

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ



ENDOMETRİUM KANSERİ VE ENDOMETRİAL HİPERPLAZİ
DOKULARINDA 2D-DIGE YÖNTEMİYLE PROTEOMİK
ANALİZİ

DR. YAŞİN CEYLAN

KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

UZMANLIK TEZİ

2016

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

ENDOMETRİUM KANSERİ VE ENDOMETRİAL HİPERPLAZİ
DOKULARINDA 2D-DIGE YÖNTEMİYLE PROTEOMİK
ANALİZİ

DR. YASİN CEYLAN

KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. İZZET YÜCESOY

3001-TÜBİTAK-Başlangıç AR-GE Projeleri Destekleme Programı

Proje Numarası: 214S323

ETİK KURUL ONAYI: 01.09.2015

KOÜ KAEK: 2014/244

2016

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimimi aldığım Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı 'nda eğitim ve öğrenimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlanma olanağı bulduğum başta Anabilim Dalı Başkanımız ve tez danışmanım Prof. Dr. İzzet Yücesoy olmak üzere , Prof.Dr. Aydın Çorakçı 'ya, Prof.Dr. Gülseren Yücesoy 'a, Prof.Dr. Birol Vural 'a, Prof.Dr. Sebiha Özdemir Özkan 'a, Doç.Dr. Emek Doğer 'e, Doç.Dr. Ahmet Yiğit Çakıroğlu 'na ve Uzm. Dr. Yasemin Doğan 'a ayrıca asistanlığım sürecinde çalışma fırsatı bulduğum ,yardımlaştığım ve tezimde emeği geçen tüm doktor arkadaşlarıma ve Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı 'nın vefakar tüm çalışanlarına en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tezim sürecinde desteklerini esirgemeyen başta Yrd.Doç.Dr. Gürler Akpınar 'a, Prof.Dr. Murat Kasap 'a, Yrd.Doç.Dr.Aylin Kanlı 'ya ve tüm Kocaeli Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırmalar Merkezi Protein Araştırmaları ve Proteom Birimi Laboratuvarı çalışanlarına ve Patoloji Anabilim Dalı 'ndan Prof. Dr. Bahar Müezzinoğlu 'na teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde sonsuz sevgisi ve emeği olan başta sevgili aileme, dostlarıma ve öğrenim hayatımdaki tüm hocalarıma teşekkür ederim.

Sevgisiyle ve emeğiyle her zaman yanımda olan sevgili eşim Büşra Ceylan 'a ve hayatımızın küçük misafiri güzel kızım Eylül Evin Ceylan 'a sonsuz teşekkür ve sevgilerimle...

Dr. Yasin Ceylan

Şubat 2016, Kocaeli

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa Numarası

1	ÖNSÖZ.....	iii
2	KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ.....	viii
3	ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
4	TABLolar DİZİNİ	xiv
5	GİRİŞ VE AMAÇ	1
6	GENEL BİLGİLER.....	3
6.1.	EPİDEMİOLOJİ	3
6.2.	RİSK FAKTÖRLERİ.....	4
6.2.1.	Sosyo-Ekonomik Seviye	4
6.2.2.	Heredité ve Aile Öyküsü	4
6.2.3.	Menstrüel Faktörler	4
6.2.4.	Reproduktif Faktörler	5
6.2.5.	Östrojenler	5
6.2.5.1.	Endojen Östrojenler	5
6.2.5.2.	Hormon Replasman Tedavisi	5
6.2.5.3.	Oral Kontraseptifler	6
6.2.5.4.	Tamoksifen	6
6.2.6.	Obezite.....	6
6.2.7.	Diabet ve Hipertansiyon	7
6.2.8.	Diyet ve Alkol	7
6.3.	ENDOMETRİUMUN PREKANSERÖZ LEZYONLARI.....	7
6.3.1.	Endometrial Hiperplazi.....	7
6.3.2.	Endometrial İntraepitelyal Neoplazi	8
6.4.	ENDOMETRİUM KANSERİNDE TARAMA	10
6.5.	KLİNİK BULGULAR.....	10
6.6.	TANI	11
6.6.1.	Muayene.....	11
6.6.2.	Papanicolaou Testi.....	11

6.6.3.Endometrial Biyopsi	12
6.6.4.Histeroskopi	12
6.6.5. Laboratuvar Testleri.....	12
6.6.6.Görüntüleme Yöntemleri	12
6.6.6.1.Ultrasound	12
6.6.6.2.Bilgisayarlı Tomografi (BT).....	13
6.6.6.3.Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG).....	13
6.7. PATOLOJİ	13
6.7.1. Endometrioid Adenokarsinom	14
6.7.2.Müsinöz Adenokarsinom	15
6.7.3.Seröz Adenokarsinom.....	15
6.7.4.Şeffaf Hücreli Adenokarsinom	15
6.7.5.Mikst Adenokarsinom.....	15
6.7.6.Skuamöz Hücreli Karsinom.....	16
6.7.7.Transizyonel Hücreli Karsinom.....	16
6.7.8.Küçük Hücreli Karsinom	16
6.7.9.Andiferansiye Karsinom	16
6.8. ENDOMETRİUM KANSERİNDE YAYILIM ŞEKİLLERİ	16
6.9. EVRELEMESİ	16
6.10. PROGNOSTİK FAKTÖRLER.....	18
6.10.1. Yaş.....	19
6.10.2. Histolojik Tip.....	19
6.10.3. Histolojik Grade	19
6.10.4. Myometriyal İnvazyon	19
6.10.5. Lenfovasküler Alan İnvazyonu.....	19
6.10.6. İstmik-Serviks Yayılımı	19
6.10.7. Lenf Nodu Metastazi	19
6.10.8. Tümör Büyüklüğü.....	20
6.10.9. Periton Sitolojisi	20
6.10.10. Hormon Reseptör Yapısı.....	20
6.10.11. Dna Ploidi.....	20
6.10.12. Genetik / Moleküler Değişiklikler.....	20
6.11. TEDAVİ.....	21
6.11.1. Cerrahi	21

6.11.2. Postoperatif Tedavi.....	22
6.11.2.1. Radyoterapi	22
6.11.2.1.1. Primer radyoterapi.....	22
6.11.2.1.2. Adjuvan Radyoterapi	22
6.11.2.2. Adjuvan Kemoterapi	23
6.11.2.3. Hormonal Tedavi.....	23
6.12. PROTEOMİK ANALİZİ	23
6.12.1. Tıpta Proteomik Kullanım Alanları	24
6.12.2. Jinekoloji Ve Obstetri’de Proteomik Çalışmaları	25
6.12.3. Endometrium Kanserinde Proteomik Analizi.....	26
6.12.4. Çalışmada Anlamlı Olarak Tespit Ettiğimiz Proteinlerin Genel Bilgileri	27
6.12.4.1. K2C8.....	27
6.12.4.2. UAP56.....	27
6.12.4.3. PDIA3.....	28
6.12.4.4. ENOA.....	28
6.12.4.5. TRFE.....	29
6.12.4.6. ACTB	29
6.12.4.7. GRP78.....	30
6.12.4.8. GSTP1	30
6.12.4.9. ACTG.....	31
6.12.4.10. PSME1.....	31
6.12.4.11. CAH1.....	32
6.12.4.12. SOD1.....	32
6.12.4.13. CALR.....	33
6.12.4.14. ANXA1.....	33
6.12.4.15. PPIA/B.....	33
6.12.4.16. RSSA.....	34
6.12.4.17. EF-Tu.....	34
6.12.4.18. HSPB1.....	35
6.12.4.19. IDHc.....	35
7 GEREÇ VE YÖNTEM.....	36
7.1. Çalışma Gruplarının Belirlenmesi	36

7.2. Örneklerden Protein Özütlerinin Hazırlanması	38
7.3. Protein Örneklerinin TCA-Aseton Çöktürmesi Yöntemi ile Temizlenmesi.....	38
7.4. Protein Konsantrasyonunun Tayini	39
7.5. Protein Örneklerinin Odaklanmaları ve 2D Jel Elektroferezleri	39
7.6. DIGE (Difference Gel Electrophoresis) Analizi.....	40
7.7. SPOT Analizi ve Spot Kesimi	42
7.8. In-Gel Tripsin Kesimi ve Zip-Tip C18.....	42
7.9. MALDI TOF-TOF Analizi	43
8 BULGULAR	44
8.1. Tüm Grupların Sağlıklı Endometrium Dokusuyla DIGE Deney Planı.....	44
8.2. MALDI Sonuçları	46
8.3. DENEYLER	46
8.3.1. Deney I	46
8.3.2. Deney II	50
8.3.3. Deney III.....	51
8.3.4. Deney IV	52
8.3.5. Deney V	53
8.3.6. Malign Dokuların Kompleks Atipili Endometrial Hiperplazi Dokusuyla Dige Deney Planı (Deney VI)	54
9 TARTIŞMA.....	58
10 SONUÇ.....	72
11 ÖZET	74
12 SUMMARY	76
13 KAYNAKLAR.....	78

2. KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

μL: Microlitre

2D DIGE: Two-Dimensional Difference Gel Electrophoresis

2D: Two-dimensional gel electrophoresis

ABD : Amerika Birleşik Devleti

ACN: Asetonitril

ACTB: β-aktin

ACTG: γ-aktin

ANXA1: Annexin A1

ATP: Adenin trifosfat

ATPaz : Adenin trifosfataz

BAT1: HLA B ilişkili transkript 1

BCA: Bicinchoninic acid

BST2 :Bone marrow stromal cell antigen 2

BT: Bilgisayarlı Tomografi

CAH1: Carbonic anhydrase 1

CALR: Calreticulin

CD171: L1 cell adhesion molecule

CHAPS: 3-[(3-Kholamidopropyl)dimethyl-ammonio]-1-propanesulfonat

Cu: Bakır

D&C: Dilatasyon&küretaj

DNA: Deoksiribonükleik Asit

DTT: Dithiothreitol

E-FABP: Epidermal fatty acid binding protein

EF-Tu: Elongation factor Tu

EH: Endometrial hiperplazi

EİN: Endometrial intraepitelyal neoplazi

ENOA: α-Enolaz

EnR: Endoplazmik retikulum

ER: Östrojen reseptörü

FİGO: Uluslararası Jinekoloji ve Obstetri Federasyonu

G: Grade

g: Gravity

GOG: Jinekolojik Onkoloji Grubu

GRP78: 78 kDa glucose-regulated protein

GSTP1: Glutathione S-transferase P

Her-2/neu: İnsan epidermal büyüme faktörü geni/nöral (onkogen)

HLA: İnsan lökosit antijen

HNPC: Hereditör Non-Polipozis Kolorektal Kanseri

HSPA5: Heat shock protein family A (Hsp70) member 5

HSPB1: Heat shock protein beta 1

HZK: Heterozigosite kaybı

IAA: İyodaasetamit

IDHc: Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic

IEF: Isoelectric focusing

IFN: İnterferon

IGF-1: İnsülin benzeri büyüme faktörü-1

IPA: Ingenuity Pathway Analysis

IPG: Immobilised pH gradient

ITRAQ: Isobaric tags for relative and absolute quantitation

K2C8: Sitokeratin 8; CK8; K8

KAH: Kompleks Atipili Endometrial Hiperplazi

kDa: Kilodalton

K-ras : Kirsten rat sarkoma (onkogen)

LC-ESI-MS/MS: Liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry

MALDI TOF/TOF-MS: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization time-of-flight, Mass Spectrometry

MAPK: Mitojenle aktive olan protein *kinaz*

MBP-1: c-myc promoter-binding protein

MI: Mikrosatellit instabilitesi

MRG: Manyetik rezonans görüntüleme

mRNA: Mesajcı RNA

MS: Mass spectrometry

MST1: Macrophage stimulating 1

NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat

p16 : Protein 16

p53 : Protein 53

PBS: Phosphate buffered saline

PDAC: Pankreatik duktal adanokarsinoma

PDIA3: Protein disulfid izomeraz A-3

PET/BT: Pozitron Emisyon Tomografisi/Bilgisayarlı Tomografi

PI3K : Fosfatidil inositol-3 kinaz

PIK3CA: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha

PKM2: Pyruvate kinase, muscle

PKN1: Protein kinase N1

PLND: Pelvik lenf nodu disseksiyonu

PPIA/B: Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A/B; cyclophilin

PPLND: Pelvik-paraortik lenf nodu disseksiyonu

PR: Progesteron reseptörü

PSME1: Proteasome activator complex subunit 1

PTEN: Fosfataz ve tensin

RNA: Ribonükleik asit

ROS: Reaktif oksijen türevleri

rRNA: Ribozomal RNA

RSSA: 40S ribozomal protein

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate – Poly Acrylamide Jel Elektroforez

SELDI-TOF-MS: Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry

SOD1: Superoxide dismutase [Cu-Zn]

TAH-BSO: Total abdominal histerektomi + bilateral salpingoooforektomi

TCA: Triklorasetik Asit

TCEP: Tris-2-carboxyethyl-phosphine

TMA: Tissue microarray analysis

T-PER: Tissue Protein Extraction Reagent; Thermo Scientific

TRFE: Serotransferrin

tRNA: Taşıyıcı RNA

TVUSG: Transvajinal ultrasonografi

UAP56: Spliceosome RNA helicase; BAT1;DDX39B

UPR: Unfolding protein response

UV: Ultraviole

VKI: Vücut kitle indeksi

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

Zn: Çinko

µg: Microgram

3. ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa Numarası

Şekil 1: EİN Tanı Kriterlerinin 1994 WHO Endometrial Hiperplazi Sınıflamasına Göre Saptanan Tanısal Kategorilerle İlişkisi.....	10
Şekil 2: 2009 FIGO Evreleme Sistemine Göre Endometrium Kanseri Evrelemesi.....	17
Şekil 3: Endometrial karsinogenezisin alternatif modelleri.....	21
Şekil 4: Minimal DIGE işaretlemenin deneysel basamakları.....	41
Şekil 5: Deney Gruplarının Cy3, Cy5 ve Cy2 İle İşaretlenen Protein Örnekleri Birleştirildikten Sonra 2-DE Jel Elektrofrezindeki Görüntüleri.....	45
Şekil 6: Deney Gruplarının 2-DE Preparatif Jel Görüntüleri ve Belirlenen Spotların Pozisyonları.....	48
Şekil 7: Deney I Spotlarının PANTHER Analizi.....	49
Şekil 8: Deney I Grubuna Ait Tanımlanan Proteinlerin STRING Analizi.....	49
Şekil 9: Deney II Spotlarının PANTHER Analizi.....	50
Şekil 10: Deney II Grubuna Ait Tanımlanan Proteinlerin STRING Analizi.....	51
Şekil 11: Deney III Spotlarının PANTHER Analizi.....	51
Şekil 12: Deney III Grubuna Ait Tanımlanan Proteinlerin STRING Analizi.....	52
Şekil 13: Deney IV Spotlarının PANTHER Analizi.....	52
Şekil 14: Deney IV Grubuna Ait Tanımlanan Proteinlerin STRING Analizi.....	53
Şekil 15: Deney V Spotlarının PANTHER Analizi.....	53
Şekil 16: Deney V Grubuna Ait Tanımlanan Proteinlerin STRING Analizi.....	54

Şekil 17: Deney I, II, III, IV ve V'te Belirlenen ve Tanımlanan Protein Spotlarının Yoğunluklarının Analizi.....	54
Şekil 18: Deney VI'nın 2-DE Preparatif Jel Görüntüleri ve Belirlenen Spotların Pozisyonları.....	55
Şekil 19: Deney VI'da Belirlenen ve Tanımlanan Protein Spotlarının Yoğunluklarının Analizi.....	56
Şekil 20: Deney VI Spotlarının PANTHER Analizi.....	57
Şekil 21: Deney VI Grubuna Ait Tanımlanan Proteinlerin STRING Analizi.....	57

4. TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa Numarası

Tablo 1: Endometrial Hiperplazi Sınıflaması.....	8
Tablo 2: WHO'nun 1994 Endometrial Hiperplazi Sınıflama Sistemiyle Endometrial İntraepitelyal Neoplazi (EİN) Sisteminin Karşılaştırılması.....	9
Tablo 3: Postmenopozal Uterin Kanama Sebepleri.....	11
Tablo 4: Endometrial Karsinomun WHO 2003 Histolojik Sınıflaması.....	14
Tablo 5: Endometrioid Adenokarsinomların Histolojik Derecelendirilmesi.....	14
Tablo 6: 2009 FIGO Evreleme Sistemine Göre Endometrium Kanseri Evrelemesi.....	17
Tablo 7: Endometrium Kanseri Prognostik Faktörler.....	18
Tablo 8: Hastaların histopatolojik özelliklerine göre gruplandırılması.....	37
Tablo 9: Tasarlanan Beş Farklı Deneyde Protein Örneklerinin Cy3, Cy5 Ve Cy2 Floresan Boya İle Boyanması.....	44
Tablo 10: MALDI TOF/TOF-MS Analizi İle Tanımlanan Proteinler.....	47

5. GİRİŞ VE AMAÇ

Endometrium kanseri en sık görülen jinekolojik kanserdir ve tüm kadın kanserleri arasında dördüncü sıradadır¹. Sıklıkla hayatın altıncı-yedinci dekadında görülen bu kanser, yaygın semptomu olan uterin kanama sayesinde genellikle erken evrelerde tanı alır ve prognozu oldukça iyidir². Bununla birlikte invaziv kansere ve ileri evrelere ilerleyen süreçte bazı olgularda prognoz kötü seyretmekte ve dünya genelinde endometrium kanserine bağlı yıllık 74000 ölüm olgusu gerçekleşmektedir³.

Endometrium kanserine bağlı gerçekleşen ölümlerin nedenleri, tanı gecikmesinin yanı sıra tanı konulma güçlükleri, hastalığın prognozunun önceden tahmin etmedeki yetersizlik ve buna bağlı tedavi başarısızlıkları, ileri evrelerde kemoterapiye ve hormonoterapiye verilen cevabın az olması olarak kabul edilebilir⁴. Bu durum göz önüne alındığında halen uygulanmakta olan klasik tanı yöntemlerinin yanında endometrium kanserinde hem tanı, hem de tedavi amaçlı terapötik hedef olarak kullanılabilecek yeni biyobelirteçlerin keşfine ihtiyaç vardır.

Proteomik çalışmaları, proteinlerin geniş ölçekli olarak tanımlanmalarına, yapılarının ve görevlerinin incelenmesine olanak veren bir araştırma metodudur. Araştırmacılara farklı hastalık durumlarında doku protein ekspresyon seviyesindeki değişimleri gösterir ve özellikle hastalıkların tanı, prognoz ve tedaviye cevabını belirlemek için kullanılan biyobelirteçlerin tespitinde kullanılır⁵. Endometrial kanserlerin hiperplazi aşamasından, invaziv ve ileri evre kanser haline gelişimi ve değişimi sırasında ortaya çıkan protein ekspresyonundaki değişiklikler, proteomik ölçümleri sayesinde hastalığın altında yatan moleküler mekanizmaları aydınlatmaya yardımcı olabilir. Günümüze kadar endometrial kanser olgularında gerçekleştirilen proteomik çalışmaları her ne kadar bazı proteinlerin hastalıkla ilişkisini kurmayı başarsa da deneysel yaklaşımlardaki eksiklikler, etnik grup farklılıkları ve kütle spektrometredeki verilerinin yorumlanmasındaki varyasyonlar sonucu halen hastalık ile moleküler patofizyolojisi arasındaki ilişkisi açıkça ortaya konulamamıştır.

Bu çalışmanın amacı; endometrium kanseri ve öncül lezyonlarının protein ekspresyonunu, sağlıklı hastalardan elde edilen endometriumun protein profili ile

karşılaştırarak, normal endometrium dokusunun hangi değişimleri göstererek kansere dönüştüğünü, 2D DIGE (Two-dimensional difference gel electrophoresis) tabanlı proteomik yaklaşım kullanarak, proteom seviyesinde ortaya koymak ve potansiyel biyobelirteç veya moleküler terapötik hedef olarak kullanılacak yeni protein/protein yollarını tanımlamaktır.



6. GENEL BİLGİLER

6.1. EPİDEMİOLOJİ

Endometrium kanseri kadınlarda en sık görülen jinekolojik kanser olmakla birlikte tüm kanserler içinde en sık görülen dördüncü kanser tipidir¹. Fakat gelişmekte olan ülkelerde en sık görülen ikinci kanser tipidir⁶. 2014 ABD verilerine göre kadınlarda kansere bağlı ölümlerde 8590 ölümlle sekizinci sırada yer almaktadır⁷. Dünya genelinde 2008 yılı verilerine göre endometrium kanserine bağlı 74000 ölüm gerçekleşmiştir³. İnsidansı kıtalar arasında değişmekle birlikte gelişmiş ülkelerde daha yüksektir. Kuzey Amerika ve Avrupa'da kadınlarda görülen kanserlerin %8-10'unu oluştururken bu oran Afrika ve Asya'da %2-4'tür⁴.

Endometrium kanseri olgularının % 95'i 40 yaş üzerindedir. % 70'i postmenopozal, % 25'i premenopozal dönemde görülür. Sadece % 5'i 40 yaş altındadır. Genellikle altıncı ve yedinci dekatta görülür; ortalama görülme yaşı 65'tir².

Endometrium kanseri genellikle iyi prognozlu olarak kabul edilir; çünkü birçok örnekte tümör sadece uterusla sınırlı izlenmiş, bu da hastanın başarılı bir şekilde tedavi görmesini sağlamıştır. 5 yıllık sağkalım oranları tümörün evresine göre; evre 1'de %80, evre 2'de %60, evre 3'te %30, evre 4'te %5 olarak rapor edilmiştir⁸.

Obezite, karşılanmamış östrojen alımı, nulliparite, diabetüs mellitüs, polikistik over sendromu, Lynch Sendromu ve tamoksifen tedavisi endometrium kanseri gelişiminde bilinen risk faktörleridir².

Endometrial karsinomlar klinik, histolojik ve prognostik faktörlere göre iki grupta incelenmektedir;

1. Grup; Tip 1 Endometrial Karsinom

En sık görülen grup olup endometroid adenokarsinomdan oluşur. Östrojen seviyesi ile ilişkili olup genelde hiperplazi zemininden gelişir ve düşük derecede malign karakterdedir⁹.¹⁰. Tip 1 endometrial karsinomların yaklaşık %80'i premenopozal ve erken postmenopozal dönemdeki kadınlarda görülür ve iyi prognoza sahiptir; 5 yıllık sağkalım oranı %74'tür¹⁰.

¹¹.

II. Grup; Tip 2 Endometrial Karsinom

Non-endometroid karsinomlar; seröz papiller, berrak hücreli karsinomlar ve karsinosarkomlardan oluşur¹¹. Östrojen ve endometrial hiperplazi ile ilişkili olmayıp; prekanseröz yapılar ve atrofik endometriümden gelişir^{12, 13}. Genelde geç menopoza dönemde görülmekte olup, yüksek dereceli malign karakterdedir^{10, 14}. Kötü prognozlu olup; 5 yıllık sağkalım oranı %27-42'dir¹⁵.

6.2. RISK FAKTÖRLERİ

6.2.1. Sosyo-Ekonomik Seviye

Sosyo-ekonomik düzeyi yüksek olan kadınlarda endometriü kanseri görülme riski daha yüksektir. Bazı çalışmalarda, östrojen içerikli doğum kontrol ilaçlarının ve östrojen replasman tedavisinin eğitimli kadınlarda daha fazla kullanılmasına bağlı olarak endometriü kanseri görülme insidansı daha yüksek görülmüştür^{16, 17}.

6.2.2. Heredite ve Aile Öyküsü

Endometriü kanserinde heredite ve aile öyküsünün rolü açık değildir. Bazı çalışmalarda, endometriü kanseri aile öyküsü olan kadınlarda endometriü kanseri riskinde küçük bir artış olduğu gösterilmiştir¹⁸. Ayrıca aile öyküsü olan, 50 yaş altındaki kadınlarda bu risk daha yüksektir^{19, 20}. Aile öyküsünde herediter non-polipozis kolorektal kanseri (HNPCC) bulunan genç kadınlarda endometriü kanseri görülme riski artmıştır. HNPCC-gen mutasyonuna sahip kadınlarda genellikle 50 yaşından önce endometriü kanseri gelişebilmektedir^{20, 21}.

6.2.3. Menstrüel Faktörler

Birçok çalışmada 11-12 yaşından önce menarş olan kadınlarda endometriü kanseri görülme riskinin 1,5- 4 kat arttığı ve geç yaşta menopoza giren kadınlarda görülme riskinin 2,4 – 4 kat arttığı rapor edilmiştir^{18, 22-24}. Bu durum, endometrial kavitenin daha uzun süre östrojen ile uyarılması nedeniyle açıklanır. Özellikle de bu duruma daha çok anovulatuvar siklusların neden olduğu düşünülmektedir. Bir çalışmada menarş ve menopoz arasındaki yıllar (gebelik süresi hariç) menstrüasyon açıklığı olarak adlandırılmış ve menstrüasyon açıklığı 39 yıldan fazla olan kadınlarda menstrüasyon açıklığı 25 yıldan az

olan kadınlara nazaran endometrium kanseri görülme riski 4.2 kat daha fazla olarak rapor edilmiştir²⁵.

6.2.4. Reprodüktif Faktörler

İngiltere’de yapılan bir çalışmada; bekar veya evli olup çocuğu olmayan kadınlarda endometrium kanserinden dolayı ölüm oranı, evli ve çocuklu kadınlardan daha yüksek olarak görülmüştür¹⁶. Ayrıca olgu-kontrollü birçok çalışmada nullipar kadınlarda endometrium kanseri riskinin 2-3 kat arttığı, doğum sayısının artmasıyla birlikte risk oranının azaldığı görülmüştür^{18,26}. Kadınların ilk doğumlarındaki yaşları ile endometrium kanseri arasında herhangi bir ilişki olmamasına rağmen son doğumlarındaki yaşları eğer ileri yaş ise bu kadınlarda endometrium kanseri görülme sıklığının belirgin olarak düşük olduğu tespit edilmiştir²⁷.

Nulliparite bir nevi infertilitenin sonucu olduğu için, infertilite endometrium kanseri için başlıca risk faktörlerinden biridir. Olgu-kontrollü bir çalışmada infertiliteye (3 yıl ve daha uzun süre gebe kalınamaması olarak tanımlanmış) bağlı riskin 3,5 kat arttığı görülmüştür²⁸. İnfertilite ile ilişkili durumlar, polikistik over sendromu, granüloza hücreli over tümörleri endometrium kanseri gelişimiyle ilişkili bulunmuştur²⁹.

6.2.5. Östrojenler

Östrojenler endometrium kanseri gelişiminde direkt veya indirekt olarak etkilidir.

6.2.5.1. Endojen Östrojenler

Endojen östrojen seviyesi yüksek olan kadınlarda endometrium kanseri görülme riski yüksektir. Polikistik over sendromu ve granüloza hücreli over tümörlerinde endojen östrojen seviyesi yüksektir^{29,30}. Bu durum genç kadınlarda endometrium kanseri görülmesiyle ilişkilidir. Polikistik over sendromu tanısı konulan premenopozal kadınların yaklaşık %30’unda endometrium kanseri görüldüğü rapor edilmiştir³¹.

6.2.5.2. Hormon Replasman Tedavisi

ABD’de 1962-1975 yılları arasında menopozal semptomların tedavisi için östrojen içeren preparatların kullanılmasıyla birlikte 1970’lerde endometrium kanseri insidansı artış

göstermiştir³². Östrojen replasman tedavisi kullanan ve endometrium kanseri tanısı konulan ilk olgu 1960'ların başında rapor edildi³³. Sonraki birçok olgu-kontrollü ve kohort çalışmada östrojen replasman tedavisini sürekli kullanan ve hiç kullanmayan hasta grupları incelenmiş; sürekli kullanan hasta grubunda endometrium kanseri görülme riskinin rölatif olarak arttığı görülmüştür (%95 confidence interval 2,1-2,5)³⁴.

Progesteron östrojen reseptörlerini azaltarak ve östradiolü daha az potent metabolitlere metabolize eden enzimleri aktifleştirerek östrojenin etkisini antagonize eder³⁵. Progesteronun 1980'li yıllarda hormon replasman tedavisinde yerini almasıyla birlikte 1984 ile 1993 yılları arasında endometrium kanseri görülme insidansında düşme izlenmiştir³⁶.

6.2.5.3. Oral Kontraseptifler

Kombine oral kontraseptiflerin (östrojen+progesteron) endometrium kanseri riskini azalttığı rapor edilmiştir^{37, 38}. Uzun süreli kombine oral kontraseptif kullanımının endometrium kanseri riskini belirgin olarak düşürmekle birlikte bırakıldıktan uzun yıllar sonra dahi endometrium kanserine karşı koruyucu özelliği olduğu belirtilmiştir³⁸.

6.2.5.4. Tamoksifen

Tamoksifen meme kanserli kadınlarda adjuvan tedavide kullanılan anti-östrojenik etkiye sahip selektif östrojen reseptör modülatörüdür. Meme dokusu üzerinde anti-östrojenik, endometrium üzerinde östrojenik etkiye sahiptir. Meme kanserli tamoksifen kullanan kadınlarda endometrium kanseri görülme sıklığı artmıştır. Tamoksifen tedavisi süresinin ve kümülatif dozun artmasıyla birlikte endometrium kanseri riski de artmaktadır³⁹.

6.2.6. Obezite

Birçok çalışmada obezitenin endometrium kanseriyle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Postmenopozal obez kadınlarda adipoz dokuda androstenedionun aromatzasyonuna bağlı olarak endojen östrojen seviyesi zayıf kadınlardan daha yüksektir. Ayrıca obeziteye bağlı olarak serum seks hormon bağlayan globulin düzeyleri düşük; biyoaktif östrojen miktarı yüksektir⁴⁰.

6.2.7. Diabet ve Hipertansiyon

Diabet ve hipertansiyon obezite ile ilişkili olan endometrium kanseri risk faktörlerindedir. Vücut kitle indeksi (VKI) 25 kg/m²'den yüksek olan obez kadınlarda riskin arttığı görülmüştür⁴¹.

Diabetik kadınlarda yüksek serum östrojen seviyesi, insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) ve hiperinsülinemi durumu diabet-endometrium kanseri ilişkisini açıklayabilir^{42, 43}.

6.2.8. Diyet ve Alkol

Birçok çalışmada yüksek yağ ve düşük karbonhidrat ve lif oranlarına sahip yiyeceklerin endometrium kanseri riskini arttırdığı gösterilmiştir⁴⁴. Yüksek dozlarda ve uzun süreli alkol kullanan kadınlarda serum östrojen seviyesinin yüksek olduğu ve endometrium kanseri riskinin yükseldiği görülmüştür⁴⁵.

6.3. ENDOMETRİUMUN PREKANSERÖZ LEZYONLARI

6.3.1. Endometrial Hiperplazi

Endometrial hiperplazi (EH) terimi, endometrial stroma ve bezlerinin fizyolojik durumu ile karsinoma in situ arasında değişiklik gösteren biyolojik ve morfolojik farklılaşma spektrumunu yansıtır. Sıklıkla progesteronla karşılanmamış endojen veya ekzojen östrojenik uyarı sonucu oluşan proliferatif endometrium zemininden gelişir. Endometrial hiperplazi karşılanmamış endojen östrojenik uyarı, obezite, kronik anovulasyon, polikistik over sendromu, östrojen üreten over tümörleri (granüloza hücreli over tümörü), ekzojen östrojen alımı sonucu oluşabilmesi ve endometrium kanseri öncesinde veya birlikteliğinde olmasından dolayı klinik olarak önemlidir. Genellikle hastalar anormal uterin kanama şikayeti ile hastaneye başvururlar⁴⁶.

2003'te hiperplazi sınıflaması Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Uluslararası Jinekolojik Patologlar Birliği (International Society of Gynecological Pathologists, ISGP) ve Jinekoloji Onkoloji Grubunun (Gynecologic Oncology Group) sınıflamaları temel alınarak yeniden düzenlenmiştir. Bu sınıflamaya göre hiperplaziler iki ana gruba ayrılır (Tablo 1)⁴⁷.

