



T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

**KRAS LCS6 POLİMORFİZMİ ve ENDOMETRİUM KANSERİ  
İLİŞKİSİ**

**Dr.Feyza Nur İNCESU**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI**

**Danışman**

**Yrd. Doç. Dr. Özlem Seçilmiş Kerimoğlu**

**KONYA-2014**

T.C

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

KADIN HASTALIKLARI ve DOĞUM ANABİLİM DALI

**KRAS LCS6 POLİMORFİZMİ ve ENDOMETRİUM KANSERİ  
İLİŞKİSİ**

Dr. Feyza Nur İNCESU

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

**Danışman**

**Yrd.Doç.Dr.Özlem Seçilmiş Kerimoğlu**

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Kordinatörlüğü tarafından 14102039 proje numarası ile desteklenmiştir.

**KONYA -2014**

Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı'na

Dr. Feyza Nur İncesu tarafından savunulan bu çalışma, jürimiz tarafından Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalında Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği / oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

İmza:

Üye:

İmza:

Üye:

İmza:

Üye:

İmza:

Üye:

İmza:

ONAY:

Bu tez, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Mezuniyet Sonrası Eğitim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca; yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Fakülte Yönetim Kurulu ..... tarih ve ..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

**İmza**

**Prof. Dr. Oktay SARI**

**Dekan**

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimimde büyük emeği geçen, her zaman engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli hocam Prof Dr. Çetin Çelik'e, uzmanlık tez çalışmalarımın planlanması ve yürütülmesinde birlikte çalıştığımız ve bu sürecin her aşamasında bana yol gösteren, yardım ve desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübesinden yararlandığım danışman hocam Yrd.Doç.Dr. Özlem Seçilmiş Kerimoğlu'na, her zaman ilgi ve yardımlarını gördüğüm değerli hocalarım Yrd.Doç.Dr.Aybike Pekin, Yrd.Doç.Dr.Setenay Arzu Yılmaz, desteklerini esirgemeyen Uzm Dr Tolgay Tuyan İlhan ve Uzm Dr Tansel Çakır'a ve genetik değerlendirmelerde yaptığı katkılar ve gösterdiği fedakarlıklardan dolayı Prof.Dr.Hasan Acar ve Prof Dr Tülin Çora'ya teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

Zorlu geçen asistanlık eğitimim sırasında gösterdikleri sabır, anlayış, koşulsuz sevgi ve destekleri için meslektaşlarım annem ve babama teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimimi gerçekleştirmeme yaptığı büyük katkılar ve sağladığı imkanlar sebebiyle Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığına teşekkür eder, en derin saygılarımı sunarım.

Eylül 2014

**Dr. Feyza Nur İNCESU**

# İÇİNDEKİLER

	SAYFA
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	4
2.1. ENDOMETRİYUM KANSERİ .....	4
2.1.1. ENDOMETRİYUM KANSERİNDE RİSK FAKTÖRLERİ .....	4
2.1.2. ENDOMETRİYUM KANSERİNDE TANIL .....	5
2.1.3. ENDOMETRİYUM KANSERİNDE PATOLOJİ .....	6
2.1.3.1. ENDOMETRİYUM KANSERİNDE HİSTOLOJİK ALT GRUPLAR .....	6
2.1.3.2. ENDOMETRİYUM KANSERİNDE TÜMÖR DERECELENDİRİLMESİ .....	18
2.1.4. ENDOMETRİYUM KANSERİNDE CERRAHİ EVRELEME .....	9
2.1.5. ENDOMETRİYUM KANSERİNDE PROGNOSTİK FAKTÖRLER .....	10
2.2. KRAS LCS6 TEK GEN NÜKLEOTİD POLİMORFİZMİ .....	14
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER .....	15
3.1. HASTALARIN SEÇİLMESİ .....	15
3.2. KRAS 3' UTR LCS6 POLİMORFİZMİNİN TESPİTİ .....	15
3.2.1. ARAŞTIRMA KANLARININ TOPLANMASI .....	16
3.2.2. KULLANILAN MALZEME VE CİHAZLAR .....	16
3.2.3. KULLANILAN KİTLER VE KİMYASALLAR .....	16
3.2.4. DNA İZOLASYONU .....	18
3.2.5. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU .....	18
3.2.6. AGAROS JEL ELEKTROFOREZİ .....	20
3.2.7. RESTRİKSİYON ENZİM KESİM ÇALIŞMALARI .....	21

<b>3.3.VERİLERİN İSTATİSTİKİ ANALİZİ.....</b>	<b>22</b>
<b>4.BULGULAR.....</b>	<b>23</b>
<b>5.TARTIŞMA .....</b>	<b>26</b>
<b>6.SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>29</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>30</b>
<b>ÖZET .....</b>	<b>35</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>36</b>
<b>EKLER.....</b>	<b>37</b>
Ek A: Etik kurul kararı .....	37
Ek B: Onam Formu.....	38
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>40</b>

## KULLANILAN KISALTMALAR

CA125:Cancer antigen 125

CTNNB: Beta-catenin gen

CDKN2A:Cyclin dependent kinase inhibitor 2A

DNA: Deoksi ribo nükleik asit

EDTA: Etilendiamin tetraasetik asit

EK: Endometriyum kanseri

FİGO: International federation of gynecology and obstetrics

HER-2/neu: cerb-B2-human epidermal growth factor receptor 2

KRAS: Kirsten rat sarkoma

LCS: Let-7 komplementer sitesi

MI: Myometrial invazyon

LVSI : Lenfovasküler saha invazyonu

UHT: Un-translated region

USG : Ultrasonografi

P53: P Tümör supresör geni

PTEN: Phosphataz tensin homolog protein

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu

RFLP: Restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi

TAE : Tris-asetik asit ve EDTA

VKI: Vücut kitle indeksi

WHO :World health organisation

## 1. GİRİŞ

Dünyada özellikle 1950'li yıllardan itibaren gelişmiş ülkelerde görülme sıklığında artış gösteren endometriyum kanseri (EK) 1970'li yıllardan sonra batı ülkelerinde yapılan yayınlarda en çok görülen ve özellikle postmenopozal yaş grubundaki kadınları sıklıkla etkileyen genital sistem kanseri olarak bildirilmiştir. Ayrıca, kadın popülasyonunda meme, kolon ve akciğer kanserlerinden sonra en sık rastlanan kanser olup, kanser ölümlerinin 7. en sık sebebidir (Mutter GL, 2010). Türkiye Kanser İstatistikleri 2008 verilerine göre kadınlarda meme, tiroid ve kolorektal kanserlerin ardından dördüncü en sık rastlanan kanser olup kansere bağlı ölümlerin sekizinci en sık nedenidir. Genel olarak bakıldığında kadınların yaşamları boyunca %2-3'nde EK gelişecektir.(Jemal A, 2006)

EK son 10 yılda insidansının değişmemesine rağmen EK ilişkili ölümlerin 1987'den beri ikiye katlanması (2900 ölüm/yıl) bu kanser tipinin tanı ve tedavisine daha çok önem verilmesini sağlamıştır (Ayhan A, 2009). EK'nın premalign lezyonlarının vajinal kanama ile erken bulgu vermesi, ultrason kullanımının yaygınlaşması ile endometrium görüntülemesinin kolaylaşması ve endometrial örneklemenin poliklinik şartlarında kolayca uygulanması ile EK tanısı koyulması artmıştır.

EK genelde postmenopozal kadınlarda görülen ve yaş arttıkça seyri kötüleşen bir hastalıktır. Ancak, hastaların %25'i premenopozal, hatta %5'i 40 yaş öncesinde, %70'i postmenopozal dönemde görülür. EK'nın ortalama görülme yaşı 60'tır; olguların %75'i 50 yaşın üzerindeki kadınlardan oluşmaktadır (Sosolw RA, 2010 ; Amant F 2005).

EK gelişiminde östrojenin rolü kesinlikle ortaya konmuştur ve karşılanmamış östrojene maruz kalmayı artıran tüm faktörler riski artırmaktadır. Bunlar arasında; ileri yaş, nulliparite, tamoksifen tedavisi, erken menarş, geç menopoz , polikistik over sendromu, obezite , diyabet, estrojen salgılayan tümör, Lynch Sendromu ve ailesel kadın genital trakt kanserleri,meme ve kolon kanseri sayılabilir (Smith RA, 2001).

EK'da en önemli prognostik faktör hastalığın evresidir. Bunun yanında tümör çapı, histopatolojik tip, grade, myometrial invazyon (MI) derinliği, lenfovasküler



invazyon (LVSI) durumu, lenf nodu tutulumu, uterin dışı yayılımın klinik ve cerrahi bulguları, hormon reseptör durumu, DNA ploidi de prognoz üzerine etkili faktörlerdir (Ayhan A, 1996).

Klinikopatolojik ve moleküler özellikleri göz önünde bulundurulduğunda EK iki ayrı yol izler. Vakaların %85'ni oluşturan tip 1 perimenopozal kadınlarda görülür ve hiperöstrojenizm bulguları (disfonksiyonel kanama, erken menarj, geç menopoz, endometrial hiperplazi) obezite, diyabet ve hiperlipidemi eşlik eder. Tip 1 EK'ya örnek endometrioid adenokarsinomadır. Tip 1 EK'lar daha iyi differansiasyon gösterirler, daha çok yüzeysel invazyon yapar ve progestagenlere daha iyi yanıt verirler. Bu tipte prognoz daha iyi olup tanı anında tümör %80 uterusu sınırlıdır. (Attar E, 2011).

İkinci grup, tip 2 veya non-endometrioid adenokarsinoma olarak bilinir östrojen bağımsız otonom gelişim gösterirler. Östrojen üretme kapasitesi olmayan, zayıf, yaşlı postmenopozal kadınlarda görülüp atrofik endometrium zemininden gelişirler. Tip2 EK'ya örnek yüksek gradeli papiller seröz, skuamöz, berrak hücreli karsinom ve undiferansiye tiplerdir. Bu tip az differansiasyon göstermekle, derin myometrial invazyon, yüksek pelvik lenf nodu metastazı oranına ve progestagenlere yanıt vermemekle karakterizedir ve prognozu daha kötüdür (Bokhman JV,1983 ).

Araştırmalar bu iki tip EK gelişiminde farklı genetik değişikliklerin farklı olduğunu göstermiştir. PTEN tümör supressör gen endometrioid adenokanserlerde %83 oranıyla en sık görülen genetik anormalliktir. PTEN gen disfonksiyonunun yol açtığı endometrial karsinogenez, östrojen zengin çevreye yol açarak tip 1 EK gelişiminin erken basamağını oluşturur (Tsugawa K, 2002). Tip 1 EK gelişiminde bir başka erken basamak ise mismatch tamir genlerinin inaktivasyonudur. Bu bölgelerin instabilitesi herediter endometrium kanserlerinde etyolojisinde büyük rol oynarken tüm EK'ların %20'sinde görülür (Inoue M, 2001; Berchuck A, 1995) . Tip 1 EK'larda görülen diğer mutasyonlar KRAS , $\beta$ 1 catenin gen ve CTNNB gen mutasyonlarıdır (Ayhan A, 2009).

Tip 2 EK ise P53 mutasyonu en sık görülen genetik anormallikdir. Bu tip EK kromozomal instabilite ve geniş çapta genetik düzensizlikler ile karakterizedir (Berchuck A, 1995). Diğer sık görülen mutasyonlar ise CDKN2A inaktivasyonu ve ERBB fazla ekspresyonudur. Tip 2 EK'nin agresif klinik seyrinin yukarıda bahsi geçen genetik mutasyonlarla ilişkili olduğu düşünülmektedir (Ayhan A, 2009).

KRAS, KRAS proto-onkogeni ile kodlanan ve normal hücre çoğalması sinyal iletiminde görev alan bir proteindir. Mutasyona uğrayan KRAS güçlü bir onkogen haline gelmektedir. KRAS geni 12. kromozomun kısa kolundadır (Sasaki H, 1993).

