



**T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**ENDOMETRİAL HİPERPLAZİLERDE FORMALİN
İLE FİKSE PARAFİNE GÖMÜLÜ DOKU
ÖRNEKLERİNDE miRNA 204-5p, miRNA 138-5p ve
miRNA 133-3p’NİN EKSPRESYON
DÜZEYLERİNİN KİYASLANMASI VE
PROGNOSTİK DEĞERİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Emre AKÇİL

KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Özcan BALAT

HAZİRAN 2016

**T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**ENDOMETRİAL HİPERPLAZİLERDE FORMALİN İLE
FİKSE PARAFİNE GÖMÜLÜ DOKU ÖRNEKLERİNDE
miRNA 204-5p, miRNA 138-5p ve miRNA 133-3p’NİN
EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN KİYASLANMASI VE
PROGNOSTİK DEĞERİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Emre AKÇİL

KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Özcan BALAT

HAZİRAN 2016

Bu tez, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi tarafından TF.UT.16.22 proje numarasıyla desteklenmiştir.

TEZ ONAY SAYFASI

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

TEZİN ADI

Endometrial Hiperplazilerde formalin ile fikse parafine gömülü doku örneklerinde miRNA 204-5p, miRNA 138-5p ve miRNA 133-3p'nin ekspresyon düzeylerinin kıyaslanması ve prognostik değeri

DR. EMRE AKÇİL

TARİH : 08.06.2016

Tıp Fakültesi Dekanlığı Onayı

(imza).....
Prof. Dr. Levent ELLEVEN
Tıp Fakültesi Dekanı

Bu tez çalışmasının "Tıpta Uzmanlık" derecesine uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

(imza)
Doç. Dr. Mete Gürol UĞUR
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımdan okunmuş ve her yönü ile "Tıpta Uzmanlık" tezi olarak uygun ve yeterli bulunmuştur.

(İmza).....
Prof. Dr. Özcan BALAT
Tez Danışmanı

TEZ JÜRİSİ:

1. Prof.Dr.Özcan BALAT (İmza).....
2. Doç.Dr.Mete Gürol UĞUR (İmza).....
3. Prof. Dr. Hakan KIRAN (İmza).....
4. Yrd. Doç. H. Çağlayan ÖZCAN(Yedek Üye) (İmza).....
5. Yrd. Doç. Özge KÖMÜRCÜ KARUSERCİ (Yedek Üye) (İmza).....

I. ÖNSÖZ

Uzmanlık Eğitimim süresince engin bilgi ve deneyimi ile bana samimiyetle yol gösteren, cerrahi disiplin kazandıran ve tez çalışmamın gerçekleşmesinde büyük katkıları olan değerli hocam Prof. Dr. Özcan BALAT'a,

Bilgi ve tecrübeleriyle bana her konuda destek olan, sabırla ve özveriyle beni yetiştiren değerli hocalarım sayın Prof. Dr. İrfan KUTLAR'a, Doç. Dr. Mete Gürol UĞUR'a, Yrd. Doç. Dr. Hüseyin Çağlayan ÖZCAN'a, Yrd. Doç. Dr. Neslihan BAYRAMOĞLU TEPE'ye, Yrd. Doç. Dr. Özge KÖMÜRCÜ KARUSERCİ'ye,

Tezim için gerekli olan patoloji incelemelerinde çokça emeği geçen ve pozitif enerjisiyle beni motive eden sevgili hocam Yrd. Doç. Dr. Zehra BOZDAĞ'a,

Yine tezimin bir parçası olan gen ölçüm çalışmalarında desteğini esirgemeyen sayın Doç. Dr. Serdar ÖZTUZCU ve bölüm arkadaşlarıma,

Tezimin istatistiksel verilerinin değerlendirilmesindeki katkılarından dolayı sayın Doç. Dr. Seval KUL'a,

Dostum ve kader ortağım Hüseyin KURT'a,

Asistan arkadaşlarımdan sevgi, saygı, hürmet ve samimiyetini bana layık görenlere,

Asistanlığım süresince güler yüzünü, manevi desteğini benden esirgemeyen hemşire ve personel arkadaşlarıma,

Ve elbette Allah'ın bana en güzel lütfu olan canım aileme,

TEŞEKKÜR EDERİM.

Dr. Emre AKÇİL
GAZİANTEP - 2016

II. İÇİNDEKİLER

I.	ÖNSÖZ	I
II.	İÇİNDEKİLER	II
III.	ÖZET	IV
IV.	ABSTRACT	V
V.	KISALTMALAR	VI
VI.	TABLO LİSTESİ	VII
VII.	ŞEKİL LİSTESİ	VIII
VIII.	RESİM LİSTESİ	IX
1.	GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.	GENEL BİLGİLER	3
2. 1.	Endometriyal Hiperplaziler	3
2. 1. 1.	Tanım	3
2. 1. 2.	Histoloji ve Sınıflandırma	3
2. 1 .2. 1.	WHO 94 (Dünya Sağlık Örgütü/DSÖ) Sınıflaması	4
2. 1. 2. 2.	Endometriyal İntraepitelyal Neoplazi (EİN) Sistemi	10
2. 1. 3.	Endometriyal Hiperplazilerin Epidemiyolojisi	14
2. 1. 4.	Endometriyal Hiperplazilerin Gelişimindeki Risk Faktörleri	15
2. 1. 5.	Endometriyal Hiperplazilerde Semptomlar ve Tanı	15
2. 1. 6.	Endometriyal Hiperplazilerde Tedavi Seçenekleri	16
2. 2.	Endometrium Kanseri	18
2. 2. 1.	Endometrium Kanserinde Epidemiyoloji	18
2. 2. 2.	Endometrium Kanserinin Histopatolojik Tipleri	19
2. 2. 3.	Endometrium Kanseri için Risk Faktörleri	19
2. 2. 3. 1.	Aşırı Östrojen Maruziyeti	19
2. 2. 3. 2.	Yaş Grubu	21
2. 2. 3. 3.	Aile Öyküsü	21
2. 2. 3. 4.	İnfertilite ve Nulliparite	22
2. 2. 3. 5.	Diabetes Mellitus ve Hipertansiyon	22

2. 2. 3. 6. Meme Kanseri Öyküsü	22
2. 2. 4. Endometrium Kanserine karşı Koruyucu Faktörler	23
2. 2. 5. Endometrium Kanserinde Tanı	24
2. 2. 6. Endometrium Kanserinde Tedavi Öncesi Değerlendirme	26
2. 2. 7. Endometrium Kanserinde Evreleme	27
2. 2. 8. Endometrium Kanserinde Tedavi	27
2. 3. Kanser ve MikroRNA	29
2. 3. 1. MikroRNA Biyogenezi	32
2. 3. 2. Tümör Süpresör ve Onkogenik miRNA Kavramı	33
2. 3. 3. Endometriumdaki MikroRNAlar	34
2. 3. 4. Endometriyal Hiperplazi ve MikroRNA	35
2. 3. 5. Endometrium Kanseri ve MikroRNA	36
2. 3. 6. Forkhead Box C1 Geni (FOXC1)	37
2. 3. 7. miRNA'nın Kanser Tanı, Tedavi ve Prognozundaki Önemi	
2. 3. 8. Onkogenik MikroRNA Tabanlı Tedavi Stratejileri	40
2. 3. 9. Tümör Baskılayıcı miRNA Tabanlı Tedavi Stratejileri	42
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	43
3. 1. Formalin ile fikse Parafine Gömülü Dokulardan miRNA Ekspresyon Ölçümü	44
3. 2. İstatistiksel Yöntem	46
4. BULGULAR	48
4. 1. Yaş	49
4. 2. miRNA 204-5p, miRNA 138-5p ve miRNA 133-3p Ekspresyon Düzeylerinin Gruplar Arası Dağılımı	50
4. 2. 1. miRNA 204-5p Ekspresyon Düzeyi	50
4. 2. 2. miRNA 138-5p Ekspresyon Düzeyi	51
4. 2. 3. miRNA 133-3p Ekspresyon Düzeyi	51
4. 3. miRNA Ekspresyon Düzeylerinin Gruplar arası Kat Değişimleri	53
5. TARTIŞMA	55
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	58
7. KAYNAKLAR	59

III. ÖZET

ENDOMETRİYAL HİPERPLAZİLERDE FORMALİN İLE FİKSE PARAFİNE GÖMÜLÜ DOKU ÖRNEKLERİNDE miRNA 204-5p, miRNA 138-5p ve miRNA 133-3p’NİN EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN KIYASLANMASI VE PROGNOSTİK DEĞERİ

Dr. Emre AKÇİL

Uzmanlık Tezi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Özcan BALAT

Haziran 2016, 81 Sayfa

Çalışmamızın amacı, endometriyal hiperplazilerde (EH) formalinle fikse parafine gömülü (FFPE) doku örneklerinde miRNA 204-5p, miRNA 138-5p ve miRNA 133-3p ekspresyon düzeylerini saptayıp kıyaslamak ve böylece endometriyal kansere dönüşümlerini öngörme ve önleme konusunda yapılan çalışmalara yol gösterici olmaktır.

Ocak 2005 – Şubat 2015 tarihleri arasında Gaziantep Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Şahinbey Uygulama ve Araştırma Hastanesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği’ne başvuran 38 adet atipili EH tanısı almış (1. hasta grubu), 44 adet atipisiz EH tanısı almış (2. hasta grubu) ve 44 adet benign endometriyal örnekleme tanısı almış hasta (kontrol grubu) çalışmaya dahil edildi. qRT-PCR yöntemiyle üç grubun miRNA 204-5p, miRNA 138-5p ve miRNA 133-3p ekspresyon düzeyleri değerlendirildi. İstatistiksel değerlendirmede Kolmogorov Smirnov, Kruskal Wallis ve Dunn testleri uygulandı. P değeri 0,05’in altında ise anlamlı olarak kabul edildi.

Atipili ve atipisiz EH gruplarına ait miRNA 204-5p ekspresyon düzeyi, kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulundu (sırasıyla $p=0,004$ ve $0,001$). miRNA-138-5p ve miRNA 133-3p ekspresyon düzeyleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında atipili EH olgularında anlamlı şekilde artmış (sırasıyla $p=0,005$ ve $p=0,001$); atipisiz EH olgularındaysa anlamlı şekilde azalmış olarak bulundu (sırasıyla $p=0,001$ ve $p=0,001$). Atipili hiperplazilerde miRNA 138-5p ve miRNA 133-3p düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmış olması, literatürdeki verilerin tersine çıktığından bu durumun klinik açıdan önemi değerlendirilemedi.

Çalışmamız, endometriyal hiperplazilere ait FFPE dokularda miRNA ekspresyon düzeylerini 126 olguyu kapsayan geniş bir örnek hacminde değerlendiren literatürdeki ilk araştırmadır. EH olgularında miRNA 204-5p ekspresyon düzeylerini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük olduğunu saptadık. Bu sonuçlar, miRNA 204-5p’nin endometriyal hiperplazilerin kansere dönüşümünü öngörmeye potansiyel biyobelirteçlerden biri olabileceğini düşündürmektedir.

ANAHTAR KELİMELER: Endometriyal Hiperplazi; Formalinle Fikse Parafine Gömülü Doku; Mikro RNA; Biyobelirteç.

IV. ABSTRACT

COMPARING THE EXPRESSION LEVELS OF miRNA204-5p, miRNA 138-5p AND miRNA 133-3p IN FORMALINE FIXED – PARAFFINE EMBEDDED TISSUE SAMPLES OF ENDOMETRIAL HYPERPLASIA AND ASSESMENT OF PROGNOSTIC VALUE

Emre AKÇİL, M.D.

Resident, Department of Obstetrics and Gynecology

Supervisor: Professor Özcan BALAT, M.D.

June – 2016, 81 Pages

The aim of our study is to determine and compare miRNA 204-5p, miRNA 138-5p and miRNA 133-3p expression levels in formaline fixed-paraffine embedded tissue samples of endometrial hyperplasia (EH) to assess their role in predicting and preventing endometrial cancer as a directive study in addition to other researches.

This study includes 38 patients with atypical hyperplasia (1.patient group), 44 hyperplasia patients without atypia (2.patient group) and 44 patients with benign endometrial sampling (control group) admitted to our clinic between January 2005 – February 2015. Using qRT-PCR method, miRNA 204-5p, miRNA 138-5p and miRNA 133-3p expression levels of each group were evaluated. Kolmogorov Smirnov, Kruskal Wallis and Dunn tests were used for statistical analysis. A p value below 0,05 was accepted as significant.

miRNA 204-5p expression levels were significantly lower in the EH patients comparing to control group ($p=0,004$ and $0,001$, respectively). Comparing to control group, miRNA 138-5p and miRNA 133-3p expression levels were significantly higher in atypical EH group ($p=0,005$ and $0,001$, respectively) whereas they were significantly lower in EH group without atypia ($p=0,001$ and $0,001$, respectively). Increased expression levels of miRNA 138-5p and 133-3p in patients with atypical EH were in conflict with researches in literature. Clinical significance of this result remained unclear.

This is the first study evaluating levels of miRNA expression in FFPE samples of EH in such a large cohort consisting of 126 cases. Significantly lower miRNA 204-5p levels in EH cases gives an impression that it could be a potential biomarker used to predict malign transformation.

KEY WORDS: Endometrial Hyperplasia; FFPE tissue sample; Micro RNA; Biomarker

V. KISALTMALAR

BAX	: Bcl-2-associated X Proteini Geni
Bcl-2	: B-cell lymphoma 2 Geni
BRCA	: Breast Cancer
BT	: Bilgisayarlı Tomografi
CEA	: Karsinoembriyonik Antijen
DGCR8	: DiGeorge Syndrome Critical Region 8 Proteini
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EH	: Endometrial Hiperplazi
EIN	: Endometrial İntraepitelyal Neoplazi
FFPE	: Formalin ile Fikse Parafine Gömülü
FIGO	: International Federation of Gynecology and Obstetrics
FOXC1	: Forkhead Box C1
GOG	: Gynecologic Oncology Group
HDL	: High Density Lipoprotein
miR veya miRNA	: Mikro Ribonükleik Asit, MikroRNA
mRNA	: Mesajcı RNA
MRG	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
ORF	: Opening Reading Frame/Açık Okuma Çerçevesi
PCOS	: Polikistik Over Sendromu
PORTEC-3	: Postoperative Radiotherapy for Endometrial Cancer-3
Pre-miR	: Prekürsör MikroRNA
Pri-miR	: Primer MikroRNA
PTEN	: Phosphatase and Tensin Homolog
RNA	: Ribonükleik Asit
USG	: Ultrasonografi
VKİ	: Vücut Kitle İndeksi
WHO	: World Health Organization

VI. TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 1. WHO 94 Sınıflamasına Göre Farklı Endometriyal Hiperplazi Tiplerinde Doğal Seyir	10
Tablo 2. EİN Sınıflama Sisteminde Tanı Kategorileri ve Önerilen Tedavi Yaklaşımları	11
Tablo 3. EİN Sınıflamasında Kullanılan Subjektif Tanı Kriterleri	11
Tablo 4. Tip 1 Endometrium Kanseri için risk faktörleri	15
Tablo 5. Kronik Anovulasyon Nedenleri	20
Tablo 6. 2009 FIGO Endometrium Kanseri Cerrahi Evreleme	27
Tablo 7. Endometrium Kanseri miRNA Ekspresyon Değişimi	38
Tablo 8. cDNA için Bileşenler ve Miktarları	45
Tablo 9. qRT-PCR için Kullanılan Bileşenlerin Oranları	46
Tablo 10. qRT-PCR Tepkime Koşulları	46
Tablo 11. Olguların Tanı Dağılım Oranları	49
Tablo 12. Yaş Dağılımı Ortalama Değerleri ve Hasta Grupları Arası Dağılım Farkları	49
Tablo 13. Hasta Gruplarının Yaş Dağılımına göre miRNA Ekspresyon Düzeyleri	49
Tablo 14. miRNA 204-5p, miRNA 138-5p ve miRNA 133-3p Ekspresyon Düzeylerinin Gruplar Arası Dağılımı	50
Tablo 15. miRNA Düzeylerinin Gruplar Arası İstatistiksel Kıyaslanması	50
Tablo 16. miR-204-5p, miR-138-5p ve miR-133-3p Ekspresyon Düzeylerinin Ortalama Kat Değişimleri	53

VII. ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 1. WHO 94 ve EİN Sınıflama Sistemleri ile Elde Edilen Sonuçların Karşılaştırılması	13
Şekil 2. MikroRNA ilgili Çalışmalar ve Endometriyal Patolojilerle ilgili Dağılımı	30
Şekil 3. İnsan Genomunda Kodlayan ve Kodlamayan DNA Dağılımı	30
Şekil 4. MikroRNA Biyogenezi	33
Şekil 5. MikroRNA'nın Hedef Moleküller Üzerindeki Etkileri	34
Şekil 6. Tümör Süpresör ve Onkogen miRNAlar	35
Şekil 7. miRNA 204-5p'nin Ekspresyon Oranın Gruplar Arası Dağılımı	51
Şekil 8. miRNA 138-5p'nin Ekspresyon Oranın Gruplar Arası Dağılımı	52
Şekil 9. miRNA 133-3p'nin Ekspresyon Oranın Gruplar Arası Dağılımı	52

VIII. RESİM LİSTESİ

	Sayfa No
Resim 1. Normal Proliferatif Endometrium	5
Resim 2. Normal Sekretuar Endometrium	5
Resim 3. Basit Endometriyal Hiperplazi	6
Resim 4. Kompleks Endometriyal Hiperplazi	7
Resim 5. Kompleks Endometriyal Hiperplazi	7
Resim 6. Nükleer Atipi	



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Uterusun myometrium ve endometrium adı verilen iki ana komponenti vardır. Myometrium, sıkıca örülmüş düz kas demetlerinden oluşan uterin duvarı oluştururken uterin kaviteyi tek katlı kolumnar epitel hücrelerinden oluşan ve selüler yapıdaki stroma içine gömülü glandlardan oluşan endometrium tabakası örter. Endometrium, menstrüel siklus boyunca, overlerden salgılanan seks steroidlerine cevaben fizyolojik ve morfolojik değişimler geçiren dinamik bir tabakadır (1). Reprodüktif dönemdeki bir kadının uterin kavitesini döşeyen endometrium tabakası, bazal ve fonksiyonel olmak üzere iki katmandan oluşur. Fonksiyonel tabaka, menstrüel siklus boyunca büyük değişimler geçirirken bazal tabaka göreceli olarak değişmeden kalır (2).

Endometriyal Hiperplazi (EH), endometriyal glandların düzensiz boyut ve şekillerde çoğalması durumudur. Proliferatif endometrium ile kıyaslandığında, endometriyal glandların stromaya oranının artmış olduğu görülür. Hemen hemen her zaman progesteron tarafından dengelenmemiş kronik östrojen uyarısına bağlı geliştiği bilinmektedir (3). Anormal uterin kanamaya yol açabilen, östrojen üreten tümörlerle ilişkili olabilen, hormon tedavisine ikincil gelişebilen ve tip 1 endometrium adenokarsinomunun öncülü olup zamanla endometriyal kansere ilerleyebilen önemli bir patolojidir.

Dünya genelinde 2008 yılında 288.000 kadın endometrium kanseri tanısı almıştır (4). Gelişmiş ülkelerde senede yüz binde 12,9 insidans ve yüz binde 2,4 mortalite oranına sahip olmakla birlikte en sık görülen jinekolojik kanserdir. Gelişmekte olan ülkelereyse, yüz binde 5,9 insidans ve yüzbinde 1,7 mortalite oranları ile serviks kanserinden sonra görülen ikinci en sık jinekolojik kanserdir (5).

Tüm endometriyal kanserlerin %80-85' i EH'ler ile ilişkisi olan tip 1 adenokarsinomlardır. Henüz hiperplazi aşamasında iken kansere progrese olma potansiyelini ortaya koyabilecek biyobelirteçlerin araştırılması, oldukça yüksek oranda görülen tip 1 endometrium kanseri insidansını azaltabilir

Son 20 yılı aşkın süre içinde, kanser genetiği uzmanları, çok basamaklı bir süreç olan tümör gelişiminin başlangıcından ve ilerlemesinden sorumlu birçok geni açığa çıkarmışlardır. Araştırmaların çoğu, onkogenler, tümör baskılayıcı ve genom stabilize edici genler gibi geleneksel protein kodlayan genler üzerine odaklanmış olsa da geçmiş 15 yıl içinde protein kodlamayan Ribonükleik asit (RNA) ailesine ait MikroRNA (**miRNA veya miR**) adı verilen yeni bir sınıf tanımlanmış ve güncel kanıtlar ışığında miRNA'ların disregülasyonunun kanser gelişimiyle ilişkili olduğu öne sürülmüştür (6). miRNA, yaklaşık 22 nükleotitten oluşan protein kodlamayan, tamamlayıcı dizileriyle gen susturma amacıyla haberci RNA (messenger RNA, mRNA)'yı hedef alan küçük RNA molekülleridir. (7). İnsan vücudundaki bütün hücre tiplerinde endojen olarak eksprese edilen miRNA'lar, canlı dokular haricinde kan, tükürük ve idrar gibi vücut sıvılarında ve hatta arşivlenmiş formalin ile fikse parafine gömülü dokularda ekspresyonları güvenilir şekilde ölçülebilecek kadar sağlam moleküllerdir.

Endometrium Kanseri de miRNA'lar ile ilişkisi en çok araştırılan kanserlerden biridir. Endometriyal kanser hücrelerinde miR-185, miR-106a, miR-181a, miR-210, miR-423, miR-103, miR-107, miR-let7c, miR-205, miR-449, miR-429, miR-7, miR-27, miR-200b ve miR-34b'nin upregüle olarak saptanmış ve onkogenik etkilerinin olduğu kanıtlanmıştır. miR-let7e, miR-221, miR-193 miR-99b, miR-193b, miR-204 , miR-152 miR-30c miR-129-2, miR-203, miR-106b ve miR-let7a'nın ise downregüle oldukları ve dolayısıyla tümör baskılayıcı etkileri ortaya çıkarılmıştır (8,9).

Bu çalışmada, EH (atipili ve atipisiz) ve normal endometriuma ait formalin ile fikse parafine gömülü dokularda, tip 1 endometrium karsinomu karsinogenezinde FOXC1 genini baskılayarak hücrel proliferasyon ve invazyonu azalttığı gösterilen miRNA 204-5p; PDE7A genini baskılayarak endometriyal kanser hücrelerinin migratuar özellik kazanmasında etkili olduğu gösterilen miRNA 133-3p ve henüz endometriyal patolojiler ile ilişkisi ortaya konmamış ancak, FOXC1 gen ekspresyonunu baskılayarak tümör süpresyonu yaptığı gösterilen miRNA 138-5p'ye ait ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldı. Böylece, endometriyal hiperplazilerin kansere progresyonunu öngörme ve önleme konusundaki miRNA bazlı çalışmalara yol gösterici olmayı amaçladık(9).

2. GENEL BİLGİLER

2. 1 Endometriyal Hiperplaziler

2. 1. 1. Tanım

Endometriyal Hiperplazi (EH), endometriyal glandların düzensiz şekil ve boyutlarda fizyolojik olmayan proliferasyonudur. Normal proliferatif endometrium ile kıyaslandığında, stromaya göre endometriyal glandlarda artmış proliferasyon mevcuttur ve gland/stroma oranında artış vardır. Endometriyal Hiperplazi, hemen hemen her zaman progesteronun dengeleyici etkisi ile karşılanmamış kronik östrojen uyarısına bağlı gelişen bir patolojidir (10). Endometriyal Hiperplazi, önemli bir anormal uterin kanama nedeni olup en yaygın endometrium kanser tipi olan tip 1 endometrium kanserinin bilindik bir prekürsörüdür (11).

2. 1. 2. Histoloji ve Sınıflandırma

Endometriyal Hiperplazilerde, normal endometriumdakine kıyasla gland/stroma oranında artış olacak şekilde glandüler proliferasyon görülür. Prolifere olan glandların şekil ve büyüklükleri farklılık gösterir ve glandları oluşturan tek katlı kolumnar epitel hücrelerinde hücresel atipi görülebilir. Geçmişte, endometriumda gözlenen anormal proliferasyonu ifade etmek için birçok terim kullanılmıştır. Bu terimlerden bazıları adenomatöz hiperplazi, atipik hiperplazi ve karsinoma in situ'yu kapsamaktaydı . Bu lezyonların bazıları endometrium kanserinin öncül lezyonlarını temsil etmekteydi. Kullanılan birçok terimi tanımlayan kriterler net bir şekilde standardize edilmediği için, proliferatif endometriyal lezyonlar ve karsinom arasındaki ilişki her zaman açık değildi (10). Günümüzde endometriyal hiperplazileri sınıflandırmak için 2 sınıflandırma sistemi kullanılmaktadır.

2. 1. 2. 1. WHO 94 (Dünya Sağlık Örgütü) Sınıflaması

En yaygın kullanılan endometriyal hiperplazi sınıflandırmasıdır (12).

Kategoriler – WHO 94 sınıflaması iki özelliği temel alır.