Tablo 1. Endometrial Hiperplazi Sınıflaması

Hiperplazi Tipleri	Kansere Dönüşüm Oranı (%)
Atipisiz	
1. Basit	1
2. Kompleks (atipisiz adenomatöz)	3
Atipik	
1. Basit	8
2. Kompleks (atipili adenomatöz)	29

Bu sınıflamada yapısal mimari ve sitolojik özellikler dikkate alınmıştır. Yapısal mimari basit veya kompleks olarak, sitolojik olarak ise atipik veya atipisiz şeklinde tanımlanmıştır. Basit ve kompleks ayrımı stroma ile glandlar arasındaki yapısal paterni gösterir. Atipi ise nuklear atipi varlığına veya yokluğuna göre isimlendirilir. Kansere gelişimi hiperplazide sitolojik atipinin varlığı ve derecesiyle ilişkilidir. Endometrium kanseri, özellikle endometrioid karsinomlar atipik endometrial hiperplazi zemininden gelişir. Endometrial doku örneklemesinde atipik hiperplazi saptanan hastalarda histerektomi yapılmış, %13-43 oranında hiperplazinin grade 1-3 endometrioid adenokarsinom ile eş zamanlı bulunduğu görülmüştür⁴⁸.

6.3.2. Endometrial İntraepitelyal Neoplazi

Deneysel birçok çalışmadan elde edilen bilgiler ışığında endometrial prekanseröz lezyonların ilk ortaya çıkmasıyla ilgili monoklonal bir model desteklenmektedir. Buna göre neoplastik sürecin başında fokal olarak endometriumda gerçekleşen bir proliferasyon söz konusudur ve bu süreç endometrial karsinom oluşumu ile sonuçlanır⁴⁶. Klinik pratikte bu monoklonal değişiklikler ortaya konulabilirse reaktif endometrial değişiklikler ile prekanseröz lezyonların birbirinden ayırt edilmesi mümkün olabilir. Endometrial intraepitelyal neoplazi (EİN) tanımı, hiperplazinin klinik olarak oldukça farklı iki fonksiyonel kategorisini ayırt edebilmek için kullanılmaktadır; biri anormal hormonal uyarıya diffüz olarak yanıt veren normal poliklonal endometrium iken diğeri artmış adenokarsinom riski ile ilişkili olan fokal olarak ortaya çıkan intrinsik proliferatif monoklonal lezyondur⁴⁹. Bu kavram vulva, vajina, serviksteki benzer lezyonlar için kullanıldığı gibi endometriumun prekanseröz lezyonları için de kullanılır ve tedavi edilmelidir. Tablo 2’de WHO’nun endometrial hiperplazi sınıflama sistemiyle EİN sisteminin karşılaştırılması verilmiştir.

Tablo 2. WHO'nun 1994 Endometrial Hiperplazi (EH) Sınıflama Sistemiyle Endometrial İntraepitelyal Neoplazi (EİN) Sisteminin Karşılaştırılması

WHO sistemine göre tanı	EİN sistemine göre tanı	Topografi	Fonksiyonel kategori	Klinik yaklaşım
Basit atipisiz EH Kompleks atipisiz EH	EH EH	Diffüz	Östrojen etkisi	Hormonal tedavi
Basit atipili EH Kompleks atipili EH	EİN EİN	Fokal, diffüze ilerleyen	Premalign	Hormonal veya cerrahi tedavi
Adenokarsinom	Adenokarsinom	Fokal, diffüze ilerleyen	Malign	Cerrahi tedavi

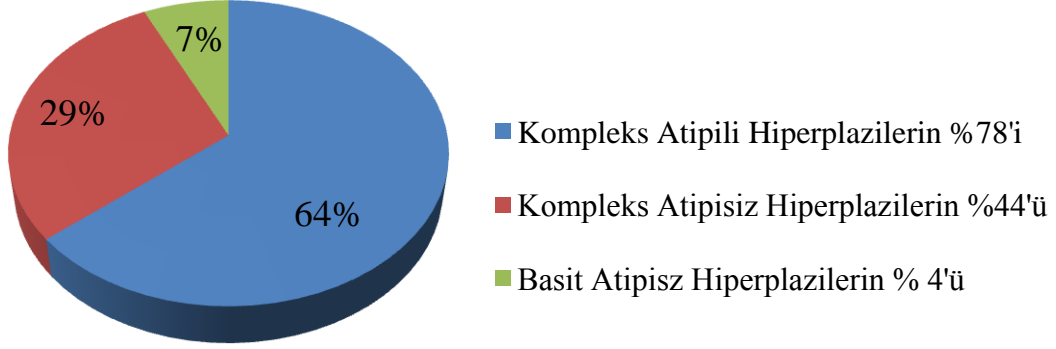
EİN tanı kriterleri;

- Monoklonal büyüme paterni
- Gland/stroma oranı >1
- Glandların yoğunlaştığı alan ile geri kalan komşu endometrium arasında hücresel farklılık (sitolojik demerkasyon hattı varlığı)
- Tek bir odakta kalabalıklaşan endometrial glandların çapı > 1mm
- Benign ve malign odaklar dışlanmalıdır
- Stromada %55 ten fazla mukozal volüm olması

EİN tanısı konabilmesi için belirtilen tanı kriterlerinin tamamının mevcut olması gerekir⁵⁰.

EİN ile kompleks atipili endometrial hiperplazi birçok klinisyen tarafından eş anlamlıymış gibi kullanılmaktadır. Kompleks yapı veya atipi saptanmayan örneklere EİN tanısı konulabilir. EİN tanı kriterleri eşliğinde hiperplazi grupları tekrar incelendiğinde kompleks atipili hiperplazilerin %78'inin, kompleks atipisiz hiperplazilerin %44'ünün, basit atipisiz hiperplazilerin % 4'ünün EİN tanı kriterlerini karşıladığı görülmüştür (Şekil 1)⁵¹.

Şekil 1. EİN Tanı Kriterlerinin 1994 WHO Endometrial Hiperplazi Sınıflamasına Göre Saptanan Tanısal Kategorilerle İlişkisi



6.4. ENDOMETRİUM KANSERİNDE TARAMA

Asemptomatik hastalarda endometrium kanseri için önerilen bir tarama testi olmamakla birlikte ultrasonografik incelemede anormal endometrial kalınlık artışı, endometrial düzensizlik, endometriumun kistik dejenerasyonu olan hastalarda endometrial biopsi tanıda yardımcı olmaktadır. Bu nedenle perimenopozal ve postmenopozal dönemdeki kadınlar endometrium kanseri semptomları hakkında bilgilendirilmelidir. Endometrium kanseri tanısı alan hastaların %75-90'ında anormal uterin kanama mevcuttur⁵². Bu yüzden herhangi bir anormal, beklenmedik vajinal kanama öyküsü olan hastalar mutlaka doktora başvurması için uyarılmalıdır. Böylece birçok hastaya erken evrede tanı konulabilecektir.

Aile öyküsünde HNPCC mevcut olan kadınlara 35 yaşından sonra yıllık endometrial biyopsi ile tarama önerilir⁵³. Aynı zamanda bu hastalara artmış endometrium kanseri ve over kanseri riski nedeniyle profilaktik histerektomi ve bilateral salpingooforektomi önerilebilir.

6.5. KLİNİK BULGULAR

Endometrium kanseri tanısı almış hastaların en sık başvuru şikayeti anormal uterin kanamadır. Hastaların %5'inden azı asemptomatiktir. İleri yaştaki hastalarda servikal stenoz sonucu hematometra, pyometra oluşabilir, bu hastalarda pürülan vajinal akıntı

şikayetleri görülebilir. Uterus dışı yayılım, ileri evre veya uterusun ileri derecede global olarak büyüdüğü vakalarda pelvik bası ve rahatsızlık hissi olabilir². Postmenopozal dönemde uterin kanama sebepleri tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. Postmenopozal Uterin Kanama Sebepleri

Kanama Sebepleri	Sıklık (%)
Endometrial atrofi	60- 80
Östrojen etkisinde endometrium	15- 25
Endometrial polip	2- 12
Endometrial hiperplazi	5- 10
Endometrial kanser	10

6.6. TANI

6.6.1. Muayene:

Eksternal genital organlar, vajina, serviks uteri ve forniksler dikkatli bir şekilde muayene edilmelidir. Uterus büyüklüğü ve mobilitesi, adneksiyel tutulum, parametrial tutulum, cul-de-sac nodüleritesi açısından bimanuel pelvik muayene ve rektovajinal muayene yapılmalıdır.

6.6.2. Papanicolaou testi :

Papanicolaou testi endometrium kanseri tanısında çok sık kullanılan bir yöntem olmasa da rastlantısal olarak endometrium kanserini tespit edebilir. Yapılan bir çalışmada endometrium kanser tanısı alan hastaların retrospektif papanicolaou testi sonuçlarına bakıldığında %55 anormal sonuç olduğu görülmüştür⁵⁴.

Postmenopozal kadından alınan papanicolaou testinde endometrial hücre varlığı rapor edilmişse ve hasta herhangi bir hormon replasman tedavisi almıyorsa, bu hastalarda %3-5 oranında endometrium kanseri riski mevcuttur⁵⁵. Bu yüzden asemptomatik bile olsa bu bulgu varlığında hastaya endometrial örnekleme yapılmalıdır.

6.6.3. Endometrial Biyopsi:

Endometrial patolojiden şüphelenilen veya anormal uterin kanaması olan hastanın değerlendirilmesinde pipelle biyopsi ilk tercih edilen yöntemdir. Biyopsi sonucu negatif olmasına rağmen semptomlar devam ediyorsa ya da pipelle yeterli materyal elde edilememişse klasik dilatasyon&küretaj (D&C) tanıyı kesinleştirmek için gereklidir.

6.6.4. Histeroskopi

D&C ile tanı konulamayan ve semptomları devam eden hastalarda histeroskopi ile endoserviks ve endometrial kavite doğrudan görüntülenerek şüpheli bölgelerden biyopsi alınması sağlanır.

6.6.5. Laboratuvar Testleri

Endometrium kanserinin değerlendirilmesinde yararlı olabilecek tek tümör belirteci CA-125'tir. Operasyon öncesi yükselmiş CA125 değerleri, daha çok ileri evrenin göstergesi olabilir⁵⁶. Klinik pratikte tedaviye yanıtın izleminde, ileri evre veya seröz tip endometrium kanserlerinin takibinde kullanılır. Fakat bu durum varlığında bile kullanımı sınırlıdır.

6.6.6. Görüntüleme Yöntemleri

6.6.6.1. Ultrasound

Anormal uterin kanama öyküsü olan kadınlarda transvajinal ultrasonografi (TVUSG) basit, hızlı, ucuz ve radyasyon etkisi olmadığı için öncelikle tercih edilen noninvaziv görüntüleme yöntemidir. Endometrium kanserli hastaların TVUSG değerlendirmesinde endometriumun kalınlaştığı, anterior-posterior mesafesinin arttığı görülür. Postmenopozal kadınlarda endometrial kalınlığın 5mm'den büyük olduğu durumlarda TVUSG'nin endometrium kanseri tanısında duyarlılığı %96, özgüllüğü ise %61'dir⁵⁷. Myometrial invazyon varlığını tespit etmede duyarlılığı %69, özgüllüğü ise %70'dir⁵⁸. Servikal yayılım, parametrial invazyon veya lenfadenopati varlığını gösterdiğine dair TVUSG ile ilgili yeterli bilimsel veri yoktur⁵⁹.

6.6.6.2. Bilgisayarlı Tomografi (BT)

Kontrastlı BT’de endometrium kanseri endometrial kavitede hipodens ve kontrast tutmayan kitle gibi görülür. Fakat bu görüntü spesifik olmayıp, submukozal myom, endometrial polip gibi diğer hipodens endometrial kitlelerden ayırıcı tanısı zordur. BT’nin myometrial invazyonun ve servikal tutulumun gösterilmesinde duyarlılığı ve özgüllüğü manyetik rezonans görüntüleme (MRG)’ye göre daha düşüktür⁶⁰. Genellikle BT, hastalığın ileri dönemlerinde lenf nodu tutulumu ve metastazları göstererek evrelemede kullanılmaktadır.

6.6.6.3. Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG)

MRG yumuşak dokuyu çok net gösterdiğinden dolayı endometrium kanseri olgularında tedavi öncesi evrelemede oldukça başarılıdır. Myometrial invazyon derinliği önemli bir prognostik faktördür. MRG ile myometrial invazyon derinliği T2-ağırlıklı sekanslarda oldukça başarılı bir şekilde görülmektedir⁶¹. Servikal invazyon varlığını görüntülemede MRG’nin duyarlılığı, özgüllüğü ve doğru tanı başarısı çok yüksek olup dinamik MRG’de %100’e ulaşmaktadır⁶². Ayrıca barsak, mesane gibi komşu organ tutulumları MRG ile çok net görülmektedir. 2009 Uluslararası Jinekoloji ve Obstetri Federasyonu (FIGO) sınıflamasında revizyon yapılarak lenf nodu tutulumu da sınıflamada yerini almıştır. Ultrasmall Supermagnetic Iron Oxide (USPIO) MRG, diffüzyon MRG ve Pozitron Emisyon Tomografisi/Bilgisayarlı Tomografi (PET/BT) ile operasyon öncesi lenf nodu tutulumları görüntülenerek operasyonda rutin olarak yapılan lenfadenektomi erken evre endometrium kanserinde artık önerilmemektedir⁶³.

6.7. PATOLOJİSİ

Endometrium kanseri tanısında patolojik inceleme en önemli basamaklardan biridir. 2003 yılında WHO sınıflaması hücre tipine dayanmakta olup tablo 4’te verilmiştir. Makroskopik ve mikroskopik inceleme dikkatlice yapılmalıdır. Tümörün boyutu, yerleşimi (Ör; fundus, alt uterin segment, serviks), myometrial invazyonun derinliği, komşu organ tutulumu mutlaka değerlendirilmelidir.

Tablo 4. Endometrial Karsinomun WHO 2003 Histolojik Sınıflaması

○	Endometrioid adenokarsinom
▪	Skvamöz farklılaşma gösteren
▪	Villoglandüler
▪	Sekretuar
▪	Silli
▪	Diğer
○	Müsinöz adenokarsinom
○	Seröz adenokarsinom
○	Şeffaf hücreli adenokarsinom
○	Mikst adenokarsinom
○	Skvamöz hücreli karsinom
○	Transizyonel hücreli karsinom
○	Küçük hücreli karsinom
○	Andiferansiye karsinom

6.7.1. Endometrioid Adenokarsinom

Endometrium kanseri olgularının yaklaşık % 80'i endometrioid tip olup histopatolojik değerlendirmede değişen derecelerde differansiyasyon gösteren endometrial glandlardan oluşur⁶⁴. Endometrioid adenokarsinomların histolojik değerlendirilmesi Uluslararası Jinekoloji ve Obstetri Federasyonu'nun (International Federation of Gynecology and Obstetrics-FİGO) üç grade'li sistemidir (Tablo 5).

Tablo 5. Endometrioid Adenokarsinomların Histolojik Derecelendirilmesi

Grade 1	İyi differansiye	Tümörde % 5'in altında solid büyüme alanının varlığı
Grade 2	Orta differansiye	Tümörde % 5-50 arasında solid büyüme alanının varlığı
Grade 3	Kötü differansiye	Tümörde % 50'den fazla solid büyüme alanının varlığı

Tümörde izlenen sitolojik atipi çok belirgin ise tümörün grade'i 1 arttırılarak 1 iken 2; 2 iken 3 olarak yeniden belirlenir⁶⁴. Grade 1 iyi, grade 2 orta, grade 3 kötü prognoza sahip olup grade 3 derin myometrial invazyon ve lenf nodu tutulumuyla ilişkili olarak görülür.

Tümöral hücreler proliferatif faz endometriumda izlenenden daha büyük olup değişken nükleer pleomorfizm gösteren oval nükleuslar içerir. Bazı tümörlerde intrasitoplazmik müsin bulunur fakat tipik bir özellik değildir. Mitotik figürler ve apoptotik cisimler görülmekle birlikte; fokal veya yaygın nekroz alanları görülebilir. Klasik morfolojisine ek olarak skuamöz farklılaşma, villoglandüler büyüme, sekretuar değişiklikler, silli hücreler

gibi çeşitli morfolojik özellikler içerebilir⁶⁵.

6.7.2. Müsinöz Adenokarsinom

Endometrial karsinomların %0,6-5'ini oluşturan müsinöz adenokarsinomların tümör hücrelerinin %50'sinden fazlasında intrasitoplazmik müsin görülür. Morfolojik olarak endoservikal tip müsinöz hücrelere benzerler. Düşük histolojik dereceli olmakla birlikte myometrial invazyon olguların yaklaşık yarısında izlenir⁶⁵.

6.7.3. Seröz Adenokarsinom

Endometrial karsinomların yaklaşık %5-10'luk kısmını oluşturan seröz adenokarsinomlar tip 2 endometrial karsinomların prototipi olup genellikle ileri evre tümörler şeklindedir ve endometrial karsinoma bağlı ölümlerin %40'ından sorumludur⁶⁶. Hücrelerin sitoplazmaları eozinofilik olup nükleuslarında belirgin pleomorfizm ve nükleolus saptanır. Olguların %30'unda psammom cisimciği bulunur. Hücrelerin kompleks papiller büyüme paterni tipik histolojik görünümüdür. Seröz papiller over ve tuba tümörlerine benzer histolojiye sahip olup over, tuba ve periton gibi bölgelerin tutulumu eş zamanlı görülebilir. Seröz adenokarsinomlar genellikle derin myometrial invazyon ve lenf nodu tutulumuyla ilişkilidir⁶⁶.

6.7.4. Şeffaf Hücreli Adenokarsinom

Endometrial karsinomların %5'ini oluşturur. Tip 2 endometrial karsinomlardandır. Papiller, tübülokistik ve solid paternlerin bir arada izlendiği yapıyla karakterizedir. Endometrial şeffaf hücreli adenokarsinom, over, vajina ve serviksten kaynaklı şeffaf hücreli karsinomlara benzer. Şeffaf hücreli adenokarsinom derin myometrial invazyon ve lenf nodu tutulumuyla seyreden agresif paterne sahiptir⁶⁵.

6.7.5. Mikst Adenokarsinom

Tip 1 ve tip 2 endometrial adenokarsinomların bir arada görülmesi olup her bir bileşen tümörün en az %10'unu oluşturmalıdır. Prognoz en agresif bileşenin tipi ve oranına bağlıdır. Bu yüzden patologlar tarafından her bir bileşenin tipi ve oranı raporda belirtilmelidir⁶⁵.

6.7.6. Skuamöz Hücreli Karsinom

Endometrial karsinomların %0,1-0,5'ini oluşturur. Tanı esnasında endometrioid adenokarsinomun skuamöz varyantı ve serviksin primer skuamöz hücreli karsinomunun endometrial yayılımı ekarte edilmelidir. Nadir görülmesine rağmen kötü prognozlu bir tümördür⁶⁵.

6.7.7. Transizyonel Hücreli Karsinom

Çok nadir görülen bir tip olup histolojik olarak üriner traktın transizyonel hücreli karsinomuna benzer⁶⁷.

6.7.8. Küçük Hücreli Karsinom

Çok nadir görülen bir tip olup histolojik olarak akciğerin küçük hücreli karsinomuna benzer⁶⁴.

6.7.9. Andiferansiye Karsinom

Yeterli miktarda histolojik incelemeye rağmen hiçbir yönde differansiyasyon göstermeyen tümörlerdir. Belirgin nükleer atipi gösteren büyük hücrelerden oluşur. Kötü prognoza sahiptir⁶⁴.

6.8. ENDOMETRİUM KANSERİNDE YAYILIM ŞEKİLLERİ

Tip 1 Endometrioid adenokarsinom ve varyantlarının sırasıyla yayılım yolları:

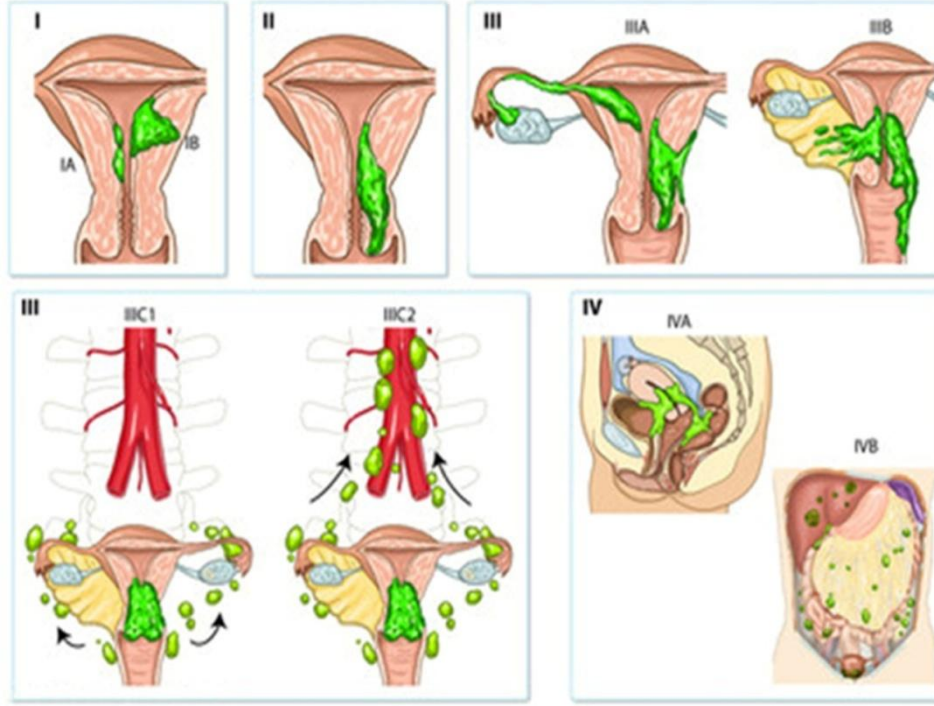
- Direkt yayılım,
- Lenfatik yayılım,
- Hematojen yayılım,
- İntraperitoneal dökülme yoluyla yayılım

Tip 2 seröz ve berrak hücreli karsinomlar ise epitelyal over kanser paternine benzer şekilde uterus dışı yayılıma meyillidirler.

6.9. EVRELEMESİ

Endometrium kanseri 2009 FIGO evreleme sistemine göre cerrahi olarak evrelendirilir. (Şekil 2/Tablo 6).

Şekil 2. 2009 FIGO Evreleme Sistemine Göre Endometrium Kanseri Evrelemesi



Tablo 6. 2009 FIGO Evreleme Sistemine Göre Endometrium Kanseri Evrelemesi

EVRE I*	Tümör uterus korpusuna sınırlı
IA*	Tümör uterusu sınırlı, < ½ myometrial invazyon
IB*	Tümör uterusu sınırlı, > ½ myometrial invazyon
EVRE II*	Tümör uterusu sınırlı, servikal stromal invazyon var**
EVRE III*	Lokal ve/veya bölgesel yayılım var
IIIA*	Tümör seroza veya adnekslere yayılmış***
IIIB*	Vajinal ve/veya parametrial tutulum var***
IIIC*	Pelvik ve/veya paraaortik lenf nodu metastazı var***
IIIC ₁ *	Pelvik lenf nodu tutulumu
IIIC ₂ *	Paraaortik lenf nodu tutulumu, pelvik lenf nodu tutulumu olan veya olmayan
EVRE IV*	Tümör mesane ve/veya barsak mukozasına invaze ve/veya uzak metastaz
IVA*	Mesane mukozası ve/veya barsak mukozasının tutulumu
IVB*	Uzak metastaz. Karın metastazı ve/veya inguinal lenf nodlar da dahil olmak üzere

*G1,G2,G3

**Tek başına endoservikal glandüler tutulum Evre I olarak kabul edilmelidir.

***Pozitif sitoloji evreyi değiştirmeksizin ayrıca rapor edilmelidir.

Cerrahi evreleme için total ekstrasfasyal histerektomi, bilateral salpingo-ooforektomi, bilateral pelvik ve paraaortik lenf nodu örnekleme standart yöntem olarak tanımlanmıştır⁶⁸. Yapılan çalışmalarda Evre IA; tüm grade'ler ve Evre IB; grade 1 ve 2' de histerektomiye ek olarak lenf nodu örnekleme faydasının olmadığı görülürken (şüpheli pelvik ve paraaortik lenf nodları patolojik inceleme için çıkarılmalıdır), ileri evre hastalarda lenf nodu örnekleme sağ kalım üzerine belirgin etkisi olduğu gösterilmiştir⁶⁹. Peritoneal sitoloji evreleme kriterleri içerisinde yoktur fakat ayrıca rapor edilmelidir. Yeterli bir evreleme yapabilmek için metastaz şüphesi olan tüm alanlardan biyopsi alınmalıdır. Omentektomi seröz ve şeffaf hücreli adenokarsinomlarda yapılmalıdır.

Obez, uterin prolapsusu olan ve düşük riskli endometrium kanseri (tümör çapı 2 cm den küçük, grade1-2 endometrioid tip adenokarsinom ve myometrial invazyon $<1/2$) olan hastalarda vajinal histerektomi ve bilateral salpingo-ooforektomi yeterli cerrahi olabilir.

6.10. PROGNOSTİK FAKTÖRLER

Endometrium kanserinde tümörün cerrahi evresi en önemli prognostik faktördür. 5 yıllık sağkalım oranları tümörün evresine göre; Evre I'de %80, Evre II'de %60, Evre III'te %30, Evre IV'te %5 olarak rapor edilmiştir⁸. Bunun dışında pek çok prognostik faktör tanımlanmıştır (Tablo7). Prognostik faktörler hangi hastalarda adjuvan tedavinin gerekli olabileceğini belirlemede yardımcıdır.

Tablo 7. Endometrium Kanserinde Prognostik Faktörler

Cerrahi evre
Yaş
Histolojik tip
Histolojik grade
Myometrial invazyon
Lenfovasküler alan invazyonu
İstmus-serviks yayılımı
Lenf nodu metastazı
Tümör büyüklüğü
Periton sitolojisi
Hormon reseptör yapısı
DNA ploidi
Genetik / moleküler değişiklikler

6.10.1. Yaş

İleri yaş sağkalım ve prognozu olumsuz etkileyen bir faktördür. Genellikle kötü differansiye tümörlü hastalar ileri yaştadır⁷⁰.

6.10.2. Histolojik Tip

Endometrial karsinomların farklı histolojik tipleri prognozu belirgin olarak etkilemektedir. Yapılan çalışmalarda 5 yıllık sağkalım oranı endometrioid tip adenokarsinomda %74 iken seröz papiller adenokarsinomda %42, şeffaf hücreli adenokarsinomda %27 olduğu görülmüştür⁷¹.

6.10.3. Histolojik Grade

Endometrium kanserinde oldukça önemli bir prognostik faktördür. Grade 3'te rekürrens riski grade 1 ve 2'ye göre dört kat artmıştır. Grade 1-2'de 5 yıllık sağkalım oranı %92 ve %86 olarak bildirilirken grade 3'te %64'e kadar düşmektedir⁷².

6.10.4. Myometriyal İnvazyon

Prognozu belirleyen en önemli faktörlerden biri de myometrial invazyondur. Myometrial invazyon arttıkça pelvik ve paraaortik lenf nodu tutulumu ve ekstrauterin tutulum artmaktadır⁷³.

6.10.5. Lenfovasküler Alan İnvazyonu

Lenfovasküler alan invazyonu, rekürrens ve tümöre bağlı ölüm açısından bütün histolojik tiplerde geçerli olmak üzere bağımsız bir risk faktörüdür⁷³.

6.10.6. İstmik-serviks yayılımı

İstmus ve servikal tutulum hastalığın uterus dışı yayılımı, lenf nodu yayılımı ve rekürrens riski ile ilişkilidir. Sadece fundustaki tümörde rekürrens oranı %13 iken, alt uterin segment veya servikte tümör varlığında rekürrens oranı %44 olarak bulunmuştur⁷⁴.

6.10.7. Lenf Nodu Metastazı

Lenf nodu metastazı önemli bir prognostik faktördür. Lenf nodu tutulumu olan hastalarda lenf nodu tutulumu olmayan hastalara göre rekürrens riski 6 kat fazladır. Lenf

nodu tutulumu olmayan hastalarda 5 yıllık sağkalım oranı %90 iken lenf nodu tutulumu olanlarda bu oran %54'tür⁷⁵. Ekstrauterin risk faktörleri arasında paraaortik lenf nodu tutulumu en önemli prognoz belirleyicisidir⁷⁶.

6.10.8. Tümör Büyüklüğü

Tümör boyutu, lenf nodu tutulumu ve yaşam süresini öngörmeye önemli bir prognostik faktördür. Tümör boyutu < 2 cm olan hastalarda, tümör boyutu > 2 cm olan hastalara kıyasla lenf nodu tutulumu daha az, 5 yıllık sağkalım oranı daha yüksektir⁷⁷.

6.10.9. Periton Sitolojisi

Pozitif peritoneal sitoloji ile genellikle grade 3 tümör, derin myometrial invazyon, adneksiyal metastaz, pelvik ve paraaortik lenf nodu tutulumu arasında korelasyon vardır⁷⁵.

6.10.10. Hormon Reseptör Yapısı

Östrojen ve progesteron reseptör pozitifliği daha uzun sağkalımla ilişkili bulunmuştur. Rekürren ve ileri evre hastalarda reseptör pozitifliğinin tedaviyi olumlu yönde etkilediği belirtilmiştir⁷⁸.

6.10.11. DNA Ploidi

Endometrium kanserinde prognoz ile DNA ploidi arasında bir korelasyon vardır. Aneuploidi arttıkça prognoz kötüleşir. Olguların %20-30'unda aneuploidi mevcuttur⁷⁹. 376 endometrium kanseri tanısı almış hasta üzerinde yapılan çalışmada; diploid ve aneuploidili hastalarda 5 yıllık sağkalım oranları sırasıyla %94 ve %83 olarak rapor edilmiştir⁸⁰.

6.10.12. Genetik / Moleküler Değişiklikler

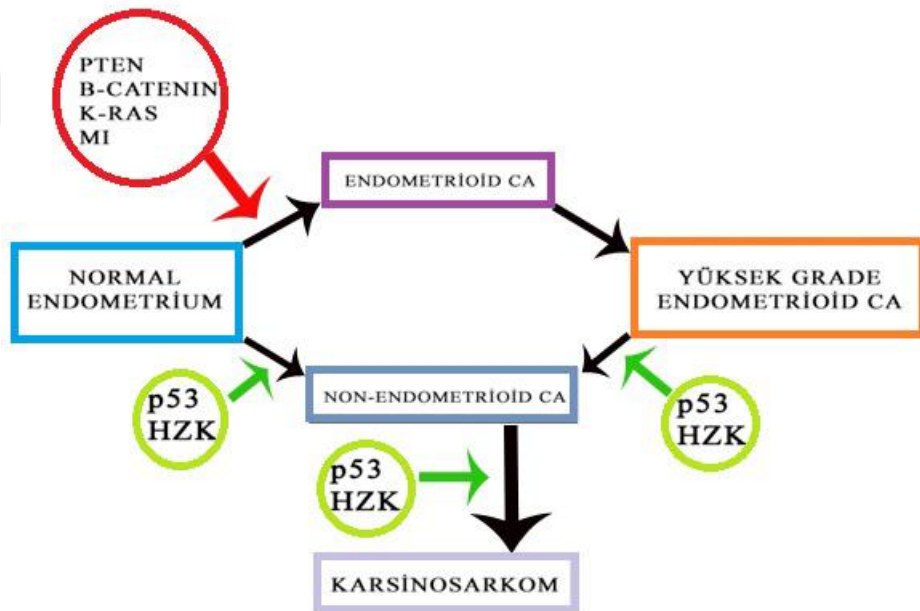
Normal endometrial hücrede genler düzeyinde meydana gelen multipl mutasyonlar sonucunda karsinom gelişir. Bu genler üç kategoriye ayrılır; proto-onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA tamir genleri. Endometrium kanserinin iki tipi için moleküler anormallikler farklıdır⁸¹.

Tip 1 Endometrial karsinomda görülen değişiklikler; mikrosatellit dengesizliği (%20-30), PTEN genindeki değişiklikler (%30-60), K-RAS gen mutasyonu (%10-30), B-catenin

gen mutasyonu (%28-35) ve PIK3CA gen mutasyonu (%25)'dur⁸².

Tip 2 Endometrial karsinomda görülen değişiklikler; p53 gen mutasyonu, p16 geninin inaktivasyonu, HER-2/neu geninde ekspresyon artışı, hücre membranında E-cadherin azalması ve hücrel heterozigositenin kaybıdır(Şekil 3)⁸².