Tümör süpresör özellik gösteren miRNA ailelerinden, let-7 ailesi insanlarda önemli bir onkogen olan RAS'ın aktivitesini kontrol eder. KRAS, KRAS geni 3'UTR bölgesinde bulunan let-7 komplementer siteleri (LCS) aracılığıyla down regülasyona uğrar. Altı numaralı LCS'de (LCS6) let-7 bağlanmasını modifiye eden bir tek gen nükleotid polimorfizmi tespit edilmiştir (4.pozisyonda Timin→Guanin, rs 61764370) (Chin LJ, 2008).

KRAS LCS6 polimorfizminin endometriozis ile ilişkisinin incelendiği bir çalışmada insan endometriyal stromal hücreleri kültürlerinde KRAS miRNA ve protein ekspresyonunun artmış olduğu ve KRAS LCS6 polimorfizmi pozitif olan kadınlarda endometriyal stromal hücrelerin proliferasyon ve invazyonunun artmış olduğu ifade edilmiştir (Grechukhina O, 2012).

Bu çalışmada amaç; KRAS geninde LCS6 polimorfizminin endometriyal hücreler üzerinde polimorfizmi ve invazyonu artırıcı etkisinin EK histopatolojik özellikleri ile ilişkisini araştırmaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Endometriyum Kanseri

İki tip EK tanımlanmıştır (Bokhman JV, 1983). Tip I karsinomlar östrojen bağımlı endometrial hiperplazi yoluyla gelişen karsinomlardır. Bu grup hastalar obez ve perimenopozal yaşadırlar. Tüm EK hastalarının %80'ni bu grup oluşturur ve endometrioid özellik (adenosquamöz, müsinoz, villaglandüler) gösterirler. İyi diferansiye endometroid ve müsinoz karsinomlar Tip I karsinomlardır ve daha iyi prognozlu kanserlerdir (Ayhan A, 2009). Tip II karsinomlar östrojenden bağımsız olup atrofik endometrium zemininden gelişirler. Bu grup hastalar daha yaşlıdır ve prognozları daha kötüdür (Parkin DM , 1997). Seröz ve şeffaf hücreli karsinomlar tip II karsinomlardır. Tip 1 kanserlerinde PTEN mutasyonu sık görülürken; Tip II kanserlerde P53 mutasyonu pozitif, Ki- 67 proliferasyon indeksi yüksek ve östrojen, progesteron reseptörleri negatiftir (Ayhan A, 2009).

#### 2.1.1. Endometriyum Kanseri Risk Faktörleri

EK gelişiminde pek çok faktör etkili olsa da en önemli risk faktörü endometriyumun uzun süre karşılanmamış estrojene maruz kalmasıdır. Nulliparlarda doğum yapmış kadınlara göre risk 2-3 kat artmış bulunmaktadır. İnfertilite, irregüler menstrual sikluslar, erken menarş, geç menopoz, aile öyküsü, progesteronla desteklenmemiş hormon replasman tedavisi kullanımı, artmış VKİ (vücut kitle indeksi ), yağlı diet ve sedanter yaşam tarzı EK risk faktörleridir (Tablo1) (Purdie DM, 2001).

Tablo-1: EK için risk faktörleri

EK riskini arttıran faktörler		EK riskini azaltan faktörler
Erken yaşta menarş	Hipertansiyon	Kombine oral kontraseptif
Geç menopoz yaşı	Diyabet	Sigara kullanımı
Nulliparite	Yaş (>35)	Yağdan fakir diyet
Polikistik over sendromu	İnfertilite	Egzersiz
Tamoksifen	Pelvik radyoterapi	Artmış parite
Hormon replasman tedavisi	Yüksek sosyoekonomik düzey	Yüksek protein ve sebze alımı
Obezite	Meme kanseri	Vitamin C, folat, karoten alımı

### 2.1.2. Endometriyum Kanserinde Tanı

Endometrial kanserli hastaların %90'ında tek başvuru şikayeti vajinal kanama veya akıntıdır. Uterus dışı yayılım veya uterin büyümenin olduğu vakalarda pelvik baskı ve rahatsızlık hissi ile ve özellikle yaşlı postmenopozal hastalarda servikal kanalın stenozuna bağlı hematometra, pyometraya bağlı olarak pürülan vajinal akıntı şikayetleri görülebilir (Smith RA, 2002). Asemptomatik hastalar ise; anormal pap smear testi sırasında veya farklı jinekolojik endikasyonlarla gerçekleştirilen histerektomi sonrasında veya ilgisiz bir sebep için pelvik bilgisayarlı tomografi veya pelvik ultrasondaki anormal bulguların incelemesi sırasında rastlantısal olarak tespit edilebilir (Dubeshter B, 1991).

Anormal perimenopozal ve postmenopozal kanama sebepleri arasında endometrial atrofi, polipler, endometrial hiperplazi, östrojen tedavisi, sarkom ve EK yer alır. Bu sebepler arasında atrofi postmenopozal kanamaların %60'ndan sorumludur (Fortier KJ, 1986) (Tablo 2).

Tablo-2: Postmenopozal kanama nedenleri

<b>Kanama nedenleri</b>	<b>Sıklık</b>
Endometrial atrofi	%60-80
Östrojen replasman tedavisi	%15-25
Endometrial polip	%2-12
Endometrial hiperplazi	%5-10
Endometrial kanser	%10

Anormal uterin kanama veya şüpheli endometrial patoloji varlığında tanıda ilk basamak endometrial aspirasyon biyopsisidir (Chambers JT, 1992). Endometrial aspirasyon biyopsi sonuçlarının postoperatif patoloji sonuçlarıyla karşılaştırıldığında % 90-98 doğruluğu bulunmaktadır (Dijkuizen FPHLJ, 2000). Örneklemede kullanılan ince plastik kanüller (pipella) ofis şartlarına kolaylıkla uygulanmasının yanı sıra kanamaya ve ağrıya daha az sebep olarak hastaların işlemi kabul oranlarını artmıştır. Transvajinal ultrasonografi anormal uterin kanamayı değerlendirmede endometrial biyopsiye ek yardımcı bir yöntemdir. Ultrasonda endometrial düzensizlik, subendometrial katların kesintiye uğraması ve endometrial kalınlık artışı (postmenopozal  $\geq 5$  mm) veya kavite içerisinde sıvı izlenmesi ileri değerlendirmeyi gerektirir (Karlsson B, 1995). Histereskopi ve dilatasyon-küretaj;

servikal stenozu olan ve aspirasyon biyopsiyi tolere edemeyen hastalarda, aspirasyon biyopside anormal kanamayı açıklayacak uygunsuz sonuç varlığında veya negatif aspirasyon biyopsi sonucu sonrası devam eden kanaması olan hastalarda uygulanabilir (Shushan A, 2002). Bilgisayarlı tomografi ve manyetik rezonans görüntüleme EK'nin uzak yayılımlarını göstermekte yaygın olarak kullanılmaktadır. İleri evre over kanserlerinin %80'inde CA125 yüksekliği görülmesi bu tümör belirtecinin EK'de araştırılmasını sağlamış ve ileri evrede yüksek seyrettiği saptanmıştır. EK'de CA125 postoperatif dönemde kemoterapiye yanıtı değerlendirmede kullanılmaktadır (Jhang H, 2003).

### **2.1.3. Endometriyum Kanserinde Patoloji**

#### **2.1.3.1. Endometriyum Kanseri Histolojik Alt Grupları**

a.Endometrioid adenokarsinom: Endometrial karsinomun en sık görülen tipidir (% 80). Bu tümörler normal endometrial bezlere benzeyen ve nükleusları bazale yönelmiş, kolumnar hücreleri olan bezlerden oluşmuştur. Sitoplazma içi müsin yok veya çok azdır. Tümör diferansiyasyonu azaldıkça solid alan artar, bezler azalır ve sitolojik atipi artar. Endometrioid tip kanserlerin % 15- 25'i skuamöz, % 2'si villoglandüler ve % 1'i sekretuar diferansiyasyonlu alanlar içerir (Norris HJ, 1993).

Eski sınıflamada benign görünümlü skuamöz alan içerenler adenoakantoma, malign görünümlü alan içerenler adenoskuamöz karsinom olarak belirtilirken; yeni tanımlama skuamöz differansiyasyon gösteren endometrioid adenokarsinom şeklindedir. Çünkü skuamöz differansiyasyon gösteren adenokarsinomlar glandüler komponentin nükleer grade'e göre gradeleri hesaplanırken skuamöz komponentin differansiyasyonu glandüler komponent ile paralellik göstermektedir (Zaino RJ, 1991).

Villoglandüler/papiller varyant ve sekretuar varyant iyi differansiye düzenli endometrioid adenokarsinomlar gibi davranırlar genellikle çok iyi prognozlu durlar (Chen JL, 1985).

b.Müsinöz karsinom: Endometrial karsinomların %5'ini oluşturur. Endoserviksin müsinöz karsinomuna benzeyen bol miktarda müsin içeren

hücrelerden oluşan iyi diferansiye ve iyi prognozlu endometrial kanser tipidir. Bu tipi endoservikal adenokarsinomdan ayırmak için vimentin kullanılır. Vimentin ile pozitif boyanması ile endoservikal adenokarsinomdan ayrılır (Ross JC, 1983).

c.Papiller seröz adenokarsinom: Over ve tubanın seröz karsinomuna benzeyen, endometrial karsinomların yaklaşık % 3-4'ünü oluşturan tiptir. Bu tümörler çoğu zaman geniş kümeler halinde tabakalaşma gösteren atipik hücrelerle döşenmiş fibrovasküler uzantılardan oluşur. Psammom cisimcikleri sıklıkla görülür (Hendrickson M, 1982). Seröz papiller adenokarsinom, çoğunlukla yüksek gradeli olup LVSI ve derin MI yaparlar. Yaşlı kadınlarda atrofik endometrium zemininden gelişen tip II EK'dır (Burkley CH, 2002). Seröz karsinomlar over kanserleri gibi abdomen içine yayılma paterni gösterir ve tip 1 EK'dan daha kötü prognozludur.

d.Şeffaf hücreli karsinom: Tip II EK olan şeffaf hücreli karsinom, tüm endometrial kanserlerin %5'inden azını oluşturur. Şeffaf hücreli karsinomların karışık histolojik dağılımları vardır papiller, tubülokistik, glandüler ve solid alanlar içerirler. Hücreler yüksek atipik çekirdek ve bol berrak veya eozinofilik sitoplazmaya sahiptirler. Bu tip EK prognozu papiller seröz karsinoma benzer genel olarak sağ kalım %33-64 olarak bildirilmiştir (Berek J, 2003).

e.Skuamöz hücreli karsinom: Ender görülen bu karsinom türü, tanı konulduğunda servikal stenoza bağlı kronik inflamasyon ve piyometra ile ilişkilidir. Skuamöz hücreli karsinomun endometrium kaynaklı olduğunun tespiti için kanserin servikal skuamöz epitel ile ilişkisi olmamalı ve servikal yayılım olmamalıdır (Anderson MC, 2002).

f. Diferansiye olmamış karsinom: Bu tip karsinomda glandüler veya skuamöz diferansiasyon izlenmez. Büyük ve küçük hücreli olmak üzere ikiye ayrılır.

g. Mikst tip adenokarsinom: Tip 1 ve tip 2 karsinomun karışımından oluşan nadir görülen tiptir (Tablo 3).

