



T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

Endometrium Karsinomlarında AMF/AMFR
Proteinlerinin Ekspresyonu

UZMANLIK TEZİ

Dr. Aml ALPSOY

Antalya, 2023



T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

Endometrium Karsinomlarında AMF/AMFR
Proteinlerinin Ekspresyonu

UZMANLIK TEZİ

Dr. Anıl ALPSOY

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hadice Elif Peştereli

**Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TTU-
2022-5893 Proje No ile desteklenmiştir.**

“Kaynak gösterilerek tezimden yararlanılabilir.”

Antalya, 2023

TEŞEKKÜR

Patoloji uzmanlık eğitimim boyunca bana yol gösteren, her konuda ilgi ve alakalarını esirgemeyen, tez danışmanı hocam Prof. Dr. Hadice Elif PEŞTERELİ ve tüm kıymetli hocalarıma,

Bütün istatistiklerimin yanlış olduğunu fark ettiğim günden itibaren, istatistiklerimi kontrol edip, büyük bir özveriyle hepsini düzelten Prof. Dr. Levent DÖNMEZ'e,

Patolojiye başladığım ilk günden beri bana destek olan, zorluklarla mücadele etmeyi öğreten, tezimde de kullandığım tümör tomurcuklanmasının varlığını bana öğreten, akademik yazı yazmaya özendirip, benimle makaleler yazan değerli akıl hocam Prof. Dr. Gülsüm Özlem ELPEK'e,

Asistanlık sürecimde zor zamanlarımda bana destek olan ve tez sürecinde elde ettiği verileri benimle paylaşıp, projemizin hayata geçmesinde büyük emeğe sahip olan Uzm. Dr GÖzde Koca YILMAZ'a,

Bir süre önce uzman olmuş bana katkıları bulunan, beraber çalışmaktan keyif aldığım Uzm. Dr. Gülşah ŞENGİZER, Uzm.Dr. Düriye Betül YILMAZ ve Uzm. Dr. Ahmet BODUROĞLU olmak üzere tüm kıdemlilerime,

Yoğun çalışma temposu içerisinde birlikte çalıştığım araştırma görevlisi arkadaşlarıma,

Tez sürecinde uyumla çalıştığım bana büyük yardımları bulunan Hülya YILDIRIM, Vedat GÖK ve Murat BİLLOR'a,

Gösterdikleri ilgi ve destek için tüm Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi çalışanlarına,

Beni bu günlere getiren, her zaman ve her koşulda sonsuz sevgisiyle yanımda olan ve asistanlık boyunca çektiğim büyük sıkıntılara benimle birlikte sürüklenen annem Güneş ALPSOY ve babam Erkan ALPSOY'a,

Bana hayatı çekilir kılan, yüzümü gülümseten sevgili eşim Aşlıhan Taşpınar ALPSOY' a sonsuz teşekkürlerimle....

İÇİNDEKİLER

Simgeler ve Kısaltmalar.....	iii
Şekiller Dizini.....	v
Çizelgeler Dizini.....	vi
1. Giriş ve Amaç.....	1
2. Genel Bilgiler.....	4
2.1. Anatomi.....	4
2.2. Embriyogenez.....	4
2.3. Normal Endometrium Morfolojisi ve Fizyolojisi.....	4
2.4. Normal Endometrium İmmünohistokimyasal Profili.....	6
2.5. Atipisiz Endometrial Hiperplazi.....	6
2.6. EİN/Atipik Hiperplazi.....	7
2.7. Endometrial Karsinom.....	8
2.7.1. Epidemiyoloji.....	8
2.7.2. Sınıflandırmalar.....	8
2.7.3. Makroskopik Bulgular.....	8
2.7.4. Histolojik Tipler.....	9
2.7.4.1. Endometrioid Karsinom.....	9
2.7.4.2. Seröz Karsinom.....	10
2.7.4.3. Berrak Hücreli Karsinom.....	10
2.7.4.4. Andiferansiye ve Dediferansiye Karsinom.....	11
2.7.4.5. Karsinosarkom.....	11
2.7.5. Prognoz.....	12
2.7.6. Moleküler Genetik.....	12
2.8. AMF/AMFR.....	14
2.9. Tümör Tomurcuklanması.....	15
3. Gereç ve Yöntem.....	17
3.1. Etik Kurul.....	17
3.2. Hasta Seçimi.....	17

3.3. Tümör Tomurcuklanma Skoru.....	17
3.4. İmmünohistokimyasal İnceleme.....	18
3.5. Real Time PCR.....	20
3.5.1. Formalinle Fikse Olmuş Parafine Gömülü Dokulardan (FFPE) DNA İzolasyonu.....	20
3.5.2. Real Time PCR.....	22
3.6. İstatistiksel Değerlendirme.....	24
4. Bulgular.....	26
4.1. Olguların Klinik ve Patolojik Özellikleri.....	26
4.2. AMF ve AMFR İmmünohistokimyasal Antikorlarının Klinik Parametrelerle İlişkisi.....	31
4.3. AMF ve AMFR İmmünohistokimyasal Antikorlarının Moleküler Gruplar ve Histolojik Tip ile İlişkisi.....	36
4.4. AMF ve AMFR İmmünohistokimyasal Antikorlarının Nüks ve Sağkalım ile İlişkisi.....	39
4.5. AMF ve AMFR İmmünohistokimyasal Antikorlarının Tümör Tomurcuklanma Skoru ile İlişkisi.....	43
5. Tartışma.....	46
6. Sonuçlar.....	49
7. Özet.....	51
8. Abstract.....	52
9. Kaynakça.....	53

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AMF	Otokrin motilite faktörü
AMFR	Otokrin motilite faktör reseptörü
ARİD1A içeren 1A (proteini)	AT (baz dizilimi) bakımından zengin, etkileşim alanı
CK7	Sitokeratin 7
CTNNB1	Katenin beta 1
DAB	Dimetilaminoazobenzen
DNA	Deoksiribonükleik asit
DSÖ	Dünya sağlık örgütü
EMA	Epitelyal membran antijen
ER	Östrojen reseptörü
FBXW7	F-kutusu/WD tekrar içeren protein 7
FGFR	Fibroblast büyüme faktörü reseptörü
FFPE	Formalin fikse parafine gömülü
FIGO Obstetrics	The International Federation of Gynecology and
HE	Hematoksilen eozin
İTB	İntratümöral tomurcuklanma
HNPPC	Hereditör nonpolipöz kolon kanseri
HNF1β	Hepatosit nükleer faktör 1 beta
HR	Risk oranı
H2O2	Hidrojen peroksit
ITBCC	International Tumor Budding Consensus Conference
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene
MMR	Mismatch repair
MSI	Mikrosatellit instabilitesi
MLH1	MutL homolog 1
MSH2	MutS homolog 2

MSH6	MutS homolog 6
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PIK3CA alfa	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfat 3-kinaz katalitik alt birim
PMS2	PMS1 Homolog 2
POLE	Polimeraz ε
PR	Progesteron reseptörü
PPP2R1A	Protein Phosphatase 2 Scaffold Subunit Alpha
PTB	Peritümöral tomurcuklanma
PTEN	Fosfotaz ve tensin homologu
TCGA	Kanser genom atlası
TNM	Tümör, Lenf Nodu, Metastaz

Şekiller Dizini

Şekil 1. Endometrial Karsinom Histopatolojik Alt Tipleri.....	27
Şekil 2. AMF İmmünohistokimyasal Antikoru ile Boyanma Şiddetleri.....	32
Şekil 3. AMFR İmmünohistokimyasal Antikoru ile Sitoplazmik Boyanma Şiddetleri.....	33
Şekil 4. Tümör Tomurcukları.....	44



ÇİZELGELER DİZİNİ

Tablo 1. Moleküler Gruplara Göre Yaş Dağılımı.....	28
Tablo 2. Hastaların Özelliklerine Göre Sağkalım Sürelerinin İncelenmesi...	30
Tablo 3. AMF, AMFR Ölçümlerine Etki Eden Diğer Faktörler.....	35
Tablo 4. AMF, AMFR Skoru 5 ve Üzeri Olanlarda P53 wild tip Durumuna Göre İncelenmesi.....	36
Tablo 5. AMF, AMFR Skoru 5 ve Üzeri Olanlarda MSI Durumuna Göre İncelenmesi	37
Tablo 6. AMF, AMFR Skoru 5 ve Üzeri Olanlarda P53 Mutant Durumuna Göre İncelenmesi.....	37
Tablo 7. AMF, AMFR Skorunun 6 ve Üzeri Olanlarda POLE Mutasyonuna Göre İncelenmesi.....	38
Tablo 8. AMF, AMFR Skoru 5 ve Üzeri Olanlarda POLE Durumuna Göre İncelenmesi.....	38
Tablo 9. AMFR Membran Boyanması ile Moleküler Gruplar ve Histolojik Tip İlişkisi.....	39
Tablo 10. AMFR Skorunun Evrelerdeki Nüks Durumuna Göre İncelenmesi.....	40
Tablo 11. AMF ve AMFR Skorlarının Histolojik Tipe Göre Nüks Durumuna Göre İncelenmesi.....	41
Tablo 12. AMF Skorunun Evrelerdeki Sağkalım Durumuna Göre İncelenmesi.....	41
Tablo 13. AMFR Skorlarının Evrelerdeki 5 Yıllık Sağkalıma Göre İncelenmesi.....	42

Tablo 14. AMF, AMFR ve İTB, PTB, İTB (4 skorlu), PTB (4 skorlu)	
İlişkileri.....	45



1.Giriş ve Amaç

Endometrium karsinomları gelişmekte olan ülkelerde en sık görülen jinekolojik kanserdir ve kadınlarda tüm malignite tipleri arasında dördüncü sıradadır. Hastalığın ortalama yaşı 63'tür. Son yıllarda en önemli etiyolojik faktör kabul edilen obezitenin sıklığının artmasıyla birlikte endometrium karsinom sıklığı artış eğilimine girmiştir. Diğer nedenler arasında tamoksifen kullanımı, polikistik over sendromu, diyabet bulunmaktadır. Lynch sendromlu kadınların %40-60'ında ortalama 48 yaşta endometrium karsinomu gelişmektedir.

Endometrium karsinomları, günümüzde morfolojiye göre tanı almaktadır. Endometrium karsinomları Bokhman'a göre ikiye ayrılmaktadır; bunlar sıklık sırasına göre endometrioid endometrium karsinomları ve non-endometrioid endometrium karsinomlarıdır. Bu patogenetik sınıflamaya göre endometrioid endometrium karsinomları tip 1, non endometrioid endometrium karsinomları tip 2 kabul edilmektedir. Tip 1 endometrium karsinomları, %85 oranında 5 yıllık sağkalıma sahip iyi prognozlu karsinomlardır. Tip 2 endometrium karsinomları, hormon tedavisine kötü yanıt veren kötü prognozlu karsinomlardır. Ancak bu sınıflama günümüzde klinikopatolojik korelasyonu sağlamada yetersiz kalmaktadır. Daha iyi korelasyon sağlamak için “ The Cancer Genome Atlas” endometrium karsinomlarını, genomik karakterizasyonlarına göre dört gruba ayırmıştır (1). Bu sınıflama endometrium karsinomunun daha iyi anlaşılması ve özellikle rekürren hastalıklarda hedef bazlı tedavide yeni seçenekler geliştirilmesi için öncül olmuştur. İlk grup POLE mutasyonuna sahip, mükemmel prognoza sahip olan POLE mutant gruptur. Bu grup DNA polimeraz ϵ mutasyonuna sahiptir. İkinci grup, mikrosatellit instabil olan iyi prognoza sahip gruptur. Bu grup hastada mismatch repair genlerinin epigenetik inhibisyonunda problem vardır ve buna bağlı olarak gelişen genomik instabilite, çok sayıda somatik mutasyona neden olmaktadır. Üçüncü grup, orta prognoza sahip düşük kopya değişimi gösteren karsinomlardan oluşmaktadır. Bu grupta genellikle PI3K/AKT sinyal yolunda artışa neden olan mutasyonlar gelişmektedir. Dördüncü grup ise kötü prognoza sahip P53 mutant karsinomlardan oluşmaktadır. P53 mutant grup en agresif ve en

kötü prognoza sahip gruptur. Bu genomik sınıflama Dünya Sağlık Örgütü tarafından 2020 yılında kabul edilmiş ve Dünya Sağlık Örgütü Kadın Genital Tümörleri klavuzunun 4. basımında yerini almıştır. TCGA genomik sınıflandırmasında moleküler yöntem kullanılarak, kopya sayısı yüksek olanlar POLE mutasyonlu kabul edilir ve sonrasında MSI (MSH2, PMS2, MSH6, MLH1) mutasyonlarına immünohistokimyasal yöntemle bakılır ve mutasyon gösteren olgular 2. grup olan mikrosatellit instabil gruba alınır. Son olarak P53 immünohistokimyasal olarak uygulanarak en kötü prognozlu olan 4. grup P53 mutant ve orta prognoza sahip 3. grup olan düşük kopya sayısı değişimli (P53 wild-tip) grubuna ayrılırlar (1).

Bu sınıflama bizim üniversitemiz de dahil olmak üzere birçok gelişmekte olan ülke laboratuvarlarında maddi sebeplerden ve moleküler imkanların bulunmamasından dolayı uygulanamamaktadır. POLE mutasyonunun moleküler yöntem ile bakılması sadece zaman ve para kaybına yol açmamaktadır, ayrıca moleküler imkanları bulunmayan çoğu laboratuvar da uygulanmasını zorlaştıracaktır. Bu kadar yaygın görülen bir karsinomun sadece büyük ve sayıca az laboratuvar da sınıflandırılabilmesi, birçok hastanın bu yöntemden yararlanamamasına neden olmaktadır.

2019 yılında Yiran Li ve arkadaşları bu sınıflandırmaya göre sınıflandırılmış endometrium karsinom olgularının ekzon sekanslama verilerini, RNA sekanslama verilerini ve klinik verilerini TCGA'dan toplayarak, endometrium karsinomu POLE mutant karsinomlarında, AMF (PGI) ve AMFR (gp78) ekspresyonlarının arttığını göstermiştir (2).

Çalışmamızda moleküler yöntem ihtiyacını ortadan kaldırıp maliyetleri azaltarak, endometrium karsinomlarının dünyanın her yerinde moleküler sınıflandırılabilmesi amacıyla, POLE mutant olgularda immünohistokimyasal yöntemle AMF ve AMFR ekspresyonu bakılması için 2005-2018 yılları arasında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde endometrium karsinomu tanısı ile histerektomi olmuş ve daha önce Prof Dr Gülgün Erdoğan ve Dr Gözde Koca Yılmaz tarafından **TSA-2018-3975** numaralı BAP desteğiyle moleküler sınıflandırma uygulanmış 55 olgunun bloklarında (3), AMF ve AMFR immünohistokimyasal ekspresyonuna bakıldı. Boyalı preparatlar boyanma

paternlerine, yüzdelere ve Őiddetlerine göre sınıflandırıldı. Sonuçlar olgulara ait diğerk prognostik öneme sahip belirteçler ile karşılaşıtırıldı. Ayrıca birçok karsinom tipinde prognostik öneme sahip olduğu bilinen tümör tomurcuklanmasına da bakılarak, immünohistokimyasal AMF/AMFR ekspresyonu ile ilişıki araştırıldı.



2. Genel Bilgiler

2.1. Anatomi

Uterus, mesanenin posterioru ve rektumun anterioru arasında yerleşmiş kadın genital organıdır. Uterus, uterin korpus ve uterin serviksten oluşmaktadır. Nullipar kadınlarda, uterus 7,5 cm uzunluğunda, fundusta 5 cm genişliğindedir ve ağırlığı 40 ile 100 gr arasında değişmektedir. Uterus round ligament ve uteroovaryan ligamentler tarafından desteklenirken, pelvik periton tarafından sarılmıştır. Uterin korpus; fundus, isthmus ve gövde olarak 3 bölüme ayrılır. Fundus, fallop tüplerinin açıldığı yerlerin distalini temsil ederken, isthmus alt uterin segmenti temsil etmektedir. Uterus, internal iliak arterden köken alan uterin arter tarafından beslenir. Myometriumdan köken alan radyal arterler düzenli aralıklarla endometriumu penetre ederek bazal arterleri oluşturur. Endometriumun fonksiyonel tabakasında bulunan arterler, spiral arter olarak tanımlanır. Uterin ven, uterin artere eşlik etmektedir ve internal iliak vene akmaktadır (4). Uterin lenfatiklerden kaynak alan lenf sıvısı, subserozal uterin pleksuslardan; pelvik ve paraaortik lenf nodlarına akmaktadır (5).

2.2. Embriyogenez

Endometrium ve myometrium mezodermal kökenlidir ve müllerian kanalların 8-9. postovuluar haftalarda birleşmesiyle gelişirler. Gestasyonun 20. haftasına kadar endometrium tek katlı kolumnar epitel ve fibroblastik stromadan oluşurken, gestasyonun 20. haftasından başlayarak stromaya doğru kıvrılarak gland yapılarını oluşturur (5).

2.3. Normal Endometrium Morfolojisi ve Fizyolojisi

Reproduktif yıllarda, endometrium overlerin döngüsel östrojen ve progesteron sekresyonlarına bağımlı proliferasyon, diferansiasyon, ve dökülme fazlarını gerçekleştirir. Endometrial morfoloji bu döngüye bağımlı olarak sürekli

değişmektedir (6). Endometriumu bu morfolojiye bağımlı olarak histolojik olarak günlere göre sınıflandırmak proliferatif endometriumda mümkün olmamaktadır. Bazı patoloğlar bu tarihsel histolojik sınıflandırmayı uygulamaktadır. Ancak Murray ve ark. tarafından yapılan çalışmaya göre endometriumu histolojik güne göre sınıflandırma yaklaşımının, temporal belirginlikten ve işlevsellikten yoksun olduğunu öne sürüldü (7).