- 1- Gland ve stromanın basit veya kompleks olarak tanımlanan mimari paterni
- 2- Hücre çekirdeğinde atipi varlığı ya da yokluğu (Nükleer Atipi)

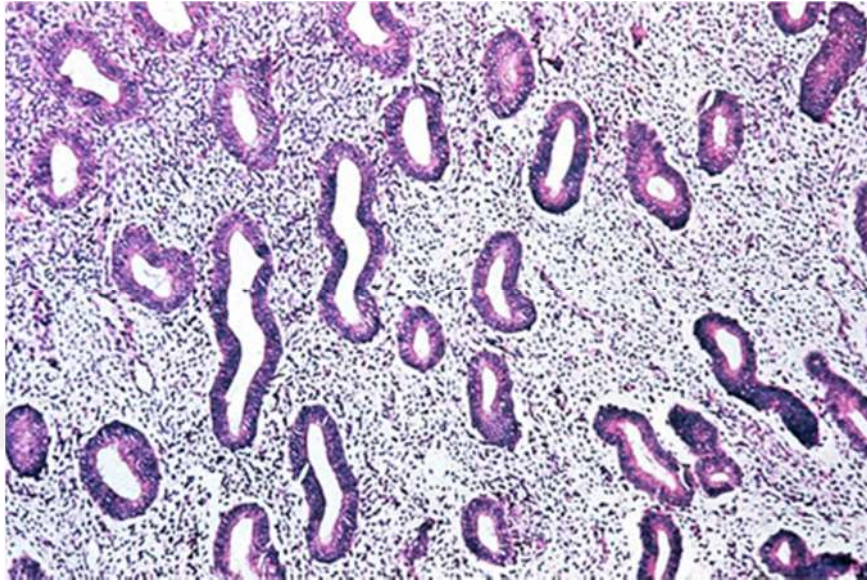
Bu özelliklere bağlı olarak endometriyal hiperplaziler 4 kategoride toplanabilir:

- Basit Atipisiz Hiperplazi
- Kompleks Atipisiz Hiperplazi
- Basit Atipili Hiperplazi
- Kompleks Atipili Hiperplazi

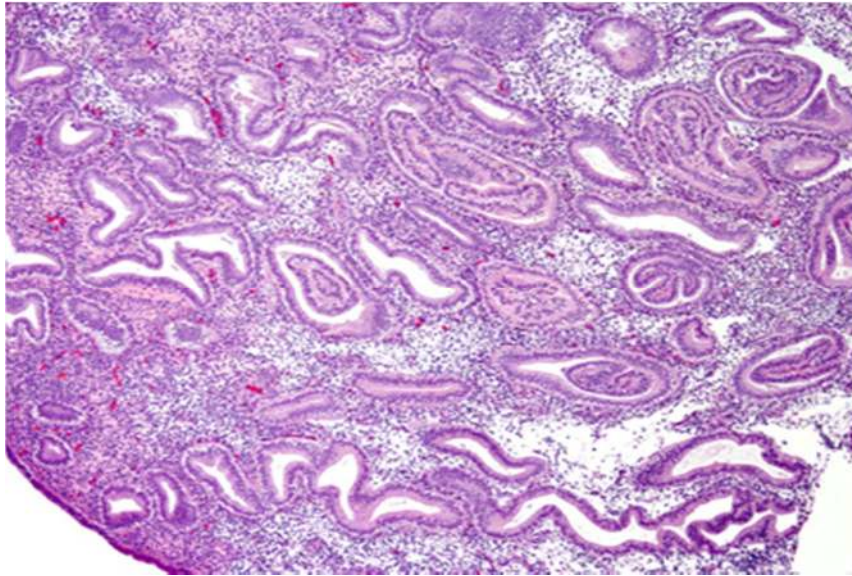
Basit atipili hiperplazi, nadir görüldüğü için birçok kaynakta basit ve kompleks atipili hiperplaziden tek başına atipili hiperplazi olarak bahsedilmektedir.

Genel olarak bakıldığında, WHO 94 sınıflamasının endometrium kanserine progresyon riskiyle daha iyi korele olduğu görülmektedir. Ancak, bu sisteme ait en önemli dezavantaj, aynı patoloji preparatlarını değerlendiren patologlar arasındaki gözlemler arası değişkenliktir (interobserver variability)(13-16). Malignansi potansiyelini gösteren en önemli belirteç olan nükleer atipi en yüksek gözlemler arası uyumsuzluk oranına sahiptir. Örneğin, 100'ün üzerinde endometriyal biyopsi preparatının incelendiği 2 çalışmada nükleer atipi değerlendirmesi için patologlar arası uyum oranları %38 ile %47 olarak bulunmuştur (13,14). 2006 yılında yapılan bir Gynecologic Oncology Group (GOG) çalışmasında atipili endometriyal hiperplazi anısı konan 306 kişinin endometriyal biyopsi materyalleri tanının tekrarlanabilirliğini ve patologlar arasındaki uyumu değerlendirmek amacıyla tekrar incelenmiştir. Burada tanı konmuş materyaller 3 patoloğ tarafından tekrar değerlendirildiğinde en az 2 patoloğun aynı sonuçta hemfikir olduğu durum, çoğunluk tanısı (majority diagnosis) şeklinde kabul edilmiştir. Buna göre olguların sadece %40'ının tanısında her 3 patoloğun hemfikir olduğu görülmüştür. Çoğunluk tanısı %29 hastada adenokarsinom iken %7 hastada normal, %18 hastada ise atipisiz endometriyal hiperplazi şeklinde rapor edilmiştir. Dolayısıyla atipili endometriyal hiperplazi tanısının tekrarlanabilirliğinin ve farklı patologların koyduğu tanıları arasındaki uyumun çok düşük olduğu ortaya konmuştur (13).

Normal Endometrium – Menstrüel siklus boyunca endometrium foliküler fazda proliferatif vasıfta; luteal fazda ise sekretuvar vasıfta izlenmektedir. Normal proliferatif endometrium, stroma içinde yığınlaşma göstermez ve gland/stroma oranı %50'nin altındadır. Normal sekretuvar endometriumda gland/stroma oranı %50'nin üzerinde olabilmektedir. Sekretuvar glandlar yığınlaşma göstermelerine rağmen organize şekilde dizilim gözlenmektedir ve glandları oluşturan hücrelerde mitotik aktivite görülmemektedir. Normal proliferatif ve sekretuvar endometrium Resim 1 ve 2'de gösterilmiştir.

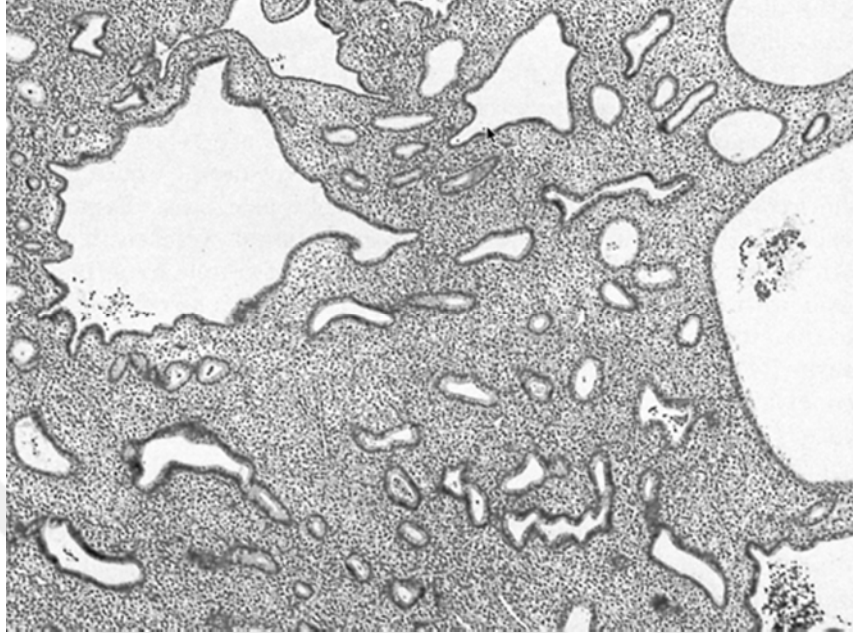


Resim 1. Normal Proliferatif Endometrium (Courtesy of Russell S Vang, MD.)



Resim 2. Normal Sekretuvar Endometrium (Courtesy of Russell S Vang, MD.)

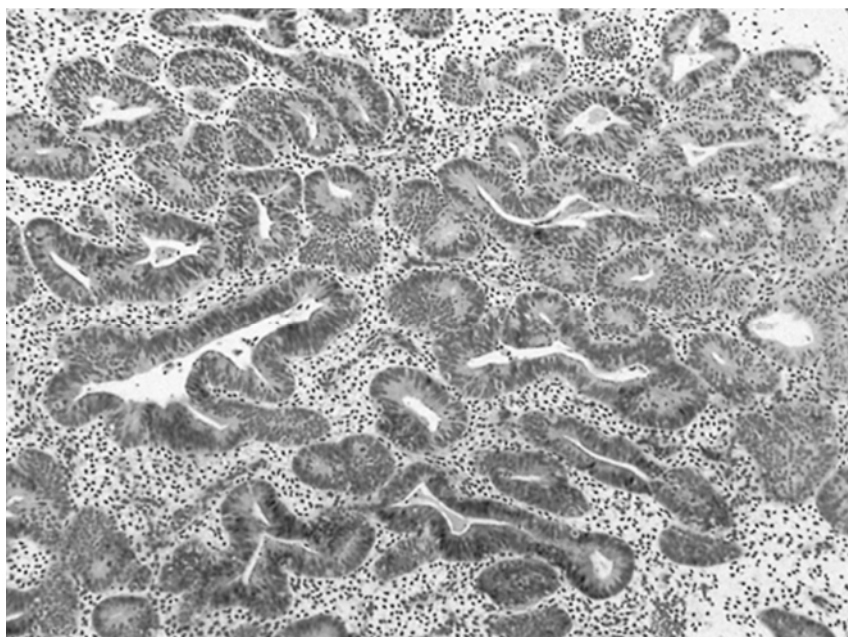
Basit Hiperplazi – Glandlarda kistik dilatasyon ve hafif bir yığılma görülmektedir. Glandüler hücrelerde mitoz olabilir. (Resim 3)



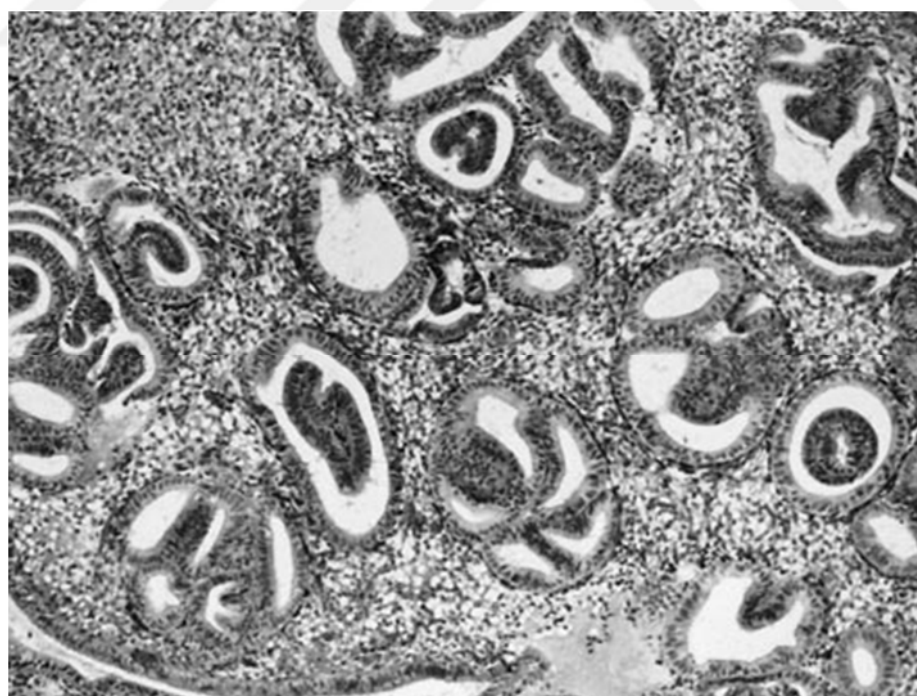
Resim 3. Basit Endometriyal Hiperplazi (Reproduced with permission from: Silverberg SG, Kurman,RJ. Tumors of the Uterine Corpus and Gestational Trophoblastic Disease. AFIP Atlas of Tumor Pathology, version 2.0, American Registry of Pathology, Washington DC 1995.)

Kompleks Hiperplazi – Glandlar organize olmayan sıkışık yığınlar halinde görülmektedir. Glandlarda içiçe geçme, teleskopik artefaktlar izlenebilmektedir. Gland/stroma oranı %50'nin üzerinde olup tipik olarak mitozlar mevcuttur. (Resim 4-5)

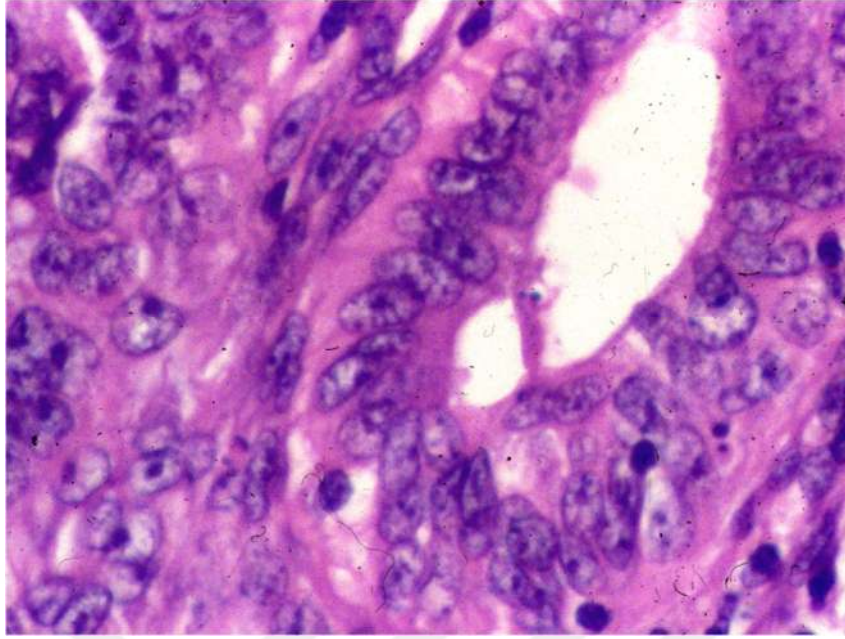
Nükleer Atipi – Karakteristik olarak, nükleus orantısız şekilde hücre için büyümüştür. Normal aralığı 1:4 ile 1:6 arasında olması yaygın görülürken nükleus/sitoplazma oranı 1:1'e yaklaşmıştır. Nükleuslar şekil olarak birbirinden farklı ve konturları düzensizdir. Kromatin içeriği çekirdek zarı boyunca kaba kümeler oluşturmuştur. Normal nükleusa göre daha koyu boyanır (Hiperkromatik). Nükleolus, normalden büyük olabilir (11).Hücrelerde belirgin polarite kaybı ve sıralanma artışı söz konusudur (Resim 6).



Resim 4.Kompleks Endometriyal Hiperplazi (Reproduced with permission from: Silverberg SG, Kurman RJ. Tumors of the Uterine Corpus and Gestational Trophoblastic Disease. AFIP Atlas of Tumor Pathology, version 2.0, American Registry of Pathology, Washington DC 1995.)



Resim 5. Kompleks Endometriyal Hiperplazi, Teleskopik Artefakt



Resim 6 – Nükleer Atipi

Atipik endometriyal hiperplazi genellikle nadiren basit yapılanma göstermekle birlikte genellikle kompleks kategoridedir.

WHO 94 sınıflamasına göre kompleks atipili hiperplazi kriterleri, non-invaziv olduğu açıkça görülen karsinom ile invaziv karsinoma yakın lezyonları da kapsadığından bu durum da bir dezavantaj olarak görülmektedir. Kompleks atipili hiperplaziyi Grade 1 endometrium kanserinden ayıran temel nokta glandlar arasında stroma kalıntısının varlığıdır. Ancak, patologlar arasında bu ayırım açısından uyumsuzluk mevcuttur. Örneğin, 289 adet kompleks atipili hiperplazi tanısı alan spesimeni kapsayan bir GOG çalışmasında, WHO kriterlerini kullanan patologlar tarafından yeniden gözden geçirildiğinde spesimelerin %25'i daha düşük dereceli bir lezyon tanısı alırken %29'u endometriyal karsinom tanısına dönmüştür (17).

Basit Atipili hiperplazide ise normal miktarda stroma ile ayrılmış hücreleri nükleer atipi gösteren glandlar görülmektedir.

Karsinom Riski – WHO 94 sınıflandırmasına göre endometriyal hiperplazi olan kadınlarda karsinom gelişme riskini gösteren en önemli belirteç nükleer atipi varlığıdır.

Endometriyal Hiperplazinin doğal seyri konusunda yüksek kalitede veri yetersizliği mevcuttur. Hiperplazilerin karsinoma dönüşme eğilimine yönelik yapılmış en iyi çalışma, endometriyal örnekleme alındıktan ortalama 13 yıl (1 ile 27 yıl arasında) içinde histerektomi yapılan 170 kadın hastayı kapsamaktadır (Tablo 1)(18). Ancak, bu

hastaların birçoğu ilk örnekleme ile histerektomi arasında çeşitli müdahaleler gördüğünden bu durum, çalışmanın güvenilirliğine kısıtlama getirmiştir. Sonucuna göre atipili hiperplazi olan kadınların histerektomisinde atipisiz hiperplazili kadınlarınkinden 10 kattan fazla endometriyal karsinom saptanmıştır (%23'e karşılık %1.6). Her bir histolojik tipin kanser insidansları aşağıdaki gibi saptanmıştır:

- Basit Atipisiz Hiperplazi – 93 hastadan 1'i (%1)
- Kompleks Atipisiz Hiperplazi – 29 hastadan 1'i (%3)
- Basit Atipili Hiperplazi – 13 hastadan 1'i (%8)
- Kompleks Atipili Hiperplazi – 35 hastadan 10'u (%29)

Endometriyal hiperplazi tanısı aldıktan sonraki 19 yıl içinde endometriyal karsinom gelişimini araştıran bir olgu – kontrol çalışmasında da atipili hiperplazisi olan olgularda kümülatif endometriyal kanser riskinin atipisiz olgulardan daha yüksek olduğu bulunmuştur (%28'e karşılık %5). Endometriyal hiperplazi tanısı aldıktan sonra karsinoma ilerleme süreci tam olarak aydınlatılamasa da bu çalışmada bütün hiperplazi çeşitleri için kanser tanısı alma için geçen ortalama sürenin 6 yıl olduğu belirtilmiştir (19).

Atipili hiperplazi olan kadınların birçoğunda eş zamanlı endometriyal karsinom mevcuttur (17). 2572 hastayı kapsayan bir derlemede endometriyal örneklemede atipili endometriyal hiperplazi tanısı almış kadınların %37'sinin müteakiben yapılan endometriyal örnekleme veya histerektomisinde endometriyal kanser olduğu rapor edilmiştir (20). Daha önce de sonuçlarından bahsedilen GOG çalışmasında atipili hiperplazi saptanan hastalar 12 hafta içinde histerektomi yapıldığında %43 civarında endometriyal kanser saptandığı rapor edilmiştir (17). Değişik çalışmalar atipili endometriyal hiperplazi tanısı konan hastalarda eşlik eden invazif kanser sıklığının %17 – 52 olduğunu göstermektedir (21). Bu nedenle, endometriyal biyopsi sonucu atipili hiperplazi olan hastalarda daha ileri incelemeye ihtiyaç duyulmaktadır.

Bunlara ek olarak WHO 94 sınıflama sistemi ile ulaşılan tanımlar spesifik bir tedavi yaklaşımını işaret etmemektedir, yani klinisyeni yönlendirmemektedir.

Önemli dezavantajlarından ötürü WHO 94 sınıflama sistemine alternatif olabilecek ve bu dezavantajları ortadan kaldırabilecek yeni bir sınıflama sistemi arayışı ortaya çıkmıştır. Sonuç olarak 2000'li yılların başlarında Endometriyal İntraepitelyal Neoplazi (EİN) sınıflama sistemi tarif edilmiştir (22).

Tablo 1. WHO 94 Sınıflamasına Göre Farklı Endometriyal Hiperplazi Tiplerinde Doğal Seyir

Hiperplazi Tipi	Regresyon (%)	Persistans (%)	Kansere Progresyon (%)
Basit Atipisiz	80	19	1
Kompleks Atipisiz	80	17	3
Basit Atipili	69	23	8
Kompleks Atipili	57	14	29

2. 1. 2. 2. Endometriyal İntraepitelyal Neoplazi (EİN) Sistemi

EİN sistemi esasen WHO 94'e göre endometriumun gerçek prekürsör lezyonlarının daha doğru saptanabilmesi ve hiperplazisi olan hastaların tedavisinin daha iyi yönlendirilebilmesi için geliştirilmiş bir sınıflamadır. Benign, premalign ve malign lezyonları belirlemek için histomorfolojik, genetik ve klinik bilgiler toplanarak oluşturulan daha objektif patolojik kriterleri içerir (8,10). Bu sınıflandırma henüz yaygın olarak kabul görmemiş olsa da hastanemiz de dahil olmak üzere bazı merkezler tarafından kullanılmaktadır.

Bu sınıflandırma sisteminde endometriyal patolojiler değişik klinik yaklaşımlar gerektirecek üç ana gruba ayrılmıştır: endometriyal hiperplazi veya benign endometriyal hiperplazi, EİN ve karsinom (Tablo 2) (23)

EİN sınıflama sistemine göre benign endometriyal hiperplazide tipik olarak anovulasyon veya başka nedenlerle ortaya çıkan karşılanmamış östrojen maruziyetinden kaynaklanan benign yapısal değişiklikler vardır. Endometriyal hiperplazilerde glandlarda birkaç adet kistik genişlemenin olduğu persistan proliferatif endometriumdan çoğu genişlemiş kıvrımlı glandların olduğu kistik glandüler hiperplaziye kadar değişen morfolojik farklılıklar vardır. Bu lezyon poliklonaldır ve hormon bağımlıdır. Bu nedenle de hormonal tedavi önerilir.

EİN ise gerçek endometriyal prekanseröz lezyondur. EİN'in objektif tanısı için moleküler testler kullanılarak monoklonalite ve PTEN mutasyonu ortaya konmalı, stromal hacmi ölçmek kompüterize morfometrik analiz yapılarak hesaplanan D skorunun da 1'in altında olduğu gösterilmelidir (23-28). D skor metodu ile spesimenler

Tablo 2. EİN Sınıflama Sisteminde Tanı Kategorileri ve Önerilen Tedavi Yaklaşımları

Tanı	Topografi	Fonksiyonel Kategori	Tedavi
Endometriyal Hiperplazi	Fokal	Östrojen Etkisi	Hormonal
EİN	Fokal başlar, diffüze ilerler	Prekanser	Hormonal veya Cerrahi
Karsinom	Fokal başlar, diffüze ilerler	Kanser	Cerrahi

benign ($D>1$), arada ($0<D<1$) veya EİN ($D<0$) olarak sınıflandırılır. Fakat, bu testler günlük rutinde kullanım için uygun olmayan testlerdir. Bu nedenle EİN tanısında konvansiyonel ışık mikroskopu ve hematoksilen-eozinle boyalı preparatlar kullanılarak ulaşılabilecek subjektif tanı kriterleri oluşturulmuştur. Subjektif EİN tanısı için Tablo 3’de belirtilen 5 kriterin tamamının mevcut olması gereklidir (29).

Tablo 3. EİN Sınıflamasında Kullanılan Subjektif Tanı Kriterleri

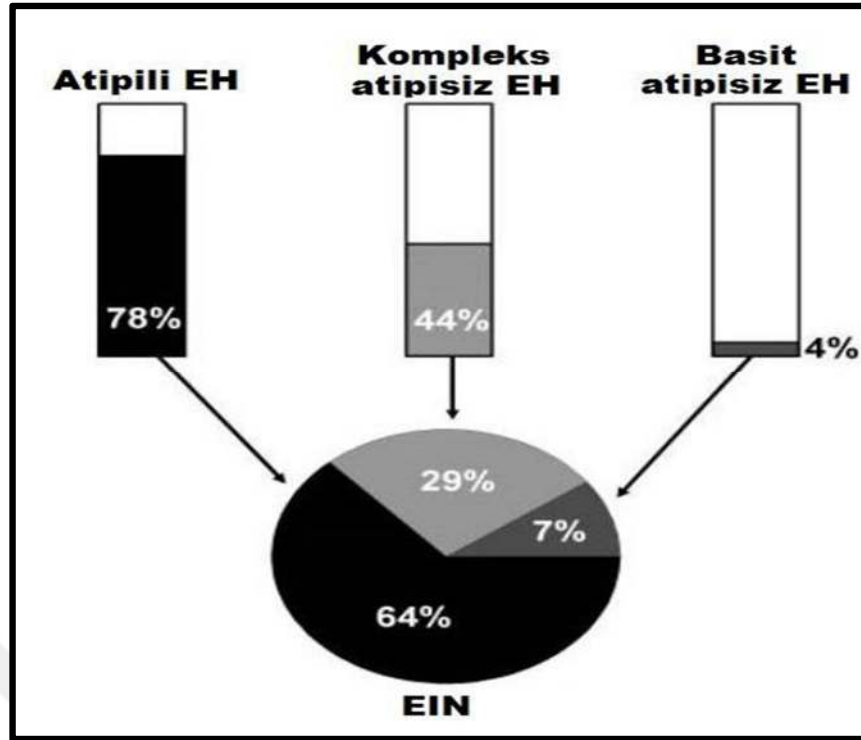
KRİTER	YORUM
Yapı	Gland/Stroma Alanı
Sitoloji	Geri kalan endometrium ile sitolojik farklılık
Boyut	Maksimal lineer çap >1 mm
Taklit eden lezyolar ekarte edilir	Proliferatif endometrium, sekretuar endometrium, polipler ve onarım süreci
Kanser ekarte edilir	Solid alanlar, belirgin kribriform büyüme

Bu kriterler kullanılarak elde edilen EİN tanısının objektif EİN tanısı ile uyumunun yüksek olduğu saptanmıştır (30). Fakat subjektif EİN tanısı koyma aşamasında hem jinekologun, hem de patoloğun dikkat etmesi gereken bazı önemli hususlar mevcuttur. Öncelikle endometriyal intraepitelyal neoplazi lezyonları monoklonal olduğu ve fokal olarak geliştiği için normal bir endometriyal biyopsi veya küretaj spesmeninin sadece bir kısmında saptanabilir. Hastaların sadece %20 kadarlık bir grubunda ilk tanı sırasında lezyonların tüm endometriyal alanı kapladığı görülür. Biyopsi örnekleri çok küçük veya ileri derecede fragmente olursa tanı için gerekli olan fokal değişiklikler her zaman göze

çarpımayabilir. Bu nedenle tanı için patoloğ öncelikle spesimeni küçük büyütmede incelemeli ve tanı için yoğunlaşması gereken alanı seçmelidir. Bir başka önemli husus ise progesteron tedavisi verilen hastalardan alınan biyopsi örneklerinin incelenmesidir. Bu durumda stromal psödosedüalizasyon oluşacak, stromal komponentin miktarının artması sonucunda glandlar birbirinden uzaklaşacaktır. Bu değişiklikler tanı kriterleri arasında yer alan gland dansitesi ve lezyon boyutu gibi önemli özellikleri etkileyeceği için tanısal güçlükler neden olabilmektedir. Bu nedenle jinekolog tarafından patoloji istek kağıdında hastanın bu tür bir tedavi aldığından ve tedavinin detaylarından bahsedilmelidir. Daha uygun olan yaklaşım ise özellikle hormonal tedaviden kaynaklanan tanısal problem söz konusu ise çekilme kanamasından 2-4 hafta sonra tekrar biyopsi yapılmasıdır (29).

EİN sistemindeki tanı sınıfları birebir olarak WHO 94 tanı sınıfları ile örtüşmez. Örneğin eski sınıflamada kompleks atipili endometriyal hiperplazi tanısı alanların tümü yeni sınıflamada EİN tanısı almaz. Tersine eski sınıflamada basit veya kompleks atipisiz endometriyal hiperplazi saptanan hastaların preparatları yeni sınıflama sistemi kriterleri kullanılarak tekrar incelendiğinde belli oranda EİN tanısı konabilmektedir. Yine de iki sınıflama sisteminin belli oranda kesiştikleri alanlar da mevcuttur, buna göre EİN tanılarının %64'ünü WHO 94 kriterlerine göre kompleks atipili endometriyal hiperplazi tanısı alan hastalar oluşturmaktadır ve atipili hiperplazi saptanan hastaların önemli bir kısmında histopatolojik bulgular EİN varlığı ile uyumludur (Şekil 1) (30).

Kullanımı hem dünya genelinde, hem de ülkemizde henüz yaygın kabul görmemesine rağmen EİN tanısının ileride endometrium kanseri gelişimi riski ile önemli oranda korele olduğu saptanmıştır (22, 30). EİN tanısı alan hastaların %41'inde 1 yıl içinde endometrium adenokarsinomu saptanırken 1 yıl içinde kanser saptanmayan hastalarda ise zaman içinde kanser gelişimi açısından artmış risk söz konusudur (31). Endometriyal biyopsi örneklerinde kompüterize morfometrik analiz kullanılarak hesaplanan D-skoru 1 veya altında saptanan hastalarda D-skoru 1'in üzerinde olanlarla karşılaştırıldığında endometrium kanseri gelişme riski 45 kat artmıştır (32 -35).



Şekil 1. WHO 94 ve EİN Sınıflama Sistemleri ile Elde Edilen Sonuçların Karşılaştırılması

D-skoru ile WHO 94 sınıflamasının karşılaştırıldığı ve tanı sonrası hastaların en az 10 yıl izlendiği bir çalışmada D-skorunun kansere progresyonu belirleme açısından sensitivite, spesifite, negatif ve pozitif prediktif değerlerinin sırasıyla %100, %78, %100 ve %58 olduğu, bunların WHO 94 sınıflama sistemi kullanıldığında ise %89, %60, %94 ve %44 olduğu gösterilmiştir. Buna göre kompüterize morfolometrik analiz kullanıldığında hastalardan endometrium kanserine progresyon açısından risk altında olanlar daha doğru bir şekilde saptanabilmektedir (35).

Endometrium kanseri geliştiren hastalarda öncü lezyonun EİN olma ihtimali de atipili hiperplazi olma ihtimalinden daha fazladır. Hiperplazi tanısı olup izlem sırasında endometrium kanseri geliştiren 67 hastanın değerlendirildiği bir çalışmada alınmış olan biyopsilerin %97'sinde EİN olduğu görülürken sadece %78'inde atipili endometriyal endometriyal hiperplazi mevcudiyeti saptanmıştır (36). Ayrıca EİN saptanan hastaların ortalama yaşları 52 iken endometrioid tip endometrium adenokarsinomlu hastalarının ortalama yaşları ise 60'tır. Bu saptama da EİN'in iyi diferansiye endometrioid tip endometrium adenokarsinomunun öncüsü olduğunu destekleyen bir saptamadır. Nitekim EİN tanısı konup uzun süre izlenen hastaların değerlendirildiği bir başka

çalışmada endometriumda adenokarsinom saptanana kadar geçen sürenin ortalama 4 yıl olduğu görülmüştür (25, 36).

Endometriyal biyopside EİN saptanan hastalarda belki de en önemli sorun tanı anında da hastada iyi diferansiye bir endometrium kanseri bulunma riskidir. Değişik yayınlara göre bu oran %40'a kadar yükselebilmektedir (37, 38). Bu konuda bölümümüzde yapılan bir çalışmada WHO 94 sınıflamasına göre endometriyal hiperplazi tanısı alıp 2 hafta içinde cerrahi tedavi (histerektomi) uygulanmış hastaların biyopsi ve histerektomi spesmenleri EİN sistemine göre tekrar incelenmiştir. Biyopsi tanısı kompleks atipili hiperplazi olanların %94,1'inde ve kompleks atipisiz hiperplazi olanların %41,7'sinde EİN saptanırken basit atipili hiperplazi saptananların hiçbirinde EİN saptanmamıştır. Hastaların %18,4'ünde eşzamanlı endometrium kanseri olduğu saptanmıştır. Kanser saptanan hastaların tümünde biyopsi spesmenlerinde EİN olduğu görülmüştür. Biyopside EİN olan hastaların histerektomi spesmenlerinde endometrium kanseri saptanma oranı %24,3 iken EİN olmayanların hiçbirinde kanser görülmemiştir. Bu çalışmadan elde edilen bulgular, biyopsi örneklerinde EİN tanısının eşzamanlı endometrium kanserinin varlığını belirleme açısından %100'lük sensitivite ve %100'lük negatif prediktif değere sahip olduğu anlamına gelmektedir (39).

EİN sisteminin bir diğer önemli avantajı da WHO 94 sınıflama sisteminde saptanan büyük boyuttaki tanı uyumsuzluklarını ortadan kaldırmış gibi görünmesidir. Preparatların EİN var veya yok şeklinde değerlendirildiği bir çalışmada farklı patoloğlar arasında bu açıdan %75 uyum olduğu saptanmıştır. Bu tanının aynı patolog tarafından tekrarlanabilirliğinin ise yaklaşık %93 olduğu görülmüştür (30).

2. 1. 3. Endometriyal Hiperplazilerin Epidemiyolojisi

Endometriyal hiperplaziler anormal uterin kanaması olan kadınlarda %1.5-15 oranında, tüm histerektomilerde ise %5'e varan oranlarda saptanmaktadır. Tanı anında hastalar en sık 50-54 yaş arasındadır. Atipili hiperplaziler atipisizlere göre daha geç yaşta tanı alır (14,15). EİN ise tüm endometriyal biyopsilerin %1.4 kadarında saptanır. Hastalar tanı anında ortalama 53 yaşındadır ve EİN tanısı endometrium kanseri tanısından ortalama 4 yıl önce konmaktadır (36, 37, 40)

2. 1. 4. Endometriyal Hiperplazilerin Gelişiminde Etkili Risk Faktörleri

Endometriyal hiperplaziler ve EİN endojen veya eksojen östrojenik stimülasyona verilen proliferatif bir cevap olarak ortaya çıkmaktadır. Bu anlamda, risk faktörleri tip 1 (östrojen bağımlı) endometrium kanseri gelişiminde rol oynayan faktörlere benzerdir. Buna göre en önemli risk faktörleri progesteronsuz postmenopozal östrojen tedavisi, tamoksifen kullanımı, nulliparite, Polikistik Over Sendromu (PCOS) gibi kronik anovulasyona neden olan klinik durumlar, obezite ve granuloza hücreli tümörler ve tekomalar gibi östrojen salgılayan tümörlerdir (Tablo 4) (31, 41)

Tablo 4. Tip 1 Endometrium Kanserine için risk faktörleri

RİSK FAKTÖRÜ	RÖLATİF RİSK
İleri Yaş	50 – 70 yaşlar arasında %1.4
Karşılanmamış (Progesteronsuz) Östrojen Tedavisi	2- 10
Tamoksifen Tedavisi	2
Erken Menarş	Mevcut Değil
Geç Menopoz (>55 yaş)	2
Nulliparite	2
PCOS (Kronik anovulasyon)	3
Obezite	2- 4
Östrojen salgılayan tümörler	Mevcut Değil
Lynch Sendromu	Yaşam boyu risk %22- 71
Cowden Sendromu	Yaşam boyu risk %13- 19
Endometrium, Over, Meme veya Kolon kanseri için aile öyküsü	Mevcut Değil

2. 1. 5. Endometriyal Hiperplazilerde Semptomlar ve Tanı

Endometriyal hiperplazi ve EİN büyük oranda semptomatik klinik patolojilerdir. Hasta premenopozal dönemde ise menoraji ve/veya metroraji, postmenopozal dönemde ise postmenopozal kanama şeklinde semptom oluştururlar.

Bu tür semptomlar varlığında endometriyal patoloji var olup olmadığını kesin olarak değerlendirmek için endometriyal örnekleme yapılmalıdır. Fakat değerlendirme aşamasında öykü, fizik muayene ve transvajinal ultrasonografi (USG) de önemlidir, bunlar hem risk faktörlerini ortaya koymada, hem de olası diğer anormal uterin kanama nedenlerini belirlemede yardımcı olur. Muayene kanamanın uterus kökenli olduğunu teyit etmede ve genital sistemin vulva, vajen gibi diğer kısımlarından veya üriner sistem veya gastrointestinal sistem gibi non-jinekolojik bölgelerden olmadığını saptamada son derece önemlidir. Bunun dışında özellikle postmenopozal dönemde olup obezite veya hormon tedavisi gibi bilinen bir östrojen kaynağı olmayan hastalarda östrojen salgılayan tümör olasılığı akılda tutulmalı ve bu yönden hasta araştırılmalıdır.

2. 1. 6. Endometriyal Hiperplazilerde Tedavi Seçenekleri

Gerek endometriyal hiperplaziler, gerekse endometriyal intraepitelyal neoplaziler semptomatik oldukları için, tedavi edilmedikleri takdirde kansere ilerleme riski taşıdıkları için ve de belli oranda kanserle birlikte görülebilmek riskleri bulunduğu için tedavi edilmeleri gereken klinik durumlardır.

Endometriyal hiperplazi saptanan bir hastada tedavi kararını belirleyen en önemli faktörler lezyonun atipili veya atipisiz olması ve hastanın fertilitate arzusunun var olup olmamasıdır. Hastanın yaşı, menopozal durumu ve cerrahi açıdan risk oluşturabilecek dahili sorunları tedavi seçiminde etkili olabilecek daha az önemli faktörlerdir.

Atipisiz endometriyal hiperplazi varlığında kansere ilerleme riski ve eş zamanlı kanser ihtimali düşük olduğu için tedavide esas amaç semptomların kontrolü olmalıdır ve bu amaçla en sık önerilenler bekleyici yaklaşım ve medikal tedavidir.

Bekleyici yaklaşım özellikle hastada progesteron tedavisi kontrendike ise veya progesteronla yan etki oluşmuşsa önerilir. Burada normal endometrium histolojisi elde edilene kadar, 3-6 ay aralıklarla endometriyal küretaj yapılır. Bu yaklaşımla %70 hastada regresyon elde edilir. Eğer lezyon persistans gösterir veya progresyon saptanırsa tedavi önerilir (42).

Medikal tedavide en sık kullanılan ajanlar progestinlerdir. Ama aromataz inhibitörleri, selektif östrojen reseptör modülatörleri, gonadotropin serbestleştirici hormon agonistleri ve danazol da kullanılabilen diğer ajanlardır. Ayrıca anovulasyonu

olan hastalarda ovulasyon indüksiyonu veya kombine oral kontraseptifler de kullanılabilir (34). Progestinlerin temel etki mekanizması östrojenin mitojenik etkilerini antagonize etmeleridir. Bunu östrojen reseptörlerini azaltarak ve hidroksilaz enzimini aktive edip estradiolü daha az aktif estrona dönüştürerek yaparlar. Diğer etki mekanizmaları apoptozun indüksiyonu, stromal desidüalizasyon ve endometriyal atrofidir. Fakat progestin tedavisi ile ilgili olarak doz, tedavi süresi, tercih edilecek progestinin türü ve kullanım yolu ile ilgili halen net ortaya konmuş standartlar yoktur (43, 44). En sık tercih edilen ve bu nedenle de klinik tecrübenin en fazla olduğu progestin medroksiprogesteron asetattır. Genellikle oral yolla 5-10 mg verilir, sıklık (ayda 12-14 gün) veya devamlı şekilde kullanılır. 3-6 ay kullanım ve regresyon olana kadar 3-6 ay aralıklarla kontrol endometriyal örnekleme önerilir. Bu tedavi ile %80-90 hastada regresyon sağlanır. Ama zaman içinde %10 hastada rekürrens riski vardır. 3 veya 6 ay kullanm sonrası regresyon yok veya progresyon varsa ya medroksiprogesteron asetat dozu artırılıp medikal tedaviye devam edilir ya da cerrahi yaklaşım tercih edilir (44).

Atipili endometriyal hiperplazide eşzamanlı kanser varlığı ve tedavisiz kansere ilerleme riski daha fazla olduğu için tedavide semptom kontrolü dışında kanserin ekartasyonu ve kansere progresyonun önlenmesi de amaçlanmalıdır. Bu hastalarda fertilité arzusu yoksa veya hasta postmenopozal ise cerrahi tedavi önerilmelidir. Fertilité arzusu olanlarda ise medikal tedavi uygulanabilir, ama genellikle daha yüksek dozda progestin kullanımı önerilir ve burada en sık kullanılan progestin megestrol asetattır. Medikal tedavi başlanan hastalarda 3 ay sonra kontrol örnekleme yapılmalıdır, persistans varsa doz daha da arttırılmalıdır. Atipili hiperplazide medikal tedavide regresyon oranları daha düşük olup %60-85 arasında değişir. %40 hastada persistans, %25 hastada ise rekürrens riski söz konusudur. Aynı zamanda tedaviye rağmen kansere progresyon riskinin olduğu akılda tutulmalıdır (44-46). Medikal tedavide median regresyon zamanı 6-9 aydır. Regresyon sonrası çocuk isteği varsa gebelik teşebbüsü önerilir, çocuk isteği yoksa rekürrensi önlemek idame progestin tedavisi ve bu idame süresince 6-12 ay aralıklarla endometriyal örnekleme yapılması önerilir (47-49).

Atipili endometriyal hiperplazide cerrahi tedavi tercih edilmişse total ekstrasfasyal histerektomi yapılmalıdır. Eşzamanlı endometrium kanseri olabileceği ve bunun serviksi tutma riski nedeniyle subtotal histerektomi yapılması önerilmemektedir. Bu

hastalarda mevcut olabilecek ortalama 1/3 oranındaki eş zamanlı endometrium kanserinden ötürü mümkünse intraoperatif frozen inceleme de yapılmalıdır (50). Cerrahi yaklaşım sırasında bilateral salpingo-ooforektomi (BSO) yapılması ise tartışmalıdır. Hasta premenopozal ve frozen incelemede endometrium kanseri mevcut değilse tüp ve overler korunabilir. Ama hasta postmenopozal dönemde ise histerektomiye BSO eklenmelidir. Frozen inceleme eş zamanlı endometrium kanseri varlığını göstermişse de %5 civarında over metastazı riski ve özellikle genç hastalarda %15'lere varan senkron over-endometrium kanseri olasılığı düşünülerek BSO yapılmalıdır (17, 51, 52).

Hastanın tanısı için EİN sınıflama sistemi kullanılmış ve benign endometriyal hiperplazisi tanısına ulaşılmış ise amaç semptomları düzeltmektir ve hormonal tedavi uygun yaklaşımdır. Ama EİN tanısı söz konusu ise fertilite arzusu olanlarda hormonal tedavi düşünülebilir. Hormonal tedavi başarısız ise veya fertilite arzusu yoksa frozen inceleme ile birlikte histerektomi planlanmalıdır. EİN'deki progesteron tedavisinde de optimal rejim net değildir. Cevap oranları ise %75-80 civarındadır. Hormonal tedavi sırasında 3 ayda bir kontrol biyopsiler alınmalıdır. Hormonal tedavi oldukça etkin görünmektedir ve bu tedavi persistan EİN riskini %90, kansere progresyon riskini ise %75 oranında azaltır (37).

2. 2. Endometrium Kanseri

2. 2. 1.Endometrium Kanseri Epidemiyoloji

Endometrium kanseri gelişmiş ülkelerde en sık, gelişmekte olan ülkelerde ise serviks kanserinden sonra ikinci en sık görülen jinekolojik kanserdir (53). Yılda 168.000 yeni tanı konmakta, 35.000 kadın ise her yıl bu hastalık nedeniyle hayatını kaybetmektedir. Ülkemizde de en sık görülen jinekolojik kanser endometrium kanseridir ve yılda 3800 civarında kadına endometrium kanseri tanısı konmakta, her yıl 950 kadar kadın ise bu hastalıktan kaybedilmektedir. Kadınların yaşam boyu bu kansere yakalanma riski %2 - 2.5 civarında olup ortalama tanı yaşı 61'dir (54).

2. 2. 2. Endometrium Kanserinin Histopatolojik Tipleri

Endometrium kanseri histopatolojik olarak iki gruba ayrılır (55, 56). Tip 1 kanserler endometrioid tip tümörleri içerir. Endometrium kanserlerinin %80-85'ini bu grup oluşturur. Tipik olarak tanı anında erken evre olma eğilimindedirler ve bundan ötürü de iyi prognozludurlar. Bu tip kanserler daha önce de belirtildiği gibi genellikle östrojen etkisiyle ortaya çıkan endometriyal hiperplazi veya endometriyal intraepitelyal neoplazi gibi öncü bir lezyon zemininde gelişirler.

Tip 2 kanserler ise endometrium kanserinin %15-20'sini oluşturur. Bu grubun tipik üyeleri uterin seröz papiller kanserler ve şeffaf hücreli endometrium adenokanserlerdir. Genellikle yüksek dereceli olan bu tip kanserler tanı anında ileri evre olmaya meyillidir ve oldukça kötü seyirli dirler. Östrojen uyarısı bu kanserlerin etyopatogene zlerinde yer almazlar ve bu nedenle prekürsör lezyonları yoktur.

2. 2. 3. Endometrium Kanseri için Risk Faktörleri

Tip 1 endometrium kanseri için ana risk faktörü karşılanmamış östrojene endojen veya ekzojen uzun dönem maruziyettir. Diğer önemli risk faktörleri arasında obezite, nulliparite, diabetes mellitus, tamoksifen tedavisi ve hipertansiyon yer alır (bakınız Tablo 3) (31, 41).

2. 2. 3. 1. Aşırı Östrojen Maruziyeti

Endojen östrojen yüksekliği obezite, kronik anovulasyon veya östrojen salgılayan tümörlere bağlı olarak oluşabilir. Ekzojen östrojene ise postmenopozal hormon replasmanı ve tamoksifen tedavisi nedeniyle maruz kalınır.

Progesteron ile karşılanmamış sistemik östrojen tedavileri kadınlarda endometriyal hiperplazi veya kanser riskini artırır. Bir yıl boyunca sistemik östrojen tedavisi alan kadınların %20-50'sinde endometriyal hiperplazi geliştiği gösterilmiştir (57). Östrojenin endometrium kanseri riskini artırdığı, bu riskin doz ve kullanım süresi ile ilişkili olduğu yapılan çalışmalar ile kanıtlanmıştır (58- 60).

Tamoksifen ise selektif östrojen reseptör modülatörüdür, meme dokusunda antagonist etkileri nedeniyle meme kanserinin adjuvan tedavisinde kullanılır. Postmenapozal kadınlar için tamoksifen kullanımı artmış endometrium kanseri riski ile ilişkilendirilirken premenapozal kadınlar için bu risk belirsizdir (61).

Postmenopozal kadınlardaki endometrium kanseri gelişme riskinin dolaşımdaki östrojen ve androjen yüksekliği ve seks hormon bağlayıcı globulin düşüklüğü ile de ilişkili olduğu gösterilmiştir. Kronik anovulatuvar kadınlarda yetersiz progesterona karşılık, kronik olarak mevcut olan östrojen üretimi hiperplazi veya kansere yol açabilir (62, 63). Kronik anovulasyona yol açabilecek çeşitli patolojiler vardır. Bunlar arasında en sık görülen PCOS'dur (Tablo 5) (64).

Tablo 5. Kronik Anovulasyon Nedenleri

Polikistik Over Sendromu (PCOS)
Prolaktin Bozuklukları
Açıklanamayan Kronik Anovulasyon
Tiroid Hastalıkları
Konjenital Adrenal Hiperplazi

Obez kadınlarda endometriyal kanser gelişme riski daha fazladır. 19 prospektif çalışmanın incelendiği bir meta-analizde, vücut kitle indeksi (VKİ) 5 kg/m² artığında endometriyal kanser gelişme riskinin de anlamlı olarak yükseldiği saptanmıştır (65). Obez kadınlardaki yüksek östrojen seviyeleri, yağ dokusunda androjenlerin östrojene aromatisasyonuna bağlanabilir (66). Ayrıca bu kişilerde seks hormon bağlayıcı globulin seviyelerinin düşük olması da endometriyal kanser riskini artırabilir (67).

Menarşın erken yaşta başlaması veya geç yaşta menopoza girilmesi de uzamış östrojen stimülasyonuna neden olacağı için endometriyal kanser riski ile ilişkilidir (31, 68, 69).

Bazı over tümörleri de östrojen salgılayarak endometriyal karsinomaya sebep olur. Granüloza hücreli tümör tanısı alan kadınlara yapılan endometriyal biyopsiler

sonucunda eş zamanlı %25-50 endometriyal hiperplazi ve %5-10 karsinom saptanmıştır (70, 71). Aynı durum tekomalarda da görülebilir.

2. 2. 3. 2. Yaş Grubu

Endometrium kanseri genellikle postmenopozal yaş grubunda görülür, ortalama tanı yaşı 61'dir. Hastaların yaklaşık %12'si 50 yaş altında tanı alır. Genç yaşta tanı alan kadınların risk faktörleri arasında obezite, nulliparite ve kronik anovulasyon bulunur. Bu hastalarda eş zamanlı senkron primer over kanseri görülme ihtimali daha fazladır (72).

2. 2. 3. 3. Aile Öyküsü

Endometrium kanserine yatkınlık için herhangi bir aday gen belirlenememesine rağmen 70 yaşına kadar kanser geliştirme için kümülatif risk birinci derece yakınlarında endometrium kanseri olmayanlarda %1.7 iken, birinci derece akrabalarında endometrium kanseri olanlarda %3.1'dir ve belirgin olarak daha yüksektir. Birinci derece akrabalarında kolorektal kanser öyküsü olanlarda da yaşam boyu endometrium kanseri gelişme riski genel popülasyona kıyasla daha yüksektir (73).

Endometrium kanseri, ailesel genetik geçişli sendromlarla da ilişkilidir. Lynch ve Cowden sendromları buna örnek verilebilir.

Lynch sendromu herediter non-polipozis kolorektal kanser olarak da adlandırılan otozomal dominant geçişli bir patolojidir ve DNA mismatch tamir genlerindeki bir mutasyon sonucu ortaya çıkar. Bu durum kolon kanseri gelişme riskini artırır. Ayrıca non-kolonik kanserlerden mide, ince barsak, pankreas, safra yolu, üriner sistem, beyin, deri, over ve endometrium kanseri gelişme riski de artmıştır. Lynch sendromu olan bir kadında yaşam boyu endometriyal kanser gelişme riski de oldukça yüksek olup %27-71 arasında değişmektedir (74, 75).

Cowden sendromu ise PTEN adlı tümör supresör genin mutant olduğu bir klinik antitedir. Bu sendromda benign hamartomatöz lezyonlara ilaveten meme, tiroid ve endometrium kanseri riski artmıştır. Bu sendromu olan kadınlarda yaşam boyu endometrium kanseri gelişme riski ortalama %17 civarındadır (76).

BRCA mutasyonu taşıyıcılarında meme ve over kanseri dışında endometrium kanseri riskinin de arttığını gösteren çalışmalar vardır. Buna göre BRCA 1 mutasyonu olanlarda yaşam boyu uterin korpus kanseri gelişimi için rölatif risk 2.6'dır (77).

2. 2. 3. 4. İnfertilite ve Nulliparite

Endometrium kanseri riski gravida ve parite ile ters orantılıdır. Doğum sayısı arttıkça endometrium kanseri için rölatif risk azalmaktadır. İnfertilite de endometrium kanseri için risk yaratan bir durumdur, fakat burada özellikle kronik anovulasyonla ilişkili infertilite, riski arttıran bir faktör olarak karşımıza çıkmaktadır (68, 78).

2. 2. 3. 5. Diabetes Mellitus ve Hipertansiyon

Diabetes mellitus ve hipertansiyon endometrium kanseri için riski artıran durumlardır. Burada insülin rezistansı ile birlikte olan obezite, artmış gıda tüketimi, düşük fiziksel aktivite, düşük HDL, yüksek trigliserid, diabetes mellitus ve hipertansiyonu içeren metabolik bir sendromun endometrium kanseri riskindeki artışın esas sorumlusu olduğu düşünülmektedir (79).

Tip 2 diabetik kadınlarda mevcut olan insülin direnci ve hiperinsülineminin, insülin-like growth factor-1 reseptörünün aktivasyonu sonucu mitojenik etki oluşturarak kanser riskini arttırdığı düşünülmektedir. Hiperinsülinemi ve hipergliseminin tümör hücrelerinin çoğalmasını ve metastazları da kolaylaştırdığı ileri sürülmüştür. Bu hastalarda genellikle mevcut olan obezite de endometrium kanseri riski artışında rol oynamaktadır. Bundan ötürü diabetik kadınlarda endometrium kanseri riskinin normale göre 2.5-3.4 kat arasında arttığını rapor eden çalışmalar bulunmaktadır (80).

Obez kadınlarda ilaveten kan basınçları da yüksek (140/90 mmHg'nin üzerinde) ise endometrium kanseri gelişme riski 3.5 kat artmıştır (81).

2. 2. 3. 6. Meme Kanseri Öyküsü

Meme ve endometrium kanserleri arasında potansiyel bir ilişkinin mevcut olduğu düşünülmektedir. Her iki hastalığın gelişiminde de genetik yatkınlık ve karşılanmamış

östrojenik uyarı etkili faktörlerdir. Yine iki hastalığın da nulliparite ve obezite gibi ortak risk faktörleri mevcuttur. Ayrıca meme kanserli hastalarda kullanılan tamoksifenin endometrium kanseri gelişimindeki rolü açıktır. Fakat tamoksifenle ilişkili olarak ortaya çıkan endometrium kanserleri bazı hastalarda östrojen bağımlı, düşük grade'li endometrioid tip endometrium kanserleri şeklinde iken bazı hastalarda ise yüksek grade'li tip 2 kanserler şeklindedir. Zaten seröz tip endometrium kanseri olan hastaların özgeçmişleri incelendiğinde, bunlarda %20'ye varan oranlarda meme kanseri öyküsü olduğu ortaya konmuştur (82).

2. 2. 4. Endometrium Kanserine karşı Koruyucu Faktörler

Koruyucu faktörler arasında hormonal kontraseptifler, sigara, aspirin kullanımı, diyet, egzersiz ve son doğumun ileri yaşta olması sayılabilir.

Östrojen ve progesteron içeren oral kontraseptiflerin kullanımı, endometrium kanseri riskini %50'den fazla azaltır. Bu koruyucu etki östrojen bağımlı endometriyal proliferasyonu inhibe eden ve siklik dökülmeye neden olan progesteron komponentine bağlıdır. Kullanım süresi ne kadar uzunsa ve progesteron dozu ne kadar yüksekse koruyucu etki de o kadar artmaktadır. Bu koruyucu etki kullanım sona erdikten 20 yıl sonra bile devam edebilmektedir. Benzer koruyucu etki sadece progesteron içeren minipiller, progesteronlu rahim içi araçlar, enjektabl progesteron ve hormonsuz rahim için araçlarda da vardır (83).

Sigara kullanımı özellikle postmenopozal kadınlarda ve hormon replasman tedavisi kullananlarda azalmış endometrium kanseri riski ile ilişkilidir. Bu ilişki de içilen sigaranın miktarı ile orantılıdır. Sigaranın muhtemel risk azaltma mekanizmaları karaciğerde östrojen metabolizmasını uyararak dolaşımdaki östrojen düzeylerini düşürmesi, kiloyu azaltması ve menapoz yaşını öne çekmesidir (84).

Fiziksel aktivite, obeziteyi ve santral adipoziteyi azaltarak endometrium kanseri açısından koruyucu rol oynar. Ayrıca fiziksel aktivitesi fazla olanlarda seks hormon düzeylerinin, özellikle de östrojenin üretiminin azaldığı ortaya konmuştur ve endometrium kanserini azaltmada bu mekanizma da etkilidir. Yeterli fiziksel aktivitesi olanlarda endometrium kanseri riskinin ortalama %30-40 azaldığı rapor edilmiştir.

Fiziksel aktivite arttıkça endometrium kanseri açısından koruyuculuk da artmaktadır (85).

Çay ve kahve içilmesinin de endometrium kanseri riskini azalttığına dair çalışmalar vardır. Çay, toksik oksijen ürünlerini temizleyerek bu etkiyi oluştururken; kahve hücre içi antioksidan savunma mekanizmalarını aktive ederek ve apoptozu etkileyerek endometrium kanseri riskini azaltabilmektedir (86, 87).

Aspirin kullanımının ise özellikle obez kadınlarda endometrium kanseri riskini azaltabileceği gösterilmiştir, bu azaltıcı etki de dozla orantılı gibi görünmektedir. Bu etkinin siklooksijenaz enziminin inhibisyonu ile prostoglandin üretiminin ve de kronik inflamasyonun azalması ile ilişkili olduğu ileri sürülmektedir. Kronik inflamasyonda ortaya çıkan sitokinler hücrel immün cevabı baskılayarak ve anjiogenezi artırarak endometriyal karsinogeneze katkıda bulunur. Diğer non-steroid anti-inflamatuar ajanlarda ise endometrium kanserini azaltıcı etki gözlenememiştir (88).

17 çalışmayı içeren bir meta-analiz sonuçlarına göre ileri yaşta çocuk doğurmak endometrium kanserinden koruyucu bir faktör olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu etkinin endometrium kanseri gelişiminde etkili olan parite, hormon kullanımı, obezite gibi diğer faktörlerden bağımsız olduğu ortaya konmuştur. Buna göre son doğumunu 25 yaştan önce yapanlarla karşılaştırıldığında 40 yaş veya üzerinde doğum yapan kadınlarda endometrium kanseri gelişme riski %44 azalmaktadır. Son doğum yaşındaki her 5 yıllık artış endometrium kanseri gelişme riskini %13 oranında azaltmaktadır. Bu risk azalması uzun yıllar boyunca da devam etmektedir. İleri yaşta doğum yapan hastalarda anovulasyonun daha az oranda görülmesi, gebelik boyunca mevcut olan yüksek progesteron seviyelerinin özellikle kanser riskinin fazla olduğu yaşlı kadınların endometriumu üzerindeki olumlu etkisi ve o yaşlarda mevcut olması daha muhtemel olan premalign hücrelerin doğum sırasında atılmasının koruyucu mekanizmalar olabileceği ileri sürülmüştür (89).

2. 2. 5. Endometrium Kanseri Tanı

Endometrium kanseri açısından genel popülasyon için önerilen bir tarama yöntemi mevcut değildir. Hastaların tipik başvuru şikayeti anormal uterin kanamadır ve sadece %20 kadar hastada bu tipik semptom mevcut değildir (90). Anormal uterin kanaması

olanlarda temel amaç ise intrauterin bir patolojinin, özellikle de endometrium kanserinin ekarte edilmesi olmalıdır (91).

Anormal kanaması olmayan kişilerde de anormal servikal sitolojik bulgular, insidental endometriyal kalınlaşma veya endometriyal kavitede sıvı birikimi saptanabilir.

Endometriyal neoplazi şüphesi ile başvuran hastalar öncelikle uterusun şekli, boyutu, aksı, mobilitesi ve pelvik kitle varlığı açısından detaylı muayene edilmelidir. Uygun laboratuvar testleri istenmelidir. Örneğin reproduktif çağda anormal uterin kanama ile başvuran her kadından gebelik ekartasyonu için kanda beta-HCG değeri görülmelidir. Kanama ağırsa hematokrit ve pıhtılaşma bozukluğu göstergeleri önem kazanır. Pelvik USG bu hastalarda tercih edilecek ilk basamak görüntüleme yöntemidir. USG aynı zamanda anormal uterin kanamanın etyolojisinde yer alan diğer faktörler için de etkin bir ayırıcı tanı aracıdır.

Endometriyal neoplazi şüphesinde kesin tanı endometriyal örnekleme ile konur. Endometriyal biyopsi genellikle ofis şartlarında Pipelle veya Karman kanülü yardımıyla veya ameliyathane şartlarında dilatasyon küretaj (D&C) yoluyla alınır. Yeterli doku örneği elde edilirse ofis örnekleminin tanısal doğruluğu ameliyathanede yapılan küretajinkine benzerdir. Fakat ofis örneklemede kanser saptanmayan hastalarda semptomlar persistans gösterirse ameliyathane koşullarında örnekleminin tekrarlanması önerilir. Ayrıca %5-8 hastada ofis örnekleme başarısız olabilmektedir (91).

45 yaşın üzerinde anormal uterin kanaması veya postmenopozal kanaması olan her hastada mutlaka endometriyal örnekleme yapılmalıdır. 45 yaş altında olanlarda ise anormal uterin kanama persistan ise, obezite veya kronik anovulasyon gibi karşılanmamış östrojen maruziyeti söz konusu ise, tamoksifen kullanımı veya Lynch sendromu gibi endometrium kanseri riskini artıran bir durum mevcut ise veya medikal tedavi ile semptomlar kontrol altına alınamamışsa endometriyal örnekleme önerilmelidir (92). USG’de polip gibi fokal bir patolojiden şüphelenildiğinde ise salin infüzyon sonografisi veya histeroskopi yapılmalıdır (93).

Servikal sitolojik incelemede endometriyal tip atipik glandüler hücreler varsa, 35 yaş veya üzerinde olanlarda veya anormal uterin kanaması olanlarda veya endometrium kanseri açısından risk taşıyanlarda herhangi bir tip atipik glandüler hücreler saptanmışsa, 40 yaş ve üzerinde benign endometriyal hücreler saptanan ve anormal

kanaması veya endometrium kanseri için artmış riski olanlarda da endometriyal örnekleme yapılmalıdır (94, 95).

Asemptomatik kişilerde başka bir sebeple yapılan görüntüleme yöntemlerinde (USG, bilgisayarlı tomografi (BT) veya manyetik rezonans görüntüleme (MRG) endometrium kalınlaşması insidental olarak saptandığında veya postmenapozal dönemdeki hastada kanama ile birlikte endometriyal kavitede sıvı varlığında da ileri inceleme (endometriyal örnekleme dahil) gerekebilir. Özellikle asemptomatik endometriyal kalınlaşmada örnekleme için eşik değer 10 mm alındığında hiçbir endometriyal kanser vakasının atlanmayacağını, bu eşikle örnekleme yapıldığında endometrium kanseri saptanma oranının %6 civarında olduğu gösterilmiştir (96, 97). Başka çalışmalarda ise kanaması olmayan postmenopozal bir kadında endometriyal kalınlık 11 mm'nin altında ise kanser riskinin çok düşük olduğu ve örnekleme gerekmediği, kalınlık 11'nin üzerinde ise %7'ye yakın endometrium kanseri riski olduğu ve bu durumda biyopsi gerektiği saptanmıştır (98).

2. 2. 6. Endometrium Kanseri Tedavi Öncesi Değerlendirme

Yapılan tetkikler ile endometrium kanseri tanısı alan kişiler tedavi öncesi ekstaruterin kitle, metastaz, asit varlığı ve eşlik eden komorbiditeler açısından değerlendirilmelidir. Tedavi öncesi bir tümör belirteci olan serum CA 125 ölçülmesi hastalığın tanı anındaki yaygınlığı hakkında bilgi verebilir. Herediter sendrom varlığı da sorgulanmalıdır, çünkü bu tür bir sendrom varlığında hastada senkron tümör olasılığı söz konusu olabilir (99). Tam cerrahi evreleme planlanan hastalarda myometrium invazyonu veya servikal tutulum açısından pelvik veya abdominal görüntüleme yöntemlerinin kullanılmasına gerek yoktur. Ancak gerekli durumlarda (klinik evreleme yapılacaksa veya fertilitenin korunması düşünüldüyse) MRG, diğer görüntüleme yöntemleri (USG ve BT) ile karşılaştırıldığında myometrial invazyon ve servikal tutulumu göstermede daha başarılıdır (100, 101). Direkt akciğer grafisi de ilk değerlendirmede rutin olarak istenmelidir.

2. 2. 7. Endometrium Kanseri Evreleme

Endometrium kanserinde en önemli prognostik faktör tanı anında hastalığın evresidir. Endometrium kanseri en son 2009 yılında revize edilen FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics) evreleme sistemi doğrultusunda cerrahi olarak evrelenir (Tablo 6) (102).

Standart evreleme prosedürü total ekstrasfalyal (tip 1) histerektomi ve bilateral salpingo-ooforektomi ile birlikte bilateral pelvik ve paraaortik lenf nodu diseksiyonunu içerir (102). Cerrahi evreyi değiştirmemesine rağmen genellikle batin yıkama sitolojisi de alınır. Omentektomi özellikle tip 2 kanser varlığında yapılmalıdır. Şüpheli alanlardan biyopsi ve metastaz varlığında sitoreduksiyon da önerilen cerrahi yaklaşımlardır.

Tablo 6. 2009 FIGO Endometrium Kanseri Cerrahi Evreleme

Evre I	Tümör korpus uteri içine sınırlı
Evre IA	Myometrial invazyon yok ya da %50'den az
Evre IB	%50 ya da daha fazla myometrial invazyon
Evre II	Servikal stromal invazyon var ancak, tümör uterus dışına çıkmamıştır.
Evre III	Lokal ve/veya bölgesel yayılım
Evre IIIA	Seroza ve/veya adneks invazyonu
Evre IIIB	Vajinal ve/veya parametrial tutulum
Evre IIIC	IIIC1: Pelvik Lenf Nodu Metastazı IIIC2: Para-aortik Lenf Nodu Metastazı
Evre IV	Mesane ve/veya barsak mukoza invazyonu ya da uzak metastaz
Evre IVA	Mesane ve/veya barsak invazyonu
Evre IVB	Uzak Metastaz: İntra-abdominal metastaz ve İnguinal Lenf Nodu metastazı dahil.

2. 2. 8. Endometrium Kanseri Tedavi

Endometrium kanserinde primer tedavisi cerrahidir ve daha önce de belirtildiği gibi cerrahide standart minimal yaklaşım total abdominal histerektomi, bilateral salpingo-ooforektomi ve retroperitoneal lenf nodu diseksiyonunu içerir (102). Fertilite arzusu olan genç hastalarda belli koşullarda medikal tedavi şeklinde konservatif yaklaşım söz

konusu olabilir ve bu progesteron kullanımı ile sağlanır (103). Buna ek olarak seçilmiş bir hasta grubunda standart cerrahiye kıyasla daha konservatif cerrahi yaklaşım uygulanabilir. Bu hastaları belirlemek için preoperatif endometriyal biyopside grade 1 veya 2, endometrioid tip adenokarsinom tanısı konanlarda histerektomi sonrası frozen inceleme istenir. Frozen değerlendirmede tümör 2 cm'nin altında, servikal uzanım veya adneks tutulumu yok ve cerrahide uterus dışında hastalık şüphesi mevcut değilse tam evreleme yapılmadan histerektomi ve bilateral salpingo-ooforektomi aşamasında cerrahi sonlandırılabilir (104).

Endometrium kanserinde adjuvan tedavi kararı etkileyen en önemli faktörler hastalığın evresi ve tümörün grade'idir. Jinekolojik Onkoloji Grubu (Gynecologic Oncology Group, GOG), orta-yüksek riskli hastaları yaş ve üç ayrı patolojik kriter varlığına göre tanımlamıştır. Patolojik kriterler derin myometrial invazyon varlığı, grade 2 veya 3 tümör, lenfovasküler invazyon varlığı olarak belirlenmiştir (105). Bu kriterler dışında kalan hastalar düşük-orta risk grubundadır.

Düşük risk grubundaki hastalar, prognozları çok iyi olduğu için cerrahi sonrası radyoterapi veya kemoterapi gibi bir adjuvan tedavi almadan izlenebilir (105). Orta-yüksek risk grubundaki hastalar ise, cerrahi sonrası lokal rekürrens riskini azaltmak amacıyla adjuvan radyoterapiye adaydırlar. Fakat bu hastalarda adjuvan radyoterapinin genel sağkalıma bir etkisi yoktur (106).

Adjuvan kemoterapinin orta-yüksek risk grubundaki hastalarda radyoterapiye alternatif olarak verilebileceğini gösteren veri sayısı yetersizdir. 425 endometrium kanseri hastası ile yapılan bir çalışmada adjuvan radyoterapi alan hastalar ve en az üç kür siklofosfomid, sisplatin, doksorubisin kemoterapisi alan hastalar karşılaştırılmış, progresyonsuz ve genel sağkalım süreleri açısından herhangi bir fark saptanmamıştır (107).

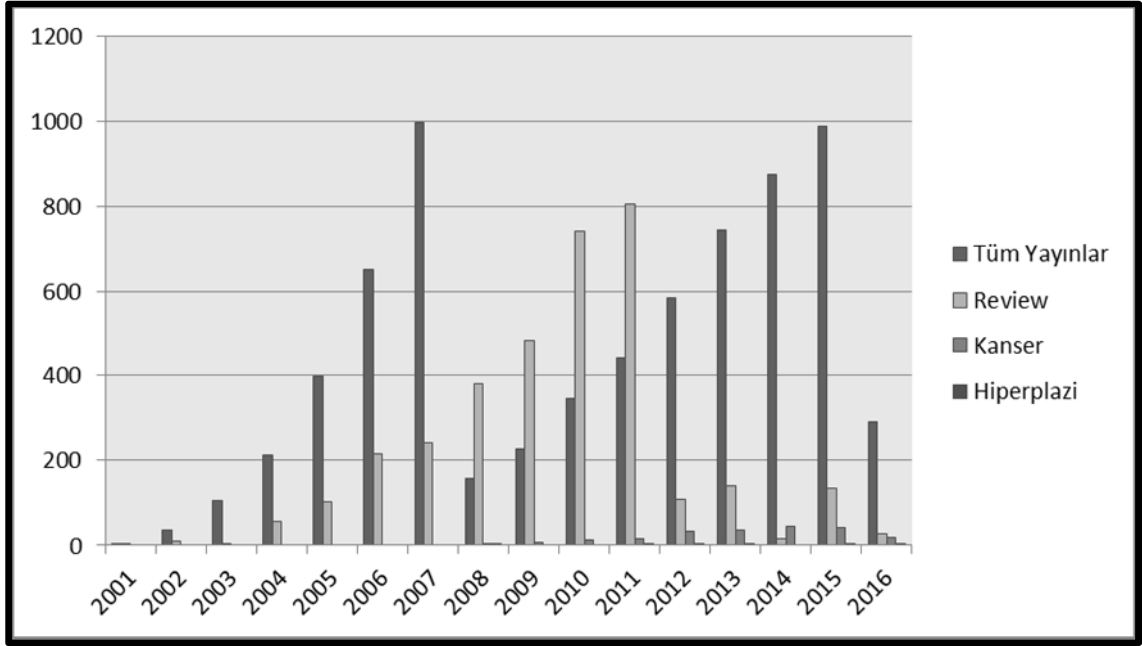
Radyoterapinin uzak rekürrenslere etkisi olmaması nedeniyle kombine kemoterapi ve radyoterapi rejimleri adjuvan tedavi yaklaşımında düşünülebilir. Kombine tedavi modaliteleri evre 1-2 seröz veya berrak hücreli endometrium kanserlerinde önerilmektedir (108). Kombine tedavinin orta-yüksek risk grubundaki yararını karşılaştırmak için GOG 249 ve PORTEC-3 adlı randomize çalışmaları halen devam etmektedir.

İleri evre (evre 3-4) hastalık varlığında ise adjuvan tedavi olarak karboplatin ve paklitaksel şeklinde kombine kemoterapi rejimleri önerilmektedir (109). Herhangi bir sebeple tam olarak evrelenemeyen hasta grubuna ise cerrahi sonrası pelvik radyoterapi verilebilir (110).

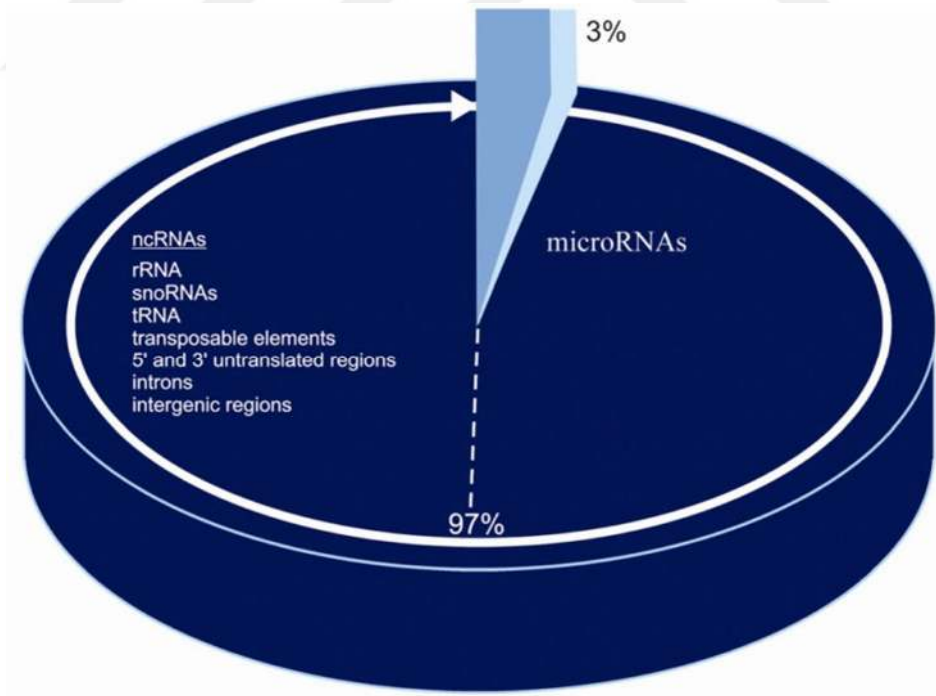
2.3. Kanser ve MikroRNA

Kanser, esas olarak hasarlı hücrelerin hayatta kalması ve kontrolsüz proliferasyonu ile sonuçlanan bir süreçtir. Hücre, bölünme, farklılaşma ve ölüm aşamasında birçok kontrol mekanizmasına sahiptir. Bu aşamaların herbirinde çeşitli düzenleyici faktörler, genleri aktive veya inaktive ederek bölünme, farklılaşma ve kontrollü hücre ölümünü (apoptozis) programlamaktadır. Bu genlerin (tümör süpresör gen ve onkogen) hasarlanması kanserle sonuçlanabilir. Birçok tümör süpresör gen ya da onkogen etkilerini göstermek için önce ilgili genin DNA'sından RNA elde edip ilgili proteini sentezleterek etki göstermektedir. Son 20 yıl içinde yapılan çalışmalarda, birbirinden farklı; tümör süpresör gen veya onkogen gibi aktivite gösterdikleri kanıtlanmış, küçük protein kodlamayan RNA aileleri keşfedilmiştir (111). İngilizce literatürde pek çok yayına sahip “small non-coding RNAs” başlığı altında derlenmiş bu RNA ailelerinden biri de MikroRNA (miR ya da miRNA) ailesidir (Şekil 2).

miRNA'lar, insan ve diğer birçok canlı türünde tanımlanmış; hücresel proliferasyon, farklılaşma, gelişim ve apoptoziste geniş biyolojik etkileri olan; protein kodlamayan; tek zincirli, 20-22 nükleotidli bir dizi gen regülatörü RNA molekülleridir. İnsan genomunda, DNA zincirindeki genlerin sadece %2-3'ü mRNA transkripsiyonu ve protein ifadesi kodlamaktadır (coding DNA). Geri kalan DNA bölgeleri herhangi bir protein kodlamamakla (non-coding DNA) birlikte gen regülatörleri olarak fonksiyon görmektedirler (Şekil 3)(112). Tüm genlerin içerisinde ~% 3'lük bir yer kapladığı için miRNAlar, gen regülatörleri içindeki büyük gruplardan biridir (113-115).



Şekil 2. MikroRNA ilgili Çalışmalar ve Endometriyal Patolojilerle ilgili Dağılımı (Pubmed'deki veriler kullanılarak hazırlanmıştır.)



Şekil 3. İnsan Genomunda Kodlayan ve Kodlamayan DNA Dağılımı (Kodlamayan DNA sekansına ait sentez ürünleri (~%97) ncRNAs olarak gösterilmiştir.)

İlk miRNA olan lin-4, ilk kez Lee RC. ve arkadaşları (116) tarafından genetik çalışmalarının vazgeçilmez canlısı *Caenorhabditis elegans* adındaki nematodta keşfedilmiştir. Bu nematodta protein lin-14'ün ekspresyonunu düzenleyerek hücrel gelişimi etkilediği düşünülen küçük protein kodlamayan bir RNA olarak tanımlanmıştır. 7 yıl sonra, Reinhart BJ. ve arkadaşları (117) *C.elegans*'ta mRNA'nın 3' ucuyla sekans-spesifik RNA-RNA etkileşimi kurarak heterokronik gen lin-41'in ekspresyonunu negatif yönde düzenleyen let-7 adında diğer bir miRNA olduğunu bulmuşlardır. 2001 yılında birbirinden bağımsız üç araştırmacı grubu tarafından omurgalı ve omurgasız canlılarda fazla sayı ve çeşitte miRNA bulunduğunu ve miRNA aracılı posttranskripsiyonel regülasyonun türler arasında yaygın bir regülasyon biçimi olduğunu öne sürmüşlerdir (118-120). İnsan genomunda şimdiye kadar, çoğunun fonksiyonu henüz aydınlatılamamış 1872 adet miRNA kodlayan prekürsör gen ve bu genlerin ürünü ~2600 adet olgun miRNA keşfedilmiştir.

Zaman geçtikçe miRNA'ların insan hastalıklarında nasıl bir rol üstlendiği konusu daha da merak uyandırmış, ve bu sorulara yanıt aramaya yönelik birçok zahmetli çalışma yürütülmüştür. Mesela, gelişimini tamamlamış dokuların fizyolojik ve patofizyolojik strese verdiği cevabı son derece etkiledikleri ortaya çıkarılmıştır (121). miRNA tarafından düzenlenen hücrel olayların stres ve hasarlanma durumunda yetersiz veya aşırı şekilde gerçekleşmesi onların hastalıkların oluşumundaki asıl rolünü açıklamaktadır (122). Elde edilen bilgiler doğrultusunda, miRNA'ların insanda kanser, kardiyovasküler hastalıklar, kalp yetmezliği, inflamatuvar hastalıklar, nörogelişimsel hastalıklar, Down sendromu, otoimmün hastalıklar, karaciğer, deri ve iskelet kası hastalıklarının patofizyolojisinde rolü olduğu bilimsel olarak kanıtlanmıştır (123).

miRNA'nın insan kanserinde rol oynadığına dair ilk kanıt, B hücreli kronik lenfositik lösemi hücrelerindeki kromozom 13q14 bölgesinde bulunan tümör baskılayıcıları tanımlamaya yönelik çalışmalarda elde edilmiştir(124). B hücreli kronik lenfositik lösemilerde sıklıkla bu bölgenin silindiğini ve bu bölgenin miR-15a ve miR-16-1 olmak üzere 2 miRNA geni içerdiğini bulmuşlardır. Bu iki gen, B hücreli kronik lenfositik lösemi klinik olgularının çoğunda silinmiş ya da down regüle olmuştur. Bu konu üzerine yapılan sonraki çalışmalar, miR-15 ve miR-16-1'in, malign B lenfositlerde ve daha birçok solid malignenside fazla eksprese olduğu bilinen anti-apoptotik protein, Bcl-2 yi baskılayarak hücre ölümünü indüklediklerini ve bu nedenle tümör baskılayıcı

miRNA'lar olduklarını ortaya çıkarmıştır (125,126). miRNA'ların karsinogenezle ilgisi araştırıldıkça birçok organ kanserinde doku spesifik miRNA'ların aberan değişimleri farkedilmiş ve kansere spesifik miRNA'lar tanımlanmıştır. Bunlardan bazıları normalinden fazla (upregülasyon); bazıları da normalinden az eksprese olarak (downregülasyon) aynı kanserin patofizyolojik sürecini başlatabilirler.

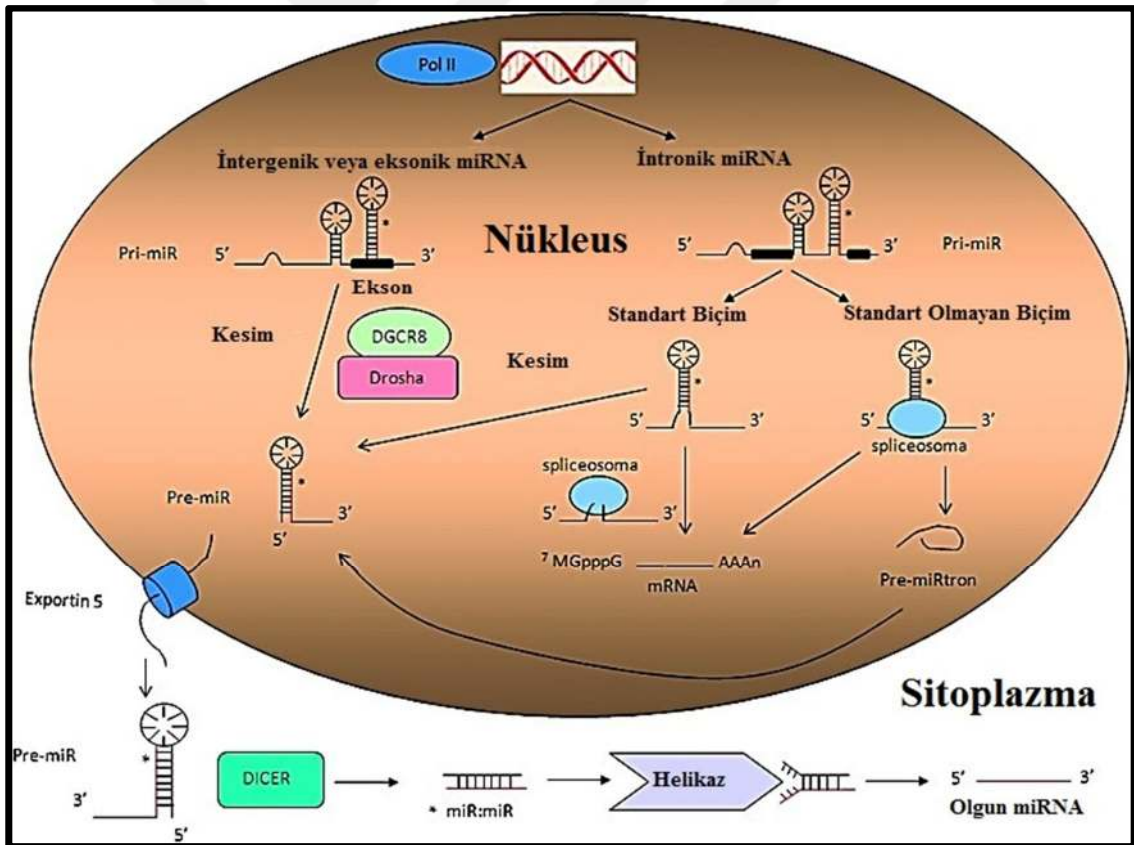
2. 3. 1. MikroRNA Biyogenezi

miRNA biyogenezi, DNA üzerindeki genin 5'-3' yapıda büyük primer transkriptte (pri-miRNA) dönüştürülmesi ile başlar. Bu transkripsiyon tipik olarak RNA Polimeraz II tarafından yönetilmektedir. Sonradan bu pri-miRNA'lar RNA bağlayıcı protein DGCR8 ve tip III RNaz Drosha tarafından oluşturulmuş mikroişlemci kompleks yardımıyla pre-miRNA (pre-miRNA) adı verilen yaklaşık 85 nükleotitli sap-ilmik yapısındaki RNA moleküllerine bölünürler. Nükleustan sitoplazmaya Ran/GTP/Exportin 5 kompleksi aracılığıyla transport edildikten sonra, pre-miRNA'lar diğer bir RNaz III enzimi Dicer ile yaklaşık 20-22 nükleotitten oluşan miRNA/miRNA* çiftine dönüştürülür (* ile gösterilen yolcu zincire, diğer tamamlayıcı zincir ise olgun ya da kılavuz zincire işaret etmektedir). Bu miRNA çifti çözüldükten sonra serbestleşen olgun miRNA, RNA aracılı susturucu kompleks (RISC) olarak adlandırılmış protein kompleksine entegre olur (miRISC) ve onu hedefi olan mRNA'ya yönlendirir. miRISC kompleksi içinde Argounate proteinler ve tek zincirli olgun miRNA bulunur. Olgun miRNA'nın mRNA üzerindeki hedef bölgesine bağlanması tam ve kısmi (parsiyel) olmak üzere iki şekilde olur. miRNA, hedef mRNA'ya kısmi bütünleyicilik ile bağlanırsa, mRNA'nın translasyonunu inhibe eder. Bu yolu kullanan olgun miRNA'lar, hedef mRNA'ya genellikle 3'UTR bölgesinden bağlanır. miRNA, hedef mRNA'ya tam bütünleyicilik ile bağlanırsa, mRNA'nın translasyonunu aktive eder. Bu yolu kullanan miRNA'lar ise, hedef mRNA'ya daha çok kodlama sekansı veya ORF (Open Reading Frame =Açık Okuma Çerçevesi) deki bölgelerden bağlanırlar. (Şekil 4 ve 5) (127, 128).

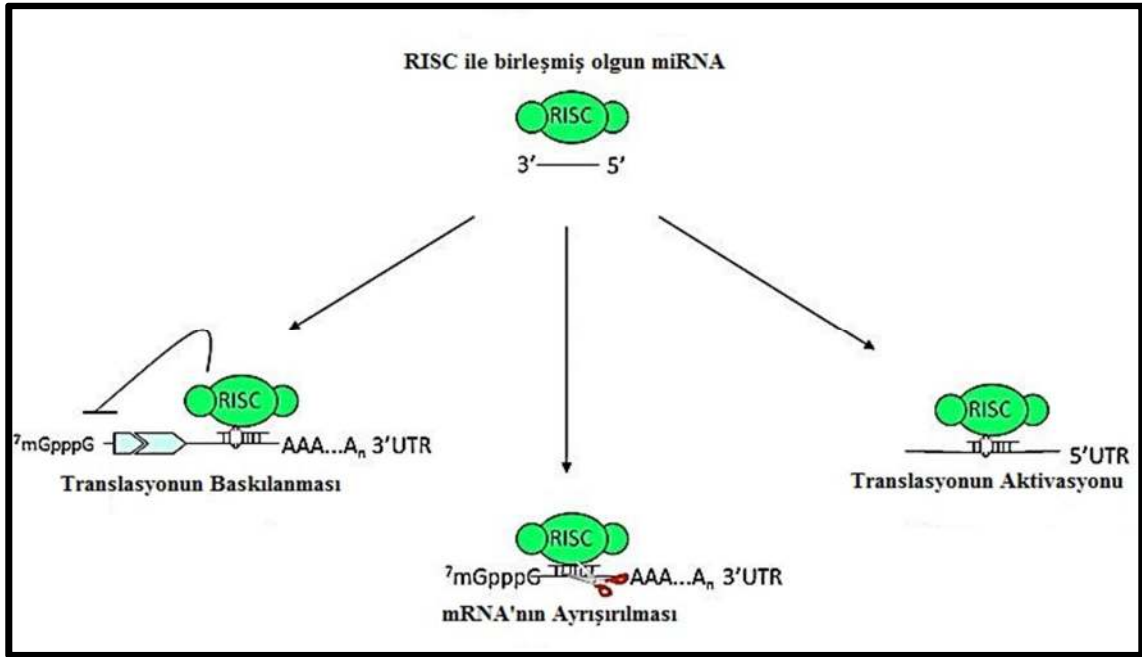
2. 3. 2. Tümör Süpresör ve Onkojenik miRNA Kavramı

Normal dokularda, miRNA'nın düzenli transkripsiyonu ve hedefi olan mRNA'ya bağlanması protein translasyonunu bloke ederek normal boyutta büyüme, proliferasyon, diferensiasyon ve hücre ölümü sağlar.

Tümör süpresör görevi üstlenmiş bir miRNA'nın redüksiyonu ya da delesyonu tümör formasyonu ile sonuçlanır. Tümör süpresör miRNA'nın biyogenez aşamasındaki herhangi bir redüksiyon ya da delesyon olması durumunda olgun miRNA hedef mRNA'ya bağlanamayacağından ilgili translasyonu durması gereken yerde durduramaz ve onkoproteinler oluşur. Bunun sonucunda artmış proliferasyon, invazyon, anjiyojenez, apoptozisin durması ve dediferansiye doku oluşumu gözlenir. Bu durumda tümör oluşumu kaçınılmaz sonuçtur.



Şekil 4. MikroRNA Biyogenezi (Pol II: RNA Polimeraz II, Pri-miR: Primer miRNA, Pre-miR: Prekürsör miRNA)



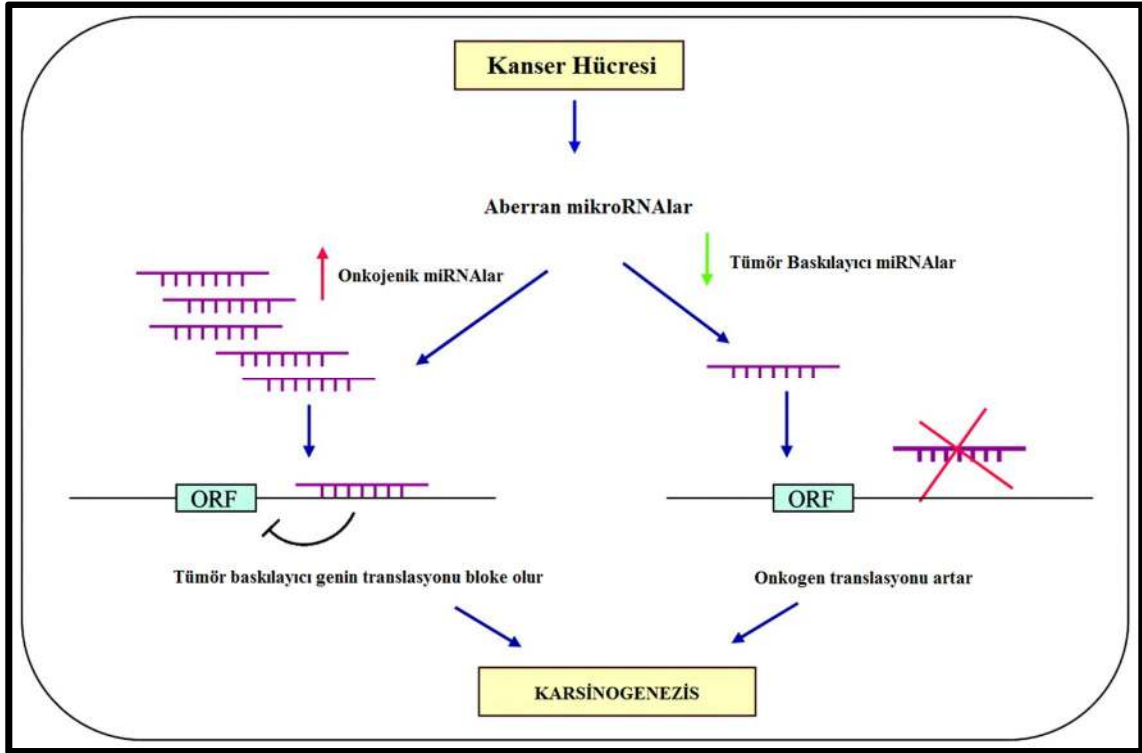
Şekil 5. MikroRNA'nın Hedef Moleküller Üzerindeki Etkileri (**RISC:** RNA-induced Silencing Complex)

Diğer yandan, onkogenik rolü olan bir miRNA'nın amplifikasyonu veya fazla ekspresyonu da tümör oluşumu ile sonuçlanabilir. Uygunsuz zamanda ve dokuda artmış olan miRNA düzeyi, miRNA-hedef mRNA arasındaki tümör baskılayıcı ilişkisinin bozulmasına neden olarak tümör oluşumuna zemin hazırlar. Hatta, olgun miRNA hedef mRNA'ya ORF'den bağlanarak promoter bölgesini harekete geçirebilir ve onkogen oluşumunu hızlandırabilir (Şekil 6) (129).

2. 3. 3. Endometriumdaki MikroRNAlar

Endometrium, östrojen (Östradiol-17 β) ve progesteronun etkisiyle döngüsel olarak proliferer olur ve dökülür. miRNA'lar tarafından tümör baskılanması, endometriumda sık hücrel proliferasyon olması nedeniyle önemlidir. Proliferatif ve sekretuar fazdaki miRNA ekspresyon paternlerini kıyaslayan çalışmada Kuokkaen S. ve arkadaşları (130) sekresyon fazının ortasında siklin, siklin bağımlı kinaz ve E2F transkripsiyon faktör 3 gibi hücre döngüsünde etkisi olan genleri baskılayacak kadar eksprese olan 12 miRNA (miR-29b, miR-29c, miR-30b, miR-30d, miR-31, miR-193a-3p, miR-203, miR-204, miR-200c, miR-210, miR-582-5p ve miR-345) tanımlamışlardır (130, 131). Bu

çalışma, miRNA'ların hücre döngüsünü etkileyerek proliferasyon ve sekresyon fazında endometriumdaki hücre çoğalmasını düzenlediğini göstermektedir.



Şekil 6. Tümör Süpresör ve Onkogen miRNAlar

2. 3. 4. Endometriyal Hiperplazi ve MikroRNA

Literatürde, salt olarak endometriyal hiperplazilerde miRNA profillemesinin yapıldığı bir çalışma yoktur. Endometriyal adenokarsinom ve normal hasta grubuna, endometriyal hiperplazi olgularının eklenerek miRNA ekspresyon düzeylerini kıyaslayan tek bir çalışma bulunmuştur. Lee H. ve arkadaşları (132), toplam 75 olguyu kapsayan bu çalışmada, parafine gömülü dokulardan elde ettikleri tip 1 endometrium adenokanseri, kompleks atipili EH, basit atipisiz EH ve normal endometrium doku kesitlerinde miR-205, miR-183, miR-200c, miR-200a, miR-182 ve miR-21 ve PTEN ekspresyon düzeylerini kıyaslamışlar ve bunlardan ilk beşinin adenokarsinomlu olgularda diğer gruplara göre anlamlı düzeyde yüksek olduğunu bulmuşlardır. Adenokanserli olgulardaki miR-21 ekspresyon düzeyi, kompleks atipili hiperplazi grubuna kıyasla orta derecede yüksek bulunmuş ancak, istatistiksel olarak anlamlı

görülmemiştir. miRNA'ların ekspresyon düzeyleri açısından kompleks atipili EH, basit atipisiz EH ve normal endometrium grupları arasında da anlamlı bir fark bulamamışlardır. Kompleks atipili EH ve endometrium adenokarsinomu olgularında anlamlı düzeyde PTEN kaybı saptamışlar; miR-200c ekspresyonunu PTEN negatif dokularda anlamlı ölçüde yüksek bulmuşlardır.

2. 3. 5. Endometrium Kanseri ve MikroRNA

Endometrium kanserinin gelişmiş ülkelerde en sık görülen kadın genital kanseri olduğunu ve vakaların %80-85'inin endometrioid adenokarsinom histopatolojisinde olduğunu bilmekteyiz (67). Endometrium kanserinin onkojenik paterni, metastaz ve invazyon faktörleri ispatlanmış olup miRNA ekspresyon paterni normal endometriumdan farklılık göstermektedir (Tablo 7)(8). Endometrioid adenokarsinom ve papiller karsinom dahi birbirinden farklı miRNA ekspresyonuna sahiptirler (133).

Endometrium kanserinde miR-185, miR-106a, miR-181a, miR-210, miR-423, miR-103, miR-107, miR-let7c, miR-205, miR-449 ve miR-429'u kapsayan bir grup miRNA upregüle olmuş; onkojenez, invazyon ve metastazda etkin rol oynamıştır (134-136). miR-7 de upregüle olmuştur ve anti-miRNA antikorlar kullanılarak miR-7 downregüle edilmiş, böylece kanser hücrelerinin invazyon ve migrasyonu inhibe edilmiştir (8). Endometrioid adenokarsinomda miR-27 ekspresyonunun upregülsayonu cerrahi evreyle bağıntılıdır. miR-27, FOXO1 genini hedef alarak onun ekspresyonunu baskılar ve hücre apoptozunu inhibe etmektedir (137).

Dai Y. ve arkadaşları (138) miR-200b overekspresyonunun adenokarsinom hücre dizilerinde TIMP2 (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2) ekspresyonunu inhibe ettiğini ve bunun sonucunda MMP (Matrix Metalloproteinase) düzeylerini arttırarak endometrium kanserinin metastazında rol oynadığını bulmuşlardır. İçlerinde miR-34b'nin de bulunduğu 6 miRNA, adenokarsinoma özgü ekspresyon paterni gösterdiği, ve miR-34b'nin, adenokarsinom hücresinde promotor bölgesinden metillenerek proliferasyon ve invazyonu indüklediği gösterilmiştir (139). Diğer taraftan, miR-let7e, miR-30c, miR-221, miR-152, miR-193, miR-204, miR-99b ve miR-193b' nin de dahil olduğu birçok miRNA'nın, endometrium kanserinde downregüle olduğu kanıtlanmıştır.

Kanser ve miRNA ilişkisinin ortaya konduğu günden bu yana yapılan birçok çalışmanın verdiği sonuçlar, miRNA'ların endometrium kanserlerinin biyolojik davranışındaki rolünü gün geçtikçe aydınlatılmaktadır.

2. 3. 6. Forkhead Box C1 Geni (FOXC1)

FOX (Forkhead Box) proteinleri; hücrenin büyüme, proliferasyon, diferensiasyon ve yaşam süresi ile ilgili genlerin ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli role sahip transkripsiyon faktörleri ailesidir. Birçoğunun embriyonik gelişimde önemli rolü olduğu gösterilmiştir (140, 141). FOXC1 proteini de bu ailenin bir üyesi olup insanda kromozom 6p25 lokasyonunda yerleşen FOXC1 geni tarafından kodlanmaktadır. Yakın geçmişte yapılan çalışmalar, FOXC1 geninin ekspresyon artışının, hücreler arası adezyonun kaybı ile birlikte hücrenin migratuar ve invaziv bir özellik kazanmasına neden olan epitelyal-mezenşimal geçiş sürecinde önemli bir rolü olduğunu göstermiştir (17,142-146). İn vitro ortamda FOXC1 geninin, onkogen gibi fonksiyon gösterdiğini ortaya çıkaran çalışmalar vardır (146).

Birçok miRNA, FOXC1 geninin regülasyonunda rol oynar. miR-204 ve miR-495'in bu geni baskılayarak, endometrium kanserinde hücrel büyüme, proliferasyon ve invazyonu baskıladığı bilindiği gibi (17,147); miR-138 ve miR-133'ün yine bu geni baskılayarak sırasıyla pankreas ve hipofiz tümörlerinde hücrel proliferasyon ve invazyon oluşmasını engellediği bildirilmiştir (148,149). Ayrıca, miR-133a 'nın PDE7A genini baskılayarak tümör baskılayıcı etki gösterdiği, metastatik endometrioid tip kanserlerde downregüle olduğu gösterilmiştir(9).

2.3.7. miRNA'nın Kanser Tanı, Tedavi ve Prognozundaki Önemi

Birçok kanser çeşidi spesifik miRNA profiline sahiptir. Bu durum, tümörleri miRNA ekspresyon düzeyine göre sınıflandırmaya olanak tanımaktadır. mRNA ve proteinler gibi karmaşık transkripsiyonel ve translasyonel modifikasyonlarının olmaması nedeniyle kanser tanısında potansiyeli yüksek sahip biyobelirteç olduğu düşünülmektedir. Araştırmalar, miRNA'ların kanser hücrelerinden salınan sitokinler, büyüme faktörleri ve proteinler gibi dolaşıma salınan moleküller olduğunu düşünmeye yönlendirmiştir. Serum ve plazma örneklerinin spesifik miRNA'ların ölçümü için

kullanılabileceğini ve her iki örnek tipinde de eşit miRNA dağılımı saptandığını ortaya koyan birçok çalışma yapılmıştır.

Tablo 7. Endometrium Kanseri miRNA Ekspresyon Değişimi

OncomiR'lar (Upregülasyon)	Hedef Genler	Referanslar
miR-185		<i>Boren ve ark.,2008; Wu ve ark.,2009; Chung ve ark.,2009</i>
miR-106a		
miR-181a		
miR-210		
miR-423		
miR-103		
miR-107		
miR-let7c		
miR-205		
miR-449		
miR-429		
miR-7		<i>Chung ve ark., 2012</i>
miR-27	<i>FOXO1</i>	<i>Mozos ve ark., 2014</i>
miR-200b	<i>TIMP2</i>	<i>Dai ve ark., 2013</i>
miR-34b		<i>Hiroki ve ark., 2012</i>
Tümör Süpresör miR'lar (Downregülasyon)	Hedef Genler	Referanslar
miR-let7e		<i>Boren ve ark.,2008; Wu ve ark.,2009; Chung ve ark.,2009</i>
miR-221		
miR-193		
miR-99b		
miR-193b		
miR-204	<i>FOXC1</i>	<i>Boren ve ark.,2008; Wu ve ark.,2009; Chung ve ark.,2009; Chung ve ark.,2012</i>
miR-152	<i>DNMT1, E2F3, MET, Rictor</i>	<i>Boren ve ark.,2008; Wu ve ark.,2009; Chung ve ark.,2009; Tsuruta ve ark., 2011; Banno ve ark., 2012</i>
miR-30c	<i>MTA1</i>	<i>Xie Y ve ark., 2011; Zhou H ve ark., 2012; Kong ve ark., 2014</i>
miR-129-2	<i>SOX4, hMLH1</i>	<i>Huang ve ark., 2011; Banno ve ark., 2012; Huang ve ark., 2014</i>
miR-203		<i>Huang ve ark., 2014</i>
miR-106b	<i>TWIST1</i>	<i>Dong ve ark., 2014</i>
miR-let7a	<i>Aurora-B</i>	<i>Liu ve ark., 2013</i>

Boeri M. ve arkadaşlarının (150) yaptığı çalışmada, plazma örneklerinde hastalık öncesi miR-21 ekspresyon düzeylerine bakarak konvansiyonel yöntemlerle tanı almadan önce akciğer kanseri gelişeceğinin tahmin edilebileceği gösterilmiştir. Erken evre akciğer kanserli hastalar ile sağlıklı insanların plazma miR-21 düzeyleri arasında farklılık olduğunu gösteren çalışmalarda Platinum bazlı kemoterapiye duyarlı hastaların tesbitinde de kullanılabileceği gösterilmiştir (151,152).

Evreleme teknikleri yönünden, Cheng H. ve arkadaşlarının (153) yapmış olduğu çalışmada dolaşımda bulunan miR-141'in Evre 4 kolorektal kanser ile yakından ilişkili olduğunu bulmuşlardır. miR-141 ve CEA düzeylerini birlikte değerlendirmenin evreyi tesbit etme gücünü arttırdığını ve her ikisinin yüksek olduğu hastaların kötü prognoza sahip olduklarını gözlemlemişlerdir.

Karaayvaz M. ve arkadaşlarının (154) yaptığı çalışmada, tüm histopatolojik tiplerin bulunduğu 48 adet endometrium kanseri olgusuna ait parafinlenmiş doku kesitlerinde miR-26a, let-7g, miR-21, miR-181b, miR-200c, miR-192, miR-215, miR-200c ve miR-205 ekspresyon düzeyleri ölçülmüş ve miR-205 overekspresyonu olan hastaların daha kötü sağkalım fenotipine sahip olduğu gösterilmiştir.

Organizmada birçok patolojinin, anormal bir endojenik gen veya mutant gen nedeniyle hücreler arasında sinyalin bozulma, apoptozis ve hücre proliferasyonu ile meydana geldiği bilinmektedir. Buna ek olarak viral enfeksiyon da yabancı gen ekspresyonu yaptırarak, hastalığa neden olmaktadır. RNAi (RNA inhibisyon) mekanizması ile yabancı gen ürünlerinin sessizleştirilerek, tedavide kullanılması yönündeki görüşler giderek artmaktadır (155-157).