Şekil 3. Endometrial karsinogenezisin alternatif modelleri



*MI: Mikrosatellit insitabilitesi , *HZK: Heterozigosite kaybı

6.11. TEDAVİ

6.11.1. Cerrahi

Endometrium kanserinin primer tedavisi cerrahidir. Cerrahi işlem batın gözlemiyle başlar, sitolojik inceleme için sıvı alma ve pelvik, abdominal organların palpasyonu ile devam eder. Rutin cerrahi prosedür total abdominal histerektomi (tip 1 histerektomi) + bilateral salpingooforektomidir (TAH-BSO). Makroskopik olarak servikal tutulumu olan ve histopatolojik olarak tanısı doğrulanmış yani Evre II hastalarda tip 3 radikal

histerektomi yapılabilir⁸³. Fakat bazı çalışmalarda radikal histerektomi yapılan ve tip 1 histerektomiye ek olarak postoperatif pelvik radyoterapi verilen hastalar incelenmiş; 5 yıllık sağkalım oranlarında anlamlı bir fark gözlenmemiştir^{83, 84}. Lenf nodu örnekleme endometrium kanseri cerrahisinde tartışmalı konular arasındadır. Lenfadenektomi ile ilgili iki yaklaşım mevcuttur; ilkinde sonuçtan bağımsız bütün hastalara lenf nodu örnekleme yapılması gerekliliği savunulmaktadır. Diğerinde ise erken evrede yüksek risk grubu hastalara lenf nodu örnekleme yapmaktayken, düşük risk grubundaki hastalara ise lenf nodu örnekleme yapılmaması yönündedir⁸⁵.

6.11.2. Postoperatif Tedavi

6.11.2.1. Radyoterapi

6.11.2.1.1. Primer radyoterapi

FIGO evrelemesine göre Evre I/II olan, operasyon için morbiditesi yüksek olan hastalarda cerrahiye alternatif olarak düşünülebilir. 5 ve 10 yıllık sağkalım oranları sırasıyla %87,5 ve %79,9'dur⁸⁶.

6.11.2.1.2. Adjuvan radyoterapi

Myometrial invazyon > 1/2 ve grade 3 histolojiye sahip tüm endometrium kanserli hastalarda radyoterapi endikasyonu mevcuttur. Postoperative Radiation Therapy in Endometrial Carcinoma (PORTEC) çalışmasında Evre I endometrium kanserli (G1 myometrial invazyon > 1/2'den fazla, G2 herhangi myometrial invazyon ve G3 myometrial invazyon < 1/2'den az) hastalar tip 1 histerektomi ve bilateral salpingo-ooforektomi sonrası gözlem veya adjuvan pelvik radyoterapi gruplarına randomize edildi. Adjuvan radyoterapi alan grupta 5 yıllık rekürrens oranları % 4 iken izlem grubunda % 14 olarak tespit edildi. Fakat 5 yıllık sağkalım oranlarında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur⁸⁷.

Vajinal-Kubbe Brakiterapisi: Pelvik lenf nodu tutulumu cerrahi olarak dışlandıysa veya düşük riskli ise eksternal radyoterapi'nin yerini brakiterapi alabilir.

Eksternal Pelvik Işınlama: Özellikle cerrahi evreleme yapılamayan, fakat pelvik ve abdominal BT'leri normal olan yüksek riskli hastalarda uygun olabilir.

Genişletilmiş Saha Işınlaması: Biyopsi ile paraaortik lenf nodu tutulumu tespit edilen hastalarda paraaortik bölgenin ışınlanmasıdır.

Tüm Abdomen Işınlaması: Omental, adneksiyal veya peritoneal tutulumu olup, komple rezeksiyon yapılmış hastalarda önerilir.

6.11.2.2. Adjuvan Kemoterapi

Lokal ileri evre hastalıkta doxorubisin-sisplatin bazlı kemoterapi önerilmektedir. GOG-122 (Gynecologic Oncology Group Study-122) çalışmasında Evre III ve metastatik olmayan Evre IV hastalar, abdominopelvik radyoterapi ve doxorubisin-sisplatin bazlı kemoterapi açısından karşılaştırılmıştır. Kemoterapi grubunda anlamlı şekilde progresyonsuz sağkalımda ve genel sağkalımda artış gözlenmiştir⁸⁸.

6.11.2.3. Hormonal tedavi

Adjuvan hormonoterapi rutin olarak önerilmemektedir. Grade 1 ve 2 tümörler genellikle progesteron reseptörü pozitif olması ve metastatik hastaların % 20'si progesteron tedavisine yanıt vermesine rağmen hormonoterapinin sağkalıma katkısı gösterilememiştir⁸⁹.

Çok nadir bir seçenek olarak, opere olması çok riskli hastalarda veya cerrahi ve radyoterapinin yetersiz görüldüğü ve kemoterapiye uygun olmayan hasta grubunda, fertilite arzusu olan erken evre hastalarda progestinlerin (megestrol asetat 400mg/gün) kullanılabileceği belirtilmektedir.

6.12. PROTEOMİK ANALİZİ

Genom, DNA'nın taşıdığı genetik bilgiyi ifade eder. Bu bilginin ortaya çıkarılması ile ilgili tüm çalışmalar genomik çalışma olarak adlandırılmaktadır. Bu çalışmalarda fizyolojik veya hastalık süreçleriyle ilişkili genler tanımlanmaya çalışılır. Fakat canlının bu genleri hangi oranda kullandığı hakkında bilgi vermez. Bu yüzden genomik çalışmalara dayanan teşhis yaklaşımları klinik kullanım için yeterli değildir.

Bir gen, birçok biyolojik işleve sahip farklı proteinler kodlamakta ve bu proteinler sentez sonrası değişimlere uğramaktadır. Gen ürünlerinin sentezlendikten sonraki değişimleri, hücrede buldukları yerleri, miktarları ve fonksiyonlarının anlaşılması için genomik çalışmalar sonrası bilgiye ihtiyaç vardır^{90,91}. Bu anlamda genomun

tanımlanmasının gen ifadesi için çok önemli bilgiler içermekle birlikte, hücre düzeyinde asıl fonksiyonel grup olan proteinler hakkında yeterli bilgiyi sağlamadığı görülmektedir. Örneğin, hastalıklar ile genler arasında ilişki kurulması klasik genom analizlerinin konusu içinde yer alırken, hastalık sırasında ortaya çıkan protein farklılıklarının ve değişen protein gruplarının tespit edilmesi proteom analizleri yaklaşımını ortaya koymaktadır⁹². Bu noktada proteom ve proteomik çalışmaları karşımıza çıkmaktadır.

Proteom; bir organizmanın genomu tarafından kodlanan belli bir zaman ve mekanda (farklı hücrelerde ve/veya farklı hücre kompartmanlarında) sahip olduğu ve eksprese ettiği (izoformlar, polimorfizmler, sentez sonrası modifikasyona uğrayan proteinler) tüm proteinlerin toplamıdır. Sabit bir yapı olan ve çok iyi tanımlanabilen genomun aksine proteom hücreden hücreye değişim göstermekle birlikte iç ve dış etkenlere bağlı olarak sürekli bir değişim halinde olan dinamik bir yapıdır. Bu nedenle incelenmeleri çok daha kompleks ve ileri teknoloji gerektiren bir süreçtir^{90, 91}.

Proteomik çalışmaları; proteomun yapısını, yerleşimini, miktarını, post-translasyonel modifikasyonunu, doku/ hücrelerdeki işlevini, diğer proteinlerle ve makro moleküllerle olan etkileşimlerini aydınlatır. Farklı koşullarda hücre, doku veya vücut sıvılarındaki proteinlerin kantitatif analiz teknolojisi şeklinde de açıklanabilir⁹¹. Proteomik çalışmaları bir defada çok fazla sayıda protein çalışılmasını sağlamaktadır.

Proteom analizinin basamakları:

- 1) Örnek hazırlanması (Biyolojik materyallerden proteinlerin ekstrakte edilmesi)
- 2) 2D (Two-dimensional gel electrophoresis) elektroforez ile proteinlerin ayrılması
- 3) Ayrılan proteinlerin görüntülenmesi
- 4) Protein spotlarının hidroliz edilerek kütle spektrometrisi kullanılarak tanımlanması
- 5) Tüm protein dizisinin tanımlanması için veri tabanı incelemesi⁹¹.

6.12.1. Tıpta Proteomik Kullanım Alanları

Gen düzeyinde birçok çalışma bulunmasına rağmen proteinler düzeyindeki çalışmalar yetersizdir. Proteinler hücrelerin fonksiyonel çeşitliliğinden sorumludur. Çünkü birçok düzenleyici süreç ve hastalık oluşum süreçleri proteinler düzeyinde gerçekleşmektedir⁹³.

Proteomik çalışmaları; hastalıkların tanı ve takibinde, terapötik uygulamaların etkilerinin izlenmesi ve patojenik mikroorganizmalara karşı etkin ilaç ve aşı geliştirmede, hastalığa spesifik proteinlerin yani yeni markerların belirlenmesi gibi birçok önemli uygulamalara sahiptir. Bu proteinlerin analiziyle, hastalığın gelişimi ile normal biyolojik süreçler arasındaki ilişkinin ve hastalığın oluşumuna neden olan mekanizmaların tanımlanması amaçlanmaktadır⁵.

Proteomik çalışmaları hücrelerdeki tüm proteinlerin tanımlanmasıyla birlikte kanserlerin erken evrelerinde tanı konması ve oluşumlarının önceden önlenmesi için biyomarkerların saptanması konusunda umut verici çalışmalardır. Araştırmacılara belirli durumlarda (farklı hastalık durumları) protein ekspresyon seviyelerindeki değişimler hakkında da bilgi vererek, özellikle biyomarker çalışmalarında yerini her geçen gün daha da güçlendirmektedir⁵.

Sağlıklı-hastalıklı, yaşlı-genç, beyaz-siyahi, erkek-kadın vb. iki farklı durum arasındaki protein ekspresyon farklılıklarının tanımlanması başlıca onkolojide olmak üzere tıbbın birçok alanında tanı, tedavi ve takipte önemli gelişmeler sağlamaktadır^{5, 94, 95}.

Plazma, idrar gibi biyolojik sıvıların kolay ve non-invaziv şekilde toplanmasından dolayı klinik uygulamalar daha kolaydır. Fakat bu proteomik analizleri için uygun bir yaklaşım değildir. Hastalığa özgü olabilecek düşük molekül ağırlıklı proteinlerin yüksek molekül ağırlıklı plazma proteinlerinden ayrıştırılması ve belirlenmesi oldukça zordur. Aynı zamanda çalışılacak örnek, hastalıklı dokudan veya lezyondan ne kadar uzaktaysa çalışmanın özgüllüğü ve duyarlılığı o oranda düşmektedir⁹⁶. Örneğin over kanseri şüphesi olan olguların batın asit sıvısından biyomarker çalışmaları değerli olabilir.

6.12.2. Jinekoloji ve Obstetri’de Proteomik Çalışmaları

CA125 epitelyal over kanserinin klinik tanısında sıkça kullanılan bir marker olmasına rağmen over kanserinin erken evre tanısında özgüllüğü ve duyarlılığı düşüktür. Bu yüzden over kanserinin erken evre tanısında ve böylelikle 5 yıllık sağ kalımı artırmak amacıyla yapılan ve devam eden birçok proteomik çalışmalarında özgüllüğü ve duyarlılığı yüksek olan yeni markerların bulunması hedeflenmiştir⁹⁷.

Serviks kanseri tanısında papanicolaou testinin duyarlılığı ve özgüllüğü tam olarak hücrel değişikliklerin karakteristik özelliklerinin tespit edilebilme başarısıyla ilgidir. Bu yüzden serviks kanseri tanısında papanicolaou testinden duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek, prognozu doğrudan olumlu yönde etkileyecek yeni biyomarkerların bulunması ihtiyacı vardır. Ancak bu yönde yapılan proteomik çalışmalarında henüz anlamlı bir sonuca ulaşamamıştır⁹⁸.

Endometriozis, infertilite, prenatal konjenital ve kromozomal anomalilerde tanı, preeklampsinin ve intrauterin gelişme geriliğinin önceden öngörülmesi hakkında yapılan ve devam eden birçok proteomik çalışması bulunmaktadır.

6.12.3. Endometrium Kanseri Proteomik Analizi

Birçok çalışmayla birlikte endometrium kanserinin moleküler biyolojisi kapsamlı olarak araştırılmıştır.

Proteomik ve endometrial kanserler ile ilgili yapılmış olan, Atthara ve ark.⁹⁹'nin yaptığı biyomarker arayışı amaçlı 2D tabanlı çalışmada MST1 (Macrophage stimulating 1) ve PKN1 (Protein kinase N1)'in endometrial kanserler için prediktif biyomarkerlar olabileceği ileri sürülmüştür. Teng ve ark.¹⁰⁰'nin yapmış olduğu ve 2D ile LC-ESI-MS/MS (Liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry) yaklaşımlarını kullandıkları bir diğer çalışmada ise PKM2 (Pyruvate kinase, muscle) ve HSPA5 (Heat shock protein family A, member 5)'nin endometrial kanserlerin gelişiminde önemli biyomarkerlar olduğu gösterilmiştir. Yokoyama ve ark.¹⁰¹ iTRAQ (Isobaric tags for relative and absolute quantitation) teknolojisi kullanarak membran yüzey proteinleri ile gerçekleştirdikleri diğer bir çalışmada ise BST2 (Bone marrow stromal cell antigen 2)'nin endometrial kanser tedavisinde kullanılabileceği yönünde sonuçlar almışlardır.

Endometrium kanserinin önceden önlenmesi ve erken tanısıyla ilgili yapılan önemli proteomik çalışmaları olmasına rağmen hala yeterli değildir. Görüldüğü gibi endometrial kanserlerin gelişimi ve ortaya çıkışı hakkında bize ipuçları verecek, bu hastalıkların altında yatan moleküler mekanizmaları aydınlatmaya yardımcı olacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bu çalışmanın temel amacı; normal endometrium dokusunun hücrel düzeyde hangi

değişimleri göstererek hiperplazik dokuya ve kansere dönüştüğünü proteom seviyesinde ortaya koymaya çalışmaktır. Ortaya konulacak hedef proteinler endometrium kanserinin patofizyolojisinin daha iyi anlaşılmasına, erken evrede tanı konulmasına yardımcı olabileceği gibi, hastalığın ilerleyişini önlemek ve tedavi modaliteleri adına yeni stratejilerin geliştirilmesi hakkında da fikir verebilir.

6.12.4. Çalışmada Anlamlı Olarak Tespit Ettiğimiz Proteinlerin Genel Bilgileri

Deney grupları içerisinde farklılık gösteren, MALDI TOF/TOF-MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization time-of-flight, Mass Spectrometry) analizine tabi tutulan protein spotlarında tanımlanan proteinlerin genel bilgileri aşağıda verilmiştir.

6.12.4.1. K2C8 (Sitokeratin 8; CK8; K8)

K2C8 yapısal bir protein olup, sadece epitel hücrelerin sitoplazmalarında dimeri CK18 ile birlikte bulunan ara filamanlardan biridir. Diğer keratinlerle birlikte K2C8 hücrenin kendine özgü şeklini oluşturur ve hücreyi mekanik stresten koruyarak stabil bir çevre oluşturur. Sitokeratin ara filamanlar sayesinde sinyal molekülleri, metabolik ürünler ve patojenler hücre içinde rahatça taşınırlar. Epitel kaynaklı tümör hücrelerinde K2C8'in fosforilasyonunda oluşan bir hata veya sentezinde oluşan mutasyondan dolayı, K2C8 hücre membranında ektopik odak olarak oluşarak doku plazminojen aktivatörüne dönüşür. Tümör hücresi bu sayede yeniden yapılır ve çevre dokuya daha kolay yayılır^{102, 103}.

6.12.4.2. UAP56 (Spliceosome RNA helicase; BAT1;DDX39B)

UAP56 ATP bağımlı RNA helikaz olup aynı zamanda ATPaz aktivitesine sahiptir. ATP' yi hidrolize ederek oluşan enerjiyi gevşek olan çift sarmallı RNA molekülüne aktarır. DExD/H-box helikaz protein ailesindedir. UAP56 başlangıçta insan majör histokompatibilite kompleksi HLA-B'nin sentromerik genlerinin analiziyle tespit edilmiştir ve BAT1(HLA B ilişkili transkript 1) olarak bilinir. BAT1 önemli bir RNA splicing faktör olarak yeniden keşfedildi ve UAP56 olarak yeniden adlandırıldı¹⁰⁴. UAP56 spliceosomların birbirine eklenmesinde ve mRNA'nın çekirdekte sitoplazmaya

taşınmasında gereklidir. RNA parçalarının birleşmesinden ve mRNA taşınmasında UAP56 rolü göz önüne alındığında, UAP56 protein sentezi ve takip eden hücre hipertrofinde önemli bir rol oynar. UAP56 ekspresyonunun artışıyla hücrede protein sentezinin artışı arasında ilişki vardır^{104, 105}.

6.12.4.3. PDIA3 (Protein disulfid izomeraz A-3)

Protein disulfid izomerazlar (PDIs) proteinlerin katlanmasında, disulfid bağlarının oluşturulmasında ve izomerizasyonunda görevlidir. Ayrıca PDIs şaperon olup, katlanmamış polipeptidlerin agregasyonunu inhibe eder ve/veya polipeptidlerin yeniden katlanmasına yardımcı olur. PDIA3 geni hücresel strese cevap olarak yüksek oranda eksprese olur ve ürünleri de birer şaperondur. Ayrıca hasar tanıma kompleksinin bir üyesi olarak DNA tamiri ile bağlantılıdır ve bilinen onarım fonksiyonları ile genlere bağlanarak gen onarımında potansiyel düzenleyici olarak görev alır^{106, 107}.

6.12.4.4. ENOA (α -Enolaz)

ENOA glikolitik yolda 2-fosfogliseratı fosfoenolpiruvata katalizleyen metalloenzimdir. Arkebakterilerde ve memelilerde bulunur. Memelilerde 3 gen; ENO1, ENO2, ENO3 tarafından sırasıyla 3 izoformu sentezlenir; α -enolaz, γ -enolaz, β -enolaz. Bu izomerler dokuya spesifik olarak sentezlenir. ENOA neredeyse tüm dokularda, β -enolaz kas dokusunda, γ -enolaz nöron ve nöroendokrin dokularında bulunur. Enzimatik aktivitesinin dışında birçok prokaryot ve ökaryot hücrelerin hücre membranlarında plasminojen reseptörü gibi davranarak hücre göçünde ve kanser metastazında rol alır. Ayrıca ENO1 alternatif başlama kodonuyla 37 kDa protein olan c-myc promoter-binding protein (MBP-1) sentezini başlatır. MBP-1 ENOA'nın nükleusta bulunan kalıntısı olup bir onkogen olan c-myc geninin P2 promotör bölgesine bağlanarak tümör supresyonunda görev alır¹⁰⁸. ENOA aynı zamanda tümör hücrelerinde fazla eksprese olarak humoral ve hücresel immun yanıtın oluşmasını indükler. Bu yüzden ENOA gerçek bir tümör ilişkili antijen olarak kabul edilir¹⁰⁹. Kanser hücreleri normal hücrelere göre daha fazla glukoz kullanır; aerobik glikolizin artmasıyla ENOA ekspresyonunda da artış olur. Glikoliz

enzimlerinin ekspresyonları hipoksi varlığında artar. Solid tümörler 1 mm³ ü aştıklarında yavaş anjiogeneze bağlı olarak hipoksik strese maruz kalırlar. Böylece ENOA beyin, meme, serviks, over, mide, kolon, akciğer, vs. gibi birçok kanser tipinde ekspresyonu artar^{108, 110}.

6.12.4.5. TRFE (Serotransferrin)

TRFE, kan yoluyla demir taşıyan bağlayıcı protein olarak sınıflandırılmış bir glikoproteindir. Normal hücreye göre hızlı proliferasyon için daha fazla demir ihtiyacı olan tümör hücreleri için kritik bir role sahiptirler. Kandan daha fazla transferrini alabilmek için tümör hücrelerinin membranında TRFE reseptörü sayısı artar. Demir metabolizmasında görev alan proteinlerin bozulması, kanser gelişiminde kritik bir role sahiptir. Serbest demir toksik olup dokularda oksidatif hasara neden olarak serbest radikallerin oluşumunu ve hidroperoksitleri reaktif peroksil ve alkoksil radikallerine dönüştürerek lipid peroksidasyonunu tetikler. TRFE miktarının belirlenmesi; kanserin durumunun değerlendirilmesini genişletmek ve hedeflenen kemoterapi ile tedaviyi geliştirmek için değerli olabilir^{111, 112}.

6.12.4.6. ACTB (β -aktin)

ACTB tüm ökaryot hücrelerin iskelet yapısını oluşturan ve birçok dokuda yüksek miktarlarda bulunan önemli bir yapısal proteindir. Hücrede gen ekspresyonunda, immun yanıtta, yara iyileşmesinde, hücre göçünde, hücre bölünmesinde ve emrionik gelişimde kritik rollere sahiptir. Bu işlevler, ACTB'nin hızla hücre ihtiyaçlarına yanıt olarak monte ve demonte edilebilir filamentler oluşturma yeteneği ile ilişkilidir. ACTB ekspresyonu genellikle deneysel ve fizyolojik koşullardan etkilenmez; bu yüzden hücre ve dokularda protein ve genlerin değişikliklerinin ölçülmesinde sıkça kullanılan bir referans değerdir. Bu varsayımdan dolayı ACTB genellikle bir housekeeping geni olarak kabul edilir. ACTB seviyesi oldukça farklı olarak çeşitli hücre ve doku türlerinde belirli metabolik şartlar altında düzenlenmiştir^{113, 114}. ACTB'nin seviyesi, polimerizasyonu, hücre iskeleti organizasyonu ve tümör hücrelerinin invazyon ve metastaz kapasitesi arasında belirgin bir

korelasyon olduğunu düşündürmesine rağmen ACTB'nin kanser patogenezindeki rolü henüz tam olarak anlaşılamamıştır. ACTB tümör hücrelerinde yeniden düzenlenerek tümör hücresinin oluşumunu, invazyonunu ve metastazını etkiler. ACTB'nin karaciğer, melanom, böbrek, kolon, mide, pankreas, özefagus, akciğer, meme, prostat, over kanserlerinde, lösemi ve lenfomada farklı düzeyde eksprese olduğu bulunmuştur^{114, 115}.

6.12.4.7. GRP78 (78 kDa glucose-regulated protein)

GRP78 endoplazmik retikulum (EnR)'da bulunan bir 78 kDa şaperon proteini ve ısı şok protein 70 ailesinin üyesi bir ATPaz'dır. Ayrıca mitokondri ve nukleusta da bulunur. Proteinlerin EnR'a translokasyonunun düzenlenmesi, proteinlerin katlanmasının sağlanması, doğru katlanmamış proteine yanıt (UPR; unfolding protein response)'ın düzenlenmesi, apoptozisin düzenlenmesi GRP78'in başlıca görevleridir. Hipoksi, oksidatif stres ve diğer metabolik bozukluklara maruz kalan kanser hücreleri EnR stresine ve UPR yolağının aktivasyonuna neden olur. Bu yüzden GRP78 birçok kanserin oluşumunda önemli bir role sahiptir¹¹⁶. Yükselmiş bir GRP78 seviyesi, kanser hücrelerinin olumsuz şartlara karşı korunmasında yardımcı olan önemli bir faktördür. Aslında, kanser hücrelerinde GRP78 protein düzeyi malignite, metastaz ve ilaç direnci ile ilişkili olduğu bildirilmiştir^{112, 116}.

6.12.4.8. GSTP1 (Glutathione S-transferase P)

GST'lar faz 2 metabolik enzim ailesinin bir üyesi olup reaktif oksidatif ürünlerin detoksifikasyonunda önemli bir role sahiptirler. Ayrıca steroid hormonlara non-kovalent bağlarla bağlanarak ekstrasellüler hormon düzeylerinin kısa süreli dalgalanma etkisini minimize ederler. İnsanda bilinen üst familyasından GST'leri kodlayan en az 5 gen bilinmektedir (α , π , μ , θ , ζ). π –sınıfı (GSTP) birçok dokuda; prostat, plasenta, meme, kolon, beyin, özefagus, akciğer ve dalakta eksprese olan en yaygın gruptur¹¹⁷. GSTP1'in steroid hormon ilişkili karsinogenezde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. GSTP1 ekspresyonunun inaktivasyonu; genlerin promoter bölgesindeki CpG dinükleotidin metilasyonu ile ilişkili olduğu bulunmuştur^{118, 119}. Normal hücrelerde genlerin promoter

bölgesindeki CpG nükleotid adaları housekeeping genlerin, tümör supressör genlerin ve hücrel metabolizmada görevli genlerin ekspresyonlarını kolaylaştırır. CpG nükleotid adalarının metilasyonu bu genlerin ekspresyonları etkilenir. Bunun sonucunda da genlerin yapısında ve fonksiyonlarında önemli epigenetik değişiklikler olur. İnsan kanserlerinde, özellikle de prostat kanserinde GSTP1'in metilasyonunu gösteren önemli çalışmalar bulunmaktadır^{120, 121}. Prostat ve endometrium kanseri steroid hormon ilişkili karsinogenezler olduğundan benzer genetik değişikliklere sahip oldukları düşünülmektedir¹²².

6.12.4.9. ACTG (γ -aktin)

γ -aktin ACTG1 geni tarafından kodlanan bir hücre iskelet proteinidir. Aktin mitoz sırasında hücre iskeleti hızla yeniden düzenlenirken görev alır. Erken mitoz safhalarında kortikal hücre zarında ve sitokinez sırasında kasılma halkasında lokalize olur. Mitotik bağların oryantasyonu için önemli olduğuna inanılan, mitoz sırasında astral mikrotübüller ile kortikal aktin arasındaki bağlantının sağlanması için aktin ve aktin düzenleyici proteinler gereklidir. Aktin ve aktin düzenleyici proteinler sentrozomların ayrılmasında kritik rol oynarlar. Aktin ekspresyonunda oluşabilecek bir defekt mikrotübüllerin yapısını ve fonksiyonunu etkileyerek hatalı mitoz ve mayoz bölünmeye neden olur¹²³. Paklitaksel gibi mitotik arresti indükleyen anti-mitotik kemoterapötik ajanların etkileri γ -aktinin azalmasıyla azalır. Yani γ -aktin ekspresyonunun fazla olduğu kanser tiplerinde anti-mitotik kemoterapötik ajanlara yanıtın artabileceği düşünülmektedir¹²⁴.

6.12.4.10. PSME1 (Proteasome activator complex subunit 1)

PSME1 immün yanıtın kontrolünde çok önemli rolü olan immünoproteazom sisteminde bir aktivatördür. PSME1 kompleksi hücrede başlıca nükleusta ve sitoplazmada bulunur. PSME1'in hücre membranında nasıl lokalize olduğu tam olarak bilinmemektedir ancak birçok kanser tipinde hücre membranındaki ekspresyonu artmıştır. PSME1 proteazom klivaj paternini değiştirerek antijen işleme için gerekli olan sınıf 1 bağlayıcı peptitlerin

üretimini artırır. PSME1 ekspresyonu, interferon (IFN) ile tedavi edilen kolon kanseri hücrelerinde insan lökosit antijen (HLA)-sınıf I üretimini indükler¹²⁵.

6.12.4.11. CAH1 (Carbonic anhydrase 1)

CAH'lar çinko (Zn) içeren metalloenzimler olup çift taraflı karbondioksitin hidrasyon reaksiyonunu katalizleyerek bikarbonat ve hidrojen oluşturur. Memelilerde yaklaşık 16 tane CAH tanımlanmış olup, CAH1 en çok eritrosit ve gastrointestinal sistem hücrelerinin sitoplazmalarında bulunur. CAH izoenzimleri glokom, epilepsi, çeşitli kanser tiplerinin önlenmesi ve tedavisinde farmakolojik ajanların hedefi olabilir. Ayrıca bazı kanser tipleri için tanı biyobelirteci olabilir. CAH'lar hipoksi durumunda indüklenir. CAH ailesinden CAH 9 birçok kanser tipinde, metastaz ve kötü prognoz durumunda yüksek miktarda eksprese edilir¹²⁶.

6.12.4.12. SOD1 (Superoxide dismutase [Cu-Zn])

Ökaryot hücreler normal hücre metabolizması sonucunda reaktif oksijen türevleri (ROS; süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil radikalleri) üretirler. Ultraviyole (UV) ışınları, iyonize radyasyon veya kemoterapötik ajanlara bağlı hücredeki ROS seviyesindeki dalgalanma ve birikimine bağlı olarak proteinler, lipidler ve DNA zarar görebilir. ROS'un indüklediği hasara karşı ilk savunma hattı antioksidan enzim süperoksit dismutaz (SOD) tarafından süperoksitin hidrojen peroksite dönüşümüdür. Bakır (Cu) ve Zn'nun kofaktör olarak kullanıldığı SOD izoformu SOD1'dir. Beklendiği gibi, SOD izoformlarının fonksiyonundaki bozukluklar insanda tümör gelişimi dahil sayısız patolojik değişikliklere neden olur. Tümör hücreleri özellikle oksidatif stresin yüksek seviyelerine maruz kaldıkları için, SOD'un bu hücrelerde genişletilmiş bir etkisinin olması beklenmektedir. ROS türevlerinin özellikle süperoksit düzeylerinin artmasıyla hücre döngüsünün, hücre çoğalmasının ve hücrenin neoplastik değişime ilerlemesi uyarılabilir¹²⁷.

6.12.4.13. CALR (Calreticulin)

CALR şaperon aktivitesi ve kalsiyum homeostazı ile ilgili çoklu fonksiyonları olan ve hücrel proliferasyon ve differansiyasyonda, apoptoz gibi immünojenik hücre ölümünde önemli bir rol oynayan yüksek ölçüde korunmuş endoplazmik retikulum (EnR) proteindir. Bu protein 3 ana kısımdan oluşur; 1) N-terminal lectin-binding kısmı Zn^{+2} inin bağlandığı şaperon aktivitesinin olduğu kısım , 2) Prolin' den zengin olan, yüksek affinite düşük kapasitede kalsiyum (Ca^{+2})'nin bağlandığı P kısmı, 3) Multipl Ca-bağlanma bölgesinin olduğu C kısmıdır. CALR EnR içinde ve dışında yer alır. Ayrıca hücre yüzeyinde, sitoplazmada, nükleusta ve hücre dışı matrikste gerçekleşen birçok hücrel fonksiyonda, örneğin; lipid ve protein sentezinde, protein katlanmasında, Ca^{+2} depolamasında, post-translasyonel modifikasyonda etkili bir rol alır¹²⁸.

6.12.4.14. ANXA1 (Annexin A1)

ANXA1 anneksin bağlayıcı protein ailesinin Ca^{+2} ve fosfolipid bağlama özelliğiyle bilinen bir proteindir. Ayrıca araşidonik asit metabolizmasında ve epidermal büyüme faktörü reseptör tirozin kinaz yolağında görevlidir. Daha sonra ANXA1'in apoptoziste kritik bir mediatör olduğu, glukortikoidlerin hücredeki anti-enflamatuar faaliyetlerinde, hücre membranında madde geçişi trafiğinde ve sinyal iletiminde, hücre proliferasyonunun inhibisyonunda ve hücre göçünün regülasyonunda görevli olduğu anlaşılmıştır¹²⁹.

6.12.4.15. PPIA/B (Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A/B; cyclophilin)

PPI'lar temel işlevi şaperon olan eşsiz bir protein ailesinin üyesidirler. Aynı zamanda siklofilinler olarak da bilinirler. Başlıca enzimatik görevleri; propil imid bağlarındaki rotasyonel enerji bariyerini düşürerek cis-trans prolin izomerizasyonunu kolaylaştırmak ve substratlarının yapısal değişikliklerini indüklemektir. 165 amino asitlik küçük bir protein olup ayrıca immünsüpresif ilaç Siklosporin A'nın reseptörüdür. Birçok siklofilinler esansiyel proteinler olmamasına rağmen sinyalizasyon ve gen ekspresyonu yollarının kontrolü gibi çeşitli rolleri nedeniyle hastalık spektrumunda ilaç hedefleri olarak dikkat

çekmiştir. Birkaç önemli siklofilin RNA-aracılı gen ekspresyonunda ve özellikle pre-mRNA fragmanlarının eklenmesinde önemli görevler alırlar¹³⁰.

