T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

NF-KB TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİ ÜZERİNDE FLAVONOİD ETKİSİNİN ENDOMETRİUM HÜCRE SOYLARI KULLANILARAK ARAŞTIRILMASI

ZEYNEP BİRSU ÇİNÇİN

DANIŞMAN
PROF.DR. BEDİA ÇAKMAKOĞLU

MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

İSTANBUL-2014

TEZ ONAYI

(Bu sayfa yerine, başarılı geçen Tez Sınavı sonrası sınav tutanağı ekinde yer alan Tez Onay sayfası gelecektir.)

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

ZEYNEP BİRSU ÇİNÇİN

İTHAF

Anneme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Doktora sürecim boyunca bilgi ve görüşleri ile beni yönlendiren, hem hocalık yapıp hem de çocuğu gibi görerek manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen danışmanım, İstanbul Üniversitesi Moleküler Tıp Öğretim Üyesi Prof. Dr. Bedia ÇAKMAKOĞLU 'na teşekkür ederim.

İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE) Moleküler Tıp Anabilim Dalı kurucusu, emekli öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Turgay İSBİR'e,

Tez çalışmam sürecinde çalışmalarım sırasında gösterdikleri tüm yardımlar için, İstanbul Üniversitesi Moleküler Tıp Bölüm Başkanı Prof.Dr.İlhan YAYLIM, İstanbul Üniversitesi Moleküler Tıp Öğretim Üyeleri Doç.Dr. Arzu ERGEN, Doç.Dr. Ş.Ümit ZEYBEK'e teşekkür ederim.

Tez çalışmamda yer alan kaspaz-3,JC-1 ve Annexin-V/FITC deneylerinin deneylerinin yapılması için teknik ekipman ve kit yardımlarını esirgemeyen İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Öğretim Üyesi Doç.Dr. Yusuf BARAN ve ekibine ile Kastamonu Üniversitesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Doç.Dr. Bayram KIRAN'a teşekkür ederim.

Tez çalışmam sürecinde çalışmalar sırasında gösterdikleri yardımlar için tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Yaşamıma kattıkları tüm güzellikler, her türlü maddi ve manevi destekler için Hülya CANAKAN, Gaye DANIŞAN ve Can OĞUZOĞLU'na teşekkür ederim.

Hayatım boyunca beni hiç yalnız bırakmayan,destekleyen,yüreklendiren biricik enerji kaynağım annem Z.Biriz ARCAN'a teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 18268

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
BEYAN ..... İİİ
İTHAF ..... İV
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
TABLOLAR LİSTESİ ..... İX
ŞEKİLLER LİSTESİ X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... Xİ
ÖZET ..... Xİİ
ABSTRACT ..... Xİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. Endometrium Kanseri 3
2.1.1. İnsidans 3
2.1.2. Risk Faktörleri 3
2.1.3. Moleküler Patoloji 4
2.1.4. Endometrium Kanser Gelişiminde Etkili Sinyal İletim Yolakları 7
2.1.4.1. PI3K/AKT/mTOR Yolağı 7
2.1.4.2. RAS/RAF/MAPK Yolağı 9
2.1.4.3. Fibroblast Büyüme Faktörü 11
2.1.4.4. HER2/Neu ve EGFR 13
2.1.4.5. Wnt/β-Katenin Sinyal İletimi 13
2.1.4.6. TP53 14
2.1.5. Endometrium Kanser Gelişiminde Steroid Hormonların Rolü 14
2.1.5.1. Östrojen ve Progesteron Sinyal İletim Sistemi 14
2.1.5.2. Östrojen,Progesteron ve İnflamasyon İlişkisi 15
2.1.6. Endometrium Kanser Gelişiminde İnflamasyonun Rolü 17
2.1.6.1. İnflamatuar Sisteminde Önemli Bir Yolak: NF-κB (Nükleer faktör κB) 18
2.1.6.2. NF-κB Aktivasyon Yolakları 20

2.1.6.3. Kanser Tedavisinde NF-κB Direnci.....22
2.2. Flavonoidler.....22
2.2.1. Hesperidin.....23
2.2.2. Kersitrin.....24
2.2.3. Kanser Gelişiminde NF-kB Yolağı Üzerinde Flavonoid Etkisi.....25
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....26
3.1. Kullanılan Materyaller.....26
3.1.1. Kimyasal Malzemeler.....26
3.1.2. Cihazlar.....27
3.2. Yöntem.....27
3.2.1. ECC-I Hücre Hattı.....27
3.2.2. Hücre Ekimi.....27
3.2.3. Alt Kültür.....28
3.2.4. Hücre Dondurma.....28
3.2.5. Hesperidin ve Kersitrin Solüsyonlarının Hazırlanması.....28
3.2.6. WST-1 Hücre Canlılık Testi.....29
3.2.7. LDH Hücre Sitotoksisite Testi.....30
3.2.8. Cell Death Detection ELISA Plus (CCD) Kolorimetrik Apoptoz Tayini.....31
3.2.9. Kaspaz-3 Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....32
3.2.10. Mitokondri Zar Potansiyelinin Belirlenmesi.....33
3.2.11. Akış Sitometrik Annexin-V Apoptoz/Nekroz Analizi.....33
3.2.12. Hücre Deney Verilerin İstatistiksel Analizi.....34
3.2.13. Mikroarray Analizi.....35
3.2.13.1. RNA İzolasyonu.....35
3.2.13.2. Mikroarray Yöntemi.....35
3.2.13.3. Normalizasyon ve Transformasyon.....35
4. BULGULAR.....36
4.1. Flavonoidlerin Hücre Canlılığı Üzerinde Doz ve Zaman Bağımlı Etkisi..36
4.2. Flavonoidlerin Hücre Üzerinde Olası Sitotoksik Etkisinin İncelenmesi...37
4.3. Canlılığı Etkileyen Hücre Ölüm Tipinin Belirlenmesi.....39
4.3.1. Cell Death Detection ELISAPLUS Kolorimetrik Kit ile Apoptoz Tayini.....39

4.3.2. Kaspaz 3 Aktivitesinin İncelenmesi.....40
4.3.3. Mitokondri Zar Potansiyelinin Belirlenmesi.....41
4.3.4. AnnexinV-FITC Yöntemi ile Apoptoz/Nekroz Analizi.....42
4.4. Mikroarray Analizleri 44
4.4.1. İstatistiksel Analiz.....44
4.4.2. Hiyerarşik kümeleme ve Heatmap.....44
4.4.3. Biyolojik Fonksiyon ve Yolak Analizleri 46
4.4.3.1. Hesperidin'in ECC-1 Hücre Hattında Tüm Genom Üzerine Etkisinin İncelenmesi 46
4.4.3.2. Kersitrin'in ECC-1 Hücre Hattında Tüm Genom Üzerine Etkisinin İncelenmesi 49
5. TARTIŞMA 52
KAYNAKLAR 57
HAM VERİLER 80
FORMLAR 81
ETİK KURUL KARARI 82
PATENT HAKKI İZNİ 83
TELİF HAKKI İZNİ.....84
ÖZGEÇMİŞ 85

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1 Endometrium kanserlerinin klinik ve histolojik özellikleri 5

Tablo 2 Endometrium kanserlerinde görülen genetik alternasyonlar 6

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1 Tip I ve Tip II Endometrium Kanser Hücre Morfolojileri 6
Şekil 2 PI3K/AKT/mTOR yolağının endometrium kanser ile ilişkili diğer yolaklar ile çapraz etkileşimi 8
Şekil 3 FGF Sinyal İletim Yolağı 12
Şekil 4 Endometrium kanserinde östrojen,inflammatuar aracılar ve genetik bileşenler arasındaki ilişki 16
Şekil 5 Endometrium Kanserinde Gelişen İnflammatuar Durumlar 18
Şekil 6 NF-κB ailesi üyelerinin moleküler yapısı 19
Şekil 7 IκB ailesi 19
Şekil 8 NF-κB Aktivasyon Mekanizmaları 21
Şekil 9 Hesperidin Moleküler Yapısı 24
Şekil 10 Kersitrin Moleküler Yapısı 24
Şekil 11 Hesperidin'in ECC-1 Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi 36
Şekil 12 Kersitrin'in ECC-1 Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi 37
Şekil 13 Hesperidin'in ECC-1 Hücre Hattında Sitotoksik Etkisinin İncelenmesi 38
Şekil 14 Kersitrin'in ECC-1 Hücre Hattında Sitotoksik Etkisinin İncelenmesi 38
Şekil 15 ECC-1 Hücre Hattında CCD ile Hesperidin'in Apoptoz Etki Tayini 39
Şekil 16 ECC-1 Hücre Hattında CCD ile Kersitrin'in Apoptoz Etki Tayini 40
Şekil 17 Hesperidin'in Kaspaz 3 Aktivitesi Üzerine Etkisi 40
Şekil 18 Kersitrin'in Kaspaz3 Aktivitesi Üzerine Etkisi 41
Şekil 19 Hesperidin'in Mitokondriyel Membran Potansiyeli Üzerine Etkisi 41
Şekil 20 Kersitrin'in Mitokondriyel Membran Potansiyeli Üzerine Etkisi 42
Şekil 21 ECC-1 hücrelerine hesperidin uygulanması ile elde edilen hücre dağılımları 42
Şekil 22 ECC-1 hücrelerine Kersitrin uygulanması ile elde edilen hücre dağılımları 43
Şekil 23 Hesperidin'nin ECC-1 hücrelerine apoptotik/nekrotik etkisi 43
Şekil 24 Kersitrin'nin ECC-1 hücrelerine apoptotik/nekrotik etkisi 43
Şekil 25 Hesperidin indüklü ve normal hücre örneklerinin heatmap haritası 45
Şekil 26 Kersitrin indüklü ve normal hücre örneklerinin heatmap haritası 45
Şekil 27 Network Analizi 46
Şekil 28 Biyolojik Fonksiyon Analizi 46
Şekil 29 Fold-change değeri en yüksek olan genler 47
Şekil 30 Fold-change değerleri düşük olan genler 47
Şekil 31 NF-κB Sinyal İletim Yolağı 48
Şekil 32 Östrojen Sinyal İletim Yolağı 48
Şekil 33 Network Analizi 49
Şekil 34 Gen-Gen ilişkisi 49
Şekil 35 Hastalık ve Metabolizma Bozuklar ile İlişkili Biyolojik Yolaklar 50
Şekil 36 Moleküler ve Hücresel Fonksiyonlar ile İlişkili Biyolojik Yolaklar 50
Şekil 37 Fizyolojik Sistemler ile İlişkili Biyolojik Yolaklar 50
Şekil 38 NF-κB Yolağı 51
Şekil 39 PI3K Akt Yolağı 51

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

AR	Androjen reseptörü
BRAF	v-raf murin sarkoma viral onkogen homolog B
Ca^{2+}	Kalsiyum iyonu
CT-FBS	Charcoal treated FBS
D-MEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
EC	Endometrial Kanser
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	Epidermal büyüme faktörü
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ER	Östrojen reseptörü
FBS	Fetal bovine serum
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
GH	Büyüme hormonu
HER-2	İnsan epidermal büyüme faktör reseptörü-2
IGF-1	İnsulin-benzeri büyüme faktörü-1
IKK	İnsulin-benzeri büyüme faktörü bağlanma proteini
IκB	Nükleer Faktör κB İnhibitörü
IR	İnsülin reseptörü
IRS-1	İnsülin reseptör substrat-1
NF-κB	Nükleer Faktör κB
KRAS	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarkoma viral onkogen homolog
MAPK	Mitojen ile aktif olan protein kinaz
Mg^{2+}	Magnezyum iyonu
PBS	Fosfat Tuz Çözeltisi
PR	Progesteron Reseptörü
PI3K	Fosfoinozitol-3-Kinaz
RTK	Reseptör Tirozin Kinaz

ÖZET

Çinçin ZB. NF-κB Transkripsiyon Faktörleri Üzerinde Flavonoid Etkisinin Endometrium Hücre Soyları Kullanılarak Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp ABD. Doktora Tezi. İstanbul. 2014.

Endometrium kanseri, dünya çapında bayanlar arasında en sık görülen jinekolojik kanser türü olup, yüksek östrojen seviyesi, endometrial karsinoma oluşumunda en büyük risk faktörü olarak bilinmektedir. Östrojen reseptörleri, nükleer reseptör süperailesi üyesi olup, hücre içinde hedef genlerde bulunan promotor bölgelerin yanıt elementlerine bağlanarak, NF-κB gibi önemli hedef genlerin transkripsiyonuna neden olmaktadır. Tümöral hücrelerde, NF-κB sürekli aktif halde bulunmakta olup bu durum NF-κB kontrolü altındaki genlerin ekspresyon seviyelerinde değişime yol açmaktadır.

Flavonoidler, doğal bitki bileşikleri olup, antiproliferatif ve antikarsinogenik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada, flavonoidlerin endometrium kanserinde yeni bir tedavi yaklaşımı olasılığını araştırmak için, kersitrin ve hesperidin flavonoidleri ile indüklenmiş ECC-1 endometrial kanser hücre soyları kullanılmıştır. Bu bileşiklerin hücre proliferasyon ve canlılığı üzerinde doza bağımlı etkisi WST-1 ve LDH sitotoksisite deneyi, bu etkinin apoptoz ile olası ilişkisi ELISA, kaspaz-3,JC-1 ve AnnexinV-FITC yöntemleri kullanılarak incelenmiştir. Son aşamada, NF-κB yolağında bulunan hedef genlerin flavonoid etkisi altındaki gen ekspresyonları,tüm genom mikrodizin yöntemi ile profillenmiştir.

Bu çalışma sonucunda, ECC-1 hücre soyu üzerinde, hesperidin ve kersitrin bileşiklerinin etkisinin, doz ve zamana bağlı olarak kaspaz-3 aktivitesinde, mitokondriyal membran potansiyelinde ve apoptotik hücre popülasyonunda artışa neden olduğu tespit edilmiştir. Biyoinformatik analizleri sonucunda, NF-κB etkisinin IκB ailesi etkisi ile baskılandığı ve bu durumun PI3K/AKT ve Ras-Raf- MAPK sinyal iletim yolları ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir.

Literatürde ilk kez, değişik endometrium hücre soyunda kersitrin ve hesperidin etkisi ayrıntılı olarak incelendiği için çalışmamız orijinal bir değer taşımaktadır. Elde ettiğimiz veriler, özellikle kanser tedavisi için yeni çalışma alanları doğuracak ve çalışmamız yeni tedavi seçeneklerinin arasında yer alarak bilime katkıda bulunacaktır.

Anahtar Kelimeler: Endometrium Kanser, Hesperidin, Kersitrin, NF-κB ,Mikrodizin

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 18268

ABSTRACT

Cincin ZB. The Effect of Flavonoids on NF-KB Transcription Factors in Endometrial Cancer Cell Lines. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Molecular Medicine. İstanbul. 2014.

Endometrial carcinoma is the most common gynecological malignancy among women in worldwide. Studies demonstrated that hyperestrinism is the most important risk factor on the development of endometrial cancer. Estrogen receptors are members of the nuclear receptor superfamily that binds to estrogen response elements in the promoter regions of target genes such as NF-κB in a cell. During this process, NF-κB becomes constitutively activated that cause dysregulation expression of down-stream signaling pathway.

Recent studies showed that flavonoids have antiproliferation and anticarcinogenic effects. In this study, we used hesperidin and quercitrin stimulated ECC-1 endometrial cancer cell lines to investigate whether flavonoids are new therapeutic approach on endometrial cancer. Dose-dependent effects of these compounds were studied by WST-1 and LDH assays for cell proliferation and viability. The relation between apoptosis and cytotoxicity analyzed subsequently by ELISA,caspase-3,JC-1 and Annexin-V FITC methods. The expression profiling of NF-κB signaling pathway under flavonoid effect analysed by whole genome expression microarray.

There were significant increases in caspase-3 activity, loss of MMP, and increases in apoptotic cell population in response to hesperidin in ECC-1 endometrial cancer cells in a time- and dose-dependent manner. After bioinformatics analysis, we demonstrated that NF-κB members were inhibited with IκB proteins by affecting PI3K/AKT and Ras-Raf- MAPK signalling pathways.

Results of our study will be encouraging for the new project areas and obtained data make possible to find out some new approaches in the treatment of cancer.

Key Words: Endometrial Cancer,Hesperidin,Quercitrin,NF-κB ,Microarray

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 18268

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Endometriyal epiteliyal hücrelerin neoplastik olarak büyümesi sonucu oluşan endometrium kanseri, batılı ve gelişmiş ülkelerde en sık görülen jinekolojik malignansi tipidir [1]. Hastaların %86'sı 50 yaşının üzerinde olup, genellikle post-menopoz döneminde bulunan bayanlarda görülmektedir [2]. Nulliparite, geç menopoz, obezite ve östrojen hormon replasman tedavisi endometrium kanser gelişimi ile en yakın ilişkili risk faktörleri olarak göze çarpmaktadır. Belirtilen risk faktörlerinin, hastaların östrojen düzeyinde artış şeklinde ortak özellik paylaştığı bildirilmiştir [3-5]. Bu nedenle, yüksek östrojen ve düşük progesteron seviyelerinin endometriyal kanser hücre proliferasyonunu hızlandırarak kanser gelişim riskini arttırdığını ileri sürülmektedir. Bununla birlikte, yapılan çalışmalar inflammatuar faktörlerin endometrial adenokarsinoma gelişimini arttırdığını ve risk faktörleri arasında yer aldığını da ortaya koymaktadır [6].

Tümör progresyonunda kronik inflamasyonun önemini belirten çalışmaların, inflamasyon ilişkili kanser modellerinde yapılan moleküler çalışmalar ile uyum gösterdiği tespit edilmiş olup, tümörogenez sürecinde NF-κB aracılı inflamasyonun merkezi rol oynadığı bildirilmiştir [7-8]. NF-κB tümörogenez ile ilişkili olan hücresel değişiklikler ile birlikte büyüme inhibisyonuna duyarsızlık, apoptotik sinyallere rezistans, immortalizasyon, anjiogenez, doku invazyonu ve metastaz süreçlerini de indüklemektedir [9-11]. Kanser hücrelerinde NF-κB aktivasyonunun konstitütif şekilde görüldüğü tespit edilmiştir [11].

Endometrium kanseri ile yapılan çalışmalarda, nukleusa NF-κB lokalizasyonunda artış tespit edilmiş ve inflamasyonun NF-κB aracılı olarak gerçekleştiği ileri sürülmüştür [12]. HEC-1A endometrium kanser hücrelerinde yapılan bir çalışmada, NF-κB 'nin VEGF ve FGF anjiogenik faktörleri ile IL-1,IL-8 ve TNF-α sitokinlerinin ekspresyonlarının artması için östrojen tarafından aktive edilebildiği gösterilmiştir [13]. HEC-1A,KLE ve AN3CA hücreleri üzerinde yapılan farklı çalışmada, östrojen indüklü NF-κB sinyalizasyonunu takiben bir proteaz olan MMP9 salınımı yapıldığı bildirilmiştir [14]. Bu çalışmalar, endometrium kanserinde östrojen artışının NF-κB aracılı inflamasyon ile ilişkili olabileceğini işaret etmektedir.

NF-κB'nin iyonize ajanlar ve kemoterapötik ajanlar aracılığı ile indüklenebilen apoptoz sürecini inhibe ettiği gösterilmiştir [15]. Bazı tümör tiplerinde, radyasyon veya kemoterapötik ilaçlara maruz kalan hücrelerde, NF-κB aktivasyonunda artış tespit edilmiş ve apoptoza karşı direnç oluşturduğu gösterilmiştir [16-18]. Yapılan çalışmalarda çeşitli tümör örneklerinde yüksek seviyede NF-κB aktivitesinin tespit edilmesi kanser tedavisinde NF-κB inhibisyonunun kullanılmasını düşündürmüştür. Ancak bu konuda yapılan çalışmaların sonucunda, sistemik NF-κB inhibisyonunun ciddi yan etkileri tespit edilmesiyle, hücreye toksik etki yaratmayacak doğal ürünlerle NF-κB inhibisyonunun sağlanması kanser tedavisinde yeni bir ilgi odağı haline gelmiştir. Bu bağlamda, doğada yaygın olarak bulunan ve insan diyetinin önemli bir parçası olan flavonoidler özel bir ilgi görmüştür. Flavonoid ailesi,flavononlar, kalkonlar, flavonlar, flavonollar, isoflavonlar ve antosiyanidinler olmak üzere altı adet majör alt gruba sahiptir [19-20]. Yapılan araştırmalar ile flavonoidlerin antioksidan, antianjiogenik ve antiproliferatif özelliklerinin yanısıra potansiyel antikarsinojenik etkileri de gösterilmiştir [21-24]. Flavonoidler, doğada genellikle glikozit formları halinde bulunmakta, bu form sindirimde bozulmadan ince bağırsaktan emilebildiği için biyoyararlanımının yüksek olabileceği ileri sürülmektedir [25-26].

Literatürde, flavonoidlerin farklı hücrelerde NF-κB hedefli sinyal iletim yolları üzerine etkisine ait yayınlar bulunmakla birlikte, glikozidik formların endometrium kanseri üzerinde etkisini ve bu etkinin NF-κB yolağı ve diger yolaklar ile ilişkisini inceleyen çalışma bulunmaktadır [27-40]. Tez çalışmamızda, iki ayrı flavonoid bileşiğinin (hesperidin ve kersitrin) endometrium kanseri hücre proliferasyonu ve apoptoz üzerinde doz-zaman bağımlı etkileri incelenerek, bu etkinin NF-κB yolağı ile ilişkisi incelenmek istenmektedir. Bu projeden elde edilen verilerin, endometrium kanseri için yeni, özgün ve hedefe yönelik bir tedavi yöntemi geliştirilmesine katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Endometrium Kanseri

2.1.1. İnsidans

Endometrium kanseri dünya çapında bayanlar arasında en sık görülen jinekolojik kanser türüdür [41]. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2008 GLOBOCAN verilerine göre her yıl tahmini olarak 287.000 yeni hasta tanımlanmakta ve 74.000 ölüm tespit edilmektedir [42]. Endometrium kanser insidans değerleri ülke ekonomilerine göre değişkenlik göstermekte olup, en yüksek insidans oranları Kuzey Amerika, Merkezi ve Doğu Avrupa bölgelerinde, en düşük insidans oranları ise Orta ve Batı Afrika bölgelerinde görülmektedir [43]. Ayarlanmış yaş oranlarına göre inceleme yapıldığında ise, insidans değerleri düşük gelirli ülkelerden gelişmiş ülkelere doğru artış göstermektedir. Kuzey Amerika ve Avrupa'nın bazı bölgelerinde, ayarlanmış yaş oranları her 100.000 bayan popülasyonunda 15 iken, bu sayı Asya ve çoğu Afrika bölgelerinde 5'ten azdır [43]. Endometrium kanseri genellikle 45 yaşın üzerinde bayanlarda görülmekte olup, hastaların büyük çoğunluğu ortalama olarak 62 yaşında ve postmenopozal dönemde endometrium kanserine yakalanmıştır [44-45]. Yapılan araştırmalar, endometrium kanser insidansının gelişmiş ülkelerde yüksek olmasını, ortalama yaşam süresi,obezite ve hormon replesman tedavisi gibi yaşamsal faktör farklılıklarına dayandırmaktadır [46].

2.1.2. Risk Faktörleri

Endometrial bezler ve stroma proliferasyonu östrojen hormonu tarafından uyarıldığı için, endojen ve eksojen durumlarda oluşan yüksek östrojen seviyesi (hiperöstrojenizm) endometrial hiperplazi ve endometrial karsinoma oluşumunda en büyük risk faktörü olarak bilinmektedir [47]. Vaka kontrol çalışmaları, karşıtsız (unopposed) östrojen tedavisi alan bayanlarda endometrium kanser riskinin almayan bayanlara göre 2 -10 misli fazla olduğunu göstermiştir [48-50].

Östron hormonu yağ doku tarafından üretildiği için, obezite endometrium kanser oluşumuna neden olan diğer önemli risk faktörü olarak göze çarpmaktadır [50]. Postmenopozal bayanlarda, yağ dokunun birincil östrojen kaynağı olarak kullanılmasına bağlı olarak, aromataz enzimi tarafından östrona dönüşüm hormonal dengesizliğe neden olmakta ve tümorognez sürecini tetiklemektedir [51]. Meta analiz sonuçları endometrium kanserinin obezite nedenli kanser türleri arasında olduğunu göstermektedir [52].

Meme kanseri tedavisinde kullanılan tamoksifen'in endometrium kanser riski ile bağlantılı olduğu gösterilmştir [53]. Tamoksifen ile meme kanseri tedavisi gören bayanlarda endometrium kanseri oluşma riskinin kontrollere göre 7.5 kat fazla olduğu bildirilmiştir [53]. Polikistik over sendromu, östrojen üreten tümörler, nulliparite veya inferitilite hikayesi, düzensiz menstrual döngüler, erken yaşta menars, geç yaşta menopoz, diyabet ve hipertansiyon endometrium kanseri oluşumda etkili diğer risk faktörleri olarak bilinmektedir [51,54-55].

2.1.3. Moleküler Patoloji

Endometrium kanseri, klinik, patolojik ve moleküler özelliklerine göre farklılık gösteren iki alt gruba ayrılmaktadır [56]. Endometrioid karsinoma olarak da bilinen Tip I karsinoma, bütün endometrium kanserlerinin %70-%80'inin oluşturmakta ve düşük derece evrede endometrioid histolojik özellikler göstermektedir [56-57]. Tip I endometrioid karsinoma, genellikle aşırı östrojen varlığında oluşmaktadır. Tip I tümörler, anahtar görevi gören birçok sinyal iletim proteininde oluşan genetik değişikler ile karakterize edilmektedir. Yapılan çalışmalar, Tip I tümörlerde, PTEN (fonksiyon kaybı veya delesyon), PIK3CA, CTNNB1 (fonksiyon kazanımı), KRAS (aktivasyon) ve FGFR2 mutasyonları ile birlikte ER/PR ve epidermal büyüme faktör reseptörünün aşırı seviyede eksprese edildiğini göstermiştir [58-72]. Bu kanser tipi erken teşhis edilebilmekte ve beş yıllık sağkalım oranları evre 1 için %97 ve evre 2 için % 80'dir [73].