MikroRNA'lar, hedefledikleri mRNA'nın moleküler yolaklardaki özelliğine göre onkogenik veya tümör baskılayıcı fonksiyon gösterebilirler (158). Fonksiyonları bir onkogenin ekspresyonunu kontrol etmek olan miRNA'lar tümör baskılayıcı miRNA'lar veya "anti-oncomiR" olarak ifade edilmektedir. Dolayısıyla tümör baskılayıcı miRNA'ların ekspresyonunun azalması onkogenin ekspresyonunun artmasına ve tümör oluşumuna sebep olur. Bunun tersi durumda ise, "oncomiR" olarak ifade edilen bazı miRNA'ların kanserin gelişimini arttırdığı görülmektedir. Bu miRNA'lar bir tümör baskılayıcısının baskılanmasını sağlarlar (159). OncomiR'ler bazı tümörlerde, gen amplifikasyonu, epigenetik mekanizmalar veya transkripsiyonel bozukluklardan dolayı aşırı eksprese olurlar. Gelişmekte olan miRNA tabanlı tedaviler için iki yaklaşım vardır:

onkogenik miRNA'ları hedef alan (anti-miR, miRNA süngerleri ve miRNA maskeleri) ve tümör baskılayıcı miRNA'ları hedef alan (miRNA mimikleri) tedavilerdir (155).

2. 3. 8. Onkogenik MikroRNA Tabanlı Tedavi Stratejileri

Onkogenik miRNA'lar (OnkomiR'ler), tümör baskılayıcı genleri ve/veya apoptozis ve hücre farklılaşmasını kontrol eden genleri negatif olarak inhibe ederek tümör gelişimine neden olmaktadır. OnkomiR'ler genlerin amplifikasyonları, transkripsiyonel düzensizlikler ve epigenetik mekanizmalardan dolayı birçok dokuda aşırı veya normalden düşük miktarda eksprese olurlar (160). Terapötik olarak kullanılan onkogenik özelliğe sahip miRNA'lar küçük tek zincirli anti-miR'ler, miRNA süngerleri ve miRNA maskeleri olmak üzere 3 gruba ayrılırlar (155).

Küçük Tek Zincirli Anti-miR'ler:

AntagomiR, miRNA'ya direk bağlanan ve onun aktivitesini bloke eden antisense oligonükleotidler için kullanılan genel bir terimdir. AntagomiR'ler aynı zamanda miRNA prekürsörlerine bağlanarak olgun miRNA'ların biyogenezini inhibe ederler (155). miRNA'ların hedef bölgelerine bağlanmaları Watson-Crick baz eşleşme kuralına göre basit bir şekilde gerçekleşmektedir. AntagomiR'lerin miRNA'larm fonksiyonunu nasıl inhibe ettiği henüz tam olarak anlaşılamamasına rağmen, olgun miRNA'ların RISC kompleksine bağlanmasını önlediği bilinmektedir. AntagomiR'lerin terapide kullanımının avantajı, spesifik ve potansiyel olarak miRNA'ları inhibe etmesi ve bunun sonucunda yüzlerce geni etkilemesidir (161).

Tedavide kullanılan miRNA'ların hücre alınımlı ve stabilitesini geliştirmek için gerekli olan yaklaşımlar; nükleik asidin kimyasal modifikasyonları ve miRNA'ların koruyucu partiküller içine çeşitli yöntemler ile paketlenmesini içerir. Bu modifikasyonların en önemli ikisi 2' O-metil (2'-OMe), 0-2' metiletil (2'-MOE)'dir. Locked nükleik asitler (LNA) olarak adlandırılan moleküllerde ise termal stabilitenin arttığı ve DNA/RNA hedeflerinin tanınmasının zenginleştiği görülmüştür. Bunlara ilave olarak kolesterol ve 3'-benzen-pridin gibi moleküllerin bağlanması ile miRNA'ların hücre içine alınmasının kolaylaştığı bildirilmiştir (162-164).

miRNA'ların hedef bölgeye in vivo olarak gönderilmesi sırasında nükleaz aracılı degradasyona dayanıklı olması gerekmektedir. Bunun için miRNA'lar bazı kimyasal modifikasyonlara maruz kalmaktadır. Bununla birlikte bu kimyasal modifikasyonlar düşük miRNA aktivitesine ve bu moleküllerin degradasyonu sonucu toksik metabolitlerin üretilmesine neden olmaktadır. miRNA modifikasyonlarındaki bu sınırlamalar sonucunda çıplak haldeki miRNA'nın in vivo koşullardan ve nükleazlardan korunması için daha uygun iletim sistemi arayışlarına gidilmiştir. miRNA ve miRNA antagomiR'lerinin ideal sistemik iletimi için hedefe güçlü bağlanmayı sağlayan, biyolojik olarak parçalanabilen ve non-immunojenik bir taşıyıcı gerektirmiştir. Bu stratejilerden birisi doğal veya sentetik olarak lipid veya polimerlerden yapılan biyolojik olarak uyumlu submikron boyutlarındaki nanotaşıyıcılardan oluşmaktadır. Nanotaşıyıcıların kullanılmasının avantajları da tümör spesifik reseptörler için yüksek affiniteli ligandlar ile kaplanabilmesi ve bu taşıyıcıların salıverilmesinin sürekli kontrol edilmesidir. miRNA'ların hücreye alınımı sırasında kullanılan bu nanotaşıyıcılardan en dikkat çekici olanı 1,2-dioleoil-sn-glisero-3-fosfatidilkolin (DOPC)'dır. Bir nötral nanolipozom olan DOPC molekülünün kullanılmasının avantajları, toksisitesinin olmaması, biyolojik olarak uyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilen bir yapıda olmasıdır. Bir diğer nanopartikül ise pozitif yük taşıyan kitosandır. Kitosan molekülü miRNA ve siRNA'nın hücreye alınmasında oldukça güvenilir ve etkin bir yapıdadır. Bunlara ilave olarak miRNA'nın hücreye alınması sırasında kullanılan ve oldukça umut verici olan modifiye edilmiş yüksek yoğunluklu lipoprotein (rl-IDL) nanopartikülü ile ilgili ileri çalışmalar da devam etmektedir (158).

MikroRNA Süngerleri:

miRNA süngerleri translasyonel başlama kodonu bulunmayan tek zincirli miRNA'lardır. Endojen miRNA'lar için birden fazla bağlanma bölgesine sahip olan ve miRNA ile onun endojen hedefi arasındaki bağlanmayı engelleyen sentetik miRNA'lardır (155).

miRNA'lar hedef bölgeyi tanımak için büyük özgüllükte belirleyici özelliğe sahip olan ve sayısı 2-7 arasında değişen nükleotidleri taşırlar. miRNA Süngerleri, ilgili miRNA üzerinde birden fazla, ardışık (en fazla 7) tamamlayıcı bağlanma bölgesi taşırlar

ve miRNA geninin çekirdek bölgesine bağlanarak, bu miRNA ile ilişkili tüm aileyi bloke ederler (165, 166).

MikroRNA Maskeleri:

Herhangi bir miRNA yüzlerce gen tarafından düzenlenebilir veya herhangi bir gen birden fazla miRNA ile düzenlenebilir. Endojen miRNA'lara benzer olarak AMO'ların aktivasyonu gen spesifik değil, dizi spesifiktir. Bu nedenle AMO'lar, hedef dışı bölgelerde istenmeyen toksisite ve yan etkiler gösterebilir. Xiao ve arkadaşları (167) endojen miRNA'ların hedef gen üzerindeki bağlanma bölgesine mükemmel tamamlayıcılık gösteren bir nükleotit dizisi dizayn etmişlerdir. miRNA maskeleri, hedef mRNA'ya yüksek affinite ile bağlanarak duplex oluştururlar ve hedef mRNA'nın yıkılmasına neden olurlar (156). Böylece AMO'larda olduğu gibi yan etkiler ve toksisite gözlenmemektedir (167).

2. 3. 9. Tümör Baskılayıcı miRNA Tabanlı Tedavi Stratejileri

Tümör baskılayıcı olarak kullanılan miRNA tabanlı tedaviler, miRNA mimiklerini içerir.

MikroRNA Mimikleri:

Çift iplikli yapılar olan miRNA mimikleri, endojen miRNA'lar ile tam olarak eşleşebilen küçük, sentetik dizilerdir (155). miRNA antagonistleri, hastalıklı dokulardaki endojen miRNA'ları etkisizleştirmek için kullanılırken miRNA mimikleri fonksiyon eksikliğini gidermek için kullanılırlar. miRNA let-7'nin bir çok kanser türünde tümör baskılayıcı olduğu gösterilmiştir. İn vitro çalışmalarda akciğer kanseri hücre dizilerinde sentetik olarak üretilen çift iplikli Let-7 mimiklerinin hücre büyüme ve migrasyonunu inhibe ettiği; hücre siklusunu da durdurduğu gösterilmiştir (168).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmaya Ocak 2005 – Şubat 2015 tarihleri arasında Gaziantep Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Şahinbey Uygulama ve Araştırma Hastanesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği'ne başvuran 38 adet atipili EH tanısı almış (1. hasta grubu), 44 adet atipisiz EH tanısı almış (2. hasta grubu) ve 44 adet benign endometriyal örnekleme tanısı almış hasta (kontrol grubu) dahil edildi. Bu hastalardan benzer endikasyonlarla alınan endometriyal biyopsilere ait parafin bloklar, Gaziantep Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Şahinbey Uygulama ve Araştırma Hastanesi, Patoloji Anabilim Dalı arşivinden temin edildi. Çalışma için Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun 02.11.2015 tarihli 302 karar no'lu onayı alındı.

Retrospektif olgu-kontrol şeklinde tasarlanmış bir çalışma olduğundan hasta ve kontrol gruplarına ait tanı, anamnez ve diğer özellikler hastanemizde kullanılmakta olan hasta otomasyon sistemi veritabanından elde edildi. Kontrol grubu için, anormal uterin kanama nedeniyle probe D&C (dilatasyon ve küretaj) yapılan ve sonuçları benign olarak raporlanan hastalara ait parafin bloklar seçildi. Probe D&C sonuçları atipili ve atipisiz EH olarak raporlanan hastalardan biyopsiyi takiben histerektomi yapılanları saptandı. Histerektomi materyallerine ait kesitlerin Hematoksilen-Eozin boyalı preparatları 2 farklı patolog tarafından WHO 94 kriterlerine göre değerlendirildi. Histerektomi sonuçları atipili ve atipisiz EH olarak değerlendirilen hastaların en az %80 oranında lezyon içeren parafin blokları seçildi. Atipili EH olgularının hepsi kompleks atipili EH kategorisinde; atipisiz EH olgularının 32 tanesi basit, 12 tanesi kompleks atipisiz EH kategorisindeydi. Seçilen parafin blokların yaşı minimum 1, maksimum 6 yıl olarak kaydedildi. Her bir bloktan 5 mikron kalınlığında onar adet kesit alındı ve hasta gruplarına göre isimlendirilmiş 1,5 mL'lik eppendorf tüplerine konuldu. Hedeflenen sayılar tamamlandıktan sonra tüplerde muhafaza edilen parafine gömülü doku kesitleri, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı laboratuvarına teslim edildi.

3. 1. Formalin ile fikse Parafine Gömülü Dokulardan miRNA Ekspresyon Ölçümü

Hasta ve kontrol gruplarına ait formalin ile fikse parafine gömülü dokulardan çalışmayı amaçladığımız miRNA 204-5p, miRNA 138-5p ve miRNA 133-3p ekspresyon düzeyleri qRT-PCR yöntemi kullanılarak aşağıdaki sıra ve algoritma ile ölçüldü. miRNA ekspresyon düzeylerinin normalizasyonu için U6 geni referans (house-keeping gene) alındı. Her bir numunenin miR-204, miR-138, miR-133 ve U6 gen C_T (cycle threshold) değeri elde edildi. Maksimum C_T değeri 39' un altında bulundu. Her miRNA'nın, U6 genine göre ΔC_T hesabı yapıldı. Rölatif ekspresyon düzeylerinin hesaplanması için ortalama $2^{-\Delta\Delta C_T}$ metodu kullanıldı. miRNA ekspresyon düzeylerinin ölçülmesi için Qiagen miScript PCR System Kit kullanıldı.

Parafine Gömülü Dokudan RNA İzolasyonu

1. Parafine gömülü olan dokular (1,5 ml eppendorf içinde) üzerine 70 °C' de ısıtılmış 1ml ksilen eklendi ve 2 dakika en yüksek devirde santrifüj edildi.
2. Süpernatant kısmı dikkatlice uzaklaştırıldı.
3. Pelletin üzerine 1 ml (%100) ethanol eklenip, vortekslenip maksimum hızda 2 dakika santrifüj edildi.
4. Süpernatant kısmı dikkatlice uzaklaştırıldı.
5. Tüplerin kapağı açılarak 10 dakika oda sıcaklığında ya da 37 °C' de bekletildi.
6. 240 µl Buffer PKD eklenip vortekslendi.
7. 10 µl Proteinaz K yavaşça pipetlendi.
8. 56 °C' de 15 dakika, 80 °C' de 15 dk bekletildi (3-5 dakikada bir vortekslendi).
9. Buz bloğunda 3 dakika inkübe edildi.
10. 13.500 rpm' de 15 dakika santrifüj edilerek süpernatantlar yeni 2 ml'lik eppendorf tüplerine aktarıldı.
11. 25 µl DNase Booster Buffer eklendi.
12. 10 µl DNase I stok solüsyonu eklenerek elle alt üst edilip, kısa süreli santrifüj edildi.
13. Oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.
14. 500 µl Buffer RBC eklenerek, oluşan lizat dikkatlice karıştırıldı.
15. 1750 µl %100 Ethanol eklenerek pipetaj yapıldı.

16. 700 µl olacak şekilde spin kolonlara transfer edilerek 1000 rpm' de 15 saniye santrifüj edildi. Bu işlem, ethanolün tamamı eklenene kadar yaklaşık 3 defa tekrar edildi.
17. 500 µl RPE eklenerek 10.000 rpm' de 15 saniye santrifüj edildi. Alttaki kolon yenilendi.
18. 500 µl RPE eklenerek 10.000 rpm' de 2 dakika santrifüj edildi. Alttaki kolon yenilendi.
19. Tüpler kapağı açık bir şekilde maksimum hızda 5 dakika santrifüj edildikten sonra filtreli kısımları yeni 1.5 ml'lik eppendorf tüplere transfer edildi.
20. 20 µl RNase free Water, tüpün filtreli kısmının tam ortasına bırakılarak 1 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve maksimum hızda 1 dakika santrifüj edildi.
21. -80 °C'de muhafaza edildi.

miRNA'dan cDNA Eldesi

1. cDNA (kalıp, complementary DNA)'lar, Qiagen miScript Reverse Transcription (RT) Kit II (Hilden, Almanya) kullanılarak sentezlendi.
2. Tablo 8'ye göre RT toplam karışımı buz üzerinde hazırlanıp, RNA'nın miktarı 20 µl hacim içerisinde 200 ng/µl olacak şekilde ayarlandı.
3. RNA, RT karışımı içeren her bir tüpe eklendi. Kısa bir santrifüj edilip, buz üzerine tekrar bırakıldı.

Tablo 8. cDNA için Bileşenler ve Miktarları

Bileşenler	Tepkime Hacmi
5x miScript HiSpec tamponu	2 µl
10x miScript Nükleik asit karışımı	1 µl
miScript Reverse Transcriptase Mix	1 µl
RNase free water	Değişken (ör: 6-x eklenir.)
Kalıp RNA	Değişken (ör: x hacmi bulunur.)
Toplam Hacim	10 µl

37°C' de 60 dakika, 95°C' de 5 dakika olan tepkime koşullarına göre RT-PCR yapıldı. Sonrasında cDNA miktarları 50 ng/µl olacak şekilde ayarlanıp, qRT-PCR için

kullanıma hazır hale getirildi. cDNA'ların kullanım ömrünü uzatmak için -80 °C'de muhafaza edildi.

qRT-PCR (Real Time-PCR, Gerçek Zamanlı-PCR)

qRT-PCR için, tepkime bileşenleri Qiagen miScript SYBR Green PCR kiti kullanılarak hazırlandı. Tablo 9' daki bileşenlerin tepkime hacimlerine göre kullanıldı.

Tablo 9. qRT-PCR için Kullanılan Bileşenlerin Oranları

Bileşenler	Hacim
2x QuantiTect SYBR Green PCR Toplam Karışım	6.25 µl
10x miScript Universal Primer	1.25 µl
10x miScript Primer Assay (ilgili miRNA primer)	1.25 µl
RNaz içermeyen su	3,125 µl
Kalıp cDNA (50ng/ul'den alındı. Sonuç 5 ng/µl)	0,63 µl
Toplam hacim	12.5 µl

Buz üzerinde tepkime bileşenleri hazırlandı ve uygun tüplere cDNA'lar ile dağıtılıp, qRT- PCR Rotor- Gene Q (Qiagen) cihazına yüklendi. Tablo 10'daki qRT-PCR tepkime koşullarına göre tespit işlemleri gerçekleştirildi.

Tablo 10. qRT-PCR Tepkime Koşulları

Sıcaklık (°C)	Zaman(dk)	
95	15	} 40 döngü
94	15	
55	30	
70	30	

3. 2. İstatistiksel Yöntem

Ekspresyon değerlerinin normal dağılıma uygunluk kontrolünde Kolmogorov Smirnov testi kullanılmıştır. Normal dağılıma sahip olmayan ölçümlerin 3 grupta

karşılaştırılmasında Kruskal Wallis ve alt gruplar arası farkların test edilmesinde Dunn testleri kullanılmıştır. Tanıtıcı istatistik olarak ortalama $\pm$ standart sapma ve medyan [%25-%75] değerleri verilmiştir. İstatistiksel analizler için SPSS 22.0 paket programı kullanılmış ve p değeri 0.05' in altında ise anlamlı kabul edilmiştir.



4. BULGULAR

Çalışmamıza anormal uterin kanama şikayetiyle hastanemize başvuran ve tanısal amaçla endometriyal örnekleme yapılan 126 hasta dahil edildi. Patoloji değerlendirmesi sonucu atipisiz EH olan 44 hasta, atipili EH olan 38 hasta ve normal endometrium olan 44 hastadan oluşan 3 grup mevcuttu (Tablo 11). Retrospektif olgu-kontrol çalışması olarak tasarlanan çalışmamızda parafinlenmiş doku bloklarından alınan kesitlerde yeterli miRNA izolasyonu yapılamayan hastalar çalışmanın haricinde tutuldu.

Tablo 11. Olguların Tanı Dağılım Oranları

Tanı	Hasta Sayısı (n)	Hasta Yüzdesi (%)
Atipili Endometriyal Hiperplazi	38	%30
Atipisiz Endometriyal Hiperplazi	44	%35
Kontrol	44	%35
Toplam	126	%100

4. 1. Yaş

Çalışma kapsamındaki atipili EH grubunun yaş ortalaması $53,08 \pm 12,29$ olup minimum ve maksimum değerleri sırasıyla 31 ve 75'ti. Atipisiz EH grubunun yaş ortalaması $44,8 \pm 8,47$ olup minimum ve maksimum değerleri sırasıyla 29 ve 76 idi. Kontrol grubunun yaş ortalaması $40,75 \pm 6,8$ olup minimum ve maksimum değerleri sırasıyla 24 ve 53'tü. Gruplar arasında yaş yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlendi ($p=0,001$)(Tablo 12). Yaşa göre miRNA 204-5p, miRNA 138-5p ve miRNA

133-3p ekspresyon düzeyleri yönünden anlamlı bir farklılık saptanmadı (minimum p değeri = 0,332)(Tablo 13).

Tablo 12. Yaş Dağılımı Ortalama Değerleri ve Hasta Grupları Arası Dağılım Farkları

Karşılaştırılan Grup	Yaş	Referans Grup	p Değeri
Kontrol (n=44)	40,75±6,8	Atipili EH	0,001*
		Atipisiz EH	0,044*
Atipili EH (n=38)	53,08±12,29	Kontrol	0,001*
		Atipisiz EH	0,001*
Atipisiz EH (n=44)	44,8±8,47	Kontrol	0,044*
		Atipili EH	0,001*

* p<0,05 düzeyinde anlamlı

Tablo 13. Hasta Gruplarının Yaş Dağılımına göre miRNA Ekspresyon Düzeyleri

Grup Adı	miRNA Adı	P Değeri
Kontrol (n=44)	miRNA 204-5p	0,340
	miRNA 133-3p	0,528
	miRNA 138-5p	0,474
	Yaş	-
Atipili EH (n=38)	miRNA 204-5p	0,349
	miRNA 133-3p	0,332
	miRNA 138-5p	0,655
	Yaş	-
Atipisiz EH (n=44)	miRNA 204-5p	0,760
	miRNA 133-3p	0,703
	miRNA 138-5p	0,752
	Yaş	-

4. 2. miRNA 204-5p, miRNA 138-5p ve miRNA 133-3p Ekspresyon Düzeylerinin Gruplar Arası Dağılımı

miRNA 204-5p, miRNA 138-5p ve miRNA 133-3p ekspresyon düzeyleri yönünden gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı ($p=0,001$) (Tablo 14).

Tablo 14. miRNA 204-5p, miRNA 138-5p ve miRNA 133-3p Ekspresyon Düzeylerinin Gruplara Göre Dağılımı

	Kontrol	Atipili EH	Atipisiz EHi	p
	Medyan-IQR	Medyan-IQR	Medyan-IQR	
miRNA204-5p	0,01568 [0,00503-0,05390]	0,00401 [0,00132-0,01665]	0,00307 [0,00168-0,00942]	0,001*
miRNA 133-3p	0,00018 [0,00006-0,00073]	0,00099 [0,00035-0,01047]	0,00003 [0,00002-0,00007]	0,001*
miRNA138-5p	0,00084 [0,00040-0,00633]	0,00649 [0,00357-0,03399]	0,00017 [0,00008-0,00104]	0,001*

IQR: %25-%75'likler arası fark, * gruplar arası dağılım $p<0,05$ düzeyinde anlamlı

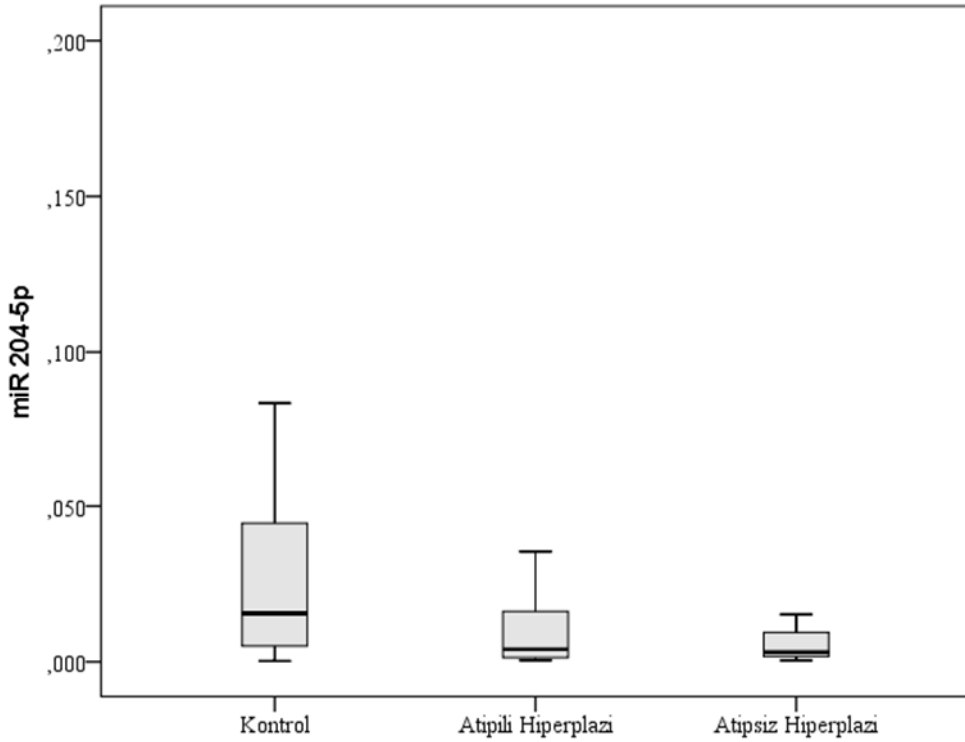
4. 2. 1. miRNA 204-5p Ekspresyon Düzeyi

Her bir grup kendi arasında karşılaştırıldığında atipisiz EH hasta grubu ile kontrol grubu ve atipili EH hasta grubu ile kontrol grubu arasında ekspresyon düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (p değerleri sırasıyla 0,001 ve 0,004). Ancak, atipili EH ile atipisiz EH grupları arasında miRNA 204-5p ekspresyonu açısından anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0,358$) (Tablo 15)(Şekil 7).

