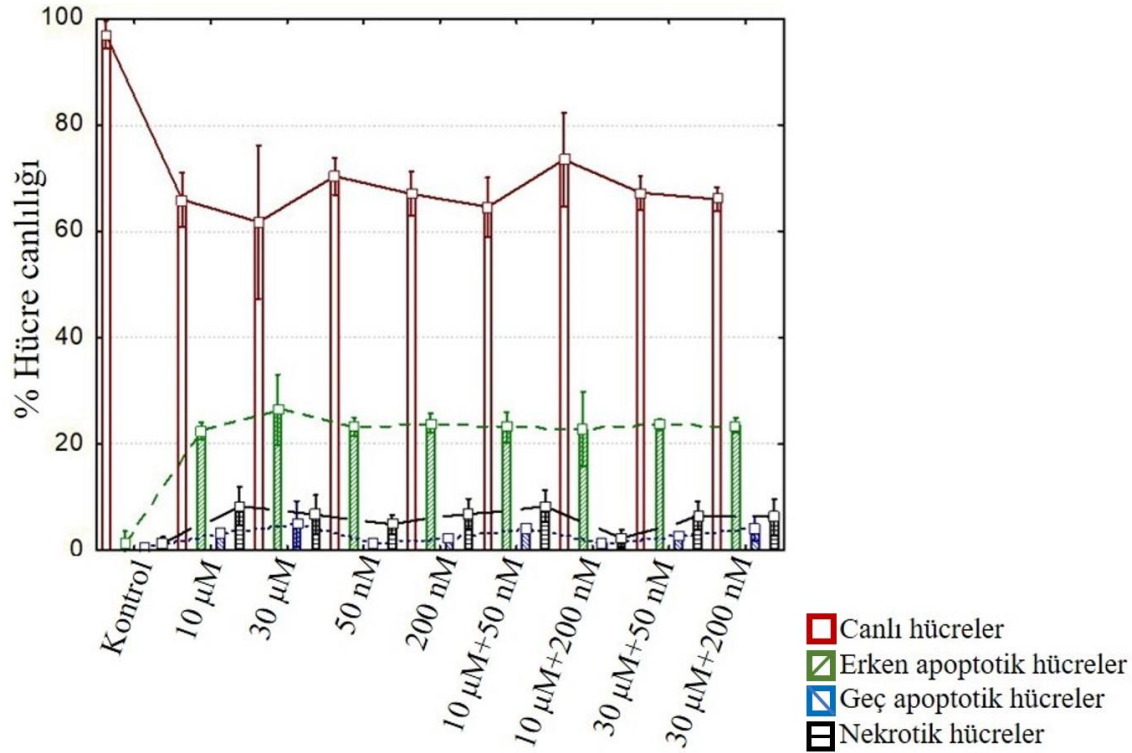


**Şekil 4.7.** Akım sitometrik analiz ile HEC1A hücrelerinde 48. saatteki canlı (Q3), erken apoptotik (Q4), geç apoptotik (Q2) ve nekrotik (Q1) hücrelerin kadran istatistiği grafiği.

**Tablo 4.4.** HEC1A hücrelerinde 48. saatteki canlı, erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik hücre ortalamaları.

Gruplar (n=4)	Canlı hücreler	Erken apoptotik hücreler	Geç apoptotik hücreler	Nekrotik hücreler
Kontrol	96,97±1,63	1,37±1,42	1,32±0,79	0,32±0,38
10 µM	65,95±3,17 <sup>a</sup>	22,52±1,02 <sup>a</sup>	8,30±2,27 <sup>a</sup>	3,20±0,40 <sup>a</sup>
30 µM	61,75±9,07 <sup>a</sup>	26,47±4,16 <sup>a</sup>	6,72±2,35	5,05±2,67 <sup>a</sup>
50 nM	70,35±2,19 <sup>a</sup>	23,25±1,12 <sup>a</sup>	4,92±1,13	1,47±0,37 <sup>c</sup>
200 nM	67,02±2,58 <sup>a</sup>	24,00±1,11 <sup>a</sup>	6,87±1,75	2,12±0,39 <sup>c</sup>
10 µM+50 nM	64,57±3,51 <sup>a</sup>	23,12±1,82 <sup>a</sup>	8,32±1,90 <sup>a</sup>	3,97±0,37 <sup>a</sup>
10 µM+200 nM	73,47±5,57 <sup>a, b</sup>	22,80±4,43 <sup>a</sup>	2,32±0,98	1,42±0,35 <sup>c</sup>
30 µM+50 nM	67,25±1,97 <sup>a</sup>	23,62±0,62 <sup>a</sup>	6,55±1,63	2,57±0,42
30 µM+200 nM	66,02±1,46 <sup>a</sup>	23,52±0,89 <sup>a</sup>	6,30±2,13	4,17±1,49 <sup>a</sup>

Veriler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir. P için anlamlı değer <0,05 olarak kabul edilmiştir. <sup>a</sup>Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında p<0,05, <sup>b</sup>10 µM perifosin grubu ile karşılaştırıldığında p<0,05, <sup>c</sup>30 µM perifosin grubu ile karşılaştırıldığında p<0,05.



**Şekil 4.8.** Akım sitometrik analiz ile HEC1A hücrelerinde 48. saatteki canlı, erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik hücre ortalamalarının bar grafiği. Perifosin (10 µM, 30 µM), D vitamini (50 nM, 200 nM) ve her ikisinin kombinasyonları (10 µM+50 nM, 10 µM+200 nM, 30 µM+50 nM ve 30 µM+200 nM) ile inkübe edilen HEC1A hücrelerinin APC Anneksin V/PI boyanma analizi.

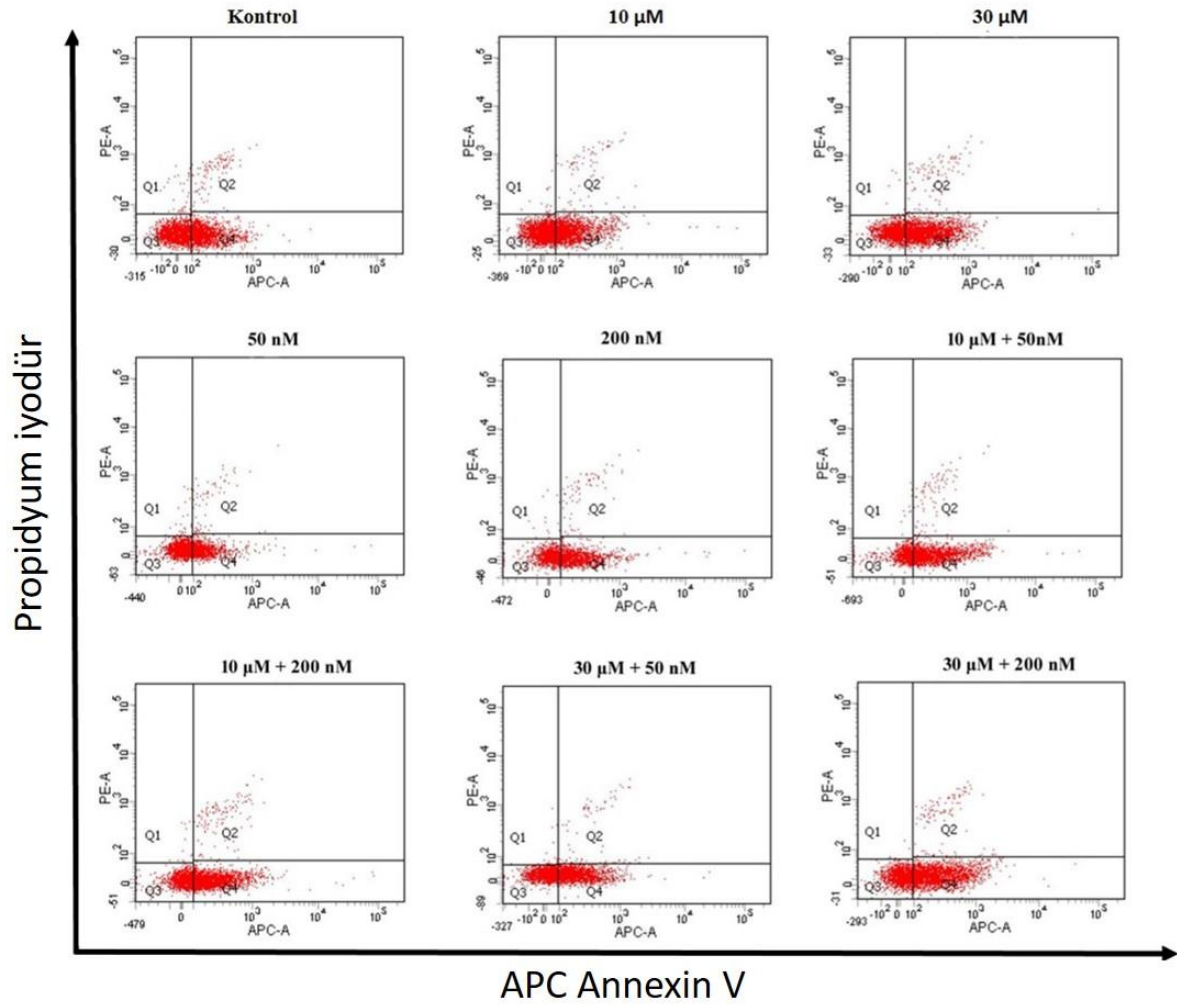
72. saatte ortalama canlı hücre yüzdesi; tüm perifosin, D vitamini ve perifosin+D vitamini kombinasyonu uygulanmış gruplarda kontrol grubundakine göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştı (tüm karşılaştırmalarda  $p < 0,05$ ), (Tablo 4.5, Şekil 4.9 ve 4.10). Perifosin, D vitamini ve perifosin+D vitamini kombinasyon grupları birbirleriyle karşılaştırıldığında; 10 µM+50 nM (%39,10±%1,58) kombinasyon grubunda ortalama canlı hücre yüzdesi 10 µM perifosin (%55,35±%3,96), 30 µM perifosin (%54,25±%10,53), 50 nM D vitamini (%54,82±%10,67) gruplarındakine göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştı (tüm karşılaştırmalarda  $p < 0,05$ ), (Tablo 4.5, Şekil 4.9 ve 4.10).

72. saatte ortalama erken apoptotik hücre yüzdesi; tüm perifosin, D vitamini ve perifosin+D vitamini kombinasyonu uygulanmış gruplarda kontrol grubundakine göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştı (tüm karşılaştırmalarda  $p < 0,05$ ), (Tablo 4.5, Şekil 4.9 ve 4.10). Perifosin, D vitamini ve perifosin+D vitamini kombinasyon grupları birbirleriyle karşılaştırıldığında; 10 µM+50 nM (%51,12±%3,43) kombinasyon grubunda ortalama erken apoptotik hücre yüzdesi 10 µM perifosin (%36,45±%3,23), 30 µM perifosin (%37,40±%8,89) gruplarındakine göre anlamlı olarak artmıştı (tüm karşılaştırmalarda  $p < 0,05$ ). 10 µM+50 nM (%51,12±%3,43), 10 µM+200 nM (%44,87±%4,60), 30 µM+50 nM (%37,40±%2,46) ve 30 µM+200 nM (%44,27±%4,97) kombinasyon gruplarının ortalama erken apoptotik hücre yüzdesi

50 nM D vitamini (%26,26±%4,78) grubundakine göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştı (tüm karşılaştırmalarda  $p<0,05$ ). 10  $\mu$ M+50 nM (%51,12±%3,43), 10  $\mu$ M+200 nM (%44,87±%4,60) ve 30  $\mu$ M+200 nM (%44,27±%4,97) kombinasyon gruplarında ortalama erken apoptotik hücre yüzdesi 200 nM D vitamini (%34,77±%2,57) grubundakine göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştı (tüm karşılaştırmalarda  $p<0,05$ ), (Tablo 4.5, Şekil 4.9 ve 4.10).

72. saatte ortalama geç apoptotik hücre yüzdesi; 50 nM D vitamini (%17,02±%7,35) ve 200 nM D vitamini (%15,72±%1,47) uygulanmış gruplarda kontrol grubundakine (%2,72±%1,33) göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştı (tüm karşılaştırmalarda  $p<0,05$ ), (Tablo 4.5, Şekil 4.9 ve 4.10). Perifosin, D vitamini ve perifosin+D vitamini kombinasyon grupları birbirleriyle karşılaştırıldığında; 30  $\mu$ M+200 nM (%4,77±%2,72) kombinasyon grubunda ortalama geç apoptotik hücre yüzdesi 50 nM D vitamini (%17,02±%7,35) ve 200 nM D vitamini (%15,72±%1,47) gruplarındakine göre anlamlı olarak azalmıştı (tüm karşılaştırmalarda  $p<0,05$ ), (Tablo 4.5, Şekil 4.9 ve 4.10).

72. saatte ortalama nekrotik hücre yüzdesi; 30  $\mu$ M+200 nM (%3,92±%3,01) kombinasyon grubunda kontrol grubu (%0,97±%0,44), 30  $\mu$ M perifosin (%1,05±%0,23), 200 nM D vitamini (%1,10±%0,21) gruplarındakine göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştı (tüm karşılaştırmalarda  $p<0,05$ ) (Tablo 4.5, Şekil 4.9 ve 4.10).

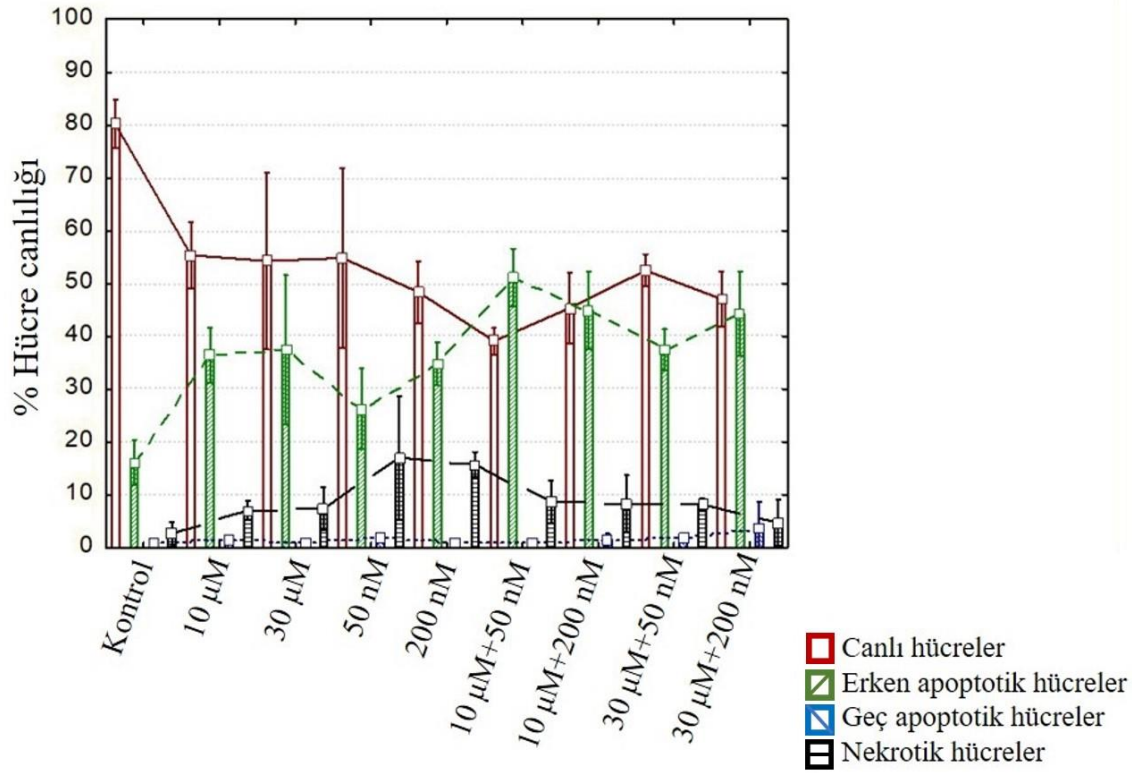


**Şekil 4.9.** Akım sitometrik analiz ile HEC1A hücrelerinde 72. saatteki canlı (Q3), erken apoptotik (Q4), geç apoptotik (Q2) ve nekrotik (Q1) hücrelerin kadran istatistiği grafiği.

**Tablo 4.5.** HEC1A hücrelerinde 72. saatteki canlı, erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik hücre ortalamaları.