Endometrioid olmayan endometrial kanser tipi olarak bilinen Tip II karsinomalar ise, endometrium kanserlerinin %10 ila %20'ini kapsamaktadır [56]. Bu kanser türü morfolojik olarak seröz ve berrak hücre özelliği taşımakta olup östrojen bağımsızdır. Tip I tümörlerin taşıdığı genetik mutasyonlar Tip II tümörlerde yaygın olarak görülmemekte ve birbirlerinden farklı mutasyonlar içermektedir. Yapılan çalışmalar ile Tip II tümörlerde, p53 [58,60,67] ve p16 [72] inaktivasyonu, E-kadherin ekspresyonunun kaybı veya azalması [57] ile birlikte EGFR/HER2/ERBB2 (avian eritroblastik lösemi viral onkogene homolog) genlerinde aşırı ekspresyon bildirilmiştir [60,75-76]. Tip II endometrium kanseri, tip I endometrium kanserine göre daha düşük prognoza sahiptir ve endometrium kanseri nedenli ölümlerin %44'ünü içermektedir [76]. Şekil 1'de endometrium kanser tiplerine ait patoloji görüntüleri mevcuttur. Tablo I'de Tip I ve Tip II endometrium kanserinin klinik ve histolojik özellikleri, Tablo 2'de ise moleküler genetik değişimler karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

Tablo 1 Tip I ve Tip II endometrium kanserlerinin klinik ve histolojik özellikleri

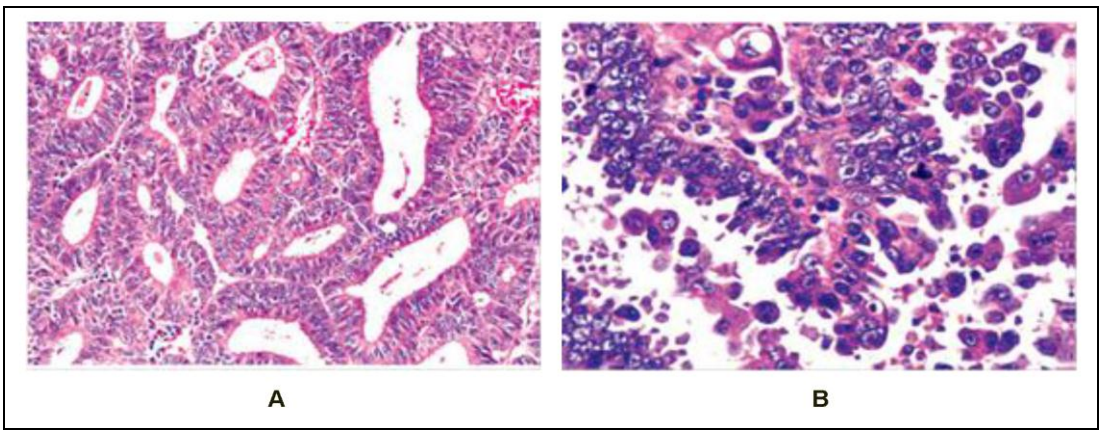
	Tip I	**Tip II**
Histoloji	Endometrioid	Endometrioid değil (seröz ve berrak hücre)
Endometrium geçmişi	Hiperplazi	Atrofi
Tümör derecesi	Düşük	Yüksek
Hormon reseptörleri	ER/PgR+	ER/PgR-
Miyometrial invazyon	Süperfizyal	Derin
Ortalama teşhis yaşı	61.9-63.7	66.8-69.3 (seröz), 64.1-66.4 yaşları (berrak hücre)
Östrojen ilişkisi	Evet	Hayır
Diagnoz	Erken evre	Geç evre
	%86 FIGO evre I ve II	FIGO evre 3 ve evre 4: %41 seröz , %33 berrak hücre
Prognoz	İyi	Zayıf
5 yıllık sağkalım süreleri (FIGO evrelerine göre)	**I** %90	**I** %80 seröz,%85 berrak hücre
	II %80	**II** %41 seröz,%63 berrak hücre
	III %68	**III** %38 seröz, %49 berrak hücre
	IV %26	**IV** %8 seröz,%6 berrak hücre

Seröz ve berrak hücreli adenokarsinomalar tip II endometrial kanserler içinde en yaygın çalışılan histolojik alt tiplerdir. ER, Östrojen Reseptör; FIGO, Uluslararası Jinekoloji Federasyonu; PgR, Progesteron reseptörü. [6]

Tablo 2 Tip I ve Tip II endometrium kanserlerinde görülen genetik alternasyonlar

Genetik Alternasyon	Tip I Tümörler (%)	Tip II Tümörler (%)
ER/PR Ekspresyonu	>90	0-31
PTEN Fonksiyon kaybı	55-83	≈10
EGFR Aşırı Ekspresyonu	46	34
PI3KCA mutasyonu	28-36	15-50
CTNNB1 fonksiyon kazanımı	23-38	Nadir
KRAS aktivasyon mutasyonu	13-26	0-10
FGFR mutasyonu	10-16	2
p53 inaktivasyon mutasyonu	5-17	80 ile >90
P16 inaktivasyonu	10	40
HER2/ERBB2 aşırı ekspresyonu	< 3	18-25
HER2/ERBB2 gen amplifikasyonu	1	17-25

EGFR,Endometrial büyüme faktörü reseptörü; ER,Östrojen Reseptörü; ERBB2,V-ERB-B2, avian eritroblastik lösemi viral onkohen homolog 2; FGR, fibroblast büyüme faktör reseptörü; HER2 insan epidermal büyüme faktörü 2,PI3K,fosfoinozitol-3-kinaz;PR:Progesteron Reseptörü, PTEN; Fosfataz ve Tensin Homoloğu [4]



Şekil 1 Tip I ve Tip II Endometrium Kanser Hücre Morfolojileri

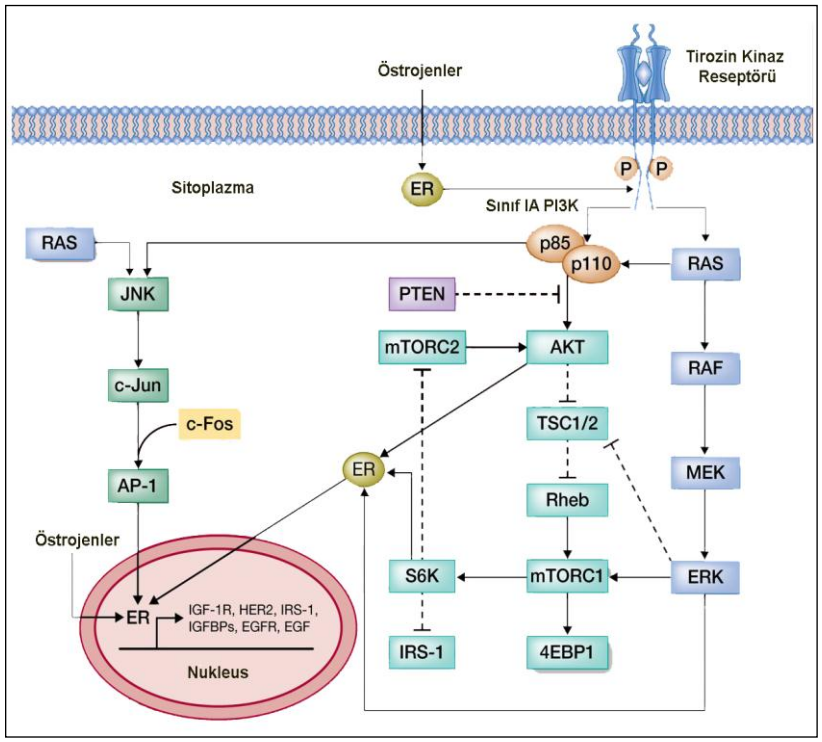
A.İyi derecede differansiye, I.evre endometrioid adenokarsinoma, B.Seröz karsinoma (3.evre), anaplastik tümör hücre strafikasyonu [77]

2.1.4. Endometrium Kanser Gelişiminde Etkili Sinyal İletim Yolakları

2.1.4.1. PI3K/AKT/mTOR Yolağı

PI3K ailesi, moleküler yapıları, substrat özgünlüğü ve lipid ürünlerine bağlı olarak üç farklı sınıfa ayrılmakta olup, Sınıf IA PI3K, kanser türlerinde en yaygın olarak bulunan alt grup olarak göze çarpmaktadır [56]. Sınıf IA PI3K, heterodimer yapı göstererek regülatör p85 ve katalitik p110 alt üniteleri içermektedir. Sınıf I PI3K, tirozin reseptör kinaz reseptörleri (RTK) tarafından büyüme faktörleri uyarımı yoluyla aktive edilebilmektedir.Aktif durumda, hücre içi domainlerde bulunan tirozin (Y) residülerinin otofosforilasyonu veya Y residülerinde bulunan IRS-1,IRS-2 ve Gab gibi substratların fosforilasyonuna uğramaktadır. Fosforile edilmiş Y residüleri, sınıf I PI3K'nın p85 düzenleme alt ünitesinde bulunan SH2 domainleri tarafından tanınmaktadır. Bu aşamada, sınıf I PI3K plazma membranına toplanarak PI3K'in aşağı sinyal iletim yollarının aktivasyonunu tetiklemektedir [77-78].

Tirozin kinaz aktivasyonundan sonra, Sınıf I PI3K'lar alternatif olarak, p110 katalitik alt üniteleri aracılığı ile Ras arasında etkileşim yoluyla da aktive olabilmektedir. Aktif durumda bulunan sınıf I PI3K, PIP2'yi (fosfoinozitol-4,5-bifosfat), PIP3'e (fosfoinozitol-3,4,5-trifosfat) dönüştürebilmekte ve plazma membranına Akt toplanmasına neden olmaktadır [9-81]. Bu durum, PDK1 (fosfoinozitol-3-bağımlı kinaz 1) fosforilasyonuna olanak sağlayarak Akt'yi aktive etmektedir. Akt, fosfataz ve tensin homoloğu (PTEN) tümör baskılayıcı geninin etkisi ile PIP3'ün PIP2'ye dönüşümü yoluyla inaktive olabilmektedir [82-84]. Aktif durumda bulunan Akt, hücresel büyüme, migrasyon, apoptoz ve anjiogenez sürecini ilerletebilecek sinyal iletim kaskatlarını başlatabilmektedir. Akt'nin en önemli efektörü, protein sentezini kontrolünü hedefleyen mTOR I (mTORC1) kompleksidir. PI3K/AKT/mTOR yolağı, RAS/RAF/MAPK ve östrojen reseptör (ER) yolakları ile çapraz etkileşime girebilmektedir [85]. PI3K/AKT/mTOR yolak mekanizması ve diğer yolaklar ile çapraz etkileşimini gösteren şema Şekil 3'de verilmiştir.



Şekil 2 PI3K/AKT/mTOR yolağının endometrium kanser ile ilişkili diğer yolaklar ile çapraz etkileşimi

Düz çizgiler aktivasyonu,kesik çizgiler inhibisyonu temsil etmektedir. 4EBP1,Ökaryötik Başlatıcı Faktör 4E-bağlanma protein 1,AP-1,Aktivatör Protein 1;EGFR,EGF reseptör; IGF-1R,İnsülin Benzeri Büyüme Faktör 1 Reseptörü;IGFBP,İnsülin Benzeri Büyüme Faktör Bağlanma Faktörü;IRS-1,İnsülin Reseptör Substrat 1,JNK,c-Jun N-terminal kinaz; mTORC1/2, mTOR kompleksi 1/2; Rheb,Ras Homolog;S6K,S6 kinaz,TSC,tüberskleroz proteini

PTEN mutasyonları Tip I endometrium kanserlerinin %57-83'ünde, Tip II endometrium kanserinin ise %10'unda görülmektedir. Bu mutasyonlar, PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağının aktivasyonunda artışa neden olmaktadır [86-89]. PTEN mutasyonlarının prekanseröz lezyonların %55'inde bulununması nedeniyle, PTEN inaktivasyonunun Tip I endometrioid kanser gelişiminin erken evresinde gerçekleştiği ileri sürülmektedir [59,86,90-91]

PI3K katalitik alt ünitesi (p110α) kodlayan PIK3CA geninde meydana gelen aktivasyon mutasyonları, Tip I tümörlerin %20-39'u, tip II tümörlerin ise %15-21'i arasında görülmektedir [62,65,86-87,90,92]. Dizileme çalışmaları ile PIK3CA helikal (ekson9) ve kinaz domainlerinin (ekzon 20) farklı kanser tiplerinde mutasyonların %80'den fazlasını içerdiğini gösterilmiştir [93].

Bütün PIK3CA ekzonlarında yapılan yeniden dizileme çalışmalarında tip I endometrial tümörlerin %52'sinin ve tip II endometrial tümörlerin %33'ünün PIK3CA mutasyonlarını içerdiği ve bu mutasyonların yarısının ekson 1-7 arasında yer aldığı ortaya çıkmıştır [88,94]. PIK3CA mutasyonu içeren kromozomal bölgenin (3q26) amplifikasyonunun, tip I endometrium kanserlerin %2-14, tip II endometirum kanserlerin ise %46'sında görüldüğü bildirilmiştir. AKT mutasyonları ise tip I tümörlerde %2.5 gibi küçük bir yüzde oranına sahipken, tip II tümörlerde görülmemektedir [92,95-99]. p85α'yı kodlayan PIK3R1 genindeki aktivasyon mutasyonları, PI3K/AKT/mTOR yolağının aşırı aktivasyonu için yeni bir alternatif olarak gösterilmektedir [100]. 243 endometrium kanser hastasında yapılan bir çalışmada, PIK3R1 mutasyonlarının tip I tümörlerde %43 oranında, tip II tümörlerde ise %12 oranında tespit edilmiştir [100].

2.1.4.2. RAS/RAF/MAPK Yolağı

Tirozin kinaz reseptörleri ve G-protein eşli reseptörler tarafından yönetilen mitojenik sinyaller ERK-MAPK yolağını aktive ederek, sırasıyla Ras,Raf,MAP kinaz/ERK kinaz ve ERK 1/2 fosforilasyonuna neden olmaktadır. Fosforile durumda ERK 1/2 nukleusa transloke olarak, Ets ve Ap1/ATF (Aktivatör protein1/aktive edici transkripsiyon faktör) gibi önemli transkripsiyon faktörlerini de içeren hücre proliferasyonu,motilite,farklılaşma ve sağkalımı ile ilgili bir dizi substratı düzenlemekle görevlidir [101-103]. Bu nedenle fosforile olmuş ERK1/2 (p-ERK1/2) ekspresyonu , aktif MAPK sinyalinazyonunun ayırıcı özelliği olarak karakterize edilmektedir. Literatürde endometrium kanser oluşumunda p-ERK1/2 ekspresyonunun etkisini inceleyen tek çalışma Mizumato ve arkadaşları tarafından 2007 yılında yapılmıştır [104]. Tip I endometrioid kanser hastaları (n=63) üzerinde yapılan bu çalışmada, p-ERK1/2 aktivasyonunun KRAS (v-Ki-ras2 Kirsten rat sarkoman viral onkogen homoloğu) ve BRAF (v-raf murine sarkoma viral onkogeni homolog B1) bağımsız bir mekanizma ile aktive olduğu gösterilmiştir [104].

ERK yolağının aktivasyonu, KRAS mutasyonu varlığında, mitojenik bir uyaranın olmadığı durumda bile devamlı indüklenmektedir. Bu nedenle, değişik kanser tipleri için karsinogenez sürecinde kritik role sahip olduğu düşünülmektedir [105].

Mutant KRAS allelleri ile transfekte edilmiş endometrium kökenli immortalize hücrelerin in vivo model olarak kullanıldığı bir çalışmada, bütün hücrelerin fenotiplerinde transformasyon gözlemlenmiş ve KRAS mutasyonu endometrial karsinogenez nedeni olarak belirtilmiştir [106-107]. Endometrium kanser klinik örnekleri ile yapılan in vitro çalışmalar sonucunda ise, tip I tümörlerin %22-43'ü, tip II tümörlerin %2-5'i ve hiperplastik lezyonlar içinse %0-18'inde KRAS mutasyonu tespit edilmiştir [108-111]. KRAS mutasyonunun, tip I endometrial karsinoma gelişiminin erken evresinde gerçekleştiği ileri sürülmektedir [112]. Yapılan in vivo ve in vitro çalışmalar sonucunda farklı sonuçlar elde edilmesi, endometrium kanserinde MAPK aktivasyon mekanizması hakkında çelişkiler oluşmuştur.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, değişik kanser tiplerinde BRAF mutasyonlarını MAPK yolağının aktivasyonu için etiyolojik faktör olarak işaret etmektedir [64]. BRAF mutasyonları, tip I endometrial kanserlerde %21 oranında, tip II endometrial kanserlerde ise %0-2 oranında görülmektedir [113-115]. Bununla birlikte, endometrium kanserinde BRAF mutasyonunun MAPK aktivasyonu üzerindeki etkisi henüz bilinmemekledir.

RASSF1A (Ras- assosiasyon domain ailesi 1), Ras-MAPK-ERK yolağının düzenlenmesi ile görevli tümör baskılayıcı olup, tümörogenez sürecinde inaktive olması gerekli olan inhibitör büyüme sinyallerini sağladığı bilinmektedir [116]. RASSF1A, hem onkogenik/mutant KRAS hem de GTP-bağlı KRAS ile RAS-GTP bağlanma protein NORE1 ile heterodimerizasyon ile ilişki kurabilmektedir [117]. Bu durum, KRAS/BRAF/RASSF1A genlerinin aynı yolakta ortaklaşa olarak görev yaptıkları hipotezini akla getirmektedir. RASSF1A geni akciğer,meme,böbrek,mide,msemase,over ve nöroblastoma gibi birçok farklı kanser tipinde epigenetik olarak inaktive edilmektedir [118]. Promotor metilasyonu endometrium kanserinde sık görülen bir gen inaktivason mekanizmasıdır. Pallares ve arkadaşları, endometrium kanser hastalarında RASSSF1A geninin promoter bölgesinden hipermetile olarak ekspresyonunun azaldığını, bu sayede Ras-MAPK-ERK sinyal iletim yolağının aktivitesinin artabileceğini göstermiştir [119].

2.1.4.3. Fibroblast Büyüme Faktörü

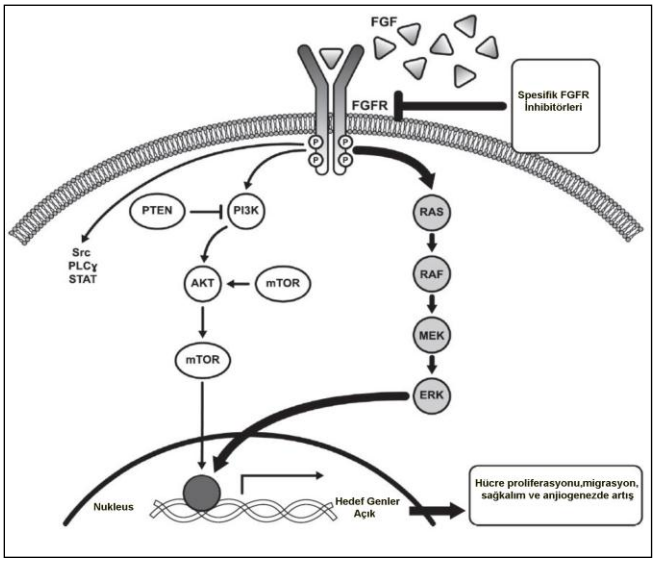
FGF sinyal iletim yolu, embriyogenez ve yetişkin doku homeostaz süreçlerinde anjiogenez,proliferasyon,farklılaşma ve sağkalım olaylarında rol oynamaktadır [120]. Yapılan çalışmalar, FGF sinyal iletim yolunun farklı endometrium kanser tiplerinin gelişiminde etkisi olduğunu göstermiştir [68-71].

FGF reseptörleri tirozin reseptör kinaz ailesi üyeleri olup, hücre dışı bölümünde immunoglobulin-benzeri domainler ve hücre içi kinaz domainleri içermektedir. FGF ligandının bağlanması , reseptör dimerizasyonu ve transotofosforilasyon olaylarına öncülük etmekte ve bu durum aşağı sinyal iletim kaskadlarının aktivasyonu için başlangıç oluşturacak enzimatik kinaz akivitesini tetiklemektedir [120-121]. Sinyal çeşitlliği, yüksek derecede korunmuş 4 FGF reseptörü ve hücre tipine özgün eksprese edilen 18 FGF ligand oluşundan kaynaklanmaktadır [122]. FGF2,FGF7,FGF9 ve FGF10 ligandları ile bu ligandların reseptörleri olan FGFR1,FGFR2 ve FGFR3 menstrual ve östrojen döngüler sürecinde normal endometrial hücrelerin proliferasyonunda görev almaktadır.

Yapılan çalışmalar, farklı kanser türlerinde FGF/FGFR sinyalizasyonunda anormallik görülebildiğini göstermektedir [120,122-123]. Farklı tümör tiplerinde,FGF reseptörleri arasında, aktivasyon mutasyonları,gene amplifikasyonu/aşırı ekspresyon ve kromozomal translokasyonları gibi çok sayıda genetik anormallikler tespit edilmiştir [44]. FGF sinyalinde değişiklik, aşırı hücre proliferasyonu ve apoptozdan kaçışa neden olarak hücre sağkalımının artması,hücre migrasyonunda ilerleme ve tümör anjiogenezine yol açmaktadır. Bununla birlikte, FGF/FGFR sinyal iletiminin artışı VEGF sinyal inhibisyon baskısı altında olan tümörler için kaçış mekanizması da sağlayabilmektedir [124].

FGFR2 mutasyonları, endometrium kanserlerinin yaklaşık olarak %10-16'sında tespit edilmiştir [68-71]. Yapılan bir çalışmada, endometrium kanser hücre hatlarının (n=10) %30'unda 11 farklı FGFR2 mutasyonu bulunmuştur [71]. Bu mutasyonlardan bazıları, reseptör-ligand bağlanma afinitesinde artışa neden olduğu, diğerlerinin ise konstitütif reseptör dimerizasyonuna önderlik ettiği veya ligand aracılı reseptör negatif regülasyonunu azalttığı ileri sürülmüştür [125-130].

FGF'in aşağı sinyal iletim yollarının aktivasyonu tetiklemesi için gerekli olan kinaz domainlerinde aktivasyon mutasyonları tespit edilmiştir.Bu mutasyonların çoğu Bryon ve arkadaşlarının 2012 yılında endometrioid tip kanser hastaları (n=466) ile yaptığı çalışmada 48 hasta üzerinde tespit edilmiştir [70]. Transmembran ve ilk kinaz domainlerinde de ek mutasyonlar belirlenmiştir. FGFR2 mutasyonunun varlığı, hastalık bağımsız sağkalıma karşı eğilim göstermektedir. Ayrıca, erken evre hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada (n=386), FGFR2 mutasyonlarının sağkalım süresinin kısalması ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [30]. Dutt ve arkadaşlarının yaptığı digger bir çalışmada, primer endometrial karsinoma tumor örneklerinin (n=40) %12'sinde FGFR2 mutasyonları belirlenmiştir [98].FGFR2 mutasyonlu endometriyal tümörlerden elde edilen veriler ile, FGFR2 reseptörünün tümorogenez sürecini PI3K/AKT yolağı ile değil MAPK yolağı aracılığı ile yönettiği ileri sürülmektedir [69,70]. Endometrial hücrelerin FGF aracılı stimülasyonun spesifik olarak MAPK yolağı üyeleri ve ERK1/2 aktivasyonuna neden olduğu gösterilmiş olup Şekil 3'de şematize edilmiştir [131].



Şekil 3 FGF Sinyal İletim Yolağı

FGF Ligandlarının reseptörlere bağlanması, PI3K/AKT/Mtor ve MAPK sinyal iletim yolaklarının aktivasyonuna yol açmaktadır.Endometrium kanserinde FGFR2 tümorogenez sürecini MAPK yolağı aracılığı ile sürdürmektedir. Koyu renkli ajanların endometrium kanserinde aktive olduğu bulunmuştur. ERK,hücre dışı sinyal ile düzenlenen kinaz;FGF,Fibroblast büyüme faktörü;FGFR,Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü; MAPK,Mitojen ile aktive protein kinaz; MEK, Mitojen ile aktive protein kinaz;Mtor, Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi;PI3K,Fosfoinozitol-3,kinaz;PLC-γ,fosfolipaz C-gama;PTEN,Fosfataz ve tensin homoloğu;STAT, sinyal iletici ve transkripsiyon aktive ediciler [44]

FGF reseptörlerinin inhibisyonunun, ERK1/2 aktivasyonunda hızlı ve sağlam bir düşüşe yol açtığı ancak AKT fosforilasyonunda sadece az miktarda bir azalma gösterdiği bildirilmiştir [69,70] Endometriyal tümörler ile yapılan çalışmalarda,FGF ligandlarının da ekspresyonunda artış tespit edilmiştir [131-133]. FGF10 ligandının, endometrial karsinoma hücrelerinin büyümesini uyardığı ayrıca MAPK aktivasyonu yolu ile Elk-1 ve c-Myc nükleer transkripsiyon faktör ekspresyonu active ettiği gösterilmiştir [131]. Endometrial adenokarsinoma neoplastik epitel hücreleri üzerine yapılan bir çalışmada,FGF2 ligandının ekspresyonununda artış tespit edilmiş olup bu artışın FGFR ve ERK yolakları aracılığı ile hücre proliferasyonunu arttırdığı bildirilmiştir [132].

2.1.4.4. HER2/Neu ve EGFR

İnsan epidermal büyüme faktör reseptör (HER) ailesine ait tirozin kinaz reseptörleri, değişik kanser tiplerinin gelişimi ve progresyonunda önemli rol oynamaktadır. Endometrial kanserlerde, anormal epidermal büyüme faktör reseptörü 2 (HER2) ekspresyonunun seröz ve berrak hücre karsinoma tipleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [46]. Endometrium kanser tiplerinde yapılan çalışmada, HER2 aşırı ekspresyonu ve HER2 gen amplifikasyonunun, tip II tümörlerde sırasıyla %17-80 ve %17-50'inde, tip I tümörlerde ise sırasıyla %9 ve %3 oranında görüldüğü bildirilmiştir [75,134-139]. Endometum kanserlerinde yapılan çalışmalarda, epidermal büyüme faktör reseptörüne (EGFR) ait aktivasyon gen mutasyonu veya amplikasyonu bulunamamıştır. Bununla birlikte, tip II seröz hücreli tümörlerin %35-56'sı ve tip I tip tümörlerin %38-46'sında EGFR aşırı ekspresyonu tespit edilmiştir [65,45,140].

2.1.4.5. Wnt/β-Katenin Sinyal İletimi

β-Katenin/E-kadherin adhezyon kompleksi, epiteliyal bütünlüğün sağlanmasında önemli rol oynamakta olup β-Katenin Wnt sinyal yolağında transkripsiyon faktörü olarak görev almaktadır. Tip I EC'lerin %6-57'si, tip II EC'lerin ise %41-87'sinde E-kadherin ekspresyon kaybı tespit edilmiştir [141-144]. Son yıllarda, östrojenlerin Wnt/β-Katenin sinyal iletimini uyardığı, regülasyonun bozulması halinde endometrial hiperplazi ve karsinogenezi indükleyebilceği gösterilmiştir [145].

Aktif kanonikal Wnt/β-Katenin sinyal iletimi, β-Katenin'in nukleusta akümülasyonu ile belirlenmektedir.Tip I EC'lerin %16-47 ve tip II EC'lerin '0-3'ünde β-Katenin varlığı bildirilmiştir [143-144,146-147]. Bu durumun CTNNB1 fonksiyon kazanım mutasyonuna bağlı olabileceği ileri sürülmüş olup tip I EC'lerin %15-40'ında, tip II EC'lerin ise %0'sında bulunmuştur [92,146,148-151].

2.1.4.6. TP53

Tümör baskılayıcı p53 hücre içinde farklı stress sinyallerine verilen yanıtları düzenlemektedir [152]. P53 aktif olduğu durumda hücre siklus tutulumu,senses ve apoptozu indükleyebilmektedir. Tip II endometriyal kanserlerde bugüne kadar en sık tespit edilen mutasyon TP3 olup, genel olarak %90'ın üzerinde seröz karsinoma tipinde %9-54 oranında, tip I EC'ler de ise %2-20 tespit edilmiştir [62,67,153-158]. Ayrıca, seröz endometriyal endometrial intraepiteliyal karsinomaların yaklaşık %75'inde TP53 mutasyonları bulunmuş ve p53 fonksiyon kaybının endometrial seröz karsinogenez sürecinde erken evrede olabilceği ileri sürülmüştür [154,158].

2.1.5. Endometrium Kanser Gelişiminde Steroid Hormonların Rolü

2.1.5.1. Östrojen ve Progesteron Sinyal İletim Sistemi

Endometrium kanseri ile yapılan çalışmalarda dolaşımda bulunan steroid hormonların yanı sıra östrojenlerin lokal biyosentezinin de CYP191A (aromataz) ekspresyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [159]. Östradiol (OE2) miktarı tümör dokularında belirlenmiş olup, bu oran menopoz öncesi ve menopoz sonrası bayanlarda tümör invazyon oranı ile korelasyon göstermektedir [160].

Östrojen reseptörünün ERα (ESR1) ve ERβ (ESR2) olarak iki alt tipi bulunmaktadır. Uterus'un genellikle ERα izoformunu içerdiği gösterilmiştir. Progesteron reseptörünün ise PR-A ve PR-B olmak üzere iki izoformu bulunmaktadır [161-162]. Östrojen (ER) ve progesterone reseptörleri (PR) nükleer reseptör süperailesi üyeleri olup hedef hormonlara (östrojen ve progesteron) bağlandıklarında transkripsiyon faktörü olarak rol oynamaktadır.Bağlı östrojen ve progesterone reseptörleri hücre içinde hedef genlerde bulunan promotor bölgelerin östrojen veya progesterone yanıt elementlerine bağlanmaktadır [161-162].

Sağlıklı premenopozal bayanlarda, östrojen reseptörü ekspresyonunun, proliferatif faz sürecince bezler ve stromada yoğun olduğu ancak progesteronun olduğu post-ovülasyonu takiben sekretuar fazda düştüğü bildirilmiştir [163]. Östrojenin endometriyal proliferasyon ve vaskularizasyonu arttırdığı tespit edilmiştir [164]. ESR1 gen delesyonlu fareler ile yapılan çalışmalarda, bu alt tipin uterus hücre proliferasyonu ve progesteron reseptör gen ekspresyonunda önemli rol oynadığı bildirilmiştir [165]. Hücre soyları kullanılarak yapılan çalışmalarda ise, ESR2'nin ESR-1 ile stimüle edilen gen transkripsiyonun inhibitör modülatörü olarak rol oynadığı ileri sürülmüştür [166]. Östrojen kökenli hiperplazi ve tümorogenez sürecinde ESR izoform ekspresyonunda dengesizliğin önemli derecede etkili olduğu gösterilmiştir [167].