Tablo-3. EK histopatolojisi

<b>EK histopatolojik alt tipleri</b>
Endometrioid adenokarsinom Skvamöz diferansiyasyon gösteren varyant Villoglanduler /Papiller varyant Sekretuar varyant
Müsinöz adenokarsinom
Seröz papiller adenokarsinom
Seffaf hücreli adenokarsinom
Skvamöz hücreli adenokarsinom
Diferansiye olmamış karsinom
Mikst tip adenokarsinom

### 2.1.3.2.Endometriyum Kanserinde Tümör Derecelendirilmesi

FIGO ve WHO'nun uterus karsinomu histopatolojik sınıflamasında, tümör derecelendirmesi hem yapısal hem de nükleer özelliklere göre yapılmaktadır.

a. Yapısal derecelendirme (grade): Bir tümörün grade'i tümörün diferansiyasyonunu gösterir ve yapısal büyüme paterni ve nükleer özelliklere göre solid alanların tüm tümör içinde kapladığı alana bakılarak belirlenir. Grade '%' olarak ifade edilir. Buna göre solid alan % 5'ten az ise grade 1, % 6-50 arasında ise grade 2, % 50'den fazla ise grade 3 olarak derecelendirilir. Yapısal derecelendirme ile uyumsuz belirgin nükleer atipi, tümörün grade değerini bir derece arttırır (Hendricson MR ,1992).

b. Nükleer derecelendirme: Nükleer şekil ve boyut, kromatin dağılımı ve nükleolusun boyutu değerlendirilir.

Grade 1 tümörler iyi diferansiye, östrojen ile ilişkili ve iyi prognozlu olup grade 3 tümörler ise undiferansiye ve kötü prognozludur. Grade 3 tümörlerde nüks gelişme olasılığı grade 1 ve 2'ye göre 5 kat artmıştır (Lurain JR,1971). Bir tümörde nükleer ve yapısal grade uyumsuzluğu varsa bu tümör ileri grade olarak kabul edilir. Seröz karsinom, berrak hücreli karsinom klinik olarak agresif tümörlerdir ve ileri grade kabul edilirler (Hendricson and Kempson 1992).

#### 2.1.4. Endometriyum Kanserinde Cerrahi Evreleme

EK'yi evreleme için 1988 yılına kadar klinik evreleme kullanılmıştır. Ancak, cerrahi yapılan hastalardan kaybedilenlerin çoğunun klinik evre 1 hastalar olması, klinik evrelemenin eksikliğini ortaya koymuş ve cerrahi evreleme gerekliliğini göstermiştir. Günümüzde tüm hastalara 2009 FIGO evrelemesine göre cerrahi evreleme yapılmaktadır (Amant F, 2005) (Tablo 4). Bu evrelemede; tümörün uterustaki tutulumu (yüzeyel veya derin myometrium), komşu organ ve uzak organ yayılımı, lenf nodu tutulumu değerlendirilmektedir. Cerrahi evrelemede; histerektomi, bilateral salpingooferektomi ve pelvik-paraaortik lenf nodu disseksiyonu yapılmaktadır. En sık görülen komplikasyonlar; yara yeri infeksiyonu, emboli, kanama, barsak yaralanması, lenfokist oluşumudur(Orr JW, 1991). Bu genel yaklaşıma rağmen lenfadenektomi tüm hastalara rutin olarak önerilmemekte; berrak hücreli ,yassı hücreli veya endometrioid histolojili, MI %50'den fazla ise, isthmus-serviks yayılım varsa, tümör büyüklüğü >2 cm ve uterus dışı yayılım riski olan hastalara yapılmaktadır (Creutzberg CL, 2000; Mariani A, 2000; Morrow CP, 1991). Lenfadenektomi hastaların ameliyat sonrası adjuvan tedavi ihtiyacını belirlemede ve uterus dışı yayılımı değerlendirmede faydalıdır. Sonuç olarak cerrahi evreleme; yüksek rekürrens oranına sahip olan ileri evre hastaları tanımlamaya, lenfatik yayılımı ve postoperatif tedavi ihtiyacı azaltmaya veya postoperatif tedavi ihtiyacı belirlemeye yardımcı olur (Aalders J, 1980)



Tablo-4: EK’inde cerrahi evreleme

EVRE 1	A- Myometrial invazyon yok veya %50’den az
	B- %50 veya daha fazla myometrial invazyon
EVRE 2	Servikal stromal invazyon (uterus dışına çıkmamış tümör)
EVRE 3	A-Uterus seroza tutulumu veya adneksiyel tutulum
	B- Vajinal ve/veya parametrial tutulum
	C- Pelvik ve/veya paraaortik tutulum C1- Pozitif pelvik lenf nodu tutulumu C2- Pozitif paraaortik lenf nodu tutulumu (ve/veya pelvik lenf nodu tutulumu)
EVRE 4	A- Mesane ve/veya barsak mukoza invazyonu
	B- Uzak metastaz (intraabdominal uzak metastaz, inguinal lenf nodu metastazı)

### 2.1.5. Endometriyum Kanserinde Prognostik Faktörler

EK’inde en önemli prognostik faktör evre olsa da yaşam süresini belirleyen ve rekürrensi öngören çeşitli prognostik faktörler vardır. Özellikle ileri evre olgularda sağ kalımı öngörmeye, nüksleri ve rekürrensi önlemek için adjuvan tedavi ihtiyacını belirlemede yeni prognostik faktörlere olan gereksinim artmıştır. Bu prognostik faktörler;

a. Yaş: Genç hastalarda EK prognozu yaşlı hastalara göre daha iyidir; yaşlı hastalarda grade 3 ve kötü histolojik tipler daha sık görülür.

b. Histolojik tip: EK’nın en sık görülen tipi endometrioid adenokarsinomdur (tip1) (%85). Bu hastalarda 5 yıllık sağ kalım %80-90’dır. Endometrioid tip dışı kanserler (tip2) ise olguların %10’nu oluşturur ve kötü prognozludur (Wilson ve ark

1990).Tip 2 kanserlere seröz adenokanser, şeffaf hücreli kanser ve papiller kanserler sayılabilir.

c.Histolojik grade: EK prognozu histolojik grade ile yakından ilişkilidir. Grade 3 tümörlü EK'larda nüks gelişmesi grade 1 ve grade 2 tümörlü hastalara göre 5 kat fazladır (Uslu T,1992). 5 yıllık hastaliksız sağ kalım grade 1 tümörde % 92 iken grade 3 tümörlü hastalarda % 64'tür. Tümör de anaplazi artışıyla derin myometrial invazyon, servikal tutulum, lenf nodu metastazı, lokal rekürrens ve uzak metastaz riski artmaktadır(Lurain JR, 1991; Kadar N, 1992).

d. Tümör boyutu: EK'larda tümör boyutu; lenf nodu metastazı ve sağ kalımı öngörmede önemli bir prognostik faktördür .Evre 1 EK hastalarında tümör <2 cm ise lenf nodu metastazı %4, tümör >2 cm ise %15 izlenmiştir. Tümör boyutu  $\leq$  2 cm olan hastaların 5 yıllık sağ kalımı %98, tümörün >2 cm olduğu hastalar için %84 ve tümörün tüm kaviteyi kapladığı hastalar için %64 bulunmuştur (Schink JC, 1991).

e. Myometrial invazyon: Myometriumun dış yarısındaki tutulum ile lenfatik sisteme geçiş olduğundan MI derinliğindeki artış uzak metastaz ve nüks ile ilişkilidir (Kadar N, 1992). Myometrial invazyon 1988 FIGO evreleme sisteminde yüzeysel, orta, derin olarak değerlendirilmekteydi. 2009 FIGO evreleme sisteminde ise myometrial invazyonun olmadığı veya % 50'den az olduğu olgularda evre 1A; myometrial invazyonun % 50'den fazla olduğu olgularda evre 1B olarak değerlendirilmiştir. MI olmayan veya %50'den az olan hastalarda lenf nodu metastazı %5'ten azken, derin MI olanlarda bu oran %20'dir (Boronow RC,1984). Tümör-myometrium sınırının uterin serozaya olan uzaklığı 5 mm'den daha az ise rekürrens ve ölüm riski fazladır (Kaku ve ark 1994).

f. Hormon reseptör durumu: Östrojen ve progesteron reseptör seviyeleri EK'da grade sınıflamasından bağımsız prognostik faktördür. Bir ya da her iki reseptörün pozitif olduğu hastalarda sağ kalım, reseptörün negatif olduğu hastalara göre daha uzundur (Liao BS, 1986).

g. DNA ploidi: EK'lı hastaların %66' sının DNA içeriği diploiddir. MI derinliği, evre, grade arttıkça diploid olmayan tümör oranı artmaktadır (Zaino RJ, 1996).

h. Lenfovasküler invazyon: Lenfovasküler invazyon, tüm endometrial kanser tiplerinde rekürrens ve ölüm riskini göstermede bağımsız risk faktörüdür (Kaku T, 1994). Erken evre EK'da lenfovasküler invazyon %15 olup bu oran tümör grade ve MI derinliği artışıyla artmaktadır (Hanson MB, 1985).

1. İstmik ve servikal tutulum: EK'da tümörün uterustaki yerleşimi prognoz açısından önemlidir. Uterus istmusu, serviks veya her ikisinin birden tutulumu; uzak metastaz, lenf nodu metastazı ve nüks riskinin artışıyla beraberdir (DiSaia PJ, 1985).

i. Lenf nodu metastazı: Lenf nodu metastazı erken evre EK'da önemli bir prognostik faktördür. Lenf nodu metastazı olan hastalarda lenf nodu metastazı olmayan hastalara göre nüks gelişme riski altı kat fazladır. Lenf nodu metastazı olmayan hastalarda 5 yıllık sağkalım oranı %90 iken lenf nodu tutulumu olanlarda bu oran %54'tür (Zaino RJ, 1996). Jinekolojik Onkoloji Grubu, EK'da paraaortik lenf nodu metastazının prognozunu belirlemede en önemli faktör olduğunu bildirmiştir (Moore DH, 1989).2010 yılında yapılan bir çalışmada nüks açısından orta ve yüksek riskli EK hastalarında pelvik ve paraaortik lenfadenektominin; sadece pelvik lenfadenektomiye karşı üstün olduğu ve sağ kalımı uzattığı gösterilmiştir (Todo Y,2010). FIGO 2009'da revize ettiği EK evrelemede paraaortik lenf nodu tutulumunu pelvik lenf nodu tutulumundan ayırarak 3C2 olarak belirtmiştir(Pecorelli S,2009).

j. İmmunohistokimyasal belirteçler: Kanser; büyüme sinyalleri ve büyüme karşıtı sinyallerin arasındaki dengesizliğe bağlı doku invazyonu ve metastaz, sınırsız hücre yenilenmesi, anjiogenez ve apoptozis kaybı gibi çoklu bir sürecin genel adıdır. Jinekolojik kanserlerdeki farklı evre, grade ve histolojik tiplerdeki klinik değişiklikler moleküler farklılıklara bağlı olabilir. EK'nin prognozunu belirlemede önemli prognostik faktörler vardır. Günümüzde immunohistokimyasal çalışmaların ilerlemesiyle birlikte farklı kanserlerde yeni prognostik belirteçlerin rolü araştırılmaktadır. Yeni immünohistokimyasal yöntemler ile endometrium karsinogenezinin oluşumu ve nedenleri tespit edilerek erken tanı ve tedavi ve de kanser gelişimini engelleyici müdahaleler geliştirilebilir.

g. Moleküler belirteçler: EK karsinogenezinde onkogenler ve tümör baskılayıcı genler olmak üzere iki tip gen sınıfı önemlidir. Onkogenler normal

hücrelerin büyüme yollarındaki stimüle edici proteinleri kodlarken, tümör baskılayıcı genler ise tam tersi etkiye yol açarlar. EK'nın moleküler patogenezinde rol oynayan onkogenler arasında en bilinenleri KRAS, e-cadherin, fms ve Her-2/neu'dur(Mendelsohn J, 2001).

KRAS geni (kodon 12 ve kodon 13) mutasyonları EK'da %10-20 arasında bildirilmiş olup kötü prognoza işaret eden bağımsız bir faktördür (Fujimoto I, 1993). K-ras mutasyonları ayrıca endometriyal hiperplazilerde de saptanmıştır, bu durum karsinogenezde erken bir basamak olduğunu düşündürür. Hiperplazi derecesi arttıkça mutasyonlar daha sık görülür. K-ras mutasyonu basit hiperplazilerde %10, adenomatöz hiperplazide %14 ve atipik hiperplazide %16-22 oranında saptanır (Sasaki H, 1993).E-cadherin hücre adezyonundan sorumludur. EK'larda azalmış e-cadherin ekspresyonu ileri evreyle ilişkilidir (Holcomb K,2002).