Tablo 15. miRNA Düzeyi Değişikliklerinin p Değerleri üzerinden Gruplar Arası Kıyaslanması

	miRNA240-5p	miRNA 133-3p	miRNA138-5p
Atipisiz EH - Kontrol	0,001*	0,001*	0,001*
Atipili EH - Kontrol	0,004*	0,001*	0,005*
Atipili EH – Atipisiz EH	0,358	0,001*	0,001*

* $p<0,05$ düzeyinde anlamlı



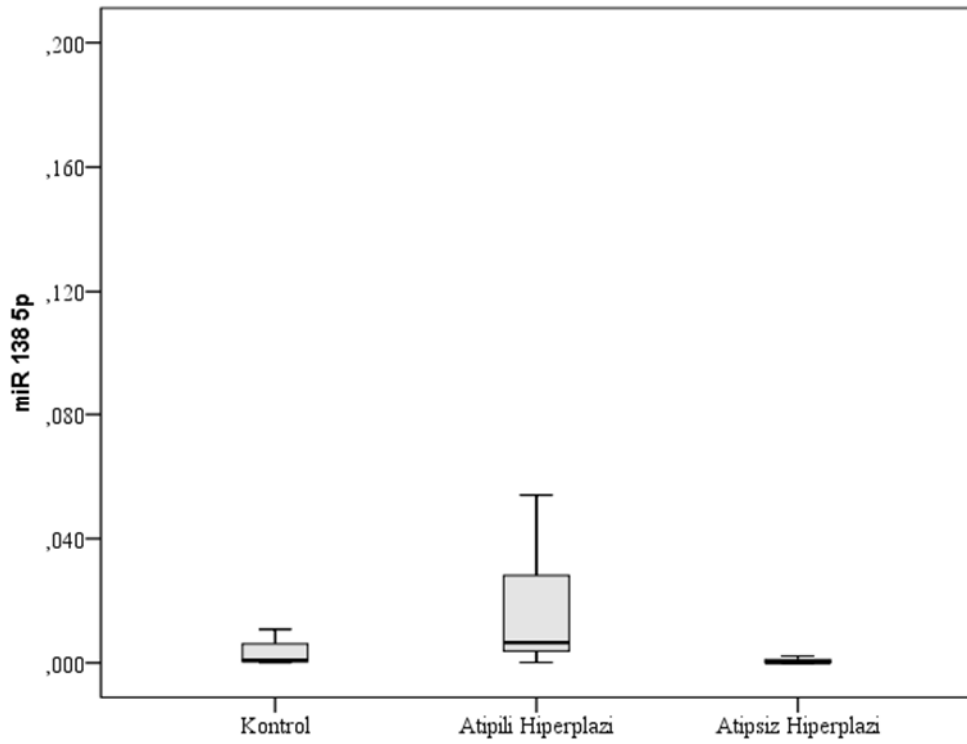
Şekil 7. miRNA 204-5p'nin Ekspresyon Oranın Gruplar Arası Dağılımı

4. 2. 2. miRNA 138-5p Ekspresyon Düzeyi

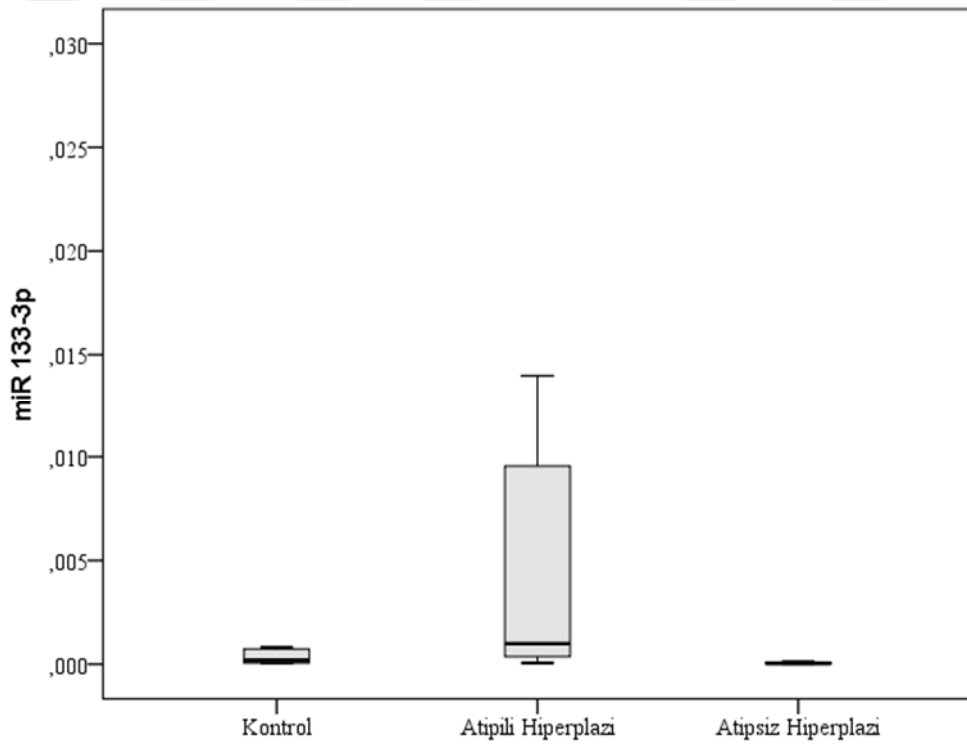
Her bir grup kendi arasında karşılaştırıldığında atipisiz EH hasta grubu ile kontrol grubu; atipili EH hasta grubu ile kontrol grubu ve atipili EH ile atipisiz EH grupları arasında ekspresyon düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (p değerleri sırasıyla 0,001; 0,005 ve 0,001) (Tablo 15) (Şekil 8).

4. 2. 3. miRNA 133-3p Ekspresyon Düzeyi

Her bir grup kendi arasında karşılaştırıldığında atipisiz EH hasta grubu ile kontrol grubu; atipili EH hasta grubu ile kontrol grubu ve atipili EH ile atipisiz EH grupları arasında ekspresyon düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (p değerleri sırasıyla 0,001; 0,001 ve 0,001) (Tablo 15) (Şekil 9).



Şekil 8. miRNA 138-5p'nin Ekspresyon Oranın Gruplar Arası Dağılımı



Şekil 9. miRNA 133-3p'nin Ekspresyon Oranın Gruplar Arası Dağılımı

4. 3. miRNA Ekspresyon Düzeylerinin Gruplar arası Kat Değişimleri

Kat değişimi (Fold Change = FC), bir gruptaki gen ekspresyon düzeyinin referans (kontrol) gruba göre kaç kat arttığını ya da azaldığını belirtmek için kullanılan bir ölçüdür. Ekspresyon azalmasının olduğunu göstermek için sayısal değerin önüne (-) işareti konabilir. Örneğin, X geni kontrol grubunda 80 değerinde eksprese olurken hasta grubunda 20 düzeyinde eksprese oluyorsa, X geni hasta grubunda kontrol grubuna göre 0,75 kat daha az eksprese olmuş denebilir ve ortalama FC= (-0,75) olarak gösterilebilir. Öte yandan, X geni kontrol grubunda 20 değerinde eksprese olurken hasta grubunda 80 değerinde eksprese oluyorsa, X geni hasta grubunda kontrol grubuna göre 3 kat daha fazla eksprese olmuş denebilir ve ortalama FC= 3 olarak gösterilebilir.

Bizim çalışmamızda %95 güven aralığında p değeri 0,05' in altında $FC \leq -0,5$ ve $FC \geq 2$ olması anlamlı kabul edildi (Tablo 16).

Tablo 16. miR-204-5p, miR-138-5p ve miR-133-3p Ekspresyon Düzeylerinin Ortalama Kat Değişimleri

miRNA	Grup 1-Grup 2	Ortalama Kat Değişimi (FC)	p değeri
miR- 204-5p	Atipili EH→Kontrol	-0,75*	0,004*
	Atipisiz EH→Kontrol	-0,80*	0,001*
	Atipili EH→Atipisiz EH	0,3	0,358
miR- 138-5p	Atipili EH→Kontrol	6,7*	0,005*
	Atipisiz EH→Kontrol	-0,80*	0,001*
	Atipili EH→Atipisiz EH	37*	0,001*
miR-133-3p	Atipili EH→Kontrol	4,5*	0,001*
	Atipisiz EH→Kontrol	-0,83*	0,001*
	Atipili EH→Atipisiz EH	32*	0,001*

* p< 0,05 ve %95 güven aralığında $FC \leq -0,5$ ve $FC \geq 2$ anlamlı

5. TARTIŞMA

Endometriyal Hiperplazi (EH), endometriyal glandların düzensiz boyut ve şekillerde çoğalması durumudur. Proliferatif endometrium ile kıyaslandığında, endometriyal glandların stromaya oranının artmış olduğu görülür. Hemen hemen her zaman progesteron tarafından dengelenmemiş kronik östrojen uyarısına bağlı geliştiği bilinmektedir (3).

EH'ler, önemli bir anormal uterin kanama nedeni olup en yaygın endometrium kanser tipi olan tip 1 endometrium kanserinin prekürsörüdür (2).

EH'ler ve EİN endojen veya eksojen östrojenik stimülasyona verilen proliferatif bir cevap olarak ortaya çıkmaktadır. Bu anlamda, risk faktörleri tip 1 (östrojen bağımlı) endometrium kanseri gelişiminde rol oynayan faktörlere benzerdir. Buna göre en önemli risk faktörleri progesteronsuz postmenopozal östrojen tedavisi, tamoksifen kullanımı, nulliparite, Polikistik Over Sendromu (PCOS) gibi kronik anovulasyona neden olan klinik durumlar, obezite ve granuloza hücreli tümörler ve tekomalar gibi östrojen salgılayan tümörlerdir (31,41).

EH'ler anormal uterin kanaması olan kadınlarda %1.5-15 oranında, tüm histerektomilerde ise %5'e varan oranlarda saptanmaktadır. Tanı anında hastalar en sık 50-54 yaş arasındadır. Atipili hiperplaziler atipisizlere göre daha geç yaşta tanı alır (14,15). EİN ise tüm endometriyal biyopsilerin %1.4 kadarında saptanır. Hastalar tanı anında ortalama 53 yaşındadır ve EİN tanısı endometrium kanseri tanısından ortalama 4 yıl önce konmaktadır (36, 37, 40).

Bizim çalışmamızda da EH tanısı almış hastaların yaş ortalaması atipisiz EH için 44 ile atipili EH için 53 olarak bulunmuştur.

Kuokkaen S. ve arkadaşları (130) sekresyon fazının ortasında siklin, siklin bağımlı kinaz ve E2F transkripsiyon faktör 3 gibi hücre döngüsünde etkisi olan genleri baskılayacak kadar eksprese olan 12 miRNA (miR-29b, miR-29c, miR-30b, miR-30d,

miR-31, miR-193a-3p, miR-203, miR-204, miR-200c, miR-210, miR-582-5p ve miR-345) tanımlamışlardır (130, 131). Bu çalışma, miRNA'ların hücre döngüsünü etkileyerek proliferasyon ve sekresyon fazında endometriumdaki hücre çoğalmasını düzenlediğini göstermektedir.

Zhang R. ve arkadaşları (169), endometial hiperplazi ve kanserli hücrelerde let-7 ve miR-27a'nın BAX genini baskılayıp hücrede Bcl-2/BAX dengesini bozacak şekilde upregüle olduklarını göstermiş ve bu hücrelerin yaşam süresi ile proliferatif etkinliğinin arttığını göstermişlerdir.

Lee H. ve arkadaşları (132), toplam 75 olguyu kapsayan bu çalışmada, parafine gömülü dokulardan elde ettikleri tip 1 endometrium adenokanseri, kompleks atipili EH, basit atipisiz EH ve normal endometrium doku kesitlerinde miR-205, miR-183, miR-200c, miR-200a, miR-182 ve miR-21 ekspresyon düzeylerini kıyaslamışlar ve bunlardan ilk beşinin adenokarsinomlu olgularda diğer gruplara göre anlamlı düzeyde yüksek olduğunu bulmuşlardır. Ancak, bu miRNA'ların ekspresyon düzeyleri yönünden hiperplazik ve normal endometrium arasında anlamlı bir fark bulamamışlardır.

Karaayvaz M. ve arkadaşları (154) endometrium kanserli 48 olguya ait parafine gömülü doku kesitlerinde miR-205'in normal endometriumla kıyasla anlamlı ölçüde arttığını; ekspresyon düzeyinin kanserin evresi ile korelasyon gösterdiğini ve bu nedenle endometriyal kanserde prognostik açıdan potansiyel bir biyobelirteç olduğunu bulmuşlardır.

Yamamoto N. ve arkadaşları (9) endometrium kanser hücre dizilerinde tümör baskılayıcı olan miR-133'ün PDE7A genini susturarak hücrelerel migrasyon ve invazyonu inhibe ettiklerini göstermişlerdir.

Literatürde yapılan benzer çalışmalardan yola çıkarak atipili ve atipisiz endometriyal hiperplazilerdeki miRNA 204-5p, miRNA 138-5p ve miRNA 133-3p ekspresyon düzeylerini değerlendirdik ve tümör baskılayıcı oldukları bilinen bu miRNA'ların normal endometriumla kıyasla endometriyal hiperplazilerde nasıl değiştiklerini irdeledik.

İngilizce literatürdeki çalışmaları incelediğimizde miRNA 204-5p, miRNA 138-5p ve miRNA 133-3p'nin serviks, endometrium, meme, akciğer, mide, kolorektal, santral sinir sistemi, mesane, prostat kanserlerinde araştırılmış olduğunu ancak endometriyal hiperplazi tanısı almış hastalara ait parafine gömülü dokularda çalışılmadığını gördük.

Çalışmamızdaki 126 adet vakadan 82 tanesinin endometriyal hiperplazi olması nedeniyle parafine gömülü dokuda miRNA profillemesinin yapıldığı literatürdeki en geniş örnek hacimli endometriyal hiperplazi çalışmasıdır.

Çalışmamızda, miR-204 ekspresyonunun endometriyal hiperplazi grubunda kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde azaldığını bulmamız, tümör süpresör miRNA ekspresyonlarının henüz kanser gelişmeden anlamlı ölçüde düştüğünü desteklemektedir. miRNA 138-5p ve miRNA 133-3p'yi tümör süpresör miRNA'lar oldukları halde atipili EH olgularında atipisiz olgulara oranla anlamlı ölçüde yüksek bulmamız literatür ile çelişiyor gibi görünse de iyi diferansiye endometrioid karsinomun bir öncü lezyonu olan atipili hiperplazi hücrelerinde malign transformasyona karşı protektif bir cevap olarak arttıkları düşünülebilir. Ancak, miRNA bazlı terapiler göz önüne alındığında miRNA-204-5p temelli bir tedavi seçeneğinin tümör gelişimini önleme ve regrese etme konusunda daha istikrarlı bir etki oluşturacağı düşünülebilir. Serum, plazma, canlı doku ya da parafine gömülü dokularda endometrium ile ilişkili olabilecek tümör süpresör ya da onkojenik miRNA'ların çok daha geniş EH vaka serilerinde çalışılması ve bu çalışmaların arttırılması, endometriyal hiperplazi tanısı, tedavisi ve prognozunda yeniliklere kapı açabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Etyopatogenezinde sıklıkla progesteron ile karşılanmamış östrojen düzeyinin rol oynadığı, nükleer atipi varlığının kansere dönüşümle pozitif yönde korelasyon gösterdiği ve tanı sonrası takibinde zorluklar olabilen endometriyal hiperplazilerde, endometrium kanseri ile ilişkisi gösterilmiş miR 204-5p ve miR 133-3p ile birlikte ilişkisi henüz ortaya konmamış miR 138-5p ‘nin dahil olduğu 3 tümör süpresör mikroRNA’ nın parafine gömülü dokulardaki ekspresyon düzeylerini tesbit edip kıyasladığımız çalışmada, elde ettiğimiz sonuçlar şunlardır;

1. Endometriyal hiperplazili ve kontrol grubu arasında miRNA 204-5p, miRNA 138-5p ve miRNA 133-3p ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı farklılık izlendi.
2. Üç grup arasında yaş ortalamaları açısından anlamlı farklılık izlendi.
3. miRNA 204-5p’nin endometriyal hiperplazili grupta kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde daha az eksprese olduğu saptandı.
4. Kontrol ve atipisiz EH grubuna nazaran atipili EH grubunda daha düşük çıkması beklenen miRNA 138-5p ve miRNA 133-3p düzeyleri tam tersine her iki gruptan anlamlı derecede yüksek bulundu.
5. miRNA 204-5p’nin ekspresyon düzeyi açısından atipili ve atipisiz EH grupları arasında anlamlı farklılık saptanmadı.
6. Atipili EH’de daha yüksek saptanan miRNA 138-5p ve miRNA 133-3p, atipisiz EH’de kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede düşük bulundu.
7. miRNA ekspresyon düzeyleri ile yaş arasında anlamlı korelasyon izlenmedi.

İngilizce literatürdeki çalışmaları incelediğimizde miRNA 204-5p, miRNA 138-5p ve miRNA 133-3p’nin serviks, endometrium, meme, akciğer, mide, kolorektal, santral sinir sistemi, mesane, prostat kanserlerinde araştırılmış olduğunu ancak, endometriyal hiperplazi tanısı almış hastalara ait parafine gömülü dokularda çalışılmadığını gördük.

Çalışmamızdaki 126 adet vakadan 82 tanesinin endometriyal hiperplazi olması nedeniyle parafine gömülü dokuda miRNA profillemesinin yapıldığı literatürdeki en geniş örnek hacimli ilk endometriyal hiperplazi çalışmasıdır.

Çalışmamızda miR-204 ekspresyonunun endometriyal hiperplazi grubunda kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde azaldığını bulmamız, tümör süpresör miRNA'ların henüz kanser gelişmeden anlamlı ölçüde düştüğünü desteklemektedir. miRNA 138-5p ve miRNA 133-3p, tümör süpresör miRNA'lar oldukları halde atipili EH olgularında atipisiz olgulara oranla anlamlı ölçüde yüksek bulmamız literatür ile çelişiyor gibi görünse de iyi diferansiye endometrioid karsinomun bir öncü lezyonu olan atipili hiperplazi hücrelerinde malign transformasyona karşı protektif bir cevap olduğu düşünülebilir. Ancak, miRNA bazlı terapiler göz önüne alındığında miRNA-204-5p temelli bir tedavi seçeneğinin tümör gelişimini önleme ve regrese etme konusunda daha istikrarlı bir etki oluşturacağı düşünülebilir. Serum, plazma, canlı doku ya da parafine gömülü dokularda endometrium ile ilişkili olabilecek tümör süpresör ya da onkojenik miRNA'ların çok daha geniş EH vaka serilerinde çalışılması ve bu çalışmaların artırılması, endometriyal hiperplazi tanısı, tedavisi ve prognozunda yeniliklere kapı açabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, Ninth Edition 2014, Chapter 22, pp.1007-1008.
2. Mescher A.L. Junqueira's Basic Histology Text and Atlas 13th Edition. McGraw – Hill Education 2013, p.463.
3. Hedrick Ellenson L, Ronnett BM, Kurman RJ. Precursor Lesions of Endometrial Carcinoma. In: Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract, 6th ed, Kurman RJ, Hedrick Ellenson L, Ronnett, BM. (Eds), Springer, New York 2010. p.360-361.
4. World cancer research fund international. Cancer facts and figures: Endometrial cancer rates. www.wcrf.org/cancer_statistics (Accessed on January 30, 2013).
5. Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin 2011; 61:69.
6. Appasani K (Ed), MicroRNAs from basic science to disease biology. Cambridge University Press 2008. p.295
7. Banno K, Yanokura M, Kisu I, et al. MicroRNAs in endometrial cancer.Int J Clin Oncol. 2013 Apr;18(2):186-92.
8. Megumi Yanokura, Kouji Banno, Miho Iida et al. MicroRNAs in endometrial cancer: recent advances and potential clinical applications. EXCLI J. 2015; 14: 190–198.
9. Yamamoto N, Nishikawa R, Chiyoumaru T. et al. The tumor-suppressive microRNA-1/133a cluster targets PDE7A and inhibits cancer cell migration and invasion in endometrial cancer. Int J Oncol. 2015 ;47(1):325-34.
10. Hedrick Ellenson L, Ronnett BM, Kurman RJ. Precursor Lesions of Endometrial Carcinoma. In: Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract, 6th ed, Kurman RJ, Hedrick Ellenson L, Ronnett, BM. (Eds), Springer, New York 2010. p.360-361.
11. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Endometrial Hyperplasia: Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease Ninth Edition. Elsevier Saunders 2015. p.1012-1013
12. Scully RE, Bonfiglio TA, Kurman, et al. Uterine corpus. In: Histological Typing of Female Genital Tract Tumours, 2nd ed., Springer-Verlag, New York 1994. p.13.
13. Zaino RJ, Kauderer J, Trimble CL, et al. Reproducibility of the diagnosis of atypical endometrial hyperplasia: a Gynecologic Oncology Group study. Cancer 2006; 106:804.

14. Kendall BS, Ronnett BM, Isacson C, et al. Reproducibility of the diagnosis of endometrial hyperplasia, atypical hyperplasia, and well-differentiated carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1998; 22:1012.
15. Bergeron C, Nogales FF, Masseroli M, et al. A multicentric European study testing the reproducibility of the WHO classification of endometrial hyperplasia with a proposal of a simplified working classification for biopsy and curettage specimens. *Am J Surg Pathol* 1999; 23:1102.
16. Skov BG, Broholm H, Engel U, et al. Comparison of the reproducibility of the WHO classifications of 1975 and 1994 of endometrial hyperplasia. *Int J Gynecol Pathol* 1997; 16:33.
17. Trimble CL, Kauderer J, Zaino R, et al. Concurrent endometrial carcinoma in women with a biopsy diagnosis of atypical endometrial hyperplasia: a Gynecologic Oncology Group study. *Cancer* 2006; 106:812.
18. Kurman RJ, Kaminski PF, Norris HJ. The behavior of endometrial hyperplasia. A long-term study of "untreated" hyperplasia in 170 patients. *Cancer* 1985; 56:403.
19. Lacey JV Jr, Sherman ME, Rush BB, et al. Absolute risk of endometrial carcinoma during 20-year follow-up among women with endometrial hyperplasia. *J Clin Oncol* 2010; 28:788.
20. Rakha E, Wong SC, Soomro I, et al. Clinical outcome of atypical endometrial hyperplasia diagnosed on an endometrial biopsy: institutional experience and review of literature. *Am J Surg Pathol* 2012; 36:1683.
21. Pennant S, Manek S, Kehoe S. Endometrial atypical hyperplasia and subsequent diagnosis of endometrial cancer: a retrospective audit and literature review. *J Obstet Gynaecol* 2008;28:632-3.
22. Mutter GL. Endometrial intraepithelial neoplasia (EIN): will it bring order to chaos? The Endometrial Collaborative Group. *Gynecol Oncol* 2000;76:287-90.
23. Baak JP, Mutter GL. EIN and WHO94. *J Clin Pathol* 2005;58:1-6.
24. Mutter GL, Baak JP, Crum CP, Richart RM, Ferenczy A, Faquin WC. Endometrial precancer diagnosis by histopathology, clonal analysis, and computerized morphometry. *J Pathol* 2000;190:462-9.
25. Jovanovic AS, Boynton KA, Mutter GL. Uteri of women with endometrial carcinoma contain a histopathological spectrum of monoclonal putative precancers, some with microsatellite instability. *Cancer Res* 1996;56:1917-21.
26. Mutter GL, Ince TA, Baak JP, Kust GA, Zhou XP, Eng C. Molecular identification of latent precancers in histologically normal endometrium. *Cancer Res* 2001;61:4311-4.

27. Mutter GL, Lin MC, Fitzgerald JT, Kum JB, Eng C. Changes in endometrial PTEN expression throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:2334-8.
28. Baak JP, Ørbo A, van Diest PJ, Jiwa M, de Bruin P, Broeckaert M, Snijders W, Boodt PJ, Fons G, Burger C, Verheijen RH, Houben PW, The HS, Kenemans P. Prospective multicenter evaluation of the morphometric D-score for prediction of the outcome of endometrial hyperplasias. *Am J Surg Pathol* 2001;25:930-5.
29. Mutter GL, Zaino RJ, Baak JP, Bentley RC, Robboy SJ. Benign endometrial hyperplasia sequence and endometrial intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Pathol* 2007;26:103-14.
30. Hecht JL, Ince TA, Baak JP, Baker HE, Ogden MW, Mutter GL. Prediction of endometrial carcinoma by subjective endometrial intraepithelial neoplasia diagnosis. *Mod Pathol* 2005;18:324-30.
31. Brinton LA, Berman ML, Mortel R, Twiggs LB, Barrett RJ, Wilbanks GD, Lannom L, Hoover RN. Reproductive, menstrual, and medical risk factors for endometrial cancer: results from a case-control study. *Am J Obstet Gynecol* 1992;167:1317-25.
32. Baak JPA, Nauta J, Wisse-Brekelmans E, Bezemer P. Architectural and nuclear morphometrical features together are more important prognosticators in endometrial hyperplasias than nuclear morphometrical features alone. *J Pathol* 1988;154:335-41.
33. Dunton C, Baak J, Palazzo J, van Diest PJ, McHugh M, Widra EA. Use of computerized morphometric analyses of endometrial hyperplasias in the prediction of coexistent cancer. *Am J Obstet Gynecol* 1996;174:1518-21.
34. Baak JP, Wisse-Brekelmans EC, Fleege JC, van der Putten HW, Bezemer PD. Assessment of the risk on endometrial cancer in hyperplasia, by means of morphological and morphometrical features. *Pathol Res Pract* 1992;188:856-9.
35. Orbo A, Baak JP, Kleivan I, Lysne S, Prytz PS, Broeckaert MA, Slappendel A, Tichelaar HJ. Computerised morphometrical analysis in endometrial hyperplasia for the prediction of cancer development. A long-term retrospective study from northern Norway. *J Clin Pathol* 2000;53:697-703.
36. Baak JP, Mutter GL, Robboy S, et al. The molecular genetics and morphometry-based endometrial intraepithelial neoplasia classification system predicts disease progression in endometrial hyperplasia more accurately than the 1994 World Health Organization classification system. *Cancer* 2005;103:2304-12.
37. Semere LG, Ko E, Johnson NR, Vitonis AF, Phang LJ, Cramer DW, Mutter GL. Endometrial intraepithelial neoplasia: clinical correlates and outcomes. *Obstet Gynecol* 2011;118:21-8.

