

**T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ENDOMETRİUM KANSERİNDE FOXO TRANSKRİPSİYON
FAKTÖRLERİ VE İLİŞKİLİ MOLEKÜLER
MEKANİZMALARIN HİSTOKİMYASAL VE MOLEKÜLER
BİYOLOJİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nihal VURANOK

Enstitü Anabilim Dalı: Histoloji ve Embriyoloji

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Elvan ŞAHİN
Ortak Danışman: Doç. Dr. Gamze GÜNEY ESKİLER**

HAZİRAN-2022

**T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ENDOMETRİUM KANSERİNDE FOXO TRANSKRİPSİYON
FAKTÖRLERİ VE İLİŞKİLİ MOLEKÜLER
MEKANİZMALARIN HİSTOKİMYASAL VE MOLEKÜLER
BİYOLOJİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nihal VURANOK

Enstitü Anabilim Dalı: Histoloji ve Embriyoloji

"Bu tez 16/06/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oy birliği / Oy çokluğu ile kabul edilmiştir."

BEYAN

Bu çalışma T.C. Sakarya Üniversitesi Rektörlüğü Tıp Fakültesi Dekanlığı Etik Kurulu'ndan 26/12/2019 tarihinde onay alarak hazırlanmıştır. Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

16/06/2022

Biyolog Nihal VURANOK

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın başından sonuçlandırılmasına kadar her aşamasında yardım ve desteklerini aldığım ve yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım danışman hocam Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Elvan ŞAHİN'e, tez çalışmam sırasında bilgi ve fikirlerini esirgemedi yanımda olan eş danışman hocam Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Gamze GÜNEY ESKİLER'e, Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Anabilim Dalı arşivinden hasta preparatlarını seçmemde ve gruplandırmamda yardımcı olan Uzm. Dr. Gözde ÇAKIRSOY ÇAKAR'a, parafin kesitlerin boyanması sürecinde ve ışık mikroskopik değerlendirmelerim için sağladığı destek ve katkılarından dolayı Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Tolga MERCANTEPE'ye, tezimin moleküler biyolojik çalışmaları sırasındaki kıymetli yardımlarından dolayı arkadaşım yüksek lisans öğrencisi Nur KAZAN'a, tez çalışmamın hazırlık aşamasındaki değerli fikirlerinden dolayı arkadaşım Dr. Miyase ERDOĞAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Her koşulda yanımda olduğunu hissettiğim eşime, eğitimim sebebiyle yapmış olduğum fazla mesailere sabırla anlayış gösteren ve çocuklarımın bakımı konusunda tüm gücüyle destek olan sevgili kayınvalideme, gücüme güç katan canım annem, babam ve ablama, işyerimde anlayış, sabır ve desteklerini benden esirgemeyen amirlerim ve çalışma arkadaşlarıma gönülden teşekkür ve minneti borç bilirim.

Bu tez Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından BAP-2020-7-25-10 numaralı proje ile finansal olarak desteklenmiştir.

Saygılarımla.

Biyolog Nihal VURANOK

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMA VE SİMGELER	v
TABLOLAR	ix
ŞEKİLLER	x
RESİMLER.....	xi
ÖZET	xii
SUMMARY	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. ENDOMETRİYUMUN HİSTOLOJİSİ	4
2.1.1. Menstrüel Siklusta Endometriumda Meydana Gelen Döngüsel Değişiklikler	8
2.2. ENDOMETRİYAL KANSER.....	12
2.2.1. Endometrial Kanser (EK) Epidemiyolojisi.....	12
2.2.2. EK'nın Etiyolojisi ve Risk Faktörleri	13
2.2.3. EK'nın Sınıflandırması	16
2.2.4. EK'nın Derecelendirmesi	18
2.2.5. EK'nın Tanısı.....	20
2.2.6. EK'nın Tedavisi.....	21
2.3. FORKHEAD TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİ	22
2.3.1. FOXO Transkripsiyon Faktörleri	23
2.3.2. FOXO Transkripsiyon Faktörlerinin PI3K/Akt ile Kontrol Edilmesi	24
2.3.3. FOXO Moleküllerinin Posttranslasyonel Mekanizmalarla Kontrol Edilmesi.....	25
2.3.4. FOXO Moleküllerinin Hücresel Süreçlerdeki Rollerini	28
2.4. STEROL DÜZENLEYİCİ ELEMENT BAĞLAYICI PROTEİNLER	30
2.5. SREBP1 VE FOXO1 PROTEİNLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİ.....	32
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	34
3.1. ETİK KURUL KARARI	34
3.2. ÖRNEKLERİN TOPLANMASI VE ÇALIŞMA GRUPLARININ	

OLUŞTURULMASI.....	34
3.3. HİSTOPATOLOJİK İŞLEMLER	35
3.3.1. Işık Mikroskopik Kesitlerin Elde Edilmesi	35
3.3.2. Hematoksilen Eozin (H-E) Boyama İşlemi	35
3.3.3. EK Grade'lemesi için Histopatolojik Değerlendirme.....	37
3.3.4. İmmunohistokimyasal Analizler.....	38
3.4. MOLEKÜLER BİYOLOJİK İŞLEMLER	41
3.4.1. Parafin Bloktan RNA İzolasyonu	41
3.4.2. cDNA Sentezi	43
3.4.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	44
3.5. İSTATİSTİK.....	45
4. BULGULAR.....	46
4.1. KLİNİK ÖZELLİKLER İLE İLGİLİ VERİLER	46
4.2. İMMUNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR.....	46
4.2.1. FOXO1A Spesifik İmmunohistokimyasal Boyama İle Elde Edilen Veriler.....	46
4.2.2. SREBP1 Spesifik İmmunohistokimyasal Boyama İle Elde Edilen Veriler.....	56
4.3. MOLEKÜLER BİYOLOJİK BULGULAR	65
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	68
5.1. TARTIŞMA	68
5.2. SONUÇ.....	75
KAYNAKLAR	77
EK 1.	95
ÖZGEÇMİŞ	96

KISALTMA VE SİMGELER

17 β -HSD12	: 17 β -Hidroksisteroid dehidrojenaz tip 12
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ADP	: Adenozin difosfat
Akt	: Protein kinaz B, PKB
AMPK	: Adenozin monofosfat kinaz
ATM	: Ataksia telanjektazi mutant
ATP	: Adenozin trifosfat
blhl-LZ	: Temel sarmal halka-sarmal lösin fermuar transkripsiyon faktörü ailesi
BT	: Bilgisayarlı tomografi
CBP	: CREB bağlayıcı protein
CDK1-2	: Siklin bağımlı kinaz 1 ve 2
CK1	: Kazein kinaz 1
COPII	: Coatomer-kaplı protein II vezikülleri
CREB	: Siklik AMP yanıt elemanı bağlayıcı protein
CTNNB1	: Catenin beta 1
DYRK1	: Çift �zg�n tirozin fosforillenmiş ve düzenlenmiş kinaz1
E1	: Östron
E2	: Östradiol
EAC	: Özofagus adenokarsinomu
EK	: Endometrium kanseri

ER	: Endoplazmik retikulum
ERa	: Östrojen reseptörü a
ERK	: Ekstrasellüler sinyal düzenleyici kinazlar
ESCC	: Skuamöz hücreli karsinom
FASN	: Yağ asidi sentaz
FGFR2	: Fibroblast büyüme faktörü reseptörü 2
FIGO	: Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Federasyonu,
FOX	: Forkhead box proteinleri
FSH	: Folikül uyarıcı hormon
G6Paz	: Glikoz 6 fosfataz
GnRH	: Gonadotropin-salgılatıcı hormon
HAT	: Histon asetil transferazlar
HDAC	: Histon deasetilaz ailesi
HNPCC	: Herediter nonpolipoid kolorektal karsinom
IGF	: İnsülin benzeri büyüme faktörü
IGF-1	: İnsülin büyüme faktörü-1
IGFBP1	: İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein 1
IHC	: İmmunohistokimya
IIS	: IGF-1 sinyali
IKK	: I-kappaß kinaz
INSIG1	: İnsülin ile uyarılan gen 1 proteini
IRS	: İnsülin reseptör substrat protein
JNK	: Jun-N-terminal kinaz

LH	: Lüteinizan hormon
MAPK	: Mitojen-bağımlı protein kinaz
MNSOD	: Mangan süperoksit dismutaz
MRI	: Manyetik rezonans görüntüleme
MSI	: Mikrosatellit instabilitesi
MST1	: Memeli STE20-benzeri protein kinaz 1
mTORC1	: Rapamisin kompleks 1'in memeli hedefi
NF-κB	: Nükleer faktör kappa B
NLS	: Nükleer lokalizasyon sinyalleri
PDK1	: 3-fosfoinositidine bağımlı protein kinaz 1
PGR	: Progesteron reseptörü
PGRMC/INSIG	: PGR membran bileşeni/insülin indüklenebilir gen
PI3K	: Fosfoinositid 3-kinaz
PIP2	: Fosfotidil inositol bifosfat
PIP3	: Fosfotidil inositol trifosfat
PKA	: Proteini kinaz A
PsA	: Psammaplysen A
PTEN	: Protein tirozin fosfotaz ve tensin homologu
PTM	: Post translasyonel modifikasyon
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RTKs	: Yüzey reseptör tirozin kinazlar
S1P	: Site-1 proteaz
S2P	: Site-2 proteaz

SCAP	: SREBP bölünme aktive edici protein
SCD	: Stearoil-CoA desatüraz
SGK	: Serum ve glukokortikoid indükleyici kinaz
SHBG	: Seks hormonu bağlayan globülin
SIRT1	: Sirtuin 1
Skp2	: S-faz kinaza bağlı protein 2
SMC4	: Kromozomların yapısal idame proteini 4
SREBP	: Sterol düzenleyici element bağlayıcı protein
USP7	: Ubikütün spesifik proteaz 7
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

TABLÖLAR

Tablo 1. EK'nın genetik mutasyonları	15
Tablo 2. EK'nın histolojik alt tipleri	17
Tablo 3. FIGO evreleme kriterleri.....	19
Tablo 4. FOXO transkripsiyon faktörlerinin hedef genleri ve düzenlediği fonksiyonlar	30
Tablo 5. Bond-Max™ IHC/ISH cihazında gerçekleştirilen immunperoksidaz boyama prosedürü	40
Tablo 6. EK hastalarının klinik ve histopatolojik özellikleri	46
Tablo 7. FOXO1A semi-kantitatif analiz sonuçları	47
Tablo 8. Dört deney grubuna ait FOXO1A immun pozitif hücre sayılarının istatistiksel çoklu karşılaştırma sonuçları	55
Tablo 9. SREBP1 semi-kantitatif analiz sonuçları	56
Tablo 10. Dört deney grubuna ait SREBP1 immun pozitif hücre değerlerinin istatistiksel çoklu karşılaştırma sonuçları	64
Tablo 11. GI, GII ve GIII EK gruplarında kontrol grubuna kıyasla değişen <i>FOXO1</i> ve <i>SREBP1</i> genlerindeki kat değişimlerinin karşılaştırılması	66

ŞEKİLLER

Şekil 1. Dişi genital organlarının anatomik yapısı.....	5
Şekil 2. Endometriumun histolojik tabakaları	6
Şekil 3. Yumurtalık ve endometrium dokusunda hormonların etkisindeki genital siklusun şematik diyagramı.....	7
Şekil 4. Endometriumun damarlanması	8
Şekil 5. Proliferasyon fazında endometriumu gösteren ışık mikroskop 10	
Şekil 7. Menstrüel fazdaki endometrium	12
Şekil 8. PI3K/Akt sinyal yolağında yer alan FOXO transkripsiyon faktörlerinin, insülin veya büyüme faktörleri tarafından düzenlenmesi	25
Şekil 9. Farklı kinaz kaskadları tarafından FOXO transkripsiyon faktörlerinin büyüme faktörleri ve stres koşullarına bağlı olarak düzenlenmesi	27
Şekil 10. FOXO proteinlerinin düzenlediği fonksiyonlar.....	29
Şekil 11. Proteoliz ile SREBP aktivasyonunun düzenlenmesi	32
Şekil 12. Dört çalışma grubuna ait FOXO1A immün pozitif hücre sayılarının mean değerlerini gösteren grafik	49
Şekil 13. FOXO1A immün pozitif hücre sayısı açısından kontrol grubu ile EK gruplarının median değerlerini gösteren grafik.....	55
Şekil 14. Tüm çalışma gruplarında SREBP1 mean değerlerini gösteren grafik.....	58
Şekil 15. Kontrol ve hasta grubuna ait SREBP1 mean değerlerini gösteren grafik	64
Şekil 16. Kontrol ve Total Tip 1 EK grubuna ait FOXO1A ve SREBP1 mean değerlerini gösteren grafik	65
Şekil 17. EK gruplarının toplamında kontrol grubuna kıyasla FOXO1 ve SREBP1 genlerinin ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin belirlenmesi.....	66
Şekil 18. GI, GII ve GIII EK gruplarında (A) FOXO1 ve (B) SREBP1 genlerinin kontrol grubuna kıyasla ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin belirlenmesi.....	66

RESİMLER

Resim 1. Thermo Scientific Microm HM40E <i>marka mikrotom</i>	35
Resim 2. Memmert™ UN55 <i>marka etiv</i>	36
Resim 3. Leica <i>marka Lam Boyama/Lam Kapama Cihazı</i>	36
Resim 4. Nikon DS-Fi ² / DIGITAL SIGHT DS-U ³ <i>marka dijital kamera monte edilmiş Nikon ECLIPSE marka ışık mikroskobu</i>	37
Resim 5. Tip 1 EK grade'lerini gösteren ışık mikrograflar.	38
Resim 6. “NIS-Elements Imaging software” programı kullanılarak yapılan skorlama tekniği.....	41
Resim 7. Isıtıcı blok (BioSan, Dry Block Thermostat, Bio TDB-100)	42
Resim 8. Soğutmalı santrifüj (Nüve NF 800R)	42
Resim 9. Derin dondurucu (Haier, Biomedical Ultra Low Temperature Freezer)....	43
Resim 10. Qubit 4.0 Fluorometer (Invitrogen™, Amerika Birleşik Devletleri)	43
Resim 11. Step One Plus Real Time-PCR (Applied Biosystems).....	45
Resim 12. Kontrol grubu endometrium kesitinde FOXO1A immun reaksiyonu.	48
Resim 13. Grade I EK grubuna ait endometrium kesitinde FOXO1A immun reaksiyonu..	50
Resim 14. Grade II EK grubuna ait endometrium kesitinde FOXO1A immun reaksiyonu.	52
Resim 15. Grade III EK grubuna ait endometrium kesitinde FOXO1A immun reaksiyonu..	54
Resim 16. Kontrol grubu endometrium kesitinde SREBP1 immun reaksiyonu.	57
Resim 17. Grade I EK grubuna ait endometrium kesitinde SREBP1 immun reaksiyonu.	59
Resim 18. Grade II EK grubuna ait endometrium kesitinde SREBP1 immun reaksiyonu.	61
Resim 19. Grade III EK grubuna ait endometrium kesitinde SREBP1 immun reaksiyonu..	62
Resim 20. Grade III EK grubuna ait endometrium kesitinde SREBP1 immun reaksiyonu.	63

ÖZET

GİRİŞ VE AMAÇ: Bu çalışmada farklı histopatolojik derecelere sahip endometrium kanseri (EK) hastalarında forkhead transkripsiyon faktörü O1 (FOXO1) ve sterol element bağlayıcı protein 1 (SREBP1)'in ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin belirlenmesi ve EK gelişiminde prognostik önemlerinin ortaya konması amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEMLER: 61 adet Tip 1 EK ve 24 adet normal endometrium içeren parafin doku bloklarında FOXO1 ve SREBP1'in gen ve protein düzeyinde ekspresyon değişimleri immunohistokimyasal boyama ve RT-PCR analizi ile araştırıldı.

BULGULAR: İmmunohistokimyasal boyama sonuçlarına göre, FOXO1 protein düzeyinin EK hastalarında kontrol grubuna kıyasla azaldığı, grade bazlı değerlendirmede ise, kontrol grubuna kıyasla grade I EK'da artmasına rağmen, grade II ve grade III EK'da azaldığı belirlendi. SREBP1 proteinin düzeyinin ise kontrol grubuna kıyasla EK hastalarında anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlendi. RT-PCR sonuçlarına göre ise *FOXO1* mRNA düzeyinin kontrol grubuna kıyasla toplam hasta grubunda upregüle olduğu belirlenmesine rağmen, grade II ve grade III EK hastalarında kontrol göre *FOXO1* ekspresyonunun azaldığı tespit edildi. Ayrıca, *SREBP1* mRNA seviyesinin kontrol grubuna göre EK hastalarında azaldığı belirlenmesine rağmen, özellikle grade I ve III EK hastalarında *SREBP1* ekspresyon düzeyinin anlamlı bir şekilde arttığı analiz edildi.

SONUÇ: Mevcut tez çalışmasında, FOXO1 ve SREBP1'in gen ve protein düzeylerinde değişimler, farklı gradelere sahip EK hastalarında ilk kez ortaya konmuştur. Ancak, EK hastalarında grade bağlı değişen FOXO1 ve SREBP1 ekspresyon düzeylerinin aydınlatılmasına yönelik ileri çalışmaların gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

Anahtar Sözcükler: FOXO1, SREBP1, endometrium kanseri, immunohistokimya, RT-PCR, mRNA.

INVESTIGATION OF FOXO TRANSCRIPTION FACTORS AND RELATED MOLECULAR MECHANISMS IN ENDOMETRIUM CANCER BY HISTOCHEMICAL AND MOLECULAR BIOLOGICAL METHODS

SUMMARY

INTRODUCTION AND AIM: In this study, it is aimed to determine the changes in the expression levels of the FOXO1 transcription factor and SREBP1 in the endometrial cancer (EC) patients with different histopathological grades, and to reveal their prognostic importance in the development of EC.

MATERIALS VE METHODS: The expression changes of FOXO1 and SREBP1 at gene and protein levels in 61 Type 1 EK and 24 normal endometrium paraffin tissue blocks were investigated by immunohistochemical staining and RT-PCR analysis.

RESULTS: According to the immunohistochemical staining results, it was determined that the FOXO1 protein level decreased in EC patients compared to the control group. It was observed that the level of SREBP1 protein was significantly increased in EC patients compared to the control group. According to RT-PCR results, although *FOXO1* mRNA level was upregulated in the patient group compared to the control group, the level of *FOXO1* was down-regulated in grade II and grade III EC patients compared to the control group. Additionally, although the level of *SREBP1* mRNA was decreased in EC patients compared to the control group, it was analyzed that the expression level of *SREBP1* was significantly increased especially in grade I and III EC patients.

CONCLUSION: In the current thesis study, changes in gene and protein levels of FOXO1 and SREBP were revealed for the first time in EC patients with different grades. However, further studies are needed to elucidate the changing expression levels of FOXO1 and SREBP1 in patients with grade-related EC.

Keywords: FOXO1, SREBP1, endometrial cancer, immunohistochemistry, RT-PCR, mRNA.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Endometrium kanseri (EK), birinci dünya ülkelerinde kadın genital sisteminin tüm malign tümörleri içinde en yüksek görülme oranına sahip kanser türüdür (Siegel, Miller, Jemal 2021). EK ile ilişkili morbidite ve mortalite son yıllarda artmış olup, Amerikan Kanser Derneği verilerine göre, 2021 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde EK ile ilişkili 12.940 ölüm ve 66.570 yeni vaka ön görülmüştür (Siegel et al 2021). Ayrıca cerrahi, radyoterapi ve kemoterapiyi içeren tedavi seçeneklerine rağmen kötü diferansiye EK hastalarının kötü prognoz sergilediği bildirilmiştir (Li et al 2012).

Forkhead box (FOX) proteinleri, hücre sinyalinde yer alan bir transkripsiyon faktörü olarak, metabolizma ve inflamasyon, dokuya özgü gen ekspresyonu ve embriyogenez gibi hücresel süreçlerde, ayrıca neoplazi oluşumunda ve kromozom translokasyonunda rol oynamaktadır (Collado et al 2000). FOX transkripsiyon faktörlerinin bilinen 19 alt grubu bulunmaktadır. Bu proteinler FOXA'dan FOXS'ye kadar isimlendirilmektedir (Arden and Biggs 2002, Katoh 2004). GEO veri tabanı (GSE63678) analizlerinde FOX ailesine ait FOXO1, FOXO3, FOXO4, FOXL2, FOXM1, FOXN3 ve FOXP3'ün EK gelişimi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (ncbi.nlm.nih.gov/geo) (Erişim tarihi: 12.11.2021, Güncellenme tarihi: 06.12.2018).

FOX transkripsiyon faktörleri ailesinin bir alt grubu olan FOXO proteinleri memelilerde, neredeyse tüm dokularda eksprese edilen dört ana üye içermektedir. Bunlar; FOXO1 (FKHR, FOXO1a), FOXO3 (FKHRL1, FOXO3a), FOXO4 (X kromozomunda bulunan akut lösemi füzyon geni, AFX) ve FOXO6 olarak isimlendirilmektedir (Martins, Lithgow, Link 2016).

FOXO transkripsiyon faktörleri; enerji metabolizması (Zhang et al 2006, Kousteni 2012), hücre döngüsü ilerlemesi (Ho, Myatt, Lam 2008), apoptoz, hücresel farklılaşma (Chen et al 2013), yara iyileşmesi (Greer, Brunet 2005) gibi önemli hücresel süreçleri düzenlemektedir.

FOXO transkripsiyon faktörü ailesinin bir üyesi olan FOXO1, tümör baskılayıcı olarak

kabul edilmekte ve fosfoinositid 3-kinaz (PI3K)/Akt sinyal yolağı ile düzenlenmektedir. FOXO1, doğrudan insülin tarafından hedeflenerek insüline duyarlı dokularda yüksek oranda eksprese edilmektedir (Zhang et al 2006). İnsülin, insülin büyüme faktörü (IGF)-1 ve FOXO1 reseptörüne bağlanarak PI3K/Akt yolunda yer alan belirli hücre içi kinazları aktive etmektedir. Bu sinyal yolunun aktivasyonu, FOXO1'in nükleer translokasyonunu azaltarak, transkripsiyonel fonksiyonunu inhibe eden FOXO1 fosforilasyonu ile sonuçlanmaktadır (Lettieri et al 2014).

Ektopik lipid metabolizması (yağ asidi ve kolesterol sentezi) kanser hücrelerinin proliferasyonunda önemli bir mekanizmadır (Deberardinis 2008a, 2008b). Yüksek lipojenik aktivite, kanserin invazyonu ve metastazı ile yakından ilişkilidir ve buna bağlı olarak EK vakalarının da %40'ında obezite görüldüğü bildirilmiştir (Li et al 2012).

Sterol düzenleyici element bağlayıcı proteinler (SREBP) lipojenik genlerin ekspresyonunu düzenlemekte olup temel sarmal halka-sarmal lösün fermuar ailesinin üyeleridir (Li et al 2012). Ailenin SREBP1a, SREBP1c ve SRBEP2 olmak üzere üç farklı izoformu bulunmaktadır. Her izoformun etkileri birbirinden farklılık göstermektedir. SREBP1a, birincil SREBP'tir ve yağ asitleri ile trigliseritlerin sentezini kontrol ederek hücre içi lipid homeostazını seçici olarak düzenlemektedir (Chen et al 2014). SREBP1'in yüksek ekspresyonunun, prostat ve pankreas kanserinin de dahil olduğu farklı kanser türlerinin progresyonda doğrudan etkili olduğu bildirilmiştir (Heemers et al 2001, Sun et al 2015). SREBP1 ayrıca insülinin hedefidir. İnsülin, karaciğer X reseptörlerinin etkinliğini artırarak SREBP1'i kodlayan genin transkripsiyonunu aktive edebilmektedir (Chen et al 2004). SREBP2'nin ise nispeten kolesterol sentezi için gerekli olduğu gösterilmiştir (Eberlé, Hegarty, Bossard, Ferré, Foulle 2004).

Son zamanlarda, SREBP1'in farklı kanser tiplerinde yüksek oranda eksprese edildiği bildirilmiştir (Ettinger et al 2004, Guo et al 2009). Daha önce yapılan çalışmalarda onkogenik oluşumlarda enerji ihtiyacı için kanser hücrelerinde normal hücrelerden farklı olarak *de novo* lipogenezinin lipidler ile karşılandığı ortaya konulmuştur. Dolayısıyla tümör oluşumlarında lipojenik genlerin aşırı ekspresyonu söz konusudur

(Deberardinis et al 2008a, 2008b). Bundan dolayı SREBP1'in inhibisyonunu hedefleyen genetik ve farmakolojik uygulamalarla tümör gelişiminin önemli ölçüde inhibe edildiği gösterilmiştir (Guo et al 2009).

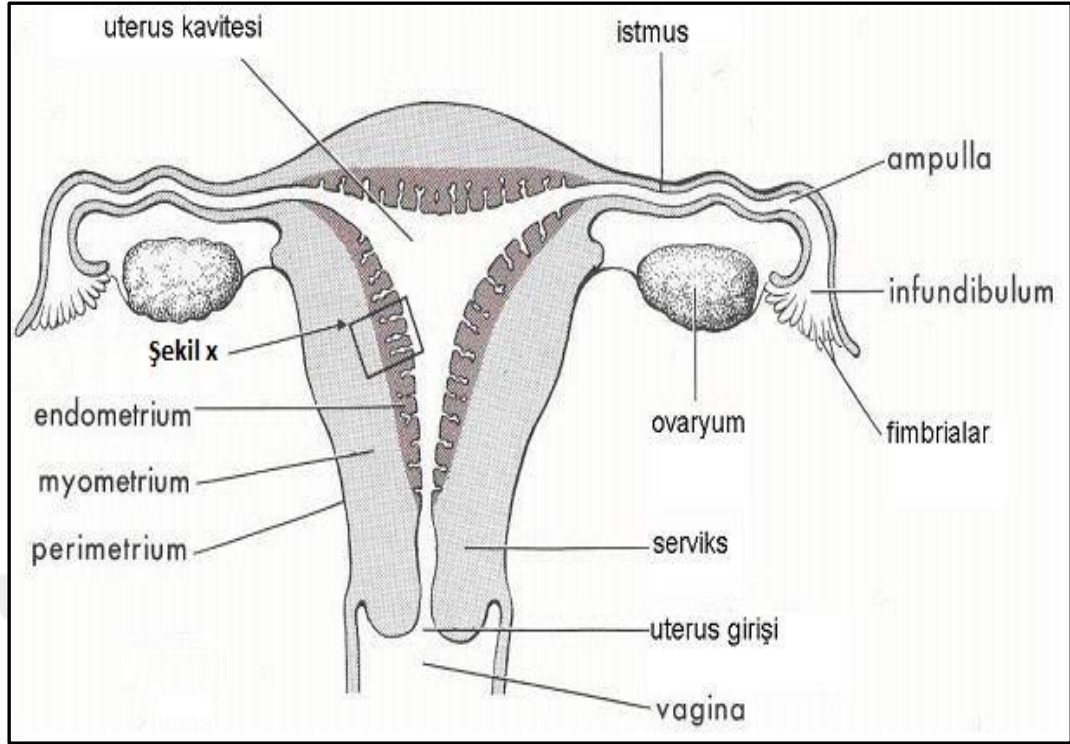
FOXO1 ve SREBP1 lipogenezde yer alan iki önemli protein olup, etkileri insülin tarafından Akt (Protein Kinaz B, PKB) sinyal yolağı ile düzenlenmektedir. Yapılan araştırmalarda EK gelişiminde FOXO1 ve SREBP1 arasındaki ilişkinin belirsizliğini koruduğu görülmüştür. Bu nedenle çalışmamızda, farklı histopatolojik derecelere (Grade 1, Grade 2 ve Grade 3) sahip EK hastalarında, FOXO1 ile SREBP1'in ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin ve bu transkripsiyon faktörlerinin EK gelişiminde moleküler biyobelirteçler olarak önemini ortaya konması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. ENDOMETRİUMUN HİSTOLOJİSİ

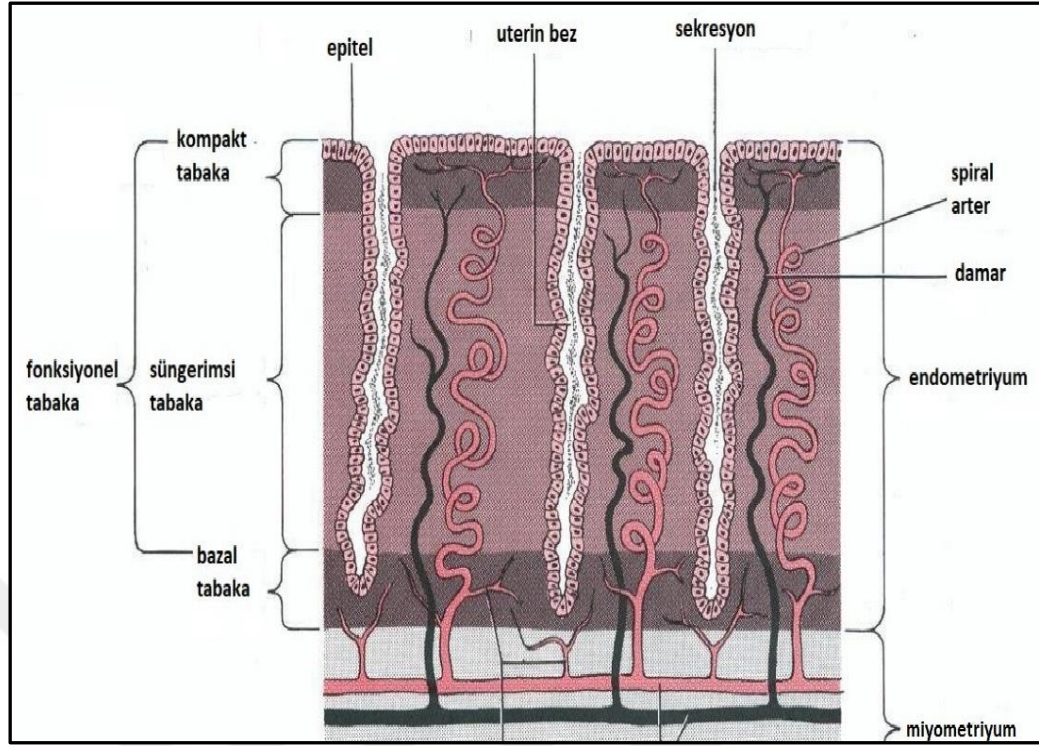
İnsan dişi üreme sistemindeki iç genital organlar; bir çift ovaryum, bir çift tuba uterina (Fallop tüpleri), ortada yerleşmiş bir uterus (rahim) ve vajinadan oluşmaktadır (Şekil 1). İçinde bir lümeni olan uterus, yaklaşık 7 cm x 4 cm x 2,5 cm ebatlarında, bir elin yumruk yapılmış şekli kadar büyüklüğe sahip armut şeklinde bir organ olup pelviste mesane ile rektum arasında yer almaktadır. Uterusun duvarı üç tabakadan oluşur. Bu tabakalar dıştan içe doğru aşağıdaki gibi sıralanmaktadır:

- Perimetrium (Tunika seroza): Uterusun dış yüzeyini kaplayan visseral periton tabakasıdır.
- Miyometriyum (Tunika muskularis): 1,25 cm kalınlığında düz kas tabakasıdır. Gebelikte kas lifleri hem büyür (hipertrofi) hem de mitoz ile çoğalırlar (hiperplazi). Ayrıca mezenkimal hücrelerden yeni kas hücreleri oluşabilir. Normalde 40-90 mikron metre uzunluğundaki kas liflerinin boyu gebelikte 10 kat artabilir.
- Endometrium (Tunika mukoza): Uterusun lümene bakan iç yüzeyini döşeyen mukoza tabakası olup menstrüel siklus boyunca değişiklikler sergiler (Eroschenko 2013, Ross and Pawlina 2014, Gartner and Hiatt 2014).



Şekil 1. Dişı genital organlarının anatomik yapısı (Kelly, Wood, Enders 1984)

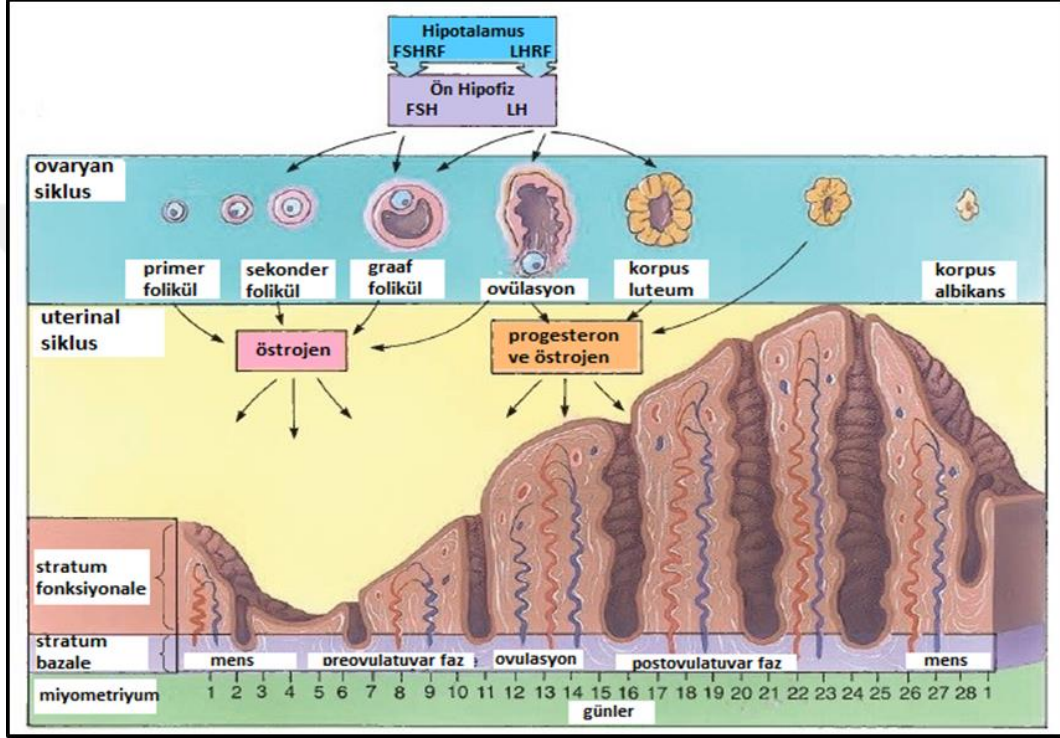
Endometrium, lamina epitelyalis (örtü epiteli) ve lamina propriadan oluşur. Örtü epiteli, kinosilyalı prizmatik hücreleri ve sekretuar hücreleri (peg hücreleri) içeren tek katlı kinosilli prizmatik epiteldir. Örtü epiteli altındaki bağ dokusu olan lamina propria başlıca stromal elemanlardan ve endometriyal bezlerden oluşur. Endometriyal bezler, örtü epitelinin alttaki stroma içine invajine olması ile meydana gelen basit tübüler bezler olup derin kısımlara doğru dallanmaktadır. Bezlerin arasını dolduran stromada yoğun olarak Tip III kollajen lifler, çok sayıda fibroblast, makrofaj, lenfosit, nötrofil, bazofil, eozinofil, ekstrasellüler ara madde ve spiral seyirli helikal arterler bulunur. Eşsiz bir damarlanma ağına sahip olan endometriumda, uterin arterden çıkan 6-10 adet arkuat arterin yukarıya doğru uzanan kolları ileri derecede sarmal hale gelerek spiral (helikal) arteri oluşturur. Spiral arterler, östrojen ve progesteronun etkisi ile dejenerasyon ve rejenerasyon olaylarının gerçekleştiği endometriumun fonksiyonel tabakasının kanlanmasından sorumludur (Şekil 2) (Ross and Pawlina 2014, Kierszenbaum 2006, Gartner and Hiatt 2014).