EK'da fms ekspresyonu ileri evre,kötü grade ve kötü prognoza işaretir.Meme ve over kanserlerinin %20-30'nda; EK'da %10-15 kadar bulunan Her-2/neu aşırı ekspresyonu uzak metastaz ve kötü prognozla ilişkilidir.

Tümör supressör genlerden insan kanserlerinde en sık saptanan P53 gen mutasyonu ; EK karsinogenezde geç gelişen olaylardan olup ekstrauterin yayılım ile bağlantılıdır. Genellikle tip2 EK'larda sık rastlanır (%20) ve ileri evre, kötü prognozla ilişkilidir (Mariani A, 2002).

PTEN 10'ncu kromozomun kısa kolunda bulunan bir fosfolipit fosfataz olup; mutasyonu ve delesyonu erken evre düşük grade iyi histolojik tipe işaret eder (Risinger JI,1998). PTEN mutasyonun endometrial hiperplazilerde de görülmesi EK patogenezinde erken bir rolü olduğunu düşündürmektedir (Latta E,2002).

Total hücresel DNA içeriğinin (ploidi) sitogenetik analizler ile araştırılmasıyla EK karsinogenezinde genetik bozuklukların rol alabileceği fikri gündeme gelmiştir. Akım sitometre analizlerinde EK'ların yaklaşık yarısında DNA içeriği diploid olarak saptanmıştır. Aneuploidi kötü histolojik özellikler, ileri evre, ileri grade, artmış MI ve azalmış sağkalım ile beraberdir (Berchuck A, 1995).

## 2.2. KRAS LCS6 Tek Gen Nükleotid Polimorfizmi

MikroRNA'lar (miRNA), genom üzerinde protein kodlayan intron veya ekzon bölgeleri ve protein kodlamayan bölgelerdeki RNA genlerinden transkripsiyonu sağlanan, fakat proteine translasyonu gerçekleştirilmeyen, fonksiyonel küçük RNA molekülleridir. miRNA'lar bir ya da birden fazla hedef geni baskılayarak hücrenin gelişim, farklılaşma, çoğalma, ölümü gibi farklı olaylarda rol oynarlar. miRNA genlerinin %50'sinden fazlası kanser ile ilişkilendirilmiş genom üzerinde bulunur. (Karagün BŞ, 2014). miRNA hedef mRNA'nın translasyona uğramayan 3' bölgesi( untranslated region 'UTR') veya open reading frame (ORF) bölgelerine bağlanırlar. 3'UTR bölgesine bağlanmasıyla eksik kusurlu komplementerlikle sonuçlanır ve translasyonun baskılanmasına neden olur (Saydam F, 2011).

Tümör süpresör özellik gösteren miRNA ailelerinden , let-7 ailesinin (let-7b, let-7c, let-7d, let-7f ve let-7g) insanlarda bulunan önemli bir onkogen olan RAS'ın aktivitesini kontrol ettiği bilinmektedir. Let-7 ailesinin üyeleri, RAS onkogenin mRNA'sını hedefleyen bir tümör süpresör fonksiyona sahiptir (Johnson, CD ,2005). KRAS, KRAS geni 3'UTR bölgesinde bulunan let-7 komplementer siteleri (LCS) aracılığıyla down regülasyona uğrar. Akciğer kanseri hücrelerinde altı numaralı LCS'de (LCS6) let-7 bağlanmasını modifiye eden bir tek gen nükleotid polimorfizmi tespit edilmiştir (4.pozisyonda Timin→Guanin, rs 61764370). Bu polimorfizm toplumda %5.8 oranında görülür (Chin, 2008). Bu variant alel orta derece sigara içme öyküsü olan küçük hücreli akciğer kanseri vakalarıyla ilişkili bulunmuştur (Nelson HH, 2008). Benzer şekilde aynı polimorfizm BRCA- herediter over ve meme kanserli hastalarda %25 oranında daha sık görülmüştür (Ratner ES, 2012).

KRAS LCS6 polimorfizminin ve jinekolojik kanserler arasındaki ilişkiyi gösteren bir çalışma; Ratner ve arkadaşları tarafından 2010 yılında yayınlanmış olup KRAS LCS6 polimorfizminin sahip kadınlarda BRCA negatif ailesel meme ve epiteliyal over kanseri gelişme riski ve bu kanserin platin resistans olup buna sekonder mortalitenin daha yüksek olduğu ifade edilmiştir(Ratner ES, 2012). KRAS LCS6 polimorfizminin endometriozis ile ilişkisinin incelendiği bir çalışmada insan endometriyal stromal hücreleri kültürlerinde KRAS miRNA ve protein ekspresyonunun artmış olduğu ve KRAS LCS6 polimorfizmi pozitif olan kadınlarda endometriyal stromal hücrelerin proliferasyon ve invazyonunun artmış olduğu ifade edilmiştir (Grechukhina O, 2012).

### **3. GEREÇ VE YÖNTEMLER**

#### **3.1. Hastaların Seçilmesi**

Bu prospektif çalışmaya, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'nda Ocak 2012 ve Ocak 2014 yılları arasında kliniğimize başvuran ve histopatolojik incelemesinde EK tanısı alıp opere olan ve jinekolojik şikayetlerle polikliniğe başvuran endometrial örnekleme yapıp benign histolojik tanı (proliferatif endometrium, sekretuar endometrium, endometrit v.b.) alan toplam 213 hasta dahil edildi. Çalışmada, hasta grubunda 33-77 yaşları arasında (ortalama  $55.90 \pm 8.58$ ) toplam 108 adet tip 1 ve tip 2 EK vakası, kontrol grubunda 41-72 yaşları arasında (ortalama  $58.3 \pm 5.5$ ) 105 adet benign histoloji rapor edilen kadın yer aldı.

Çalışmaya dahil edilen tüm hastalardan yaş, parite, boy, kilo açısından detaylı anamnez alındı. Ayrıca EK hastalarının evre, histolojik grade, LVI, toplanan toplam lenf nodu sayısı, toplanan paraaortik lenf nodu sayısı, pozitif pelvik ve paraaortik lenf nodu sayısı, MI ve sitoloji sonuçları kaydedildi. EK hasta grubunu histopatolojik olarak endometrioid (tip 1) ve seröz (tip 2) karsinomlar ve 2009 FIGO'nun cerrahi evreleme kriterlerine göre evre 1,2 ve 3'e ait hastalar oluşturmaktaydı.

Endometrium kanserli hastalarda eşlik eden sekonder kanser varlığında ve çalışmaya katılmak istemeyenler çalışma dışı bırakılırken, kontrol grubunda endometrial örnekleme sonucu endometrial hiperplazi ile uyumlu olanlar ve daha önceden kanser tanısı olanlar dahil edilmemiştir.

Çalışma için S.Ü Tıp Fakültesi Etik Kurulundan 2014/120 sayılı Etik Kurul Kararı ile onay alındı ve çalışmaya katılan tüm bireyler araştırma öncesi bilgilendirildi ve yazılı onamları alındı.

#### **3.2. KRAS 3'UTR LCS6 Polimorfizminin Tespiti**

Çalışmaya dahil edilen hastalara ait genetik çalışmaları, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na ait moleküler genetik laboratuvarında yürütülmüştür.

### **3.2.1. Araştırma Kanlarının Toplanması**

Çalışma ile ilgili bilgi verildikten sonra, teşhis esnasında genetik incelemeleri yürütmek amacıyla, hastalardan ve kontrol grubundan alınan 3 ml'lik periferik kan örneği EDTA'lı tüplere steril olarak alındı. Hasta ve kontrol grubuna ait bireylerden kan örneklerinden DNA izolasyonu yapılarak, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve restriksiyon enzim kesimi (RFLP) çalışmaları gerçekteştirildi

### **3.2.2. Kullanılan Malzeme ve Cihazlar**

- Soęutmalı santrifüj
- Vortex
- Hassas terazi
- Ayarlanabilir otomatik pipetler
- Shaker
- Thermal Cyclers
- Görüntüleme cihazı
- Elektroforez Tankı
- Güç Kaynaęı
- Mikrodalga Fırın
- Spektrofotometre
- -20 °C derin dondurucu

### **3.2.3. Kullanılan Kit ve Kimyasallar**

- Hot start long PCR Taq DNA Polimeraz
- dNTP seti
- PCR buffer
- Reverse-forward primer
- Restriksiyon enzimi
- Agaroz
- Etidyum Bromid
- Tris-Cl

- EDTA
- Etidyum Bromid
- Asetik Asit
- Loadingdye
- Etanol
- Glyserol
- Kloroform
- Proteinaz K
- dNTP
- Trizol
- Taq Polimeraz
- dNTP seti
- PCR buffer
- 25mM MgCl<sub>2</sub>
- Reverse-forward primer
- Restriksiyon enzimi
- Ladder 100 bp
- Agaroz
- Etidyum Bromid
- Tris
- EDTA
- Asetik Asit
- 6 x loading dye
- Etanol
- DNA İzolasyon Kiti
- RNA İzolasyon Kiti
- Harici c DNA Kiti
- DNase-I



### 3.2.4. DNA İzolasyonu

Alınan kan örneklerinden steril şartlarda sağlanan DNA izolasyon kiti kullanılarak spin klon yöntemiyle aşağıdaki şekilde DNA izolasyonu yapıldı.

- 1,5 ml'lik steril boş ependorf tüp içine 200 µl lizis tamponu konuldu.
- Lizis tamponunun üzerine 200 µl pellet ilave edildi.
- Pellet ve Lizis tamponu karışımının üzerine 20 µl Proteinaz-K ilave edilerek karıştırıldı.
- Karışım 56 °C'lik hot plate`de 10 dakika inkübasyonda tutuldu.
- Sürenin sonunda karışım vortekslendi.
- İnkübasyonun sonunda karışıma 200 µl %100 etil alkol ilave edilerek pipetaj yapıldı ve spin kolona aktarıldı.
- 5000 g'de 1 dk santrifuj edildi.
- Spin kolon her defasında yeni bir ependorf tüpe aktarılarak üzerine 500'er µl yıkama solüsyonu ilave edilerek 500 g'de 1'er dk ara ile yıkama işlemi yapıldı.
- İnkübatörde daha önce 56 °C' de ısıtılmış 200 µl distile su, spin kolona ilave edildi ve 5000 g'de 1 dk santrifuj edilerek spin kolondaki filtreye tutunan DNA ayrılmış oldu.
- Elde edilen DNA, PCR analizinde kullanana kadar -20 °C' de saklandı.

### 3.2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

KRAS geninin 3'UTR (untranslated region) bölgesinin 4. pozisyonunda (rs61764370) T>G baz değişimi bulunmaktadır. Bu polimorfizm analizi için PCR-restriksiyon enzim kesimi metodu kullanılarak elde edilen kesim ürünlerinin uzunluk değişimine bakılarak (PCR-RFLP; PCR- restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi) analiz yapıldı. Gen bölgesinde Timin nükleotidi bulunursa enzim kesimi gerçekleşirken Guanin nükleotidi varlığında kesim gerçekleşmedi.

Bunun için Reverse: 5'-AGTACCTAGGATTAT-3' ve Forward: 5'-CGTGTGCACTCACTA -3' primerleri kullanılarak polimorfik olabilecek bölge çoğaltıldı. Primerlerin dizaynı Selçuk Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilimdalı Prof Dr Hasan Acar tarafından gerçekleştirildi. Reaksiyon için aşağıdaki karışım hazırlandı (Grechukhina O, 2012).

PCR miks:

dNTP (her biri 10 pmol).....	1,5 µl
10 x PCR tamponu.....	2,5 µl
10 pmol primer .....	1 µl
Molekuler Grade dH <sub>2</sub> O.....	17,25 µl
DNA Taq polimeraz enzimi .....	0,25 µl
Genomik DNA .....	2,5 µl
TOPLAM .....	25 µl

PCR reaksiyonu aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi.

