

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI**

**BASİT ENDOMETRİAL HİPERPLAZİDEN
ENDOMETRİUM KANSERİNE DOĞRU GELİŞEN SÜREÇTE TRPM
İYON KANALLARININ ROLÜ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Emre YALÇIN**

**TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Şehmus PALA**

**ELAZIĞ
2017**

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. Ahmet KAZEZ

DEKAN

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Doç. Dr. Salih Burçin KAVAK
Kadın Hastalıkları Ve Doğum Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafınızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Şehmus PALA _____ **Danışman**

Uzmanlık Sınavı Jüri Üyeleri

..... _____
..... _____
..... _____
..... _____
..... _____

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince eğitimime olan katkıları ve tez hazırlığı sırasında esirgemediği yardımları nedeniyle danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Şehmus PALA'ya, incelemelerde yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Tuncay KULOĐLU, Yrd. Doç. Dr. Ebru ÖNALAN, Yrd. Doç. Dr. Gökhan ARTAŐ'a yönlendirmeleri için Doç. Dr. Remzi ATILGAN'a, uzmanlık eğitimim ve tez çalışmam boyunca sürekli desteğini gördüğüm eşim Dr.Ece Meltem YALÇIN'A, ihtiyaç duyduğumda yanımda olan bölüm arkadaşlarıma ve canım aileme teşekkür etmeyi bir borç biliyorum.

ÖZET

Tüm dünyada endometrium kanserleri en sık görülen jinekolojik kanser türüdür. Her yıl dünya çapında 287.100 kadın bu hastalığın tanısını almaktadır. Endometrium kanseri kadınlar arasındaki kanserlerde dördüncü sırada, kanser nedenli ölümlerde sekizinci sıradadır. Endometrium kanserinin gelişiminde endometrial hiperplaziler bilinen tek doğrudan sebeptir.

Artmış proliferasyon sonucu malign hücrelerin transformasyonu, bozuk farklılaşma, ölüm yeteneğinin bozulması anormal doku gelişiminin temel sebebidir. Bunun sonucunda kontrolsüz yayılım ve invazyon ortaya çıkabilmektedir. Transformasyon sıklıkla iyon kanal ekspresyonundaki değişimlerle gerçekleşebilmektedir. Plazma membranında yer alan iyon kanalları hücrel elektrogenез ve elektrik iletiminden sorumludur. Bu kanallar apoptoz, proliferasyon ve farklılaşma gibi doku homeostazının korunması için gerekli olan tüm temel hücre davranışlarının yerine getirilmesinde görev almaktadırlar. İyon kanallarının bu kritik süreçlere katkısında birkaç ana mekanizma vardır. Bunlar membran potansiyelinin korunması, hücre volümünün düzenlenmesi ve temel sinyal iletimini sağlayan iyonların girişidir. Sonuç, hücrel cevapların anormal progresyonudur. Kanserın ortaya çıkmasını ve ilerlemesini düzenleyen farklı ekspresyon ve iyon kanalı aktiviteleri önerilmesine rağmen, endometrium kanseri hücrelerinde, iyon kanalı bağımlı mekanizmaları incelemek oldukça kıymetli olacaktır. Çalışmamıza kliniğimizde son 10 yılda tanı alan atipili endometrial hiperplaziden , atipisiz endometrial hiperplaziden, grade 1 endometrium adeno kanser(ca) den, grade 2 endometrium adeno ca dan, grade 3 endometrium adeno ca dan ve kontrol grubundan 20 şer hastanın FRC (fraksiyone küretaj) materyalleri Patoloji Arşivinden seçilerek çalışılmıştır. Bu dokulardan TRPM2 ve TRPM7 immunohistokimyasal olarak ekspresyonları ve gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile TRPM2, TRPM7'nin mRNA ekspresyonları çalışılmıştır. Endometrium kanseri oluşumunda TRPM iyon kanallarının etkileri incelenmiş, özellikle TRPM2 ve TRPM7'nin terapotik bir hedef olup olamayacağını belirlenmesi yönünde yol gösterici bir özelliği olduğu gibi, sonuçlarımız da bu iyon kanallarının endometrium kanseri tedavisinde yeni hedef genler olabileceğini ve böylece daha sonraki bir aşamada in vivo koşullarda bu

proteinler hedeflenerek deneysel anlamda endometrium kanseri tedavi yöntemlerinin denenebilmesine olanak sağlayacağını düşünüyörüz.

Sonuç olarak endometrial hiperplaziden endometrium adenokarsinoma geçişte TRPM7 mRNA ve TRPM2 mRNA anlamlı olarak düştü. TRPM7 endometrium adenokarsinomunda immünohistokimyasal olarak ta düşerken TRPM2 de immünohistokimyasal bir değişiklik izlenmedi. TRPM7 ve TRPM2 iyon kanalları farklı kanser türlerinde farklı davranmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Endometrial hiperplazi, endometrium adenokanser, TRPM2, TRPM7



ABSTRACT

ROLE OF TRPM CATION CHANNELS IN THE PROCESS THAT GOES FROM SIMPLE ENDOMETRIAL HYPERPLASIA TO ENDOMETRIUM CANCER

Endometrium cancer is the most common type of gynecological cancer in the world. Every year, 287. 100 women are diagnosed with this condition. Endometrium cancer is the 4th most common cancer among women and 8th in deaths caused by cancer. Endometrial hyperplasia is the only known direct cause of endometrium cancer. Transformation of malignant cells due to increased proliferation, impaired differentiation, losing the ability to suicide are the main ways of abnormal tissue growth. As a result, uncontrolled expansion and invasion may occur. The transformation may routinely happen via changes in ion channel expression. Ion channels located in the plasma membrane are in charge of cellular electrogenesis and current flow. These channels are responsible for doing all basic behaviors of cells, like; apoptosis, proliferation, and differentiation. Ion channels' contribution to these essential tasks involves several main mechanisms. These are; protecting membrane potential, modulating cell volume and influx of basic signal transporting ions. The result is an abnormal progression of cellular response. Despite, the proposition of differential expression and ion channel activities that modulate cancer's appearance and progression; examining ion channel-dependent mechanisms in bladder cancer would be valuable. In our study, we included 20 patients each, diagnosed with: atypical endometrial hyperplasia, nonatypical endometrial hyperplasia, grade 1 endometrium adenocarcinoma, grade 2 endometrium adenocarcinoma, grade 3 endometrium adenocarcinoma in the last 10 years in our clinics by selecting fractional curettage (FRC) materials from the pathology archive. Expressions of those tissues are studied immunohistochemically and mRNA expressions of TRPM2 and TRPM7 were studied by a real-time polymerase chain reaction.

We studied the effects of TRPM ion channels on endometrial carcinoma formation and our results not only shines light on whether TRPM2 and TRPM7 could be therapeutic targets but we also think that these ion channels could be the new target genes in endometrial carcinoma and as a result, may enable further studies

to target those proteins in vivo conditions in an effort to try experimental treatment modalities for endometrial carcinoma.

In conclusion, TRPM7 miRNA and TRPM2 miRNA had lowered significantly in the transformation of endometrial hyperplasia to endometrial adenocarcinoma. While TRPM7 also lowered immunohistochemically in endometrial adenocarcinoma; TRPM2 didn't show any significant immunohistochemical change. TRPM7 and TRPM2 ion channels behave differently in different cancer types.

Key words: Endometrium hyperplasia, endometrium adenocancer, TRPM2,TRPM7



İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
TABLO LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ	xi
KISALTMALAR LİSTESİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Endometrial Hiperplazi	1
1.1.1. Sınıflama	1
1.1.2. Endometrial İntraepitelyal Neoplazi	1
1.1.3. Klinik Özellikler	2
1.1.4. Tedavi	2
1.1.4.1. Atipik Olmayan Endometrial Hiperplazi	3
1.1.4.2. Atipik Endometrial Hiperplazi	3
1.2. Endometrium Kanseri	4
1.2.1. Patogenez	4
1.2.2. Tanı	4
1.2.2.1. Bulgular ve Semptomlar	4
1.2.2.2. Papanicolaou Testi	4
1.2.2.3. Endometrial Örnekleme	5
1.2.2.4. Laboratuar Testleri	5
1.2.2.5. Görüntüleme Çalışmaları	5
1.2.3. Patoloji	5
1.2.3.1. Histolojik Tip	6
1.2.4. Histolojik Grade	7
1.2.5. Tedavi	7
1.2.5.1. Cerrahi Tedavi	7
1.2.5.2. Postoperatif (Adjuvan) Radyoterapi	8

1.2.5.3. Postoperatif (Adjuvan) Kemoterapi	8
1.3. Endometrium Kanseri ve İyon Kanalları	9
1.3.1. TRPM 2 İyon Kanalı	10
1.3.2. TRPM 7 İyon Kanalı	12
2. GEREÇ VE YÖNTEMLER	14
2.1. Genetik Gereç ve Yöntemler	14
2.1.1. Vakaların Seçimi	14
2.1.2. İyon Kanallarını Tespit Etmede Kullanılan Aletler	14
2.1.3. İyon Kanallarını Tespit Etmede Kullanılan Kimyasal Maddeler	15
2.1.4. İyon Kanallarını Tespit Etmede Kullanılan Yöntemler	15
2.1.4.1. Parafin Blok Kesitlerden RNA İzolasyonu	15
2.1.4.2. Spektrofotometrik RNA Ölçümü	16
2.1.5. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	16
2.1.5.1. Kullanılan Çözeltiler ve Gereçler	16
2.1.5.2. Komplementer DNA Sentezi	16
2.1.5.3. Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile cDNA Amplifikasyonu	17
2.1.6. İstatistiksel Değerlendirme	18
2.2. İmmünohistokimyasal Gereç Ve Yöntemler	18
2.3. İstatistiksel Analiz	19
3. BULGULAR	20
3.1. İmmünohistokimyasal Bulgular	20
3.1.1. TRPM2 İmmünreaktivitesi	20
3.1.2. TRPM7 İmmünreaktivitesi	20
3.2. Genetik Bulgular	30
4. TARTIŞMA	31
5. KAYNAKLAR	36
6. ÖZGEÇMİŞ	47

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Endometrial Hiperplazide Dünya Sağlık Örgütü Sınıflaması	1
Tablo 2. Tip 1 ve 2 Endometrium Kanseri Ayırıcı Özellikler	4
Tablo 3. Endometrium Kanseri İçin FIGO Evrelemesi	7
Tablo 4. cDNA karışım miktarı	17
Tablo 5. CDNA sentezi için uygulanan pcr programı	17
Tablo 6. RT-PCR için her bir kuyucuğa konan bileşikler	18
Tablo 7. Uygulanan RT-PCR programı	18
Tablo 8. TRPM2 ve TRPM7 İmmünreaktivitesi	20

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.	TRP kanallarının hücre zarında yerleşimi ve geçirgenliği	10
Şekil 2.	TRPM2 Kanallarının Şematik Gösterimi	11
Şekil 3.	TRPM7'nin kanserogenezdeki rolü	13
Şekil 4.	Kontrol grubuna ait histolojik görünüm. Hematoksilen&eoizin	21
Şekil 5.	Atipisiz endometrial hiperplazi grubuna ait histolojik görünüm	21
Şekil 6.	Atipili endometrial hiperplazi grubuna ait histolojik görünüm.	22
Şekil 7.	Grade I endometrial adenocarcinoma. Hematoksilen&eoizin.	22
Şekil 8.	Grade II endometrial adenocarcinoma. Hematoksilen&eoizin.	23
Şekil 9.	Grade III endometrial adenocarcinoma. Hematoksilen&eoizin.	23
Şekil 10.	Kontrol grubunda TRPM2 İmmünreaktivitesi (kırmızı ok).	24
Şekil 11.	Atipisiz endometrial hiperplazi grubunda TRPM2 İmmünreaktivitesi	24
Şekil 12.	Atipili endometrial hiperplazi grubunda TRPM2 İmmünreaktivitesi	25
Şekil 13.	Grade I endometrial adenocarcinomada TRPM2 İmmünreaktivitesi	25
Şekil 14.	Grade II endometrial adenocarcinomada TRPM2 İmmünreaktivitesi	26
Şekil 15.	Grade III endometrial adenocarcinomada TRPM2 İmmünreaktivitesi	26
Şekil 16.	Kontrol grubunda TRPM7 İmmünreaktivitesi (kırmızı ok).	27
Şekil 17.	Atipisiz endometrial hiperplazi grubunda TRPM7 İmmünreaktivitesi	27
Şekil 18.	Atipili endometrial hiperplazi grubunda TRPM7 İmmünreaktivitesi	28
Şekil 19.	Grade I endometrial adenocarcinomada TRPM7 İmmünreaktivitesi	28
Şekil 20.	Grade II endometrial adenocarcinomada TRPM7 İmmünreaktivitesi	29
Şekil 21.	Grade III endometrial adenocarcinomada TRPM7 İmmünreaktivitesi	29
Şekil 22.	Grupların qRT-PCR kat artışı grafiği.	30