Şekil 2. Endometriyumun histolojik tabakaları (Kelly, Wood, Enders 1984)

Puberteden itibaren üreme çağı boyunca endometriyum her ay döngüsel olarak morfolojik ve fonksiyonel değişimlere uğrar. Ortalama 28 gün süren bu döngüye menstrüel siklus denir. Her siklusta, ovaryumdaki folikül gelişmesine (ovaryan siklus) paralel olarak endometriyal evreler (uterinal siklus) ortaya çıkar (Şekil 3). Yirmi sekiz günlük menstrüel siklus boyunca overlerde ve uterus endometri umunda görülen değişikliklerin tümü genital siklus olarak adlandırılır. Siklusun ilk 14 günü boyunca overlerde folikül büyümesi ve olgunlaşması gerçekleşirken endometriyum ilk 1-4. gündeki menstrüasyon kanamasını takiben proliferasyon evresine (proliferatif faz, preovulatuvar faz) girer. Ortalama 14. günde gerçekleşen ovulasyonu takiben overlerde luteal faz (korpus luteumun gelişmesi) görülürken, endometriyumda sekresyon fazı ortaya çıkar. Ovulasyonla overden dışarı atılan sekonder oosit tuba uterinanın infundibulum bölgesinde bulunan fimbriyalarla yakalanarak tüp içine alınır ve burada yaklaşık olarak 24 saat canlı kalır. Eğer döllenme gerçekleşmezse oosit dejenere olarak buradaki hücreler tarafından absorbe edilir. Ovulasyondan sonraki bu dönemde endometriyum, gerçekleşebilecek döllenme neticesinde oluşması muhtemel olan embriyonun yuvalanmasına (nidasyon) yardımcı olmak ve embriyoyu beslemek üzere sekretuar (postovulatuvar faz) evrededir. Şayet döllenme olmazsa, 14 günlük

sekretuar evrenin sonunda, yani menstrüel siklusun 28. günü tamamlanınca menstrüasyon kanaması başlar. Menstrüel siklusun fazları gerçekleşirken endometriumun kalınlığı siklus sonuna doğru giderek artar (0,5 mm-8 mm). Seksüel olarak olgunlaşan bireyde menstrüel siklusun ilk olarak görülmesine menarş adı verilir. Bu siklusların ileri yaşlarda düzensizleştiği ve en sonunda durduğu dönem ise menopoza olarak adlandırılır.

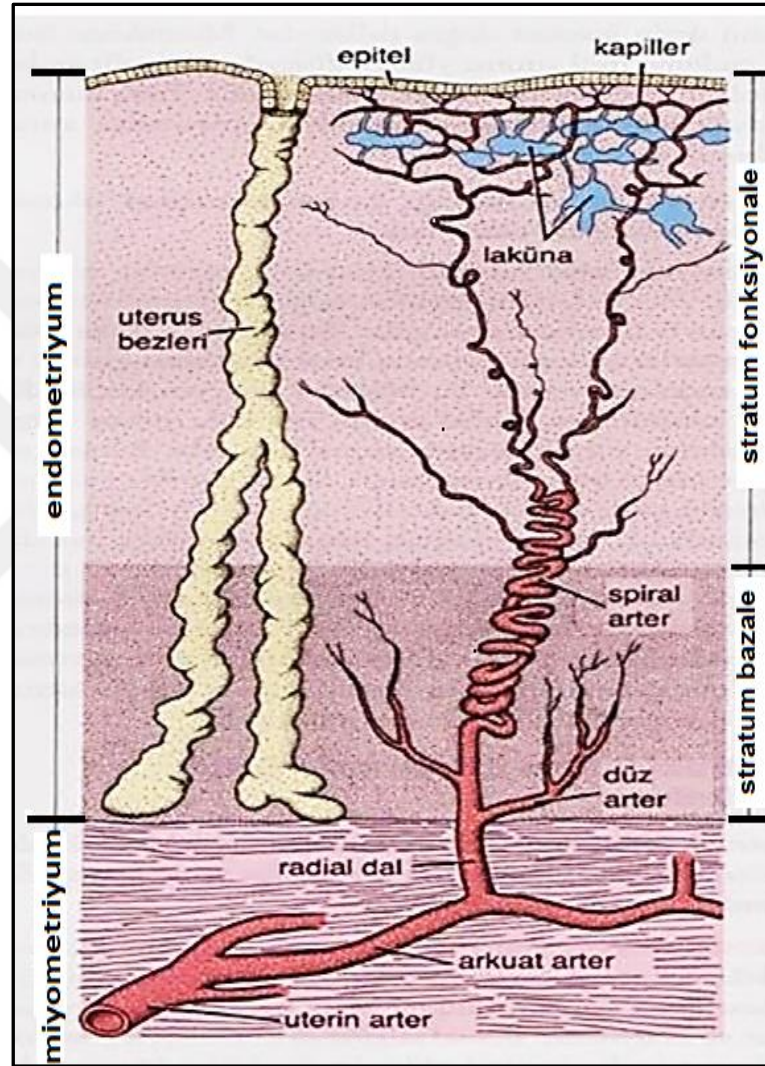


Şekil 3. Yumurtalık ve endometrium dokusunda hormonların etkisindeki genital siklusun şematik diyagramı (Gartner and Hiatt 2014)

Üreme çağında endometrium yapısal ve fonksiyonel açıdan, stratum fonksiyonale ve stratum bazale olmak üzere iki tabakadan oluşmaktadır (Şekil 4);

- Stratum fonksiyonale (fonksiyonel tabaka): Östrojen ve progesteron hormonlarının etkisinde menstrüel siklusta prolifere olan ve menstrüel kanama döneminde kısmen veya tamamıyla dökülen endometriumun 2/3'lük kalın üst bölümüdür. Sekresyon fazında fonksiyonel tabakada iki kısım ayrılır: Stratum kompaktum, ince en üst tabakadır, bezlerin boyun kısmını içerir, bağ dokusu sıkı yapıdadır. Stratum spongiosum ise kompakt tabakanın altında, lümeni genişlemiş bezlerden dolayı süngerimsi görüntüye sahiptir. Burada bezlerin arasında ödemli bağ dokusu yer almaktadır.

- Stratum bazale (bazal tabaka): Menstrüel kanama esnasında dökülmeyen ve fonksiyonel tabakanın yeniden oluşumu için gerekli olan endometriumun 1/3'lük derin kısmıdır. Östrojen ve progesteron hormonlarının etkisinde değildir. Kanlanması bazal arterlerden sağlanır. (Kierszenbaum 2006, Eşrefoğlu 2016, Ross and Pawlina 2014).



Şekil 4. Endometriumun damarlanması (Ross and Pawlina 2014)

2.1.1. Menstrüel Siklusta Endometriumda Meydana Gelen Döngüsel Değişiklikler

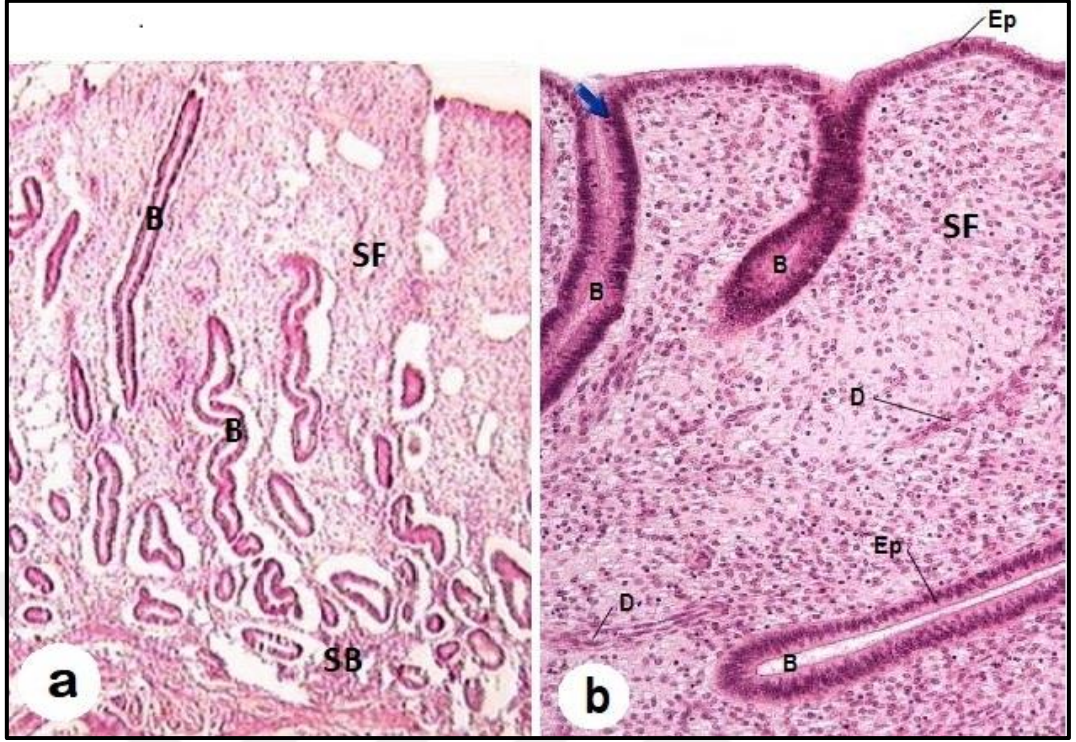
Hipotalamustan salgılanan gonadotropin salgılatıcı hormonun (GnRH) kontrolü altında ön hipofizden salgılanan Folikül uyarıcı hormon (FSH) ve lüteinizan hormonları (LH) ile overlerden östrojen ve progesteron salınımı kontrol edilmektedir.

Östrojen ve progesteron hormonlarındaki döngüsel değişimler ise endometrium fonksiyonals tabakasında her ay görülen siklik değişikliklere sebep olmaktadır. Endometriumda görülen bu döngüsel değişiklikler proliferasyon fazı, sekretuar faz ve menstrüel faz olmak üzere üçe ayrılmaktadır (Şekil 3).

2.1.1.1. Proliferasyon Fazı

Bu faz, ovaryumlarda foliküllerin geliştiği foliküler fazla eş zamanlı olarak gerçekleşmektedir. Menstrüel fazda endometriumun stratum fonksiyonale tabakası dökülerek geriye yaklaşık 0,5-1 mm kalınlığındaki stratum bazale kalmaktadır. Kalan bu bölüm, uterus bezlerinin ve spiral arterlerin bazal kısmını içermektedir. Bu bölümdeki epitel dokusu ve stromal hücreler ovaryumlarda olgunlaşan foliküllerden salgılanan östrojenin etkisi ile hızla prolifer olmaya başlar ve endometrium yeniden yapılandırılır. Böylece uterus bezleri ve damarlar uzayarak büyürken, stromal hücreler de prolifer olarak ara maddeyi salgılar (Şekil 5) (Ross and Pawlina 2014, Hall and Hall 2006).

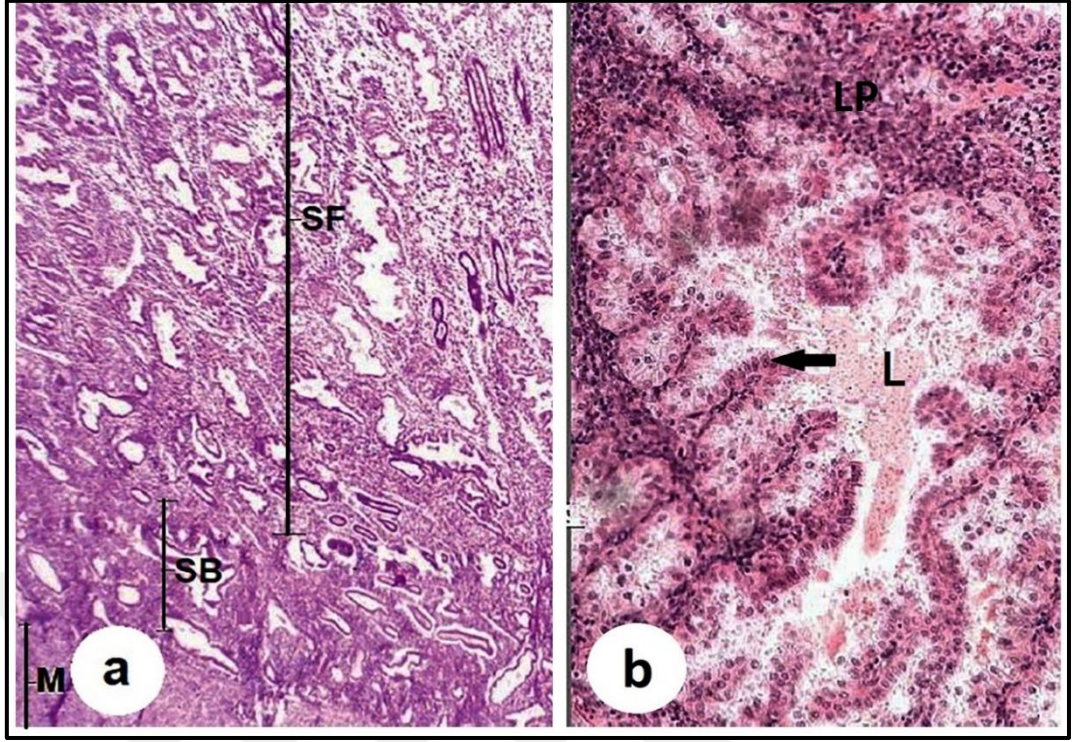
Menstrüasyonun başlangıcından ovulasyona kadar geçen ilk 2 hafta içinde, stromal hücrelerdeki artışın, endometriyal bezlerin büyümesinin ve yeni gelişen damarların etkisi ile endometrium kalınlığı belirgin şekilde artarak ovulasyonun başlangıcında yaklaşık 3-5 mm kalınlığa ulaşır. Endometriyal bezler proliferatif fazda daha düz ve tübüler yapıda olup, daha kısa ve lümenleri boştur. Bezlerin arasındaki stromal alan daha geniştir. Proliferatif fazın sonuna doğru bezlerin boyunun daha da uzamasıyla bulundukları yere sığabilmek için daha kıvrımlı hale gelir ve hafif dalgalı görünüm kazanır. Bez hücrelerinde granüllü endoplazmik retikulum sisternaları ve Golgi kompleksinin miktarı giderek artar ve bez epitel hücrelerinin bazalinde glikojen birikimi ile sekretuar aktiviteye hazırlık tamamlanır (Eşrefoğlu 2016, Ross and Pawlina 2014, Hall and Hall 2006, Kierszenbaum 2006, Mescher 2009).



Şekil 5. Proliferasyon fazında endometriumu gösteren ışık mikrogramı. **B:** Endometriyal bez, **SF:** Stratum fonksiyonale, **SB:** Stratum bazale, **Ep:** Epitel, **D:** Kan damarı, **mavi ok:** Yüzey örtü epiteli lamina propriya içine çökerek bez epitelini oluşturmaktadır. **a** (Ross and Pawlina 2014), **b** (Gartner and Hiatt 2014)

2.1.1.2. Sekretuar Faz

Bu dönemde, ovulasyondan sonra folikülün geri kalanından gelişen korpus luteum hızlı bir şekilde östrojen ve progesteron salgılamaya başlar. Östrojen, endometriumda hafif derecede proliferasyonun devamını sağlarken, progesteron endometriumu ödematöz hale getirir ve sekretuar değişikliklerin oluşmasını sağlar, böylece bezler daha da büyüyerek iyice kıvrımlı hale gelir, lümenleri genişleyerek glikojenden zengin mukoid bir sıvı ile dolar (Şekil 6). Bu sıvının fertilize ovumun, uterin kaviteye girişinden implante oluşuna kadar geçen süre içinde beslenmesini sağladığı ve ayrıca, implantasyon gerçekleştiği takdirde embriyo gelişimini desteklediği bildirilmektedir.



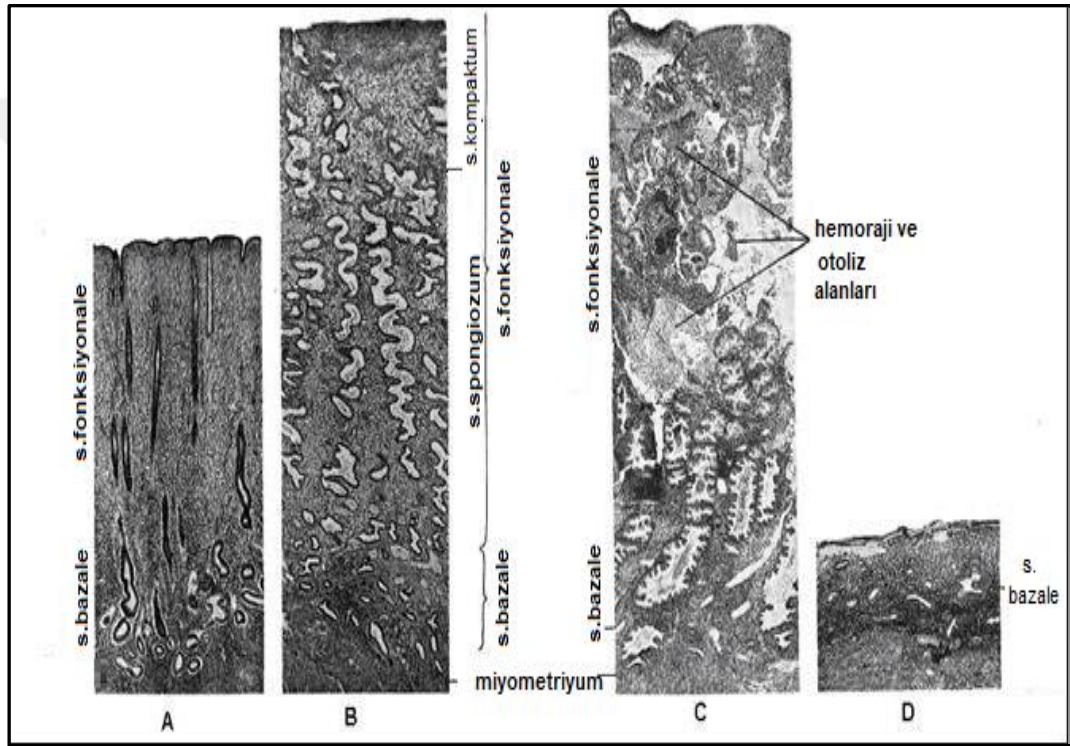
Şekil 6. Sekretuar fazda endometriumu gösteren ışık mikrogram. **M:** Miyometriyum, **SB:** Stratum bazale, **SF:** Stratum fonksiyonale, **L:** Lümen, **Ok:** Endometriyal bezi oluşturan içi glikojen dolu kolumnar epitel, basit prizmatik epitel. **Boya:** H-E. **a** (Ross and Pawlina 2014), **b** (Gartner and Hiatt 2014)

Sekretuar fazda spiral arterler iyice uzar, daha sarmallı hale gelir ve endometrium yüzeyine kadar ilerler. Ovulasyondan yaklaşık 1 hafta sonra endometrium kalınlığı 5-6 mm'ye, siklusun sonuna doğru ise 7-8 mm'ye ulaşmış olur. Eğer döllenme gerçekleşir ve blastosist implante olursa, endometriumun lamina propriasındaki stromal hücreler büyür, progesterona yanıt olarak lipid ve glikojen depolayarak desidual hücrelere dönüşürler. Gebelik sırasında endometriumda görülen bu değişikliklere desidual reaksiyon denir (Eşrefoğlu 2016, Ross and Pawlina 2014, Hall and Hall 2006).

2.1.1.3. Menstrüel Faz

Fertilizasyon gerçekleşmezse, korpus luteum yaklaşık 10 gün daha hormon üretir ve ardından gerilemeye başlar. Buna bağlı olarak dolaşımdaki progesteronun ve östrojenin ani azalan düzeyleri menstrüel fazı başlatır. Bu ani düşüş spiral arterlerin duvarında periyodik kasılmalara sebep olarak fonksiyonel tabakada iskemiye sebep

olur. Bez salgılamayı durdurur ve stromadaki ödem azalır. Bunu takiben yaklaşık 48 saat sonra uzun süreli arteriyal kontraksiyonlar nedeni ile kan damarlarında rüptür ve yüzey epitelinde bozulma meydana gelir. Endometriumun fonksiyonel tabakası nekroze olup kanamaya başlar. Menstrüasyonun başlamasından yaklaşık 2 gün sonra endometriumun fonksiyonel tabakası tamamen dökülür. Menstrüel kanama ise yaklaşık 4-5 gün devam eder. Fertilizasyon gerçekleşmediği sürece, bu döngü her ay tekrarlanmaktadır (şekil 7). (Eşrefoğlu 2016, Ross and Pawlina 2014, Hall and Hall 2006).



Şekil 6. Menstrüel fazdaki endometium. S: stratum (Kelly, Wood, Enders 1984)

2.2. ENDOMETRİAL KANSER

2.2.1. Endometrial Kanserin (EK) Epidemiyolojisi

EK kadınlarda meme, akciğer ve kolon kanserinden sonra tüm dünyada en sık görülen ve kötü prognoza sahip kanser türüdür ve Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) kanser sebebiyle gerçekleşen ölümlerde yedinci sırada yer almaktadır (Siegel et al 2021). Ortalama görülme yaşı 60 olup 61 yaş sonrası insidansı kademeli olarak azalmaktadır (www.cancer.org/cancer/endometrial-cancer/about/key-statistics.html)

(Erişim tarihi: 04.11.2021). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 2020 verilerine göre dünya çapında en yaygın görülen kanser tipleri arasında 5. sırada EK yer almaktadır. Dünya genelinde 2021 yılında EK yeni vaka sayısının 66.570, ölüm sayısının 12.940 olacağı ve yeni tanımlanan kanser vakalarının %3,5'ini oluşturması öngörölmüştür. EK'nın 2011-2017 yılları arasında göreceli sağkalım oranı %81,1'dir (<https://seer.cancer.gov/statfacts/html/corp.html>) (Erişim tarihi: 02.11.2021). 2016'da yapılan bir çalışmada histopatolojik grade 1-2'de erken evrede beş yıllık sağ kalım oranları %70-90 olarak tespit edilmiştir (Kaban 2016). EK insidansının, düşük ve orta gelirli ölkelerde, gelecek on yılda artmaya devam edeceği tahmin edilmektedir (<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.31961>) (Erişim tarihi: 02.11.2021).

EK'nın en yaygın belirtisi anormal uterin kanamalarıdır. Hastaların %75-90'ı vajinal kanama şikâyeti ile kliniklere başvurmaktadır. Anormal kanama şikâyeti ile gelen postmenapozal kadınların %3-20'sinde EK saptanırken, %5-15'inde endometrial hiperplazi saptanmaktadır. Anormal vajinal kanamalarda ise 45 yaş ve altı hastalarda EK görölme riski oldukça düşüktür (Ronghe and Gaudoin 2010). İleri evre EK hastalarında barsak veya idrar kesesi fonksiyonlarında meydana gelen değişiklikler, abdominal şişkinlik ve ağrı ve bazen bunlara eşlik eden pelvik ağrıları semptomları arasında yer almaktadır (Burke et al 2014).

Servikal darlığı olan, yaşlı, zayıf ve östrojen eksikliği olan hastalarda EK'ya bağlı kanama şikâyeti nispeten az bildirilmiştir. Bu hastalarda hematometra göröllebilir ve bir kısmında nadir de olsa pürölan akıntı şikâyeti vardır (Hacker and Moore 1998).

EK 40 yaş ve altındaki kadınlarda düşük prevalans göstermektedir (Engelsen, Akslen, Salseven 2009). EK tanısı, kadınlarda büyük oranda menopoz sonrası konmaktadır. Tanı oranı 50 yaş öncesi %15, 40 yaş öncesi ise bu oran sadece %5' tir (Burke et al 2014). Hastalık %70-80 oranında erken evrede tespit edilebilmektedir.

2.2.2. EK'nın Etiyolojisi ve Risk Faktörleri

EK gelişiminde en yaygın risk faktörleri; uzun süreli östrojen maruziyeti, obezite, diyabet, genetik yatkınlık, erken menarj, hiç doğum yapmamış olmak (nulliparite), menopoza girme yaşının geç olması, ileri yaş, endokrin faktörler ve tamoksifen

kullanımı yer almaktadır (Kaaks, Lukanova, Kurzer 2002). Özellikle obezite, nulliparite ve polikistik over sendromu (PKOS) hikayesi eşliğinde kırk yaş ve altı genç kadınlarda EK riski daha yüksek olarak bildirilmiştir (Soliman et al 2005).

Obezite ekstra hepatik aromataz sistemini etkileyerek periferik östrojen üretimini artırmaktadır. Periferik östrojen üretiminin birincil kaynağı olan adipöz dokuda, yüksek aromataz aktivitesinden dolayı androstenediondan östron ve testosterondan östradiol oluşmaktadır. Ayrıca obez kadınlarda azalan seks hormon bağlayan globülin (SHBG) düzeyi östrojenin serumda serbest kalan miktarını arttırmakta ve buna bağlı olarak da EK görülme riski 3 ile 10 kat arasında artmaktadır (Mahboubi, Eyler, Wynder 1982). Bu nedenle Japonya gibi düşük yağlı beslenme alışkanlığına sahip ülkelerde endometrium kanserine daha az rastlandığı bildirilmiştir (Lawrence 1987).

PKOS'lu kadınlarda normalden 3-4 kat daha fazla androstenedion ve östron üretilmesine bağlı olarak anovulasyon riski artmaktadır. Normalden çok üretilen östrojenin progesteronla karşılanamaması, endometrial hiperplazi ve premalign etkilere sebep olabilmektedir. Ayrıca PKOS'lu kadınlarda eşlik eden hiperinsülinemi ile artmış insülin ve IGF EK riskini artırdığı düşünülmektedir. Nitekim Lauritzen ve arkadaşlarının yaptığı *in vivo* deneylerde çoğu tümör hücresinin proliferasyonunun insüline bağımlı olduğu gösterilmiştir (Lauritzen 1977, McDonald, Malkasian, Gaffey 1977).

Hiç doğum yapmamış kadınlarda kronik östrojen maruziyeti daha fazla olduğundan EK riskinin arttığı düşünülmektedir. Gebelik sayısı arttıkça EK riski azalmaktadır. ABD'de EK tanısı alan kadınların %21-34'ünün nullipar olduğu bildirilmiştir (Mahboubi et al 1982).

Uzun süreli östrojen maruziyeti Tip 1 EK ile ilişkilidir. Menopozal semptomların kontrolü için kullanılan östrojen replasman tedavisinin EK gelişim riskini 2-20 kat arttırdığı saptanmıştır (Burke et al 2014). Ayrıca progestinlerin sürekli veya aralıklı olarak uygulanması sonucunda EK riskinin önemli ölçüde düşürüldüğü bildirilmiştir (Malcolm 1997).

EK gelişimi için yaş önemli bir risk faktörüdür. Genç kadınların ileri yaşlara göre

erken evre ve endometrioid histolojisi iyi diferansiye EK tanısı aldığı bildirilmiştir (Pamela et al 2005). On iki yaşından önce adet görmeye başlayanlarda daha fazla anovulatuvar siklus görülmesinden dolayı EK riski 1,6 kat arttığı, 52 yaşından sonra menapoza giren kadınlarda ise artan östrojen maruziyeti nedeniyle bu riskin 2,4 kat arttığı bildirilmiştir (Mahboubi et al 1982, Lawrence 1987).

Genç yaştaki kadınlarda EK'nın bir diğer gelişim sebebi ise genetik yatkınlıktır. BRCA1 gen mutasyonuna sahip kadınlarda EK'nın özellikle seröz tipinin gelişme olasılığının arttığı gösterilmiştir (Beiner, Finch, Rosen 2007). Herediter nonpolipoid kolorektal karsinom (HNPCC) hastalığı olan kadınlarda EK gelişim riskinin %40-60 olduğu bildirilmiştir. HNPCC, DNA tamir genlerindeki mutasyonlara bağlı olarak gelişen otozomal dominant bir hastalıktır. (Arora and Quinn 2012). Ayrıca, tümör supresör gen olan protein tirozin fosfotaz ve tensin homoloğu (PTEN) geninde oluşan mutasyonun da EK dahil pekçok neoplazi ile ilişkili olduğu ve riski arttırdığı gösterilmiştir (Kaaks et al 2002). Mahboubi ve arkadaşlarının (1982) İngiltere'de gerçekleştirdiği çalışmalarda EK hastalarının %15'inde aile öyküsü olduğu bildirilmiştir (Mahboubi et al. 1982). EK ile ilişkili genetik değişiklikler Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. EK'nın genetik mutasyonları (Lax 2007)

Değişen Gen Aktivasyonu	% Tip 1	% Tip 2
PTEN inaktivasyonu	35-50	10
Beta-katenin mutasyonu	25-40	0-5
MSI (mikrosatellit instabilitesi)	20-40	0-5
K-Ras mutasyonu	15-30	0-4
HER-2/neu amplifikasyonu	10-30	45
P53 mutasyonu	10-20	90
E-kaderin değişikliği	10-20	80-90
P16 mutasyonu	10	40

EK etiolojisinde yer aldığı bildirilen diyabetle ilgili bazı yazarların tartışmalı fikirleri bulunmaktadır (Lawrence 1987). Friberg ve arkadaşları (2007) ile O'Mara ve arkadaşlarının (1985) yaptığı çalışmalarda Tip 2 diyabet ve EK arasında pozitif bir ilişki olduğu gösterilirken, Rubin ve arkadaşları (1990) ile Coughlin ve arkadaşları

(2004) bu ilişkinin tamamen tutarlı olmadığını bildirmişlerdir. 1966-2007 yılları arasında 96.003 katılımcıyla gerçekleştirilen bir meta analizde Tip 2 diyabetli kadınlarda, diyabet olmayan kadınlara kıyasla EK görülme riskinin 2 kat olduğu, Tip 1 diyabetin ise 3 kat artabileceği gösterilmiştir (Friberg, Orsini, Mantzoros, Wolk 2007). Tip 2 diyabetin başlıca belirleyicileri olan obezitenin (Kissebah et al 1982, Bjorntorp 1991) ve düşük fiziksel aktivitenin EK için de risk faktörleri olduğu rapor edilmiştir (Vainio, Kaaks, Bianchini 2002).

2.2.3. EK'nın Sınıflandırması

EK geleneksel sınıflandırması endometrioid, seröz ve clear-cell adenokarsinoma gibi histopatolojik karakteristiklere bakılarak ya da klinik ve endokrin özelliklere bakılarak yapılmaktadır. Dedes ve arkadaşlarının (2011) yaptığı çalışmada, tümörün histopatolojisine göre EK'nın Bokhman JV tarafından Tip 1 ve 2 olarak iki sınıfa ayrıldığını (Bokhman 1983) bildirmişlerdir (Tablo 2).

Tip 1 tümörler yüksek östrojen seviyesi, endometrial hiperplazi, obezite, hormon-reseptör pozitifliği ile yakından ilişkilidir ve tedavide başarı oranı yüksektir. Tip 1 endometrioid adenokarsinomlar, EK'nın yaklaşık %80-90 gibi büyük bir kısmını oluşturmaktadır. Tipik olarak normal büyüklükte ya da miyohiperplastik uterus içerisinde, düzensiz proliferatif ya da hiperplastik endometrium ile karakterizedir.

Tip 2 tümörler çoğunlukla ileri seviyede tanı almaktadır ve ileri yaşlarda obez olmayan kadınlarda daha yaygın görülmektedir. Endokrin ve metabolik bozukluklarda ortaya çıkan tümörler az diferansiyedir. Bu tümörler östrojenik uyarıma bağlı olmayıp, atrofik veya inaktif endometriumla ilişkilidir. Tip 2 tümörlü hastalarda serum östrojen seviyesinin düşük olduğu kaydedilmiştir (Murali 2014). Tip 2 EK'lar lenf nodu yayılımı ve derin miyometrial invazyon göstermektedir. Tip 2 EK'lar ayrıca p53, p16, epidermal büyüme faktörü ailesinin ikinci üyesi HER-2/neu ve E-kaderinde gerçekleşen genetik değişikliklerle de karakterize edilmiştir (Lobo and Thomas 2016).

EK'nın en sık görülen tipi olan Tip 1 endometrioid adenokarsinomlarda sitolojik atipi artmakta ve tümör diferansiyasyonu solid alanlar arttıkça azalmaktadır. Ayrıca Tip 1 adenokarsinomların yaklaşık %15-25'i skuamöz diferansiyasyonlu alanlar

içermektedir. Tip 1 endometrioid adenokarsinomun farklı bir tipi olan sekretuar karsinom ise olguların yalnızca %1'ini oluşturmaktadır. Skuamöz farklılaşma gösteren adenokarsinomlar glandüler komponentin nükleer değerlendirmesine göre derecelendirilmektedir.

Tablo 2. EK'nın histolojik alt tipleri (Dedes et al 2011)

Endometrioid adenokarsinoma/Tip 1	Non-endometrioid karsinoma/Tip 2
Skuamöz diferansiyasyon	Seröz adenokarsinoma
Villoglandüler diferansiyasyon	Clear-cell adenokarsinoma
Sekretuar varyant	Metaplastik adenokarsinoma
Silyalı -hücre varyantı	Müsinöz adenokarsinoma
	Skuamöz-hücre karsinoması
	Diğer; karışık adenokarsinomalar, transizyonel- hücre karsinoması, küçük hücre karsinoması ve undiferansiye karsinoma

Tip 2 olarak sınıflandırılan seröz adenokarsinom, berrak hücreli karsinom ve skuamöz hücreli karsinomlarda ise nükleer derecelendirme dikkate alınarak sınıflandırılmakla birlikte Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Federasyonu (International Federation of Gynecology and Obstetrics, FIGO) grade sistemi tüm endometrioid karsinomlara ve müsinöz karsinomlara uygulanabilmektedir (Zaino and Kurman 1988).

Villoglandüler konfigürasyon EK'nın %2'sinde bulunmaktadır (Sutton, Brill, Michael, Stehman, Ehrlich 1987). Bu tümörlerde hücreler papiller bir görüntü sergilemekte olup, iyi farklılaşmışlardır. Endometrioid karsinomlarda villoglandüler konfigürasyon erken postmenapozal kadınlarda daha sık görülmektedir (Tobon and Watkins 1985).

Müsinöz adenokarsinomlar EK'nın yaklaşık %5'ini oluşturmakta ve intrasitoplazmik müsine sahip hücreler tümörün yarısından fazlasını kaplamaktadır (Ross, Eifel, Cox, Kempson, Hendrickson 1983). Bu tümörlerin çoğu iyi diferansiyasyon göstermektedir.

Seröz adenokarsinomda çoğunlukla fibrovasküler yapılar etrafında çoğalmış yüksek atipili hücreler gözlenmekte ve Psammom cisimcikleriyle de karakterize

edilebilmektedir. Hastalık kötü prognoza sahiptir ve agresif seyirlidir.

Berrak hücreli adenokarsinomlar ise çoğunlukla ileri yaş kadınlarda görülen agresif endometrial karsinomdur. Hücreleri belirgin, berrak, eozinofilik sitoplazma ve yüksek derece atipili nukleus içermektedir. Çoğunlukla hyalinizasyon gösteren papiller yapıdan ve bu yapıda atnalı konfigürasyonundaki hücrelerden oluşmaktadır. Abeler ve arkadaşları berrak hücreli adenokarsinomlarda miyometrial invazyon ve lenfovasküler alan invazyonunun önemli birer belirleyici olduğunu bildirmiştir (Abeler, Vergote, Kjorstad 1996).

Tip 2 non-endometrioid skuamöz karsinom ise kötü prognoz ile karakterizedir. Çok nadir görülen bu tümörün tanı ve tedavisinde servikal skuamöz epitele yayılımının olmadığı gösterilmesi oldukça önemli bir belirleyici faktördür.

EK için cerrahi evreleme sağ kalımı belirlemede en önemli prognostik belirteç olup, tedaviyi şekillendirmede sıkça kullanılmaktadır. Ayrıca tümörün yayılımını gösteren cerrahi evreleme başta olmak üzere, rekürrens ve sağ kalımı değerlendirmede; histopatolojik grade, histolojik tip, yaş, miyometrial invazyon varlığı ve derinliği, pelvik ve paraaortik lenf nodu metastazı, servikal tutulum, pozitif peritoneal sitoloji, peritoneal metastaz, adneksiyel tutulum gibi çok sayıda prognostik değişken de tanımlanmıştır. Evreleme sistemi 2009 yılında FIGO tarafından güncellenerek Tablo 3'teki şeklini almıştır (Pecorelli 2009).

Lezyonların orijin aldığı organ ile sınırlı görüldüğü Evre I, erken evre hastalığı olarak adlandırılmaktadır. Evre II, orijin alanının dışına lokal olarak yayılan hastalık ile karakterizedir. Evre III daha geniş tutulumu temsil etmektedir. Evre IV ise metastatik ilerlemenin olduğunu göstermektedir. Bu temel evreler ise, genellikle belirli bir evredeki değişken prognostik faktöre bağlı olarak alt gruplara ayrılmaktadır (Benedet, Bender, Jones, Ngan, Pecorelli 2000) (Tablo 3).

2.2.4. EK'nın Derecelendirmesi

Tip 1 EK'da histopatolojik yapısal derecelendirme, solid alanların oranına ve nükleer atipiyeye göre yapılmaktadır. Skuamöz diferansiyasyon alanları solid tümör alanları

olarak değerlendirilmemelidir. Solid alanların oranı; Grade 1’de %5 ve altında, Grade2’de %6-50 arasında, Grade 3’te %50’nin üzerindedir.

Tip 1 EK’da nükleus derecelendirmesi ise; nükleusun boyutu ve şekli, kromatin dağılımı ve nükleolusun boyutuna göre yapılmaktadır. Grade 1’de; nükleus oval ve kromatin dağılımı düzgündür ve belirsiz bir nükleolusa sahiptir. Grade 2’de; düzensiz oval nükleus, kümelenmiş kromatin ve orta büyüklükte nükleolus, Grade 3’te ise; büyük-pleomorfik nükleus, büyük düzensiz nükleolus ve kaba kromatin bulunmaktadır.

Tablo 3. FIGO evreleme kriterleri (Pecorelli 2009)

Evre I Tümör yalnızca endometriumdadır.	Evre IA	Tümör miyometriyumun ½’ sinden azına invazyon gösterir.
	Evre IB	Miyometriyumun ½’ sinden fazlasına invazyon gösterir.
Evre II Serviks tutulumu vardır fakat tümör hala uterusla sınırlıdır	Evre IIA	Endoservikal glandüler tutulum varlığı
	Evre IIB	Servikal stromal invazyon
Evre III Lokal ve/veya bölgesel yayılım varlığı.	Evre IIIA	Seröza/adneksiyal invazyon
	Evre IIIB	Vajinal metastaz vardır.
	Evre IIIC	Pelvik lenf nodu metastazı vardır. Paraaortik lenf nodu metastazı vardır.
Evre IV	Evre IVA	Mesane ve/veya barsak metastazı vardır.
	Evre IVB	Uzak metastaz ve/veya inguinal/intraabdominal lenf nodu tutulumu vardır.

Tümör hücrelerinin yarısından fazlasında belirgin nükleer pleomorfizm, kaba kromatin, nükleolus belirginliği var ise yapısal derece bir basamak yükseltilmektedir (Özakıncı 2015). Seröz adenokarsinom ve berrak hücreli adenokarsinomlar yüksek dereceli tümörler olup nükleer derecelendirmem yapılmamaktadır.

Tümörün histolojik diferansiyasyonunun değerlendirmesi lezyonun farklılaşma

derecesi dikkate alınarak yapılmaktadır. Lezyonlar Grade 1’de önemli ölçüde farklılaşmış ise iyi diferansiye tümör, Grade 2’de kısmen solid alanlı ise kısmen ya da orta derece diferansiye tümör, Grade 3’te ise, solid ya da tamamen farklılaşmamış ise indiferansiye tümör olarak tanımlanmaktadır (Ayhan 2009).

Miyometrial invazyon derinliği; tümörün derecesi, lenf nodu metastazı varlığı ve genel hasta sağkalımı ile ilişkili en önemli morfolojik prognostik belirleyicidir. Lenf nodu metastazlarının prevalansı yüzeysel miyometrial invazyon ile %3’ten derin miyometrial invazyonda %46’ya yükselmektedir (Beddy et al 2012). Endometrioid adenokarsinom tümörleri çoğunlukla miyometrial invazyon göstermemektedirler. Bunun yerine komşu miyometriuma doğru gelişir, sınırları düzgündür, invazyon kolay farkedilir, ancak bazı vakalarda yaygın invazyon nedeni ile endometrium- miyometrium sınırı net olarak değerlendirilememektedir. Tümörlerin %20’sinde servikse uzanım mevcuttur (Gunderson et al 2014).

2.2.5. EK’nın Tanısı

EK risk grubunda olan tüm hastalara endometrial biyopsi yapılmalıdır. Pipelle biyopsinin, endometrial kanseri yakalamada oldukça etkili olduğu bildirilmiştir (Dijkhuizen, Mol, Brölmann, Heintz 2000). Pap smear testi EK tanısında spesifik bir yöntem olmasa da tesadüfi olarak hastalığı yakalayabilir. Klasik serviko-vajinal smear, invaziv EK’da %47-67 oranında pozitif sonuç vermektedir (Şahmay and Atasü 2004). Postmenopozal kadınlardan alınan Pap smearde endometrial hücrelerin görülmesi, hasta hormon replasman tedavisi görmüyorsa, EK riskini önemli ölçüde artırmaktadır (Simsir, Carter, Elgert, Cangiarella 2005). Bu nedenle bu gruptaki hastalara belirti vermeseler de endometrial örnekleme yapılmalıdır. Klinik açıdan EK’yı belirlemede yararlı olabilecek tek tümör belirteci Ca-125’tir. Tedavi sonrası özellikle ileri evre veya seröz tip EK’nın takibinde kullanılabileceği bildirilmiştir (Powell, Shiro, Diehl, Gajewski 2005).

Trans vajinal USG; endometriumun kalınlığını, kitlenin büyüklüğünü, servikal tutulumun ve bölgesel lenf nodlarının durumunu görmede ve miyometrial invazyonu belirlemede kullanılabilecek bir görüntüleme yöntemidir. Postmenapozal kanaması olan veya hormon replasman tedavisi gören, düzensiz kanama şikâyeti ile hastaneye

başvuran kadınlarda endometrial kalınlık 4 mm veya altında ise EK görölme olasılığı %1'in altındadır. Eğer kalınlık 5 mm veya üzerinde ise EK görölme olasılığı %18,7'dir. Kalınlığı 15 mm ve üzerinde ise hastaların hemen hepsi EK tanısı almaktadırlar (Gull, Carlsson, Carlsson, Ylostalo, Milson, Granberg 2000).

Renkli doppler USG, EK için rutin bir uygulama olmasa da %60-70 oranında doğruluk payı vardır. Bilgisayarlı tomografi (BT) ve manyetik rezonans görüntölme (MRI) lokal veya uzak yayılımın değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. MRI, özellikle miyometrial invazyonun operasyon öncesi değerlendirilmesinde güvenirliliği oldukça yüksek bir teknik olmakla birlikte, servikal uzanımlı EK'nın primer endoservikal adenokarsinomdan ayırımında kullanılabileceği bildirilmiştir (Saarelainen, Kööbi, Järvenpää, Laurila, Mäenpää 2012). Operasyon öncesi tetkiklerde akciğer grafisine bakılarak hastalığın yayılımı değerlendirilmektedir.

2.2.6. EK'nın Tedavisi

EK'da temel tedavi tümörün histolojisine, hastanın yaşı ve fertilite isteğine göre değişmektedir. Göbek altı median insizyon, cerrahi tedavide tercih edilmektedir. şüphede edilen her lezyondan sitolojik inceleme için batın yıkama sıvısı alınmalıdır.

Hayatında hiç gebelik yaşamamış bir kadın EK ile başvurduğunda fertilite koruyucu tedavi için seçim kriterleri, tedavi yaklaşımları, tedaviye yanıt oranları, onkolojik ve reproduktif sonuçlar dikkatle incelenip değerlendirilmelidir. İyi diferansiye erken evre (evre1A, Grade1) EK olduğu belirlenen hastada, uterus dışı yayılımın olmadığının kesin olarak belirlenmesi hayati önem taşımaktadır. şiddetli fertilite isteği olan hastaya 'takip ve ilaçla tedavi' yönteminin standart tedavi olmadığının anlatılması ve bu tedavi şeklini kabul ettiğini gösterir onam formunun imzalatılması oldukça önemli ve gereklidir. Bu hastaların yaklaşık üçte birinde nüks gelişebilecekdi dikkate alınarak yakın takipli olmaları ve gebelik tamamlandığında kesin cerrahi tedavinin gerekliliği anlatılmalıdır.

EK teşhisi ile başvuran genç hastalarda birçok farklı tedavi yöntemi kullanılmaktadır. Genel olarak, hormonal tedavi, cerrahi tedavi veya bu ikisinin birlikte uygulanması şeklindedir. Literatürde yaygın bir şekilde hastalara yalnızca hormonal tedavi (%50

medroksipropogesteron asetat ve %25 megestrol asetat) uygulandığı görülmektedir. Bir başka yöntem ise oral progestin takviyesi ile uygulanan levenorgestrel-releasing intrauterin sistemdir.

İleri evre EK'da primer tedavi cerrahidir. Cerrahi evreleme sonuçlarına göre hormon tedavisi, radyoterapi, kemoterapi gibi yöntemler uygulanabilmektedir. Bu seçeneklerin dışında agresif cerrahi girişimler de uygulanabilir. Sitoredüktif cerrahi ve adjuvan kemoterapi uygulamaları ileri evre ve rekürren EK hastalarında uygulansa da başarı oranı tartışmalıdır. İleri evre EK hastalarının relatif olarak az olması, eldeki verilerin azlığı bu hastaların optimal koşullarda ele alınmalarını zorlaştırmaktadır. Hastalar için hala en uygun, en etkili tedavi ile ilgili ortak bir görüş bulunmamaktadır. Bu hastaların tedavisini belirlemede multidisipliner bir yaklaşım gerekmektedir.

Standart yaklaşım; primer cerrahi (ekstrafasiyal total histerektomi ve bilateral salpingooferektomi, periton yıkama sıvısı alma, tüm abdomen eksplorasyonu, pelvik ve paraaortik lenf nodu örnekleme veya lenfadenektomi, omentektomi ve optimal sitoredüksiyon), adjuvan radyoterapi, kemoterapi veya reseptör pozitif hastalarda hormon tedavisidir.

2.3. FORKHEAD TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİ

FOX transkripsiyon faktörleri, sıkıca korunmuş monomerik, FOX adı verilen DNA bağlanma bölgelerine sahip büyük bir protein ailesidir (Weigel and Jackle 1990). İlk olarak Drosophila'da tanımlanan bu proteinlerin mutasyonu ile ortaya çıkan çatal şeklindeki ektopik baş morfolojisi sebebiyle 'Forkhead' olarak isimlendirilmiştir. DNA'ya bağlanma yerleri X ışını kristallografisinde kelebek kanadına benzer bir motif oluşturduğundan kanatlı (winged)-Heliks olarak da adlandırılmaktadır. FOX ailesi 110 amino asitten oluşmaktadır ve 3 adet sıkıca korunmuş ' α -heliks', ' β -sheet' ve 2 adet 'loop' bölgeden meydana gelen kelebeğe benzeyen bir yapıya sahiptir (Weigelt, Climent, Dahlman-Wright 2001). İnsanda 100'den fazla çeşidi bulunan FOX proteinleri sekans benzerlikleri dikkate alınarak 19 alt aileye ayrılmıştır. Bunlar FOXA'dan FOXS'ye kadar isimlendirilmektedir (Katoh 2004). FOX ailesi üyeleri hücre sinyalizasyonunda yer alarak, hücre büyümesi, proliferasyon, dokuya özgü gen ekspresyonu, embriyogenez, metabolizma, inflamasyon gibi hücresel süreçlerin yanı

sıra neoplazi oluşumuna ve kromozom translokasyonuna da neden olmaktadır (Carter and Brunet 2007, Martins, Lithgow and Link 2016). Örneğin göz epitel hücrelerinde aktif şekilde eksprese olan FOXE3 göz gelişimi için önemlidir ve bu transkripsiyon faktörünü kodlayan gende meydana gelecek bir mutasyon görme fonksiyonlarında dejeneratif kayıplara sebep olmaktadır. Aynı şekilde birçok omurgalıda konuşma ve ses gelişimi için önemli olan FOXP2 özellikle memeli primatlarda beyin ve dil gelişimi koordinasyonu için nöral esneklik sağlayan özgün bir role sahiptir (Carter and Brunet 2007).

2.3.1. FOXO Transkripsiyon Faktörleri

O sınıfı forkhead transkripsiyon faktörleri ailenin diğer üyelerine göre DNA bağlanma bölgelerinde sergilediği birtakım farklılıklardan dolayı ingilizcede diğer, öteki anlamlarına gelen ‘other’ kelimesinin ilk harfi kullanılarak adlandırılmıştır. FOXO proteinlerinin bir başka ayırt edici özelliği sıkıca korunmuş Akt fosforilasyon bölgelerinin olmasıdır (Huang and Tindall 2007, Maiese, Chong, Shang, Hou 2008). Omurgasızlarda bir tane FOXO geni var olup, solucanlarda daf-16, sineklerde dFOXO olarak adlandırılmaktadır. Memelilerde ise FOXO1 (FKHR/FKH1/FOXO1A), FOXO3 (FKHRL1/FOXO3A), FOXO4 (AFX/AFX1) ve FOXO6 olmak üzere dört adet FOXO geni bulunmaktadır (Biggs, Cavenee, Arden 2001). Son yıllarda yapılan çalışmalarda FOXO6 geninin C terminal ucunda Akt fosforillenme alanının olmadığı ve bu nedenle farklı bir şekilde düzenlenerek görev alabileceği düşünülmektedir (Heide, Hoekman, Smidt 2004). FOXO2 ve FOXO3 birbirinin psödogenidir, FOXO3 ün ortoloğu ise FOXO5’tir (Carter and Brunet 2007). FOXO proteinleri hemen hemen tüm hücrelerde var olmakla birlikte, FOXO1 en çok karaciğerde, yağ dokusunda ve pankreasın β -hücrelerinde eksprese edilmektedir (Maiese et al 2008). FOXO alt ailesi üyeleri, apoptoz, hücre çoğalması, stres direnci ve metabolizmanın düzenlenmesinde görev alan hedef genlerin ifadesinin düzenlenmesinde ve DNA tamirinde rol oynamaktadır (Huang and Tindall 2007, Weigel, Jürgens, Küttner, Seifert, Jäckle 1989).

FOXO1’in nükleusa giriş-çıkışı ve transkripsiyonel aktivitesinin belirlenmesi posttranslasyonel modifikasyonlar denilen fosforilasyon, asetilasyon, ubiquitilasyon,

arginin metilasyon ve O-glikozilasyon gibi mekanizmalar tarafından sağlanmaktadır. Bu modifikasyonlar rol aldıkları hücresel sürece göre FOXO1'in transkripsiyonel aktivitesini hem artırır hem de azaltmaktadır (Brunet et al 2001, Eijkelenboom and Burgering 2013, Xie et al 2012).

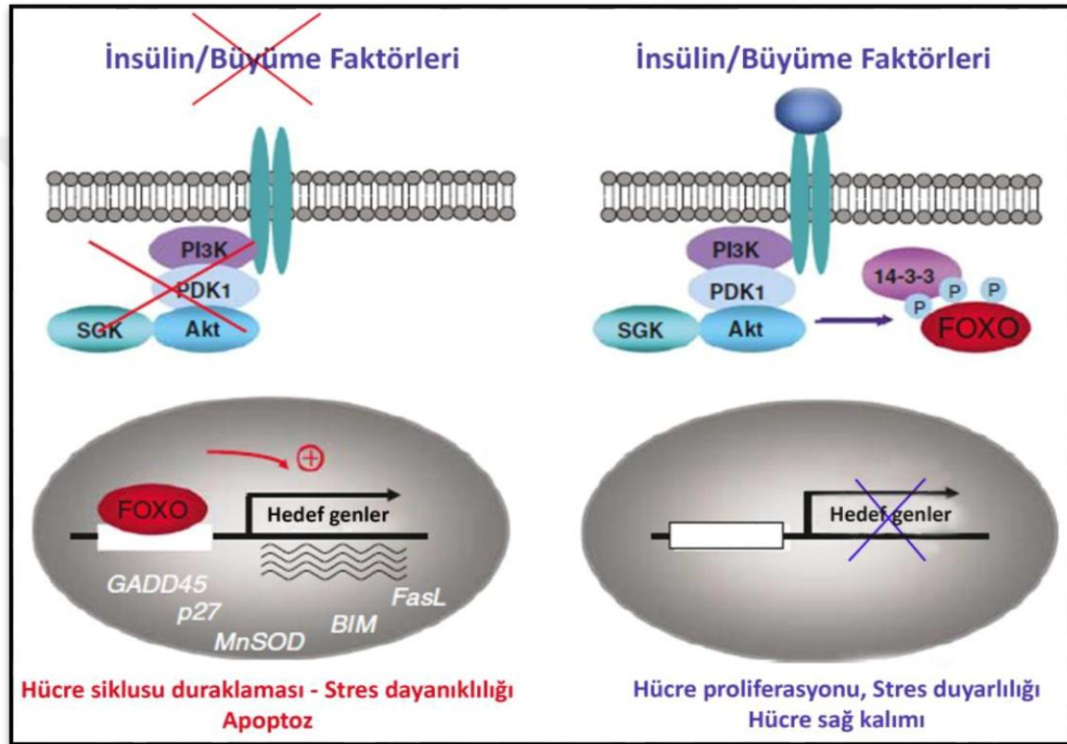
FOXO proteinleri, insülin ve büyüme faktörlerinin uyarısıyla sitozolde doğrudan Akt tarafından fosforillenip übikitinasyon için işaretlenmektedir. Bu nedenle fosforile edilen FOXO nükleusa geçip ilgili genlerin transkripsiyonunu başlatamamaktadır (Weigel et al 1989). Akt'nin yanı sıra, mitojen-bağımlı protein kinaz (MAPK), siklin-bağımlı kinaz 2 (CDK2) ve nükleer faktör κ B (NF- κ B) kinaz gibi diğer kinazların da FOXO1'in fosforilasyonunu etkilediği bilinmektedir (Boccitto and Kalb 2011).

2.3.2. FOXO Transkripsiyon Faktörlerinin PI3K/Akt ile Kontrol Edilmesi

Hücrede sağkalım ve proliferasyondan sorumlu sinyal yollarından biri olan PI3K/Akt sinyal yolağı, IGF ve diğer büyüme faktörleri ile aktive edilmektedir. FOXO transkripsiyon faktörlerinin PI3K/Akt ile düzenlenmesi bu ailenin en tipik özelliğidir (Huang and Tindall 2007). Hücre membranındaki yüzey reseptör tirozin kinazlara (RTKs) bağlanan IGF molekülleri insülin reseptör substrat protein (IRS) gibi alt adaptörleri uyarmakta ve PI3K'yı aktive ederek hücredeki kaskadı başlatmaktadır. Aktive olan PI3K enzimatik reaksiyonlarla Adenozin Trifosfatı (ATP), Adenozin Difosfata (ADP) dönüştürmektedir. Bu tepkimelerle kazanılan monofosfat, fosfotidilinositol bifosfatı (PIP2) fosforillemektedir. Oluşan fosfotidilinositol trifosfat (PIP3), 3-fosfoinositidine bağımlı protein kinaz 1 (PDK1) ve Akt'yi plazma membranına bağlayarak Akt molekülünün PDK1 tarafından aktive edilmesini sağlamaktadır (Tizivion, Dobson, Ramakrishnan 2011). Aktive olan Akt molekülü, FOXO proteinlerini direkt olarak 3 farklı serin/treonin bölgesinde fosforile etmekte ve 14-3-3 (Hsp6) şaperon proteininin nükleer lokalizasyon sinyallerini (NLS) baskılayarak sitozoldeki tutulumunu artırmaktadır. Bu nedenle nükleusa geçemeyen 14-3-3 şaperon proteini sitoplazmada FOXO molekülünün übikitinasyonunu sağlayarak hedef genlerin susturulmasına neden olmaktadır. PI3K/Akt yolağı inaktif olması durumunda ise FOXO transkripsiyon faktörleri nükleusa geçmekte ve ilgili genlerin ifadesini gerçekleştirmektedir (Şekil 8) (Hemmings and Restuccia 2012,

Zhang, Tang, Hadden, Rishi 2011).

FOXO'ların fosforilasyonu nükleusa geçişlerini düzenlemenin yanı sıra transkripsiyon aktivitelerini de kontrol etmektedir. FOXO1'in 256. pozisyonundaki serin kalıntısının fosforilasyonu DNA'ya bağlanma afinitesini değiştirmektedir (Zhang, Gan, Pan 2002). Ayrıca FOXO1'in fosforilasyonu kofaktöründen ayrılmasını da sağlamaktadır (Nasrin et al 2000).



Şekil 7. PI3K/Akt sinyal yolağında yer alan FOXO transkripsiyon faktörlerinin, insülin veya büyüme faktörleri tarafından düzenlenmesi (Kuşcu 2014)

FOXO transkripsiyon faktörlerinin insülin ve büyüme faktörleri ile aktivasyonunun ve inhibisyonunun dışında hücresel stres koşullarında da etkinliğini düzenleyen pek çok sinyalizasyon vardır (Brownawell, Kops, Macara, Burgering 2001, Brunet, Park, Tran, Hu 2001).

2.3.3. FOXO Moleküllerinin Posttranslasyonel Mekanizmalarla Kontrol Edilmesi

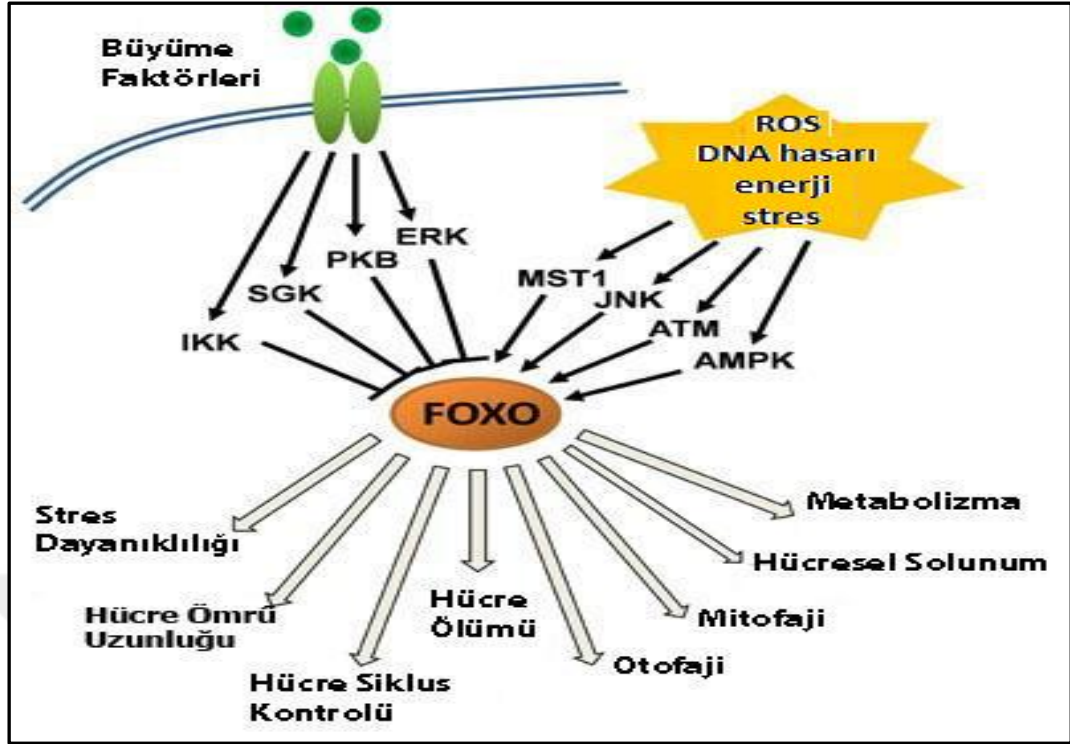
FOXO transkripsiyon faktörlerinin aktivitesi; fosforilasyon, asetilasyon ve

übikütilasyon süreçlerinin de dahil olduğu farklı posttranslasyonel modifikasyon mekanizması tarafından kontrol edilmektedir (Weigel et al 1989).

2.3.3.1. Fosforilasyon Mekanizması

FOXO transkripsiyon faktörlerinin her izoformu için fosforilasyon mekanizmasındaki kinazların değişen fosforilasyon bölgeleri vardır. Örneğin, FOXO1 için Akt fosforilasyon bölgeleri treonin (Thr)24, serin (Ser)256 ve Ser319 bölgesi iken, FOXO3 için Thr32, Ser253 ve Ser315' tir. FOXO4'ün ise Akt tarafından fosforilasyonu Thr28, Ser193 ve Ser258 bölgelerinde gerçekleşmektedir (Bocitto and Kalb 2011, Xie, Chen, Yuan 2012). Bazı kinazlar tarafından gerçekleştirilen fosforilasyon FOXO'nun aktivasyonu ile sonuçlanırken bazı durumlarda da inaktivasyonu ile sonuçlanabilmektedir (Burgering 2013).

FOXO1, IGF aracılığı ile Akt molekülünün aktivasyonunun yanı sıra başka kinazlar tarafından da düzenlenmektedir (Datta, Brunet, Greenberg 1999). Serum ve glukokortikoid indükleyici kinaz (SGK), çift özgün tirozin fosforillenmiş ve düzenlenmiş kinaz1 (DYRK1), IKKbeta-kinaz (IKK), ekstrasellüler sinyal düzenleyici kinazlar (ERK) ve kazein kinaz 1 (CK1), FOXO transkripsiyon faktörlerini fosforilleyerek nükleusa girişini engelleyen negatif regülatörler olarak gösterilmiştir (Brunet, Park, Tran, Hu 2001, Yang et al 2008). Yetersiz büyüme faktörü koşullarında strese giren hücrede DNA hasarı ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikimine bağlı olarak Jun-N-terminal kinaz (JNK), memeli STE20-benzeri protein kinaz 1 (MST1), siklin bağımlı kinaz 1 ve 2 (CDK1-2), aktif ataksia telanjektazi mutant kinaz (ATM) ve AMP aktif edilmiş kinazlar (AMPK) aktive olarak nükleer FOXO ekspresyon miktarını artırmaktadır. Bu nedenle hücre döngüsü üzerinden apoptoz mekanizmalarını hedefleyen genlerin ekspresyonunu sağlamaktadır (Şekil 9) (Bocitto and Kalb 2011, Jang, Yang, Srinivasan, Ye 2007). Ayrıca AMPK, FOXO transkripsiyon faktörlerinin nükleer aktivasyonunu sağlamanın yanı sıra hedef DNA sekansına bağlanmayı yönlendiren kinazlar arasında yer almaktadır (Burgering 2013).



Şekil 8. Farklı kinaz kaskadları tarafından FOXO transkripsiyon faktörlerinin büyüme faktörleri ve stres koşullarına bağlı olarak düzenlenmesi (Hagenbuchner and Ausserlechner 2013)

2.3.3.2. Asetilasyon Mekanizması

FOXO transkripsiyon faktörlerinin bir başka regülasyon mekanizması olan asetilasyon, sirtuin 1 ve 2 gibi histon deasetilazlar (HDAC) ile siklik AMP yanıt elemanı bağlayıcı protein (CREB) bağlayıcı protein (CBP) ve p300 gibi histon asetil transferazlar (HAT) tarafından sağlanmaktadır (Zhang, Pan, Cobb, Anderson 2007, Yin, Qie, Sang 2012). FOXO moleküllerinin asetilasyonu koaktivatör ya da korepresör komplekslerine bağlanarak gerçekleştirilmektedir (Xing, Li, Yang, Xi, Su 2014). Böylece asetilasyon yoluyla FOXO transkripsiyon faktörlerinin DNA bağlanma kapasiteleri baskılanmaktadır (Matsuzaki et al 2005).

2.3.3.3. Übikütilasyon Mekanizması

FOXO proteinlerinin düzenlenmesinde übikütilasyon mekanizmaları monoübikütilasyon, deübikütilasyon ve poliübikütilasyon olarak sınıflandırılmaktadır. FOXO'lar di-asilgliserol kinaz 2 (SPK2) ile poliübikütilasyon sonucu proteazomal

parçalanmaya uğramaktadır. Ubikütün spesifik proteaz 7 (USP7) ile deübikütilasyona uğrayan FOXO molekülleri, E3 ubikütün-protein ligaz 2 (MDM2) ile monoübikütilasyon sonucu hücrede meydana gelen ROS aktivitesine karşı lizin rezidülerini asetilasyondan koruyarak cevap vermektedir (Brenkman, Keizer, Broek, Jochemsen, Burgering 2008).

2.3.4. FOXO Moleküllerinin Hücresel Süreçlerdeki Roller

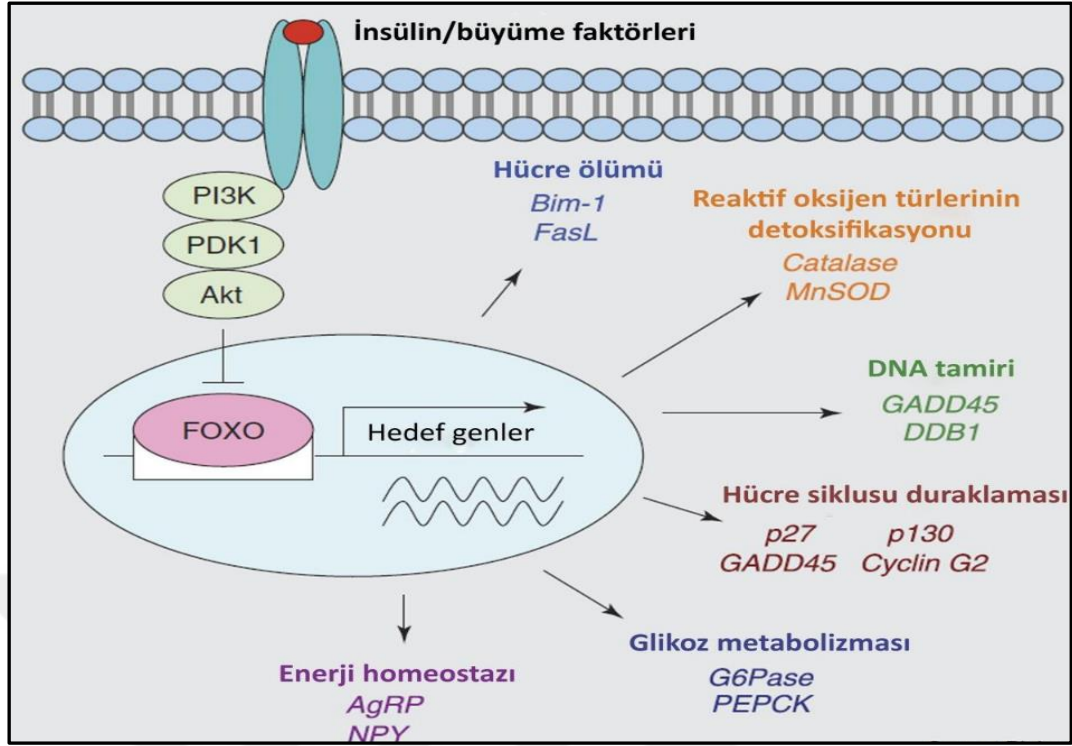
FOXO proteinleri, fosforilasyon mekanizmalarının kontrolünde, asetilasyon ve ubikütilasyon mekanizmaları ile düzenlenerek nükleusa giriş-çıkışları gerçekleşmektedir (Şekil 10) (Xie et al 2012).

Stres koşullarında, ROS detoksifikasyonunu sağlayan katalaz ve mangan süperoksit dismutazın (MnSOD) transkripsiyonu ile hücrede bu strese bir direnç gelişmektedir (Sedding 2008).

FOXO ailesi üyeleri, p21cip1 ve p27kip1 gibi genlerin transkripsiyonel düzenlemeleri ile hücre siklusunun duraklamasında görevli siklinlerin (siklin A, B, D, E, G2) ekspresyonlarının azalışına sebep olmaktadır (Zhang et al 2011).

FOXO, FasL ve TRAIL gibi ölüm sitokinlerinin transkripsiyonunu gerçekleştirerek pro-apoptotik etkinliğe sahip Bcl2 ailesinin üyesi olan Bim proteinini aktive ederek hücrede ölüm kaskadını başlatmaktadır (Nakae, Kitamura, Silver, Accili 2001, Schmoll et al 2000).

Ayrıca FOXO molekülleri, glikoz 6 fosfatı glikoza çeviren glikoz 6 fosfataz (GAPaz) enzim aktivitesini arttırarak glukoneogenezi uyarmaktadır (Nakae, Kitamura, Ogawa, Kasuga, Accili 2001).



Şekil 9. FOXO proteinlerinin düzenlediği fonksiyonlar (Kuşcu 2014)

FOXO proteinlerinin genomik DNA'ya her bağlanması mutlaka gen aktivasyonu ile sonuçlanmamaktadır. FOXO proteinleri, DNA'ya bağlanmadan da gen transkripsiyonunu düzenleyebilmektedir ve bu düzenlemeyi diğer transkripsiyon faktörleri üzerinden veya onların aktivitelerini düzenleyerek gerçekleştirmektedir (Ramaswamy, Nakamura, Sansal, Bergeron, Sellers 2002). Bu nedenle, FOXO hedef genlerinin, FOXO transkripsiyon faktörleri tarafından doğrudan düzenlenmesi şart değildir. Bu şekilde doğrudan veya dolaylı olarak FOXO proteinleri çeşitli hücre fonksiyonları düzenlemektedir. Tablo 4'de FOXO proteinlerinin farklı fizyolojik durumlarda hangi genlerin aktivasyonuna neden olduğu kısaca özetlenmiştir (Eijkelenboom and Burgering 2013).

Tablo 4. FOXO transkripsiyon faktörlerinin hedef genleri ve düzenlediği fonksiyonlar (Weigel et al 1989)

FOXO	
Hedef genleri	Düzenlediği fonksiyonlar
BCL2L11, FASLG, TNFSF10, TNF, BCL6, PMAIP1, BBC3	Apoptoz
CDKN2, CDKN2A, CCND1, RBL2, CDKN1B, CDKN1A, CCNG2	Hücre döngüsünü duraklatma
PEPCK, APOC3, G6PC	Glikoneogenez
GPR17, AGRP, NPY	Besin alımı
CAT, PRDX3, SOD2, SENP	Redoks dengesi
PINK1	Mitofaji
TRIM63, FBXO32	Proteozomal yıkım
GABARAPL1, BCEN1, ATG12, BNIP3	Otofaji
IRS2, PI3K	Artan PI3K sinyalleşmesi
EGFR	Artan EGF sinyalleşmesi
SESN3, RICTOR, RAPTOR	Azalan mTORC1 sinyalleşmesi, artan mTORC2 sinyalleşmesi
MXI1	Azalan MYC (sellüler protoonkogen) sinyalleşmesi
SOX2, OCT4	Pluripotensiyel bakım
FOXP3, IFNG IL7R, CCR7, RAG2, IRF7 SELL, RAG1	Bağışıklık sistemi

2.4. STEROL DÜZENLEYİCİ ELEMENT BAĞLAYICI PROTEİNLER

Sterol düzenleyici eleman bağlayıcı proteinler (SREBP), temel sarmal halka-sarmal lösün fermuar (bLHL-LZ) transkripsiyon faktörü ailesinin üyeleridir. SREBP'ler, kolesterol, triaçilgliserol, yağ asidi ve fosfolipid metaboizmasında kilit rol oynayarak lipid homeostazını düzenlemektedir.

SREBP'lerin üç üyesi vardır; bunlar SREBP1a, SREBP1c ve SREBP2'dir. SREBP1a ve SREBP1c izoformları SREBF1 geni tarafından, SREBP2 izoformu ise SREBF2 geni tarafından kodlanmaktadır. SREBP1c, yağ asidi sentezi ve insülin kaynaklı glikoz mekanizmasında, SREBP2 ise kolesterol sentezinde rol almaktadır. SREBP1a ise, SREBP ile ilgili tüm genleri potansiyel olarak bağlayabilmektedir (Eberlé , Hegarty, Bossard, Ferré, Foufelle 2004). SREBP1c, daha ziyade karaciğerde eksprese edilen izoform olmasına rağmen, SREBP1a immün sistemdeki hücre kültür hatları ve bazı hücre tiplerinde üretilmektedir (Sundqvist and Ericsson 2003).

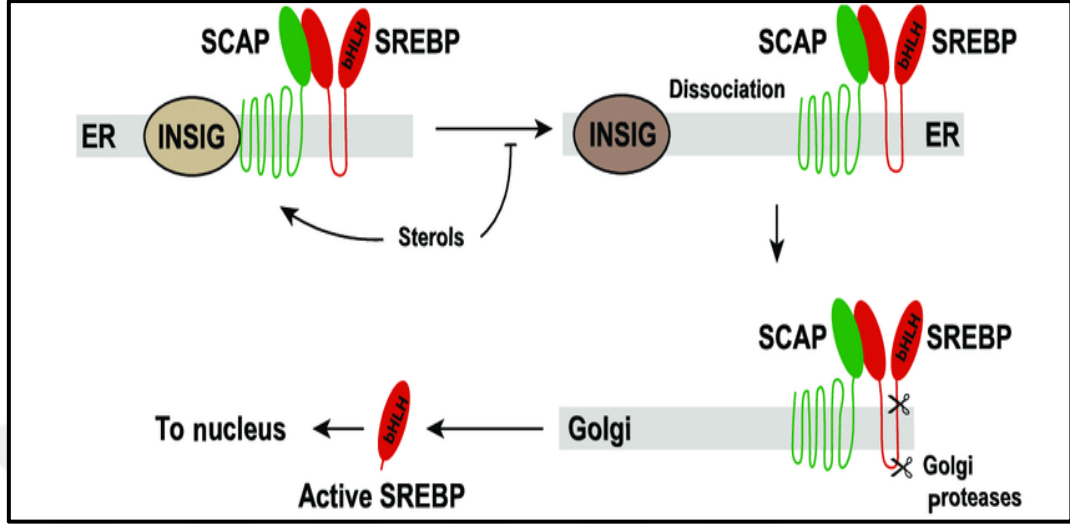
SREBP'ler, endoplazmik retikulum (ER) membranına tutunan iki transmembran

heliks içeren inaktif formda sentezlenmektedir. ER membranı üzerinde bulunan ve hücrel lipid yükünden gelen sinyalleri dönüştüren SREBP bölünme aktive edici protein (SCAP) ile insulin-induced gene 1 protein (INSIG) adı verilen ER proteinlerine tutunmuş durumdadır (Goldstein, DeBose-Boyd, Brown 2006). Aktive olabilmek için SREBP-SCAP kompleksi INSIG'den ayrılarak, coatomer-kaplı protein II (COPII) vezikülleri ile birleşmekte ve sonrasında Golgi organeline taşınmaktadır (anterograd taşınma) (Brown and Goldstein 1997). Steroller, SREBP'lerin ER'den Golgi organeline taşınmasını kontrol etmektedir (Osborne and Espenshade 2009). SREBP N-terminal (bHLH-LZ) aktif transkripsiyon faktör alanı, Golgi organelinde sırayla site-1 (S1P) ve site-2 (S2P) proteazları ile ayrılarak Golgi membranından salınmaktadır (Adams, Goldstein, Brown 2003). Serbest kalan bHLH-LZ bölgesini içeren bu alan daha sonra çekirdeğe girerek, hedef genleri bir homodimer olarak SRE veya E-box sekansı üzerinde bağlayarak lipid alımı ve biyosentezinde görevli genleri aktive etmektedir. Bu sayede hücrede sterol homeostazını sağlamaktadır (Eberle et al 2004).

Başta IGF, doymamış yağ asitleri, kolesterol, SREBP-N gibi çok sayıda sinyal, INSIG'in varlığını ve devamlılığını sürdürerek SREBP'lerin proteolitik aktivasyonunu, ayrıca ER'den Golgi'ye geçişini düzenlemektedir. Örneğin aşırı sterol varlığında, 25-hidroksikolesterol gibi oksisterol türevleri hücrede birikmekte ve bağımsız olarak, bir dizi değişikliğe uğrayarak INSIG'a bağlanmaktadır. Daha sonra SREBP-SCAP'ın ER'de tutulmasını sağlayarak, SCAP'ın sterol algılama alanıyla hücrel lipid yükünden gelen sinyalleri dönüştürmektedir (Goldstein et al 2006). Böylece SREBP-SCAP kompleksinin ER'den çıkışı bloke edilmekte ve hedef genler susturulmaktadır. Ayrıca nükleer SREBP'ler, translasyon sonrası modifikasyonlarla da (asetilasyon, fosforilasyon ve ubiquitilasyon) düzenlenmektedir. Bu transkripsiyonun son ürünü ile gerçekleştirilen geri bildirim mekanizması (translasyon sonrası modifikasyonlar), lipogeneze homeostazı sağlamaktadır (Osborne and Espenshade 2009, Shao and Espenshade 2012).

SCAP sterol algılama alanında meydana gelen nokta mutasyonları ise, sterol aracılı düzenlemeyi bozarak SCAP ile INSIG proteini arasındaki etkileşimi inhibe etmektedir. Buna bağlı olarak ER'den ayrılan SREBP-SCAP kompleksi Golgi'ye

gitmekte ve SREBP-N terminal bölgesinin nukleusa geçmesini sağlayarak lipogenezi hedefleyen genlerin transkripsiyonunu gerçekleştirmektedir (Şekil 11).



Şekil 10. Proteoliz ile SREBP aktivasyonunun düzenlenmesi
(https://www.researchgate.net/figure/fig2_312890557) (Erişim tarihi: 06.11.2021)

2.5. SREBP1 VE FOXO1 PROTEİNLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİ

Çeşitli kanser türlerinde SREBP1 ekspresyonunun arttığı (Li, Mahmoud, Han, Ripple & Pizer 2000, Yahagi et al 2005) ve lipogenezin kanserli hücrelerin özelliği olduğu (Swinnen, Brusselmans & Verhoeven 2006, Menendez & Lupu 2007) yapılan pek çok çalışmada gösterilmiştir. Sirtuin 1 (SIRT1); genomun sürdürülmesi, gen regülasyonu, apoptoz, DNA onarımı, yaşlanma ve kanser gelişimi gibi süreçlerde rol oynayan, NAD⁺ bağımlı sınıf III histon deasetilaz (HDAC) ailesinin bir üyesidir (Rifai et al 2018). Kanserli hücrelerde SIRT1 deasetilasyon yoluyla FOXO1 aktivitesini baskımlarken (Motta et al 2004, Frampton et al 2012), FOXO1'in düşük ekspresyonu SREBP1'in baskılanmasını azaltmakta ve yüksek SREBP1 ekspresyon seviyelerine neden olmaktadır (Zhang et al 2006, Deng et al 2012).

FOXO1'in SREBP1 gen ekspresyonu üzerindeki etkisini göstermek için transgenik fareler üzerinde yapılan bir çalışmada; çekirdekte FOXO1'in doğrudan SREBP1c promotörüyle birleşerek SREBP1 gen ekspresyonunu negatif yönde düzenlediği gösterilmiştir. Bu çalışma ile FOXO1'in SREBP1 gen ekspresyonu üzerinde doğrudan bir inhibitör olduğu, açlık sırasında FOXO1'in SREBP1 ve *de novo* lipogenezin

baskılanmasında fizyolojik bir rolü olabileceği bildirilmiştir. Aynı çalışmada EK'da SIRT1'in, SREBP1 ve lipogenezi hedefleyerek tümör proliferasyonunu, göçünü ve istila kapasitesini önemli ölçüde etkileyerek desteklediği rapor edilmiştir (Deng et al 2012).

EK'da aktive olan SIRT1'in deasetilasyonla FOXO1 aktivitesini baskıladığı ve FOXO1'in düşük ekspresyonunun SREBP1'in baskılanmasını azalttığına gösterildiği *in vivo* bir çalışmada, SIRT1'in SREBP1'i ve dolayısıyla lipogenezi artırarak endometrial tümör büyümesini desteklediği bildirilmiştir (Lin et al 2014).

Farklı *in vivo* çalışmalarda, EK ve over kanserinde SREBP1'in aşırı düzeyde eksprese edildiği ve yükselen SREBP1 protein ekspresyonunun daha yüksek FİGO cerrahi evresi ve histopatolojik grade ile ilişkili olduğu gösterilmiş, SREBP1'in yıkılması ile apoptozun indüklenebileceği ve hücre proliferasyonunun azaltılabileceği bildirilmiştir (Li et al 2014, Nie et al 2013).

Hirota ve arkadaşları (2003) ile Dong ve arkadaşları (2008) tarafından yapılan çalışmalarda insülin eksikliği ve/veya bozulmuş insülin sinyali olan fare karaciğerinde tespit edilen FOXO1 ekspresyonundaki azalma ve SREBP1c ekspresyonundaki artış FOXO1'in SREBP1 geni üzerindeki negatif etkisini destekler niteliktedir.

FOXO1 proteinlerinin SREBP1 gen ekspresyonu üzerine doğrudan etkisi tam olarak açıklığa kavuşturulamamış olsa da FOXO1 proteininin, insülin eksikliği ve açlık durumunda yani PI3K/Akt sinyal yolağının inaktif olmasıyla, SREBP1c gen ekspresyonu üzerine olan negatif etkisini, RNA polimeraz II'nin promotöre katılmasını ve transkripsiyonel komplekslerin bir araya getirilmesini engelleyerek gerçekleştirdiği düşünülmektedir (Kamei et al 2008, Liu et al 2010).

Çalışmamızda farklı histopatolojik derecelere (Grade I, Grade II ve Grade III) sahip EK hastalarında, FOXO1 ile SREBP1 transkripsiyon faktörlerinin EK gelişiminde moleküler bir biyobelirteç olarak öneminin ortaya konması ve grade bağlantılı olarak FOXO1 ve SREBP1'in ekspresyon düzeylerindeki farklılığın aydınlatılması amaçlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. ETİK KURUL KARARI

Mevcut çalışma için Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 26/12/2019 tarih ve E-16070 sayılı karar ile etik onay alınmıştır (Ek 1).

Bu çalışma 'Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu' tarafından finansal olarak desteklenmiştir (BAPK Proje Numarası: 2020-7-25-10).

3.2. ÖRNEKLERİN TOPLANMASI VE ÇALIŞMA GRUPLARININ OLUŞTURULMASI

Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Anabilim Dalı arşivinden, 100 adet endometrial kanser (EK) tanısı konmuş parafin doku bloğu ve kontrol grubunda kullanılmak üzere, menometroraji ve endometrial kalınlaşma nedeniyle biyopsi materyali olarak alınmış, fakat EK olmadığı saptanmış 50 adet normal endometrium içeren parafin doku bloğu çıkarıldı. Arşivden çıkarılan EK tanılı örneklerde kanserin alt tiplerinin belirlenebilmesi için, parafin bloklardan yeni kesitler alınarak ışık mikroskopik preparatlar hazırlandı. Bu preparatlar bir patolog tarafından değerlendirilerek EK alt tiplendirmeleri ve grade'lemeleri yapıldı. Buna göre, EK tanısı almış örneklerden 61 tanesinin Tip 1 EK (Endometrioid adenokarsinoma) olduğu saptandı. Geri kalan EK tanılı bloklar ise ya yeterince doku örneği içermediğinden ya da Tip 2 EK (berrak hücreli karsinom ve seröz karsinom) olduğu belirlendiğinden çalışma dışında bırakıldı.

Patolog tarafından Tip 1 EK olduğu saptanan 61 örneğe ait kesitlerin histopatolojik değerlendirmesi neticesinde Grade I, Grade II ve Grade III şeklinde gruplandırmaları yapıldı. Buna göre; 61 örneğin 24 tanesinin Grade I EK (GI grubu, n=24), 18 tanesinin Grade II EK (GII grubu, n=18) ve 19 tanesinin de Grade III EK (GIII grubu, n=19) olduğu saptandı. Standardizasyon için kontrol grubundaki örnek sayısı 24 (n=24) olarak belirlendi. Böylece, tez çalışmamızın immunohistokimyasal ve moleküler biyolojik laboratuvar çalışmalarında, endometriyal doku örneklerini içeren toplam 85 adet parafin blok kullanıldı.

Çalışmamızda kullanılan parafin doku örneklerinin ait olduğu kişilerin ya bizzat kendilerinden ya da ölmüş olanların birinci derece yakınlarından, gönüllü onam formu doldurularak gerekli izinler alındı.

3.3. HİSTOPATOLOJİK İŞLEMLER

3.3.1. Işık Mikroskopik Kesitlerin Elde Edilmesi

Parafin doku bloklarından *Thermo Scientific Microm HM40E* (Thermo Scientific™, Walldorf, Almanya) markalı mikrotom (Resim 1) kullanılarak, histopatolojik değerlendirme için rodajlı normal lamlara ve immunohistokimyasal boyamalar için poly-L lizin kaplı lamlara (Citoglas™, Adhesin Microscope Slides, Citotest Labwere Manufacturing Co. Ltd, Çin Halk Cumhuriyeti) 4-5 mikrometre kalınlığında seri kesitler alındı.

Tüm örneklerden rodajlı normal lamlara alınan ışık mikroskopik kesitler hematoksilen eozin (H-E) ile boyandıktan sonra bir patolog tarafından incelenerek değerlendirildi.



Resim 1. Thermo Scientific Microm HM40E marka mikrotom

3.3.2. Hematoksilen Eozin (H-E) Boyama İşlemi

Parafin kesitler, H-E ile boyama işlemine geçmeden önce deparafinizasyon için *Memmert UN55* (Memmert™, GmbH+Co. KG, Schwabach, Almanya) marka etüvde (Resim 2) 70°C’de 1 saat bekletildi.



Resim 2. Memmert™ UN55 marka etiv

H-E boyama işlemi, Leica marka Lam Boyama/Lam Kapama Cihazında (*Leica™ AutoStainer XL, ST5010*, Buffalo Grove, IL, Amerika Birleşik Devletleri) otomatik olarak yapıldı (Resim 3).



Resim 3. Leica marka Lam Boyama/Lam Kapama Cihazı (*Leica™ AutoStainer XL, ST5010*)

H-E boyama prosedürü sırasıyla; kesitlerde kalan parafinin uzaklaştırılması için ksilenden geçirme, rehidratasyon için yüksekten düşüğe doğru dereceli etil alkol serilerinden geçirme, Harris'in hematoksileni (*Sitogen™, Bright slide C.I. 75290*, İstanbul, Türkiye) ve Eozin Y (*Sitogen™, Bright slide, Eosin Y Water Solution*, İstanbul, Türkiye) ile boyama, takiben dehidratasyon için düşükten yükseğe doğru

dereceli etil alkol serilerinden geçirme ve ksilolde şeffaflaştırma basamakları şeklinde cihaz tarafından otomatik olarak gerçekleştirildi.

Boyanan kesitler entellan (*Merck™*, Darmstadt, Almanya) ile kapatıldıktan sonra, *Nikon DS-Fi²/ DIGITAL SIGHT DS-U³* (Nikon Instruments Inc., Japonya) marka bir dijital kamera monte edilmiş *Nikon ECLIPSE* (Nikon, Tokyo, Japonya) marka ışık mikroskopunda (Resim 4) incelendi ve fotoğrafları çekildi.



Resim 4. Nikon DS-Fi²/ DIGITAL SIGHT DS-U³ marka dijital kamera monte edilmiş Nikon ECLIPSE marka ışık mikroskobu

3.3.3. EK Grade'lemesi için Histopatolojik Değerlendirme

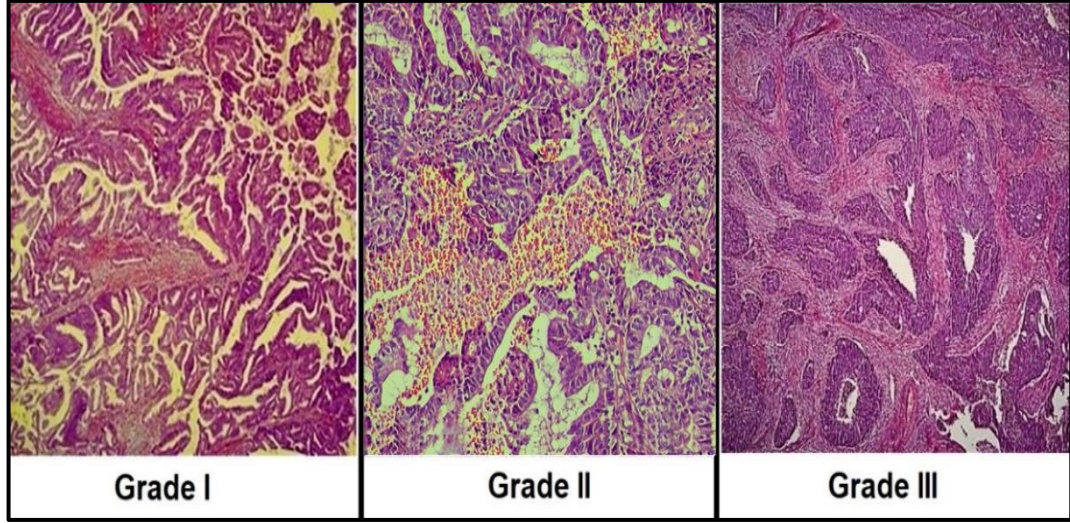
H-E ile boyandıktan sonra patolog tarafından değerlendirilerek Tip 1 EK olduğu saptanan kesitlerde 'grade' belirlenmesi, FIGO kriterlerine göre yapıldı (WHO, 2014). Buna göre;

Grade I'de solid alan oranı %5 ve altında,

Grade II'de %6-50 arasında,

Grade III'te ise %50'nin üzerinde olarak değerlendirildi (Resim 5).

Solid epitelyal tümör bileşeni oranı eşik oranın altında olan, ancak %50'den fazla tümör hücresinde şiddetli nükleer atipi gösteren az sayıda örnek, bir üst dereceye yükseltildi. Yapısal derece, nükleer dereceye göre ön planda değerlendirildi (WHO, 2014).



Resim 5. Tip 1 EK grade'lerini gösteren ışık mikrograflar. **Boya:** H-E, **objektif büyütmesi:** x10

3.3.4. İmmunohistokimyasal Analizler

Parafin bloklardan poly-L lizin kaplı lamlara alınan kesitlerde FOXO1A ve SREBP1 proteinlerinin immünohistokimyasal yöntemler (IHC) ile görüntülenmesi için immunperoksidaz boyama tekniği kullanıldı. IHC boyama için, anti-FOXO1A primer antikoru (Abcam™, Katalog no: ab227752, İngiltere) ile anti-SREBP1 primer antikoru (Abcam™, Katalog no: ab191857, İngiltere) ve primer antikorlarla uyumlu Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Horseradish Peroxidase, HRP) (Abcam™, ab205718, İngiltere) sekonder antikor kiti kullanıldı.

3.3.4.1. İmmunperoksidaz Boyama Prosedürü

IHC için alınan kesitler, etüvde 60 °C'de 1 saat deparafinizasyon işleminden sonra tam otomatik IHC/ISH cihazında (*Leica Biosystems™*, Bond-Max, Fully Authomated IHC and ISH Staining System, Avustralya) boyandı (Resim 6). FOXO1A ve SREBP1 primer antikorları 1/100 dilüsyonda, sekonder antikor ise 1/200 dilüsyonda kullanıldı. Otomatik boyama cihazında gerçekleştirilen işlemler Tablo 5'de özetlendi.



Resim 6. Tam otomatik IHC/ISH cihazı

3.3.2.2. Işık Mikroskobunda IHC Skorlama

İmmunperoksidaz tekniği ile boyanan preparatlar, Nikon DS-Fi²/ DIGITAL SIGHT DS-U³ (Nikon Instruments Inc., Japonya) dijital fotoğraf makinesi ataçmanlı bir ışık mikroskobunda (Nikon ECLIPSE Ni, Nikon Instruments Inc., Japonya), çalışma grupları bakımından kör iki histolog tarafından semikantitatif olarak skorlandı ve fotoğrafları çekildi.

Skorlama için, x40 büyütme objektifi altında her lamda rastgele seçilen ortalama 10 alanın her birinde, mikroskoba entegre edilmiş '*NIS-Elements Imaging Software*' programı kullanılarak 100'er adet hücre sayıldı (Resim 6). Yani, tek bir lam üzerinde 10 farklı alan değerlendirildiğinde, toplam 1000 hücre sayılmış oldu. Sayılan bu hücreler içinde immün pozitif reaksiyon verenlerin sayısı yüzde olarak ifade edildi. Böylece tek bir lamda bulunan 10 farklı alanın her biri ayrı ayrı skorlandı ve veri setine kaydedildi.

Skor puanı; 100 hücreden, 10 ve daha azı immün pozitif ise '0',

11-25 aralığında ise '1',

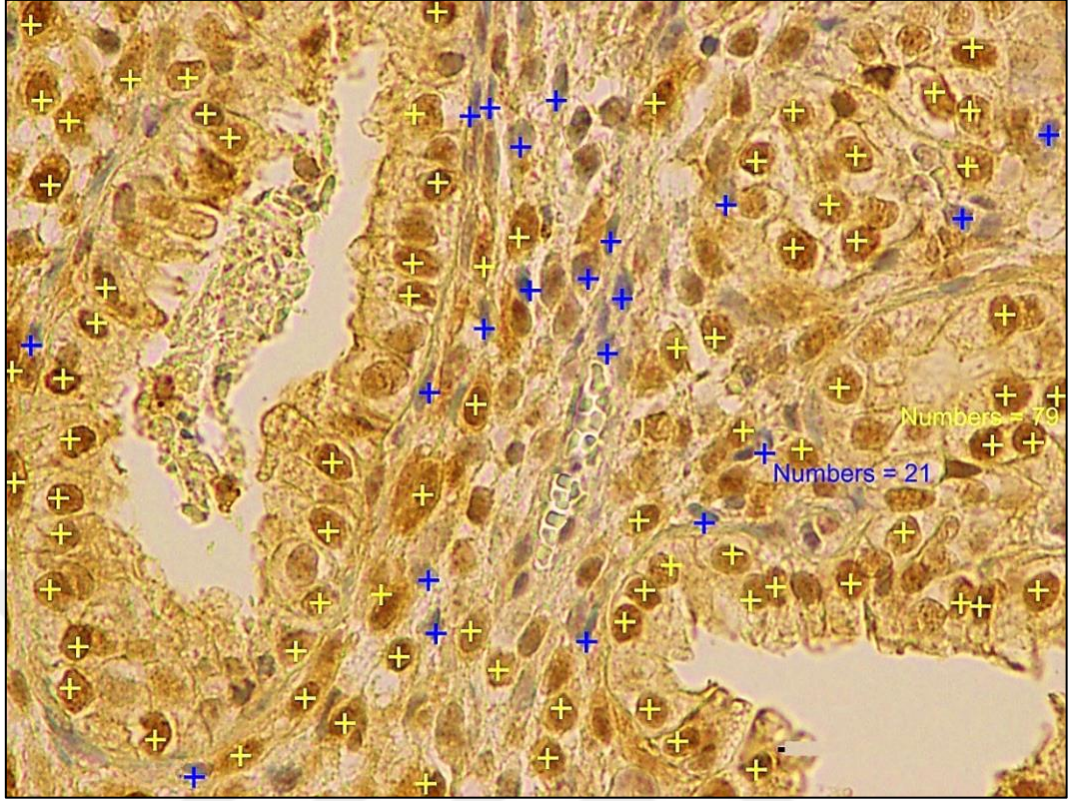
26-50 aralığında ise '2',

51-75 aralığında ise '3',

75'ten daha fazlası immün pozitif ise '4' olarak değerlendirildi.

Tablo 5. Bond-Max™ IHC/ISH cihazında gerçekleştirilen immunperoksidaz boyama prosedürü

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	Bond-dewax Solüsyon	1 dk
Deparafinizasyon	Bond-dewax Solüsyon	30 sn
Deparafinizasyon	Bond-dewax Solüsyon	30 sn
Rehidratasyon	Absolü etil alkol	30 sn
Rehidratasyon	%80 Etil alkol	30 sn
Rehidratasyon	%70 Etil alkol	20 sn
Yıkama	Bond-wash Solüsyon	30 sn (3 tekrar)
Antijen açığa çıkarma (Ag retrieval)	Bond ER Solüsyon 2	30 sn (4 tekrar)
Yıkama	Bond-wash Solüsyon	30 sn (3 tekrar)
Endojen enzim blokajı	%3'lük Hidrojen peroksit	1,5 dk
Yıkama	Bond-wash Solüsyon	45 sn (4 tekrar)
Primer antikor	Anti-FOXO1A veya Anti-SREBP1	20 dk
Yıkama	Bond-wash Solüsyon	40 sn (7 tekrar)
Sekonder antikor	Biotinylated Goat anti-polyvalent	20 dk
Yıkama	Bond-wash Solüsyon	40 sn (7 tekrar)
HRP	Streptavidin Peroxidase	10 dk
Yıkama	Bond-wash Solüsyon	1 dk (4 tekrar)
HRP	Streptavidin Peroxidase	8 dk
Yıkama	Bond-wash Solüsyon	1 dk (2 tekrar)
Yıkama	Deiyonize Su	30 sn (2 tekrar)
Kromojen ile boyama	Diaminobenzidine (DAB)	10 dk
Yıkama	Deiyonize su	30 sn (6 tekrar)
Kontrast (zıt) boyama	Harris hematoksilin	10 dk
Yıkama	Deiyonize su	1 dk
Yıkama	Bond-wash Solüsyon	1,5 dk (2 tekrar)
Yıkama	Deiyonize su	30 sn (2 tekrar)
Yıkama	Bond-wash Solüsyon	10 sn
Boyama cihazından çıkarılan lamalar; %70'likten başlayıp giderek %100'e kadar yükseltilen etil alkol serilerinden geçirilerek dehidratasyon işlemi yapıldı. Takiben, ksilenden geçirilerek şeffaflaştırma işlemine tabi tutulduktan sonra entellan ile kapatıldı.		



Resim 6. “NIS-Elements Imaging software” programı kullanılarak yapılan skorlama tekniği. **Sarı (+) işareti:** immun pozitif hücre, **mavi (+) işareti:** immun negatif hücre. **Boya:** İmmünperoksidaz yöntemi.

3.4. MOLEKÜLER BİYOLOJİK İŞLEMLER

3.4.1. Parafin Bloktan RNA İzolasyonu

Çalışmada toplanan parafin blok örneklerinden RNA izolasyonu için TriGent reaktifi (Biomatik™, Kanada) kullanıldı. Parafin bloklardan alınan kesitler üzerine ksilen eklenerek parafinin uzaklaştırılması ve dokunun rehidrolizi sağlandı. Ardından %100 ethanol ile yıkanan doku parçaları proteinaz K (Genaxxon Bioscience™, Ulm, Almanya) eklenerek *BioSan* marka ısıtıcı blokta (Dry Block Thermostat, *Bio TDB-100*, Letonya) 55°C’de bir gece inkübe edildi (Resim 7). İnkübasyon sonrası örnekler proteinaz K’nın inaktif olması amacıyla 90°C’de ısıtıcı blokta 30 dakika bekletildi. Süspansiyon üzerine 1mL TriGent reaktifi için 200 µl kloroform (Sigma™, ABD) eklenildi ve *Nüve* marka soğutmalı santrifüjde (Nüve™ *NF 800R*, Türkiye) 12.000 rpm’de +4 °C’de 15 dakika boyunca santrifüj edildi (Resim 8).



Resim 7. Isıtıcı blok (BioSan, Dry Block Thermostat, Bio TDB-100)



Resim 8. Soğutmalı santrifüj (Nüve NF 800R)

Santrifüj sonrasında elde edilen üç fazdan üstte kalan sıvı faz (aqueous) yeni ependorf tüplere toplandı ve üzerine izopropanol (Sigma™, Amerika Birleşik Devletleri) eklenerek inkübe edildi ve 12.000 rpm’de +4°C’de 10 dakika santrifüj edildi. İşlem sonrası süpernatant atıldı; kalan pellet üzerine %75’lik etanol ilave edilerek 7.500 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pelletler 15 dakika oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Süre sonunda pellet üzerine RNaz içermeyen su eklenerek ısıtıcı blokta 55°C’de 15 dakika bekletildi. RNA’lar daha sonra çalışılmak üzere *Haier* marka derin dondurucuda (Biomedical Ultra Low Temperature Freezer, Qingdao, Çin Halk Cumhuriyeti) -80 °C’de saklandı (Resim 9). Çalışmamızda izole edilen total RNA miktarı Qubit 4.0 Fluorometer (Invitrogen™, Amerika Birleşik Devletleri) cihazında (Resim 10) ölçüldü.



Resim 9. Derin dondurucu (Haier, Biomedical Ultra Low Temperature Freezer)



Resim 10. Qubit 4.0 Fluorometer (Invitrogen™, Amerika Birleşik Devletleri)

3.4.2. cDNA Sentezi

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), izole edilen mRNA'dan revers transkriptaz enzimi yardımıyla komplementer DNA (cDNA) dönüştürülmesinin yapılabildiği hızlı ve hassas bir yöntemdir. Ölçülen RNA örneklerin cDNA'ya çevrimi, *The Applied Biosystems™ High-Capacity cDNA Reverse Transcription* kiti (Thermo Fisher Scientific, Amerika Birleşik Devletleri) ile gerçekleştirildi. PCR tüplerine her örnekten

100 ng RNA örneği alındı ve reaktif tüpüne kit protokolüne uygun miktarlarda dH₂O, dNTP Mix (100 uM) ve 10X RT Random Primers eklendi. Sonrasında, 10X RT Buffer ve *MultiScribe™ Reverse Transcriptase* eklenerek 25°C’de 10 dakika, 42°C’de 60 dakika, 80°C’de 5 dakika ve 4°C’de 15 dakika programda cDNA sentezi gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA’ lar sonraki deneyler için -20°C’ de saklandı.

3.4.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Bir genin hücre içerisindeki gen ifade seviyesinin analizi için günümüzde en yaygın kullanılan yöntem *real time* PCR (RT-qPCR) yöntemidir. RT-qPCR reaksiyonunda gerçekleşen her bir döngüde üretilen PCR ürününün miktarı, cihaz tarafından yayılan bir floresan sinyali ile ilişkilendirilmektedir.

Parafin doku bloklarından elde edilen RNA’lar cDNA’ya çevrildikten sonra FOXO1 (Hs01054576_m1) ve SREBP1 (Hs01088691_m1) genleri ve kontrol olarak ACTB (Hs99999903_m1) genlerinin ekspresyon düzeylerinde değişimler çalışıldı. İlgili genlerin ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi için *TaqMan® Gene Expression Assays* (Thermo Fisher Scientific, Amerika Birleşik Devletleri) primerleri kullanıldı. 96 kuyucuklu plakalara *TaqMan® Gene Expression Master Mix*, primer, nükleaz içermeyen dH₂O ve cDNA örneği eklendi ve *Step One Plus Real Time-PCR* (Applied Biosystems, Amerika Birleşik Devletleri) cihazına yerleştirildi (Resim 11). Reaksiyon 95 °C 10 dakika, 95 °C 15 saniye, 60 °C 1dakika, 40 °C 30 saniye olarak 40 döngü çalışıldı. Elde edilen veriler *The GeneGlobe Data Analysis Center* web tabanlı programda $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu ile bağımsız t testi gerçekleştirilerek istatistiksel olarak değerlendirildi.



Resim 11. Step One Plus Real Time-PCR (Applied Biosystems)

3.5. İSTATİSTİK

Elde edilen tüm veriler SPSS 20.0 (IBM, Armonk, NJ, Amerika Birleşik Devletleri) ve GraphPad Prism 6.0 programları kullanılarak hesaplandı. Semikantitatif analizler sonucu elde edilen non parametrik immunohistokimyasal veriler maksimum ve minimum değerler göz önüne alınarak median-%25 ve %75 çeyreklik dilimler arası değerler olarak hesaplandı. Gruplar arasındaki farklar kullanılarak non-parametrik Krukall-Wallis H testi ve bunu takiben bir Tamhane T2 testi uygulanarak analizler yapıldıktan sonra, grupların sayısal verileri analize tabi tutuldu. PCR verilerinin istatistiksel analizinde EK hastalarına ait klinik parametreler ile belirlenen genlerin ekspresyon düzeylerinin gruplar arası farkları için Kruskall Wallis ve ikili karşılaştırmalar için Mann Whitney U testi kullanıldı. İstatiksel olarak $p < 0,05$ anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. KLİNİK ÖZELLİKLER İLE İLGİLİ VERİLER

Çalışmamızda toplam 85 olguya ait parafin blok örneği kullanıldı. EK grubunda bulunan 61 örneğin tamamı uterektomi materyali iken, kontrol grubunda yer alan toplam 24 örneğin tamamı menometroraji ve endometrial kalınlaşma nedeniyle alınmış küretaj materyali niteliğindeydi. Kontrol grubu örneklerinin 23'ü 50 yaş altı olguya ait olup, 15 tanesi proliferatif faz, 9 tanesi ise sekretuar faz endometriumu idi.

Çalışmamızda kullanılan EK tanımlı blok materyallerinin ait olduğu hastaların hastane kayıtlarından elde edilen klinik ve histopatolojik veriler Tablo 6'da gösterildi.

Tablo 6. EK hastalarının klinik ve histopatolojik özellikleri

Klinik Özellikler	Hasta Sayısı	Yüzde Oranı (%)
Yaş (yıl)		
≤ 60	27	44,3
> 60	34	55,7
Menopoz durumu		
Pre	11	18,0
Post	50	82,0
Histolojik grade		
I	24	39,3
II	18	29,5
III	19	31,2
FIGO evre		
I-II	43	79,6
III-IV	11	20,4

4.2. İMMUNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR

4.2.1. FOXO1A Spesifik İmmunohistokimyasal Boyama İle Elde Edilen Veriler

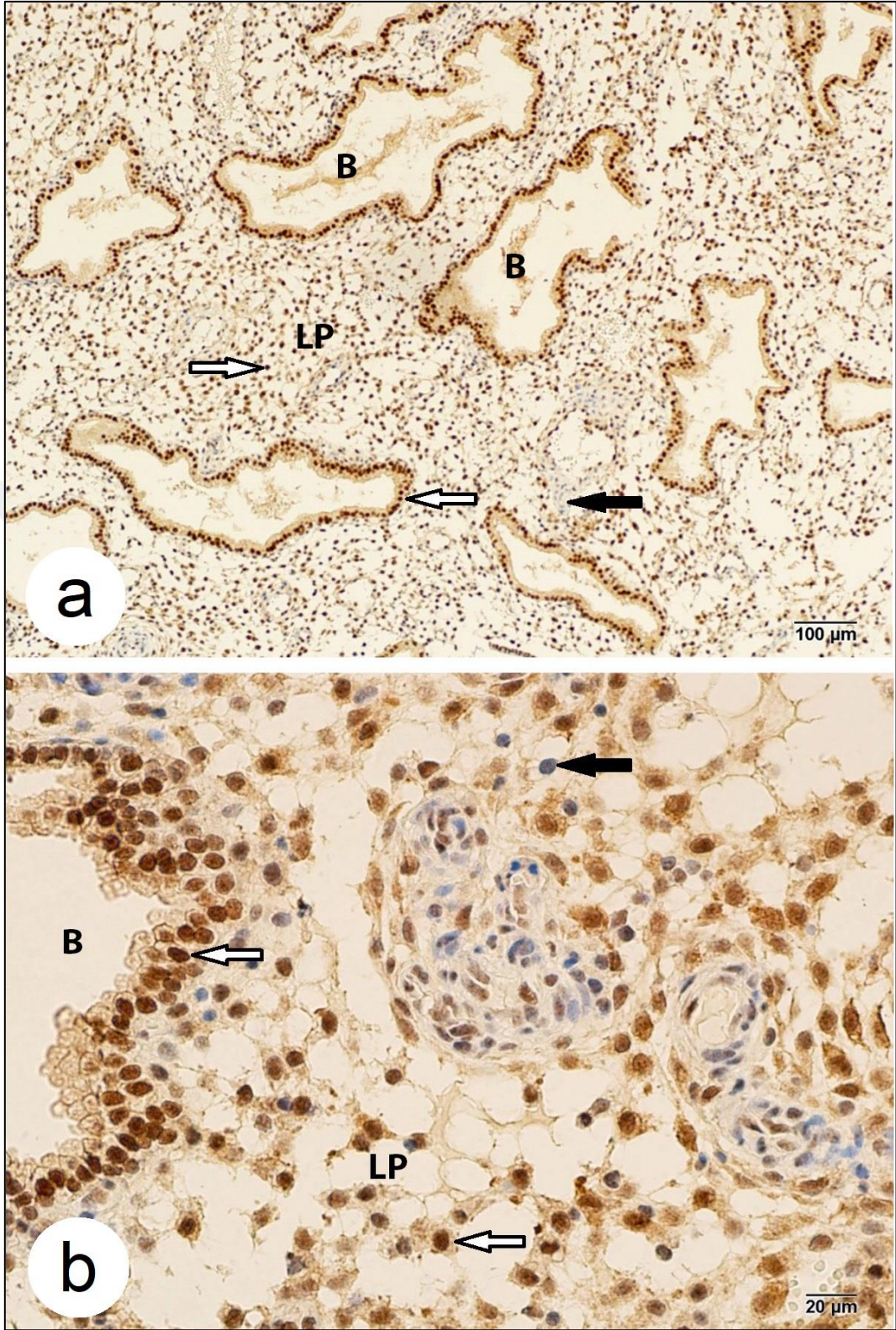
Anti-FOXO1A primer antikoru kullanılarak immunperoksidaz tekniği ile boyanan ışık mikroskopik kesitlerde, kontrol grubuna ait preparatlarda hem endometriyal bez epitel hücrelerinin nükleuslarında hem de stromal hücrelerin nükleuslarında, belirgin kahverengi görünümde, kuvvetli immun pozitif reaksiyon saptandı (Resim 12).

Nükleer immün pozitifliğin yanı sıra, daha hafif düzeyde sitoplazmik immün boyanma da mevcuttu. İmmün reaksiyon göstermeyen hücrelerin nükleusları Harris hematoxileni ile boyanmış halde mavi renkte görüldü (Resim 12).

Kontrol grubunda, immün pozitif hücre sayısı açısından ortalama skor değeri 3 olarak bulundu (%25'lik dilimde 2 ve %75'lik dilimde 4; Median değeri 3) (Tablo 7).

Tablo 7. FOXO1A semi-kantitatif analiz sonuçları (Median %25-%75'lik çeyreklik dilimler arası)

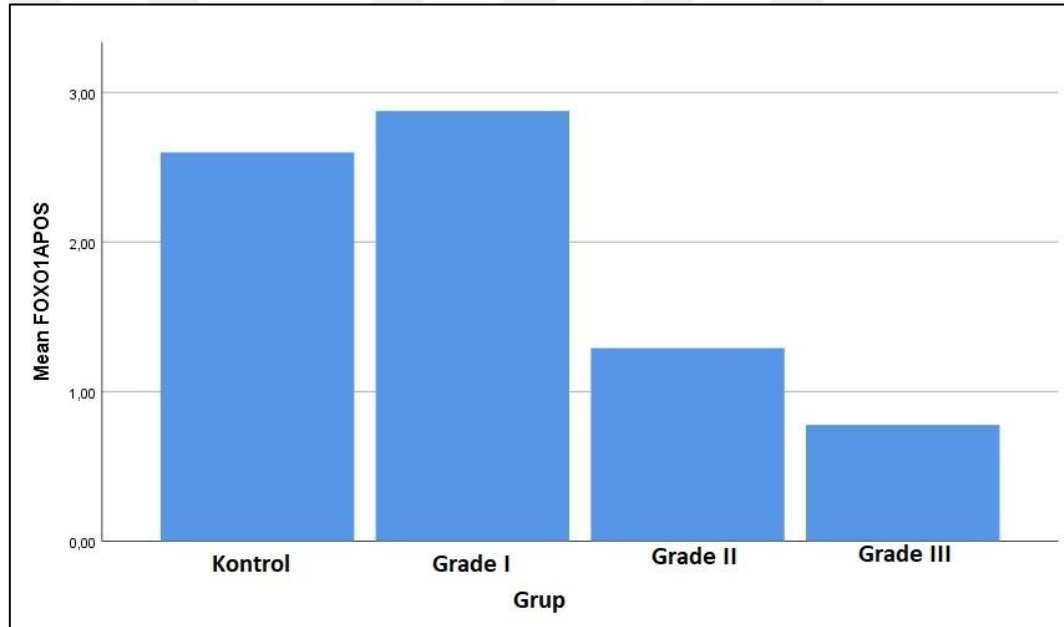
Grup	FOXO1A median değeri
Kontrol	3 (2-4)
Grade I	3 (2-3) ^{a,c}
Grade II	1 (0-2) ^{b,d}
Grade III	1 (0-1) ^b
^a $p=0,392$ Kontrol grubuna kıyasla, ^b $p=0,000$ Kontrol grubuna kıyasla, ^c $p=0,000$ Grade II ve Grade III grubuna kıyasla, ^d $p=0,003$ Grade III grubuna kıyasla, * $p \leq 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Kruskal Wallis/Tamhane T2 test	



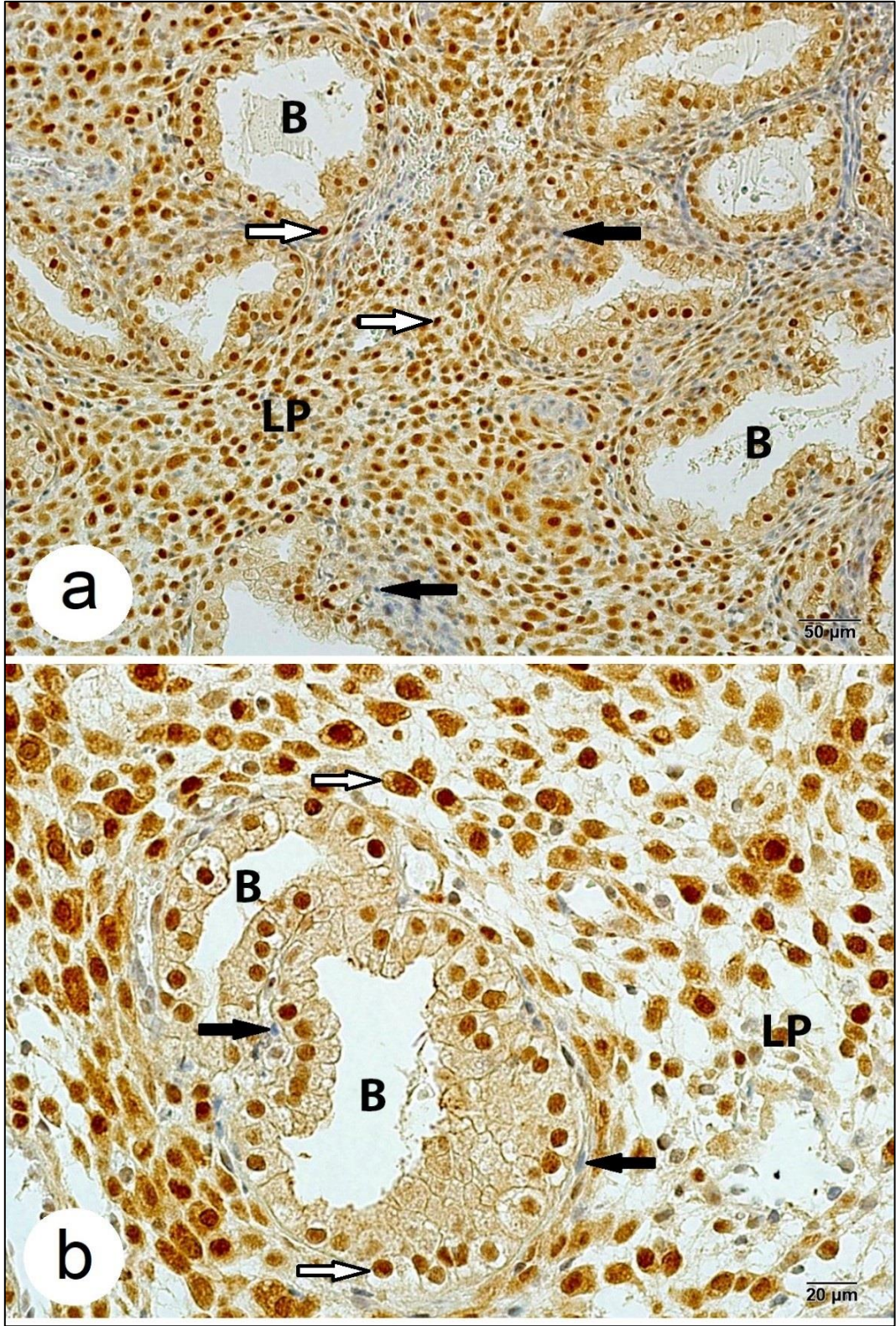
Resim 12. Kontrol grubu endometrium kesitinde FOXO1A immun reaksiyonu. **B:** Endometriyal bez, **LP:** Lamina propriya, **beyaz ok:** İmmun pozitif hücre nukleusu, **siyah ok:** İmmun negatif hücre nukleusu. **Boya:** İmmunperoksidaz tekniği. **Büyütme objektifi:** a'da x10, b'de x40.

Grade I EK grubuna ait endometrium parafin blok kesitlerinde immunohistokimyasal boyama sonrası yapılan değerlendirmede yine stromada ve bez epitelinde immun pozitif hücrelerin sayısı oldukça fazlaydı. Bu grupta immun pozitif reaksiyonun stromal hücrelerde hem nükleer hem de sitoplazmik seviyede ve kontrol grubuna kıyasla daha kuvvetli olduğu, bez epitelinde ise daha çok nükleer ağırlıklı olduğu gözlemlendi (Resim 13).

Skorlama sonrası yapılan istatistiksel analizde Grade I EK grubuna ait median skor değeri 3(2-3) olarak tespit edildi (Tablo 7). Mean skor değerine göre ise, kontrole kıyasla Grade I EK grubunda immun pozitif hücre sayısında hafif bir artış görülmekle birlikte (Şekil 12), aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p \leq 0,05$).



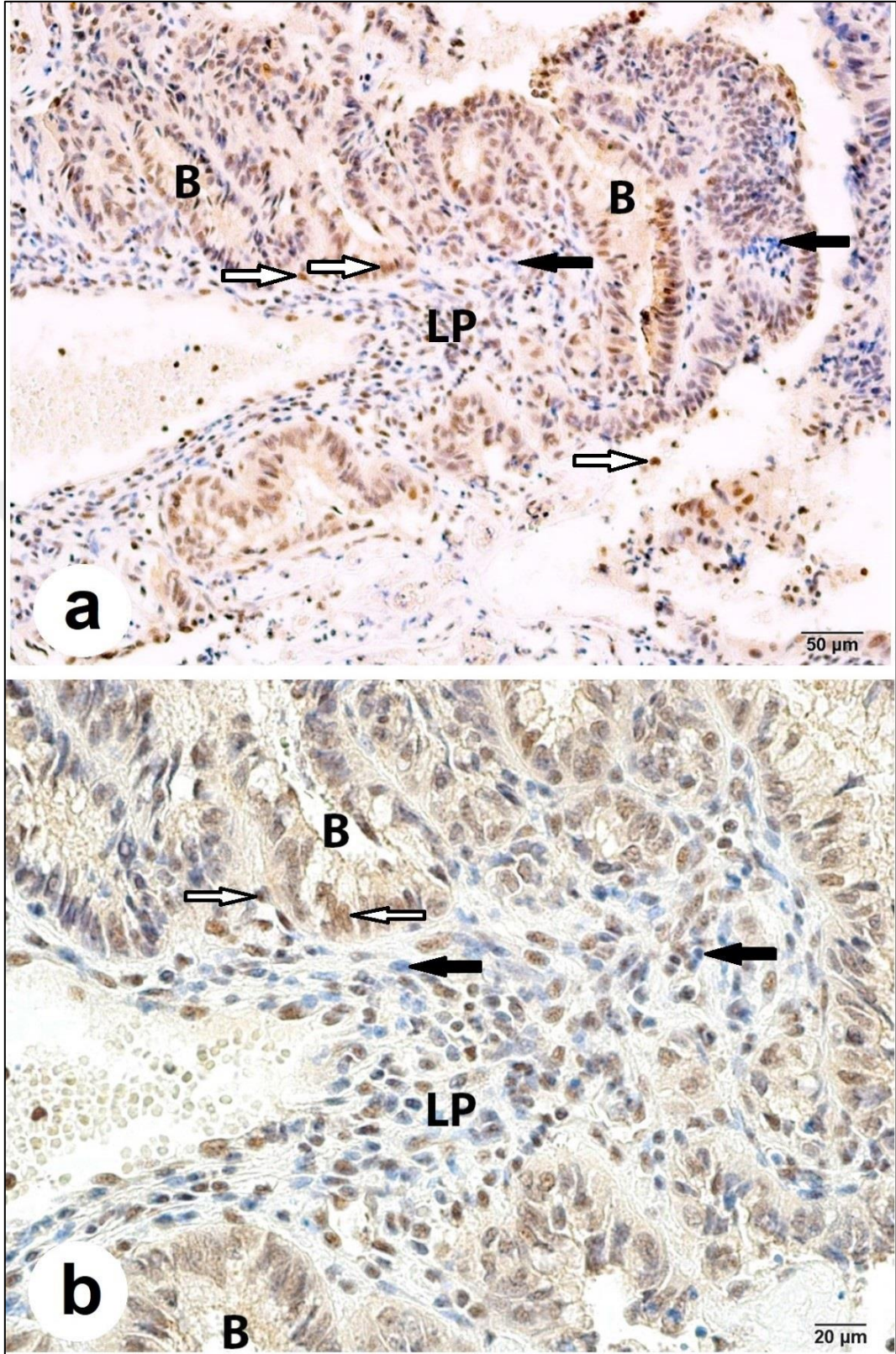
Şekil 11. Dört çalışma grubuna ait FOXO1A immun pozitif hücre sayılarının mean değerlerini gösteren grafik



Resim 13. Grade I EK grubuna ait endometrium kesitinde FOXO1A immün reaksiyonu. **B:** Endometriyal bez, **LP:** Lamina propriya, **beyaz ok:** İmmün pozitif hücre, **siyah ok:** İmmün negatif hücre. **Boya:** İmmünperoksidaz tekniği. **Büyütme objektifi:** a'da x20, b'de x40.

Grade II EK grubuna ait parafin kesitlerin immunohistokimyal boyama sonrası yapılan değerlendirmesinde stromada yaygın olarak immun negatif hücreler gözlenirken, bez epitelinde ağırlıklı olarak immun pozitif hücreler saptandı. Grade II EK grubundaki immun pozitif hücrelerde boyanmanın şiddeti Grade I EK grubundakilere kıyasla daha az olmakla birlikte hem nükleer hem de sitoplazmik düzeyde pozitif reaksiyon mevcuttu (Resim 14). Dolayısıyla, bu grupta FOXO1A proteinlerinin nükleusta aktif olan formlarının onkojenik aktiviteye bağlı olarak sitoplazmada tutulmaya başladığı söylenebilir.

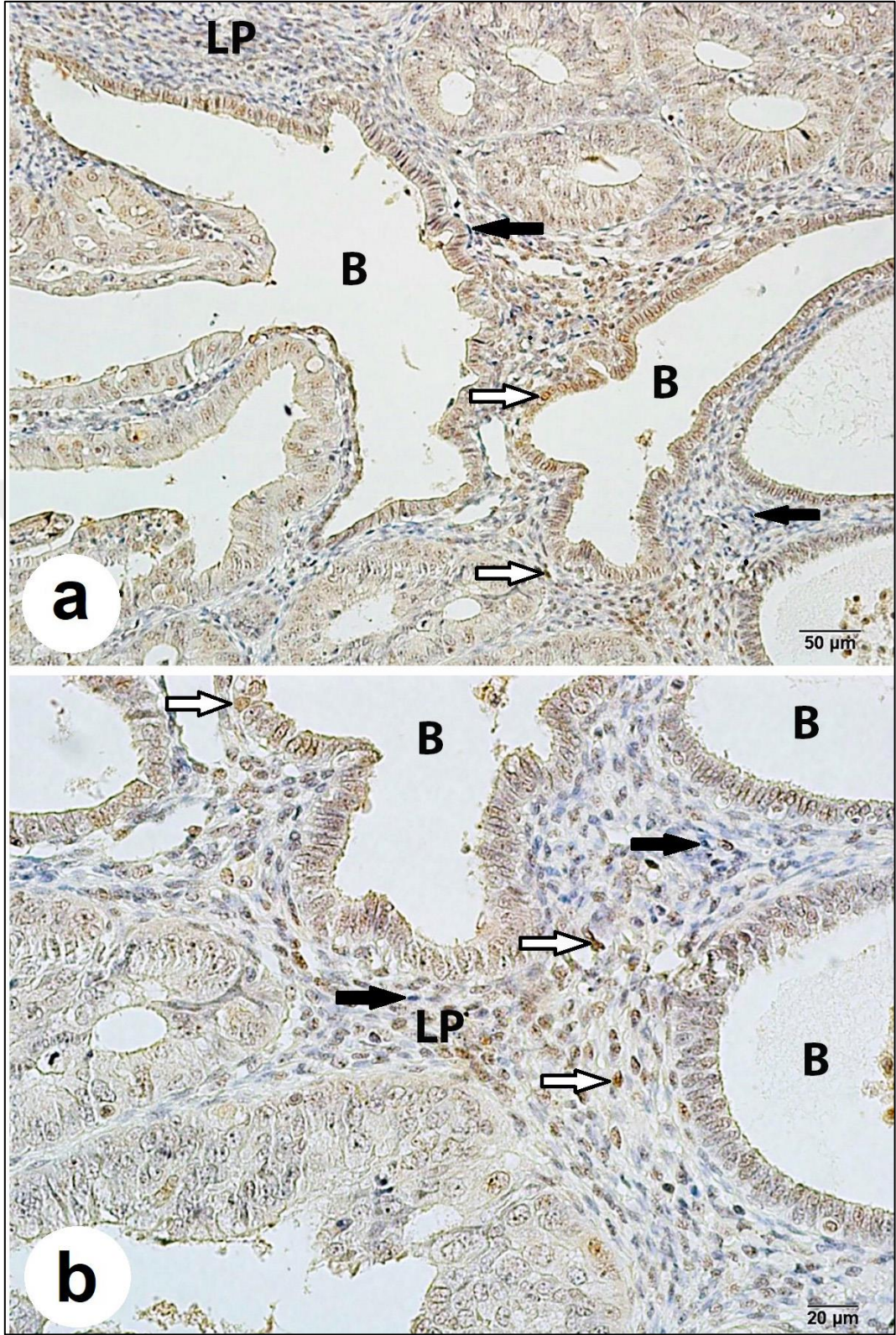
Skorlama sonrası yapılan istatistiksel analizde Grade II EK grubuna ait median değeri 1(0-2) olarak tespit edildi. Grade II EK grubundaki FOXO1A immun pozitif hücre sayısında hem kontrol hem de Grade I EK grubuna kıyasla gözle görülür bir düşüş vardı ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,000$), (Tablo 7), (Şekil 12).



Resim 14. Grade II EK grubuna ait endometrium kesitinde FOXO1A immün reaksiyonu. **B:** Endometriyal bez, **LP:** Lamina propriya, **beyaz ok:** İmmün pozitif hücre nükleusu, **siyah ok:** İmmün negatif hücre nükleusu. **Boya:** İmmünperoksidaz tekniği. **Büyütme objektifi:** a'da x20, b'de x40.

Grade III EK grubuna ait endometrium parafin blok kesitlerinde immunohistokimyasal boyama sonrası, ağırlıklı olarak immün negatif hücreler stromada göze çarpmaktaydı ve yer yer immün pozitif hücreler gözlemlendi. İmmün pozitif hücrelerdeki boyanmanın şiddeti diğer gruplara kıyasla oldukça azalmıştı ve ağırlıklı olarak nükleuslar boyanmıştı. Bez epitelinde ise hafif şiddette sitoplazmik boyanma mevcuttu (Resim 15).

Skorlama sonrası yapılan istatistiksel analize göre Grade III EK grubuna ait median değeri 1(0-1) olarak tespit edildi. Grade III EK grubunda FOXO1A immün pozitif hücre sayısı kontrole ve Grade I EK grubuna kıyasla belirgin bir şekilde düşerken ($p=0,000$), Grade II EK grubuna kıyasla daha az bir düşüş ($p=0,003$) görüldü. Diğer gruplarla kıyaslandığında Grade III EK grubundaki bu azalma istatistiksel olarak da anlamlı bulundu (Tablo 7), (Şekil 12).



Resim 15. Grade III EK grubuna ait endometrium kesitinde FOXO1A immün reaksiyonu. **B:** Endometriyal bez, **LP:** Lamina propriya, **beyaz ok:** İmmün pozitif hücre nükleusu, **siyah ok:** İmmün negatif hücre nükleusu. **Boya:** İmmünperoksidaz tekniği. **Büyütme objektifi:** a'da x20, b'de x40.

Tüm çalışma gruplarının FOXO1A immün pozitiflik düzeylerine ait median skor değerleri karşılaştırıldığında, kontrol grubu ile Grade I EK grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmazken ($p>0,05$), Grade II EK ve Grade III EK grubunda immün pozitif hücre sayısının hem kontrole hem de Grade I EK grubuna kıyasla azalmasının anlamlı olduğu tespit edildi ($p\leq 0,05$; Kruskal Wallis Test/Tamhane T2 test), (Tablo 7, 8).

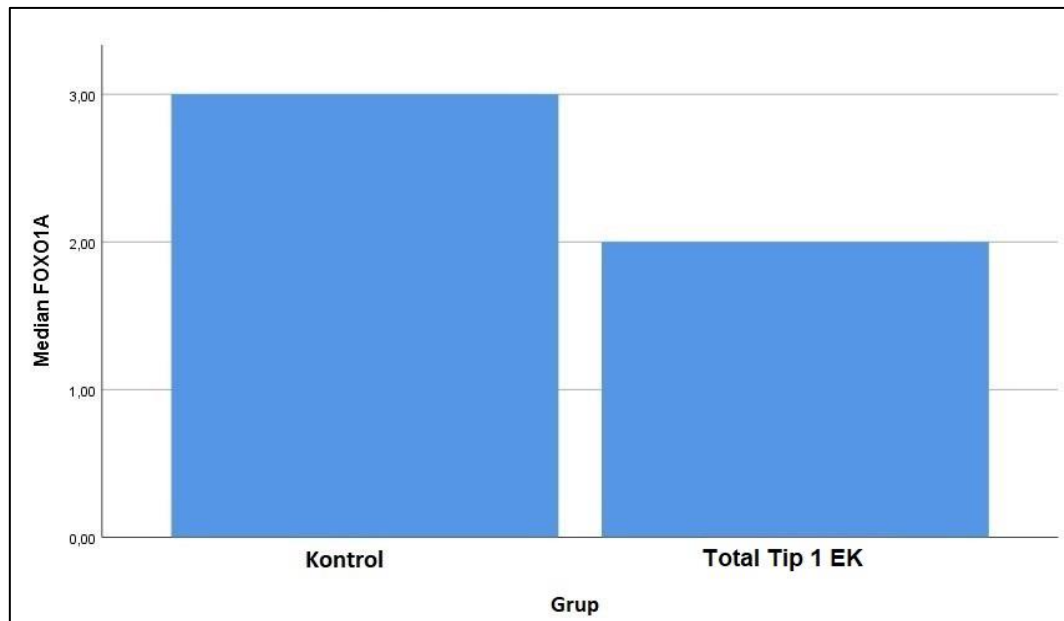
Tablo 8. Dört deney grubuna ait FOXO1A immün pozitif hücre sayılarının istatistiksel çoklu karşılaştırma sonuçları

Test Statistics ^{a,b}	
	FOXO1A
Kruskal-Wallis H	154,936
df	3
Asymp. Sig.	,000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Group

Skorlama sonrası yapılan istatistiksel analize göre toplam hasta grubunda FOXO1A immün pozitif hücre sayısının kontrole kıyasla belirgin bir şekilde düştüğü ve aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p\leq 0,05$), (Şekil 13).



Şekil 12. FOXO1A immün pozitif hücre sayısı açısından kontrol grubu ile EK gruplarının median değerlerini gösteren grafik

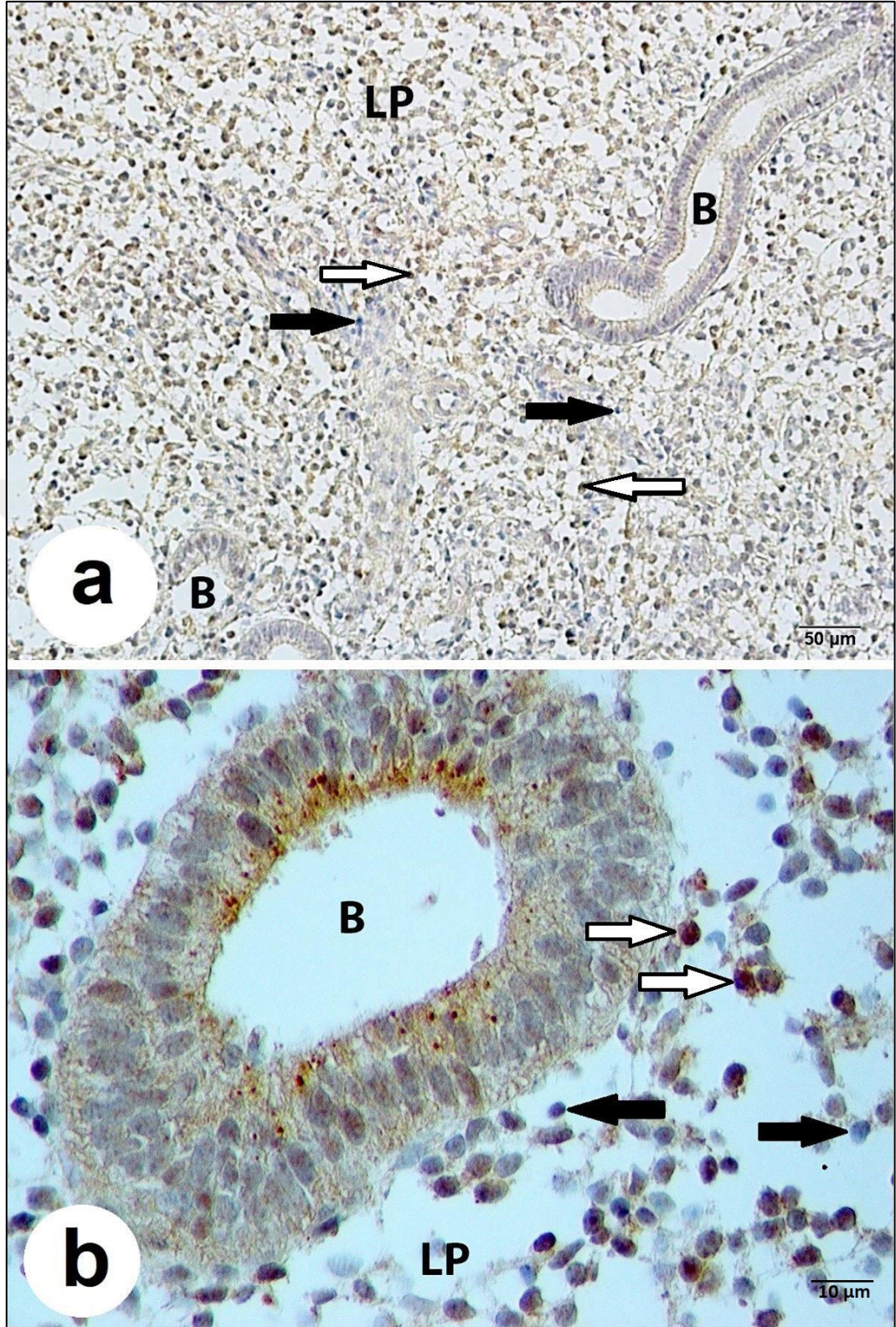
4.2.2. SREBP1 Spesifik İmmunohistokimyasal Boyama İle Elde Edilen Veriler

Kontrol, Grade I, Grade II ve Grade III EK hastalarına ait parafin blok kesitleri anti-SREBP1 primer antikoru kullanılarak immunperoksidaz yöntemi ile boyandı ve SREBP1 pozitiflik düzeyi ışık mikroskopunda semikantitatif ve subjektif olarak değerlendirildi.

Kontrol grubuna ait parafin blok kesitlerinde immunohistokimyasal boyama sonrası yapılan değerlendirmede, immun negatif hücrelerin sayıca daha ağırlıklı olarak bulunduğu, immun pozitif hücrelerin daha az sayıda olduğu saptandı. Stromal hücrelerde görülen immun pozitifliğin daha çok nükleer lokalizasyonlu olduğu, bez epitelinde ise hafif sitoplazmik boyanmanın olduğu gözlemlendi (Resim 16). Kontrol grubuna ait median değeri 1(0-2)'di (Tablo 9).

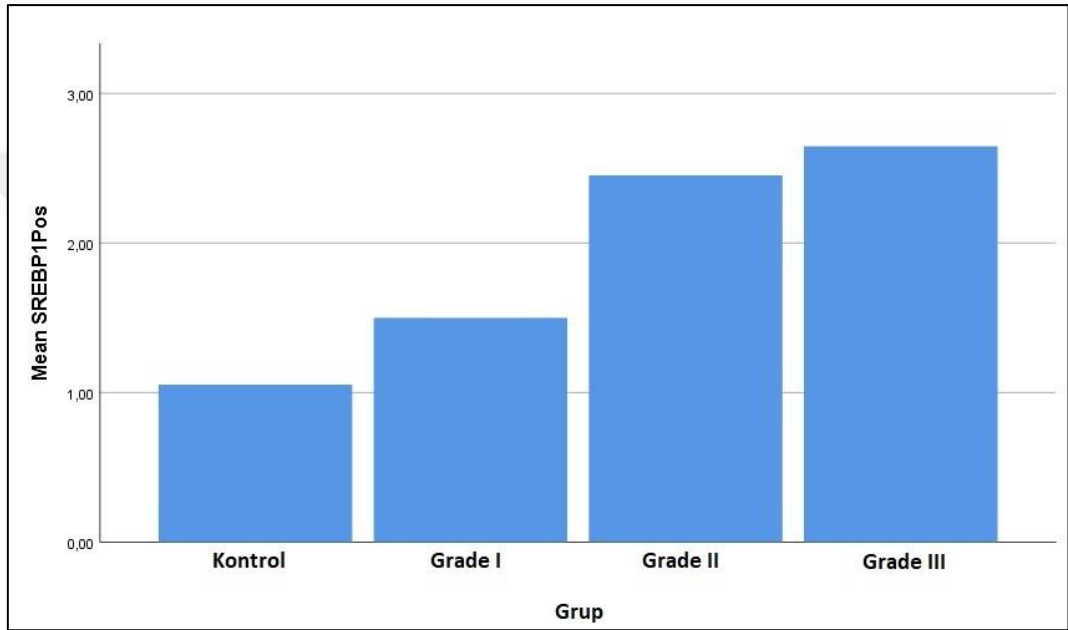
Tablo 9. SREBP1 semi-kantitatif analiz sonuçları (Median %25-%75'lik çeyreklik dilimler arası)

Grup	SREBP1 median değeri
Kontrol	1 (0-2)
Grade I EK	1 (0,50-2) ^{a,c}
Grade II EK	3 (2-3) ^{b,d}
Grade III EK	3 (2-4) ^b
^a p=0,057 K grubuna kıyasla, ^b p=0,000 K grubuna kıyasla, ^c p=0,000 Grade II, Grade III grubuna kıyasla, ^d p=0,812 Grade III grubuna kıyasla, *p ≤0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Kruskal Wallis/Tamhane T2 test	

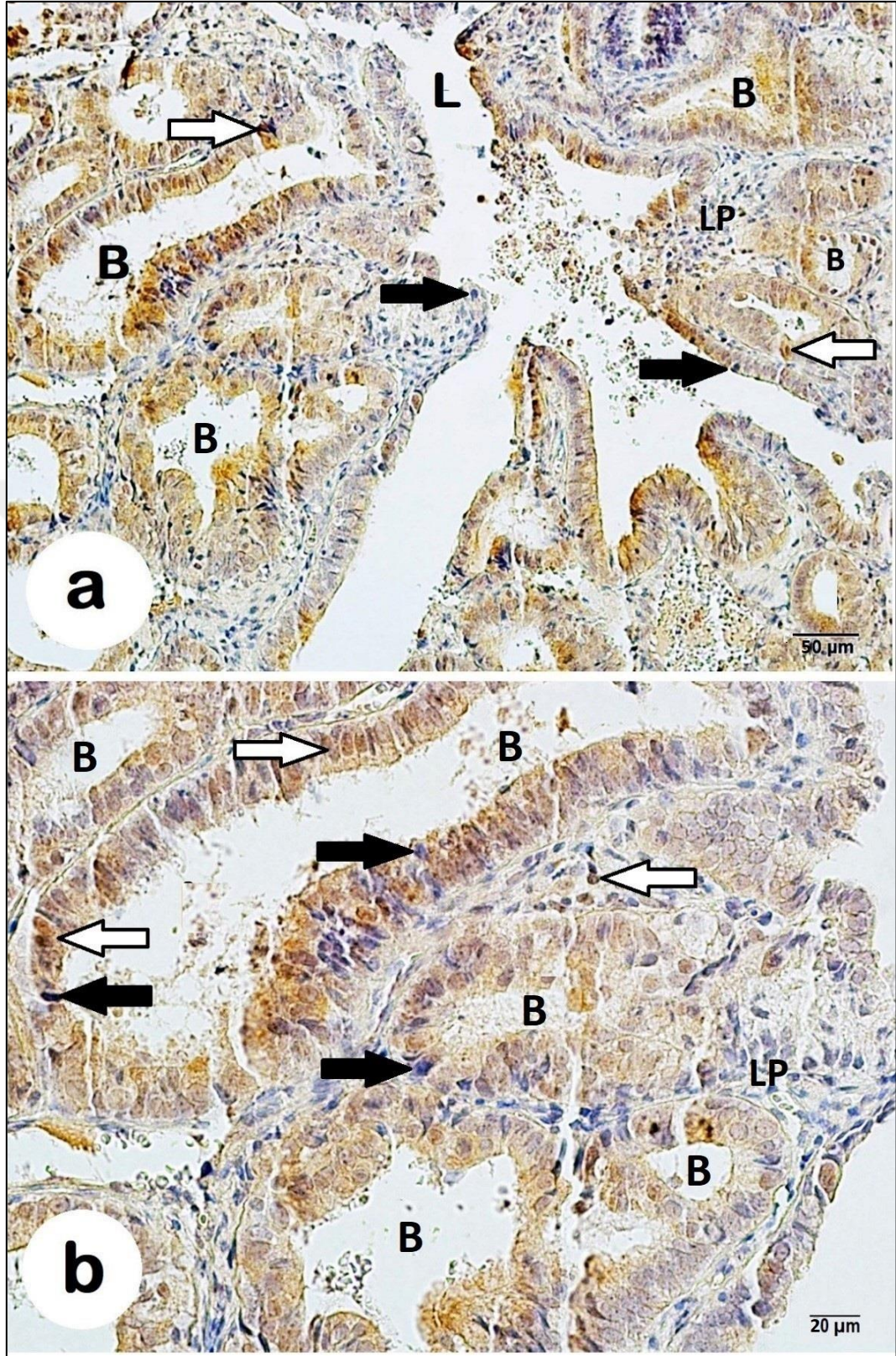


Resim 16. Kontrol grubu endometrium kesitinde SREBP1 immün reaksiyonu. **B:** Endometriyal bez, **LP:** Lamina propriya, **beyaz ok:** İmmün pozitif hücre nükleusu, **siyah ok:** İmmün negatif hücre nükleusu. **Boya:** İmmünperoksidaz tekniği. **Büyütme objektifi:** **a**'da x20, **b**'de x100

Grade I EK grubuna ait parafin blok örneklerinde immünperoksidaz boyama sonrası, stromada yaygın olarak immün negatif hücreler, bez epitelinde ise sitoplazmik boyanmış immün pozitif hücreler izlendi (Resim 17). Skorlama sonrası yapılan istatistiksel analize göre Grade I grubuna ait median skor değeri 1(0,5-2) olarak tespit edildi (Tablo 9). Mean skor değerine göre Grade I grubunda kontrol grubuna kıyasla hafif bir artış görülmekle birlikte (Şekil 14), bu fark median bazlı istatistiksel analize göre anlamlı değildi ($p=0,057$).



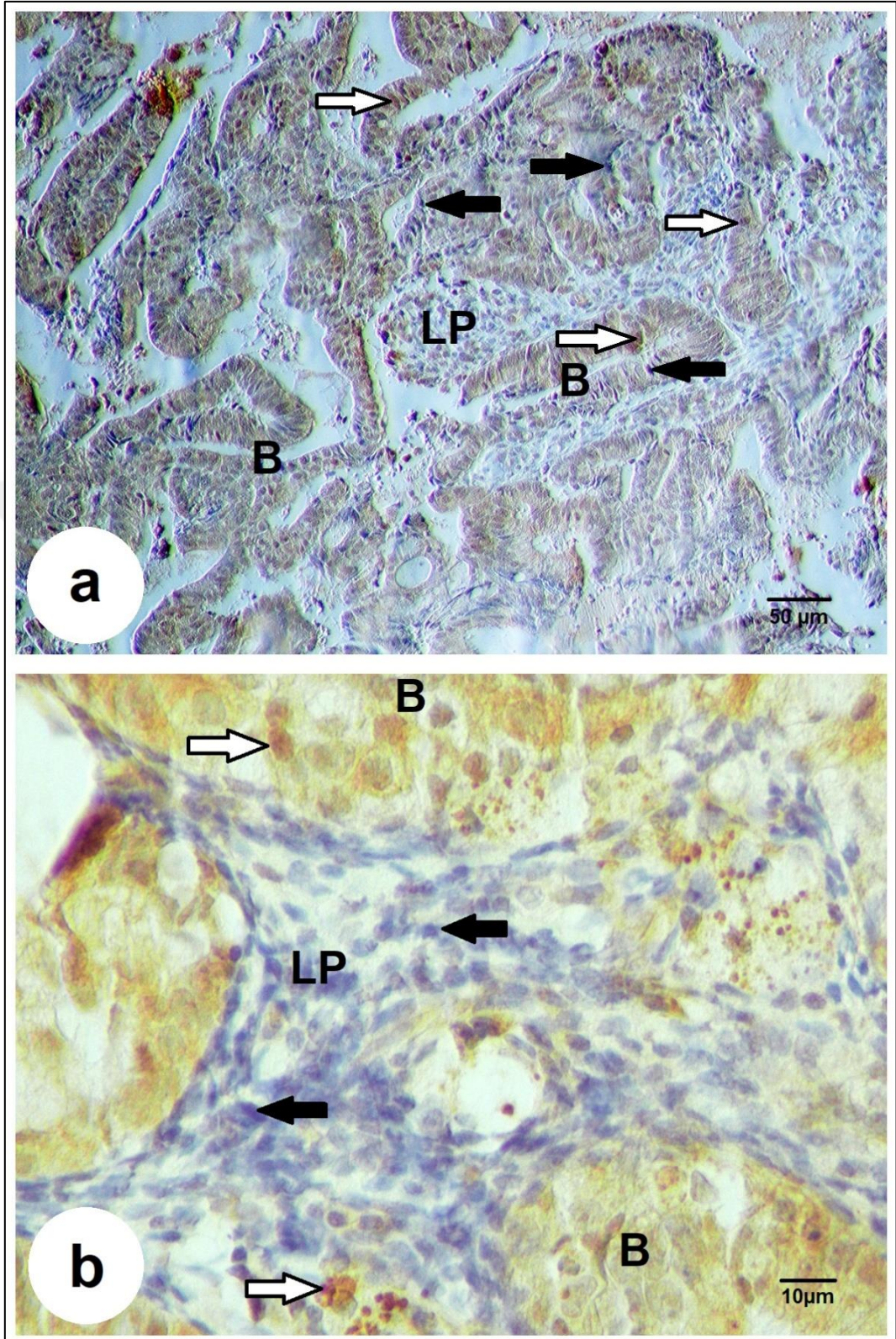
Şekil 13. Tüm çalışma gruplarında SREBP1 mean değerlerini gösteren grafik



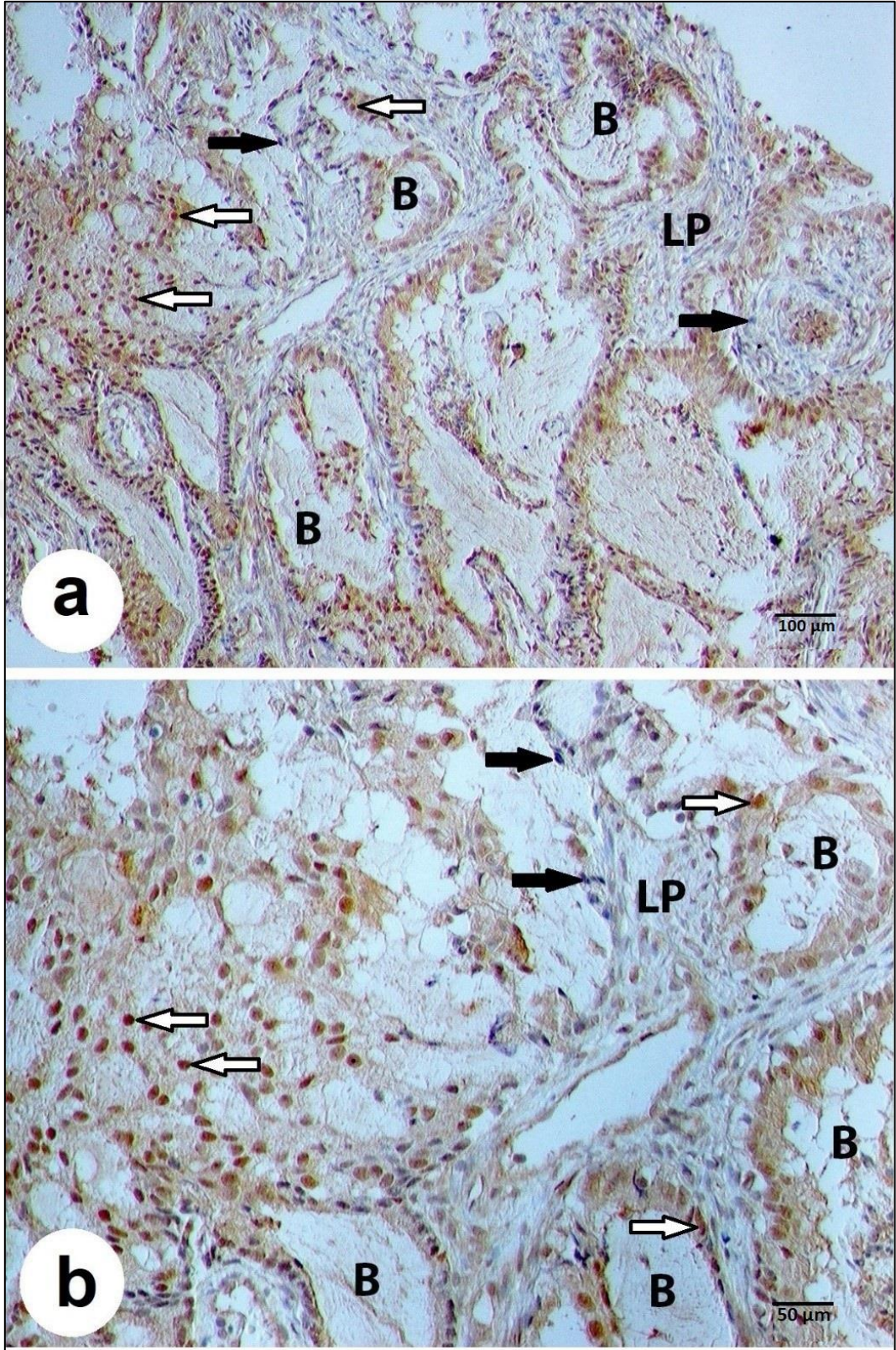
Resim 17. Grade I EK grubuna ait endometrium kesitinde SREBP1 immün reaksiyonu. **B:** Endometriyal bez, **L:** Bez lümeni, **LP:** Lamina propriya, **beyaz ok:** İmmün pozitif hücre nükleusu, **siyah ok:** İmmün negatif hücre nükleusu. **Boya:** İmmünperoksidaz tekniği. **Büyütme objektifi:** a'da x20, b'de x40

Grade II EK grubuna ait parafin blok örneklerinde immünperoksidaz boyama sonrası stromal alanlarda yaygın immün negatif hücreler gözlenirken, bez epitelinde sitoplazmik boyanmış immün pozitif hücreler yoğun bir şekilde izlenmektedir (Resim 18). Skorlama sonrası yapılan istatistiksel analize göre Grade II EK grubuna ait median skor değeri 3 (2-3) olarak tespit edildi (Tablo 9). Grade II EK grubundaki immün pozitif hücre sayısı, Kontrol ve Grade I EK gruplarına kıyasla daha yüksekti ve bu istatistiksel olarak anlamlı bulundu. ($p=0,000$).

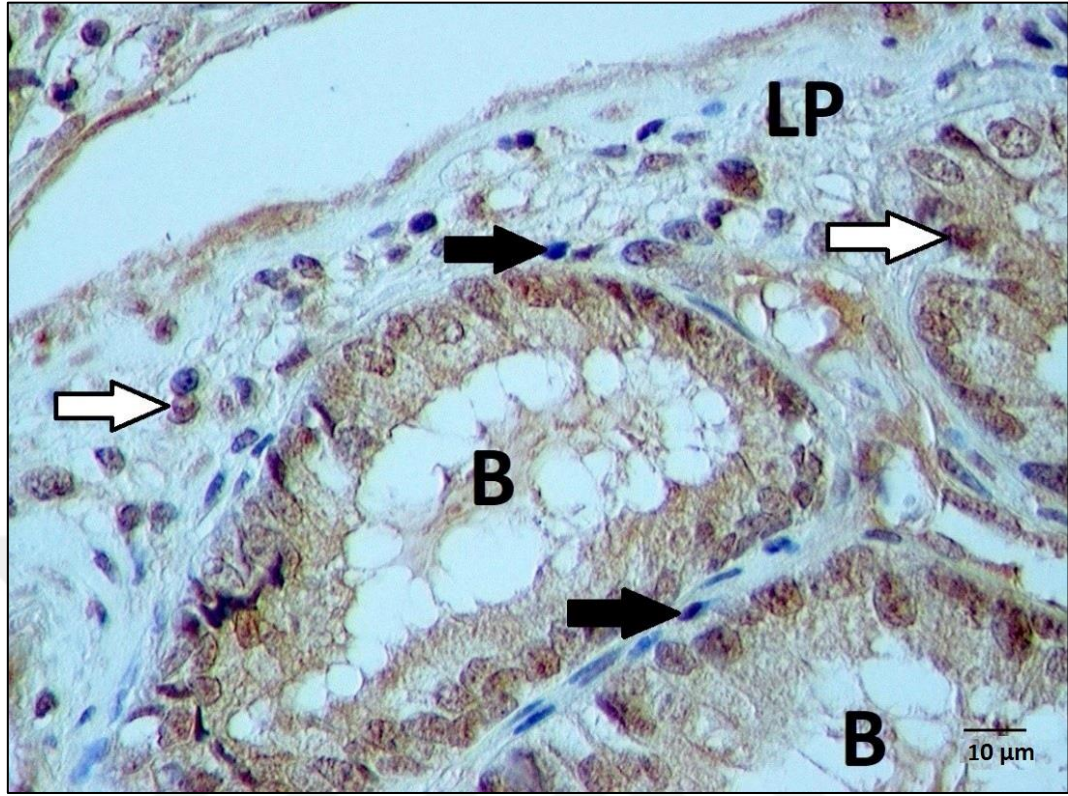
Grade III EK grubuna ait parafin blok örneklerinde immunohistokimyasal boyama sonrası yapılan değerlendirmede, ağırlıklı olarak endometriyal bez epiteli hücrelerinin immün pozitif reaksiyon verdiği ve bu boyanmanın hem nükleer hem de sitoplazmik düzeyde olduğu; bunun yanı sıra stromada da nadir sayıda, nükleusları boyanmış immün pozitif hücrelerin bulunduğu gözlendi (Resim 19, 20). Stromada immün negatif hücreler yaygındı. Yapılan istatistiksel analizde Grade III EK grubunun median skor değeri 3 (2-4) olarak tespit edildi (Tablo 9). Kontrol ve Grade I EK gruplarıyla kıyaslandığında, Grade III EK grubunda immün pozitif hücre sayısında belirgin bir yükseliş söz konusuydu (Şekil 14) ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,000$). Ancak, SREBP1 immün pozitif hücre sayısı bakımından Grade III ve Grade II grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p=0,812$).



Resim 18. Grade II EK grubuna ait endometrium kesitinde SREBP1 immün reaksiyonu. **B:** Endometriyal bez, **S:** Lamina propriya, **beyaz ok:** İmmün pozitif hücre nükleusu, **siyah ok:** İmmün negatif hücre nükleusu. **Boya:** İmmünperoksidaz tekniği. **Büyütme objektifi:** a'da x20, b'de x100



Resim 19. Grade III EK grubuna ait endometrium kesitinde SREBP1 immün reaksiyonu. **B:** Endometriyal bez, **LP:** Lamina propriya, **beyaz ok:** İmmün pozitif hücre nükleusu, **siyah ok:** İmmün negatif hücre nükleusu. **Boya:** İmmünperoksidaz tekniği. **Büyütme objektifi:** a'da x10, b'de x20



Resim 20. Grade III EK grubuna ait endometrium kesitinde SREBP1 immün reaksiyonu. **B:** Endometriyal bez, **LP:** Lamina propriya, **beyaz ok:** İmmün pozitif hücre nükleusu, **siyah ok:** İmmün negatif hücre nükleusu. **Boya:** İmmünoperoksidaz tekniği. **Büyütme objektifi:** x100

Dört çalışma grubunda SREBP1-spesifik immün pozitif boyanan hücre sayılarının median değerleri karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı fark olduğu görüldü ($p \leq 0,05$; Kruskal Wallis Test) (Tablo 10). Kontrol grubuna kıyasla, Grade I EK grubunda SREBP1 immün pozitif hücre sayısı hafif yüksek bulunsa da aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p = 0,057$; Kruskal Wallis/Tamhane T2 test). Grade II EK grubunda hem kontrole hem de Grade I EK grubuna kıyasla, SREBP1 immün pozitif hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptandı ($p \leq 0,05$; Kruskal Wallis/Tamhane T2 test). Grade III EK grubunda da immün pozitif reaksiyon gösteren hücrelerin sayısı kontrol ve Grade I grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek bulundu ($p \leq 0,05$; Kruskal Wallis/Tamhane T2 test). Ancak, Grade III EK grubu Grade II EK grubu ile kıyaslandığında immün pozitif hücre sayısında artış gözlenirse de (Şekil 14), bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p = 0,812$; Kruskal Wallis/Tamhane T2 test) (Tablo 9).

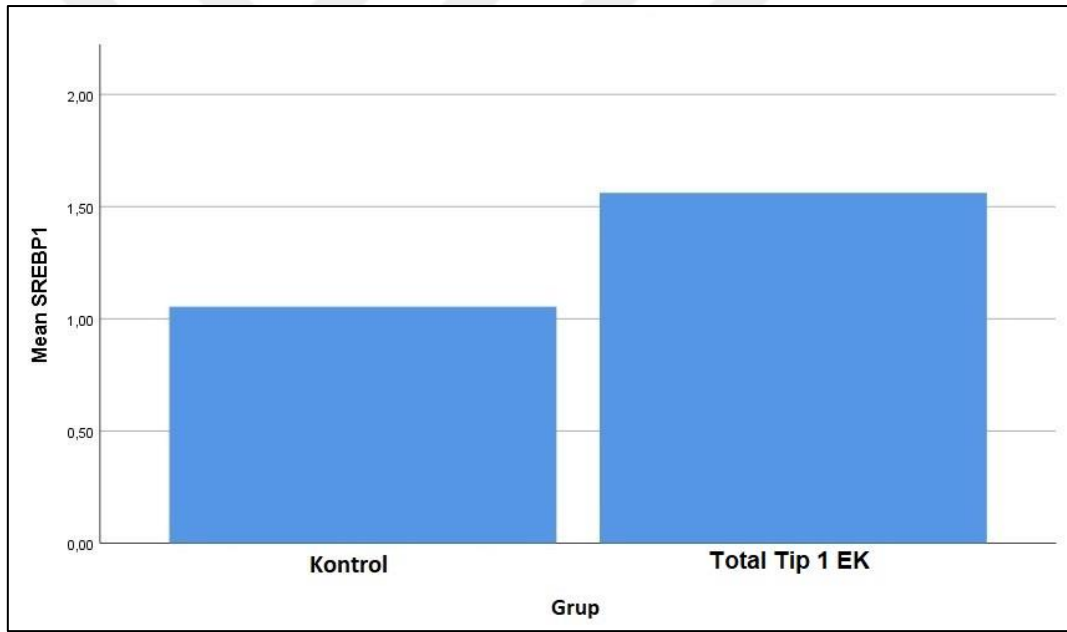
Tablo 10. Dört deney grubuna ait SREBP1 immün pozitif hücre değerlerinin istatistiksel çoklu karşılaştırma sonuçları

Test Statistics ^{a,b}	
	SREBP1
Kruskal-Wallis H	97,987
df	3
Asymp. Sig.	,000

a. Kruskal Wallis Test

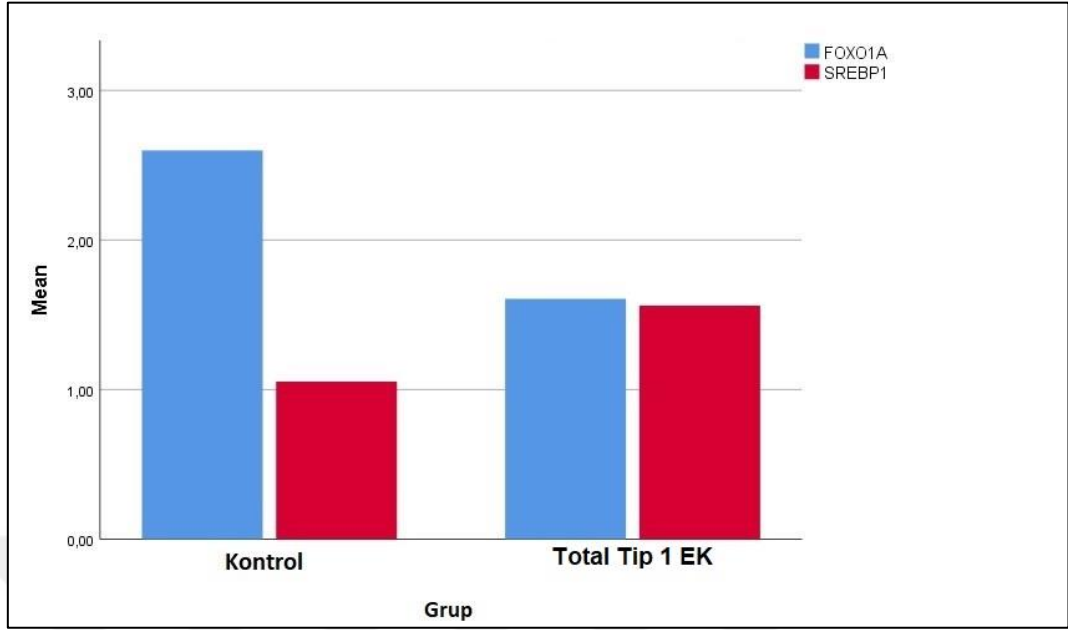
b. Grouping Variable: Group

SREBP1 immün pozitif hücre sayısı, kontrol grubuna kıyasla toplam hasta grubunda artmakla birlikte bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$; Kruskal Wallis/Tamhane T2 test) (Şekil 15).



Şekil 14. Kontrol ve Tip 1 EK grubuna ait SREBP1 mean değerlerini gösteren grafik

Toplam hasta grubunun FOXO1A ve SREBP1 immün pozitif hücre sayıları bir arada değerlendirildiğinde; kontrol grubuna kıyasla FOXO1A immün pozitif hücre sayısının azaldığı, bunun aksine SREBP1 immün pozitif hücre sayısının arttığı saptandı (Şekil 16). FOXO1A proteini açısından iki grup arasında bulunan bu fark istatistiksel olarak anlamlı iken ($p\leq 0,05$), SREBP1 bakımından gözlenen fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$).



Şekil 15. Kontrol ve Total Tip 1 EK grubuna ait FOXO1A ve SREBP1 mean değerlerini gösteren grafik

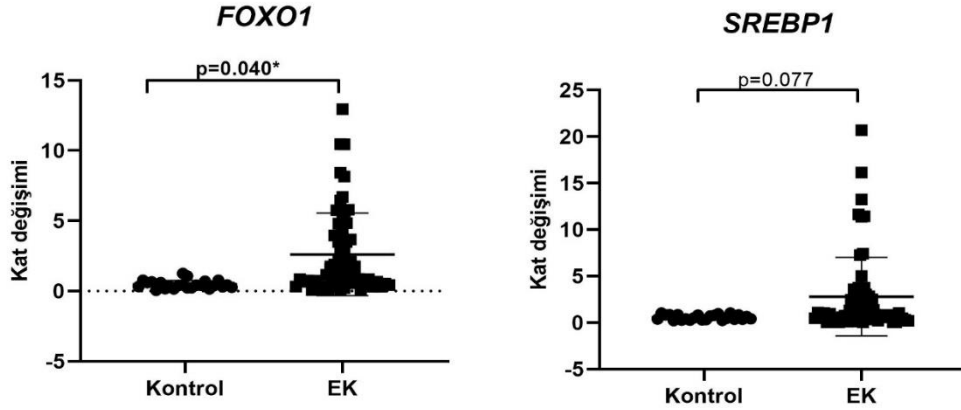
4.3. MOLEKÜLER BİYOLOJİK BULGULAR

FOXO1 ve SREBP1 Genlerinin Ekspresyon Düzeylerinin Değerlendirilmesi

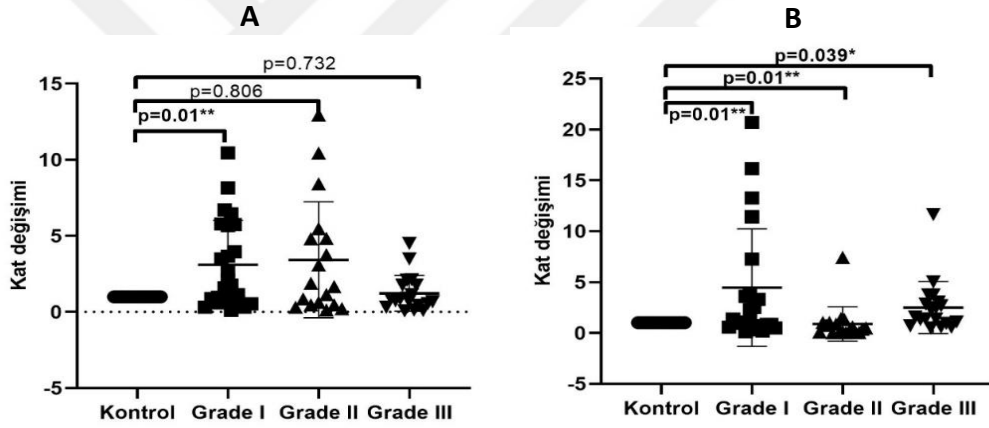
EK hastalarına ait parafin blok örneklerinden izole edilen RNA'dan *FOXO1* ve *SREBP1* genlerinin ekspresyon seviyeleri, *ACTB* kontrol geni ile normalize edilerek RT-PCR analizi ile belirlendi ve elde edilen bulgular Şekil 17'de sunuldu.

RT-PCR analizi sonuçlarına göre; EK gruplarının toplamında *FOXO1* ve *SREBP1* genlerinin ekspresyon düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sırasıyla 1,22- ($p=0,040$) ve 0,86-kat ($p= 0,077$) olarak belirlendi (Tablo 11). Ayrıca, *FOXO1* geninin mRNA seviyesi kontrole kıyasla Grade I grubunda 2,59-kat ($p=0,01$) iken, Grade II ve Grade III gruplarında ise sırasıyla 0,9 ($p=0,806$) ve 0,66-kat ($p= 0,732$) olduğu belirlendi. *SREBP1* gen ekspresyonunun ise kontrol grubuna kıyasla Grade I ve Grade III EK gruplarında sırasıyla 1,96 ($p=0,01$) ve 1,59-kat ($p=0,039$) daha fazla eksprese olduğu belirlenmesine rağmen, Grade II hasta grubunda 0,16-kat olarak ($p=0,01$) down-regüle olduğu analiz edildi (Şekil 18). *FOXO1* ve *SREBP1* genlerinin kontrol grubuna göre ekspresyon düzeylerindeki değişimler EK Grade'leri ile karşılaştırılarak

Tablo 11’de özetlendi.



Şekil 16. EK gruplarının (GI, GII ve GIII EK) toplamında kontrol grubuna kıyasla FOXO1 ve SREBP1 genlerinin ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin belirlenmesi ($p<0,05^*$; $p<0,01^{**}$)



Şekil 17. GI, GII ve GIII EK gruplarında (A) FOXO1 ve (B) SREBP1 genlerinin kontrol grubuna kıyasla ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin belirlenmesi ($p<0,05^*$; $p<0,01^{**}$)

Tablo 11. GI, GII ve GIII EK gruplarında kontrol grubuna kıyasla değişen FOXO1 ve SREBP1 genlerindeki kat değişimlerinin karşılaştırılması

	Kontrol Grubu	Grade I				Grade II				Grade III	
	$2^{-\Delta\Delta CT}$	$2^{-\Delta\Delta CT}$	Kat Değişimi	p	$2^{-\Delta\Delta CT}$	Kat Değişimi	p	$2^{-\Delta\Delta CT}$	Kat Değişimi	p	
FOXO1	0,247	0,642	2,59	0,0	0,225	0,91	0,806	0,162	0,66	0,73	
SREBP1	0,125	0,244	1,96	0,0023	0,019	0,16	0,0	0,198	1,56	0,03	

Sonuç olarak, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında EK gruplarının (GI, GII ve GIII EK) toplamında *FOXO1* ekspresyon düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmesine rağmen, *SREBP1* gen ekspresyon düzeyinin azaldığı saptandı. Ancak, kontrole kıyasla, Grade I EK grubunda *FOXO1* geninin ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış söz konusu iken ($p<0,01$), Grade II ve III EK gruplarında *FOXO1* mRNA seviyelerinin azaldığı tespit edildi. Ayrıca, *SREBP1* gen ekspresyonunun Grade I ve Grade III EK gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı saptanmasına karşın, Grade II EK grubunda down-regüle olduğu belirlendi ($p<0,01$).



5. TARTIŞMA ve SONUÇ

5.1. TARTIŞMA

EK, kadın üreme sisteminin en yaygın ikinci malignitesidir (<https://www.cancer.org/cancer/endometrial-cancer/about/key-statistics.html>) (erişim tarihi 10.02.2022). Ancak endometriyal homeostaziyi sağlayan moleküler mekanizmalar henüz tam olarak anlaşılamamıştır. EK'ların çoğunluğu (%75-80) östrojen bağımlı, hormon reseptör pozitif adenokarsinomlar olup, Tip 1 endometrioid EK olarak da isimlendirilmektedir (Fanning et al 1989, Morice et al 2016).

FOXO1 (FOXO1A) FOXO alt ailesinin bir üyesidir ve apoptoz, hücre döngüsü ilerlemesi, oksidatif ve genotoksik strese karşı savunma gibi farklı hücresel yanıtların düzenlenmesinde rol alan transkripsiyon faktörüdür (Dijkers ve diğerleri, 2000; Kops ve diğerleri, 2002; Sunter ve diğerleri, 2003, Nemato et al 2004). Kanseri hücrelerinde *PTEN* geninin fonksiyon kaybı veya mutasyonu Akt'nin aktivasyonuna ve buna bağlı olarak FOXO1A'nın nükleer translokasyonunun inhibisyonuna neden olmaktadır. Böylece, FOXO1A proteininin nükleusa geçişinin engellenmesiyle hücre döngüsü durdurulamamakta ve buna bağlı olarak da FOXO1A'nın inhibisyonu karsinogenez gelişiminde rol almaktadır (Burgering, Kops 2002; Accili, Arden 2004).

SREBP1, kolesterol ve yağ asidi sentezi için gerekli enzimlerin ekspresyonunu kontrol ederek lipid homeostazını düzenleyen başlıca transkripsiyon faktörlerinden biridir. Kanseri hücrelerinin proliferasyonundaki artış hücre membranı için lipid sentezinin hızlanmasını gerektirmektedir. Enerji bakımından zengin olan lipidler besin yokluğunda kanseri hücrelerine enerji de sağlamaktadır (Santos and Schulzade 2012). Kanseri hücrelerindeki sterol seviyelerindeki azalma, SREBP1'in ER içinde öncülerinin sentezlenmesine neden olarak SREBP-SCAP ile protein kompleksleri oluşmasını sağlamaktadır. Bu kompleksler Golgi aparatında işlenerek öncül SREBP1 nükleusa salınmakta, kolesterol ve yağ asidi anabolizması ile ilgili enzimlerin transkripsiyonu aktive edilmektedir (Shimano 2001, Walker et al 2011).

FOXO1'in aşırı ekspresyonunun, SREBP1'in down-regülasyonuna yol açarak EK hücrelerinin proliferasyonunu, migrasyonunu ve invazyonunu baskıladığı yapılan bazı çalışmalarda gösterilmiştir (Zhang et al 2017, Li et al 2012). Ayrıca FOXO1'in, SREBP1c transkripsiyon faktörleri aracılığıyla SREBP1 gen ekspresyonunu inhibe ettiği belirlenmiştir (Deng et al 2012). Bunun yanı sıra SREBP1'in prostat kanseri, meme kanseri ve EK'da apoptotik ölüme neden olduğu da literatürde belirlenmiştir (Brovkovich et al 2018, Gao et al 2018, Shi et al 2019). Bu kapsamda FOXO1A aktivitesinin SREBP1'in baskılanmasıyla arttığı hipotezinden yola çıkılarak mevcut tez çalışmasında farklı histopatolojik gradeye sahip EK hastalarında kontrol grubuna göre *SREBP1* ve *FOXO1*'in mRNA ve protein düzeyinde değişimlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Elde edilen bulgulara göre, tümör dokularında *FOXO1A* ve *SREBP1* mRNA ve protein seviyelerinin kontrol grubuna göre farklı olduğu tespit edilmiştir.

IHC analizleri sonucunda kontrol grubuna kıyasla hasta grubunda FOXO1A protein miktarının azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca, FOXO1A proteininin histopatolojik gradeler arasındaki değişimleri değerlendirildiğinde kontrol grubuna göre Grade I EK grubunda artış görüntülenmesine rağmen, Grade II ve Grade III EK grubunda azaldığı tespit edilmiştir. EK'lı dokuların epitel hücresi ve stromasında FOXO1A immün pozitif hücre sayısı ve boyamanın yoğunluğu kontrol dokularına kıyasla azalmış ve stromada büyük oranda negatifleşmiştir. Ayrıca kontrol grubunda kuvvetli nükleer pozitiflik söz konusuysen Grade I EK grubunda nükleer ve sitoplazmik tutulum bir arada Grade II ve Grade III EK grubunda ise daha çok sitoplazmik ve zayıf tutulum gözlenmiştir.

Literatürde yapılan çalışmalarda da azalan FOXO1A ekspresyonunun EK gelişimine neden olduğu belirlenmiştir. Mozos ve arkadaşları (2014), miR-27 ve hedef geni olarak FOXO1'in ekspresyon düzeyinde ve dokuda protein düzeyinde etkisini araştırdıkları çalışmalarında EK tümör dokularında normal dokulara göre FOXO1'in down regüle olduğu ve yüksek grade invaziv tümörlerde düşük grade invaziv olmayanlara göre daha düşük FOXO1 ekspresyon düzeyinin olduğunu belirlemiştir (Mazos et al 2014). Myatt ve arkadaşları (2010) hem klinik örneklerde hem de EK hücre hatlarında, FOXO1 ekspresyonunun tüm normal endometriyal doku örneklerinde güçlü pozitif olduğunu ve epitel hücrelerinin hem sitoplazmasında hem

de çekirdeğinde, stromal hücrelerde de önemli seviyelerde *FOXO1* ekspresyonu gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Buna karşılık, *FOXO1* boyamasının tüm hasta örneklerinde saptanamadığını veya düşük seviyelerde ve zayıf olduğunu ve özellikle tümör dokularında, normal endometriumun aksine *FOXO1* ekspresyonu epitelyal hücrelerle sınırlandırıldığını rapor etmişlerdir. Elde edilen Western blot analizi sonuçlarında da *FOXO1*'in normal endometriyal dokularda nispeten yüksek seviyelerde eksprese edildiğini, buna karşın EK dokularında seviyelerin çok daha düşük olduğunu göstermişlerdir (Myatt et al 2010). Zou ve arkadaşları (2016) yaptıkları başka bir çalışmada endometriyal dokulardaki p-AMPK seviyesini ve *FOXO1* protein lokalizasyonu araştırmışlar ve p-AMPK seviyelerinin EK'nın gelişmesiyle kademeli olarak azaldığını ve *FOXO1* proteininin boyanma özelliğinin normal kontrollere kıyasla zayıf ve büyük oranda negatif, ağırlıkta sitoplazma ile sınırlı olduğunu bildirmişlerdir (Zou et al 2016). Bizim çalışmamızda da özellikle EK tümör dokularında *FOXO1A* transkripsiyon faktörlerinin inaktif halde sitoplazmada boyandığı görüntülenmiştir ve mevcut tez çalışmasındaki bulguları literatürdeki bu çalışmalar destekler niteliktedir.

Grade temelli değerlendirmede ise IHC analizleri sonucunda kontrol grubuna kıyasla Grade II ve Grade III EK grubunda *FOXO1A* proteini azalırken, Grade I EK grubu hastalarda hafif düzeyde arttığı görüntülenmiştir. IHC analizlerinde EK hastalarında *FOXO1A* protein ekspresyon düzeylerindeki bu değişimler RT-PCR analizleri ile de mRNA düzeyinde desteklenmiştir.

RT-PCR sonuçlarına göre *FOXO1A* mRNA düzeyinin kontrol grubuna kıyasla Grade I EK grubunda arttığı, Grade II ve Grade III EK hastalarında ise azaldığı tespit edilmiştir. İnsan endometriumunda yapılan çalışmalarda, *FOXO* transkripsiyon faktörlerinin değişen hormonal ve çevresel faktörlere yanıt olarak farklı genlerin regülasyonunda rol aldığı belirlenmiştir (Kajihara et al 2012, Lam, Shah, & Brosens 2012). *FOXO1* transkripsiyon faktörü, yüksek progesteron seviyelerine yanıt olarak insan endometriyal stromal hücrelerini farklılaşmada görevli PRL ve IGFBP-1 gibi desidual genlerin ekspresyonunu düzenlemesine rağmen, progesteronun azaltılmasının *FOXO1* proteininin yeniden nükleer birikimine, Bim ekspresyonuna ve hücre ölümüne neden olduğu bildirilmiştir (Labied et al 2006). Bu kanıtlar *FOXO1*'in hedef dokularda

östrojen tepkilerine aracılık etmede önemli bir rol oynadığını ve steroid sinyalleme maruz kalan endometriumun normal koşullarda değişen FOXO1A aktivitesine sahip olduğunu göstermektedir. Döngülü endometriumda steroid sinyallemeyle ilgili olarak proliferatif fazda azalan FOXO1A aktivitesi, sekretuar fazda artmaktadır (Goto et al 2008). Mevcut tez çalışmasında kontrol grubunda ağırlıkta proliferatif faz endometriyuma sahip bireylere ait dokular (15 Proliferatif / 9 Sekretuar faz) kullanıldığından Grade I EK grubu hastalarda FOXO1A mRNA seviyesi artmış olabilir. Ayrıca kontrol grubunun menstrüel siklusuna bağlı olarak azalan FOXO1A aktivitesinin hastalığın başlangıcında yani Grade I EK grubunda onkojenik sinyallemeyle tepki olarak artmış daha sonra onkojenik aktivitenin baskın gelmesiyle birlikte Grade II ve Grade III EK grubunda azalmış olabilir. Diğer yandan Antmen (2019) yaptığı çalışmada EK'da PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağında rol alan *Akt* ve mTOR ekspresyon düzeylerinin Grade III EK grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde azaldığını tespit etmiştir (Antmen 2019). Bu çalışmanın sonuçlarına göre mevcut tez çalışmasında FOXO1A aktivasyonunun *Akt* aktivasyonu ile negatif etkilenecek Grade I EK grubunda azalan *mTOR* ve *Akt* ekspresyon düzeylerinden dolayı FOXO1A ekspresyon düzeyi artmış olabilir. Ancak ileri moleküler çalışmalar ile özellikle Grade I grubu hastalarda artan FOXO1A aktivitesinin moleküler mekanizmasının aydınlatılması gerekmektedir.

RT-PCR analizleri sonucunda FOXO1A mRNA seviyesinin toplam hasta grubunda kontrol grubuna göre arttığı belirlenmiştir. EK patogenezinin yanısıra farklı kanser tiplerinde FOXO1 aktivitesindeki değişimler araştırılmıştır. Grupp ve arkadaşları (2018) tarafından özefagus kanserinde nükleer FOXO1 ve sitoplazmik pSerine256-FOXO1 immün boyamasının prognostik rolü araştırılmış ve neoplastik olmayan özefagus mukozasında FOXO1 ekspresyonu düşük ve pSerine256-FOXO1 ekspresyonu yüksek yoğunlukta olduğu (stratum bazaliste zayıf ya da hiç boyanmayan hücreler mevcutmuş) ve özefagus adenokarsinomlarında (EAC) ve skuamöz hücreli karsinomda (ESCC) ileri tümör evresi ile ilişkili olarak artmış FOXO1 (nükleer) ve azalmış pSerine256-FOXO1 (sitoplazmik) ekspresyonu bulduklarını bildirmişlerdir. Bunlara ek olarak, FOXO1'in aşırı ekspresyonu ve pSerine256-FOXO1 ekspresyon kaybının EAC'li hastaların sağ kalımını kısalttığını bildirmişlerdir. Özetle, bu çalışmada nükleer FOXO1'in aşırı ekspresyonunun ve sitoplazmik pSerine256-

FOXO1 ekspresyon kaybının EAC'li hastalarda kötü prognoz ile ilişkili olduğu ve FOXO1'in özofagus kanserlerinde onkojenik bir rol oynayabileceği öngörülmüştür (Grupp et al 2018). Ayrıca Kim ve arkadaşları (2009) tarafından FOXO1 ve onkojenik potansiyele sahip olan ve transkripsiyonel baskılayıcı olarak işlev gören FOXG1 geninin primer mesane kanseri numunelerinde ve normal mesane mukozasında RT-PCR ve immünohistokimyasal analizi sonucunda *FOXO1* ve *FOXG1* mRNA ekspresyonunu kanser dokularında normal mesane mukozasından daha yüksek düzeyde eksprese olduğu belirlenmiş ve FOXO1'in mesanede tümör gelişimi sırasında aktive olabileceği belirtilmiştir. Ayrıca *FOXO1* mRNA seviyesinin iyi prognoza sahip hastalarda önemli ölçüde daha yüksek iken, kötü prognoza sahip hastalarda FOXG1 mRNA düzeyinin arttığı ancak FOXO1 ekspresyon düzeyinin azaldığı bildirilmiştir (Kim et al 2009).

Bu kapsamda RT-PCR sonuçlarına göre EK tümör dokularında normal dokuya göre artan *FOXO1* mRNA ekspresyonu dokuya özgü değişen FOXO1 aktivitesinden veya tümöre spesifik yanıtta kaynaklanabilir. Bu nedenle özellikle grade I EK hastalarında artan FOXO1 mRNA düzeyinin hastaların klinik özellikleri ile birlikte istatistiksel olarak değerlendirilmesi ve prognostik öneminin ortaya konması için daha kapsamlı hasta grubunda çalışmaların gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

Mevcut tez çalışmasında *FOXO1* mRNA düzeyi, grade I EK grubu hastalarda kontrol grubuna kıyasla belirgin şekilde artarken, protein düzeyinde aynı oranda artış görülmemiştir. EK'larda aşırı eksprese edilen Skp1/Cul1/F-box proteini ubiquitin kompleksinin onkojenik bir alt birimi olan S-faz kinaza bağlı protein 2 (Skp2), FOXO1'in ubiquitinasyon ve proteozomal degradasyonuna neden olmaktadır (Lahav-Baratz et al, 2004; Dijkers et al 2000). Böylece dokudaki FOXO1A protein miktarı EK'da farklı mekanizmalar tarafından, PTM'ler aracılığıyla değişebilmektedir. Zou ve arkadaşları (2016) normal ve tip 1 EK'lı dokularda metformine yanıt olarak AMPK ve FOXO1 aktivitesini immünohistokimyasal boyama ile inceledikleri araştırmalarında, tedavi sonrası p-FOXO1 (sitoplazmik/inaktif) proteininde önemli bir azalma ve FOXO1 proteinlerinde önemli bir artış belirlenmesine rağmen, FOXO1 mRNA ekspresyonunda anlamlı bir değişiklik olmadığını bildirmişlerdir (Zou et al 2016). Ayrıca Dijkers ve arkadaşları (2000) tarafından FOXO1'in Ser-256'da Akt tarafından

fosforilasyonunun sadece çekirdekten sitoplazmaya translokasyonundan sorumlu olmadığı, aynı zamanda FOXO1'in ubiquitinasyonunda ve degradasyonundan sorumlu Skp2 için de gerekli olduğu gösterilmiştir (Dijkers et al 2000). Bir diğer çalışmada da metformin tedavisi ile Ishikawa EK hücrelerinde FOXO1 protein seviyesinin arttığı ancak Akt fosforilasyonunun değişmediği bildirilmiştir (Iglesias et al 2013). Bu nedenle, *Akt* ve *FOXO1* mRNA düzeylerinde değişiklik olmadan FOXO1'in aktivitesinin artabileceği ya da azabileceği ve EK patogenezinde transkripsiyon sonrası PTM'lerin onkojenik aktivitesine bağlı olarak *FOXO1* mRNA'larını proteozomal degradasyona uğratarak dokudaki protein miktarının azaltılabileceği belirtilmektedir. Bu nedenle grade I EK grubu hastalarda artan *FOXO1* mRNA düzeyine rağmen protein düzeyinde azalmış olabilir.

Mevcut tez çalışmasında SREBP1 protein düzeyinde değişimler değerlendirildiğinde ise kontrol grubuna göre hasta grubunda SREBP1 proteininin ekspresyonunun arttığı ve ileri evre hastalarda en yüksek ekspresyon düzeyinde olduğu görüntülenmiştir. SREBP1'in hücre içi lipid homeostazını düzenlemedeki temel rolünün yanı sıra, kolorektal karsinom, hepatokarsinom, meme ve prostat kanseri gelişiminde ekspresyon düzeyinin arttığı literatürde belirtilmektedir. Ayrıca yüksek SREBP1 ekspresyonunun, çeşitli kanser türlerinde özellikle hormon duyarlı meme ve prostat kanserinde kanser progresyonu ve metastaz ile yakından ilişkilidir (Li et al 2000, Yang et al 2003, Ettinger et al 2004, Yahagi et al 2005, Yamashita et al 2009). Li ve arkadaşları (2012) EK dokularında SREBP1 ekspresyonunun sadece atipik hiperplazi ve normal endometriumdakinden daha yüksek olmadığını, iyi farklılaşmış ECC-1 hücrelerinde saptanamadığını, ancak orta ve zayıf farklılaştırılmış RL95-2 ve AN3 CA hücrelerinde yüksek oranda eksprese edildiğini dolayısı ile EK'da *SREBP1* ekspresyonunun arttığını ve kötü farklılaşmış (histopatolojik derecesi yüksek) tümörlerde SREBP1 protein ekspresyonunun daha da arttığını rapor etmişlerdir (Li et al 2012). EK'nın yanı sıra, lipogenezle ilişkili SREBP, FASN ve SCD1 gibi hedef genlerin over, prostat, kolon, pankreas ve meme kanserinin de dahil olduğu farklı kanser türlerinde upregüle olarak kanser hücrelerinde proliferasyona ve metastaza neden olduğu belirtilmektedir (Liang et al 2002, Wu et al, 2014, Chakraborty et al 2015, Li et al 2018, Wen et al 2018). Elde edilen sonuçlar, SREBP1'in aşırı aktivitesinin onkojenik dönüşümden ziyade EK progresyonunda kanser hücrelerinin

proliferasyonunda rol aldığını göstermektedir. İlgili literatür eşliğinde mevcut tez çalışmasında da SREBP1 protein miktarının EK dokularında kontrol grubuna göre arttığı görüntülenmiştir. Ayrıca Grade III EK grubunda *SREBP1* mRNA ve protein düzeyinin en yüksek düzeyde olduğu tespit edilmiştir. SREBP1'in tümörjenezde yer alarak kanser hücrelerinin membran yapı taşlarının ve sinyal lipid moleküllerinin oluşumunda rol aldığı ve bunda dolayı ileri evre hastalarda aşırı eksprese olabileceği öngörülmüştür.

RT-PCR analizinde, *SREBP1* gen ekspresyonunun hasta grubunda kontrol grubuna göre downregüle olduğu, grade temelli değerlendirildiğinde ise Grade I ve Grade III EK gruplarında up-regüle, Grade II EK grubunda ise down-regüle olduğu tespit edilmiştir. Antmen'in (2019) yaptığı çalışmada, SREBF1 protein ekspresyonunun kontrole göre downregüle olduğu belirlenmiştir. Ayrıca EK hastalarında azalan SREBF1 ekspresyonu ile birlikte kontrol grubuna göre Akt ve mTOR protein düzeylerinin hasta gruplarında daha az olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışmada hasta grupları içerisinde korelasyon katsayıları araştırıldığında, hastalığın ilerleyen evrelerinde Akt/mTOR yolağının baskılandığı ve PI3K/Akt/mTOR yolağının EK progresyonunda temel yolak olarak rol almayabileceği bildirilmiştir (Antmen 2019). Ayrıca, PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağında rol alan *PIK3CA* ve *PTEN* genlerinde meydana gelen mutasyonlar sonucunda Akt'den bağımsız bir şekilde PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağının PI3K temelli aktive olabileceği belirtilmektedir (Lien, Dibble & Toker 2017). Bu kapsamda Grade II EK dokularında *SREBP1* mRNA düzeyinin azalmasına farklı sinyal yollarının aktivitesindeki değişimler veya *PTEN* ve/veya *PIK3CA* genlerinde meydana gelen mutasyonlar neden olabilir.

Normal döngülü endometriumda steroid sinyallemeinin etkisinde SREBP1'in hedef genlerinden FASN ekspresyonu, proliferatif erken sekretuar faza kadar endometrial bezlerde ve stromal hücrelerde artmakta, orta ve geç salgı fazında hücre proliferasyonunun azalmasından sonra, endometrial dokuda FASN negatif olmaktadır (Escot et al 1990, Pizer, Kurman, Pasternack & Kuhajda 1997). Ayrıca Antmen (2019) yaptığı çalışmada da endometriumun proliferatif fazında artan SREBP1 ekspresyonu, sekretuar ve menstrüasyon fazında ise azalan SREBP1 ekspresyonu rapor edilmiş ve sayıca artan hücrelerin lipogeneze ihtiyaç duyacağı hipotezi desteklenmiştir (Qiu et al

2013, Antmen 2019). Buna bağılı olarak Grade II grubunda azalan *SREBP1* mRNA düzeyi kontrol grubunun proliferatif faz ağırlıklı oluşuna bağılı artan lipojenik aktivitesinden kaynaklanabilir. Ayrıca hücre, kanser gelişimine bağılı metabolik yeniden programlanma sebebi ile lipid ihtiyacını karşılamak için hedef genlerin ekspresyonunu arttırmakla birlikte, mevcut olan ancak inaktif halde ER’de yerleşmiş *SREBP1* öncüllerini nukleusa transloke aşamasında da olabilir. Bu durumda yapılan analizlerde *SREBP1* transkript seviyesindeki değişimlere bağılı olmaksızın lipogeneze artış olmuş ve *SREBP1* proteini nukleusa geçiş sırasında görüntülenmiş olabilir. Ayrıca Grade I EK grubunda artmış olan *FOXO1A* transkriptleri hastalığın ilerleyen aşamasında lipogenezi baskılayarak Grade II EK grubunda *SREBP1* mRNA seviyesini azaltmış olabilir. Bu kapsamda *FOXO1A* ile *SREBP1* arasındaki ilişki bu tez çalışmasında ilk kez aydınlatılmasına rağmen, daha kapsamlı hasta grubunda ilişkili sinyal yollarının aydınlatılması ile lipogenezin EK progresyonunda rolü ortaya konulabilir.

5.2. SONUÇ

Mevcut tez çalışmasında IHC analizlerinde, *FOXO1A* proteini kontrole kıyasla Grade I EK dokularında artarken, Grade II ve Grade III EK doku örneklerinde azaldığı ve *SREBP1* proteinin kontrol grubuna göre tüm hasta grubunda ve gradeler arasında kademeli olarak arttığı görüntülenmiştir. RT-PCR analizlerinde ise kontrol grubuna göre EK dokularında *FOXO1* mRNA düzeyi up-regüle iken, özellikle grade II ve III EK hastalarında down-regüle olduğu, *SREBP1* ekspresyon düzeyinin ise EK dokularında kontrole göre down-regüle iken, özellikle grade I ve grade III EK grubunda up-regüle, grade II EK grubunda ise down-regüle olduğu tespit edilmiştir.

EK hastalarında yapılan çalışmaların çoğunda kontrol grubuna göre değişen *FOXO1* veya *SREBP1* ekspresyon düzeyleri belirlenmesine rağmen hastalarda grade bağılı olarak ekspresyon düzeylerinde değişimler analiz edilmemiştir. Bu kapsamda *FOXO1* ile *SREBP1* in EK progresyonunda ilişkisi ilk kez aydınlatılmış olup özellikle farklı gradeye sahip EK hastalarında grade özgü gen ve protein düzeylerinde değişimler aydınlatılmıştır. Ancak, özellikle *FOXO1*’in ve dolaylı olarak *SREBP1* düzenlenmesinde rol alan *PI3K/Akt/mTOR* sinyal yolağının aktivitesinin belirlenmesine yönelik ileri çalışmaların gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Ayrıca,

Grade I ve Grade II EK hastalarında diğ er gruplara g ore farklı düzeyde FOXO1 ve SREBP1 mRNA ekspresyon düzeylerinin regülasyonunda epigenetik mekanizmaların ve EK progresyonunda neden olan gen mutasyonlarının araştırılmasına yönelik ileri çalışmalarda gerçekleştirilebilir. Bu kapsamda EK gelişiminde FOXO1A ve SREBP1 proteinlerinin rolünü tam olarak anlamak için bu proteinlerin işlevinin ve düzenlenmesinin daha iyi anlaşılmasına hala ihtiyaç vardır.



KAYNAKLAR

- Abeler VM, Vergote IB, Kjørstad KE & Tropé CG. (1996). Clear cell carcinoma of the endometrium. Prognosis and metastatic pattern. *Cancer*, 78(8), 1740–1747.
- Accili D, Arden KC. FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell* 2004; 117: 421–426.
- Adams CM, Goldstein JL & Brown MS. (2003). Cholesterol-induced conformational change in SCAP enhanced by Insig proteins and mimicked by cationic amphiphiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(19), 10647–10652.
- Antmen ŞE. (2019). Endometrial Kanserde Lipogenez İle AMPK/AKT/MTOR Sinyal İletim Yolu İlişkisi. Mersin Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, (Danışman: Prof. Dr. N CANACANKATAN).
- Arden KC & Biggs WH,3rd. (2002). Regulation of the FoxO famil of transcription factors by phosphatidylinositol-3 kinase-activated signaling. *Archieves of biochemistry and biophysics*, 403(2),292-298.
- Arimoto-Ishida E, Ohmichi M, Mabuchi S, Takahashi T, Ohshima C, Hayakawa J, Kimura A, Takahashi K, Nishio Y, Sakata M, Kurachi H, Tasaka K, & Murata Y. (2004). Inhibition of phosphorylation of a forkhead transcription factor sensitizes human ovarian cancer cells to cisplatin. *Endocrinology*, 145(4), 2014–2022.
- Arora V, & Quinn MA. (2012). Endometrial cancer. Best practice & research. *Clinical obstetrics & gynaecology*, 26(3), 311–324.
- Ayhan S. (2009). Endometium Kanserli Hastalarda Operasyon Öncesi Değerlendirmede PET-BT nin Yeri. Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi, İzmir (Prof. Dr. Hatice DURAK).
- Beddy P, O'Neill AC, Yamamoto AK, Addley HC, Reinhold C, & Sala, E. (2012). FIGO staging system for endometrial cancer: added benefits of MR imaging. *Radiographics: a review publication of the Radiological Society of North America, Inc*, 32(1), 241–254.
- Beiner ME, Finch A, Rosen B, Lubinski J, Moller P, Ghadirian P, Lynch HT, Friedman

- E, Sun, P, Narod SA., & Hereditary Ovarian Cancer Clinical Study Group (2007). The risk of endometrial cancer in women with BRCA1 and BRCA2 mutations. A prospective study. *Gynecologic oncology*, 104(1), 7–10.
- Benedet JL, Bender H, Jones H, 3rd, Ngan, H. Y., & Pecorelli, S. (2000). FIGO staging classifications and clinical practice guidelines in the management of gynecologic cancers. FIGO Committee on Gynecologic Oncology. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*, 70(2), 209–262.
- Berchuck A, Anspach C, Evans AC, Soper JT, Rodriguez GC, Dodge R, Robboy S, & Clarke-Pearson DL. (1995). Postsurgical surveillance of patients with FIGO stage I/II endometrial adenocarcinoma. *Gynecologic oncology*, 59(1), 20–24.
- Biggs WH, 3rd, Cavenee WK & Arden KC. (2001). Identification and characterization of members of the FKHR (FOX O) subclass of winged-helix transcription factors in the mouse. *Mammalian genome: official journal of the International Mammalian Genome Society*, 12(6), 416–425.
- Björntorp P. (1991). Metabolic implications of body fat distribution. *Diabetes care*, 14(12), 1132–1143.
- Bocitto M & Kalb RG. (2011). Regulation of Foxo-dependent transcription by post-translational modifications. *Current drug targets*, 12(9), 1303–1310.
- Bokhman JV. (1983). Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecologic oncology*, 15(1), 10–17.
- Brenkman AB, de Keizer PL, van den Broek NJ, Jochemsen AG and Burgering BM. (2008). "Mdm2 induces mono-ubiquitination of FOXO4." *PLoS One* 3(7): e2819.
- Brovkovich V, Izhar Y, Danes JM, Dubrovskiy O, Sakalliglu IT, Morrow LM, Atilla-Gokcumen GE & Frasier J. (2018). Fatostatin induces pro- and anti-apoptotic lipid accumulation in breast cancer. *Oncogenesis*, 7(8), 66.
- Brownawell AM, Kops GJ, Macara IG & Burgering BM. (2001). Inhibition of nuclear import by protein kinase B (Akt) regulates the subcellular distribution and activity of the forkhead transcription factor AFX. *Molecular and cellular biology*, 21(10), 3534–3546.
- Brunet A, Park J, Tran H, Hu LS, Hemmings BA & Greenberg ME. (2001). Protein

- kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHL1 (FOXO3a). *Molecular and cellular biology*, 21(3), 952–965.
- Burgering BM, Kops GJ. Cell cycle and death control: long live Forkheads. *Trends Biochem Sci* 2002; 27:352–360.
- Burke WM, Orr J, Leitao M, Salom E, Gehrig P, Olawaiye AB, Brewer M, Boruta D, Herzog TJ, Shahin FA & Society of Gynecologic Oncology Clinical Practice Committee, SGO Clinical Practice Endometrial Cancer Working Group. (2014). Endometrial cancer: a review and current management strategies: part II. *Gynecologic oncology*, 134(2), 393–402.
- Carter ME & Brunet, A. (2007). FOXO transcription factors. *Current biology: CB*, 17(4), R113–R114.
- Chakraborty PK., Xiong, X., Mustafi, S. B., Saha, S., Dhanasekaran, D., Mandal, N. A., McMeekin, S., Bhattacharya, R., & Mukherjee, P. (2015). Role of cystathionine beta synthase in lipid metabolism in ovarian cancer. *Oncotarget*, 6(35), 37367–37384.
- Chen C, Xu T, Zhou J, Yan Y, Li W, Yu H, Hu G, Ding X, Chen J, Lu Y. (2013). High cytoplasmic FOXO1 and pFOXO1 expression in astrocytomas are associated with worse surgical outcome. *PLoS One*, 8: e69260.
- Chen, G., Wang, T., Uttarwar, L., vanKrieken, R., Li, R., Chen, X., Gao, B., Ghayur, A., Margetts, P., & Krepinsky, J. C. (2014). SREBP-1 is a novel mediator of TGFβ1 signaling in mesangial cells. *Journal of molecular cell biology*, 6(6), 516–530. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mju041>
- Collado M, Medema RH, Garcia-Cao I, Dubuisson ML, Barradas M, Glassford J, Rivas C, Burgering BM, Serrano M & Lam EW. (2000). Inhibition of the phosphoinositide 3-kinase pathway induces a senescence-like arrest mediated by p27Kip1. *The Journal of biological chemistry*, 275(29), 21960–21968. Company, Philadelphia.
- Coughlin, SS, Calle EE, Teras, L. R., Petrelli, J., & Thun, M. J. (2004). Diabetes mellitus as a predictor of cancer mortality in a large cohort of US adults. *American journal of epidemiology*, 159(12), 1160–1167.
- Datta SR, Brunet, A., & Greenberg, M. E. (1999). *Cellular survival: a play in three*

- Akts. *Genes & development*, 13(22), 2905–2927.
- DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, & Thompson CB. (2008). The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell metabolism*, 7(1), 11–20.
- Deberardinis RJ, Sayed N, Ditsworth D & Thompson CB. (2008). Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. *Current opinion in genetics & development*, 18(1), 54–61.
- Dedes KJ, Wetterskog, D., Ashworth, A., Kaye, S. B., & Reis-Filho, J. S. (2011). Emerging therapeutic targets in endometrial cancer. *Nature reviews. Clinical oncology*, 8(5), 261–271.
- Deng X, Zhang W, O-Sullivan, I., Williams, J. B., Dong, Q., Park, E. A., Raghow, R., Unterman, T. G., & Elam, M. B. (2012). FoxO1 inhibits sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) gene expression via transcription factors Sp1 and SREBP-1c. *The Journal of biological chemistry*, 287(24), 20132–20143.
- Dijkers PF, Medema, R. H., Pals, C., Banerji, L., Thomas, N. S., Lam, E. W., Burgering, B. M., Raaijmakers, J. A., Lammers, J. W., Koenderman, L., & Coffey, P. J. (2000). Forkhead transcription factor FKHR-L1 modulates cytokine-dependent transcriptional regulation of p27(KIP1). *Molecular and cellular biology*, 20(24), 9138–9148.
- Dijkhuizen FP., Mol, B. W., Brölmann, H. A., & Heintz, A. P. (2000). The accuracy of endometrial sampling in the diagnosis of patients with endometrial carcinoma and hyperplasia: a meta-analysis. *Cancer*, 89(8), 1765–1772.
- Dong XC, Copps, K. D., Guo, S., Li, Y., Kollipara, R., DePinho, R. A., & White, M. F. (2008). Inactivation of hepatic Foxo1 by insulin signaling is required for adaptive nutrient homeostasis and endocrine growth regulation. *Cell metabolism*, 8(1), 65–76.
- Eberlé D, Hegarty, B., Bossard, P., Ferré, P., & Foufelle, F. (2004). SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie*, 86(11), 839–848.
- Eijkelenboom A & Burgering, B. M. (2013). FOXOs: signalling integrators for homeostasis maintenance. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 14(2), 83–

- Engelsen IB, Akslen, L. A., & Salvesen, H. B. (2009). Biologic markers in endometrial cancer treatment. *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 117(10), 693–707.
- Eroschenko VP. (2013). *Di Fiore Histoloji Atlası*. Çeviri Editörü: Prof. Dr. Ramazan DEMİR. Palme Yayıncılık, Ankara.
- Escot C, Joyeux C, Mathieu, M., Maudelonde, T., Pages, A., Rochefort, H., & Chalbos, D. (1990). Regulation of fatty acid synthetase ribonucleic acid in the human endometrium during the menstrual cycle. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 70(5), 1319–1324.
- Eşrefoğlu M. (2016) Özel histoloji. İstanbul tıp kitabevi.
- Ettinger SL, Sobel, R., Whitmore, T. G., Akbari, M., Bradley, D. R., Gleave, M. E., & Nelson, C. C. (2004). Dysregulation of sterol response element-binding proteins and downstream effectors in prostate cancer during progression to androgen independence. *Cancer research*, 64(6), 2212–2221.
- Fanning J, Evans MC, Peters AJ, Samuel M, Harmon ER, Bates JS. Endometrial adenocarcinoma histologic subtypes: clinical and pathologic profile. *Gynecol Oncol* 1989; 32: 288–291.
- Frampton G, Ueno, Y., Quinn, M., McMillin, M., Pae, H. Y., Galindo, C., Leyva-Illades, D., & DeMorrow, S. (2012). The novel growth factor, progranulin, stimulates mouse cholangiocyte proliferation via sirtuin-1-mediated inactivation of FOXO1. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 303(11), G1202–G1211.
- Friberg E, Mantzoros, C. S., & Wolk, A. (2007). Diabetes and risk of endometrial cancer: a population-based prospective cohort study. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 16(2), 276–280.
- Friberg E, Orsini, N., Mantzoros, C. S., & Wolk, A. (2007). Diabetes mellitus and risk of endometrial cancer: a meta-analysis. *Diabetologia*, 50(7), 1365–1374.
- Gao S, Shi, Z., Li, X., Li, W., Wang, Y., Liu, Z., & Jiang, J. (2018). Fatostatin suppresses growth and enhances apoptosis by blocking SREBP-regulated

- metabolic pathways in endometrial carcinoma. *Oncology reports*, 39(4), 1919–1929.
- Gartner LP, Hiatt JL. (2014). *Color Textbook of Histology*. '8nded.' WB. Saunders
- Goldstein JL, DeBose-Boyd RA, & Brown, M. S. (2006). Protein sensors for membrane sterols. *Cell*, 124(1), 35–46.
- Goto T, Takano M, Albergaria A, Briesse J, Pomeranz KM, Cloke, B., Fusi, L., Feroze-Zaidi, F, Maywald N., Sajin, M., Dina, R. E., Ishihara, O., Takeda, S., Lam, E. W., Bamberger, A. M., Ghaem-Maghami, S., & Brosens, J. J. (2008). Mechanism and functional consequences of loss of FOXO1 expression in endometrioid endometrial cancer cells. *Oncogene*, 27(1), 9–19.
- Greer EL & Brunet A. (2005). FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene*, 24(50), 7410–7425.
- Grupp K, Uzunoglu, F.G., Nathaniel Melling, N., Hofmann, B., Gammal, A.T.E., Grotelüschen, R., Heumann, A., Bellon, E., Reeh, M., Wolters-Eisfeld, G., Ghabdan, T., Nentwich, M., Bachmann, K., Bockhorn, M., Bogoevski, D., Izbicki, J.R. & Kutup, A. FOXO1 overexpression and loss of pSerine256-FOXO1 expression predicts clinical outcome in esophageal adenocarcinomas. *Sci Rep* 8, 17370 (2018).
- Gull B, Carlsson, S., Karlsson, B., Ylöstalo, P., Milsom, I., & Granberg, S. (2000). Transvaginal ultrasonography of the endometrium in women with postmenopausal bleeding: is it always necessary to perform an endometrial biopsy? *American journal of obstetrics and gynecology*, 182(3), 509–515.
- Gunderson CC, Dutta S, Fader AN, Maniar KP, Nasseri-Nik N, Bristow RE, Diaz-Montes TP, Palermo R, Kurman RJ. (2014). Pathologic features associated with resolution of complex atypical hyperplasia and grade 1 endometrial adenocarcinoma after progestin therapy. *Gynecologic Oncology*, Volume 132, Issue 1, Pages 33-37.
- Guo D, Prins, R. M., Dang, J., Kuga, D., Iwanami, A., Soto, H., Lin, K. Y., Huang, T. T., Akhavan, D., Hock, M. B., Zhu, S., Kofman, A. A., Bensinger, S. J., Yong, W. H., Vinters, H. V., Horvath, S., Watson, A. D., Kuhn, J. G., Robins, H. I., Mehta, M. P., Mischel, P. S. (2009). EGFR signaling through an Akt-SREBP-1-dependent, rapamycin-resistant pathway sensitizes glioblastomas to

- antilipogenic therapy. *Science signaling*, 2(101), ra82.
- Hacker NF, Moore JG. *Essentials of obstetrics and gynecology*. 3rd Edition. Philadelphia 1998:635
- Hagenbuchner J, & Ausserlechner, M. J. (2013). Mitochondria and FOXO3: breath or die. *Frontiers in physiology*, 4, 147.
- Hall JE, Hall ME. (2006). *Guyton and Hall Textbook Of Medical Physiology*. '14th edition', s. 1027-1041. Elsevier, Philadelphia.
- Heemers H, Maes B, Fougelle, F., Heyns, W., Verhoeven, G., & Swinnen, J. V. (2001). Androgens stimulate lipogenic gene expression in prostate cancer cells by activation of the sterol regulatory element-binding protein cleavage activating protein/sterol regulatory element-binding protein pathway. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md.), 15(10), 1817–1828.
- Hemmings BA, & Restuccia, D. F. (2012). PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(9), a011189.
- Hirota K, Daitoku H, Matsuzaki H, Araya N, Yamagata, K., Asada, S., Sugaya, T., & Fukamizu, A. (2003). Hepatocyte nuclear factor-4 is a novel downstream target of insulin via FKHR as a signal-regulated transcriptional inhibitor. *The Journal of biological chemistry*, 278(15), 13056–13060.
- Ho KK, Myatt SS, Lam EW. (2008). Many forks in the path: Cycling with FoxO. *Oncogene*, 2008;27:2300–2311.
- Huang H & Tindall, D. J. (2007). Dynamic FoxO transcription factors. *Journal of cell science*, 120(Pt 15), 2479–2487.
- Iglesias DA Yates MS, van der Hoeven, D., Rodkey, T. L., Zhang, Q., Co, N. N., Burzawa, J., Chigurupati, S., Celestino, J., Bowser, J., Broaddus, R., Hancock, J. F., Schmandt, R., & Lu, K. H. (2013). Another surprise from Metformin: novel mechanism of action via K-Ras influences endometrial cancer response to therapy. *Molecular cancer therapeutics*, 12(12), 2847–2856.
- Ii TG, Vandenboom, Li Y, Philip PA, Sarkar FH. MicroRNA and Cancer: Tiny Molecules with Major Implications. *Curr Genomics*. 2008; 9:97–109.
- Jang SW, Yang SJ, Srinivasan S & Ye K. (2007). Akt phosphorylates MstI and prevents its proteolytic activation, blocking FOXO3 phosphorylation and

- nuclear translocation. *The Journal of biological chemistry*, 282(42), 30836–30844.
- Kaban A, Topuz S, Sözen H & Salihoglu Y. (2018). İleri evre yüksek grade endometrium kanserli hastalarda sağkalım sonuçları. *Türk Jinekolojik Onkoloji Dergisi*,19(4),139-144.
- Kajihara T, Tochigi H, Prechapanich, J., Uchino, S., Itakura, A., Brosens, J. J., & Ishihara, O. (2012). Androgen signaling in decidualizing human endometrial stromal cells enhances resistance to oxidative stress. *Fertility and sterility*, 97(1), 185–191.
- Kamei Y, Miura S, Suganami T, Akaike F, Kanai, S., Sugita, S., Katsumata, A., Aburatani, H., Unterman TG, Ezaki O & Ogawa Y. (2008). Regulation of SREBP1c gene expression in skeletal muscle: role of retinoid X receptor/liver X receptor and forkhead-O1 transcription factor. *Endocrinology*, 149(5), 2293–2305.
- Katoh M & Katoh M. (2004). Human FOX gene family (Review). *International journal of oncology*, 25(5), 1495–1500.
- Kelly DE Wood RL, Enders AC. (1984). *Bailey's Textbook Of MICROSCOPIC ANATOMY*. Eighteenth edition. WW, London.
- Kierszenbaum AL. (2006) *Histoloji ve Hücre Biyolojisi-Patolojiye Giriş*, çeviri editörü: R. Demir, Palme yayıncılık, s.532-605
- Kim TH, Jo SW, Lee YS, Kim Y J, Lee SC, Kim W J., & Yun, S. J. (2009). Forkhead box O-class 1 and forkhead box G1 as prognostic markers for bladder cancer. *Journal of Korean medical science*, 24(3), 468–473.
- Kissebah AH, Vydelingum N, Murray R, Evans DJ, Hartz A. J., Kalkhoff, R. K., & Adams, P. W. (1982). Relation of body fat distribution to metabolic complications of obesity. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 54(2), 254–260.
- Kops GJ, Dansen TB, Polderman, P. E., Saarloos, I., Wirtz, K. W., Coffey, P. J., Huang, T. T., Bos, J. L., Medema, R. H., & Burgering, B. M. (2002). Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature*, 419(6904), 316–321.
- Korani M, Fallah S, Tehranian, A., Nourbakhsh, M., Samadikuchaksaraei, A., Pour,

- M. S., & Maleki, J. (2013). The evaluation of the FOXO1, KLF9 and YT521 genes expression in human endometrial cancer. *Clinical laboratory*, 59(5-6), 483–489.
- Kousteni S. (2012). FoxO1, the transcriptional chief of staff of energy metabolism. *Bone*, 50(2), 437–443.
- Kuşcu N. (2014). Fare Preimplantif Embriyo Gelişim Sürecinde FOXO1, FOXO3 Ve FOXO4 Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi. Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Antalya, (Danışman: Doç. Dr. Ç ÖZENCİ).
- Labied, S., Kajihara, T., Madureira, P. A., Fusi, L., Jones, M. C., Higham, J. M., Varshochi, R., Francis, J. M., Zoumpoulidou, G., Essafi, A., Fernandez de Mattos, S., Lam, E. W., & Brosens, J. J. (2006). Progestins regulate the expression and activity of the forkhead transcription factor FOXO1 in differentiating human endometrium. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md.), 20(1), 35–44.
- Lahav-Baratz S, Ben-Izhak O, Sabo E, Ben-Eliezer S, Lavie O, Ishai D, Ciechanover, Dirnfeld AM. Decreased level of the cell cycle regulator p27 and increased level of its ubiquitin ligase Skp2 in endometrial carcinoma but not in normal secretory or in hyperstimulated endometrium, *Molecular Human Reproduction*, Volume 10, Issue 8, August 2004, Pages 567–572.
- Lam EW, Brosens JJ, Gomes, A. R., & Koo, C. Y. (2013). Forkhead box proteins: tuning forks for transcriptional harmony. *Nature reviews. Cancer*, 13(7), 482–495.
- Lam EW, Shah K, & Brosens, J. J. (2012). The diversity of sex steroid action: the role of micro-RNAs and FOXO transcription factors in cycling endometrium and cancer. *The Journal of endocrinology*, 212(1), 13–25.
- Lauritzen C. (1977). Oestrogens and endometrial cancer: a point of view. *Clinics in obstetrics and gynaecology*, 4(1), 145–167.
- Lawrence C, Tessaro I, Durgerian, S., Caputo, T., Richart, R., Jacobson, H., & Greenwald, P. (1987). Smoking, body weight, and early-stage endometrial cancer. *Cancer*, 59(9), 1665–1669.
- Lax SF. (2007). Molecular genetic changes in epithelial, stromal and mixed neoplasms

- of the endometrium. *Pathology*, 39(1), 46–54.
- Lettieri BD, Aquilano K, Ciriolo MR. (2014). FoxO1 at the nexus between fat catabolism and longevity pathways. *Biochim Biophys Acta*, 1555–1560.
- Li JN, Mahmoud MA, Han, W. F., Ripple, M., & Pizer, E. S. (2000). Sterol regulatory element-binding protein-1 participates in the regulation of fatty acid synthase expression in colorectal neoplasia. *Experimental cell research*, 261(1), 159–165.
- Li W, Bai H, Liu, S., Cao, D., Wu, H., Shen, K., Tai, Y., Yang, J., 2018. Targeting stearyl-CoA desaturase 1 to repress endometrial cancer progression. *Oncotarget* 9, 12064–12078.
- Li W, Tai Y, Zhou J, Gu W, Bai Z, Zhou, T., Zhong, Z., McCue, P. A., Sang, N., Ji, J. Y., Kong, B., Jiang, J., & Wang, C. (2012). Repression of endometrial tumor growth by targeting SREBP1 and lipogenesis. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 11(12), 2348–2358.
- Liang G, Yang J, Horton JD, Hammer, R. E., Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (2002). Diminished hepatic response to fasting/refeeding and liver X receptor agonists in mice with selective deficiency of sterol regulatory element-binding protein-1c. *The Journal of biological chemistry*, 277(11), 9520–9528.
- Lien EC, Dibble, C. C., & Toker, A. (2017). PI3K signaling in cancer: beyond AKT. *Current opinion in cell biology*, 45, 62–71.
- Liu X, Qiao A, Ke Y, Kong, X., Liang, J., Wang, R., Ouyang, X., Zuo, J., Chang, Y., & Fang, F. (2010). FoxO1 represses LXR α -mediated transcriptional activity of SREBP-1c promoter in HepG2 cells. *FEBS letters*, 584(20), 4330–4334.
- Lobo FD & Thomas E. (2016). Type II endometrial cancers: A case series. *Journal of mid-life health*, 7(2), 69–72.
- Lu Z & Chen J. (2014). *Zhonghua bing li xue za zhi* = Chinese journal of pathology, 43(10), 649–650.
- Ma X, Zhao T, Yan H, Guo, K., Liu, Z., Wei, L., Lu, W., Qiu, C., & Jiang, J. (2021). Fatostatin reverses progesterone resistance by inhibiting the SREBP1-NF- κ B pathway in endometrial carcinoma. *Cell death & disease*, 12(6), 544.
- Maekawa T, Maniwa Y, Doi T, Nishio, W., Yoshimura, M., Ohbayashi, C., Hayashi, Y., & Okita Y. (2009). Expression and localization of FOXO1 in non-small

- cell lung cancer. *Oncology reports*, 22(1), 57–64.
- Mahboubi E, Eyler, N., & Wynder, E. L. (1982). Epidemiology of cancer of the endometrium. *Clinical obstetrics and gynecology*, 25(1), 5–17.
- Maiese K, Chong ZZ, Shang YC & Hou J. (2008). Clever cancer strategies with FoxO transcription factors. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 7(24), 3829–3839.
- Martins R, Lithgow GJ & Link. (2016). Long live FOXO: unraveling the role of FOXO proteins in aging and longevity. *Aging cell*, 15(2), 196–207.
- Matsuzaki H, Daitoku H, Hatta M, Aoyama H, Yoshimochi K and Fukamizu (2005). "Acetylation of Foxo1 alters its DNA-binding ability and sensitivity to phosphorylation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(32): 11278-11283.
- Maxfield FR & van Meer G. (2010). Cholesterol, the central lipid of mammalian cells. *Current opinion in cell biology*, 22(4), 422–429.
- McDonald TW, Malkasian GD, & Gaffey, T. A. (1977). Endometrial cancer associated with feminizing ovarian tumor and polycystic ovarian disease. *Obstetrics and gynecology*, 49(6), 654–658.
- Melnik BC & Zouboulis CC. (2013). Potential role of FoxO1 and mTORC1 in the pathogenesis of Western diet-induced acne. *Experimental dermatology*, 22(5), 311–315.
- Mescher AL. (2009). *Junqueira's Basic Histology Text & Atlas*. '14th edition.' Edition: 14th Publisher: McGraw-Hill Medical, Indiana University Bloomington, s.461-490.
- Monsalve M & Olmos Y. (2011). The complex biology of FOXO. *Current drug targets* 12, 1322–1350.
- Morice P, Leary A, Creutzberg C, Abu-Rustum N & Darai E. (2016). Endometrial cancer. *Lancet (London, England)*, 387(10023), 1094–1108.
- Motta MC, Divecha N, Lemieux M, Kamel C, Chen D, Gu W, Bultsma Y, McBurney M & Guarente L. (2004). Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors. *Cell*, 116(4), 551–563.
- Mozos, A., Catasús, L., D'Angelo, E., Serrano, E., Espinosa, I., Ferrer, I., Pons, C., & Prat, J. (2014). The FOXO1-miR27 tandem regulates myometrial invasion in endometrioid endometrial adenocarcinoma. *Human pathology*, 45(5), 942–951.

- Murali R, Soslow RA & Weigelt B. (2014). Classification of endometrial carcinoma: more than two types. *The Lancet. Oncology*, 15(7), e268–e278.
- Myatt SS, Wang J, Monteiro LJ, Christian M, Ho KK, Fusi L, Dina RE, Brosens JJ, Ghaem-Maghami S & Lam EW. (2010). Definition of microRNAs that repress expression of the tumor suppressor gene FOXO1 in endometrial cancer. *Cancer research*, 70(1), 367–377.
- Nakae J, Kitamura, T., Ogawa, W., Kasuga, M., & Accili, D. (2001). Insulin regulation of gene expression through the forkhead transcription factor Foxo1 (Fkhr) requires kinases distinct from Akt. *Biochemistry*, 40(39), 11768–11776.
- Nakae J, Kitamura, T., Silver, D. L., & Accili, D. (2001). The forkhead transcription factor Foxo1 (Fkhr) confers insulin sensitivity onto glucose-6-phosphatase expression. *The Journal of clinical investigation*, 108(9), 1359–1367.
- Nasrin N, Ogg, S., Cahill, C. M., Biggs, W., Nui, S., Dore, J., Calvo, D., Shi, Y., Ruvkun, G., & Alexander-Bridges, M. C. (2000). DAF-16 recruits the CREB-binding protein coactivator complex to the insulin-like growth factor binding protein 1 promoter in HepG2 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(19), 10412–10417.
- Nemoto S, Fergusson MM & Finkel T. (2004). Nutrient availability regulates SIRT1 through a forkhead-dependent pathway. *Science (New York, N.Y.)*, 306(5704), 2105–2108.
- Nie LY, Lu QT, Li WH, Yang N, Dongol S, Zhang X & Jiang J. (2013). Sterol regulatory element-binding protein 1 is required for ovarian tumor growth. *Oncology reports*, 30(3), 1346–1354.
- O'Mara BA, Byers T & Schoenfeld E. (1985). Diabetes mellitus and cancer risk: a multisite case-control study. *Journal of chronic diseases*, 38(5), 435–441.
- Osborne TF & Espenshade PJ. (2009). Evolutionary conservation and adaptation in the mechanism that regulates SREBP action: what a long, strange tRIP it's been. *Genes & development*, 23(22), 2578–2591.
- Özakıncı H. (2015). Endometriyal Karsinogenezde Östrojen Reseptör Alt Tiplerinin (Alfa, Beta, Gpr30) Araştırılması. Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıpta Uzmanlık Tezi, Ankara (Yrd. Doç. Dr. Duygu KANKAYA).
- Pecorelli S. (2009). Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and

- endometrium. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*, 105(2), 103–104.
- Pike MC, Peters RK, Cozen W, Probst-Hensch NM, Wan PC, Mack TM, Felix JC. (1997). Estrogen-Progestin Replacement Therapy and Endometrial Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, Volume 89, Issue 15, 6 August 1997, Pages 1110–1116.
- Pizer ES, Kurman RJ, Pasternack GR & Kuhajda, F. P. (1997). Expression of fatty acid synthase is closely linked to proliferation and stromal decidualization in cycling endometrium. *International journal of gynecological pathology: official journal of the International Society of Gynecological Pathologists*, 16(1), 45–51.
- Powell JL, Hill KA, Shiro BC, Diehl SJ & Gajewski WH. (2005). Preoperative serum CA-125 levels in treating endometrial cancer. *The Journal of reproductive medicine*, 50(8), 585–590.
- Qiu CP, Qing-Tao LV, Dongol S, Wang C, Jiang J. (2014). Single Nucleotide Polymorphism of SREBF-1 Gene Associated with an Increased Risk of Endometrial Cancer in Chinese Women. *PLOS ONE*, Volume, Issue 3, e90491.
- Ramaswamy S, Nakamura N, Sansal I, Bergeron L & Sellers WR. (2002). A novel mechanism of gene regulation and tumor suppression by the transcription factor FKHR. *Cancer cell*, 2(1), 81–91.
- Rifaï K, Idrissou M, Penault-Llorca F, Bignon YJ & Bernard-Gallon D. (2018). Breaking down the Contradictory Roles of Histone Deacetylase SIRT1 in Human Breast Cancer. *Cancers*, 10(11), 409.
- Ronghe R & Gaudoin M. (2010). Women with recurrent postmenopausal bleeding should be re-investigated but are not more likely to have endometrial cancer. *Menopause international*, 16(1), 9–11.
- Ross JC, Eifel PJ, Cox RS, Kempson RL & Hendrickson MR. (1983). Primary mucinous adenocarcinoma of the endometrium. A clinicopathologic and histochemical study. *The American journal of surgical pathology*, 7(8), 715–729.

- Ross MH and Pawlina W. (2014) Histoloji konu anlatımı ve atlas. Palme yayıncılık, 830-895.
- Rubin GL, Peterson HB, Lee NC, Maes EF, Wingo PA, & Becker S. (1990). Estrogen replacement therapy and the risk of endometrial cancer: remaining controversies. *American journal of obstetrics and gynecology*, 162(1), 148–154.
- Saarelainen SK, Kööbi L, Järvenpää R, Laurila M & Mäenpää JU. (2012). The preoperative assessment of deep myometrial invasion by three-dimensional ultrasound versus MRI in endometrial carcinoma. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*, 91(8), 983–990.
- Santos R, Schulzade A. Lipid metabolism in cancer. *FEBS Journal* 2012, 279, 2610–2623.
- Schmoll D, Walker KS, Alessi DR, Grempler R, Burchell A, Guo S, Walther R & Unterman TG. (2000). Regulation of glucose-6-phosphatase gene expression by protein kinase B α and the forkhead transcription factor FKHR. Evidence for insulin response unit-dependent and -independent effects of insulin on promoter activity. *The Journal of biological chemistry*, 275(46), 36324–36333.
- Sedding DG. (2008). FoxO transcription factors in oxidative stress response and ageing – a new fork on the way to longevity? *389(3)*, 279-283.
- Shao W & Espenshade PJ. (2012). Expanding roles for SREBP in metabolism. *Cell metabolism*, 16(4), 414–419.
- Shi Z, Zhou Q, Gao S, Li W, Li X, Liu Z, Jin P & Jiang J. (2019). Silibinin inhibits endometrial carcinoma via blocking pathways of STAT3 activation and SREBP1-mediated lipid accumulation. *Life sciences*, 217, 70–80.
- Shimano H. (2001). Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes. *Progress in lipid research*, 40(6), 439–452.
- Simsir A, Carter W, Elgert P, Cangiarella J. (2005). Reporting endometrial cells in women 40 years and older: Assessing the clinical usefulness of Bethesda 2001. *Am J Clin Pathol*, 123(4):571-5.
- Soliman PT, Oh JC, Schmeler KM, Sun CC, Slomovitz BM, Gershenson DM, Burke

- TW & Lu KH. (2005). Risk factors for young premenopausal women with endometrial cancer. *Obstetrics and gynecology*, 105(3), 575–580.
- Sun Y, He W, Luo M, Zhou Y, Chang G, Ren W, Wu K, Li X, Shen J, Zhao X & Hu Y. (2015). SREBP1 regulates tumorigenesis and prognosis of pancreatic cancer through targeting lipid metabolism. *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 36(6), 4133–4141.
- Sundqvist A & Ericsson J. (2003). Transcription-dependent degradation controls the stability of the SREBP family of transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(24), 13833–13838.
- Sunters A, Fernández de Mattos S, Stahl M, Brosens JJ, Zoumpoulidou G, Saunders CA, Coffey PJ, Medema RH, Coombes RC & Lam EW. (2003). FoxO3a transcriptional regulation of Bim controls apoptosis in paclitaxel-treated breast cancer cell lines. *The Journal of biological chemistry*, 278(50), 49795–49805.
- Sutton GP, Brill L, Michael H, Stehman FB & Ehrlich CE. (1987). Malignant papillary lesions of the endometrium. *Gynecologic oncology*, 27(3), 294–304.
- Şahmay S, Atasü T. (2004). Uterusun Malign Hastalıkları. *Jinekoloji Kadın Hastalıkları 2. Baskı*; 2004: 299-320.
- Tobon H & Watkins GJ. (1985). Secretory adenocarcinoma of the endometrium. *International journal of gynecological pathology: official journal of the International Society of Gynecological Pathologists*, 4(4), 328–335.
- Tzivion G, Dobson M & Ramakrishnan G. (2011). FoxO transcription factors; Regulation by AKT and 14-3-3 proteins. *Biochimica et biophysica acta*, 1813(11), 1938–1945.
- Vainio H, Kaaks R & Bianchini F. (2002). Weight control and physical activity in cancer prevention: international evaluation of the evidence. *European journal of cancer prevention: the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, 11 Suppl 2, S94–S100.
- Van Der Heide LP, Hoekman MF & Smidt MP. (2004). The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation.

- The Biochemical journal, 380(Pt 2), 297–309.
- Walker, A. K., Jacobs, R. L., Watts, J. L., Rottiers, V., Jiang, K., Finnegan, D. M., Shioda, T., Hansen, M., Yang, F., Niebergall, L. J., Vance, D. E., Tzoneva, M., Hart, A. C., & Näär, A. M. (2011). A conserved SREBP-1/phosphatidylcholine feedback circuit regulates lipogenesis in metazoans. *Cell*, 147(4), 840–852.
- Weigel D & Jäckle H. (1990). The fork head domain: a novel DNA binding motif of eukaryotic transcription factors? *Cell*, 63(3), 455–456.
- Weigel D, Jürgens G, Küttner F, Seifert E & Jäckle H. (1989). The homeotic gene fork head encodes a nuclear protein and is expressed in the terminal regions of the *Drosophila* embryo. *Cell*, 57(4), 645–658.
- Weigelt J, Climent I, Dahlman-Wright K & Wikström M. (2001). Solution structure of the DNA binding domain of the human forkhead transcription factor AFX (FOXO4). *Biochemistry*, 40(20), 5861–5869.
- Wen YA, Xiong X, Zaytseva YY, Napier DL, Vallee E, Li AT, Wang C, Weiss HL, Evers BM & Gao T. (2018). Downregulation of SREBP inhibits tumor growth and initiation by altering cellular metabolism in colon cancer. *Cell death & disease*, 9(3), 265.
- Wu X, Daniels G, Lee P & Monaco ME. (2014). Lipid metabolism in prostate cancer. *American journal of clinical and experimental urology*, 2(2), 111–120.
- Wu Y, Elshimali Y, Sarkissyan M, Mohamed H, Clayton S & Vadgama JV. (2012). Expression of FOXO1 is associated with GATA3 and Annexin-1 and predicts disease-free survival in breast cancer. *American journal of cancer research*, 2(1), 104–115.
- Xie Q, Chen J & Yuan Z. (2012). Post-translational regulation of FOXO. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 44(11), 897–901.
- Xing Z, Li D, Yang L, Xi Y & Su X. (2014). MicroRNAs and anticancer drugs. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 46(3), 233–239.
- Yahagi N, Shimano H, Hasegawa K, Ohashi K, Matsuzaka T, Najima Y, Sekiya M, Tomita S, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Ohashi K, Nagai R, Ishibashi S, Kadowaki T, Makuuchi M, Ohnishi S, Osuga J & Yamada N. (2005). Co-ordinate activation of lipogenic enzymes in hepatocellular carcinoma.

- European journal of cancer (Oxford, England: 1990), 41(9), 1316–1322.
- Yamashita T, Honda M, Takatori H, Nishino R, Minato H, Takamura H, Ohta T & Kaneko S. (2009). Activation of lipogenic pathway correlates with cell proliferation and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Journal of hepatology*, 50(1), 100–110.
- Yang JY, Zong CS, Xia W, Yamaguchi H, Ding Q, Xie W, Lang JY, Lai CC, Chang CJ, Huang WC, Huang H, Kuo HP, Lee DF, Li LY, Lien HC, Cheng X, Chang KJ, Hsiao CD, Tsai FJ, Tsai CH, Sahin AA, Muller WJ, Mills GB, Yu D, Hortobagyi GN and Hung MC. (2008). "ERK promotes tumorigenesis by inhibiting FOXO3a via MDM2-mediated degradation." *Nat Cell Biol*, 10(2): 138-148.
- Yang L, Xie S, Jamaluddin MS, Altuwaijri S, Ni J, Kim E, Chen YT, Hu YC, Wang L, Chuang KH, Wu CT & Chang C. (2005). Induction of androgen receptor expression by phosphatidylinositol 3-kinase/Akt downstream substrate, FOXO3a, and their roles in apoptosis of LNCaP prostate cancer cells. *The Journal of biological chemistry*, 280(39), 33558–33565.
- Yang YU, Morin PJ, Han WF, Chen T, Bornman DM, Gabrielson EW & Pizer ES. (2003). Regulation of fatty acid synthase expression in breast cancer by sterol regulatory element binding protein-1c. *Experimental cell research*, 282(2), 132–137.
- Yin C, Qie S & Sang N. (2012). Carbon source metabolism and its regulation in cancer cells. *Critical reviews in eukaryotic gene expression*, 22(1), 17–35.
- Zaino RJ & Kurman RJ. (1988). Squamous differentiation in carcinoma of the endometrium: a critical appraisal of adenoacanthoma and adenosquamous carcinoma. *Seminars in diagnostic pathology*, 5(2), 154–171.
- Zhang B, Pan X, Cobb GP & Anderson TA. (2007). microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Developmental biology*, 302(1), 1–12.
- Zhang W, Patil S, Chauhan B, Guo S, Powell DR, Le J, Klotsas A, Matika R, Xiao X, Franks R, Heidenreich KA, Sajjan MP, Farese RV, Stolz DB, Tso P, Koo SH, Montminy M, & Unterman TG. (2006). FoxO1 regulates multiple metabolic pathways in the liver: effects on gluconeogenic, glycolytic, and lipogenic gene expression. *The Journal of biological chemistry*, 281(15), 10105–10117.

- Zhang X, Gan L, Pan H, Guo S, He X, Olson ST, Mesecar A, Adam S & Unterman TG. (2002). Phosphorylation of serine 256 suppresses transactivation by FKHR (FOXO1) by multiple mechanisms. Direct and indirect effects on nuclear/cytoplasmic shuttling and DNA binding. *The Journal of biological chemistry*, 277(47), 45276–45284.
- Zhang X, Tang N, Hadden TJ & Rishi AK. (2011). Akt, FoxO and regulation of apoptosis. *Biochimica et biophysica acta*, 1813(11), 1978–1986.
- Zhang Y, Zhang L, Sun H, Lv Q, Qiu C, Che X, Liu Z & Jiang J. (2017). Forkhead transcription factor 1 inhibits endometrial cancer cell proliferation via sterol regulatory element-binding protein 1. *Oncology letters*, 13(2), 731–737.
- Zou J, Hong L, Luo C, Li Z, Zhu Y, Huang T, Zhang Y, Yuan H, Hu Y, Wen T, Zhuang W, Cai B, Zhang X, Huang J & Cheng J. (2016). Metformin inhibits estrogen-dependent endometrial cancer cell growth by activating the AMPK-FOXO1 signal pathway. *Cancer science*, 107(12), 1806–1817.