95 °C'de 10 dakika	}	1 döngü
95 °C'de 15 saniye		
58 °C'de 30 saniye	}	10 döngü
72 °C'de 45 saniye		
95 °C'de 15 saniye	}	25 döngü
56 °C'de 30 saniye		
72 °C'de 45 saniye		
72 °C'de 5 dakika	}	1 döngü

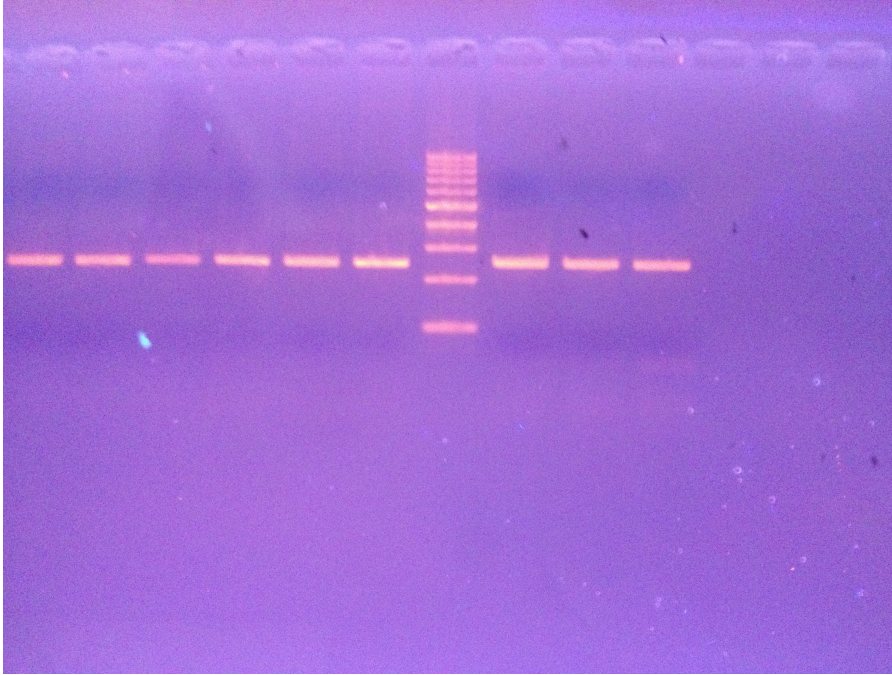
PCR ürününün 5 µl'si hazırlanan agaroz jelde yürütülerek 250 bp büyüklüğünde spesifik bandların olup olmadığı tespit edildi. Geri kalan 15 µl'lik PCR ürünü TfiI restriksiyon enzimi (Biolabs) kullanılarak kesildi. Bunun için aşağıdaki karışım kullanıldı:

Molekuler Grade dH <sub>2</sub> O .....	7 µl
Restriksiyon Enzim Buffer.....	2 µl
Restriksiyon Enzimi (TfiI) .....	2 µl
PCR ürünü.....	15 µl

### 3.2.6. Agaroz Jel Elektrofözezi

- 2 gr agaroz tartılarak 250 ml'lik bir erlenmayere konuldu ve üzerine 100 ml 1X TAE (Tris, Asetik asit ve EDTA) tamponu eklendi. Mikrodalga fırınında agar eriyene kadar yaklaşık 2 dakika tutuldu ve kaynatıldı.
- Eriyen agar solüsyonu oda ısısında bekletilerek yaklaşık 75°C'ye kadar soğutuldu ve 0.5mg/ml'lik etidyum bromür'den 100 µl ilave edildi.
- Daha önceden tarakları tabana yaklaşık 1 mm boşluk kalacak şekilde yerleştirilen elektroförez kabına, hazırlanan agaroz jel döküldü ve donması için oda sıcaklığında 20-30 dk. bekletildi.
- Taraklar her iki uçtan tutularak dikkatlice çıkartıldı ve jel kabı elektroförez tankına yerleştirildi.
- Jelde ortaya çıkan kuyucuklara total 12 µl olacak şekilde uygun DNA marker ve PCR ürünleri (10 µl PCR ürünü + 2 µl 6X loading dye yükleme tamponu) aktarıldı.
- Elektroförez 125 volt'da (12.5 volt/cm<sup>2</sup>) 20-30 dakika süreyle yapıldı.
- Ortaya çıkan bandlar UV illüminatörde (görüntü analiz sistemi) marker ile kıyaslanarak DNA'ların yürüdüğü mesafe belirlendi (Şekil 1).

Şekil 1: UV İllüminatörde DNA bantlarının marker ile kesilmiş görüntüsü



### 3.2.7. Restriksiyon Enzim Kesim Çalışmaları

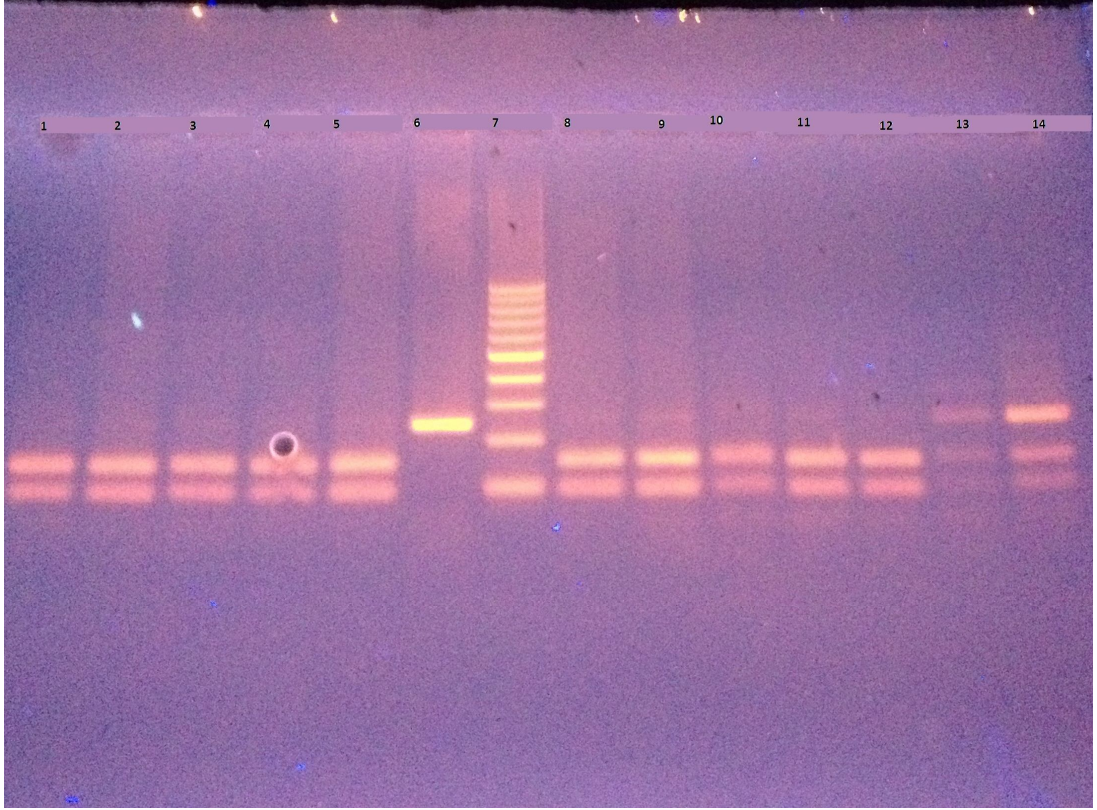
RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphism- restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi) sınırlanmış parçacık uzunluğu polimorfizmi adındaki yöntem ; genomik DNA' nın spesifik bir restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesilmesi ve DNA segmentlerinin agaroz jel elektroforez sisteminde ayrıştırılmasıyla oluşturulan, DNA profillerinin incelenmesine imkan tanıyan bir yöntemdir. Bakterilerde bulunan bu enzimler DNA' daki özgün dizileri tanıyarak kesme işlemini, tanıma bölgesinde veya bu bölgenin dışında başka özel bir dizide gerçekleştirirler. Bu yöntem ile tek nükleotit polimorfizmlerinin genotiplendirilmesi iki basamakta gerçekleştirilmektedir. İlk basamak DNA bölgesindeki SNP (Single Nucleotid Polymorphism-Tek Nükleotid Polimorfizmi) çevresindeki yaklaşık 200 baz çiftinin milyarlarca kez PCR ile çoğaltılarak, polimorfik bölgenin genotiplenmesi amacı ile PCR ürününün sekanslanmasına veya jel elektroforezinin ardından enzimle kesilmesine dayanmaktadır (Linn ve Arber 1968).

RFLP yönteminde, örnek DNA bir veya daha fazla restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesildikten sonra, elde edilen DNA fragmentlerinin moleküler büyüklükleri göre jel elektroforezde yürütülerek moleküler ağırlık standardı (marker) yardımıyla belirlenebilmektedir. Jel, ethidium bromid ile muamele edildikten sonra fragmentler UV ışık altında görünür hale getirilerek jel profilindeki bantların sayılarına, büyüklüklerine bakılarak genotiplenebilir ve lokusa ait genotip/allel sıklıkları saptanabilir.

Çalışmamızda KRAS geninin 3' UHT bölgesindeki LCS6 (let-7 complementary sites) polimorfik bölgelerinin genotip analizi RFLP yöntemi ile yapıldı.

Karışım su banyosunda 65°C'de 5-10 dk bekletildi. Bu sürenin sonunda elde edilen enzim kesim ürünleri jelde yürütüldükten sonra UV illüminator kullanılarak değerlendirildi ve fotoğrafları çekildi (Şekil 2).

Şekil 2. KRAS geninin 3' UHT bölgesindeki LCS6 polimorfizimi T>G değişimi için PCR jel elektroforez görüntüsü



1,2,3,4,5 ve 8,9,10,11,12. bireyler ( TT wildtype-normal), 6. birey ( GG homozigot mutant) 7 :marker (100 bp ladder\*), 13 ve 14. bireyler ( TG heterozigot mutant)\*bp: baz çifti

### 3.3. Verilerin İstatistiksel Analizi

Bu çalışmada elde edilen veriler SPSS 20 paket program aracılığıyla analiz edilmiştir. Elde edilen verilerin karşılaştırılmasında; kategorik verilerde bağımlılık testi olan Ki-Kare analizi,iki gruplu karşılaştırmalarda Mann-Whitney U testi,üç ve daha fazla gruplu karşılaştırmalarda ise Kruskal-Wallis H testi kullanılmıştır. Anlamlılık seviyesi olarak 0.05 kullanılmış olup,  $p < 0.05$  olması durumunda anlamlı farklılığın olduğu,  $p > 0.05$  olması durumunda ise anlamlı farklılığın olmadığı belirtilmiştir.

#### 4. BULGULAR

Çalışmamıza katılan EK hastalarının demografik özellikleri incelendiğinde; Tip 1 EK hastalarının ortalama yaşı  $56.9 \pm 8.1$  ve tip2 EK hastalarının ortalama yaşı  $51.7 \pm 12.4$  iken kontrol grubunun  $58.3 \pm 7.7$  idi. Tip 1, tip 2 ve kontrol grupları arasında yaş değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülememektedir ( $p > 0.05$ ). Tip1 EK  $2.8 \pm 2.1$  ortalama pariteye sahipken bu değer tip 2 ve kontrol grubunda sırasıyla;  $3.9 \pm 2.8$  ve  $2.4 \pm 1.5$  idi. Tip 1, tip 2 ve kontrol grupları arasında parite sayısı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülememekle beraber tip 2 grubu 3.9 ile en yüksek parite değerine sahiptir. ( $p > 0.05$ ). Tip1 grubunda yer alanların ortalama kilo değerleri (72,9) Tip2 (59,0) ve kontrol grubunda (64,6) yer alanlara göre daha yüksektir. Fakat Tip1, Tip-2, kontrol grupları arasında kilo değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık görülmektedir. ( $p < 0,05$ ) Tip 1 EK'in VKİ  $30 \pm 3.5$ , tip 2 EK'in  $24.1 \pm 4.4$  ve kontrol grubunun  $26.2 \pm 3.0$  olarak bulunmuştur. Tip1, Tip2, kontrol grupları arasında VKİ değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemektedir. ( $p > 0,05$ ) İstatistiksel olarak anlamlı fark olmamakla birlikte Tip1 grubu 30,0 ile en yüksek BMI değerine sahiptir. Tip2 grubunda BMI değeri 24,1 iken kontrol grubunda ise, 26,2'dir.