Aktif yıllarda, endometrium 2 tabakadan oluşmaktadır. Bu tabakalar yüzeyel fonksiyonel tabaka ve bazal tabaka olarak sınıflandırılmaktadır. Endometriumun döngüsel siklusunu fonksiyonel tabaka yansıtmaktadır. Basalis tabakası hormonal cevap göstermez. Bazal tabaka inaktif görünümlü bezler, selüler bir stroma ve spiral arterlerden oluşmaktadır. Bazal tabakadaki spiral arterler, fonksiyonel tabakaya göre daha kalın muskuler duvara sahiptir.

Menstruasyon sonrası endometrium sığ bir bazal endometrium ve fonksiyonel tabakanın geriye kalan derin kısmından oluşmaktadır. Proliferasyon fazının 3-4. gününden başlayarak endometrium çoğalarak proliferasyon fazının sonuna kadar endometrium kalınlığı 4-5 mm'yi bulmaktadır. Proliferasyon fazında endometrial bezler uniformdur ve düzgün aralıklarla yerleşmiş olup tübüler bir yapılanma oluşturmaktadır. Bu fazda bezlerde mitotik figürler rahatlıkla gözlenebilir. Bez epiteli psödostratifiye küboidal veya alçak kolumnar hücreler ve orta miktarda bazofilik sitoplazmayla karakterizedir. Proliferatif fazdaki nükleuslar, oval veya yuvarlak şekilli ve bazal membrana perpendiküler şekilde yerleşim gösterir.

Sekretuar endometrium, ovulasyon sonrası korpus luteumdan salgılanan progesterona bağımlı bezlerde sekresyon, stomal olgunlaşma ve vasküler farklılaşma ile karakterizedir. Bu fazda endometrium kalınlığı 7-8mm'ye ulaşır (8). Sekretuar faz 3 aşamaya ayrılabilir; erken sekretuar faz (ovulasyon sonrası 2-4. günler), orta sekretuar faz (ovulasyon sonrası 5-9. Günler), geç sekretuar faz (ovulasyon sonrası 10-14. Günler). Erken sekretuar fazda, endometrial bezler tubuler yapıya sahiptir ve mitotik aktivite izlenebilir. Başlangıçta morfolojik olarak bezlerde subnükleer vakuoller izlenir. Bu subnükleer vakuoller 3-4. günlerde en yüksek sayıya ulaşır fonksiyonel tabakanın tüm katmanlarında izlenebilir. Orta sekretuar fazda sitoplazmik vakuoller lümene doğru göçe başlayıp vakuollerde

supranükleer görünüm hakim olur. Orta sekretuar fazda, bezler köşeli görünümlü olup mitotik aktivite fonksiyonel tabakada artık izlenmemektedir. Ovulasyon sonrası 7-9'uncu günlerde stromal ödem en belirgin halini alır. Spiral arterler belirginleşir ve stromal hücre sitoplazmaları daha eozinofilik bir görünüm alır. Bu hücrelere predesidual hücreler denir. Geç sekretuar fazda bezlerin sekretuar aktivitelerinde tipik azalma ile birlikte bezler tırtıklı görünüme kavuşurlar. Predesidual stromal değişiklik vasküler yapılar çevresinde en belirgindir.

Menstruasyon normal siklusun 28. gününde gerçekleşir. Stromal ve glanduler dökülmeyle karakterizedir. Ortalama 4 gün sürer. Bezler tırtıklı ve çökük görünümdedir. Stroma hücreleri kondanse olup çökerek stromal mavi hücre toplarını oluşturur.

2.4. Normal Endometrium İmmünohistokimyasal Profili

Normal endometrial bezler ve stroma immünohistokimyasal olarak ER ve PR pozitifdir. Endometrial bezler proliferatif faz boyunca anti-apoptotik bir protein olan BCL2 ekspresyonu gösterir. Bu boyanma erken ve orta sekretuar fazlarda anlamlı şekilde azalırken, geç sekretuar fazda tekrar boyanma izlenir (9). Az miktarda endometrial epitelyal hücrede p63 ekspresyonu izlenir. Bu hücrelerin rezerv hücrelere veya metaplastik hücrelere karşılık geldiği düşünülmektedir (10) Endometrial bezler CK7 pozitif ve CK20 negatiftir. Normal endometrial stroma, CD10, BCL2 pozitif; CD34 negatiftir (11).

2.5. Atipisiz Endometrial Hiperplazi

Endometrial hiperplazi gösteren hastalar tipik olarak anormal kanamayla başvururlar. Nadiren bu hastalar postmenopozal hormon replasman tedavisi öncesi veya infertilite nedeniyle yapılan tetkiklerde saptanırlar. Hiperplazi, karşılanmamış östrojen stimülasyonuna bağımlı gelişir (12). Risk faktörleri arasında perimenopozal dönem, obezite, polikistik over sendromu ve diyabet bulunmaktadır. Bu nedenle birçok hastanın hikayesinde persistan anovulasyon veya karşılanmamış ekzojen östrojen stimülasyonu hikayesi bulunmaktadır (13).

Atipisiz hiperplazi artmış bez/stroma oranı ve anormal yapısal patern gösterir. Bezler sayı ve boyut farklılıkları gösterir. Bezler kistik olarak genişlemiş

ve/veya dışa doğru fıtıklaşmış olabilir. Bezleri saran epitel hücreleri amfofilik sitoplazmaya sahiptir, stratifiye ve kolumnar yapılanma gösterir. Mitotik aktivite değişkendir. Artan yapısal anomalilerle birlikte bezler kompleks ve dallanmış, düzensiz sınırlı ve papiller katlanmalar gösterebilir. Artmış proliferasyona bağlı bezler kalabalıklaşıp, aradaki stromayı iterek sırt-sırta görünüm gösterebilir.

2.6. EİN/Atipik Hiperplazi

EİN, endometrial biyopsilerin %1,4'ünü oluşturmaktadır. Ortalama hasta yaşı 50-55 yaşlar arasındadır. Çoğu hasta menopoza yakın zamanlarda görülse de karşılıksız östrojen kullanımına bağlı genç kadınlarda sıklığı artmaktadır. Hastalar, anormal uterin kanama, hipermenore şikayetleriyle başvururlar.

Makroskopik olarak endometrium üzerinde polipoid görünüm oluşturabileceği gibi normal bir görünüm de sergileyebilir.

EİN Histolojik kriterleri;

- 1mm'yi aşan boyut
- Gland/stroma oranı 1'i aşan, arada az miktarda stroma içeren yapılanma
- Değişken nükleer atipi içeren tübüler veya dallanma gösteren bez yapıları
- Karsinomun dışlanması
- Taklit eden benign lezyonların (sekretuar endometrium, polip ve rejenerasyona bağımlı değişiklikler) dışlanması (14)

Son Dünya Sağlık Örgütü Sınıflaması'nda yer almasa da Avrupa Çalışma Grubu'nun (EWG) endometrial proliferatif lezyonlar için geliştirmiş olduğu kalsifikasyona değinmek gerekir. Bu sistemde basit ve kompleks atipisiz hiperplaziler “Hiperplazi” olarak sınıflandırılmakla birlikte, atipik hiperplazi ve iyi diferansiye karsinomlar “Endometrial Neoplazi” olarak sınıflandırılır. Bu sistem hiperplazi / atipik hiperplazi ve EİN'den oluşan sisteme göre daha tutarlı bulunmuştur (15).

İmmünohistokimyasal olarak PTEN, PAX2 ve MMR protein ekspresyon kaybının gösterilmesi tanıda yardımcıdır (16, 17). PTEN mutasyonları, EİN ve karsinomlarda aynı sıklıkta bulunmaktadır (18). Atipik hiperplazide, KRAS mutasyonları ve mikrosatellit instabilite bildirilmiştir (19). Yeni yapılan

immünohistokimyasal çalışmaya göre PTEN ekspresyonunda azalma ve tam kayıp bulunan biyopsilerin %70'inde fokal ARID1A kaybı izlendi (20).

2.7. Endometrial Karsinom

2.7.1. Epidemiyoloji:

ABD'nde endometrial karsinom kadın genital sisteminin en yaygın invaziv neoplazmidir. Kanada, İngiltere ve ABD'nde 4. Sıklıkta karşılaşılan karsinomdur. Dünya çapında kadınlarda en sık görülen 6. karsinomdur. Endometrial karsinom sıklık olarak en fazla Kuzey Amerika ve Avrupa'da görülürken gelişmekte olan ülkelerde sıklık beşte bire kadar inmektedir.

2.7.2. Sınıflandırmalar:

Bokhman 1983 yılında endometrial karsinomları 2 majör kategoriye ayırmıştır (21). Bu kategorizasyon endometrium karsinomunun patogenezi için geliştirilmiştir. Karşılıksız östrojen stimülasyonu, obezite ve ekzojen hormon kullanımı, tip 1 karsinomların prototipi olarak kabul edilen endometrioid karsinomunun gelişimiyle ilişkilidir (22). Seröz karsinomlar, östrojenik stimülasyondan bağımsız olan tip 2 karsinomların prototipi olarak kabul edilir.

Son Dünya Sağlık örgütü sınıflandırmasında, endometrium karsinomları mutasyonlarına göre 4 ayrı moleküler gruba ayırmıştır. Bu moleküler gruplar, iyi prognozludan kötü prognozluya doğru sırasıyla POLE mutant, MSI, P53 wild tip ve P53 mutant gruptan oluşmaktadır.

2.7.3. Makroskopik Bulgular

Uterus, genellikle normal boyutlardadır. Ancak tümörün kavitede aşırı büyümesine ve/veya derin myometrial invazyonuna bağlı olarak genişleyebilir. Uterus açıldığında tümör polip şeklinde olabileceği gibi tüm endometrial kaviteyi de doldurabilir. Tümörün kesit yüzü ten rengi, yumuşak kıvamlı olmakla birlikte

hemoraji ve nekroz içerebilir. Genç kadınlarda tümör genellikle alt uterin segment yerleşimlidir. Skuamöz diferansiasyona sahip tümörler pulsu görünümüne sahip olurken, müsinöz tümörler jelatinöz görünümündedir.

2.7.4. Histolojik Tipler

2.7.4.1. Endometrioid Karsinom

Endometrioid karsinom tipik olarak postmenopozal ve perimenopozal kadınlarda görülen ve median yaşı 63 olan endometrial karsinom tipidir. Endometrioid karsinomların %90'ı postmenopozal kadınlarda gelişir. Hiperöstrojenizm ve karşılanmamış östrojenik stimülasyon ile ilişkilidir. Klinik olarak en sık başvuru nedeni anormal uterin kanamadır. Endometrioid intraepitelyal neoplazi ile benzer moleküler profile sahiptir. Lynch sendromu ve Cowden sendromu ile ilişkili neoplazilerdir (23).

Endometrioid karsinom, makroskopik olarak ekzofitik veya diffüz infiltratif görünüme sahip olabilir. Mikroskopik olarak villoglandüler yapıya sahip, kolumnar psödoglandüler hücrelerden oluşurlar. Eozinofilik, granüler sitoplazmaya sahiptir. Olguların %10-25'inde skuamöz diferansiasyon mevcuttur. Endometrioid karsinomlar immünohistokimyasal olarak diffüz kuvvetli ER ve PR ekspresyonu ve yama tarzında P16 ekspresyonu gösterir. İmmünohistokimyasal ARID1A, PTEN ve MMR kaybı yüksek dereceli endometrioid karsinomla uyumludur. Düşük dereceli olguların %2-5'inde ve yüksek dereceli olguların %20'sinde anormal P53 ekspresyonu görülür (24).

FIGO derecelendirme sisteminde, endometrioid karsinomlar nonskuamöz alanlardaki solid alanlarının oranlarına göre 3 ayrı dereceye ayrılırlar. %5'ten az solid alan içeren tümörler derece 1, %5-50 arası solid alan içeren tümörler derece 2 ve %50 üstünde solid alan içeren tümörler derece 3 kabul edilir. Derece 1 ve 2 karsinomlar düşük dereceli; derece 3 karsinomlar yüksek dereceli kabul edilirler.

2.7.4.2. Seröz Karsinom

Seröz karsinomlar, endometrial karsinomların %5-10'unu oluşturan papiller ve/veya glandüler büyüme paterni gösteren pleomorfik tümörlerdir. Endometrial karsinomlar arasında görülen mortalitenin %40'ından seröz karsinomlar sorumludur (25). Seröz karsinom, çoğunlukla postmenopozal kadınlarda görülür. Çoğu hasta postmenopozal olup anormal uterin kanama şikayetiyle kliniğe başvurur. P53 mutasyonu çoğu tümörde görülür. Ayrıca PIK3CA, PP2R1A ve FBXW7 genetik değişimleri görülür (1). Makroskopik görünüm polip şeklinde olabileceği gibi infiltratif görünümde de olabilir.

Seröz Karsinom, atrofik endometrium veya polip zemininde gelişir. Çoğu olguda kompleks papiller ve glandüler yapılar geliştiği gibi solid alanlar da izlenebilir. Glandlar, fermuar benzeri lümene sahip uzamış ve irregüler görünümündedir. Tümör, sitolojik olarak yüksek dereceli, belirgin pleomorfizm ve makronükleol içeren tümör hücrelerinden oluşur. İmmünohistokimyasal olarak P16, IMP3 ve HMGA2 ile diffüz ekspresyon izlenir. Ayrıca çoğu olguda pansitokeratin, sitokeratin 7, EMA ve PAX8 ekspresyonu izlenir. Karakteristik olarak seröz karsinomlarda mutant P53 ekspresyonu saptanır. Endometrioid karsinomlarda yama tarzı boyanma gösteren P16 ile diffüz nükleer ve sitoplazmik boyanma görülür.

İntrauterin seröz karsinomlar iyi prognoz gösterirken, ekstrauterin yayılım gösteren seröz karsinom kötü prognoza sahiptir.

2.7.4.3. Berrak Hücreli Karsinom

Berrak hücreli karsinomlar endometrial karsinomların %5'ini oluşturur. Berrak hücreli karsinom, çoğunlukla postmenopozal kadınlarda gelişir. P53, PPP2R1A, PIK3CA, PIK3R1, KRAS, ARID1A ve SPOP somatik mutasyonları görülür. Mikroskopik olarak tümör en sık papiller olmak üzere tübülokistik, ve/veya solid yapılanma da gösterebilir. Tümör hücreleri küboidal veya yassı olup glikojen içeriği artmış oksifilik/berrak sitoplazma içerir. Lümene bakan tümör hücreleri kabara çivisi görünümü oluşturur. Berrak hücreli karsinom, HNF1β, Napsin A ve AMACR ile pozitif immünohistokimyasal boyanma gösterir.

Olguların bir kısmı ayrıca anormal P53 boyanma bulguları ve artmış P16 ekspresyonu gösterir.

2.7.4.4. Andiferansiye ve Dediferansiye Karsinom

Andiferansiye karsinom, tüm diferansiasyon modellerinden yoksun olan ve tabaka benzeri yapı oluşturan monoton kanser hücrelerinden oluşan, oldukça agresif bir endometrial karsinom tipidir. Dediferansiye karsinomlar ise andiferansiye karsinom ile diferansiye karsinom bileşeninden oluşan karsinomlardır. Dediferansiye karsinomlarda görülen diferansiye komponent çoğunlukla FIGO derece 1 ve 2 endometrioid karsinomdan oluşur. Çoğunlukla perimenopozal ve postmenopozal hastalarda gelişir. Median hasta yaşı 55'tir (26).

Andiferansiye karsinomlar 2 ile 15 cm arasında değişen boyuta sahip polipoid intraluminal kitleden oluşur (26). Tümör, küçük-orta boyutlu uniform, diskoheziv, trabeküller ve/veya adacıklar oluşturan tümöral hücrelerden oluşur. Tümör hücreleri EMA ile perinükleer noktasal boyanma paterni sergiler. Tümör hücreleri CK8/18 ve vimentin ile pozitif immün reaksiyon gösterir. Tümör hücreleri %10'a kadar sinaptofizin ve kromogranin ile boyanma gösterebilir.

Andiferansiye ve dediferansiye karsinomların %37-43'ü MSI moleküler grubuna dahildir (27). POLE mutasyonu andiferansiye karsinomlarda nadirdir ancak dediferansiye karsinomların üçte birini oluşturmaktadır. Andiferansiye ve dediferansiye karsinomların %7-28'i P53 mutanttır.

2.7.4.5. Karsinosarkom

Yüksek dereceli karsinomatöz bileşen ve sarkomatöz bileşenden oluşan bifazik tümördür. Hastaların vajinal kanama, uterin genişleme ve pelvik kitle bulguları mevcuttur. Hastaların çoğu postmenopozaldır (26). Karsinosarkomlar tüm uterin malignitelerin %5'ini oluşturmaktadır (28). Hastaların %6'sında tamoksifen kullanım hikayesi mevcuttur (29).

Olgularda karsinom ve sarkom bileşenlerinde benzer genetik değişimler mevcuttur (30). Sarkom bileşeninin, epitelyal-mezenkimal transformasyon sonucu

geliştiği kabul edilmektedir (31). Olguların %90'ında P53 mutasyonu bulunmaktadır (26).

2.7.5. Prognoz

Endometrium Karsinomunda Prognozu Belirleyen Etkenler:

- 1) Endometrial karsinomda FIGO evreleme sistemi en etkin prognostik parametredir.
- 2) Myometrial invazyon, düşük evre endometrial karsinomlarda ekstrauterin metastazların ve pelvik/paraaortik lenf nodu metastazının önemli bir belirleyicisidir.
- 3) Servikal stromal invazyon, aynı zamanda FIGO evre 2'ye denk gelmektedir.
- 4) Adneksiyal yayılım
- 5) Lenfovasküler invazyon, önemli bir bağımsız prognostik parametredir. Lenf nodu metastazı ile ilişkilidir.
- 6) Lenf nodu metastazı
- 7) Pozitif peritoneal sitoloji, yüksek histolojik derece, derin myometrial invazyon ve ekstrauterin yayılım ile ilişkilidir.
- 8) Histolojik tip ve derece
- 9) Moleküler klasifikasyon (32)

2.7.6. Moleküler Genetik

Yeni jenerasyon sekanslama ile beraber endometrial karsinom patogenezinde rol alan birçok tümör supresör gen, onkogen ve mutasyon tanımlanmıştır. Son yeni jenerasyon sekanslama çalışmaları endometrioid ve seröz karsinomların, 4 ayrı moleküler subtip ayrılabilceğini gösterdi.

Ultramutant Subtip

Bu mutasyon subtipi çok sayıda mutasyon göstermektedir. Bu yüksek sayıda mutasyon, DNA polimeraz epsilonu kodlayan POLE geninin ekzonükleazında meydana gelen mutasyondan kaynaklanmaktadır. Mutasyonun,

işlevsiz holoenzim oluşturması nedeniyle replikasyon sırasında DNA onarımı aksar. POLE mutasyonu, %5,6-6,5 olguda izlenmektedir (1). POLE mutasyonu içeren endometrium karsinomlarının çoğunluğu endometrioid tiptir (33). Daha önce yapılan çalışmalara göre POLE mutasyonu iyi prognozla ilişkili bulunmuştur (24). Ancak olumlu sonuç vermeyen bir çalışma da mevcuttur (34). POLE mutasyonlu endometrial karsinomlu olgular, normal bir beden-kitle endeksi ile daha genç yaşta gelişme eğilimindedir ve genellikle yüksek tümör histolojik derecesi ve yaygın lenfovasküler boşluk invazyonu gibi yüksek riskli patolojik özelliklere sahip olmalarına rağmen, %96'nın üzerinde 5 yıllık sağkalım oranı ile oldukça iyi prognoza sahiptir (35).

Hipermutant (MSI) Subtip

Bu subtip, POLE mutant tipten da az mutasyon içermektedir. Mikrosatellit DNA sekanslarında değişimlerle karakterizedir. MMR, uygun eşleşmemiş baz çiftlerinde nükleotid onarımında görevlidir. Bu subtip endometrioid karsinomlarda bulunmaktadır. Sporadik gelişen karsinomların %20-25'inde bulunmaktadır. Ayrıca Lynch sendromuna bağlı gelişen endometrium karsinomlarında bulunmaktadır. Başka tedavi seçeneğinin bulunmaması durumunda rekürren ve ilerlemiş olgularda PD1/PD-L1 inhibitörü kullanımı için FDA onayı mevcuttur (36).

Düşük Kopya Sayılı (MSS) Subtip

Bu subtip, önemli derecede yüksek kopya sayısı değişimi ve DNA MMR mutasyonu içermemektedir. Demografik olarak en yüksek beden-kitle endeksine sahip hasta grubudur (37). Bununla birlikte, sıklıkla PTEN, PIK3CA, PIK3R1, ARID1A, CTNNB1 (beta-katenin) mutasyonu içerirler. Düşük kopya sayılı subtip tümörlerin ayrıca PI3K/Akt/mTOR yolundaki mutasyonlarla ilişkili olduğu ve pozitif östrojen ve progesteron reseptörleri (ER+, PR+) ile ilişkileri göz önüne alındığında, bu reseptörleri hedef alan tedavileri inceleyen birkaç çalışma yapılmıştır. Tekrarlayan endometrial karsinomlar ile ilgili bir faz II çalışmasında everolimus ve letrozol kullanımı, %32'lik bir hasta yanıt oranı (ORR) gösterdi (38).

CTNNB1'in 3. ekzonundaki mutasyonlar, düşük kopya sayılı endometrium karsinomlarında daha kötü bir prognoz ile ilişkilidir (39).

Kopya Sayısı Yüksek/ Seröz Benzeri Subtip

Bu olgularda P53 mutasyonu bulunmaktadır. Bu subtip çoğunlukla seröz karsinomlardan oluşmakla birlikte derece 3 endometrioid karsinomlar, berrak hücreli karsinomlar ve karsinosarkomlar da bu subtipde bulunabilir. P53 anormal endometrial karsinomlar, PIK3CA, FBXW7 ve PPP2R1A'da tekrarlayan mutasyonlara sahiptir (1). Olguların %20'sinde HER2 amplifikasyonu bulunurken az sayıda olguda homolog rekombinasyon eksikliği bildirilmiştir (40, 41). PORTEC-3 klinik deneme sonuçları, p53 anormal endometrial karsinomlu hastaların radyasyona ek olarak kemoterapi ile tedavi edildiğinde, tek başına radyoterapi ile karşılaştırıldığında daha üstün sonuçlara sahip olduğunu göstermektedir (42).

2.8. AMF/AMFR

AMF (Autocrine Motility Factor) ilk olarak melanom hücrelerinden elde edilmiş, 55 kDa ağırlığında tümör migrasyonunu stimüle eden sitokindir (43). Klinik olarak, serum ve idrarda AMF varlığı, kanser ilerlemesini gösteren prognostiktir değerdir (44). Moleküler klonlama ve sekanslama, PGI (Phosphoglucose Isomerase)'yı bir AMF olarak tanımlamıştır ve AMF'nin PGI enzimatik aktivitesine sahip olduğu kabul edilmektedir (45). Çok sayıda araştırmada, özellikle anjiyogenezi başlatarak (46), AMF'nin tümör metastazı ve invazyonla ilişkili olduğunu göstermiştir. AMF etkisini primer olarak AMF reseptörü olan gp78 üzerinden gösterir. AMFR/gp78 hücre membranında yerleşimli G protein kenetli reseptör ailesine üye, 78 kDa ağırlığında yedi transmembran bileşenli glikoproteinden oluşmaktadır (47). AMF'nin reseptör ile etkileşmesini takip eden süreçte G protein aktivasyonu (48), IP3 üretimi (49), protein kinaz C aktivasyonu (50) ve reseptör fosforilasyonu (51) gerçekleşir.

Yapılan çalışmalarda AMF ve AMFR ekspresyon artışının gastrik karsinomların, küçük hücreli dışı akciğer karsinomlarının (52) ve timomanın progresyonuyla ilişkili olduğu gösterilmiştir (53-57). Ayrıca AMF ve/veya AMFR

ekspresyon artışı berrak hücreli renal hücreli karsinomlar (58), odontojenik tümörler (59), oral yassı epitel hücreli karsinomlar (60), kolorektal karsinomlar (61), mesane karsinomlarında (62) gösterilmiştir.

Gerçekleşen intraselüler metabolizmadaki değişimlerin, hücre aktivitesini artırdığı kabul edilir (63). Ancak endometrial karsinom üzerinde yapılan bir çalışmada AMF'nin endometrial karsinomların migrasyonu, proliferasyonu ve invazyonunda MAPK yolağının sorumlu olduğunu, hücre kültürü ve in vivo fare modeli ile göstermiştir (64). Aynı araştırmacı tarafından yapılan başka bir çalışmada AMF'nin endometrial karsinomlardaki proliferatif etkisini GPER-1 reseptörü aracılığıyla gösterdiğini, GPER-1 sessizleştirilmiş fareler ve endometrium karsinomlu hastalar üzerinde yapılan immünohistokimyasal inceleme aracılığıyla göstermiştir. Ayrıca endometrial karsinom üzerindeki bu etkinin, IP3K yolağı ile gerçekleştirildiğini in vivo olarak göstermişlerdir (65).

2.9. Tümör Tomurcuklanması

Tümör tomurcuklanması karsinomların klinik yönetiminde önemli bir prognostik faktör olarak kabul edilmektedir (66). Tümör tomurcuğu, koheziv tümörden ayrılan 1 ile 4 hücre arasındaki tümör hücre gruplarını tanımlamaktadır. Yapılan birçok çalışmada klinikten bağımsız olarak, artan tomurcuklanma skoru, kötü prognozla ilişkili bulunmuştur. Literatürde kolorektal karsinomlar üzerinde yapılan çok sayıda çalışma mevcuttur. Uluslararası Tümör Tomurcuklanması Konsensus Konferansı'nda (ITBCC), tümör içerisinde 0,785 mm² alanda tomurcuklanma sayısı 0-4 olan olgulara 1 puan, 5-9 olan olgulara 2 puan, 10 ve üzerinde tomurcuğu olan olgulara 3 puan verilerek bir skoreleme sistemi oluşturulmuştur (67). Tümör tomurcukları üzerinde yapılan bir çalışmada, epitelyal-mezenkimal dönüşümle birlikte, transkripsiyon faktörlerinden ZEB1 ve PRRX1 ekspresyonlarının arttığı saptanmıştır (68).

Park ve ark. tarafından 96 endometrioid endometrial karsinom olgularında yapılan çalışmada tümör tomurcuklanması invazyon derinliği, yüksek histolojik derece, lenf nodu metastazı ve lenfovasküler invazyon ile ilişkili bulunmuştur (69) ve ayrıca ER, PR, e-cadherin ekspresyon kaybıyla ilişkili bulunurken aberran β -katenin ekspresyonuyla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Okçu ve ark. 104 endometrial

endometrioid karsinom olgusu kullanarak (70) çalışmada elde ettikleri kesim değeri üzerinde tümör tomurcuk sayısı ile kötü sağkalım, metastaz, lenfovasküler invazyon, serviks invazyonu, artmış tümör boyutu, yüksek histolojik derece ile ilişki saptamıştır. Yamamoto ve ark. tarafından 208 endometrioid karsinomlu olgu ile yapılan çalışmada tümör tomurcuklanması, daha düşük ilerlemesiz sağkalımla ilişkili bulundu (71). Qi ve ark. 176 hastada MELF paterni durumu ve tümör tomurcuklanması varlığına göre endometrioid endometrium karsinomu olgularını 4 gruba ayırdı (72). Çalışmada sağkalım analizleri, MELF paterni ve tümör tomurcuklanmasının birlikte, bağımsız kötü prognostik parametre olduğunu göstermiştir.



3. Gereç ve Yöntem

3.1. Etik Kurul

Bu çalışmanın yapılmasının bilimsel ve etik açıdan uygun olduğuna 18.08.2021 tarih ve 601 nolu karar ile Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nca karar verilmiştir.

3.2. Hasta Seçimi

Çalışmamızda 2005-2018 yılları arasında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde grade 2 ve grade 3 endometrium kanseri tanısı ile histerektomi olmuş, en az 5 yıl süreyle düzenli izlemi yapılmış hastalar dahil edildi. Dr Gözde Koca Yılmaz tarafından moleküler olarak sınıflandırılmış (3) toplam 55 hastaya ait bloklar değerlendirildi. Hasta bilgileri MEDİ-PİS ve MİA-MED sistemleri ile tarandı. Ayrıca Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalındaki hasta dosyaları incelendi. Hastaların parafin blokları ve preparatları Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı arşivinden çıkarıldı. Her hasta için yeterli tümör hücresi içeren birer blok ve preperat seçildi. Çalışma 55 hastaya ait bloklar ile yapıldı.

3.3. Tümör Tomurcuklanma Skoru

Tümör tomurcuklanma skoru verilirken kolorektal karsinomlar için uygulanan “Tumor Budding Consensus” önerilerine uyulmuştur (67). ITBCC grubu tarafından seçilen görüntü alanı, Ueno (73) tarafından kullanılan ve Japon Kolon ve Rektum Kanseri Derneği (74) tarafından da benimsenen görüntü alanına karşılık gelen $0,785 \text{ mm}^2$ alan benimsendi ve bu nedenle Olympus Bx53 mikroskopunda x200'lük büyütme alanı sayım amacıyla kullanıldı. Tümör tomurcuğu olma kriteri olarak 1-4 hücreden oluşma kriteri kabul edildi. Tüm olguların endometriuma ait tümör lamaları içerisinde tümör tomurcuklanmasının en

fazla olduğu alanlar seçilerek bu alanlardaki intratümöral ve peritümöral tümör tomurcukları x200 görüntü alanı içerisinde sayıldı. Tomurcuk sayısı 0-4 olanlara 1 puan, 5-9 tomurcuğu olanlara 2 puan, 10 ve üzerinde tomurcuğu olan olgulara 3 puan verildi. Ayrıca bazı çalışmalarda uygulanan 0 tomurcuğa “0 skoru” verilerek 4 skorlu (0, 1, 2, 3) ikinci bir tümör tomurcuklanma skoru (75) uygulandı. Her iki skorlama sistemi ayrı değerlendirildi.

3.4. İmmünohistokimyasal İnceleme

Olgulara ait immünohistokimyasal MMR (MLH1,PMS2,MSH2,MSH6) ve P53 sonuçları Dr Gözde Koca Yılmaz’ın tezinden alınmıştır (3). Çalışmaya alınan hastaların parafin bloklarının 4 mikronluk kesitleri H&E ile boyandı. Patoloji Anabilim Dalı mikroskopları (Olympus Bx53) ile bir patolog tarafından incelendi. İşaretlenen preparatların ait oldukları bloklardan immünohistokimyasal değerlendirme için Akdeniz Üniversitesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı’na ait mikrotom cihazları kullanılarak her iki hastanın kesitleri bir pozitif şarjlı lama alınarak 4 mikronluk kesitler alındı. Alınan kesitler 50°C’de bir gece boyunca bekletildi. Alınan kesitlerde immünohistokimyasal MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, P53 antikorları Dr Gözde Koca Yılmaz tarafından (3); AMF ve AMFR antikorları bizim tarafımızdan tam otomatik Dako boyama makinesinde standart prosedür kullanılarak yapıldı. Makinede uygulanan immunohistokimya prosedürü :

- 1.Olgulara ait seçilmiş birer adet parafin bloktan 5 mikronluk kesitler pozitif şarjlı lama alındı. Kesitler 50 °C’de bekletilir.
- 2.İki seri sırasıyla ksilolde 10 dakika, %100 alkolde 5 dakika, %85’ lik alkolde 5 dakika ve %75’ lik alkolde 5 dakika bekletilerek deparafinizasyon işlemi tamamlanır.
- 3.Kesitler, distile su ile yıkanır.
- 4.Kesitler, 90 °C sıcaklıkta antijen retrieval solüsyonda önce 20 dakika ve devamında iki kere 5’ er dakika süre ile kaynatılır.

5.Kaynatma işleminin tamamlanmasının devamında kesitlere 30 dakika soğutma işlemi uygulanır.

6.Kesitler distile su ve PBS solüsyonu ile yıkanır.

7.Kesitlere H₂O₂ (Hidrojen peroksit) solüsyonunda 10 dakika süreyle endojen peroksit blokajı uygulanır.

8.Endojen peroksit blokajı sonrasında kesitlere, distile su ve PBS solüsyonu ile yıkama yapılır.

9.MLH1 (G168-15, thermo) 1/25, Anti MSH2 (epr210172, abcam) 1/1000, PMS2 (163C1251, thermo) 1/300, MSH6 (3E1, mab, cell signaling) 1/200, P53 (Pab240, thermo) 1/200, AMF (bs-10419r, bioss) 1/400, AMFR (bs-6511r, bioss) 1/150 oranlarında dilüe edilip spesifik primer antikorlar, kesitler üzerine uygulanır. Nemli ortamda 1 saat inkübasyona alınır.

10.İnkübasyon sonrasında kesitler üzerine sekonder antikor uygulanarak kesitler 10 dakika bekletilir.

11.Kesitler distile su ve PBS ile yıkanır.

12.Kesitler üzerine HRP (Streptavidin Peroksidaz) uygulanarak 10 dakika boyunca beklenilir. Sonrasında kesitler, distile su ve PBS ile yıkanır.

13.DAB (Diamino Benzidine Solüsyonu) solüsyonu kesitlere uygulanarak 2 dakika beklenilir. Sonrasında distile su ve PBS ile yıkanır.

14.Kesitler şale içine alınarak Hematoksilen solüsyonunda 2 dakika bekletilir. Sonrasında musluk suyunda yıkanır.

15.Kesitler, %80 alkolde 5 dakika, %96 alkolde 5 dakika, %100 alkolde 5 dakika ve iki seri ksilolde 5' er dakika bekletilerek dehidratasyon işlemi tamamlanır.

16.Kesitler entellan aracılığıyla lamel ile kapatılıp ışık mikroskopunda değerlendirilerek, olgulara özel antikor skorları kayıt altına alınır.

MLH1, MSH2, PMS2, MSH6 antikorlarından biri veya daha fazlasında boyanma kaybı saptandığında olgu MMR hipermutasyonlu grubuna alındı. P53 hiç boyanmamış veya %80 üzerinde tümör hücresinde güçlü pozitif (+2,+3) ise p53

mutant kabul edildi ve kopya sayısı yüksek gruba dahil edildi. P53 +1 pozitifse ve %80'in altında tümör hücresinde boyanma var ise kopya sayısı düşük (P53 wild tip) grubuna dahil edildi. AMF ve AMFR boyalarının değerlendirilmesi amacıyla olgular boyanma şiddetine ve boyanma yüzdelere göre skorlandı. Boyanma şiddetleri +1 olan olgulara 1 puan, +2 olan olgulara 2 puan, +3 olan olgulara 3 puan verildi. Boyanma yüzdeleri %0 olan olgulara 0 puan, %1-25 arasına 1 puan, %26-50 arasına 2 puan, %51-75 arasına 3 puan ve %76-100 arasına 4 puan verildi. Son olarak boyanma şiddet skoru ve boyanma yüzde skorları toplanarak AMF skoru ve AMFR skoru elde edildi.

3.5. Real Time PCR

RT-PCR bulguları Dr Gözde Koca Yılmaz'ın tez çalışmasındaki verilerdir. Dr Gözde Koca Yılmaz'ın tez çalışmasından (3) çalışmaya alınan olgulara, FFPE DNA izolasyon kiti ile DNA izolasyonu uygulandı. P286R/S, V411L, F367S/C/L, P436R, A456P, L424P, E396Q mutasyonlarına spesifik primer ve prob dizileri kullanılarak Real-time PCR tekniği ile hot-spot mutasyonlar için tarama yapıldı. Real-time PCR ile taranan mutasyonların birinin bulunması durumunda, olgu POLE ultramutasyonlu gruba alındı.

3.5.1. Formalinle Fikse Olmuş Parafine Gömülü Dokulardan (FFPE) DNA İzolasyonu

1.FFPE Dokusundan DNA izolasyonuna spesifik kit (Exegene™ Cell SV Mini Kit; GeneAll) kullanılarak kit prosedürüne göre DNA izolasyon işlemleri yapıldı.

2.Belirlenen tümör bloklarından 6-7 mikron kalınlığında 6 adet lam kesit alındı. Tümör alanları lam üzerinden kazındı.

3.Deparafinizasyon: Kazınan alanlar steril 2 ml santrifüj tüpüne konuldu. Üzerine 1 ml ksilol eklendi. Kısa vorteks yapıldıktan sonra 13000 rpm ayarlı mikrosantrifüjde 5 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı. Bu işlem bir kez daha tekrarlandı. Santrifüj sonunda süpernatant atıldı. Son basamak olarak, santrifüj

tüpüne 1 ml absolü alkol konuldu ve 13000 rpm ile 5 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı. Alkolün uçması için, tüplerin ağzı açık bir şekilde oda ısısında 15 dakika kurumaya bırakıldı.

4.Dokunun parçalanması aşaması: Kuruma işlemi tamamlandıktan sonra, kit içinde bulunan CL buffer'dan 180 µl ve Proteinaz K solüsyonundan 20 µl santrifüj tüpündeki dokuya eklendi. İyice vortekslendikten sonra 56°C sıcaklıkta gece boyu inkübasyona bırakıldı.

5.Ertesi gün DNA eldesi aşaması: Dokunun bulunduğu tüpler kısa bir santrifüj yapıldıktan sonra üzerine kit içinde bulunan BL buffer'dan 200 µl konuldu. Vorteks ile BL bufferın iyice karıştırılması sağlandı. Tüpler 70°C sıcaklıkta 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda kısa santrifüj yapıldı. Üzerine 200 µl absolü alkol eklendi. Vorteks yapıldı. Elde edilen karışım, kit içinde bulunan kolonlara aktarıldı. 8500 rpm ile 1 dakika santrifüj yapıldı. Kolonlar temiz tüp içine alındı. Kolon üzerine, kit içinde bulunan BW solüsyonundan 600 µl konuldu. 8500 rpm ile 1 dakika santrifüj yapıldı. Kolon temiz tüpe alındı. Kolon üzerine, kit içinde bulunan TW solüsyonundan 700 µl konuldu. 8500 rpm ile 1 dakika santrifüj yapıldı. Kolonlar temiz tüpe alınarak 13000 rpm ile 2 dakika santrifüj yapılarak TW solüsyonu iyice kolondan uzaklaştırıldı.

6.DNA elüsyon aşaması: Kolonlar temiz santrifüj tüpüne alındı. Kolonlara, kit içerisinde bulunan AE bufferdan 100 µl eklendi ve oda ısısında 5 dakika inkübasyon yapıldıktan sonra 13000 rpm ile 2 dakika santrifüj yapılarak DNA eldesi tamamlandı.

7.Nanodrop kullanılarak DNA miktarı ve kalitesi ölçüldü.

8.Elde edilen DNA'lar, -20°C sıcaklıkta saklandı.

3.5.2. Real Time PCR

Hedef Diziler:

GACCTGACCCTGTGGTTTTGGCATTGACATTGAGACGACCAAACCTGC
CCCTCAAGTTTC

[C/G/T]TGATGCTGAGACAGACCAGATTATGATGATTTCTACATGATC
GATGGCCAGGGCTACC P286R/S

TCATCACCAACAGGGAGATTGTTTCAGAAGATATTGAAGATTTTGAGT
TCACCCCAAGC

CAGAATATGAAGGCCCTTTTGTGTCTTCAATGAACCCGATGAGGCTC
ATCTGATCCAAA

GGTGGTTTGAACACGTCCAGGAGACCAAACCCACCATCATGGTCACCT
ACAACGGGGACT

TT[T/C][T/C/G]TGAAGGCTTTGTGGAGGCCCCGGGCAGCAGTCCACG
GTCTGAGCATGCAGCAGG F367S/C/L

AGATAGGCTTCCAGAAGGACAGCCAGGGG[G/C]AGTACAAGGCGCCCC
AGTGCATCCACATGG E396Q

ACTGCCTCAGGTGG[G/T]TGAAGAGGGACAGTTACCTTCCTGTGGGCA
GTCATAATC[T/C]CAAGG V411L-L424P

CGGCCGCCAAGGCCAAGCTAGGCTATGATC[C/G]CGTGGAGCTAGACC
CGGAGGACATGTGCC P436R

GGATGGCCACGGAGCAGCCCCAGACTCTG[G/C]CCACGTATTCTGTGTC
AGATGCTGTGCGCCA A456P

CTTACTACCTGTACATGAAGTACGTCCACCCATTCATCTTTGCTCTGTG
CACCATTATTC-485

Allel Spesifik Realtime PCR Prensibi;

Allele özgü primerler, sadece primerin 3 ucundaki mutasyon dönüşüm bazına tamamladıysa, PCR amplifikasyonuna izin vermek için, uygun PCR yazılım kullanılarak tasarlanmıştır. Primerler, primer blast arama motorunu kullanarak spesifitesi araştırılmıştır. Hedef mutasyona özgü baz değişimi örnek DNA'sında mevcut ise PCR çoğalma işlemi gerçekleşir ve master mix içerisinde bulunan hibridizasyon probu ile realtime PCR cihazı bu çoğalmaların varlığını çoğalma eğrisi olarak yazılımında gösterir.

Her bir mutasyon için ayrı ayrı olmak üzere aşağıdaki PCR kurulumu ile Dr Gözde Koca Yılmaz tarafından (3) aşağıdaki reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir.

10ul----- 2X Master Mix with Eva Green (Genmark Türkiye)

2ul-----0,2 µM (forward ve Reverse primer karışımı) (Oligomer-Türkiye)

50ng-----Örnek DNA sı

Toplam PCR Hacmi:20uL

Reaksiyonlar CFX96 (Biorad-ABD) Realtime-PCR cihazıyla aşağıda belirtilen şartlarda çalışılmış ve araştırılmıştır.

95C----15dk

95C----15sn

60C----40sn (Okuma- EvaGreen)

Allel Spesifik Realtime PCR Primerleri:

P286Rfor primeri: ATAATCTGGTCTGTCTCAGCATCGC

P286Rrev primeri: TTTGGCATTGACATTGAG

P286Sfor primeri: CCAAAGTGGCCCTCAAGTTTAT

P286Srev primeri:CCATCGATCATGTAGGAAAT

F367Sfor primeri: ACCTACAACGGGGACTTAC

F367Srev primeri: TCAAATGCTGCCCAGTTACTCA

F367Cfor primeri: CCTACAACGGGGACTTTGC

F367Crev primeri: TCAAATGCTGCCCAGTTACTCA

F367Lfor primeri: ACCTACAACGGGGACTTTTCG

F367Lrev primeri: TCAAATGCTGCCCAGTTACTCA

E369Qfor primeri: CAGAAGGACAGCCAGGGAC

E369Qrev primeri: GAGGCAGTCCATGTGGAT

V411Lfor primeri: GAAGGTAAGTGTCCCTCTTCGA

V411Lrev primeri: TGTTAGAATCATCCTGGCTTCT

L424Pfor primeri: CTTCTGTGGGCAGTCATAATAC

L424Prev primeri: TAGCTCCACGGGATCATAG

P436Rfor primeri: CCGGGTCTAGCTCCACAC

P436Rrev primeri: TGAAGAGGGACAGTTACCTT

A456Pfor primeri: GTTCTCTCCTCAGACTCTAC

A456Prev primeri: CAGGTAGTAAGTGGCGACAG

3.6. İstatistiksel Değerlendirme

Olgulardan elde edilen sayısal veriler kodlanarak bilgisayar programına aktarıldı. İstatistiksel değerlendirme için SPSS (Statistical Package for Social Science, Chicago, II, USA) 23.0 Windows paket programı kullanıldı. Betimsel istatistikler ortalama, standart sapma, frekans ve yüzde değerleri ile verilmiştir. Grupların ortalama değerlerinin karşılaştırılmasında t testi ve Mann Whitney U testleri uygulanmıştır. Gruplara göre oransal özelliklerin incelenmesi amacı ile Ki-Kare analizi ve t testi uygulanmıştır. Çalışmada ölçümler arasındaki ilişkilerin incelenmesi, ölçüm düzeylerinin üç ve üzeri gruplarda değerlendirilmesi için

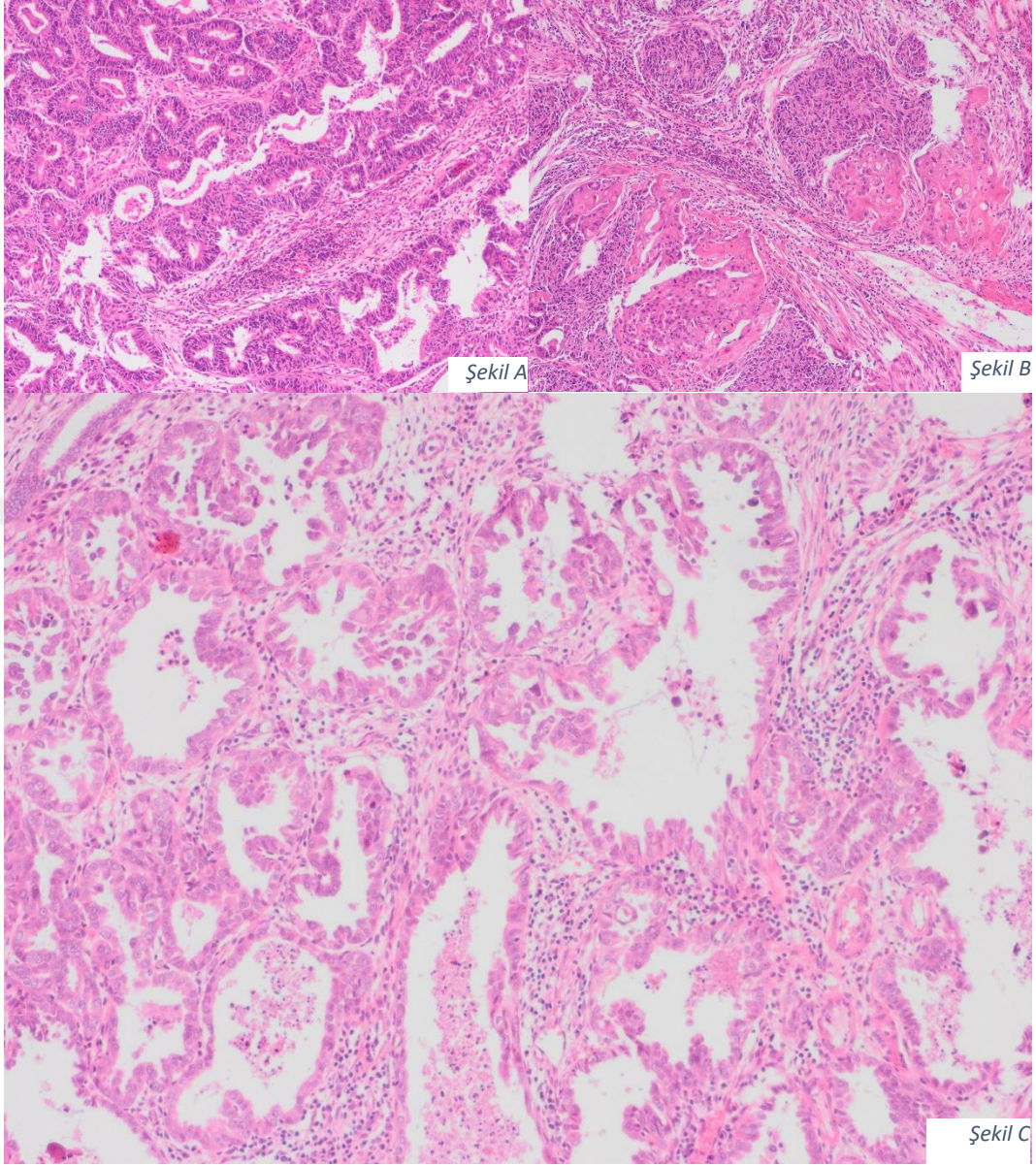
ANOVA testi yapılmıştır. Evre gruplarında farklılığın incelenmesinde ise Mann Whitney U testi yapılmıştır. Anlamlılık değeri olan p değerinin, 0,05'ten küçük olması ($p<0,05$) istatistiksel açıdan anlamlı kabul edilmiştir.



4. Bulgular

4.1. Olguların Klinik ve Patolojik Özellikleri

Çalışmaya, tanı sırasındaki yaşları 27 ile 84 aralığında 55 kadın olgu dahil edildi. Hastaların median yaşı 62, ortalama yaşı 62,5 yıl olarak hesaplandı. Hastaların histolojik derecesi, 13 olguda FİGO histolojik derece 2 iken 42 olguda FİGO histolojik derecesi 3'tü. Histolojik olarak 36 olgu endometrioid karsinom, 11 olgu seröz karsinom ve 8 olgu miks karsinom fenotipine sahipti (Şekil 1). Myometrium invazyonu 36 olguda $\frac{1}{2}$ 'den fazlaydı. Serviks invazyonu 16 olguda tanımlandı. Hematoksilen ve eozin slaytlarda yapılan değerlendirmede 21 olguda lenfovasküler invazyon bulunmaktaydı. Makroskopik ve mikroskopik olarak değerlendirildiğinde, 8 olguda adneksiyal yayılım, 7 olguda omental yayılım gözlemlendi. 9 olguda paraaortik lenf nodlarına, 14 olguda pelvik lenf nodlarına yayılım vardı. 55 olgu içerisinde operasyon sonrası 5 yıl içerisinde 20 olgu hayatını kaybetmişti.



Şekil 1. Endometrial karsinom histopatolojik alt tipleri (H&E): Şekil 1A) Endometrioid Karsinom (x100), 1B) Skuamoz Diferensiasyonlu Endometrioid Karsinom (x100), 1C) Seröz Karsinom (x100)

Olgulara moleküler sınıflandırma uygulandığında 11 olgu POLE mutant, 14 olgu mikrosatellit instabil, 15 olgu P53 wild tip, 15 olgu P53 mutant olarak sınıflandırılmıştır. POLE mutasyonlu olguların ortalama yaşı 58,09, MSI olguların ortalama yaşı 62,14, P53 wild tip olguların ortalama yaşı 58,67 iken P53 mutant grubun ortalama yaşı 69,93 olarak hesaplandı. Çalışmamızda P53 mutant hastaların ortalama yaşı belirgin derecede, POLE mutant ve P53 wild tip hastaların ortalama yaşına göre daha ileri yaşta bulunmuştur (p=0,015). Olguların moleküler sınıflama ve yaş dağılımı ilişkisi aşağıda Tablo 1’de özetlenmiştir.

Tablo 1: Moleküler Gruplara Göre Yaş Dağılımı

	Ort.±s.s.	p
POLE Mutant	58,09±15,46	0,015*
MSI	62,14±5,25	
P53 wild tip	58,67±7,98	
P53 Mutant	69,93±9,60	

**ANOVA testi, *0,05 düzeyinde anlamlı ilişki

Nüks oranı en düşük grup %7,1 ile MSI mutasyonu gösteren grup iken, nüks oranı en yüksek grup %66,7 ile P53 mutant grup olarak belirlendi. En yüksek 5 yıllık sağkalım oranına sahip grup %93,3 ile P53 wild type grubuydu. MSI mutant grup %71,4, POLE mutant grup ise %63,6 sağkalım oranlarına sahipti. P53 mutant grup %26,7 ile en kötü sağkalım oranına sahipti.

Hastaların yaşlarının 60 yaş üzerinde olmasının 5 yıllık sağkalım oranlarını azalttığı saptandı (p=0,005). Moleküler gruplara göre incelendiğinde P53 mutant hastaların 5 yıllık sağkalım oranlarının diğer moleküler gruplara göre belirgin az olduğu gözlemlendi (p=0,002). Histolojik tipe göre sağkalım oranlarının istatistiksel anlamlı fark göstermediği belirlendi (p=0,096). Ancak endometrioid karsinomların, seröz karsinoma göre yaklaşık 2 kat 5 yıllık sağ kalım oranına sahip olduğu gözlemlendi.

Tümör boyutu 2 cm üzerinde ve altında olan hastaların sağkalım oranlarının istatistiksel anlamlı fark göstermediği belirlendi ($p=0,616$). Myometrium invazyonu, adneksiyal yayılım, lenfovasküler invazyon, serviks invazyonu durumuna göre 5 yıllık sağkalım oranları arasında istatistiksel olarak belirgin fark saptanmadı (sırasıyla, $p=0,957$, $p=0,124$, $p=0,834$, $p=0,911$). Sitoloji sonucu malign olan hastaların 5 yıllık sağkalım oranları, benign olan hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı belirlendi ($p=0,014$). Omentum invazyonu bulunan olguların 5 yıllık sağkalım oranlarının belirgin ölçüde az olduğu görüldü ($p=0,007$). Paraaortik lenf nodu tutulumu ve pelvik lenf nodu tutulumu olan hastalar 5 yıllık sağkalım oranları açısından incelendiğinde istatistiksel açıdan anlamlı fark gözlenmedi (sırasıyla, $p=0,709$, $p=0,539$). Hastaların evre düzeyinin 1-2 ve 3-4 olmasına göre sağkalım oranları evre 3-4 hastalarda daha düşüktü ancak istatistiksel açıdan anlamlı fark izlenmedi ($p=0,385$).

AMF skorunun 6 düzeyinin altında veya 6 ve üzerinde olması durumuna göre 5 yıllık sağkalım oranlarının herhangi bir farklılık göstermediği saptandı ($p=0,799$). AMFR skorunun 5 düzeyinin altında veya 5 ve üzerinde olması durumuna göre sağkalım gün süreleri arasında istatistiksel bir anlamlı fark bulunmamaktaydı ($p=0,775$). Hastaların klinik ve patolojik özelliklerinin sağkalım gün sürelerine göre ilişkileri tablo 2’de özetlenmiştir.

Tablo 2: Hastaların Özelliklerine Göre Sağkalım Sürelerinin İncelenmesi

Özellik		Ölü	Sağ	P**
Yaş***	<60 yaş	3 (%13,6)	19 (%86,4)	0,005**
	≥60 yaş	17 (%51,5)	16 (%48,5)	
Moleküler Grup	POLE Mutant	4 (%36,4)	7 (%63,6)	0,002**
	MSI	4 (%28,6)	10 (71,4)	
	P53 wild tip	1 (%6,7)	14 (%93,3)	
	P53 mutant	11 (%73,3)	4 (%26,7)*	
Histolojik Tip	Endometrioid	10 (27,8)	26 (%72,2)	0,096
	Seröz	7 (%63,6)	4 (%36,4)	
	Miks	3 (%37,5)	5 (%62,5)	
Tümör boyutu (cm)***	<2 cm	2 (%50,0)	2 (%50,0)	0,616
	≥2 cm	18 (%35,3)	33 (%64,7)	
Myometrium İnvazyonu	1/2'den az	7 (%36,8)	12 (%63,2)	0,957
	1/2'den fazla	13 (%36,1)	23 (%63,9)	
Lenfovasküler İnvazyon	Yok	12 (%35,3)	22 (%64,7)	0,834
	Var	8 (%38,1)	13 (%61,9)	
Serviks İnvazyonu	Yok	14 (%35,9)	25 (%64,1)	0,911
	Var	6 (%37,5)	10 (%62,5)	
Adneksiyal Yayılım	Yok	15 (%31,9)	32 (%68,1)	0,124
	Var	5 (%62,5)	3 (%37,5)	
Omentum İnvazyonu***	Yok	14 (%29,2)	34 (%70,8)	0,007**
	Var	6 (%85,7)	1 (%14,3)	
Sitoloji***	Benign	16 (%31,4)	35 (%68,6)	0,014*
	Malign	4 (%100)	0 (%0)	
Paraaortik Lenf Nodu***	Negatif	16 (%34,8)	30 (%65,2)	0,709
	Pozitif	4 (%44,4)	5 (%55,6)	
Pelvik Lenf Nodu***	Negatif	16 (%39)	25 (%61)	0,539
	Pozitif	4 (%28,6)	10 (%71,4)	
Evre	1-2	12 (%32,4)	25 (%67,6)	0,385
	3-4	8 (%44,4)	10 (%55,6)	
AMF	AMF skoru 5 ve altı	11 (%37,9)	18 (%62,1)	0,799
	AMF skoru 6 ve üstü	9 (%34,6)	17 (%65,4)	
AMFR	AMFR skoru 4 ve altı	15 (%37,5)	25 (%62,5)	0,775
	AMFR skoru 5 ve üstü	5 (%33,3)	10 (%66,7)	

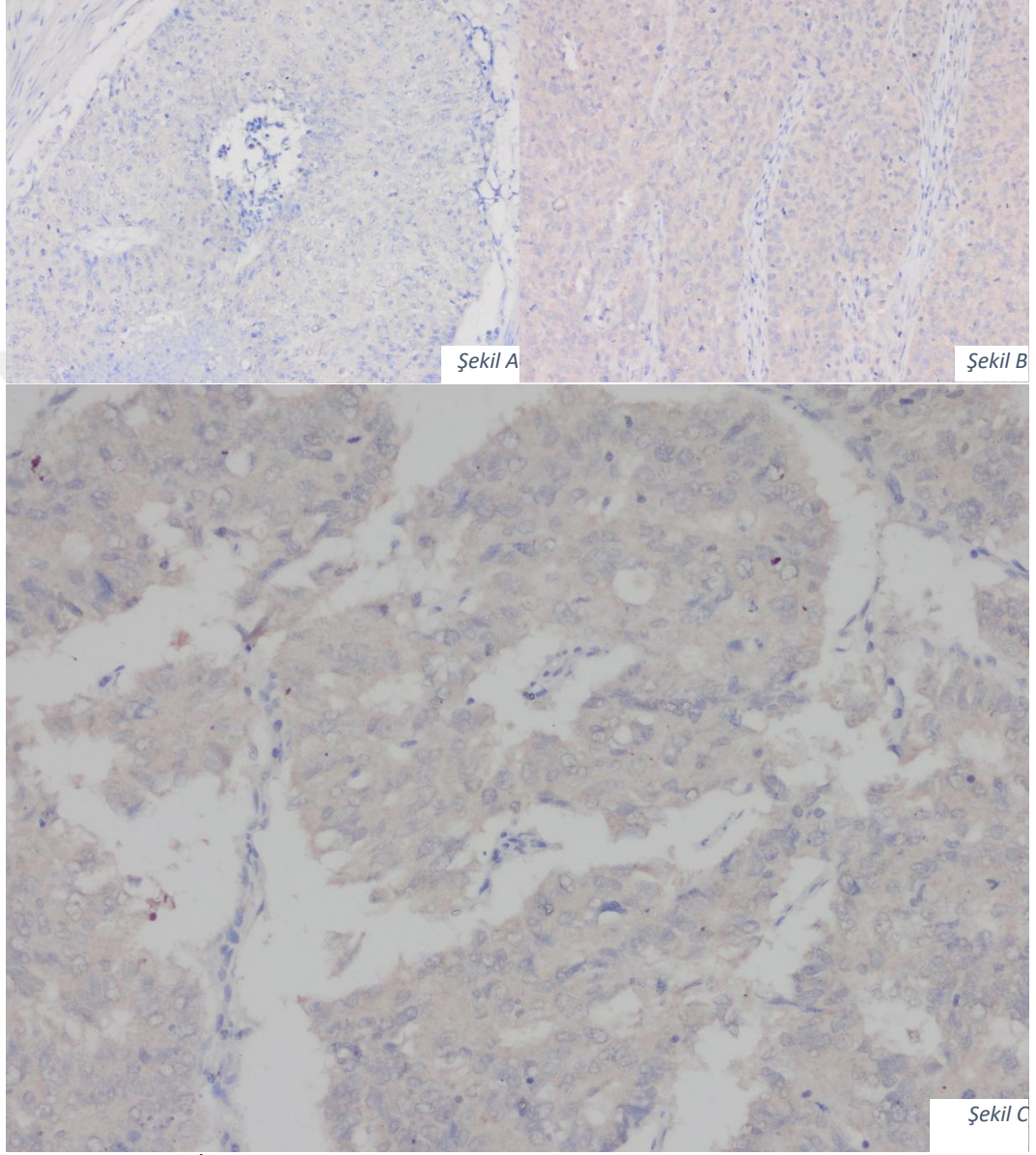
Pearson Ki-kare testi, ***Fisher's Exact Test, * p<0,05 düzeyinde anlamlıdır,**p<0,01 düzeyinde anlamlıdır.

4.2. AMF ve AMFR İmmünohistokimyasal Antikorlarının Klinik Parametrelerle İlişkisi

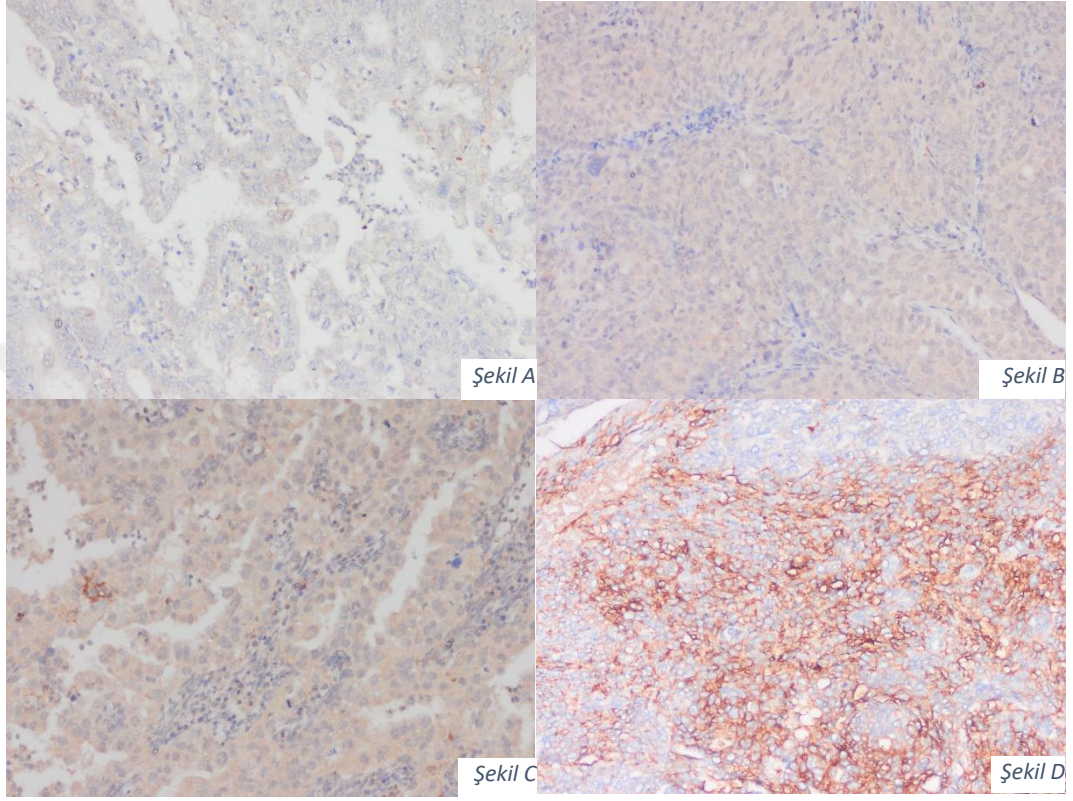
AMF antikoruna ile immünohistokimyasal olarak 55 olgu içerisinde 15 olgu +1 şiddetinde, 26 olgu +2 şiddetinde, 14 olgu +3 şiddetinde boyanma gösterdi. AMF ile boyanan alan oranı %5 ile %90 arasında değişmektedir (Şekil 2).

AMFR antikoruna ile 5 olguda boyanma izlenmemiştir. AMFR antikoruna ile 21 olgu +1 şiddetinde, 17 olgu +2 şiddetinde, 12 olgu +3 şiddetinde boyanma göstermiştir. AMFR antikoruna ile boyanma yüzdeleri %0 ile %100 arasında değişmektedir. AMFR antikoruna ile 10 olguda +3 şiddetinde membran boyanması izlenirken geriye kalan 45 olguda membran boyanması gözlenmedi (Şekil 3).

P53 mutasyonu durumu, myometrium invazyonu, lenfovasküler invazyon, serviks invazyonu, omentum invazyonu, evre, paraaortik ve pelvik lenf düğümü durumlarına göre AMF skorlarının farklılık göstermediği tespit edilmiştir (sırasıyla, $p=0,330$, $p=0,856$, $p=0,722$, $p=0,849$, $p=0,436$, $p=0,545$, $p=0,815$, $p=0,692$). Sitoloji sonucuna göre malign sitolojisi olan olguların, AMF skorlarının daha düşük olduğu görüldü ($p=0,042$).



Şekil 2. AMF İmmünohistokimyasal Antikoru ile Boyanma Şiddetleri:
2A) +1 Şiddetinde Sitoplazmik Boyanma (x200), **2B)** +2 Şiddetinde Sitoplazmik Boyanma (x200), **2C)** +3 Şiddetinde Sitoplazmik Boyanma (x200)



Şekil 3. AMFR İmmünohistokimyasal antikoru ile Sitoplazmik Boyanma Şiddetleri ve Membranöz Boyanma: **3A)** +1 Şiddetinde Sitoplazmik Boyanma (x200), **3B)** +2 Şiddetinde Sitoplazmik Boyanma (x200), **3C)** +3 Şiddetinde Sitoplazmik Boyanma (x200), **3D)** +3 Şiddetinde Membran Boyanması (x200)

Myometrium invazyonu, lenfovasküler invazyon, serviks invazyonu, evre, paraaortik ve pelvik lenf düğümü durumlarına göre AMFR skorlarının istatistiksel anlamlı farklılık göstermediği tespit edilmiştir (sırasıyla, $p=0,621$, $p=0,396$, $p=0,675$, $p=0,056$, $p=0,990$, $p=0,759$). Ancak istatistiksel açıdan anlamlı olmasa da evre arttıkça AMFR skoru ortalamasının düşüş eğiliminde olması dikkati çekti ($p=0,056$). P53 mutant olguların, AMFR skorları ortalamasının, P53 mutant grupta olmayan popülasyona göre daha düşük olduğu görüldü ($p=0,019$). Sitolojisi malign olan olguların AMFR ($p=0,026$) skorlarının daha düşük olduğu görüldü. Omentum invazyonu olan olguların, AMFR skorları ortalamasının daha düşük olduğu belirlendi ($p=0,047$). Klinik bulguların AMF ve AMFR skorları ile ilişkisi tablo 3'te özetlenmiştir.

Tablo 3: AMF, AMFR Ölçümlerine Etki Eden Diğer Faktörler

		AMF SKORU	P	AMFR SKORU	P
		Ort.±s.s.		ort.±s.s.	
P53 Mutant	Yok	5,12±1,52	0,330	3,97±1,33	0,019*
	Var	4,67±1,59		2,87±1,92	
Myometrium invazyonu	1/2'den Az	4,95±1,75	0,856	3,53±1,93	0,621
	1/2'den Fazla	5,03±1,44		3,75±1,38	
Lenfovasküler invazyon	Yok	5,06±1,52	0,722	3,53±1,54	0,396
	Var	4,90±1,61		3,90±1,64	
Serviks invazyonu	Yok	5,03±1,53	0,849	3,74±1,31	0,675
	Var	4,94±1,61		3,5±2,13	
Omentum invazyonu	Yok	5,06±1,46	0,436	3,83±1,46	0,047*
	Var	4,57±2,07		2,57±1,99	
Sitoloji	Benign	5,12±1,51	0,042*	3,80±1,46	0,026*
	Malign	3,50±1,29		2,00±2,31	
Evre**	1	5,03±1,40	0,545	3,84±1,21	0,056
	2	5,33±1,75		3,00±2,10	
	3	5,17±1,64		4,25±1,60	
	4	4,17±1,94		2,33±2,06	
Paraaortik	Yok	4,98±1,53	0,815	3,67±1,58	0,990
	Var	5,11±1,69		3,67±1,66	
Pelvik	Yok	4,95±1,47	0,692	3,63±1,44	0,759
	Var	5,14±1,79		3,79±1,97	

T testi **ANOVA testi, *0,05 düzeyinde anlamlı ilişki

4.3. AMF ve AMFR İmmünohistokimyasal Antikorlarının Moleküler Gruplar ve Histolojik Tip ile İlişkisi

POLE mutant olguların AMFR skor ortalaması 4,45 iken POLE mutasyonu olmayan olgularda AMFR skoru ortalaması 3,47 olarak saptandı. Mann-Whitney U testi uygulandığında POLE mutant hasta grubunun AMFR skor ortalaması geri kalan popülasyona göre anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p=0,043$). AMFR skoru 55 olgunun 15'inde 5 ve üzeri bir skor alırken 40 olguda 4 ve altında skor aldı. AMFR skorları 5 düzeyi ve üstünde olan hastaların daha yüksek oranda POLE mutant grupta bulunduğu belirlendi ($p=0,023$). Buna karşın, AMFR skoru 5 ve üzerinde bulunan hastaların daha düşük oranda P53 mutant grupta bulunduğu saptandı ($p=0,045$). AMFR skorunun 5 ve üzerinde bulunmasının, POLE mutant hastaları belirlemede duyarlılığı %54,5, seçiciliği %79,5 olarak belirlendi. AMF, AMFR skoru 5 ve üzeri olan olguların P53 wild tip, MSI ve P53 mutant gruplarında bulunma ilişkileri sırasıyla tablo 4, tablo 5 ve tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 4: AMF, AMFR Skoru 5 ve Üzeri Olanlarda P53 wild tip Durumuna Göre İncelenmesi

Skor		P53 wild tip				P
		Yok		var		
		N	%	N	%	
AMF	4 ve altında	14	35,0	6	40,0	0,731
	5 ve üzerinde	26	65,0	9	60,0	
AMFR	4 ve altında	31	77,5	9	60,0	0,194
	5 ve üzerinde	9	22,5	6	40,0	

**Pearson Ki-kare testi, *0,05 düzeyinde anlamlı farklılık

Tablo 5: AMF, AMFR Skoru 5 ve Üzeri Olanlarda MSI Durumuna Göre İncelenmesi

Skor		MSI				P
		Yok		Var		
		N	%	N	%	
AMF	4 ve altında	13	31,7	7	50,0	0,219
	5 ve üzerinde	28	68,3	7	50,0	
AMFR**	4 ve altında	28	68,3	12	85,7	0,304
	5 ve üzerinde	13	31,7	2	14,3	

Pearson Ki-kare testi, **Fisher's Exact Test, *0,05 düzeyinde anlamlı farklılık

Tablo 6: AMF, AMFR Skoru 5 ve Üzeri Olanlarda P53 Mutant Durumuna Göre İncelenmesi

Skor		P53 Mutant				P
		Yok		Var		
		N	%	N	%	
AMF **	4 ve altında	14	35	6	40	0,731
	5 ve üzerinde	26	65	9	60	
AMFR***	4 ve altında	26	65	14	93,3	0,045*
	5 ve üzerinde	14	35	1	6,7	

*** Fisher's Exact Test, **Pearson Ki-kare testi, *0,05 düzeyinde anlamlı farklılık

11 POLE mutasyonu bulunan olgunun 10'unda +2 ve +3 şiddetinde boyanma izlendi. 11 POLE mutant olgunun hepsinde %50'nin üzerinde alanda sitoplazmik boyanma izlendi. POLE mutant olguların AMF skor ortalaması yaklaşık 5,90 iken, POLE mutasyonu taşımayan olguların AMF skor ortalaması yaklaşık 4,77 olarak bulunmuştur. T testi uygulandığında AMF skor ortalamasının POLE mutant grupta, POLE mutasyonu taşımayan hasta grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi (p=0,003). AMF skoru 55 olgunun 26'sında 6 ve 7 skoruna ve 29 olguda 5 ile 2 arasında değere sahipti. AMF skoru 11 POLE mutasyonuna sahip olguların 9'unda 6 ve üzerinde bulunurken, 44 POLE mutasyonu bulunmayan olguların 17'sinde 6 ve üzerinde bulundu. AMF skorları 6 ve üstünde olan hastaların daha yüksek oranda POLE mutasyonu gösterdiği saptandı (p=0,017). AMF skorunun 6 ve üzerinde bulunmasının, POLE mutant

hastaları belirlemede duyarlılığı %81,8, seçiciliği %61,4 olarak saptandı. AMF'nin 6 ve üzeri skorlu hastalarda POLE mutasyonuna göre incelenmesi tablo 7'de özetlenmiştir.

Tablo 7: AMF, AMFR Skorunun 6 ve Üzeri Olanlarda POLE Mutasyonuna Göre İncelenmesi

Skor		POLE Mutant				P
		Yok		Var		
		N	%	n	%	
AMF	5 ve altında	27	61,4	2	18,2	0,017*
	6 ve üzerinde	17	38,6	9	81,8	

Fisher's Exact Test, *0,05 düzeyinde anlamlı farklılık

AMF skorları 5 ve üstünde olan hastaların, daha yüksek oranda POLE mutasyonlu grupta yer aldığı belirlendi (p=0,042). AMF, AMFR skoru 5 ve üzeri olanlarda POLE mutasyonu ile ilişkisi tablo 8'de özetlenmiştir.

Tablo 8: AMF, AMFR Skoru 5 ve Üzeri Olanlarda POLE Durumuna Göre İncelenmesi

Skor		POLE Mutant				P
		Yok		Var		
		N	%	N	%	
AMF **	4 ve altında	19	43,2	1	9,1	0,042*
	5 ve üzerinde	25	56,8	10	90,9	
AMFR***	4 ve altında	35	79,5	5	45,5	0,023*
	5 ve üzerinde	9	20,5	6	54,5	

***Pearson Ki-kare testi **Fisher's Exact Test, *0,05 düzeyinde anlamlı farklılık

Toplam 10 olguda, hücre membranında AMFR boyanması saptandı. Boyanma yüzdesi olgular arasında %1 ile %30 arasında değişmekteydi. Moleküler gruplar arasında P53 wild tip grubunun AMFR membran boyanma yüzdesi ortalamasının, diğer gruplara göre daha yüksek düzeylerdeydi ($p=0,238$). Histolojik tipe göre bakıldığında seröz karsinom grubunun AMFR membran boyanma yüzdesi ortalamasının, endometrioid karsinom ve miks karsinom gruplarına göre daha düşük düzeylerde olduğu gözlemlendi ($p=0,784$). AMFR membran boyanma yüzdesinin moleküler grup ve histolojik tip ilişkisi tablo 9’da özetlenmiştir.

Tablo 9: AMFR Membran Boyanması ile Moleküler Gruplar ve Histolojik Tip İlişkisi

		AMFR Membran Boyanma Yüzdesi	P
		Ort.±s.s.	
Histolojik tip	Endometrioid	2,36±6,27	0,784
	Seröz	1,00±3,00	
	Miks	2,50±7,07	
Moleküler Sınıflama	POLE Mutant	1,00±2,00	0,238
	MSI	1,79±5,41	
	P53 wild tip	4,67±9,15	
	P53 Mutant	0,67±2,58	

**ANOVA testi*0,05 düzeyinde anlamlı ilişki

4.4. AMF ve AMFR İmmünohistokimyasal Antikorlarının Nüks ve Sağkalım ile İlişkisi

AMF skoru ortalaması nüks olan olgularda ortalama 4,77, nüks olmayan olgularda ortalama 5,07 değerlerini aldı. Nüks ile olguların AMF skorları arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmadı ($p=0,541$).

AMFR skorunun nüks gelişen hastalardaki ortalaması 2,84 iken, nüks gelişmeyen olgularda 3,93 olarak daha yüksek bulundu ($p=0,029$). AMFR mutasyonları tümör evrelerindeki nüks durumuna göre değerlendirildiğinde evre 1

hastalarda nüks gelişen olgularda AMFR skorunun daha düşük seviyelerde olduğu gözlemlendi ($p=0,030$). Evre 2, 3 ve 4 olan hastalarda istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$). AMFR skorunun evrelere göre nüks ilişkisi tablo 10’da gösterilmiştir.

Tablo 10: AMFR Skorunun Evrelerdeki Nüks Durumuna Göre İncelenmesi

		Nüks		p
		Yok	Var	
		AMFR Skoru		
		Ort.±s.s.	Ort.±s.s.	
evre grup	1	4,14±0,99	3,11±1,45	0,030*
	2	2,80±2,28	4,00	0,656
	3	4,25±1,60	-	-
	4	3,00±1,00	1,67±2,89	0,492

**T testi yapılmıştır. *0,05 düzeyinde anlamlı farklılık

Seröz karsinomlar arasında nüks durumuna göre AMFR skorları değerlendirildiğinde, nüks olan grupta anlamlı olarak daha düşük düzeylerde olduğu görüldü ($p=0,025$). Endometrioid karsinomlu olgularda nüks gelişen olgularda AMF skorunun daha yüksek olduğu izlendi ($p=0,001$). Miks karsinom hasta grubunda AMF, AMFR skorları ve nüks açısından farklılık gözlenmedi ($p>0,05$). AMF ve AMFR skorlarının histolojik tiplerdeki nüks ilişkileri tablo 11’de incelenmiştir.

Tablo 11: AMF ve AMFR Skorlarının Histolojik Tipe Göre Nüks Durumuna Göre İncelenmesi

		AMF SKORU		p	AMFR SKORU		p
		Nüks			Nüks		
		Yok	Var		Yok	Var	
		Ort,±s.s.	Ort,±s.s.		Ort,±s.s.	Ort,±s.s.	
Histolojik tip	Endometrioid	5,06±1,48	6,00±0,00	0,001*	4,00±1,06	4,67±0,58	0,295
	Seröz	6,00±0,82	4,14±1,68	0,071	5,00±1,41	2,29±1,7	0,025*
	Miks	4,40±2,19	5,00±1,73	0,702	2,60±2,61	2,33±2,08	0,886

T testi, *0,05 düzeyinde anlamlı ilişki

AMF skorunun 5 yıllık sağkalım oranlarına göre evre 1, evre 2, evre 3 ve evre 4 grupları içerisinde farklılık göstermediği saptandı (sırasıyla, p=0,866, p=0,351, p=0,850, p=0,110). AMF skorunun evrelere göre sağkalıma etkisi tablo 12’de özetlenmiştir.

Tablo 12: AMF Skorunun Evrelerdeki Sağkalım Durumuna Göre İncelenmesi

		Son Durum		P
		Ölü	Sağ	
		AMF Skoru		
		Ort.±s.s.	Ort.±s.s.	
Evre grup	1	5,09±1,38	5,00±1,45	0,866
	2	7,00	5,00±1,73	0,351
	3	5,33±1,53	5,11±1,76	0,850
	4	3,60±1,52	7,00	0,110

**T testi yapılmıştır.

Sağkalım oranlarına göre AMFR immünohistokimyasal antikoru skorunun evre 1, evre 2, evre 3 ve evre 4 grupları içerisinde farklılık göstermediği belirlendi (sırasıyla, p=0,501, p=0,656, p=0,374, p=0,765). Olguların AMFR skorlarının sağkalım ile ilişkisi tablo 13’te incelenmiştir.

Tablo 13: AMFR Skorlarının Evrelerdeki 5 Yıllık Sağkalıma Göre İncelenmesi

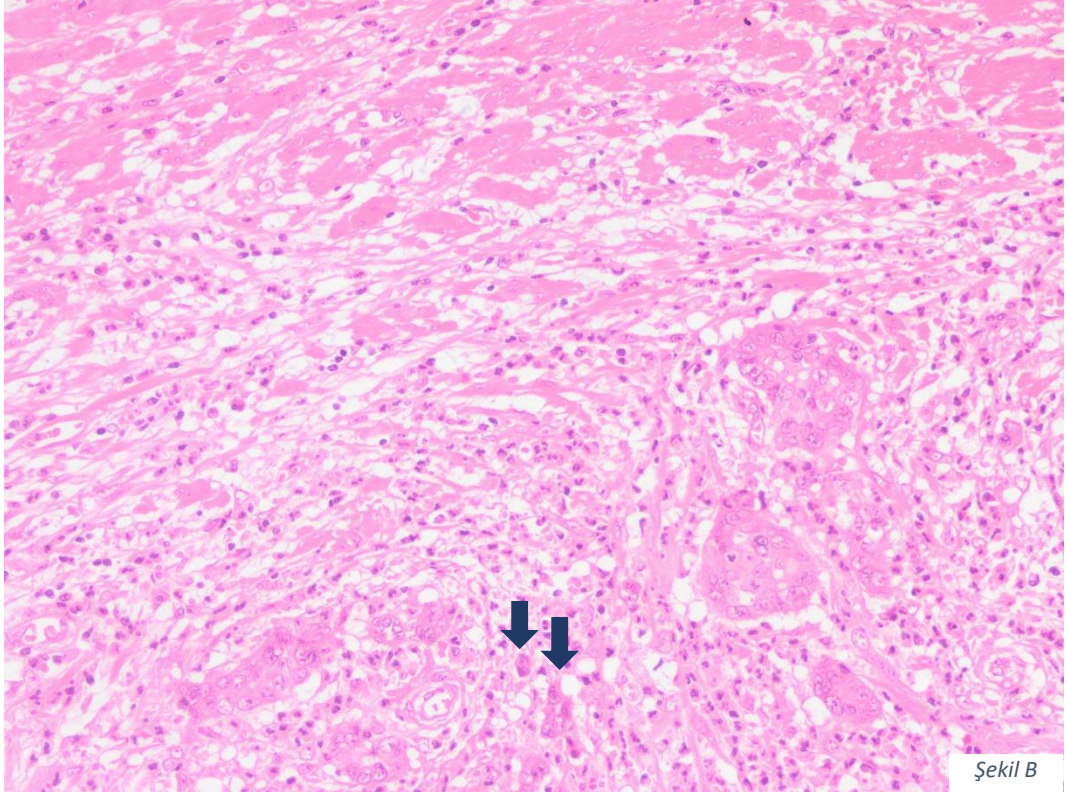
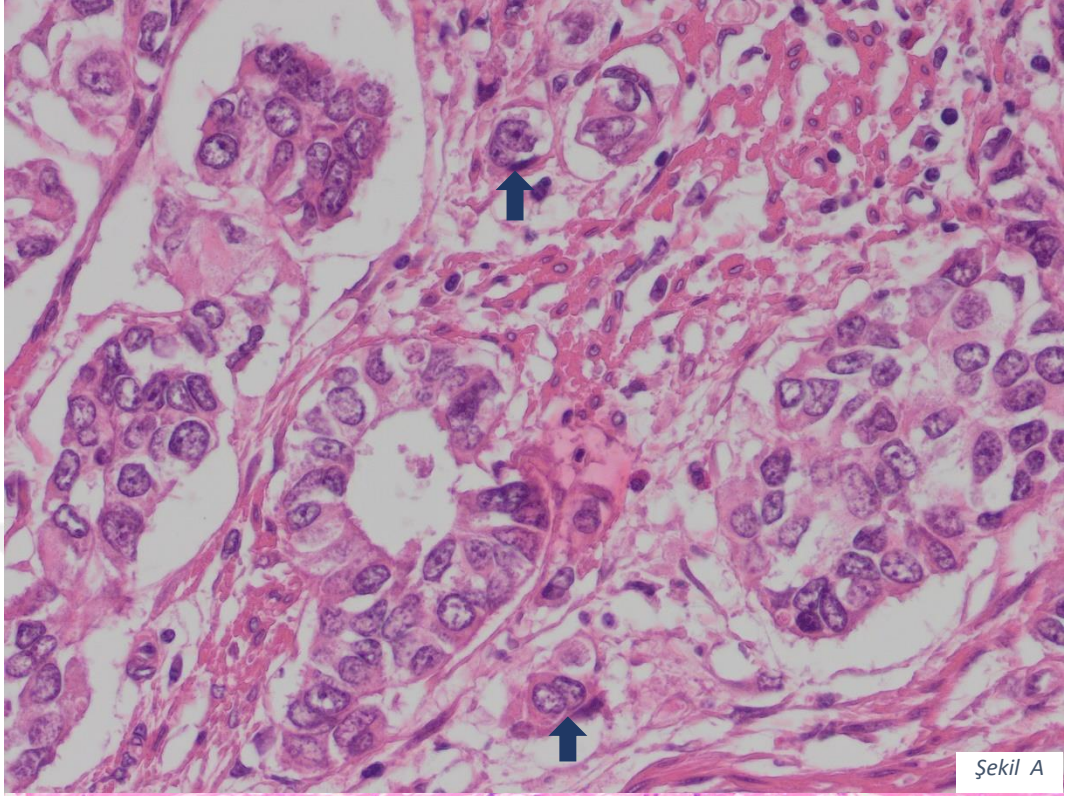
		Son Durum		p
		Ölü	Sağ	
		AMFR SKORU		
		Ort.±s.s.	Ort.±s.s.	
Evre	1	3,64±1,43	3,95±1,1	0,501
	2	4,00	2,80±2,28	0,656
	3	5,00±1,73	4,00±1,58	0,374
	4	2,20±2,28	3,00	0,765

**T testi yapılmıştır.

4.5. AMF ve AMFR İmmünohistokimyasal Antikorlarının Tümör Tomurcuklanma Skoru ile İlişkisi

Olgularımızda ortalama peritümöral tomurcuk sayısı (Şekil 4) 2,27 olarak hesaplandı. ITBCC tümör tomurcuklanma skoru uygulandığında peritümöral tomurcuklanma skoru 55 hasta içerisinde 47 olguda 1 skoruna, 6 olguda 2 skoruna ve 2 olguda 3 skoruna sahipti. Endometrioid karsinomlu olgularda 31 olgu 1 skoruna sahipken 4 olgu 2 skoruna, 1 olgu 3 skoruna sahipti. Seröz karsinomlu hasta grubunda 10 olgu 1 skoruna, 1 olgu 2 skoruna sahipti. Miks karsinom hasta grubu içerisinde 6 olgu 1 skoruna, 1 olgu 2 skoruna ve 1 olgu 3 skoruna sahipti. Skorlama sisteminde “0” skorunu da içeren 4 skorlu peritümöral tomurcuklanma skoru uygulandığında endometrioid karsinomlar içerisinde 6, seröz karsinomlar içerisinde 1 olgu, miks karsinomlar içerisinde 2 olgu “1” yerine “0” skorunu aldı.

Olguların intratümöral tomurcuk sayılarına (Şekil 4) göre ITBCC tümör tomurcuklanma skoru uygulandığında 40 olgu 1 skorunu, 13 olgu 2 skorunu ve 2 olgu 3 skorunu elde etti. Endometrioid karsinomlu olgular içerisinde 27 olgu 1 skorunu, 8 olgu 2 skorunu ve 1 olgu 3 skorunu aldı. Miks karsinomlu olgular içerisinde 5 olgu 1 skorunu, 3 olgu 2 skorunu aldı. Seröz karsinomlar arasında 8 olgu 1 skoruna, 2 olgu 2 skoruna, 1 olgu 3 skoruna sahipti. Skorlama sistemi “0” skorunu da içeren 4 skorlu intratümöral tomurcuklanma skoruna göre uygulandığında endometrioid karsinomlar içerisinde 4 olgu, miks karsinomlar içinde 2 olgu, toplam 6 olgu “1” yerine “0” skoru aldı.



Şekil 4. Tümör Tomurcukları H&E (x400): 4A) İntratümöral tümör tomurcukları (x400), 4B) Peritümöral tümör tomurcukları (x200)

ANOVA testi uygulandığında peritümöral tomurcuklanma skoru 3 olan olguların skoru 1 olan olgulara göre AMFR skorları ortalamasının daha düşük olduğu izlendi ($p=0,043$). Diğer skorlandırma sistemlerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olmasa da tomurcuklanma skoru arttıkça AMFR skorlarının düştüğü gözlemlendi ($p>0,05$). AMF ve AMFR skorlarının, tomurcuklanma skorları ile ilişkileri tablo 14’te özetlenmiştir.

Tablo 14: AMF, AMFR ve İTB, PTB, İTB (4 skorlu), PTB (4 skorlu) İlişkileri

		AMF SKORU	P	AMFR SKORU	P
		Ort.±s.s.		Ort.±s.s.	
İntratümöral Tomurcuklanma Skoru	1	5,15±1,53	0,426	3,85±1,55	0,395
	2	4,69±1,60		3,23±1,69	
	3	4,00±1,41		3,00±1,41	
Peritümöral Tomurcuklanma Skoru	1	5,06±1,51	0,379	3,81±1,42	0,043*
	2	5,00±1,67		3,50±2,17	
	3	3,50±2,12		1,00±1,41	
İntratümöral Tomurcuklanma 4 skorlu	0	4,67±2,07	0,497	4,67±1,03	0,290
	1	5,23±1,44		3,71±1,59	
	2	4,69±1,60		3,23±1,69	
	3	4,00±1,41		3,00±1,41	
Peritümöral Tomurcuklanma 4 Skorlu	0	5,67±1,00	0,303	4,33±1,12	0,055
	1	4,92±1,58		3,68±1,47	
	2	5,00±1,67		3,50±2,17	
	3	3,50±2,12		1,00±1,41	

**ANOVA testi, *0,05 düzeyinde anlamlı farklılık.

5. TARTIŞMA

Endometrial karsinomların prognozları evre, histolojik tip, histolojik derece gibi çok sayıda faktör tarafından etkilenmektedir. Ayrıca son yıllarda prognozun POLE mutasyonu, MSI, P53 mutasyonu, MUC16 mutasyonu gibi çeşitli mutasyonlara bağlı etkilendiği gösterilmiştir. Dünya Sağlık Örgütü, mutasyonların prognoz üzerindeki etkisi nedeniyle 2020 yılı sınıflandırmasında endometrium karsinomlarında moleküler sınıflandırmayı kullanmaya başlamıştır. Ancak bu sınıflandırma içerisinde POLE mutasyonu basamağı dünyanın önemli bir bölümünde, moleküler tetkiklere ulaşımın kısıtlı olması nedeniyle uygulanamamaktadır. Biz bu çalışmada immünohistokimyasal AMF antikoru ekspresyonu yardımıyla POLE mutasyonunu yüksek bir duyarlılık ile belirledik ve bu antikorun, endometrial karsinomların moleküler sınıflandırmasında triaj amacıyla kullanılabileceğini gösterdik.

Li ve ark. tarafından yapılan çalışmada 80 POLE mutant ve 446 POLE wild tip hasta arasında ekspresyonu artmış ve azalmış toplam 1587 gen değerlendirilmiştir. Bu çalışmada glikoliz metabolizmasında görevli 18 gen ve glukoneogenezde görevli 20 adet gen ekspresyonuna bakılmıştır. POLE mutasyonlu hastalarda AMF ve AMFR ekspresyonunun diğer popülasyona göre anlamlı derecede arttığı saptanmıştır. Sonuç olarak POLE mutasyonunun AMF ve AMFR ekspresyonu ile güçlü şekilde ilişkisi olduğu gösterilmiştir. Ek olarak aynı çalışmada hasta sağkalım eğrileri, yüksek AMFR ekspresyonu ve düşük POLE ekspresyonunun iyi prognozla ilişkili olduğunu göstermiştir (2).

Biz, çalışmamızda Yılmaz ve ark. (3) tarafından daha önce moleküler olarak sınıflandırılmış 11'i POLE mutasyonu gösteren toplam 55 endometrial karsinom olgusuna immünohistokimyasal olarak AMF ve AMFR antikorlarını uygulayıp, olguları ekspresyonlarına göre skorlandırıdık. T testi uygulandığında POLE mutant grubun AMF skor ortalaması, POLE mutasyonu bulunmayan hastalara göre yüksek belirlendi ($p=0,003$). AMF immünohistokimyasal boyasıyla POLE mutant grupta 11 hastanın 9'unda AMF skorunun 6 ve üzerinde olduğunu gösterdik. AMF

immünohistokimyasal testi, referans test olarak kullandığımız RT-PCR ile A456P Ct mutasyonu saptanan 1 olgu ile F367L Ct mutasyonu saptanan 1 olgu 6'nın altında skor almıştır. POLE mutant grupta, POLE mutasyonu bulunmayan gruba göre 6 ve üstü skora sahip olguların anlamlı ölçüde oranının arttığını saptadık ($p=0,017$). Çalışmamızda AMF immünohistokimyasal antikorunun POLE mutant hastaları bulma duyarlılığını %81,8, seçiciliğini ise %61,4 olarak hesapladık.

POLE mutant grubun AMFR skor ortalaması, POLE mutasyonu bulunmayan hasta grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p=0,043$). AMFR immünohistokimyasal antikorunun sitoplazmik boyanması dikkate alındığında POLE mutant 11 olgunun 6'sında AMFR skorunun 5 ve üzerinde skor aldığı görüldü. POLE mutant grupta POLE mutasyonu bulunmayan olgulara göre 5 ve üzerinde skora sahip olguların oranlarının anlamlı ölçüde arttığını saptadık ($p=0,023$). AMFR skorunun 5 ve üzerinde bulunma durumuna göre duyarlılık %54,5, seçiciliği %79,5 olarak bulunmuştur. Duyarlılığı yüksek olmasa da seçiciliği yüksek bulunmuştur.

AMF ve AMFR antikor skorları dikkate alındığında, aynı evre içindeki olgular arasında AMF veya AMFR skorlarına göre 5 yıllık sağkalım açısından anlamlı fark saptamadık. Nüks durumuna göre evrelerden bağımsız tüm olgularda ($p=0,029$) ve evre 1 olgularda ($p=0,030$) AMFR skorunu nüks gelişen olgularda daha düşük bulduk. Benzer şekilde seröz karsinom grubu içinde AMFR skorlarının, nüks olan grupta anlamlı olarak daha düşük düzeylerde olduğu görülmüştür ($p=0,025$). Bu bulgular AMFR skorunun azalmasının nüks ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir.

Koheziv tümörden ayrılan 1 ile 4 hücre grupları tümör tomurcuğu olarak tanımlanmaktadır. ITBCC tümör tomurcuklanması skorumaya göre 0,785 mm² alanda sayılan hücre grupları skorlanır. Tümör tomurcuk sayısı 0-4 arasında ise skor 1, 5-9 arasında ise skor 2 ve 9'un üzerinde tomurcuk sayısı ise 3 skorunu alır. Tümör tomurcuklanmasının, epitelyal-mezenkimal dönüşüm ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda epitelyal-mezenkimal dönüşümün immünohistokimyasal antikorlarla ilişkisini saptamak amacıyla olgulara, ITBCC skorunu ve "0" skorunu içeren ITBCC skorunu uyguladık. AMFR skorunun,

epitelyal-mezenkimal dönüşümü göstermesi amacıyla yapılan peritümöral tomurcuklanma skorunda yüksek skorlu hastaların, daha düşük AMFR skor ortalamasına sahip olduğu belirlendi ($p=0,043$).

Nüks gelişen hastalarda ($p=0,029$), en kötü prognozlu moleküler grup olan P53 mutant karsinomlarda ($p=0,019$), seröz karsinomlar arasında nüks olan olgularda ($p=0,025$) AMFR skoru istatistiksel açıdan anlamlı seviyede daha düşük düzeylerde bulunmuştur. Ayrıca omentum invazyonu bulunan olgularda AMFR skorlarının daha düşük düzeyde bulunması ($p=0,047$) ve peritoneal sitolojisi malign olguların daha düşük AMFR skorlarına sahip olması ($p=0,026$) nedenlerinden dolayı, AMFR ekspresyon azalmasının kötü prognozla ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda en yüksek 5 yıllık sağkalım oranına sahip grup %93,3 ile P53 wild tip grubu olmakla birlikte, MSI mutant grup %71,4, POLE mutant grup %63,6, P53 mutant grup %26,7 ile en kötü sağkalım oranına sahiptir. Sağkalım sonuçlarımız literatürden farklı çıkmıştır. Literatürde en iyi prognozdan en kötü prognoza göre POLE mutant, MSI, P53 wild tip ve P53 mutant gruptur (1). Bu fark çalışmanın tek merkezli olması, hasta sayısının literatürdeki diğer çalışmalara göre daha küçük bir popülasyonda yapılması, bazı evrelerdeki hastaların moleküler gruplarda bulunmaması ve sağkalımın evrelerden bağımsız olarak değerlendirilmesinden kaynaklanıyor olabilir.

Çalışmamızın bazı sınırlılıkları bulunmaktadır. Retrospektif araştırma desenine sahip olması ve olgu sayısının görece sınırlı olması nedeniyle, sonuçlar topluma genellenirken dikkatli olunmalıdır. Yine kayıtlar kullanıldığı için dosyaya girilmiş olan hatalı bilgiler sonuçlarımızı etkilemiş olabilir.

Sonuç olarak, çalışmamızda immünohistokimyasal olarak AMF antikoru ekspresyonu yardımıyla POLE mutasyonunu yüksek bir duyarlılıkla belirledik. Sonuçlarımız farklı toplumlarda doğrulanırsa, pahalı ve henüz sınırlı bir kullanımı olan moleküler yöntemlere iyi bir alternatif olabilir.

6. Sonuçlar

Endometrium karsinomları, günümüzde hala morfolojiye göre tanı almaktadır. Endometrium karsinomları Bokhman'a göre ikiye ayrılmaktadır. Tip 1 endometrium karsinomları, %85 oranında 5 yıllık sağkalıma sahip iyi prognozlu karsinomlardır. Tip 2 endometrium karsinomları ise hormon tedavisine kötü yanıt veren, kötü prognozlu karsinomlardır. Ancak bu sınıflama günümüzde klinikopatolojik korelasyonu sağlamada yetersiz kalmaktadır. Son yıllarda endometrial karsinomlarda genetik değişiklikler hakkında bilgi birikiminin artması ve Bokhman sınıflandırmasının prognoz ve klinikopatolojik korelasyonu sağlamada yetersiz kalması nedeniyle DSÖ 2020 yılında moleküler sınıflamayı standart sınıflama kabul etmiştir. Ancak bu sınıflamanın özellikle birçok ikinci basamak sağlık kuruluşunda uygulanmasına engel olan POLE mutasyon basamağı bulunmaktadır. Bu basamak günümüzde yalnızca moleküler yöntemlerle uygulanabilmektedir. Biz bu ilk basamağa çözüm bulmak amacıyla AMF ve AMFR antikrlerini, endometrium karsinom bloklarına immünohistokimyasal yöntem kullanarak uyguladık.

Çalışmamızda POLE mutant olguların AMF ve AMFR skor ortalamaları, POLE mutasyonu bulunmayan olgulara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek saptandı (sırasıyla, $p=0,003$, $p=0,043$). AMF immünohistokimyasal uygulaması %81,8 duyarlılık ve %61,4 seçicilik ile POLE pozitif endometrium karsinomlarını 6 ve üzeri bir skorla boyadı. Bu şekilde 11 POLE mutasyonlu hastanın 9'unu saptamış oldu. Ayrıca 5 ve zeri AMF skorunun POLE pozitif hastalarda boyanma oranının diğer moleküler gruplara göre yüksek olduğunu gösterdik. AMF immünohistokimyasal antikru 11 POLE mutant olgunun 10'unda 5 ve üzeri bir skor almayı başardı ($p=0,042$). Biz bu immünohistokimyasal uygulamanın POLE potansiyeli yüksek olan hastaları saptamada yararlı olacağını düşünüyoruz. Sonuçlarımız AMFR antikrunun %79 ile iyi bir seçiciliğe sahip olduğunu ancak duyarlılığının çok yüksek olmaması nedeniyle POLE ile ilişkili ve

spesifik başka antikorlarla beraber uygulanması durumunda, POLE mutant olguları saptamakta başarılı olacağını göstermektedir.

AMFR immünohistokimyasal uygulaması skorlandığında nüks gelişen, peritoneal sitolojisi malign olan, omentum invazyonu gelişen ve en kötü prognoza sahip moleküler grup olan P53 mutant olgularda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha düşük ortalama skora sahip olduğu saptanmıştır (sırasıyla, $p=0,029$, $p=0,026$, $p=0,047$, $p=0,019$). Bu bulgular, AMFR ekspresyon düşüklüğünün kötü prognozla ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.



7. ÖZET

2020 DSÖ endometrium kanseri sınıflandırmasına göre endometrium karsinomları POLE mutant, MSI, P53 wild tip ve P53 mutant gruplarına ayrılır. Ancak bu sınıflandırmada ilk basamakta POLE mutasyonunun sadece moleküler yöntemlerle belirlenebilmesi nedeniyle sağlık kuruluşlarının büyük bir bölümünde uygulanamamaktadır. Yapılan bir çalışmada POLE mutant olgularda anlamlı ölçüde arttığı saptanan AMF (Autocrine Motility Factor) ve AMFR (Autocrine Motility Factor Receptor) proteinlerinin, immünohistokimyasal ekspresyonlarını araştırdık. Aynı zamanda bu antikörlerin epitelyal-mezenkimal dönüşümle ilişkilerini belirlemek amacıyla H&E slaytlardan tümör tomurcuklanma skorlarıyla ilişkilerini değerlendirdik.

Çalışmamızda daha önce merkezimizde tanı almış ve Yılmaz ve ark. tarafından moleküler olarak sınıflandırılmış 55 endometrium karsinomu olgusunun karsinom bloklarına AMF ve AMFR antikörleri immünohistokimyasal olarak uygulanmıştır ve boyanma sonuçları değerlendirilip boyanma şiddeti ve yüzdelere göre olgular skorlanmıştır. Bu olguların H&E slaytları mikroskop ile incelenip, tümör tomurcuklanması skorları verilmiştir.

AMF immünohistokimyasal antikoru 11 POLE mutant olgunun 9'unda 6 ve üzeri skor almıştır. AMF antikörünün immünohistokimyasal olarak duyarlılığı %81,8 ve seçiciliği %61,4 olarak bulunmuştur. AMFR antikoru ekspresyonu ortalaması, yüksek peritümöral tomurcuklanma skoruna sahip olgularda daha düşük bulunmuştur (p=0,043).

Sonuç olarak elde ettiğimiz veriler ışığında, AMF antikörünü uygulamanın, POLE potansiyeli yüksek olan hastaları saptamada önemli olacağına inanıyoruz.

Anahtar kelimeler: POLE, AMF, AMFR, Tümör Tomurcuklanması, İmmünohistokimya

8. ABSTRACT

The previous Bokhman classification was used to classify the endometrial carcinoma and was found ineffective with the clinicopathological correlation. Therefore in 2020, the WHO changed their classification to the molecular classification. Molecular classification has one big challenge, the POLE mutation status only can be determined by molecular methods. Many hospitals around the globe aren't able to perform molecular methods. In a previous study, AMF (Autocrine Motility Factor) and AMFR (Autocrine Motility Factor Receptor) proteins were found to be increased in POLE mutant endometrial carcinoma cases. Therefore we applied AMF and AMFR immunohistochemistry to endometrial carcinoma cases to see whether this approach can find POLE-mutated endometrial carcinoma cases. Furthermore, we counted tumor budding and scored it into four different tumor budding scores to understand the relationship between epithelial-mesenchymal transition and AMF, AMFR antibodies.

We applied AMF and AMFR immunohistochemistry to 55 endometrial carcinoma cases molecularly classified by Koca Yılmaz et al.. Then we examined the H&E slides of the 55 cases and counted the tumor buds. Later we transformed tumor bud counts into tumor budding scores.

AMF antibody was able to reach a score of 6 and more on 9 out of 11 POLE mutant cases. Also, the AMF antibody reached a sensitivity of %81,8 and a specificity of %61,4. AMFR antibody showed low expression in high peritumoral tumor budding scored cases ($p=0,043$).

As a result of our findings, we believe that immunohistochemical AMF application can be used to triage high-potential POLE mutant cases in the practice.

Keywords: POLE, AMF, AMFR, Tumor Budding, Immunohistochemistry

9. Kaynakça

1. Kandoth C, Schultz N, Cherniack AD, Akbani R, Liu Y, Shen H, et al. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature*. 2013;497(7447):67-73.
2. Li Y, Bian Y, Wang K, Wan XP. POLE mutations improve the prognosis of endometrial cancer via regulating cellular metabolism through AMF/AMFR signal transduction. *BMC medical genetics*. 2019;20(1):202.
3. Gözde Koca Yılmaz GE. Yüksek dereceli endometrium karsinomlarının moleküler ve immunohistokimyasal yöntemlerle sınıflanması [Tıpta Uzmanlık, Patoloji]. Ulusal Tez Merkezi: Akdeniz Üniversitesi 2019.
4. Ellis H. Anatomy of the uterus. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*. 2011;12(3):99-101.
5. Robert J. Kurman MLC, C. Simon Herrington, Robert H. Young. *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract*: Springer Cham; 2019.
6. Crum CP, Hornstein MD, Nucci MR, Mutter GL. Hertig and beyond: a systematic and practical approach to the endometrial biopsy. *Adv Anat Pathol*. 2003;10(6):301-18.
7. Murray MJ, Meyer WR, Zaino RJ, Lessey BA, Novotny DB, Ireland K, et al. A critical analysis of the accuracy, reproducibility, and clinical utility of histologic endometrial dating in fertile women. *Fertility and sterility*. 2004;81(5):1333-43.
8. Murdock TA, Veras EFT, Kurman RJ, Mazur MT. The Normal Endometrium. In: Murdock TA, Veras EFT, Kurman RJ, Mazur MT, editors. *Diagnosis of Endometrial Biopsies and Curettings: A Practical Approach*. Cham: Springer International Publishing; 2019. p. 9-37.
9. Bozdoğan O, Atasoy P, Erekul S, Bozdoğan N, Bayram M. Apoptosis-related proteins and steroid hormone receptors in normal, hyperplastic, and neoplastic endometrium. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists*. 2002;21(4):375-82.
10. O'Connell JT, Mutter GL, Cviko A, Nucci M, Quade BJ, Kozakewich HP, et al. Identification of a basal/reserve cell immunophenotype in benign and neoplastic endometrium: a study with the p53 homologue p63. *Gynecologic oncology*. 2001;80(1):30-6.
11. Barroeta JE, Pasha TL, Acs G, Zhang PJ. Immunoprofile of endocervical and endometrial stromal cells and its potential application in localization of tumor involvement. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists*. 2007;26(1):76-82.
12. Lacey JV, Jr., Chia VM, Rush BB, Carreon DJ, Richesson DA, Ioffe OB, et al. Incidence rates of endometrial hyperplasia, endometrial cancer and hysterectomy from 1980 to 2003 within a large prepaid health plan. *International journal of cancer*. 2012;131(8):1921-9.
13. Epplein M, Reed SD, Voigt LF, Newton KM, Holt VL, Weiss NS. Risk of complex and atypical endometrial hyperplasia in relation to anthropometric measures and reproductive history. *Am J Epidemiol*. 2008;168(6):563-70; discussion 71-6.
14. Huang EC, Mutter GL, Crum CP, Nucci MR. Clinical outcome in diagnostically ambiguous foci of 'gland crowding' in the endometrium. *Modern pathology : an official*

journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc. 2010;23(11):1486-91.

15. Ordi J, Bergeron C, Hardisson D, McCluggage WG, Hollema H, Felix A, et al. Reproducibility of current classifications of endometrial endometrioid glandular proliferations: further evidence supporting a simplified classification. *Histopathology*. 2014;64(2):284-92.

16. Monte NM, Webster KA, Neuberg D, Dressler GR, Mutter GL. Joint loss of PAX2 and PTEN expression in endometrial precancers and cancer. *Cancer research*. 2010;70(15):6225-32.

17. Hardisson D, Moreno-Bueno G, Sánchez L, Sarrió D, Suárez A, Calero F, et al. Tissue microarray immunohistochemical expression analysis of mismatch repair (hMLH1 and hMSH2 genes) in endometrial carcinoma and atypical endometrial hyperplasia: relationship with microsatellite instability. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2003;16(11):1148-58.

18. Hayes MP, Wang H, Espinal-Witter R, Douglas W, Solomon GJ, Baker SJ, et al. PIK3CA and PTEN mutations in uterine endometrioid carcinoma and complex atypical hyperplasia. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2006;12(20 Pt 1):5932-5.

19. Levine RL, Cargile CB, Blazes MS, van Rees B, Kurman RJ, Ellenson LH. PTEN mutations and microsatellite instability in complex atypical hyperplasia, a precursor lesion to uterine endometrioid carcinoma. *Cancer research*. 1998;58(15):3254-8.

20. Ayhan A, Mao TL, Suryo Rahmanto Y, Zeppernick F, Ogawa H, Wu RC, et al. Increased proliferation in atypical hyperplasia/endometrioid intraepithelial neoplasia of the endometrium with concurrent inactivation of ARID1A and PTEN tumour suppressors. *The journal of pathology Clinical research*. 2015;1(3):186-93.

21. Bokhman JV. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecologic oncology*. 1983;15(1):10-7.

22. Lukanova A, Lundin E, Micheli A, Arslan A, Ferrari P, Rinaldi S, et al. Circulating levels of sex steroid hormones and risk of endometrial cancer in postmenopausal women. *International journal of cancer*. 2004;108(3):425-32.

23. Bartosch C, Clarke B, Bosse T. Gynaecological neoplasms in common familial syndromes (Lynch and HBOC). *Pathology*. 2018;50(2):222-37.

24. Bosse T, Nout RA, McAlpine JN, McConechy MK, Britton H, Hussein YR, et al. Molecular Classification of Grade 3 Endometrioid Endometrial Cancers Identifies Distinct Prognostic Subgroups. *The American journal of surgical pathology*. 2018;42(5):561-8.

25. Fader AN, Boruta D, Olawaiye AB, Gehrig PA. Uterine papillary serous carcinoma: epidemiology, pathogenesis and management. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2010;22(1):21-9.

26. Kurman RJCM HC, Young RH. . WHO classification of tumours of female reproductive organs. 5 ed: Lyon: IARC Publications; 2020.

27. Prendergast EN, Holman LL, Liu AY, Lai TS, Campos MP, Fahey JN, et al. Comprehensive genomic profiling of recurrent endometrial cancer: Implications for selection of systemic therapy. *Gynecologic oncology*. 2019;154(3):461-6.

28. Matsuo K, Ross MS, Machida H, Blake EA, Roman LD. Trends of uterine carcinosarcoma in the United States. *J Gynecol Oncol*. 2018;29(2):e22.

29. Matsuo K, Ross MS, Bush SH, Yunokawa M, Blake EA, Takano T, et al. Tumor characteristics and survival outcomes of women with tamoxifen-related uterine carcinosarcoma. *Gynecologic oncology*. 2017;144(2):329-35.

30. Biscuola M, Van de Vijver K, Castilla M, Romero-Pérez L, López-García M, Díaz-Martín J, et al. Oncogene alterations in endometrial carcinosarcomas. *Human pathology*. 2013;44(5):852-9.
31. Castilla M, Moreno-Bueno G, Romero-Pérez L, Van De Vijver K, Biscuola M, López-García M, et al. Micro-RNA signature of the epithelial-mesenchymal transition in endometrial carcinosarcoma. *The Journal of pathology*. 2011;223(1):72-80.
32. Nucci M. *Gynecologic Pathology*. 2nd Edition ed. Goldblum JR, editor: Elsevier; 2020. 1040 p.
33. Hoang LN, Kinloch MA, Leo JM, Grondin K, Lee CH, Ewanowich C, et al. Interobserver Agreement in Endometrial Carcinoma Histotype Diagnosis Varies Depending on The Cancer Genome Atlas (TCGA)-based Molecular Subgroup. *The American journal of surgical pathology*. 2017;41(2):245-52.
34. Billingsley CC, Cohn DE, Mutch DG, Stephens JA, Suarez AA, Goodfellow PJ. Polymerase ε (POLE) mutations in endometrial cancer: clinical outcomes and implications for Lynch syndrome testing. *Cancer*. 2015;121(3):386-94.
35. Stasenkov M, Tunnage I, Ashley CW, Rubinstein MM, Latham AJ, Da Cruz Paula A, et al. Clinical outcomes of patients with POLE mutated endometrioid endometrial cancer. *Gynecologic oncology*. 2020;156(1):194-202.
36. FDA Approves First Cancer Treatment for Any Solid Tumor with a Specific Genetic Feature. <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-grants-accelerated-approval-pembrolizumab-first-tissuesite-agnostic-indication2020> [
37. Raffone A, Travaglino A, Gabrielli O, Micheli M, Zuccalà V, Bitonti G, et al. Clinical features of ProMisE groups identify different phenotypes of patients with endometrial cancer. *Arch Gynecol Obstet*. 2021;303(6):1393-400.
38. Slomovitz BM, Jiang Y, Yates MS, Soliman PT, Johnston T, Nowakowski M, et al. Phase II study of everolimus and letrozole in patients with recurrent endometrial carcinoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2015;33(8):930-6.
39. Kurnit KC, Kim GN, Fellman BM, Urbauer DL, Mills GB, Zhang W, et al. CTNNB1 (beta-catenin) mutation identifies low grade, early stage endometrial cancer patients at increased risk of recurrence. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2017;30(7):1032-41.
40. de Jonge MM, Auguste A, van Wijk LM, Schouten PC, Meijers M, Ter Haar NT, et al. Frequent Homologous Recombination Deficiency in High-grade Endometrial Carcinomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2019;25(3):1087-97.
41. Ashley CW, Da Cruz Paula A, Kumar R, Mandelker D, Pei X, Riaz N, et al. Analysis of mutational signatures in primary and metastatic endometrial cancer reveals distinct patterns of DNA repair defects and shifts during tumor progression. *Gynecologic oncology*. 2019;152(1):11-9.
42. León-Castillo A, de Boer SM, Powell ME, Mileschkin LR, Mackay HJ, Leary A, et al. Molecular Classification of the PORTEC-3 Trial for High-Risk Endometrial Cancer: Impact on Prognosis and Benefit From Adjuvant Therapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2020;38(29):3388-97.
43. Liotta LA, Mandler R, Murano G, Katz DA, Gordon RK, Chiang PK, et al. Tumor cell autocrine motility factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(10):3302-6.
44. Gomm SA, Keevil BG, Thatcher N, Hasleton PS, Swindell RS. The value of tumour markers in lung cancer. *British journal of cancer*. 1988;58(6):797-804.

45. Watanabe H, Takehana K, Date M, Shinozaki T, Raz A. Tumor cell autocrine motility factor is the neuroleukin/phosphohexose isomerase polypeptide. *Cancer research*. 1996;56(13):2960-3.
46. Funasaka T, Haga A, Raz A, Nagase H. Tumor autocrine motility factor is an angiogenic factor that stimulates endothelial cell motility. *Biochemical and biophysical research communications*. 2001;285(1):118-28.
47. Shimizu K, Tani M, Watanabe H, Nagamachi Y, Niinaka Y, Shiroishi T, et al. The autocrine motility factor receptor gene encodes a novel type of seven transmembrane protein. *FEBS Lett*. 1999;456(2):295-300.
48. Watanabe H, Nabi IR, Raz A. The relationship between motility factor receptor internalization and the lung colonization capacity of murine melanoma cells. *Cancer research*. 1991;51(10):2699-705.
49. Kohn EC, Liotta LA, Schiffmann E. Autocrine motility factor stimulates a three-fold increase in inositol trisphosphate in human melanoma cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 1990;166(2):757-64.
50. Silletti S, Timar J, Honn KV, Raz A. Autocrine motility factor induces differential 12-lipoxygenase expression and activity in high- and low-metastatic K1735 melanoma cell variants. *Cancer research*. 1994;54(22):5752-6.
51. Watanabe H, Carmi P, Hogan V, Raz T, Silletti S, Nabi IR, et al. Purification of human tumor cell autocrine motility factor and molecular cloning of its receptor. *The Journal of biological chemistry*. 1991;266(20):13442-8.
52. Takanami I, Takeuchi K. Autocrine motility factor-receptor gene expression in lung cancer. *Jpn J Thorac Cardiovasc Surg*. 2003;51(8):368-73.
53. Ohta Y, Minato H, Tanaka Y, Go T, Oda M, Watanabe Y. Autocrine motility factor receptor expression associates with tumor progression in thymoma. *Int J Oncol*. 2000;17(2):259-64.
54. Takanami I, Takeuchi K, Watanabe H, Yanagawa T, Takagishi K, Raz A. Significance of autocrine motility factor receptor gene expression as a prognostic factor in non-small-cell lung cancer. *International journal of cancer*. 2001;95(6):384-7.
55. Tímár J, Rásó E, Döme B, Ladányi A, Bánfalvi T, Gilde K, et al. Expression and function of the AMF receptor by human melanoma in experimental and clinical systems. *Clin Exp Metastasis*. 2002;19(3):225-32.
56. Kawanishi K, Doki Y, Shiozaki H, Yano M, Inoue M, Fukuchi N, et al. Correlation between loss of E-cadherin expression and overexpression of autocrine motility factor receptor in association with progression of human gastric cancers. *Am J Clin Pathol*. 2000;113(2):266-74.
57. Hirono Y, Fushida S, Yonemura Y, Yamamoto H, Watanabe H, Raz A. Expression of autocrine motility factor receptor correlates with disease progression in human gastric cancer. *British journal of cancer*. 1996;74(12):2003-7.
58. Lucarelli G, Rutigliano M, Sanguedolce F, Galleggiante V, Giglio A, Cagiano S, et al. Increased Expression of the Autocrine Motility Factor is Associated With Poor Prognosis in Patients With Clear Cell-Renal Cell Carcinoma. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94(46):e2117.
59. Grewal HK, Sethi S. Immunohistochemical expression of Type IV Collagen and Autocrine Motility Factor Receptor in Odontogenic Tumours. *J Clin Diagn Res*. 2014;8(10):Zc17-21.
60. Niinaka Y, Oida S, Ishisaki A, Takeda K, Iimura T, Maruoka Y, et al. Autocrine motility factor and its receptor expressions in human oral squamous cell carcinoma (SCC) cells. *Int J Oncol*. 1996;9(3):433-8.

61. Nakamori S, Watanabe H, Kameyama M, Imaoka S, Furukawa H, Ishikawa O, et al. Expression of autocrine motility factor receptor in colorectal cancer as a predictor for disease recurrence. *Cancer*. 1994;74(7):1855-62.
62. Otto T, Birchmeier W, Schmidt U, Hinke A, Schipper J, Rübber H, et al. Inverse relation of E-cadherin and autocrine motility factor receptor expression as a prognostic factor in patients with bladder carcinomas. *Cancer research*. 1994;54(12):3120-3.
63. Funasaka T, Raz A. The role of autocrine motility factor in tumor and tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Rev*. 2007;26(3-4):725-35.
64. Li Y, Jia Y, Che Q, Zhou Q, Wang K, Wan XP. AMF/PGI-mediated tumorigenesis through MAPK-ERK signaling in endometrial carcinoma. *Oncotarget*. 2015;6(28):26373-87.
65. Li Y, Jia Y, Bian Y, Tong H, Qu J, Wang K, et al. Autocrine motility factor promotes endometrial cancer progression by targeting GPER-1. *Cell Commun Signal*. 2019;17(1):22.
66. Lugli A, Zlobec I, Berger MD, Kirsch R, Nagtegaal ID. Tumour budding in solid cancers. *Nature reviews Clinical oncology*. 2021;18(2):101-15.
67. Lugli A, Kirsch R, Ajioka Y, Bosman F, Cathomas G, Dawson H, et al. Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Modern Pathology*. 2017;30(9):1299-311.
68. Jensen DH, Dabelsteen E, Specht L, Fiehn AM, Therkildsen MH, Jønson L, et al. Molecular profiling of tumour budding implicates TGF β -mediated epithelial-mesenchymal transition as a therapeutic target in oral squamous cell carcinoma. *The Journal of pathology*. 2015;236(4):505-16.
69. Park JY, Hong DG, Chong GO, Park JY. Tumor Budding is a Valuable Diagnostic Parameter in Prediction of Disease Progression of Endometrial Endometrioid Carcinoma. *Pathol Oncol Res*. 2019;25(2):723-30.
70. Okcu O, Şen B, Aşkan G, Öztürk Ç, Öztürk SD, Bedir R. Tumor Budding is an Independent Prognostic Factor to Predict Overall Survival in Endometrial Endometrioid Carcinoma: A Retrospective Study. *Int J Surg Pathol*. 2023;31(1):26-37.
71. Yamamoto M, Kaizaki Y, Kogami A, Hara T, Sakai Y, Tsuchida T. Prognostic significance of tumor budding, poorly differentiated cluster, and desmoplastic reaction in endometrioid endometrial carcinomas. *J Obstet Gynaecol Res*. 2021;47(11):3958-67.
72. Qi X, Zhu L, Zhang B. Clinicopathologic association and prognostic impact of microcystic, elongated and fragmented pattern invasion, combined with tumor budding in endometrioid endometrial cancer. *J Obstet Gynaecol Res*. 2022;48(9):2431-41.
73. Ueno H, Murphy J, Jass JR, Mochizuki H, Talbot IC. Tumour 'budding' as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer. *Histopathology*. 2002;40(2):127-32.
74. Watanabe T, Itabashi M, Shimada Y, Tanaka S, Ito Y, Ajioka Y, et al. Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum (JSCCR) Guidelines 2014 for treatment of colorectal cancer. *Int J Clin Oncol*. 2015;20(2):207-39.
75. Zlobec I, Bächli M, Galuppini F, Berger MD, Dawson HE, Nagtegaal ID, et al. Refining the ITBCC tumor budding scoring system with a "zero-budding" category in colorectal cancer. *Virchows Arch*. 2021;479(6):1085-90.