KISALTMALAR LİSTESİ

BT	: Bilgisayarlı Tomografi
CA	: Karsinom
D/C	: Dilatasyon Ve Küretaj
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EH	: Endometrial Hiperplazi
EİN	: İntraepitelyal neoplazi
FIGO	: Uluslararası Jinekoloji Ve Obstetri Federasyonu
GAPDH	: Gliseraldehit 3 Fosfat Dehidrogenaz
MPA	: Medroksiprogesteron Asetat
MR	: Manyetik Rezonans
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PIP2	: Fosfotidil Inositol
RIA	: Rahim İçi Araç
RT-PCR	: Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TRP	: Transient Reseptör Potansiyel
TRPM	: Transient Reseptör Potansiyel Melastanin

1. GİRİŞ

1.1. Endometrial Hiperplazi

Endometrium kanserlerinin çoğu histolojik olarak ayırt edilebilen, hiperplastik lezyonların ilerlemesinden sonra ortaya çıkar. Gerçekte, endometrial hiperplazi, invaziv hastalığın bilinen tek doğrudan öncüsüdür. Endometrial hiperplazi, düzensiz çoğalan glandların sayısı ve büyüklüğündeki artış ile endometriumdaki kalınlaşma ve gland/stroma oranındaki artış olarak tanımlanır (1) Kalınlaşmanın yokluğunda, lezyonlar en iyi düzensiz proliferatif endometrium ya da fokal glandüler toplanma olarak tanımlanmaktadır. Bu lezyonlar anovulatuvar endometriumdaki, monoklonal prekanseröz yapılara kadar farklılık gösterir.

1.1.1. Sınıflama

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) ve Uluslararası Jinekolojik Patoloji Derneği'nin kullandığı sınıflama sistemi değişik malignite potansiyellerine sahip, dört farklı tipi belirtir (2, 3). Hiperplaziler, glandüler karmaşıklık ve birikim varlığı ya da yokluğu gibi mimari yapıya dayanarak basit veya kompleks olarak sınıflandırılırlar. En önemlisi, hiperplaziler eğer sitolojik atipi gösteriyorsa atipik olarak tanımlanırlar. Yalnızca atipik endometrial hiperplaziler, açık bir biçimde izleyen adenokanser gelişimi ile ilişkilidirler. Aşağıdaki tabloda hiperplazilerin kansere ilerleme oranları gösterilmiştir.

Tablo 1. Endometrial Hiperplazide Dünya Sağlık Örgütü Sınıflaması

Tipler	Kansere ilerleme (%)
Basit hiperplazi	1
Kompleks hiperplazi	3
Basit atipik hiperplazi	8
Kompleks atipik hiperplazi	29

1.1.2. Endometrial İntraepitelyal Neoplazi

Son zamanlarda, endometrial intraepitelyal neoplazi (EİN) tanımı, hiperplazinin klinik olarak iki çok farklı grubunu kusursuz bir şekilde ayırt edebilmek için kullanılmaktadır. 1. anormal hormonal çevreye yanıt olarak yaygın

normal poliklonal endometrium ve 2. Aslında fokal ortaya çıkan ve artmış endometrial adenokanser riskini veren proliferatif monoklonal lezyonlar (4).

Bu sistemi kullanarak, genellikle atipik olmayan anovulatuvar yada uzun süre östrojene maruz kalmış endometrium, endometrial hiperplazi olarak tanımlanmıştır. EİN sınıflama sistemi, çok daha doğrudur ve kansere ilerlemeyi öngören bir yoldur, fakat dünya çapında uygulanmamaktadır (5, 6)

1.1.3. Klinik Özellikler

Endometrial hiperplazi gelişimi için risk faktörleri genellikle invaziv kanserdekileri yansıtmaktadır (7, 8). Olguların üçte ikisi postmenapozal kanama ile başvurur (9) Anormal vajinal kanaması olanlarda endometrial kalınlığın transvajinal sonografisi, endometrial hiperplaziyi öngörmeye güvenli bir yöntemdir (10-12). Endometrial kalınlığın 5 mm yada daha az olan postmenapozal kadınlarda kanamanın daha çok atrofiye bağlı olduğu gösterilmiştir. Daha kalın endometriumu olanlarda, biyopsi gerekir.

Premenopozal kadınlar için transvajinal sonografi sıklıkla anormal vajinal kanamanın yapısal nedenlerini dışlama için yapılır. Endometrial kalınlık premenopozal kadınlarda önemli ölçüde değişir ve normal sınırları 4-16 mm olarak belirlenmiştir (13-15). Bu nedenle bu grup için endometrial kalınlık klavuzu belirtilmemiştir.

Sonografiye alternatif olarak, Pipelle ile ofis biyopsisi ya da ayaktan dilatasyon ve küretaj ilk seçenek olabilir (16). Hiperplastik endometrium, makroskopik olarak ayırt edilemez ve bu nedenle, histeroskopi kullanarak doğrudan görsel tanımlama yanlıştır (17).

1.1.4. Tedavi

Endometrial hiperplazili kadınların tedavisi, çoğunlukla hastanın yaşına ve sitolojik atipinin ve cerrahi risk faktörünün olup olmadığına bağlıdır. Özellikle çok sayıda çalışma, DSÖ'nün endometrial hiperplazi sınıflandırması için düşük tekrarlanabilirlik ortaya koymuştur (18-20).

1.1.4.1. Atipik Olmayan Endometrial Hiperplazi

Premenapozal Kadınlar: Atipik olmayan hiperplazili premenapozal kadınlara tipik olarak 3 ile 6 aylık düşük doz progestin tedavisi gerekir. Her ay, 12 ile 14 gün süreyle günlük 10 ile 20 mg dozda oral olarak verilen siklik medroksiprogesteron asetat (MPA) yaygın olarak kullanılmaktadır. Diğer sık kullanılan seçenek ise, kullanım kontrendikasyonu olmayanlarda kombine oral kontraseptif başlanmasıdır. Küçük olgu serilerinde progesteron içeren rahim içi araç(RIA)'ların da etkili olduğu gösterilmiştir (21-23).

Genel olarak hasta progestin kullanırken biyopsiden kaçınılmalıdır, çünkü bu hormon, endometrial morfolojideki değişikliğe neden olarak patolojik tanıyı karıştırır. Biyopsiden önce 2 ile 6 hafta beklemek, bu sorunu çözer. Levonergestrel salımlı rahim içi araç kullananlarda biyopsi RIA çekilmeden yapılabilir.

Postmenapozal Kadınlar: Atipik olmayan basit endometrial hiperplazili postmenapozal kadınlarda, düşük doz siklik ya da devamlı 2, 5 mg/gün MPA ile tedavi edilebilir. Ancak, özellikle yaşlı kadınlarda sitolojik atipiyi dışlamak için yeterli bir örneğin elde edildiğinden emin olunmalıdır.

Pratikte, basit hiperplazili postmenapozal kadınlar sıklıkla tedavisiz izlenmektedir. Atipisiz kompleks hiperplazi, genellikle progestinlerle tedavi edilmektedir. Bu kadınların izleminde, yıllık endometrial biyopsi uygulanmalıdır.

1.1.4.2 Atipik Endometrial Hiperplazi

Histerektomi, herhangi bir yaşta atipik endometrial hiperplazisi olan kadınlarda en iyi tedavidir, çünkü eşlik eden subklinik invaziv hastalık riski yüksektir (24, 25). Fertilitenin şiddetle korunmasını isteyen hastalar istisnadır. Bu hastalara yüksek doz progestin tedavisi uygun tedavidir (26). Bu hasta grubunda tedaviye yanıt gösterilene kadar, her 3 ayda bir seri endometrial biyopsilerle hiperplazinin iyileşmesi doğrulanmalıdır. Aksi halde histerektomi önerilmelidir (27). Hiperplazinin iyileşmesinden sonra, er geç kansere ilerleme potansiyeli nedeniyle izlem uzun süre devam etmelidir (28).

1.2. Endometrium Kanseri

1.2.1. Patogenez

Endometrium kanseri, biyolojik ve histolojik olarak ikili patogenez modeli ile karakterize, farklı bir neoplazi grubudur. Tip 1 endometrium kanseri, tüm olguların %75'ini oluşturur. Östrojene bağımlı olup, düşük gradeliler ve atipik endometrial hiperplaziden köken alırlar. Tersine, tip 2 kanserler genellikle seröz yada berrak sitolojiye sahiptir, öncü lezyonları yoktur ve daha agresif bir klinik süreç izlerler.

Morfolojik ve klinik farklılıklar, tip 1 ve tip 2 tümörlerin taşıdıkları gen gruplarındaki bağımsız mutasyonlardaki genetik ayırım ile paraleldir (29, 30).

Tablo 2. Tip 1 ve 2 Endometrium Kanseri Ayırıcı Özellikler

Özellikler	Tip 1	Tip 2
Karşılanmamış Östrojen	Var	Yok
Menapozal Durum	Pre-peri menopozal	Postmenapozal
Hiperplazi	Var	Yok
İrk	Beyaz	Siyah
Grade	Düşük	Yüksek
Myometrial İnvazyon	Çok az	Derin
Spesifik alt tipler	Endometrioid	Seröz, berrak hücreli
Davranış	Stabil	Agresif

1.2.2. Tanı

1.2.2.1. Bulgular ve Semptomlar

Endometrium kanserinin erken tanısı, hemen hemen tamamıyla düzensiz vajinal kanamanın hızla tanınması ve değerlendirilmesine dayanır. Premenapozal kadınlarda, klinisyen, uzamış ağır menstrüasyon ya da ara kanamaları öyküsü nedeniyle yüksek kuşku indeksini devam ettirmelidir. Postmenapozal vajinal kanama, %5 ile %10 endometrium kanseri olasılığı nedeniyle kaygı vericidir (31, 32).

1.2.2.2. Papanicolaou Testi

Tarihsel olarak, Pap smear, endometrium kanseri tanısı için duyarlılığa sahip bir araç değildir ve endometrium kanseri olan kadınların %50'sinde normal bulgular

olacaktır (33). Sıvı bazlı sitoloji, glandüler anormalliklerin saptanmasını artırdığı görülmektedir, fakat klinik uygulamayı değiştirmek için yeterli değildir (34, 35).

1.2.2.3. Endometrial Örnekleme

Malignite için kuşkulu kanaması olan kadınların başlangıç değerlendirmesi için, daima Pipelle biyopsi tercih edilmektedir (36). Ancak, örnekleme teknikleri, uygun tanısal değerlendirme sağlamada başarısız olursa ya da anormal kanama devam ederse, tanıyı kesinleştirmek için dilatasyon ve küretaj(D/C) gerekebilir (37)

Ayaktan histeroskopi, bölgesel endometrial lezyon tanısı için daha duyarlıdır ve bu nedenle hiperplazi tanısında daha az yarar sağlamaktadır (38). Ayrıca, anormal kanamayı değerlendirmek için histeroskopi kullanılan hastalarda pozitif peritoneal sıvı sıklığı artmıştır (39-41). Ancak hastaların genel prognozunun kötüleşmediği görülmektedir (42, 43).

1.2.2.4. Laboratuvar Testleri

Endometrium kanserinin yönetiminde klinik olarak yararlı tek belirteç serum CA125 düzeyinin ölçümüdür. Operasyon öncesi yükseklik oldukça ilerlemiş bir hastalık olduğunu gösterir (44). Ancak, bu durumda bile, diğer klinik bulguların yokluğunda kullanımı sınırlıdır (45).

1.2.2.5. Görüntüleme Çalışmaları

Bilgisayarlı Tomografi (BT) ya da Manyetik Rezonans (MR) görüntüleme, genellikle gerekli değildir. Ancak MR görüntüleme bazen servikse uzanan bir endometrium kanserinin, primer serviks kanserinden ayırt edilmesinde yardımcı olabilir (46)

1.2.3. Patoloji

Dünya Sağlık Örgütü endometrium kanserini aşağıdaki gibi sınıflamıştır.