6.12.4.16. RSSA (40S ribozomal protein)

Ribozomal RNA (rRNA), ribozomlarda bulunan bir RNA tipidir. rRNA'nın görevi, mesajcı RNA (mRNA)'daki bilginin translasyon süreci sırasında amino asit dizisine çevrilmesi için tRNA ile etkileşmek ve uzayan peptid zincirine amino asit bağlamaktır. Hücre sitoplazmasında bulunan RNA'nın %80'i rRNA'dan oluşur. Ribozom rRNA ve proteinlerden oluşan iki altbirimden meydana gelir. mRNA'nın ribozom tarafından translasyonu sırasında mRNA bu iki altbirim arasında yer alır. Küçük altbirime iki taşıyıcı RNA (tRNA) bağlıdır, bunlardan birine uzamakta olan peptid zinciri bağlıdır, öbürüne ise bu zincirin ucuna eklenecek olan yeni bir amino asit bağlıdır. Ribozom bu amino asidin peptid zincirine eklenme tepkimesini katalizler¹³¹.

Ökaryotlar hücrelerde küçük ribozomal altbirimde 40S (18S) rRNA ve 33 protein, büyük altbirimde ise 60S (5S, 5.8S ve 28S) rRNA ve 50 protein vardır. Büyümekte olan hücreler pek çok ribozoma gerek duyduklarından çok sayıda rRNA sentezlemek durumundadırlar. Ribozomal proteinlerde oluşacak bir defekt hücrenin hücresel fonksiyonlarını gerçekleştirilmesi için gerekli olan protein sentezinde bir defekt oluşmasına neden olur. Mutant bir genin ekspresyonu sonucunda anormal düzeyde üretilen ribozomal proteinler bazı hastalıklara ve kanser tiplerine özgü olabilir^{131, 132}.

6.12.4.17. EF-Tu (Elongation factor Tu, mitochondrial)

EF-Tu mitokondrinin önemli bir proteini olup, mitokondrial proteinlerin sentezinin elongasyon kısmında anahtar bir role sahiptir. EF-Tu'nun başlıca görevi aminoasit-tRNA'yı ribozomun A bölgesine götürmektir. Ayrıca yapılan çalışmalarda EF-Tu'nun şaperon ve sinyal iletiminde rolü olduğu rapor edilmiştir. EF-Tu'nun birçok dokuda yüksek düzeylerde ekspresyonu yapılırken en çok kalp ve beyin dokusu gibi aktif oksidatif metabolizmanın yüksek olduğu dokularda yapılır^{133, 134}.

6.12.4.18. HSPB1 (heat shock protein beta 1)

HSPB1 aynı zamanda HSP27 olarak bilinen hücre metabolizmasında geniş görev alanı olan ısı şok protein (HSP) ailesinin bir üyesidir. Çeşitli HSP'ler hücrelerde normal bir şekilde eksprese edilir. Hücre döngüsü sırasında hormonların etkisiyle hücre gelişiminin ve farklılaşmasının farklı evrelerinde farklı eksprese edilir ve/veya düzenlenirler. HSP'ler öldürücü ısı şoku, UV ışınlar, çeşitli kimyasallara karşı korunmada hücreyi aktive ederler. Çeşitli stres faktörlerine karşı HSPB1, aktin hücre iskelet sisteminin stabilize olmasını sağlayan şaperonlardan biridir. HSPB1, HSP70 ve HSP90 insan endometriumunda eksprese olan HSP'lerdir. HSPB1'in aynı zamanda östrojen reseptörleriyle ilişkili olduğu bilinmektedir^{135, 136}.

6.12.4.19. IDHc (Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic)

İzositrat dehidrogenaz sitoplazma (IDHc) ve mitokondride (IDHm) bulunan enzimatik bir antioksidandır. IDH glutatyon rejenerasyonu için gerekli olan indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH)'ı NADP⁺'ı indirgeyerek üretir. En çok ciltte olmakla birlikte böbrek ve karaciğerde yüksek düzeylerde bulunur. Kanser gelişiminde ve yaşlanmada serbest oksijen radikalleri etkin bir rol oynar. Glutatyon hücrede serbest oksijen radikallerinin etkilerini minimalize eden antioksidanlardan biridir¹³⁷.

7. GEREÇ VE YÖNTEM

7.1. Çalışma Gruplarının Belirlenmesi

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'nda yerel etik kurul onayı sonrasında, 01.Eylül.2014 – 01.Ağustos.2015 tarihleri arasında anormal uterin kanama ve postmenopozal kanama yakınmaları nedeniyle dilatasyon ve küretaj (D&C) yapılmış ve materyalin histopatolojik incelemesi sonucunda “benign endometrial değişiklikler”, “kompleks atipili endometrial hiperplazi” ve “endometrioid tip adenokarsinom” rapor edilmiş ve bu tanılar ile opere edilen 30 olgu yazılı aydınlatılmış onamları alınması sonrasında çalışmaya alındı. Çalışma dışı bırakılma kriterleri: a. Neo-adjuvan tedavi almış olmak, b. Endometrioid dışı histopatolojik tanıya sahip olmak, c. Yazılı onamın kabul edilmemesi olarak belirlendi.

Çalışmada değerlendirilen 30 olgunun 10'una TAH/BSO, dördüne TAH/BSO/pelvik lenf nodu disseksiyonu (PLND), 16'sına TAH/BSO/ pelvik-paraortik lenf nodu disseksiyonu (PPLND) /Omentektomi yapıldı. Tüm olgularda uterus donmuş-kesit (frozen-section) inceleme için patolojiye gönderildi. Donmuş-kesit inceleme esnasında yeterli endometrial dokusu olan hastalardan steril şartlarda proteomik değerlendirilmesi için endometrial örnekleme yapıldı ve örnekler protein degradasyonuna fırsat vermemek için hemen sıvı azot içerisinde dondurulup proteomik laboratuvarına ulaştırıldı. Örnekler çalışılacağı güne kadar -80°C'de saklandı.

Hastaların nihai patoloji raporlarına göre her grupta en az 3 hasta olacak şekilde 6 çalışma grubu belirlendi: a. Benign endometrial değişiklik olguları (grup 1, n=7, kontrol grubu), b. Kompleks atipili endometrial hiperplazi olguları (grup 2, n=5), c. Evre IA endometrioid tip adenokarsinom olguları (grup 3, n=5), d. Evre IB endometrioid tip adenokarsinom olguları (grup 4, n=5), e. Evre II endometrioid tip adenokarsinom olguları (grup 5, n=3), f. Evre III endometrioid tip adenokarsinom olguları (grup 6, n=5) (Tablo 8).

Tablo 8. Hastaların histopatolojik özelliklerine göre gruplandırılması

Grup	Örnek no	Yaş	Histolojik tip	Grade	Evre
1	1	46	Progesteron etkisinde endometrium		
	2	46	Sekresyon döneminde endometrium		
	3	46	İnaktif endometrium		
	4	53	Atrofik endometrium		
	5	59	Atrofik endometrium		
	6	62	Atrofik endometrium		
	7	64	Atrofik endometrium		
2	8	51	Kompleks atipili endometrial hiperplazi		
	9	51	Kompleks atipili endometrial hiperplazi		
	10	51	Kompleks atipili endometrial hiperplazi		
	11	52	Kompleks atipili endometrial hiperplazi		
	12	63	Kompleks atipili endometrial hiperplazi		
3	13	40	Endometroid tip adenokarsinom	2	IA
	14	52	Endometroid tip adenokarsinom	2	IA
	15	53	Endometroid tip adenokarsinom	1	IA
	16	62	Endometroid tip adenokarsinom	1	IA
	17	68	Endometroid tip adenokarsinom	2	IA
4	18	57	Endometroid tip adenokarsinom	1	IB
	19	60	Endometroid tip adenokarsinom	2	IB
	20	68	Endometroid tip adenokarsinom	1	IB
	21	70	Endometroid tip adenokarsinom	1	IB
	22	78	Endometroid tip adenokarsinom	2	IB
5	23	54	Endometroid tip adenokarsinom	1	II
	24	62	Endometroid tip adenokarsinom	2	II
	25	71	Endometroid tip adenokarsinom	2	II
6	26	52	Endometroid tip adenokarsinom	1	3A
	27	43	Endometroid tip adenokarsinom	2	3C1
	28	56	Endometroid tip adenokarsinom	3	3C1
	29	59	Endometroid tip adenokarsinom	2	3C1
	30	61	Yüksek dereceli endometroid tip adenokarsinom	3	3C2

7.2. Örneklerden Protein Özütlerinin Hazırlanması

Saklandıkları sıvı azot tankından çıkarılan kanserli dokular ve sağlıklı kontrol dokuları protein izolasyonu öncesi en az üç kez soğuk tampon çözelti (Phosphate buffered saline; PBS) ile yıkandı. Bu yıkamaların amacı; örnekler üzerinde bulunan kanı mümkün olduğu kadar uzaklaştırmaya çalışmaktır. Kanlı kalacak bir dokudan elde edilecek protein örnekleri kandan gelecek proteinlere ait kontaminasyondan dolayı daha sonraki analizlerde sorun çıkarmaktadır (yıkama işlemleri buz üzerinde yapıldı). Kandan tamamen uzaklaştırılan örnekler daha sonra buz içerisinde tutularak (örneklerin ısınmasını engellemek amacı ile) hazır bir tür doku protein izolasyonu tamponu olan T-PER (Tissue Protein Extraction Reagent; Thermo Scientific) içerisinde homojenize edildi. Homojenizasyon için örnekler arasındaki izolasyondan kaynaklı farklılıkları ortadan kaldıran, çapraz kontaminasyonu engelleyen Bullet Blender teknolojisi kullanıldı. Bu sistem izole edilecek dokuya uygun beadler ile doku arasında oluşan mekanik etkileşim sonucu homojenizasyonu sağlamaktadır. Örneklerin homojenizasyonu sırasında protein yıkımını engellemek için proteaz inhibitör karışımı eklendi. Homojenize edilen kanserli doku ve normal doku örneklerinden proteinleri içeren sıvı kısmı elde edebilmek için örnekler önce 4°C’de 10.000xg(x gravity)’de 10 dakika (dk) santrifüj edildi, oluşan sıvı üst faz temiz yeni tüpe alınarak örnekler tekrar 4°C’de 20,000xg’de 30 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda iyice temizlenen protein içeren supernatant dikkatlice pipet yardımıyla alınarak Lo-Binding tüpler içerisine aktarıldı.

7.3. Protein Örneklerinin Triklorasetik Asit (TCA)-Aseton Çöktürmesi Yöntemi ile Temizlenmesi

Örnekler buz üzerinde çözüldükten sonra tuzları ve diğer uygun olmayan maddeleri uzaklaştırmak için TCA-Aseton ile çöktürülerek temizlendi. Her bir örneğin hacimce dörtte biri TCA örneklere eklenerek 4°C’de 10 dk bekletildi. Tüpler mikrosantrifüjde 14000xg de 5 dk santrifüj edildikten sonra çöken proteinlerden sıvı kısım dikkatli bir şekilde ayrıştırıldı. Protein çökeltileri 200 µL (mikrolitre) aseton ile yıkandıktan sonra mikrosantrifüjde 14000xg de 5 dk santrifüj edildi ve sonrasında asetonu uzaklaştırmak için proteinler 5 dk oda sıcaklığında bırakıldı. Çökelek 250 µL rehidrasyon tamponu içerisinde çözüldükten sonra protein konsantrasyonu belirlendi [Rehidrasyon tamponu: 8M urea, %0,2(w/v) Bio-Lye 3/10 ampholytes, %2 CHAPS, 50 Mm dithiothreitol (DTT) ve

Bromophenol Blue].

7.4. Protein Konsantrasyonunun Tayini

Örneklerin -80°C’de saklama öncesi protein konsantrasyonları ölçüldü. Protein konsantrasyonları hazırlanan örnekler ve gerekli örnek dilüsyonları Lowry assay (NanoDrop1000, Thermo Scientific) veya BCA assay (Multiscan FC, Thermo Scientific) kullanılarak hazırlanan karışımlar tüplere konuldu. Tüplerin üzerine konsantrasyonları yazılarak hızlı dondurma sonrası -80°C’de saklandı.

7.5. Protein Örneklerinin Odaklanmaları ve 2D Jel Elektrofrezleri

Protein örnekleri ilk aşamada IPG (Immobilised pH gradient) stripler üzerine geçebilmeleri için striplerle birlikte rehidrasyon işlemine tabi tutuldu. İzoelektrik odaklamada öncül denemeler için 7cm’lik, analizler için ise 11 cm’lik IPG stripleri (7cm; pH 3-10 ve 11cm; pH 5-8 IPG ReadyStrip, BioRad) kullanıldı. (Gerektiğinde preparatif jeller için 17cm’lik pH 5-8 IPG stripler de kullanıldı). Bu aşamada 7cm IPG stripler için 25-50µg, 11cm IPG stripler için ise 100-200 µg (mikrogram) protein örneği kullanıldı. Gerekli miktardaki protein örneği 2D rehidrasyon buffer (son miktar 7cm’lik stripler için 125µl, 11cm’lik stripler için ise 200µl ve 17cm’lik stripler için ise 300µl dir) ile karıştırılıp içerisine stripin pH’sına uygun %1 Amphylote ve %1 TBP eklendi. Bu aşamadan sonra protein örnekleri fokuslama trayleri içerisine konuldu ve örneklerin üzerlerine uygun IPG stripler dikkatli bir şekilde yerleştirilerek 50µA/IPG Strip akım uygulanacak şekilde PROTEAN IEF (BioRad) içerisinde aktif rehidrasyona tutuldu (20°C). Aktif rehidrasyon sırasında 1. saatin sonunda örneğin buharlaşmasını önlemek için IPG striplerin üzerine 2-3 ml mineral yağı ilave edilerek yaklaşık 16 saat süre ile rehidrasyon işlemine devam edildi.

Rehidrasyon işleminden sonra IPG striplerin izoelektrik odaklamasına geçildi. Rehidrasyon sonunda IPG stripler alınarak üzerlerinde fazla miktarda bulunan yağ kurutma kağıdı ve su yardımı ile temizlenip, ardından temiz bir fokuslama trayi içerisine konularak üzerlerine yeni mineral yağ eklendi. Trayler daha sonra yine PROTEAN IEF (BioRad) içerisine konularak adım adım akımı yükselten üç aşamalı bir program ile 20°C’de fokuslandı. (7cm’lik IPG stripler için S1:250V 20 dk Linear, S2: 4000V 2 saat

Linear, S3: 4000volt, 10000 V-saat, Rapid, toplam 5 saat 14000 V-saat. 11cm'lik IPG stripler için S1:250V 20 dk Linear, S2: 8000V 2.5 saat Linear, S3: 8000volt, 20000 V-saat, Rapid, toplam 5.3 saat ~30000 V-saat. 17cm'lik IPG stripler için S1:250V 20 dk Linear, S2: 10000V 2.5 saat Linear, S3: 10000volt, 40000 V-saat, Rapid, toplam 7 saat ~50000 V-saat.). Fokuslama sırasında proteinler ait oldukları izoelektrik noktalarına göre IPG strip üzerinde sıralandılar.

Fokuslama sonrasında stripler tampon I (6M üre, 0.375M tris-HCL pH8.8, 2% SDS, 20% gliserol, 2% (w/v) DTT) ve tampon II (6M üre, 0.375M tris-HCL pH8.8, 2% SDS, 20% gliserol, 2% (w/v) iodoasetamid) içerisinde 30 dk lık sürelerle yıkandı. Stripler bu aşamadan sonra hazırlanan ve precast olarak alınan poliakrilamid jellere (12% veya değişik konsantrasyonlarda) yerleştirilerek elektroforez (7 cm'lik stripler için Mini Protean Tetra Cell (Bio-Rad) kullanılarak 180V'da 55 dakika oda sıcaklığında, 11 cm'lik stripler için Criterion Dodeca Cell (Bio-Rad), 180V'da 1 saat 16°C'de ve 17 cm'lik stripler için Dodeca Cell (Bio-Rad) kullanılarak 35mA 30 dk, 48mA 5 saat 16°C'de) ile moleküler büyüklüklerine (MW) göre 2-DE ayırma tabii tutuldu. (Laemmli, 1970). İkinci boyutta ayırım sırasında kullanılan jeller için jel farklılıklarını ortadan kaldırmak amacıyla çoklu örnek çalışmalarında 11cm'lik stripler için Criterion hazır jeller veya 17'cm'lik stripler için DODECA (BioRad) jel dökme, jel yürütme ve boyama sistemi kullanıldı.

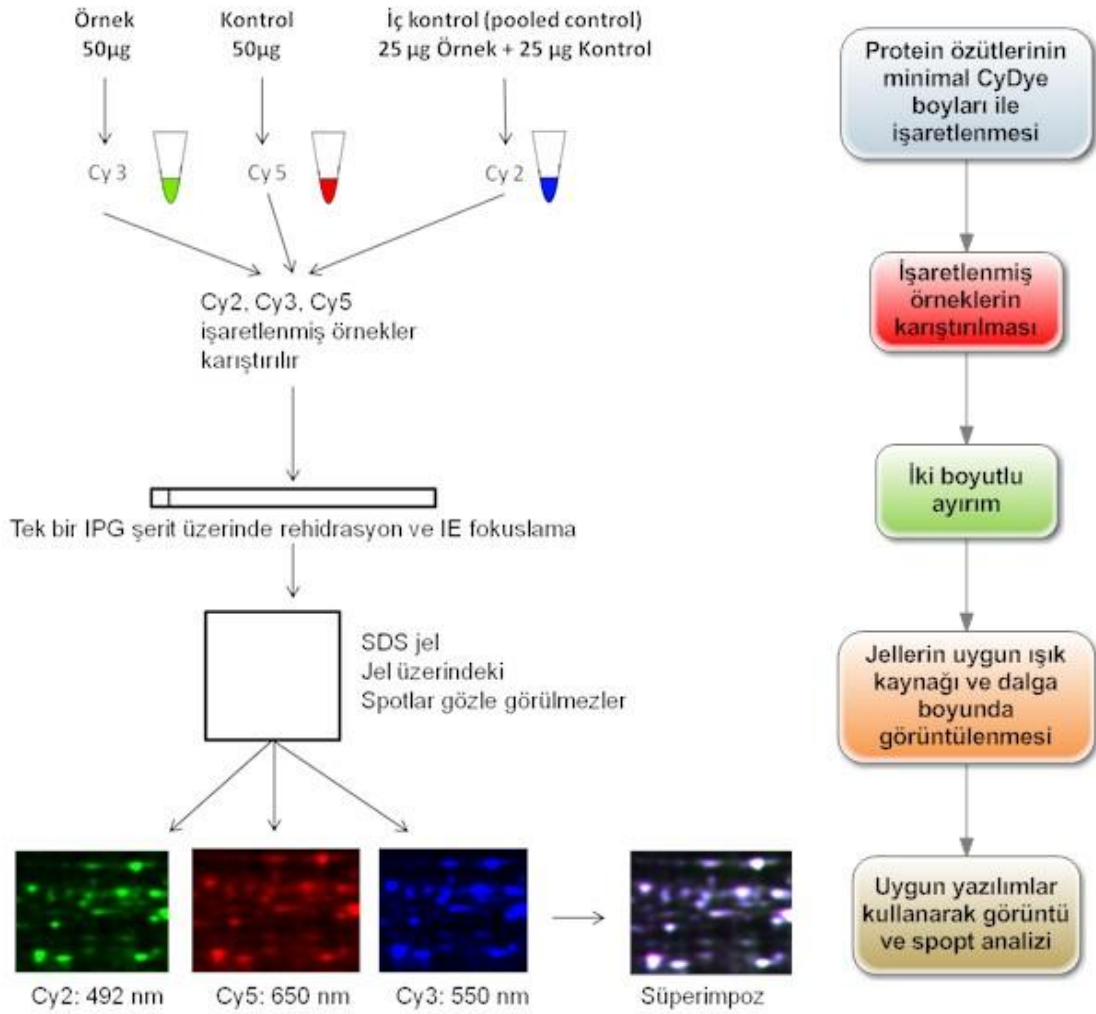
Elektroforez sonrasında jeller 40% metanol, 10% asetik asit içerisinde en az bir saat fikse edilerek ardından SyproRuby (BioRad) boyası içerisinde gece boyu boyandı. Jellerin görüntülenmesi VersaDoc sistemi (BioRad) ile yapıldıktan sonra jellerin analizleri PDQuest Advanced programı ile yapılarak istatistiksel olarak anlamlı olan spotların kesimi Spot-cutter robotu (BioRad) ile yapıldı.

7.6. DIGE (Difference Gel Electrophoresis) Analizi

Klasik iki boyutlu jel elektroforezine ek olarak, daha detaylı araştırma için protein örnekleri ile DIGE analizi yapıldı. Burada temel kavram örneklerin jellerde yürütülürken oluşabilecek jelden jele farklılıkları en aza indirmek, protein örneklerine floresan boyalar ekleyerek 0.5-1ng seviyesinde protein çözünürlüğünü arttırmaktır.

Her minimal DIGE deneyi üç farklı Cye boyası ile yapılmaktadır. Örnekler Cy3 ve Cy5 ile işaretlenip, bu örneklerin eşit miktarda karışımlarından oluşan iç standart ise Cy2 floresan boyası ile işaretlendi. Şekil 4’te DIGE deneyine ait genel bir akış şeması verilmiştir.

Şekil 4. Minimal DIGE işaretlemenin deneysel basamakları (@KOU Proteomiks Lab)



İşaretleme aşamasından sonra örneklerin bir arada tek bir IPG şerit üzerinde fokuslanması ve tek bir SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate – Poly Acrylamide Jel Elektroferez) ile yürütülmesi klasik 2D’de olduğu gibidir.

Tek bir IPG strip ve jel üzerinde yürütülen örneklerin, jelin üç farklı ışık kaynağı ile alınan (Cy2: 492 nm, Cy3: 550 nm ve Cy5: 650 nm) görüntüleri uygun yazılımlar vasıtası ile üst üste çakıştırılarak istenilen DIGE görüntüsü elde edildi. Jellerin görüntülenmesi VersaDoc sistemi (BioRad) ile uygun filtreler ve ışık kaynakları kullanılarak yapıldıktan sonra jellerin analizleri PDQuest Advanced programı ile yapılarak istatistiksel olarak anlamlı olan spotların kesimi Spot-cutter robotu (BioRad) ile yapıldı.

7.7. SPOT Analizi ve Spot Kesimi

Jellerin görüntüleri önce QuantityOne (BioRad) yazılımı ile elektronik ortamda spot analizi yapmak için uygun formata getirildi. Ardından PDQuest Advance (BioRad) yazılımı ile spot analizi gerçekleştirildi. Kısaca; jellerin ait olduğu gruplar bu yazılım sayesinde karşılaştırıldı, 2 kat artış ve azalış gözlenen spotlar seçilerek protein spotlarının jelden kesim işlemine geçildi.

Spotların jelden kesimleri otomatize spot kesme (BioRad) cihazı yardımı ile yapıldı. Kesimler esnasında 1.5 mm'lik kesim ucu kullanıldı, daha önce jeldeki koordinatları belirlenen spotların bu uç yardımı ile kesilerek 96'lık platalere aktarıldı.

7.8. In-Gel Tripsin Kesimi ve Zip-Tip C18

Protein spotlarından peptidlerin elde edilebilmesi için proteinlerin jel içerisinde peptidlerine ayrılması ve ardından jelden izole edilmeleri gerekmektedir. Bu işlem için spot örnekleri %50 asetonitril (ACN) %50 25 mM amonyum bikarbonat çözeltisi içerisinde destain edilerek çalkalamalı vorktes üzerinde yıkandı. Yıkama sonunda örnekler 25mM amonyum bikarbonat içerisinde 10% TCEP olacak şekilde 60°C'de 10 dk disulfit bağlarının kırılması sağlanarak reducing edildi. Ardından son konsantrasyonu 100 mM iyodaasetamit (IAA) olan 25mM amonyum bikarbonat içerisinde oda sıcaklığında karanlıkta 1 saat bekletilerek indirgenmiş olan sistin yan zincirlerinden metillendi. (Alkylation). Bu işlem sonunda %100'lük ACN içerisine alınan spotlar, ACN uzaklaştırıldıktan sonra son konsantrasyonu 10ng/µl olan tripsin ile 30°C'de gece boyu kesime alındı.

Örneklerin Zip-Tip'leri uçların önce ACN ve 0.1% triflorik asit ile dengelenmesi ile başladı. Her örnek 25-30 defa pipetlendikten sonra MALDI matriks ile MALDI plate üzerine elüsyonu yapıldı.

7.9. MALDI TOF-TOF Analizi

Zip-tip sonrası MALDI plate üzerine yerleştirilen örneklerin AbSciex 5800 MALDI-TOF-TOF (MS/MS) cihazında analizleri yapıldı. MALDI-TOF-TOF bir kütle spektrometresi olup lazer ışığı kullanarak iyonize ettiği peptitleri vakumlu bir tüp içerisinde ayrıştırdıktan sonra kütle/yük (m/z) oranlarına ve peptitlerin amino asit dizilimlerine göre tanımlamaya yardımcı olur. Cihazdan elde edilen veriler online MASCOT data bankasından PROTEIN PILOT programı kullanılarak hangi proteine ait oldukları belirlendi. Elde edilen proteinler arasındaki biyolojik ilişkiyi ortaya koymak ve hücrel yolakları belirlemek için ise IPA (Ingenuity Pathway Analysis) ve PANTHER programları kullanıldı.

MALDI kalibrasyonu eksternal veya internal kalibrant kullanılarak yapılan, her bir spektrum için ortalama 200 lazer vuruşu kullanıldı. Elde edilen tüm spektralar (m/z), arama parametreleri; bir hatalı kesim bölgesi, fiksede modifikasyon olarak carbamidomethyl (cysteine), değişken modifikasyon olarak Met oksidasyonu, peptid yükü +1, monoizotopik kütle değerleri, peptid kütle toleransı ± 50 ppm, fragment kütle toleransı ± 0.25 Da olarak belirlenip MASCOT bilgi bankasında analiz edildi.

8. BULGULAR

Bu tez çalışmasında endometrium kanserinin farklı evreleri ile kontrol grubu olarak kullanılan sağlıklı endometrium dokularının protein profilleri proteomik yaklaşımlar olan DIGE tekniği kullanılarak karşılaştırıldı ve farklı ekspresyon gösteren protein spotları MALDI TOF/TOF-MS yöntemi ile tanımlandı.

8.1. Tüm Grupların Sağlıklı Endometrium Dokusuyla DIGE Deney Planı

DIGE 2-DE temelli bir yaklaşım olup bu teknikte proteinler üç farklı floresan boya ile işaretlenip (Cy2, Cy3 ve Cy5) tek bir IPG strip üzerinde fokuslandıktan sonra aynı 2-DE jel üzerinde ayırma tabi tutulur. Bu tekniğin klasik 2-DE tekniğine olan avantajı, farklı floresan boylarla işaretlenen proteinlerin tek bir havuzda toplandıktan sonra tek bir strip ve jel üzerinde ayırma tabi tutulmasıdır. Böylelikle klasik 2-DE jel elektroforezinde sıklıkla görülen jel'den jel'e olan varyasyon engellenmiş olunur ve alınan sonuçlar çok daha güvenilirdir. Tasarlanan beş farklı deneyde hangi protein örneğinin hangi floresan boya ile işaretlendiği tablo 9'da verildi.

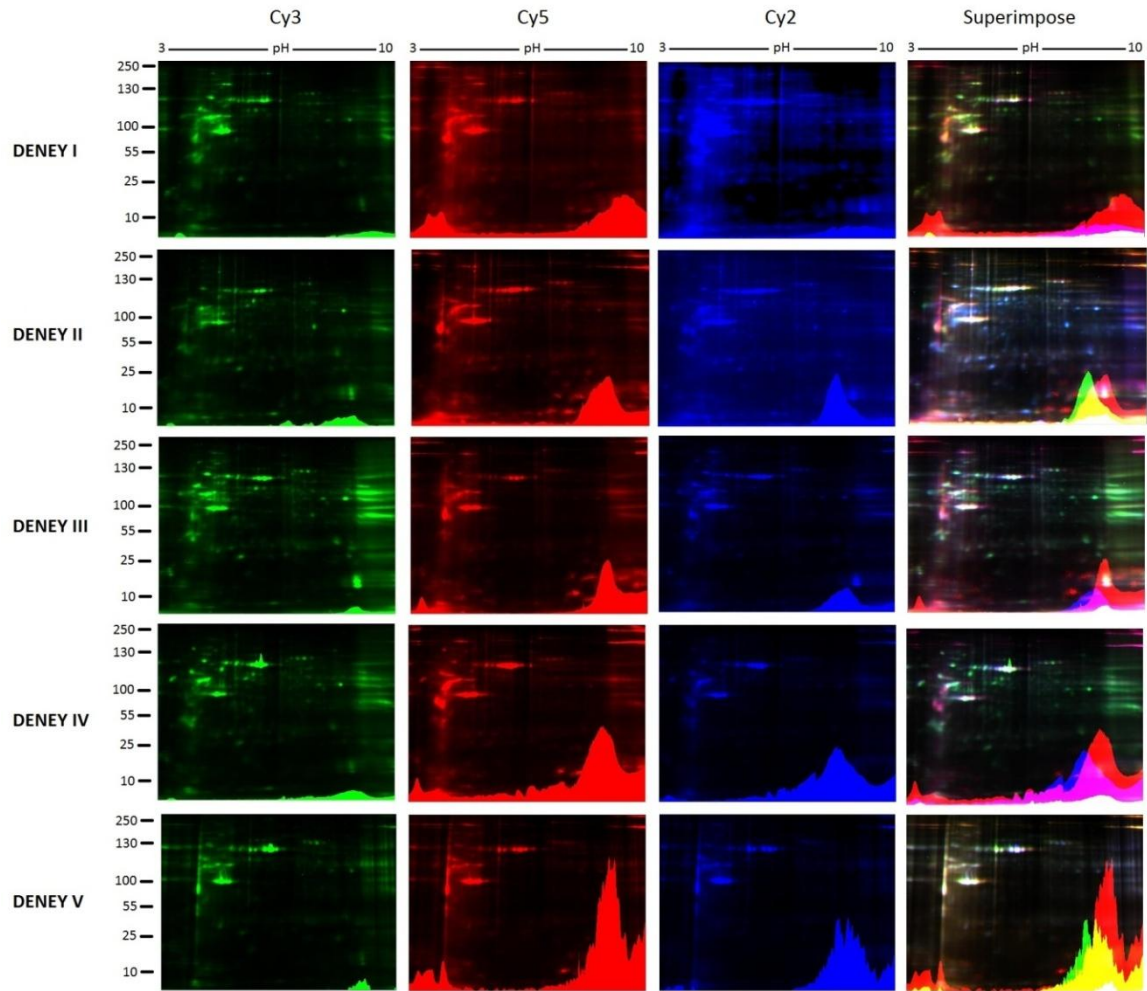
Tablo 9. Tasarlanan Beş Farklı Deneyde Protein Örneklerinin Cy3, Cy5 Ve Cy2 Floresan Boya İle Boyanması

Deney No	Cy3 (50µg)	Cy5 (50µg)	Cy2 (50µg)
DENEY I	Evre IA	Kontrol	Evre IA + Kontrol (Mix)
DENEY II	Evre IB	Kontrol	Evre IB + Kontrol (Mix)
DENEY III	Evre II	Kontrol	Evre II + Kontrol (Mix)
DENEY IV	Evre III	Kontrol	Evre III + Kontrol (Mix)
DENEY V	KAH	Kontrol	KAH + Kontrol (Mix)

Bu deneyde amacımız; evre IA, IB, II, III endometroid tip adenokarsinom dokusu ve kompleks atipili endometrial hiperplazi dokusunda ekspresyonu indüklenmiş proteinlerin sağlıklı endometrium dokusunda ekspresyonu indüklenmiş proteinler ile karşılaştırmaktır. Bu amaçla her bir deney grubuna ayrı ayrı yapılmak üzere evre IA, IB, II, III endometroid

tip adenokarsinomu dokusu ve kompleks atipili endometrial hiperplazi dokusunda ekspresyonu olan tüm proteinleri Cy3 floresan boyası ile, sağlıklı endometrium dokusunda ekspresyonu olan tüm proteinler Cy5 floresan boyası ile işaretlendi. Normalizasyon yapabilmek amacı ile her deney grubu için iki örnekten eşit miktarda alınan proteinler karıştırılarak Cy2 floresan boyası ile işaretlendi. Ayrı ayrı Cy3, Cy5 ve Cy2 ile işaretlenen protein örnekleri birleştirildikten sonra 2-DE jel elektroforezine tabi tutuldu (Şekil 5). Jellerin görüntüleri uygun ışık kaynakları altında alındıktan sonra spot analizi yapılarak jeller arasında değişen spotlar belirlendi.