Tip 2 EK hasta sayısının son derece az olması sebebiyle polimorfizm varlığının değişkenlere etkisi incelenirken sadece Tip 1 EK hastaları incelendi. Polimorfizm olan ve olmayan hastaların demografik değişkenleri Tablo 5'te özetlenmiştir.

Tablo-5: Tip 1 EK hastalarında demografik özellikler

Endometrioid adenokarsinom hastaları (tip1)	Wild tip (Normal), TT n=83	Homozigot+Heterozigot KRAS LCS6 Polimorfizmi, GG ve TG n=16	P değeri
yaş	$56.5 \pm 8.0$	$58.9 \pm 8.4$	0.134
parite	$2.8 \pm 2.1$	$3.0 \pm 2.2$	0.711
boy	$157.6 \pm 5.3$	$157.4 \pm 3.7$	0.767
kilo	$72.4 \pm 8.2$	$75.7 \pm 15.4$	0.897
VKİ	$29.8 \pm 2.9$	$31.0 \pm 5.8$	0.651

VKİ (Vücut kitle indeksi), değerler ort± SD olarak verilmiştir

KRAS LCS6 polimorfizminin EK histolojik tipi ile ilişkisine bakıldığında 105 kişi kontrol 99 tip 1 EK hastası ve 9 tip 2 EK hastası çalışmada değerlendirildi. Kontrol grubu içerisinde polimorfizmin varlığı %12 iken tip 1 EK'lerinde %16 tip 2 EK'lerinde %22 olarak saptandı(p=0.609) Tablo 6'da gösterildiği gibi tip 2 EK'lerinde KRAS polimorfizmi (%22) tip 1 EK (%16) ve kontrol grubuna (%12) göre daha sık görülmektedir. Tip 2 EK sayısının az olmasından ötürü istatistiksel anlamlı fark yakalanamamıştır.

Tablo-6: EK ve kontrol grubu arasında polimorfizm ilişkisi

Hastalar	Wild tip (Normal) TT	Homozigot+Heterozigot KRAS LCS6 Polimorfizmi GG ve TG	Toplam sayı	P değeri
Kontrol	92 %87	13 %12	105	0.609
Endometrioid adenokarsinom hastaları tip1	83 %83	16 %16	99	0.609
Seröz adenokarsinom hastaları tip2	7 %77	2 %22	9	0.609

Değerler sayı, (yüzde) olarak verilmiştir.

Tip 1 EK'li hastaların patolojik özellikleri tablo 7'de görülmektedir. 99 Tip 1 EK hastası histopatolojik özellikleri KRAS LCS6 polimorfizmi açısından değerlendirildi. KRAS LCS6 polimorfizmi variant ve heterozigot/homozigot hastalar arasında evre,grade,MMI,LVI ve sitoloji açısından fark bulunamamıştır(p>0.05). İstatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber wild tip hasta grubunda MMI oranı(%86.7) KRAS variant hasta grubuna (%68.8) göre daha yüksek görülmektedir.Aynı şekilde wild tip hastalarda LVI varlığı KRAS variant hastalara göre daha az saptanmıştır (%9.6'ya karşılık %%18.8).Wild tip ve variant hastalarda pozitif paraaortik ve pelvik lenf nodu sayısı birbirine benzerdir.

Tablo-7: Tip 1 EK hastalarının patolojik özelliklerinin polimorfizm ile ilişkisi

Endometrioid adenokarsinom hastaları (tip1)	Wild tip (Normal) TT		Homozigot+Heterozigot KRAS LCS6 Polimorfizmi GG ve TG		P değeri
	Sayı	%	Sayı	%	
Stage					
1A,1B,2	74	%89.2	12	%75	0.319
3A,3B,3C	9	%10.8	4	%25	
Grade					
1,2	76	%91.5	15	%93.8	1
3	7	% 8.4	1	%6.3	
MMI					
≤ %50	72	%86.87	11	%68.8	0.129
≥%50	11	%13.3	5	%31.3	
LVI					
var	8	%9.6	3	%18.8	0.378
yok	75	%90.4	13	%81.3	
Sitoloji					
Pozitif	2	%2.4	0	%0	>0.05
Negatif	81	%97.6	16	%100	
Pozitif pelvik lenf nodu	0.6±2.0		0.4±1.0		0.822
Pozitif paraaortik lenf nodu	0.9±3.2		0.0±0.0		0.488

Değerler sayı, (yüzde) ve ort± SD olarak verilmiştir.



## 5. TARTIŞMA

Normal LCS6 let-7 bağlanma bölgesinin kaybı KRAS transkripsiyon ve translasyonunda artışla beraberdir. RAS proteinlerinin, tirozin kinaz mitojenik ve onkojenik etkisinde düzenleyici etkileri önemlidir. RAS aktivasyonu hücre ömrünü ve proliferasyonunu artırır (Khosravi-Far R, 1994; Schubert S, 2007).

Chin ve arkadaşları 2008 yılında LCS6 polimorfizm allel sıklığını 46 farklı populasyonda 2433 sağlıklı kişide araştırmış ve bu grupta %5.8 oranında LCS6 polimorfizm bölgesinde variant G aleli bulunduğunu tespit etmişlerdir. Bu polimorfizm Doğu Asya ve kızılderili toplumlarında yok denecek kadar az, Afrika toplumunda son derece nadir, Avrupa toplumunda ise %7 oranında tespit edilmektedir (Chin LJ ,2008).

Grechukhina ve arkadaşlarının 2012 yılında yayınladıkları; KRAS 3'-UTR üzerinde bulunan let-7 miRNA bağlanma bölgesi (LCS6) polimorfizminin endometriozis ile ilişkisini araştırdıkları çalışmada hücre kültüründe bu variant allel mevcudiyetinin endometriyal hücrelerde proliferasyon ve invazyon oranlarının artmış olduğunu göstermiş olmaları bu çalışmanın ilham kaynaklarından biridir. Bahis edilen çalışmada bu polimorfizm endometriozis tanısı alan hastalarda (%31) kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur (Grechukhina O, 2011).

KRAS variantının varlığının non-jinekolojik kanserlerle ilişkisi araştırılmış olup, Amerika populasyonunda küçük hücreli olmayan akciğer kanseri olgularında kontrol grubuna göre daha yüksek tespit edilmiştir (%18-20 vs. %12-14). Baş-boyun bölgesi kanserlerinde de kötü prognoz için genetik bir marker olarak kabul edilmektedir (Christensen B, 2009). Bu çalışmalarda hem hasta hem de sağlıklı dokuların neredeyse tamamında KRAS variantının heterozigot olduğu dikkati çekmektedir (Chin LJ, 2008). Bizim çalışmamızda ise KRAS variantının %77 oranında heterozigot olduğu tespit edilmiştir. Bu durum araştırmaların değişik kanser gruplarında yapılması ile alakalı olabileceği gibi, çalışma datasını oluşturan etnik grupların farklı olmasından da kaynaklanıyor olabilir.

Ratner ve arkadaşları 2010 yılında yayınladıkları çalışmalarında over kanseri olgularında KRAS variant allel sıklığını % 25 olarak tespit etmiş ve KRAS variant allelinin over kanseri gelişimi riskini artıran bir faktör olduğunu ifade etmişlerdir (Ratner E, 2010).

LCS6 polimorfizminin EK hastalarında sıklığını ve EK kliniği üzerine etkilerini araştıran tek çalışma 2014 yılında Lee ve arkadaşları tarafından yayınlanmıştır. Bu çalışmada LCS6 polimorfizmi tip 1 EK olgularında %16.7, tip 2 EK olgularında %24.3, kontrol vakalarında ise %13.9 oranında tespit edilmiştir (p=0.19). Bu sonuçlara göre LCS6 polimorfizminin genel olarak EK riskini artırmadığı ancak tip 2 EK riski için genetik bir marker olabileceği ifade edilmiştir. Bu çalışmada tip 1 EK'li 46 hastanın tümör spesimenleri ekspresyon profilleri ve genotiplerinden miRNA ve DNA izole edilmiş ve miRNA ekspresyon seviyeleri ve KRAS variant genotipinin hasta karakteristikleri, histopatolojik özellikler ve sağkalım ile ilişkisi incelenmiştir. LCS6 polimorfizminin yaş, hastalık evresi, histoloji, MI derinliği ve LVSI varlığı ile ilişkisi incelenmiş ve variant allel ve non-variant allel varlığı ile bu parametrelerin değişmediği ifade edilmiştir. Üç yıllık sağkalım oranları KRAS variant bulunan hastalarda %100, non-variant allel bulunan hastalarda ise %77 oranında tespit edilmiş olup (HR 0.3, p=0.24); istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir. Yazarlar bu durumun sınırlı hasta sayısı ve takip süresinin kısa olmasına bağlı olabileceği ifade etmişlerdir. KRAS variantının gen ekspresyonunu değiştirebileceği gibi miRNA ekspresyonunu da değiştirebileceğinden yola çıkarak tümör dokularında miRNA ekspresyon seviyelerini incelemişlerdir. miRNA ekspresyonunun yaş, LVSI ve KRAS variant mevcudiyeti ile değiştiği gösterilmiştir.(Lee LJ, 2014)

Bu çalışmamızda KRAS 3'-UTR üzerinde bulunan let-7 miRNA bağlanma bölgesi polimorfizminin (LCS6) tip 1 EK hastalarında %16.2, tip 2 EK hastalarında %22.2 oranında, tüm EK hastaları için hesaplandığında ise %38.4 oranında Lee'nin çalışmasına benzer oranlarda tespit edildiğini göstermiştir. Her ne kadar bizim çalışmamızda EK hastalarında tespit edilen variant allel sıklıkları, kontrol grubunda tespit edilen oranla (%13) karşılaştırıldığında muhtemelen küçük örneklem sayısına bağlı olarak istatistiksel olarak anlamlı olmasa da; dünya genelinde bu polimorfizmin insidansının %5.8 olduğu göz önüne alındığında, EK hastalarında tespit edilen polimorfizm oranlarının yüksekliği dikkati çekmektedir (Chin LJ, 2008).Histopatolojik değişkenlerin dağılımı incelendiğinde bizim çalışmamızda da Lee'nin sonuçlarına benzer şekilde variant ve non-variant allel taşıyan hastalarda istatistiksel farklılık tespit edilmemiştir.

Sınırlı hasta sayısı, tip 2 EK hasta sayısının azlığı nedeniyle ayrı bir grup olarak incelenememesi ve teknik yetersizlikler nedeni ile miRNA ekspresyonunun araştırılmamış olması bu çalışmanın limitasyonlarıdır.

## **6. SONUÇ ve ÖNERİLER**

EK hastalarında LCS6 polimorfizmi sıklığı kontrol grubuna göre anlamlı değişiklik göstermese de, geniş vaka sayısıyla yapılan çalışmalara göre yüksek olması dikkat çekicidir ancak LCS6 polimorfizmi varlığının EK histopatolojik karakteristikleri üzerine etkisi tespit edilmemiştir. LCS6 polimorfizmi mevcudiyetinin EK üzerine etkilerini daha fazla hasta sayısıyla inceleyecek araştırmalar; hastalığın genetik temeli, EK prognozunu etkileyebilecek faktörlerin tanınması, hastalık için risk altındaki bireylerin tanınması ve bireysel tedavi hedefleri belirlemek için son derece önemlidir.