1. Endometrioid Adenokanser
 - a. Squamöz farklılaşmalı tip
 - b. Villoglandüler tip
 - c. Sekretuar tip
 - d. Silya hücreli tip

2. Müsinöz kanser
3. Seröz kanser
4. Berrak hücreli kanser
5. Skuamöz hücreli kanser
6. Mikst hücreli kanser
7. Farklılaşmamış kanser
8. Diğerleri

1.2.3.1. Histolojik Tip

a.Endometrioid Adenokanser

Endometrium kanserinin en yaygın histolojik tipidir. Olguların %75'ini oluşturur. Bu tümör, karakteristik olarak normal endometriumu anımsatan glandlar içerir. Eşlik eden hiperplastik endometrium, tipik olarak düşük grade'li tümör ve myometrial invazyonun olmaması ile ilişkilidir. Ancak, glandüler bileşen azaldığında ve solid kümeler arttığında, tümör yüksek grade olarak sınıflandırılır (3). Ayrıca, atrofik bir endometrium, çoğunlukla metastatik olan yüksek grade'li lezyonlar ile çok daha fazla ilişkilidir (47).

Adenokanserler değişik şekiller gösterebilir. Bunlar, skuamöz farklılaşma, villoglandüler, sekretuar ve silyalı hücreli varyantlarıdır.

b.Seröz Kanser

Endometrial kanserlerin yaklaşık %5 ile 10'unu oluştururlar. Yaşlı kadınların atrofik endometriumlardan kaynaklanan, oldukça agresif tip 2 tümörleri simgeler (48). Tipik olarak, belirgin nükleer atipi gösteren hücreleri olan kompleks bir papiller büyüme şekli vardır ve hastaların %30'unda Psammoma cisimcikleri görülür (3).

c.Berrak Hücreli Kanser

Endometrial kanserlerin %5'inden daha azı berrak hücreli kanserlerdir. Bu tip yüksek grade'li ve derin invazyon yapan tümörler olma eğilimindedirler. Hastalar genellikle ilerlemiş hastalıkta tanı alırlar ve kötü bir prognoza sahiptirler (49).

d.Müsinöz Kanser

Endometrial kanserlerin %1-2'sini oluşturan bu kanser, tümörün yarısından fazlasını kapsayan müsinöz bir görünüme sahiptir. Hemen hemen hepsi, iyi prognozu olan evre 1, grade 1 lezyonlardır (50).

e.Mikst Kanser

Bu kanser tip 1 ve tip 2 kanserin bir karışımıdır (3).

f.Farklılaşmamış (Andiferansiye) Kanser

Bu tümörler, belirli bir paterni olmayan solid tabakada tek düze büyüyen epitel hücrelerinin, orta boylu proliferasyonu ile karakterizedir (51). Sonuçta prognoz, kötü farklılaşmış adenokanserden daha kötüdür (52).

1.2.4. Histolojik Grade

Endometrial kanser için en yaygın kullanılan derecelendirme sistemi, üç basamaklı Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Federasyonu (FIGO) sistemidir. Grade 1 lezyonlar, tipik olarak iyi bir prognoza sahiptir. Grade 2 lezyonlar, orta derecede bir prognoza sahiptir. Grade 3 kanserler, sıklıkla kötü bir prognoza sahiptir ve myometrial invazyon ve lenf nodu metastazı potansiyelinde artış ile ilişkilidir.

Tablo 3. Endometrium Kanseri İçin FIGO Evrelemesi

EVRE	KARAKTERİ
1	Tümör korpusta sınırlı
1A	Miyometrial invazyon yok veya 1/2 den az
1B	Eşit invazyon veya 1/2 den daha fazla
2	Tümör servikal stromayı invaze etmiş, fakat uterusun dışına yayılmamıştır
3	Lokal ve/veya bölgesel tümör yayılımı
3A	Tümör korpus uterin serozasını ve/veya adneksi invaze etmiş
3B	Vajinal ve/veya parametrial tutulum
3C	Pelvik ve/veya paraaortik lenf nodu tutulumu
3C1	Pozitif pelvik lenf nodu
3C2	Pozitif paraaortik lenf nodu, pelvik lenf nodu pozitif veya negatif
4	Tümör mesane ve/veya barsak mukozasına yayılmış ve/veya uzak metastaz
4A	Tümör mesane ve/veya barsak mukozasına yayılmış
4B	Uzak metastaz, intraabdominal metastaz ve/veya inguinal lenf nodu metastazı dahil

1.2.5. Tedavi

1.2.5.1. Cerrahi Tedavi

Cerrahi temel yaklaşım şeklidir. Cerrahide yapılması gereken işlemler;

TAH-BSO; Adneksler mikroskobik metastaz yeri olduğundan ve eş zamanlı veya daha sonra oluşabilecek over kanseri riski artmış olduğundan çıkartılmalıdır.

Ancak overler gross olarak normal görüldüğünde adneksial kanser riski %1'in altına inmektedir. Premenapozal hastada overlerin korunması durumunda dikkatli bir inspeksiyon zorunludur. Servikse yakın vajenin çıkartılmasına gerek yoktur.

Sitoloji; Subdiyafragmatik, parakolik ve pelvisten 50 cc yıkama sıvısı örneği alınmalıdır.

Şüpheli alanlardan biyopsi alınmalı, uterus açılarak, tümörün büyüklüğü, myometrial invazyon derinliği ve servikal yayılıma bakılmalıdır. Omentektomi veya omental biyopsi yapılmalıdır. Non-endometrioid tümörlerde apendektomi ve peritoneal biyopsi yapılabilir.

Cerrahi evrelemede artan tecrübeler düşük riskli olgularda (grade 1 veya 2 endometrioid tümörler, myometrium iç ½'sinde sınırlı) sistematik lenfadenektominin şart olmadığını göstermiştir. Bu hastalarda sadece şüpheli pelvik ve paraaortik lenf nodları patolojik inceleme için çıkarılmalıdır. Yüksek riskli olgularda (grade 3, seröz veya berrak hücreli histoloji, evre 1b veya 2, tümör>2 cm) ise sistemik pelvik lenfadenektomi yapılmalıdır. Paraaortik lenf nodlarında klinik olarak şüpheli olanlar çıkarılmalıdır.

Parsiyel omentektomi yüksek riskli hastalarda, papiller seröz ve mikst müllerian tümör olgularında operasyona eklenmelidir.

1.2.5.2. Postoperatif (Adjuvan) Radyoterapi

Evre 1A ve Grade 1-2 tümörlerde postoperatif radyoterapiye gerek yoktur. Uterusta sınırlı tümörlerde postoperatif vajinal cuffa radyoterapi uygulanır. Grade 3 histolojisi ve lenfovasküler alan invazyonu olan evre 1 tümörlerde vajinal rekürrensi azaltmak için postoperatif vajinal cuffa radyoterapi uygulanır. Paraaortik lenf nodu tutulumu olan ancak başka pelvis dışı yayılımı olmayan olgularda genişletilmiş alan radyoterapisi uygulanır.

1.2.5.3. Postoperatif (Adjuvan) Kemoterapi

İleri evre tümörlerde standart tedavi kemoterapidir. Doksorubicin + sisplatin kullanılabilir.

Tedavi sonrası ilk 3 yıl 3-4 ayda bir, daha sonra 6 ayda bir takip yapılmalıdır.

1.3. Endometrium Kanseri ve İyon Kanalları

Plazma membranında yer alan iyon kanalları hücrel elektrogenez veelektrik iletiminden sorumludur. Bu kanallar apoptoz, proliferasyon ve farklılaşma gibi doku homeostazının korunması için gerekli olan tüm temel hücredavranışlarının yerine getirilmesinde görev almaktadırlar. İyon kanallarının bukritik süreçlere katkısında birkaç ana mekanizma vardır. Bunlar membran potansiyelinin korunması, hücre volümünün düzenlenmesi ve temel sinyaliletimini sağlayan iyonların girişidir. Artmış proliferasyon sonucu malignhücrelerin transformasyonu, bozuk farklılaşma, ölüm yeteneğinin bozulması anormal doku gelişiminin temel sebebidir. Bunun sonucunda kontrolsüz yayılımve invazyon gerçekleşebilmektedir (53).

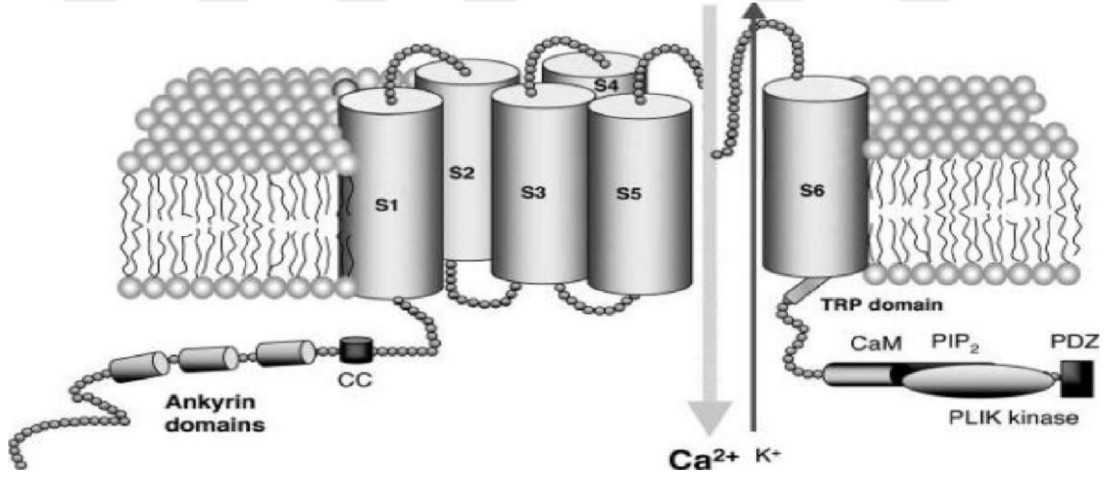
Tümör progresyonu, hücre proliferasyonu, apoptoz, migrasyon, invazyonve anjiogenez gibi fizyolojik süreçlerin değişimi sonucunda oluşur. Bu süreçler, kalsiyum homeostazı ve transient reseptör potansiyel (TRP) katyon kanalları kontrolü altındadır (54). İyon kanalları, önemli ölçüde de TRP kanalları, birçok fizyolojik süreçte yer almaktadır. Bu kanalların, kanser gibi bazı ciddi hastalıklarla da ilişkili olduğu gösterilmiştir. Kanser başlangıcı ve progresyonu sürecinde, bir veya daha fazla TRP proteininin değişmiş ekspresyonu önem arz etmektedir (55).

Transient reseptör potansiyel (TRP) kanalları ilk defa *Drosophila*'da tanımlanmıştır (56). TRP geni ürünü 1989'da klonlanmıştır ve TRP ailesinin kurucu üyesi olan ve Ca^{2+} 'a geçirgen olan bir katyon kanalını kodlar. TRP kanallarının bazı ortak özellikleri vardır. Hepsi katyon selektif kanallardır. Genel olarak, homo- ve heterotetramerler olarak fonksiyonel kanalları oluşturan 4 subunitten oluştuğu düşünülmektedir. Hücrel seviyede, multifonksiyonel algılayıcılar olarak fonksiyon görürler. Fiziksel veya kimyasal uyarılar ve spesifik ligandların bağlanmasıyla aktive olurlar. TRP gen mutasyonuna sahip olan fotoreseptörler sürekli ışığa maruz bırakıldıklarında fazık olarak (transient) voltaj değişikliğine yol açmaları nedeniyle bu isim verilmiştir. Farklı türlerde, 50'den fazla TRP kanalı tanımlanmıştır (57). Memelilerde 20'den fazla TRP kanal tipitani tanımlanmıştır (55). Bu kanal ailesinin iyon kanalları ısı ve/veya mekanik gibi çokdeğişik formdaki uyarılarla aktive edilirler. Sekans homolojisine bağlı olarak 28 memeli TRP'si, 6 alt gruba ayrılır. 1) vanilloid reseptör ailesi (TRPV), 2) Kanonikal (TRPC), 3) melastatin (veya uzun) TRPM, 4) polisitin (TRPP), 5) mukolipin (TRPML), 6) Ankirin (TRPA) (58, 59).

Transient Reseptör Potansiyel (TRP) kanalları, yüksek derecede değişken aktivasyon mekanizmalarıyla karakterize olan selüler algılayıcılardır. Farklı TRP genlerindeki mutasyonlar, çeşitli hastalıklarla ilişkilidir.