Şekil 5. Deney Gruplarının Cy3, Cy5 ve Cy2 İle İşaretlenen Protein Örnekleri Birleştirildikten Sonra 2-DE Jel Elektroforezindeki Görüntüleri



8.2. MALDI Sonuçları

Deney grupları içerisinde farklılık gösteren protein spotları MALDI TOF/TOF-MS analizine tabi tutuldu, protein spotlarına ait peptidlerin m/z (kütle/yük) oranlarından elde edilen değerler MASCOT yazılımı kullanılarak Swissprot veri bankasında analiz edildi ve yüksek güvenilirlikte tanımlanan proteinler tablo 10' da verildi. Proteinler tanımlanırken en az iki peptide ait iyon skorunun olmasına dikkat edildi.

Elde edilen jel görüntüleri PDQuest Advance yazılımı yardımı ile analiz edildikten sonra her spot tek tek araştırmacı tarafından da kontrol edildi. Jeller üzerinde her deney grubu için ayrı olarak farklılaşan protein spotları belirlendi. Belirlenen protein spotlarının miktarı DIGE jellerinde MALDI analizi ile tanımlanmayacak kadar az olduğundan spotların kesilip MALDI ile analiz edilebilmeleri için örnekler tekrar IPG striplerde fokuslandıktan sonra preparatif jeller dökülerek örnekler tekrardan burada da yürütüldü. MALDI TOF/TOF-MS analizi sonucu tanımlanan proteinlerin pozisyonları şekil 6'da verilmiştir.

8.3. DENEYLER

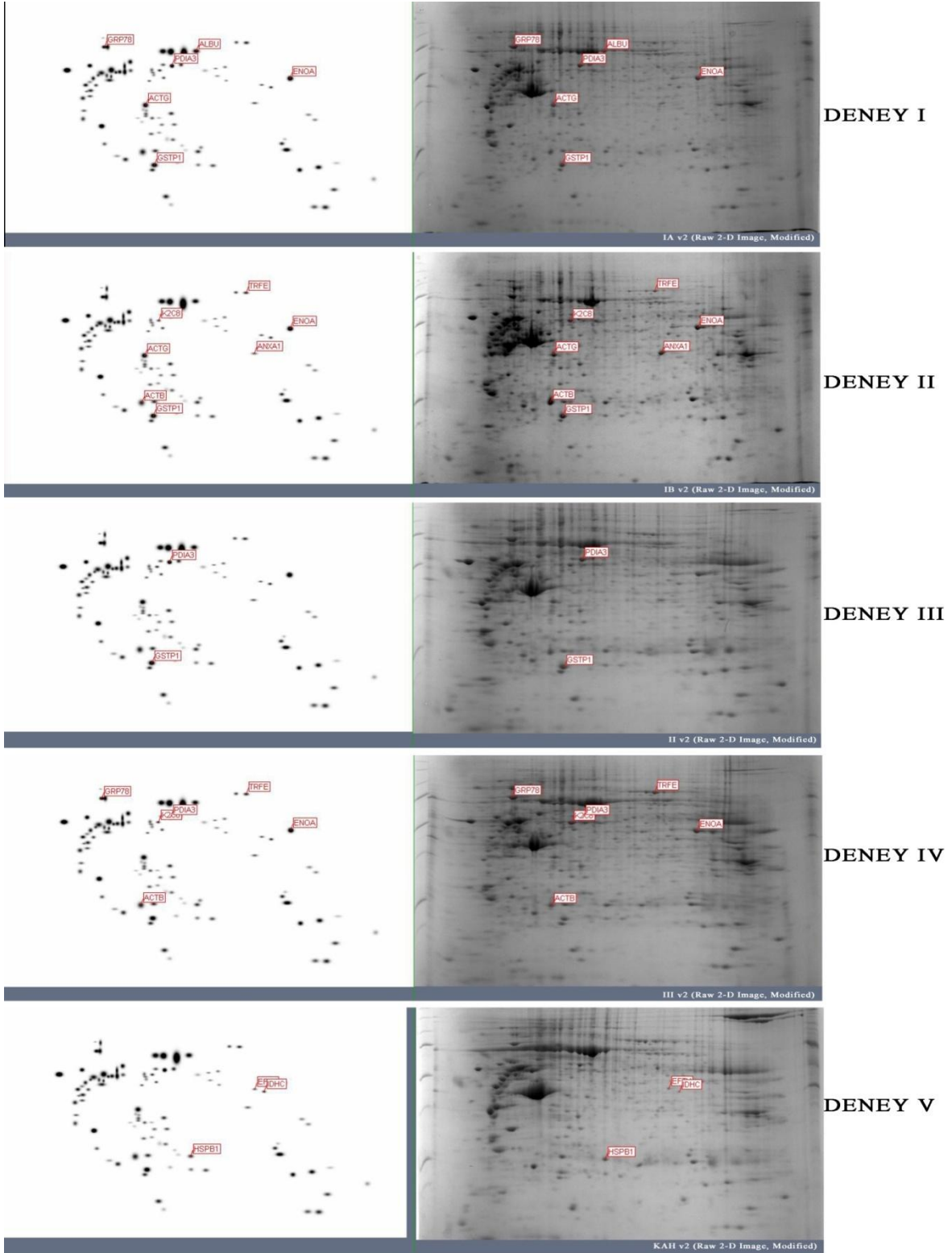
8.3.1. Deney I

Bu deneyde amacımız; evre IA endometroid tip adenokarsinom dokusunda ekspresyonu indüklenmiş proteinleri sağlıklı endometrium dokusunda ekspresyonu indüklenmiş proteinler ile karşılaştırmaktır. GRP78, GSTP1, ACTG, PDIA3, ENOA proteinlerinin evre IA endometroid tip adenokarsinom dokusunda ekspresyonunun arttığı, ALBU proteininin ise ekspresyonunun azaldığı görüldü. Bu proteinler, ekspresyon seviyeleri farklılık gösteren proteinler olup istatistiksel anlam ifade etmektedirler. Belirlenen bu proteinler otomatik spot kesim cihazı (Exquest Spot Cutter, Bio-Rad, ABD) ile kesildi. Proteinler jel tripsin metodu kullanılarak tripsin enzimi ile peptidlerine ayrılarak jelden izole edildi ve MALDI TOF/TOF-MS cihazı (Absciex 5800, ABD) ile tanımlandı. Elde edilen datanın incelenmesi ile tanımlanan bu proteinlerin bir kısmının mitokondriyal, bir kısmının ise nükleer ya da sitoplazmik proteinler olduğu belirlendi. Bu deneyin PANTHER analizi şekil 7'de verildi. Belirlenen proteinlerin birbiriyle ilişkileri STRING analizi yapılarak ortaya konuldu (Şekil 8).

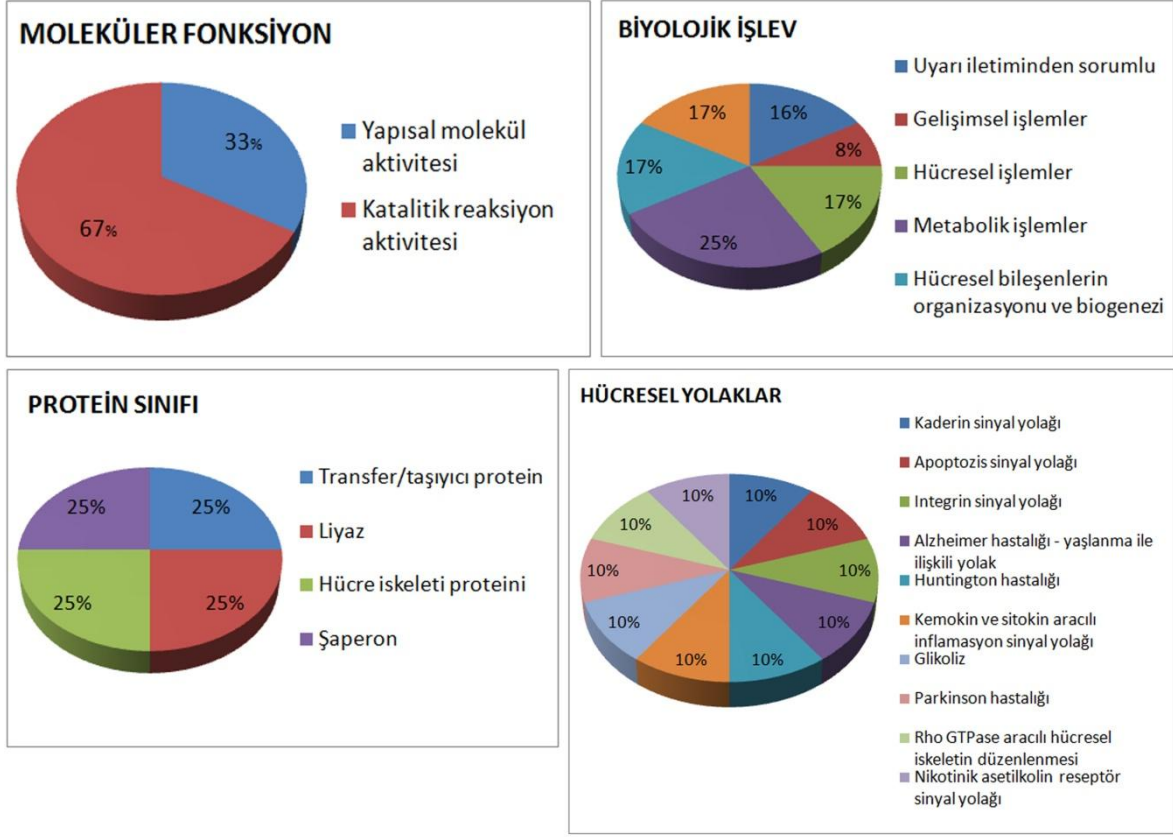
Tablo 10. MALDI TOF/TOF-MS Analizi İle Tanımlanan Proteinler

SSP	Uniprot Numarası	Protein Ulaşım Adı	Protein Kütleli (Da)	Protein Skoru	E değeri	Eşleşen Peptid	pI	Dizi örtüşmesi	Protein
416	P27797	C-ALR	48112	368	3.2e-033	23	4,29	44%	Calreticulin
1214	P08865	RSSA	32833	427	4e-039	17	4,79	40%	40S ribosomal protein SA
2620	P11021	GRP78	72288	814	8.1e-078	40	5,07	45%	78 kDa glucose-regulated protein
3009	P09211	GSTP1	23341	286	5.1e-025	18	5,43	60%	Glutathione S-transferase P
3011	P60709	ACTB	41710	270	2e-023	18	5,29	28%	Actin, cytoplasmic 1
5010	P04792	HSPB1	22768	324	8.1e-029	13	5,98	36%	Heat shock protein beta-1
3215	P63261	ACTG	41766	347	4,00E-31	20	5,31	39%	Actin, cytoplasmic 2
3413	P05787	K2C8	53671	530	2e-049	39	5,52	50%	Keratin, type II cytoskeletal 8
3416	Q13838	UAP56	48960	392	1.3e-035	21	5,44	32%	Spliceosome RNA helicase; BAT1
4015	P00441	SODC	15926	124	8.1e-009	9	5,7	64%	Superoxide dismutase [Cu-Zn]
4119	Q06323	PSME1	28705	298	3.2e-026	21	5,78	63%	Proteasome activator complex subunit 1
4512	P30101	PDIA3	56747	482	1.3e-044	34	5,98	52%	Protein disulfide-isomerase A3
5614	P02768	ALBU	69321	411	1.6e-037	36	5,92	45%	Serum albumin
6219	P04083	ANXA1	38690	683	1e-064	27	6,57	58%	Annexin A1
6311	P49411	EFTU	49510	575	6.4e-054	25	7,26	47%	Elongation factor Tu, mitochondrial
6618	P02787	TRFE	77000	663	1e-062	39	6,81	37%	Serotransferrin
7116	P00915	CAH1	28852	387	4e-035	17	6,59	63%	Carbonic anhydrase 1
7311	O75874	IDHC	46630	621	1.6e-058	32	6,53	45%	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic
7410	P06733	ENOA	47139	361	1.6e-032	31	7,01	66%	Alpha-enolase
8021	P62937	PPIA	18001	362	1.3e-032	22	7,68	76%	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A
9014	P23284	PPIB	23728	380	2e-034	27	9,42	60%	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B

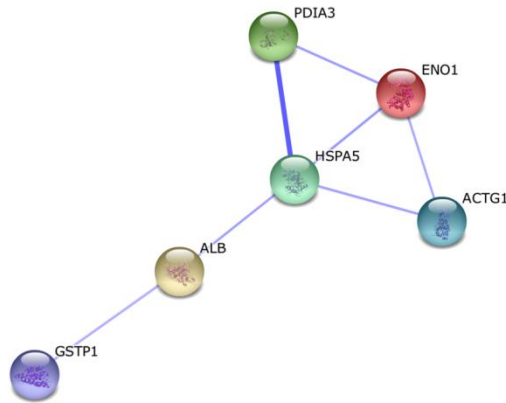
Şekil 6. Deneysel Grupların 2D Preparatif Jel Görüntüleri ve Belirlenen Spotların Pozisyonları



Şekil 7. Deney I Spotlarının PANTHER Analizi



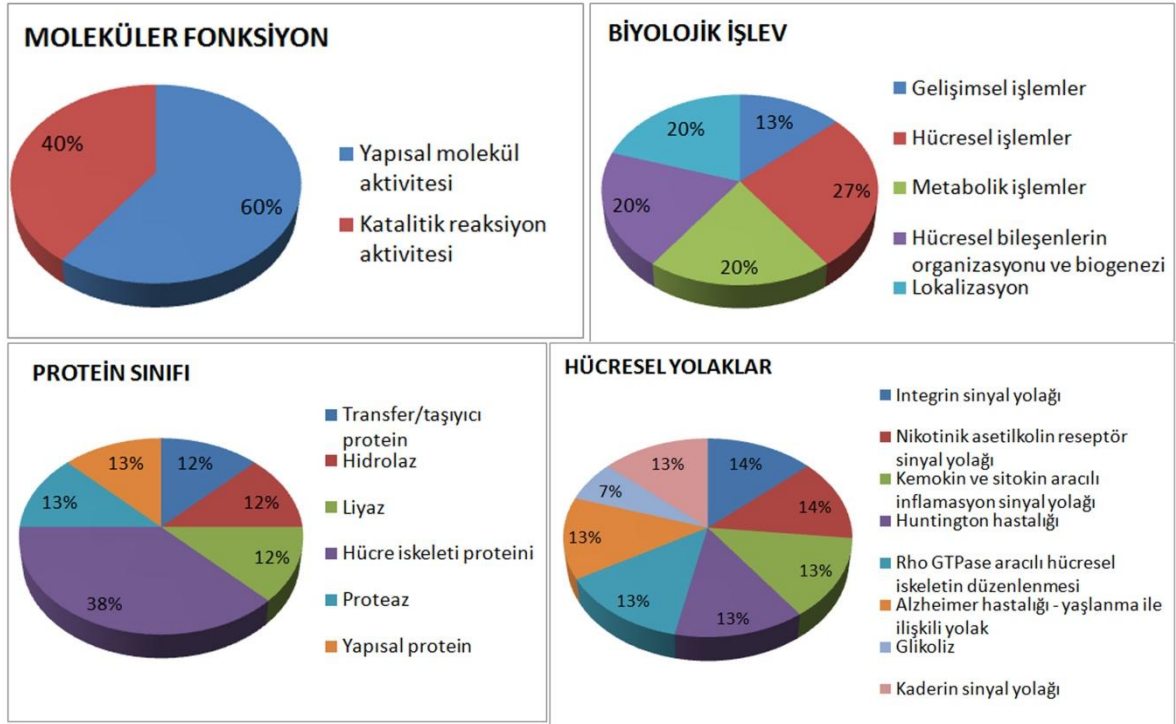
Şekil 8. Deney I Grubuna Ait Tanımlanan Proteinlerin STRING Analizi



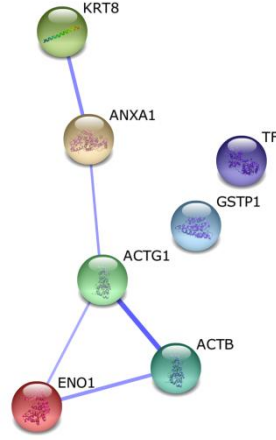
8.3.2. Deney II

Bu deneyin amacı, evre IB endometroid tip adenokarsinom dokusunda ekspresyonu indüklenmiş proteinleri normal endometrium dokusunda ekspresyonu indüklenmiş proteinler ile karşılaştırmaktır. GSTP1, ACTB, ACTG, K2C8, ANXA1, ENOA proteinlerinin evre IB endometroid tip adenokarsinom dokusunda ekspresyonunun arttığı, TRFE proteininin ise ekspresyonunun azaldığı görüldü. Deney 1’de yapılan işlemler bu deney için de yapıldı. Bu deneyin PANTHER analizi şekil 9’de verildi Belirlenen proteinlerin birbiriyle ilişkileri STRING analizi yapılarak ortaya konuldu (Şekil 10).

Şekil 9. Deney II Spotlarının PANTHER Analizi



Şekil 10. Deney II Grubuna Ait Tanımlanan Proteinlerin STRING Analizi



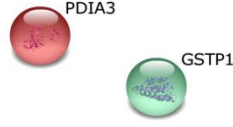
8.3.3. Deney III

Bu deneyin amacı, evre II endometroid tip adenokarsinom dokusunda ekspresyonu indüklenmiş proteinleri normal endometrium dokusunda ekspresyonu indüklenmiş proteinler ile karşılaştırmaktır. GSTP1, PDIA3 proteinlerinin evre II endometroid tip adenokarsinom dokusunda ekspresyonunun arttığı görüldü. Deney 1’de yapılan işlemler bu deney için de yapıldı. Bu deneyin PANTHER analizi şekil 11’de verildi. PANTHER analizi, bu deney grubu için hücre yolak ve protein sınıfı analizlerinin sonucunu vermemiştir. Belirlenen proteinlerin birbiriyle ilişkileri STRING analizi yapılarak ortaya konuldu (Şekil 12).

Şekil 11. Deney III Spotlarının PANTHER Analizi



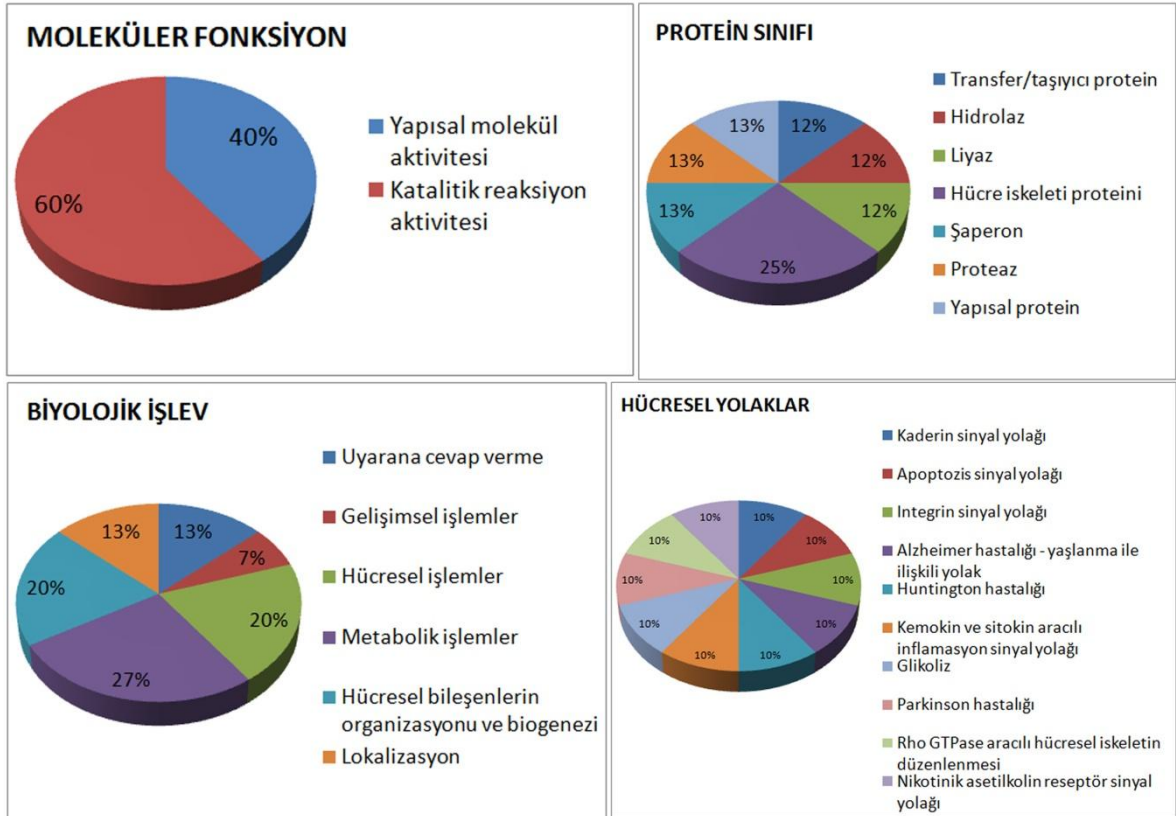
Şekil 12. Deney III Grubuna Ait Tanımlanan Proteinlerin STRING Analizi



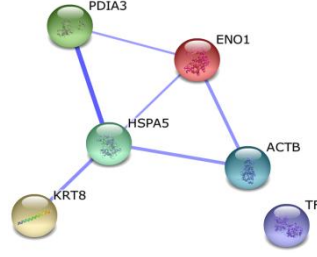
8.3.4. Deney IV

Bu deneyin amacı, evre III endometroid tip adenokarsinom dokusunda ekspresyonu indüklenmiş proteinleri normal endometrium dokusunda ekspresyonu indüklenmiş proteinler ile karşılaştırmaktır. GSTP1, ACTB, K2C8, PDIA3, TRFE, ENOA proteinlerinin evre III endometroid tip adenokarsinom dokusunda ekspresyonunun arttığı görüldü. Deney 1’de yapılan işlemler bu deney için de yapıldı. Bu deneyin PANTHER analizi şekil 13’te verildi. Belirlenen proteinlerin birbiriyle ilişkileri STRING analizi yapılarak ortaya konuldu (Şekil 14).

Şekil 13. Deney IV Spotlarının PANTHER Analizi



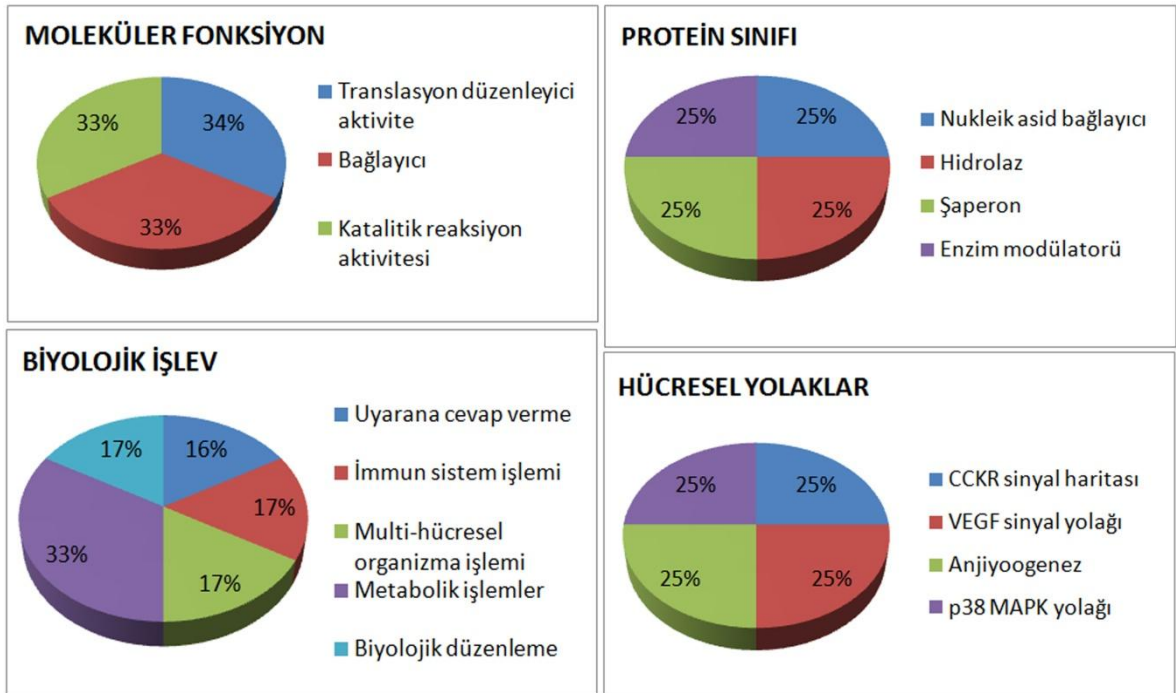
Şekil 14. Deney IV Grubuna Ait Tanımlanan Proteinlerin STRING Analizi



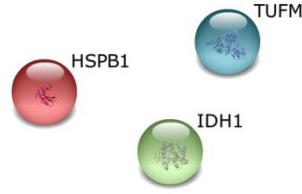
8.3.5. Deney V

Bu deneyin amacı, kompleks atipili endometrial hiperplazi dokusunda ekspresyonu indüklenmiş proteinlerin normal endometrium dokusunda ekspresyonu indüklenmiş proteinler ile karşılaştırmaktır. HSPB1, EF-Tu, IDHC proteinlerinin kompleks atipili endometrial hiperplazi dokusunda ekspresyonunun arttığı görüldü. Deney 1’de yapılan işlemler bu deney için de yapıldı. Bu deneyin PANTHER analizi şekil 15’te verildi. Belirlenen proteinlerin birbiriyle ilişkileri STRING analizi yapılarak ortaya konuldu (Şekil 16).

Şekil 15. Deney V Spotlarının PANTHER Analizi

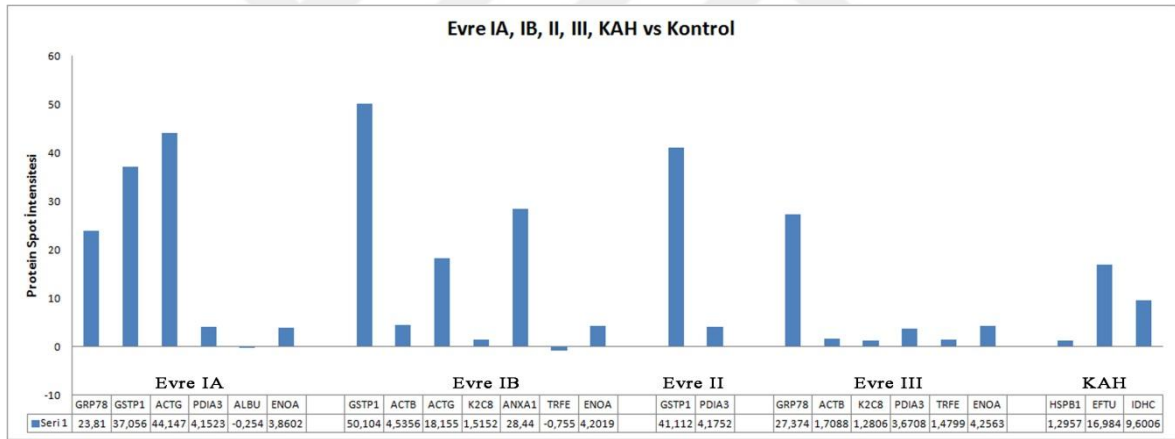


Şekil 16. Deney V Grubuna Ait Tanımlanan Proteinlerin STRING Analizi



Deney I, II, III, IV ve V' te belirlenen ve tanımlanan protein spotlarının yoğunluklarının gruplara göre dağılımı grafiksel olarak şekil 17'de verildi.

Şekil 17. Deney I, II, III, IV ve V'te Belirlenen ve Tanımlanan Protein Spotlarının Yoğunluklarının Analizi



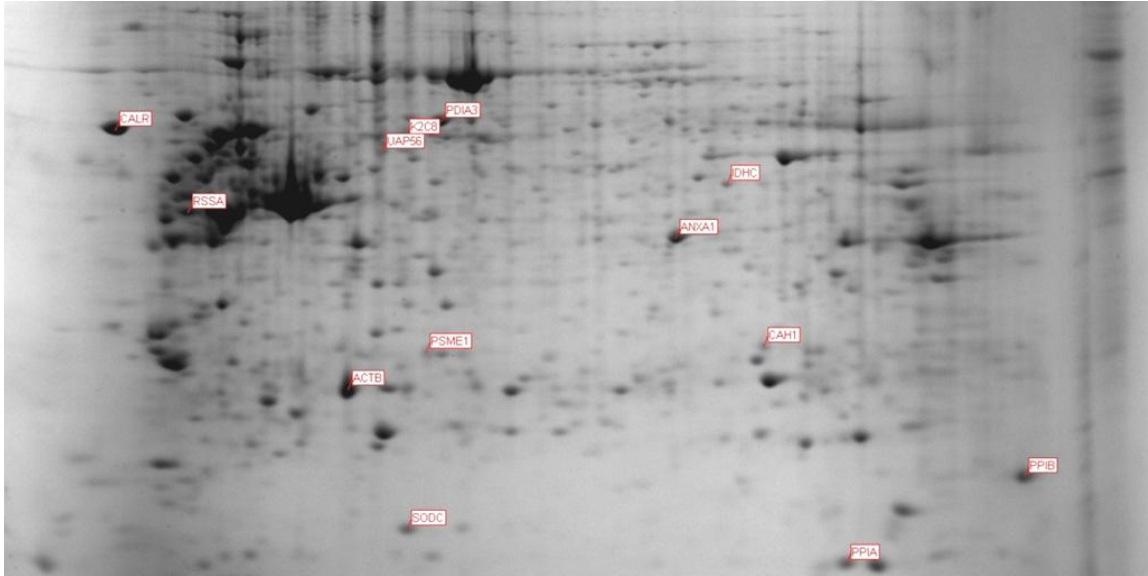
8.3.6. Malign Dokuların Kompleks Atipili Endometrial Hiperplazi Dokusuyla DIGE Deney Planı (Deney VI)

Bu deneyde amacımız; tüm malign grupların dokularında ekspresyonu indüklenmiş proteinleri kompleks atipili endometrial hiperplazi dokusunda ekspresyonu indüklenmiş proteinler ile karşılaştırmaktır. Bu amaçla tüm malign grupların ayrı ayrı dokularında ekspresyonu olan tüm proteinleri Cy3 floresan boyası ile, kompleks atipili endometrial hiperplazi dokusunda ekspresyonu olan tüm proteinler Cy5 floresan boyası ile işaretlendi. Normalizasyon yapabilmek amacı ile her deneydeki iki gruptan örnekten eşit miktarda

alınan proteinler karıştırılarak Cy2 floresan boyası ile işaretlendi. Aynı ayrı Cy3, Cy5 ve Cy2 ile işaretlenen protein örnekleri birleştirildikten sonra 2-DE-jel elektroforezine tabi tutuldu.

Elde edilen jel görüntüleri PDQuest Advance yazılımı yardımı ile analiz edildikten sonra her spot tek tek araştırmacı tarafından da kontrol edildi. Jeller üzerinde her deney grubu için ayrı olarak farklılaşan protein spotları belirlendi. Belirlenen protein spotlarının miktarı DIGE jellerinde MALDI analizi ile tanımlanmayacak kadar az olduğundan spotların kesilip MALDI ile analiz edilebilmeleri için örnekler tekrar IPG striplerde fokuslandıktan sonra preparatif jeller dökülerek örnekler tekrardan burada da yürütüldü. MALDI TOF/TOF-MS analizi sonucu tanımlanan proteinlerin pozisyonları şekil 18’de verilmiştir.