38. Mutter GL, Kauderer J, Baak JP, Alberts D; Gynecologic Oncology Group. Biopsy histomorphometry predicts uterine myoinvasion by endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. *Hum Pathol* 2008;39:866-74.
39. Salman MC, Usubutun A, Boynukalin K, Yuce K. Comparison of WHO and endometrial intraepithelial neoplasia classifications in predicting the presence of coexistent malignancy in endometrial hyperplasia. *J Gynecol Oncol* 2010;21:97-101.
40. Carlson JW, Mutter GL. Endometrial intraepithelial neoplasia is associated with polyps and frequently has metaplastic change. *Histopathology* 2008;53:325-32.
41. Smith RA, von Eschenbach AC, Wender R, et al; ACS Prostate Cancer Advisory Committee, ACS Colorectal Cancer Advisory Committee, ACS Endometrial Cancer Advisory Committee. American Cancer Society guidelines for the early detection of cancer: update of early detection guidelines for prostate, colorectal, and endometrial cancers. Also: update 2001--testing for early lung cancer detection. *CA Cancer J Clin* 2001;51:38-75.
42. Reed SD, Voigt LF, Newton KM, Garcia RH, Allison HK, Epplein M, Jordan D, Swisher E, Weiss NS. Progestin therapy of complex endometrial hyperplasia with and without atypia. *Obstet Gynecol* 2009;113:655-62.
43. Armstrong AJ, Hurd WW, Elguero S, Barker NM, Zanotti KM. Diagnosis and management of endometrial hyperplasia. *J Minim Invasive Gynecol* 2012;19:562-71.
44. Trimble CL, Method M, Leitao M, Lu K, Ioffe O, Hampton M, Higgins R, Zaino R, Mutter GL. Management of endometrial precancers. *Obstet Gynecol* 2012;120:1160-75.
45. Gallos ID, Yap J, Rajkhowa M, Luesley DM, Coomarasamy A, Gupta JK. Regression, relapse, and live birth rates with fertility-sparing therapy for endometrial cancer and atypical complex endometrial hyperplasia: a systematic review and metaanalysis. *Am J Obstet Gynecol* 2012;207:266.e1-12.
46. Ushijima K, Yahata H, Yoshikawa H, et al. Multicenter phase II study of fertility-sparing treatment with medroxyprogesterone acetate for endometrial carcinoma and atypical hyperplasia in young women. *J Clin Oncol* 2007;25:2798-803.
47. Gunderson CC, Fader AN, Carson KA, Bristow RE. Oncologic and reproductive outcomes with progestin therapy in women with endometrial hyperplasia and grade 1 adenocarcinoma: a systematic review. *Gynecol Oncol* 2012;125:477-82.
48. Wheeler DT, Bristow RE, Kurman RJ. Histologic alterations in endometrial hyperplasia and well-differentiated carcinoma treated with progestins. *Am J Surg Pathol* 2007;31:988-98.

49. Randall TC, Kurman RJ. Progestin treatment of atypical hyperplasia and well-differentiated carcinoma of the endometrium in women under age 40. *Obstet Gynecol* 1997;90:434-40.
50. Salman MC, Usubutun A, Dogan NU, Yuce K. The accuracy of frozen section analysis at hysterectomy in patients with atypical endometrial hyperplasia. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2009;36:31-4.
51. Attard Montalto S, Coutts M, Devaja O, Summers J, Jyothirmayi R, Papadopoulos A. Accuracy of frozen section diagnosis at surgery in pre- malignant and malignant lesions of the endometrium. *Eur J Gynaecol Oncol* 2008;29:435-40.
52. Indermaur MD, Shoup B, Tebes S, Lancaster JM. The accuracy of frozen pathology at time of hysterectomy in patients with complex atypical hyperplasia on preoperative biopsy. *Am J Obstet Gynecol* 2007;196:e40-2.
53. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011;61:69-90.
54. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012, <http://globocan.iarc.fr>.
55. Bokhman JV. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 1983;15:10-7.
56. Felix AS, Weissfeld JL, Stone RA, Bowser R, Chivukula M, Edwards RP, Linkov F. Factors associated with Type I and Type II endometrial cancer. *Cancer Causes Control* 2010;21:1851-6.
57. Woodruff JD, Pickar JH. Incidence of endometrial hyperplasia in postmenopausal women taking conjugated estrogens (Premarin) with medroxyprogesterone acetate or conjugated estrogens alone. The Menopause Study Group. *Am J Obstet Gynecol* 1994;170(5 Pt 1):1213-23.
58. Henderson BE. The cancer question: an overview of recent epidemiologic and retrospective data. *Am J Obstet Gynecol*. 1989;161(6 Pt 2):1859-64.
59. Persson I, Adami HO, Bergkvist L, Lindgren A, Pettersson B, Hoover R, Schairer C. Risk of endometrial cancer after treatment with oestrogens alone or in conjunction with progestogens: results of a prospective study. *BMJ* 1989;298:147-51.
60. Beral V, Reeves G, Bull D, Green J; Million Women Study Collaborators. Breast cancer risk in relation to the interval between menopause and starting hormone therapy. *J Natl Cancer Inst* 2011;103:296-305.

61. Mourits MJ, De Vries EG, Willemse PH, Ten Hoor KA, Hollema H, Van der Zee AG. Tamoxifen treatment and gynecologic side effects: a review. *Obstet Gynecol* 2001;97(5 Pt 2):855-66.
62. Lukanova A, Lundin E, Micheli A, Arslan A, Ferrari P, Rinaldi S, Krogh V, Lenner P, Shore RE, Biessy C, Muti P, Riboli E, Koenig KL, Levitz M, Stattin P, Berrino F, Hallmans G, Kaaks R, Toniolo P, Zeleniuch-Jacquotte A. Circulating levels of sex steroid hormones and risk of endometrial cancer in postmenopausal women. *Int J Cancer* 2004;108:425-32.
63. Nyholm HC, Nielsen AL, Lyndrup J, Dreisler A, Hagen C, Haug E. Plasma oestrogens in postmenopausal women with endometrial cancer. *Br J Obstet Gynaecol* 1993;100:1115-9.
64. Chandeying P, Pantasri T. Prevalence of conditions causing chronic anovulation and the proposed algorithm for anovulation evaluation. *J Obstet Gynaecol Res* 2015. doi: 10.1111/jog.12685.
65. Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet* 2008;371:569-78.
66. Folsom AR, Kaye SA, Potter JD, Prineas RJ. Association of incident carcinoma of the endometrium with body weight and fat distribution in older women: early findings of the Iowa Women's Health Study. *Cancer Res* 1989;49:6828-31.
67. Amant F, Moerman P, Neven P, Timmerman D, Van Limbergen E, Vergote I. Endometrial cancer. *Lancet* 2005;366:491-505.
68. McPherson CP, Sellers TA, Potter JD, Bostick RM, Folsom AR. Reproductive factors and risk of endometrial cancer. The Iowa Women's Health Study. *Am J Epidemiol* 1996;143:1195-202.
69. La Vecchia C, Franceschi S, Decarli A, Gallus G, Tognoni G. Risk factors for endometrial cancer at different ages. *J Natl Cancer Inst* 1984;73:667-71.
70. Schumer ST, Cannistra SA. Granulosa cell tumor of the ovary. *J Clin Oncol* 2003;21:1180-9.
71. Zanagnolo V, Pasinetti B, Sartori E. Clinical review of 63 cases of sex cord stromal tumors. *Eur J Gynaecol Oncol* 2004;25:431-8.
72. Soliman PT, Oh JC, Schmeler KM, Sun CC, Slomovitz BM, Gershenson DM, Burke TW, Lu KH. Risk factors for young premenopausal women with endometrial cancer. *Obstet Gynecol* 2005;105:575-80.
73. Win AK, Reece JC, Ryan S. Family history and risk of endometrial cancer: a systematic review and meta-analysis. *Obstet Gynecol* 2015;125:89-98.

74. Koornstra JJ¹, Mourits MJ, Sijmons RH, Leliveld AM, Hollema H, Kleibeuker JH. Management of extracolonic tumours in patients with Lynch syndrome. *Lancet Oncol* 2009;10:400-8.
75. Barrow E, Robinson L, Alduaij W, Shenton A, Clancy T, Laloo F, Hill J, Evans DG. Cumulative lifetime incidence of extracolonic cancers in Lynch syndrome: a report of 121 families with proven mutations. *Clin Genet* 2009;75:141-9.
76. Pilarski R, Stephens JA, Noss R, Fisher JL, Prior TW. Predicting PTEN mutations: an evaluation of Cowden syndrome and Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome clinical features. *J Med Genet* 2011;48:505-12.
77. Thompson D, Easton DF, Breast Cancer Linkage Consortium. Cancer incidence in BRCA1 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:1358-65.
78. Parazzini F, Negri E, La Vecchia C, Benzi G, Chiaffarino F, Polatti A, Francheschi S. Role of reproductive factors on the risk of endometrial cancer. *Int J Cancer* 1998;76:784-6.
79. Weiderpass E, Persson I, Adami H-O, Magnusson C, Lindgren A, Baron JA. Body size in different periods of life, diabetes mellitus, hypertension, and risk of postmenopausal endometrial cancer (Sweden). *Cancer Causes Control* 2000;11:185-92.
80. Noto H, Osame K, Sasazuki T, Noda M. Substantially increased risk of cancer in patients with diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of epidemiologic evidence in Japan. *J Diabetes Complications* 2010;24:345-53.
81. Furberg AS, Thune I. Metabolic abnormalities (hypertension, hyperglycemia and overweight), lifestyle (high energy intake and physical inactivity) and endometrial cancer risk in a Norwegian cohort. *Int J Cancer* 2003;104:669-76.
82. Liang SX, Pearl M, Liang S, Xiang L, Jia L, Yang B, Fadare O, Schwartz PE, Chambers SK, Kong B, Zheng W. Personal history of breast cancer as a significant risk factor for endometrial serous carcinoma in women aged 55 years old or younger. *Int J Cancer* 2011;128:763-70.
83. Mueck AO, Seeger H, Rabe T. Hormonal contraception and risk of endometrial cancer: a systematic review. *Endocr Relat Cancer* 2010;17:R263-71., Vessey M, Painter R. Oral contraceptive use and cancer. Findings in a large cohort study, 1968-2004. *Br J Cancer* 2006;95:385-9.
84. Zhou B, Yang L, Sun Q, Cong R, Gu H, Tang N, Zhu H, Wang B. Cigarette smoking and the risk of endometrial cancer: a meta-analysis. *Am J Med* 2008;121:501-508., Terry PD, Rohan TE, Franceschi S, Weiderpass E. Cigarette smoking and the risk of endometrial cancer. *Lancet Oncol* 2002;3:470-80.
85. Friedenreich CM, Orenstein MR. Physical activity and cancer prevention: etiologic evidence and biological mechanisms. *J Nutr* 2002;132(11 Suppl):3456S-3464S.

86. Tang NP, Li H, Qiu YL, Zhou GM, Ma J. Tea consumption and risk of endometrial cancer: a metaanalysis. *Am J Obstet Gynecol* 2009;201:605.e1-8.
87. Yu X, Bao Z, Zou J, Dong J. Coffee consumption and risk of cancers: a meta-analysis of cohort studies. *BMC Cancer* 2011;11:96.
88. Neill AS, Nagle CM, Protani MM, Obermair A, Spurdle AB, Webb PM; Australian National Endometrial Cancer Study Group. Aspirin, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, paracetamol and risk of endometrial cancer: a case-control study, systematic review and meta-analysis, *Int J Cancer* 2013;132:1146-55.
89. Setiawan VW, Pike MC, Karageorgi S, et al; Australian National Endometrial Cancer Study Group. Age at last birth in relation to risk of endometrial cancer: pooled analysis in the epidemiology of endometrial cancer consortium. *Am J Epidemiol* 2012;176:269.
90. Schmidt T, Breidenbach M, Nawroth F, Mallmann P, Beyer IM, Fleisch MC, REIN DT. Hysteroscopy for asymptomatic postmenopausal women with sonographically thickened endometrium. *Maturitas* 2009;62:176-8.
91. Clark TJ, Mann CH, Shah N, Khan KS, Song F, Gupta JK. Accuracy of outpatient endometrial biopsy in the diagnosis of endometrial cancer: a systematic quantitative review. *BJOG* 2002;109:313-21.
92. Committee on Practice Bulletins - Gynecology. Practice bulletin no. 128: diagnosis of abnormal uterine bleeding in reproductive-aged women. *Obstet Gynecol* 2012;120:197-206.
93. La Sala GB, Blasi I, Gallinelli A, Debbi C, Lopopolo G, Vinci V, Villani MT, Iannotti F. Diagnostic accuracy of sonohysterography and transvaginal sonography as compared with hysteroscopy and endometrial biopsy: a prospective study. *Minerva Ginecol* 2011;63:421-7.
94. Zhao C, Austin RM, Pan J, Barr N, Martin SE, Raza A, Cobb C. Clinical significance of atypical glandular cells in conventional pap smears in a large, high-risk U.S. west coast minority population. *Acta Cytol* 2009;53:153-9.
95. Wright TC Jr, Massad LS, Dunton CJ, Spitzer M, Wilkinson EJ, Solomon D; 2006 ASCCP-Sponsored Consensus Conference. 2006 consensus guidelines for the management of women with abnormal cervical screening tests. *J Low Genit Tract Dis* 2007;11:201-22.
96. Debby A, Malinger G, Glezerman M, Golan A. Intra-uterine fluid collection in postmenopausal women with cervical stenosis. *Maturitas* 2006;55:334-7.

97. Giannella L, Mfuta K, Setti T, Boselli F, Bergamini E, Cerami LB. Diagnostic accuracy of endometrial thickness for the detection of intra-uterine pathologies and appropriateness of performed hysteroscopies among asymptomatic postmenopausal women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2014;177:29-33.
98. Smith-Bindman R, Weiss E, Feldstein V. How thick is too thick? When endometrial thickness should prompt biopsy in postmenopausal women without vaginal bleeding. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2004;24:558-65.
99. Hsieh CH, Chang-Chien CC, Lin H, Huang EY, Huang CC, Lan KC, Chang SY. Can a preoperative CA 125 level be a criterion for full pelvic lymphadenectomy in surgical staging of endometrial cancer? *Gynecol Oncol* 2002;86:28-33.
100. Kinkel K, Kaji Y, Yu KK, Segal MR, Lu Y, Powell CB, Hricak H. Radiologic staging in patients with endometrial cancer: a meta-analysis. *Radiology* 1999;212:711-8.
101. Beddy P, Moyle P, Kataoka M, Yamamoto AK, Joubert I, Lomas D, Crawford R, Sala E. Evaluation of depth of myometrial invasion and overall staging in endometrial cancer: comparison of diffusion-weighted and dynamic contrast-enhanced MR imaging. *Radiology* 2012;262:530-7.
102. Pecorelli S. Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium. *Int J Gynaecol Obstet* 2009;105:103-104.
103. Jadoul P, Donnez J. Conservative treatment may be beneficial for young women with atypical endometrial hyperplasia or endometrial adenocarcinoma. *Fertil Steril* 2003;80:1315-24.
104. Mariani A, Dowdy SC, Cliby WA, Gostout BS, Jones MB, Wilson TO, Podratz KC. Prospective assessment of lymphatic dissemination in endometrial cancer: a paradigm shift in surgical staging. *Gynecol Oncol* 2008;109:11-8.
105. Keys HM, Roberts JA, Brunetto VL, Zaino RJ, Spirtos NM, Bloss JD, Pearlman A, Maiman MA, Bell JG; Gynecologic Oncology Group. A phase III trial of surgery with or without adjunctive external pelvic radiation therapy in intermediate risk endometrial adenocarcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 2004;92:744-51.
106. ASTEC/EN.5 Study Group, Blake P, Swart AM, Orton J, Kitchener H, Whelan T, Lukka H, Eisenhauer E, Bacon M, Tu D, Parmar MK, Amos C, Murray C, Qian W. Adjuvant external beam radiotherapy in the treatment of endometrial cancer (MRC ASTEC and NCIC CTG EN.5 randomised trials): pooled trial results, systematic review, and meta-analysis. *Lancet* 2009;373:137-46.

107. Susumu N, Sagae S, Udagawa Y, Niwa K, Kuramoto H, Satoh S, Kudo R; Japanese Gynecologic Oncology Group. Randomized phase III trial of pelvic radiotherapy versus cisplatin-based combined chemotherapy in patients with intermediate- and high-risk endometrial cancer: a Japanese Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 2008;108:226-33.
108. Havrilesky LJ, Secord AA, Bae-Jump V, Ayeni T, Calingaert B, Clarke-Pearson DL, Berchuck A, Gehrig PA. Outcomes in surgical stage I uterine papillary serous carcinoma. *Gynecol Oncol* 2007;105:677-82.
109. Galaal K, Al Moundhri M, Bryant A, Lopes AD, Lawrie TA. Adjuvant chemotherapy for advanced endometrial cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2014;5:CD010681.
110. Creutzberg CL, Nout RA, Lybeert ML, Wárlám-Rodenhuis CC, Jobsen JJ, Mens JW, Lutgens LC, Pras E, van de Poll-Franse LV, van Putten WL; PORTEC Study Group. Fifteen-year radiotherapy outcomes of the randomized PORTEC-1 trial for endometrial carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2011;81:e631-8.
111. A.E.Kerscher, F.J. Slack Oncomirs – microRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews Cancer* 2006; 10.1038/nrc1840.
112. Cinzia Seignani, George A. Calin, Linda D. Siracusa, Carlo M. Croce. Mammalian micro RNAs: a small world for fine-tuning gene expression. *Mamm Genome* 2006;17(3):189-202.
113. Lim, L. P., Glasner, M. E., Yekta, S., Burge, C. B. & Bartel, D. P. Vertebrate microRNA genes. *Science* (2003) 299, 1540.
114. Berezikov, E. et al. Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. *Cell* (2005) 120, 21–24.
115. Bentwich, I. et al. Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nature Genet.* (2005) 37, 766–770.
116. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75:843–854.
117. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE et al. The 21 nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2000; 403: 901–906.
118. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 2001; 294: 853–858.
119. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001; 294:858–862.

120. Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001; 294: 862–864.
121. Leung, A.K., and Sharp, P.A. (2010). MicroRNA functions in stress responses. *Mol. Cell* 40, 205–215.
122. Mendell JT, Olson EN. MicroRNAs in stress signaling and human disease. *Cell* 2012 16;148(6):1172-87.
123. Ali M. Ardekani, Mozghan Moslemi Naeini. The role of microRNAs in human diseases. *Avicenna J Med Biotechnol*. 2010 Oct-Dec; 2(4): 161–179.
124. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 15524–15529.
125. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M et al. miR-15 and miR 16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 13944–13949.
126. Calin GA, Cimmino A, Fabbri M, Ferracin M, Wojcik SE, Shimizu M et al. MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 5166–5171.
127. Croce CM, Iorio MV, microRNA involvement in human cancer, *Carcinogenesis*. 2012 ; 33(6): 1126–1133.
128. Yong Peng and Carlo M Croce. The role of microRNAs in human cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy* (2016) 1, Article 15004. Retrieved from <http://www.nature.com/articles/sigtrans20154>
129. Esquela-Kerscher, A.; Slack, F.J. Oncomirs—MicroRNAs with a role in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2006, 6, 259–269.
130. Kuokkanen S, Chen B, Ojalvo L et al. Genomic profiling of microRNAs and messenger RNAs reveals hormonal regulation in microRNA expression in human endometrium. *Biol Reprod* 2010. 82:791 -801.
131. Lessey BA. Fine tuning of endometrial function by estrogen and progesterone through microRNAs. *Biol Reprod* 2010, 82:653 -655
132. Lee H, Choi HJ, Kang CS, Lee HJ, Lee WS, Park CS. Expression of miRNAs and PTEN in endometrial specimens ranging from histologically normal to hyperplasia and endometrial adenocarcinoma. *Mod Pathol*. 2012 ;25(11):1508-15

133. Chan E, Prado DE, Weidhaas JB. Cancer microRNAs from subtype profiling to predictors of response to therapy. *Trends Mol Med.* 2011;17:235-43.
134. Boren T, Xiong Y, Hakam A, Wenham R, Apte S, Wei Z, et al. MicroRNAs and their target messenger RNAs associated with endometrial carcinogenesis. *Gynecol Oncol.* 2008;110:206-15.
135. Wu W, Lin Z, Zhuang Z, Liang X. Expression profile of mammalian microRNAs in endometrioid adenocarcinoma. *Eur J Cancer Prev.* 2009;18:50-5.
136. Chung TK, Cheung TH, Huen NY, Wong KW, Lo KW, Yim SF, et al. Dysregulated microRNAs and their predicted targets associated with endometrioid endometrial adenocarcinoma in Hong Kong women. *Int J Cancer.* 2009;124:1358-65.
137. Mozos A, Catasús L, D'Angelo E, Serrano E, Espinosa I, Ferrer I, et al. The FOXO1-miR27 tandem regulates myometrial invasion in endometrioid endometrial adenocarcinoma. *Hum Pathol.* 2014;45:942-51.
138. Dai Y, Xia W, Song T, Su X, Li J, Li S, et al. MicroRNA-200b is overexpressed in endometrial adenocarcinomas and enhances MMP2 activity by downregulating TIMP2 in human endometrial cancer cell line HEC-1A cells. *Nucleic Acid Ther.* 2013;23:29-34.
139. Hiroki E, Suzuki F, Akahira J, Nagase S, Ito K, Sugawara J, et al. MicroRNA-34b functions as a potential tumor suppressor in endometrial serous adenocarcinoma. *Int J Cancer.* 2012;131:E395-404.
140. Tuteja G, Kaestner KH (September 2007). SnapShot: forkhead transcription factors I. *Cell* 130 (6): 1160.e1–1160.e2
141. Tuteja G, Kaestner KH (October 2007). Forkhead transcription factors II. *Cell* 131 (1): 192–192.e1
142. Ray PS, Wang J, Qu Y, Sim MS, Shamonki J, Bagaria SP, Ye X, Liu B, Elashoff D, Hoon DS, et al. FOXC1 is a potential prognostic biomarker with functional significance in basal-like breast cancer. *Cancer Res.* 2010;70:3870–3876.
143. Xu ZY, Ding SM, Zhou L. et al. FOXC1 contributes to microvascular invasion in primary hepatocellular carcinoma via regulating epithelial-mesenchymal transition. *Int J Biol Sci.* 2012;8:1130–1141.
144. Wang L, Gu F, Liu CY, Wang RJ, Li J, Xu JY. High level of FOXC1 expression is associated with poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Tumour Biol.* 2013;34:853–858. doi: 10.1007/s13277-012-0617-7
145. Nagel S, Meyer C, Kaufmann M, Drexler HG, MacLeod RA. Deregulated FOX genes in Hodgkin lymphoma. *Genes Chromosomes. Cancer.* 2014;53:917–933.

146. Wei LX, Zhou RS, Xu HF, Wang JY, Yuan MH. High expression of FOXC1 is associated with poor clinical outcome in non-small cell lung cancer patients. *Tumour Biol.* 2013;34:941–946.
147. Xu YY, Tian J, Hao Q. MicroRNA-495 downregulates FOXC1 expression to suppress cell growth and migration in endometrial cancer. *Tumour Biol.* 2016;37(1):239-51.
148. Yu C, Wang M, Li Z. et al. MicroRNA-138-5p regulates pancreatic cancer cell growth through targeting FOXC1. *Cell Oncol (Dordr).* 2015 Jun;38(3):173-81.
149. Wang DS, Zhang HQ, Zhang B. et al. miR-133 inhibits pituitary tumor cell migration and invasion via down-regulating FOXC1 expression. *Genet Mol Res.* 2016;24;15(1).
150. Boeri M, Verri C, Conte D, et al. MicroRNA signatures in tissues and plasma predict development and prognosis of computed tomography detected lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108(9):3713–8. [PubMed: 21300873]
151. Shen J, Liu Z, Todd NW, et al. Diagnosis of lung cancer in individuals with solitary pulmonary nodules by plasma microRNA biomarkers. *BMC Cancer.* 2011;24;11:374
152. Wei J, Gao W, Zhu CJ, et al. Identification of plasma microRNA-21 as a biomarker for early detection and chemosensitivity of non-small cell lung cancer. *Chin J Cancer.* 2011; 30(6):407–14. [PubMed: 21627863]
153. Cheng H, Zhang L, Cogdell DE, et al. Circulating plasma MiR-141 is a novel biomarker for metastatic colon cancer and predicts poor prognosis. *PLoS One.* 2011; 6(3),e17745 Available from <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0017745>.
154. Karaayvaz M, Zhang C, Liang S, Shroyer KR, Ju J (2012) Prognostic significance of miR-205 in endometrial cancer. *PLoS One* 7: e35158.
155. McDermott AM, Heneghan HM, Miller N, Kerin MJ. The therapeutic potential of microRNAs: disease modulators and drug targets. *Pharm Res.* 2011 ;28(12):3016-29.
156. Rupaimoole R, Han HD, Lopez-Berestein G, Sood AK. MicroRNA therapeutics: principles, expectations, and challenges. *Chin J Cancer.* 2011;30(6):368-70.
157. Kota J, Chivukula RR, O'Donnell KA, et al. Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model. *Cell.* 2009 12;137(6):1005-17.
158. Bhardwaj A, Singh S, Singh AP. MicroRNA-based Cancer Therapeutics: Big Hope from Small RNAs. *Mol Cell Pharmacol.* 2010;2(5):213-219.

159. Saydam F, Degirmenci I, Gunes H.V. MikroRNA'lar ve kanser. Dicle Tıp Dergisi 2011; 38 (1): 113-120.
160. Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol* 2007;302(1):1-12.
161. Love TM, Moffett HF, Novina CD. Not miR-ly small RNAs: big potential for microRNAs in therapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;121(2):309-19.
162. Elmén J, Lindow M, Schütz S, et al. LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature*. 2008;452(7189):896-9.
163. Krtitzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, et al. Silencing of microRNAs in vivo with antagomirs. *Nature* 2005;438(7068):685-9.
164. Esau C, Davis S, Murray SF, et al. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab*. 2006;3(2):87-98.
165. Ebert MS, Neilson JR, Sharp PA. MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nat Methods*. 2007 ;4(9):721-6.
166. Ebert MS, Sharp PA. MicroRNA sponges: progress and possibilities. *RNA* 2010;16(11):2043-50.
167. Xiao J, Yang B, Lin H, et al. Novel approaches for gene-specific interference via manipulating actions of microRNAs: examination on the pacemaker channel genes HCN2 and HCN4. *J Cell Physiol*. 2007;212(2):285-92.
168. Wang QZ, Lv YH, Gong YH, et al. Double-stranded Let-7 mimics, potential candidates for cancer gene therapy. *J Physiol Biochem*. 2012;68(1):107-19.
169. Zhang R, He Y, Zhang X, et al. Estrogen receptor-regulated microRNAs contribute to the BCL2/BAX imbalance in endometrial adenocarcinoma and precancerous lesions. *Cancer Lett*. 2012;314(2):155-65.