Transient Reseptör Potansiyel kanalları ayrıca hücre farklılaşması, büyümesi ve apoptozda da yer alır. Bildiğimiz gibi Ca^{2+} artışı hücrelerde apoptozu indükler. Bu yüzden, tümör hücresi membranında lokalize olan TRP kanalları ilaç terapisi, immunoterapi ve hatta gen terapisinde yeni hedefler olacaktır. Bu kanalların farklılaşma ve karsinogenez esnasındaki ekspresyon değişiklikleri hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Bu kanalların ekspresyon yolları, karsinogeneze katkıları ve kanser tedavisinde TRP agonistlerinin uygulamaya konmasıyla ilgili araştırmalara ihtiyaç vardır (57).

Transient Reseptör Potansiyel Melastanin (TRPM) alt grubu, potansiyel bir tümör supresor olarak tanımlanan bir proteinden olan melastatinden adını almaktadır. Bu gruba ait 8 protein tanımlanmıştır. TRPM alt grubunun birçok üyesi kalsiyuma geçirgendir ve kalsiyumla aktive olan proteinlerdir (60, 61). TRPM iyon kanallarındaki değişiklikler fizyolojik fonksiyonları etkileyerek, patolojik süreçlerin oluşumuna zemin hazırlar (62).

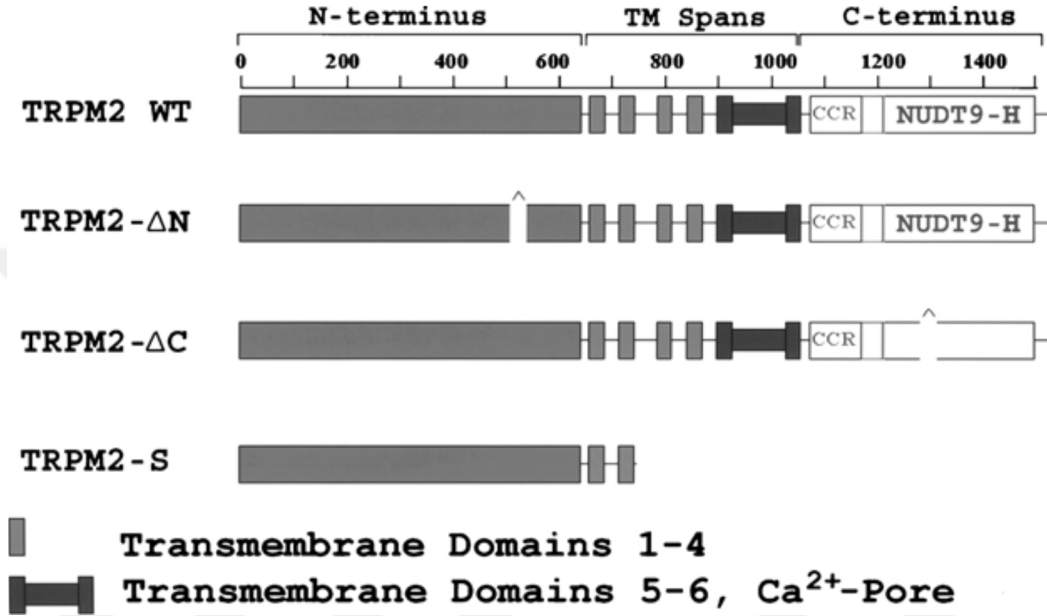


Şekil 1. TRP kanallarının hücre zarında yerleşimi ve geçirgenliği

1.3.1. TRPM 2 İyon Kanalı

Transient Reseptör Potansiyel Melastanin 2 geni kromozom 21q22. 3 üzerinde lokalizedir. TRP kanallarının çoğunda olduğu gibi TRPM2 kanalları voltaj kapılı olmayan katyon kanallarıdır ve önemli bir ikinci haberci olan Ca^{2+} 'a önemli geçirgenlikleri vardır (63).

Transient Reseptör Potansiyel Melastanın 2 kanalı intrasellüler N ve C uçlarına sahip olan 6 transmembran alanı içermektedir. TRPM2 kanalları en fazla hipokampus, serebral korteks, talamus ve orta beyin bölgeleri olmak üzere merkezi sinir sisteminde yoğun olarak eksprese edilmektedir (58, 64). Kemik iliği, dalak, kalp, lokosit, karaciğer, akciğer ve pankreas gibi çok sayıda insan dokusunda eksprese edildiği belirlenmiştir (65).



Şekil 2. TRPM2 Kanallarının Şematik Gösterimi

Transient Reseptör Potansiyel Melastanın 2 ve TRPM8 düşük sekans homolojisine sahiptir ve herhangi bir altgruba dahil edilmemişlerdir. Kanser hücrelerindeki fazla TRPM2 düzeyleri, hücre proliferasyonu ile ilgili olarak enzimatik bir fonksiyona sahip olabilir (66). Zeng ve ark. (67) eksik TRPM2'nin bir endoplazmikretikulum kalsiyum kanalı olarak rol oynayabileceğini ifade etmiştir. İntrasellüler kalsiyum regülasyonu hücre replikasyonu ve apoptozu düzenleyen temel mekanizmalardan biri olup tümör oluşumunda temel bir role sahiptir. TRPM2'nin inhibisyonu bu reseptörün eksprese olduğu beyin ve periferik kan hücreleri gibi hücrelerde yaşamın devam etmesinde faydalı olabilir (68). Bu proteinlerin nükleusa transmigasyonun veya ekspresyonunun seçici olarak baskılanması normal hücreler üzerinde herhangi bir etki oluşturmazken kanser hücrelerinin apoptozunu sağlayabileceğinden kanser için önemli bir terapötik hedef konumundadır (68). Ancak TRPM2 inhibitörlerinin kanser hücrelerinde nasıl bir etki göstereceği bilinmemektedir ve bu alanda yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

1.3.2. TRPM 7 İyon Kanalı

Transient Reseptör Potansiyel Melastatin 7 ilk olarak Nadler ve arkadaşları tarafından klonlanmıştır (69). TRPM2 kanalı ile heterodimer yaptığı bilinmektedir. Kanal, 15q21. 2 üzerinelokalizedir. Fare ve insanda TRPM7 kanalı %95 oranında yüksek bir homolojiye sahiptir. 39 ekzona sahip olan 85kb'lik bir DNA bölgesini kapsamaktadır. İnsanda 1864 aminoasitlik ve farede 1863 aminoasitlik büyük bir protein kodlamaktadır.

Protein yaklaşık 212 KDa'dur. 6 transmembran alanına sahiptir. Fosfatidilinositol4, 5-fosfat (PIP2), ile etkileşen TRPM7 diğer bazı kanalların pozitif düzenleyicisidir. Kanalin C ucu atipik serin/threonin protein kinaz alanına sahiptir. Ancak bu kinaz alanı direkt kanalın aktivitesi ile ilişkili değildir (70).

Transient Reseptör Potansiyel Melastatin 7, endotelial hücreler (71), monosit (72), nöron (73-75), osteoblastlar (76, 77), mezenkimal kök hücreleri (78) ve vasküler düz kas hücreleri (79) gibi, hemen hemen tüm dokularda eksprese olmaktadır. Diğer TRPMkanalları ile karşılaştırıldığında dokulardaki ekspresyon düzeyi daha yüksektir.

Özellikle hipokampus ve kolinerjik veziküllerde ekspresyonu tespit edilmiştir. Seçici olmayan bir katyon kanalıdır. Özellikle kalsiyum ve magnezyum gibi divalent katyonlara geçirgendir. Kanal aktivitesi ekstrasellüler Ph tarafından düzenlenmektedir. TRPM7'nin hücre proliferasyonunda etkili olduğu tespit edilmiştir (70). TRPM7 kanalları, yeni Ca²⁺ geçirgen non-selektif katyon kanallarıdır. TRPM7 kanallarının aktivasyonu, hücrel Mg²⁺ homeostazında, anormal magnezyum absorpsiyonunun neden olduğu hastalıklarda ve iskemikkoşullar altında Ca²⁺ ilişkili nöronal hasarlarda yer aldığı gösterilmiştir. TRPM7 kanalları, ayrıca hücrel çinko (Zn²⁺) homeostazı ve Zn²⁺ ilişkili nöronal hasarlarda da önemli bir rol oynamaktadır. Transient reseptör potansiyel melastatin 7 (TRPM7), hemen her doku ve hücre tipinde eksprese olan büyükTRP kanalı ailesinin bir üyesidir. TRPM7 kanallarının artan aktivasyonunun çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik süreçlere katkıda bulunduğuna dair çeşitlibilgiler bulunmaktadır (80). TRPM7 kanalları, Zn toksisitesinin önemli bir yer aldığı nörolojik hastalıklarda yeni bir hedef olabilir (81).

2. GEREÇ VE YÖNTEMLER

2.1. Genetik Gereç ve Yöntemler

2.1.1. Vakaların Seçimi

Bu çalışma, Fırat Üniversitesi Etik Kurulu tarafından 01.04.2017 tarih ve 0701 sayılı karar ile bilimsel ve etik açıdan uygun görülüp kabul edilmiştir.

Hastalarımız Fırat Üniversitesi Hastanesi'nde son 10 yılda yapılan küretaj materyallerinden seçilmiştir. Kontrol grubu, atipisiz hiperplazi, atipili hiperplazi, grade 1 endometrium adeno ca, grade 2 endometrium adeno ca, grade 3 endometrium adeno ca olmak üzere her gruptan 20'ser hasta seçilmiştir.

2.1.2. İyon Kanallarını Tespit Etmede Kullanılan Aletler

- -20°C derin dondurucu: Arçelik, Türkiye
- -80°C derin dondurucu: Nuaire, Meksika
- Etüv: Gallenkamp, Economy Incubator Size, Ukrayna
- Falkon Tüp: Corning® 430766, 15 mL Centri füge Tube, Meksika
- Mini Plate Spin: Labnet C1000, ABD
- Otomatik Pipetler: Socorex, Acura 825, Switzerland, İsviçre
- PZR ve Qubit tüpleri (0,6ml): Neptune, Katalog: 3737. S. X, Biotix Laboratory Media, İngiltere
- Plate Yapıştırıcı: AB Applied Biosystems, MicroAmp, Optical Adhesive Film, ABD
- Plate: AB Applied Biosystems, MicroAmp, Fast Optical 96-Well Reaction Plate With Barcode (0, 1 mL), Singapur
- Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR): Biometra, Almanya
- Qubit® 2, 0 Fluormeter: İnvitrogen by life teknologies, Avustralya
- Real Time- PCR: AB Applied Biosystems, ABI Prism 7500 Fast Real Time PCR Instrument, Foster City, CA
- Santrifüj: Sigma, Almanya
- Spin: Labnet International, Katalog No: C1031B-230V, Kore
- Vorteks: Elektro-Mag, Türkiye

2.1.3. İyon Kanallarını Tespit Etmede Kullanılan Kimyasal Maddeler

- cDNA Kiti: AB Applied Biosystems, High- Capacity cDNA Reverse Transcription Kits, Part No: 437522 REVB, Foster City, CA
- 5 x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX): Solis Biodyne, Riia 185a, 51014 Tartu, Estonia
- Temizleme Solüsyonu: Bioshop, Nuclease Removal Reagent (500 mL), Kanada
- Tri Reagent, Molecular Research Center, Cat No: TR 118, Montgomery Road Cincinnati, OH, USA

2.1.4. İyon Kanallarını Tespit Etmede Kullanılan Yöntemler

2.1.4.1. Parafin Blok Kesitlerden RNA İzolasyonu

Temin edilen parafin bloklardan 0, 2mm kalınlığında kesitler alınarak ependorflarda istiflenip izolasyon için -80 C'de saklandı. Parafin bloktan RNA izolasyonu Trizol kullanılarak gerçekleştirildi. Yöntem Sharma ve arkadaşlarından modifiye edilerek uygunluğu test edilmiştir.

1. Parafin erimesi için 20 µm 5 adet kesit ependorf tüplere konularak 65°C ısı bloğunda 1 saat bekletildi.

2. Parafinin uzaklaştırılması için ependorflara 1000 µl ksilol (65°C etüvde ısıtılacaktır) konup 65°C'de 5 dk. inkübasyonu takiben 14. 000 rpm'de 2 dk. santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası süpernatant atılacaktır. Ksilol eklendikten sonraki işlemler 3 kez tekrar edildi.