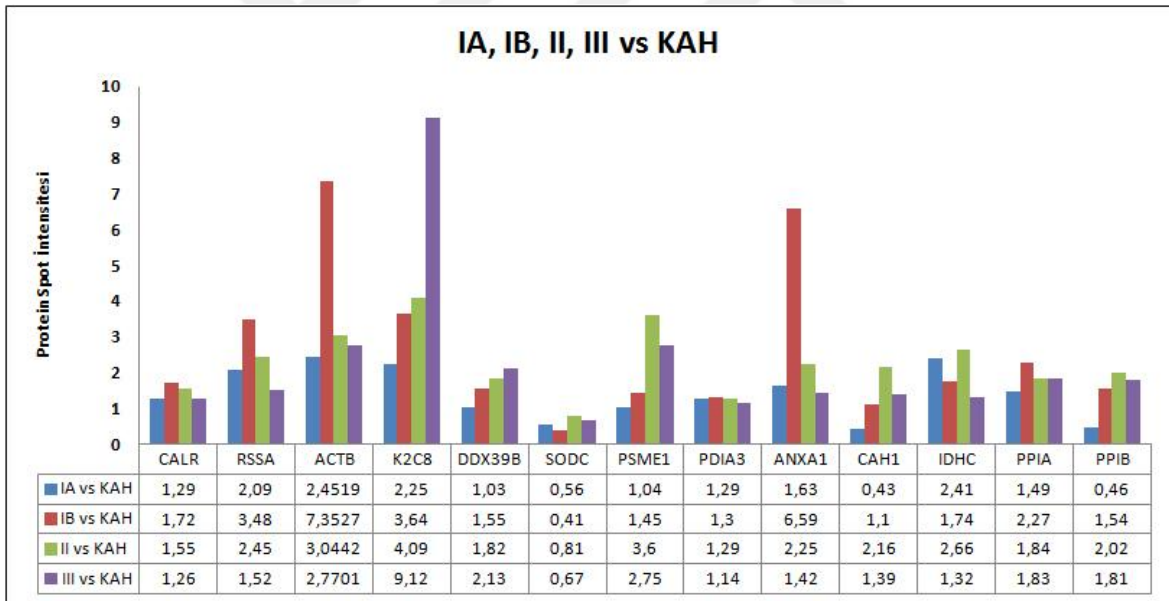
Şekil 18. Deney VI’nın 2-DE Preparatif Jel Görüntüleri ve Belirlenen Spotların Pozisyonları



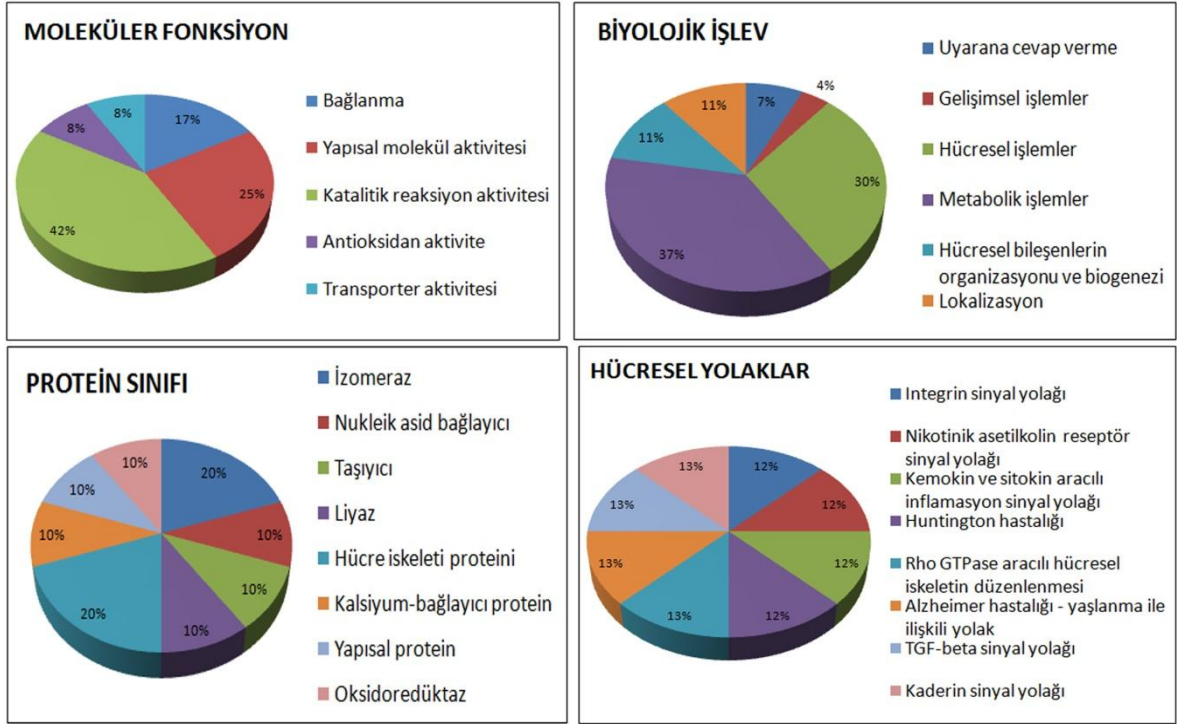
Bu deneyde amacımız; evre IA, IB, II, III endometroid tip adenokarsinom dokusunda ekspresyonu indüklenmiş proteinleri kompleks atipili endometrial hiperplazi dokusunda ekspresyonu indüklenmiş proteinler ile karşılaştırmaktır. CALR, RSSA, ACTB, K2C8, UAP56(DDX39B), SODC, PSME1, PDIA3, ANXA1, CAH1, IDHC, PPIA, PPIB proteinlerinin ekspresyon seviyeleri farklılık gösteren proteinler olup istatistiksel anlam ifade etmektedirler. SODC ekspresyonunun tüm endometrium kanseri gruplarında, CAH1 ve PPIB’nin evre IA endometroid tip adenokarsinom grubunda azaldığı görüldü.

Belirlenen ve tanımlanan protein spotlarının yoğunluklarının gruplara göre dağılımı grafiksel olarak şekil 19’de verildi. Belirlenen bu proteinler otomatik spot kesim cihazı (Exquest Spot Cutter, Bio-Rad, ABD) ile kesildi. Proteinler jel tripsin metodu kullanılarak tripsin enzimi ile peptidlerine ayrılarak jelden izole edildi ve LC-MS/MS cihazı (Waters Inc., ABD) ile tanımlandı. Elde edilen datanın yakından incelenmesi ile tanımlanan bu proteinlerin bir kısmının mitokondriyal, bir kısmının ise nükleer ya da sitoplazmik proteinler olduğu belirlendi. Bu deneyin PANTHER analizi şekil 20’de verildi. Belirlenen proteinlerin birbiriyle ilişkileri STRING analizi yapılarak ortaya konuldu (Şekil 21).

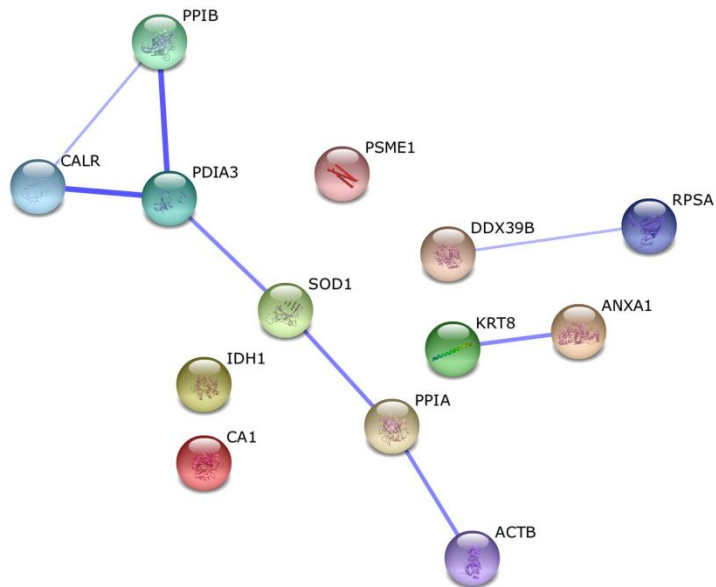
Şekil 19. Deney VI’da Belirlenen ve Tanımlanan Protein Spotlarının Yoğunluklarının Analizi



Şekil 20. Deney VI Spotlarının PANTHER Analizi



Şekil 21. Deney VI Grubuna Ait Tanımlanan Proteinlerin STRING Analizi



9. TARTIŞMA

Endometrium kanserinin oluşmasında ve gelişmesinde rol oynayan DNA metilasyonu, p53, K-ras, β -katenin genlerinin mutasyonları, mikrosatellit instabilitesi gibi genetik değişiklikleri anlamak ve hasta sonuçlarını iyileştirmek amacıyla endometrium kanserinin moleküler genetiği hakkında yapılan çalışmalar sonucunda CD171, PTEN ve ürokinaz plazminojen aktivatör reseptörü gibi belirteçler, endometrium kanserinin tanısında, prognozunun tahmininde ve alt tip sınıflamasında kullanılmaktadır^{80, 138}.

Endometrium kanserinin moleküler özellikleri hakkında bilgiler; a. mRNA ekspresyonunun alt kümesiyle ilişkili olan protein miktarı, b. anormal şekilde karsinogenezde düzenlenen fosforilasyon ve glikozilasyonun dahil olduğu bazı post-translasyonel modifikasyonlar, c. mRNA miktarının ölçülmesi yolu ile nükleotid sekanslarını, genomik seviyenin de ötesinde inceleyerek önemli ölçüde tespit edebilme yeteneğine sahiptir^{138, 139}.

Endometrium kanserinin moleküler mekanizmalarının aydınlatılması için geçerli olan yöntemlerin sınırlamaları vardır ve bu sınırlamaları aşmak için kanser proteomik analizinin genomik ve transkriptomik analizlerden daha bilgilendirici ve kullanışlı olduğu öne sürülmüştür^{138, 140}. Özellikle MS ve diğer proteomik temelli yöntemlerle ortaya konulan proteinlerin değişen ekspresyon düzeyleri karsinogenezi anlamak için bilgilendiricidir. Çünkü kanser ile ilişkili işlevler olan protein modifikasyonları ve diğer hücrel olaylar mRNA miktarıyla yansıtılamaz. Bununla birlikte endometrium kanserindeki proteinlerin profil değişikliğiyle ilgili çok az çalışma mevcuttur.

Li ve ark.¹⁴⁰ 2D MS temelli yöntem ile yaptıkları proteomik çalışmasında endometrium kanseri dokusuyla, normal endometrium dokusu arasında değişen protein profillerini ortaya koymayı hedeflemişlerdir. Endometrium kanseri tanılı sekiz hastadan elde ettikleri endometrium doku örneklerinin protein analizinde, biyolojik aktiviteye sahip toplam 99 protein ekspresyon değişimi tespit ettiler. Bu çalışmada epidermal yağ asidi bağlayıcı

protein (E-FABP), calcyphosine (CAPS) ve cyclophilin A proteinlerinin endometrium kanseri tanısında, prognozunda ve tedavisinde önemli olabilecek biyobelirteçler olabileceği bildirildi. Aynı araştırmacıların 39 normal endometrium dokusu, 29 EIN dokusu ve 84 endometrium karsinomu dokusunda E-FABP ve CAPS düzeylerini karşılaştırdıkları diğer bir çalışmalarında; endometrium karsinomu dokusunda E-FABP düzeyinin 2.64 kat ve CAPS düzeyinin 2.18 kat arttığını tespit ettiler. Ayrıca CAPS düzeyinin arttığı olgularda sağkalımın düştüğünü tespit ettiler¹³⁹. Bu iki çalışmanın sonucunda; CAPS belirtecinin endometrium kanseri olgularda sağkalım ile ilişkili bir prognostik faktör olabileceği belirtilmiştir^{139, 140}.

Benzer bir çalışmada Maxwell ve ark.¹⁴¹ 91 evre I endometrium kanseri olgusu (endometroid tip n=79, seröz tip n=12) ile 10 postmenopozal olgudan alınan endometrium kontrol grubu örneklerini protein ekspresyonu açısından karşılaştırdılar ve 209 proteinin farklılaşma gösterdiğini tespit ettiler. Bu çalışmada önemli bulunan protein ekspresyon değişimleri ise ANXA-1 (anneksin 1), ANXA-2, PRDX-1 (peroksiredoksin 1), PRDX-3, PRDX-4, PRDX-5, PRDX-6, ve COX-2 (sitokrom c oksidaz alt grubu 2) olarak bildirildi. Bu çalışmada endometrium kanser dokusunda artan ANXA-2 ve PRDX-1'in spektral sayım-kaynaklı western analizi ve doku mikroarray analizi (TMA) sonucuyla benzerlik gösterdiği izlendi.

Yoshizaki ve ark¹⁴². Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (SELDI-TOF-MS) proteomik analizi ile 19 endometrium kanseri dokusu ile 20 normal endometium dokusunu karşılaştırdıklarında, EC-1 ve EC-2 olarak adlandırdıkları iki proteinin ekspresyon düzeylerinde anlamlı değişiklik olduğunu, kanserli dokularda EC-1 proteininin anlamlı şekilde artarken, EC-2 proteininin düştüğünü, bu iki proteinin endometrium kanseri tanısında potansiyel birer biyobelirteç olabileceğini bildirdiler.

Teng ve ark¹⁰⁰. erken evre ve ileri evre endometrium kanseri olgularından ve sağlıklı olgulardan elde edilen endometrium dokularının protein ekspresyon profilini karşılaştırdıkları çalışmalarında, PKM2 and HSPA5 düzeylerini ileri evre endometrium kanseri olgularında daha yüksek oranda tespit etmişlerdir. Endometrium kanserinin progresyonunda PKM2 ve HSPA5'in önemli fonksiyonlara sahip biyobelirteç olabilecekleri belirtilmiştir.

Protein ekspresyonu üzerine yapılan çalışmalar her ne kadar çalışmamıza kıyasla fazla sayıda hasta içeriyor olsalar da, bu çalışmaların birçoğunda elde edilen dokuların parafin blok kaynaklı olduğu, bu blokların hazırlanması aşamasında kimyasal maruziyeti olabileceği ve parafin blokların hazırlanmasına kadar geçen sürede proteom kaybı olabileceği göz önünde tutulmalıdır. Biz çalışmamızda tüm örnekleri taze dokulardan elde ettik ve hepsini ilk dakikalar içinde sıvı azot içinde dondurarak saklama şansımız oldu.

Çalışmamızın verileri değerlendirilirken olgu sayılarının nispeten az olduğu ve evrelere göre gruplara ayırmanın, grup başına düşen olgu sayısını daha da azalttığı unutulmamalıdır. Bu durum bazı proteinlerde kanserin çeşitli evrelerinde gözlenen yükseliş ve düşüşlerin sebebi olabilir. Araştırmamızda elde ettiğimiz bazı verilerin literatür ile uyumsuz olduğunu gördük. Aynı zamanda literatür de kendi içerisinde tutarsızlık göstermekteydi. Bu durumun en önemli sebebinin çalışmalarda protein ekspresyon tayini için farklı farklı yöntemlerin kullanılmış olması olduğunu düşünüyoruz. Biz çalışmamızda 2D-DIGE tabanlı MALDI TOF/TOF-MS yöntemini kullandık ki, pek çok çalışma immünohistokimya çalışması olup, dokuda çok düşük düzeyde bulunabilecek proteinleri ayırt edebilme yeteneği bulunmamaktadır. Kullandığımız yöntem sayısal analiz yapma gücünde olup, gözlemci içi ve gözlemciler arası değişikliklerden en az seviyede etkilenmektedir. Bu durum elde ettiğimiz sonuçların güvenilir olduğuna işaret etmektedir.

Çalışmamızda endometrium kanseri olgularının protein ekspresyonlarının sağlıklı ve kompleks atipili hiperplazi olgularının protein ekspresyonlarıyla karşılaştırılması sonucunda K2C8, UAP56, ENOA, ACTB, GRP78, GSTP1, PSME1, CALR, PPIA, PDIA3, IDHc proteinlerinin ekspresyon düzeylerinde anlamlı yükselmeler izledik.

SOD1'in ekspresyon düzeyi kanserin evresi arttıkça düşüş trendine girmektedir. Bu sonuçlar protein aşırı ekspresyonunun olduğu kadar, zayıf ekspresyonunun da kanserin evresinin tanımlanması ve tedavi planı oluşturulmasında değerli olabileceğini düşündürmektedir. CALR aktivitesinin indüklenmesiyle kanser hücrelerinde apoptozu ilerleten bir faktör olabileceğini, böylece postoperatif yeni kemoterapi yöntemlerine umut olabileceğini tespit ettik. Bununla beraber K2C8 ve UAP56 proteinlerinin ekspresyon düzeyleri karsinom dokuları ve kompleks atipili hiperplazi dokusu arasında karşılaştırıldıklarında; kanserin evresinin artmasıyla K2C8 ve UAP56 düzeyinin arttığını tespit ettik. Bununla beraber CAH1 ve PPIB proteinlerinin ekspresyonları kompleks atipili hiperplazi ile karsinom evreleri karşılaştırıldıklarında evre 1A grubunda azalmış bulunmak ile birlikte, daha ileri evrelerde ekspresyonlarının arttığı gözleddik. Bu belirteçler arasında ileri evre kanser ile en yakından ilişkili proteinler K2C8, UAP56, GRP78 olarak bulundu.

Çalışmamızda kompleks atipili olgu örneklerinden itibaren ayrıca evre IB ve evre III gruplarında K2C8 ekspresyon düzeyi belirgin olarak yüksek bulundu. Bu sonuç ile tümör evresinin ilerlemesi ile K2C8 ekspresyon düzeyinin arttığı, K2C8'in tümöral hücrelerin proliferasyon ve invazyon yeteneği ile ilişkili olabileceği söylenebilir. Benzer şekilde endometrial adenokarsinom, adenoakantoma ve adenoskuamöz karsinomlarda K2C8 ekspresyonunun arttığı immunohistokimyasal olarak gösterilmiştir¹⁴³. Ayrıca akciğer adenokanserli olgularda K2C8 düzeyinin kanser hücrelerinde belirgin olarak arttığı ve K2C8'in sağ kalım oranıyla belirgin olarak ilişkili olduğu tespit edilmiştir¹⁴⁴. K2C8 endometrium ve akciğer kanserlerinin yanı sıra baş-boyun bölgesinin pre-malign ve malign tümörlerinin belirlenmesinde çok iyi bir biyobelirteç olduğu bildirilmiştir¹⁴⁵. Çalışmamız ile benzer şekilde epitel hücre kökenli tümör hücrelerinde K2C8 varlığı tümör invazyonuyla ilişkili bulunmuştur¹⁴⁶. K2C8'in endometrial dokuda aşırı ekspresyon göstermesi olası invaziv tümörün belirteci olarak düşünülebilir ve gelecekte yapılacak çalışmaların sonucunda bu bulgular doğrulanabilir ise, tedavi planlanmasında kullanılabilir.

Çalışmamızda; karsinom gruplarının kompleks atipili hiperplazi grubuyla karşılaştırılması sonucunda UAP56 protein ekspresyon düzeyinin tüm karsinom gruplarında yüksek olduğu ve tümör ileri evrelere ulaştığında UAP56 ekspresyon

düzeşinin daha da arttığı görüldü. Bu durum endometrial kanserlerde ilk kez gösterildi. Dominguez-Sanchez ve ark¹⁴⁷. UAP56 ekspresyon düzeyinin over ve akciğer tümörlerinde arttığını, testis ve cilt tümörlerinde azaldığını bildirdiler. Ayrıca başka bir çalışmada UAP56'nın yüksek düzeyde eksprese olması kardiomyositlerde hipertrofiye neden olduğu gösterilmiştir¹⁰⁵. RNA parçalarının birleşmesi ve mRNA taşınmasında UAP56 rolü göz önüne alındığında, UAP56 protein sentezi ve takip eden hücre hipertrofisinde önemli bir rol oynar.UAP56 ekspresyonunun artışıyla hücrede protein sentezinin artışı arasında ilişki vardır^{104, 105}. UAP56'nın kanser patogeneşinde rolünün ortaya konulmasıyla birlikte kanser tedavisinde yeni kemoterapötik ajanlarla cevabın daha iyi olabileceğini düşünuyoruz.

Çalışmamızda evre IA, evre II ve evre III gruplarında PDIA3 ekspresyon düzeyinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında belirgin olarak yüksek olduğunu tespit ettik. Aynı şekilde kompleks atipili endometrial hiperplazili olgu grubuyla karşılaştırıldığında, PDIA3 ekspresyon düzeyinin tüm karsinom gruplarında yüksek olduğu görüldü. Fakat tümörün evresinin artmasıyla PDIA3 ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir farklılık oluşmadığı; tümörün evresinden bağımsız bir faktör olduğu görüldü. PDIA3 jinekolojik kanserlerden özellikle seröz over kanserinde yüksek düzeylerde eksprese olmaktadır. Benzer şekilde serviks kanserinde de düşük genel sağkalımlı hastaların %73'ünde PDIA3'ün yüksek düzeyde eksprese olduğu görülmüştür^{148, 149}. Gastrik, prostat, özefagus, serviks, over, meme gibi farklı kanser tiplerinde PDIA3 ekspresyonu izlenmiştir¹⁰⁶. Memenin invaziv duktal karsinomu (IDC) tanılı 45 hastanın meme dokusu, normal meme dokusuyla karşılaştırıldığında, IDC grubunda PDIA3 ekspresyonunun anlamlı olarak arttığı, grade 3 tümör ve lenf nodu metastazı varlığı ile PDIA3 ekspresyon düzeyinin ilişkili olduğu görülmüştür¹⁰⁶. PDIA3 geni hücreşel strese cevap olarak yüksek oranda eksprese olur. Hasar tanıma kompleksinin bir üyesi olarak DNA tamiri ile bağlantılıdır ve bilinen onarım fonksiyonları ile genlere bağlanarak gen onarımında potansiyel düzenleyici olarak görev alır^{106, 107}. Tümör dokusundaki aşırı ekspresyonu hücreşel düzeyde stresin ve tamir çabasının sonucu olabilir. Elimizde invazyon ve prognoz belirteci olarak kullanımı için yeterli veri yoktur.

Tümör hücrelerinde fazla eksprese olarak humoral ve hücrel immun yanıtın oluşmasını indüklemesi dolayısı ile gerçek bir tümör ilişkili antijen olarak kabul edilen ENOA belirtecinin beyin, meme, serviks, over, mide, kolon, akciğer, vs. gibi birçok kanser tipinde ekspresyonu arttığı gösterilmiştir¹⁰⁹. Meme kanserinde ENOA ekspresyonunun artması, artmış tümör boyutu, artmış nodal tutulum ve düşük sağkalım oranı ile ilişkili bulunmuştur¹⁵⁰. Ayrıca ileri evre meme ve akciğer kanseri hastalarında anti-ENOA otoantikorları düşük düzeylerde tespit edilmiştir¹⁵¹. Bunun da ötesinde ENOA izoformlarına karşı gelişen otoantikorların ölçülmesi, kanserlerin tanısında ve postoperatif rekürrens takibinde önemli olabileceği bildirilmiştir¹⁵¹. Pankreas kanseri hastalarında, gemcitabin kullanımı anti-ENOA otoantikorlarının fosforilasyonunu artırarak daha uzun sağkalıma katkı sağlar¹⁵². Pankreatik duktal adanokarsinoma (PDAC)'lı hastaların %62'sinde ENOA 1 ve 2 izoformlarına karşı otoantikor üretiminin arttığını, otoantikor düzeyi serum CA19.9 düzeyi ile birlikte değerlendirildiğinde PDAC tanısında % 95 oranında başarılı olduğunu bildirdiler¹⁵². Çalışmamızda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında evre IA, evre IB ve evre III gruplarında ENOA ekspresyonunun belirgin olarak arttığı tespit edildi. Kanser hücrelerinde aerobik glikolizin artmasıyla ENOA ekspresyonunda da artış olur. Solid tümörler 1 mm³ ü aşıklarında yavaş anjiogeneze bağlı olarak hipoksik strese maruz kalırlar. Glikoliz enzimlerinin ekspresyonları hipoksi varlığında artar^{108, 110}. Elimizdeki bilgiler ışığında endometrium kanserinde, endometrial dokuda ENOA aşırı ekspresyonu, tümör büyüklüğü ile ilişkili olabilir. Endometrial kanserde 2 cm'yi geçen tümör büyüklüğünün lenf nodu tutulumu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir⁷⁶. Bu durum göz önüne alındığında ENOA prognostik belirteç olarak anlamlı olabilir.

Milioli ve ark.¹¹¹ lenf nodu metastazı olmayan ve lenf nodu metastazı olan meme kanseri dokularında TRFE proteinin ekspresyon düzeylerini karşılaştırdıklarında, TRFE ekspresyon düzeyini lenf nodu metastazı olmayan dokularda daha yüksek buldular. Bunun aksine Pendharkar ve ark.¹¹² ise luminal B HER2 pozitif (ER pozitif ve/veya PR pozitif, HER2 pozitif, Ki67 yüksek) ve HER2-enriched (ER negatif, PR negatif, HER2 pozitif) invaziv duktal meme kanserli hastaları evrelerine göre gruplandırdıkları çalışmalarında, TRFE ekspresyon düzeyinin ileri evre invaziv duktal meme kanserinde arttığını tespit ettiler. Bu bulgular ışığında TRFE düzeyinin belirlenmesi ile kanserin prognozunun daha

iyi değerlendirilmesi ve hedeflenen kemoterapi rejimlerini geliştirmek için değerli olabileceği öne sürülmüştür^{111,112}. Çalışmamızda endometrium kanseri olguları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında; evre IB grubunda TRFE ekspresyon düzeyinin azaldığını ancak evre III grubunda TRFE ekspresyon düzeyinin belirgin olarak arttığını tespit ettik. Bu durum gruplardaki olgu sayısının az olması ile ilişkili olabilir ve çalışmamızda elde ettiğimiz veriler bu proteinin ekspresyonu ile evre arasında açık ilişki tanımlamaktan uzak kalmıştır.

ACTB ekspresyon düzeyi invaziv olan malign melanomda, invaziv olmayan malign melanomdan daha yüksek bulunmuştur. Özefagusun skuamöz hücreli karsinomunda ACTB ekspresyon düzeyi artarken, özefagus adenokarsinomunda azalmıştır^{113, 114}. Meme kanseri olgularında çevre dokuya invazyon ve metastaz oranının artışı ile ACTB ekspresyon düzeyinde artış izlenmiştir¹¹⁴. Çalışmamızda karsinom grupları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, evre IB ve evre III gruplarında ACTB ekspresyon düzeyinin yüksek olduğunu tespit ettik. Ayrıca karsinom grupları hiperplazi grubu ile karşılaştırıldığında, ACTB ekspresyon düzeyinin karsinom gruplarında belirgin olarak yüksek olduğunu tespit ettik. Günümüze dek yapılan çalışmalarda tümör hücrelerinin çevre dokuya invazyon ve metastaz kapasitesi arasında belirgin bir ilişki olduğu belirtilmiştir^{114, 115}. Çalışmamızda bu sonucun endometrium kanseri için de doğru olabileceğini gösteren veriler elde ettik. Bu durum ACTB'nin tedavi planlamasında kullanılabileceğinin bulgusu olabilir.

Çeşitli araştırmalarda meme, akciğer, prostat, over, gastrik, hepatosellüler, özofagus, renal, endometrium, melanoma, glioma ve fibrosarkom gibi kanser tiplerinde, kanser hücrelerinden GRP78 ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir. Bununda ötesinde kanser hücrelerinde GRP78 protein düzeyinin metastaz ve ilaç direnci ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür^{112, 116}. Cali ve ark.¹⁵³ neoplastik endometrium dokularında GRP78 ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla belirgin olarak arttığını tespit ettiler. Luvsandagva ve ark.¹⁵⁴ ise endometrial adenokarsinomlu hastalarda protein analizi sonucunda G1, G2 grubunda GRP78 ekspresyonunu, G3 grubundan daha yüksek düzeyde buldular. Ayrıca

aynı çalışmada araştırmacılar estrojen reseptörü-pozitif olgularda da GRP78 ekspresyonunu yüksek buldular ve östrojenin GRP78 ekspresyonunu artırdığını öne sürdüler. Lim ve ark.¹⁵⁵ ise beş normal over dokusu, beş G3 over karsinomu dokusunda GRP78 ekspresyonunu karşılaştırdıkları çalışmalarında; G3 over kanserli olguların dokusunda GRP78 ekspresyonunun arttığını bildirdiler. Pendharkar ve ark.¹¹² luminal B HER2 pozitif (ER pozitif ve/veya PR pozitif, HER2 pozitif, Ki67 yüksek) ve HER2-enriched (ER negatif, PR negatif, HER2 pozitif) invaziv duktal meme kanserli hastalarda GRP78'in, luminal B HER2 pozitif grupta 2.59 kat, HER2-enriched grubunda 3.62 kat, erken evreli grupta 2.55 kat, ileri evreli grupta 3.32 kat arttığını bildirdiler. Tüm bu çalışmalar ile benzer şekilde çalışmamızda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında evre IA ve Evre III hastalığa sahip olgu gruplarında belirgin olarak artmış GRP78 düzeyleri tespit ettik. Diğer çalışmalarda da benzer sonuçlar alınmış olması nedeniyle GRP78'in biyobelirteç olarak umut verici olduğu göz önüne alınmalıdır.

Chan ve ark.¹¹⁹ 97 endometrium karsinomu olgusunu sekiz proliferatif endometrium, 20 basit hiperplazi, 11 kompleks hiperplazi, 20 atipik hiperplazi olgusu ile karşılaştırdıkları çalışmalarında, GSTP1 ekspresyonunu non-neoplastik olan gruplarda daha yüksek olduğunu, endometrium karsinomu olgularının %68'inde GSTP1 ekspresyonunda azalma olduğunu bildirdiler. Ayrıca bu çalışmada myometrial invazyonun, GSTP1 geninin metilasyonu ve protein ekspresyonuyla ilişkili olduğu bildirildi. Chan ve ark.¹¹⁷ diğer bir çalışmalarında GSTP1 *Ile*¹⁰⁵*Val* polimorfizmin yüksek gradeli ve derin myometrial invazyonu olan endometrium kanseriyle ilişkisi olduğunu tespit ettiler. İlginç şekilde Yokoyama ve ark.¹⁵⁶ ise 63 tane endometrium karsinomu olgusunun % 34.9'unda GSTP1 ekspresyonu olduğunu ve evre 3, myometrial invazyonun 1/2' den büyük, lenfovasküler alan tutulumu pozitif, pelvik-paraaortik lenf nodu tutulumu pozitif olan olgularda anlamlı şekilde GSTP1 ekspresyonunun arttığını, GSTP1 ekspresyonunun kötü prognoz ile ilişkili olduğunu bildirdiler. Fiolka ve ark.¹⁵⁷'nin çalışmasında GSTP1 metilasyonunun endometroid tip adenokarsinom grubunda %68.3, kompleks endometrial hiperplazi grubunda %52.6, kontrol grubunda %35 olduğu görülmüştür. Ayrıca yüksek tümör grade'i, myometrial invazyon ve metastatik lenf nodlarının varlığında GSTP1 ekspresyonunda anlamlı olarak artış izlendiğini bildirdiler¹⁵⁷. Çalışmamızda kontrol grubuyla

karşılaştırdığımızda evre IA, evre IB ve evre II gruplarında GSTP1 ekspresyonunun belirgin olarak arttığını tespit ettik. Bununla birlikte GSTP1 proteini için metilasyon değerlendirmesi yapma şansımız olmadı. Oysaki proteinin metilasyon sonrası epigenetik değişiklikler yolu ile genlerin yapı ve fonksiyonunu etkileyebildiği bilinmektedir¹¹⁹. GSTP1 biyobelirteç olarak klinik kullanımda yer alması için metilasyon mekanizması ve epigenetik değişikliklerin etkisi gibi kompleks sorunların çözümüne ihtiyaç vardır.

ACTG1 geninin fazla ekspresyonu kanser hücrelerinin göçünü; invazyonunu ve metastazını arttırdığı düşünülmektedir. Önceki çalışmalarda ACTG1 ekspresyonunda oluşan değişikliklere bağlı olarak işitme kaybı ve kanser oluşumu görülmüştür. İşitme hücrelerinde ACTG1 geninde birden çok mutasyonun varlığı işitme kaybının derecesiyle korele olduğu gösterilmiştir¹⁵⁸. Yapılan birçok çalışmada kanser tedavisinde ACTG1 ekspresyonunun baskılanmasıyla kanser hücresinin göçünün, invazyonunun ve metastazının önlenmesi amaçlanmaktadır¹⁵⁹. Moleküler düzeydeki araştırmalar ACTG1 geninin fazla ekspresyonunun kanser hücrelerinin migrasyonunu, invazyonunu ve metastaz yeteneğini artırabileceğine ve ACTG1 protein ekspresyonunda oluşan değişikliklerin kanser oluşumuna neden olabileceğine dair kanıtlar sunmuştur¹⁵⁸. Çalışmamızda kontrol grubuyla karşılaştırdığımızda, evre IA ve evre IB gruplarında ACTG ekspresyon düzeyinin belirgin olarak arttığını ancak evre II ve evre III gibi ileri evredeki endometrial kanser grubunda ACTG ekspresyon düzeyinde artış olmadığını gördük. Her ne kadar bu bulguların daha geniş hasta serilerinde teyit edilmesi gerekli ise de erken evre endometrium adenokarsinomunda ACTG ekspresyonunun arttığı, bu proteinin tümörün başlangıç aşamasında eksprese olduğu düşünülmektedir. İlerleyen evrelerde bu proteinin üretiminin azalmasından tümörün differensiyasyonunun ilerlemesi sorumlu olabileceği düşünülmektedir.