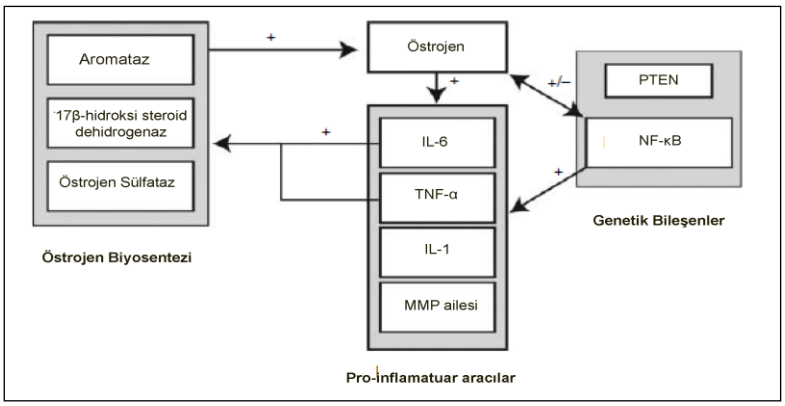
Premenopozal bayanlarda PGR aktivasyonu sekretuar faz sürecinde gerçekleşmekte ve endometrial proliferasyonda düşüşe neden olmaktadır. Progesteron biyosentezinin yetersiz olduğu durumlarda, endometrium hiperplastik duruma gelmekte ve endometrium kanser gelişim riskini arttırmaktadır. PGR ekspresyonu hem östrojen hem de progesteron hormonu kontrolü altındadır. PGR izoformlarının farklı fonksiyonlara sahip olduğu gösterilmiştir [168-169]. PGRA transkripsiyonel baskılayıcı olarak görev yaparak östrojen indüklü proliferasyonu baskılamaktadır. PGRB ise endometriyal ösztrojen agonisti olarak aktive edici role sahiptir [1,6].

Endometriyum kanserinde ESR ve PGR izoformlarının ekspresyonu evre bağımlı olup, düşük differansiasyon görülen kanserlerde ESR2 ekspresyonu aynı seviyede devam ettiği halde ESR1 ve PGR ekspresyonunda düşüş görüldüğü tespit edilmiştir. PGR ekspresyonunun aynı zamanda hastalık bağımsız sağkalım ile de ilişkili olduğu gösterilmiştir.

2.1.5.2. Östrojen,Progesteron ve İnflamasyon İlişkisi

Reproduktif dokularda homeostaz hormonal ve inflammatuar sinyallerin integrasyonunu gerektirmektedir. Pro-inflammatuar sinyaller baskılanmış steroid hormon reseptörlerini transkripsiyonel aktivatörlere dönüştürebilmektedir [170]. Östrojenlerin inflammatuar süreçleri etkilleyebildiği gösterilmiştir [171]. Normal endometrium dokusunda,östrojenin IL-6 gibi inflammatuar sitokinlerin ekspresyonunu düzenlemektedir. KLE ve RL95 endometrial adenokarsinoma hücre soyları üzerinde yapılan bir çalışmada, östrojen stimülasyonunu takiben sitokin üretimi tespit edilmiştir.

IL-1,TNF-α ve matriks metalloproteinazlar (MMP) östrojen tarafından düzenlenen inflammatuar aracılar olup IL1B'nin östrojen etkisini attırabildiği bildirilmiştir [172-174]. Endometrium kanserinde östrojenin ayrıca çok sayıda inflamatuar aracının ekspresyonunu düzenleyebilen NF-κB sinyalizasyonunu arttırabileceği de gösterilmiştir. Östrojen ve inflamatuar sinyaller arasındaki ilişki Şekil 4'de gösterilmektedir.



Şekil 4 Endometrium kanserinde östrojen,inflammatuar aracılar ve genetik bileşenler arasındaki ilişki

Östrojen IL-6 ve TNF-α gibi inflamatuar aracıların uyarılması ile kendi biyosentezini de düzenleyebilmektedir. Hem östrojen hem PTEN mutasyonu inflamasyonu arttırabilen NF-κB aktiivitesini uyarabilmektedir. Bu nedenle pro-inflammatuar aracıların östrojen aracılı uyarımı ve NF-κB aktivasyonu inflamasyon durumunu ilerletebilmektedir [6].

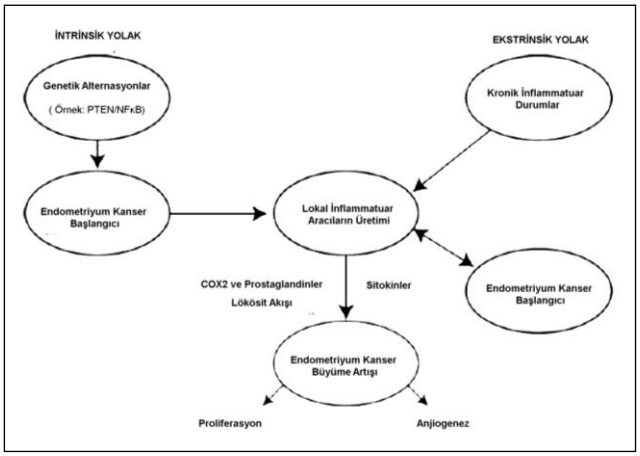
Progesteron inflamatuar aracıların üretimini negatif olarak düzenlemektedir. Yapılan *in vitro* çalışmalar, progesteron hormonunun mürin ve insan uterus hücrelerinde sitokin salınımını inhibe edebildiği bildirilmiştir [175-177]. Bu sitokinlerin bir çoğu NF-κB kontrolü altındadır. Hec50co endometrial adenokarsinoma hücre hattında yapılan bir çalışmada, progesteronun NF-κB aktivasyonunu inhibe edebildiği gösterilmiştir [178]. PGR içermeyen fare üzerinde *in vivo* ortamda yapılan bir çalışmada, rahimde inflamatuar yanıtlarda ve lökosit infiltrasyonunda artış tespit edilmiştir [179]. Progesteron ayrıca prostoglandin dehidrogenaz üretimini stimüle ve sitokin indüklü siklooksijenaz2 transkripsiyonunu inhibe etmektedir [180]. Bu nedenle, endometrium kanseri progesteron sinyaline yanıt olarak östrojen artışı,inflamatuar aracılarda artış meydana gelmesi ve bu sayede tümör büyümesinin ilerlemesi ile karakterize edilmektedir.

2.1.6. Endometrium Kanser Gelişiminde İnflamasyonun Rolü

Kanser ve inflamasyon arasındaki bağlantı ilk kez 19. Yüzyılda Virchow tarafından ortaya atılmış ve kanserli dokularda lökosit akışının belirlenmesini takiben, lökositlerin tümör büyümesinde etkili olduğu ileri sürmüştür [181]. Günümüzde, inflamatuar yolakların kanser gelişimini intrinsik ve ekstrinsik olarak iki farklı mekanizma ile etkilediği düşünülmektedir [182-183]. İntrinsik yolakta, genetik mutasyonlar ve inflammatuar faktörlerin ekspresyonunda artış tümör büyümesine neden olmaktadır. Ekstrinsik yolakta ise, mevcut inflammatuar durumlar kanser başlangıcına yol açmaktadır [182-183].

İnflamatuar hastalıkların bazı kanser tiplerine yatkın olduğuna dair çalışmalar ve epidemiyolojik veriler kanser başlangıcında ekstrinsik inflammatuar hipotezini desteklemektedir. Yapılan çalışmalar, inflamatuar bağırsak hastalığının kolon kanseri , prostat iltihabının prostat kanseri,mikrobial enfeksiyonun ise gastrik kanser ile ilişkili olduğunu göstermektedir [184-186]. Ayrıca, uzun süreli steroid olmayan antiinflammuar ilaç kullanan risk altında hastalarda kanser insidansında belirgin oranda düşüş tespit edilmiştir [184,187].

Alternatif intrinsik yolak hipotezinde ise kanser gelişimini takiben, hücreler tarafından inflamatuar aracıları üretiminin tümör gelişimini hızlandırdığı ileri sürülmektedir. Bu inflamatuar ortam, sitokinler ve prostaglandinler gibi inflamatuar belirteçler, lökositler ile anjiogenik faktörleri içermektedir. Bu hipotez, inflamatuar koşulların inhibe olduğu tümörler ile yapılan çalışmalarla desteklenmektedir. Yapılan *in vivo* kanser model çalışmalarında, sitokin sinyal iletimi engellenmesinin tümör büyümesinde azalma veya tümör regresyonuna neden olduğu gösterilmiştir [188-190]. Bu çalışmalar tümörlerde oluşan inflammatuar yolakların kanser büyümesini ilerlettiğini desteklemektedir. Şekil 5'te endometrium kanser gelişiminde rol alan ekstrinsik ve intrinsiik yolaklar gösterilmiştir.



Şekil 5 Endometrium Kanserinde Gelişen İnflammatuar Durumlar

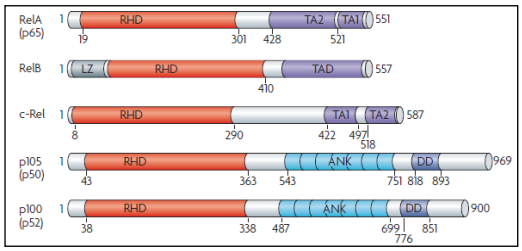
İnflammasyon kanser gelişimini farklı şekillerde etkileyebilmektedir. İntrinsik yolakta, genetik mutasyonlar ile kanser başlangıcını takiben, inflammatuar ajanların ekspresyonu artmakta ve tümör gelişimine neden olmaktadır.Ekstrinsik yolakta, mevcut inflammatuar durumlar kanser başlangıcına yol açmaktadır. Her iki yolakta da, inflamatuar aracılar kanser büyümesini hızlandırmaktadır.

2.1.6.1. İnflamatuar Sisteminde Önemli Bir Yolak: NF-κB (Nükleer faktör κB)

NF-κB transkripsiyon faktörü, büyüme, gelişim, apoptoz, immün ve inflamatuvar yanıt gibi çok sayıda önemli ve hücresel sürecin düzenlenmesinde rol almaktadır [191]. Memelilerde NF-κB ailesi, birbiriyle yakın ilişkide bulunan beş gen (NF-κB1, NF-κB2, RelA, c-Rel ve RelB) içermektedir [192].

NF-κB proteinleri N terminallerinde yaklaşık 300 aminoasitten oluşan ve evrimsel olarak yüksek derecede korunmuş Rel homoloji bölgesi (RHD) içermek olup bölge, DNA bağlama, dimerizasyon ile NF-κB dimerlerinin sitoplazma kalması sağlayan IκB özgün inhibitör faktörleri ile etkileşime aracılık etmektedir [193].

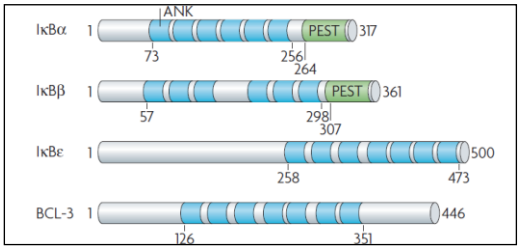
RelA, c-Rel ve RelB olgun formlarında sentezlenirler ve transkripsiyonel aygıt ile etkileşerek gen transkripsiyonunu teşvik eden C- terminal transaktivasyon bölgesi (TAD) içermektedirler [194]. Bununla birlikte, NF-κB1 (p105/p50) ve NF-κB2 (p100/p52) öncül formlarında sentezlenirler. Öncül formlar (p100 ve p105) olgun formların (p50 ve p52) üretimi için proteozom tarafından proteoliz edilen C- terminal ankyrin tekrarları içermektedir [195]. Hem p50 hem de p52 DNA bağlama bölgesi içermekle beraber transaktivasyon bölgeleri (TAD) yoktur [195]. Şekil 6'da memelilerde bulunan NF-κB ailesi üyelerinin moleküler yapısı verilmektedir.



Şekil 6 NF-κB ailesi üyelerinin moleküler yapısı

Bütün NF-κB aile üyeleri N-terminallerinde DNA bağlanma ve dimerizasyondan sorumlu RHD (Rel Homoloji Domain) bölgesi içermektedir. Rel alt ailesi, C-terminallerinde transkripsiyon aktivasyon bölgesi (TAD) içermektedir. TA1 ve TA2 RelA transaktivasyon bölgesinin alt bölgeleridir. p50 ve p52 ise C-terminallerşnde ankyrin tekrar bölgesi içermektedir.

Birçok normal hücre tipinde, NF-κB dimerleri çoğunlukla inhibitörleri (IκB) ile etkileşmelerine bağlı olarak sitoplazmada transkripsiyonel olarak inaktif konumdadırlar. IκB ailesi (IκBα, IκBβ, IκBε ve Bcl-3) NF-κB proteinlerinin RHD bölgesi ile etkileşen ankyrin tekrarları içermektedir. IκBα, IκBβ ve IκBε, NF-κB dimerleri ile etkileşerek sitoplazmada tutulmalarından sorumludur [196]. Bcl-3 ailenin transaktivasyon bölgesi içerdiği için ayrıcalıklı üyesi olup, p50 veya p52 homodimerleri ile etkileşerek transkripsiyonel koaktivatör olarak rol alabilmektedir (Şekil 7). NF-κB aktivasyonu, IκB kinaz (IKK) kompleksi tarafından IκB proteinlerinin fosforilasyonu ve devamında IκB proteozom bağlı degredasyonu ile sonuçlanmaktadır. Bu durum NF-κB 'nin serbest kalarak nükleusa translokasyonuna yol açmaktadır [197].



Şekil 7 IκB ailesi

NF-κB inhibitör ailesi, IκBα, IκBβ, IκBε ve Bcl-3olarak 4 üyeden oluşmaktadır. IκB proteinleri,p52 ve p 105 gibi C-terinallerinde ankyrin tekrar motifleri taşımaktadır.PEST;prolin (P),glutamat (E),serin (S) ve threonin (T) zengin domain

2.1.6.2. NF-κB Aktivasyon Yolakları

Kanonikal ve kanonikal olmayan NF-κB aktivasyon yolağı sinyal mekanizmaları açısından farklılık göstermektedir. Bu yüzden fizyolojik ve patolojik durumlarda, hangi NF-κB aktivasyon yolağının kullanıldığı ve bu yolağın moleküler mekanizmasını anlamak terapötik açıdan çok değerlidir.

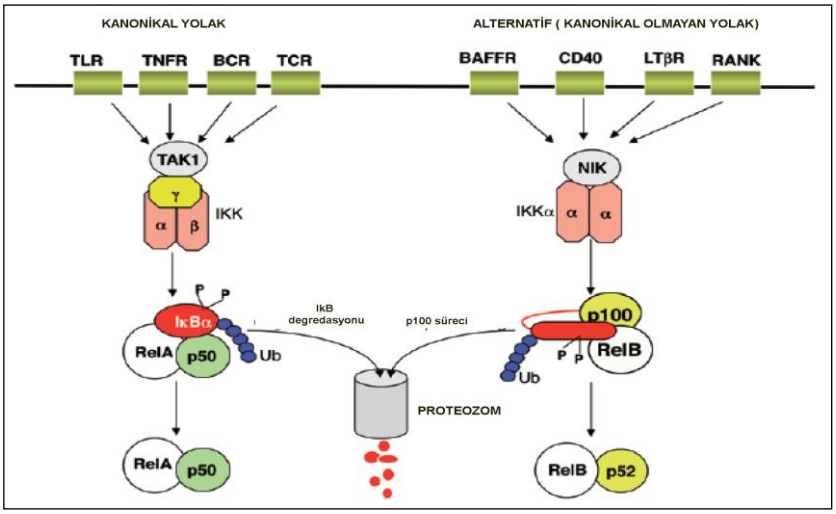
Temel olarak kanonikal ve alternatif (kanonikal olmayan) olarak bilinen iki adet NF-κB aktivasyon yolağı bulunmaktadır. Birçok hücre tipinde genellikle kanonikal yolağı kullanılmaktadır ve bu yolak IL-1β ve TNF-α (tümör nekrosis faktör) gibi proinflamatuar sitokinler tarafından aktive edilmektedir. TNF-α uyarısı, TNF-α reseptör I (TNFRI) sinyal kompleksine TRAF2 ve RIP-I (reseptör ile etkileşen protein kinaz-I) yolu ile adaptör proteinlerin ve kinazların ortama toplanmasını indüklemektedir. Bu durum IkappaB kinaz (IKK) kompleksinin fosforilasyonu ve aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır [191-200] .

IKK kompleksi, IKK- α (IKK1), IKK- β(IKK2) ve IKK-γ (NEMO: NF-κB essensiyal modülatörü) ünitelerinden oluşmaktadır .Kanonikal aktivasyon yolağı için, IKK aktivitesi IKK-β bağımlıdır. IKK, RIP aracılı fosforilasyon yolu ile aktive olmaktadır. IKK aktive edici kinaz'ın mitojen aktive edici kinaz 3 (MEKK3) veya TGF-β aktive edici kinaz (TAKI) olduğu ileri sürülmektedir [191-200].

Aktif halde bulunan IKK β katalitik alt ünitesi, IκB proteinlerini 32. ve 36. pozisyonda bulunan serin rezidülerinden fosforile etmekte, bu sayede IκB poliubikitinasyonunu ve proteozomda hızlı degredasyonu tetiklemektedir [198-199]. Bu süreç, p65 ve p50 üzerinde bulunan NLS sinyalini ortaya çıkararak NF-κB nükleer translokasyonuna olanak sağlamaktadır. Nukleusta NF-κB transkripsiyonel aktivitesi, p65 alt ünitesinin fosforilasyonu ve asetilasyonu ile DNA'ya bağlanması veya CBP/p300 gibi transkripsyonel koaktivatör ile etkileşimi yolu ile düzenlenmektedir [198-199].

Kanonikal olmayan alternatif yolak, CD40, lenfotoksinβ (LT-β), B-hücre aktive edici factor (BAF) ve Epstein-Barr virüsün LMP-1 viral proteinler ile aktive olmaktadır . Bu yolak NF-κB indükleyici kinaz (NIK) aracılı IKK-α aktivasyonuna bağımlıdır. IKK-α, p100'ün p52'ye dönüşümünü tetiklemektedir [200-201].

p52,RelB ile fonksiyonel kompleks oluşturmakta ve gen ekspresyonunu düzenlemek için nükleusa transloke olmaktadır.Kanonikal yolağı ilerleten cIAP poroteinleri, NIK ubikitinasyonu ve degredasyonu tetikleyerek, kanonikal olmayan yolak için negatif rol oynamaktadır bu yüzden kanonikal yolak ve kanonikal olmayan yolak bazı durumlarda koordine şekilde gereç ve yöntem düzenlenmektedir.Şekil 8'de NF-κB aktivasyon mekanizmaları şematize olarak gösterilmektedir [200-201].



Şekil 8 NF-κB Aktivasyon Mekanizmaları

Kanonikal yolak çok sayıda doğuşan ve adaptif immün reseptör aracılı sinyal tarafından tetiklenebilmekte olup Tak1 tarafından IKK aktivasyonu, IKK-aracılı IκB fosforilasyonu,degredasyon ve RelA/p50 hterodimerinin nukleusa translokasyon basamaklarını içermektedir. Alternatif yolak ise fosforilasyon indüklü p100 sürecine dayanmakta ve TNFR üyelerinden gelen sinyaller tarafından tetiklenmektedir. Bu yolak NIK ve IKKα bağımlıdır ve RelB/p52 kompleksinin aktivasyonuna aracılık etmektedir.

NF-κB'nin farklı heterodimerleri hücresel önem taşıyan çok sayıda genin transkripsiyonunu başlatmak için özgün promoter bölgelerine bağlanmaktadır. NF-κB hücresel hedefleri arasında sitokinler (IL-1, IL-2, IL-6, TNF-α), kemokinler (MIP-1α, MCP1, RANTES), adhezyon molekülleri (ICAM-1, VCAM-1, E-selektin), indüklenebilir efektör enzimler (iNOS, COX-2) ile apoptoz ve hücre proliferasyonu düzenleyicileri (c-IAP1, c-IAP2, XIAP, Bcl-xL,Fas Ligand, c-myc, siklin D1) yer almaktadır [191-201].

2.1.6.3. Kanser Tedavisinde NF-κB Direnci

NF-κB, kemoterapötik ajanlar ve iyonize radyasyon ile indüklenen apoptoz sürecini inhibe etmektedir. Bazı tümör tiplerinde, radyasyon veya kemoterapötik ilaçlara maruz kalan hücreler, NF-κB aktivasyonunda artış göstermekte ve apoptoza karşı direnç oluşturmaktadır [202-204] . Kemoterapötik ajanlar ve iyonize radyasyona yanıt olarak NF-κB aktivasyonunda görülen artış ile tedaviden önce birçok tümörün konstitütif olarak NF-κB aktivitesi gösterdiği gerçeği, kanser tedavisinin etkili ve verimli olması için önemli derecede engel oluşturmaktadır [205].

NF-κB yolağı, apoptoz inhibisyonu ve tümör gelişiminde önemli role sahip olduğu için, hedefe yönelik NF-κB inhibisyonunun apoptotik yanıtı arttıracağı ve problem çözümü için daha etkili ve hedefe özgün tedavi mekanizmaları geliştirilebilceği ileri sürülmüştür [194,205-206]. NF-κB aktivasyon mekanizmasının bloklanması için değişik tedavi stratetjileri kullanılmaktadır. Proteozom inhibitörleri (PS-341 ve MG132), IKK inhibitörleri,hücre geçirgen peptidler,antioksidanlar,IκBα geninin adenovirüs aracılı aşırı ekspresyonu ve NF-κB antisense oligonükleotidler kullanılarak NF-κB susturulması NF-κB inhibisyonu için ön görülen tedavi stratejileri arasındadır. [194,205-206].

2.2. Flavonoidler

Flavonoidler, doğada yaygın olarak bulunan ve benzo-γ-piron halkası (C6-C3-C6) taşıyan polifenolik bileşiklee olarak bilinmektedir [207]. Flavonoidler meyve ve sebzelerde bol miktarda bulunduklarından insan diyetinin önemli bir bölümünü oluşturmaktadır. Günümüzde 8000'den fazla flavonoid yapısı tanımlanmış olup bu çeşitlilik temel ve benzo-γ-piron halka yapısına hidroksil,metoksil ve *O*-glikozit alt gruplarının farklı kombinasyonlar oluşturmasından kaynaklanmaktadır [208] .Sitrus (Rutacea) familyasında flavanonlar,flavonlar,flavonoller ve anthosiyaninler şeklinde dört temel flavonoid türünün bulunduğu tanımlanmıştır [209].

Flavonoidlerin kan ve mikrovasküler endoteliyal hücreler üzerinde etkili olduğu gösterilmiş olup, sitrus flavonoidlerin biyolojik etkileri hakkında yapılan araştırmalar inflamasyon ve kanser üzerinde yoğunlaşmıştır. Epidemiyolojik ve hayvan modelleri üzerinde yapılan çalışmalardan elde edilen veriler flavonoidlerin kardiyovasküler hastalıklar ve kanser üzerinde koruyucu etkisi olabileceğini işaret etmektedir [210]. Yaklaşık olarak 50 yıldır flavonoidler ile ilgili değişik çalışmalar yapılmış olmasına karşın, biyolojik etki mekanizmaları halen tam olarak bilinmemektedir.

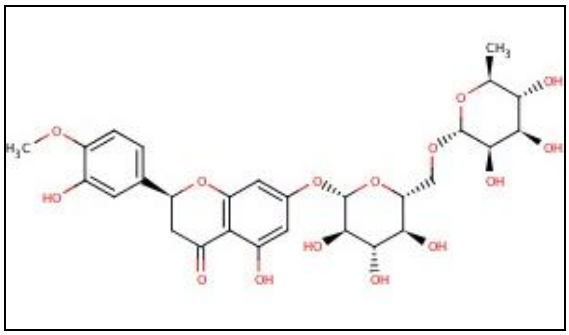
Flavonoidlerin farmakolojik özelliklerinin çoğu hücre aktivasyonunda rol alan enzimleri inhibe etme yetenekleri ile ilişkilendirilmiştir. Yapılan in vitro araştırmalarda,flavonoidlerin memelilerde bulunan enzimatik sistemlerin (kinazlar, fosfolipazlar, ATPazlar, lipooksijenazlar,siklooksijenazlar,fosfodiesterazlar) aktivitesini modifiye etme kapasiteleri olduklarını göstererek flavonoid yapısı ve enzimatik aktivitesi arasında korelasyon tespit edilmiştir [209]. Bu etkilerin çoğunun, flavonoidlerin düzenleyici enzimlerin nükleotid bağlanma bölgeleri ile etkileşme yetenekleri kaynaklı olduğu ileri sürülmektedir. Yapılan araştırmalar ile sitrus flavonoidlerin radikal süpürücü potansiyeline sahip olduklarına,bu sayede reaktif oksijen türlerinin dahil olduğu yaşlanma ve dejenaratif olaylarda görev aldıklarını göstermiştir [209,211].

Son yıllarda, antiproliferatif ve antikarsinojenik özellikleri bilinmekte olan flavonoidlerin çeşitli kanser türlerinde etkilerini araştıran çalışma sayısında artış görülmektedir. Doğada olarak meyve ve sebzelerin yapısında bulunan flavonoid bileşikleri kanser koruyucu özellikleri ile göze çarpmaktadırlar [212]. Flavonoidler hücre transformasyonu, invazyon, metastaz ve anjiogenez gibi karsinogenez sürecinin birçok noktasını kinaz inhibisyonu, transkripsiyon faktörlerinin redüksiyonu, hücre döngüsünün düzenlenmesi ve apoptotik hücre ölümünün uyarılması yoluyla bloklayabilmektedir [212-214].

2.2.1. Hesperidin

Hesperidin (3,5,7-trihidroksi flavanon 7-ramnoglikozit), limon ve portakal gibi sitrus meyvelerde bol miktarda bulunan farmakolojik olarak aktif glikozitik bioflavanoid bileşiği olup, serbest radikal süpürücü ve biyolojik membranlarda anti-lipit peroksidayon özellikleri ile bilinmektedir [215-216].

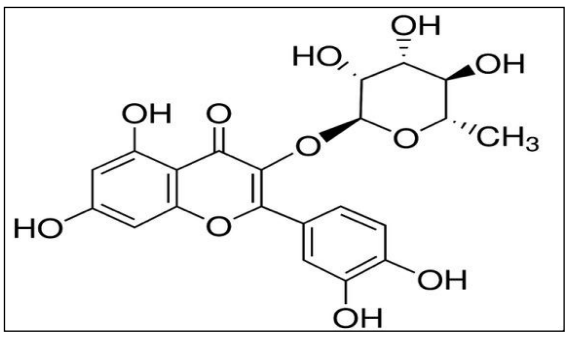
Hesperidin bileşiğinin ayrıca, antiinflamatuar, antioksidatif ve antiproliferatif etkilere sahip olduğu da ve kolon ve pankreatik kanser hücreleri gibi değişik hücrelerde hücre büyüme tutulumunu ile apoptozu uyarabildiği gösterilmiştir [217-220]. Bununla birlikte, hesperidin'in büyüme inhibitörü etkisinin altında yatan moleküler mekanizma henüz aydınlatılamamıştır. Hesperidin'in moleküler yapısı Şekil 9'da gösterilmektedir.



Şekil 9 Hesperidin Moleküler Yapısı

2.2.2. Kersitrin

Kersitrin,kersetin bileşiğinin glikozidik formu olup kersetin'in en iyi absorblanan formu olarak bilinmektedir [221]. Yapılan çalışmalar ile kersitrin bileşiğinin güçlü antiinflamatuar özelliklerinin yanı sıra çeşitli tümörlere karşı kemokoruyucu etkiye sahip olduğu da gösterilmiştir [222-223]. Kersitrin ayrıca bakteriyal infeksiyon, allerjik reaksiyon, H_2O_2 ve UV uyarımlı hücre ölümü ve apoptoz olaylarında da rol oynamaktadır [224-225]. Bununla birlikte,kersitrin bileşiğinin moleküler etki moleküler etki mekanizması henüz bilinmemektedir. Kersitrin'in moleküler yapısı Şekil 10'da gösterilmektedir.



Şekil 10 Kersitrin Moleküler Yapısı

2.2.3. Kanser Gelişiminde NF-kB Yolağı Üzerinde Flavonoid Etkisi

Kanser gelişimi ile inflamasyon arasındaki ilişkiyi incelemeyi hedefleyen çalışmalar, kanser gelişim sürecinde NF-κB aracılı inflamasyonun merkezi rol oynadığı bildirilmiştir [7-8]. Farklı tipte kanser hücrerinde aşırı düzeyde NF-κB ekspresyonu tespit edilmiştir [11]. Hedefe yönelik tedavi strateji çalışmaları, radyasyon ve kemoterapötik etkinin NF-κB aktivasyonunda artış yolu ile hücresel letaliyi işaret etmektedir [202,204-205].

Antioksidan ve antiproliferatif etkileri bilinen flavonoidler, son yıllarda potansiyel antitümöral ajanlar olarak öne çıkmakta, ancak moleküler etki mekanizmaları henüz tam olarak bilinmemektedir Flavonoidler, doğada yaygın olarak bulundukları ve insan diyetinin önemli bir parçası oldukları için NF-κB inhibisyonunun sağlanması için kanser tedavisinde yeni bir ilgi odağı haline gelmiştir. Flavonoidler, doğada genellikle glikozit formları halinde bulunmakta, bu form sindirimde bozulmadan ince bağırsaktan emilebildiği için biyoyararlanımının yüksek olabileceği ileri sürülmektedir [25-26].

Literatürde, çalışmamızda kullanılan hesperidin bileşiğinin yolağı üzerinden etki edebileceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır [217,220]. Lee ve arkadaşları, TPA indüklü (12-0-tetradekanoil forbol 13-asetat) hepatoselüler karsinoma hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmada, hesperidin bileşiğinin NF-κB translokasyonunun inhibisyonu yolu ile MMP-9 transkripsiyonunu baskılayarak anti-invazif ve antimetastatik etki gösterebilceğini bildirmiştir [217]. Nazari ve arkadaşları ise Ramos Burkitt hücre hattında hesperidin indüklü apoptoz sürecinde transkripsiyon faktörlerinin rolünü incelemiştir. Hesperidin ile muamele edilen Ramos hücrelerinde inhibitör alt ünitelerinin (IκB) fosfolarilasyonunun inhibisyonu yoluyla konstitütif ve doksorubisin indüklü NF-κB aktivasyonunun durdurulduğu gösterilmiştir [220]. Yine aynı çalışmada, hesperidin ile muamele edilen Ramos hücrelerinde hücre canlılığının inhibisyonu ve apoptoz indüksiyonunun PPARγ bağımsız yol ile gerçekleştiği ileri sürülmüştür [220].

Bu çalışmada kullanılan kersitrin bileşiğinin NF-κB yolağı üzerinde etkisini inceleyen bir çalışma literatürde bulunmamaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Materyaller

3.1.1. Kimyasal Malzemeler

Hesperidin (CAS 520-26-3) ve Kersitrin (CAS 522-12-3) bileşikleri Santa Cruz firmasından temin edilmiş olup, stok solüsyonları 100 mg/ml olacak şekilde DMSO içinde hazırlanmıştır. Bütün stoklar küçük hacimlere bölünerek -20°C'de saklanmıştır.

Hücreleri büyütmek amacı ile ATCC modifikasyonlu fenol kırmısı +/- RPMI-1640 (Gibco, A10491-01, L-Glutamin,HEPES,sodyum pirüvat ve sodyum bikarbonat içeren) besiyerleri kullanılmıştır. Bu besiyerlerine ilk kullanımdan önce Fetal Bovin Serum (FBS, sıcaklık inaktif, Gibco,10437028) ve penisilin/streptomisin (Gibco,15140-122) eklenmiştir. FBS içeriğindeki hormon etkisini baskılamak amacı ile charcoal (Sigma, C6241) muamelesi yapılmıştır. Hücre alt kültürü esnasında %0,25 Tripsin-EDTA (Gibco, 25200072) ve Ca^{+2}/Mg^{+2} içermeyen DPBS (Gibco, 14190367) solüsyonları kullanılmıştır.

Hücre canlılık deneyleri için sırasıyla WST-1 (Roche, 11644807001) ve radyoaktif olmayan CytoTox 96 sitotoksisite (Promega,G1780) kitleri kullanılmıştır. Hesperidin ve kersitrin indüklü apoptotik etkinin incelenmesi için sırası ile CCD (Cell Death Detection,Roche,11920685001), kaspaz 3 (kolorimetrik,BioVision, K106-100) JC-1 (mitokondriyal membran deteksiyon, Cayman Chemicals, 10009172) ve AnnexinV-FITC (BD Pharmingen,556570) kitleri kullanılmıştır.

RNA izolasyonu için High Pure RNA Isolation (Roche, 11828665001) ,cDNA ve cRNA dönüşümü için ise Illumina® TotalPrep™ RNA Amplifikasyon kitleri (Ambion, AMIL1791) tercih edilmiştir. Mikroarray uygulaması Illumina Human HT-12V4 çipleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.1.2. Cihazlar

CO_2 İnkübatörü (New Brunswick), Işık Mikroskobu (Leica),Floid (Life Technologies), Otomatik Hücre Sayıcı (Life Technologies), laminar kabin (Fast Safe Elit),Santrifüj (Beckman Coulter), ,ELISA okuyucu (ThermoScan,Thermo), iScan (Illumina), Heat Block (Illumina), Bioanalyzer (Agilent),Nanodrop (Roche), Buzdolabı (+4°C,-20°C,-80°C derin dondurucu), sıvı azot tankı, otoklav, su banyosu, vortex,çalkalayıcı

3.2. Yöntem

3.2.1. ECC-I Hücre Hattı

Bu çalışmada kullanılan ECC-I (CRL-2923) hücre hattı ATCC (American American Type Culture Collection,LGC Standarts) firmasından temin edilmiştir. ECC-I endometrium hücre hattı, Saytaswaroop tarafından nude fare içine iyi derecede differansiye insan endomertium kanser tabakası transfeksiyonu ile üretilmiştir. Hücreler östrojen,progesteron ,androjen ve interferon (IFN) reseptörleri içermektedir. Yaklaşık olarak 26 saate duplike olabilmektedir. . Hücreler nemli atmosferde 37ºC sıcaklıkta ve %5 CO_2 altında büyütülmüştür. Büyüme ortamı olarak, %10 Fetal Bovine Serum ve %1 Penisilin Streptomisin içeren RPMI-1640 besiyeri kullanılmıştır.

Hesperidin ve kersitrin etkisinin güvenilir analizi için, östrojen veya benzeri etki aktivite gösteren bileşiklerin etkisini ortadan kaldırabilmek için charcoal muamelesi FBS içindeki östrojen miktarının minimuma indirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla 1 gram dekstran kaplı charcoal, 50 ml FBS içine eklenerek gece boyu çalkalayıcıda karıştırıldıktan sonra, 4500 rpm'de 30 dk santrifüj edilmiş ve üst sıvı aspirasyon yöntemi ile dikkatlice alınmıştır. Fenol kırmızısı da benzer östrojenik etkiler göstermesi nedeni ile uygulama sırasında fenol kırmızı içermeyen RPMI-1640 kullanılmıştır.

3.2.2. Hücre Ekimi

Kryotüp,37ºC su banyosunda O-halkası suya değmeyecek şekilde ~ 90 sn süre ile çözdürülmüştür. Çözünen kryotüp, etrafı %70 etil alkol ile silinerek laminar kabine alınmıştır. 1 ml hücre solüsyonu içinden 10 µl alınmış ve 1:1 oranında Trypan Blue solüsyonu ile karıştırılarak Countless Cell Counter ile hücre sayısı belirlenmiştir.

Hücre solüsyonu, 5 ml hücre besiyeri içinde süspanse edilerek 1500 rpm'de 5 dk. santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hücre pelleti, belirlenen hücre sayısına göre 25 cm2'lik flasklara ekilmiştir.

3.2.3. Alt Kültür

Hücrelerin besiyerleri 2 günde bir olacak şekilde yenilenmiştir.Hücreler konfluent oldukları durumda alt kültürleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Alt kültürleme işleminde birinci aşama olarak, besiyeri uzaklaştırılmıştır. Besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra,serum etkisini uzaklaştırmak amacı ile hücreler Ca^{+2}/Mg^{+2} (-) DPBS ile yıkanmıştır. Bu aşamadan sonra DPBS aspire edilmiştir. Hücrelerin flask yüzeyinden ayrılması için %0.25 Tripsin-EDTA karışımı eklenmiş ve 37ºC,%5 CO_2 koşullar altında 5 dk. inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresini takiben hücreler besiyeri ile yıkanmış ve santrifüj tüpüne aktarılmıştır. (Süspanse hücrelerden 10 µl alınmış ve 1:1 oranında Trypan Blue solüsyonu ile karıştırılarak Countless Cell Counter ile hücre sayısı belirlenmiştir) 5 dk. 1500 rpm'de santrifügasyon yapılmış,süpernatant uzaklaştırılmış ve hücre pelleti hücre sayısına göre belli ekim oranlarında 75 cm^2'lik flasklara ekilmiştir.

3.2.4. Hücre Dondurma

Hücre dondurulması için,alt kültürleme santrifüj aşamasından sonra pellet üzerine %90 büyüme besiyeri ve %10 FBS içeren hücre dondurma medyumu eklenerek kryotüplere 1 ml hücre solüsyonu eklenmiştir. Kryotüpler aşamalı olarak önce -80°C'ye,24 saat sonra -196°C azot tankına aktarılmıştır.

3.2.5. Hesperidin ve Kersitrin Solüsyonlarının Hazırlanması

Hesperidin ve Kersitrin bileşikleri ticari olarak satın alınmış olup çözücü olarak DMSO (Dimetil sülfoksit) kullanılmıştır. 610.6 mg/ml Hesperidin ve 448.38 mg/ml Kersitrin, DMSO ile seyreltilerek 100 mg/ml stok konsantrasyon kullanılarak farklı konsantrasyonlarda (5,10,25,50 µM) seyreltilmiştir.

3.2.6. WST-1 Hücre Canlılık Testi

Hesperidin ve Kersitrin bileşiklerinin ECC-1 hücre canlılığı üzerinde doz ve zaman bağımı etkisi WST-1 Hücre Canlılık Testi ile incelenmiştir. Pozitif kontrol olarak, hücreler üzerinde sitotoksik etki göstermeyen dozda DMSO kullanılmıştır. Yöntem metabolik aktif hücrelerde mitokondriyel süksinat dehidrogenaz aktivitesi sonucunda WST-1 tuzunun kolorimetrik olarak tayin edilebilen formazan kristallerine dönüştürülmesi prensibine dayanmaktadır. Her bir örnekten elde edilen absorbans değerleri, örnekteki canlı hücre miktarı ile doğru orantılıdır.

75 cm^2'lik flasklarda çoğaltılan ECC-1hücreleri tripsinazyon aşamasından sonra sayılmış ve $5x10^3$ hücre 100 µL büyüme medyumu içinde 96 kuyulu plaklara ekilmiştir. Her bir parametre için üç ekim yapılmıştır. Plaklar hücrelerin yapışması için 24 saat inkübatörde bekletilmiştir. Bu süreyi takiben kuyucuklardaki büyüme medyumu aspire edilerek 0,5,10,25,50 µM Kersitrin,Hesperidin ve DMSO içeren deney ortamları ilave edilmiştir. 0µM Hesperidin veya Kersitrin içeren kuyucuklar kontrol, hücre içermeyen sadece deney ortamı içeren kuyucuklar kör olarak değerlendirilmiştir. Plaklar 24, 48 ve 72 saat inkübatörde bekletilmiştir.Her sürecin sonunda ilgili plaklara 10 µL WST-1 çözeltisi eklenmiş ve plaklar 4 saat inkübatörde bekletilmiştir. Plak kuyucuklarının absorbans değerleri plak okuyucuda 450 ve 690 nm dalga boyuna karşı okunmuştur. Kontrol hücrelerinin absorbans değerleri %100 olarak kabul edilmiş ve diğer örneklerin absorbanslarından rölatif canlılık değerleri hesaplanmıştır.

Tüm absorbans değerlerinden köre ait absorbans değerlerinin ortalaması çıkartılarak asıl absorbans değerleri elde edilmiştir. Her bir örnek için elde edilen üçlü asıl absorbans değerlerinin ortalaması alınarak ortalama absorbans değerleri (ABSortalama) belirlenmiştir. Örneklerin ortalama absorbans değerleri, kontrol hücrelerinden elde edilen ortalama absorbans değerine bölünerek kontrol hücrelerine karşı rölatif absorbans oranı tespit edilmiş ve bu oran 100 ile çarpılarak her bir örnek için yüzde canlılık değeri hesaplanmıştır [**Yüzde Canlılık = [Örnek ABSortalama / Kontrol ABSortalama] x 100].**

3.2.7. LDH Hücre Sitotoksisite Testi

Hesperidin ve Kersitrin bileşiklerinin ECC-1 hücre sitotoksisitesi üzerinde doz ve zaman bağımı etkisi Cytotox Non-Radioactive Sitotoksisite Testi ile incelenmiştir. Pozitif kontrol olarak, hücreler üzerinde sitotoksik etki göstermeyen dozda DMSO kullanılmıştır. Cytotox Sitotoksisite Testi, hücrelerin lizis aşamasında açığa çıkan sitosolik LDH (Laktat Dehidrogenaz) enziminin tetrazolium tuzunun kırmızı formazan tuzuna dönüştürülmesine neden olması prensibine dayanmaktadır. Her bir örnekten elde edilen absorbans değerleri, örnekteki lizis olan hücre miktarı ile orantılıdır. 75 cm^2'lik flasklarda çoğaltılan ECC-1 hücreleri tripsinazyon aşamasından sonra sayılmış ve $5x10^3$ hücre 100 µL büyüme medyumu içinde 96 kuyulu plaklara ekilmiştir.

Her bir parametre için üç ekim yapılmıştır. Plaklar hücrelerin yapışması için 24 saat inkübatörde bekletilmiştir. Bu süreyi takiben kuyucuklardaki büyüme medyumu aspire edilerek 0,5,10,25,50 µM Kersitrin,Hesperidin ve DMSO içeren deney ortamları ilave edilmiştir. 0µM Hesperidin veya Kersitrin içeren kuyucuklar kontrol, hücre içermeyen sadece deney ortamı içeren kuyucuklar kör olarak değerlendirilmiştir. Plaklar 24, 48 ve 72 saat inkübatörde bekletilmiştir. Her sürecin sonunda bütün kuyucuklara 10X Lizis solüsyonu eklenmiş ve 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Bu aşamayı takiben enzimatik plak kuyularına 50 µl süpernatant transfer edilmiştir. Assay Çözeltisi ile Substrat karşımı hazırlandıktan sonra,enzimatik plağın her kuyusuna 50 µl Substrat eklenmiştir. Plak alimünyum folyo ile kaplanmış ve oda sıcaklığında ışıksız ortamda 30 dk. İnkübe edilmiştir. Bu süreci takiben her kuyuya 50 µl Stop solüsyonu eklenmiş ve plak okuyucuda 490 nm dalga boyun karşı absorbans okunmuştur. Kontrol hücrelerinin absorbans değerleri %100 olarak kabul edilmiş ve diğer örneklerin absorbanslarından rölatif inhibisyon değerleri hesaplanmıştır. Tüm absorbans değerlerinden köre ait absorbans değerlerinin ortalaması çıkartılarak asıl absorbans değerleri elde edilmiştir. Her bir örnek için elde edilen üçlü asıl absorbans değerlerinin ortalaması alınarak ortalama absorbans değerleri (ABSortalama) belirlenmiştir. Örneklerin ortalama absorbans değerleri, kontrol hücrelerinden elde edilen ortalama absorbans değerine bölünerek kontrol hücrelerine karşı rölatif absorbans oranı tespit edilmiş ve bu oran 100 ile çarpılarak her bir örnek için yüzde inhibisyon değeri hesaplanmıştır [**Yüzde İnhibisyon = [Örnek ABSortalama / Kontrol ABSortalama] x 100].**

3.2.8. Cell Death Detection ELISA Plus (CCD) Kolorimetrik Apoptoz Tayini

Hesperidin ve Kersitrin bileşiklerinin ECC-1 hücrelerinde neden olduğu hücre ölüm tipinin belirlenmesinde kullanılmıştır. CCD kiti hücrelerin sitoplazmik lizatlarındaki mono- ve oligo-nükleozom içeriklerini karşılaştırarak örnekler arası oransal apoptoz değerlendirmesine olanak sağlamaktadır.

75 cm^2'lik flasklarda çoğaltılan ECC-1hücreleri tripsinazyon aşamasından sonra sayılmış ve $5x10^3$ hücre 100 µL büyüme medyumu içinde 96 kuyulu plaklara ekilmiştir. Her bir parametre için üç ekim yapılmıştır. Plaklar hücrelerin yapışması için 24 saat inkübatörde bekletilmiştir. Bu süreyi takiben kuyucuklardaki büyüme medyumu aspire edilerek 0,5,10,25,50 µM Kersitrin,Hesperidin ve DMSO içeren deney ortamları ilave edilmiştir. 0µM Hesperidin veya Kersitrin içeren kuyucuklar kontrol, hücre içermeyen sadece deney ortamı içeren kuyucuklar kör olarak değerlendirilmiştir. Plaklar 48 saat inkübatörde bekletilmiştir. Bu süreçten sonra plaklar 200 g'de 10 dk. santrifüj edilmiştir ve süpernatant atılmıştır. Pelletler 200'er µL lizis tamponunda süspanse edilmiştir. Lizisin gerçekleşebilmesi için plak oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir.Plak 200g de 10 dakika santrifüj edilmiştir.

Sitoplazmik fraksiyonu içeren süpernatandan 20 µL dikkatlice streptavidin kaplı plağa aktarılmıştır. 20 µL pozitif kontrol, negatif kontrol (0µM hesperidin ve kersitrin içeren kuyucuklardan elde edilmiş hücre lizatlarının süpernatanları) ve kör (inkübasyon tamponu) streptavidin kaplı plağa aktarılmıştır. Her bir kuyucuğa 80'er µL immünoreaktif ilave edilmiştir. Plak yapışkan koruyucu ile kaplandıktan sonra oda sıcaklığında 300rpmde plak karıştırıcıda 2 saat inkübe edilmiştir. Kuyucukların içerisindeki solüsyon dikkatlice çekilip atılmış ve kuyucuklar 250-300µL inkübasyon tamponu ile üçer kez yıkanmıştır. Kuyucukların içerisindeki solüsyon dikkatlice çekilip atılmıştır.Her bir kuyucuğa 100'er µL ABST solüsyonundan ilave edilmiş ve plak, spektrofotometrik analiz için yeterli renk oluşumu sağlanana kadar (yaklaşık 10-20 dakika) 250 rpmde plak karıştırıcıda inkübe edilmiştir. Her bir kuyucuğa 100er µL ABST stop solüsyonundan ilave edilmiştir.Plak kuyucuklarının absorbans değerleri plak okuyucuda 450nm dalga boyuna karşı okunmuştur. Negatif kontrolün zenginleşme faktörü 1 olarak kabul edilmiş ve diğer örneklerin zenginleşme faktörü absorbans değerlerinden rölatif olarak hesaplanmıştır.

Tüm absorbans değerlerinden köre ait absorbans değerlerinin ortalaması çıkartılarak asıl absorbans değerleri elde edilmiştir. Her bir örnek için elde edilen üçlü asıl absorbans değerlerinin ortalaması alınarak ortalama absorbans değerleri (ABSortalama) belirlenmiştir. Örneklerin ortalama absorbans değerleri, negatif kontrol hücrelerinden elde edilen ortalama absorbans değerine bölünerek negatif kontrol hücrelerine karşı oransal absorbans oranları elde edilmiştir. Bu rölatif absorbans değeri zenginleştirme faktörü olarak adlandırılır ve her bir örnekteki mono-, oligo-nükleozom miktarının kontroldekine oranını ifade etmektedir [**Zenginleşme Faktörü = $ABS_{ortalama}$ (her bir örnek) / $ABS_{ortalama}$ (kontrol)]**

3.2.9. Kaspaz-3 Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Apoptoz sürecinde önemli bir enzim olan Kaspaz-3'ün enzim aktivitesinin belirlenmesi amacı ile kaspaz-3 kolorimetrik değerlendirme kiti (BioVision Research Products, California, CA, USA) kullanılmıştır. Bu yöntem total protein eldesinden sonra ortama verilen DEVD-pNA substratını kesen kaspaz 3'ün, pNA floresan ışıması ile miktar ölçümüne dayanmaktadır. İlk olarak (5×10^5) hücre, 6 kuyucuklu kültür kabına (2 ml besiyeri/ kuyucuk) ekilmiş ve 72 saat boyunca farklı dozlarda hesperidin ve kersitrin'e maruz bırakılmışlardır. Bu inkübasyon süresinden sonra, hücreler 800 rpm' de 5 dk santrifüj edilerek toplanmış ve süpernatantlar uzaklaştırılmıştır. Daha sonra, hücrelerin üzerine 100 µL soğutulmuş liziz tamponu ilave edilip karıştırılmış, örnekler ependorf tüpe alınıp buzun üzerinde 10 dk bekletilmiştir. 10000 rpm' de 1 dk santrifuj işleminden sonra üst sıvı faz, steril yeni bir ependorf tüpe alınıp 100 µL daha liziz tamponu eklenerek protein örnekleri hazırlanmıştır. Kaspaz aktivite ölçümü için 96 kuyucuklu düz tabanlı mikro-tabaklara ikili olarak her kuyucuğa 50 µL protein örneği ve 50 µL 2X reaksiyon tamponu eklenmiştir. Daha sonra her kuyucuğa 5 µL kaspaz-3 kolorimetrik substratı ilave edilip 37ºC' de 2 saat bekletilmiştir. Sonuçlar 405 nm dalga boyunda ELISA okuyucu (Thermo Varioskan Spectrum, Vantaa, Finland) ile okunmuştur. Bu yöntemle hücrelerde durağan ve ilaç uygulamaları sonrasında kaspaz-3 enzim aktivitesinde meydana gelen değişim belirlenmiştir.

3.2.10. Mitokondri Zar Potansiyelinin Belirlenmesi

Sağlıklı ve apoptotik hücrelerde mitokondri fonksiyonunun belirlenmesi önemli bir parametredir. Apoptoz esnasında mitokondri membran potansiyeli kaybı JC-1 mitokondri membran potansiyeli belirleme kiti (Cayman Chemicals, MI, USA) kullanılarak ELISA okuyucu aracılığıyla belirlenmiştir. Sağlıklı hücrelerde bir katyonik boya olan JC-1 mitokondride agregatlar şeklinde toplanır ve kırmızı floresan bir renk verir. Apoptotik hücrelerde ise mitokondri membran potansiyeli çökmüş olduğundan JC-1 boyası mitokondri içinde toplanamaz ve sitoplazmada monomerik formda kalarak yeşil floresan bir renk verir. Spektrofotometre ile abzorbans değerleri ölçülür ve kırmızı/yeşil abzorbans değer oranı hesaplanarak sağlıklı ve apoptotik hücreler arasındaki mitokondri membran potansiyeli farkı elde edilir. Bu amaçla $5x10^5$ hücre, 6 kuyucuklu kültür kabına (2 ml besiyeri/ kuyucuk) ekilerek, 72 saat boyunca farklı dozlarda ajanlara maruz bırakılmıştır. Hücreler 800 rpm' de 5 dk santrifuj edilerek toplanmış ve 300 µL besiyerinde çözüldükten sonra 30 dakika 30 µL JC-1 boyası eklenerek 37°C' de %5 CO_2 içeren inkübatörde 30 dakika inkübe edilmiştir. 400 g'de 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılmış ve hücreler 200 µL 1X JC-1 tamponunda çözülerek ilk yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Süpernatant 400 g'de 5 dk santrifüjden sonra uzaklaştırılmıştır. JC-1 tamponu ile yıkama işlemi tekrarlandıktan sonra hücre peleti 300 µL JC-1 tamponu ile sulandırılıp her bir örnekten 100 µL 96 kuyucuklu plakalara eklenmiştir. Plakalar spektrofotometre cihazı (Thermo Varioskan Spectrum, Vantaa, Finland) ile okunarak, yeşil/kırmızı (510/585 nm) abzorbans değerleri, mitokondri zar potansiyeli değişimini değerlendirmek üzere hesaplanmıştır.

3.2.11. Akış Sitometrik Annexin-V Apoptoz/Nekroz Analizi

Çalışmamızda Annexin-V FITC apoptoz analizi, kersitrin ve hesperidin etkisi ile hücrelerde tetiklenen apoptozun ve nekrozun kantitatif tayini amacıyla kullanılmıştır. Annexin-V apoptoz analizinde kullanılan FITC ile konjüge Annexin-V lektini, apoptotik hücrelerin hücre membranının dış yüzeyinde bulunan ve bir çeşit fosfolipit olan fosfatidil serine bağlanmaktadır. FITC, Annexin-V bağlanan hücrelerin flüoresan (FL1 dedektörü; eksitasyon= 488nm, emisyon=535nm) ışımasına neden olmaktadır. Hücrelerdeki bu floresan ışıma akış sitometrideki FL1 dedektörü ile belirlenmektedir. Işımanın şiddetine göre hücreler sınıflandırılarak bir diyagrama yerleştirilir.

Nekrotik hücreler ise nükleik asitlere bağlanabilen floresan PI (FL2 detektörü, eksitasyon= 488nm, emisyon=562-588nm) boyası ile belirlenmektedir. PI nekrotik hücrelerin integrasyonunu kaybetmiş membranından geçerek DNA fragmentlerine tutunur. Hücresel DNA'ya bağlanan PI floresan ışıma vererek akış sitometrideki FL2 dedektörü ile belirlenir. Işımanın şiddetine göre hücreler sınıflandırılır ve bir diyagrama yerleştirilir.

75 cm^2'lik flasklarda çoğaltılan ECC-1 hücreleri tripsinazyon aşamasından sonra 6 kuyulu plaklara her kuyucuğa $1x10^6$ hücre/ 2ml olarak ekilmiştir. Plaklar hücrelerin yapışması için 24 saat inkübatörde (37°C' de % 5 CO_2) bekletilmiştir. Bu süreyi takiben kuyucuklardaki büyüme medyumu aspire edilerek 0, 5, 10, 25 ve 50 µM kersitrin, hesperidin ve DMSO içeren deney ortamları hazırlanmıştır. Plaklar 48 saat inkübatörde bekletilmiştir. Kuyucuklar 1er mL PBS ile yıkandıktan sonra 1'er mL tripsin ile kaldırılmış ve 1300 rpmde 5 dakika santrifüj edilmiştir. Hücre pelleti soğuk PBS ile iki kere yıkandıktan sonra 1x Binding çözeltisi içinde süspanse edilmiştir. 100 µl solüsyon 5 ml kültür tüpüne aktarılmıştır. Aynı tüpe 5µl FITC-AnnexinV ve 5µl PI (Propidium Iodide) eklenmiştir. Hücreler vortekslenerek 15 dk. oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edilmiştir. Her tübe 400 µl 1X binding çözeltisi eklenmiş ve akış sitometride analiz edilmiştir. Annexin-V FITC yeşil ve PI kırmızı ışıma vererek apoptoz ve nekroz diyagram üzerinde belirlenir. Annexin-V (-) ve PI (+) canlılığı, PI (+) nekrozu, Annexin-V (+) erken apoptoz olarak ifade edilmektedir. Annexin-V (+) ve PI (+) hücreler ise geç apoptotik olarak değerlendirilmiştir. Diyagramdaki her bir bölgeye düşen hücre sayısının toplam hücre sayısına oranından yüzde değerleri hesaplanmıştır [**Yüzde Hücre = (Hücre sayısı bölge / Toplam Hücre sayısı) x 100].** Bu formüle göre hesaplanan yüzde değerlerinin her bir örnek için ortalamaları alınmıştır. Elde edilen ortalama hücre yüzdeleri grafiğe geçirilerek veriler değerlendirilmiştir. Tüm Annexin-V pozitif alanlara düşen hücre sayısı, Annexin-V (+) / PI (-) ve Annexin-V (+) / PI (+) değerleri toplanarak hesaplanmıştır .

3.2.12. Hücre Deney Verilerin İstatistiksel Analizi

Her deney koşulu için hücreler 3'er kez ekilecek ve deneyler 3'er kez tekrarlanarak elde edilen veriler Mann-Whitney U SPSS 16.0 programı ile $p<0.05$ anlamlılık düzeyinde negatif kontrol ve kontrol hücre hattından elde edilen veriler ile karşılaştırılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir

3.2.13. Mikroarray Analizi

3.2.13.1. RNA İzolasyonu

75 cm2'lik flasklarda çoğaltılan ECC-I hücreleri tripsinazyon aşamasından sonra sayılmış ve 10^6 hücre/ml olacak şekilde 6 kuyulu plaklara ekilmiştir. Plaklar hücrelerin yapışması için 24 saat inkübatörde bekletilmiştir. Bu süreyi takiben kuyucuklardaki büyüme medyumu aspire edilerek 50 μM Kersitrin, Hesperidin veya DMSO içeren deney ortamları ilave edilmiştir. Plaklar 48 saat inkübatörde bekletilmiştir. Kuyucuklar 1'r mL PBS ile yıkandıktan sonra 1'er mL tripsin ile kaldırılmış ve 1300 rpmde 5 dakika santrifüj edilmiştir. Hücre pelleti soğuk PBS ile iki kere yıkandıktan sonra PBS çözeltisi içinde 10^6 hücre/ml olacak şekilde süspanse edilmiştir. Bu aşamadan sonra üretici firmanın önerdiği protokole göre RNA izole edilmiştir. Elde edilen RNA'ların miktarı ve integritesi sırası ile nanodrop ve Bioanalyzer aletleri vasıtasıyla ölçülmüştür. 50 ng-500 ng aralığında bulunan ve degrade olmamış RNA örnekleri, ticari kit vasıtası ile cRNA'ya dönüştürülmüştür.

3.2.13.2. Mikroarray Yöntemi

Elde edilen RNA örneklerinin gen ifade profilleri çıkarılmıştır. Örneklerin gen ifade profilleri 47 binden fazla prob kullanılarak genom boyu transkriptlerin miktarını tespit eden Illumina Human HT-12V4 mikroçipi ile elde edilmiştir. Her örnek bir sefer çalışılarak ölçümlenmiştir.

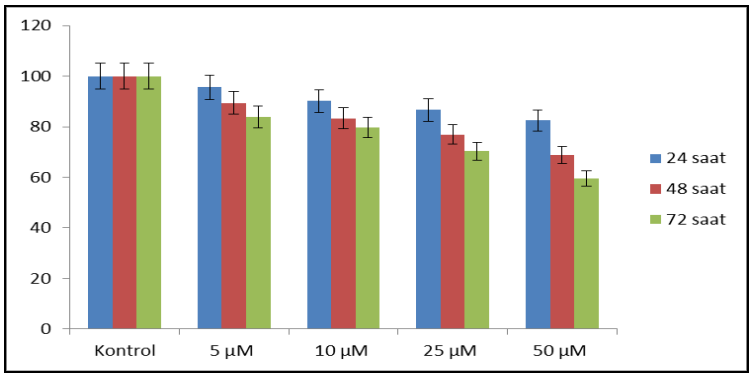
3.2.13.3. Normalizasyon ve Transformasyon

Ham mikrodizi verisi GenomeStudio programı yardımı ile elektronik verilere dönüştürülmüştür. Daha sonra her örneğin verisinden arkaplan gürültüsü uzaklaştırılmış ve veriler yüzdelik (quantile) normalizasyona tabi tutulmuştur. Normalize edilen tüm veri kullanılarak örneklerin gen ekspresyon profilleri arasında hiyerarşik kümeleme analizi yapılmıştır. Biyolojik Fonksiyon ve yolak analizi IPA (Ingenuity Pathway Software) kullanılarak yapılmıştır.

4. BULGULAR

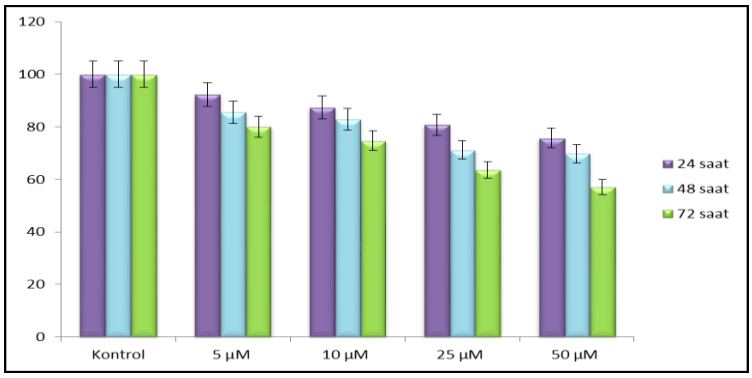
4.1. Flavonoidlerin Hücre Canlılığı Üzerinde Doz ve Zaman Bağımlı Etkisi

0, 5,10, 25 ve 50 µM Hesperidin, Kersitrin ve pozitif kontrol olarak DMSO ile 24, 48, 72 saat inkübe edilen ECC-1 endometrial kanser hücreleri 96-well plaklarda kuyucuk başına $5x10^3$ hücre olacak şekilde 3'er kez ekilerek, hücrelerin yapışması ve duplikasyonu için 24 saat beklendikten sonra denemeler gerçekleştirilmiştir. Hesperidin ve Kersitrin ilave edilmeyen (0µM) kontrol grubu hücrelerinin canlılığı tüm zaman dilimleri için %100 kabul edilmiş ve diğer örneklere ait canlılık değerleri oransal olarak absorbans değerlerinden hesaplanmıştır. Bulgular Hesperidin'nin ECC-1 hücre hattında konsantrasyon ve süreye bağımlı olarak hücre ölümüne neden olduğunu göstermektedir. Bu etki özellikle 50 µM Hesperidin ile 48 ve 72 saat muamele edilen hücrelerde sırası ile %38.72 ve %42.28 oranlarında azalma görülmüştür ($p<0.05$). 10 ve 25 µM Hesperidin ile 72 saat muamele sonucu sırası ile %22.35 ve %31.73 oranlarında kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde hücre ölümünün gerçekleştiği saptanmıştır ($p<0.05$). 24 saatlik inkübasyon sürelerinde, Hesperidin'nin 50µM'dan daha düşük konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde ($p>0.05$) hücre ölümünün gerçekleşmediği belirlenmiştir. Belirtilen veriler Şekil 11'de gösterilmektedir.



Şekil 11 Hesperidin'in ECC-1 Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Bulgular Kersitrin'nin ECC-1 hücre hattında konsantrasyon ve süreye bağımlı olarak hücre ölümüne neden olduğunu göstermektedir. Bu etki özellikle 50 µM Hesperidin ile 48 ve 72 saat muamele edilen hücrelerde yaklaşık %29.28 ve %42.48 oranında görülmüştür ($p<0.05$). 25 µM Hesperidin ile 72 saat muamele sonucu %31.73 oranında kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde hücre ölümünün gerçekleştiği saptanmıştır ($p<0.05$). 24 saatlik inkübasyon sürelerinde, Hesperidin'nin 50µM'dan daha düşük konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde ($p>0.05$) hücre ölümünün gerçekleşmediği belirlenmiştir (Şekil 12).

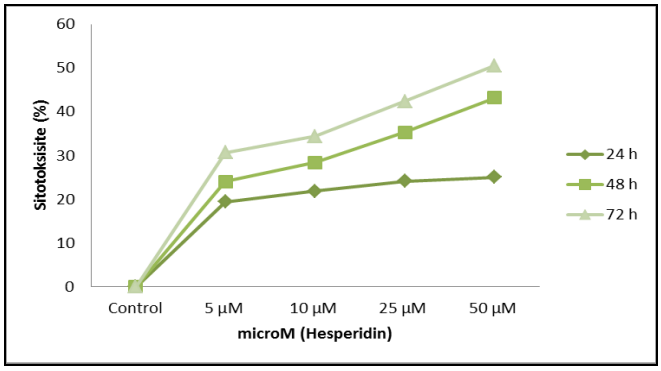


Şekil 12 Kersitrin'in ECC-1 Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

4.2. Flavonoidlerin Hücre Üzerinde Olası Sitotoksik Etkisinin İncelenmesi

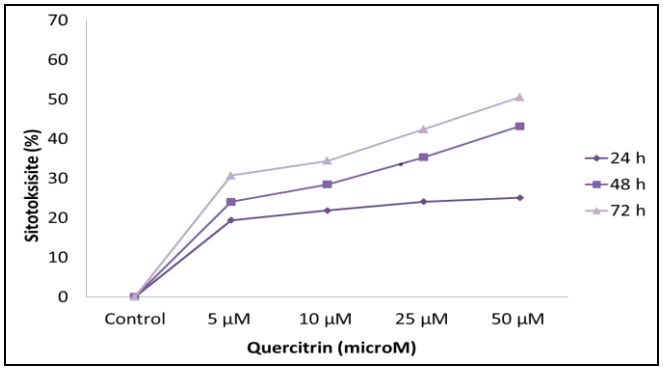
5,10, 25 ve 50 µM Hesperidin, Kersitrin ve pozitif kontrol olarak DMSO ile 24, 48, 72 saat inkübe edilen, ECC-1 kanser hücreleri 96-well plaklarda kuyucuk başına $5x10^3$ hücre olacak şekilde 3'er kez ekilerek, hücrelerin yapışması ve duplikasyonu için 24 saat beklendikten sonra denemeler gerçekleştirildi. Hesperidin ve kersitrin ilave edilmeyen (0µM) kontrol grubu hücrelerinin inhibisyonu tüm zaman dilimleri için %0 kabul edildi ve diğer örneklere ait yüzde inhibisyon değerleri oransal olarak absorbans değerlerinden hesaplanmıştır. Bulgular Hesperidin'nin ECC-1 hücre hattında konsantrasyon ve süreye bağımlı olarak hücre ölümüne neden olduğunu göstermektedir. Bu etki özellikle 50 µM Hesperidin ile 48 ve 72 saat muamele edilen hücrelerde sırası ile %43.19 ve %50.53 görülmüştür ($p<0.05$).

25 µM Hesperidin ile 48 ve 72 saat muamele sonucu sırası ile %35.30 ve %42.38 oranlarında kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde hücre ölümünün gerçekleştiği saptanmıştır ($p<0.05$). 24 ve 48 saat inkübasyon sürelerinde, Hesperidin'nin 50µM'dan daha düşük konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde ($p>0.05$) hücre ölümünün gerçekleşmediği belirlenmiştir. Bu sonuçlar WST-1 sonuçları ile uyum göstermektedir (Şekil 13).



Şekil 13 Hesperidin'in ECC-1 Hücre Hattında Sitotoksik Etkisinin İncelenmesi

Bulgular Kersitrin'nin ECC-1 hücre hattında konsantrasyon ve süreye bağımlı olarak hücre ölümüne neden olduğunu göstermektedir. Bu etki özellikle 50 µM kersitrin ile 48 ve 72 saat muamele edilen hücrelerde sırasıyla %40.27 ve %50.1 oranında görülmüştür ($p<0.05$). Kersitrin'nin 50µM'dan daha düşük konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde ($p>0.05$) hücre ölümünün gerçekleşmediği belirlenmiştir. Bu sonuçlar WST-1 sonuçları ile uyum göstermektedir (Şekil 14).



Şekil 14 Kersitrin'in ECC-1 Hücre Hattında Sitotoksik Etkisinin İncelenmesi

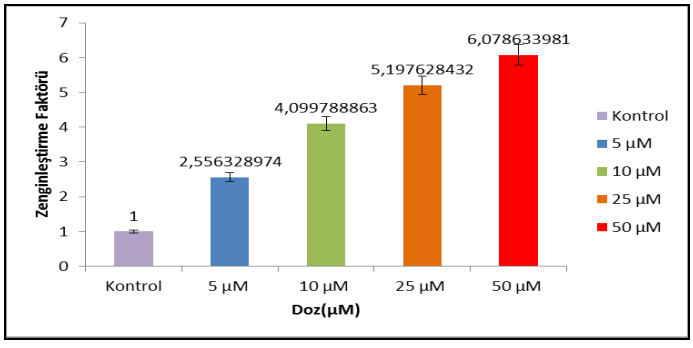
4.3. Canlılığı Etkileyen Hücre Ölüm Tipinin Belirlenmesi

Hücre canlılığı deneylerinde kullanılan 0, 5, 10, 25,50 µM Hesperidin veya kersitrin dozları ile 48 saat inkübe edilen ECC-1 hücrelerinde gerçekleşen hücre ölümünün ağırlıklı olarak apoptotik hücre ölümü olup olmadığı Cell Death Detection ELISAPLUS Kolorimetrik Apoptoz tayini, kaspaz-3, ‚JC-1 mitokondriyel membran potansiyel kaybı ve Akış Sitometrik Annexin-V Apoptoz/Nekroz Analizi analizleri kullanılarak incelenmiştir.

4.3.1. Cell Death Detection ELISAPLUS Kolorimetrik Kit ile Apoptoz Tayini

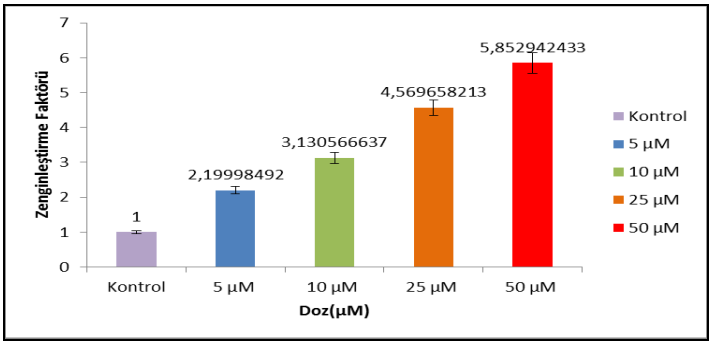
0, 5, 10, 25,50 µM Hesperidin,Kersitrin ve pozitif kontrol olarak DMSO ile 48 saat inkübe edilen ECC-I hücrelerinde tetiklenen apoptoz, Cell Death Detection ELISAPLUS kolorimetrik apoptoz tayin kiti ile belirlendi. 96-well plaklarda kuyucuk başına $5x10^3$ hücre 3'er kez ekilerek, hücrelerin yapışması ve dublikasyonu için 24 saat beklendikten sonra 48 saatlik inkübasyon sürecini takiben, üretici firmanın önerdiği yönteme göre gerçekleştirildi. DNA fragmantasyonunu ifade eden mono- ve oligo-nükleozom zenginleşmesi 0µM DMSO (kontrol hücreleri) örneği için 1,00 kabul edilerek diğer örneklere ait zenginleşme faktörleri oransal olarak hesaplanmıştır.

ECC-1 hücreleri ile yapılan denemeler sonucu elde edilen bulgular, apoptozun 25 ve 50 µM Hesperidin ile 48 saat inkübe edilen hücrelerde kontrol hücrelerine göre sırasıyla 5.19 ve 6.07 kat olmak üzere anlamlı düzeyde artış göstermektedir (Şekil 15) ($p<0.05$)



Şekil 15 ECC-1 Hücre Hattında CCD ile Hesperidin'in Apoptoz Etki Tayini

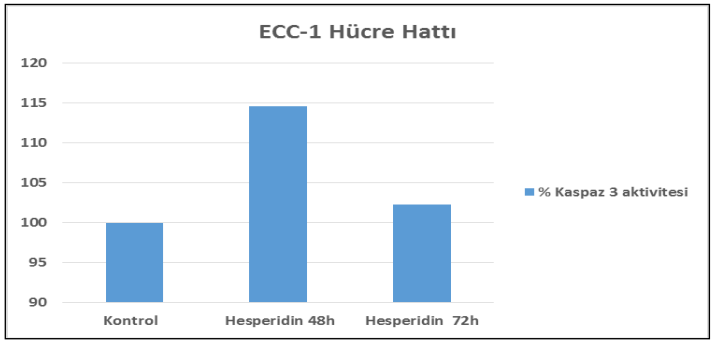
ECC-I hücreleri ile yapılan denemeler sonucu elde edilen bulgular, apoptozun 25 ve 50 µM Kersitrin ile 48 saat inkübe edilen hücrelerde kontrol hücrelerine göre sırasıyla 4.56 ve 5.85 kat olmak üzere anlamlı düzeyde artış göstermektedir (Şekil 16) ($p<0.05$).



Şekil 16 ECC-1 Hücre Hattında CCD ile Kersitrin'in Apoptoz Etki Tayini

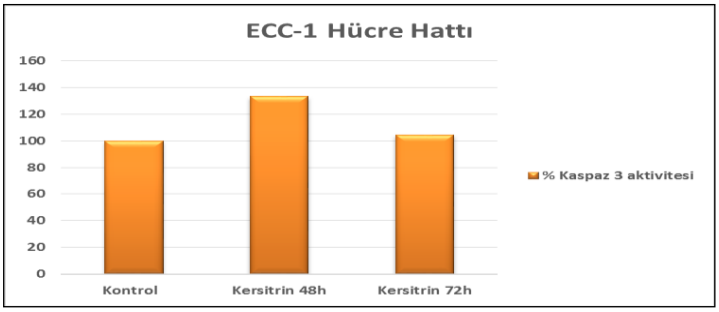
4.3.2. Kaspaz 3 Aktivitesinin İncelenmesi

50 µM Hesperidin'in 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürecinde kaspaz-3 aktivitesi üzerine etkisi incelenmiş olup, 48 saatte 1.5 kat anlamlı artış tespit edilmiştir (Şekil 17).



Şekil 17 Hesperidin'in Kaspaz 3 Aktivitesi Üzerine Etkisi

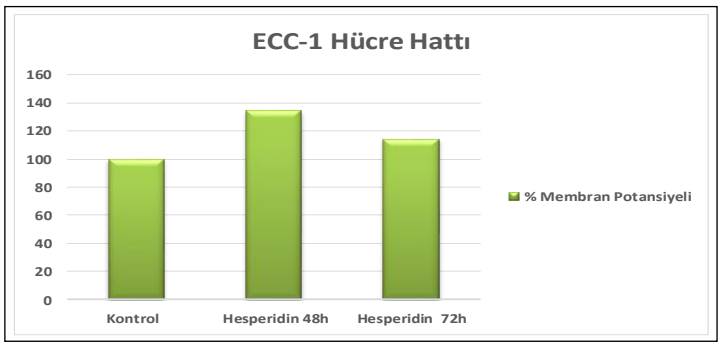
50 µM Kersitrin'in 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürecinde kaspaz-3 aktivitesi üzerine etkisi incelenmiş olup, 48 saatte 1.4 kat anlamlı artış tespit edilmiştir (Şekil 18).



Şekil 18 Kersitrin'in Kaspaz3 Aktivitesi Üzerine Etkisi

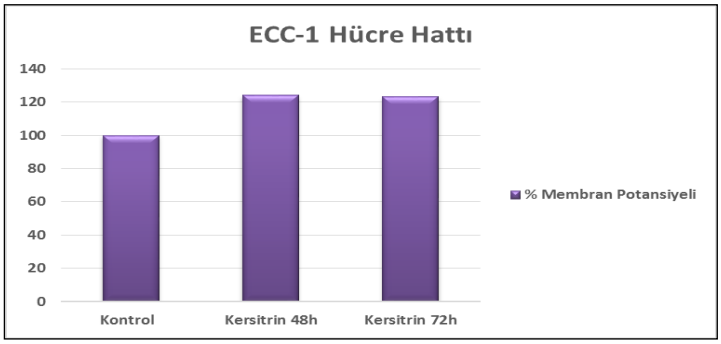
4.3.3. Mitokondri Zar Potansiyelinin Belirlenmesi

50 µM Hesperidin'in 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürecindemembran potansiyel kayıp aktivitesi üzerine etkisi incelenmiş olup, 48 saatte 1.4 kat anlamlı artış tespit edilmiştir (Şekil 19)



Şekil 19 Hesperidin'in Mitokondriyel Membran Potansiyeli Üzerine Etkisi

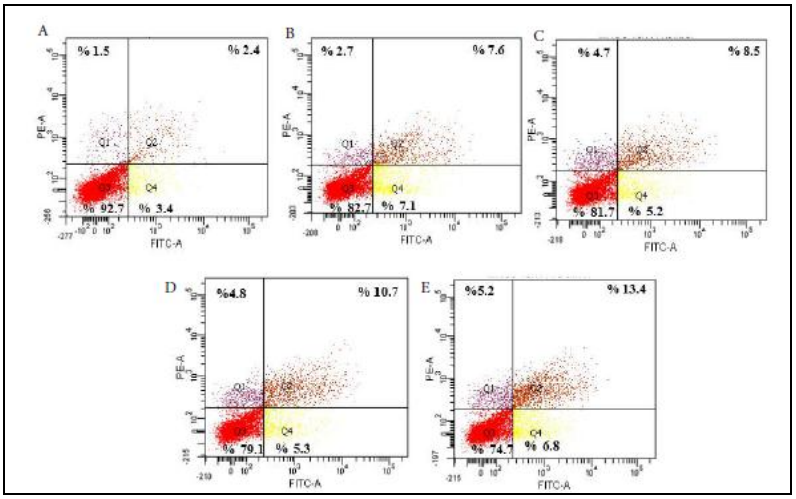
50 µM Kersitrin'in 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürecinde membran potansiyel kayıp aktivitesi üzerine etkisi incelenmiş olup, 48 ve 72 saatte yaklaşık 1.3 kat anlamlı artış tespit edilmiştir (Şekil 20)



Şekil 20 Kersitrin'in Mitokondriyel Membran Potansiyeli Üzerine Etkisi

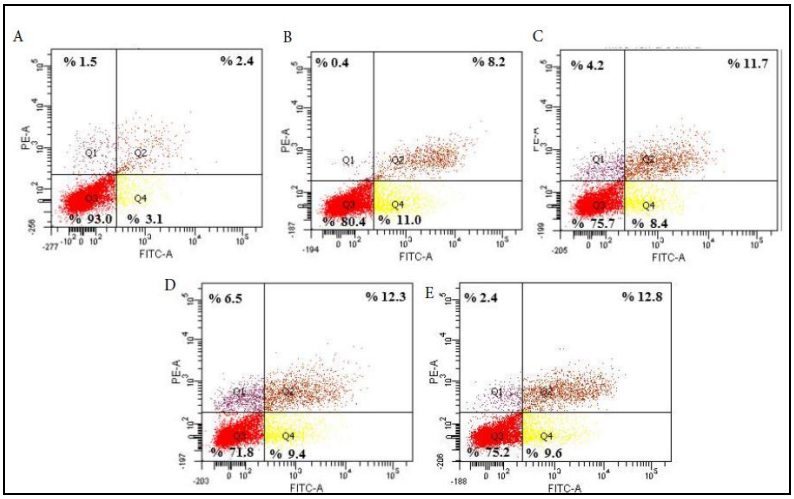
4.3.4. AnnexinV-FITC Yöntemi ile Apoptoz/Nekroz Analizi

0, 5, 10, 25, 50 µM hesperidin,kersitrin veya pozitif kontrol olarak DMSO ile 48 saat inkübe edilen ECC-1 hücrelerinde tetiklenen hücre ölümünün tipi, Akış Sitometrik Annexin-V Apoptoz/Nekroz Analizi ile belirlenmiştir. Her bir örnek için akış sitometride 10.000 hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Annexin-V (-) ve PI (-) hücreler sağlıklı, Annexin-V (+) ve PI (-) hücreler erken apoptotik, Annexin-V (+) ve PI (+) hücreler geç apoptotik ve son olarak Annexin-V (-) ve PI (+) hücreler nekrotik olarak kabul edilmiştir (Şekil 21 ve 22). BCDE



Şekil 21 ECC-1 hücrelerine hesperidin uygulanması ile elde edilen hücre dağılımları

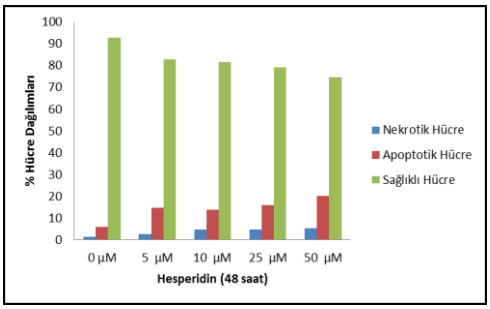
A) 0µM (kontrol hücreleri), B) 5 µM, C) 10 µM, D) 25 µM ve E) 50 µM hesperidin ile 48 saat muamele edilen hücreler



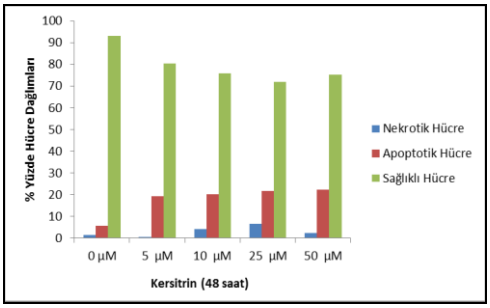
Şekil 22 ECC-1 hücrelerine Kersitrin uygulanması ile elde edilen hücre dağılımları

A) 0µM (kontrol hücreleri), B) 5 µM, C) 10 µM, D) 25 µM ve E) 50 µM kersitrin ile 48 saat muamele edilen hücreler

Uygulanan hesperidin ve kersitrin dozlarında kontrol grubuna göre apoptotik/nekrotik hücre ölüm oranları karşılaştırılmıştır. Apoptotik hücre ölümünün 50 µM hesperidin veya kersitrin ile 48 saat muamele edilen hücrelerde %20.2 ve %22.4 oranında görüldüğü belirlenmiştir. ($p<0.05$) (Şekil 23 ve 24).



Şekil 23 Hesperidin'nin ECC-1 hücrelerine apoptotik/nekrotik etkisi



Şekil 24 Kersitrin'nin ECC-1 hücrelerine apoptotik/nekrotik etkisi

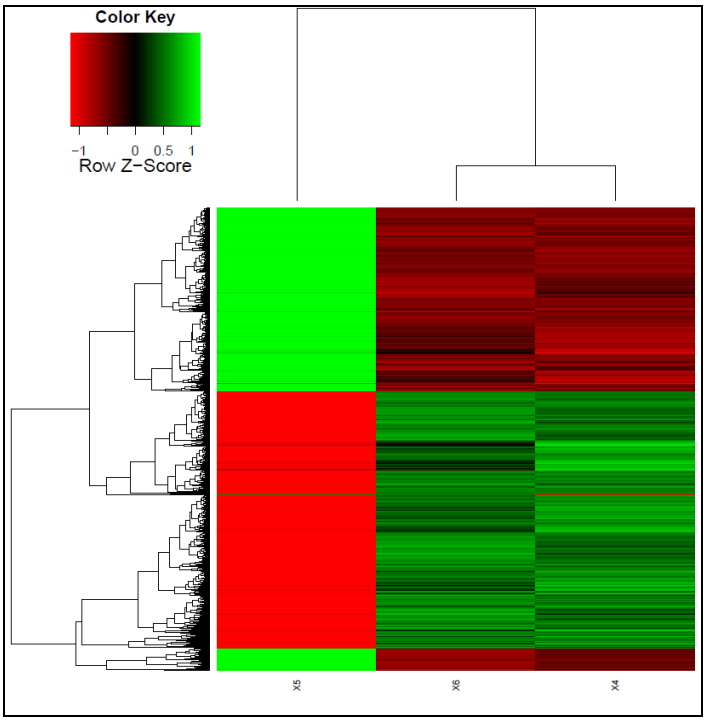
4.4. Mikroarray Analizleri

4.4.1. İstatistiksel Analiz

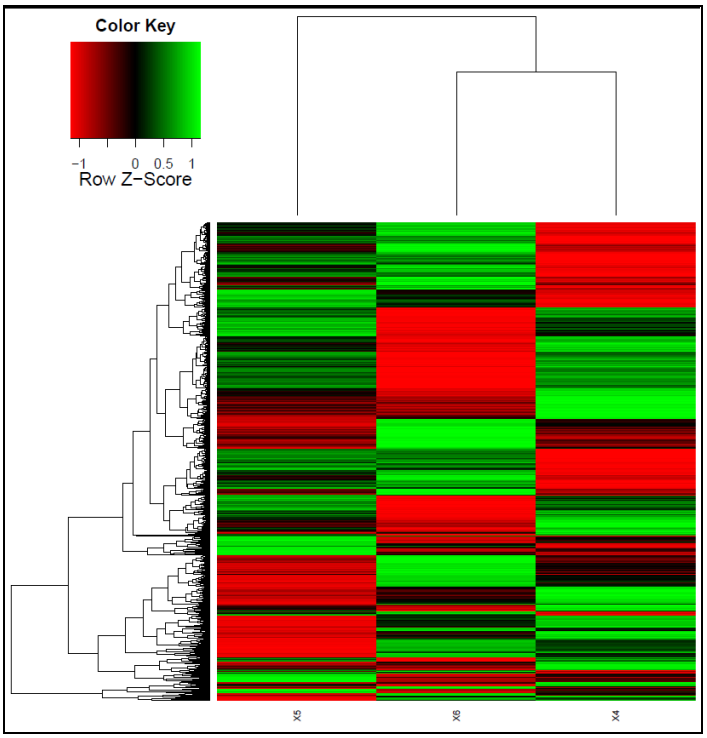
Ön analizin tamamlanmasından sonra elde edilen veriler kullanılarak oluşturulan kontrol ve 50 μM hesperidin veya kersitrin ile muamele edilmiş hücreler gruplandırılarak diferansiyel ekspresyon analizi yapılmıştır. Fold Change değerlerinin (+) olması gen ekspresyonunun artması, (-) olması gen ekspresyonun azalması anlamına gelmektedir.

4.4.2. Hiyerarşik kümeleme ve Heatmap

İki grubun karşılaştırmasında anlamlı değişim tespit edilen genler ve ekspresyon seviyeleri kullanılarak yapılan hiyerarşik kümeleme genlerin ve örneklerin ekspresyon paternlerine göre gruplandırılmasını göstermektedir. Bu kümelemede sütunlar örnekleri, satırlar probları ifade etmektedir. Kümeleme sonucu ile ekspresyon skalaları bir 'heatmap' olarak gösterilmiştir. Bu problar kullanılarak hazırlanan sıcaklık haritası ve tekrar edilen hiyerarşik kümeleme ile aşağıda gösterilmiştir. Kırmızı renk ekspresyon seviyesindeki azalmayı gösterirken yeşil renk ise artışı göstermektedir. Diferansiyel ekspresyon gösteren probların hiyerarşik kümelemesi sonucunda tümör ve kontrol hücre örneklerinin ekspresyon profilleri bakımından ayrıştığı görülmektedir. Şekil 25'te kontrol ile 50 μM hesperidin,Şekil 26'da ise kontrol ile 50 μM kersitrin kıyaslanması sonucu ortaya çıkan heatmap analizleri verilmiştir.



Şekil 25 Hesperidin indüklü ve normal hücre örneklerinin heatmap haritası



Şekil 26 Kersitrin indüklü ve normal hücre örneklerinin heatmap haritası

4.4.3. Biyolojik Fonksiyon ve Yolak Analizleri

Çalışılan bütün hücre hatları için, hesperidin vs. kontrol ve kersitrin vs. kontrol olmak üzere iki grup oluşturulmuş ve IPA (Ingenuity Pathway Analysis) programı kullanılarak anlamlı farklılık gösteren biyolojik fonksiyon ve yolak analizi yapılmıştır.

4.4.3.1. Hesperidin'in ECC-1 Hücre Hattında Tüm Genom Üzerine Etkisinin İncelenmesi

ECC-1 hücre hattında 50 µM hesperidin ve kontrol fold change değerleri karşılaştırılarak ile yapılan network analizi sonucu en yüksek skorlu bulunan network listesi Şekil 27'de verilmektedir. Bu analize göre 31 skor ile en yüksek skorlu yolak olarak gelişimsel ve metabolizma hastalıkları ile göze çarpmaktadır.

ID	Associated Network Functions	Score
1	Auditory Disease, Developmental Disorder, Hereditary Disorder	31
2	Developmental Disorder, Hereditary Disorder, Metabolic Disease	31
3	Carbohydrate Metabolism, Post-Translational Modification, Cell Morphology	31
4	Behavior, Hereditary Disorder, Ophthalmic Disease	28

Şekil 27 Network Analizi

Elde edilen sonuçlar ile biyolojik fonksiyon analizi yapılmış ve fizyolojik sistemlerin hesperidin indüklü endometrium kanser hücreleri ile istatistiksel olarak ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Şekil 28).

Name	p-value	# Molecules
Connective Tissue Development and Function	3,76E-06 - 1,14E-02	355
Organismal Development	4,77E-05 - 1,08E-02	306
Tissue Morphology	1,08E-04 - 1,01E-02	204
Tumor Morphology	1,17E-04 - 1,12E-02	321
Tissue Development	6,03E-04 - 1,08E-02	156

Şekil 28 Biyolojik Fonksiyon Analizi

ECC-1 hücre hattında 50 µM hesperidin ve kontrol fold change değerleri karşılaştırıldığında en yüksek ve en düşük değeri veren genler Şekil 29 ve 30'da gösterilmektedir.

Molecules	Exp. Value
TTN	↑124,740
UGT2B7*	↑62,749
DOK1	↑62,401
KCTD7	↑59,561
COL8A1*	↑47,871
APOF	↑38,561
SLC4A8	↑38,507
GOLGA8I*	↑38,059
UCA1	↑37,087
SLC14A1	↑36,861

Şekil 29 Fold-change değeri en yüksek olan genler

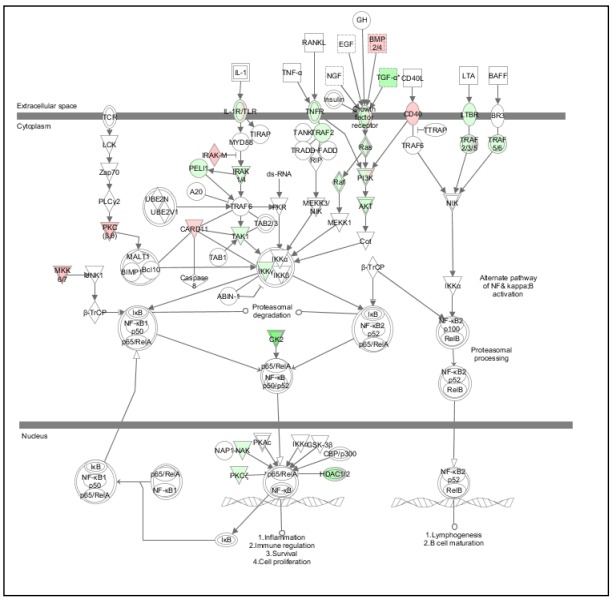
50 µM hesperidin ve kontrol fold change değerleri karşılaştığında en yüksek gen ekspresyon seviyesine sahip olan genleri listesi. TTN,Çizgili Kas Geni; UGT2B7 UDP glikotransferaz 2 ailesi, polipeptid B; DOK1,Docking protein 1; KCTD7, Potasyum kanalı tetradimerizasyon proteini; COL8A1, Kollajen tip 8 alfa 1,;APOF, apolipoprotein F; SLC4A8, Sodyum bikarbonat taşıyıcısı; GOLGA8I, Golgin A8 ailesi ; UCA1,Üroteliyal kanser ilişkili protein; SLC14A1, Sodyum bikarbonat taşıyıcısı

Molecules	Exp. Value
RPL12*	↓-319,955
RPLP1*	↓-224,689
RPS9*	↓-204,316
RPS15A*	↓-198,782
RPS25	↓-166,117
RPS8	↓-158,638
RPLP0*	↓-139,363
RPL24	↓-135,277
EEF1A1*	↓-120,372
EEF1G	↓-117,545

Şekil 30 Fold-change değerleri düşük olan genler

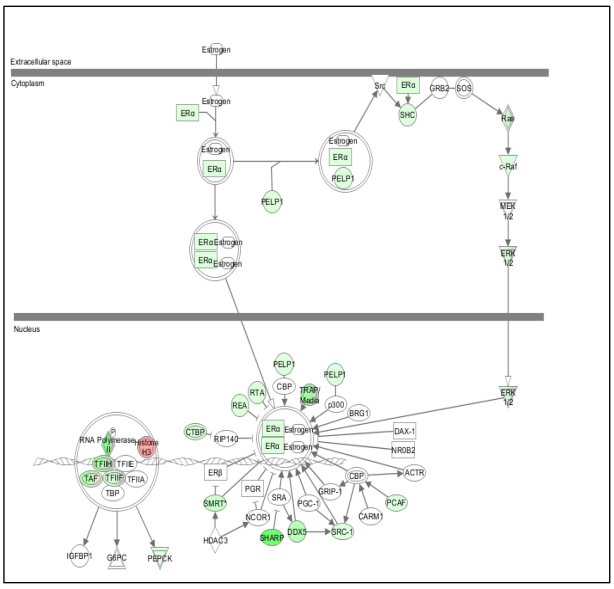
50 µM hesperidin ve kontrol fold change değerleri karşılaştığında en düşük gen ekspresyon seviyesine sahip olan genleri listesi. RPL,RPS;ribozomal protein, EEF,EF-1-alfa; elongasyon faktörü

ECC-1 hücre hattında 50 µM hesperidin ve kontrol fold change değerleri karşılaştırılarak ile yapılan yolak analizi sonucunda NF-κB sinyal iletim yolağının östrojen ve Ras-Raf-MAPK sinyal iletim yolakları ile koordineli olarak çalıştığı ve NF-κB sinyal iletim yolunun aktivasyonunda önemli rol alan IKK genlerinin ekspresyon seviyelerinin azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 31).



Şekil 31 NF-κB Sinyal İletim Yolağı

50 µM hesperidin indüklü endometrium kanser hücrelerinin kullanıldığı çalışmada NF-κB yolağının RAS-RAF-MAPK yolağı ile çapraz etkileşime girerek inaktif konumda olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 32 Östrojen Sinyal İletim Yolağı

50 µM hesperidin indüklü endometrium kanser hücrelerinin kullanıldığı çalışmada östrojen reseptör (ER) ekspresyonunun azaldığı, bu durumun Ras-MAPK sinyal iletim yolağında bulunan ve ER hedef ekspresyon seviyelerini etkileyebilceği tespit edilmiştir.

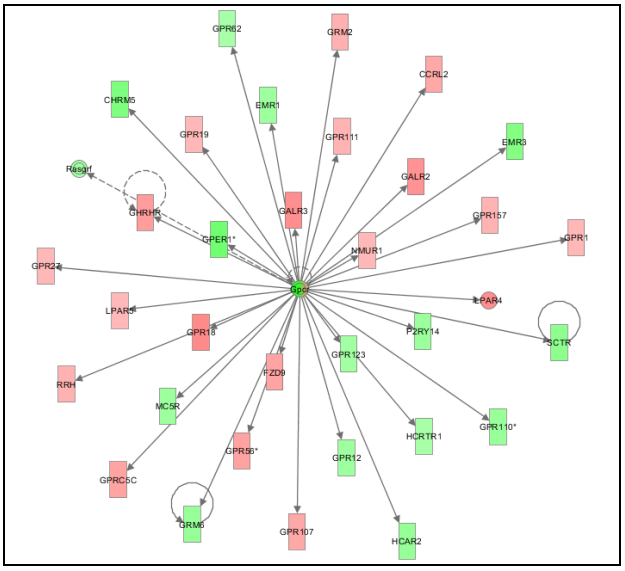
4.4.3.2. Kersitrin'in ECC-1 Hücre Hattında Tüm Genom Üzerine Etkisinin İncelenmesi

ECC-1 hücre hattında 50 µM kersitrin ve kontrol fold change değerleri karşılaştırılarak ile yapılan network analizi sonucu en yüksek skorlu bulunan network ve bu networkda görev alan gen ilişkisi Şekil 32 ve 33'de verilmektedir. Bu analize göre 41 skorla en yüksek skorlu network olarak gelişimsel ve genetik hastalıklar ile 36 skorla hücre hücre ilişkisi ve moleküler transport fonksiyonları tespit edilmiştir.

ID	Associated Network Functions	Score
1	Neurological Disease, Developmental Disorder, Hereditary Disorder	41
2	Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Cell Signaling, Molecular Transport	36
3	Neurological Disease, Skeletal and Muscular Disorders, Connective Tissue Disorders	35
4	Hereditary Disorder, Metabolic Disease, Neurological Disease	35

Şekil 33 Network Analizi

50 µM kersitrin indüklü endometrium kanser hücrelerinin kullanıldığı çalışmadan elde edilen mikroarray verileri, ortaya çıkan gen profilinin gelişimsel hastalık ve moleküler transport mekanizmaları ile ilişkili olduğunu göstermektedir.



Şekil 34 Gen-Gen ilişkisi

Kırmızı renk gen ekspresyonunda artışı, yeşil renk gen ekspresyonunda azalışı işaret etmektedir. Bu networkda yer alan genlerin prolaktin salgılayıcı hormon reseptör ailesine (GPR) ait olup, ortak çıkış noktalarının G protein eşli reseptör 2 olduğu tespit edilmiştir.

Elde edilen sonuçlar ile fizyolojik,hücresel ve hastalıklar ile ilişkili biyolojik fonksiyon analizi yapılmış ve inflamatuar yanıtın kersitrin indüklü endometrium kanser hücre gelişimi ve tümör morfolojisi ile istatistiksel olarak ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Şekil 35).

Diseases and Disorders

Name	p-value	# Molecules
Inflammatory Response	5,23E-06 - 8,66E-03	307
Cardiovascular Disease	1,45E-05 - 8,23E-03	250
Cancer	1,59E-05 - 8,49E-03	1247
Organismal Injury and Abnormalities	1,59E-05 - 8,43E-03	503
Reproductive System Disease	1,59E-05 - 6,55E-03	390

Şekil 35 Hastalık ve Metabolizma Bozuklar ile İlişkili Biyolojik Yolaklar

50 µM kersitrin indüklü endometrium kanser hücrelerinin kullanıldığı çalışmadan elde edilen mikroarray verileri, ortaya çıkan gen profilinin inflamatuar yanıt ve kanser ilişkisi ile istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir.

Molecular and Cellular Functions

Name	p-value	# Molecules
Cellular Growth and Proliferation	3,36E-11 - 8,27E-03	678
Cellular Development	1,54E-08 - 8,46E-03	599
Cellular Movement	2,11E-07 - 8,66E-03	397
Carbohydrate Metabolism	1,53E-06 - 6,55E-03	176
Cellular Function and Maintenance	2,57E-06 - 8,44E-03	302

Şekil 36 Moleküler ve Hücresel Fonksiyonlar ile İlişkili Biyolojik Yolaklar

50 µM kersitrin indüklü endometrium kanser hücrelerinin kullanıldığı çalışmadan elde edilen mikroarray verileri, hücresel büyüme ve proliferasyonda rol alan genlerin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir.

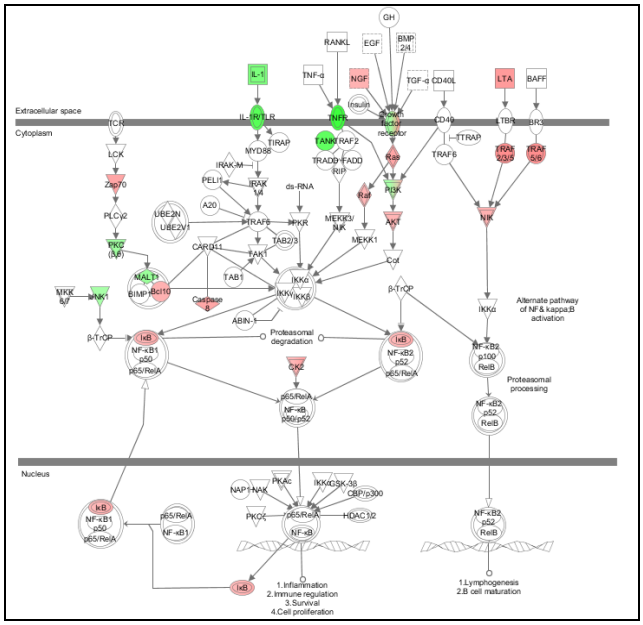
Physiological System Development and Function

Name	p-value	# Molecules
Tumor Morphology	2,18E-05 - 6,55E-03	183
Tissue Development	3,05E-05 - 8,73E-03	273
Cardiovascular System Development and Function	5,97E-05 - 8,47E-03	268
Hematological System Development and Function	6,30E-05 - 8,66E-03	337
Embryonic Development	8,04E-05 - 8,73E-03	331

Şekil 37 Fizyolojik Sistemler ile İlişkili Biyolojik Yolaklar

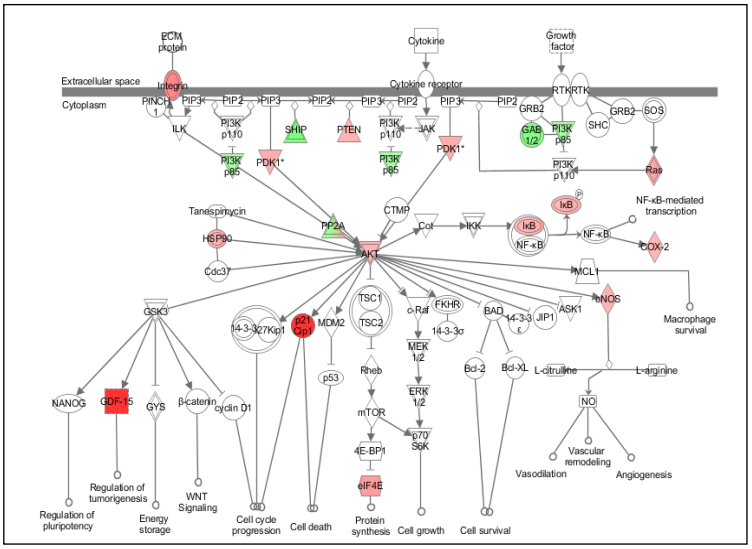
50 µM kersitrin indüklü endometrium kanser hücrelerinin kullanıldığı çalışmadan elde edilen mikroarray veriler,tümör morfolojisi ve doku gelişimde rol alan genlerin fizyolojik açıdan istatistiksel olarak anlamlı olduğunu işsaret etmektedir.

ECC-1 hücre hattında 50 µM kersitrin ve kontrol fold change değerleri karşılaştırılarak ile yapılan yolak analizi sonucunda NF-κB sinyal iletim yolağının PI3K –Akt ve MAPK sinyal iletim yolakları ile koordineli olarak çalıştığı ve NF-κB sinyal iletim yolunun aktivasyonunda rol alan IκB gen ekpresyonunun arttığı tespit edilmiştir (Şekil 38-39).



Şekil 38 NF-κB Yolağı

50 µM kersitrin indüksiyonunun alternatif NF-κB yolağının tetiklenmesinde rol alan genlerin ekspresyonunda artışa sebep olduğu ancak IκB gen ekpresyonunda artış nedeni ile uyarının nukleusa transloke olamadığı tespit edilmiştir.



Şekil 39 PI3K Akt Yolağı

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada,literatürde ilk kez,hesperidin ve kersitrin flavonoidlerinin ECC-1 endometrium kanser hattı üzerindeki apoptotik etkileri ve bu etkinin NF-κB sinyal iletim yolağı ile ilişkisi incelenmiştir.

Bu çalışmada hesperidin ve kersitrinin doza ve zamana bağlı ECC-I hücre hattının canlılığı WST-1 ve LDH testleri ile incelenmiştir. 48 ve 72 saat süre ile 50 μM hesperidin veya kersitrin uygulamasında hücre canlılığının yüksek oranda azaldığı belirlenmiştir. Literatürde hesperin bileşiğinin değişik kanser hücre hatları üzerinde antiproliferatif ve apoptotik etki gösterebildiğine dair çalışmalar bulunmakta olup çalışmadan elde ettiğimiz veriler ile korelasyon göstermektedir [216-220]. Park ve arkadaşları, SNU-C4 kolon kanser hücre hattı üzerinde yaptıkları çalışmada hesperidin'in doz bağımlı apoptotik etkilerini araştırmış ve 100 mM hesperidin'in hücre canlılığını kontrole kıyasla %65 oranında düşürdüğünü bildirmiştir. Lee ve arkadaşları ise androjen bağımsız PC3ve DU3 prostat kanseri hücre hatları, androjen bağımlı LNCaP prostat kanseri hücre hattı ve MCF-7 östrojen bağımlı meme kanseri hücre hattı üzerinde hesperidin etkisini incelemişlerdir [217]. Hesperidin'in GFP ile transfekte edilmiş meme kanseri hücre hattında hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ancak bu olayın antimitotik mekanizma ile gerçekleşmediği bildirilmiştir. Hesperidin aynı zamanda bazal ve testosteron indüklü LNCaP hücrelerinin proliferasyonunu da inhibe etmiştir. Bununla birlikte, hormon bağımsız prostat hücre hatlarının (PC3 ve DU9145) canlılığı üzerinde herhangi bir etki tespit edilememiştir [217]. Bu çalışmadan elde edilen verilerde, hesperidinin androjenik reseptörlerle olan ilişkisi prostat kanseri gelişiminde rol oynayan olası sinyal mekanizmalarını etkileyebileceğini ortaya koymaktadır.

Kersitrin, kersetin bileşiğinin glikolize formu olup, doğada yaygın olarak bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar kersitrin bileşiğinin güçlü antioksidant ve antikarsinojenik etkilere sahip olduğunu göstermekle birlikte, kersitrinin moleküler mekanizması henüz aydınlatılamamıştır. Literatürde Kersitrin'in antiproliferatif ve antiapoptotik etkisini inceleyen çalışma az sayıda bulunmaktadır. Browning ve arkadaşlarının 2005 yılında SSC-9 oral skuamöz kanser hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmada, kersitrin'in hücreler üzerinde minimum etkiye sahip olduğu belirlenmiştir [230]

Kersitrin, kersetin bileşiğinin glikolize formu halinde doğada yaygın olarak bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar kersitrin bileşiğinin güçlü antioksidant ve antikarsinojenik etkilere sahip olduğunu göstermekle birlikte, moleküler mekanizması aydınlatılamamıştır [227-230]. Literatürde Kersitrin'in antiproliferatif ve antiapoptotik etkisini inceleyen çalışma az sayıda bulunmaktadır. Xu ve ark., PC3 prostat kanseri üzerinde yaptıkları çalışmada kersitrin'in hücre proliferasyonu üzerinde zayıf oranda etkili olduğu gösterilmiştir [227-229]. Browning ve arkadaşlarının SCC-9 oral skuamöz kanser hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmada ise kersitrin'in hücreler üzerinde minimum etkiye sahip olduğu bildirilmiştir [230]. Xu ve ark. 2012 yılında PC3 prostat kanseri üzerinde yaptıkları çalışmada kersitrin'in hücre prolifeasyonu üzerinde zayıf oranda etkili olduğu gösterilmiştir [227-229]. Elde ettiğimiz verilerde ise kersitrinin ECC-1 endometrial kanser hücre hattı üzerinde antiprolifetatif ve apoptotik etkisi olup, bu etkinin steroid ile ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz.

Hesperidin ve kersitrin bileşiklerininin ECC-1 endometrium kanser hücrelerinde hangi mekanizma ile apoptozu tetiklediğini göstermek için apoptoz yolaklarının aktivasyonu incelenmiştir. Bu nedenle ilk olarak, çeşitli dozlarda (5-50 μM) hesperidin ve kersitrin ile 48 saat inkübe edilmiş ECC-1 hücrelerinde DNA fragmantasyonunu ifade eden mono- ve oligo-nükleozom zenginleşmesi oranı tespit edilmiştir.Kontrol grubu ile kıyaslandığında her iki bileşiğin 50 μM dozları için zenginleşme oranında anlamlı artış tespit edilmiştir. İkinci aşamada apoptotik yolakalrda önemli role sahip kaspaz sisteminin etkinliği, 50 μM hesperidin ve kersitrin ile 48 saat inkübe edilmiş ECC-1 hücrelerinde 48 ve 72 saatlerde kaspaz-3 aktivite değişimine bakılarak test edilmiştir. Kontrol ile kıyaslandığında her bileşik için 48 saatlik etkide anlamlı bir artış tespit edilmiş, böylece hesperidin ve kersitrinin kaspaz yolakları üzerinden apoptozu tetikleyebileceği gösterilmiştir. Kaspaz-3 aktivitesi ölçümü yanında mitokondriyal transmembran potansiyeli değişimi de incelenmiştir. 50 μM hesperidin ve kersitrin ile 48 ve 72 saat inkübe edilmiş ECC-1 hücrelerde mitokondriyal transmembran potansiyeli (MMP) değişimi JC-1 yöntemiyle test edilmiştir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 48 saatte MMP'de anlamlı bir artış tespit edilmiştir. Son aşamada, akım sitometrisi kullanılarak AnnexinV/FITC yöntemi ile çeşitli dozlarda (5-50 μM) hesperidin ve kersitrin ile 48 saat inkübe edilmiş ECC-1 hücrelerinde apoptoz ve nekroz oranı tespit edilmiştir. En yüksek apoptotik yüzdesinin 50 μM hesperidin ve kersitrin etkisi altında görüldüğü tespit edilmiştir.

Yapılan bütün apoptoz deneyleri birbirini doğrular nitelikte olup, hesperidinin literatür ile uyumlu şekilde apoptotik etki gösterdiği tespit edilmiştir [216-220]. Park ve arkadaşları, hesperidin indüklü apoptoz düzenleyici gen ekspresyonlarını inceleyerek B-hücre/lenfoma 2 (Bcl2) mRNA ekspresyonunun düştüğünü ve BCL2-ilişkili X proteini (BAX) ve önemli bir apoptotik faktör olan kaspaz-3 ekspresyonunu arttırdığını tespit edilmiştir. Bu sonuçlar Hesperidin'in kolon kanser hücrelerinde kaspaz3 aktivasyonu yolu ile apoptozu indükleyebilceğini göstermektedir [226]. Ghorbani ve arkadaşları, NALM-6 (yabani tip p53-pozitif insan pre-B hücre hattı) proliferasyonu üzerinde hesperidin etkisini PPAR inhibitörü olan GW9662 varlığında ve yokluğunda araştırmış, hesperidin'in düşük dozlarının 24 saatte minimal bir etkiye, ancak 48 saat muamele ile hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüşe neden olduğunu göstermiştir [219]. GW9662 ile muamele edilmiş NALM-6 hücrelerinde hesperidin'in düşük dozlarının antiproliferatif etkisini önleyerek kısmi olarak PPARc aracılığı yapabilceğini işaret etmektedir. Hesperidin'in farklı dozlardaki olası apoptotik etkisi, PI boyama yöntemi ile hücre siklusu dağılımı GW9662 varlığında ve yokluğunda incelenerek sub-G1 hücre fazında artış tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, hesperidin'in NALM-6 hücrelerinde apoptotik etkiye sahip olduğunu gösterdiği için, aynı çalışmada apoptozun kaspaz yoluna bağımlılığı GW9662 varlığında ve yokluğunda western-blot yöntemi ile incelenmiş ve hesperidin'in prokaspaz-3 ve prokaspaz-9 kesimini indüklediğini gösterilmiştir [219]. Bu çalışmadan elde dilen veriler ile hesperidin aracılı proapoptotik ve antiproliferatif etkinin PPARc-bağımlı ve PPAR-c bağımsız yollar ile düzenlenebileceği ileri sürülmüştür.

Çalışmamızda tespit ettiğimiz apoptotik etkinin hangi yolaklar üzerinden gerçekleştiğini incelemek amacıyla Illumina Platformu Human VT 4.0 çipi ile tüm genom gen ekspresyon analizi yapılmıştır. ECC-1 hücre hattında 50 μM hesperidin ve kontrol fold change değerleri karşılaştırılarak ile yapılan biyolojik fonksiyon sonuçları metabolizma bozukları ile hesperidin indüklü endometrium kanser hücreleri ile istatistiksel olarak ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Yapılan yolak analizi sonucunda NF-κB sinyal iletim yolağının östrojen ve Ras-Raf-MAPK sinyal iletim yolakları ile koordineli olarak çalıştığı ve NF-κB sinyal iletim yolunun aktivasyonunda önemli rol alan IKK genlerinin ekspresyon seviyelerinin azaldığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar hesperidin aracılı etkinin immün yanıt üzerinden kanser ile östrojen bağımlı ilişki kurduğunu göstermektedir.

Elde edilen veriler, hesperidin'in endometrium kanser hücreleri üzerinde antiproliferatif etkisinin immün sistem aracılı olabileceğini işaret etmektedir. Literatürde, Hesperidin molekülünün NF-κB yolağı üzerinden etki edebileceğini işaret eden ve elde ettiğimiz sonuçlar ile korelasyon gösteren çalışmalar bulunmaktadır [217,220]. Lee ve arkadaşları, TPA indüklü (12-0-tetradekanoil forbol 13-asetat) hepatoselüler karsinoma hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmada, hesperidin bileşiğinin NF-κB translokasyonunun inhibisyonu yolu ile MMP-9 transkripsiyonunu baskılayarak anti-invazif ve antimetastatik etki gösterebilceğini bildirmiştir [217]. Nazari ve arkadaşları ise Ramos Burkitt hücre hattında hesperidin indüklü apoptoz sürecinde transkripsiyon faktörlerinin rolünü incelemiştir. Hesperidin ile muamele edilen Ramos hücrelerinde inhibitör alt ünitelerinin (IκB) fosfolarilasyonunun inhibisyonu yoluyla konstitütif ve doksorubisin indüklü NF-κB aktivasyonunun durdurulduğu gösterilmiştir [220]. Yine aynı çalışmada, hesperidin ile muamele edilen Ramos hücrelerinde hücre canlılığının inhibisyonu ve apoptoz indüksiyonunun PPARγ bağımsız yol ile gerçekleştiği ileri sürülmüştür [220].

ECC-1 hücre hattında 50 μM kersitrin ve kontrol fold change değerleri karşılaştırılarak ile yapılan biyolojik fonksiyon sonuçları Elde edilen sonuçlar ile fizyolojik,hücresel ve hastalıklar ile ilişkili biyolojik fonksiyon analizi yapılmış ve inflamatuar yanıtın kersitrin indüklü endometrium kanser hücre gelişimi ve tümör morfolojisi ile istatistiksel olarak ilişkili olduğu tespit edilmiştir. ECC-1 hücre hattında 50 μM kersitrin ve kontrol fold change değerleri karşılaştırılarak ile yapılan yolak

analizi sonucunda NF-κB sinyal iletim yolağının PI3K –Akt ve MAPK sinyal iletim yolakları ile koordineli olarak çalıştığı ve NF-κB sinyal iletim yolunun aktivasyonunda rol alan IκB gen ekpresyonunun östrojen bağımsız şekilde arttığı tespit edilmiştir .Literatürde benzer bir çalışma bulunmamaktadır.

Sonuç olarak, kersitrin ve hesperidin indüklü kanser yolakları analiz edildiğinde ortak mekanizma olarak NF-κB , immün sistem ve kanser ilişkisi öne çıkmaktadır. Çalışmadan elde edilen veriler, endometrium kanser hücre hatlarında flavonoid aracılı antiproliferatif etkinin NF-κB yolağının inhibe edilerek apoptoza yönelim gösterdiğini işaret etmektedir. Yapılacak ileri analizler ile bu mekanizmanın aydınlatılması, endometrium kanser tedavisi için hedefe yönelik tedavi gelişimi için önemli bir adım olacağı düşünülmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Doll A, Abal M, Rigau M, Monge M, Gonzalez M, Demajo S ve ark.Novel molecular profiles of endometrial cancer-new light through old windows. J Steroid Biochem Mol Biol.2008;108(3-5):221-9

2. Akhmedkhanov A, Zeleniuch-Jacquotte A, Toniolo P. Role of exogenous and endogenous hormones in endometrial cancer: review of the evidence and research perspectives. Ann N Y Acad Sci. 2001;943:296-315

3. D'Andrilli G, Bovicelli A, Paggi MG, Giordano A. New insights in endometrial carcinogenesis. J Cell Physiol. 2012;227(7):2842-6

4. Rieck G, Fiander A. The effect of lifestyle factors on gynaecological cancer. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2006;20(2):227-51

5. Gates EJ, Hirschfield L, Matthews RP, Yap OW. Body mass index as a prognostic factor in endometrioid adenocarcinoma of the endometrium. J Natl Med Assoc. 2006 ;98(11):1814-22

6. Wallace AE, Gibson DA, Saunders PT, Jabbour HN. Inflammatory events in endometrial adenocarcinoma. J Endocrinol. 2010;206(2):141-57

7. Greten FR, Eckmann L, Greten TF, Park JM, Li ZW, Egan LJ ve ark. IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model ofcolitis-associated cancer. Cell. 2004;118(3):285-96

8. Pikarsky E, Porat RM, Stein I, Abramovitch R, Amit S, Kasem S ve ark. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. Nature. 2004 ;431(7007):461-6

9. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell. 2000;100(1):57-70

10. Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. Nat Rev Cancer. 2002;2(4):301-10

11. Allavena P, Garlanda C, Borrello MG, Sica A, Mantovani A. Pathways connecting inflammation and cancer. Curr Opin Genet Dev. 2008;18(1):3-10

12. Pallares J, Martínez-Guitarte JL, Dolcet X, Llobet D, Rue M, Palacios J ve ark. Abnormalities in the NF-kappaB family and related proteins in endometrial carcinoma. J Pathol. 2004;204(5):569-77

13. Seo KH, Lee HS, Jung B, Ko HM, Choi JH, Park SJ ve ark.Estrogen enhances angiogenesis through a pathway involving platelet-activating factor-mediated nuclear factor-kappaB activation. Cancer Res. 2004;64(18):6482

14. Oh JH, Kim JH, Ahn HJ, Yoon JH, Yoo SC, Choi DS ve ark. Syndecan-1 enhances the endometrial cancer invasion by modulating matrix metalloproteinase-9 expression through nuclear factor kappaB. Gynecol Oncol. 2009;114(3):509-15

15. Lee CH, Jeon YT, Kim SH, Song YS. NF-kappaB as a potential molecular target for cancer therapy. Biofactors. 2007;29(1):19-35

16. Arlt A, Gehrz A, Müerköster S, Vorndamm J, Kruse ML, Fölsch UR ve ark. Role of NF-kappaB and Akt/PI3K in the resistance of pancreatic carcinoma cell lines against gemcitabine-induced cell death. Oncogene. 2003;22(21):3243-51.

17. Brach MA, Hass R, Sherman ML, Gunji H, Weichselbaum R, Kufe D. Ionizing radiation induces expression and binding activity of the nuclear factor kappa B. J Clin Invest. 1991;88(2):691-5

18. Hwang S, Ding A. Activation of NF-kappa B in murine macrophages by taxol.Cancer Biochem Biophys. 1995;14(4):265-72

19. Guven EC, Otkun GT, Boyacıoglu D.Flavonoidlerin Biyoyararlılığını Etkileyen Faktörler,GIDA2010,35,387-394.

20. Prasad S, Phromnoi K, Yadav VR, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Targeting inflammatory pathways by flavonoids for prevention and treatment of cancer.Planta Med. 2010;76(11):1044-63

21. Birt DF, Hendrich S, Wang W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. Pharmacol Ther. 2001;90(2-3):157-77

22. Iwashita K, Kobori M, Yamaki K, Tsushida T. Flavonoids inhibit cell growth and induce apoptosis in B16 melanoma 4A5 cells. Biosci Biotechnol Biochem. 2000;64(9):1813-20

23. Neuhouser ML. Dietary flavonoids and cancer risk: evidence from human population studies. Nutr Cancer. 2004;50(1):1-7

24. Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L, Zhang L. Flavonoids: promising anticancer agents. Med Res Rev. 2003;23(4):519-34

25. Vukics V, Guttman A. Structural characterization of flavonoid glycosides by multi-stage mass spectrometry. Mass Spectrom Rev. 2010;29(1):1-16

26.Hollman PC. Absorption, Bioavailability, and Metabolism of Flavonoids. Pharmaceutical Biology. 2004 Vol. 42, 74–83

27. Shen KH, Chang JK, Hsu YL, Kuo PL. Chalcone arrests cell cycle progression and

induces apoptosis through induction of mitochondrial pathway and inhibition of nuclear factor kappa B signalling in human bladder cancer cells. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2007 ;101(4):254-61

28. Kumar S, Sharma A, Madan B, Singhal V, Ghosh B. Isoliquiritigenin inhibits IkappaB kinase activity and ROS generation to block TNF-alpha induced expression of cell adhesion molecules on human endothelial cells. Biochem Pharmacol. 2007;73(10):1602-12.

29. Abuarqoub H, Foresti R, Green CJ, Motterlini R. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory actions of 2'-hydroxychalcone in RAW 264.7 murine macrophages.Am J Physiol Cell Physiol. 2006;290(4):C1092-9

30. Ban HS, Suzuki K, Lim SS, Jung SH, Lee S, Ji J ve ark. Inhibition of lipopolysaccharide-induced expression of inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha by 2'-hydroxychalcone derivatives in RAW 264.7 cells. Biochem Pharmacol. 2004;67(8):1549-57

31. Kim JB, Han AR, Park EY, Kim JY, Cho W, Lee J ve ark. Inhibition of LPS-induced iNOS, COX-2 and cytokines expression by poncirin through the NF-kappaB inactivation in RAW 264.7 macrophage cells. Biol Pharm Bull. 2007;30(12):2345-51

32. Sung B, Pandey MK, Aggarwal BB. Fisetin, an inhibitor of cyclin-dependent kinase 6, down-regulates nuclear factor-kappaB-regulated cell proliferation,antiapoptotic and metastatic gene products through the suppression of TAK-1 and receptor-interacting protein-regulated IkappaBalpha kinase activation. Mol Pharmacol. 2007;71(6):1703-14

33. Kunnumakkara AB, Nair AS, Ahn KS, Pandey MK, Yi Z, Liu M, Aggarwal BB. Gossypin, a pentahydroxy glucosyl flavone, inhibits the transforming growth factor beta-activated kinase-1-mediated NF-kappaB activation pathway, leading to potentiation of apoptosis, suppression of invasion, and abrogation of osteoclastogenesis. Blood. 2007;109(12):5112-21

34. Ju W, Wang X, Shi H, Chen W, Belinsky SA, Lin Y. A critical role of luteolin-induced reactive oxygen species in blockage of tumor necrosis factor-activated nuclear factor-kappaB pathway and sensitization of apoptosis in lung cancer cells. Mol Pharmacol. 2007;71(5):1381-8

35. Pan MH, Lai CS, Wang YJ, Ho CT. Acacetin suppressed LPS-induced up-expression of iNOS and COX-2 in murine macrophages and TPA-induced tumor promotion in mice.Biochem Pharmacol. 2006;72(10):1293-303

36. Shukla S, Gupta S. Suppression of constitutive and tumor necrosis factor alpha-induced nuclear factor (NF)-kappaB activation and induction of apoptosis by apigenin in human prostate carcinoma PC-3 cells: correlation with down-regulation of NF-kappaB-responsive genes. Clin Cancer Res. 2004;10(9):3169-78

37. Seo HS, Choi HS, Choi HS, Choi YK, Um JY, Choi I, ve ark. Phytoestrogens induce apoptosis via extrinsic pathway, inhibiting nuclear factor-kappaB signaling in HER2-overexpressing breast cancer cells. Anticancer Res. 2011;31(10):3301-13

38. Lee KW, Kang NJ, Rogozin EA, Kim HG, Cho YY, Bode AM ve ark. Myricetin is a novel natural inhibitor of neoplastic cell transformation and MEK1. Carcinogenesis. 2007;28(9):1918-27

39. Kang JL, Lee HW, Lee HS, Pack IS, Chong Y, Castranova V ve ark. Genistein prevents nuclear factor-kappa B activation and acute lung injury induced by lipopolysaccharide. Am J Respir Crit Care Med. 2001;164(12):2206-12

40. Ahn KS, Noh EJ, Cha KH, Kim YS, Lim SS, Shin KH, Jung SH. Inhibitory effects of Irigenin from the rhizomes of Belamcanda chinensis on nitric oxide and prostaglandin E(2) production in murine macrophage RAW 264.7 cells. Life Sci.2006;78(20):2336-42

41. Dong P, Kaneuchi M, Konno Y, Watari H, Sudo S, Sakuragi N. Emerging therapeutic biomarkers in endometrial cancer. Biomed Res Int. 2013;2013:130362

42. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. Int J Cancer. 2010;127(12):2893-917

43. World Cancer Research Fund / American Institute for Cancer Research. (2013) Food, Nutrition, Physical Activity and Cancer – Keeping the Evidence Current: WCRF/AICR Continuous Update Project (CUP), Imperial College London.

44. Lee PS, Secord AA. Targeting molecular pathways in endometrial cancer: A focus on the FGFR pathway. Cancer Treat Rev. 2013. doi: 10.1016/j.ctrv.2013.11.004.

45. National Cancer Institute. Surveillance epidemiology and end results. SEER stat fact sheets; corpus and uterus, NOS. http://seer.cancer.gov/statfacts/html/corp.html [Accessed August 2, 2013].

46. Weigelt B, Banerjee S. Molecular targets and targeted therapeutics in endometrial cancer. Curr Opin Oncol. 2012;24(5):554-637.

47. Tang X, Liu D, Shishodia S, Ozburn N, Behrens C, Lee JJ, Hong WK, Aggarwal BB,Wistuba II. Nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) is frequently expressed in lung cancer and preneoplastic lesions. Cancer. 2006;107(11):2637-46

48. Wright JD, Barrena Medel NI, Sehouli J, Fujiwara K, Herzog TJ. Contemporary management of endometrial cancer. Lancet. 2012;379(9823):1352-60.

49. Grady D, Gebretsadik T, Kerlikowske K, Ernster V, Petitti D.Hormone replacement therapy and endometrial cancer risk:a meta-analysis. Obstet Gynecol 1995; 85: 304–13.

50. Weiderpass E, Adami HO, Baron JA, Magnusson C, Bergström R ve ark. Risk of endometrial cancer following estrogen replacement with and without progestins. J Natl Cancer Inst. 1999;91(13):1131-7

51. Carlson MJ, Thiel KW, Yang S, Leslie KK. Catch it before it kills:progesterone, obesity, and the prevention of endometrial cancer. Discov Med. 2012;14(76):215-22.

52. Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. Lancet 2008; 371: 569–78.

53. Fisher B, Costantino JP, Redmond CK, Fisher ER, Wickerham DL,Cronin WM. Endometrial cancer in tamoxifen-treated breast cancer patients: findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) B-14. J Natl Cancer Inst 1994; 86 (7): 527–37

54. Pickar JH. The endometrium--from estrogens alone to TSECs. Climacteric. 2009;12(6):463-77

55. Nyholm HC, Nielsen AL, Norup P. Endometrial cancer in postmenopausal women with and without previous estrogen replacement treatment: comparison of clinical and histopathological characteristics. Gynecol Oncol. 1993;49(2):229-35.

56. Slomovitz BM, Coleman RL. The PI3K/AKT/mTOR pathway as a therapeutic target in endometrial cancer. Clin Cancer Res. 2012 1;18(21):5856-64.

57. Bansal N, Yendluri V, Wenham RM. The molecular biology of endometrial cancers and the implications for pathogenesis, classification, and targeted therapies.Cancer Control. 2009;16(1):8-13.

58. Hecht JL, Mutter GL. Molecular and pathologic aspects of endometrial carcinogenesis. J Clin Oncol 2006;24(29):4783–91.

59. Mutter GL, Lin MC, Fitzgerald JT, Kum JB, Baak JP, Lees JA ve ark. Altered PTEN expression as a diagnostic marker for the earliest endometrial precancers. J Natl Cancer Inst. 2000;92(11):924-30

60. Cancer Genome Atlas Research Network, Kandoth C, Schultz N, Cherniack AD,Akbani R, Liu Y, Shen H ve ark. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. Nature. 2013;497(7447):67-73

61. Oda K, Stokoe D, Taketani Y, McCormick F. High frequency of coexistent mutations of PIK3CA and PTEN genes in endometrial carcinoma. Cancer Res. 2005;65(23):10669-73

62. Catasus L, Gallardo A, Cuatrecasas M, Prat J. PIK3CA mutations in the kinase domain (exon 20) of uterine endometrial adenocarcinomas are associated with adverse prognostic parameters. Mod Pathol. 2008;21(2):131-9

63. Okuda T, Sekizawa A, Purwosunu Y, Nagatsuka M, Morioka M, Hayashi M, ve ark. Genetics of endometrial cancers. Obstet Gynecol Int. 2010;2010:984013

64.Konstantinova D, Kaneva R, Dimitrov R, Savov A, Ivanov S, Dyankova T,Kremensky I, Mitev V. Rare mutations in the PIK3CA gene contribute to aggressive endometrial cancer. DNA Cell Biol. 2010;29(2):65-70

65. Hayes MP, Douglas W, Ellenson LH. Molecular alterations of EGFR and PIK3CA in uterine serous carcinoma. Gynecol Oncol. 2009;113(3):370-3

66. Saegusa M, Hashimura M, Yoshida T, Okayasu I. beta- Catenin mutations and aberrant nuclear expression during endometrial tumorigenesis. Br J Cancer. 2001;84(2):209-17

67. Lax SF, Kendall B, Tashiro H, Slebos RJ, Hedrick L. The frequency of p53,K-ras mutations, and microsatellite instability differs in uterine endometrioid and serous carcinoma: evidence of distinct molecular genetic pathways. Cancer.2000;88(4):814-24.

68. Dutt A, Salvesen HB, Chen TH, Ramos AH, Onofrio RC, Hatton C ve ark. Drug-sensitive FGFR2 mutations in endometrial carcinoma. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105(25):8713-7.

69. Byron SA, Gartside MG, Wellens CL, Mallon MA, Keenan JB, Powell MA,ve ark. Inhibition of activated fibroblast growth factor receptor 2 in endometrial cancer cells induces cell death despite PTEN abrogation. Cancer Res. 2008;68(17):6902-7.

70. Byron SA, Gartside M, Powell MA, Wellens CL, Gao F, Mutch DG ve ark. FGFR2 point mutations in 466 endometrioid endometrial tumors:relationship with MSI, KRAS, PIK3CA, CTNNB1 mutations and clinicopathological features. PLoS One. 2012;7(2):e30801.

71. Pollock PM, Gartside MG, Dejeza LC, Powell MA, Mallon MA, Davies H ve ark. Frequent activating FGFR2 mutations in endometrial carcinomas parallel germline mutations associated with craniosynostosis and skeletal dysplasia syndromes. Oncogene. 2007;26(50):7158-62

72.Zagouri F, Bozas G, Kafantari E, Tsiatas M, Nikitas N, Dimopoulos MA,Papadimitriou CA. Endometrial cancer: what is new in adjuvant and molecularly targeted therapy? Obstet Gynecol Int. 2010;2010:749579.

73.Fujimoto T, Nanjyo H, Fukuda J, Nakamura A, Mizunuma H, Yaegashi N ve ark. Endometrioid uterine cancer: histopathological risk factors of local and distant recurrence. Gynecol Oncol. 2009;112(2):342-7.

74.Slomovitz BM, Broaddus RR, Burke TW, Sneige N, Soliman PT, Wu W ve ark. Her-2/neu overexpression and amplification in uterine papillary serous carcinoma. J Clin Oncol. 2004;22(15):3126-32

75. Konecny GE, Santos L, Winterhoff B, Hatmal M, Keeney GL, Mariani A ve ark. HER2 gene amplification and EGFR expression in a large cohort of surgically staged patients with nonendometrioid (type II) endometrial cancer. Br J Cancer.2009;100(1):89-95

76. Hamilton CA, Cheung MK, Osann K, Chen L, Teng NN, Longacre TA ve ark. Uterine papillary serous and clear cell carcinomas predict for poorer survival compared to grade 3 endometrioid corpus cancers. Br J Cancer. 2006;94(5):642-6

77.Wymann MP, Pirola L. Structure and function of phosphoinositide 3-inases.Biochim Biophys Acta. 1998;1436(1-2):127-50

78. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. Cell. 2010;141(7):1117-34

79. Kurig B, Shymanets A, Bohnacker T, Prajwal, Brock C, Ahmadian MR ve ark. Ras is an indispensable coregulator of the class IB phosphoinositide 3-kinase p87/p110gamma. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106(48):20312-7

80. Rodriguez-Viciana P, Warne PH, Vanhaesebroeck B, Waterfield MD,Downward J. Activation of phosphoinositide 3-kinase by interaction with Ras and by point mutation. EMBO J 1996, 15:2442–2451.

81. Gupta S, Ramjaun AR, Haiko P, Wang Y, Warne PH, Nicke B ve ark. Binding of ras to phosphoinositide 3-kinase p110alpha is required for ras-driven tumorigenesis in mice. Cell. 2007;129(5):957-68

82. Faivre S, Kroemer G, Raymond E. Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. Nat Rev Drug Discov 2006, 5:671–688.

83. Chen YT, Tan KA, Pang LY, Argyle DJ. The class I PI3K/Akt pathway is critical for cancer cell survival in dogs and offers an opportunity for therapeutic intervention. BMC Vet Res. 2012;8:73.

84. Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, Mills GB. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. Nat Rev Drug Discov. 2005;4(12):988-1004

85. Miller TW, Balko JM, Arteaga CL. Phosphatidylinositol 3-kinase and antiestrogen resistance in breast cancer. J Clin Oncol. 2011;29(33):4452-61.

86. Hayes MP, Wang H, Espinal-Witter R, Douglas W, Solomon GJ, Baker SJ ve ark. PIK3CA and PTEN mutations in uterine endometrioid carcinoma and complex atypical hyperplasia.Clin Cancer Res. 2006;12(20 Pt 1):5932-5

87. Oda K, Okada J, Timmerman L, Rodriguez-Viciana P, Stokoe D, Shoji K ve ark. PIK3CA cooperates with other phosphatidylinositol 3'-kinase pathway mutations to effect oncogenic transformation. Cancer Res. 2008;68(19):8127-36.

88. Rudd ML, Price JC, Fogoros S, Godwin AK, Sgroi DC, Merino MJ ve ark. A unique spectrum of somatic PIK3CA (p110alpha) mutations within primary endometrial carcinomas. Clin Cancer Res. 2011;17(6):1331-40.

89. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human

cancer. Nat Rev Cancer. 2002;2(7):489-501

90. Dedes KJ, Wetterskog D, Ashworth A, Kaye SB, Reis-Filho JS. Emerging therapeutic targets in endometrial cancer. Nat Rev Clin Oncol. 2011 May;8(5):261-71.

91. Levine RL, Cargile CB, Blazes MS, van Rees B, Kurman RJ, Ellenson LH. PTEN mutations and microsatellite instability in complex atypical hyperplasia,aprecursor lesion to uterine endometrioid carcinoma. Cancer Res. 1998;58(15):3254-8.

92.Konopka B, Janiec-Jankowska A, Kwiatkowska E, Najmoła U, Bidziński M,Olszewski W, Goluda C. PIK3CA mutations and amplification in endometrioid endometrial carcinomas: relation to other genetic defects and clinicopathologicstatus of the tumors. Hum Pathol. 2011;42(11):1710-9.

93. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S ve ark. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers.Science.2004;304(5670):554.

94. Cheung LW, Hennessy BT, Li J, Yu S, Myers AP, Djordjevic B ve ark. High frequency of PIK3R1 and PIK3R2 mutations in endometrial cancer elucidates a novel mechanism for regulation of PTEN protein stability. Cancer Discov. 2011;1(2):170-85

95. Miyake T, Yoshino K, Enomoto T, Takata T, Ugaki H, Kim A ve ark. PIK3CA gene mutations and amplifications in uterine cancers, identified by methods that avoid confounding by PIK3CA pseudogene sequences. Cancer Lett. 2008;261(1):120-6

96. Salvesen HB, Carter SL, Mannelqvist M, Dutt A, Getz G, Stefansson IM ve ark. Integrated genomic profiling of endometrial carcinoma associates aggressive tumors with indicators of PI3 kinase activation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106(12):4834-9.

97. Cohen Y, Shalmon B, Korach J, Barshack I, Fridman E, Rechavi G. AKT1 pleckstrin homology domain E17K activating mutation in endometrial carcinoma.Gynecol Oncol. 2010;116(1):88-91.

98. Dutt A, Salvesen HB, Greulich H, Sellers WR, Beroukhim R, Meyerson M. Somatic

mutations are present in all members of the AKT family in endometrial carcinoma. Br J Cancer. 2009;101(7):1218-9

99. Shoji K, Oda K, Nakagawa S, Hosokawa S, Nagae G, Uehara Y ve ark.The oncogenic mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in endometrial carcinomas. Br J Cancer. 2009;101(1):145-8

100. Urick ME, Rudd ML, Godwin AK, Sgroi D, Merino M, Bell DW. PIK3R1 (p85α) is somatically mutated at high frequency in primary endometrial cancer. Cancer Res.

2011;71(12):4061-7

101.Marshall CJ. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. Cell 1999;80: 179–85.

102.Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. Nature 2001; 410: 37–40.

103.Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH.Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. Endocr Rev. 2001;22(2):153-83

104.Mizumoto Y, Kyo S, Mori N, Sakaguchi J, Ohno S ve ark. Activation of ERK1/2 occurs independently of KRAS or BRAF status in endometrial cancer and is associated with favorable prognosis. Cancer Sci. 2007 May;98(5):652-8.

105.Shaw RJ, Cantley LC. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. Nature 2006; 441: 424–30.

106. Kyo S, Nakamura M, Kiyono T, Maida Y, Kanaya T, Tanaka M ve ark. Successful immortalization of endometrial glandular cells with normal structural and functional characteristics. Am J Pathol. 2003;163(6):2259-69

107. Mizumoto Y, Kyo S, Ohno S, Hashimoto M, Nakamura M, Maida Y ve ark. Creation of tumorigenic human endometrial epithelial cells with intact chromosomes by introducing defined genetic elements. Oncogene. 2006;25(41):5673-82

108. Dobrzycka B, Terlikowski SJ, Mazurek A, Kowalczuk O, Niklińska W, Chyczewski L ve ark. Mutations of the KRAS oncogene in endometrial hyperplasia and carcinoma. Folia Histochem Cytobiol. 2009;47(1):65-8

109. Pappa KI, Choleza M, Markaki S, Giannikaki E, Kyroudi A, Vlachos G ve ark. Consistent absence of BRAF mutations in cervical and endometrial cancer despite KRAS mutation status. Gynecol Oncol. 2006;100(3):596-600.

110.Mizuuchi H, Nasim S, Kudo R, Silverberg SG, Greenhouse S, Garrett CT.Clinical implications of K-ras mutations in malignant epithelial tumors of the endometrium. Cancer Res 1992;52: 2777–81.

111.Imamura T, Arima T, Kato H, Miyamoto S, Sasazuki T, Wake N. Chromosomal deletions and K-ras gene mutations in human endometrial carcinomas.Int J Cancer 1992; 51:47–52.

112.DiCristofano A, Ellenson LH. Endometrial carcinoma. Annu Rev Pathol.2007;2:57-85.

113. Kawaguchi M, Yanokura M, Banno K, Kobayashi Y, Kuwabara Y, Kobayashi M ve ark. Analysis of a correlation between the BRAF V600E mutation and abnormal

DNA mismatch repair in patients with sporadic endometrial cancer. Int J Oncol. 2009;34(6):1541-7.

114. Mutch DG, Powell MA, Mallon MA, Goodfellow PJ. RAS/RAF mutation and defective DNA mismatch repair in endometrial cancers. Am J Obstet Gynecol. 2004;190(4):935-42

115.Salvesen HB, Kumar R, Stefansson I, Angelini S, MacDonald N, Smeds J ve ark. Low frequency of BRAF and CDKN2A mutations in endometrial cancer. Int J Cancer. 2005;115(6):930-4.

116.Matias-Guiuthan X, Prat J. Molecular pathology of endometrial carcinoma.Histopathology. 2013;62(1):111-23

117. Ortiz-Vega S, Khokhlatchev A, Nedwidek M, Zhang XF, Dammann R, Pfeifer GP

ve ark. The putative tumor suppressor RASSF1A homodimerizes and heterodimerizes with the Ras-GTP binding protein Nore1. Oncogene. 2002;21(9):1381-90.

118. Pfeiffer GP, Dammann R. Methylation of the tumor suppressor gene RASSF1A in human tumors. Biochem 2005;70:576–583.

119. Pallarés J, Velasco A, Eritja N, Santacana M, Dolcet X, Cuatrecasas M ve ark. Promoter hypermethylation and reduced expression of RASSF1A are frequent molecular alterations of endometrial carcinoma. Mod Pathol. 2008;21(6):691-9.

120. Korc M, Friesel RE. The role of fibroblast growth factors in tumor growth.Curr Cancer Drug Targets. 2009;9(5):639-51.

121. Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, McEwen DG, MacArthur CA, Coulier F ve ark. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. J Biol Chem. 1996;271(25):15292-7

122. Ahmad I, Iwata T, Leung HY. Mechanisms of FGFR-mediated carcinogenesis.Biochim Biophys Acta. 2012;1823(4):850-60

123. Presta M, Dell'Era P, Mitola S, Moroni E, Ronca R, Rusnati M. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. Cytokine Growth Factor Rev. 2005;16(2):159-78.

124. Casanovas O, Hicklin DJ, Bergers G, Hanahan D. Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors.Cancer Cell. 2005;8(4):299-309.

125. Ibrahimi OA, Eliseenkova AV, Plotnikov AN, Yu K, Ornitz DM, Mohammadi M. Structural basis for fibroblast growth factor receptor 2 activation in Apert syndrome. Proc Natl Acad Sci USA 2001;98:7182–7.

126. Ibrahimi OA, Zhang F, Eliseenkova AV, Itoh N, Linhardt RJ, Mohammadi M.Biochemical analysis of pathogenic ligand-dependent FGFR2 mutations suggests distinct pathophysiological mechanisms for craniofacial and limb abnormalities. Hum Mol Genet 2004;13:2313–24.

127. Yu K, Herr AB, Waksman G, Ornitz DM. Loss of fibroblast growth factor receptor 2 ligand-binding specificity in Apert syndrome. Proc Natl Acad Sci USA 2000;97:14536–41.