3. Ependorflara 1000 µl %100'lük etanol konup vorteks yapılacaktır. Etüvde 37°C'de 15 dakika bekletildikten sonra 14. 000 rpm'de 2 dk. santrifüj yapıp süpernatant uzaklaştırıldı. Ependorflara 1000 µl %70'lik etanol konup vorteks yapıldı. Etüvde 37°C'de 15 dakika bekletildi. 14. 000 rpm'de 2 dk. antrifüj yapıp ve süpernatant atıldı. Ependorflara 1000 µl %50'lik etanol konulup ve vorteks yapıldı. Etüvde 37°C'de 15 dakika bekletilip 14. 000 rpm 2 dk. santrifüj yapıldı ve süpernatant kısım atıldı.

4. Ependorflara; 750 µl Trizol, 60 µl Proteinaz K ve 2 µl RNase inhibitör ilave edilerek 60°C'de ayarlanmış çalkalamalı su banyosunda 1 gece bekletildi.

5. Örneklerin oda ısısına düşmesi beklendi. Ependorflara 300 µl kloroform eklenip ve 15 saniye vorteks yapıldı. 20. 000 rpm'de 20 dk. +4 °C'de santrifüj edilip üstte kalan faz yeni tüplere aktarıldı.

6. Üzerlerine 800 µl izopropil alkol eklendi ve oda sıcaklığında tüpler alt üst edilip -20°C'de 1 gece beklemeye alındı.

7. 13. 500 rpm'de 10 dk. +4°C'de santrifüj edilip üst faz atıldı. %75'lik etil alkol ile yıkama yapıldı. Tüpler altüst edilip 7500 rpm'de 5 dk. +4°C'de santrifüj edilip 10 dk. Etanolün uçması için tüpler kapakları açık şekilde bekletildi.

8. Dipte kalan beyaz RNA pelletinin büyüklüğüne göre DNase, RNase ve pirojen içermeyen su eklendi (121).

2.1.4.2. Spektrofotometrik RNA Ölçümü

RNA ölçümü için Qubit® RNA Assay Kit For Use With The Qubit® 2. 0 Fluorometer (İnvitrogen/Molecular Probes) kullanıldı. İşleme geçmeden önce DNAaz-RNAaz içermeyen steril su ile kör ölçüm yapıldı. BioSpec-nano (Shimadzu) cihazının ölçüm alanına 1 µl RNA konularak RNA miktarı ng/µl olarak ölçüldü. Bu işlem her bir örnek için tekrarlandı. cDNA sentezi için RNA miktarlarının eşitlenmesi amacıyla okunan en düşük RNA değeri standart alındı.

2.1.5. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

2.1.5.1. Kullanılan Çözeltiler ve Gereçler

High- Capacity cDNA Reverse Transcription Kiti: Kit içinde 10X RT Buffer, 25XdNTP mix, 10XRT Random Primers, MultiScribe™ Reverse Transcriptase hazır halde bulunmaktadır.

PCR Cihazı

500/1500 µl Ependorf Tüp

Nükleaz İçermeyen Steril Su

2.1.5.2. Komplementer DNA Sentezi

cDNA sentezi için RNA örneklerinden 10 µl kullanılarak cDNA sentezi toplam 20µl hacim üzerinden gerçekleştirildi. Sentez için 10µl RNA örneği, 2 µl 10XRT buffer, 2 µl 10XRT random primer, 0. 8 µl 25XdNTP mix, 4. 2 µl nükleaz içermeyen su ve en son olarak 1µl MultiScribe™ Reverse Transcriptase enzimi

kullanıldı. Örnekler termal döngü cihazına yerleştirildi. 25°C’de 10 dk, 37°C’de 120 dk, 85°C’de 5 dk ve 4°C’de ∞ olacak şekilde cihazda bekletildi. Oluşan cDNA örnekleri -80°C’de saklandı.

Tablo 4. cDNA karışım miktarı

Bileşik	Hacim (µl)	Katalog No
10X RT Tamponu	2.0	4319981
25X dNTP karışımı (100mM)	0.8	4367381
MultiScribe™Revers Transkriptaz	1.0	4319983
10XRT Random Primer	2.0	4319979
Nükleaz içermeyen H ₂ O	4.2	
Reaksiyon toplamı	10.0	

Tablo 5. CDNA sentezi için uygulanan pqr programı

PZR	1.Adım	2.Adım	3.Adım	4.Adım
Sıcaklık	25°C	37°C	85°C	4°C
Zaman	10 dk	120 dk	5 dk	∞

2.1.5.3. Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile cDNA Amplifikasyonu

Revers transkripsiyon ile elde edilen cDNA’lar sekans spesifik primerlerin varlığında Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ile amplifiye edildi. Genlerin ifadelerinin belirlenmesi için tabloda verilen primerler kullanıldı. Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH (Qiagen (Kat. No: OT00079247))), Realltimeprimers Gen Panelinde yer alan TRPM2 ve TRPM7 genlerinin ekspresyonları belirlendi. Gen ekspresyonları arasındaki farklılıkların hesaplanmasında $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanıldı.

Real Time PCR 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. RT-PCR Plate hazırlanırken cDNA örneklerinde her bir kuyucuğa 0, 5µl kondu. Her bir örnek için 1 µl qPCR mix, 0, 5 µl primer ve 3 µl DNAaz ve RNAaz içermeyen steril su olacak şekilde örnek sayısına göre hesaplanan bileşen miktarları ependorflara kondu ve vortekslendi. Plate’deki cDNA örneklerinin üzerine 4, 5 µl hazırlanan karışımdan bırakılarak plate’in üzeri optik yapıştırıcı filmle kapatıldı. Plate örneklerin tamamen dibe çökmesi ve oluşan kabarcıkların yok edilmesi amacıyla Mini plate spin cihazında 1 dakika santrifüj edildi.

Tablo 6. RT-PCR için her bir kuyucuğa konan bileşikler

Bileşikler	Hacim (µl)X Örnek Sayısı
cDNA	0,5
Primer	0,5
qPCR Mix	1
Nükleaz içermeyen H ₂ O	3
Toplam	5

Gen ekspresyon seviyeleri, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR sistemi ile ölçüldü. Çalışmada GAPDH kontrol gen (housekeeping) olarak kullanıldı. Isı koşulları 1 kez 95 °C'de, 15 dk ve 40 kez 95 °C'de 15 sn, 60 °C'de 30 sn, 72 °C'de 30 sn olacak şekilde ayarlandı.

Tablo 7. Uygulanan RT-PCR programı

Döngü Basamağı	Sıcaklık	Zaman	Döngü Sayısı
Başlangıç aktivasyonu	95°C	15 dk	1
Denatürasyon	95°C	15 sn	
Annealing	60°C	30 sn	40
Uzama	2°C	30 dk	

2.1.6. İstatistiksel Değerlendirme

Bu tez çalışmasında istatistiksel değerlendirme; Fırat Üniversitesi Lisanslı (193. 255. 124. 131) IBM SPSS 22. 0 paket program kullanılarak yapılmıştır. Hasta ve tümör özellikleriyle, ilgili gen ekspresyon pozitifliği arasındaki korelasyonun belirlenmesi için çift yönlü “Fisher testi” kullanılmıştır. Normal ve tümörlü dokulardaki ilgili gen ekspresyonlarının belirlenmesi için “Spearman Korelasyon testi”, normal ve tümörlü dokulardaki ilgili gen ekspresyon pozitifliklerinin karşılaştırılması için “ki kare analizleri” kullanılacaktır. $p < 0,05$ değeri istatistiksel açıdan anlamlı kabul edilmiştir.

2.2. İmmunohistokimyasal Gereç ve Yöntemler

Parafin bloklardan 4–6 µm kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara alındı. Deparafinize edilen dokular dereceli alkol serilerinden geçirilip antijen retrieval için sitrat tampon solüsyonunda pH: 6'da mikrodalga fırında (750W) 7+5 dakika kaynatıldı. Kaynatma sonrası oda ısısında yaklaşık 20 dakika soğutmak için bekletilen dokular PBS (Phosphate Buffered Saline, P4417, Sigma-Aldrich, USA)

ile 3x5 dakika yıkandıktan sonra endojen peroksidaz aktivitesini önlemek için hidrojen peroksid blok solusyonu ile 5 dakika inkübe edildi (Hydrogen Peroxide Block , TA-125-HP, Lab Vision Corporation, USA). PBS ile 3x5 dakika yıkanana dokulara zemin boyasını engellemek için 5 dakika Ultra V Block (TA-125-UB, Lab Vision Corporation, USA) solüsyonu uygulandıktan sonra 1/200 oranında dilue primer antikolar((Rabbit Anti-TRPM2 antibody, ab101738 ve Goat Anti-TRPM7 antibody, ab729, Abcam, Cambridge, UK)ile 60 dakika nemli ortamda oda ısısında inkübe edildi. Dokular, primer antikor uygulanmasından sonra PBS ile 3x5 dakika yıkandıktan sonra sekonder antikolar (biotinylated Goat Anti-Poliyvalent (anti-mouse / rabbitIgG), TP-125-BN, Lab Vision Corporation, USA ve Donkey anti-goat, sc-2042, Santa Cruz Biotechnology, USA) ile 30 dakika nemli ortamda oda ısısında inkübe edildi. Dokular, Sekonder antikor uygulanmasından sonra PBS ile 3x5 dakika yıkayıp Streptavidin Peroxidase (TS-125-HR, Lab Vision Corporation, USA) ile 30 dakika nemli ortamda oda ısısında inkübe edildikten sonra PBS içerisine alındı. Dokulara 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) Substrate + AEC Chromogen (AEC Substrate, TA-015 ve HAS, AEC Chromogen, TA-002-HAC, Lab Vision Corporation, USA) solusyonu damlatılıp ışık mikroskopunda görüntü sinyali alındıktan sonra eş zamanlı olarak PBS ile yıkamaya alındı. Mayer's hematoksilen ile zıt boyaması yapılan dokular PBS ve distile sudan geçirilerek uygun kapatma solusyonu (Large Volume Vision Mount, TA-125-UG, Lab Vision Corporation, USA) ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar Leica DM500 mikroskopunda incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı (Leica DFC295).

Boyamada immünreaktivitenin yaygınlığı (0.1: <%25, 0.4: %26-50, 0.6: %51-75, 0.9: %76-100) ve şiddeti (0: yok, +0.5: çok az, +1: az, +2: orta, +3: şiddetli) esas alınarak histoskor oluşturuldu. Histoskor= yaygınlık x şiddet

2.3. İstatistiksel Analiz

Elde edilen veriler ortalama \pm standart sapma olarak belirlendi. İstatistiksel analiz için SPSS version 22 programı kullanıldı. Gruplar arası değerlendirme One-way ANOVA ve posthoc tukey testi ile yapıldı. $p < 0.05$ değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. İmmünohistokimyasal Bulgular

3.1.1. TRPM2 İmmünreaktivitesi

Transient Reseptör Potansiyel Melastanın 2İmmünreaktivitesi için yapılan immünohistokimyasal boyamanın ışık mikroskobu altında değerlendirilmesi sonucu; Kontrol grubu (Şekil 1, 7) ile karşılaştırıldığında TRPM2İmmünreaktivitesi Atipisiz endometrial hiperplazi (Şekil 2, 8) , Atipili endometrial hiperplazi (Şekil 3, 9), Grade I endometrial adenocarcinoma (Şekil 4, 10), Grade II endometrial adenocarcinoma (Şekil 5, 11) ve Grade III endometrial adenocarcinoma (Şekil 6, 12) gruplarında benzer şekilde izlenmekte olup gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik izlenmedi.

3.1.2. TRPM7 İmmünreaktivitesi

TRPM7 İmmünreaktivitesi için yapılan immünohistokimyasal boyamanın ışık mikroskobu altında değerlendirilmesi sonucu; TRPM7 İmmünreaktivitesi, Kontrol (Şekil 13), Atipisiz endometrial hiperplazi (Şekil 14) ve Atipili endometrial hiperplazi (Şekil 15) gruplarında benzer şekilde izlendi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında TRPM7 İmmünreaktivitesi; Grade I endometrial adenocarcinoma (Şekil 16), Grade II endometrial adenocarcinoma (Şekil 17) ve Grade III endometrial adenocarcinoma (Şekil 18) gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştı ($p < 0.05$).