İmmün yanıtın kontrolünde aktivatör rolü olan PSME1 proteini ekspresyonunun, serviks karsinomu ve hepatosellüler karsinomlarında azaldığı rapor edilmiştir¹²⁵. Ancak bunun aksine normal özefagus dokusuyla karşılaştırıldığında kanser grubunda PSME1 ekspresyon düzeyinde artış olduğu bildirilmiştir¹⁶⁰. Benzer şekilde PSME1

ekspresyonunun prostat kanserinde tümöral hücrelerin membranında arttığı gösterilmiş, bu nedenle prostat kanserinde tümör belirteci olabileceği ve hem primer hem de metastatik prostat kanserinde anti-PSME1 antikoruyla tedavi edilebileceği hipotezi ortaya atılmıştır¹²⁵. Bizim çalışmamızda endometrial karsinom gruplarının protein analizleri kompleks atipili hiperplazi grubuyla karşılaştırıldığında, PSME1 ekspresyon düzeyi tüm evrelerdeki karsinom gruplarında yüksek olarak tespit edildi. Bununla birlikte normal endometrium dokusu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir değişiklik olmadığı sonucuna ulaşıldı. İleri ki dönem çalışmalarda tümör biyolojisinde immünmodülasyonunun ve PSME1 proteinin rolü anlaşıldıkça, anti-PSME1 antikorunun rekürren ve metastatik endometrium kanseri tedavisinde kullanılıp kullanılmayacağı tartışma konusu olacaktır.

Sağlıklı dokular ile karşılaştırıldığında, meme kanserli hastalarda, CAH1 ekspresyon düzeylerinin hem meme kanseri dokusunda hem de hasta kan serumunda arttığı tespit edilmiştir. İlginç şekilde, meme dokusunda kalsifikasyon düzeyinin CAH1 düzeyiyle ilişkili olduğu ve asetazolamid uygulanması ile CAH1 ekspresyonunun baskılanabildiği belirtilmiştir¹⁶¹. CAH ailesinden CAH 9'un yüksek miktarda ekspresyonu, birçok kanser tipinde metastaz ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu görülmüş, CAH izoenzimlerinden CAH 2, CAH 9 ve CAH 12 ekspresyonlarının endometrial karsinom gelişimiyle ilişkisi üzerinde çalışmalar yapılmıştır^{126,162, 163}. Bununla birlikte endometrial karsinom ile CAH1 ekspresyonu arasındaki ilişkiyi inceleyen çok az yayın mevcuttur. Çalışmamızda kompleks atipili hiperplazi grubuyla karşılaştırıldığında, CAH1 ekspresyon düzeyinin evre IA hariç diğer tüm kanser gruplarında yüksek olduğu izlendi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir değişiklik olmadığı sonucuna ulaşıldı. Bu sonuçlar myometrial invazyon, uterus dışı yayılım, lenf nodu tutulumları gibi hastayı ileri evreye taşıyan özellikler ile CAH1 ekspresyon düzeyleri arasında ilişki olabileceğini düşündürmektedir.

Punnonen ve ark. endometrial kanser dokusu ile normal endometrium dokusundaki SOD1 aktivitesini karşılaştırdıklarında, kanser dokusunda SOD1 aktivitesinin normal endometrium dokusuna göre çok düşük olduğunu tespit ettiler¹⁶⁴. Benzer şekilde Pejić ve ark.¹⁶⁵ da normal endometrium, endometrial polip, myoma uteri, endometrial hiperplazi ve endometrial adenokarsinom dokularında antioksidan enzim düzeylerini karşılaştırdıklarında SOD1 düzeyinin özellikle endometrial adenokarsinom grubunda

düşük olduğunu buldular. Beklendiği gibi, SOD izoformlarının fonksiyonundaki bozukluklar serbest oksijen radikallerinin temizlenmesini azaltarak potansiyel karsinojenlerin DNA üzerindeki hasarının engellenememesine ve sonuçta tümör gelişimi dahil sayısız patolojik değişikliklere neden olur. Tümör hücreleri özellikle oksidatif stresin yüksek seviyelerine maruz kaldıkları için, SOD'un bu hücrelerde genişletilmiş bir etkisinin olması beklenmektedir¹²⁷. Bizim çalışmamızda da endometrial karsinom gruplarının protein analizleri kompleks atipili hiperplazi grubuyla karşılaştırıldığında, SOD1'in ekspresyon düzeyi tüm karsinom gruplarında düşük olarak izlendi. Elbette bu durumun kansere yol açan olaylar zincirinde sebep mi sonuç mu olduğunu açıkça ortaya koymak zordur. Bu durum ROS'un artmış endojen üretimine bağlı SOD1'in tüketimine ve/veya SOD1'in mutasyonuna bağlı olarak işlev görememesine bağlı olabilir.

Yapılan bir çok çalışmada; esansiyel trombositopeni, primer myelofibrosis hastalarında CALR mutasyonu izlenmiştir¹²⁸. Östrojene maruz kalan endometriumda, progesteron maruziyetine kıyas ile CALR ekspresyonunun daha fazla arttığı bilinmek ile beraber endometrial adenokarsinom olgularında normal endometrium ile kıyaslandığında, CALR ekspresyon düzeyinin azaldığı bildirilmiştir^{166, 167}. Çalışmamızda kompleks atipili hiperplazi grubu ile karşılaştırıldığında en yüksek CALR ekspresyonu evre IB'de görüldü. Ancak ilerleyen evrelerde CALR ekspresyon düzeyinde azalma olduğunu tespit ettik. CALR proteininin apoptoz gibi immünojenik hücre ölümünde önemli bir rol oynayan yüksek ölçüde korunmuş endoplazmik retikulum proteini olduğu göz önünde bulundurulduğunda, apoptoza dirençli kanser hücrelerinde düzeyinin düşmesi beklenebilir. İleride CALR aktivitesinin indüklenmesi kanser hücrelerinde apoptozu ilerleten bir faktör olarak kullanımının önünü açabilecektir.

Prostat, meme, özefagus, B hücreli non-Hodgkin's lenfomada ANXA1 ekspresyon düzeyinin düştüğü, hepatik kanserde, hairy cell lösemide, özefagogastrik bileşke adenokarsinomlarında ANXA1 ekspresyon düzeyinin arttığı bildirilmiştir¹²⁹. Wang ve ark.¹⁶⁸ servikal neoplazi ve malignite olgularından elde edilen 234 tane serviks dokusunu değerlendirdikleri çalışmalarında en yüksek ANXA1 ekspresyonunu normal serviks epiteli dokusunda tespit ettiler. Bu çalışmada ANXA1 ekspresyonu, CIN 1 grubunda normal

serviks grubuna oranla azalmaktaydı. Bunun ötesinde CIN 1 ile CIN 3 arasında ve CIN 3 ile skuamöz hücreli serviks kanseri arasında ANXA1 ekspresyonu açısından anlamlı azalma mevcuttu. Bizim çalışmamızda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında Evre IB endometrium kanserli olgularda ANXA1 ekspresyon düzeyinin arttığı tespit edildi. Fakat diğer gruplar ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark yoktu. İlginç şekilde kompleks atipili hiperplazi grubuyla karşılaştırıldığında, ANXA1 ekspresyon düzeyi tüm karsinom gruplarında yüksekti. Fakat uterus dışı tümöral yayılım durumunda ANXA1 ekspresyon düzeyinde azalma tespit ettik. Bu sonuçlar ile ANXA1 ekspresyon düzeyindeki değişimleri anlamlandırmak mümkün olmamak ile birlikte bu durumun çalışmamızda grup başına düşen olgu sayısının az olmasından kaynaklı olabileceğini düşünmekteyiz.

Son yıllardaki çalışmalarda PPIB'nin meme, karaciğer, kolon ve pankreas kanserinde tümörün malign progresyonunda önemli rol aldığı belirtilmiştir¹⁶⁹. Meng ve ark.¹⁷⁰ PPIB ekspresyon düzeyinin mide kanserinde prognostik önemini araştırdıkları çalışmalarında, kanserli dokuların %84.2'sinde ve prekanseröz dokuların %56'sında PPIB ekspresyon düzeyinde artış izlendiğini bildirdiler. Li Z ve ark.¹³⁸ çalışmalarında endometrial karsinom dokularında tespit ettikleri PPIA'nın endometrial karsinogenezin oluşumunda önemli bir protein olabileceğini, bir diğer çalışmalarında ise endometrial karsinom dokularında terapötik olarak PPIA ekspresyonunun baskılanmasıyla tümörün myometrial invazyonunun ve metastazının baskılanabileceğini rapor ettiler¹⁷¹. Bu sonuçlar PPI proteinlerinin terapötik tedavi hedefi olabileceğini göstermektedir. Zaten hali hazırda Paklitaksel direnci olan dokularda PPIA düzeyinin yüksek olduğu, PPIA'nı görev aldığı MAPK kinaz yolunun baskılanmasıyla paklitaksel direncinin kırılabilceği bildirilmiştir¹⁷². Ayrıca PPIB'nin siklosporin A'yı bağlayarak immünsüpresyonu kolaylaştırıcı etkisi de gelecekte tedavi planları arasında göz önünde bulundurulmalıdır. Çalışmamızda kompleks atipili hiperplazi grubuyla karşılaştırıldığında, PPIB ekspresyon düzeyi evre IA hariç diğer tüm gruplarda yüksek olarak izlendi. PPIA ekspresyon düzeyleri ise tüm karsinom gruplarında yüksek olarak bulundu. Bu sonuçlar literatürde bulunmuş olan sonuçlar ile birleştirildiğinde PPI proteinlerinin endometrial malignitenin aktivitesinde rolü olduğunu ortaya koymaktadır.

Literatürde endometrium kanseri olgularında 40S ribozomal RNA'nın biyobelirteç veya terapötik hedef olarak kullanılıp kullanılmayacağına dair veri olmamak ile birlikte, çalışmamızda kompleks atipili hiperplazi grubuyla karşılaştırıldığında, RSSA ekspresyon düzeyinin tüm karsinom gruplarında yüksek olduğunu gördük. Tümöral hücrelerde proliferasyon çok hızlı olduğu için beklenilebileceği gibi gen ekspresyonu ve buna bağlı protein sentezi de çok yüksek düzeydedir. Ribozomal proteinlerde oluşacak bir defekt hücrenin hücresel fonksiyonlarını gerçekleştirme için gerekli olan protein sentezinde bir defekt oluşmasına neden olur. Mutant bir genin ekspresyonu sonucunda anormal düzeyde üretilen ribozomal proteinler kanser tiplerine özgü olabilir^{131,132}.

EF-Tu'nu ekspresyon düzeyleri birçok kanser tipinde değişiklik göstermektedir. Bu proteinin ekspresyonu pankreatik ve kolorektal adenokarsinomlarında, akciğer ve özefagus skuamöz karsinomlarında yüksek, hepatosellüler karsinomlarda ise düşük düzeylerde bulunmuştur^{155, 173}. Chaoyang ve ark.¹³³ 104 tane gastrik adenokarsinom dokusunu, 104 tane normal gastrik mukoza dokusu ile karşılaştırdıkları çalışmada, kontrol dokularının %62.5'inde, gastrik adenokarsinom olgularının %47.1'inde yüksek düzeyde EF-Tu ekspresyonu tespit ettiler. Ancak serozal invazyon ve nodal tutulumun olduğu ileri evrelerde EF-Tu ekspresyonunun daha da düşük düzeyde bulunduğunu bildirdiler. Bunun aksine Lim ve ark.¹⁵⁵ over kanseri olgularında grade ilerledikçe EF-Tu ekspresyonunun arttığını rapor ettiler. Bizim çalışmamızda ise kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, malign olgularda EF-Tu ekspresyon düzeyinde anlamlı bir değişiklik saptanmazken, sadece kompleks atipili hiperplazi olgularında EF-Tu ekspresyon düzeyinde anlamlı bir yükselme izlendi.

HSP'ler öldürücü ısı şoku, UV ışınlar, çeşitli kimyasallara karşı korunmada hücreyi aktive eden ve aynı zamanda östrojen reseptörleriyle (ER) ilişkili olduğu bilinen hücresel proteinlerdir. Primer meme kanserinde ER(+) olan hastalarda ER(-) olan hastalara göre HSPB1 ekspresyon düzeyinin daha yüksek olduğu ve meme kanseri ile endometrium kanserinde ER varlığıyla HSPB1 varlığı arasında ilişki olduğu gösterilmiştir¹⁷⁴. Koya ve ark.¹³⁵ normal, hiperplazili ve kanserli 92 endometrial doku örneğinde; HSPB1 ekspresyon

düzeinin özellikle endometrial hiperplazi grubunda daha yüksek olduğu, aynı zamanda hiperplazi zemininden gelişen endometrium kanserinde de eksprese olduğunu bildirdiler. Benzer şekilde Zagorianakou ve ark.¹³⁶ 122 endometrial doku örneğinde; endometrium karsinomu olan grupta HSPB1 ekspresyon düzeyinin normal endometrium ve endometrial hiperplazi grubuna göre çok daha düşük düzeyde olduğunu tespit ettiler. Bu çalışmada endometrial kanserli olgularda, postmenopozal gruba kıyasla premenopozal grupta, ayrıca ER ve PR negatif olan olgulara kıyasla pozitif olan olgularda HSPB1 ekspresyon düzeyi daha yüksekti. Fakat HSPB1 ekspresyon düzeyi tümörün grade'i ve evresiyle anlamlı şekilde değişmemekteydi. Çalışmamızda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında sadece kompleks atipili hiperplazi grubunda HSPB1 ekspresyon düzeyinde anlamlı olarak artış izlendi. Endometrial kanser gruplarında ise anlamlı HSPB1 ekspresyon değişimi görülmedi. Bu durum hiperplazi tanıli olguların, kanser tanıli olgulara oranla nispeten daha genç yaşta olmaları, daha yüksek estrogen üretme kapasiteleri ile ilişkili olabilir. Bu özellik HSP proteinlerinin endometrium kanserinin prognoz predikasyonu ve tedavi planlanmasında kullanışlı olmayabileceğini göstermektedir.

Kanser gelişiminde ve yaşlanmada serbest oksijen radikalleri etkin bir rol oynar. Glutatiyon hücrede serbest oksijen radikallerinin etkilerini minimize eden antioksidanlardan biridir. IDHc ise glutatiyon rejenerasyonunda rol oynar¹³⁷. IDHc mutasyonunun analizleri yapılmış; diffüz glial tümörlerde önemli bir prognostik faktör olduğu, melanomlarda IDHc mutasyonunun varlığının metastazla ilişkili olduğu görülmüştür. IDHc mutasyonunun tümör gelişimi ile ilgili iki hipotez öne sürülmektedir; a. Mutant IDHc taşıyan hücre oksidatif strese karşı daha duyarlı hale gelir, b. Mutant IDHc taşıyan hücre anti kanser ilaçların serbest oksijen radikallerine karşı daha savunmasız hale gelir¹³⁷. Çalışmamızda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında sadece kompleks atipili hiperplazi grubunda IDHc ekspresyon düzeyinde anlamlı olarak artış izlendiği, endometrial kanserli grupların hiçbirinde IDHc ekspresyon düzeyinin anlamlı olarak yükselmediği görüldü. Fakat endometrial karsinom gruplarının protein analizleri kompleks atipili hiperplazi grubuyla karşılaştırıldığında IDHc ekspresyon düzeyinin tüm karsinom gruplarında yüksek olduğu görüldü.

10. SONUÇ

Çalışmamızda normal endometrium dokusunun hangi değişimleri göstererek kansere dönüştüğünü proteom seviyesinde ortaya koymak ve potansiyel biyobelirteç veya moleküler terapötik hedef olarak kullanılabilir yeni protein/protein yollarını tanımlamak amacı ile 2D-DIGE tabanlı MALDI TOF/TOF-MS yöntemini kullandık. Farklı ekspresyon gösteren protein spotları bu yöntem ile tanımlanırken, her deney grubu için tanımlanan proteinlerin hücredeki görevleri PANTHER analiziyle ve proteinlerin birbiriyle ilişkileri STRING analiziyle ortaya konuldu.

Çalışmamızda endometrium kanseri olgularının protein ekspresyonlarının sağlıklı ve kompleks atipili hiperplazi olgularının protein ekspresyonlarıyla karşılaştırılması sonucunda K2C8, UAP56, ENOA, ACTB, GRP78, GSTP1, PSME1, CALR, PPIA, PDIA3, IDHc proteinlerinin ekspresyon düzeylerinde anlamlı yükselmeler izlendi. SOD1'in ekspresyon düzeyi kanserin evresi arttıkça düşme eğiliminde izlendi. Bu sonuçlar protein aşırı ekspresyonunun olduğu kadar, zayıf ekspresyonunun da kanserin evresinin tanımlanması ve tedavi planı oluşturulmasında değerli olabileceğini düşündürmektedir. CALR aktivitesinin indüklenmesiyle kanser hücrelerinde apoptozu ilerleten bir faktör olabileceğini böylece postoperatif yeni kemoterapi tedavi yöntemlerine umut olabileceğini tespit ettik. Bununla beraber K2C8 ve UAP56 proteinlerinin ekspresyonları kompleks atipili hiperplazi ile karşılaştırıldıklarında; adenokarsinom gruplarının evresinin artmasıyla K2C8 ve UAP56 düzeyinin arttığını tespit ettik. Bununla beraber CAH1 ve PPIB proteinlerinin ekspresyonları kompleks atipili hiperplazi ve endometrial adenokarsinom evreleri arasında karşılaştırıldıklarında; CAH1 ve PPIB düzeyinin evre 1A grubunda azaldığını fakat daha ileri evrelerde düzeyinin arttığını tespit ettik. Bu belirteçler arasında ileri evre kanser ile en yakından ilişkili proteinler K2C8, UAP56 ve GRP78 olarak bulundu.

Endometrium kanserinde gözlenen ölümler; sıklıkla hastalığın prognozunu önceden tahmin etmedeki yetersizlik ve buna bağlı uygun tedavi planının oluşturulamaması ve ilerleyen zamanda görülen nüks ve rekürrens ile ilişkilidir. Özellikle ileri evre kanserler kemoterapiye ve hormonoterapiye daha az cevap verir. Çalışma amacımız her ne kadar

terapötik hedef olabilecek belirteç bulmak olmasa da aşırı eksprese olan K2C8, UAP56, GRP78, proteinlerin terapötik hedef olarak ileri araştırmalar ile değerlendirilmesine katkı sağlayacaktır.

Günümüze kadar endometrial kanser olgularında gerçekleştirilen proteomik çalışmaları her ne kadar bazı proteinlerin hastalıkla ilişkisini kurmayı başarsa da deneysel yaklaşımlardaki eksiklikler, etnik grup farklılıkları ve kütle spektrometredeki verilerinin yorumlanmasındaki varyasyonlar sonucu halen hastalık ile moleküler patofizyolojisi arasındaki ilişkisi açıkça ortaya konulamamıştır.

Çalışmamızda ön plana çıkan K2C8, UAP56, GRP78 ve CALR proteinlerinin diagnoz, prognoz tahmini ve terapötik hedef belirlemek için ileride yapılacak araştırmalarda, daha geniş serilerde tekrar değerlendirilmesinin yararlı olacağını düşünüyoruz.

11. ÖZET

Amaç:

Kompleks atipili endometrial hiperplazi ve endometrial karsinom dokularının protein ekspresyonunu, sağlıklı endometrium dokusunun protein ekspresyonuyla karşılaştırmak, bu sayede diağnoz, prognoz ve moleküler terapötik hedef amacıyla kullanılabilir proteinleri tanımlamak.

Materyal Metod:

Çalışmaya dilatasyon ve küretaj materyalinin histopatolojik incelemesinde “benign endometrial değişiklikler”, “kompleks atipili endometrial hiperplazi” ve “endometrioid tip adenokarsinom” rapor edilmiş ve bu tanılar ile opere edilen 30 olgu alındı. Hastaların nihai patoloji raporlarına göre 6 grupta değerlendirildiler (a. Benign endometrial değişiklikler (n=7), b. Kompleks atipili endometrial hiperplazi (n=5), c. Evre IA (n=5), d. Evre IB (n=5), e. Evre II (n=3), f. Evre III (n=5)).

Çalışma gruplarının protein profilleri 2D-DIGE tekniği kullanılarak tespit edildi ve kontrol grubuyla karşılaştırıldı. Farklı ekspresyon gösteren protein spotları MALDI TOF/TOF-MS yöntemi ile tanımlandı. Her deney grubu için tanımlanan proteinlerin PANTHER ve STRING analiziyle hücredeki görevleri ve birbiriyle ilişkileri belirlendi.

Bulgular:

Çalışmamızda endometrium kanseri olgularının protein ekspresyonlarının sağlıklı ve kompleks atipili endometrial hiperplazi olgularının protein ekspresyonlarıyla karşılaştırılması sonucunda K2C8, UAP56, ENOA, ACTB, GRP78, GSTP1, PSME1, CALR, PPIA, PDIA3, IDHc proteinlerinin ekspresyon düzeylerinde anlamlı yükselmeler izlendi. SOD1’in ekspresyon düzeyi kanserin evresi arttıkça azalma eğilimindeydi. CALR aktivitesinin indüklenmesiyle kanser hücrelerinde apoptozu ilerleten bir faktör olabileceğini böylece postoperatif yeni kemoterapi tedavi yöntemlerine umut olabileceğini tespit ettik. Bununla beraber CAH1 ve PPIB proteinlerinin ekspresyonları kompleks atipili endometrial hiperplazi ile karsinom evreleri arasında karşılaştırıldıklarında, CAH1 ve PPIB düzeyinin ileri evrelerde arttığı gözlemlendi. Bu belirteçler arasında ileri evre kanser ile en yakından ilişkili proteinler K2C8, UAP56 ve GRP78 olarak bulundu.

Sonuç:

Çalışmamızda ön plana çıkan K2C8, UAP56, GRP78 ve CALR proteinlerinin endometrium kanserinde diağnoz, prognoz tahmini ve terapötik hedef belirlemek için ileride yapılacak araştırmalar ve daha geniş serilerde tekrar değerlendirilmesinin yararlı olacağını düşünüyöruz.



12. SUMMARY

Aim :

To compare the protein expression of complex atypical endometrial hyperplasia and endometrial carcinoma tissues with the protein expression of healthy endometrial tissue, and by this way, to identify proteins that can be used for diagnosis, prognosis and molecular therapeutic targets.

Material Method:

After local ethical committee approval, we made dilatation and curettage (D & C) to the patients who had an abnormal uterine bleeding and postmenopausal bleeding symptoms. Histopathological examination of the D & C material had reported "benign endometrial changes", "complex atypical endometrial hyperplasia" and "endometrioid adenocarcinoma" and 30 patients, who underwent surgery with these diagnosis, were studied.

Six study groups were determined according to the patients final pathology report: a. Benign endometrial changes (group 1, n = 7, the control group) b. Complex atypical endometrial hyperplasia (group 2, n = 5), c. Stage IA endometrioid adenocarcinoma (group 3, n = 5), d. Stage IB endometrioid adenocarcinoma (group 4, n = 5), e. Stage II endometrioid adenocarcinoma (group 5, n = 3), f. Stage III endometrioid adenocarcinoma (group 6, n = 5).

Protein profiles of the study groups were detected using 2D-DIGE technique and compared to the control group. Protein spots which showing different expression, were defined by MALDI TOF / TOF-MS method. For each test groups, the functions and the relations of the defined proteins in the cell were determined by PANTHER and STRING analysis, respectively.

Results:

In our study, comparison of the results of protein expression of endometrial cancer cases with protein expression of healthy and complex atypical hyperplasia cases revealed significant elevations in the expression levels of K2C8, UAP56, ENOA, ACTB, GRP78, GSTP1, PSME1, CALR, PPIA, PDIA3 and IDHc proteins. The expression of SOD1 levels had a tendency to decline with the increase of the stage of the cancer. We identified a factor

that may promote apoptosis in cancer cells by inducing the activity of CALR so that it might be a hope for the new postoperative chemotherapy treatments. However, when the expression of the CAH1 and PPIB proteins were compared between complex atypical endometrial hyperplasia and carcinoma stages, it has been observed that CAH1 and PPIB levels were increased in advanced stages. Among these markers, the most closely related proteins with advanced stage cancer were found to be as K2C8, UAP56 and GRP78 proteins.

Conclusion:

We think that it would be useful to make researches in the future to determine the diagnosis, prediction of prognosis and identifying therapeutic targets of the highlighted proteins of our study that are K2C8, UAP56, GRP78 and CALR in endometrial cancer and also recurrent investigations in larger study series would be useful.

13. KAYNAKLAR

1. Strom, B.L., R. Schinnar, A.L. Weber, G. Bunin, J.A. Berlin, M. Baumgarten, et al., Case-control study of postmenopausal hormone replacement therapy and endometrial cancer. *American journal of epidemiology*. 2006;1648:775-786.
2. Arora, V. and M.A. Quinn, Endometrial cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2012;263:311-24.
3. Ferlay, J., H.R. Shin, F. Bray, D. Forman, C. Mathers, and D.M. Parkin, Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: Globocan 2008. *International journal of cancer*. 2010;12712:2893-2917.
4. Purdie, D.M. and A.C. Green, Epidemiology of endometrial cancer. *Best practice & research clinical obstetrics & gynaecology*. 2001;153:341-354.
5. Nedelkov, D., U.A. Kiernan, E.E. Niederkofler, K.A. Tubbs, and R.W. Nelson, Population proteomics: the concept, attributes, and potential for cancer biomarker research. *Mol Cell Proteomics*. 2006;510:1811-8.
6. Balasubramaniam, G., S. Sushama, B. Rasika, and U. Mahantshetty, Hospital-based study of endometrial cancer survival in Mumbai, India. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2013;142:977-980.
7. Siegel, R., J. Ma, Z. Zou, and A. Jemal, Cancer statistics, 2014. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2014;641:9-29.
8. Semple, D., Endometrial cancer. *Br J Hosp Med*. 1997;576:260-2.
9. Hecht, J.L. and G.L. Mutter, Molecular and pathologic aspects of endometrial carcinogenesis. *J Clin Oncol*. 2006;2429:4783-91.
10. Ryan, A.J., B. Susil, T.W. Jobling, and M.K. Oehler, Endometrial cancer. *Cell Tissue Res*. 2005;3221:53-61.
11. Salvesen, H.B., N. MacDonald, A. Ryan, O.E. Iversen, I.J. Jacobs, L.A. Akslen, et al., Methylation of hMLH1 in a population-based series of endometrial carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2000;69:3607-13.
12. Ambros, R.A., M.E. Sherman, C.M. Zahn, P. Bitterman, and R.J. Kurman, Endometrial intraepithelial carcinoma: a distinctive lesion specifically associated with tumors displaying serous differentiation. *Human pathology*. 1995;2611:1260-1267.

13. Wheeler, D.T., K.A. Bell, R.J. Kurman, and M.E. Sherman, Minimal uterine serous carcinoma: diagnosis and clinicopathologic correlation. *Am J Surg Pathol.* 2000;246:797-806.
14. Emons, G., G. Fleckenstein, B. Hinney, A. Huschmand, and W. Heyl, Hormonal interactions in endometrial cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2000;74:227-42.
15. Salvesen, H.B. and L.A. Akslen, Molecular pathogenesis and prognostic factors in endometrial carcinoma. *Apmis.* 2002;11010:673-89.
16. Ewertz, M., G. Schou, and J.D. Boice, Jr., The joint effect of risk factors on endometrial cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 1988;242:189-94.
17. Egeland, G.M., K.A. Matthews, L.H. Kuller, and S.F. Kelsey, Characteristics of noncontraceptive hormone users. *Prev Med.* 1988;174:403-11.
18. Kelsey, J.L., V.A. LiVolsi, T.R. Holford, D.B. Fischer, E.D. Mostow, P.E. Schwartz, et al., A case-control study of cancer of the endometrium. *Am J Epidemiol.* 1982;1162:333-42.
19. Gruber, S.B. and W.D. Thompson, A population-based study of endometrial cancer and familial risk in younger women. Cancer and Steroid Hormone Study Group. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention.* 1996;56:411-417.
20. Parslov, M., Ø. Lidegaard, S. Klintorp, B. Pedersen, L. Jønsson, P.S. Eriksen, et al., Risk factors among young women with endometrial cancer: a Danish case-control study. *American journal of obstetrics and gynecology.* 2000;1821:23-29.
21. Berends, M.J., J.H. Kleibeuker, E.G. de Vries, M.J. Mourits, H. Hollema, E. Pras, et al., The importance of family history in young patients with endometrial cancer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1999;822:139-41.
22. Elwood, J.M., P. Cole, K.J. Rothman, and S.D. Kaplan, Epidemiology of endometrial cancer. *Journal of the National Cancer Institute.* 1977;594:1055-1060.
23. La Vecchia, C., E. Negri, S. Franceschi, B. D'avanzo, and P. Boyle, A case-control study of diabetes mellitus and cancer risk. *British Journal of Cancer.* 1994;705:950.
24. Kalandidi, A., A. Tzonou, L. Lipworth, I. Gamatsi, D. Filippa, and D. Trichopoulos, A case-control study of endometrial cancer in relation to reproductive, somatometric, and life-style variables. *Oncology.* 1996;535:354-359.
25. Pettersson, B., H.-O. Adami, R. Bergström, and E.D. Johansson, Menstruation span-a time-limited risk factor for endometrial carcinoma. *Acta obstetricia et*

- gynecologica scandinavica*. 1986;653:247-255.
26. Logan, W., Marriage and childbearing in relation to cancer of the breast and uterus. *The Lancet*. 1953;2626797:1199-1202.
 27. Parazzini, F., C. La Vecchia, E. Negri, L. Fedele, and F. Balotta, Reproductive factors and risk of endometrial cancer. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1991;1642:522-527.
 28. Henderson, B., J. Casagrande, M. Pike, T. Mack, I. Rosario, and A. Duke, The epidemiology of endometrial cancer in young women. *British journal of cancer*. 1983;476:749.
 29. Mansell, H. and A.T. Hertig, Granulosa-Theca Cell Tumors and Endometrial Carcinoma: A study of their relationship and a survey of 80 cases. *Obstetrics & Gynecology*. 1955;64:385-394.
 30. Wood, G. and R. Boronow, Endometrial adenocarcinoma and the polycystic ovary syndrome. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1976;1242:140-142.
 31. Gallup, D.G. and R.J. Stock, Adenocarcinoma of the endometrium in women 40 years of age or younger. *Obstetrics & Gynecology*. 1984;643:417-420.
 32. Kennedy, D.L., C. Baum, and M.B. Forbes, Noncontraceptive estrogens and progestins: use patterns over time. *Obstetrics & Gynecology*. 1985;653:441-446.
 33. Gusberg, S. and R.E. Hall, Precursors of Corpus Cancer: III. The Appearance of Cancer of the Endometrium in Estrogenically Conditioned Patients. *Obstetrics & Gynecology*. 1961;174:397-412.
 34. Grady, D., T. Gebretsadik, K. Kerlikowske, V. Ernster, and D. Petitti, Hormone replacement therapy and endometrial cancer risk: a meta-analysis. *Obstetrics & Gynecology*. 1995;852:304-313.
 35. Tseng, L. and E. Gurbide, Effects of progestins on estradiol receptor levels in human endometrium. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1975;412:402-404.
 36. Ziel, H.K., W.D. Finkle, and S. Greenland, Decline in incidence of endometrial cancer following increase in prescriptions for opposed conjugated estrogens in a prepaid health plan. *Gynecologic oncology*. 1998;683:253-255.
 37. Voigt, L.F., Q. Deng, and N.S. Weiss, Recency, duration, and progestin content of oral contraceptives in relation to the incidence of endometrial cancer (Washington,

- USA). *Cancer Causes & Control*. 1994;53:227-233.
38. Weiderpass, E., H.-O. Adami, J.A. Baron, C. Magnusson, A. Lindgren, and I. Persson, Use of oral contraceptives and endometrial cancer risk (Sweden). *Cancer Causes & Control*. 1999;104:277-284.
 39. Mignotte, H., C. Lasset, V. Bonadona, A. Lesur, E. Luporsi, J.F. Rodier, et al., Iatrogenic risks of endometrial carcinoma after treatment for breast cancer in a large French case-control study. *International journal of cancer*. 1998;763:325-330.
 40. Austin, H., J.M. Austin, E.E. Partridge, K.D. Hatch, and H.M. Shingleton, Endometrial cancer, obesity, and body fat distribution. *Cancer research*. 1991;512:568-572.
 41. Weiderpass, E., I. Persson, H.-O. Adami, C. Magnusson, A. Lindgren, and J.A. Baron, Body size in different periods of life, diabetes mellitus, hypertension, and risk of postmenopausal endometrial cancer (Sweden). *Cancer Causes & Control*. 2000;112:185-192.
 42. Parazzini, F., C. La Vecchia, E. Negri, G. Luca Riboldi, M. Surace, G. Benzi, et al., Diabetes and endometrial cancer: An Italian case-control study. *International journal of cancer*. 1999;814:539-542.
 43. Troisi, R., N. Potischman, R.N. Hoover, P. Siiteri, and L.A. Brinton, Insulin and endometrial cancer. *American journal of epidemiology*. 1997;1466:476-482.
 44. Levi, F., S. Franceschi, E. Negri, and C. La Vecchia, Dietary factors and the risk of endometrial cancer. *Cancer*. 1993;7111:3575-81.
 45. Katsouyanni, K., P. Boyle, and D. Trichopoulos, Diet and urine estrogens among postmenopausal women. *Oncology*. 1991;486:490-4.
 46. Mutter, G.L., J. Baak, C.P. Crum, R.M. Richart, A. Ferenczy, and W.C. Faquin, Endometrial precancer diagnosis by histopathology, clonal analysis, and computerized morphometry. *The Journal of pathology*. 2000;1904:462-469.
 47. Silverberg, S., G.L. Mutter, and R.J. Kurman, Tumors of the uterine corpus: epithelial, al tumors and related lesions. . *Pathology and Genetics of Tumors of the Breast and Female Genital Organs. World Health Organization Classification of Tumors*. Lyon: IARC Press. 2003;221-32.
 48. Trimble, C.L., J. Kauderer, R. Zaino, S. Silverberg, P.C. Lim, J.J. Burke, et al., Concurrent endometrial carcinoma in women with a biopsy diagnosis of atypical

- endometrial hyperplasia. *Cancer*. 2006;1064:812-819.
49. Mutter, G.L. and T.E.C. Group, Endometrial intraepithelial neoplasia (EIN): will it bring order to chaos? *Gynecologic oncology*. 2000;763:287-290.
 50. Mutter, G.L., R.J. Zaino, J.P. Baak, R.C. Bentley, and S.J. Robboy, Benign endometrial hyperplasia sequence and endometrial intraepithelial neoplasia. *International Journal of Gynecologic Pathology*. 2007;262:103-114.
 51. Hecht, J.L., T.A. Ince, J.P. Baak, H.E. Baker, M.W. Ogden, and G.L. Mutter, Prediction of endometrial carcinoma by subjective endometrial intraepithelial neoplasia diagnosis. *Modern pathology*. 2005;183:324-330.
 52. Seebacher, V., M. Schmid, S. Polterauer, K. Hefler-Frischmuth, H. Leipold, N. Concin, et al., The presence of postmenopausal bleeding as prognostic parameter in patients with endometrial cancer: a retrospective multi-center study. *BMC cancer*. 2009;91:460.
 53. Balmaña, J., D.H. Stockwell, E.W. Steyerberg, E.M. Stoffel, A.M. Deffenbaugh, J.E. Reid, et al., Prediction of MLH1 and MSH2 mutations in Lynch syndrome. *Jama*. 2006;29612:1469-1478.
 54. Gu, M., W. Shi, R.R. Barakat, H.T. Thaler, and P.E. Saigo, Pap smears in women with endometrial carcinoma. *Acta cytologica*. 2001;454:555-560.
 55. Simsir, A., W. Carter, P. Elgert, and J. Cangiarella, Reporting Endometrial Cells in Women 40 Years and Older Assessing the Clinical Usefulness of Bethesda 2001. *American journal of clinical pathology*. 2005;1234:571-575.
 56. Powell, J.L., K.A. Hill, B.C. Shiro, S.J. Diehl, and W.H. Gajewski, Preoperative serum CA-125 levels in treating endometrial cancer. *The Journal of reproductive medicine*. 2005;508:585-590.
 57. Smith-Bindman, R., K. Kerlikowske, V.A. Feldstein, L. Subak, J. Scheidler, M. Segal, et al., Endovaginal ultrasound to exclude endometrial cancer and other endometrial abnormalities. *Jama*. 1998;28017:1510-1517.
 58. Ascher, S.M. and C. Reinhold, Imaging of cancer of the endometrium. *Radiologic Clinics of North America*. 2002;403:563-576.
 59. Barwick, T., A. Rockall, D. Barton, and S. Sohaib, Imaging of endometrial adenocarcinoma. *Clinical radiology*. 2006;617:545-555.
 60. Hardesty, L.A., J.H. Sumkin, C. Hakim, C. Johns, and M. Nath, The ability of

- helical CT to preoperatively stage endometrial carcinoma. *American Journal of Roentgenology*. 2001;1763:603-606.
61. Beddy, P., A.C. O'Neill, A.K. Yamamoto, H.C. Addley, C. Reinhold, and E. Sala, FIGO staging system for endometrial cancer: added benefits of MR imaging. *Radiographics*. 2011;321:241-254.
 62. Murakami, T., H. Kurachi, H. Nakamura, K. Tsuda, A. Miyake, K. Tomoda, et al., Cervical invasion of endometrial carcinoma—evaluation by parasagittal MR imaging. *Acta Radiologica*. 1995;363:248-253.
 63. Todo, Y., H. Watari, S. Kang, and N. Sakuragi, Tailoring lymphadenectomy according to the risk of lymph node metastasis in endometrial cancer. *Journal of obstetrics and gynaecology research*. 2014;402:317-321.
 64. Amant, F., P. Moerman, P. Neven, D. Timmerman, E. Van Limbergen, and I. Vergote, Endometrial cancer. *The Lancet*. 2005;3669484:491-505.
 65. Brown, L., Pathology of uterine malignancies. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2008;206:433-47.
 66. Havrilesky, L.J., A.A. Secord, V. Bae-Jump, T. Ayeni, B. Calingaert, D.L. Clarke-Pearson, et al., Outcomes in surgical stage I uterine papillary serous carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2007;1053:677-82.
 67. Lum, D., Primary transitional cell carcinoma of the endometrium. *Pathology*. 2005;376:554-7.
 68. Pecorelli, S., Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium. *Int J Gynaecol Obstet*. 2009;1052:103-4.
 69. Chan, J.K., M.K. Cheung, W.K. Huh, K. Osann, A. Husain, N.N. Teng, et al., Therapeutic role of lymph node resection in endometrioid corpus cancer: a study of 12,333 patients. *Cancer*. 2006;1078:1823-30.
 70. Abeler, V.M. and K.E. Kjorstad, Endometrial adenocarcinoma in Norway. A study of a total population. *Cancer*. 1991;6712:3093-103.
 71. Abeler, V.M. and K.E. Kjorstad, Endometrial adenocarcinoma with squamous cell differentiation. *Cancer*. 1992;692:488-95.
 72. Lax, S.F., R.J. Kurman, E.S. Pizer, L. Wu, and B.M. Ronnett, A binary architectural grading system for uterine endometrial endometrioid carcinoma has superior reproducibility compared with FIGO grading and identifies subsets of advance-

- stage tumors with favorable and unfavorable prognosis. *The American journal of surgical pathology*. 2000;249:1201-1208.
73. Christopherson, W.M., P.J. Connelly, and R.C. Alberhasky, Carcinoma of the endometrium V. An analysis of prognosticators in patients with favorable subtypes and stage I disease. *Cancer*. 1983;519:1705-1709.
 74. DiSaia, P.J., W.T. Creasman, R.C. Boronow, and J.A. Blessing, Risk factors and recurrent patterns in Stage I endometrial cancer. *Am J Obstet Gynecol*. 1985;1518:1009-15.
 75. Zaino, R.J., R.J. Kurman, K.L. Diana, and C.P. Morrow, Pathologic models to predict outcome for women with endometrial adenocarcinoma: The importance of the distinction between surgical stage and clinical stage--A gynecologic oncology group study. *Cancer*. 1996;776:1115-1121.
 76. Morrow, C.P., B.N. Bundy, R.J. Kurman, W.T. Creasman, P. Heller, H.D. Homesley, et al., Relationship between surgical-pathological risk factors and outcome in clinical stage I and II carcinoma of the endometrium: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecologic oncology*. 1991;401:55-65.
 77. Schink, J.C., A.W. Rademaker, D. Miller, and J.R. Lurain, Tumor size in endometrial cancer. *Cancer*. 1991;6711:2791-2794.
 78. Moore, T.D., P. Phillips, S. Nerenstone, and B. Cheson, Systemic treatment of advanced and recurrent endometrial carcinoma: current status and future directions. *Journal of clinical oncology*. 1991;96:1071-1088.
 79. Hetzel, D.J., T.O. Wilson, G.L. Keeney, P.C. Roche, S.S. Cha, and K.C. Podratz, HER-2/neu expression: a major prognostic factor in endometrial cancer. *Gynecologic oncology*. 1992;472:179-185.
 80. Lundgren, C., G. Auer, B. Frankendal, B. Moberger, B. Nilsson, and B. Nordström, Nuclear DNA content, proliferative activity, and p53 expression related to clinical and histopathologic features in endometrial carcinoma. *International Journal of Gynecological Cancer*. 2002;121:110-118.
 81. Persson, I. and H.-O. Adami, Endometrial cancer. *Textbook of Cancer Epidemiology*. New York: Oxford University Press. 2002;359-77.
 82. Matias-Guiu, X., L. Catasus, E. Bussaglia, H. Lagarda, A. Garcia, C. Pons, et al., Molecular pathology of endometrial hyperplasia and carcinoma. *Hum Pathol*.

- 2001;326:569-77.
83. Sartori, E., A. Gadducci, F. Landoni, A. Lissoni, T. Maggino, P. Zola, et al., Clinical behavior of 203 stage II endometrial cancer cases: the impact of primary surgical approach and of adjuvant radiation therapy. *Int J Gynecol Cancer*. 2001;116:430-7.
 84. Ayhan, A., C. Taskiran, C. Celik, and K. Yuce, The long-term survival of women with surgical stage II endometrioid type endometrial cancer. *Gynecol Oncol*. 2004;931:9-13.
 85. Soliman, P.T., M. Frumovitz, W. Spannuth, M.J. Greer, S. Sharma, K.M. Schmeler, et al., Lymphadenectomy during endometrial cancer staging: practice patterns among gynecologic oncologists. *Gynecol Oncol*. 2010;1192:291-4.
 86. Shenfield, C.B., R.G. Pearcey, S. Ghosh, and G.S. Dundas, The management of inoperable Stage I endometrial cancer using intracavitary brachytherapy alone: a 20-year institutional review. *Brachytherapy*. 2009;83:278-83.
 87. Creutzberg, C.L., W.L. van Putten, P.C. Koper, M.L. Lybeert, J.J. Jobsen, C.C. Warlam-Rodenhuis, et al., Surgery and postoperative radiotherapy versus surgery alone for patients with stage-1 endometrial carcinoma: multicentre randomised trial. PORTEC Study Group. *Post Operative Radiation Therapy in Endometrial Carcinoma*. *Lancet*. 2000;3559213:1404-11.
 88. Randall, M.E., V.L. Filiaci, H. Muss, N.M. Spiratos, R.S. Mannel, J. Fowler, et al., Randomized phase III trial of whole-abdominal irradiation versus doxorubicin and cisplatin chemotherapy in advanced endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol*. 2006;241:36-44.
 89. Martin-Hirsch, P.L., R.J. Lilford, and G.J. Jarvis, Adjuvant progestagen therapy for the treatment of endometrial cancer: review and meta-analyses of published randomised controlled trials. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1996;652:201-7.
 90. Del Boccio, P. and A. Urbani, Homo sapiens proteomics: clinical perspectives. *Ann Ist Super Sanita*. 2005;414:479-82.
 91. Arthur, J.M., Proteomics. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2003;124:423-30.
 92. Haseltine, W.A., Discovering genes for new medicines. *Sci Am*. 1997;2763:92-7.
 93. Attarha, S., M. Mints, S. Andersson, and S. Souchelnytskyi, Endometrial cancer and application of proteomics. *Exp Oncol*. 2011;333:174-7.
 94. Guo, Y., Z. Fu, and J.E. Van Eyk, A proteomic primer for the clinician. *Proc Am*

- Thorac Soc. 2007;41:9-17.
95. Han, M.H., S.I. Hwang, D.B. Roy, D.H. Lundgren, J.V. Price, S.S. Ousman, et al., Proteomic analysis of active multiple sclerosis lesions reveals therapeutic targets. *Nature*. 2008;4517182:1076-81.
 96. Anderson, N.L., The clinical plasma proteome: a survey of clinical assays for proteins in plasma and serum. *Clin Chem*. 2010;562:177-85.
 97. Cadron, I., T. Van Gorp, D. Timmerman, F. Amant, E. Waelkens, and I. Vergote, Application of proteomics in ovarian cancer: which sample should be used? *Gynecol Oncol*. 2009;1153:497-503.
 98. Lin, Y.W., H.C. Lai, C.Y. Lin, J.Y. Chiou, H.A. Shui, C.C. Chang, et al., Plasma proteomic profiling for detecting and differentiating in situ and invasive carcinomas of the uterine cervix. *Int J Gynecol Cancer*. 2006;163:1216-24.
 99. Attarha, S., S. Andersson, M. Mints, and S. Souchelnytskyi, Individualised proteome profiling of human endometrial tumours improves detection of new prognostic markers. *Br J Cancer*. 2013;1093:704-13.
 100. Teng, Y., Z. Ai, Y. Wang, J. Wang, and L. Luo, Proteomic identification of PKM2 and HSPA5 as potential biomarkers for predicting high-risk endometrial carcinoma. *J Obstet Gynaecol Res*. 2013;391:317-25.
 101. Yokoyama, T., T. Enomoto, S. Serada, A. Morimoto, S. Matsuzaki, Y. Ueda, et al., Plasma membrane proteomics identifies bone marrow stromal antigen 2 as a potential therapeutic target in endometrial cancer. *Int J Cancer*. 2013;1322:472-84.
 102. Hembrough, T.A., K.R. Kralovich, L. Li, and S.L. Gonias, Cytokeratin 8 released by breast carcinoma cells in vitro binds plasminogen and tissue-type plasminogen activator and promotes plasminogen activation. *Biochem J*. 1996;317 (Pt 3):763-9.
 103. Kralovich, K.R., L. Li, T.A. Hembrough, D.J. Webb, L.R. Karns, and S.L. Gonias, Characterization of the binding sites for plasminogen and tissue-type plasminogen activator in cytokeratin 8 and cytokeratin 18. *J Protein Chem*. 1998;178:845-54.
 104. Spies, T., G. Blanck, M. Bresnahan, J. Sands, and J.L. Strominger, A new cluster of genes within the human major histocompatibility complex. *Science*. 1989;2434888:214-7.
 105. Sahni, A., N. Wang, and J.D. Alexis, UAP56 is an important regulator of protein synthesis and growth in cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun*.

- 2010;3931:106-10.
106. Ramos, F.S., L.T. Serino, C.M. Carvalho, R.S. Lima, C.A. Urban, I.J. Cavalli, et al., PDIA3 and PDIA6 gene expression as an aggressiveness marker in primary ductal breast cancer. *Genet Mol Res.* 2015;142:6960-7.
 107. Kullmann, M., G.V. Kalayda, M. Hellwig, S. Kotz, R.A. Hilger, S. Metzger, et al., Assessing the contribution of the two protein disulfide isomerases PDIA1 and PDIA3 to cisplatin resistance. *J Inorg Biochem.* 2015;153247-52.
 108. Capello, M., S. Ferri-Borgogno, P. Cappello, and F. Novelli, alpha-Enolase: a promising therapeutic and diagnostic tumor target. *Febs j.* 2011;2787:1064-74.
 109. Hanash, S., Harnessing immunity for cancer marker discovery. *Nat Biotechnol.* 2003;211:37-8.
 110. Brown, J.M. and A.J. Giaccia, The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy. *Cancer Res.* 1998;587:1408-16.
 111. Milioli, H.H., K. Santos Sousa, R. Kaviski, N.C. Dos Santos Oliveira, C. De Andrade Urban, R.S. De Lima, et al., Comparative proteomics of primary breast carcinomas and lymph node metastases outlining markers of tumor invasion. *Cancer Genomics Proteomics.* 2015;122:89-101.
 112. Pendharkar, N., A. Gajbhiye, K. Taunk, S. RoyChoudhury, S. Dhali, S. Seal, et al., Quantitative tissue proteomic investigation of invasive ductal carcinoma of breast with luminal B HER2 positive and HER2 enriched subtypes towards potential diagnostic and therapeutic biomarkers. *J Proteomics.* 2016;132112-30.
 113. Popow, A., D. Nowak, and M. Malicka-Blaszkiewicz, Actin cytoskeleton and beta-actin expression in correlation with higher invasiveness of selected hepatoma Morris 5123 cells. *J Physiol Pharmacol.* 2006;57 Suppl 7111-23.
 114. Guo, C., S. Liu, J. Wang, M.Z. Sun, and F.T. Greenaway, ACTB in cancer. *Clin Chim Acta.* 2013;41739-44.
 115. Le, P.U., T.N. Nguyen, P. Drolet-Savoie, N. Leclerc, and I.R. Nabi, Increased beta-actin expression in an invasive moloney sarcoma virus-transformed MDCK cell variant concentrates to the tips of multiple pseudopodia. *Cancer Res.* 1998;588:1631-5.
 116. Lee, E., P. Nichols, S. Groshen, D. Spicer, and A.S. Lee, GRP78 as potential predictor for breast cancer response to adjuvant taxane therapy. *Int J Cancer.*

- 2011;1283:726-31.
117. Chan, Q.K., U.S. Khoo, H.Y. Ngan, C.Q. Yang, W.C. Xue, K.Y. Chan, et al., Single nucleotide polymorphism of pi-class glutathione s-transferase and susceptibility to endometrial carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2005;118:2981-5.
 118. Nakayama, M., C.J. Bennett, J.L. Hicks, J.I. Epstein, E.A. Platz, W.G. Nelson, et al., Hypermethylation of the human glutathione S-transferase-pi gene (GSTP1) CpG island is present in a subset of proliferative inflammatory atrophy lesions but not in normal or hyperplastic epithelium of the prostate: a detailed study using laser-capture microdissection. *Am J Pathol.* 2003;1633:923-33.
 119. Chan, Q.K., U.S. Khoo, K.Y. Chan, H.Y. Ngan, S.S. Li, P.M. Chiu, et al., Promoter methylation and differential expression of pi-class glutathione S-transferase in endometrial carcinoma. *J Mol Diagn.* 2005;71:8-16.
 120. Ishioka, C., R. Kanamaru, H. Shibata, Y. Konishi, A. Ishikawa, A. Wakui, et al., Expression of glutathione S-transferase-pi messenger RNA in human esophageal cancers. *Cancer.* 1991;6710:2560-4.
 121. Nelson, W.G., A.M. De Marzo, and T.L. DeWeese, The molecular pathogenesis of prostate cancer: Implications for prostate cancer prevention. *Urology.* 2001;574 Suppl 1:39-45.
 122. Huber, J.C., C. Schneeberger, and C.B. Tempfer, Genetic modelling of the estrogen metabolism as a risk factor of hormone-dependent disorders. *Maturitas.* 2002;421:1-12.
 123. Po'uha, S.T. and M. Kavallaris, Gamma-actin is involved in regulating centrosome function and mitotic progression in cancer cells. *Cell Cycle.* 2015;1424:3908-19.
 124. Po'uha, S.T., S. Honore, D. Braguer, and M. Kavallaris, Partial depletion of gamma-actin suppresses microtubule dynamics. *Cytoskeleton (Hoboken).* 2013;703:148-60.
 125. Sanchez-Martin, D., J. Martinez-Torrecedrada, T. Teesalu, K.N. Sugahara, A. Alvarez-Cienfuegos, P. Ximenez-Embun, et al., Proteasome activator complex PA28 identified as an accessible target in prostate cancer by in vivo selection of human antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;11034:13791-6.
 126. Durdagi, S., D. Vullo, P. Pan, N. Kahkonen, J.A. Maatta, V.P. Hytonen, et al., Protein-protein interactions: inhibition of mammalian carbonic anhydrases I-XV by

- the murine inhibitor of carbonic anhydrase and other members of the transferrin family. *J Med Chem.* 2012;5511:5529-35.
127. Young, B., C. Purcell, Y.Q. Kuang, N. Charette, and D.J. Dupre, Superoxide Dismutase 1 Regulation of CXCR4-Mediated Signaling in Prostate Cancer Cells is Dependent on Cellular Oxidative State. *Cell Physiol Biochem.* 2015;376:2071-84.
 128. Saeidi, K., Myeloproliferative neoplasms: Current molecular biology and genetics. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2016;98375-89.
 129. Luthra, R., R.R. Singh, M.G. Luthra, Y.X. Li, C. Hannah, A.M. Romans, et al., MicroRNA-196a targets annexin A1: a microRNA-mediated mechanism of annexin A1 downregulation in cancers. *Oncogene.* 2008;2752:6667-78.
 130. Thapar, R., Roles of Prolyl Isomerases in RNA-Mediated Gene Expression. *Biomolecules.* 2015;52:974-99.
 131. Bhavsar, R.B., L.N. Makley, and P.A. Tsonis, The other lives of ribosomal proteins. *Hum Genomics.* 2010;45:327-44.
 132. Chen, C.Y. and A.B. Shyu, Emerging mechanisms of mRNP remodeling regulation. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2014;55:713-22.
 133. Xu, C., J. Wang, J. Li, and R. Fang, Expression of elongation factor (EF)-Tu is correlated with prognosis of gastric adenocarcinomas. *Int J Mol Sci.* 2011;1210:6645-55.
 134. Parmeggiani, A. and P. Nissen, Elongation factor Tu-targeted antibiotics: four different structures, two mechanisms of action. *FEBS Lett.* 2006;58019:4576-81.
 135. Wataba, K., T. Saito, K. Fukunaka, K. Ashihara, M. Nishimura, and R. Kudo, Over-expression of heat shock proteins in carcinogenic endometrium. *Int J Cancer.* 2001;914:448-56.
 136. Zagorianakou, N., E. Ioachim, A. Mitselou, E. Kitsou, P. Zagorianakou, G. Makrydimas, et al., Immunohistochemical expression of heat shock protein 27, in normal hyperplastic and neoplastic endometrium: correlation with estrogen and progesterone receptor status, p53, pRb and proliferation associated indices (PCNA, MIB1). *Eur J Gynaecol Oncol.* 2003;243-4:299-304.
 137. Kim, J.Y., J.Y. Shin, M. Kim, S.K. Hann, and S.H. Oh, Expression of cytosolic NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase in melanocytes and its role as an antioxidant. *J Dermatol Sci.* 2012;652:118-25.

138. Li, Z., W. Min, C. Huang, S. Bai, M. Tang, and X. Zhao, Proteomics-based approach identified differentially expressed proteins with potential roles in endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Cancer*. 2010;201:9-15.
139. Li, Z., C. Huang, S. Bai, X. Pan, R. Zhou, Y. Wei, et al., Prognostic evaluation of epidermal fatty acid-binding protein and calcyphosine, two proteins implicated in endometrial cancer using a proteomic approach. *Int J Cancer*. 2008;12310:2377-83.
140. Li, Z., X. Zhao, S. Bai, Z. Wang, L. Chen, Y. Wei, et al., Proteomics identification of cyclophilin a as a potential prognostic factor and therapeutic target in endometrial carcinoma. *Mol Cell Proteomics*. 2008;710:1810-23.
141. Maxwell, G.L., B.L. Hood, R. Day, U. Chandran, D. Kirchner, V.S. Kolli, et al., Proteomic analysis of stage I endometrial cancer tissue: identification of proteins associated with oxidative processes and inflammation. *Gynecol Oncol*. 2011;1213:586-94.
142. Yoshizaki, T., T. Enomoto, R. Nakashima, Y. Ueda, H. Kanao, K. Yoshino, et al., Altered protein expression in endometrial carcinogenesis. *Cancer Lett*. 2005;2262:101-6.
143. Dallenbach-Hellweg, G., G. Lang-Averous, and U. Hahn, The value of immunohistochemistry in the differential diagnosis of endometrial carcinomas. *APMIS Suppl*. 1991;2391-9.
144. Gharib, T.G., G. Chen, H. Wang, C.C. Huang, M.S. Prescott, K. Shedden, et al., Proteomic analysis of cytokeratin isoforms uncovers association with survival in lung adenocarcinoma. *Neoplasia*. 2002;45:440-8.
145. Matthias, C., B. Mack, A. Berghaus, and O. Gires, Keratin 8 expression in head and neck epithelia. *BMC Cancer*. 2008;8267.
146. Majumdar, D., J.P. Tiernan, A.J. Lobo, C.A. Evans, and B.M. Corfe, Keratins in colorectal epithelial function and disease. *Int J Exp Pathol*. 2012;935:305-18.
147. Dominguez-Sanchez, M.S., C. Saez, M.A. Japon, A. Aguilera, and R. Luna, Differential expression of THOC1 and ALY mRNP biogenesis/export factors in human cancers. *BMC Cancer*. 2011;1177.
148. Chay, D., H. Cho, B.J. Lim, E.S. Kang, Y.J. Oh, S.M. Choi, et al., ER-60 (PDIA3) is highly expressed in a newly established serous ovarian cancer cell line, YDOV-139. *Int J Oncol*. 2010;372:399-412.

149. Liao, C.J., T.I. Wu, Y.H. Huang, T.C. Chang, C.S. Wang, M.M. Tsai, et al., Glucose-regulated protein 58 modulates cell invasiveness and serves as a prognostic marker for cervical cancer. *Cancer Sci.* 2011;10212:2255-63.
150. Tu, S.H., C.C. Chang, C.S. Chen, K.W. Tam, Y.J. Wang, C.H. Lee, et al., Increased expression of enolase alpha in human breast cancer confers tamoxifen resistance in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;1213:539-53.
151. Shih, N.Y., H.L. Lai, G.C. Chang, H.C. Lin, Y.C. Wu, J.M. Liu, et al., Anti-alpha-enolase autoantibodies are down-regulated in advanced cancer patients. *Jpn J Clin Oncol.* 2010;407:663-9.
152. Tomaino, B., P. Cappello, M. Capello, C. Fredolini, I. Sperduti, P. Migliorini, et al., Circulating autoantibodies to phosphorylated alpha-enolase are a hallmark of pancreatic cancer. *J Proteome Res.* 2011;101:105-12.
153. Cali, G., L. Insabato, D. Conza, G. Bifulco, L. Parrillo, P. Mirra, et al., GRP78 mediates cell growth and invasiveness in endometrial cancer. *J Cell Physiol.* 2014;22910:1417-26.
154. Luvsandagva, B., K. Nakamura, Y. Kitahara, H. Aoki, T. Murata, S. Ikeda, et al., GRP78 induced by estrogen plays a role in the chemosensitivity of endometrial cancer. *Gynecol Oncol.* 2012;1261:132-9.
155. Lim, R., M. Lappas, N. Ahmed, M. Permezel, M.A. Quinn, and G.E. Rice, 2D-PAGE of ovarian cancer: analysis of soluble and insoluble fractions using medium-range immobilized pH gradients. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;4063:408-13.
156. Yokoyama, Y., M. Sagara, S. Sato, and Y. Saito, Value of glutathione S-transferase pi and the oncogene products c-Jun, c-Fos, c-H-Ras, and c-Myc as a prognostic indicator in endometrial carcinomas. *Gynecol Oncol.* 1998;683:280-7.
157. Fiolka, R., P. Zubor, V. Janusicova, J. Visnovsky, A. Mendelova, K. Kajo, et al., Promoter hypermethylation of the tumor-suppressor genes RASSF1A, GSTP1 and CDH1 in endometrial cancer. *Oncol Rep.* 2013;306:2878-86.
158. Chou, C.C., R.C. Davis, M.L. Fuller, J.P. Slovin, A. Wong, J. Wright, et al., Gamma-actin: unusual mRNA 3'-untranslated sequence conservation and amino acid substitutions that may be cancer related. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;849:2575-9.

159. Luo, Y., F. Kong, Z. Wang, D. Chen, Q. Liu, T. Wang, et al., Loss of ASAP3 destabilizes cytoskeletal protein ACTG1 to suppress cancer cell migration. *Mol Med Rep.* 2014;92:387-94.
160. Zhang, D., S.G. Lim, and E.S. Koay, Proteomic identification of down-regulation of oncoprotein DJ-1 and proteasome activator subunit 1 in hepatitis B virus-infected well-differentiated hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol.* 2007;313:577-84.
161. Zheng, Y., B. Xu, Y. Zhao, H. Gu, C. Li, Y. Wang, et al., CA1 contributes to microcalcification and tumourigenesis in breast cancer. *BMC Cancer.* 2015;15679.
162. Jo, M.S., O.H. Choi, D.S. Suh, M.S. Yun, S.J. Kim, G.H. Kim, et al., Correlation between expression of biological markers and [F]fluorodeoxyglucose uptake in endometrial cancer. *Oncol Res Treat.* 2014;371-2:30-4.
163. Sadlecki, P., M. Bodnar, M. Grabiec, A. Marszalek, P. Walentowicz, A. Sokup, et al., The role of Hypoxia-inducible factor-1 alpha , glucose transporter-1, (GLUT-1) and carbon anhydrase IX in endometrial cancer patients. *Biomed Res Int.* 2014;2014616850.
164. Punnonen, R., R. Kudo, K. Punnonen, E. Hietanen, T. Kuoppala, H. Kainulainen, et al., Activities of antioxidant enzymes and lipid peroxidation in endometrial cancer. *Eur J Cancer.* 1993;29a2:266-9.
165. Pejic, S., A. Todorovic, V. Stojiljkovic, J. Kasapovic, and S.B. Pajovic, Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in endometrium of patients with polyps, myoma, hyperplasia and adenocarcinoma. *Reprod Biol Endocrinol.* 2009;7149.
166. Morelli, M., D. Scumaci, A. Di Cello, R. Venturella, G. Donato, M.C. Faniello, et al., DJ-1 in endometrial cancer: a possible biomarker to improve differential diagnosis between subtypes. *Int J Gynecol Cancer.* 2014;244:649-58.
167. Parmar, T., S. Nimbkar-Joshi, R.R. Katkam, S. Gadkar-Sable, U. Chaudhari, D.D. Manjramkar, et al., Differential expression of calreticulin, a reticuloplasm in primate endometrium. *Hum Reprod.* 2009;249:2205-16.
168. Wang, L.D., Y.H. Yang, Y. Liu, H.T. Song, L.Y. Zhang, and P.L. Li, Decreased expression of annexin A1 during the progression of cervical neoplasia. *J Int Med Res.* 2008;364:665-72.
169. Kim, K., H. Kim, K. Jeong, M.H. Jung, B.S. Hahn, K.S. Yoon, et al., Release of

- overexpressed CypB activates ERK signaling through CD147 binding for hepatoma cell resistance to oxidative stress. *Apoptosis*. 2012;178:784-96.
170. Meng, D.Q., P.L. Li, and M. Xie, Expression and role of cyclophilin B in stomach cancer. *Genet Mol Res*. 2015;142:5346-54.
171. Li, Z., J. Gou, and J. Xu, Down-regulation of focal adhesion signaling in response to cyclophilin A knockdown in human endometrial cancer cells, implicated by cDNA microarray analysis. *Gynecol Oncol*. 2013;1311:191-7.
172. Li, Z., W. Min, and J. Gou, Knockdown of cyclophilin A reverses paclitaxel resistance in human endometrial cancer cells via suppression of MAPK kinase pathways. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2013;725:1001-11.
173. Kim, H.K., W.S. Park, S.H. Kang, M. Warda, N. Kim, J.H. Ko, et al., Mitochondrial alterations in human gastric carcinoma cell line. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007;2932:C761-71.
174. Ciocca, D.R., S. Oesterreich, G.C. Chamness, W.L. McGuire, and S.A. Fuqua, Biological and clinical implications of heat shock protein 27,000 (Hsp27): a review. *J Natl Cancer Inst*. 1993;8519:1558-70.