128.Wilkie AO, Patey SJ, Kan SH, van den Ouweland AM, Hamel BC. FGFs, their receptors, and human limb malformations: clinical and molecular correlations.Am J Med Genet 2002;112:266–78.

129.Monsonego-Ornan E, Adar R, Feferman T, Segev O, Yayon A. The transmembrane mutation G380R in fibroblast growth factor receptor 3 uncouples ligand-mediated receptor activation from down-regulation. Mol Cell Biol 2000;20:516–22.

130. Cho JY, Guo C, Torello M, Lunstrum GP, Iwata T, Deng C, Horton WA. Defective lysosomal targeting of activated fibroblast growth factor receptor 3 in achondroplasia. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(2):609-14

131. Taniguchi F, Harada T, Sakamoto Y, Yamauchi N, Yoshida S, Iwabe T ve ark. Activation of mitogen-activated protein kinase pathway by keratinocyte growth factor or fibroblast growth factor-10 promotes cell proliferation in human endometrial carcinoma cells. J Clin Endocrinol Metab. 2003;88(2):773-80.

132. Sales KJ, Boddy SC, Williams AR, Anderson RA, Jabbour HN. F-prostanoid receptor regulation of fibroblast growth factor 2 signaling in endometrial adenocarcinoma cells. Endocrinology. 2007;148(8):3635-44

133. Fujimoto J, Hori M, Ichigo S, Tamaya T. Expressions of the fibroblast growth factor family (FGF1,2 and 4) mRNA in endometrial cancers. Tumour Biol. 1996;17(4):226-33.

134. Díaz-Montes TP, Ji H, Smith Sehdev AE, Zahurak ML, Kurman RJ, Armstrong DK,Bristow RE. Clinical significance of Her-2/neu overexpression in uterine serous

carcinoma. Gynecol Oncol. 2006;100(1):139-44

135. Morrison C, Zanagnolo V, Ramirez N, Cohn DE, Kelbick N, Copeland L ve ark. HER-2 is an independent prognostic factor in endometrial cancer:association with outcome in a large cohort of surgically staged patients. J Clin Oncol. 2006;24(15):2376-85

136. Odicino FE, Bignotti E, Rossi E, Pasinetti B, Tassi RA, Donzelli C ve ark. HER-2/neu overexpression and amplification in uterine serous papillary carcinoma: comparative analysis of immunohistochemistry,real-time reverse transcription-polymerase chain reaction, and fluorescence in situ hybridization. Int J Gynecol Cancer. 2008;18(1):14-21

137. Santin AD, Bellone S, Van Stedum S, Bushen W, De Las Casas LE, Korourian S ve ark. Determination of HER2/neu status in uterine serous papillary carcinoma: Comparative analysis of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. Gynecol Oncol. 2005 Jl;98(1):24-30

138. Santin AD, Bellone S, Van Stedum S, Bushen W, Palmieri M, Siegel ER ve ark. Amplification of c-erbB2 oncogene: a major prognostic indicator in uterine serous papillary carcinoma. Cancer. 2005;104(7):1391-7

139. Santin AD, Bellone S, Gokden M, Palmieri M, Dunn D, Agha J ve ark. Overexpression of HER-2/neu in uterine serous papillary cancer. Clin Cancer Res. 2002;8(5):1271-9

140. Mori N, Kyo S, Nakamura M, Hashimoto M, Maida Y, Mizumoto Y ve ark. Expression of HER-2 affects patient survival and paclitaxel sensitivity in endometrial cancer. Br J Cancer. 2010;103(6):889-98

141. Holcomb K, Delatorre R, Pedemonte B, McLeod C, Anderson L, Chambers J.E-cadherin expression in endometrioid, papillary serous, and clear cell carcinoma of the endometrium. Obstet Gynecol. 2002;100(6):1290-5

142. Moreno-Bueno G, Hardisson D, Sarrió D, Sánchez C, Cassia R, Prat J ve ark.. Abnormalities of E- and P-cadherin and catenin (beta-, gamma-catenin, and p120ctn) expression in endometrial cancer and endometrial atypical hyperplasia. J Pathol. 2003;199(4):471-8

143. Schlosshauer PW, Ellenson LH, Soslow RA. Beta-catenin and E-cadherin expression patterns in high-grade endometrial carcinoma are associated with histological subtype. Mod Pathol 2002; 15:1032–1037.

144. Stefansson IM, Salvesen HB, Akslen LA. Prognostic impact of alterations in P-cadherin expression and related cell adhesion markers in endometrial cancer. J Clin Oncol 2004; 22:1242–1252.

145. van der Horst PH, Wang Y, van der Zee M, Burger CW, Blok LJ. Interaction between sex hormones and WNT/β-catenin signal transduction in endometrial physiology and disease. Mol Cell Endocrinol. 2012 Jul 25;358(2):176-84.

146. Moreno-Bueno G, Hardisson D, Sánchez C, Sarrió D, Cassia R, García-Rostán G ve ark. Abnormalities of the APC/beta-catenin pathway in endometrial cancer. Oncogene. 2002 Nov 14;21(52):7981-90

147. Scholten AN, Creutzberg CL, van den Broek LJ, Noordijk EM, Smit VT. Nuclear

beta-catenin is a molecular feature of type I endometrial carcinoma. J Pathol.2003;201(3):460-5

148. Schlosshauer PW, Pirog EC, Levine RL, Ellenson LH. Mutational analysis of the

CTNNB1 and APC genes in uterine endometrioid carcinoma. Mod Pathol. 2000 ;13(10):1066-71

149. Machin P, Catasus L, Pons C, Muñoz J, Matias-Guiu X, Prat J. CTNNB1 mutations and beta-catenin expression in endometrial carcinomas. Hum Pathol. 2002;33(2):206-12

150. Mirabelli-Primdahl L, Gryfe R, Kim H, Millar A, Luceri C, Dale D ve ark. Beta-catenin mutations are specific for colorectal carcinomas with microsatellite instability

but occur in endometrial carcinomas irrespective of mutator pathway. Cancer Res. 1999;59(14):3346-51

151. Fukuchi T, Sakamoto M, Tsuda H, Maruyama K, Nozawa S, Hirohashi S.Beta-catenin mutation in carcinoma of the uterine endometrium. Cancer Res. 1998;58(16):3526-8

152. Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. Nat Rev Cancer 2002; 2:594–604

153. An HJ, Logani S, Isacson C, Ellenson LH. Molecular characterization of uterine clear cell carcinoma. Mod Pathol. 2004 ;17(5):530-7

154. Jia L, Liu Y, Yi X, Miron A, Crum CP, Kong B ve ark. Endometrial glandular dysplasia with frequent p53 gene mutation: a genetic evidence supporting its precancer nature for endometrial serous carcinoma. Clin Cancer Res. 2008;14(8):2263-9

155. Jones MW, Kounelis S, Hsu C, Papadaki H, Bakker A, Swalsky PA, Finkelstein SD.Prognostic value of p53 and K-ras-2 topographic genotyping in endometrial carcinoma: a clinicopathologic and molecular comparison. Int J Gynecol Pathol.1997 ;16(4):354-60

156. Koul A, Willén R, Bendahl PO, Nilbert M, Borg A. Distinct sets of gene alterations in endometrial carcinoma implicate alternate modes of tumorigenesis. Cancer. 2002;94(9):2369-79

157. Lee EJ, Kim TJ, Kim DS, Choi CH, Lee JW, Lee JH ve ark. p53 alteration independently predicts poor outcomes in patients with endometrial cancer: a clinicopathologic study of 131 cases and literature review. Gynecol Oncol. 2010;116(3):533-8

158. Saffari B, Bernstein L, Hong DC, Sullivan-Halley J, Runnebaum IB, Grill HJ ve ark. Association of p53 mutations and a codon 72 single nucleotide polymorphism with lower overall survival and responsiveness to adjuvant radiotherapy in endometrioid endometrial carcinomas. Int J Gynecol Cancer. 2005;15(5):952-63

159. Bulun SE, Economos K, Miller D, Simpson ER. CYP19 (aromatase cytochrome P450) gene expression in human malignant endometrial tumors. J Clin Endocrinol Metab.1994;79(6):1831-4

160. Berstein LM, Tchernobrovkina AE, Gamajunova VB, Kovalevskij AJ, Vasilyev DA,Chepik OF ve ark. Tumor estrogen content and clinico-morphological and endocrine features ofendometrial cancer. J Cancer Res Clin Oncol. 2003;129(4):245-9

161. Ryan Aj, Susil B, Jobling TW, Oehler M. Endometrial cancer.Cell Tissue Res 2005; 322: 53–61.

162. Aplin JD, Fazleabas, A, Glasser SR, Giudice LJ. The Endometrium. Informa Press.2008;2nd Edition,840-842

163. Critchley HO, Saunders PT. Hormone receptor dynamics in a receptive human endometrium. Reprod Sci. 2009;16(2):191-9

164. Hastings JM, Licence DR, Burton GJ, Charnock-Jones DS, Smith SK. Soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 inhibits edema and epithelial proliferation induced by 17beta-estradiol in the mouse uterus. Endocrinology.2003;144(1):326-34

165. Couse JF, Korach KS. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? Endocr Rev. 1999;20(3):358-417.

166. Hall JM, McDonnell DP. The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. Endocrinology. 1999;140(12):5566-78

167. Hale GE, Hughes CL, Cline JM. Endometrial cancer: hormonal factors, the perimenopausal "window of risk," and isoflavones. J Clin Endocrinol Metab. 2002;87(1):3-15.

168. Cserni G, Francz M, Kálmán E, Kelemen G, Komjáthy DC, Kovács I ve ark. Estrogen receptor negative and progesterone receptor positive breast carcinomas-how frequent are they? Pathol Oncol Res. 2011;17(3):663-8

169. Alexander IE, Clarke CL, Shine J, Sutherland RL. Progestin inhibition of progesterone receptor gene expression in human breast cancer cells. Mol Endocrinol. 1989 ;3(9):1377-86

170. Brosens JJ, Lam EW, Parker MG. Inflammation and sex steroid receptors: a motif for change. Cell. 2006;124(3):466-8

171. Straub RH. The complex role of estrogens in inflammation. Endocr Rev. 2007;28(5):521-74

172. He YY, Cai B, Yang YX, Liu XL, Wan XP. Estrogenic G protein-coupled receptor 30 signaling is involved in regulation of endometrial carcinoma by promoting proliferation, invasion potential, and interleukin-6 secretion via the MEK/ERK mitogen-activated protein kinase pathway. Cancer Sci. 2009;100(6):1051-61

173. Modugno F, Ness RB, Chen C, Weiss NS. Inflammation and endometrial cancer: a hypothesis. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2005;14(12):2840-7

174. King AE, Collins F, Klonisch T, Sallenave JM, Critchley HO, Saunders PT. An additive interaction between the NFkappaB and estrogen receptor signaling pathways in human endometrial epithelial cells. Hum Reprod. 2010;25(2):510-8

175. Ito K, Utsunomiya H, Yaegashi N, Sasano H. Biological roles of estrogen and progesterone in human endometrial carcinoma--new developments in potential endocrine therapy for endometrial cancer. Endocr J. 2007;54(5):667-79

176. Kelly RW, Illingworth P, Baldie G, Leask R, Brouwer S, Calder AA. Progesterone control of interleukin-8 production in endometrium and chorio-decidual cells underlines the role of the neutrophil in menstruation and parturition. Hum Reprod. 1994;9(2):253-8

177. Kelly RW, Carr GG, Riley SC. The inhibition of synthesis of a beta-chemokine, monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) by progesterone. Biochem Biophys Res Commun. 1997;239(2):557-61

178. Davies S, Dai D, Feldman I, Pickett G, Leslie KK. Identification of a novel mechanism of NF-kappaB inactivation by progesterone through progesterone receptors in Hec50co poorly differentiated endometrial cancer cells: induction of A20 and ABIN-2. Gynecol Oncol. 2004;94(2):463-70

179. Lydon JP, DeMayo FJ, Funk CR, Mani SK, Hughes AR, Montgomery CA Jr, Shyamala G, Conneely OM, O'Malley BW. Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. Genes Dev. 1995;9(18):2266-78

180. van der Burg B, van der Saag PT. Nuclear factor-kappa-B/steroid hormone receptor interactions as a functional basis of anti-inflammatory action of steroids in reproductive organs. Mol Hum Reprod. 1996;2(6):433-8

181. Balkwill FR, Mantovani A. Cancer-related inflammation: common themes and therapeutic opportunities. Semin Cancer Biol. 2012;22(1):33-40

182. Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability.Carcinogenesis.2009;30(7):1073-81

183. Mantovani A, Savino B, Locati M, Zammataro L, Allavena P, Bonecchi R. The chemokine system in cancer biology and therapy. Cytokine Growth Factor Rev. 2010;21(1):27-39

184. Flossmann E, Rothwell PM. Commentary: aspirin and colorectal cancer an epidemiological success story. Int J Epidemiol. 2007;36(5):962-5

185. Sandhu JS. Prostate cancer and chronic prostatitis. Curr Urol Rep. 2008;9(4):328-32

186. Suzuki H, Iwasaki E, Hibi T. Helicobacter pylori and gastric cancer. Gastric Cancer. 2009;12(2):79-87

187. Dannenberg AJ, Subbaramaiah K. Targeting cyclooxygenase-2 in human neoplasia: rationale and promise. Cancer Cell. 2003;4(6):431-6

188. Sparmann A, Bar-Sagi D. Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. Cancer Cell. 2004;6(5):447-58

189. Loberg RD, Ying C, Craig M, Day LL, Sargent E, Neeley C, Wojno K, Snyder LA,Yan L, Pienta KJ. Targeting CCL2 with systemic delivery of neutralizing antibodies induces prostate cancer tumor regression in vivo. Cancer Res. 2007;67(19):9417-24

190. Singh S, Varney M, Singh RK. Host CXCR2-dependent regulation of melanoma growth, angiogenesis, and experimental lung metastasis. Cancer Res. 2009 15;69(2):411-5

191. Sun SC. Non-canonical NF-κB signaling pathway. Cell Res. 2011;21(1):71-85

192. Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Matias-Guiu X. NF-κB in development and progression of human cancer. Virchows Arch. 2005;446(5):475-82

193. Escárcega RO, Fuentes-Alexandro S, García-Carrasco M, Gatica A, Zamora A. The transcription factor nuclear factor-kappa B and cancer. Clin Oncol (R Coll Radiol). 2007;19(2):154-61

194. Lee CH, Jeon YT, Kim SH, Song YS. NF-kappaB as a potential molecular target for cancer therapy. Biofactors. 2007;29(1):19-35

195. Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. Nat Rev Mol Cell Biol. 2007;8(1):49-62

196. Ruland J. Return to homeostasis: downregulation of NF-κB responses. Nat Immunol. 2011 Jun 19;12(8):709-14

197. Naugler WE, Karin M. NF-kappaB and cancer-identifying targets and mechanisms. Curr Opin Genet Dev. 2008 Feb;18(1):19-26.

198. Lin Y, Bai L, Chen W, Xu S. The NF-kappaB activation pathways, emerging molecular targets for cancer prevention and therapy. Expert Opin Ther Targets.2010 Jan;14(1):45-55

199. Wajant H, Scheurich P. TNFR1-induced activation of the classical NF-κB pathway. FEBS J. 2011;278(6):862-76

200. Razani B, Zarnegar B, Ytterberg AJ, Shiba T, Dempsey PW, Ware CF, Loo JA,Cheng G. Negative feedback in noncanonical NF-kappaB signaling modulates NIK stability through IKKalpha-mediated phosphorylation. Sci Signal. 2010 25;3(123):ra41

201. Razani B, Reichardt AD, Cheng G. Non-canonical NF-κB signaling activation and regulation: principles and perspectives. Immunol Rev. 2011;244(1):44-54

202. Arlt A, Gehrz A, Müerköster S, Vorndamm J, Kruse ML, Fölsch UR, Schäfer H.

Role of NF-kappaB and Akt/PI3K in the resistance of pancreatic carcinoma cell lines against gemcitabine-induced cell death. Oncogene. 2003;22(21):3243-51

203. Brach MA, Hass R, Sherman ML, Gunji H, Weichselbaum R, Kufe D. Ionizing radiation induces expression and binding activity of the nuclear factor kappa B. J Clin Invest. 1991 Aug;88(2):691-5

204. Hwang S, Ding A. Activation of NF-kappa B in murine macrophages by taxol. Cancer Biochem Biophys. 1995;14(4):265-72

205. Li F, Sethi G. Targeting transcription factor NF-kappaB to overcome chemoresistance and radioresistance in cancer therapy. Biochim Biophys Acta. 2010 Apr;1805(2):167-80

206. Baud V, Karin M. Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. Nat Rev Drug Discov. 2009;8(1):33-40

207. Benavente-García O, Castillo J. Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. J Agric Food Chem. 2008;56(15):6185-205

208. Manthey JA, Guthrie N. Antiproliferative activities of citrus flavonoids against six human cancer cell lines. J Agric Food Chem. 2002;50(21):5837-43

209.Benavente-García O, Castillo J. Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. J Agric Food Chem. 2008;56(15):6185-205

210. Manthey JA, Grohmann K, Guthrie N. Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. Curr Med Chem. 2001 Feb;8(2):135-53

211. Wilmsen PK, Spada DS, Salvador M. Antioxidant activity of the flavonoid hesperidin in chemical and biological systems. J Agric Food Chem. 2005 Jun 15;53(12):4757-61

212. Del Rio D, Costa LG, Lean ME, Crozier A. Polyphenols and health: what compounds are involved? Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2010;20(1):1-6

213. Strissel PL, Strick R. Multiple effects of bioflavonoids on gene regulation,cell proliferation and apoptosis: natural compounds move into the lime light of cancer research. Leuk Res. 2005;29(8):859-61

214. Barnes S. Nutritional genomics, polyphenols, diets, and their impact on dietetics. J Am Diet Assoc. 2008;108(11):1888-95

215. Sahu BD, Kuncha M, Sindhura GJ, Sistla R. Hesperidin attenuates cisplatin-induced acute renal injury by decreasing oxidative stress, inflammation and DNA damage. Phytomedicine. 2013 Mar 15;20(5):453-60

216. Kamaraj S, Ramakrishnan G, Anandakumar P, Jagan S, Devaki T. Antioxidant and anticancer efficacy of hesperidin in benzo(a)pyrene induced lung carcinogenesis in mice. Invest New Drugs. 2009 Jun;27(3):214-22

217. Lee KH, Yeh MH, Kao ST, Hung CM, Liu CJ, Huang YY, Yeh CC. The inhibitory effect of hesperidin on tumor cell invasiveness occurs via suppression of activator protein 1 and nuclear factor-kappaB in human hepatocellular carcinoma cells. Toxicol Lett. 2010;194(1-2):42-9

218. Saiprasad G, Chitra P, Manikandan R, Sudhandiran G. Hesperidin alleviates oxidative stress and downregulates the expressions of proliferative and inflammatory markers in azoxymethane-induced experimental colon carcinogenesis in mice. Inflamm Res. 2013 Apr;62(4):425-40

219. Ghorbani A, Nazari M, Jeddi-Tehrani M, Zand H. The citrus flavonoid hesperidin induces p53 and inhibits NF-κB activation in order to trigger apoptosis in NALM-6 cells: involvement of PPARγ-dependent mechanism. Eur J Nutr. 2012;51(1):39-46

220. Nazari M, Ghorbani A, Hekmat-Doost A, Jeddi-Tehrani M, Zand H. Inactivation of nuclear factor-κB by citrus flavanone hesperidin contributes to apoptosis and chemo-sensitizing effect in Ramos cells. Eur J Pharmacol. 2011;650(2-3):526-33

221. Morand C, Manach C, Crespy V, Remesy C. Quercetin 3-O-beta-glucoside is better absorbed than other quercetin forms and is not present in rat plasma. Free Radic Res. 2000;33(5):667-76

222. Granado-Serrano AB, Martín MA, Bravo L, Goya L, Ramos S. Quercetin induces apoptosis via caspase activation, regulation of Bcl-2, and inhibition of PI-3-kinase/Akt and ERK pathways in a human hepatoma cell line (HepG2). J Nutr.2006;136(11):2715-21.

223. Yin Y, Li W, Son YO, Sun L, Lu J, Kim D, Wang X, Yao H, Wang L, Pratheeshkumar P, Hitron AJ, Luo J, Gao N, Shi X, Zhang Z. Quercitrin protects skin from UVB-induced oxidative damage. Toxicol Appl Pharmacol. 2013;269(2):89-99

224. Soberón JR, Sgariglia MA, Sampietro DA, Quiroga EN, Vattuone MA. Antibacterial activity of plant extracts from northwestern Argentina. J Appl Microbiol. 2007;102(6):1450-61

225 Cruz EA, Da-Silva SA, Muzitano MF, Silva PM, Costa SS, Rossi-Bergmann B.Immunomodulatory pretreatment with Kalanchoe pinnata extract and its quercitrinflavonoid effectively protects mice against fatal anaphylactic shock. IntImmunopharmacol. 2008 Dec 10;8(12):1616-21

226. Park HJ, Kim MJ, Ha E, Chung JH. Apoptotic effect of hesperidin through caspase3 activation in human colon cancer cells, SNU-C4. Phytomedicine. 2008 ;15(1-2):147-51

227. Ding M, Zhao J, Bowman L, Lu Y, Shi X. Inhibition of AP-1 and MAPK signaling and activation of Nrf2/ARE pathway by quercitrin. Int J Oncol. 2010 36(1):59-67

228. Brognard J, Clark AS, Ni Y, Dennis PA. Akt/protein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation. Cancer Res. 2001;61(10):3986-97.

229. Xu R, Zhang Y, Ye X, Xue S, Shi J, Pan J, Chen Q. Inhibition effects and induction of apoptosis of flavonoids on the prostate cancer cell line PC-3 in vitro. Food Chem. 2013 May 1;138(1):48-53

230. Browning AM, Walle UK, Walle T. Flavonoid glycosides inhibit oral cancer cell proliferation--role of cellular uptake and hydrolysis to the aglycones. J Pharm Pharmacol. 2005 Aug;57(8):1037-42

HAM VERİLER

FORMLAR

ETİK KURUL KARARI

PATENT HAKKI İZNİ

TELİF HAKKI İZNİ

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Zeynep Birsu	**Soyadı**	Çinçin
Doğ.Yeri	Üsküdar/İstanbul	**Doğ.Tar.**	04.01.1984
Uyruğu	TC	**TC Kim No**	31924645824
Email	birsucincin@gmail.com	**Tel**	05300694499

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mez. Yılı**
Doktora	İstanbul Üniversitesi	2014
Yük.Lis.	Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü	2009
Lisans	Trakya Üniversitesi	2005
Lise	Hayrullah Kefoğlu Anadolu Lisesi	2001

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl - Yıl)**
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu Anlama***	**Konuşma***	**Yazma***	**KPDS/ÜDS Puanı**	**(Diğer) Puanı**
İngilizce	Çok iyi	İyi	İyi	79	

***Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	**Eşit Ağırlık**	**Sözel**
LES Puanı	72	72	70
ÜDS Puanı = 78			

Bilgisayar Bilgisi

Program	**Kullanma becerisi**
Microsoft Office,Windows 7 VE 8	Çok iyi
Photoshop	İyi
IPA (Ingenuity Analysis Software),Genome Studio	İyi

Yayınları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri

ULUSLARARASI HAKEMLİ YAYINLAR

Cincin ZB, Iyibozkurt AC, Kuran SB, Cakmakoglu B. DNA repair gene variants in endometrial carcinoma. Med Oncol. 2012 Dec;29(4):2949-54.

Narter KF, Agachan B, Sozen S, Cincin ZB, Isbir T. CCR2-64I is a risk factor for development of bladder cancer. Genet Mol Res. 2010 Apr 13;9(2):685-92.

Kozanoglu I, Yandim MK, Cincin ZB, Ozdogu H, Cakmakoglu B, Baran Y. New indication for therapeutic potential of an old well-known drug (propranolol) for multiple myeloma. J Cancer Res Clin Oncol. 2013 Feb;139(2):327-35

Tanyel CR, Cincin ZB, Gokcen-Rohlig B, Bektas-Kayhan K, Unur M, Cakmakoglu B. Effects of genetic variants of CCR5 chemokine receptors on oral squamous cell carcinoma. Genet Mol Res. 2013 Nov 18;12(4):5714-20.

ULUSAL HAKEMLİ YAYINLAR

Esen B, Daşdemir S, Çinçin ZB, Özdemircan A, Çakmakoğlu B. Diyabet Hastalığında Osteoprotegerin (OPG) proteini T950C gen Polimorfizminin İncelenmesi. Deneysel Tıp Dergisi,1(1):40-46, 2011

Gökhan Bağcı, Zeynep Birsu Çinçin, Selçuk Daşdemir, Abdullah Özdemircan, Zeynep Ermis Karaali, Bedia ÇakmakoğluDiyabetik Koroner Arter Hastalığında Monosit Kemotaktik Proteini (MCP-1) A A-2518G ve CCR2 Reseptörü G190A Gen Polimorfizmlerinin İncelenmesi, Deneysel Tıp Dergisi,1(2):9-13, 2011

BİLDİRİLER

Cincin ZB, Kıran B, Baran Y, Cakmakoğlu B: Kersitrin'in antiproliferatif ve apoptotik etkilerinin ccl-221 kolon kanseri hücre hattı üzerinde incelenmesi.(Sözlü bildiri) IV. Multidisipliner Kanser Araştırma Kongresi, 13 – 16 Aralık 2012

Cincin ZB, Gökçen Röhlig B, Bektaş Kayhan K, Ünür M, Cakmakoğlu B. Effects of genetic variants of CCR5 chemokin receptors on oral squamose cell carcinoma,36.FEBS CONGRESS, 25-30 June,2011 Torino,ITALY

Dasdemir S, Kucukali Cİ, Cincin ZB, Ozkok E, Cakmakoglu B, Aydin M. Effect of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) gene variants on schizophrenia: results from a case-control study in turkish population, III. International Molecular Medicine Congress, 27-30 June2011, Istanbul

Ozdemircan A, Kucukali Cİ, Dasdemir S, Cincin ZB, Ozkok E, Cakmakoglu B, Aydin M. Associatıon between the CCR5 32-bp deletion allele and obsessive-compulsive disorder (OCD), III. International Molecular Medicine Congress, 27-30 June 2011, Istanbul

Gokçe H, Küçükali Cİ, Daşdemir S, Cincin ZB, Özkök E, Çakmakoğlu B, Aydın M. The relation between APE1 asp148glu polymorphism and bipolar disorder: results from a case-control study in Turkish population, 2011, III. International Molecular Medicine Congress, 27-30 June 2011, Istanbul

Kozanoğlu İ, Kartal Yandım M, Cincin ZB, Özdoğu H, Çakmakoğlu B, Baran Y: Eski Bir İlaç, Yeni Bir Yaklaşım: Dideral'in Multipl Miyelom Hücrelerin Üzerine Apoptotik Etkileri Ve Nf-Kb Sinyal Yolağı Üzerine Etkileri.(Sözlü bildiri) IV. Multidisipliner Kanser Araştırma Kongresi, 13 – 16 Aralık 2012

ULUSAL BİLİMSEL TOPLANTILAR

Selçuk Daşdemir, Zeynep Birsu Çinçin, Abdullah Özdemircan, Yılmaz Çetinkaya, Mehmet Gencer, Bedia Çakmakoğlu, Elif Özkök, Makbule Aydin, Cem İsmail Küçükali Migren Gelişimi ile NER Tamir Yolağı Gen Varyantları Arasındaki İlişkinin İncelenmesi ,III.DETAE GÜNLERİ,17-18 Kasım 2011,İstanbul

Zeynep Birsu Çinçin, Selçuk Özdemir, Abdullah Özdemircan, Yılmaz Çetinkaya, Mehmet Gencer, Bedia Çakmakoğlu, Elif Özkök, Makbule Aydin, Cem İsmail Küçükali Migren Gelişimi ile DNA Tamir BER Yolağı Gen Varyantları Arasındaki İlişkinin İncelenmesi, III.DETAE GÜNLERİ,17-18 Kasım 2011,İstanbul

Abdullah Özdemircan, Selçuk Daşdemir, Zeynep Birsu Çinçin, Mehmet Gencer, Yılmaz Çetinkaya, Elif Özkök, Bedia Çakmakoğlu, Makbule Aydin, Cem İsmail Küçükali XRCC1 ve XRCC3 Gen Varyantlarının Migren Gelişimine Etkisinin İncelenmesi III.DETAE GÜNLERİ,17-18 Kasım 2011,İstanbul

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Kitap okumak, fotoğraf çekmek, müzik dinlemek