Tablo 8. TRPM2 ve TRPM7İmmünreaktivitesi

	TRPM2	TRPM7
Kontrol	0,35±0,12	0,66±0,16
Atipisiz endometrial hiperplazi	0,32±0,11	0,64±0,17
Atipili endometrial hiperplazi	0,33±0,10	0,65±0,15
Grade I endometrial adenocarcinoma	0,31±0,12	0,25±0,14 ^a
Grade II endometrial adenocarcinoma	0,37±0,20	0,31±0,25 ^a
Grade III endometrial adenocarcinoma	0,36±0,14	0,23±0,17 ^a

Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

^aKontrol grubuna göre karşılaştırıldığında, ($p < 0.05$).

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada biz basit atipisiz endometriyal hiperplaziden Grade3 endometriyum adeno kansere kadar olan endometriyal neoplazilerde TRPM2 mRNA, TRPM7 mRNA gen ekspresyonları ve immünohistokimyasal olarak boyanma skorlarını değerlendirdik. Çalışmamızın sonucunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında TRPM2 mRNA ekspresyonu tüm gruplarda azalmış iken, TRPM2 immünreaktivitesinde ise kontrol grubu ile atipisiz endometrial hiperplazi, atipili endometrial hiperplazi, Grade I,II ve III endometrial adenokarsinom arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik izlenmedi. TRPM7 mRNA ekspresyonu tüm gruplarda kontrole göre azalmış iken, immünreaktivitesi sadece Grade I,II ve III endometrial adenokarsinom gruplarında anlamlı olarak azalmış izlendi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında TRPM7 mRNA gen ekspresyonu ve immünreaktivitesi Grade I,II ve III endometrial adenocarcinoma gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmış izlendi. Endometriyal hiperplaziden kansere doğru ilerleyişte özellikle TRPM7 mRNA down-regülasyonu önemli bir progresyon markırı olabilir. Yaptığımız çalışma bu bakımdan literatürde ilk çalışma olma özelliğindedir.

TRP kanalları hücre differansiasyonu, hücre büyümesi ve apoptosis ile ilgili olup, Ca^{2+} u yükselterek apoptosisi indüklerler. Bu nedenle, tümör hücre zarında lokalize TRP kanallarının, ilaç tedavisi, immünoterapi ve gen tedavisi için yeni hedefler olacağı öngörülmektedir. Hücre farklılaşması ve karsinogenez sırasında bu kanalların ekspresyonundaki değişikliklerle ilgili az miktarda bilgi mevcuttur. Kanser tedavisinde kanserogenezin anlaşılmasına ve TRP agonistlerinin uygulanmasına katkıda bulunmak için bu kanalların ekspresyon yolları hakkında daha ileri araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır (82). Ana TRP ailesinin alt ailesinden biri olan melastatin sub-ailesi (TRPM) eşsiz yapısal özelliklere sahip olup ortak özellikler paylaştığı bildirilmiştir (83). Büyüyen kanıtlar TRPM7 üyesinin hücresel süreçlerde, embriyonik gelişimde ve insan hastalıklarında, özellikle kanserde önemli rol oynadığını göstermiştir. Biriken veriler, insan malignitelerinde moleküler biyolojik belirteç ve terapötik hedef olarak TRPM7'nin potansiyel önemini vurgulamaktadır (84-87). TRPM7 birçok solid tümör tipinde değişik hücresel prosesleri regüle eden hem bir iyon kanalı hem de bir kinaz proteindir. Bununla beraber endometrium adenokarsinomda değerlendirilmemiştir.

Bildiklerimize göre bu çalışma TRPM7 ve TRPM2'yi endometrium adenokarsinomlarda araştran ilk çalışmadır.

Çeşitli kanser türlerinde TRPM7 nin patofizyolojik rolü ile ilgili çalışmalar mevcut (88-90) olmasına rağmen sonuçlar yetersiz kalmaktadır. Dhenin-Duthille I ve ark. (88) meme duktal adenokarsinomlarında TRPM7' nin özellikle yüksek gradeli büyük çaplı (>2 cm) karsinomlarda yüksek eksprese olduğunu bildirmişlerdir.

Yee ve ark. (89) pankreatik adenokarsinomlarda tümör çapı ve tümör derecesi ile TRPM7 immun boyanma skorunun pozitif korelasyon gösterdiğini ileri sürmüşlerdir. Wang ve ark. (90) TRPM' nin pelvik metastaz ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir.

Bu çalışmaların aksine biz TRPM7 mRNA ve immünohistokimyasal olarak TRPM7' nin normal endometrial doku ile endometrium adeno Ca grade I, II ve III arasında negatif korelasyon olduğunu gördük. Bu çalışmamızı Nakashima ve ark. larının yaptığı çalışma da desteklemektedir (91).

Nakashima ve ark. (91) TRPM7'nin immünohistokimyasal olarak ve TRPM7 siRNA supresyonunun özağial skuamöz hücreli karsinomda proliferasyon, migrasyon ve invazyonu arttırdığını bildirmişlerdir. Ayrıca 5 yıllık surveyin TRPM7 seviyesi yüksek olanlarda düşük olanlara göre daha yüksek olduğunu ve TRPM7 nin özağial skuamöz hücreli karsinomda bağımsız bir iyi prognoz belirteci olabileceğini bildirmişlerdir.

Buna ters olarak Rybarczk ve ark. (92) ise yüksek TRPM7 seviyelerinin pankrasın duktal adenokarsinomunda kötü prognozla ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Wang ve ark. (90) TRPM7'nin ovarian kanserde aşırı ekspresyonunun kötü prognozla ilişkili olduğunu ileri sürmüşlerdir. Middelbeek ve ark. (93) meme kanserinin progresyon ve metastazında TRPM7'nin güçlü bir kötü prognostik faktör olduğunu bildirmişlerdir. Bu yayınlara ters olarak Nakashima ve ark. (91) TRPM7 down-regulasyonunun hücre proliferasyon, migrasyon ve invazyonunu anlamlı olarak arttığını bulmuşlardır. Mizuno ve ark. (94) de TRPM7'yi aşırı eksprese eden fare mesane kanseri hücrelerinin, sahte-transfeksiyona uğramış hücrelere kıyasla daha yavaş proliferasyon gösterdiğini bildirmiştir. Bu çalışmada bulgularımıza benzer şekilde TRPM7' nin mesane kanseri hücrelerini negatif olarak regüle ettiğini göstermektedir.

Biz de çalışmamızda kontrol grubuna ve atipili, atipisiz endometrial hiperplazi gruplarına göre grade I, II ve III endometrium adenokarsinomunda hem TRPM7 mRNA ekspresyonu hem de immunohistokimyasal olarak TRPM7' de gördüğümüz anlamlı azalmanın endometrial hiperplaziden endometrial adenokarsinoma geçişte bir belirteç olabileceğini ve düşük TRPM7 seviyelerinin endometrial hücrelerde proliferasyona ve invazyona yol açtığını düşünmekteyiz. Bununla beraber grade I, II ve III endometrial adenokanserlerde gradeler arasında ise anlamlı bir fark bulamadık. Bu da bize düşük TRPM7 seviyelerinin endometrial hücrelerde proliferasyona ve invazyona yol açtığını düşündürmektedir. Biz eğer gradeleme yerine endometrium adenokanserlerini evrelerine göre inceleysek ve tip I ile Tip II endometrium kanserlerini kıyaslamış olsaydık evreler arasındaki TRPM7 seviyeleri arasında da fark bulabilecektik. Leng ve ark. (95) TRPM7 siRNA ve TRPM7' nin supresyonunun glioma hücrelerinde proliferasyon, migrasyon ve invazyonu dramatik şekilde azalttığını bildirmişlerdir. Meng ve ark. (96) azalan TRPM7 'nin meme kanseri hücrelerinde migrasyon ve invazyon kapasitesinde azalmaya yol açtığını göstermişlerdir.

Transient Reseptör Potansiyel ailesi üyelerinin ekspresyon seviyeleri, çeşitli kanser tiplerinde progresyon ile ilişkilidir (97). Bununla birlikte TRP kanallarının fizyolojik rolü kanser tipine göre değişmektedir (94). Bu da bize TRPM7 seviyelerinde gördüğümüz düşüşün endometrium grade I, II ve III adenokanserlerinin diğer kanser türlerine göre farklı davrandığını düşündürmektedir.

Bizim endometrial hiperplazili olgularda TRPM7 mRNA down regüle olduğu halde immünohistokimyasal boyanmada hiperplaziler ile kontrol grubu arasında fark tespit edemedik. Bu durum gen ekspresyonu sonucu üretimi baskılanan protein miktarının immünohistokimyasal farklılık oluşturabilecek düzeyde olmamasından kaynaklanabilir (98). Endometriyal hiperplazi zemininde gelişen endometrioid adeno kanserler progresyon ve survival bakımından atrofik endometriyum zemininde gelişen kanserlerden daha iyi olduğu gösterilmiştir (99). Ayrıca hipoksik koşullarda TRPM7 ve TRPM2' nin arttığı gösterilmiştir (100). Östrojenin ise hipoksik koşulları iyileştirerek TRPM7 yi down-regüle ettiği gösterilmiştir (101). Çalışmamızda kanserlerdeki TRPM7 mRNA down-regülasyonunu ve immünreaktivitesindeki azalmayı bu mekanizmayla açıklayabiliriz. Bir çalışmada estrogen reseptör

aktivitesinin TRPM6'yı anlamlı şekilde inhibe ettiği ancak TRPM6'nın en yakın homoloğu olan TRPM7 gen ekspresyonunu etkilemediği bildirilmiştir(102). Dolayısıyla çalışmamızdaki TRPM7 down regülasyonunu tek bir mekanizma ile açıklamak güç görünmektedir. Başka çalışmalarla bu konu aydınlatılabilir.

Transient Reseptör Potansiyel Melastanin -2 TRPM ailesinin ikinci subalesi olup birçok hücrede klonlanıp eksprese edilmektedir (103). TRPM2'nin mesane, meme, akciğer, karaciğer, baş ve boyun kanserleri gibi birçok kanserde eksprese olduğu bildirilmiştir (104). Ekspresyonu regüle eden mekanizmalar net bilinmemekle beraber TRPM2 de malignensiyi modüle edebilecek birçok metilasyon bölgesinin mevcut olduğu bildirilmiştir (105). TRP kanallarının farklı kanser türlerinde farklı şekilde eksprese olduğu bildirilmiştir. TRPV8'in serviks kanserinde aşırı eksprese olduğu bildirilmişken, buna ters olarak karaciğer kanserinde düştüğü bildirilmiştir. TRPA1 ekspresyonunun böbrek kanserinde arttığı, prostat kanserinde ise azaldığı bildirilmiştir. Bu bulgular TRP kanallarını kanser tipine göre zıt rolleri olduğunu göstermektedir. Bununla beraber TRPV1'in değişik kanser türlerinde anlamlı değişmediği bildirilmiştir. TRPM2 yüksek ekspresyonunun mesane, baş- boyun, karaciğer ve akciğeri içeren 4 kanser tipinde risk artışı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Buna zıt olarak ise yüksek TRPM3 ekspresyonunun meme, mesane ve tiroid kanserlerinde azalmış bir riskle ilişkili olduğu bildirilmiştir. Yine ilginç olarak yüksek TRPC6 ekspresyonu azalmış meme, kolon ve prostat kanseri ile ilişkili iken, baş ve boyun kanserlerinde ise artmış bir risk ile ilişkili bulunmuştur (104). Biz yaptığımız çalışmada bildiğimiz kadar literatürde ilk olarak TRPM2 miRNA ve TRPM2'yi immunohistokimyasal olarak atipisiz, atipili ve grade I, II, III endometrium adenokarsinomunda araştırdık. TRPM2 miRNA'nın kontrole göre atipisiz, atipili endometrial hiperplazi ve grade I, II, III endometrium adenokarsinomunda anlamlı düştüğünü ama immunohistokimyasal olarak kontrol grubu, hiperplaziler ve kanser grupları arasında anlamlı bir fark bulmadık. Bulgularımız bu açıdan Park ve ark.(104)'nın yaptığı metaanalizde belirttiği gibi TRP kanallarının ekspresyonunun farklı kanser tiplerinde farklı olabileceği bulgularıyla uyumaktadır. TRPM2 miRNA'daki azalmanın immunohistokimyasal olarak gösterilememesi nedeni ise gen ekspresyonu sonucu üretimi baskılanan protein miktarının immunohistokimyasal farklılık oluşturabilecek düzeyde olmamasından

kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz. Yine Hiroi ve ark. (105) yaptıkları bir çalışmada kültüre edilmiş endometrial stromal hücrelerde TRPM2 geninin estrojene bağımlı bir gen olduğunu bulmuşlar da estrojenin en yüksek olduğu orta ve geç endometrial proliferatif fazda TRPM2 mRNA ekspresyonunda bir artış olmadığını bulmuşlardır. İnsan endometriumunda invivo mRNA transkripsiyonunda proliferatif endometrial fazda başka regülatör faktörlerin etkili olabileceğini düşünmüşlerdir. TRPM2 mRNA ekspresyonunun geç sekretuar fazda anlamlı arttığını bulmuşlardır. Kültüre edilmiş endometrial stromal hücrelerde estrojen ve progesteron tedavisinin TRPM2 mRNA ekspresyonunu arttırdığını bildirmişlerdir. Ahn ve ark. (106) ratlarda yaptıkları bir çalışmada TRPM2 mRNA seviyelerinin proöstrusta anlamlı arttığını, meteöstrusta basal seviyelerine döndüğünü ve diestrusta eski seviyelerine döndüğünü bulmuşlardır.

