

**T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA (TIP) YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**ENDOMETRİAL KANSERLERDE PTEN
EKSPRESYONUNUN PROGNOSTİK FAKTÖRLERLE
KARŞILAŞTIRILMASI**

MESUT CAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Yusuf KURTULMUŞ**

AYDIN-2019

KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya (Tıp) Anabilim Dalı çerçevesinde Mesut CAN tarafından hazırlanan “Endometrial kanserlerde PTEN ekspresyonunun prognostik faktörlerle karşılaştırılması” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından ~~Doktora~~/Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 07/08/2019

Üye (T.D.) : Doç Dr.Yusuf KURTULMUŞ
Aydın Adnan Menderes Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Aslıhan BÜYÜKÖZTÜRK KARUL
Aydın Adnan Menderes Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Ümmühani ÖZEL TÜRKCÜ
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi

ONAY:

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsününtarih vesayılı oturumunda alınannolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Cavit KUM
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı yüksek lisans eğitimim süresince ve tez çalışmamın her aşamasında desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübesi ile bana her zaman yol gösterici olan, tez danışmanım Sayın Hocam Doç. Dr. Yusuf KURTULMUŞ 'a.

Çok değerli tecrübelerini hiçbir zaman esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Hocam Prof. Dr. Aslıhan BÜYÜKÖZTÜRK KARUL' a.

Biyokimya Anabilim Dalındaki tüm hocalarıma.

Hayatım boyunca sonsuz özveri ve sevgileriyle yanımda olan, annem ve babama.

Sevgi ve anlayışıyla her zaman sol yanımda olan, hayatımın her anında olduğu gibi yüksek lisans eğitimim boyunca elimi hiç bırakmayan, hayat arkadaşım sevgili eşim Nazlı CAN'a.

Varlıklarıyla beni onurlandıran, her zamankinden daha güçlü bir insan olmamı sağlayan, yaşama sevinçlerim biricik oğullarım Bartu Ege ve Emir Mete'ye sonsuz teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	ii
TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
RESİMLER DİZİNİ.....	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
ÖZET.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Uterus	3
2.1.1. Uterus embriyolojisi:.....	4
2.1.2. Uterus Anatomisi:	4
2.1.3. Uterus histolojisi	5
2.2. Endometrial Karsinom	8
2.2.1. Endometrial Karsinom Tip 1	9
2.2.2. Endometrial Karsinom Tip 2.....	10
2.3. Endometrium Kanserlerinin Derecelendirilmesi	10
2.3.1. Histolojik Derecelendirme	10
2.3.2. Nükleer Derecelendirme	11
2.3.3. FIGO Derecelendirmesi	11
2.4. Endometrial Karsinomun Moleküler ve Genetik Özellikleri	12
2.4.1 Tip 1 Endometrium Kanserlerin Moleküler ve Genetik Özellikleri.....	12
2.4.2. Tip 2 Endometrium Kanserlerin Moleküler ve Genetik Özellikleri.....	13
2.5. PTEN.....	14
2.6. Endometrial Karsinom ve PTEN İlişkisi.....	15
3.1. Materyal Toplanması ve Örneklerin Hazırlanması	16
3.2. Endometrial Karsinom'un Sınıflandırılması	17
3.3. İmmunohistokimyasal değerlendirme	17

3.4. H skorlama	18
3.5. Moleküler Analiz	18
3.5.1 RNA İzolasyonu.....	19
3.5.2. RNA Saflığının Belirlenmesi ve Konsantrasyon Hesaplanması	20
3.5.3. cDNA Sentezi.....	21
3.5.4. RT-PCR Analizi	21
3.5. İstatistiksel Analizler.....	22
4. BULGULAR	23
4.1. PTEN Primer Antikoru Kullanılarak İmmunohistokimyasal Yöntem ile Değerlendirme;	27
4.2. PTEN Geni Salınım Düzeylerinin RT-PCR Yöntemi ile Değerlendirilmesi	30
5. TARTIŞMA	35
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	39
KAYNAKLAR	41
EKLER.....	48
ÖZGEÇMİŞ	49

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AKT	: Aktin
°C	: Santigrat Derece
cDNA	: Tamamlayıcı DNA
CEA	: Karsinoembriyonik Antijen
CT	: Eşik Değeri
DAB	: Diaminobenzidine
DNA	: Deoksiribo Nükleik asit
FIGO	: Uluslararası Jinekolojik ve Obstetrik Federasyonu
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
kDa	: Kilo Dalton
nm	: Nanometre
p53	: Tümör protein 53
PBS	: Fosfat tamponlu salin
PI3K	: Fosfatidilinositol 3-kinaz yolu
PTEN	: Fosfataz ve tümör supresor gen
q	: Kromozom
RNA	: Ribo Nükleik asit
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
RT PCR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SPSS	: Sosyal Bilimler İçin İstatistik Programı
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Kontrol ve hasta gruplarının immunohistokimyasal olarak PTEN geni ekspresyon seviyeleri.....	28
Şekil 2. Kontrol grubuna ait immunohistokimyasal olarak PTEN geni ekspresyon seviyeleri	25
Şekil 3. Hasta grubuna ait immunohistokimyasal olarak PTEN geni ekspresyon seviyeleri ..	28
Şekil 4. Hasta grubunun ddCT yönüyle PTEN geni salınım seviyeleri ve ortalama değerleri	31
Şekil 5. Kontrol grubunun ddCT yönüyle PTEN geni salınım seviyeleri ve ortalama değerleri	32
Şekil 6. Hasta gruplarının grade olarak ve kontrol grubunun ddCT yönüyle PTEN geni salınım seviyeleri ve ortalama değerleri	32
Şekil 7. Kontrol ve hasta gruplarının ddCT değerleri ile PTEN geni salınım seviyeleri ve ortalama değerleri	33

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Uterus ve bağlantılı yapılar	3
Resim 2. Endometrium'un Histolojik Görünümü	7
Resim 3. Endometriyal siklus	8
Resim 4. PTEN'in x20 büyütmede immünohistokimyasal görüntüsü.....	29



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Endometrium Kanserlerinin Histolojik Derecelendirmesi.....	9
Tablo 2. Endometrioid adenokarsinomun nükleer olarak derecelendirilmesi.....	10
Tablo 3. Endometrium kanseri FIGO evrelemesi	11
Tablo 4. Hasta Grupları Kendi İçerisinde Histolojik Gradeleme, Figo Evreleme Lenfovasküler ve Servikal İnvazyon Değerleri	22
Tablo 5. Hasta grubunu kendi içerisinde myometrial invazyon değerlerine göre dağılımı	23
Tablo 6. Kontrol ve hasta grubu P53 ekspresyonu değerleri	24
Tablo 7. Hasta grubu kendi içerisinde P53 ekspresyonu değerleri	24
Tablo 8. Kontrol ve hasta grubu CEA ekspresyonu değerleri.....	24
Tablo 9. Hasta grubu kendi içerisinde CEA ekspresyonu değerleri	24
Tablo 10. Gruplara ait ortalama H-skor değerleri	25
Tablo 11. Hasta grupları ve kontrol grubunun PTEN ve β -Aktin geni değerleri.....	27
Tablo 12. Hasta ve Kontrol gruplarının (en yüksek, en düşük ve ortalama) PTEN geni salınım seviyeleri	31

ÖZET

ENDOMETRİAL KANSERLERDE PTEN EKSPRESYONUNUN PROGNOSTİK FAKTÖRLERLE KARŞILAŞTIRILMASI

**CAN M. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya (Tıp) Programı, Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2019.**

Endometrium kanseri günümüzde kadınlarda görülen kanserler içinde dördüncü sıradadır ve Amerika'da en sık görülen kadın kanseridir. Endometriyal karsinomlar kadın genital sisteminin en sık görülen malign tümörü olup, %80-85 olguda östrojen bağımlı iken, %10-15 olguda östrojen bağımlı değildir. Endometriyal karsinomlar tip I ve tip II olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Tip I endometriyal karsinomlar anovulasyon ya da östrojen replasman tedavisi öyküsüne sahip 40-60 yaşları arasındaki genç hasta grubunda görülür. Genellikle iyi diferansiye, miyometriyum invazyonu olmayan ve endometriyal hiperplazi ile ilişkili olan karsinomlardır. Tip II endometriyal karsinomlar ise hiperplazi ve östrojen fazlası ile ilişkisi olmayan saldırgan tümörlerdir. Bunlar endometriyal atrofi zemininden gelişirler. Hastalar daha çok postmenapozal dönemde olup, tip I tümörlere göre daha ileri yaştaadır. Tümör supresör gen PTEN (phosphatase ve tensin homolog), endometrial kanserlerde sıklıkla mutasyona uğrayan genlerdir. PTEN, tümör supresor genidir ve mutasyon oranı %30-50'dir. PTEN, 10.kromozomun uzun kolunda (q), 23.3 pozisyonunda lokalize olup, primer hedefi PIP3 adı verilen lipid molekülü olan, bir fosfataz kodlar. PIP3, hücre büyümesi ve apoptozu regüle eden sinyal iletim yolu üzerinde çalışır. PTEN ayrıca, iki hücre iskelet proteini ile büyük homoloji gösterir. Bu da hücre adezyon ve migrasyonunda da etkili olduğuna işaret eder. PTEN' in, tümör büyümesinde supresor, gelişim ve metastazında ise inhibitör rol oynadığı gösterilmiştir. PTEN geninde homozigot ve heterozigot delesyon olan farelerle yapılan deneyde, PTEN tümör supresor genin gelişim sırasında oldukça önemli rolü olduğu izlenmiştir. PTEN inaktivasyonunun, histomorfolojik değişikliklerin yokluğunda bile görüldüğü tanımlanmıştır. Hiperplazilerde de yaklaşık %20 oranında görülür. Bu bulgular, PTEN inaktivasyonunun, endometrioid karsinom patogenezinin erken basamaklarında etkili olduğunu düşündürmektedir. Bu çalışmada amacımız, düşük yaş aralığındaki tip 2 endometrial kanserlerde erken basamaklarda geliştiği düşünülen PTEN proteinin

ekspresyonundaki değişiklikleri Real time PCR, immunohistokimyasal yöntemler ile rutin prognostik parametrelerle karşılaştırılarak, değerlendirmektir.

Anahtar Kelimeler: Endometrium Kanseri, PTEN, Real Time PCR,



ABSTRACT

COMPARISON OF PTEN EXPRESSION WITH PROGNOSTIC FACTORS IN ENDOMETRIAL CANCER

**CAN M. University of Aydın Adnan Menderes Health Sciences Institute Medical
Biochemistry Master Thesis, Aydın, 2019.**

Endometrial cancer is nowadays the fourth most common cancer among women and it is the most common female cancer in America. Endometrial carcinomas as being the most common malignant tumors of the female genital system, while estrogen-dependent in 80-85% of cases, but not dependent in 10-15% of cases. Endometrial carcinomas are divided into two groups as type I and type II. Type I endometrial carcinomas are seen in a group of young patients aged 40-60 years with a history of anovulation or estrogen replacement therapy. They are usually well differentiated, without myometrial invasion and associated with endometrial hyperplasia. If type II endometrial carcinomas are aggressive tumors that are not associated with hyperplasia and excess estrogen. They develop from the background of endometrial atrophy. Patients as being mostly in postmenopausal period and are older than type I tumors. Tumor suppressor gene PTEN is one of the genes which frequently mutated in endometrial cancers. The most frequently changing gene in endometrial carcinoma, PTEN (phosphatase and tensin homolog) is the tumor suppressor gene and the mutation rate is 30-50%. PTEN as being located in the long arm (q) of chromosome 10 at position 23.3 and encodes a phosphatase whose primary target is the lipid molecule called PIP3. PIP3 works on the signal transduction pathway that regulates cell growth and apoptosis. PTEN has been shown to be suppressor in tumor growth and inhibitory role in development and metastasis. These findings suggest that PTEN inactivation is effective in the early stages of the pathogenesis of endometrioid carcinoma. we created two groups in our study Control group: control group consisting of people who were not diagnosed with early age type2 endometrial cancer. a group of patients diagnosed with type 2 endometrial cancer not early estrogen dependent. Patient age, CEA, p53, myometrial invasion, lymphovascular invasion, and cervical invasion values in the hospital archive of the patients were statistically evaluated within the control group and the patient group. PTEN, obtained by staining using primary antibody; control group H-score

values were significantly higher than all patient groups. When the patient groups were evaluated among themselves; The H-score was significantly higher in the Grade 1 patient group. this shows that PTEN expression is correlated with grade in end2 endometrial cancers. When we evaluated PTEN expression values by qRT-PCR method, we reached the same results. In conclusion, PTEN gene expression may play a role in type 2 endometrial carcinogenesis as well as type1 endometrial cancers.

Keywords: Endometrial Cancer, PTEN, Real Time PCR



1. GİRİŞ

Endometrium kanseri günümüzde kadınlarda görülen kanserler içinde dördüncü sıradadır ve Amerika'da en sık görülen kadın kanseridir (Peng ve ark, 2014; Ngai ve ark, 2014). Endometriyal karsinomlar kadın genital sisteminin en sık görülen malign tümörü olup, %80-85 olguda östrojen bağımlı iken, %10-15 olguda östrojen bağımlı değildir (Ngai ve ark, 2014). Endometriyal karsinomlar tip I ve tip II olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Tip I endometriyal karsinomlar kronik anovulasyon ya da östrojen replasman tedavisi öyküsüne sahip 40-60 yaşları arasındaki genç hasta grubunda görülür. Genellikle iyi diferansiye, miyometriyum invazyonu olmayan ve endometriyal hiperplazi ile ilişkili olan karsinomlardır. Bu grup tümörler östrojen ve progesteron reseptörleri pozitif, p53 negatif ve Ki-67 indeksi düşük olan tümörlerdir. Tip II endometriyal karsinomlar ise hiperplazi ve östrojen fazlası ile ilişkisi olmayan saldırgan tümörlerdir. Bunlar endometriyal atrofi zemininden gelişirler. Hastalar daha çok postmenapozal dönemde olup, tip I tümörlere göre daha ileri yaşadadır. Genellikle östrojen ve progesteron negatif, p53 pozitif tümörlerdir. Ki-67 proliferasyon indeksleri yüksektir. Tanı sırasında derin miyometriyal invazyon gösterme eğiliminde olan kötü prognozlu tümörlerdir (Ngai ve ark, 2014; Bansal ve ark, 2007).

Tümör supresor gen PTEN, endometrioid tip endometrial kanserlerde sıklıkla mutasyona uğrayan genlerdir. Endometrioid tip endometrial karsinomda en sık değişen gen, PTEN (phosphatase ve tensin homolog), tümör supresor genidir ve mutasyon oranı % 30-50'dir. PTEN, 10. kromozomun uzun kolunda (q), 23.3 pozisyonunda lokalize olup, primer hedefi PIP3 adı verilen lipid molekülü olan, bir fosfataz kodlar. PIP3, hücre büyümesi ve apoptozu regüle eden sinyal iletim yolu üzerinde çalışır. PTEN ayrıca, iki hücre iskelet proteini ile büyük homoloji gösterir. Bu da hücre adezyon ve migrasyonunda da etkili olduğuna işaret eder. PTEN'in, tümör büyümesinde supresor, gelişim ve metastazında ise inhibitör rol oynadığı gösterilmiştir. PTEN geninde homozigot ve heterozigot delesyon olan farelerle yapılan deneyde, PTEN tümör supresor genin gelişim sırasında oldukça önemli rolü olduğu izlenmiştir (Laas ve ark, 2014). PTEN geninde homozigot delesyonu olan farelerin, erken embriyogenez sırasında öldükleri, heterozigot delesyonu olan farelerin ise normal olarak gelişebildiklerini ancak endometrial karsinomu da içeren birçok kanser için artmış riskleri olduğu bulunmuştur (Rosai ve ark, 2004). PTEN inaktivasyonunun, histomorfolojik değişikliklerin yokluğunda bile görüldüğü tanımlanmıştır. Hiperplazilerde de yaklaşık %20

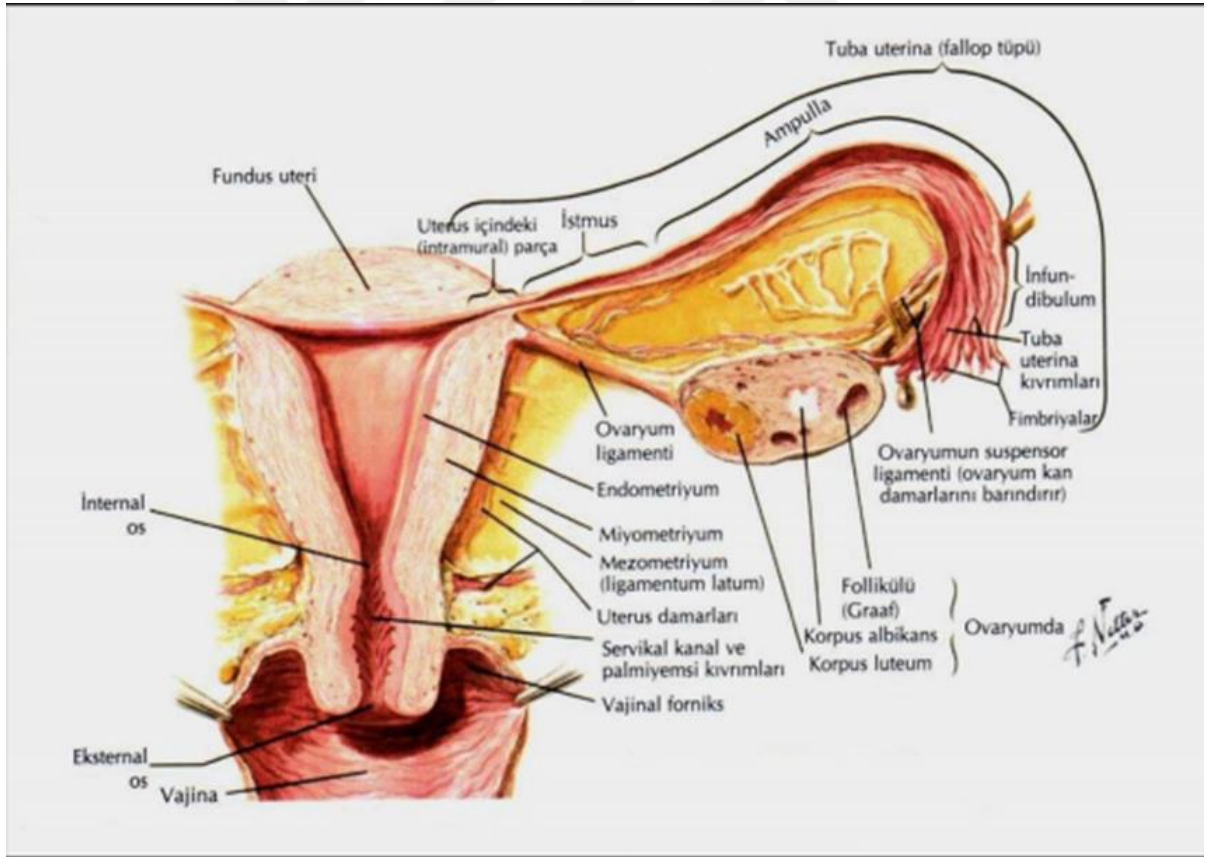
oranında görülür. Bu bulgular, PTEN inaktivasyonunun, endometrioid karsinom patogenezinin erken basamaklarında etkili olduğunu düşündürmektedir. Mutasyonlu hücrelerin genetik analizi ile tanınabilen bu prelinik faz, menstrual sikluslar boyunca devamlılık gösterebilir ve bu süreçte mutant hücrelerin gelişimi, sistemik hormonal faktörlerle pozitif ya da negatif olarak etkilenir. İmmunhistokimyasal bir çalışmada, endometrioid karsinomların büyük bir kısmında PTEN ekspresyon kaybı olduğu bulunmuş ve bu tümör tipinin gelişiminde santral rolüne dikkat çekilmiştir.

Bu çalışmada, özellikle tip 1 endometrial kanserlerde erken basamaklarda geliştiği daha önceki çalışmalarda gösterilen PTEN proteininin ekspresyonundaki değişikliklerin östrojen bağımlı olmayan ve erken yaş aralığındaki tip 2 endometrial kanser tanısı almış hastalarda Real Time PCR, immuno histokimyasal yöntemler ile rutin prognostik parametrelerle karşılaştırılarak, değerlendirilmiştir. Ayrıca çalışmamızda veriler genç hasta popülasyonundaki östrojen bağımlı olmayan tip 2 endometrial kanser tanısı almış hastalarda PTEN ekspresyon düzeylerinin kontrol grubu ile hasta grubu ve hasta grubu gradeleri arasında kendi içerisinde karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Çalışmadaki amacımız PTEN gen ifadesinin erken yaş tip 2 endometrial karsinogenezinde de tip 1 endometrial kanserler gibi rol oynadıklarını araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Uterus

Uterus; pelviste mesane ile rektum arasında uzanan, kalın müsküler bir duvara sahip, içi oyuk armut biçimli bir organdır. 7 cm uzunluğunda, 4 cm genişliğinde ve 2,5 cm kalınlığındadır. Organın genişlemiş üst bölümü gövde veya korpus bölümüdür. Tepedeki kubbe biçimli bölümü fundus olarak adlandırılır ve bu bölümün duvarından fallop tüpleri (tuba uterina) organın içine girer. Organın en dar ve en alt bölümü olan serviks, vajinaya açılır. Korpus ve fundus histolojik olarak hemen hemen aynıdır, ancak serviks bazı önemli yapısal farklılıklar gösterir (Ross ve Pawlina, 2014; Kierszenbaum, 2006).



Resim 1. Uterus ve bağlantılı yapılar (Ovalle ve Nahirney, 2009).

2.1.1. Uterus Embriyolojisi:

Embriyonun genetik ve kromozomal cinsiyeti döllenme sırasında belirlenir. Genital sistem gelişimin erken evrelerinde her iki cinste de birbirine benzer. Bu sebeple genital sistem gelişiminin başlangıç, “seksüel gelişiminin farklanmamış evresi” olarak adlandırılır. Genital sistem mezodermal kökenlidir. Dişi ve erkek embriyoda iki çift genital kanal bulunur. Bunlar mezonefrik ve paramezonefrik kanallardır. Dişi embriyolarda testosteron hormonu bulunmadığı için mezonefrik kanallar gerilerken, paramezonefrik kanallar gelişir. Dişi cinsiyet gelişiminde ovaryumların ya da hormonların varlığı gerekmektedir. Dişi genital yollarının çoğunluğu, paramezonefrik kanallarca oluşturulur. Tuba uterina'lar, paramezonefrik kanalların birleşmemiş kranial bölümlerinden gelişir. Paramezonefrik kanalların kaudal birleşmiş kısımlarından ise uterovajinal primordium farklanır. Bu yapı, uterus ve vajinayı oluşturur. Endometriyal stroma ve miyometriyum, komşu splanknik mezeneşimden gelişir (Moore ve Persaud, 2009; Sadler, 2005).

Paramezonefrik kanal, ürogenital sırtın ön-yan yüzeyindeki epitelin uzunlamasına bir çöküntüsü şeklinde belirir. Kanalin, kranial ucu karın boşluğuna açılan huni şeklindedir. Kaudal yönde de, önce mezonefrik kanalın lateralinde seyrederek ve onu önden çaprazlayarak kaudomedial yönde gelişmeyi sürdürür. Orta hatta diğer paramezonefrik kanala yaklaşır. Başlangıçta bir septumla birbirinden ayrılmış olan 9 kanallar, daha sonra birleşerek uterusu yaparlar (Moore ve Persaud, 2009; Sadler, 2005). Kanallar orta hatta birleştikten sonra pelvis içerisinde kalın bir transfer bir kıvrım oluşur. Kaynaşmış haldeki paramezonefrik kanalların lateralinden pelvis duvarına kadar uzanan bu kıvrıma uterusun broad ligamenti denir. Bu ligamentin üst yüzeyinde uterus tüpleri arka yüzeyinde de overler yer alır. Uterus ve broad ligamentler pelvisi uterorektal poş ve utero servikal poş olarak ikiye böler. Kaynaşan paramezonefrik kanallardan uterusun korusu ve serviksi gelişir. Bunların etrafı uterusun muskuler tabakasının, myometriyum ve peritoneal örtüsünü, perimetriyum, meydana getiren bir mezeneşim tabakasıyla sarılır (Moore ve Persaud, 2002; Sadler, 2005; Ross ve Pawlina, 2014; Kierszenbaum, 2006).

2.1.2. Uterus Anatomisi:

Kalın musküler duvarlı bir kese olan uterus rektum ile mesane arasında yerleşimlidir. Uterus normal olarak erişkin bir kadında, mesanenin üzerinde ve arkasında yer almaktadır.

Mesane boş olduğunda pubisin arkasında olan uterusun karın ön duvarında ki palpasyonu zor olmaktadır. Dolu bir mesane ile ise pubisin üzerine çıkarak daha ventral bir hal alır. Üst sağ ve sol köşelerde boynuz benzeri bir görünüm sergileyerek tuba uterinalar ile bağlantı sağlamaktadır. Uterus önden arkaya basık bir armut gibidir. 7,5 cm boy, 5 cm genişlik, 2.75 cm kalınlıkta ve 30-40 gram ağırlığındadır. Yapı ve fonksiyon bakımından serviks ve korpus olmak üzere bölümlere ayrılmaktadır, boyun görevi gören ve içerisinde ostium uteri internum bulunan isthmus bu iki yapının arasında bulunmaktadır (Morton ve ark, 2000; Moore ve Persaud, 2009).

2.1.2.1. Korpus uteri:

Uterusun sağ ve sol kısmında her iki ovaryum ile bağlantılı olan tuba uterinanın uterusu giriş kısmının üst kısmında bulunana uterus parçasına fundus denmektedir. Fundustan isthmusa doğru giderek daralan yapı corpus olarak isimlendirilir. Mesaneye bakan ön kısmı periton ile kaplıdır bu periton tabakası servikse kadar inerek mesanenin arka yüzüne geçmektedir. Konveks olan arka tarafını saran periton ise buradan aşağı inerek servik ve vaginanın arka yüzünü sarar ve rektumun ön yüzüne geçer.

Fundusun üst kısmında uterusu açılan tuba uterinalar bulunmaktadır. Bu yapıların altında ligamentum teres uteri bulunmaktadır ve üstünde ligamentum ovarii proprium bulunur. Bu iki yapı birden ligamentum latum uteri oluşturmaktadır. (Moore ve Persaud, 2009; Sadler, 2005).

2.1.2.2. Serviks uteri:

Serviks uteri kısa adı ile serviks, 2 cm uzunluğundaki vagina içerisine invaginasyon gösteren isthmusun altındaki bölümdür. Vaginanın içerisine invazive olan serviks kısmı Portio vaginalisolarak isimlendirilir ve ağız kısmında labium anterius ve labium posterius ile çevrili ostium uteri bulunmaktadır (Moore ve Persaud, 2009; Sadler, 2005).

2.1.3. Uterus Histolojisi

Uterus oluşan embriyonun büyüyüp geliştirdiği eşsiz bir organdır ve histolojik olarak 3 ayrı tabakadan oluşmaktadır (Ross ve Pawlina, 2014).

- 1) Dış tabaka: Perimetrium
- 2) Orta tabaka: Miyometriyum
- 3) İç tabaka: Endometrium

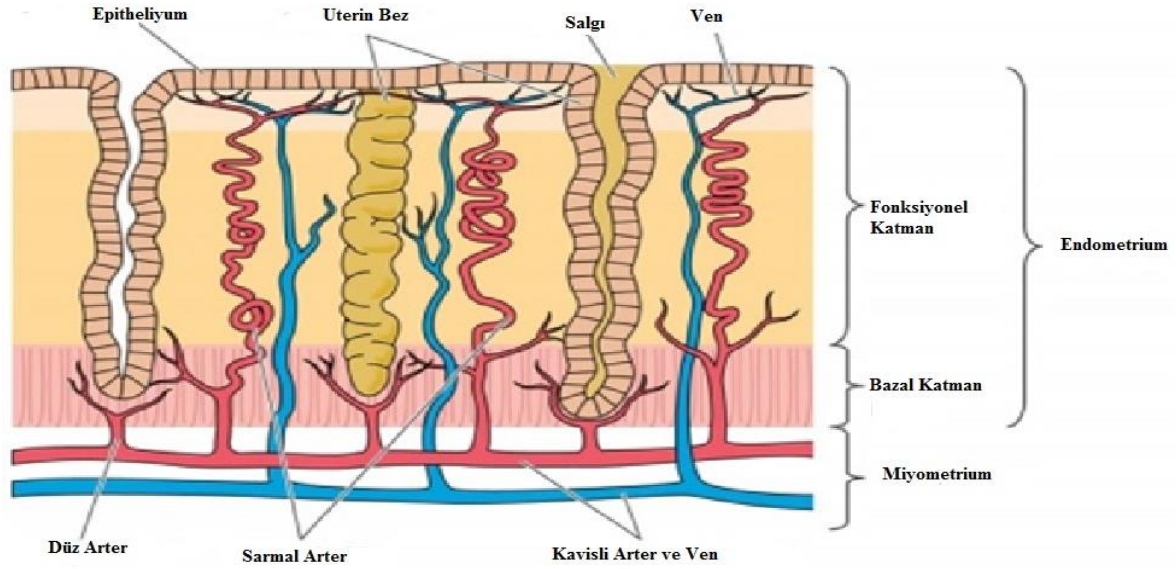
Perimetrium; dışta seroz yapıdaki gevşek bağ dokusudur ve peritoneal mezotel ile örtülüdür. Fundus ve korpus kısmının arka yüzeyleri serozayla örtülü iken, mesaneye bakan ön kısmı adventisya ile örtülüdür. (Tekelioğlu, 2002; Ross ve Pawlina, 2014).

Miyometriyum; uterusun en kalın ve orta kısmı olan miyometriyum, iç ve dışta longitudinal ortada sirküler kas demetlerinden oluşmuştur ve yaklaşık 12mm kalınlığındadır sirküler kas demetlerinin oluşturduğu orta tabaka büyük kan ve lenf damarlarını bünyesinde barındırır ve bu bölgeye bulunur. Vasküler kat ya da başka bir deyiş ile stratum vaskulare denir. Miyometriyum, ovaryumlardan salınan östrojen hormonunun etkisi ile kalınlığı değişebilen bir tabakadır (Kierszenbaum, 2012).

Endometrium; Uterusun en ince tabakası olan endometrium, tek katlı kinosilyalı prizmatik epitel ve altındaki gevşek bağ dokusu yapısındaki lamina propriyadan oluşur. Epitelde, silyalı hücrelerin yanı sıra silya içermeyen salgı hücreleri de bulunur. Lamina propriyada miyometriyuma kadar uzanan ve yüzey epitelinden farklı olarak epitelinde silyalı hücreler bulunmayan basit tübüler yapıda bezler bulunur. Bezler arasındaki bağ dokusu endometriyal stroma adını alır; bol miktarda hücre içeren, kollajen ve retikulum telciklerinin ağ şeklinde seyrettiği özel bir dokudur (Kierszenbaum, 2012).

Endometrium iki farklı tabakadan oluşur: fonksiyonel tabaka ve bazal tabaka. Fonksiyonel tabaka aylık döngüsel değişim gösteren ve mensturiyal kanamayla birlikte atılan üstteki 2/3' lük bölümdür. Bazal tabaka ise miyometriyuma komşu olan 1/3' lük alt bölümdür. Hormonal değişikliklerden etkilenmez ve fonksiyonel tabakanın rejenerasyonuna yardım eder (Tekelioğlu, 2002). Endometriumu besleyen kan damarları bu tabakanın büyük bir bölümünün periyodik olarak dökülmesinde özel bir öneme sahiptir. İki tabakanın kanlanması iki ayrı kaynaktan olur (Resim 2). Uterus arteri, serozanın hemen altında uterusu çepeçevre kuşatan 6-10 arkuat artere dallanır. Arkuat arterlerden ayrılan radyal arterler, miyometriyumun iç kas tabakasının içine penetre olarak bazal arterler ve spiral arterlere dallanır. Kısa ve düz olan bazal arterler, bazal tabakayı kanlandırarak, dolaşımın kesintisiz olmasını sağlar. Spiral arterler ise uterus bezlerine paralel olacak şekilde uzanarak endometriyal yüzeye ulaşır çevrede bulunan yoğun kapiller ağa drene 6 olurlar. Kapiller ağ ince duvarlı venöz göllenmelere, bunlar da efferent venlere drene olur (Resim 2). Spiral arterlerin distal segmentleri her mensturiyal döngüde dejenere ve rejenere olur. Menstruasyondan yaklaşık bir gün önce bu arterlerde ortaya çıkan güçlü

vazokonstrüksiyonlar, bu damarlardan kanlanan kapillerde iskemi ve rüptürlere sebep olur. Uterus bezleri nekroze olur; kan, uterus sekresyonları ve doku artıkları endometriumdan dökülerek vajinadan dışarı atılır (Ovalle, 2009; Janquiera, 2009).



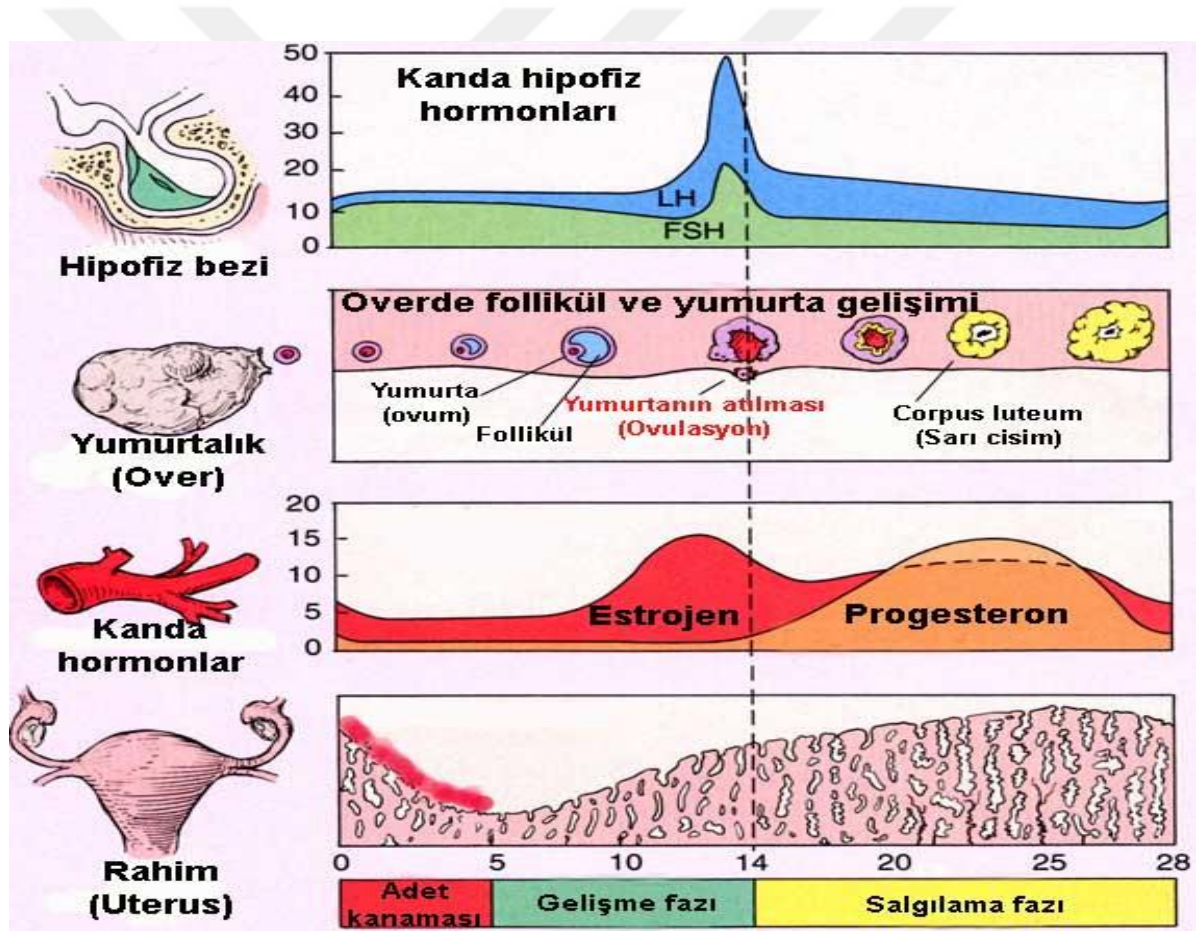
Resim 2. Endometrium'un Histolojik Görünümü (Gartner, 2007)

2.1.3.1 Endometrial siklus

Endometrium işlevsel olarak iki tabakadan oluşmaktadır. Bu tabakalar, menstruasyon sırasında dökülen fonksiyonel tabaka ve menstruasyon sırasında dökülmeyen, menstruasyondan sonra yenilenecek olan fonksiyonel tabakaya kaynak oluşturan bazal tabakadır. Endometriyal siklus 28 gün sürer ve menstrual, proliferatif ve sekretuar olmak üzere birbirini izleyen 3 evreye ayrılır:

- 1. Menstrual Faz:** Bu evre siklusun başlangıcı olarak bilinir. Menstruasyon süresince endometriumun yüzey ve orta tabakası dökülür, bazal tabaka sağlam kalır.
- 2. Proliferatif Faz:** Yaklaşık 9 gün süren bu evrede olgunlaşan ovaryum foliküllerinde üretilen östrojenin uyarıcı etkisiyle endometrium kalınlığı artar.
- 3. Sekretuar Faz:** Ovulasyonun olduğu bu evre yaklaşık 13 gün sürer. Bu evre sırasında endometriyal bezler salgılamaya başlar. Bu dönemde korpus luteum büyür, gelişir ve işlevsel hale gelir. Bu evre, korpus luteumda üretilen östrojen ve progesteron tarafından kontrol edilir.

Eğer oosit fertilize olmazsa, ovulasyondan 10-12 gün sonra korpus luteumda gerileme ve dejenerasyon gözlenir. Östrojen ve progesteron düzeyleri düşmeye başlar, endometriumda sekretuar fazın son günü gelişen iskemiye takiben mensturasyon başlar. Eğer oosit fertilize olursa, endometrium lamina propriyasındaki stromal hücreler artan progesteron düzeyine yanıt olarak lipid ve glikojen depolar ve bu endometriyal değişiklikler desidual reaksiyon olarak adlandırılır. Desidual reaksiyon sonucunda endometriyal stromal hücreler büyür. Blastosistin implantasyonu, hormonal olarak hazırlanmış endometriuma, desidual hücrelerle çevrilmiş ve salgılama yapan endometriyal bezlere bağlıdır. Ayrıca progesteron düzeyinin yüksek olması miyometriyumun oldukça hareketsiz kalmasını sağlar (Moore ve Persaud, 2002).



Resim 3. Endometriyal siklus (Ross ve Pawlina, 2014).

2.2. Endometrial Karsinom

Endometriumda gözlenen kanser tipleri arasında en çok karşılaşılan kanser tipi adenokarsinomlardır. Endometrium kanserleri insidansları ve östrojene duyarlılıklarına ve klinik verilerine göre iki ye ayrılmaktadır (Kurman ve ark, 2014).

Endometrial Karsinom Tip 1: Endometriumda gözlenen kanserlerin %80'ini oluşturan kanserlerdir. Genellikle grade 1 ve grade 2 olarak gözlenen kanserlerdir. Genelde iyi prognoza sahip tümörlerdir. Tip 1 endometrial kanserler östrojen duyarlı kanserlerdir ve genellikle operimenopozal kadınlarda gözlenen bu kanser tipinde kilo önemli bir faktördür. Kanser öncesinde intraepitelyal atipik veya kompleks endometrial hiperplaziler gibi neoplaziler görüldüğü gibi KRAS, CTNNB1, PTEN, PIK3CA genlerini etkileyen mutasyonlar gözlenmektedir (Potischman ve ark, 1996).

Endometrial Karsinom Tip 2: Endometriumda gözlenen kanserlerin %10-20' sini oluşturan kanserlerdir. Genellikle grade 3 olarak gözlenen ileri gradeleme gözlenen kanserlerdir. Genelde yüksek grademeleye sahip oldukları için kötü prognoza sahip tümörlerdir. Seröz, berrak hücreli, müsinöz, skuamöz, transisyonel hücreli, mezonefrik ve undifferansiye gibi Non-endometrioid histolojiye sahiptirler. Tip 1 endometrial kanserler östrojen duyarlı olmadığı düşünülen kanserlerdir ve genellikle postmenopozal kadınlarda gözlenen bu kanser tipinde ileri yaş ve zayıf olmak önemli bir faktördür. Prekürsör lezyon çok nadir tespit edilir (Potischman ve ark, 1996). P53 geninde değişim ortaya konulmuştur. Bazı kromozomlarda heterozigozite kaybı mevcuttur. STK 15, E-cadherin, p16, c-erb-B2 genlerinde moleküler değişim saptanmıştır (Potischman ve ark, 1996; Samarthai ve ark, 2010).

2.2.1. Endometrial Karsinom Tip 1

Endometrial kanserlerin %70-80' lik bir kısmını Tip 1 endometrial kanserler oluşturur. Bu kanserler tipik olarak ilk olarak karşılanmamış östrojen etkisi ile ilişkilendirilmiş endometrioid kanserlerdir ve düşük dereceli, erken evre olarak sınıflandırılmıştır (Potischman ve ark, 1996). Tip 1 endometrial kanserlerde; obezite, endometrial hiperplazi, hiper östrojen, geç menapoz ve hiperlipidemi, risk faktörleri arasındadır. Tip 1 endometrial kanserlerde progesteron ve östrojen reseptörleri eksprese edildiği daha önceki çalışmalarla gösterilmiştir (Samarthai ve ark, 2010).

2.2.2. Endometrial Karsinom Tip 2

Nonendometrioid olarak bilinen tip 2 endometrial kanserler, tüm endometrial kanserler arasında %10-20' lik kısmı oluşturan daha az yaygın endometrial kanser şeklidir. Bu kanser tipi daha çok seröz papiller olarak ve daha az sıklıkla da berrak hücreli alt tiplerinde gözlenmektedir. Bu kanser tipinde tipik bir atrofik endometrium ve genellikle derin myometrial penetrasyon özelliği gözlenmektedir. Tip 1 endometrial kanserlere göre görülme yaşı yaklaşık daha yüksektir. Bu kanser tipinin östrojen uyarılması ile ilgisi olmamaktadır. Tip 2 endometrial kanserlerin tümör oluşumu ile ilgili çok az bilgi elde edilse de, içinde küçük hücreli, farklılaşmamış ve squomaz hücreli kanserler olduğu bulunmuştur. Bu tip endometrial kanserler tipik olarak atropik endometrium sahiptirler ve patogeneplerinde hormonal risk faktörleri henüz belirlenememiştir. Klinik olarak tip 2 kanserler agresif, zayıf prognoz ve erken yayılma eğilimleri olduğu gösterilmiştir (Samarntai ve ark, 2010).

2.3. Endometrium Kanselerinin Derecelendirilmesi

Endometrial kanserlerde histolojik ve nükleer özelliklere dayanarak yapılan derecelendirme bir tanı göstergesi olarak oldukça önemlidir.

2.3.1. Histolojik Derecelendirme

Histolojik olarak Derece 1, Derece 2, Derece 3 olarak derecelendirilen endometrium kanserlerinde histolojik gradleme, solid alanların varlığına göre yapılmaktadır. Endometrium Kanselerinin Histolojik Derecelendirmesi Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Endometrium Kanselerinin Histolojik Derecelendirmesi

EVRE	AÇIKLAMASI
Derece 1 Adenokarsinom	Nonskuamöz veya nonmorüler solid büyüme şekilleri <% 5
Derece 2 Adenokarsinom	Nonskuamöz veya nonmorüler solid büyüme şekilleri % 6-50
Derece 3 Adenokarsinom	Nonskuamöz veya nonmorüler solid büyüme şekilleri >%50

2.3.2. Nükleer Derecelendirme

Kromatin dağılımı, nükleer şekil ve boyut ve çekirdek boyutuna göre yapılan derecelendirme nükleer derecelendirmedir (Morrow ve ark, 1991).

Tablo 2. Endometrioid adenokarsinomun nükleer olarak derecelendirilmesi

EVRE	AÇIKLAMASI
Grade 1 endometrioid adenokarsinom	Nükleus oval-yuvarlak, kromatin dağılımı düzgün, nükleus belirgin değildir.
Grade 2 endometrioid adenokarsinom	İrregüler oval nükleus, kromatin kümelenmesi ve orta büyüklükte nükleolus dikkati çeker.
Grade 3 endometrioid adenokarsinom	İri-pleomorfik nükleus, kaba kromatin ve iridüzensiz nükleolus izlenir.

2.3.3. FIGO Derecelendirmesi

Cerrahi evre sağ kalımı belirlemede en önemli prognostik unsurdur ve tedaviyi yönlendirmede en sık kullanılan faktördür. Günümüzde FIGO 'nun (The International Federation of Gynecology and Obstetrics – Uluslararası Jinekolojik ve Obstetrik Federasyonu) cerrahi evreleme sistemi kullanılmaktadır (Kurman RJ, 2014).

Tablo 3. Endometrium kanseri FIGO evrelemesi

EVRE	AÇIKLAMASI
Evre 0	Primer tümör bulunmuyorsa In situ karsinom varlığı (preinvaziv hastalık)
Evre I	Tümör korpus uteriye sınırlıdır
Evre IA	Tümör endometriuma sınırlıdır
Evre IB	Tümör myometriyumun ½'sinden azına invazyon göstermektedir
Evre IC	Tümör myometriyumun ½'sinden fazlasına invazyon göstermektedir
Evre II	Serviks tutulumu vardır fakat tümör halen uterusunda
Evre IIA	Sadece endoservikal glandüler tutulum vardır

Tablo 4. Endometrium kanseri FIGO evrelemesi (devamı)

Evre IIB	Servikal stromal invazyon vardır
Evre III	Lokal ve/veya bölgesel yayılım vardır
Evre IIIA	Seroza ve/veya adneksiyal tutulumu (direk veya metastatik olarak) ve/veya batın yıkama sıvısında veya asitte kanser hücreleri saptanmıştır
Evre IIIB	Vajinal tutulum (direk veya metastatik)
Evre IIIC	Pelvik veya para-aortik lenf nodu metastazı varlığı
Evre IVA	Mesane ve/veya barsak mukozası tutulumu
Evre IVB	Uzak metastaz varlığı

2.4. Endometrial Karsinomun Moleküler ve Genetik Özellikleri

Endometriumda gözlenen kanser tipleri arasında en çok karşılaşılan kanser tipi adenokarsinomlardır. Endometrium kanserleri insidansları ve östrojene duyarlılıklarına ve klinik verilerine göre iki ye ayrılmaktadır (Kurman ve ark, 2014).

2.4.1 Tip 1 Endometrium Kanserlerin Moleküler ve Genetik Özellikleri

Endometrial karsinomların yaklaşık %83' ünde ve ayrıca kanser öncesi prekanser lezyonların yaklaşık olarak %55' inde 10q23 kromozmunda bulunan PTEN inaktivasyonun olduğu daha önceki çalışmalarla gösterilmiştir. Tirozin kinaz etkisi gösteren proteinin kodlanması ile tümör baskılayıcı olarak görev alan PTEN inaktivasyonu bir mutasyon sonucu meydana gelir ve ekspresyon kaybı ile sonuçlanır (Bansal ve ark, 2009). PTEN aktivitesinde meydana gelen bir azalma, hücre proliferasyonu ve buna bağlı sağ kalımların artması ve sinyal iletim yolağında meydana gelecek düzelmelerin kaynağıdır. Endometrium kanserlerinin %83' ünde PTEN mutasyonları gözlenmektedir (Gougelet ve ark, 2005). Endometrial kanserlerde gözlenen %40' lık delesyon PTEN inaktive olurken, genelde gradelesi yüksek olan tümörlerde promoter hipermetilasyonu ile de PTEN inaktivasyonu meydana gelmektedir. (Samarthai ve ark, 2010).

Endometrioid endometrial kanserlerde; B-katenin ve K-ras, genlerinde gözlenen mutasyonlar ve mikrosatellit kararsızlık genetik olarak incelendiğinde dikkati çekmektedir.

Mikrosatellit kararsızlığın, sporadik endometrioid kanserlerin %20' sinde gözlenirken nonendometrioid kanserlerin ise %0-11' de görüldüğü daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir. (Gougelet ve ark, 2005, Samarntai ve ark, 2010).

GTP ailesinin küçük bir proteinini kodlayan K-ras, çekirdek ile hücre yüzey reseptör arasındaki sinyal iletiminde görev alır. %10 ile %30' luk bir dilimde, Tip 1 endometrial kanserlerde K-ras mutasyonu gözlenmektedir. Mikrosatellit kararsızlık varlığında, K-ras mutasyonunda o kanser vakasında normal oranlardan daha fazla olduğu yapılan çalışmalarda gözlemlenmiştir. B-katenin ise hücre farklılaşması, normal doku şeklinin yapısının korunmasında ve sinyal iletiminde önemli rol oynayan E-kaderin proteininin bir parçasıdır. PTEN, MSK ve K-ras mutasyonu genellikle bir arada görülürken, B-katenin mutasyonu genelde tek başına görüldüğü belirlenmiştir (Bansal ve ark, 2009).

2.4.2. Tip 2 Endometrium Kanserlerin Moleküler ve Genetik Özellikleri

p53 geninde oldukça fazla gözlenen genetik değişiklikler Tip 2 seröz kanserlerde ortaya çıkmaktadır. Tümör baskılayıcı p53 geni 17p13.1 kromozomunda bulunan ve tümör baskılayıcı özellik gösteren p53 geni, yüksek dereceli Tip 1 endometrium kanserlerin %10-20'sinde görülürken, %90 oranında Tip 2 endometrial kanserlerde gözlenmektedir. p53 mutasyonları çoğunlukla anploidi ile ilişkilendirilir ve PTEN mutasyonu görülen tümörlerde görülmediği gözlemlenmiştir (Bansal ve ark, 2009; Samarntai ve ark, 2010).

HERII/neu (Epidermal büyüme faktör reseptörü) insanda 17q12 kromozomunda bulunmaktadır. HERII/neu geni tirozin kinaz transmembran reseptörü kodlayan ve sinyal iletimine dâhil olan bir onkogendir. Tip 2 endometrial kanserlerin %18-80' inde, derece 2 ve 3'lerde ise %10-30 arasında HERII/neu' nin fazla ekspresyonu veya amplikasyonu saptanmıştır (Bansal ve ark, 2009).

Hücre döngüsünü düzenleyici proteini kodlayan ve 9p21 kromozomunda bulunan p16 geninin inaktivasyonu kontrolsüz hücre büyümesine sebep olur. Genelde yapılan çalışmalarda özellikle seröz ve bazı berrak hücreli kanserlerin yaklaşık olarak %45' inde p16 aktivasyonunda azalma ya da durma gözlenmektedir. p16 ekspresyonunun azalması K-ras ve p53 mutasyonu ile bağlantılı olan p16 ekspresyonu, ileri evre ve kötü prognoz ve morbilite ile ilişkilendirilmiştir (Samarntai ve ark, 2010). Adhezyon moleküllerinin ailesinden olan kaderinler hücreler arasındaki sıkı bağlantılardan sorumludur. E-kaderin ise CDH1 geni tarafından kodlanır ve 16q22.1 kromozomunda bulunur. Bu genin ekspresyonunun azalması

düşük hücre-hücre çekim gücü ile ilişkilendirilir ayrıca metastaz olasılığını ve tümör invazyonunu başlattığı bilinmektedir (Bansal ve ark, 2009; Samarntai ve ark, 2010).

2.5. PTEN

Dört yüz üç (403) aminoasitten oluşan PTEN, 55 kDa ağırlığında olan bir fosfatazdır. PTEN canlıda, miyofibroblast farklılaşması, hücre çoğalması, hücre göçü, gibi çeşitli canlılık faaliyetlerini düzenler (Wen ve ark, 2001). Bu genin N-terminal bölgesini oluşturan birden 185' e kadar olan ilk kısmı fosfataz aktivitesi gösterir. Arda kalan 186-403 aminoasitlik kısmı ise C-terminal bölgesidir. Üç alt kısımdan oluşan C-terminal bölgesi sinyal iletiminden sorumludur. C terminal bölgesini oluşturan bu 3 kısımdan ilki lipid bağlayıcı kısımdır ve PTEN'in hücre membranına yerleşimini sağlar. Ayrıca 186-351' lik kısmı oluşturan bu ilk kısım sinyal iletiminde sorumludur. Akabindeki ikinci kısım prolin, glutamik asit, serin ve treonin amino asit bakiyelerinden oluşan PEST dizileridir. C-terminal bölgesinin sonunda yer alan 399-403 amino asitlik bölüme denk gelen son kısım PDZ olarak bilinir ve hücrel sinyal iletiminde önemli rol oynayan protein-protein etkileşimini sağlar. Ayrıca bu son PTEN'in N-terminal bölgesi ile etkileşime girerek molekülün fosfataz aktivitesini göstermesine katkı sağlar (Myers ve ark, 1997). İnsanlarda PTEN geni tarafından kodlanan bir protein olan fosfataz ve tensin homoloğu (PTEN); ilk kez bağımsız bir grup tarafından keşfedilmiş ve primer insan kanserlerinde mutasyona son derece duyarlı bir lokus olan, insan kromozomu 10q23 üzerinde sık sık tekrarlayan tümör süpresör gen kaybı olarak tanımlanmıştır (Li ve ark, 1997). PTEN geni tümör baskılayıcı gen olarak anılmasındaki ana prensipler aşağıda sıralanmıştır;

1. PTEN meydana gelen mutasyonlar kanser ile ilişkilendirilmeden önce (Cowden ve Bannayan Zonana sendromu) gibi sendromların görülmesi ile ilişkilidir.
2. PTEN geni homozigot olarak sporadik kanserlerde inaktive durumdadır.
3. PTEN oldukça korunmuş bir proteindir (Ali ve ark, 1999).

PTEN geninde meydana gelen mutasyonlar yapılan birçok çalışma ile birçok kanser türünün gelişmesinde rol oynadığı gösterilmiştir. Tümör süpresör bir gen olarak görev gören PTEN, çok hızlı büyüyen ve bölünen hücreleri önleyerek hücre döngüsünün düzenlenmesinde yer alır (Reddy ve ark, 2008). Mutasyon veya heterozigosite kaybına bağlı olarak PTEN ekspresyonunda bozulma PTEN geninde meydana gelebilecek bir mutasyon ve/veya heterozigosite kaybına bağlı olarak gerçekleşmektedir. PTEN geninde meydana gelen bir

mutasyon ile fosfotidil inositol trifosfata (PIP3) hücre içerisinde kontrolsüz olarak artar ve tümör oluşumuna sebep olabilecek hücre içi değişikliklere yol açar. Lipid fosfataz aktivitesinin substratı olan PIP3' e karşı PTEN geni yüksek derecede spesifiktir. PIP3 oluşuktan sonra Protein kinaz B (AKT) ailesi ve PIK1 gibi diğer kinazların plazma membranına gelmesi ve aktivasyonu gerçekleşmektedir. Eğer PTEN aktivitesinde bir kayıp gerçekleşirse hücre içinde PI3-kinaz /AKT sinyal yolağı sürekli olarak aktif hale gelir. AKT hedefleri veya substratları proliferasyon, apoptoz, glukoz hemostazı, hücre boyutu ve DNA hasarı gibi birçok kritik hücre fonksiyonda rol oynamaktadır (Risinger ve ark, 1997; Ali ve ark, 1999).

PTEN geninde meydana gelen germ hücresi mutasyonları; Proteus Sendromu, Cowden Sendromu, Bannayan-Riley-Ruvalcaba Sendromu ve Lhermitte Duclos Sendromuna sebep olmaktadır. PTEN geninde meydana gelen inaktivasyonlar ve PTEN geninde meydana gelen mutasyonlar gün geçtikçe prostat, meme, endometrium, tiroid, glioblastom gibi kanser türlerine sebep olabilmekte ve bu patolojinin erken saptanması ile erken gradeli tümörlerle prognozo daha iyi tedaviler sağlanabilmektedir (Bonneau ve ark, 2000).

2.6. Endometrial Karsinom ve PTEN İlişkisi

Normal endometriumdaki PTEN ekspresyonu sıklık fazlarda farklılık gösteren hormon bağımlı bir durumdur. Özellikle endometrium epitelinde PTEN' nin yüksek oranda sentezlenmesi östrojen bağımlıdır. Eğer östrojen oranında artış olursa endometrium epitelinde de PTEN ekspresyonu artmaktadır. Endometrium histolojisinde patolojik değişimler izlenmeden de PTEN seviyelerindeki artış çalışmalarla izlenmiştir. Ekspresyonunda bozulma, endometriumdaki histomorfolojik değişikliklerin yokluğunda da tanımlanmıştır (Hecht ve ark, 2006). PTEN ekspresyonundaki artış patolojik inceleme sonrası hiperplazilerde yaklaşık %20 oranında artarken, EIN lezyonlarında ise bu oran %55 kadar bulunmaktadır (Levine ve ark, 1998; Maxwell ve ark, 1998). Elde edilen bu sonuçlar, PTEN geninde meydana gelen mutasyonların da PTEN geninin inaktivasyonunun, endometrioid karsinom patogenezinin erken basamaklarında etkili olduğunu düşündürmektedir (Lacey ve ark, 2008; Mutter ve ark, 2000). Yapılan immunohistokimyasal çalışmalarda, endometrioid karsinomların büyük bir kısmında (%30-80) PTEN ekspresyon kaybı olduğu bulunmuş ve bu tümör tipinin gelişiminde santral rolü olduğuna dikkat çekilmiştir (Mutter ve ark, 2000).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Materyal Toplanması ve Örneklerin Hazırlanması

Bu çalışma 10.09.2014 tarihli Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu karar onayı ile yapılmıştır.

Çalışmamızda Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalında Tip 2 endometrial kanser tanısı alan ve endometrial kanser sebebi ile opere edilen, yaş aralığı 18-60 olan hastalar dahil edilmiştir.

Olgulara ait hastane arşivinde bulunan CEA, p53 verileri istatistiksel olarak değerlendirilmek için kayıt altına alınmıştır. Opere edilen hastalarda biyopsi örneklerinde qRT-PCR yöntemi gen ekspresyonları değerlendirilmiştir. Ayrıca hastalara ait biyopsi örneklerinden immunohistokimyasal boyama için 3-4 µm' lik parafin kesitler alınarak, kit protokolüne uygun olarak PTEN antikor boyaması yapılmıştır.

Hasta sayısı 20, kontrol grubu sayısı 15 toplam örneklem sayısı 35 olarak Güç Analizi (Power Analysis) ile belirlenmiştir.

Çalışmamız için iki grup belirlenmiştir;

Kontrol grubu: 18-60 yaş aralığında endometrial kanser teşhisi almamış hastalardan alınan biyopsi örnekleri.

Hasta grubu: 18-60 yaş aralığında tip 2 endometrial kanser teşhisi almamış hastalardan alınan biyopsi örnekleri.

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalına başvuran ve Tip 2 endometrial karsinom teşhisi ile opere edilen ve doku parçaları patoloji laboratuvarına gönderilen hastaların örneklerinin bir kısmı taze doku olarak - 80 °C de qRT PCR için saklanmıştır. Daha sonra qRT-PCR protokolüne uygun olarak hazırlanan örneklerde PTEN ekspresyonu incelenmiştir. İmmünohistokimya yöntemi için % 10 luk formaldehitte fiske edilen doku örnekleri rutin doku takibi yöntemleri ile takip edilerek parafin bloklar hazırlanacak ve 3-4 µm kesitler alınarak PTEN primer antikoruna boyanmak üzere hazırlanmış ve incelenmiştir.

3.2. Endometrial Karsinom'un Sınıflandırılması

Histolojik olarak sınıflandırma Grade 1, grade 2, grade 3 olarak derecelendirilmiştir. Endometrium kanserlerinde histolojik gradeleme, solid alanların varlığına göre yapılmıştır. Cerrahi evreleme ise FIGO'nun (Uluslararası Jinekolojik ve Obstetrik Federasyonu) cerrahi evreleme sistemi kullanılarak yapılmış ve kayıt altına alınmıştır.

3.3. İmmunohistokimyasal değerlendirme

İmmunohistokimyasal boyamadaki ana hedef, hücrede varlığı bilinen makromoleküllerin işaretlenerek akabinde boyama işlemleri ile görünür hale getirilmesi esas alınır.

PTEN antikoru kullanılarak her bir gruba dâhil toplam 35 parafin blok hazırlandı. Rutin doku takibi protokollerinden geçirilen örnekler parafin bloklara gömülerek 0,5 mikron kesitler mikrotom ile alınarak dokular lizinli lamlara aktarıldı. Dehidrasyon işleminden sonra lizinli lamlar üzerinde bulunan dokular pappen aracılığı ile çizildi.

Örnekler %3' lük H₂O₂ (Hidrojen peroksit) eklenerek oda ısısında 10 dakika bekletildi. Bekleme süresinin bitiminde PBS ile üçer defa iyice yıkanan örneklerin kurutma kâğıdı ile kurutulması dokuya zarar vermemek kaydı ile yapıldı. Bu işlemin akabinde uygun retrieval yöntemi uygulanan örnekler 20 dakika 37 °C inkübe edildi. Bu sürenin sonunda PBS ile üçer defa iyice yıkanan örneklerin kurutma kâğıdı ile kurutulması dokuya zarar vermemek kaydı ile yapıldı. Örnekler üzerinde Pab-pen ile çizili alanı kapatacak şekilde peroxidaz dizileme solüsyonu damlatıldı. 6 dakika sonra PBS ile yıkanan örnekler kurulandıktan sonra üzerlerine bloking solüsyonu damlatıldı ve oda ısısında 30 dakika süre ile bekletildi. Blok solüsyonu yıkama yapılmadan dikkatlice uzaklaştırıldı ve üzerine uygun şekilde dilüe edilen primer antikor konularak +4 derecede bir gece bekletildi. Ertesi gün PBS ile iyice yıkaması yapılan preparatlar üzerine primer antikor ile uyumlu biyotinlenmiş sekonder antikor damlatıldı ve kapalı nemli kutuda oda ısısında 30 dakika bekletildi. PBS solüsyonu ile 3 kez yıkaması yapıp kurutulan preparatlar üzerine streptavidin peroksidaz konjuget eklendi ve oda ısısında kapalı nemli ortam kabında 15 dakika bekletildi. 1000 mikrolitre (µl) DAB dilüsyonu içerisine 27 µl DAB substratı olacak şekilde örnek sayısına göre DAP karışımı hazırlandı ve inkübasyon süresi sonunda 3 'er kez PBS ile yıkayıp fazla suyu alınan lamlar üzerine, DAP karışımı koyulup ortalama 2 dakika beklenildi. Preparatlar distile suyla yıkandı. Yayma

preparatların üzerine Harris Hematoksilen konulup 40 saniye beklenecek zemin boyaması yapıldı ve yine distile suyla yıkama yapılan yayma preparatlar kurutulmadan alkol ve ksilol serilerinden geçirilip entellan ile kapatıldı.

3.4. H skorlama

Her bir çalışma grubunda bulunan her bir hasta için yapılan immunohistokimyasal değerlendirme için, her bir örnekten rastgele 10 alan seçilmiş ve bu 10 ayrı alanda PTEN açısından hem pozitif hem de negatif hücreler olmak üzere tüm hücreler sayılmış ve yüzdeleri alınmıştır. Pozitif boyanan hücrelerin ise boyanma yoğunluğu ‘H-skor yöntemi’ kriterlerine göre, zayıf (+), orta (++) ve kuvvetli (+++) olacak şekilde 3 kategoride değerlendirilmiştir (Detre ve ark, 1995; Mazieres ve ark, 2013).

Her örnek için; zayıf (+) pozitif boyanan hücrelerin yüzdesi hesaplandı ve çıkan sonuç 1 ile çarpılarak bir değer elde edildi. Daha sonra orta (++) pozitiflikte boyanan hücrelerin yüzdesi hesaplandı ve bu sonucun 2 ile çarpılması ile de bir değer elde edildi. Kuvvetli (+++) pozitiflikte boyanan hücreler için de bu hücrelerin yüzdesi hesaplanmış ve sonuç 3 ile çarpılarak üçüncü bir değer elde edilmiş oldu. Daha sonra elde edilen bu 3 değer toplandı ve her hasta için bir “H-skor değeri” elde edildi. Her bir hasta için H-score değerinin hesaplamasında aşağıda belirtilen formül kullanılmıştır:

$$\text{H-score} = 1 \times [\text{zayıf (+) pozitiflikte boyanan hücrelerin \% si}] + 2 \times [\text{orta (++) pozitiflikte boyanan hücrelerin \% si}] + 3 \times [\text{kuvvetli (+++) pozitiflikte boyanan hücrelerin \% si}]$$

3.5. Moleküler Analiz

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalına başvuran ve endometrial karsinom teşhisi ile opere edilen ve doku parçaları patoloji laboratuvarına gönderilen hastaların örneklerinin bir kısmı taze doku olarak -80 °C de qRT-PCR için saklanmıştır.

Primer ve Probelar PTEN (Hedef gen)

Sol: GCAGAAACAAAAGGCGCTAC

Sağ: TGGGATAAATATAGGTCAAGTCCAA Probe: Katalog numarası: 04689135001
Probe 88 set (Roche, Elips, Türkiye)

β -aktin (Referans gen)

Sol: GAAGTGACTGTGGCTTGTGC

Sağ: AGATTCCATATTTCTGTTGATTCCA Katalog numarası: 04688015001 Probe42 set
(Roche, Elips, Türkiye)

3.5.1 RNA İzolasyonu

Roche High Pure RNA Paraffin Kit (Roche, Almanya, Ref no: 03270289001)'i, kullanılarak DNA'dan PTEN gen bölgesini çoğaltmak için RNA izolasyonu işlemi aşağıdaki basamaklar kullanılarak yapıldı.

- 1) -80 °C de saklanan fresh dokular oda ısısına getirilerek erimesi sağlandı. Dokular vortekslenerek homojen hale getirildikten sonra RNA izolasyonuna geçildi.
- 2) Her bir doku üzerine ayrı ayrı 40 μ l Proteinaz K ve 116 μ l Tissue Lysis Buffer eklendi, tekrar homojen hale getirmek için vortekslendi ve +55 °C'de over night kurutma banyosunda havuzunda düşük devirde karışıma bırakıldı.
- 3) Daha sonra Lizat pipet yardımı ile toplayıcı ve High Pure filtreli tüp kombinasyonuna eklendi.
- 4) Tüpe eklenen dokular 8000 rpm 30 sn santrifüj edildi ve santrifüj sonrası toplayıcı tüpte biriken sıvının atılması sağlandı.
- 5) Sıvının atılmasının ardından tekrar bu sefer 12000 rpm santrifüj edilerek toplayıcı tüpte tekrar biriken sıvının atılması sağlandı
- 6) Geride kalan doku pelleti üzerine kit protokolüne uygun olarak Wash Buffer I solüsyonu yaklaşık olarak 500 μ l eklenerek 8000 rpm de 15 sn santrifüj edildi. Ve tekrar toplayıcı tüpte biriken sıvının dökülmesi sağlandı.
- 7) 6. Maddedeki işlem tekrar edilerek 500 μ l Wash Buffer II çalışma solüsyonu eklendi. Toplayıcı tüpte biriken sıvının dökülmesi sağlandı ve bu işlem bir kez daha tekrarlandı.
- 8) son işlemten sonra 12000 rpm de 2 dk santrifüj işlemi yapılarak toplayıcı tüp atıldı ve filtreli tüpün altına 1,5 ml reaksiyon tüpü yerleştirildi.
- 9) Her bir örneğin üzerine 90 μ l Elution Buffer eklendi. 60 sn 8000 rpm de santrifüj işlemi yapılarak işlem sonunda filtreli tüp atıldı.

- 10) +37 °C'de 45 dk inkübasyona bırakılacak reaksiyon tüpünde bulunan örnekler üzerine 1 µl DNaz I çalışma solüsyonu ve 10 µl DNaz Incubation Buffer eklendi.
- 11) daha sonra örnekler üzerine 38 µl Tissue Lysis Buffer ve 40 µl Proteinaz K solüsyonları eklendi önce vortekslenen örnekler 60 dk +55 °C' de inkübe edildi.
- 12) Birebir oranında (325 µl) Binding Buffer ve etanol pipet yardımı ile toplayıcı tüp bağlanmış High Pure filtreli tüp içerisine homojen hale getirildikten sonra eklendi ve 8000 rpm de 30 sn santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplayıcı tüpte biriken sıvı atıldı.
- 13) Geri kalan karışım tekrar bu sefer 12000 rpm de 30 sn santrifüj edilerek yine toplayıcı tüpte bulunan sıvı kısım atıldı.
- 15) Daha sonra 500 µl Wash Buffer I solüsyonu protokole uygun olarak eklendi ve 8000 rpm de 15 sn santrifüj edildi. Tekrar toplayıcı tüpte biriken sıvının dökülmesi sağlandı.
- 16) Bu işlemi takiben 500 µl Wash Buffer II solüsyonu tüp içerisine eklenerek 8000 rpm de 15 sn santrifüj edildi ve akabinde toplayıcı tüpte biriken sıvı boşaltıldı.
- 17) Tekrar toplayıcı tüp bağlanmış High Pure filtreli tüp içerisine 300 µl Wash Buffer II solüsyonu ilave edildi ve yine 8000 rpm de 15 sn santrifüj edilerek toplayıcı tüpte bulunan sıvı atıldı.
- 18) örnek 2 dk daha 12000 rpm de santrifüj edildi ve High Pure filtreli tüpün altına 1,5 ml reaksiyon tüpü yerleştirilerek 50 µl Elution Buffer eklendi. Bu karışım, 15-25 °C'de 60 sn inkübasyona bırakıldı ve akabinde 8000 rpm de 60 sn santrifüj edildi. Sonuç olarak, RNA izolasyonu gerçekleştirilmiş oldu. Her bir hastadan elde edilen RNA örnekleri -80 °C de saklandı.

3.5.2. RNA Saflığının Belirlenmesi ve Konsantrasyon Hesaplanması

RNA izolasyon işlemi sonrası -80 °C de saklanan örnekler çıkarıldı ve oda ısısına gelmeleri sağlandı. Daha sonra, spektrofotometre cihazında (BioDrop, µLite, İngiltere) 260 nm /280 nm dalga boyunda elde edilen RNA'nın saflığı ve miktarı ölçülerek saflık oranları 1,8 civarı olan RNA'lar çalışmaya dahil edildi. Çalışmamızdaki tüm örneklerden istenilen saflıkta RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

3.5.3. cDNA Sentezi

RNA'dan cDNA sentezinde Roche EvoScript Universal cDNA Master Kit (Roche, Almanya, Ref no: 07812439011)'i ve termal cycler cihazı (SensoQuest, Almanya) kullanılarak yapıldı.

Kit protokolüne uygun olarak;

1. Kit reaktifleri çözdürüldükten sonra kuru buz üzerine alındı. (cDNA Master Kit)
2. Reaktifler tamamen homojen olana kadar vortekslendi.
3. Her bir örnek için spektrofometrede ölçümü yapılan RNA 100 nm' ye göre hesaplandı, örnekler üzerine 4 mikrolitre reaction buffer ve toplam 18µl olacak şekilde su eklendi. Kuru buz üzerine daha önceden yerleştirdiğimiz reaksiyon tüpleri üzerine her bir örneğin bileşeni bırakıldı.

3.5.4. RT-PCR Analizi

RT-PCR analizinde Roche FastStart Essential DNA Probes Master (Roche, Almanya, Ref no: 16 402 682 001) kiti, primer olarak Roche CTLA-4 (Roche, Almanya, Id: 113194), Roche PD-L1 (Roche, Almanya, Id: 104031), Roche PD-L2 (Roche, Almanya, Id: 117537) ve kontrol primer olarak Roche ACTB (Roche, Almanya, Id: 143636) kullanıldı. Roche Cobas Z 480 (Roche, Almanya) cihazında, LightCycler 480 Sistemi ile çalışıldı. PCR karışımı protokole uygun olarak, kuyucuk başına 20 µl son hacim olacak şekilde Roche FastStart Essential DNA Probes Master kiti protokolü kullanılarak hazırlandı.

1. Çözdürülen solüsyonların tüm içeriğinin çöktürülerek geri kazanılması için, açmadan önce mikrosantrifüjde spinlendi sonrasında, pipetleme yapılarak dikkatlice karıştırıldı ve solüsyonlar kuru buz üzerine alındı.
2. Kuru buz üzerinde PCR karışımları hazırlandı ve örnek tüplerine eklendi. Protokole uygun olarak 20 µl reaksiyon için PCR karışımı;

Su	: 4 µl
Light Cycler 480 Probe Master	: 10 µl
Real Time Hazır Spesman	: 1 µl
Toplam Hacim	: 15 µl.

3. Karışım pipetleme yaparak dikkatlice karıştırıldı.

4. LightCycler 480 Multiwell plakasının her bir kuyucuğuna 5 µl örnek cDNA ve 15 µl PCR karışımı eklendi toplam 20 µl hacim pipetlenerek karışımı sağlandı.
5. MultiCell Plakası Light Cycler 480 Folyo ile kapatıldı.
6. Multiwell Plate'i Light Cycler 480 cihazına aktarıldı.
7. LightCycler 480 Cihazı uygun PCR protokolüne göre çalıştırıldı.

3.5. İstatistiksel Analizler

Çalışma sonucunda elde edilen tüm veriler SPSS 22.0 programına da istatistiksel olarak değerlendirildi. Her bir prognastik faktör için Normal Dağılıma Uygunluk analizi yapıldı. Normal dağılıma uymayan veriler Kruskal-Wallis testi ile değerlendirildi. İkili karşılaştırmalar için Mann Whitney U testi yapıldı. Normal dağılıma uygunluk analizi yapılan ve normal dağılıma uyan H-skor sonuçları ve RT PCR sonuçları için, One Way Anova tek yönlü varyans analizi yapıldı. Elde edilen veriler de $p < 0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmaya, kontrol grubuna dahil edilen ve endometrial kanser teşhisi almamış 15 hastaya ait örnek ile tip 2 endometrium kanseri teşhisi almış 20 hastaya ait örnekler dahil edilerek toplamda 35 örnek ile çalışılmıştır. Çalışmamızda yaş dağılımı 48 ile 60 arasında olup, ortalama yaş kontrol grubunda 54,2 hasta grubunda 55,35 ve toplam çalışmaya katılan kişiler göz önüne alındığında 54,85 olarak bulunmuştur. Histolojik grade için FIGO gradeleme sistemi kullanılarak histolojik gradeleme yapılmıştır. Hasta grubumuzda 20 hastadan 7 tanesinde grade 1;(35%), 7 tanesinde Grade 2; (35%) ve 6 tanesinde Grade 3 (30%) tip 2 endometrial kanser gözlenmiştir. Hasta grubuna ait 20 örnekte FIGO' ya göre evreleme yapılmıştır. 1 hastada evre I (5%), 6 hastada evre IA (30%), 4 hastada evre IB (20%), 3 hastada evre IC (15%), 2 hastada evre II (10%), 1 hastada evre IIA (5%) ve 2 hastada evre IIB (10%) skorlaması gözlenmiştir. Myometrial invazyon derinliğini üç aşamada incelenmiş olup hasta grubunda invazyon olmayan hasta sayısı; 11 hasta (55%), myometriyumun ½ sinden az invazyon olan hasta sayısı 5 hasta (25%) ve myometrial kalınlığın ½'den fazlasında invazyon olan hasta sayısı 4 hasta (20%) olarak bulunmuştur. Hasta grubunda 20 hasta içerisinde servikal invazyon olan hasta sayısı 3 (15%) olarak bulunmuştur. Glandüler invazyon olan hasta sayısı 1 (5%), stromal invazyonu olan hasta sayısı 2'dir (10%).

Tablo 4'de hasta grupları kendi içerisinde histolojik gradeleme, figo evreleme lenfovasküler ve servikal invazyon değerleri gösterilmiştir.

Tablo 4. Hasta Grupları Kendi İçerisinde Histolojik Gradeleme, Figo Evreleme Lenfovasküler ve Servikal İnvazyon Değerleri

Hasta Grup	Histolojik Grade	Figo Evre	Lenfovasküler İnvazyon	Servikal İnvazyon
Hasta 1	Grade 2	1B	Negatif	Negatif
Hasta 2	Grade 3	1B	Negatif	Negatif
Hasta 3	Grade 3	2	Negatif	Negatif
Hasta 4	Grade 2	2A	Negatif	Pozitif
Hasta 5	Grade 1	1A	Negatif	Negatif
Hasta 6	Grade 3	1B	Negatif	Negatif

Tablo 4. Hasta Grupları Kendi İçerisinde Histolojik Gradeleme, Figo Evreleme Lenfovasküler ve Servikal İnvazyon Değerleri (devamı)

Hasta 7	Grade 2	1A	Negatif	Negatif
Hasta 8	Grade 1	1C	Negatif	Negatif
Hasta 9	Grade 2	1B	Negatif	Negatif
Hasta 10	Grade 3	2B	Negatif	Pozitif
Hasta 11	Grade 2	2B	Negatif	Pozitif
Hasta 12	Grade 1	1	Negatif	Negatif
Hasta 13	Grade 1	1B	Negatif	Negatif
Hasta 14	Grade 1	1A	Negatif	Negatif
Hasta 15	Grade 2	1C	Negatif	Negatif
Hasta 16	Grade 3	2	Negatif	Negatif
Hasta 17	Grade 1	1A	Negatif	Negatif
Hasta 18	Grade 3	1C	Negatif	Negatif
Hasta 19	Grade 1	1A	Negatif	Negatif
Hasta 20	Grade 2	1A	Negatif	Negatif

Tablo 5’de hasta grubunu kendi içerisinde myometrial invazyon değerlerine göre dağılımı gösterilmiştir.

Tablo 5. Hasta grubunu kendi içerisinde myometrial invazyon değerlerine göre dağılımı

Hasta	Miyometrial İnvazyon Yok	Miyometrial İnvazyon ½ den az	Miyometrial İnvazyon ½ den fazla
Hasta 1	+		
Hasta 2		+	
Hasta 3	+		
Hasta 4		+	
Hasta 5	+		
Hasta 6	+		
Hasta 7		+	
Hasta 8	+		
Hasta 9		+	
Hasta 10	+		

Tablo 5. Hasta grubunu kendi içerisinde myometrial invazyon değerlerine göre dağılımı (devamı)

Hasta 11					+
Hasta 12	+				
Hasta 13					+
Hasta 14	+				
Hasta 15				+	
Hasta 16	+				
Hasta 17					+
Hasta 18	+				
Hasta 19					+
Hasta 20	+				

İmmunhistokimyasal olarak p53 ve CEA antikorları ile yapılan boyama sonuçları kontrol grubu ile hasta grubu arasında karşılaştırıldığında Grade 1, Grade 2 ve Grade 3 olan hastaların tümünde de P53 ekspresyonu ($p=0,000$) anlamlı derecede artmıştı. Hasta grubu kendi içerisinde değerlendirildiğinde Grade 1 ve grade 2 hasta grubu kendi içerisinde karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0,998$). Grade 1 ve grade 3 ve Grade 3 hasta grubu kendi içerisinde karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0,706$) grade 2 hasta grubu grade 3 hasta grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0,805$). Tablo 6’da kontrol ve hasta grubu P53 ekspresyonu değerleri verilmiştir.

CEA antikorları ile yapılan boyama sonuçları kontrol grubu ile hasta grubu arasında karşılaştırıldığında Grade 1, Grade 2 ve Grade 3 olan hastaların tümünde de CEA ekspresyonu ($p=0,000$) anlamlı derecede artmıştı. Hasta grubu kendi içerisinde değerlendirildiğinde Grade 1 ve grade 2 hasta grubu kendi içerisinde karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0,870$). Grade 1 ve grade 3 ve Grade 3 hasta grubu kendi içerisinde karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0,270$) grade 2 hasta grubu grade 3 hasta grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0,740$). Tablo 6’da kontrol ve hasta grubu P53 ekspresyonu değerleri verilmiştir.

Tablo 6. Kontrol ve hasta grubu P53 ekspresyonu değerleri

Grup/P53	Median (Min.-Maks.)
Kontrol (n=15)*	0,000 (0,000-0,000)
Hasta (n=20)*	31,20 (4-67)

*Kontrol grubu ile Hasta grupları arasındaki istatistiksel anlamlılık (p=0,000)

Hasta grubu kendi içerisinde P53 ekspresyonu değerleri Tablo 7' de gösterilmiştir.

Tablo 7. Hasta grubu kendi içerisinde P53 ekspresyonu değerleri

Grup/P53	Median (Min.-Maks.)
Grade 1	28,71 (5-40)
Grade 2	29,85 (4-67)
Grade 3	35,66 (27-40)

Kontrol ve hasta grubu CEA ekspresyonu değerleri Tablo 8' de gösterilmiştir.

Tablo 8. Kontrol ve hasta grubu CEA ekspresyonu değerleri

Grup/CEA	Median (Min.-Maks.)
Kontrol (n=15)*	0,000 (0,000-0,000)
Hasta (n=20)*	1,30 (1-2)

*Kontrol grubu ile Hasta grupları arasındaki istatistiksel anlamlılık (p=0,000)

Hasta grubu kendi içerisinde CEA ekspresyonu değerleri Tablo 9' da verilmiştir.

Tablo 9. Hasta grubu kendi içerisinde CEA ekspresyonu değerleri

Grup/CEA	Median (Min.-Maks.)
Grade 1	1,14 (1-2)
Grade 2	1,29 (1-2)
Grade 3	1,50 (2-2)

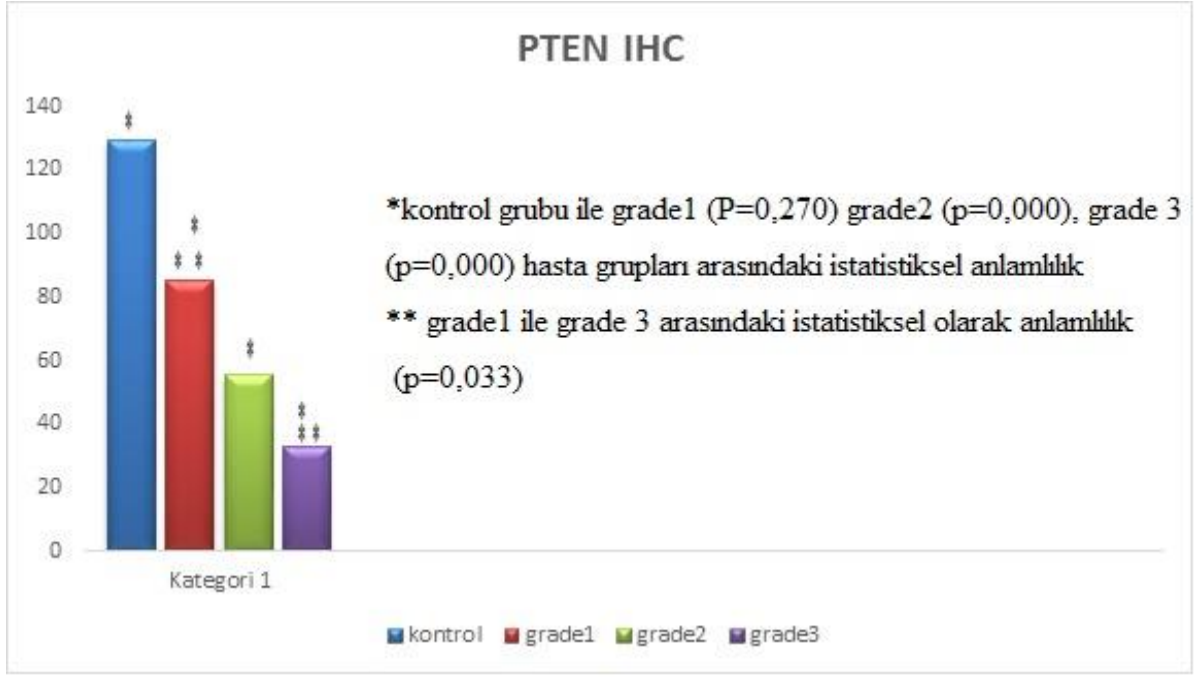
4.1. PTEN primer antikoru kullanılarak immunohistokimyasal yöntem ile değerlendirme;

PTEN primer antikoru kullanılarak yapılan boyamalar sonucunda elde edilen H-skor değerleri kontrol grubu ile hasta grupları arasında karşılaştırılmıştır. H skor değerleri FIGO grade ile karşılaştırılarak değerlendirildiğinde; PTEN, primer antikoru kullanılarak yapılan boyamalar sonucu elde edilen; kontrol grubu H-skor değerlerinin Grade 1 hasta grubuna göre ($p=0,27$), Grade 2 hasta grubuna göre ($p=0,000$) ve Grade 3 hasta grubuna göre ($p=0,000$) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derece fazla olduğu gösterilmiştir. Hasta grupları kendi arasında değerlendirildiğinde; Grade 1 ile Grade 2 hasta grubu ($p=0,341$) ve Grade 2 grade 3 hasta grubu ($p=0,591$) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunamazken Grade 1 ile Grade 3 hasta grubu ($p=0,033$) karşılaştırıldığında Grade 1 hasta grubunda H-skor değeri istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Gruplara ait ortalama H-skor değerleri ve en düşük en yüksek H-skoru değerleri Tablo 10 ve Şekil 1’de gösterilmiştir.

Tablo 10. Gruplara ait ortalama H-skor değerleri

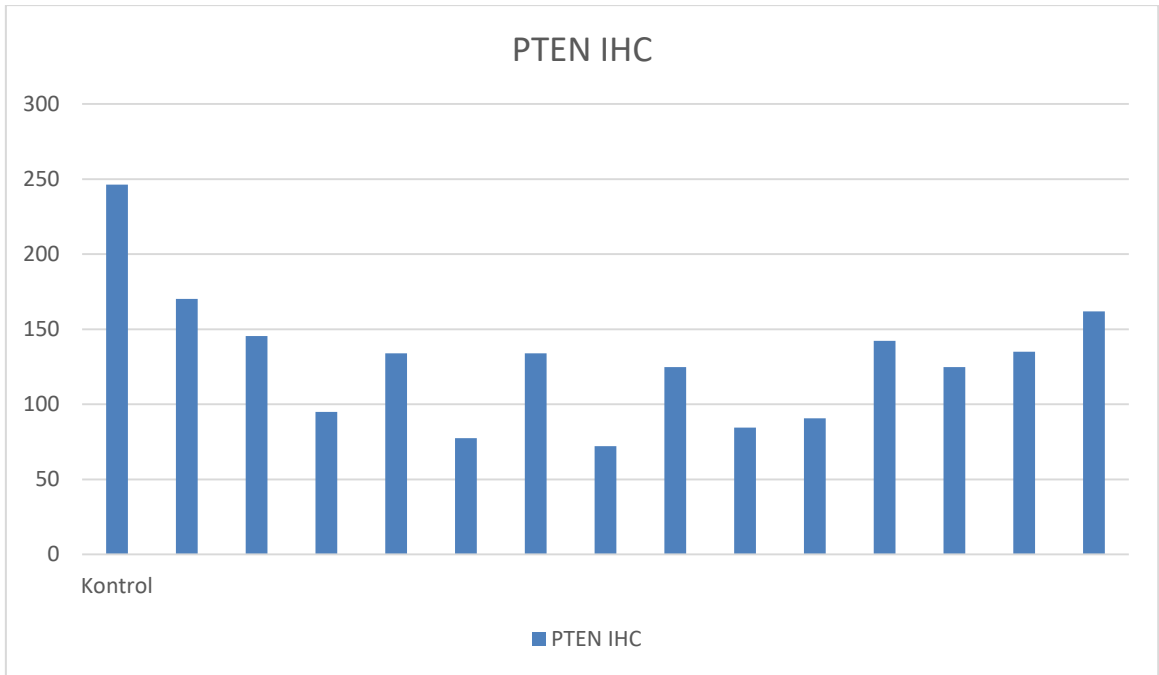
Grup/PTEN IHC	Median (Min.-Maks.)
Kontrol	129,21 (72,16-246,39)
Grade 1	84,95 (67,42-123,20)
Grade 2	55,45 (24,23-85,57)
Grade 3	32,59 (26,80-36,70)

Her iki grubun immunohistokimyasal olarak PTEN geni ekspresyon seviyeleri aşağıda şekil 1’deki gibidir.

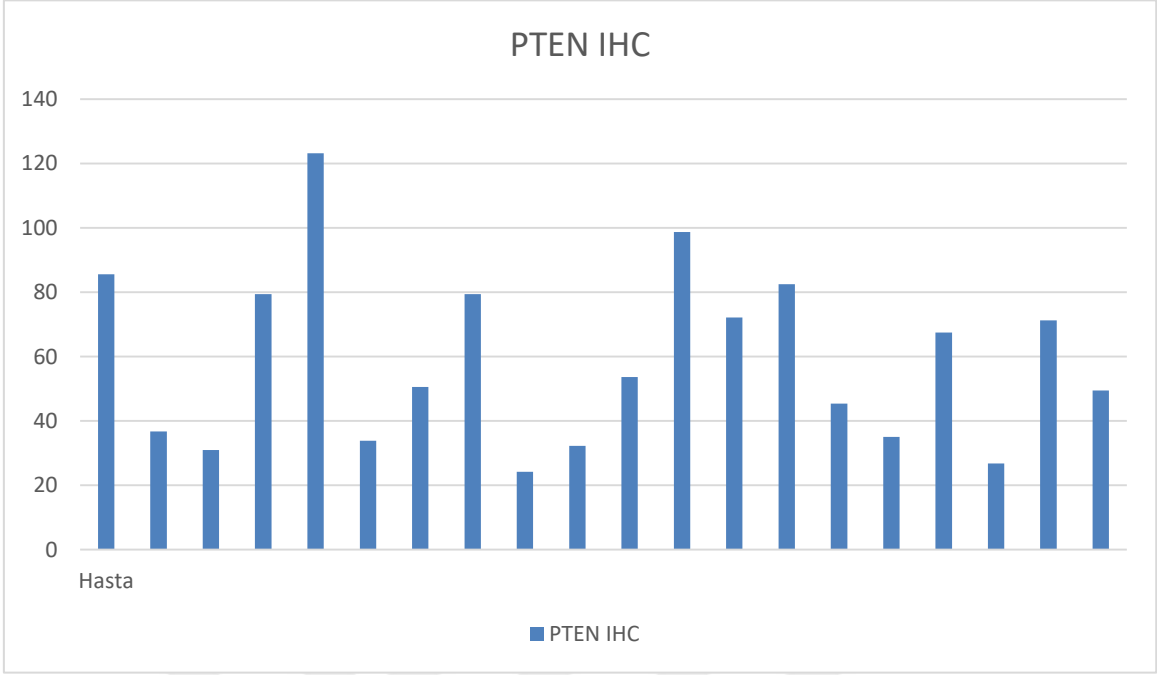


Şekil 1. Kontrol ve hasta gruplarının immunohistokimyasal olarak PTEN geni ekspresyon seviyeleri

Kontrol grubunun immunohistokimyasal olarak PTEN geni ekspresyon seviyeleri şekil 2’de, hasta grubunun immunohistokimyasal olarak PTEN geni ekspresyon seviyeleri şekil 3’de gösterilmiştir.

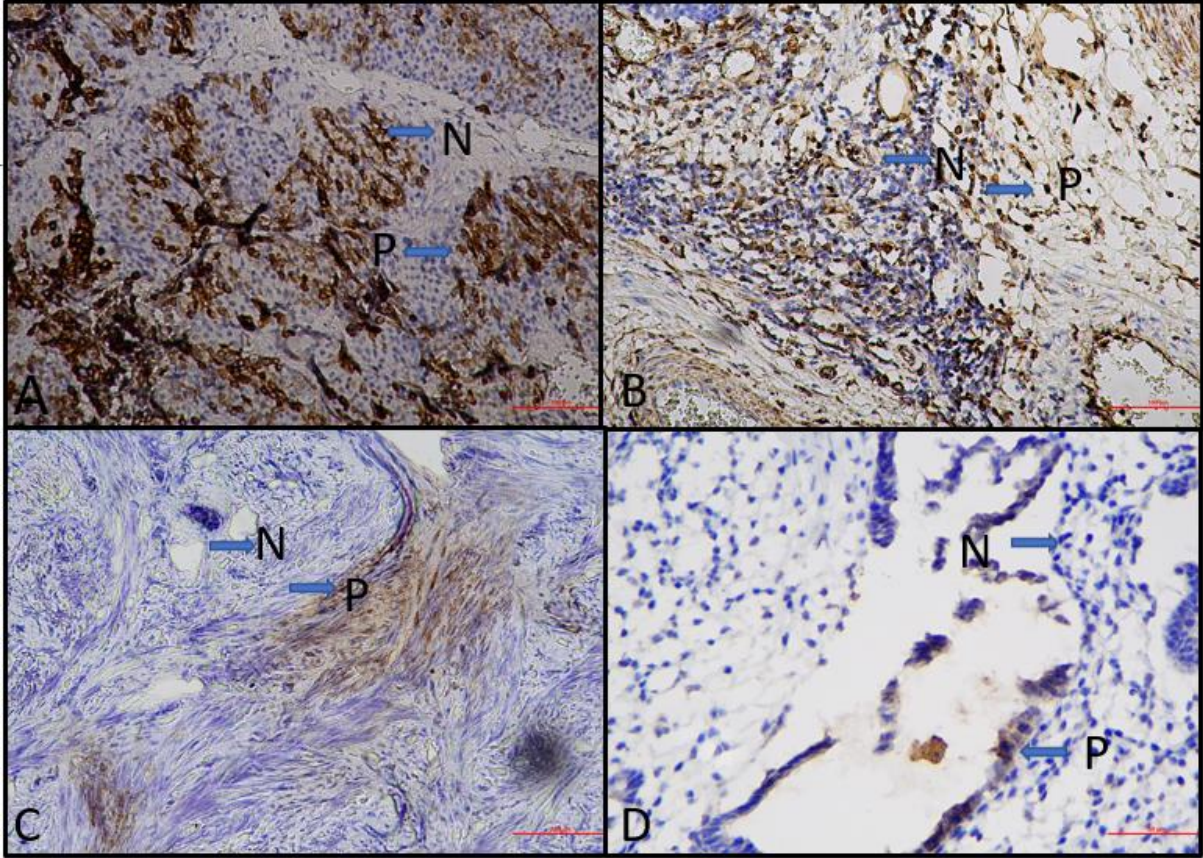


Şekil 2. Kontrol grubuna ait immunohistokimyasal olarak PTEN geni ekspresyon seviyeleri



Şekil 3. Hasta grubuna ait immunohistokimyasal olarak PTEN geni ekspresyon seviyeleri

Kontrol grubunda IHC boyama sonrası elde edilen değerlerde (++,+++) pozitif boyanan hücre sayısının daha fazla olduğu gözlenirken hasta grubunda Grade 1 den Grade 3 e doğru (-) ve (+) zayıf boyanmanın daha yoğun olduğu gözlemlendi. Işık mikroskobu altında x20 objektifte alınan görüntüler Resim 4' te verilmiştir.



Resim 4. PTEN, x20 büyütme. (A; Kontrol Grubu, B; Grade 1 endometrial kanser grubu, C; Grade 1 endometrial kanser grubu, D; Grade 1 endometrial kanser grubu, N; negatif boyanma, P; pozitif boyanma)

4.2. PTEN geni salınım düzeylerinin RT-PCR yöntemi ile değerlendirilmesi

Hasta grubuna ait 20 adet endometrium kanser dokusu ve kontrol grubuna ait sağlıklı bireylere ait 15 adet endometrium dokusunun PTEN geni salınım düzeyleri qRT-PCR yöntemi kullanılarak saptanmıştır. Hasta ve kontrol grubuna ait dokuların her siklusunda bir adet kalibratör doku çalışmaya eklenerek cihazın ve manuel kullanıcının da hataları minimize edilerek standardize edilmiştir. Hasta ve kontrol grubuna ait endometrium dokularında ki hedef gen ve internal gen için ilk floresans sinyalin saptandığı siklus sayıları (cycle threshold – dCT) olarak belirlenmiştir. Hasta ve kontrol grubuna ait endometrium dokularının dCT değerinden kalibratör olarak kullanılan dokuların dCT değeri çıkarılarak delta delta (cycle threshold - ddCT) değeri elde edilmiştir (Livak ve Schmittgen, 2001). Elde edilen verilere göre, hasta grubuna ait; PTEN geni salınım düzeyi 0,67 – 7,10 (ort. 4,08),

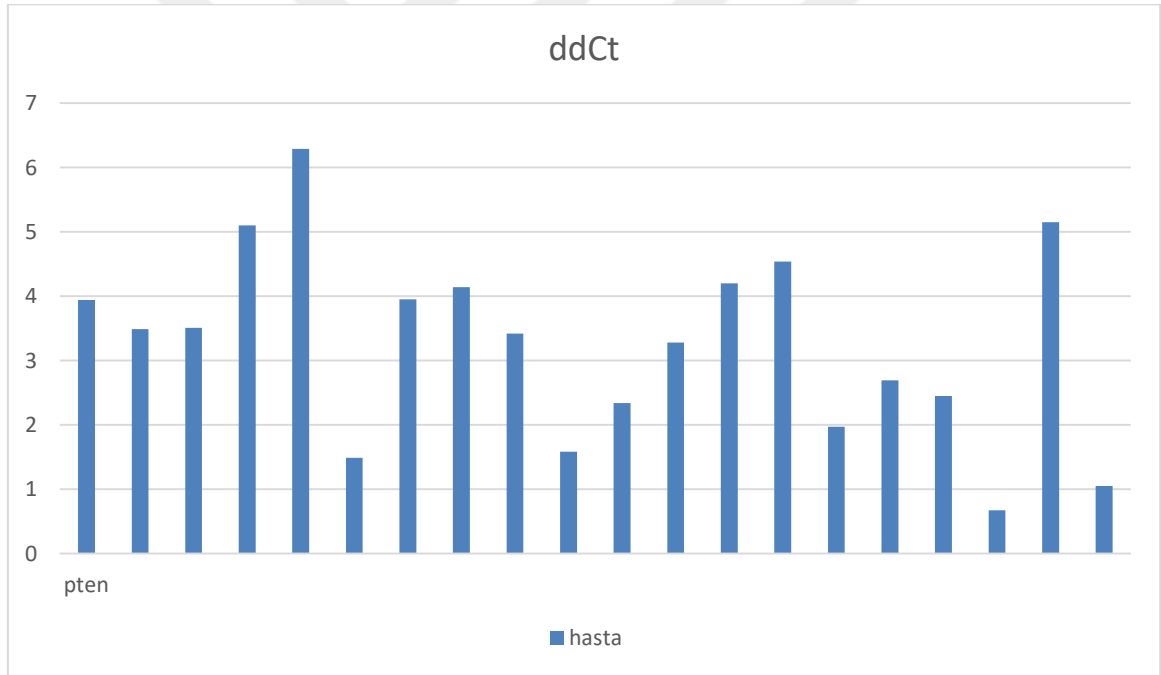
kontrol grubunda ise; 3,44 – 7,10 (ort5,12) olarak bulunmuştur. Hasta grubu kendi içerisinde gradeleme sistemine göre karşılaştırıldığında Grade 1 2,45-6,29 (ort:4,29), grade 2 1,05-5,10 (ort;3,11) ve grade 3 0,67-3,51 (ort: 2,84) olarak bulunmuştur. Hasta grupları ve kontrol grubunun PTEN ve β -Aktin geni değerleri Tablo 11 'de verilmiştir.

Tablo 11. Hasta grupları ve kontrol grubunun PTEN ve β -Aktin geni değerleri

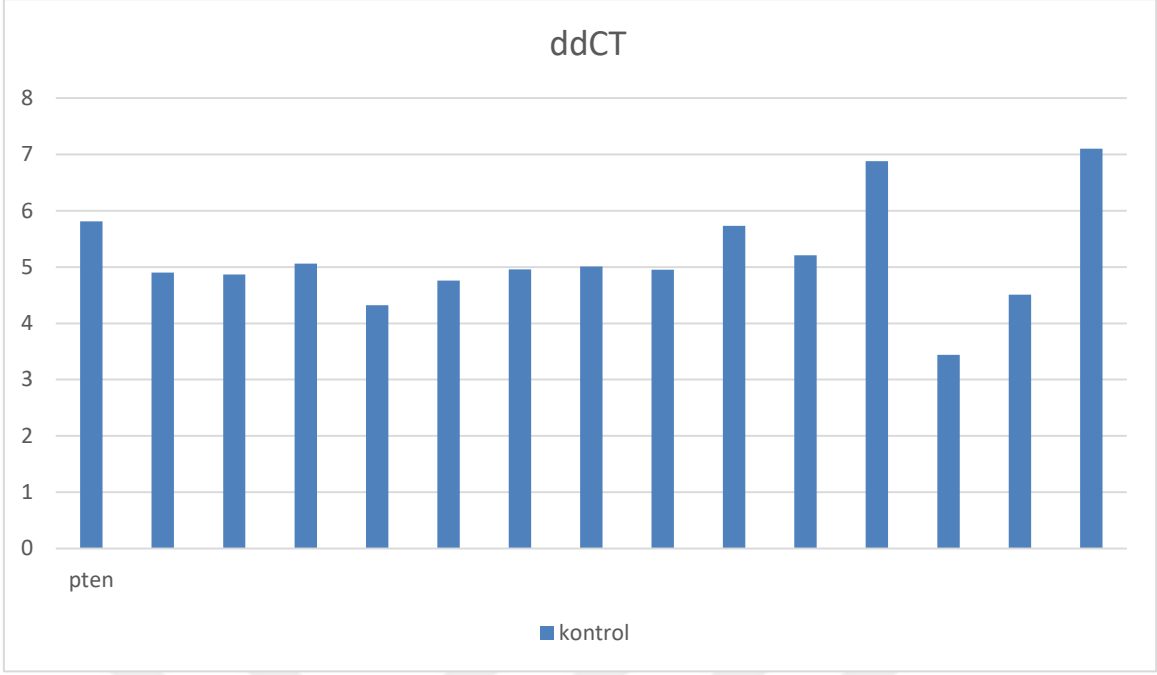
Doku Türü	PTEN	b-Aktin	dCt	ddCt
Kontrol 1	27,51	36,14	9,92	5,81
Kontrol 2	28,02	35,62	9,01	4,90
Kontrol 3	28,61	36,43	8,98	4,87
Kontrol 4	27,97	36,12	9,17	5,06
Kontrol 5	28,48	36,57	8,43	4,32
Kontrol 6	27,64	35,91	8,87	4,76
Kontrol 7	26,02	35,61	9,07	4,96
Kontrol 8	24,42	34,23	10,82	5,01
Kontrol 9	27,67	35,02	10,76	4,95
Kontrol 10	29,01	38,12	11,54	5,73
Kontrol 11	28,01	37,24	11,02	5,21
Kontrol 12	27,88	35,73	9,69	6,88
Kontrol 13	27,65	36,08	9,25	3,44
Kontrol 14	26,28	35,96	10,42	4,51
Kontrol 15	27,31	36,87	9,85	7,10
Hasta 1	23,58	35,07	11,21	3,94
Hasta 2	24,32	34,62	9,21	5,10
Hasta 3	25,13	36,23	9,10	6,29
Hasta 4	22,92	34,32	9,76	1,49
Hasta 5	23,73	33,71	9,33	3,95
Hasta 6	25,30	34,48	10,05	4,14
Hasta 7	25,24	34,76	7,30	3,42
Hasta 8	22,45	35,60	7,49	1,58
Hasta 9	24,31	34,68	7,61	2,34
Hasta 10	26,37	35,97	8,55	3,28
Hasta 11	26,67	36,53	6,32	4,20

Hasta 12	25,25	35,51	9,81	4,54
Hasta 13	24,39	33,96	7,96	1,97
Hasta 14	23,82	34,65	7,88	2,69
Hasta 15	26,31	31,67	8,36	2,45
Hasta 16	24,01	29,56	11,06	,67
Hasta 17	25,02	33,20	6,48	5,15
Hasta 18	23,53	28,01	7,60	3,49
Hasta 19	25,37	35,47	9,32	3,51
Hasta 20	22,86	33,45	8,55	4,36

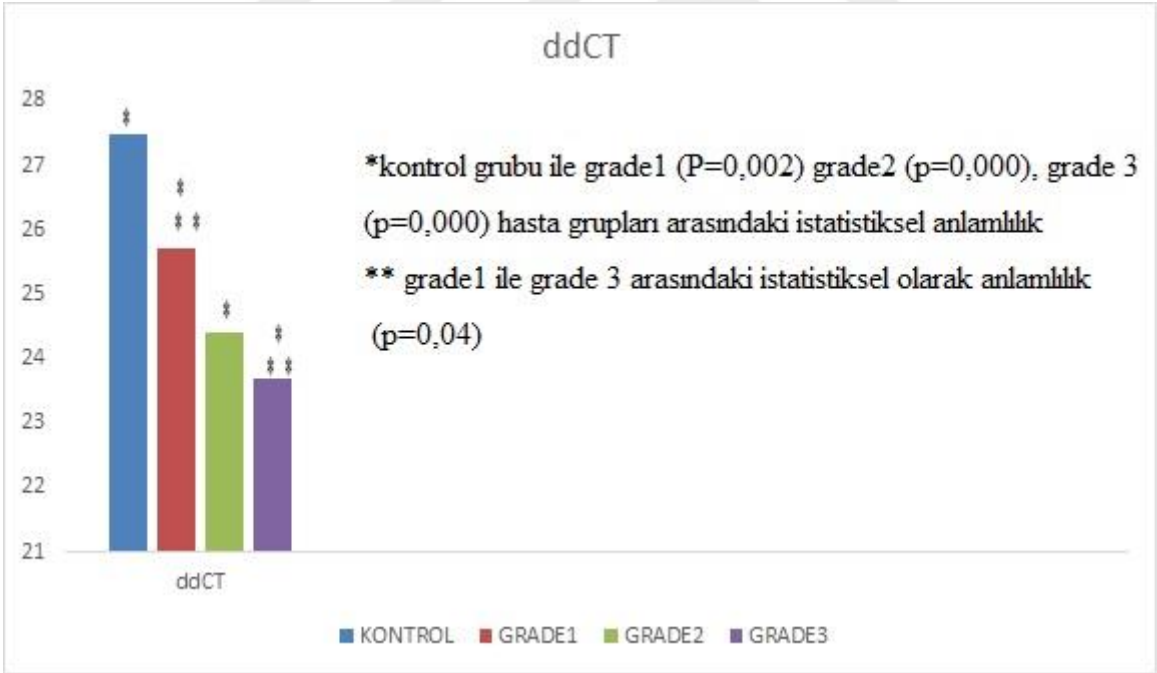
Hasta grubunun şekil 4’de, kontrol grubunun şekil 5’de ddCT yönüyle PTEN geni salınım seviyeleri ve ortalama değerleri belirtilmiştir.



Şekil 4. Hasta grubunun ddCT yönüyle PTEN geni salınım seviyeleri ve ortalama değerleri

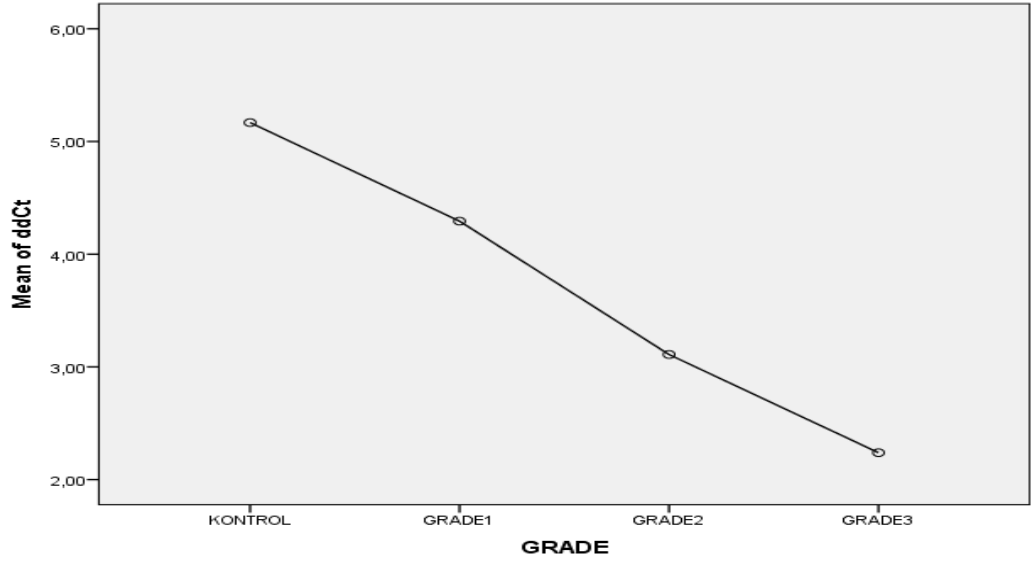


Şekil 5. Kontrol grubunun ddCT yönüyle PTEN geni salınım seviyeleri ve ortalama değerleri



Şekil 6. Hasta gruplarının grade olarak ve kontrol grubunun ddCT yönüyle PTEN geni salınım seviyeleri ve ortalama değerleri

Her iki grubun ddCT değerleri ile PTEN geni salınım seviyeleri ve ortalama değerleri aşağıdaki şekil 7’de belirtilmiştir.



Şekil 7. Kontrol ve hasta gruplarının ddCT değerleri ile PTEN geni salınım seviyeleri ve ortalama değerleri

Hasta ve Kontrol gruplarının (en yüksek, en düşük ve ortanca) PTEN geni salınım seviyeleri Tablo 12’de verilmiştir.

Tablo 12. Hasta ve Kontrol gruplarının (en yüksek, en düşük ve ortanca) PTEN geni salınım seviyeleri

Grup/ddCt	Median (Min.-Maks.)
Kontrol	5,17 (3,44-7,10)
Grade 1	4,29 (2,45-6,29)
Grade 2	3,11 (1,05-5,10)
Grade 3	2,24 (0,67-3,51)

5. TARTIŞMA

Endometrial karsinom kadın genital sisteminin en sık görülen malignitesidir ve gelişmiş ülkelerde kadınlarda görülme sıklığına bakacak olursak en çok gözlenen dördüncü kanser tipidir (Turgut ve ark, 2012). Endometrium kanserleri over kanseri gibi kanser türlerine nazaran erken dönemde kanama ile belirti vermesi ile erken tanıya olanak sağlamaktadır (Kim ve ark, 2012). Endometrium kanseri teşhisi alan bir hastaya ilk olarak cerrahi olarak evrelendirilme yapılmalıdır. FIGO evreleme sistemi cerrahi olarak endometrium kanserlerinin evrlenmesinde kullanılan bir sistematiktir (Barrena Medel ve ark, 2011; Kwon ve ark, 2009). Endometrium kanseri kendini kanama ile gösteren ve böylelikle erken evrelerde teşhis konulabilen bir kanser türü olması sebebi ile prognozuda daha iyidir. 2012 de yapılmış bir çalışmada; hastaların %72' si (Sorosky ve ark, 2012) ve 2014'de yapılan bir çalışmada ise hastaların %64'ü evre I olarak tespit edilmiş ve tedaviye erken dönemde başlanabilmiştir (Nicholas ve ark, 2014).

Hücre siklusunda, DNA tamir ve apoptozda görev alan tümör supresör gen proteini P53 (tümör protein 53) mutasyonu, kanserlerin %5 sinde saptanmıştır (Levine ve ark, 1991). Endometriyum kanserlerinde P53 ekspresyonu çok yaygın olarak çalışılmıştır (Levine ve ark, 1991; Trovik ve ark, 2011). Yapılan çalışmalar p53 mutasyonunu ileri evre, endometrioid tip endometrial kanserlerin %43' ünde; seröz adenokarsinomların %90' ında olduğunu göstermiştir (Darvishian F, 2004). Yapılan bir çalışmada 221 endometrioid tip endometrial kanser olgusunun yüzde 47' sinde (%21,3) p53 ekspresyonunda artış gözlenmiştir (Kiyoshi ve ark, 1994). Tashiro ve ark (1997) yapmış olduğu bir çalışmada 21 endometrial seröz adenokarsinom teşhisi almış hastasının yüzde 76' sında (16 tanesinde) p53 ekspresyonlarında artış gözlemlenmişler ve sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Darvishian ve ark (2004) yapmış olduğu bir çalışmada ise 8 endometrial seröz adenokarsinom teşhisi almış hastanın altısında p53 ekspresyonunda artış gözlenmiş ve p53 belirtecini tanı amaçlı olarak immunohistokimyasal değerlendirilmelerde kullanılabileceği yorumunu yapmışlardır. Biz de çalışmamızda P53 ekspresyon değerlerini değerlendirdiğimizde kontrol grubuna göre P53 değerlerinin hasta grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığını gözlemledik. Hasta grubunu kendi içerisinde değerlendirdiğimizde gradeler arasında anlamlı bir fark mevcut değildi. Ayrıca çalışmamızda bakmış olduğumuz CEA belirtecini kontrol grubu ile hasta grubunu karşılaştırdığımızda Grade 3 olan hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı

derecede artmış olduğunu gözlemledik ($p=0,03$). Hasta grubunu kendi içerisinde karşılaştırdığımız da ise gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlemlenmemektedir. Kimura ve ark (2004) yapmış olduğu bir çalışmada, miyometriyal invazyon derinliği ve lenfovasküler invazyon ile PTEN ekspresyon değişiklikleri arasında anlamlı bir korelasyon gözlemlenmemişlerdir. Biz de çalışmamızda, miyometriyal invazyon derinliği ve lenfovasküler invazyon ile PTEN ekspresyon değişiklikleri arasında anlamlı bir farklılık gözlemlenmedi.

Endometrial karsinogenezin gelişim aşamaları ve ilerlemesi ve bu aşamalarda genetik değişiklikleri incelemeye kullanılan en yaygın tekniklerin başında immunohistokimyasal analizler gelmektedir. Endometrioid karsinomda PTEN geni en sık değişen genler ve mutasyon oranı yaklaşık %30-50 arasındadır (Risinger ve ark 1997; Tashiro ve ark, 1997). PTEN geni 10. kromozomun uzun kolunda (q), 23.3 'de lokalizedir ve apoptoz regülasyonu, hücre büyümesi gibi görevlerde yer alan ve bir lipid molekülü olan PIP3 ü kodlar (Tang Maehama T, Dixon JE, 1998). PTEN inaktivasyonu hiperplazilerde de yaklaşık olarak %20 oranında gözlenmektedir (Hecht J, Mutter G, 2006; Levine ve ark, 1998; Maxwell G, 1998).

Yapılan çalışmalarda PTEN aktivasyonunda azalmanın endometrioid karsinom patogenezinin erken basamaklarında da gözlemlendiğini vurgulamaktadır. Endometrial kanser teşhisi almış hastalarda yapılan bir çalışmada PTEN ekspresyonu immunohistokimyasal olarak değerlendirilmiş ve bu hastaların büyük bir kısmında PTEN inaktivasyonu olduğu gözlenmiştir. Mutter ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada 33 endometrial endometrioid adenokarsinom teşhisi almış hastanın % 61' inde (20 hastada) PTEN ekspresyon kaybı izlenmiştir (Mutter ve ark, 2000). Yine 2012 yılında yapılan bir çalışmada endometrial endometrioid adenokarsinom teşhisi almış hastalar ile normal endometriyuma sahip kontrol grubu hastaları ve hiperplastik endometrium teşhisi almış hasta grubu karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiş ve 29 adet endometrial endometrioid karsinom teşhisi almış hastanın 12' sinde negatif, 13' ünde % 50' nin altında pozitif, 4' ünde % 50' nin üzerinde ekspresyon gözlenmiştir (Erkanlı ve ark, 2006). Kapucuoğlu ve ark (2007) 35 endometrial endometrioid adenokarsinom hastası ile PTEN ekspresyon düzeyleri üzerine bir çalışma planlamışlar ve hastaların %45,7' sinde (16 hasta) PTEN inaktivasyonu izlenmiş ve sonuçta PTEN gen ifadesinin endometrial kanserlerin erken dönemlerinde önemli bir rolü olduğu ve PTEN ekspresyonlarında gözlenen farklılıkların endometrial karsinogenezde önemli bir immunohistokimyasal belirteç olduğunu bulmuşlardır. Biz de çalışmamızda elde ettiğimiz immunohistokimyasal görüntüler üzerinde yapmış olduğumuz H skorlaması

sonuçlarına göre kontrol grubunda PTEN ekspresyon değerlerini hasta gruplarına göre anlamlı derecede yüksek bulduk. Yine hasta gruplarını histolojik gradeleme değerlerine göre kendi içerisinde karşılaştırdığımızda grade arttıkça ekspresyon değerlerinin azaldığını gözlemledik.

Endometrial karsinomezlerde PTEN ekspresyon kaybının diğer malinite gözlenen durumlara göre daha önem arz etmesini en önemli bir diğer sebebi de FİGO evrelemenin erken evrelerinde de gözleniyor olması ve böylelikle erken teşhis ve morbilite oranlarında azalmaya sebep olabilmesidir (Bussaglia ve ark, 2000; Risinger ve ark, 1998; Salvesen ve ark, 2004).

Günümüzde birçok çalışma endometrial kanserlerin moleküler mekanizmasını anlamaya yönelik olarak, histolojik gradeleme, invazyon sebeplerini araştırarak invazyona sebep olabilecek invaziv davranışları tetikleyen mekanizmalar üzerine ve özellikle kansere yol açabilecek genetik mekanizmaları anlamak ve çözmek için endometrial kanserlerde moleküler mekanizmalar üzerine yoğunlaşmaktadır (Ali ve ark, 1999). Çeşitli tümör supresör genlerin ve onkogenlerin ekspresyon düzeylerinde gözlenen değişiklikler, endometrial kanserlerin biyolojik davranışlarında önemli bir rol oynamaktadır (Stavropoulos ve ark, 2018). 2009 yılında, premenopoz öncesi endometriyum kanserli kadınlarda yapılan bir çalışmada, PTEN ekspresyon düzeyleri incelenmiş ve endometriyum kanseri teşhisi almış kadınlarda PTEN gen değişikliği ve progesteron reseptörü ekspresyon değerleri arasında anlamlı bir ilişki olduğu kanısına varılmıştır (Nehad ve ark, 2009). Menstrual siklus boyunca PTEN ekspresyonunda gözlenene değişikliklerin hormon kontrol altında olduğunu gösteren çalışma da östrojenin PTEN ekspresyonunu fosforilizasyon ile baskıladığını progesteronun ise östrojenin oluşturmuş oldu fosforilizasyonu baskılayarak PTEN gen aktivitesini arttırdığını göstermiştir. (Guzeloglu Kayisli ve ark, 2003). PTEN'in ubiquitinyasyonu sitoplazma-çekirdek taşınması için gereklidir. Hücre döngüsü, farklılaşma ve dinlenme durumuna göre hücre lokalizasyonu ve diğer proteinler ile etkileşimleri PTEN'in ekspresyon değerlerini böylelikle çalışma fonksiyonunu etkilemektedir. Birçok çalışma PTEN' in sitoplazmada bulunduğuna işaret etmektedir. Ancak son çalışmalar PTEN'in tümör süpresör etkisini çekirdekte bulunduğu zaman gösterdiği yönündedir. Fakat farklı kanser türlerinde PTEN proteininin hücre çekirdeğinden kaybolduğu gözlenmiştir (Romona ve Schepis, 2012).

Endometrial karsinomda, özellikle tip I' de, PTEN mutasyonlarının vakaların % 25-83'ünde olduğu gözlenmiştir; Bununla birlikte, PTEN mutasyonlarının endometrial hiperplazilerin yaklaşık olarak %55' inde meydana geldiği gösterilmiştir. Bu çalışmalardan da çıkarım yapabileceğimiz gibi birçok çalışma, PTEN gen ekspresyonunda meydana

gelebilecek azalmanın endometrioid endometrial kanserini ileri evrelere ilerlemesine katkısının olabileceğini ileri sürmüşler ve PTEN ekspresyon düzeylerinin endometrial kanserin oluşum mekanizması ve ilerlemesi ile yakından ilgili olduğunu göstermiştir (Bian ve ark, 2018). Endometrial karsinom başka bir çalışmada 154 endometrioid ve endometrioid olmayan hastalarda PTEN dizilimi ve immünohistokimyasında yapılan araştırmada; PTEN sekans anormallikleri PTEN protein kaybına (% 64) göre vakaların anlamlı şekilde daha düşük oranda (% 43) tespit edildi (p=0.0004). Endometrioid tümörler, endometrioid olmayan tümörlerden daha yüksek oranda PTEN sekans anormallikleri ve PTEN protein kaybına sahipti (Djordjevic ve ark, 2012). An ve ark (2002) yapmış olduğu bir çalışmada çalışmaya alınan olguların %66 'sında PTEN ekspresyonunda meydana gelen değişiklikler histolojik grademelerle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır. Biz de çalışmamızda Grade 2 ve Grade 3 olan hastaların PTEN ekspresyon değişikliklerini anlamlı bulmadık.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada amacımız, endometrial kanserlerde erken basamaklarda geliştiği düşünülen PTEN proteinin ekspresyonundaki değişiklikleri, 18-60 yaş arasındaki tip 2 endometrial kanser teşhisi almış hastalarda qRT-PCR ve immunohistokimyasal yöntemler ile saptamak ve bu değerleri kontrol grubu (kanseri teşhisi almamış 18-60 arası kadın hasta) ile hasta grupları arasındaki değişiklikleri incelemektir. Ayrıca hasta gruplarında Figo evreleme sistemine göre belirlenmiş gradelere ayırarak tip 2 endometrial kanserlerde evre arttıkça meydana gelebilecek gen ekspresyon farklılıklarını da çalışmamızda gözlemledik. Hastalara ait prognostik faktörleride kayıt altına alarak kontrol grubu ile hasta grubu ve hasta grubunda kendi içerisinde karşılaştırmalı olarak inceledik. İmmunohistokimyasal olarak p53 ve CEA antikoru ile yapılan boyama sonuçları kontrol grubu ile hasta grubu arasında karşılaştırıldığında Grade 1, Grade 2 ve Grade 3 olan hastaların tümünde de P53 ekspresyonunun anlamlı derecede arttığını gözlemledik. CEA antikoru ile yapılan boyama sonuçları kontrol grubu ile hasta grubu arasında karşılaştırıldığında Grade 1, Grade 2 ve Grade 3 olan hastaların tümünde de CEA ekspresyonuna yine anlamlı derecede artmıştı.

PTEN primer antikoru kullanılarak yapılan boyamalar sonucunda elde edilen H-skor değerleri kontrol grubu ile hasta grupları arasında karşılaştırdığımızda H skor değerleri FIGO grade ile karşılaştırılarak değerlendirildiğinde; PTEN, primer antikoru kullanılarak yapılan boyamalar sonucu elde edilen; kontrol grubu H-skor değerlerinin tüm hasta gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derece fazla olduğu gözlemledik. Hasta grupları kendi arasında değerlendirildiğinde; Grade 1 ile Grade 2 hasta grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunamazken Grade 1 ile Grade 3 hasta grubu arasında Grade 1 hasta grubunda H-skor değeri istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti buda bize tip 2 endometrial kanserlerde PTEN ekspresyonunun grade derecesi ile korelasyon halinde olduğunu göstermiştir. Yine benzer şekilde PTEN ekspresyon değerlerini qRT-PCR yöntemi ile değerlendirildiğimizde hem immunohistokimyasal olarak elde ettiğimiz sonuçlar hemde qRT-PCR yöntemi ile elde ettiğimiz sonuçlar birbirini destekler nitelikteydi. Sonuç olarak PTEN gen ifadesinin erken yaş tip 2 endometrial karsinogenezinde de tip 1 endometrial kanserler gibi rol oynadıkları düşünülmektedir. Ancak bu belirleyicilerin prognostik önemini belirlemek için uzun süreli takibi bulunan geniş serilerde, çalışmaların yapılmasının bu çalışmalar

neticesinde gen ekspresyonlarının tedavi planlamasında önemli bir unsur olabileceği kanaatindeyiz.



KAYNAKLAR

Ali IU, Schriml LM, Dean M. Mutational Spectra of PTEN/MMAC1 Gene: a Tumor Suppressor With Lipid Phosphatase Activity. *Journal of the National Cancer Institute* 1999, 91 (22), 1922-1932.

An HJ, Lee YH, Cho NH, Shim JY, Kim JY, Lee C, Kim SJ. Alteration of PTEN expression in endometrial carcinoma is associated with down-regulation of cyclin dependent kinase inhibitor. *Histopathology* 2002, 41, 27.

Ascher SM, Reinhold C. Imaging of cancer of the endometrium. *Radiologic Clinics of North America* 2002, 40(3), 563-76.

Bansal N, Yendluri V, Wenham RM. The Molecular Biology of endometrial Cancer and the implications for pathogenesis, classification and targeted therapies. *Cancer Control January* 2009, 16(1), 8-13.

Barrena Medel NI, Herzog TJ, Deutsch I, Burke WM, Sun X, Lewin SN, et al. Comparison of the prognostic significance of uterine factors and nodal status for endometrial cancer. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 2011, 204(3), 248.

Bian X, Gao J, Luo F, Rui C, Zheng T, et al. PTEN deficiency sensitizes endometrioid endometrial cancer to compound PARP-PI3K inhibition but not PARP inhibition as monotherapy. *The Journal of Oncogene* 2018, 37, 341–351.

Bonneau D, Longy M. Mutations of the human PTEN gene. *The Journal of Human mutation* 2000, 16, 109.

Buckley H, Fox H. *Biopsy Pathology of the Endometrium*, 2Ed: Taylor & Francis, 2002.

Cornelison TL, Trimble EL, Kosary CL. SEER data, corpus uteri cancer: treatment trends versus survival for FIGO stage II, 1988-1994. *The Journal of Gynecol Oncology* 1999; 74(3), 350-355.

Darvishian F, Hummer A, Thaler H, Bhargava R, Linkov I, Asher M, et al. Serous endometrial cancers that mimic endometrioid adenocarcinomas: a clinicopathologic and immunohistochemical study of a group of problematic cases. *The American Journal of Surgical Pathology* 2004, 28, 1568–1578.

Detre S, Saclani Jotti G, Dowsett M. A “quickscore” for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas. *Journal of clinical pathology* 1995, 48(9), 876-878.

- Djordjevic B, Hennessy BT, Li J, Barkoh BA, Luthra R, Mills GB, Broaddus RR.** Clinical assessment of PTEN loss in endometrial carcinoma: immunohistochemistry outperforms gene sequencing. *Modern Pathology* 2012, 25, 699 – 708.
- Erkanlı S, Kayaselcuk F, Kuscu E, Bagis T, Bolat F, Haberal A.** Expression of survivin, PTEN and p27 in normal, hyperplastic, and carcinomatous endometrium. *International Journal of Gynecological Cancer* 2006, 16, 3.
- Gougelet A, Bouclier C, Marsaud V, Maillard S, Mueller SO, Korach KS, Renoir JM.** Estrogen receptor and subtype expression and transactivation capacity are differentially affected by receptor- HSP90- and immunophilin-ligands in human breast cancer cells. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 2005, 94, 71–81.
- Guzeloglu-Kayisli O, Kayisli UA, Al-Rejjal R, Zheng W, Luleci G, Arici A,** Regulation of PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) expression by estradiol and progesterone in human endometrium. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2003, 88, 5017-5026.
- Hecht J, Mutter G.** Molecular and pathologic aspects of endometrial carcinogenesis. *Journal of clinical Oncology* 2006, 4783-4791.
- Kapucuoğlu N, Aktepe F, Kaya H, Bircan S, Karahan N, Çiriş M.** Immunohistochemical expression of PTEN in normal, hyperplastic and malignant endometrium and its correlation with hormone receptors, bcl-2, bax, and apoptotic index. *Pathology - Research and Practice* 2007, 3, 153-162.
- Kim BW, Jeon YE, Cho H, Nam EJ, Kim SW, Kim S, et al.** Pre-treatment diagnosis of endometrial cancer through a combination of CA125 and multiplication of neutrophil and monocyte. *Journal of Obstetrics and Gynaecology* 2012, 38 (1), 48-56.
- Kim JW, Kim SH, Kim YT, Kim DK.** Clinicopathologic and biological parameters predicting the prognosis in endometrial cancer. *Yonsei Medical Journal* 2002, 43(6), 769-778.
- Kimura F, Watanabe J, Hata H, Fujisawa T, Kamata Y, Nishimura Y, Jobo T, Kuramoto H:** PTEN immunohistochemical expression is suppressed in G1 endometrioid adenocarcinoma of the uterine corpus. *Journal of cancer research and clinical oncology* 2004, 130, 161-168.
- Kiyoshi I, Watanabe K, Nasim S, Sasano H, Sato S, Yajima A, et al.** Prognostic Significance of p53 Overexpression in Endometrial Cancer. *American Journal of Cancer Research* 1994, 54:4667.
- Klinc P, Rath D.** Reduction of oxidative stress in bovine spermatozoa during flow cytometric sorting. *The Journal of Reproduction in Domestic Animals* 2007, 42(3), 63–67.

Konopka B, Janiec-Jankowska A, Czapczak D, Paszko Z, Bidziński M, Olszewski W, Goluda C: Molecular genetic defects in endometrial carcinomas: microsatellite instability, PTEN and beta-catenin (CTNNB1) genes mutations. *Journal of cancer research and clinical oncology* 2007, 133, 361-371.

Konopka B, Paszko Z, Janiec-Jankowska A and Goluda M. Assessment of the quality and frequency of mutations occurrence in PTEN gene in endometrial carcinomas and hyperplasias. *Journal of Cancer Letters* 2002, 178: 43-51.

Kurman RJ. International Agency for Research on C, World Health O: WHO classification of tumours of female reproductive organs. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2014.

Kwon JS, Qiu F, Saskin R, Carey MS. Are uterine risk factors more important than nodal status in predicting survival in endometrial cancer? *American Journal of Obstet Gynecology* 2009; 114(4), 736-743.

Laas E, Ballester M, Cortez A, Gonin J, Daraï E, Graesslin O. Supervised clustering of immunohistochemical markers to distinguish atypical endometrial hyperplasia from grade 1 endometrial cancer. *The Journal of Gynecologic Oncology* 2014, 133, 205–210.

Lacey JV, Mutter GL, Ronnett BM, Ioffe OB, Duggan MA, Rush BB, Glass AG, Richesson DA Chatterjee N, Langholz B. PTEN expression in endometrial biopsies as a marker of progression to endometrial carcinoma. *American Journal of Cancer research* 2008, 68, 6014-6020.

Levine A, Momand J, Finlay C. The p53 tumour suppressor gene. *Nature Research of the Journal* 1991, 351, 453-456.

Levine RL, Cargile CB, Blazes MS, van Rees B, Kurman RJ, Ellenson LH: PTEN mutations and microsatellite instability in complex atypical hyperplasia, a precursor lesion to uterine endometrioid carcinoma. *American Journal of Cancer research* 1998, 58, 3254-3258.

Lewin SN, Herzog TJ, Barrena Medel NI, Deutsch I, Burke WM, Sun X, et al. Comparative performance of the 2009 international Federation of gynecology and obstetrics' staging system for uterine corpus cancer. *The Journal of Obstetrics Gynecology*, 2010, 116(5), 1141-1149.

Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliarensis C, Rodgers L, McCombie R, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Journal of Science* 1997, 275, 1943–1947.

- Maehama T, Dixon JE.** The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *Journal of Biological Chemistry* 1998, 13, 375-378.
- Mariani A, Sebo T, Katzmann J, Keeney G, Roche P, Lesnick T, et al.** Pretreatment assessment of prognostic indicators in endometrial cancer. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2000, 182, 1535-1544.
- Maxwell GL, Risinger JI, Gumbs C, Shaw H, Bentley RC, Barrett JC, Berchuck A, Futreal PA.** Mutation of the PTEN tumor suppressor gene in endometrial hyperplasias. *The Journal of Cancer research* 1998, 58, 2500-2503.
- Mazières J, Brugger W, Cappuzzo F, Middel P, Frosch A, Bara I, Klingelschmitt G, Klughammer BA.** Evaluation of the EGFR protein expression by immunohistochemistry using H-score and the magnification rule: re-analysis of the SATURN study. *American Journal of Lung Cancer* 2013, 82(2), 231-237.
- Moore KL, Dalley AF.** *Clinically oriented anatomy*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 1999.
- Moore KM, Persaud TVN.** *Klinik Yönleri İle İnsan Embriyolojisi*. (Eds, Yıldırım M.) İkinci baskı, Nobel Tıp Kitabevi 2002, s:323- 325.
- Morrow CP, Bundy BN, Kurman RJ, Creasman WT, Heller P, Homesley HD, Graham JE.** Relationship between surgical-pathological risk factors and outcome in clinical stage I and II carcinoma of the endometrium: A Gynecologic Oncology Group study. *American Journal of Gynecologic Oncology* 1991, 40(1), 55-65.
- Morton DA, Peterson KD, Albertine KH, Morton DA.** *Gray's dissection guide for human anatomy*. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone Elsevier 2007.
- Mutter G, Lin M, Fitzgerald J, Kum J, Baak J, Lees A.** Altered PTEN Expression as a Diagnostic Marker for the Earliest Endometrial Precancers. *Journal of the National Cancer Institute* 2000, 92, 924-930.
- Mutter GL, Ince TA, Baak JP, Kust GA, Zhou X-P, Eng C.** Molecular identification of latent precancers in histologically normal endometrium. *American Journal of Cancer research* 2001, 61, 4311-4314.
- Mutter GL, Lin MC, Fitzgerald JT, Kum JB, Baak JP, Lees JA, Weng LP and Eng C.** Altered PTEN expression as a diagnostic marker for the earliest endometrial precancers. *J Natl The National Cancer Institute* 2000, 92, 924 – 930.

- Mutter GL, Lin M-C, Fitzgerald JT, Kum JB, Eng C.** Changes in Endometrial PTEN Expression throughout the Human Menstrual Cycle 1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2000, 85, 2334-2338.
- Myers MP, Stolarov JP, Eng C, Li J, Wang SI, Wigler MH, Parsons R, Tonks NK.** PTEN, the tumor suppressor from human chromosome 10q23, 73 is a dual-specificity phosphatase. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997, 94 (17), 9052-9057.
- Nehad MR, El-Maqsoud A, El-Gelany S.** Differential expression patterns of PTEN in cyclic, hyperplastic and malignant endometrium: its relation with ER, PR and clinicopathological parameters. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute* 2009, 21, 323-331.
- Ngai NC.** Loss of LKB1 in High-Grade Endometrial Carcinoma: LKB1 is a Novel Transcriptional Target of p53. *American Journal of Clinical Cancer* 2014, 2.
- Nicholas Z, Hu N, Ying J, Soisson P, Dodson M, Gaffney DK.** Impact of comorbid conditions on survival in endometrial cancer. *American Journal of Clinical Oncology* 2014, 37(2), 131-134.
- Peng WX, Kudo M, Fujii T, Teduka K, Naito Z.** Altered expression of fibroblast growth factor receptor 2 isoform III c: relevance to endometrioid adenocarcinoma carcinogenesis and histological differentiation. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2014, 7(3), 1069-1076.
- Potischman N, Hoover RN, Brinton LA, Siiteri P, Dorgan JF, Swanson CA, Berman ML, Mortel R, Twiggs LB, Barrett RJ, Wilbanks GD, Persky V and Lurain JR.** Case-control study of endogenous steroid hormones and endometrial cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 1996, 88, 1127-1135.
- Pugazhanthi S, Khandelwai RL.** Insulin-like effects of vanadate on hepatic glycogen metabolism in nondiabetic and streptozotocin induced diabetic rats. *The Journal of Diabetes* 1990, 39, 821-827.
- Reddy P, Liu L, Adhikari D, Jagarlamudi K, Rajareddy S, et al.** Oocyte specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. *American Journal of Science* 2008, 319, 611–613.
- Risinger JI, Hayes AK, Berchuck A, Barrett JC.** PTEN/MMAC1 mutations in endometrial cancers. *American Journal of Cancer research* 1997, 57, 4736-4738.

Risinger JI, Hayes K, Maxwell GL, Carney ME, Dodge RK, Barrett JC, Berchuck A: PTEN mutation in endometrial cancers is associated with favorable clinical and pathologic characteristics. *Clinical Cancer Research* 1998, 4, 3005-3010.

Romano C, Schepis C. PTEN gene: a model for genetic diseases in dermatology. *The Scientific World Journal Volume* 2012.

Rosai J. Femalere productivesystem In: Ackerman's surgical pathology. 9th. ed. St. Louis: Mosbyearbook 2004, s 1569–1639.

Rosai J. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology: Elsevier Health Sciences, 2011.

Ross HM, Pawlina W. Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas İlişkili Hücre Biyolojisi ve Moleküler Biyoloji ile 2014, s784-809.

Salvesen HB, Stefansson I, Kretzschmar EI, Gruber P, MacDonald ND, Ryan A, Jacobs IJ, Akslen LA, Das S. Significance of PTEN alterations in endometrial carcinoma: a population-based study of mutations, promoter methylation and PTEN protein expression. *International journal of oncology* 2004, 25, 1615-1623.

Samarntjai N, Hall K, Yeh IT. Molecular Profiling of endometrial Malignancies. *Obstetrics and Gynecology International* 2010.

Scully MM, Palacios-Helgeson LK, Wah LS and Jackson TA. Rapid estrogen signaling negatively regulates PTEN activity through phosphorylation in endometrial cancer cells. *American Journal of Horm Cancer* 2014, 5, 218 - 231.

Setchell BP. The effects of heat on the testes of mammals. *The journal of Animal Reproduction* 2006, 3(2), 81-91.

Sorosky JI. Endometrial cancer. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 2012, 120(2), 383-397.

Stavropoulos A, Varras M, Vasilakaki T, Varra VK, Tsavari A, Varra Fn, Nonni A, Kavantzias N, Lazaris A.C. Expression of p53 and PTEN in human primary endometrial carcinomas: Clinicopathological and immunohistochemical analysis and study of their concomitant expression. *International Journal of Oncology and Letter* 2019, 17(5), 4575–4589.

Tang D, Chang L, Tavis W and Frierson H. Mutations of PTEN/MMAC1 in Primary Prostate Cancers from Chinese Patients. *American Journal of Clinical Cancer Research* 2001, 7, 304-308.

Tashiro H, Blazes M, Wu R, Cho K, Bose S, Wang S, et al. Mutations in PTEN are frequent in endometrial carcinoma but rare in other common gynecological malignancies. *American Journal of Cancer Research*, 1997, 39, 35-40.

Tashiro H, Isacson C, Levine R, Kurman R, Cho K and Lora Hedrick. p53 Gene Mutations Are Common in Uterine Serous Carcinoma and Occur Early in their Pathogenesis. *The American Journal of Pathology* 1997, 1, 68-70.

Trovik J, Wik E, Stefansson I, Marcickiewicz J, Tingulstad J, Staff A, et al. Stathmin Overexpression Identifies High-Risk Patients and Lymph Node Metastasis in Endometrial Cancer. *American Association for Cancer Research* 2011, 17, 3368-3377.

Turgut A, Özler A, Sak ME, Evsen ME, Soydiñç HE, Başaranoğlu S. Retrospective Analysis of the patients with gynecological cancer: 11-Year Experience. *Journal of Clinical and Experimental Investigations* 2012, 3, 209-213.



EKLER



ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : CAN, MESUT
Uyruk : T.C.
Doğum yeri ve tarihi : GÜLŞEİR – 03/05/1979
Telefon : 02522114862 - 05055142435
E-mail : mesutcan@mu.edu.tr
Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Y. Lisans	Muğla Üniversitesi Sağlık Bilimleri Ens. Sağlık Yönetimi	2017
Lisans	Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya	2006

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
2008-2013	MSB Askeri Hastane	Kimyager
2013-2019	Muğla Üniversitesi Tıp Fakültesi	Kimyager

AKADEMİK YAYINLAR

1. MAKALELER

Can M, Durukan Köse S, Can Karagöz N. Bir Eğitim ve Araştırma Hastanesinde Üremeye Yardımcı Tedavi (Üyte) Uygulamalarının Faaliyet Tabanlı Maliyetleme Yöntemi İle Analizi. *Akademik Sosyal Araştırmalar Dergisi* 2017, 5(56), s241-266.