Gruplar (n=4)	Canlı hücreler	Erken apoptotik hücreler	Geç apoptotik hücreler	Nekrotik hücreler
Kontrol	80,17±2,86	16,12±2,67	2,72±1,33	0,97±0,44
10 µM	55,35±3,96 <sup>a</sup>	36,45±3,23 <sup>a</sup>	7,00±1,16	1,25±0,17
30 µM	54,25±10,53 <sup>a</sup>	37,40±8,89 <sup>a</sup>	7,32±2,56	1,05±0,23
50 nM	54,82±10,67 <sup>a</sup>	26,26±4,78 <sup>a</sup>	17,02±7,35 <sup>a</sup>	1,80±0,52
200 nM	48,37±3,66 <sup>a</sup>	34,77±2,57 <sup>a</sup>	15,72±1,47 <sup>a</sup>	1,10±0,21
10 µM+50 nM	39,10±1,58 <sup>a, b, c, d</sup>	51,12±3,43 <sup>a, b, c, d, e</sup>	8,70±2,55	1,02±0,15
10 µM+200 nM	45,35±4,25 <sup>a</sup>	44,87±4,60 <sup>a, d, e</sup>	8,30±3,37	1,52±0,68
30 µM+50 nM	52,45±1,91 <sup>a</sup>	37,40±2,46 <sup>a, d</sup>	8,12±0,67	2,02±0,30
30 µM+200 nM	47,05±3,29 <sup>a</sup>	44,27±4,97 <sup>a, d, e</sup>	4,77±2,72 <sup>d, e</sup>	3,92±3,01 <sup>a, c, e</sup>

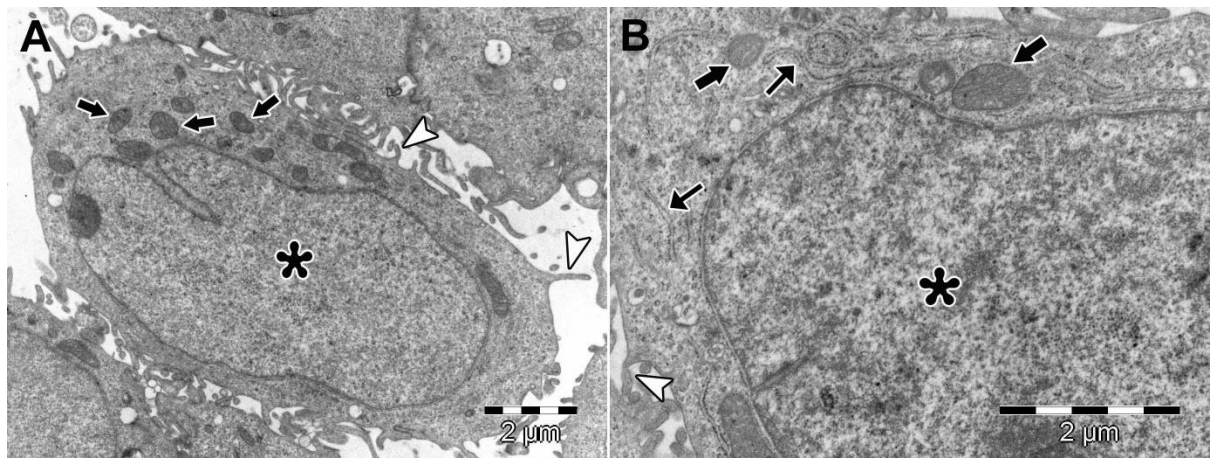
Veriler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir. P için anlamlı değer <0,05 olarak kabul edilmiştir. <sup>a</sup>Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında p<0,05, <sup>b</sup>10 µM perifosin grubu ile karşılaştırıldığında p<0,05, <sup>c</sup>30 µM perifosin grubu ile karşılaştırıldığında p<0,05, <sup>d</sup>50 nM D vitamini grubu ile karşılaştırıldığında p<0,05, <sup>e</sup>200 nM D vitamini grubu ile karşılaştırıldığında p<0,05.



**Şekil 4.10.** Akım sitometrik analiz ile HEC1A hücrelerinde 72. saatteki canlı, erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik hücre ortalamalarının bar grafiği. Perifosin (10 µM, 30 µM), D vitamini (50 nM, 200 nM) ve her ikisinin kombinasyonları (10 µM+50 nM, 10 µM+200 nM, 30 µM+50 nM ve 30 µM+200 nM) ile inkübe edilen HEC1A hücrelerinin APC Anneksin V/PI boyanma analizi.

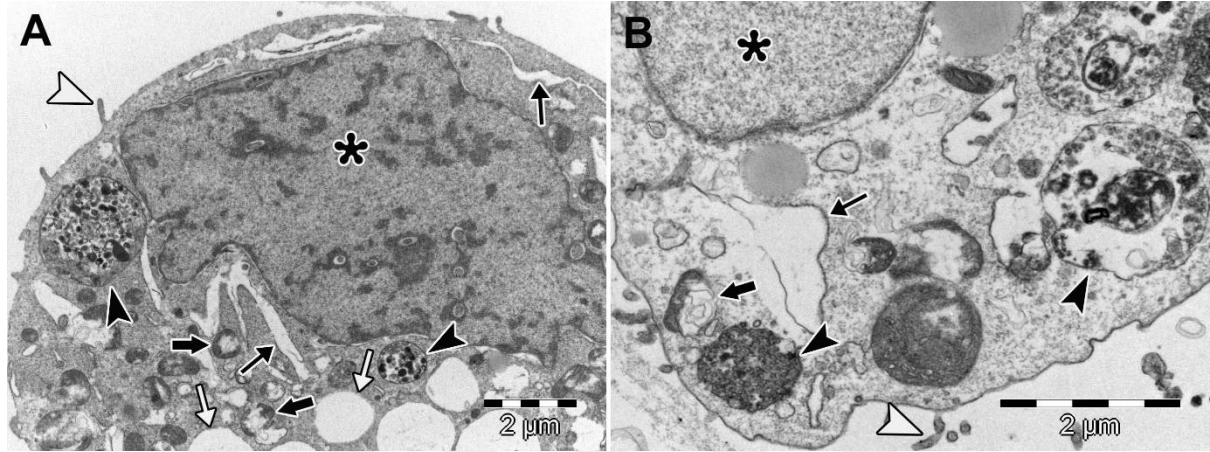
#### 4.4. Elektron Mikroskopik İncelemeler

Kontrol grubu HEC1A hücrelerinde, hücre membranının, sitoplazmik organellerin ve nükleusun normal ultrastrüktürel yapıda olduğu görüldü (Şekil 4.11).



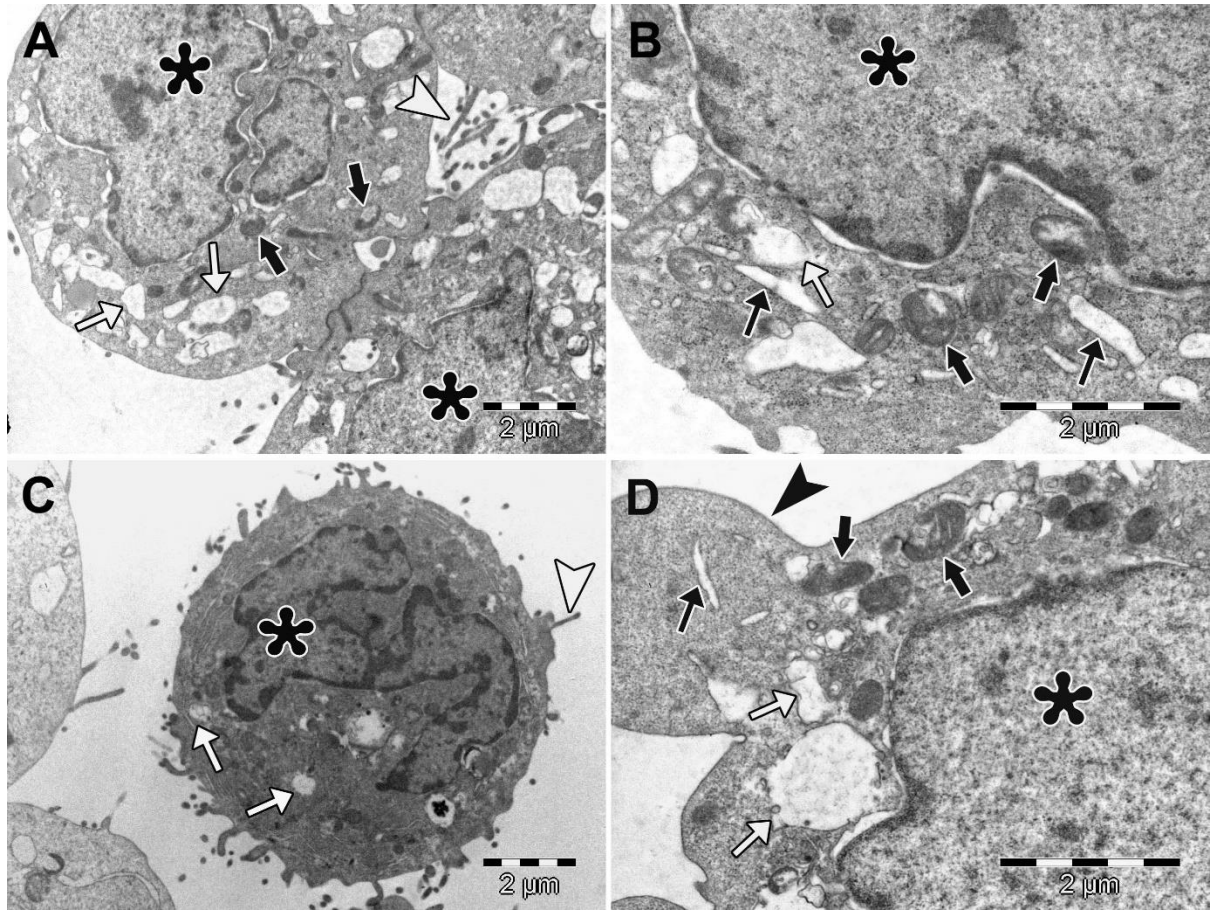
**Şekil 4.11.** Kontrol grubu HEC1A hücrelerinin normal ultrastrüktürel görüntüsü. Nükleus (asteriskler), mitokondriyonlar (kalın oklar), ER sisternaları (ince oklar), mikrovilluslar (beyaz ok başları). (A) X10000, (B) X20000. (uranyl asetat-kurşun sitrat).

10  $\mu$ M ve 30  $\mu$ M perifosin uygulanan HEC1A hücrelerinde, farklı büyüklüklerde otofajik vakuoller ve boş vakuoller, genişlemiş ER sisternaları ve dejenere olmuş mitokondriyonlar ile karakterize otofajik hücre ölümü bulguları gözlemlendi (Şekil 4.12).



**Şekil 4.12.** Perifosin gruplarında HEC1A hücrelerinin ultrastrüktürel görüntüsü. A, B) Farklı büyüklüklerde otofajik vakuoller, genişlemiş ER sisternaları ve dejenere olmuş mitokondriyonlar ile karakterize otofajik hücreler. Nükleus (asteriskler), dejenere olmuş mitokondriyonlar (kalın oklar), genişlemiş ER sisternaları (siyah oklar), otofajik vakuoller (siyah ok başları), boş vakuoller (beyaz oklar), mikrovilluslar (beyaz ok başları). (A) X10000, (B) X20000 (uranil asetat-kurşun sitrat).

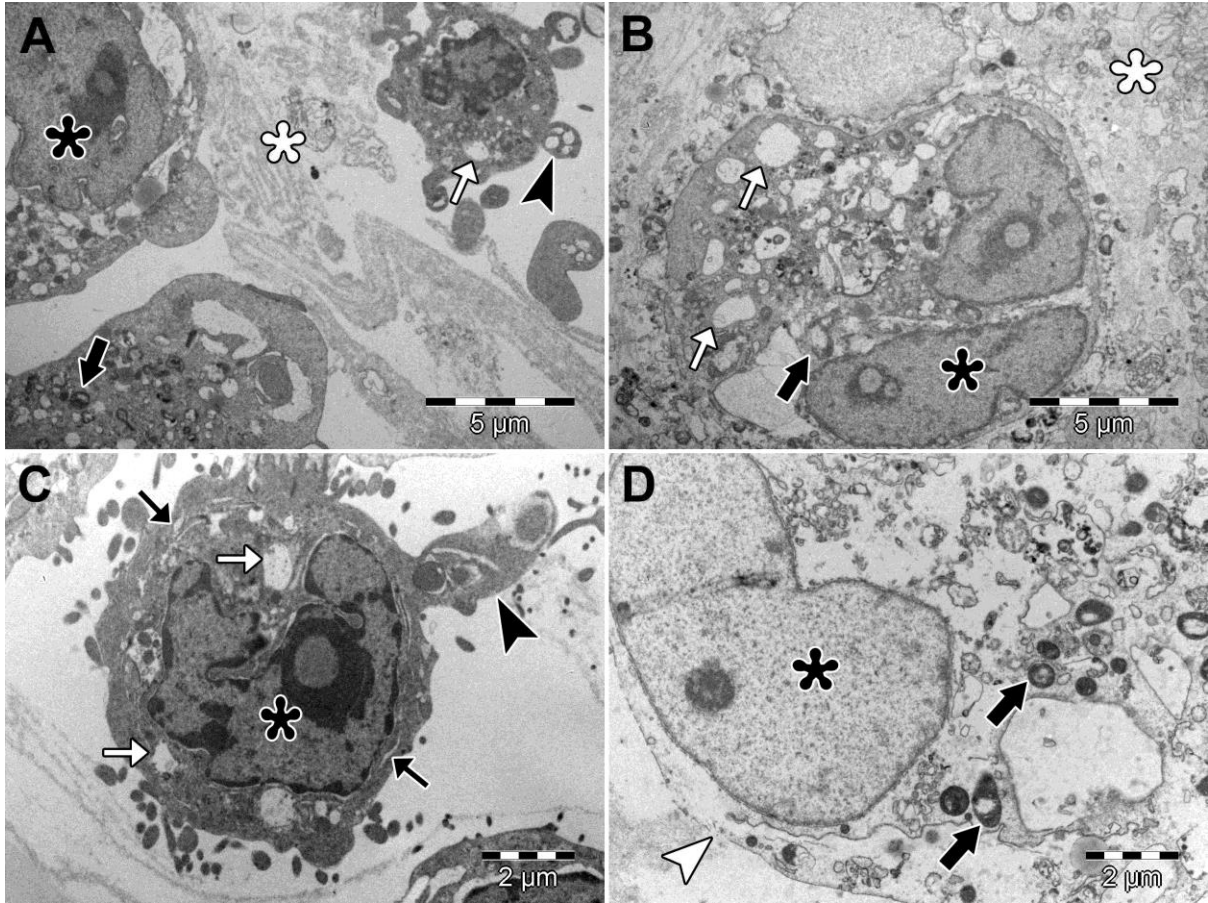
50 nM ve 200 nM D vitamini uygulanan HEC1A hücrelerinde, genişlemiş ve füzyona uğramış ER sisternaları, dejenere olmuş mitokondriyonlar, perinükleer alanda genişlemeler ile karakterize paraptosis benzeri hücre ölümü bulguları saptandı (Şekil 4.13A ve B). Bu gruplarda ayrıca kromatin marjinasyonu ve plazma membranında blebler ile karakterize apoptotik hücreler ve bunların arasında fragmente nükleer materyal içeren hücre parçacıkları da görüldü (Şekil 4.13C ve 4.13D).



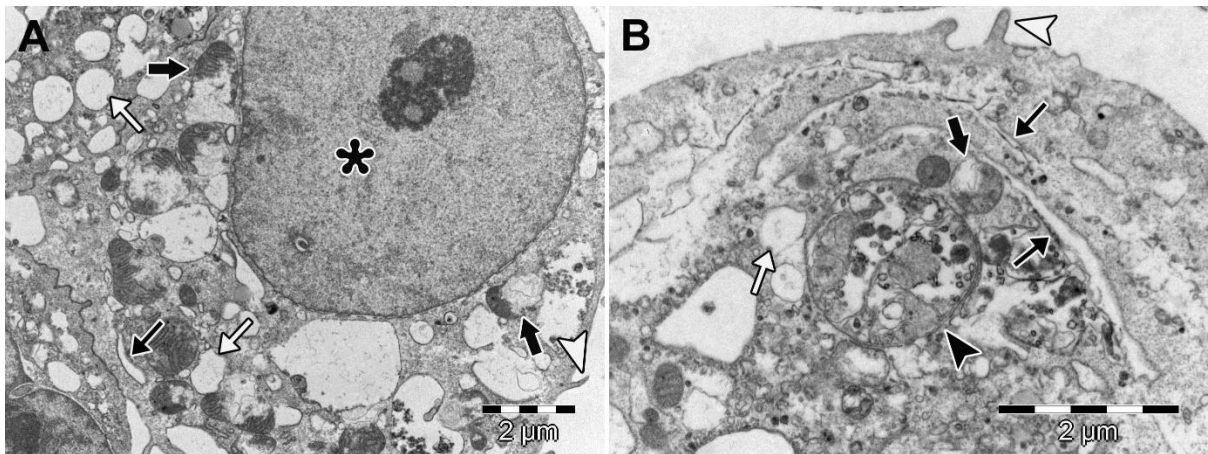
**Şekil 4.13.** D vitamini gruplarında HEC1A hücrelerinin ultrastrüktürel görüntüsü. A, B) Sitoplazmik vakuolizasyon, mitokondriyonlarda ve ER sisternalarında şişme ile karakterize paraptotik hücreler. C, D) Kromatin marjinasyonu ve plazma membranında blebler ile karakterize apoptotik hücreler. Nükleus (asteriskler), dejenere olmuş mitokondriyonlar (kalın oklar), genişlemiş ER sisternaları (siyah oklar), boş vakuoller (beyaz oklar), mikrovilluslar (beyaz ok başları), plazma membranında bleb (siyah ok başı). (A, C) X10000, (B, D) X20000 (uranil asetat-kurşun sitrat).

Perifosin+D vitamini kombinasyonunun uygulandığı gruplarda, çok sayıda apoptotik ve nekrotik hücre görülürken bu hücreler arasında dejenere olmuş hücre parçacıklarının da çok sayıda olduğu saptandı (Şekil 4.14). Bazı hücrelerde ER sisternalarının genişlediği, mitokondriyonların dejenere olduğu saptanırken, bazı hücrelerde de bunlara ek olarak farklı büyüklüklerde otofajik vakuollerin olduğu görüldü (Şekil 4.15).





**Şekil 4.14.** Perifosin+D vitamini kombinasyon gruplarında HEC1A hücrelerinin ultrastrüktürel görüntüsü. A, B) Apoptotik ve nekrotik hücreler arasında dejenere olmuş hücre parçacıkları. C) Apoptotik hücre. D) Nekrotik hücre. Nükleus (siyah asteriskler), dejenere olmuş hücre parçacıkları (beyaz asteriskler), dejenere olmuş mitokondriyonlar (kalın oklar), genişlemiş ER sisternaları (siyah oklar), boş vakuoller (beyaz oklar), plazma membranında blebler (siyah ok başları), dejenere olmuş plazma membranı (beyaz ok başı). (A, B) X6000, (C, D) X10000 (uranil asetat-kurşun sitrat).



**Şekil 4.15.** Perifosin+D vitamini kombinasyon gruplarında HEC1A hücrelerinin ultrastrüktürel görüntüsü. A) Paraptotik hücre. B) Otofajik hücre. Nükleus (asterisk), dejenere olmuş mitokondriyonlar (kalın oklar), genişlemiş ER sisternaları (siyah oklar), otofajik vakuol (siyah ok başı), boş vakuoller (beyaz oklar), mikrovilluslar (beyaz ok başları). (A) X10000, (B) X20000 (uranil asetat-kurşun sitrat).

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Endometriyum kanseri kadınlarda görülen kanserlerin %4-6'sını oluşturmaktadır [168]. İlerlemiş veya tekrarlayan endometriyum kanseri tedavisi hala önemli bir problem olmaya devam etmektedir, bu nedenle tedaviye yönelik yapılan birçok çalışmada farklı ilaçların tedavi edici etkileri araştırılmaktadır. Farklı kanser tiplerinde perifosin ve D vitamini kullanımının tedavi edici etkinliği gösterilse de, bu ilaçların yüksek dozlarda kullanımına bağlı olarak çeşitli yan etkilerin ortaya çıkması her iki ilacın klinik kullanımlarını sınırlayabilmektedir. Bu nedenle, araştırmacılar her iki ilacın düşük dozlarda kullanılabilmesi kombinasyon alternatiflerinin, tedavinin etkinliğini arttırabileceğini ve doza bağlı yan etkileri sınırlandırabileceğini ileri sürmüşlerdir [169]. Yapılan çalışmalarda perifosin ve D vitamininin farklı kanser hücreleri üzerinde anti-proliferatif etkiler gösterdiği ortaya konulmuştur, ancak her iki ilacın birlikte kullanımının endometriyum kanseri üzerindeki etkileri bilinmemektedir [14, 25, 94, 170]. Bu nedenle, bu çalışmada perifosin, D vitamini (kalsitriol) ve perifosin+D vitamini kombinasyonunun uygulanacağı endometriyum kanseri hücre hattındaki (HEC1A) olası anti-proliferatif ve apoptotik değişikliklerin incelenmesi amaçlandı.

Perifosin, anti-kanser aktivitesi gösteren bir APL'dir [25]. Diğer APL'ler gibi perifosinin hücre membranı sentezi ve fonksiyonunu değiştirerek büyümeyi durdurduğu ve apoptozu uyardığı bildirilmiştir [27]. Perifosinin anti-kanser aktivitesinin, JNK aktivasyonunu indüklemesi, AKT ve MAPK aktivasyonunu inhibe etmesi gibi mekanizmalar ile ilişkilendirilmesine rağmen tam olarak hangi mekanizma ile anti-kanser etki gösterdiği açıklanamamıştır [24, 108, 171]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, perifosinin AKT fosforilasyonunu azaltarak, AKT aktivitesinde inhibisyona neden olduğu ve AKT'nin plazma membranına translokasyonunu azalttığı gösterilirken, buna bağlı olarak da perifosinin AKT inhibisyonu ile anti-kanser aktivite gösterdiği raporlanmıştır [24, 25, 171]. AKT hücre büyümesi, hücre siklusunun ilerlemesi, hücre göçü, epitelyal-mezenkimal geçiş ve anjiyogenez gibi kanserle ilişkili hücresel süreçlerin düzenlenmesinde anahtar rol oynamaktadır [94]. Bu nedenle, günümüzde AKT inhibitörleri kanser tedavisi için umut verici bir ilaç haline gelmiştir. Farklı kanser tiplerinde yapılan çalışmalarda, 1-50 µM doz aralığında perifosinin anti-kanser aktivitesi olduğu gösterilmiştir [25, 94]. Elrod ve ark.'nın yapmış olduğu bir çalışmada, perifosinin (8-15 µmol/L) AKT'yi inhibe ederek NSCLC hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir [25]. Başka bir çalışmada ise perifosinin (5 µM) insan prostat adenokarsinom hücrelerinde (PC-3), AKT fosforilasyonunu inhibe ederken AKT seviyelerini de düşürerek anti-proliferatif etki gösterdiği ortaya konulmuştur [24]. Engel ve ark., Ishikawa (1.25 µM ve 7 µM) ve HEC1A (6 µM ve 25 µM) hücrelerinde, perifosinin AKT yolağını bloke ederek hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini raporlamışlardır [29]. Block ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada ise, Ishikawa ve HEC1A

hücrelerinde perifosinin (10 µM ve 50 µM) doza bağlı anti-proliferatif etki gösterdiği bildirilmiştir [121]. Bu çalışmada, HEC1A hücrelerinin 10 µM, 30 µM ve 50 µM perifosin uygulamalarına verdiği sitotoksosite yanıtı, xCELLigence ile 96 saat boyunca proliferasyon eğrilerinin zamana bağlı grafiğinde değerlendirildi. 24-36 saatler arasında 10 µM ve 30 µM perifosin gruplarında kontrole göre hücre proliferasyonunda anlamlı bir azalma gözlemlendi. 36-48, 48-72 ve 72-96 saatler arasında tüm perifosin gruplarında (10 µM, 30 µM, 50 µM) kontrol grubuna göre hücre proliferasyonunun azaldığı saptandı. Çalışmalarla uyumlu olarak bu çalışmada, perifosinin HEC1A hücrelerinde doz ve zamana bağlı olarak anti-proliferatif aktivitesinin arttığı görüldü. Bu etkinin AKT fosforilasyonundaki inhibisyon artışı ve buna bağlı olarak da artmış AKT yolağı inhibisyonuyla ilişkili olabileceği düşünüldü. Ancak yapılacak yeni çalışmalarla, perifosin dozu ve kullanım süresine bağlı olarak endometriyum kanser hücrelerinde AKT yolağı inhibisyonu ve anti-proliferatif etki arasındaki ilişkinin ortaya konulması gerekmektedir.

Kalsitriol, D vitamininin hormonal aktif formu olup in vivo ve in vitro anti-kanser etkinliğine sahiptir [13]. Farklı kanser tiplerinde yapılan çalışmalarda, 1-400 nM doz aralığında D vitamininin hücre siklusu arrestinin uyarılması, apoptozun ve diferansiyasyonun indüksiyonu, proliferasyonun ve anjiyogenezin inhibe edilmesi, kanser hücrelerinin invazyon ve göç etme potansiyelinin inhibisyonu gibi farklı anti-kanser etkinliklerinin olduğu bildirilmiştir [14, 170]. Yapılan çalışmalarda, D vitamininin endometriyum, akciğer, baş ve boyun, prostat ve meme kanseri hücre hatlarında anti-proliferatif etkilere sahip olduğu gözlemlenmiştir [172-176]. D vitamini tedavisinin endometriyum kanseri hücreleri üzerine etkilerini araştıran bir çalışmada, D vitamininin (10 nmol/L, 1,25-dihidroksikolekalsiferol) bu hücrelerde 25-hidroksikolekalsiferol 24-hidroksilaz aktivitesinde artışa neden olmasına rağmen hücre proliferasyonu üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir [177]. Bu çalışmanın aksine sonraki çalışmalarda, farklı endometriyum kanseri hücre hatlarında D vitamininin anti-proliferatif etki gösterdiği raporlanmıştır. Saunders ve ark., D vitamini (10 nM, 50 nM, 80 nM kalsitriol) tedavisinin endometriyum kanseri (RL95-2) hücrelerinin büyümesi üzerinde inhibitör etkisi olduğunu göstermişlerdir [178]. Yabushita ve ark. ise VDR ekspresye eden endometriyum kanseri (RL95-2) hücrelerinin büyümesinin D vitamini (50 nM) tedavisi ile doza bağlı bir şekilde önlendiğini göstermişlerdir [172]. Bu çalışmada, HEC1A hücrelerinin 50 nM ve 200 nM D vitamini uygulamalarına verdiği sitotoksosite yanıtının, 96 saat boyunca proliferasyon eğrilerinin zamana bağlı grafiği değerlendirildiğinde; 24-36 saatler arasında D vitamini gruplarında kontrole göre hücre proliferasyonunda herhangi bir fark gözlemlenmedi. 36-48, 48-72 ve 72-96 saatler arasında tüm D vitamini gruplarında (50 nM ve 200 nM) kontrol grubuna göre hücre proliferasyonunun azaldığı saptandı. Önceki çalışmalarla uyumlu olarak bu çalışmada elde edilen sonuçlar, D vitamininin HEC1A hücrelerinde anti-proliferatif aktivite gösterdiğini ortaya koymuştur. İnsan meme kanseri (MCF-7) hücrelerinde yapılan çalışmalarda, D vitamininin (100 nM) hücre siklusu

mekanizmasında rol oynayan CDK'ların aktivitesini baskılayarak veya kinaz inhibitörlerini (p21, p27) indükleyerek anti-proliferatif etki gösterdiği bildirilmiştir [179, 180]. İnsan retinoblastoma hücrelerinde yapılan başka bir çalışmada ise, D vitamininin P53 ve p21 ekspresyonunu artırarak hücre proliferasyonunu azalttığı raporlanmıştır [181]. Bu nedenle, D vitamininin endometriyum kanseri hücreleri üzerindeki anti-proliferatif etkisinin hücre siklusu mekanizmasında rol alan CDK ve/veya kinaz inhibitörleri aracılığıyla ortaya çıkabileceği düşünülmüştür. Ancak, bu etkinin tam olarak hangi mekanizma üzerinden gerçekleştiğini gösteren yeni moleküler çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

D vitamininin birçok kanser tipinde anti-kanser özelliklere sahip olduğu ancak terapötik olarak etkili dozlarda kalsiyum mobilizasyonu ile ilişkili toksisitelere sahip olduğu gösterilmiştir [182]. Bu nedenle hiperkalsemik yan etkisi daha az olan D vitamini analoglarının oluşturulması ve D vitamini dozunun azaltılabildiği farklı ilaç kombinasyon uygulamaları ile D vitamininin yüksek doz toksisitesinin ortaya çıkmasına engel olan yeni tedavi alternatifleri geliştirilmektedir [183]. Yapılan çalışmalarda, D vitamini ve analoglarının taksanlar ve platin analogları gibi farklı kemoterapötik ilaçlarla kombine edildiklerinde anti-kanser etkilerinin arttığı bildirilmiştir [16, 184, 185]. Axanova ve ark. prostat kanseri hücrelerinde yaptıkları çalışmada, AKT inhibitörleri (API-2 ve GSK690693) ile D vitamini (1 nM, 10 nM ve 100 nM) kombinasyonunun sinerjistik etki göstererek kanser hücrelerinde proliferasyonu inhibe ettiğini göstermişlerdir [130]. Zhang ve ark. ise miyeloid lösemi (HL60) hücrelerinde D vitamini (1 nM, 10 nM, 100 nM) ile PI3K/AKT yolağı inhibitörlerinin (LY294002 ve Wortmannin) kombine edilerek kullanılmasının, D vitamininin bu hücreler üzerindeki anti-proliferatif etkisini arttırdığını göstermişlerdir. Yapılan çalışmalar sonucunda ise PI3K/AKT yolağı inhibitörlerinin D vitamini analogları ile kombine edilerek kullanılmasının, kanser tedavisinde etkin bir tedavi alternatifi olabileceği öne sürülmüştür [186]. Akciğer (A549) ve prostat kanseri (PC-3) hücrelerinde yapılan bir çalışmada, AKT inhibitörü olan perifosin ile protein kinazın selektif inhibitörü olan UCN-01 kombinasyonunun, bu hücrelerde artmış anti-proliferatif etki gösterdiği bildirilmiştir. [27]. Engel ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada ise, perifosin ile sisplatin kombinasyonunun PTEN ekspresyonunu düşürmeyen Ishikawa hücrelerinde proliferasyonu önemli ölçüde inhibe ederken, PTEN ekspresyonunu düşüren HEC1A hücrelerinde herhangi bir etki göstermediği bildirilmiştir [29]. Bu çalışmada, perifosin ve D vitamini kombinasyonunun HEC1A hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği saptandı. 24-36 saatler arasında 30 µM+50 nM, 30 µM+200 nM ve 50 µM+50 nM kombinasyon gruplarında kontrol grubuna göre hücre proliferasyonunda anlamlı bir azalma gözlenirken, 30 µM+50 nM ve 50 µM+50 nM kombinasyon gruplarında ise 50 µM perifosin grubuna göre hücre proliferasyonunda azalma olduğu saptandı. 36-48, 48-72 ve 72-96 saatler arasında ise tüm perifosin+D vitamini kombinasyon gruplarında hücre proliferasyonunun kontrol ve D vitamini gruplarına göre azaldığı saptandı. Bu bulgular perifosin+D vitamini kombinasyonunun hücre

proliferasyonunu sadece perifosin ve D vitamini uygulanan gruplara göre daha fazla inhibe ettiğini gösterdi. Bu nedenle, endometriyum kanserinde perifosinin D vitamini ile kombine edilmesinin sinerjistik etki ile her iki ilacın tek kullanımına göre daha etkin anti-proliferatif etki gösterdiği ve klinik uygulamalarda yeni alternatif tedavi olarak kullanılabilirliği sonucuna varıldı. Ancak kombinasyon tedavisinin endometriyum kanserinde proliferasyonu inhibe edici etkilerinin daha ileri moleküler çalışmalar ve ilaç faz çalışmaları ile desteklenmesinin endometriyum kanserli hastalarda bu ilaçların klinik kullanım için uygunluğunun belirlenmesine katkıda bulunabileceği düşünüldü.

Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ilaçların klinik etkinlikleri, kanser hücrelerinde etkin hücre siklus arresti oluşturmaları ve apoptotik aktivasyonu arttırmaları ile ilişkilendirilmektedir [187, 188]. Elrod ve ark., NSCLC hücrelerinde perifosinin (8-15  $\mu\text{mol/L}$ ) kaspaz-8 ve DR5 aktivasyonu ile apoptozu indüklediğini ve bu etkilerin AKT'nin plazma membran lokalizasyonunun azalması, AKT fosforilasyonunun inhibisyonu ve toplam AKT seviyelerinin azalması ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir [25]. Yapılan başka çalışmalarda ise, perifosin uygulamasının farklı kanser hücrelerinde PI3K/AKT kaskadının bozulmasına ve apoptozun artmasına neden olduğu raporlanmıştır [24, 61]. Engel ve ark. ise endometriyum kanseri hücre hatlarında (Ishikawa ve HEC1A) perifosinin (10  $\mu\text{M}$ ) hücrelerin %50'sinden fazlasında apoptozu neden olduğunu göstermişlerdir [29]. Block ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada, perifosin (20  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ , 40  $\mu\text{M}$  ve 50  $\mu\text{M}$ ) uygulanmış endometriyum kanseri hücre hatlarında (Ishikawa ve HEC1A) perifosin dozu artışıyla orantılı olarak apoptotik hücre yüzdesinin arttığı raporlanmıştır [121]. Çalışmalarla uyumlu olarak bu çalışmada, 48. ve 72. saatlerde ortalama apoptotik hücre yüzdesinin 10  $\mu\text{M}$  ve 30  $\mu\text{M}$  perifosin gruplarında kontrole göre arttığı saptandı. Bu nedenle, perifosin gruplarında meydana gelen apoptotik hücre yüzdesindeki artışın perifosinin PI3K/AKT yoluyla üzerindeki inhibe edici etkisinden kaynaklandığı düşünüldü.

Pan ve ark., D vitamininin PTEN ekspresyonunu artırarak AKT aracılı anti-apoptotik sinyal yollarını inhibe ettiğini raporlamışlardır [189]. Yapılan çalışmalarda, D vitamini analoglarının farklı hücre hatları üzerindeki apoptotik etkisinin yaklaşık 6 günde ortaya çıktığı gösterilmiştir [190, 191]. Mathiasen ve ark. ise tedavi sonrası 6-7. günlerde D vitamini kaynaklı apoptozun pik yaptığını bildirmişlerdir [192]. Bu çalışmada, 48. ve 72. saatlerde ortalama apoptotik hücre yüzdesinin 50 nM ve 200 nM D vitamini gruplarında kontrole göre arttığı saptandı. Bu artışın 72. saatte 48. saate göre yüksek olduğu görüldü. Yapılan çalışmalarla uyumlu olarak D vitamini gruplarında zamana bağlı olarak meydana gelen apoptotik hücre yüzdesindeki artışın D vitamininin hücreler üzerindeki apoptotik etkisini daha uzun sürede göstermesinden kaynaklandığı düşünüldü.

Farklı kemoterapötik ilaçların kombine edilerek kullanıldığı bir çalışmada, insan Jurkat T-lösemi hücrelerinde perifosin (5  $\mu\text{mol/L}$ ) ile etoposid kombinasyonunun sinerjistik bir şekilde

apoptoza neden olduğu gösterilmiştir [28]. Başka bir çalışmada ise, perifosin ile histon deasetilaz inhibitörlerinin (HDACI, sodyum butirat, suberosilanilid hidroksamik asit ve trikostatın) kombinasyonunun, insan lösemi hücrelerinde (U937, HL-60 ve Jurkat hücreleri) mitokondriyal disfonksiyonu (sitokrom-c ve AIF salınımı), kaspaz-3 ve kaspaz-8 aktivasyonunu sinerjistik olarak indüklediği ve apoptozu arttırdığı bildirilmiştir [106]. Lee ve ark. yapmış olduğu bir çalışmada, progesteron ve kalsitriolün apoptozu arttırarak ve hücre siklusu arrestini indükleyerek endometriyum ve over kanserlerinin büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir [169]. Rashid ve ark., HDACI (sodyum butirat ve trikostatın) ile D vitamini kombinasyonunun prostat kanseri hücrelerinin apoptozunu sinerjistik olarak indüklediğini bildirmişlerdir. [193]. Steroid dirençli T-ALL hücrelerinde yapılan başka bir çalışmada ise metilprednizolon (2.5 mM), D vitamini (100 nM) ve AKT inhibitörü olan MK-2206 (2 µM)'nın hücrelerde apoptozu belirgin olarak arttırdığı gösterilmiştir [31]. Bu çalışmada, 48. ve 72. saatlerde, ortalama apoptotik hücre yüzdesinin tüm perifosin+D vitamini kombinasyon gruplarında kontrole göre arttığı saptanırken, 72. saatte 10 µM+50 nM kombinasyon grubunun HEC1A hücrelerinin %50'sinden fazlasında apoptoza neden olduğu görüldü. Ayrıca ortalama apoptotik hücre yüzdesinin kombinasyon gruplarında (10 µM+50 nM, 10 µM+200 nM) sadece perifosin ve D vitamini uygulanan gruplara göre daha yüksek olduğu görüldü. Bu nedenle endometriyum kanseri tedavisinde perifosin ve D vitamini kombinasyonunun tek ilaç kullanıma göre daha etkin bir şekilde apoptozu arttırdığı düşünüldü. Ancak perifosin ve D vitamini kombinasyonunun klinik etkinliğinin gösterilebilmesi için yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışmada olası apoptotik mekanizmaların ortaya konulabilmesi amacıyla P53, BCL2 ve BAX mRNA ekspresyonları incelendi. P53, hücrede DNA hasarı sonrasında eksprese edilerek DNA tamir mekanizmalarını aktive eden bir transkripsiyon faktörüdür [194]. DNA'nın tamir edilemediği durumlarda ise P53 geni BAX ekspresyonunu arttırıp, BCL2 ekspresyonunu inhibe ederek veya Fas, TNF-R gibi ölüm reseptörlerini indükleyerek hücrenin apoptoz sürecine girmesine neden olduğu bildirilmiştir [156]. Elrod ve ark., perifosinin (8-15 µmol/L) NSCLC hücre hatlarında (H157 ve A549) DR5 ekspresyonunu indüklediğini, kaspaz-8 inhibe edici proteinin ekspresyonunu ve BAX seviyelerini azalttığını, ancak BCL2, Bcl-XL ve PUMA seviyeleri üzerinde sınırlı bir modülatör etkisinin olduğunu ortaya koymuşlardır [24]. Yapılan çalışmalarda, over ve endometriyum kanseri (HEC-1B ve RL-95) hücrelerinde progesteron (20 µM) ve kalsitriol (100 nM) kombinasyonunun, apoptozla ilişkili diğer proteinlerle (HIST1H1E, HINT2 ve EIF2AK2) birlikte BAX ekspresyonunu arttırdığı ayrıca kaspaz-3 aktivasyonu ve G0-G1 hücre siklusu arresti indüksiyonuna neden olduğu gösterilmiştir [169, 195-197]. Başka bir çalışmada, perifosin ile HDACI kombinasyonunun miyeloid ve lenfoid lösemi hücrelerinde (U937, HL-60 ve Jurkat) kaspaz aktivasyonunu ve BAX yapısında konformasyonel değişiklikleri indükleyerek yüksek bir şekilde sinerjistik etki gösterdiği raporlanmıştır [106]. Bu çalışmada, 48. ve 72. saatlerde

perifosin, D vitamini ve perifosin+D vitamini kombinasyonu uygulanmış hücrelerde kontrol grubuna göre BCL2 mRNA ekspresyonunda istatistiksel olarak herhangi bir farklılık saptanmadı. 48. saatte sadece 30 µM perifosin grubunda kontrol grubuna göre BAX mRNA ekspresyon düzeyinin arttığı saptanırken, 72. saatte gruplar arasında BAX mRNA ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak herhangi bir farklılık saptanmadı. Perifosinin BCL2/BAX yolağı üzerinde etkisinin 48. saatte 30 µM perifosin grubunda ortaya çıktığı görüldü. Buna bağlı olarak, perifosin gruplarında bu etkinin HEC1A hücrelerinde doza bağımlı olduğu düşünüldü. D vitamini ve perifosin+D vitamini kombinasyon uygulamalarının ise HEC1A hücrelerinde BCL2/BAX yolağından farklı bir yolak üzerinden apoptozu indükleyebileceği düşünüldü.

Fei ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada, insan hepatoselüler karsinom (HepG2) hücrelerinde perifosinin kaspaz-3, kaspaz-9 ve poli ADP riboz polimeraz'ın aktivasyonuna neden olduğunu, ancak P53 ve BCL2 seviyesini etkilemediği gösterilmiştir [198]. Başka bir çalışmada, insan Jurkat T-ALL hücrelerinde perifosin (5 µmol/L) ile etoposid kombinasyonunun Fox1 ve Fas/Fas ligand ölüm reseptör yolaklarının spesifik aktivasyonuna neden olduğu, kaspaz-8, kaspaz-9, kaspaz-3, Bid ve Bim aktivasyonunun arttığı ve Bcl-xL ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir [28]. Bu çalışmada, P53 mRNA ekspresyonunun 48. saatte 30 µM+200 nM kombinasyon grubunda diğer gruplara göre, 72. saatte ise 10 µM+200 nM kombinasyon grubunda diğer gruplara göre anlamlı derecede yüksek olduğu saptandı. Buna bağlı olarak, perifosin+D vitamini kombinasyonunun sinerjistik etki ile P53 mRNA ekspresyonunu arttırarak HEC1A hücrelerinde apoptozu indükleyebileceği düşünüldü. Ayrıca, erken dönemde yüksek doz kombinasyonda gözlenen apoptotik etkinin ilerleyen dönemlerde daha düşük kombinasyon dozlarıyla elde edilebileceği sonucuna varıldı.

Bu çalışmada, perifosin, D vitamini ve perifosin+D vitamini kombinasyonları uygulanmış HEC1A hücrelerinde, hücre ölüm tiplerinin ultrastrüktürel olarak tanımlanabilmesi için TEM incelemeleri yapıldı. Perifosin uygulanan HEC1A hücrelerinde çok sayıda hücrenin heterojen dağılımlı ve elektron dens içeriğe sahip otofajik vakuollere sahip olduğu gözlenirken, az sayıda hücrenin apoptotik görünümde olduğu tespit edildi. Rios-Marco ve ark, APL analogları (10 µM konsantrasyonlarda edelfosin, perifosin, HePC, ErPC) uyguladıkları U-87 MG insan glioblastoma hücrelerinde otofajik vakuol ve otolizozomların arttığını, buna bağlı olarak da APL'lerin kanser hücrelerinde otofajik hücre ölüm mekanizmalarını aktive ettiğini ileri sürmüşlerdir [199]. Önceki çalışmalarda, perifosinin insan akciğer kanseri hücrelerinde apoptozu indüklediği ayrıca mTOR sinyalini inhibe ederek otofajiye neden olduğu gösterilmiştir [25, 61]. Bu nedenle, endometriyum kanserinde perifosinin hangi mekanizma ile otofajik hücre ölümünü indüklediğini ortaya koyan yeni çalışmaların yapılması gerekmektedir.

D vitamini uygulanan gruplarda, belirgin olarak genişlemiş ve kaynaşmış ER sisternaları ve dejenere olmuş mitokondriyonlarla karakterize, paraptosis benzeri hücre ölümü

ultrastrüktüründe olan çok sayıda hücre gözlenirken, bu hücreler arasında yer yer apoptotik morfolojiye sahip hücrelerin olduğu saptandı. Literatürde, D vitamininin kanser hücrelerinde paraptosis benzeri hücre ölümüne yol açtığını raporlayan herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak, yapılan bir çalışmada, D vitamininin MCF-7 hücrelerinde ER'nin olası fonksiyonel ve yapısal değişiklikleri ile ortaya çıkan kaspaz-bağımsız hücre ölümünde rol alabileceği bildirilmiştir [192]. Haddur ve ark., D vitamininin aktif formu olan kalsitriolün meme kanseri hücre hatlarında (MCF7, MDA-MB-231) ER stres belirteçlerinden biri olan BIP ekspresyonunda artışa neden olduğunu göstermişlerdir [200]. Çalışmalarla uyumlu olarak, bu çalışmada D vitamini uygulanan HEC1A hücrelerinde genişlemiş ve füzyona uğramış ER'nin ER stresine bağlı olabileceği düşünüldü. Mathiasen ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada ise, D vitamini analoglarının (kalsitriol ve EB 1089) meme kanseri (MCF-7) hücrelerinde kaspaz bağımsız hücre ölümünü indüklerken, hücrelerin sitoplazmasında ve kromatin içeriğinde yoğunlaşma ile karakterize apoptoz benzeri ultrastrüktürel değişikliklere neden olduğu raporlanmıştır. Ayrıca bazı hücrelerde ER stresinden kaynaklanabilecek dilate ER sisternaları gözlenmiştir [201]. Apoptotik olmayan hücre ölümü olarak tanımlanan paraptosisde sitoplazmik vakuolizasyon, mitokondriyal şişme, ER sisternalarında genişleme gözlenirken, piknozis, DNA fragmentasyonu gibi apoptozun tipik nükleer değişikliklerini ve kaspaz aktivasyonunu içermediği bildirilmiştir [202]. Bu sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda, D vitamininin HEC1A hücrelerinde kaspaz bağımsız yollar üzerinden hücre ölümüne neden olabileceği düşünüldü. Bununla ilişkili olarak, D vitamini, ER stresi ve paraptosis benzeri hücre ölümü arasındaki ilişkiyi ortaya koyan çalışmalara ihtiyaç olduğu sonucuna varıldı.

Cirstea ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada, ultrastrüktürel olarak perifosin ve rapamisin kombinasyonu uyguladıkları MM hücrelerinde, apoptotik ve otofajik hücre ölümünün meydana geldiğini ve kombinasyon tedavisinin apoptotik ve apoptotik olmayan hücre ölümüne neden olarak etkin tedavide kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir [203]. Bu çalışmadan farklı olarak çalışmamızda, perifosini D vitamini ile kombine ederek her iki ilacın HEC1A hücreleri üzerindeki anti-kanser etkinliğini ultrastrüktürel olarak inceledik. Perifosin ve D vitamini kombinasyonu uygulanan HEC1A hücrelerinin apoptotik, paraptotik ve otofajik hücre ölümü morfolojisinde olduğu gözlenirken, bu hücreler arasında nekrotik hücreler ve çok sayıda dejenere olmuş hücre artıklarının da olduğu saptandı. Elde edilen bu sonuçlar, her iki ilaç kombinasyonunun sinerjistik etki göstererek apoptotik ve apoptotik olmayan hücre ölüm mekanizmalarını aktive edebileceğini düşündürdü.

Sonuç olarak, elde ettiğimiz bulgular perifosin, D vitamini ve perifosin+D vitamini kombinasyonlarının endometriyum kanseri hücrelerinde proliferasyon inhibisyonuna neden olabileceğini, apoptotik ve apoptotik olmayan hücre ölüm mekanizmalarını aktive edebileceğini göstermektedir. Perifosin+D vitamini kombinasyonunun endometriyum kanser hücrelerindeki



anti-proliferatif ve apoptotik etkisinin tek ilaç uygulamasına göre daha fazla olduğu görüldü. Perifosinin doza bağlı olarak BCL2/BAX yolu üzerinden apoptozu indüklediği, perifosin+D vitamini kombinasyonlarının ise P53 ekspresyonunda artışa neden olmasına rağmen BCL2/BAX yolu üzerinden apoptotik etki göstermediği saptandı. Elektron mikroskopik incelemelerde ise, endometriyum kanseri hücrelerinde perifosinin otofajik hücre ölümünü, D vitamininin paraptosis benzeri hücre ölümünü ve perifosin+D vitamini kombinasyonlarının ise apoptotik ve apoptotik olmayan hücre ölümünü indüklediği görüldü. Endometriyum kanser hücrelerinde 48. saatte 30 µM+200 nM kombinasyonunun, 72. saatte ise 10 µM+200 nM kombinasyonunun sadece perifosin ve sadece D vitamini uygulamalarına göre daha etkin anti-proliferatif ve apoptotik etki gösterdiği saptandı. Bu nedenle, her iki ilacın kombine edilerek kullanılmasının apoptotik yollar dışında otofajik ve paraptotik hücre ölüm yollarını da aktive ederek kanser kemoterapisi için alternatif ve etkili bir tedavi seçeneği olabileceği düşünüldü. Ancak, perifosin+D vitamini kombinasyonlarının endometriyum kanseri hücrelerinde artmış hücre ölümüne neden olan moleküler mekanizmaların ortaya konulması ve bunlarla ilişkili yeni klinik çalışmaların yapılması gerektiği sonucuna varıldı.

## KAYNAKLAR

- [1]. Ronnett, B. M.; Zaino, R. J.; Ellenson, L. H.; Kurman, J. R., *Endometriyal carcinoma*. 5th ed.; Blaustein's pathology of female genital tract: Berlin, 2002; p 501.
- [2]. Junqueira, L. C.; Carneiro, J., *Temel Histoloji*. 11 th ed.; Nobel Tıp Kitabevleri: İstanbul, 2006; p 412-417.
- [3]. Noyes, R. W.; Hertig, A. W.; Rock, J., Dating the endometriyal biopsy. *Fertil Steril* **1950**, 1, (1), 3.
- [4]. Christiaens, G. C. M. L.; Sixma, J. J.; Haspels, A. A., Hemostasis in menstrual endometriyum: a reiew. *Obstet Gynecol survey* **1982**, 37, (5), 281.
- [5]. Abraham, L.; Kierszenbaum, M. D., *Histoloji ve Hücre Biyolojisi*. Palme Yayıncılık: Ankara, 2006; p 156.
- [6]. Liu, J. J.; Bertrand, K. A.; Karageorgi, S.; Giovannucci, E.; Hankinson, S. E.; Rosner, B.; Maxwell, L.; Rodriguez G.; De Vivo I., Prospective analysis of vitamin D and endometriyal cancer risk. *Ann Oncol* **2013**, 24, (3), 687-692.
- [7]. Parkin, D. M.; Bray, F.; Ferlay, J., Global Cancer Statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* **2005**, 55, (2), 74-108.
- [8]. Creasman, W. T., Endometriyal cancer: incidence, prognostic factors, diagnosis, and treatment. *Semin Oncol* **1997**, 24, (1), 140-150.
- [9]. Kişnişçi, H.; Gökşin, E.; Durukan, T.; Üstay, K.; Ayhan, A.; Gürkan, T.; Önderoğlu, L., *Temel Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi; Endometriyum Kanseri*. 2. Baskı; Güneş Kitabevi: Ankara, 1996; p 963-973.
- [10]. Currie, L. J., *Malignant tumors of the uterine corpus. The Linde's Operative Gynecology*. 8 th ed.; Lipincott-Rovven Publishers: Philadelphia, 1997, p 1522-1529.
- [11]. Belkız, Ö.; Ceyda, K.; Zuhul, P., Vitamin D'nin Biyokimyasal ve Laboratuvar Değerlendirmesi. *Türk Klinik Biyokimya Derg* **2008**, 6, (1), 23-31.
- [12]. Akkoyun, H. T.; Bayramoğlu, M.; Ekin, S.; Çelebi, F., D Vitamini ve Metabolizma için Önemi. *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg* 2014, 9, (3), 213-219.
- [13]. Ravid, A.; Rocker, D.; Machlenkin, A.; Rotem, C.; Hochman, A.; Kessler-Icekson, G.; Liberman, U. A.; Koren. R., 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Enhances the Susceptibility of Breast Cancer Cells to Doxorubicin-induced Oxidative Damage. *Cancer Res* **1999**, 59, (4), 862-867.
- [14]. Wigington, D. P.; Urban, C. M.; Strugnell, S. A.; Knutson, J. C., Combination study of 1,24(S)-dihydroxyvitamin D2 and chemotherapeutic agents on human breast and prostate cancer cell lines. *Anticancer Res* **2004**, 24, (5A), 2905-2912.
- [15]. Getzenberg, R. H.; Light, B. W.; Lapco, P. E.; Konety, B. R.; Nangia, A. K.; Acierno, J. S., Vitamin D inhibition of prostate adenocarcinoma growth and metastasis in the Dunning rat prostate model system. *Urology* **1997**, 50, (6), 999-1006.
- [16]. Hershberger, P. A.; Yu, W. D.; Modzelewski, R. A.; Rueger, R. M.; Johnson, C. S.; Trump, D. L., Calcitriol (1,25-dihydroxycholecalciferol) enhances paclitaxel antitumor activity in vitro and in vivo and accelerates paclitaxel induced apoptosis. *Clin Cancer Res* **2001**, 7, (4), 1043-1051.
- [17]. Johnson, C. S.; Muindi, J. R.; Hershberger, P. A.; Trump, D. L., The Antitumor Efficacy of Calcitriol: Preclinical Studies. *Anticancer Res* **2006**, 26, (4A), 2543-2550.
- [18]. Yu, W. D.; Ma, Y.; Flynn, G.; Muindi, J. R.; Kong, R. X.; Trump, D. L.; Johnson, C. S., Calcitriol enhances gemcitabine anti-tumor activity in vitro and in vivo by promoting apoptosis in a human pancreatic carcinoma model system. *Cell Cycle* **2010**, 9, (15), 3022-3029.
- [19]. Guyton, K. Z.; Kensler, T. W.; Posner, G. H., Cancer chemoprevention using natural vitamin D and synthetic analogs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **2001**, 41, 421-442.
- [20]. Kelloff, G. J.; Johnson, J. R.; Crowell, J. A.; Boone, C. W.; DeGeorge, J. J.; Steele, V. E., Approaches to the development and marketing approval of drugs that prevent cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **1995**, 4, (1), 1-10.
- [21]. Cheung, F. S.; Lovicu, F. J.; Reichardt, J. K., Current progress in using vitamin D and its analogs for cancer prevention and treatment. *Expert Rev Anticancer Ther* **2012**, 12, (6), 811-837.

- [22]. Krishnan, A. V.; Trump, D. L.; Johnson, C. S.; Feldman, D., The role of vitamin D in cancer prevention and treatment. *Rheum Dis Clin North Am* **2012**, 38, (1), 161-178.
- [23]. Richardson, G. P.; Eng, C.; Kolesar, J.; Pharm, D.; Hideshima, T.; Anderson, K. C., Perifosine, an oral, anti-cancer agent and inhibitor of the Akt pathway: mechanistic actions, pharmacodynamics, pharmacokinetics, and clinical activity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **2012**, 8, (5), 623-633.
- [24]. Kondapaka, S. B.; Singh, S. S.; Dasmahapatra, G. P.; Sausville, E. A.; Roy, K. K., Perifosine a novel alkylphospholipid, inhibits protein kinase B activation. *Mol Cancer Ther* **2003**, 2, (11), 1093-1103.
- [25]. Elrod, H. A.; Lin, Y. D.; Yue, P., The alkylphospholipid perifosine induces apoptosis of human lung cancer cells requiring inhibition of Akt and activation of the extrinsic apoptotic pathway. *Mol Cancer Ther* **2007**, 6, (7), 2029-2038.
- [26]. Hideshima, T.; Catley, L.; Yasui, H., Perifosine, an oral bioactive novel alkylphospholipid, inhibits Akt and induces in vitro and in vivo cytotoxicity in human multiple myeloma cells. *Blood* **2006**, 107, (10), 4053-4062.
- [27]. Dasmahapatra, G. P.; Didolkar, P.; Alley, M. C.; Ghosh, S.; Sausville, E. A.; Roy, K. K., In vitro combination treatment with perifosine and UCN-01 demonstrates synergism against prostate (PC-3) and lung (A549) epithelial adenocarcinoma cell lines. *Clin Cancer Res* **2004**, 10, (15), 5242-5252.
- [28]. Nyakern, M.; Cappellini, A.; Mantovani, I.; Martelli, A. M., Synergistic induction of apoptosis in human leukemia T cells by the Akt inhibitor perifosine and etoposide through activation of intrinsic and Fas-mediated extrinsic cell death pathways. *Mol Cancer Ther* **2006**, 5, (6), 1559-1570.
- [29]. Engel, J. B.; Honig, A.; Schonhals, T.; Weidler, C.; Hausler, S.; Krockenberger, M.; Grunewald, T. G.; Dombrowski, Y.; Rieger, L.; Dietl, J.; Wischhusen, J., Perifosine inhibits growth of human experimental endometrial cancers by blockade of AKT phosphorylation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **2008**, 141, (1), 64-69.
- [30]. Patel, V.; Lahusen, T.; Sy, T.; Sausville, E. A.; Gutkind, J. S.; Senderowicz, A. M., Perifosine, a novel alkylphospholipid, induces p21 (WAF1) expression in squamous carcinoma cells through a P53-independent pathway, leading to loss in cyclin-dependent kinase activity and cell cycle arrest. *Cancer Res* **2002**, 62, (5), 1401-1409.
- [31]. Pistor, M.; Schrewe, L.; Hauptshofer, S.; Miclea, A.; Faissner, S.; Chan, A.; Hoepner, R., 1,25-OH<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> and AKT-inhibition increase glucocorticoid induced apoptosis in a model of T-cell acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Leuk Res Rep* **2018**, 9, 38-41.
- [32]. Part3: Female Reproductive System, <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/43754782.pdf> (10.06.2019).
- [33]. Ross, M. H.; Pawlina, W., *Histology a text and atlas*. 6th ed.; Wolters Kluwer, Lippincott Williams&Wilkins: London, 2011; p 848-852.
- [34]. Groothuis, P. G.; Dassen, H. H. N. M.; Romano, A.; Punyadeera, C., Estrogen and the endometrium: lessons learned from gene expression profiling in rodents and human. *Hum Reprod Update* **2007**, 13, (4), 405-417.
- [35]. Baerwald, A. R.; Pierson, R. A., Endometrial development in association with ovarian follicular waves during the menstrual cycle. *Ultrasound Obstet Gynecol* **2004**, 24, (4), 453-460.
- [36]. Deligdisch, L., Hormonal Pathology of the Endometrium. *Mod Pathol* **2000**, 13, (3), 285-294.
- [37]. Deachapunya, C.; Sutthasinee Poonyachoti, S.; Krishnamra, N., Regulation of electrolyte transport across cultured endometrial epithelial cells by prolactin. *J Endocrinol* **2008**, 197, (3), 575-582.
- [38]. Noe, M.; Kunz, G.; Herbertz, M.; Mall, G.; Leyendecker, G., The cyclic pattern of the immunocytochemical expression of oestrogen and progesterone receptors in human myometrial and endometrial layers: characterization of the endometrial-subendometrial unit. *Hum Reprod* **1999**, 14, (1), 190-197.
- [39]. Kim, A.; Lee, J. Y.; Ji, Y. I.; Lee, H. H.; Lee, E. S.; Kim, H. Y.; Oh, Y. L., Do Endometrial movements affect the achievement of pregnancy during intrauterine insemination?. *Int J Fertil Steril* **2015**, 8, (4), 399-408.
- [40]. Aguilar, H. N.; Mitchell, B. F., Physiological pathways and molecular mechanisms regulating

uterine contractility. *Hum Reprod Update* **2010**, 16, (6), 725-744.

[41]. Teixeira, J.; Rueda, B. R.; Pru, J. K., *Uterine stem cells*. Stem Book [Internet]: Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute, 2008; p 1-12.

[42]. Ulukaş, Ç., Endometriyum kanseri nedir?. Dokuz Eylül Üniversitesi Patoloji AD, <http://www.turkpath.org.tr/files/endometrial.pdf> (13.05.2019).

[43]. Clark, T. J.; Volt, D.; Gupta, J. K.; Hyde, C.; Song, F.; Khan, K.S., Accuracy of hysteroscopy in the diagnosis of endometrial cancer and hyperplasia: a systematic quantitative review. *J Am Med Assoc* **2002**, 288, (13), 1610-1621.

[44]. Reed, S. D.; Newton, K. M.; Clinton, W. L.; Epplein, M.; Garcia, R.; Allison, K.; Voigt, L. F.; Weiss, N. S., Incidence of Endometrial Hyperplasia. *Am J Obstet Gynecol* **2009**, 200, (6), 678.e1-678.e6.

[45]. Key, T. J.; Pike, M. C., The dose-effect relationship between 'unopposed' oestrogens and endometrial mitotic rate: its central role in explaining and predicting endometrial cancer risk. *Br J Cancer* **1988**, 57, (2), 205-212.

[46]. American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2008*. Atlanta: American Cancer Society; 2008, p 1-68.

[47]. Hernandez, V. M. V.; Aguilar, V. M. V., Endometrial Cancer; Clinical Aspects and Prognosis. *Austin J Womens Health* **2015**, 2, (2), 1016.

[48]. Felix, A. S.; Weissfeld, J. L.; Stone, R. A.; Bowser, R.; Chivukula, M.; Edwards, R. P.; Linkov, F., Factors associated with Type I and Type II endometrial cancer. *Cancer Causes Control* **2010**, 21, (21), 1851-1856.

[49]. Wang, Y.; Wang, Y.; Li, J.; Cragun, J.; Hatch, K.; Chambers, S. K.; Zheng, W., Lynch syndrome related endometrial cancer: clinical significance beyond the endometrium. *J Hematol Oncol* **2013**, 6, 22.

[50]. Thompson, D.; Easton, D.F., Cancer Incidence in BRCA1 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst*, **2002**, 94, (18), 1358-1365.

[51]. Biron-Shental, T.; Drucker, L.; Altaras, M.; Bernheim, J.; Fishman, A., High incidence of BRCA1-2 germline mutations, previous breast cancer and familial cancer history in Jewish patients with uterine serous papillary carcinoma. *Eur J Surg Oncol* **2006**, 32, (10), 1097-1100.

[52]. Burke, W. M.; Orr, J.; Leitao, M.; Salom, E.; Gehrig, P.; Olawaiye, A. B.; Brewer, M.; Boruta, D.; Villeda, J.; Herzog, T.; Abu Shahin, F., Endometrial cancer: a review and current management strategies: part I. *Gynecol Oncol* **2014**, 134, (2), 385-392.

[53]. Amant, F.; Moerman, P.; Neven, P.; Timmerman, D.; Van Limbergen, E.; Vergote, I., Endometrial cancer. *Lancet* **2005**, 366 (9484), 491-505.

[54]. Deligdisch, L.; Kalir, T.; Cohen, C.J.; de Latour, M.; Bouedec, G.L.; Penault-Llorca, F., Endometrial Histopathology in 700 Patients Treated with Tamoxifen for Breast Cancer. *Gynecol Oncol* **2000**, 78, (2), 181-186.

[55]. Langer, R. D.; Pierce, J. J.; O'Hanlan, K. A.; Johnson, S.R.; Espeland, M.A.; Trabal, J.F.; Barnabei, V.M.; Merino, M.J.; Scully, R.E., Transvaginal ultrasonography compared with endometrial biopsy for the detection of endometrial disease: Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions Trial. *N Engl J Med* **1997**; 337, (25), 1792-1798.

[56]. Revel, A., Does hysteroscopy produce intraperitoneal spread of endometrial cancer cells?. *Obstet Gynecol Surv* **2004**, 59, (4), 280-284.

[57]. Azueta, A.; Gatus, S.; Matias-Guiu, X., Endometrioid carcinoma of the endometrium: pathologic and molecular features. *Semin Diagn Pathol* **2010**, 27, (4), 226-240.

[58]. Deng, L.; Broaddus, R. R.; McCampbell, A.; Shipley, G. L.; Loose, D. S.; Stancel, G. M.; Pickar, J. H.; Davies, P. J., Identification of a novel estrogen-regulated gene, EIG121, induced by hormone replacement therapy and differentially expressed in type I and type II endometrial cancer. *Clin Cancer Res* **2005**, 11, (23), 8258-8264.

[59]. Bokhman, J. V., Two pathogenetic types of endometrial carcinoma, *Gynecol Oncol* **1983**, 15, (1), 10-17.

[60]. Momota, H.; Nerio, E.; Holland, E. C., Perifosine inhibits multiple signaling pathways in glial progenitors and cooperates with temozolomide to arrest cell proliferation in gliomas in vivo. *Cancer Res* **2005**, 65, (16), 7429-7435.

- [61]. Ruiter, G. A.; Zerp, S. F.; Bartelink, H.; van Blitterswijk, W. J.; Verheij, M., Anti-cancer alkyllysophospholipids inhibit the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/PKB survival pathway. *Anticancer Drugs* **2003**; 14, (2), 167-173.
- [62]. Engin, Y.; Tezcan, S.; Üstün, Y.; Dündar İ., Endometrium Kanserinde Prognostik Faktörler. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası* **2001**, 54, (1), 57-63.
- [63]. Colombo, N.; Preti, E.; Landoni, F.; Carinelli, S.; Colombo, A.; Marini, C.; Sessa, C., Endometrial cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* **2013**, 24, (6), 33-38.
- [64]. Creutzberg, C. L.; van Putten, W. L.; Koper, P.C.; Lybeert, M.L.; Jobsen, J. J.; Wárlám-Rodenhuis, C. C.; De Winter, K. A.; Lutgens, L. C.; van den Bergh, A. C.; van de Steen-Banasik, E.; Beerman, H.; van Lent, M., Surgery and postoperative radiotherapy versus surgery alone for patients with stage-1 endometrial carcinoma: multicentre randomised trial. Post Operative Radiation Therapy in Endometrial Carcinoma. *Lancet* **2000**, 355, (9213), 1404-1411.
- [65]. Keys, H. M.; Roberts, J. A.; Brunetto, V. L.; Zaino, R. J.; Spirtos, N. M.; Bloss, J. D.; Pearlman, A.; Maiman, M. A.; Bell, J. G., A phase III trial of surgery with or without adjunctive external pelvic radiation therapy in intermediate risk endometrial adenocarcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* **2004**, 92, (3), 744-751.
- [66]. Aalders, J.; Abeler, V.; Kolstad, P.; Onsrud, M., Postoperative external irradiation and prognostic parameters in stage I endometrial carcinoma: clinical and histopathologic study of 540 patients. *Obstet Gynecol* **1980**, 56, (4), 419-427.
- [67]. Karabulut, S.; SAİP, P. M., Endometrium Kanserinde Kemoterapi Chemotherapy in Endometrial Cancer. *Türkiye Klinikleri J Gynecol Obst-Special Topics* **2014**, 7, (3), 100-106.
- [68]. Hogberg, T.; Signorelli, M.; De Oliveira, C. F.; Fossati, R.; Lissoni, A. A.; Sorbe, B.; Andersson, H.; Grenman, S.; Lundgren, C.; Rosenberg, P.; Boman, K.; Tholander, B.; Scambia, G.; Reed, N.; Cormio, G.; Tognon, G.; Clarke, J.; Sawicki, T.; Zola, P.; Kristensen, G., Sequential adjuvant chemotherapy and radiotherapy in endometrial cancer: Results from two randomised studies. *Eur J Cancer* **2010**, 46, (13), 2422-2431.
- [69]. Moxley, K. M.; McMeekin, D. S., Endometrial carcinoma: a review of chemotherapy, drug resistance, and the search for new agents. *Oncologist* **2010**, 15, (10), 1026-1033.
- [70]. Moore, T. D.; Phillips, P. H.; Nerenstone, S. R.; Cheson, B. D., Systemic treatment of advanced and recurrent endometrial carcinoma: current status and future directions. *J Clin Oncol* **1991**, 9, (6), 1071-1088.
- [71]. Muss, H. B., Chemotherapy of metastatic endometrial cancer. *Semin Oncol* **1994**, 21, (1), 107-113.
- [72]. Randall, M. E.; Filiaci, V. L.; Muss, H.; Spirtos, N. M.; Mannel, R. S.; Fowler, J.; Thigpen, J. T.; Benda, J. A., Randomized phase III trial of whole-abdominal irradiation versus doxorubicin and cisplatin chemotherapy in advanced endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol* **2006**, 24, (1), 36-44.
- [73]. Homesley, H. D.; Filiaci, V.; Gibbons, S. K.; Long, H. J.; Cella, D.; Spirtos, N. M.; Morris, R. T.; DeGeest, K.; Lee, R.; Montag, A., A randomized phase III trial in advanced endometrial carcinoma of surgery and volume directed radiation followed by cisplatin and doxorubicin with or without paclitaxel: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* **2009**, 112, (3), 543-552.
- [74]. Matias-Guiu, X.; Catusus, L.; Bussaglia, E.; Lagarda, H.; Garcia, A.; Pons, C.; Munoz, J.; Arguelles, R.; Machin, P.; Prat, J., Molecular pathology of endometrial hyperplasia and carcinoma. *Hum Pathol* **2001**, 32, (6), 569-577.
- [75]. Sherman, M. E.; Bur, M. E.; Kurman, R. J., P53 in endometrial cancer and its putative precursors: Evidence for diverse pathways of tumorigenesis. *Hum Pathol* **1995**, 26, (11), 1268-1274.
- [76]. Tritz, D.; Pieretti, M.; Turner, S.; Powell, D., Loss of heterozygosity in usual and special variant carcinomas of the endometrium. *Hum Pathol* **1997**, 28, (5), 607-612.
- [77]. Cinrsano, F. D.; Karlan, B. Y., The Role of the HER-2/neu Oncogene in Gynecologic Cancers. *J Soc Gynecol Invest* **1996**; 3, (3), 99-105.

- [78]. Cairns, P.; Okami, K.; Halachmi, S.; Halachmi, N.; Esteller, M.; Herman, J.; Jen, J.; Isaacs, W.; Bova, G.; Sidransky, D., Frequent inactivation of PTEN/MMAC1 in primary prostate cancer. *Cancer Res* **1997**, *57*, 4997-5000.
- [79]. Li, D.; Sun, H., PTEN/MMAC1/TEP1 suppresses the tumorigenicity and induces G1 cell cycle arrest in human glioblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **1998**, *95*, (26), 15406-15411.
- [80]. Davies, M.; Koul, D.; Dhesi, H.; Berman, R.; McDonnell, T.; McConkey, D.; Yung, W.; Steck, P., Regulation of Akt/PKB activity, cellular growth, and apoptosis in prostate carcinoma cells by MMAC/PTEN. *Cancer Res* **1999**, *59*, (11), 2551-2556.
- [81]. Stambolic, V.; Suzuki, A.; de la Pompa, J.; Brothers, G.; Mirtsos, C.; Sasaki, T.; Ruland, J.; Penninger, J.; Siderovski, D.; Mak, T., Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* **1998**, *95*, (1), 29-39.
- [82]. Özcan, Ö.; Dikmen, M., Kanser Tedavisinde mTOR İnhibitörleri. *Marmara Pharm J* **2015**, *19*, (3), 290-297.
- [83]. Ali, I., Gatekeeper for endometrium: the PTEN tumor suppressor gene. *J Natl Cancer Inst* **2000**, *92*, (11), 861-863.
- [84]. Thorpe, L. M.; Yuzugullu, H.; Zhao, J. J., PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation, and therapeutic targeting. *Nat Rev Cancer* **2015**, *15*, (1), 7-24.
- [85]. Özdil, B.; Gürel, Ç.; Kılıç, K. D.; Kuşçu, G. C.; Adalı, Y.; Aktuğ, H., Intracellular trafficking and cell behaviour characteristics. *Ege J Med* **2017**, *56*, (1), 102-110.
- [86]. Jaber, N.; Dou, Z.; Chen, J. S.; Catanzaro, J.; Jiang, Y. P.; Ballou, L. M.; Selinger, E.; Ouyang, X.; Lin, R. Z.; Zhang, J.; Zong, W. X., Class III PI3K Vps34 plays an essential role in autophagy and in heart and liver function. *Proc Natl Acad Sci USA* **2012**, *109*, (6), 2003-2008.
- [87]. Wymann, M. P.; Marone, R., Phosphoinositide 3-kinase in disease: timing, location, and scaffolding. *Curr Opin Cell Biol* **2005**, *17*, (2), 141-149.
- [88]. Franke, T.; Kaplan, D.; Cantley, L., PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* **1997**, *88*, (4), 435-437.
- [89]. Kulik, G.; Klippel, A.; Weber, M. J., Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt. *Mol Cell Biol* **1997**, *17*, (3), 1595-1606.
- [90]. Datta, S. R.; Brunet, A.; Greenberg, M. E., Cellular survival: a play in three AKTs. *Genes Dev* **1999**, *13*, (22), 2905-2927.
- [91]. Del Peso, L.; Gonzalez-Garcia, M.; Page, C.; Herrera, R.; Nunez, G., Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* **1997**, *278*, (5338), 687-689.
- [92]. Pap, M.; Cooper, G., Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem* **1998**, *273*, (32), 19929-19932.
- [93]. Brunet, A.; Bonni, A.; Zigmond, M.; Lin, M.; Juo, P.; Hu, L.; Anderson, M.; Arden, K.; Blenis, J.; Greenberg, M., Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **1999**, *96*, (6), 857-868.
- [94]. Cheng, J. Q.; Lindsley, C.W.; Cheng, G. Z.; Yang, H.; Nicosia, S. V., The Akt/PKB pathway: molecular target for cancer drug discovery. *Oncogene* **2005**, *24*, (50), 7482-7492.
- [95]. Tashiro, H.; Blazes, M. S.; Wu, R.; Cho, K.R.; Bose, S.; Wang, S. I.; Li, J.; Parsons, R.; Ellenson, L. H., Mutations in PTEN are frequent in endometrial carcinoma but rare in other common gynecological malignancies. *Cancer Res* **1997**, *57*, (18), 3935-3940.
- [96]. Hay, N., The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer. *Cancer Cell* **2005**, *8*, (3), 179-183.
- [97]. Bjornsti, M. A.; Houghton, P. J., The TOR pathway: a target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **2004**, *4*, (5), 335-348.
- [98]. Guertin, D. A.; Sabatini, D. M., An expanding role for mTOR in cancer. *Trends Mol Med* **2005**, *11*, (11), 353-361.
- [99]. Shaw, R. J.; Cantley, L. C., Ras PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* **2006**, *441*, (7092), 424-430.
- [100]. Lasarge, C. L.; Danzer, S. C., Mechanisms regulating neuronal excitability and seizure development following mTOR pathway hyperactivation. *Front Mol Neurosci* **2014**, *7*, 18.
- [101]. Vink, S. R.; Schellens, J. H. M.; van Blitterswijk, W. J.; Verheij, M., Tumor and normal tissue pharmacokinetics of perifosine, an oral anti-cancer alkylphospho lipid. *Invest New Drugs* **2005**, *23*, (4), 279-286.

- [102]. Gills, J. J.; Dennis, P. A., Perifosine: Update on a Novel Akt Inhibitor. *Curr Oncol Rep* **2009**, *11*, (2), 102-110.
- [103]. Fleer, E. A. M.; Unger, C.; Kim, D.J.; Eibl, H., Metabolism of other phospholipids and analogs in neoplastic cells. *Lipids* **1987**, *22*, (11), 856-861.
- [104]. Stekar, J.; Hilgard, P.; Klenner, T.; Nössner, G.; Schumacheret, W., A second generation of alkylphospho lipids with high antineoplastic activity [abstract 1996]. *Proc Am Assoc Cancer Res* **1993**, *34*, 335.
- [105]. Catley, L.; Hideshima, T.; Chauhan, D.; Neri, P.; Tassone, P.; Bronson, R.; Song, W.; Tai, Y. T.; Munshi N. C.; Anderson, K. C., Alkyl phospholipid perifosine induces myeloid hyperplasia in a murine myeloma model. *Exp Hematol* **2007**, *35*, (7), 1038-1046.
- [106]. Rahmani, M.; Reese, E.; Dai, Y.; Bauer, C.; Payne, S. G.; Dent, P.; Spiegel, S.; Grant, S., Coadministration of histone deacetylase inhibitors and perifosine synergistically induces apoptosis in human leukemia cells through Akt and ERK1/2 inactivation and the generation of ceramide and reactive oxygen species. *Cancer Res* **2005**, *65*, (6), 2422-2432.
- [107]. Festuccia, C.; Gravina, G. L.; Muzi, P.; Millimaggi, D.; Dolo, V.; Vicentini, C.; Bologna, M., Akt down-modulation induces apoptosis of human prostate cancer cells and synergizes with EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Prostate* **2008**, *68*, (9), 965-974.
- [108]. Li, X.; Luwor, R.; Lu, Y.; Liang, K.; Fan, Z., Enhancement of antitumor activity of the anti-EGF receptor monoclonal antibody cetuximab/C225 by perifosine in PTEN-deficient cancer cells. *Oncogene* **2006**, *25*, (4), 525-535.
- [109]. Huston, A.; Leleu, X.; Jia, X.; Moreau, A. S.; Ngo, H. T.; Runnels, J.; Anderson, J.; Alsayed, Y.; Roccaro, A.; Vallet, S.; Hatjiharissi, E.; Tai, Y. T.; Sportelli, P.; Munshi, N.; Richardson, P.; Hideshima, T.; Roodman, D. G.; Anderson, K. C.; Ghobrial, I. M., Targeting Akt and heat shock protein 90 produces synergistic multiple myeloma cell cytotoxicity in the bone marrow microenvironment. *Clin Cancer Res* **2008**, *14*, (3), 865-874.
- [110]. David, E.; Sinha, R.; Chen, J.; Sun, S. Y.; Kaufman, J. L.; Lonial, S., Perifosine synergistically enhances TRAIL-induced myeloma cell apoptosis via up-regulation of death receptors. *Clin Cancer Res* **2008**, *14*, (16), 5090-5098.
- [111]. Crul, M.; Rosing, H.; de Klerk, G. J.; Dubbelman, R.; Traiser, M.; Reichert, S.; Knebel, N. G.; Schellens, J. H.; Beijnen, J. H.; ten Bokkel Huinink, W. W., Phase I and pharmacological study of daily oral administration of perifosine (D-21266) in patients with advanced solid tumours. *Eur J Cancer* **2002**, *38*, (12), 1615-1621.
- [112]. Henderson, I. C.; Spigel, D. R.; Nemunaitis, J. J.; Richards, D. A.; Liebmann, J. E.; Purcell R. Birch, W. T.; Gardner, L. R.; Burris III, H. A., A phase I study of weekly, divided dose perifosine in patients with non-small cell lung cancer. *J Clin Oncol* **2006**, *24*, (18), 13063.
- [113]. Knowling, M.; Blackstein, M.; Tozer, R.; Bramwell, V.; Dancey, J.; Dore, N.; Matthews, S.; Eisenhauer, E., A phase II study of perifosine (D-21226) in patients with previously untreated metastatic or locally advanced soft tissue sarcoma: a National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group trial. *Invest New Drugs* **2006**, *24*, (5), 435-439.
- [114]. Bailey, H. H.; Mahoney, M. R.; Ettinger, D. S.; Maples, W. J.; Fracasso, P. M.; Traynor, A. M.; Erlichman, C.; Okuno, S. H., Phase II study of daily oral perifosine in patients with advanced soft tissue sarcoma. *Cancer* **2006**, *107*, (10), 2462-2467.
- [115]. Birch, R.; Chawla, S.; Nemunaitis, J.; Savage, P.; Kaiser, P.; Spira A. Cervera, A.; Middleman, E.; Sausville, E.; Knowling, M.; Henderson, I., Perifosine as an active agent in the treatment of patient with advanced sarcoma. *J Clin Oncol* **2007**, *25*, (18S), 10059.
- [116]. Steinert, D.; Henderson, C.; Chawla, S., *A phase II trial of perifosine in patients with chemo-insensitive sarcomas—study update [abstract 860]*. Presented at the 13th Annual Meeting of the Connective Tissue Oncology Society, Seattle, WA, 1-3 November 2007.
- [117]. Schmidt-Hieber, M.; Dabrowski, R.; Weimann, A.; Aicher, B.; Lohneis, P.; Busse, A.; Thiel, E.; Blau, I. W., In vitro cytotoxicity of the novel antimyeloma agents perifosine, bortezomib and lenalidomide against different cell lines. *Invest New Drugs* **2012**; *30*, (2), 480-489.
- [118]. Weiss, S.; Nemunaitis, J. J.; Diaz-Lacayo, M.; Birch, R.; Ebrahimi, B.; Berdeaux, D. H.; Allerton, P.; Gardner, L. R.; Henderson, I. C., A phase 1 study of daily oral perifosine (P) and weekly gemcitabine (G). *J Clin Oncol* **2016**, *24*, (18), 13084.

- [119]. Posadas, E. M.; Gulley, J.; Arlen, P. M.; Trout, A.; Parnes, H. L.; Wright, J.; Lee, M. J.; Chung, E.J.; Trepel, J. B.; Sparreboom, A.; Chen, C.; Jones, E.; Steinberg, S. M.; Daniels, A.; Figg, W. D.; Dahut, W. L., A phase II study of perifosine in androgen independent prostate cancer. *Cancer Biol Ther* **2005**, 4, (10), 1133-1137.
- [120]. Ernst, DS.; Eisenhauer, E.; Wainman, N.; Davis, M.; Lohmann, R.; Baetz, T.; Belanger, K.; Smylie, M., Phase II study of perifosine in previously untreated patients with metastatic melanoma. *Invest New Drugs* **2005**, 23, (6), 569-575.
- [121]. Block, M.; Fister, S.; Emons, G.; Seeber, S.; Gründker, C.; Günthert, A. R., Antiproliferative effects of antiestrogens and inhibitors of growth factor receptor signaling on endometrial cancer cells. *Anticancer Res* **2010**, 30, (6), 2025-31.
- [122]. Agic, A.; Xu, H.; Altgassen, C.; Noack, F.; Wolfler, M. M.; Diedrich, K.; Friedrich, M.; Taylor, R. N.; Hornung, D., Relative expression of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor, vitamin D 1 alpha-hydroxylase, vitamin D 24-hydroxylase, and vitamin D 25-hydroxylase in endometriosis and gynecologic cancers. *Reprod Sci* **2007**; 14, (5), 486-497.
- [123]. Kongsbak, M.; Levring, T. B.; Geisler, C.; von Essen, M. R., The vitamin D receptor and T cell function. *Front Immunol* **2013**, 4, 148.
- [124]. Taner, C. E.; İriş, A.; Aydoğan Kırmızı, D.; Okay, G., Endometrium karsinomlu olguların klinikopatolojik özelliklerinin değerlendirilmesi. *Göztepe Tıp Derg* **2012**, 27, (3), 99-105.
- [125]. Guyton, K. Z.; Kensler, T. W.; Posner, G. H., Vitamin D and vitamin D analogs as cancer chemopreventive agents. *Nutr Rev* **2003**, 61, (7), 227-238.
- [126]. Koeffler, H. P.; Aslanian, N.; O'Kelly, J., Vitamin D (2) analog (Paricalcitol; Zemplar) for treatment of myelodysplastic syndrome. *Leuk Res* **2005**, 29, (11), 1259-1262.
- [127]. Garland, C. F.; Garland, F. C.; Gorham, E. D.; Lipkin, M.; Newmark, H.; Mohr, S. B.; Holick, M. F., The role of vitamin D in cancer prevention. *Am J Public Health* **2006**, 96, (2), 252-61.
- [128]. Holick, M. F., Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* **2007**, 357, (3), 266-81.
- [129]. Trump, D. L.; Hershberger, P. A.; Bernardi, R. J.; Ahmed, S.; Muindi, J.; Fakih, M.; Yu, W. D.; Johnson, C. S., Anti-tumor activity of calcitriol: pre-clinical and clinical studies. *J Steroid Biochem Mol Biol* **2004**, 89-90, (1-5), 519-526.
- [130]. Axanova, L. S.; Chen, Y. Q.; McCoy, T.; Sui, G.; Cramer, S. D., 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and PI3K/AKT inhibitors synergistically inhibit growth and induce senescence prostate cancer cells. *Prostate* **2010**, 70, (15), 1658-1671.
- [131]. Erdoğan, B. B., Apoptozis mekanizmaları: tümör gelişiminde fas-fasl bağımlı apoptozis. *Akciğer Arşivi* **2003**, 4, (3), 165-174.
- [132]. Hikim, A. P. S.; Wang, C.; Leung, A. R.; Swerdloff, S., Involvement of apoptosis in the induction of germ cell degeneration in adult rats after gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment. *Endocrinology* **1995**, 136, (6), 2770-2775.
- [133]. Kerr, J. F.; Wyllie, A. H.; Currie, A. R., Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **1972**, 26, (4), 239-257.
- [134]. Gewies, A., Introduction to Apoptosis. *ApoReview* **2003**, 1-6, <http://www.celldeath.de/encyclo/aporev/apointro.pdf> (12.05.2019).
- [135]. Vaskivuo, T. E.; Stenback, F.; Karhumaa, P.; Risteli, J.; Dunkel, L.; Tapanainen, J. S., Apoptosis and apoptosis-related proteins in human endometrium. *Mol Cell Endocrinol* **2000**, 165, (1-2), 75-83.
- [136]. Behringer, R. R.; Finegold, M. J.; Cate, R. L., Mullerian-inhibiting substance function during mammalian sexual development. *Cell* **1994**, 79, (3), 415-425.
- [137]. Tilly, J. L., Apoptosis and ovarian function. *Rev. Reprod* **1996**, 1, (3), 162-172.
- [138]. Akşit, H.; Bildik, A., Apoptozis. *Yü Vet Fak Derg* **2008** 19, (1), 55-63
- [139]. Majno, G.; Joris, I., Apoptosis, oncosis, and necrosis: An overview of cell death. *Am J Pathol* **1995**, 146, (1), 3-15.
- [140]. Mason, R. P., Effects of calcium channel blockers on cellular apoptosis. Implications for carcinogenic potential. *Cancer* **1999**, 85, (10), 2093-2102.
- [141]. Hockenbery, D., Defining apoptosis. *Am J Pathol* **1995**, 146, (1), 16-19.
- [142]. Öktem, S.; Özhan, M. H.; Özol D., Apoptozisin önemi. *Toraks Dergisi* **2001**, 2, (1), 91-95.



- [143]. Cummings, M. C.; Winterfold, C. M.; Walker, N. I., Apoptosis. *Am J Surg Pathal* **1997**, 21, (1), 88-101.
- [144]. Wright, S. C.; Wei, Q. S.; Kinder, D. H.; Larrick, J. W., Biochemical pathways ofapoptosis; nicotinamide adenine dinucleotide-deficient cells are resistant to tumor necrosis factor or ultraviolet light activation of the 24-kd apoptotic protease and DNA fragmentation. *J Exp Med* **1996**, 183, (2), 463-471.
- [145]. Kane, A. B., Redefining cell death. *Am J Pathal* **1995**, 146, (1), 1-2.
- [146]. Nagata, S., Apoptosis by death factor. *Cell* **1997**, 88, (3), 355-365.
- [147]. Tomatır, A. G., Apoptoz; programlı hücre ölümü. *T. Klin. J. Med. Sci* **2003**, 23, (6), 499-508.
- [148]. Yang, E.; Korsmeyer, S. J., Malecular thanatopsis: A discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood* **1996**, 88, (2), 386-401.
- [149]. Wickremasinghe, G.; Hoffbrant, A. V., Biochemical and genetic control of apoptosis. Relevance to normal hematopoiesis and hematological malignancies. *Blood* **1999**, 93, (11), 3587-3600.
- [150]. Diniz, H., Apoptosis: The Death Decision. *Tepecik Eđit Hast Derg* **2004**, 14, (1): 1-20.
- [151]. Adams, J. M., Cory, S., Life or death decions by the BCL2 family. *Trends Biochem Sci* **2001**, 26, (1), 61-66.
- [152]. Adrain, C.; Martin, S. J., The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem Sci* **2001**, 26, (6), 390-397.
- [153]. Spierings, D. C.; de Vries, E. G.; Vellenga, E.; van den Heuvel, F. A.; Koornstra, J. J.; Wesseling, J.; Hollema, H.; de Jong, S., Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *J Histochem Cytochem* **2004**, 52, (6), 821-831.
- [154]. Akar, A. R.; Akcalı, K. C.; Durdu, S.; Aydın, I. T.; Çivril, F.; Taşöz, K. B.; Özyurda, Ü., Tip A aortik diseksiyonlu hastalarda vasküler düz kas hücrelerindeki apoptozu düzenleyici proteinlerin rolü. *Turkish J Vasc Surg* **2005**, 14, (2), 25-30.
- [155]. Vander Heiden M. G.; Chandel, N. S.; Williamson, E. K.; Schumacker, P. T.; Thompson, C. B., Bcl-XL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell* **1997**, 91, (5), 627-632.
- [156]. Vousden, K. H.; Lu, X., Live or let die: the cells response to P53. *Nat Rev Cancer* **2002**, 2, (8), 594-604.
- [157]. Gülsar, M. G.; Özdemir, H. N.; Çeviker, K.; Bağcı, Ö.; Tatar, B.; Yazkan, R.; Erdemođlu, E., Tümörögenizde p53 geni ve genetik tedavi yaklaşımları. *Mühendislik Bilimleri ve Tasarım Dergisi* **2016**, 4, (2), 133-135.
- [158]. Koçak, N.; Yıldırım, İ. H.; Yıldırım, S. C., P53 ve P53 gen ailesi üyeleri olan p63 ve p73'ün hücreşel işlevleri. *Dicle tıp dergisi* **2011**, 38, (4), 530-535.
- [159]. Danial, N. N.; Korsmeyer, S. J., Cell death: critical control points. *Cell* **2004**, 116, (2), 205-219.
- [160]. Kroemer, G.; Galluzi, L.; Brenner, C., Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* **2007**, 87, (1), 99-163.
- [161]. Smaili, S.; Hsu, Y.; Youle, R. J.; Russell, J.T., Mitochondria in Ca<sup>2+</sup> signaling and apoptosis. *J. Bioenerg and Biomembr* **2000**, 32, (1), 35-46.
- [162]. Muşdal, Y.; Aksoy, Y., Apoptoz: mekanizması, hastalıklarla ilişkisi ve tedavi yaklaşımlarındaki yeri. *Hacettepe Tıp Derg* **2007**, 38, 106-112.
- [163]. Hornsby, P. J., Aging of the human adrenal korteks. *Ageing Res Rev* **2002**, 1, (2), 229-242.
- [164]. Palmer, A. M.; Greengrass, P. M.; Cavalla D., The role of mitochondria in apoptosis. *Drug News Perspect* **2000**, 13, (6), 378-384.
- [165]. Doğan, A. L., *Apoptozis ve ürolojik tümörler açısından önemi*. (Üroonkoloji). Ertem Basım Yayın: İstanbul, 2007; p 25-33.
- [166]. Kandaş, N. Ö., Apoptozis, Programlı Hücre Ölümü. *AÜ Dikimevi Sağ Hiz Mesl Yük Okul Derg* **2004**, 5, (1), 7-10.
- [167]. Ross, M. H.; Pawlina, W., *Histology a text and atlas*. 6th ed.; Wolters Kluwer, Lippincott Williams&Wilkins: London, 2011; p 93-97.
- [168]. Parkin, D. M.; Whelan, S. L.; Ferlay, J.; Teppo, L.; Thomas, D. B., *Cancer Incidence in Five Continents Vol. VIII*. IARC Press: France, 2002; p 57-73.

- [169]. Lee, L.; Teng, P. N.; Nguyen, H.; Hood, B. L.; Kavandi, K.; Wang, G.; Turbov, J. M.; Thaete, L. G.; Hamilton, C. A.; Maxwell, G. L.; Rodriguez, G. C.; Conrads, T. P.; Syed, V., Progesterone enhances calcitriol antitumor activity by upregulating vitamin-D receptor expression and promoting apoptosis in endometrial cancer cells. *Cancer Prev Res* **2013**, (7), 6, 731-43.
- [170]. Ma, Y., Yu, W. D.; Hershberger, P. A.; Flynn, G.; Kong, R. X.; Trump, D. L.; Johnson, C. S., 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> potentiates cisplatin antitumor activity by p73 induction in a squamous cell carcinoma model. *Mol Cancer Ther* **2008**, 7, (9), 3047-3055.
- [171]. Ruitter, G. A.; Verheij, M.; Zerp, S. F.; van Blitterswijk, W. J., Alkyl-lysophospholipids as anticancer agents and enhancers of radiation-induced apoptosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **2001**, 49, (2), 415-419.
- [172]. Yabushita, H.; Hirata, M.; Noguchi, M.; Nakanishi, M., Vitamin D receptor in endometrial carcinoma and the differentiation-inducing effect of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on endometrial carcinoma cell lines. *J Obstet Gynaecol Res* **1996**, 22, (6), 529-539.
- [173]. Buras, R. R.; Schumaker, L. M.; Davoodi, F.; Brenner, R. V.; Shabahang, M.; Nauta, R. J.; Evans, S. R., Vitamin D receptors in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* **1994**, 31, (2-3), 191-202.
- [174]. Higashimoto, Y.; Ohata, M.; Nishio, K.; Iwamoto, Y.; Fujimoto, H.; Uetani, K.; Suruda, T.; Nakamura, Y.; Funasako, M.; Saijo, N., 1  $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and all-trans-retinoic acid inhibit the growth of a lung cancer cell line. *Anticancer Res* **1996**, 16, (5A), 2653-2659.
- [175]. Kornfehl, J.; Formanek, M.; Temmel, A.; Knerer, B.; Willheim, M., Antiproliferative effects of the biologically active metabolite of vitamin D<sub>3</sub> (1,25 [OH]<sub>2</sub> D<sub>3</sub>) on head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Eur Arch Otorhinolaryngol* **1996**, 253, (6), 341-344.
- [176]. Hedlund, T. E.; Moffatt, K. A.; Miller, G. J., Vitamin D receptor expression is required for growth modulation by 1  $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in the human prostatic carcinoma cell line ALVA-31. *J Steroid Biochem Mol Biol* **1996**, 58, (3), 277-288.
- [177]. Christopherson, W. A.; Porter, J. C.; MacDonald, P. C.; Casey, M. L., Responsiveness of human carcinoma cells of gynecologic origin to 1,25-dihydroxycholecalciferol. *Am J Obstet Gynecol* **1986**, 155, (6), 1293-1296.
- [178]. Saunders, D. E.; Christensen, C.; Wappler, N. L.; Cho, Y. L.; Lawrence, W. D.; Malone, J. M.; Malviya, V. K.; Deppe, G., Additive inhibition of RL95-2 endometrial carcinoma cell growth by carboplatin and 1,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Gynecol Oncol* **1993**, 51, (2), 155-159.
- [179]. Jensen, S. S.; Madsen, M. W.; Lukas, J.; Binderup, L.; Bartek, J., Inhibitory effects of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D(3) on the G(1)-S phase-controlling machinery. *Mol Endocrinol* **2001**, 15, (8), 1370-1380.
- [180]. Simboli-Campbell, M.; Narvaez, C. J.; van Weelden, K.; Tenniswood, M.; Welsh, J., Comparative effects of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and EB1089 on cell cycle kinetics and apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* **1997**, 42, (1), 31-41.
- [181]. Audo, I.; Darjatmoko, S. R.; Schlamp, C. L.; Lokken, J. M.; Lindstrom, M. J.; Albert, D. M.; Nickells, R. W., Vitamin D analogues increase p53, p21, and apoptosis in a xenograft model of human retinoblastoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **2003**, 44, (10), 4192-4199.
- [182]. Banerjee, P.; Chatterjee, M., Antiproliferative role of vitamin D and its analogs—a brief overview. *Mol Cell Biochem* **2003**, 253, (1-2), 247-254.
- [183]. Galior, K.; Grebe, S.; Singh, R., Development of Vitamin D Toxicity from Overcorrection of Vitamin D Deficiency: A Review of Case Reports. *Nutrients* **2018**, 10, (8), 953.
- [184]. Hershberger, P. A.; McGuire, T. F.; Yu, W. D.; Zuhowski, E. G.; Schellens, J. H.; Egorin, M. J.; Trump, D. L.; Johnson, C. S., Cisplatin potentiates 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-induced apoptosis in association with increased mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MEKK-1) expression. *Mol Cancer Ther* **2002**, 1, (10), 821-829.
- [185]. Moffatt, K. A.; Johannes, W. U.; Miller, G. J., 1 $\alpha$ ,25dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and platinum drugs act synergistically to inhibit the growth of prostate cancer cell lines. *Clin Cancer Res* **1999**, 5, (3), 695-703.
- [186]. Zhang, Y.; Zhang, J.; Studzinski, G. P., AKT Pathway Is Activated by 1, 25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and Participates In Its Anti-Apoptotic Effect and Cell Cycle Control in Differentiating HL60 Cells. *Cell Cycle* **2006**, 5, (4), 447-451.

- [187]. Gerl, R.; Vaux, D. L., Apoptosis in the development and treatment of cancer. *Carcinogenesis* **2005**, 26, (2), 263-270.
- [188]. Huang, C. Y.; Da-Tong Ju, D. T.; Chang, C. F.; Reddy, M. P.; Velmurugan, B. K., A review on the effects of current chemotherapy drugs and natural agents in treating non-small cell lung cancer. *Biomedicine* **2017**, 7, (4), 23.
- [189]. Pan, L.; Matloob, A. F.; Du, J.; Pan, H.; Dong, Z.; Zhao, J.; Feng, Y.; Zhong, Y.; Huang, B.; Lu, J., Vitamin D stimulates apoptosis in gastric cancer cells in synergy with trichostatin A /sodium butyrate-induced and 5-aza-2'-deoxycytidine-induced PTEN upregulation. *FEBS J* **2010**, 277, (4), 989-999.
- [190]. Zhang, X.; Jiang, F.; Li, P.; Li, C.; Ma, Q.; Nicosia, S. V.; Bai, W., Growth suppression of ovarian cancer xenografts in nude mice by vitamin D analogue EB1089. *Clin Cancer Res* **2005**, 11, (1), 323-328.
- [191]. Zhang, X.; Li, P.; Bao, J.; Nicosia, S. V.; Wang, H.; Enkemann, S. A.; Bai, W., Suppression of death receptor-mediated apoptosis by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> revealed by microarray analysis. *J Biol Chem* **2005**, 280, (42), 35458-35468.
- [192]. Mathiasen, I. S.; Lademann, U.; Jaattela, M., Apoptosis induced by vitamin D compounds in breast cancer cells is inhibited by Bcl-2 but does not involve known caspases or p53. *Cancer Res* **1999**, 59, (19), 4848-4856.
- [193]. Rashid, S. F.; Moore, J. S.; Walker, E.; Driver, P. M.; Engel, J.; Edwards, C. E.; Brown, G., Uskokovic, M. R.; Campbell, M. J., Synergistic growth inhibition of prostate cancer cells by 1 alpha,25 Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and its 19-nor-hexafluoride analogs in combination with either sodium butyrate or trichostatin A. *Oncogene* **2001**, 20, (15), 1860-1872.
- [194]. Campomenosi, P.; Monti, P.; Aprile, A.; Abbondandolo, A.; Frebourg, T.; Gold, B.; Crook, T.; Inga, A.; Resnick, M. A.; Iggo, R.; Fronza, G., p53 mutants can often transactivate promoters containing a p21 but not Bax or PIG3 responsive elements. *Oncogene* **2001**, 20, (27), 3573-3579.
- [195]. Bokhari, A. A.; Lee, L. R.; Raboteau, D.; Hamilton, C. A.; Maxwell, G. L.; Rodriguez, G. C.; Syed, V., Progesterone inhibits endometrial cancer invasiveness by inhibiting the TGF $\beta$  pathway. *Cancer Prev Res* **2014**, 7, (10), 1045-1055.
- [196]. Bokhari, A. A.; Lee, L. R.; Raboteau, D.; Turbov, J.; Rodriguez, I. V.; Pike, J. W.; Hamilton, C. A.; Maxwell, G. L.; Rodriguez, G. C.; Syed, V., Progesterone potentiates the growth inhibitory effects of calcitriol in endometrial cancer via suppression of CYP24A1. *Oncotarget* **2016**, 7, (47), 77576-77590.
- [197]. Rodriguez, G. C.; Turbov, J.; Rosales, R.; Yoo, J.; Hunn, J.; Zappia, K. J.; Lund, K.; Barry, C. P.; Rodriguez, I. V.; Pike, J. W.; Conrads, T. P.; Darcy, K. M.; Maxwell, G. L.; Hamilton, C. A.; Syed, V.; Thaete, L. G., Progestins inhibit calcitriol induced CYP24A1 and synergistically inhibit ovarian cancer cell viability: An opportunity for chemoprevention. *Gynecol. Oncol* **2016**, 143, (1), 159-167.
- [198]. Fei, H. R.; Chen, G.; Wang, J. M.; Wang, F. Z., Perifosine induces cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell lines by blockade of Akt phosphorylation. *Cytotechnology* **2010**, 62, (5), 449-460.
- [199]. Ríos-Marco, P.; Marco, C.; Gálvez, X.; Jiménez-López J. M.; Carrasco, M. P., Alkylphospholipids: An update on molecular mechanisms and clinical relevance. *Biochim Biophys Acta Biomembr* **2017**, 1859, (9), 1657-1667.
- [200]. Haddur, E.; Ozkaya, A. B.; Ak, H.; Aydin, H. H., The effect of calcitriol on endoplasmic reticulum stress response. *Biochem Cell Biol* **2015**, 93, (3), 268-271.
- [201]. Mathiasen, I. S.; Sergeev, I. N.; Bastholm, L.; Elling, F.; Norman, A. W.; Jäättelä, M., Calcium and Calpain as Key Mediators of Apoptosis-like Death Induced by Vitamin D Compounds in Breast Cancer Cells. *J Biol Chem* **2002**, 277, (34), 30738-30745.
- [202]. Sperandio, S.; de Belle, I.; Bredesen, D. E., An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci* **2000**, 97, 14376-14381.
- [203]. Cirstea, D.; Hideshima, T.; Rodig, S.; Santo, L.; Pozzi, S.; Vallet, S.; Ikeda, H.; Perrone, G.; Gorgun, G.; Patel, K.; Desai, N.; Sportelli, P.; Kapoor, S.; Vali, S.; Mukherjee, S.; Munshi, N. C.; Anderson, K. C.; Raje, N., Dual inhibition of akt/mammalian target of rapamycin pathway by

nanoparticle albumin-bound-rapamycin and perifosine induces antitumor activity in multiple myeloma. *Mol Cancer Ther* **2010**, 9, (4), 963-975.



## ÖZGEÇMİŞ

**Adı ve Soyadı :** Meryem İlkey KARAGÜL

**Doğum Tarihi :** 08.05.1987

**E-mail:** meryemilkay@mersin.edu.tr

### Öğrenim Durumu:

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji Bölümü	Mersin Üniversitesi	2005-2010
Yüksek Lisans	Histoloji ve Embriyoloji	Mersin Üniversitesi	2010-2012
Doktora	Histoloji ve Embriyoloji	Mersin Üniversitesi	2013-2019

### Görevler:

Araştırma Görevlisi 2013	Mersin Üniversitesi/Tıp Fakültesi/Temel Tıp Bilimleri Bölümü/Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
-----------------------------	---

### Projelerde Yaptığı Görevler:

1. İnsan yetişkin ve fetus kavrularında flexor hallucis longus ve flexor digitorum longus tendonları arasındaki sliplerin histolojik ve morfolometrik özellikleri, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı: KARAGÜL Meryem İlkey, Yürütücü: KURTOĞLU Zeliha, Araştırmacı: BEGER Orhan, Araştırmacı: UZMANSEL Deniz, 29/04/2016 (Tamamlandı) (ULUSAL)
2. Perifosine ve Vitamin D Kombinasyonunun Endometriyum Kanseri Hücre Hattı HEC1A Üzerine Etkisi, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı: KARAGÜL Meryem İlkey, Yürütücü: AKTAŞ Savaş, 01/07/2016 (Devam Ediyor) (ULUSAL)
3. N Asetilsistein in Vazodilatatör Etkisinde ATP sensitif Potasyum Kanallarının Rolü ve Gen Ekspresyonunun Etkisi, TÜBİTAK PROJESİ, Araştırmacı: SÖĞÜT Fatma, Yürütücü: ÇÖMELEKOĞLU Ülkü, Bursiyer: KARAGÜL Meryem İlkey, 01/07/2015-01/07/2016 (ULUSAL)
4. SiO<sub>2</sub> nanoparçacığının iskelet kası uyarılma kasılma bağlantısı üzerine etkileri, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı: SÖĞÜT FATMA, Araştırmacı: TÜRKSEVEN Çağatay Han, Araştırmacı: YAMAN Selma, Araştırmacı: EROĞLU Pelin, Araştırmacı: KARAGÜL Meryem İlkey, Araştırmacı: BALLI Ebru, Yürütücü: ÇÖMELEKOĞLU Ülkü, Araştırmacı: YALIN Serap, Araştırmacı: OCAKOĞLU Kasım, Araştırmacı: BATTAL Dilek, 19/11/2012-19/11/2014 (ULUSAL)
5. Polikistik Over Sendromu Oluşturulmuş Fare Over Dokusunda Gdf 9 Ve Bmp 15 Ekspresyonlarının ve İnce Yapı Değişikliklerinin İncelenmesi, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı: KARAGÜL Meryem İlkey, 25/06/2012-25/11/2012 (ULUSAL)

### Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler:

1. Beger O, Koç T, Karagül M. İ., Özdemir D. L., Müdüroğlu F., Cintacioiu D.G., Le H. T., Vayisoğlu Y., Yılmaz Ş. N., Olgunus Z. K., Talas D. Ü. Evaluation of the stapedial tendon growth dynamic in human fetuses. *Surgical and Radiologic Anatomy*, **2019**, 1-7.
2. ELVAN Ö., BEGER O., KARAGÜL M. İ., UZMANSEL D., YILMAZ Ş. N., KURTOĞLU Z. Anatomic and histological analyses of chiasma plantare and long flexor tendons of the foot on human fetuses. *Surgical and Radiologic Anatomy*, **2019**, 1-10.

3. AKTAŞ S., ÜN İ., BARLAS İ. Ö., BATU ÖZTÜRK A., KARAGÜL M. İ. Evaluation of the Rho A/Rho-kinase pathway in the uterus of the rat model of polycystic ovary syndrome. *Reproductive Biology*, **2019**, 19 (1): 45-54.
4. ÇÖMELEKOĞLU Ü., AKTAŞ S., DEMİRBAĞ B., KARAGÜL M. İ., YALIN S., YILDIRIM M., AKAR A., KORUNUR ENGİZ B., SÖĞÜT F., ÖZBAY E. Effect of low-level 1800 MHz radiofrequency radiation on the rat sciatic nerve and the protective role of paricalcitol. *Bioelectromagnetics*, 2018, 39 (8), 631-643.
5. KARAGÜL M. İ., AKTAŞ S., COŞKUN YILMAZ B., YILMAZ M., OREKİCİ TEMEL G. GDF9 and BMP15 Expressions and Fine Structure Changes During Folliculogenesis in Polycystic Ovary Syndrome. *Balkan Medical Journal*, **2018**, 35(1), 43-54.
6. VEZİR Ö., ÇÖMELEKOĞLU Ü., SUCU N., YALINA. E., YILMAZ Ş. N., YALIN S., SÖĞÜT F., YAMAN S., KİBAR D., AKKAPULU M., KARAGÜL M. İ., SEÇER D. N-Acetylcysteine-induced vasodilatation is modulated by KATP channels, Na/K-ATPase activity and intracellular calcium concentration: An in vitro study. *Pharmacological Reports*, **2017**, 69 (4):738-745.
7. KARAGÜL M. İ., BATU A., AKTAŞ S., ÖZKAYA T., AKAR A., ÇÖMELEKOĞLU Ü., OVLA D. Subkronik 1800 MHz elektromanyetik alan uygulanmasının sıçan tubauterina ampullası üzerine etkileri. *Mersin Univ Sağlık Bilim Derg*, **2017**, 10 (1), 1-13.
8. YAMAN S., ÇÖMELEKOĞLU Ü., DEĞİRMENCİ E., KARAGÜL M. İ., YALIN S., BALLI E., YILDIRIMCAN S., YILDIRIM M., DOĞANER A., OCAKOĞLU K. Effects of silica nanoparticles on isolated rat uterine smooth muscle. *Drug and Chemical Toxicology*, **2017**, 1-11.
9. BALLI E., ÇÖMELEKOĞLU Ü., YALIN S., BATTAL D., OCAKOĞLU K., SÖĞÜT F., YAMAN S., TÜRKSEVEN Ç., EROĞLU P., KARAGÜL M. İ., YILDIRIMCAN S. Toxic Effects Of Silica Nanoparticles On Heart: Electrophysiological, Biochemical, Histological And Genotoxic Study. *Fresenius Environmental Bulletin*, **2016**, 25, 612-622.

**Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında (Proceedings) Basılan Bildiriler:**

1. KARAGÜL M. İ., AKTAŞ S., YETKİN D., BAYRAK G., ÇELİKCAN H. D. (2018). P53, Bcl2 and Bax expression and apoptosis in perifosine and vitamin d-treated endometrialcancer cell line (HEC1A). the 2nd International Cell Death Research Congress, 2(25), 1564, Doi: 10.3390/proceedings2251564 (Tam Metin Bildiri/Poster)(Yayın No:4565404).
2. AKTAŞ S., ÜN İ., BARLAS İ. Ö., BATU ÖZTÜRK A., KARAGÜL M. İ., ÜNVAN M. (2018). Polikistik over sendromu oluşturulmuş sıçanların uteruslarında rho a/rho-kinaz ekspresyonu ve spontan kontraksiyon değişiklikleri. 14. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:4434287)
3. ELVAN Ö., BEGER O., KARAGÜL M.İ., UZMANSEL D.,YILMAZ Ş.N., KURTOĞLU Z. (2018). Anatomik andhistological analysis of chiassma plantare and long flexor tendons of the foot on human fetuses. the International Mediterranean Anatomy Congress and to the 19th National Anatomy Congress (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:4366582)
4. KARAGÜL M. İ., AKTAŞ S., YETKİN D., KİBAR K., ÇELİKCAN H. D. (2017). The effect of perifosine and vitamin d combination on endometrial cancer cell line (HEC1A). 3 rd International Multidisciplinary Symposium on Drug Research and Development-DRD 2017, 148 (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:3856623)
5. SEVİN F., KARAGÜL M. İ., YILMAZ Ş. N., KİBAR K., TÜRKEGÜN M. (2017). Effects of revascularization when different alloplastic implant materials are used in adjacently with acellular dermal matrix. 15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No:3737253)
6. EROĞLU P., ÇÖMELEKOĞLU Ü., YALIN S., SÖĞÜT F., YAMAN S., BALLI E., KARAGÜL M. İ., YALIN A. E. (2017). Farklı boyutlardaki silisyum dioksit nanoparçacıklarının karaciğer ve böbrek üzerine etkileri. III. Mediterranean Pharmacy Congress (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:3937785)
7. Çalışkan M, KARAGÜL M. İ., AYTEKİN C., AYGÜN Y. C., COŞKUN YILMAZ B., ERDEM E. (2017). Prepisyumun yaşa bağlı histolojik değişimi. 14. Türk Çocuk Ürolojisi Kongresi, 1 (1), 30 (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:3841194)
8. KOÇ M. İ., ÖZBAY E., SÖĞÜT F., YILDIRIM M., DEMİRBAĞ B., AKTAŞ S., AKAR A., YALIN S., ÇÖMELEKOĞLU Ü. (2016). The effects of paricalcitol on rat peripheral nerve following exposure to 1800 mhz electromagnetic fields. 1st International Mediterranean Science and Engineering Congress (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:3389991)
9. SÖĞÜT F., ÇÖMELEKOĞLU Ü., VEZİR Ö., SUCU N., YALIN A. E., YALIN S., YILMAZ Ş. N., YAMAN S., KOÇ M. İ., KİBAR K., SEÇER D., AKKAPULU M. (2016). The role of ATP sensitive potassium channels in the

- vasodilatory effect of N acetylcysteine. The 41st FEBS Congress Molecular and Systems Biology for a Better Life (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:3390077)
10. YAMAN S., ÇÖMELEKOĞLU Ü., YALIN S., YILDIRIM M., BALLI E., KOÇ M. İ., OCAKOĞLU K., YILDIRIMCAN S. (2016). The effects of SiO<sub>2</sub> nanoparticles of rat uterine smooth muscle. The 41st FEBS Congress Molecular and Systems Biology for a Better Life (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:3390143)
  11. YETKİN D., KOÇ M. İ., KİBAR K., BALLI E., YILMAZ Ş. N., TÜRKEGÜN M. (2016). Real time monitoring of the effects of tamoxifen and vitamin D on proliferation of breast cancer cell line. 6. MultiDiSiPliNer Kanser Araştırma Kongresi (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:3390208)
  12. KOÇ MERYEM İLKAY, BATU AYLA, AKTAŞ SAVAŞ, ÖZKAYA TÜLAY, OVLA HAVVA DİDEM (2015). Subkronik 1800 MHz Elektromanyetik alan uygulanmasının sıçan tuba uterina ampullasındaki etkileri. Elektromanyetik Alanlar ve Etkileri 2015 sempozyumu (Tam Metin Bildiri/Poster)(Yayın No:3389901)
  13. YAMAN S., ÇÖMELEKOĞLU Ü., KARAGÜL M. İ., AKTAŞ S., YETKİN D., DEĞİRMENCİ E., ÇELİKCAN H. D. (2013). Polikistik over sendromunda miyometriyum düz kaslarının kasılma kinetiği, alfa aktininekspreyonu ve ince yapı değişikliklerinin incelenmesi. 25. Ulusal Biyofizik Kongresi (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:4397115)
  14. KARAGÜL M. İ., AKTAŞ S. (2013). Polikistik over sendromu oluşturulmuş fare over dokusunda gdf 9 ve bmp 15 ekspresyonlarının ve ince yapı değişikliklerinin incelenmesi. 21. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi (Uluslararası Katılımlı) (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:489264)
  15. YAMAN S., SÖĞÜT F., KARATAŞ İ., KARAGÜL M. İ., EROĞLU P., ÇÖMELEKOĞLU Ü., YALIN S., DAĞTEKİN A., BALLI E. (2012). Hypericum perforatumun sıçan zedelenmiş periferik sinir modelinde sinirrejenasyonu üzerine etkisi. 24.Ulusal Biyofizik Kongresi (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:4397152)
-