Bizim endometrium adenokarsinom ve hiperplazi gruplarında TRPM2 mRNA seviyelerindeki düşüşün diğer bir nedeni de yukarıdaki çalışmalarda belirtildiği gibi estrojenin farklı dönemlerde endometrium üzerine etkilerinin farklı olmasından ve karsinom etyopatogenezinde invivo olarak birçok faktörün birarada etki etmesinden kaynaklanmış olabilir. Bu konuda daha geniş çaplı araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Sonuç olarak endometrial hiperplaziden endometrium adenokarsinoma geçişte TRPM7 miRNA ve TRPM2 miRNA anlamlı olarak düştü. TRPM7 endometrium adenokarsinomunda immünohistokimyasal olarak ta düşerken TRPM2 de immünohistokimyasal bir değişiklik izlenmedi. TRPM7 ve TRPM2 iyon kanalları farklı kanser türlerinde farklı davranmaktadır.

5. KAYNAKLAR

1. Ellenson LH, Ronnett BM, Kurman RJ. Precursor lesions of endometrial carcinoma. Kurman RJ, Ellenson LH, Ronnett BM (eds). *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract*. New York: Springer, 2011: 360-371.
2. Kurman RJ, Kaminski PF, Norris HJ. The behavior of endometrial hyperplasia. A long-term study of "untreated" hyperplasia in 170 patients. *Cancer* 1985; 56: 403-412.
3. Silverberg SG, Kurman RJ, Nogales F. Tumors of the uterine corpus [Epithelial tumors and related lesions]. Tavassoli FA, Devilee P (eds). *World Health Organization Classification of Tumours*. Lyon, France, IARC Press, 2003: 221-228.
4. Mutter GL. Endometrial intraepithelial neoplasia (EIN): will it bring order to chaos? The Endometrial Collaborative Group. *Gynecol Oncol* 2000; 76: 287-290.
5. Baak JP, Mutter GL, Robboy S. The molecular genetics and morphometrybased endometrial intraepithelial neoplasia classification system predicts disease progression in endometrial hyperplasia more accurately than the 1994 World Health Organization classification system. *Cancer* 2005; 103: 2304-2312.
6. Hecht JL, Ince TA, Baak JP. Prediction of endometrial carcinoma by subjective endometrial intraepithelial neoplasia diagnosis. *Mod Pathol* 2005; 18: 324-330.
7. Anastasiadis PG, Skaphida PG, Koutlaki NG. Descriptive epidemiology of endometrial hyperplasia in patients with abnormal uterine bleeding. *Eur J Gynaecol Oncol* 2000; 21: 131-134.
8. Ricci E, Moroni S, Parazzini F. Risk factors for endometrial hyperplasia: results from a case-control study. *Int J Gynecol Cancer* 2002; 12: 257-260.
9. Horn LC, Schnurrbusch U, Bilek K. Risk of progression in complex and atypical endometrial hyperplasia: clinicopathologic analysis in cases with and without progestogen treatment. *Int J Gynecol Cancer* 2004; 14: 348-353.
10. Goldstein SR, Nachtigall M, Snyder JR. Endometrial assessment by vaginal ultrasonography before endometrial sampling in patients with postmenopausal bleeding. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 163: 119-123.

11. Granberg S, Wikland M, Karlsson B. Endometrial thickness as measured by endovaginal ultrasonography for identifying endometrial abnormality. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 164: 47-52.
12. Jacobs I, Gentry-Maharaj A, Burnell M. Sensitivity of transvaginal ultrasound screening for endometrial cancer in postmenopausal women: a casecontrol study within the UKCTOCS cohort. *Lancet Oncol* 2001; 12: 38-48.
13. Breitkopf DM, Frederickson RA, Snyder RR: Detection of benign endometrial masses by endometrial stripe measurement in premenopausal women. *Obstet Gynecol* 2004; 104: 11-16.
14. Goldstein SR, Zeltser I, Horan CK. Ultrasonography-based triage for perimenopausal patients with abnormal uterine bleeding. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 177: 102-104.
15. Shi AA, Lee SI. Radiological reasoning: algorithmic workup of abnormal vaginal bleeding with endovaginal sonography and sonohysterography. *AJR Am J Roentgenol* 2008; 191: 68-70.
16. Merisio C, Berretta R, De Ioris A. Endometrial cancer in patients with preoperative diagnosis of atypical endometrial hyperplasia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005; 122: 107-111.
17. Garuti G, Mirra M, Luerti M. Hysteroscopic view in atypical endometrial hyperplasias: a correlation with pathologic findings on hysterectomy specimens. *J Minim Invasive Gynecol* 2006; 13: 325-330.
18. Allison KH, Reed SD, Voigt LF. Diagnosing endometrial hyperplasia: why is it so difficult to agree? *Am J Surg Pathol* 2008; 32: 691-698.
19. Sherman ME, Ronnett BM, Ioffe OB. Reproducibility of biopsy diagnoses of endometrial hyperplasia: evidence supporting a simplified classification. *Int J Gynecol Pathol* 2008; 27: 318-323.
20. Zaino RJ, Kauderer J, Trimble CL. Reproducibility of the diagnosis of atypical endometrial hyperplasia: a Gynecologic Oncology Group study. *Cancer* 2006; 106: 804-811.

21. Gallos ID, Shehmar M, Th angaratinam S. Oral progestogens vs levonorgestrel-releasing intrauterine system for endometrial hyperplasia: a systematic review and metaanalysis. *Am J Obstet Gynecol* 2010; 203: 547-551.
22. Scarselli G, Bargelli G, Taddei GL. Levonorgestrel-releasing intrauterine system (LNG-IUS) as an effective treatment option for endometrial hyperplasia: a 15-year follow-up study. *Fertil Steril* 2011; 95: 420-426.
23. Wildemeersch D, Janssens D, Pylyser K. Management of patients with nonatypical and atypical endometrial hyperplasia with a levonorgestrel-releasing intrauterine system: long-term follow-up. *Maturitas* 2007; 57: 210-220.
24. Horn LC, Schnurrbusch U, Bilek K. Risk of progression in complex and atypical endometrial hyperplasia: clinicopathologic analysis in cases with and without progestogen treatment. *Int J Gynecol Cancer* 2004; 14: 348-353.
25. Trimble CL, Kauderer J, Zaino R. Concurrent endometrial carcinoma in women with a biopsy diagnosis of atypical endometrial hyperplasia: a Gynecologic Oncology Group study. *Cancer* 2006; 106: 812-819.
26. Randall TC, Kurman RJ. Progestin treatment of atypical hyperplasia and well-differentiated carcinoma of the endometrium in women under age 40. *Obstet Gynecol* 1997; 90: 434-440.
27. American College of Obstetricians and Gynecologists: Management of endometrial cancer. *Practice Bulletin No.* 2005; 65: 1-5.
28. Rubatt JM, Slomovitz BM, Burke TW. Development of metastatic endometrial endometrioid adenocarcinoma while on progestin therapy for endometrial hyperplasia. *Gynecol Oncol* 2005; 99: 472-476.
29. Bansal N, Yendluri V, Wenham RM. The molecular biology of endometrial cancers and the implications for pathogenesis, classification, and targeted therapies. *Cancer Control* 2009; 16: 8-12.
30. Hecht JL, Mutter GL. Molecular and pathologic aspects of endometrial carcinogenesis. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4783-4791.

31. Gredmark T, Kvint S, Havel G. Histopathological findings in women with postmenopausal bleeding. *Br J Obstet Gynaecol* 1995; 102: 133-136.
32. Iatrakis G, Diakakis I, Kourounis G. Postmenopausal uterine bleeding. *Clin Exp Obstet Gynecol* 1997; 24: 157-164.
33. Gu M, Shi W, Barakat RR. Pap smears in women with endometrial carcinoma. *Acta Cytol* 2001; 45: 555-560.
34. Guidos BJ, Selvaggi SM. Detection of endometrial adenocarcinoma with the ThinPrep Pap test. *Diagn Cytopathol* 2000; 23: 260-271.
35. Schorge JO, Hossein SM, Hynan L. ThinPrep detection of cervical and endometrial adenocarcinoma: a retrospective cohort study. *Cancer* 2002; 96: 338-343.
36. Feldman S, Berkowitz RS, Tosteson AN. Cost-effectiveness of strategies to evaluate postmenopausal bleeding. *Obstet Gynecol* 1993; 81: 968-972.
37. Gordon SJ, Westgate J. The incidence and management of failed Pipelle sampling in a general outpatient clinic. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 1999; 39: 115.
38. Ben Yehuda OM, Kim YB, Leuchter RS. Does hysteroscopy improve upon the sensitivity of dilatation and curettage in the diagnosis of endometrial hyperplasia or carcinoma? *Gynecol Oncol* 1998; 68: 4-5.
39. Obermair A, Geramou M, Gucer F. Does hysteroscopy facilitate tumor cell dissemination? Incidence of peritoneal cytology from patients with early stage endometrial carcinoma following dilatation and curettage (D&C) versus hysteroscopy and D & C. *Cancer* 2000; 88: 139-142.
40. Polyzos NP, Mauri D, Tsioras S. Intraperitoneal dissemination of endometrial cancer cells after hysteroscopy: a systematic review and meta-analysis. *Int J Gynecol Cancer* 2010; 20: 261-264.
41. Zerbe MJ, Zhang J, Bristow RE. Retrograde seeding of malignant cells during hysteroscopy in presumed early endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2000; 79: 55-62.

42. Cicinelli E, Tinelli R, Colafigli G. Risk of long-term pelvic recurrences after fluid mini hysteroscopy in women with endometrial carcinoma: a controlled randomized study. *Menopause* 2010; 17: 511-516.
43. Revel A, Tsafir A, Anteby SO. Does hysteroscopy produce intraperitoneal spread of endometrial cancer cells? *Obstet Gynecol Surv* 2004; 59: 280-281.
44. Powell JL, Hill KA, Shiro BC. Preoperative serum CA-125 levels in treating endometrial cancer. *J Reprod Med* 2005; 50: 585-591.
45. Price FV, Chambers SK, Carcangiu ML. CA 125 may not reflect disease status in patients with uterine serous carcinoma. *Cancer* 1998; 82: 1720-1726.
46. Nagar H, Dobbs S, McClelland HR. The diagnostic accuracy of magnetic resonance imaging in detecting cervical involvement in endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2006; 103: 431-436.
47. Kurman RJ, Norris HJ. Endometrial hyperplasia and related cellular changes. Kurman RJ (ed). *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract*. New York: Springer, 1994: 411-432.
48. Jordan LB, Abdul-Kader M, Al Nafussi A. Uterine serous papillary carcinoma: histopathologic changes within the female genital tract. *Int J Gynecol Cancer* 2001; 11: 283-290.
49. Hamilton CA, Cheung MK, Osann K. Uterine papillary serous and clear cell carcinomas predict for poorer survival compared to grade 3 endometrioid corpus cancers. *Br J Cancer* 2006; 94: 642-645.
50. Melhem MF, Tobon H. Mucinous adenocarcinoma of the endometrium: a clinicopathological review of 18 cases. *Int J Gynecol Pathol* 1987; 6: 347-352.
51. Silva EG, Deavers MT, Malpica A. Undifferentiated carcinoma of the endometrium: a review. *Pathology* 2007; 39: 134-140.
52. Altrabulsi B, Malpica A, Deavers MT. Undifferentiated carcinoma of the endometrium. *Am J Surg Pathol* 2005; 29: 1316-1321.

53. Prevarskaya N, Skryma R, Bidaux G, Flourakis M, Shuba Y. Ion channels in death and differentiation of prostate cancer cells. *Cell Death Differ* 2007; 14: 1295-304.
54. Gautier M, Dhennin-Duthille I, Ay AS, Rybarczyk P, Korichneva I, Ouadid-Ahidouch H. New insights into pharmacological tools to TR (i)P cancer up. *Br J Pharmacol*. 2014; 171: 2582-2592.
55. Guinamard R, Sallé L, Simard C. The non-selective monovalent cationic channels TRPM4 and TRPM5. *Adv Exp Med Biol* 2011; 704: 147-171.
56. Kraft R, Harteneck C. The mammalian melastatin-related transient receptor potential cation channels: an overview. *Pflugers Arch* 2005; 451: 204–211.
57. Everaerts W, Gevaert T, Nilius B, De Ridder D. On the origin of bladder sensing: Tr (i)ps in urology. *Neurourol Urodyn* 2008; 27: 264-73.
58. Xie YF, Macdonald JF, Jackson MF. TRPM2, calcium and neurodegenerative diseases. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 2010; 15: 95-103.
59. Everaerts W, Vriens J, Owsianik G, Appendino G, Voets T, De Ridder D, Nilius B. Functional characterization of transient receptor potential channels in mouse urothelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010; 298: 692-701.
60. Farooqi AA, Javeed MK, Javed Z, Riaz AM, Mukhtar S, Minhaj S, et al. TRPM channels: same ballpark, different players, and different rules in immunogenetics. *Immunogenetics* 2011; 63: 773–787.
61. Zholos A. Pharmacology of transient receptor potential melastatin channels in the vasculature. *British Journal of Pharmacology* 2010; 159: 1559–1571.
62. Simon F, Varela D, Cabello-Verrugio C. Oxidative stress-modulated TRPM ion channels in cell dysfunction and pathological conditions in humans. *Cell Signal* 2013; 25: 1614-1624.
63. Perraud AL, Schmitz C, Scharenberg AM. TRPM2 Ca²⁺ permeable cation channels: from gene to biological function. *Cell Calcium* 2003; 33: 519–531.

64. Nagamine K, Kudoh J, Minoshima S, Kawasaki K, Asakawa S, Ito F, Shimizu N. Molecular cloning of a novel putative Ca²⁺ channel protein (TRPC7) highly expressed in brain. *Genomics* 1998; 54: 124–131.
65. Inamura K, Sano Y, Mochizuki S, Yokoi H, Miyake A, Nozawa K, et al. Response to ADP-ribose by activation of TRPM2 in the CRI-G1 insulinoma cell line. *J Membr Biol* 2003; 191: 201–217.
66. Wu LJ, Sweet TB, Clapham DE. Current progress in the mammalian TRP ion channel family. *International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Pharmacol Rev* 2010; 62: 381–404.
67. Zeng X, Sikka SC, Huang L, Sun C, Xu C, Jia D, et al. Novel role for the transient receptor potential channel TRPM2 in prostate cancer cell proliferation. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2010; 13: 195-201.
68. Hofmann T, Chubanov V, Gudermann T, Montell C. TRPM5 is a voltagedmodulated and Ca (2+)-activated monovalent selective cation channel. *Curr Biol* 2003; 13: 1153-1158.
69. Nadler MJ, Hermosura MC, Inabe K, Perraud AL, Zhu Q, Stokes AJ, et al. LTRPC7 is a Mg. ATP-regulated divalent cation channel required for cell viability. *Nature* 2001; 411: 590–595.
70. Prevarskaya N, Zhang L, Barritt G. TRP channels in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1772: 937-946.
71. Fantozzi I, Zhang S, Platoshyn O, Remillard CV, Cowling RT, Yuan JX. Hypoxia increases AP-1 binding activity by enhancing capacitative Ca²⁺ entry in human pulmonary artery endothelial cells. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 2003; 285: 1233–1245.
72. Wuensch T, Thilo F, Krueger K, Scholze A, Ristow M, Tepel M. High glucose-induced oxidative stress increases transient receptor potential channel expression in human monocytes. *Diabetes* 2010; 59: 844–849.
73. Nunez-Villena F, Becerra A, Echeverria C, Briceno N, Porras O, Armisen R, et al. Increased expression of the transient receptor potential melastatin 7 channel is

critically involved in lipopolysaccharide-induced reactive oxygen species-mediated neuronal death. *Antioxidants & Redox Signaling* 2011; 15: 2425–2438.

74. Aarts M, Iihara K, Wei WL, Xiong ZG, Arundine M, Cerwinski W, et al. A key role for TRPM7 channels in anoxic neuronal death. *Cell* 2003; 115: 863–877.
75. Coombes E, Jiang J, Chu XP, Inoue K, Seeds J, Branigan D, et al. Pathophysiologically relevant levels of hydrogen peroxide induce glutamate-independent neurodegeneration that involves activation of transient receptor potential melastatin 7 channels. *Antioxidants & Redox Signaling* 2011; 14: 1815–1827.
76. Abed E, Labelle D, Martineau C, Loghin A, Moreau R. Expression of transient receptor potential (TRP) channels in human and murine osteoblast-like cells. *Molecular and Membrane Biology* 2009; 26: 146–158.
77. Martineau C, Abed E, Medina G, Jomphe LA, Mantha M, Jumarie C, Moreau R. Involvement of transient receptor potential melastatin-related 7 (TRPM7) channels in cadmium uptake and cytotoxicity in MC3T3-E1 osteoblasts. *Toxicology Letters* 2010; 199: 357–363.
78. Cheng H, Feng JM, Figueiredo ML, Zhang H, Nelson PL, Marigo V, Beck A. Transient receptor potential melastatin type 7 channel is critical for the survival of bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development* 2010; 19: 1393–1403.
79. He Y, Yao G, Savoia C, Touyz RM. Transient receptor potential melastatin 7 ion channels regulate magnesium homeostasis in vascular smooth muscle cells: role of angiotensin II. *Circulation Research* 2005; 96: 207–215.
80. Sahni J, Nelson B, Scharenberg AM. SLC41A2 encodes a plasma-membrane Mg²⁺ transporter. *Biochem J* 2007; 401: 505-513.
81. Inoue K, Branigan D, Xiong ZG. Zinc-induced neurotoxicity mediated by transient receptor potential melastatin 7 channels. *J Biol Chem* 2010; 285: 7430-7439.
82. Everaerts W, Gevaert T, Nilius B, De Ridder D. On the origin of bladder sensing: Tr(i)ps in urology. *Neurourol Urodyn* 2008; 27: 264-273.
83. Fleig A, Penner R. The TRPM ion channel subfamily: Molecular, biophysical and functional features. *Trends Pharmacol Sci* 2004; 25: 633–639.

84. Yee NS, Kazi AA, Yee RK. Cellular and developmental biology of TRPM7 channel-kinase: Implicated roles in cancer. *Cells* 2014; 3: 751–777.
85. Fleig A, Chubanov V. TRPM7 Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels. *Handbook of Experimental Pharmacology*. Nilius B, Flockerzi V, (Eds). Berlin/Heidelberg, Germany: Springer, 2014: 521-522.
86. Cabezas-Bratesco D, Brauchi S, Gonzales-Teuber V, Steinberg X, Valencia I, Colenso C. The different role of the channel-kinases TRPM6 and TRPM7. *Curr Med Chem* 2015; 22: 2943–2953.
87. Gautier M, Perriere M, Monet M, Vanlaeys A, Korichneva I, Dhennin-Duthille I, et al. Recent advances in oncogenic roles of the TRPM7 channel-kinase. *Curr Med Chem* 2016; 23: 4092–4107.
88. Dhennin-Duthille I, Rybarczyk P, Sahni J, Sevestre H, Scharenberg AM, Ouadid-Ahidouch H. Transient receptor potential melastatin 7 is involved in oestrogen receptor-negative metastatic breast cancer cells migration through its kinase domain. *Eur J Cancer* 2013; 49: 3694-3707.
89. Yee NS, Kazi AA, Li Q, Yang Z, Berg A, Yee RK. Aberrant over-expression of TRPM7 ion channels in pancreatic cancer: required for cancer cell invasion and implicated in tumor growth and metastasis. *Biol Open* 2015; 4: 507-514.
90. Wang J, Liao QJ, Zhang Y, Zhou H, Luo CH, Tang J, et al. TRPM7 is required for ovarian cancer cell growth, migration and invasion. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 454: 547-553.
91. Nakashima S, Shiozaki A, Ichikawa D, Hikami S, Kosuga T, Konishi H, et al. Transient Receptor Potential Melastatin 7 as an Independent Prognostic Factor in Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Anticancer Res* 2017; 37: 1161-1167.
92. Rybarczyk P, Gautier M, Hague F, Dhennin-Duthille I, Chatelain D, Kerr-Conte J, et al. Transient receptor potential melastatin-related 7 channel is overexpressed in human pancreatic ductal adenocarcinomas and regulates human pancreatic cancer cell migration. *Int J Cancer* 2012; 131:851-861.
93. Middelbeek J, Kuipers AJ, Henneman L, Visser D, Eidhof I, van Horssen R, et al. TRPM7 is required for breast tumor cell metastasis. *Cancer Res* 2012; 72: 4250-4261.

94. Mizuno H, Suzuki Y, Watanabe M, Sokabe T, Yamamoto T, Hattori R, et al. Potential role of transient receptor potential (TRP) channels in bladder cancer cells. *J Physiol Sci* 2014; 64: 305-314.
95. Leng TD, Li MH, Shen JF, Liu ML, Li XB, Sun HW, et al. Suppression of TRPM7 inhibits proliferation, migration, and invasion of malignant human glioma cells. *CNS Neurosci Ther* 2015; 21: 252-261
96. Meng X, Cai C, Wu J, Cai S, Ye C, Chen H, et al. TRPM7 mediates breast cancer cell migration and invasion through the MAPK pathway. *Cancer Lett* 2013; 333: 96-102.
97. Prevarskaya N, Zhang L, Barritt G. TRP channels in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1772: 937-946.
98. <http://www.abcam.com/protocols/a-comparison-between-polyclonal-and-monoclonal>
99. Prat J, Gallardo A, Cuatrecasas M. Endometrial carcinoma: Pathology and genetics. *Pathology*. Crossref Medline 2007; 39: 72– 87.
100. Huang S, Turlova E, Li F, Bao MH, Szeto V, Wong R, et al. Transient receptor potential melastatin 2 channels (TRPM2) mediate neonatal hypoxic-ischemic brain injury in mice. *Exp Neurol* 2017; 296: 32-40.
101. Nickel EA, Hsieh CH, Chen JG, Schwacha MG, Chaudry IH. Estrogen suppresses cardiac IL-6 after trauma-hemorrhage via a hypoxia-inducible factor 1 alpha-mediated pathway. *Shock*. 2009; 31: 354-358.
102. Cao G, van der Wijst J, van der Kemp A, van Zeeland F, Bindels RJ, Hoenderop JG. Regulation of the epithelial Mg²⁺ channel TRPM6 by estrogen and the associated repressor protein of estrogen receptor activity (REA). *J Biol Chem* 2009; 284: 14788-14795.
103. Miller BA, Zhang W. TRP channels as mediators of oxidative stress. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2011; 704: 531–544.
104. Park YR, Chun JN, So I. Data-driven analysis of TRP channels in cancer: linking variation in gene expression to clinical significance. *Cancer Genomics Proteomics* 2016; 13: 83–90.

- 105.** Hiroi H, Momoeda M, Watanabe T, Ito M, Ikeda K, Tsutsumi R, et al. Expression and regulation of transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 2 (TRPM2) in human endometrium. *Mol Cell Endocrinol* 2013; 365: 146-152.
- 106.** Ahn C, Yang H, Hong EJ, Jeung EB. Regulation and localization of transient receptor potential melastatin 2 in rat uterus. *Reprod Sci* 2014; 21: 1288-1295.



6.ÖZGEÇMİŞ

7 Haziran 1987 tarihinde Elazığ'da dünyaya geldim. İlkokul ve ortaokulu Elazığ Namık Kemal İlköğretim Okulunda, liseyi Elazığ Balakgazi Süper Lisesinde okudum. 2005 yılındaki üniversite sınavında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesini kazandım. 2011 yılında mezun olarak meslek hayatına başladım. Pratisyen hekim olarak sırasıyla Kovancılar Devlet Hastanesi, Ağın ASM, Elazığ Merkez Kırklar Mahallesi ASM'de görev yaptım. 2013 Eylül TUS'unda Fırat Üniversitesi Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Ana Bilim Dalını kazanarak asistanlık eğitimime başladım ve hala görev yapmaktayım. Evliyim.