## KAYNAKLAR

- Aalders J, et al. "Postoperative external irradiation and prognostic parameters in stage I endometrial carcinoma: clinical and histopathologic study of 540 patients." *Obstetrics & Gynecology* 56.4 (1980): 419-427.
- Anderson MC, Robboy SJ, Russel P, Morse A. Endometrial carcinoma. *Pathology of Female Reproductive Tract*. China: Churchill Livingstone 2002;331-359.
- Amant F, Moerman P, Neven P, Timmerman D, Van Limbergen E, Vergote I. Endometrial cancer. *Lancet* 2005;366:491-505.
- Attar E, Ata B. Gomel'in Jinekolojisi. Nobel Tıp Kitapevleri 2007
- Ayhan A, Kişnişçi H, Gökşin E, Durukan T et al: EK. Temel Kadın Hast. ve Doğum Bilg., Güneş Kitabevi 1996, 963-73.
- Ayhan A, Murat G, Polat D. Textbook of Gynaecological Oncology. Güneş Kitabevi 2009.
- Berchuck, Andrew, and Jeff Boyd. "Molecular basis of endometrial cancer." *Cancer* 76.S10 (1995): 2034-2040.
- Berchuck A, and Boyd J. Molecular basis of endometrial cancer. *Cancer* 1995;76: 2034.
- Benedetti Panici P, Basile S, Maneschi F, et al. Systematic pelvic lymphadenectomy vs no lymphadenectomy in early endometrial carcinoma: Randomised clinical trial. *J Nat Cancer Inst* 2008;100: 1707-1716.
- Berek, Jonathan S. "Novak's gynecology." *Journal of Midwifery & Women's Health* 48.3 (2003): 237-238.
- Bokhman JV. Two pathogenetic types of endometriyal carcinoma *Gynecol Oncol* 1983;15: 10-17.
- Boronow, R. C., et al. "Surgical staging in endometrial cancer: clinical-pathologic findings of a prospective study." *Obstetrics & Gynecology* 63.6 (1984): 825-832.
- Burkley CH, Fox H. *Biopsy Pathology of the Endometrium*. 2th Ed, London: 338 Euston Road, London NW1, 2001
- Burkley CH, Fox H. Carcinoma of the endometrium ( endometrial müllerian epithelial tumours).In Burkley CH, Fox H. *Biopsy Pathology of Endometrium*. 2 th ed, Italy: Arnold,2002;145-172.
- Chen, Jane L., Donald C. Trost, and Edward J. Wilkinson. "Endometrial papillary adenocarcinomas: two clinicopathological types." *International Journal of Gynecologic Pathology* 4.4 (1985): 279-288.
- Chin, Lena J., et al. "A SNP in a let-7 microRNA complementary site in the KRAS 3' untranslated region increases non-small cell lung cancer risk." *Cancer research* 68.20 (2008): 8535-8540.
- Chambers JT, Chambers SK. Endometrial sampling: When? Where? Why? With what? *Clin Obstet Gynecol* 1992; 35: 28-29
- Christensen, Brock C., et al. "A let-7 microRNA-binding site polymorphism in the KRAS 3' UTR is associated with reduced survival in oral cancers." *Carcinogenesis* 30.6 (2009): 1003-1007.

- Christiaens GCML, Sixma JJ, Haspels AA, Hemostasis in menstrual endometrium: a review, *Obstet Gynecol survey* 37: 281, 1982.
- Creutzberg CL, van Putten WL, Koper PC, et al. PORTEC study group. Postoperative radiation therapy in endometrial carcinoma. Surgery and postoperative radiotherapy versus surgery alone for patients with stage1 endometrial carcinoma: multicentre randomised trial. *Lancet* 2000; 355: 1404-1411
- Dijkhuizen FPHLJ, Mol BWJ HAM, Brokman HAM, et al. The accuracy of endometrial sampling in the diagnosis of patients with endometrial carcinoma and hyperplasia: a meta-analysis. *Cancer* 2000;89: 1765-1772.
- DiSaia PJ et al. "Risk factors and recurrent patterns in stage I endometrial cancer." *American journal of obstetrics and gynecology* 151.8 (1985): 1009-1015.
- Dubeshter Brent, et al. "Endometrial carcinoma: the relevance of cervical cytology." *Obstetrics & Gynecology* 77.3 (1991): 458-462.
- Enomoto T. Inoue M. Perantoni A. O. Terakawa N. Tanizawa O. and Rice J. M. K-ras activation in neoplasms of the human female reproductive tract. *Cancer Res.* 50: 6139-6145.1990
- Enomoto T et al.,K-ras activation in premalignant and malignant epithelial lesions of the human uterus. *Cancer Res.* 51: 5308-5314, 1991.
- Fortier, Kenneth J. "Postmenopausal bleeding and the endometrium." *Clinical obstetrics and gynecology* 29.2 (1986): 440-445.
- Fujimoto, Ikuno, et al. "Studies on ras oncogene activation in endometrial carcinoma." *Gynecologic oncology* 48.2 (1993): 196-202.
- Gray H. The urogenital system. In: Goss CM, ed. *Anatomy of the human body*, 29 th ed. 1973; 1339-1265.
- Grechukhina, Olga, et al. "A polymorphism in a let-7 microRNA binding site of KRAS in women with endometriosis." *EMBO molecular medicine* 4.3 (2012): 206-217.
- Hanson MB, Van Nagell JR, Powell DE, et al. The prognostic significance of lymph-vascular space invasion in stage I endometrial cancer. *Clin Cancer* 1985;55: 1753-1757.
- Hendrickson MR, et al. "Uterine papillary serous carcinoma: a highly malignant form of endometrial adenocarcinoma." *The American journal of surgical pathology* 6.2 (1982): 93-108.
- Hendrickson MR, Kempson LR. Uterus and fallopian tubes. Stenberg SS, In *histology for pathologists*. Ist. New York: Raven pres; 1992;797-835
- Hidemitsu Mizuuchi, Suhail Nasim, Ryuichi Kudo et al. Clinical Implications of K-ras Mutations in Malignant Epithelial Tumors of the Endometrium. *Cancer Res.* 1992;52:2777-2781. Published online May 1, 1992
- Holcomb K, et al. "E-cadherin expression in endometrioid, papillary serous, and clear cell carcinoma of the endometrium." *Obstetrics & Gynecology* 100.6 (2002): 1290-1295.
- Inoue, M. "Current molecular aspects of the carcinogenesis of the uterine endometrium." *International Journal of Gynecological Cancer* 11.5 (2001): 339-348.
- Jhang, Helen, et al. "CA 125 levels in the preoperative assessment of advanced-stage uterine cancer." *American journal of obstetrics and gynecology* 188.5 (2003): 1195-1197.
- Johnson, Charles D., et al. "The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells." *Cancer research* 67.16 (2007): 7713-7722.

- Kadar N, Malfetano JH, Homesley HD. Determinants of survival of surgically staged patients with endometrial carcinoma histologically confined to the uterus: implications for therapy. *Obstet Gynecol* 1992;80: 655-659.
- Kaku T, Tsuruchi N, Tskumoto N, et al. Reassessment myometrial invasion in endometrial carcinoma. *Obstet Gynecol* 1994;84: 979-982.
- Karagün, Barbaros Şahin, et al. "Mikro RNA ve Kanser." *Türk Klinik Biyokimya Derg* 2014; 12(1): 45-56
- Karlsson, Bengt, et al. "Transvaginal ultrasonography of the endometrium in women with postmenopausal bleeding—a Nordic multicenter study." *American journal of obstetrics and gynecology* 172. 5 (1995): 1488-1494.
- Khosravi-Far R, and Channing J. Der. "The Ras signal transduction pathway." *Cancer and Metastasis Reviews* 13. 1 (1994): 67-89.
- Kitchener H, Swart AM, Qian Q, et al. ASTEC Study Group. Efficacy of systematic pelvic lymphadenectomy in endometrial cancer (MRC ASTEC trial): a randomised study. *Lancet* 2009;373:125-136.
- Latta, Eleanor, and William B. Chapman. "PTEN mutations and evolving concepts in endometrial neoplasia." *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* 14.1 (2002): 59-65.
- Lester D. R., and Cauchi M. N. Point mutations at codon 12 of K-ras in human endometrial carcinomas. *Cancer Lett.*51: 7-10, 1990
- Liao BS, Twigs LB, Leung B S, et al. Cytoplasmic estrogen and progesterone receptors as prognostic parameters in primary endometrial carcinoma. *Obstet Gynecol* 1986;67 :463-467
- Linn, S., and W. Arber. "In vitro restriction of phage fd replicative form." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 59 (1968): 1300-1305.
- Lurain JR, Rice BL, Rademaker AW, et al. Prognostic factors associated with recurrence in clinical stage 1 adenocarcinoma of the endometrium. *Obstet Gynecol* 1991;78 :63-69.
- Mariani A, Webb MJ, Keeny GL, et al. Low risk corpus cancer: is lymphadenectomy or radiotherapy necessary? *Am J Obstet Gynecol* 2000;182:1506-1519.
- Mariani A, Webb MJ, Keeney GL, Aletti G, Podratz KC. Assessment of prognostic factors in stage 3A endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2002;86(1):38-44
- M. Esteller, A. Garcia, M. Martinez Palones, J. Xercavins, J. Reventos. Clinicopathological Significance of K-ras Mutation and Gene Amplification in Endometrial Cancer. *European Journal of Cancer* Vol. 33, No. 10, pp. 1572-1577, 1997
- Molecular Basis of Cancer, 2nd ed. Mendelsohn J, Howley PM, Israel MA and Liotta LA (eds) (2001). Philadelphia: Saunders
- Moore DH, et al. "Morbidity of lymph node sampling in cancers of the uterine corpus and cervix." *Obstetrics & Gynecology* 74.2 (1989): 180-184.
- Morrow CP, Bundy BN, Kurman RJ, et al. Relationship between surgical- pathological risk factors and outcome in clinical stage 1 and 2 carcinoma of the endometrium: A Gynecologic Oncology Group Study. *Gynecol Oncol* 1991; 40: 55-65.
- Mutter GL: Endometrial intraepithelial neoplasia: will it bring order to chaos? The Endometrial Collaborative Group. *Gynecol Oncol*, 2000; 76:278-290.

- Nelson, H. H., et al. "KRAS mutation, KRAS LCS6 polymorphism, and non-small cell lung cancer." *Lung Cancer* 69 .1 (2010): 51-53.
- Norris HJ, F. A. Tavassoli, and Robert J. Kurman. "Endometrial hyperplasia and carcinoma: Diagnostic considerations\*." *The American journal of surgical pathology* 7.8 (1983): 839-847.
- Noyes RW, Hertig AW, Rock J, Dating the endometrial biopsy, *Fertil Steril* 1950; 1 :3.
- Jemal, Ahmedin, et al. "Cancer statistics, 2006." *CA: a cancer journal for clinicians* 56 .2 (2006): 106-130.
- Orr JR, James W., et al. "Surgical staging of uterine cancer: an analysis of perioperative morbidity." *Gynecologic oncology* 42.3 (1991): 209-216.
- Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Raymond L, Yound J. *Canceincidence in five continents*, vol. 7. Lyon: IARC; 1997
- Pecorelli S. "Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium." *International Journal of Gynecology & Obstetrics* 105.2 (2009): 103-104.
- Purdie DM. Gren AC. *Epidemiology of endometrial cancer*. Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol. 2001;15: 341.
- Ratner, E. S., et al. "A KRAS variant is a biomarker of poor outcome, platinum chemotherapy resistance and a potential target for therapy in ovarian cancer." *Oncogene* 31.42 (2012): 4559-4566. Etseller M, Xercavins J, Reventos J. *Advances in the molecular genetics of endometrial cancer* (Review). *Oncol. Rep.* 1999;6: 1377
- Ronnett BM, Zaino RJ, Ellenson LH, Kurman RJ. *Endometrial Karsinom in: , Kurman RJ Blaustein's Pathology of the female genital tract*. 5th. ed. USA: Springer, 501-559, 2002
- Risinger, John I., et al. "PTEN mutation in endometrial cancers is associated with favorable clinical and pathologic characteristics." *Clinical cancer research* 4.12 (1998): 3005-3010.
- Ross, Jon C., et al. "Primary mucinous adenocarcinoma of the endometrium: A clinicopathologic and histochemical study." *The American journal of surgical pathology* 7.8 (1983): 715-729.
- Sasaki H, et al. Mutation of the Ki-ras protooncogene in human endometrial hyperplasia and carcinoma. *Cancer Res* 1993;53: 1906- 1910
- Saydam F, Değirmenci İ, Güneş HV. Mikro RNA'lar ve kanser. *Dicle Medical Journal* 2011; 38(1):113-20.
- Schink JC, Rademaker AW, Miller DS, et al. Tumor size in endometrial cancer. *Cancer* 1991; 67:2791-2794
- Schubbert S, Shannon K and Bollag K ."Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer." *Nature Reviews Cancer* 7 .4 (2007): 295-308.
- Shushan, Asher, et al. "Hysteroscopic treatment of intrauterine lesions in premenopausal and postmenopausal women." *The Journal of the American Association of Gynecologic Laparoscopists* 9.2 (2002): 209-213.
- Smith, Robert A., et al. "American Cancer Society guidelines for the early detection of cancer: update of early detection guidelines for prostate, colorectal, and endometrial cancers: Also: update 2001—testing for early lung cancer detection." *CA: a cancer journal for clinicians* 51.1 (2001): 38-75.



- Smith, Robert A., et al. "American Cancer Society guidelines for the early detection of cancer." *CA: a cancer journal for clinicians* 52.1 (2002): 8-22.
- Sosolw RA, Pirog E, Isacson C. Endometrial intraepithelial carcinoma with associated peritoneal carcinomatosis. *Am J Sur Pathol*,2000; 24 (5):726-732.
- Todo Y et al. "Survival effect of para-aortic lymphadenectomy in endometrial cancer (SEPAL study): a retrospective cohort analysis." *The Lancet*375.9721 (2010): 1165-1172.
- Tsugawa, Kouji, et al. "Biological role of phosphatase PTEN in cancer and tissue injury healing." *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library* 7 (2002): e245-51.
- Uslu T. Yörükoğlu K.Oktay E. Uslu T , *Endometrium Kanseri, Jinekolojik Onkoloji, Dokuz Eylül Yayınları, İzmir 1998, 126-8.*
- Zaino, R. J., et al. "The significance of squamous differentiation in endometrial carcinoma. Data from a Gynecologic Oncology Group study." *Cancer* 68.10 (1991): 2293-2302.
- Zaino RJ, Kurman RJ, Diana KL ,et al. Pathologic models to predict outcome for women with endometrial adenocarcinoma. *Cancer* 1996; 77: 1115-1121.
- Zaino RJ, Davis ATL, Ohlsson-Wilhelm BM, et al. DNA content is an independent prognostic indicator in endometrial adenocarcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 1998;17: 312-319.
- Wilson TO, Podratz KC, Gaffey TA, et al. Evaluation of unfavorable histologic subtypes in endometrial adenocarcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 1990;162:418-426.

## ÖZET

T.C. SELÇUK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

### KRAS LCS6 POLİMORFİZMİ ve ENDOMETRİYUM KANSERİ

Dr.Feyza Nur İNCESU

KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

TIPTA UZMANLIK TEZİ/ KONYA-2014

**Amaç:** Kras mutasyonunun endometriyum hiperplazi ve kanseri ile ilişkili olduğu bilinmektedir. KRAS 3' UHT bölgesindeki LCS6 polimorfizmi toplumda %5.8 görülürken bu oran epitelyal over kanseri hastalarında %25'tir. Biz bu tez çalışmamızda KRAS LCS6 mutasyonunun endometriyum kanseri(EK) ile ilişkisini araştırmayı amaçladık.

**Metod:** Bu çalışmaya EK dışı nedenler ile histerektomi yapılan 105 hasta (Grup 1) ve EK 108 hasta (Grup 2) dahil edildi. İkinci gruptaki olgular; histolojik özellikler, kanser evresi, grade, tümör çapı, myometrial invazyon, lenfovasküler invazyon, sitoloji, pozitif lenf nodu açısından sınıflandırıldı. Tüm grupların kan örneklerinde hastanemiz genetik laboratuvarı tarafından KRAS LCS6 mutasyonu incelendi. Çalışmada kategorik verilerde bağımlılık testi olan Ki-Kare analizi, iki gruplu karşılaştırmalarda Mann-Whitney U testi, üç ve daha fazla gruplu karşılaştırmalarda ise Kruskal-Wallis H testi kullanılmıştır

**Bulgular:** Grup 1 ve grup 2'deki hastalarda yaş, parite, VKI açısından istatistiksel anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Endometriyum kanserli hastalardan KRAS LCS6 mutasyonu oranı %38.4 olarak saptanırken bu oran kontrol grubunda %12.4 olarak bulundu. Endometriyum kanserli vakalarda LCS6 mutasyonu histolojik tip, grade, evre, lenfovasküler invazyon, myometrial invazyon, sitoloji, lenf nodu tutulumu ile ilişkili bulunmadı.

**Sonuç:** EK hastalarında LCS6 polimorfizmi sıklığı kontrol grubuna göre anlamlı değişiklik göstermese de ( $p=0.609$ ), geniş vaka sayısı ile yapılan çalışmalara göre yüksek olması dikkat çekicidir ancak LCS6 polimorfizmi varlığının EK histopatolojik karakteristikleri üzerine etkisi tespit edilmemiştir ( $p>0.05$ ). LCS6 polimorfizmi mevcudiyetinin EK üzerine etkilerini daha fazla hasta sayısı ile inceleyecek araştırmalar; hastalığın genetik temeli, EK prognozunu etkileyebilecek faktörlerin tanınması, hastalık için risk altındaki bireylerin tanınması ve bireysel tedavi hedefleri belirlemek için son derece önemlidir.

**Anahtar kelimeler:** genetik; mutasyon; KRAS LCS6; endometriyum kanseri

## SUMMARY

### KRAS LCS6 POLYMORPHISM AND ENDOMETRIAL CANCER

Feyza Nur İNCESU, MD

GYNECOLOGY AND OBSTETRICS CLINIC

RESIDENCY GRADUATE THESIS / KONYA 2014

**Aim:** : It is well known that KRAS mutation is correlated with endometrial hyperplasia and carcinoma. While LCS 6 polymorphism in 3' UTR of KRAS gene is observed 5.8 % in population; it is prevalence is 25 % in epithelial ovarian cancer. We evaluated KRAS LCS 6 mutation's relation to endometrial cancer (EC) in this study.

**Method:** Hysterectomy performed 105 patients for non- EC reasons (Group 1) and 108 patients for EC reasons (Group 2) were included to this study. Second group's patients were classified according to hystological features, carcinoma stage, tumor diameter, myometrial invasion, lympho-vascular invasion, cytological results and positive lymph nodes. Blood samples of both groups were screened for KRAS LCS 6 mutation. Chi-square analysis as correlation test for categorical data, Mann-Whitney test for double groups comparation, Kruskall-Wallis test for triple groups comparation were performed.

**Results:** :No significant difference for age, parity and BMI criteria were found between two groups. KRAS LCS 6 polymorphism incidence 38.4 % was found in EC group while 12.4 in control group. No correlation between LCS 6 polymorphism and hystological type, grade, lympho-vascular invasion, myometrial invasion, cytology, lymph node invasion were found.

**Conclusion:** Even if there is no significant difference between EC and control groups;it is important that LCS6 polymorphism prevalence is higher than large populated studies.No correlation between LCS 6 polymorphism and hystological-pathological characteristics.More populated investigations on effects of LCS 6 polymorphism on EC is necessary to find out genetical basis of disease, recognizing factors that would change EC prognosis, recognizing individuals under risk and determine individual treatment targets.

**Keywords:** genetics; mutation; KRAS LCS6; endometrial cancer.

# ETİK KURULU KARARI

T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI

## GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARARLARI

Toplantı Sayısı: 2014/8

Toplantı Tarihi : 15.04.2014

**Karar Sayısı 2014/120** S.Ü. Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd.Doç.Dr. Özlem Seçilmiş KERİMOĞLU'nun, "KRAS Mutasyonu, KRAS LCS6 Polimorfizmi ve Endometrium Kanseri" başlıklı araştırmasının değerlendirilme talebi ile ilgili 01.04.2014 tarihli dilekçesi ve ekleri görüşüldü.

Yapılan inceleme ve görüşmelerden sonra; Yrd.Doç.Dr. Özlem Seçilmiş KERİMOĞLU'nun, "KRAS Mutasyonu, KRAS LCS6 Polimorfizmi ve Endometrium Kanseri" adlı araştırmanın kabulüne, BAP desteği alındıktan sonra protokolün dosyaya ilave edilmek üzere Etik Kurul sekreteryasına teslim edilmesine oy birliği ile karar verildi.

ASLI GİBİDİR  
15/04/2014  
Mahmut KESİK  
Sekreteryas

EK :  
Karar

Selçuk Üniversitesi Alaeddin Keykubad Yerleşkesi Selçuklu - Konya 42131 Türkiye Ayrıntılı bilgi için irtibat: Mahmut Kesik  
Tel:3322412181 Faks:3322412184  
E-Posta :dekanliktip@selcuk.edu.tr Elektronik Ağ :www.selcuk.edu.tr

Bu belge, 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununa göre Güvenli Elektronik İmza ile imzalanmıştır.

## AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU

### I. BİLGİLENDİRME

Selçuk Üniversitesi Selçuklu Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı bünyesinde yapılan “**KRAS LCS6 POLİMORFİZMİ ve ENDOMETRİUM KANSERİ**” isimli çalışmada kişisel bir takım bilgilerin kadınlarda endometriyum-rahim kanseri gelişimine etkisi araştırılmaktadır.

Bu çalışmaya dahil olmayı kabul eden hastalara polikliniğe başvuru nedenlerinin gerektirdiğinin haricinde hiçbir ek muayene uygulanmayacaktır. Çalışmada değerlendirilecek materyal operasyonda alınan patoloji spesmenleri ve yine hastalar normal başvuru sebeplerinin gerektirdiği kan tetkiklerini verecek; çalışma için ek kan örneği alınmayacak, araştırma rutin verilen kan örneklerinden artan materyallerden veya rutin değerlendirme tamamlandıktan sonra incelenecektir.

Bu incelemeler için hastalarımız hiçbir parasal yük altına girmeyeceklerdir. Eğer bu araştırmaya katılırsanız size ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında büyük özen ve saygı ile yaklaşılabilecektir. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgileriniz ihtimamla korunacaktır.

Çalışmaya dahil olmayı kabul eden ve etmeyen tüm hastalar mevcut sağlık problemleri ve başvuru nedenleri ile ilgili tüm sağlık hizmetlerinden faydalanacaklar ve tanı-tetkik ve tedavi süreçleri aksamayacaktır.

### II. GÖNÜLLÜ BEYANI:

Sayın Dr..... tarafından Selçuk Üniversitesi Selçuklu Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'nda tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılabileceğine inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi. Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. *(Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağını bilincindeyim)*

Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır. İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; bu sağlık kuruluşuna her zaman başvurabileceğimi biliyorum.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersen, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi basıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” olarak yer alma kararımı aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum. İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

**Katılımcı\***

Adı, soyadı:

Adres:

Tel.

İmza

**Görüşme tanığı**

Adı, soyadı:

Adres:

Tel.

İmza:

**Katılımcı ile görüşen hekim**

Adı soyadı, unvanı:

Adres:

Tel.İmza:

## ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında İstanbul'da doğdum. Babam göz hastalıkları uzman, annem kadın hastalıkları uzmanı olup 2 kardesim var.

Konya İnkilap İlkokulu (1996), Konya Meram Anadolu Lisesi (2000), Özel Büyükkoyuncu Fen Lisesini (2003), Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesini (2009) bitirdim.

2010 yılından itibaren Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Doğum Kliniğinde araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım.