



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NORMAL ENDOMETRİYUM, ENDOMETRİYAL HİPERPLAZİ
VE ENDOMETRİYUM KANSERLERİNDE
EZH2 PROTEİNİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
DEĞERLENDİRİLMESİ**

OYA KORKMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: PROF. DR. V. SEVİNÇ İNAN

MANİSA-2016



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NORMAL ENDOMETRİYUM, ENDOMETRİYAL HİPERPLAZİ
VE ENDOMETRİYUM KANSERLERİNDE
EZH2 PROTEİNİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
DEĞERLENDİRİLMESİ**

OYA KORKMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Prof.Dr. Sevinç İNAN

(Tez danışmanı)

Prof. Dr. M. Kemal ÖZBİLGİN

(Jüri Üyesi)

Prof.Dr. Çetin PEKÇETİN

(Jüri Üyesi)

MANİSA-2016

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilemeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışım olmadığını beyan ederim.

Oya KORKMAZ

TEŞEKKÜR/ÖNSÖZ

Yüksek Lisans tez projemi destekleyen Celal Bayar Üniversitesi Rektörlüğü; Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi; Sağlık Bilimleri Enstitüsü ve Tıp Fakültesi Dekanlığı'na;

Yüksek lisans eğitimim sürecinde, eğitimime büyük katkıları olan hiçbir zaman destek ve yardımlarını esirgemeyen, göstermiş olduğu özveri ve katkıların ötesinde, eğitimim boyunca üzerimden manevi ve bilimsel desteğini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız ve tez danışman hocam *Prof. Dr. V. Sevinç İNAN'a*,

Yüksek lisans eğitim sürecimin tüm aşamalarında değerli bilgilerini aktaran, her konuda destek olarak, yol gösteren Anabilim Dalımızın değerli öğretim üyeleri *Prof. Dr. Kemal ÖZBİLGİN, Prof. Dr. H. Seda VATANSEVER, Prof. Dr. M. İbrahim TUĞLU* ve *Doç. Dr. Elgin Türköz ULUER* hocalarıma;

Deneyisel çalışmalarım süresince hiçbir zaman yardımını esirgemeyen, her konuda öneri ve eleştirileriyle bilgisinden en verimli şekilde yararlandığım, manevi desteğini her zaman hissettiğim, bütün deneyimlerini bitmek tükenmek bilmeyen bir sabırla ve abla şefkatiyle bana aktaran *Dr. Işıl AYDEMİR'e*,

Bu zorlu süreçte benden desteğini hiç esirgemeyen, her türlü zor zamanımda yanımda olan bitanecik dostum *Biyolog Fatih ÇÖLLÜ'ye* ve Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı'nda birlikte çalıştığım tüm *asistan ve uzman arkadaşlarıma*;

Tezimin Western Blotting kısmının gerçekleştirilmesinde yardımlarını esirgemeyen Biofizik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi *Doç. Dr. Zafer AKAN'a* ve *Taner ÖZEL'e*;

Bugünlere gelmemde en büyük pay sahibi olan, hayatımın tüm aşamalarında olduğu gibi yüksek lisans eğitimim süresince de bana sevgi ve desteklerini biran bile eksik etmeyen, karşılıksız sevgi ve fedakârlıklarıyla sürekli yanımda olup sabırlarını sunan sevgili *ANNEM, BABAM VE KARDEŞLERİM'e* maddi ve manevi destekleri için teşekkürü bir borç bilirim.

Oya KORKMAZ
MANİSA/ 2016

TABLÖLAR ve GRAFİKLER DİZİNİ

Tablo 1. Hücre Kültürü İçin Uygulanan İndirekt İmmünohistokimya Protokolü.....	30
Tablo 2. İndirekt İmmünohistokimyasal İnceleme İçin Kullanılan Malzemeler	31
Tablo 3. Western Blotting İnceleme İçin Kullanılan Malzemeler	34
Tablo 4. Parafin Doku Takibi Protokolü.....	36
Tablo 5. Hematoksilen-Eosin Boyama Protokolü.....	37
Tablo 6. İndirekt İmmünohistokimya Protokolü.....	39
Tablo 7. Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal İnceleme İçin Kullanılan Malzemeler	40
Tablo 8. TUNEL Yöntemi Protokolü.....	42
Tablo 9. Ishikawa İnsan Endometriyum Adenokanser Hücrelerinin Anti-EZH2 Primer Antikoru İle Elde Edilen H-Skor Sonuçları	48
Tablo 10. MFE-319 (ACC423) insan endometriyum adenokanser hücrelerinin anti-EZH2 primer antikoru ile elde edilen H-Skor Sonuçları	48
Tablo 11. Normal Proliferasyon Evresi Endometriyum Örneklerinde anti-EZH2 Primer Antikoru İmmünoreaktivite Şiddeti ve İmmüno lokalizasyon Sonuçları (n:10).....	54
Tablo 12. Normal Sekresyon Evresi Endometriyum Örneklerinde anti-EZH2 Primer Antikoru İmmünoreaktivite Şiddeti ve İmmüno lokalizasyon Sonuçları (n:10).....	56
Tablo 13. Basit-Atipisiz Endometriyal Hiperplazi Örneklerinde anti-EZH2 Primer Antikoru İmmünoreaktivite Şiddeti ve İmmüno lokalizasyon Sonuçları (n:10)	58
Tablo 14. Kompleks-Atipili Endometriyal Hiperplazi Örneklerinde anti-EZH2 Primer Antikoru İmmünoreaktivite Şiddeti ve İmmüno lokalizasyon Sonuçları (n:10).....	60
Tablo 15. Tip I Endometriyal Adenokanser Örneklerinde anti-EZH2 Primer Antikoru İmmünoreaktivite Şiddeti ve İmmüno lokalizasyon Sonuçları (n:10)	62
Tablo 16. Tip II Endometriyal Adenokanser Örneklerinde anti-EZH2 Primer Antikoru İmmünoreaktivite Şiddeti ve İmmüno lokalizasyon Sonuçları (n:10)	64
Grafik 1. Ishikawa ve MFE-319 (ACC423) İnsan Endometriyum Adenokanser Hücrelerinin Anti-EZH2 Primer Antikoru İle Elde Edilen H-Skor Sonuçlarının İstatistiksel Karşılaştırmaları.....	49
Grafik 2. Normal Endometriyum, Endometriyal Hiperplazi ve Endometriyum Kanseri Örneklerinde Anti-EZH2 Primer Antikoru İle Elde Edilen İmmünoreaktivite H-Skor Sonuçları	66
Grafik 3. Normal Endometriyum, Endometriyal Hiperplazi ve Endometriyum Kanseri Örneklerinde TUNEL % İNDEKSİ Sonuçları	71

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Primordiyal Germ Hücrelerinin Farklanmamış Gonad Üzerine Etkileri	8
Şekil 2. Embriyonik Gelişim Evrelerinde Over ve Genital Kanallar	9
Şekil 3. Uterus'un Anatomik Yapısı	12
Şekil 4. Uterusun Histolojik Yapısı	13
Şekil 5. Uterus Endometriyumunun Histolojik Yapısı	13
Şekil 6. Endometriyum Kanseri İlişkin Belirlenen Risk Faktörleri	18
Şekil 7. 2010 FIGO Evreleme Sistemine Göre Endometriyum Kanseri Evrelemesine Ait Şematik Görüntüler	20
Şekil 8. PRC2 Kompleksinin Bileşenleri (Tan ve ark. 2014).	23
Şekil 9. EZH2 Hiperaktivasyonu ve Kanseler (Tan ve ark. 2014).	24

RESİMLER LİSTESİ

Resim 1. Ishikawa (A-C) Ve MFE-319 (ACC423) (D-F) İnsan Endometriyum Adenokanser Hücre Hatlarının İnverted Mikroskop Görüntüleri.	45
Resim 2. Ishikawa Ve MFE-319 (ACC423) İnsan Endometriyum Adenokanser Hücrelerinin Anti-EZH2 Primer Antikoru İle İndirek İmmunohistokimyasal Yöntemle Elde Edilen İmmunoreaktivite Boyanma Görüntüleri	47
Resim 3. Ishikawa Ve MFE-319 (ACC423) İnsan Endometriyal Adenokanser Hücre Hatlarında Western Blotting Yöntemi Sonuçları.	50
Resim 4. Proliferasyon (A-B) ve Sekresyon (C-D) Evrelerinde Alınan Endometriyum Örneklerinin H&E Boyalı Preperatlarının Işık Mikroskopik Görüntüleri	51
Resim 5. Basit- Atipisiz (A-B) ve Kompleks-Atipili (C-D) Endometriyal Hiperplazi Tanısı Alan Endometriyum Örneklerinin H&E Boyalı Preperatlarının Işık Mikroskopik Görüntüleri.	52
Resim 6. Tip I Endometriyal Adenokanser (A-B) ve Tip II Endometriyal Adenokanser (C-D) Tanısı Alan Endometriyum Örneklerinin H&E Boyalı Preperatlarının Işık Mikroskopik Görüntüleri.	53
Resim 7. Proliferasyon Evresinde Alınan Normal Endometriyum Örneklerinde Anti-EZH2 Primer Antikoru İle İndirek İmmunohistokimyasal Yöntemle Boyalı Preperatlarının Işık Mikroskopik Görüntüleri.	55
Resim 8. Sekresyon Evresinde Alınan Normal Endometriyum Örneklerinde Anti-EZH2 Primer Antikoru İle İndirek İmmunohistokimyasal Yöntemle Boyalı Preperatlarının Işık Mikroskopik Görüntüleri.	57
Resim 9. Basit-Atipisiz Endometriyal Hiperplazi Örneklerinde Anti-EZH2 Primer Antikoru İle İndirek İmmunohistokimyasal Yöntemle Boyalı Preperatlarının Işık Mikroskopik Görüntüleri.	59
Resim 10. Kompleks-Atipili Endometriyal Hiperplazi Örneklerinde Anti-EZH2 Primer Antikoru İle İndirek İmmunohistokimyasal Yöntemle Boyalı Preperatlarının Işık Mikroskopik Görüntüleri.	61
Resim 11. Resim 11. Tip I Endometriyal Adenokanser Örneklerinde Anti-EZH2 Primer Antikoru İle İndirek İmmunohistokimyasal Yöntemle Boyalı Preperatlarının Işık Mikroskopik Görüntüleri.	63

Resim 12. Tip II endometriyal adenokanser örneklerinde anti-EZH2 primer antikoru ile indirek immunohistokimyasal yöntemle boyalı preperatlarının ışık mikroskopik görüntüleri.	65
Resim 13. Proliferasyon (A-B) ve Sekresyon (C-D) Evrelerinde Alınan Endometriyum Örneklerinin TUNEL Yöntemi İle Boyalı Preperatlarının Işık Mikroskopik Görüntüleri. ...	68
Resim 14. Basit- Atipisiz (A-B) ve Kompleks-Atipili (C-D) Endometriyal Hiperplazi Tanısı Alan Endometriyum Örneklerinin TUNEL Yöntemi İle Boyalı Preperatlarının Işık Mikroskopik Görüntüleri.	69
Resim 15. Tip I Endometriyal Adenokanser (A-B) ve Tip II Endometriyal Adenokanser (C-D) Tanısı Alan Endometriyum Örneklerinin TUNEL Boyalı Preperatlarının Işık Mikroskopik Görüntüleri. TUNEL pozitif hücreler kahverengi olarak izlenmektedir.	70

KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ

Adipocyte Enhancer-Binding Protein	AEBP2
Amerika Birleşik Devletleri	ABD
Basit Atipisiz Endometriyal Hiperplazi	BAEH
Diabetes Mellitus	DM
Endometriyal Adenokanser Tip I	ECAI
Endometriyal Adenokanser Tip II	ECAII
End-to-end distance	EED
Enhancer of Zeste Homolog 1	EZH1
Enhancer of Zeste Homolog-2	EZH2
Folikül Uyarıcı Hormon	FSH
Guanine Nucleotide Exchange Factor	VAV1
Histon 3 lizin 27 metil	H3K27me3
Hormon Replasman Tedavisi	HRT
Kompleks Atipili Endometriyal Hiperplazi	KAEH
Lutein Hormon	LH
mikroRNA	miRNA
Policomb - Grup Protein	PcG
Polycomb Repressive Complex-1	PRC1
Polycomb Repressive Complex-2	PRC2
Primordiyal Germ Hücresi	PGH
Proliferasyon Evresi	PE
Sekresyon Evresi	SE
Supressor of Zeste Homolog 12	SUZ12
Uluslararası Jinekoloji ve Onkoloji Federasyonu	FIGO
X'e Bağlı Nükleer Protein	XNP

İÇİNDEKİLER

1.ÖZET	1
2.SUMMARY	2
3. GİRİŞ	3
4. GENEL BİLGİLER	7
4.1. Uterus Gelişimi ve Histolojisi.....	7
4.1.1. Uterus Gelişimi	7
4.1.2. Uterus anomalileri.....	10
4.1.3. Uterus Anatomisi ve Histolojisi:.....	11
4.1.4. Menstrüel Siklus.....	15
4.2. Endometriyum Kanseri	16
4.2.1. Genel özellikleri	16
4.2.2. Endometriyum Kanseri Tipleri	17
4.2.3. Risk faktörleri.....	17
4.2.4. Evrelendirme	19
4.2.5. Tanı kriterleri	20
4.3. EZH-2 proteini	21
4.3.1. Genel özellikleri.....	21
4.3.2. Kanserde EZH-2 proteini	24
4.3.3. Endometriyum kanserinde EZH-2	25
5. GEREÇ ve YÖNTEM	27
5.1. İn vitro İnsan Endometriyum Adenokanser Hücre Hatlarının Hücre Kültürü	28
5.2. Hücreler için İndirekt İmmünohistokimya Protokolü	29
5.3. Western Blotting Yöntemi	32
5.4. Doku Örneklerinin Alınması ve Parafin Doku Takibi	35
5.5. Histokimyasal Değerlendirme.....	37
5.5.1. Hematoksilen & Eozin Boyama.....	37

5.6. Avidin- Biotin Peroksidaz Yöntemi ile İndirek İmmunohistokimya (İHK)	38
5.7. TUNEL Yöntemi.....	41
6. BULGULAR	43
6.1. Hücre Kültürü Bulguları	43
6.1.1. Endometriyum Adenokanser Hücre Hatlarının İndirek İmmunohistokimya Boyamaları	46
6.2. Western Blotting Bulguları	50
6.2.1. Ishikawa ve MFE-319 (ACC423) İnsan Endometriyum Adenokanser Hücre Hatlarında EZH2 Protein Tayini	50
6.3. Histopatolojik Değerlendirme Bulguları	51
6.4. İmmunohistokimyasal Değerlendirme Bulguları	54
6.5. TUNEL Yöntemi Bulguları.....	67
7.TARTIŞMA	72
8.SONUÇ VE ÖNERİLER	81
9.KAYNAKLAR	83
10.EKLER/ YEREL ETİK KURULLAR	90
11.ÖZGEÇMİŞ	92

Başlık: Normal Endometriyum, Endometriyal Hiperplazi ve Endometriyum Kanserlerinde EZH2 Proteininin Moleküler Yöntemlerle Değerlendirilmesi

Öğrencinin adı: Oya KORKMAZ

Danışman: Prof. Dr. V. Sevinç İNAN

Anabilim Dalı: Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

1. ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, malignite açısından iki farklı insan endometriyum kanser hücre hatları ile normal endometriyum, endometriyal hiperplazi ve endometriyum kanserlerinde Enhancer of Zeste Homolog-2 (EZH2)'nin rolünün araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: İnsan endometriyum kanseri hücre hatları Ishikawa ve MFE-319 (ACC-423) ile; normal endometriyum, endometriyal hiperplazi ve endometriyal adenokarsinom örneklerinde EZH2 proteininin indirek immunohistokimyasal ve Western blotting yöntemleri ile değerlendirilmesi yapılmıştır. TUNEL yöntemi ile % apoptotik indeksler belirlenmiştir. EZH2 proteininin immunoreaktivite boyanmaları hafif (1), orta (2), şiddetli (3) ve çok şiddetli (4) olarak belirlenmiştir. Boyanan hücre sayıları % olarak sayılıp, boyanma şiddetleri ile H-skor elde edilerek, sonuçlar One-way ANOVA istatistiksel testi ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. $P < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Bulgular: Çalışmada, malignite açısından farklı iki insan endometriyum kanser hücre hattı EZH2 immunoreaktivitesi açısından karşılaştırmalı olarak değerlendirildiğinde; agresif olan MFE-319 insan endometriyum hücre hattında çok şiddetli (4) gözlenirken, Ishikawa hücrelerinde hafif/orta (1/2) olarak izlenmiştir ($p < 0,05$). Histopatolojik değerlendirmenin ardından endometriyum örneklerinde EZH2 immunoreaktivitesi değerlendirildiğinde, normal endometriyumdan hiperplaziye geçiş ve endometriyal hiperplaziden karsinogeneze geçiş süreçlerinde istatistiksel olarak anlamlı artmış EZH2 immunoreaktivitesi izlenmiştir. % TUNEL indeksleri değerlendirildiğinde kanser gelişiminin ileri evrelerinde TUNEL pozitif hücre sayılarında istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu belirlenmiştir. Western Blotting yöntemi ile EZH2 proteini varlığı insan endometriyum kanser hücre hatlarında saptanmıştır.

Sonuç: Malignite yönünden farklı iki farklı insan endometriyum kanser hattında ve normal endometriyumdan, endometriyal hiperplaziye ve karsinogenez sürecinde EZH2 proteininin prognostik faktör ve kanser tedavisinde hedef molekül olarak önemi ortaya konulmuştur.

Anahtar Kelimeler: EZH2, endometriyum hiperplazisi, endometriyum kanseri, immunohistokimya, western blotting, TUNEL

Title: Investigating of the EZH2 Protein in Normal Endometrium, Endometrial Hyperplasia and Endometrium Cancers with the Molecular Methods.

Student name: Oya KORKMAZ

Supervisor: Professor Doctor V. Sevinc INAN

Department: Histology and Embryology Department

2. SUMMARY

Objective: The aim of this study, in terms of malignity, is to investigate the Enhancer of Zeste Homolog-2 (EZH2)'s role in two different human endometrium cancer cell lines and in the normal endometrium, endometrial hyperplasia and endometrium cancers.

Material and methods: On the human endometrium cancer cell lines Ishikawa and MFE-319 (ACC-423); normal endometrium, endometrial hyperplasia and endometrial adenocarcinoma samples, the evaluation of EZH2 protein was made with the indirect immunohistochemical and Western blotting methods. With the TUNEL method, the percentage of apoptotic indexes was evaluated. The immunoreactivity staining of the EZH2 protein was detected as light (1), medium (2), strong (3) and very strong (4). Stained cell numbers were counted as percent rate, with the staining intensity, the H-score was obtained, and then the results were evaluated by using the One-way ANOVA statistical test in a comparative manner. $P < 0,05$ was accepted as significant.

Results: In this study, the two different human endometrial cell lines were evaluated comparatively with the EZH2 immunoreactivity in terms of malignity. The aggressive MFE319 human endometrium cell line was strongly (4) stained, meanwhile the Ishikawa cells were stained as light/medium (1/2) degrees ($p < 0,05$). After the histopathologic evaluation, when the EZH2 immunoreactivity was evaluated in the endometrium samples, at the transition at normal endometrium to hyperplasia and at the transition of endometrial hyperplasia to carcinogenesis process; statistically increased EZH2 immunoreactivity was observed. When the percent of TUNEL indexes were evaluated, at the later stage of cancer progression, TUNEL positive cell numbers increased in a statistically significant manner. With the Western Blotting method, EZH2 protein presence was detected at the human cell lines.

Conclusion: In the two different human endometrium cancer cell lines that differ in the way of malignity and from the normal endometrium to endometrial hyperplasia to the carcinogenesis process; the significance of the EZH2 protein was revealed as a prognostic factor and as a target molecule in cancer treatment.

Keywords: EZH2 protein, endometrial cancer, endometrial hyperplasia, immunohistochemistry, Western Blotting, TUNEL

3. GİRİŞ

Kanser; tıp alanındaki büyük ilerlemelere rağmen, hala her toplum için önemli bir sağlık sorunu olma özelliğinde olup, insan sağlık sistemi üzerinde sosyal ve ekonomik etkileri olan önemli bir problemdir. Teşhis, korunma yöntemleri ve tedavilerdeki gelişimlere rağmen bu hastalık dünyada çoğu hastayı olumsuz yönde etkilemekte, yaşam kalitesini düşürmekte ve dünyadaki ölüm nedenlerinin başında gelmektedir (Davoudi ve ark. 2013).

Endometriyum kanseri, gelişmiş ülkelerde en sık görülen jinekolojik kanserler arasında dördüncü sırada yer almaktadır (Burke ve ark. 2014). En sık 55-65 yaş arasında görülür ve 40 yaşın altında nadirdir.

Endometriyum kanseri, etiyolojik ve klinik bulgularına göre Tip 1 ve Tip 2 olarak sınıflandırılmaktadır. Tip 1 endometriyum kanseri, östrojen bağımlı olup, olguların % 80-90'ını oluşturmakta, menopoza öncesi ve peri-menopoz dönemindeki kadınlarda daha sıklıkla rastlanmaktadır. Tip 2 endometriyum kanseri ise östrojenden bağımsız olup, olguların % 10-20'sini oluşturmakta, post-menopoz dönemindeki kadınlarda ve atrofik endometriyum zemininde gelişmektedir (Zhou ve ark. 2013).

Endometriyum kanseri için en iyi bilinen risk faktörleri aşağıda belirtilmiştir:

- ✓ Obezite
- ✓ Adrenal veya over kökenli öncüllerin yağ depolarında östrojene dönüşmeleri
- ✓ Diyabet
- ✓ Hipertansiyon
- ✓ İnfertilite: doğum yapmamış ve sıklıkla anovulatuvar siklus içeren kadınlar.

Bu risk faktörlerinden bazıları artmış östrojen uyarısını işaret eder gerçekten de süresi ve dozajına bağımlı uzun süreli östrojen replasman tedavisi ve östrojen salgılayan over tümörleri kanser gelişim riskini artırmaktadırlar (Robins ve ark. 2011).

Menstrüel siklus, 28 günde östrojen ve progesteron etkisi ile gerçekleşmektedir. Siklusun proliferasyon evresinde, ovaryumdan salgılanan östrojenin etkisi altında endometriyumun fonksiyonel tabakası kalınlaşır, uterus bezleri uzar ve yüzeye doğru düz olarak ilerler. Kıvrıntılı (spiral) arterler endometriyumun derin bölgelerinde görülür (Rosai 2004).

Menstrüel siklusun sekresyon evresi, olgun folikülün ovulasyonundan sonra başlar. Endometriyumdaki ek değişiklikler, aktif korpus luteum tarafından salgılanan östrojen ve progesteronun etkisi ile olmaktadır. Sonuç olarak, endometriyumun fonksiyonel ve bazal tabakaları, lamina propriyadaki artmış salgı bezlerinin sekresyonları ve ödem nedeniyle kalınlaşır.

Progesteron düzeyine göre rölatif östrojen fazlalığı, belirgin olarak veya uzun süre endometriyumu etkilerse endometriyumda pre-neoplastik olabilecek hiperplazi meydana gelir.

Hiperplazinin şiddetine göre, yapısal değişim ve sitolojik atipi bulguları göz önünde bulundurularak basit hiperplazi, kompleks hiperplazi ve atipik hiperplazi olarak sınıflandırılır. Bu üç kategori aşırı östrojenin seviyesi ve süresine bağlı olarak ardışık düzen gösterir. Zamanla hiperplazi, östrojen varlığına gereksinim duymaksızın bağımsız olarak çoğalmaya devam eder (Robins ve ark. 2011).

Kanser gelişim riski hiperplastik değişikliklerin şiddetine ve hücresel atipiyeye bağlıdır. Her aşırı östrojen seviyesi endometriyal hiperplaziye neden olabilir. Potansiyel katkı yapan etkenler arasında, menopoza döneminde izlenen ovulasyon yetmezliği; progestin ile dengelenmeyen uzamış östrojenik steroid uygulanması; östrojen üreten polikistik overler gibi over lezyonları; kortikal stromal hiperplazi; overin granüloza-teka hücreli tümörü bulunmaktadır. Atipik hiperplazi saptanması durumunda, olgu kanser varlığı açısından dikkatle değerlendirilmeli ve yinelenen endometriyal biopsiler ile izlenmelidir.

Endometriyal hiperplazi ve kanser gelişiminde hormonal faktörlerin etkisiyle hücre çoğalması, farklılaşması ve göçünde moleküler hücre sinyal yolları ve transkripsiyon faktörleri önemli rol oynamaktadır. Hücreye iletilen çeşitli faktörlerin etkisi sonucunda sitoplazmik sinyal kaskadı başlamakta ve bu etki hücre çekirdeğine iletilerek transkripsiyon etkilenmektedir.

Hücre çoğalması üzerinde etkili sinyal faktörleri arasında yer alan ve son yıllarda kanser gelişim sürecinde etkili olabileceği belirtilen Enhancer of Zeste Homolog-2 (EZH2) proteini, 7q35 üzerinde EZH2 gen lokusunda bulunan, polycomb- (PcG) grubuna ait bir proteindir (Yamaguchi ve Hung 2014). PcG ailesi üyeleri, hücre çoğalması sürecinde kromatin düzenlenmesini kontrol ederek, baskılayıcı transkripsiyonel genlerden sorumlu multimerik protein kompleksini oluştururlar.

EZH2 proteini, Polycomb Repressive Complex-2 (PRC2)'nin bir enzimatik alt-birimidir. Histon 3 lizin 27 metillenmesini (H3K27me3) indükleyen ve spesifik gen transkripsiyonunu susturan epigenetik bir düzenleyicidir. Böylece kromatin kondansasyonuna yol açmaktadır (Yamaguchi ve Hung 2014; Xu ve ark. 2016).

EZH2'nin ekspresyonu çeşitli onkojenik transkripsiyon faktörleri, tümör baskılayıcı mikroRNA (miRNA)'lar ve kanserle ilişkili kodlayıcı olmayan RNA'lar ile düzenlenir. Ayrıca EZH2 aktivitesi kanserde düzenlenmesi bozulan post-translasyonel modifikasyonlar tarafından kontrol edilir.

Normalde, EZH-2 proteini, miRNA-101, EZH2 için kodlanan mRNA translasyonunu inhibe etmektedir (Yamaguchi ve Hung 2014). Bu mikro RNA genin kaybı, EZH2'nin üretiminin artmasına yol açmaktadır.

EZH-2 proteini, embriyonik ektoderm gelişimi, VAV1 (VAV1 Guanine Nucleotide Exchange Factor-VAV1 Guanin Nükleotid Değişim Faktörü) onkoproteini ve X'e bağlı nükleer protein (XNP) ile ilişkili bir proteindir. Hematopoetik ve santral sinir sistemlerinin gelişimleri üzerinde de önemli rol oynamaktadır. EZH2 gen mutasyonunun kafa kemik yapısı ve farklı nörolojik sistem bozuklukları ile seyreden Weaver sendromuna yol açtığı gösterilmiştir.

Histon metilasyonunun artışının tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonlarının susturulmasına neden olmasından dolayı, EZH2'nin artmış ekspresyonunun kanser gelişiminde önemli rol oynayabileceği ileri sürülmektedir. EZH2'nin kanseri başlatması, geliştirmesi, ilerletmesi, metastaz ve ilaç direncinde önemli rol oynayabileceğine yönelik çalışmalar önem kazanmıştır (Kim ve Robert 2016).

Prostat (Yang ve Yu 2013), deri (Collett ve ark. 2006; Ougolkov ve ark. 2008) ve meme (Bachmann ve ark. 2006; Wang ve ark. 2012) karsinomalarında, EZH2'nin artmış ekspresyonu çeşitli moleküler yöntemlerle gösterilmiştir. EZH2-hedefleyen ilaçların beyin ve prostat kanserlerinde ilerlemeyi inhibe ettiğine yönelik olarak pre-klinik çalışmalar devam etmektedir (Wang ve ark. 2012).

Bu çalışmada, EZH2 proteininin malignite açısından iki farklı insan endometriyum kanseri hücre hattında ve proliferasyon ve sekresyon evrelerinde alınan normal endometriyum, basit-atipisiz endometriyal hiperplazi, kompleks-atipili endometriyal hiperplazi, Tip I endometriyal adenokarsinom, Tip II endometriyal adenokarsinom örneklerinde karşılaştırmalı olarak araştırılması amaçlanmıştır.

Formalin ile tespit edilerek parafine gömülen patolojik doku örneklerinde histopatolojik değerlendirmenin ardından EZH2 proteininin indirek immunohistokimyasal ve western blotting yöntemleri ile değerlendirilmesi ve TUNEL yöntemi ile apoptotik indekslerin belirlenmesi yapılmıştır. Sonuçlar One-way ANOVA istatistiksel testi ile değerlendirilerek; normal endometriyumdan hiperplaziye geçiş ve endometriyal hiperplaziden karsinogeneze geçiş süreçlerinde, EZH2 proteininin immunolokalizasyonu ve protein varlığı belirlenerek, bu süreçlerde EZH2 proteininin prognostik ve terapötik olası hedef molekül olarak önemi ortaya konmuştur.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Uterus Gelişimi ve Histolojisi

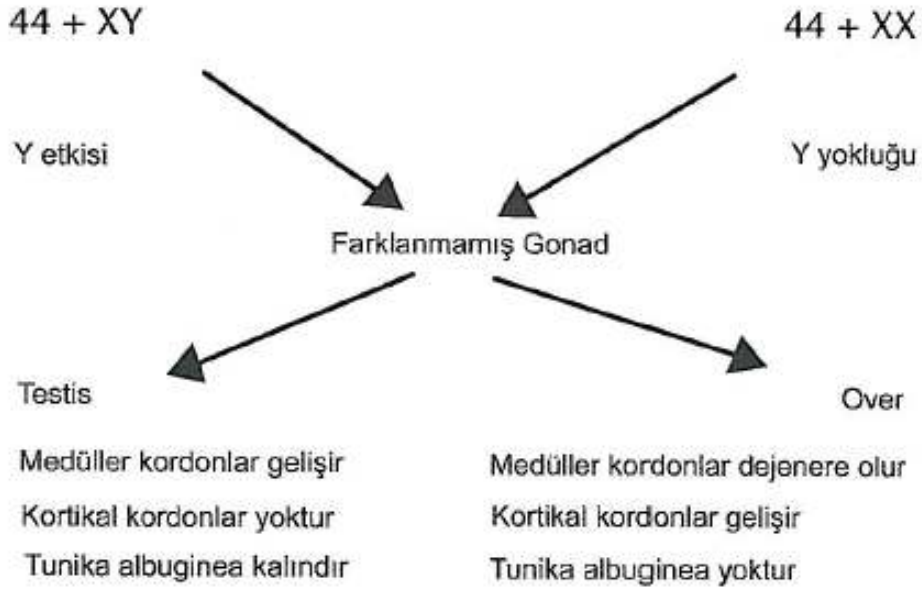
4.1.1. Uterus Gelişimi

Kadın üreme sisteminde, primordiyal germ hücreleri (PGH) ilk kez embriyonik gelişimin 2. haftası sonunda epiblast'tan farklı olarak ortaya çıkmaktadır. PGH'leri daha sonra vitellus kesesinin kaudal kısmında, allantoise yakın duvarında sayılarını arttırarak, dorsal mezenter boyunca çoğalarak ameboid hareketler ile göç ederler ve 5. hafta'da arka karın duvarındaki gonad taslaklarına ulaşırlar (McCluggage 2011; Moore 2008; Sadler 2011).

Gonad taslakları, 5 haftalık insan embriyosunda orta çizginin her iki yanında mezonefroza dorsal mezenter arasında yer alan bir çift çıkıntı olarak ortaya çıkarlar (McCluggage 2011; Moore 2008; Sadler 2011).

Beşinci haftanın başında, primitif gonadlara ulaşan PGH'lerinin indükleyici etkileri ile gonadlar gelişir. PGH'lerinin primitif gonadlara ulaşmalarından hemen önce genital sırttaki epitel hücreleri çoğalarak alttaki mezenşim içine gömülürler. Bunlar burada da primitif cinsiyet kordonları olarak adlandırılan düzensiz hücre topluluklarını oluştururlar. Yüzeyinde oldukça kalın bir kölom epiteli bulunmaktadır. Bu tabakanın altındaki mezenşim içerisinde kölom epiteli altında ve cinsiyet kordonları arasında çok sayıda PGH bulunur. Gelişimin bu döneminden 7. haftaya kadar erkek ve dişi gonadlar birbirlerinden ayrılamadıklarından bu dönem “farklılaşmamış gonad” olarak tanımlanır (McCluggage 2011; Moore 2008; Sadler 2011).

Embriyonun cinsiyetinin fertilizasyon sırasında belirlendiği ve tümüyle spermatositin X veya Y kromozomuna sahip olmamasına bağlı olduğu söylenebilir. XX cinsiyet kromozomuna sahip bir embriyoda, primitif germ hücresi grupları içeren düzensiz kümeler, overin meduller bölgesinde yerleşmişlerdir. Bu hücre kümeleri bir süre sonra, kaybolarak yerlerini vasküler bir stromaya (ovarian medulla) bırakırlar (16). Kadın üreme sisteminde gonadın yüzey epiteli, çoğalmaya devam eder. Yedinci haftada bu epitelden kortikal kordonlar adı verilen ikinci nesil kordonlar gelişir. Kortikal kordonlar altlarındaki mezenşimin içine gömülürler ancak, yüzeye yakın kalmaya devam ederler. Dördüncü ayda, bu kordonlar izole hücre kümelerine ayrılırlar (**Şekil 1**).



Şekil 1. Primordiyal Germ Hücrelerinin Farklanmamış Gonad Üzerine Etkileri

Bu kümelerdeki hücreler çoğalmaya devam eder ve her oogoniumun etrafını folliküler hücreler denilen bir epitel hücresi tabakasıyla sararlar. Folliküler hücreler oogoniumlarla birlikte primordiyal follikülü meydana getirir.

Altıncı haftada hem erkek hem dişi embriyolarında iki çift genital kanal oluşmaktadır (Şekil 2).

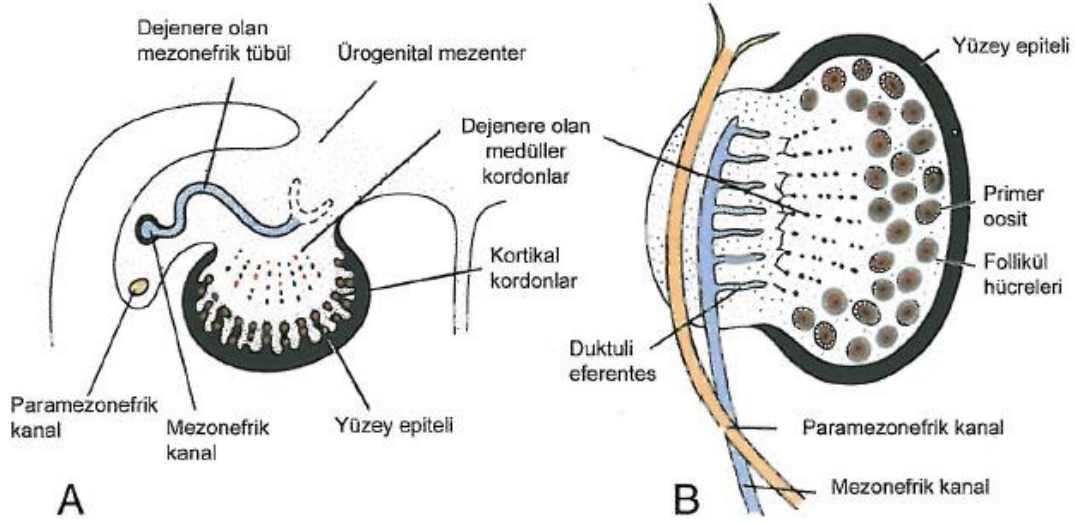
1. Mezonefrik kanal (Wolff kanalı) : Mezonefrozdaki kloakaya doğru uzanan kanaldır. Erkek üreme sistemi ile ilgili genital kanallar (duktus epididimis, duktus deferens) bu kanaldan gelişmektedir.

Paramezonefrik kanal (Müller kanalı) : Kölom epitelinin ürogenital ön-dış yan yüzeyi üzerinde ve Wolff kanalına paralel uzanır (McCluggage 2011; Moore 2008; Sadler 2011).

2. Kanal, karın boşluğuna kranial ucundan huni benzeri bir yapıyla açılır.

Dişilerde ana genital kanallar paramezonefrik kanallardan gelişir. Başlangıçta her kanalda tanımlanabilir üç kısım vardır. Bunlar;

- a) Karın boşluğuna açılan kranial vertikal parça
- b) Mezonefrik kanalları çaprazlayan horizontal kısım
- c) Karşı taraftan gelen eşiyile birleşen kaudal vertikal kısım



Şekil 2. Embriyonik Gelişim Evrelerinde Over ve Genital Kanallar

A. Gelişimin 7. haftasındaki bir overden geçen ve primitif (medullar) cinsiyet kordonlarının dejenerasyonunu ve kortikal kordonların oluşumunun gösterildiği transvers kesit ; B. Gelişimin 5. ayında over ve genital kanallar.

Overlerin aşağı inişiyle birlikte ilk iki kısımdan uterus tüpleri (fallop tüpleri) gelişir. Kaudal yönde, önce mezonefrik kanalın lateralinde seyrederek, ardından onu önden çaprazladıktan sonra kaudo-medial yönde büyümeye devam eder. Orta hatta, karşı tarafın paramezonefrik kanalıyla temas geçer. Başlangıçta bir septumla birbirinden ayrılmış olan bu iki kanal, daha sonra birleşerek uterus kanalını oluşturur. Kanallar orta hatta birleştikten sonra, pelvis içinde transvers katlantı oluşur. Birbirleriyle kaynaşmış paramezonefrik kanalların lateralinden, pelvis duvarlarına doğru uzanan bu katlantı uterusun broad ligamentidir. Bu ligamentin üst sınırında uterus tüpleri, arka yüzünde de overler yer alır. Uterus ve broad ligamentler, pelvisi uterorektal poş ve uterovesikal poş şeklinde ikiye böler. Kaynaşan paramezonefrik kanallardan uterusun korpusu ve serviksi gelişir. Bunların etrafı uterusun musküler tabakasını (miyometriyumu) ve peritoneal örtüsünü (perimetrium) meydana getiren bir mezenşim tabakasıyla sarılır (Sadler 2011).

Paramezonefrik kanal, ürogenital sırtın anterolateral yüzeyindeki epitelin uzunlamasına bir invajinasyonu şeklinde ortaya çıkar (Şekil 2). Kanal, karın boşluğuna kranial ucundan huni benzeri bir yapıyla açılır.

Birleşen kanalların kaudal ucu, ürogenital sinusun arka duvarına doğru ilerleyerek paramezonefrik veya müllerian tüberkül denilen küçük bir şişlik oluştururlar. Mezonefrik kanallar, ürogenital sinusa müllerian tüberkülün iki yanından açılırlar (Moore 2008; Sadler 2011). WNT4 bir over belirleyici gendir. Bu gen, nükleer hormon reseptör ailesinin bir üyesi olan ve SOX9'un işlevini inhibe etme özelliğine sahip DAX1'i aktive eder. Ayrıca WNT4 de overin diferansiyasyonundan sorumlu olan hedef genlerin ekspresyonunu kontrol eder. Hedef genlerden biri TAFII105 geni olabilir. Overin folliküler hücrelerinde bu genin protein ürünü, RNA'nın TATA bağlayan proteini için bir alt üründür (Sadler 2011). Cinsiyet farklanmasında östrojenlerin de rolü vardır. Paramezonefrik kanallardan östrojenlerin etkisiyle fallop tüpleri, uterus, serviks ve vajenin üst kısımları meydana gelmektedir. Östrojenler aynı zamanda dış genital organlar üzerinde de etkili olarak labia majör, labia minör, klitoris ve vajenin alt kısımlarının gelişmesine de katkıda bulunmaktadır.

Sonuç olarak; tuba uterinale, uterus ve vajinanın üst bölümü, uterusun sağ ve sol düz ligamentleri, rekto-uterin kese ve veziko-uterin kese Müller kanalından gelişirken (Moore 2008), endometriyal stroma ve myometriyum ise splanknik mezenkimden (McCluggage 2011; Moore 2008; Sadler 2011). Gebeliğin 20. haftasına kadar endometriyum, tek katlı prizmatik epitel ile döşelidir ve epitel altında kalın bir fibröz stroma ile desteklenir. 20. haftadan sonra yüzey epiteli stromaya invazyon göstererek myometriyuma doğru yayılan glandüler yapıları oluşturur, gelişim 24. haftada tamamlanır (McCluggage 2011; Moore 2008; Sadler 2011).

4.1.2. Uterus anomalileri

Uterus duplikasyonları, paramezonefrik kanalların uzunlukları boyunca veya herhangi bir bölgesinde kaynaşmalarını sonucu oluşur. En şiddetli formu olan **uterus didelfis**'te iki uterus vardır. En hafif formu ise, **uterus arkuatus** olarak bilinen uterus korpusunun ortasından lümen içine doğru hafif bir çıkıntının olduğu durumudur (Sadler 2011).

Sık görülen uterus anomalilerinden biri de, uterusun ortak bir vajene iki boynuz şeklinde açıldığı **uterus bikornistir**. Bu anomali primatların altında yer alan memelilerin bir çoğunda normal bir durumdur (Sadler 2011).

Paramezonefrik kanallardan birinin tam veya kısmen atrezik olduğu durumlarda rudimenter parça genellikle vajene açılmadığından buna bağlı komplikasyonlar görülebilir. Bir rudimenter boynuza sahip uterusu **uterus bikornis unikollis** denir (Sadler 2011).

4.1.3. Uterus Anatomisi ve Histolojisi:

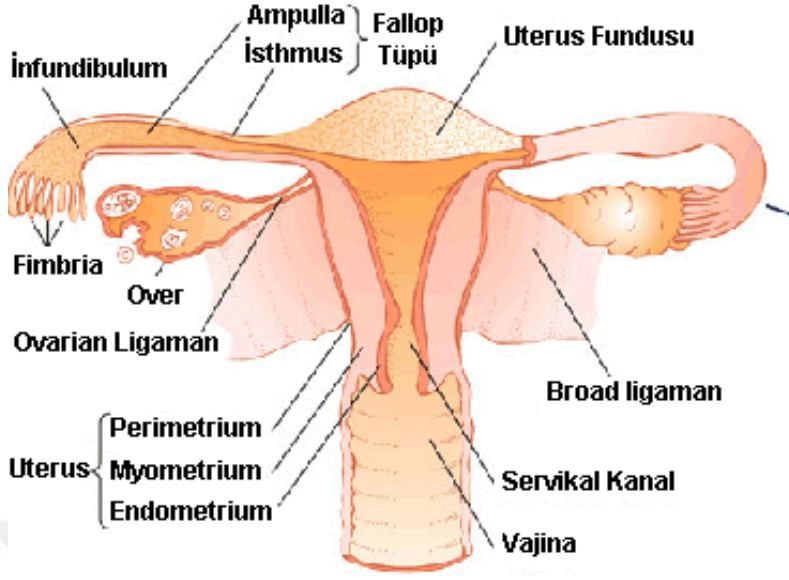
Pelviste mesane ile rektum arasında bulunan uterus, kalın müsküler duvarlı, içi boş, armut şeklinde bir organdır (McCluggage 2011; Ovale ve Nahirney 2009; Bentley ve ark 2009). Pelvik peritonla sarılmış round ligament ve utero-ovarian ligament’ler ile desteklenir (14). Doğum yapmamış kadınlarda yaklaşık 30-40 gr ağırlığında, 7,5 cm uzunluğundadır.

Üretkenlik ağında normal bir uterusun boyutları ve ağırlığı gebeliğe göre oldukça değişkenlik gösterir (McCluggage 2011). Lmeni tuba uterinalar ile devam eder (Ross ve Pawlina 2014).

Yapı ve fonksiyon bakımından incelediğinde korpus ve serviks olmak üzere iki ana kısma ayrılmaktadır. İkiisi arasındaki daralmış kısma isthmus adı verilmektedir (Rosai 2011; Bentley ve ark 2009; Dere 1994). (**Şekil 3**).

Korpus, uterusun büyük üst kısmıdır. Anterior yüzeyi düz, posterior yüzeyi konvektir. Gövdenin tuba uterina bağlantısının üstünde genişleyen yuvarlak parçası fundus olarak adlandırılmaktadır (Ross ve Pawlina 2014).

Serviks, uterusun alttaki silindir biçimli kısmıdır ve istmus tarafından uterusun gövdesinden ayrılmaktadır. Serviksin lümeni olan servikal kanal, her iki ucunda dar açıklıklara sahiptir. Fibromüsküler bir bileşke olan internal os, uterus boşluğuna açılır ve uterusun müsküler yapıdaki korpusunu fibröz yapıdaki serviksten ayırır (McCluggage 2011). Eksternal os ise vajinaya açılır (Ovale ve Nahirney 2009; Ross ve Pawlina 2014). Bu alanda yer alan endoservikal bezlerin salgılama etkinliği östrojenler tarafından düzenlenir ve ovulasyon zamanı salgılama en yüksek düzeyine ulaşır. Bezlerin salgısı, cinsel ilişki sırasında vajinayı kayganlaştırır ve bakterilerin uterus boşluğuna geçmesini engelleyen koruyucu bir bariyer olarak işlev görür (Kierszenbaum 2006).

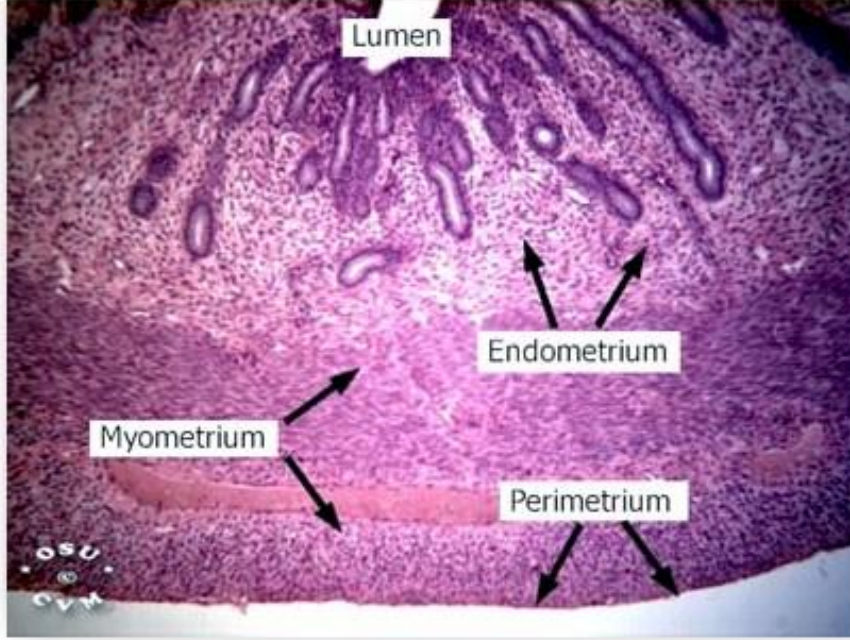


Şekil 3. Uterus'un Anatomik Yapısı

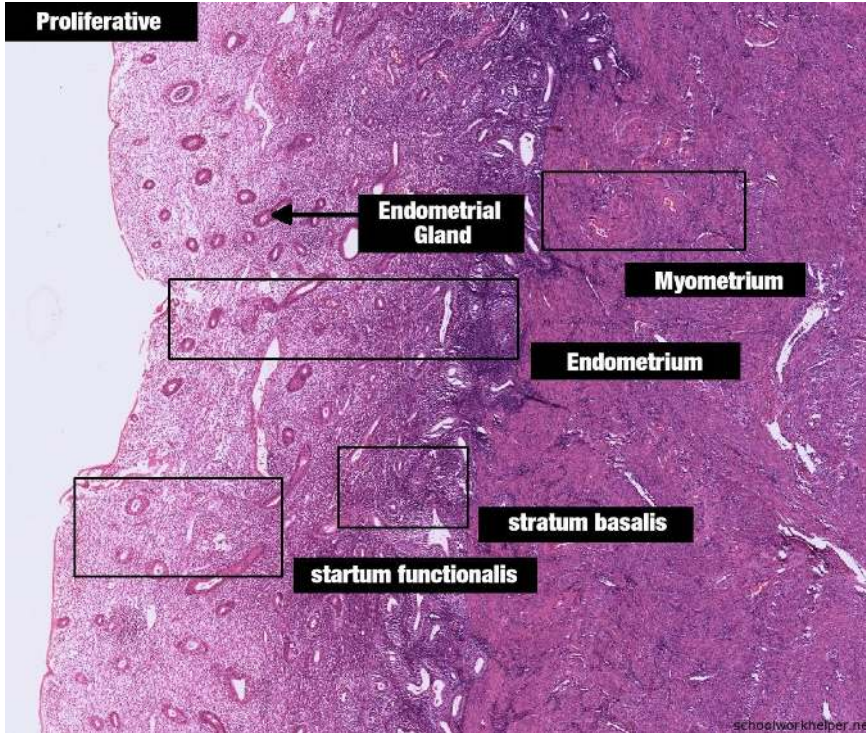
Uterus, histolojik olarak endometriyum, miyometriyum ve perimetriyum (adventisya, seroza) olmak üzere üç tabakadan oluşur (Şekil 4).

Endometriyum: Uterusun en iç tabakası olan endometriyum, tek sıralı kinosilyalı prizmatik yüzey epiteli, basit tübüler yapıdaki uterus bezleri ve hücreden son derece zengin stroma kısmı olan lamina propriya'dan oluşur. Endometriyum her ay fertilize bir ovumun implantasyonu ve beslenmesi için hazırlanır (Ovale ve Nahirney 2009; Ross ve Pawlina 2014). Endometriyum'un üst 2/3 kısmı stratum fonksiyonalis ismini alır, pars kompakta ve pars spongioza olarak iki kısımda incelenir (Şekil 5). Üretkenlik döneminde endometriyumun fonksiyonalis tabakası menstrüel siklus hormonların etkisi ile morfolojik değişikliklere uğrar. Endometriyum'un alt 1/3 kısmı ise stratum bazale olarak isimlendirilir ve endometriyal bezlerin ve arterlerin kök kısımlarını içerir (McCluggage 2011). Bu bazal kısmın özel kanlanması nedeniyle menstrasyonda dökülmeden kalarak yüzeysel tabakanın rejenerasyonunu sağlar. Endometriyumu besleyen kan damarları bu tabakanın büyük bir bölümünün periyodik olarak dökülmesinde özel bir öneme sahiptir. Arkuat arterler dairesel olarak miyometriyumun orta tabakalarında yerleşmiştir.

Bu damarlardan endometriyumu kanlandıran iki grup damar çıkar. Stratum bazalisi kanlandıran arterler düz arterler, stratum fonksiyoneli kanlandıran arterler spiral arterlerdir (Rosai 2011; Ovale ve Nahimey 2009).



Şekil 4. Uterusun Histolojik Yapısı



Şekil 5. Uterus Endometriyumunun Histolojik Yapısı

Miyometriyum, ortada yer alan ve en kalın tabakadır. Birbirine bağı düz kas demetlerinden oluşmuştur. Düz kas demetleri uterusun işlevi ile ilişkili olarak sınırları tam ayırt edilemeyen üç tabaka şeklinde düzenlenmiştir. İç ve dış tabakadaki hücreler genellikle longitudinal, orta tabakada yer alan hücreler ise oblik ve sirküler seyirlidir. Uterus kontraksiyonu süresince miyometriyumun 3 düz kas tabakası lümen içeriğini atmak için dar orifisin dışına doğru birlikte çalışır (Ovale ve Nahimey 2009). Miyometriyumu endometriyumdan ayıran submukoza bulunmaz (Ross ve Pawlina 2014).

Gebelik sırasında, miyometriyal düz kaslar büyür (hipertrofi) ve aynı zamanda sayıca artar (hiperplazi). Gebelik sırasında miyometriyal kontraksiyonların baskılanması, ovaryum ve plasentadan salgılanan bir peptit hormon olan relaksin'in kontrolü altındadır. Doğum sırasındaki miyometriyal kasılmalar ise nörohipofizden salgılanan bir peptit hormon olan oksitosin'in kontrolü altındadır (Kierszenbaum 2006).

Perimetriyum, uterusu kaplayan dış seröz tabaka olup, visseral periton'dan oluşur. Pelvik ve abdominal periton ile devam etmektedir. Tek sıralı yassı epitel olan mezotel ve ince bir gevşek bağ dokusu tabakasından meydana gelmektedir. Perimetriyum uterusun arka yüzeyini tamamen kaplarken ön yüzün yalnızca bir kısmını kaplar, geri kalan kısım bağ dokusu veya adventisyadan oluşur (Ross ve Pawlina 2014).

Uterus kanlanması menstrüel siklusun fizyolojisini düzenlemek üzere özellik gösterir. Uterin arterler her iki tarafta internal iliak arterin anterior dallarından köken alırlar, korpo-servikal bileşke bölgesinde uterusu ulaşırlar ve perimetriyumda uterus fundusuna doğru seyrederler. Uterin arterler serozanın hemen altında miyometriyum içerisine doğru uterusu çepeçevre kuşatan 6-10 adet arkuat artere dallanarak kan desteği sağlarlar. Arkuat arterlerden ayrılan radyal arterler, miyometriyumun iç kas tabakasının içine girerek bazal arterler ve spiral arterler olarak bilinen iki ayrı arter grubunu oluştururlar. Kısa ve düz olan bazal arterler endometriyumun bazal kısmının, spiral arterler ise fonksiyonel kısmının kan desteğini sağlarlar (Ovale ve Nahimey 2009; Dere 1994).

Uterusun lenfatikleri subserozal uterin pleksustan pelvik ve para-aortik lenf düğümlerine drene olurlar (Rosai 2011; McCluggage 2011; Dere 1994).

4.1.4. Menstrüel Siklus

Endometriyum tabakası menstrüel siklusun evrelerine göre değişiklik gösterir. Üreme çağındaki kadınlarda yaklaşık 28 gün sürer; ancak zamanla küçük değişiklikler olabilir. Menstrüel siklus, birbirini izleyen 3 evreden oluşur.

1. **Menstrüel evre:** Siklusun başlangıcı olan evredir. 4-5 gün sürer. Endometriyumun çoğalmış olan stratum fonksiyonalis tabakası dökülür. Yaklaşık 30-50 cc kan kaybedilir.
2. **Proliferasyon evresi (östrojenik ya da foliküler) evre:** Yaklaşık 9 gün sürer. Bu evre sırasında, Follikül Stimüle Edici Hormon (FSH) etkisiyle olgunlaşan ovaryum foliküllerinde üretilen östrojenin uyarıcı etkisiyle endometriyumun kalınlığı artar. Hem epitelde hem de lamina propriyadaki hücrelerde mitoz görülür. Basit tübüler bezlerin epitel hücreleri yukarıya doğru göç eder, bez giderek daralır ve kıvrımlı bir şekil alır (Kierszenbaum 2006).
3. **Sekresyon (progestasyonel) evre:** Luteinleştirici Hormon (LH) etkisiyle ovulasyonun olduğu 14. günden sonra, endometriyum yaklaşık 13 gün sürecek olan sekresyon evresine girer. Bu evre sırasında endometriyal bezler salgılama yapmaya başlar. Tübüler bezlerin dış sınırları düzensizleşmeye ve kıvrılmaya, döşeyici epitelde glikojen birikmeye başlar ve bez lümenini glikojen ve glikoproteinden zengin bir salgı doldurur. Endometriyal bezlere paralel seyreden damarların boyu uzar ve lamina propriyada çok miktarda sıvı birikir (ödem). Sekresyon evresi, korpus luteumda üretilen progesteron ve östrojen tarafından kontrol edilir (Kierszenbaum 2006).

Menstrüel siklusun sonunda, korpus luteumun gerilemesine bağlı olarak kandaki steroid hormonların azalması, iskemik evreyi tetikler. Normal kanlanmanın azalması aralıklı iskemiye başlatır ve bunu izleyen hipoksi, endometriyumun fonksiyonel tabakasında nekroza neden olur. Nekroze doku, menstrüel evrede dökülür. Gebelik olmuşsa, endometriyum lamina propriyasındaki stromal hücreler büyür ve artan progesteron düzeyine yanıt olarak lipid ve glikojen depolar. Bu endometriyal değişikliklere desidual reaksiyon denir (Kierszenbaum 2006).

4.2. Endometriyum Kanseri

4.2.1. Genel özellikleri

Kadın üreme sistemindeki kanserlerin görülme sıklığı ülkeden ülkeye değişiklik göstermektedir. Örneğin; serviks kanseri Brezilya, Hindistan, Japonya gibi ülkelerde en sık görülen kanser türüdür. Diğer yandan ABD, İsviçre, Kanada gibi ülkelerde görülüş sıklığı yönünden uterus ve korpus kanserleri daha ön sıralarda yer almaktadır. Kuzey Amerika ve Avrupa’da ise over kanseri daha ön sıralardadır.

Endometriyum kanseri, kadınlarda tüm kanserler arasında meme, akciğer ve kolorektal kanserlerden sonra 4. en sık görülen kanserdir. Kadınlarda kansere bağlı ölümlerin 8. en sık nedenidir. Gelişmiş ülkelerde ve ülkemizde endometriyum kanseri tüm kadın genital sistemi kanserlerinin arasında en sık görülen kanserdir, bunu over kanseri ve serviks kanseri izlemektedir (Bakkum-Gamez ve ark. 2008; Ferlay ve ark. 2012).

Endometriyum kanseri 40 yaşından önce nadir görülür, 55-65 yaş arasında görülme sıklığında artış gözlenir. Endometriyum kanserinin %10’u kalıtsal, %90’ı sporadikdir (Önen 2009).

Endometriyum kanseri vakalarının büyük çoğunluğu menopoza sonrası kadınlarda ve genellikle yaşlı hastalarda görülmektedir. Primer olarak postmenopozal kadınlarda görülen ve yaş ilerledikçe seyri kötüleşen bir hastalıktır. Tüm kadınların %2-3’ü hayatları boyunca endometriyum kanserine yakalanabilir (Setiawan ve ark. 2011). Tanı konulduğunda vakaların %75’i erken evrede teşhis edilmeleri nedeniyle genellikle prognozları bu vakalarda daha iyidir (Sorosky 2008; Cormier ve ark. 2015).

Endometriyum kanseri genel olarak postmenopozal bir hastalık olmasına rağmen vakaların yaklaşık olarak %12’si premenopozal olarak görülür. Endometriyum kanserinde yaygın olarak rastlanan semptom postmenopozal kanamalardır. Postmenopozal kanamalarda endometriyum kanseri oranı %5,7-11,5 olarak rapor edilmiştir (Erenel 2012).

Endometriyum kanseri gelişiminde çeşitli risk faktörlerinin olduğu bilinmektedir. Bu risk faktörleri arasında nulliparite, geç menopoza, obezite, diyabet, polikistik over sendromu, tamoksifen kullanımı, atipik endometriyum hiperplazisi gibi faktörler yer almaktadır (Vanderstraeten ve ark. 2015).

Normal endometriyum, menstrüel siklus sırasında östradiol ve progesteron hormonlarının sürekli kontrolü altındadır.

Endometriyum kanseri için, endometriyal dokunun artmış enflamasyonu ile bağlantılı olabilen, artan östrojene maruz kalmanın ilişkili olduğu gösterilmiştir. Östrojen ile ilişkili kanser gelişim, inflamatuvar olaylarla ilişkili olabilir. Kronik inflamasyon kanser gelişimi ile bağlantılıdır (Hanahan ve Weinberg 2011).

4.2.2. Endometriyum Kanseri Tipleri

Endometrium kanserinin iki farklı tipi görülmektedir (Ellenson 2011; Mutter 2009). En sık rastlanan tipi olan Tip 1, endojen ya da eksojen karşılanmamış östrojene maruz kalma öyküsü olan genç, perimenapozal kadınlarda görülmektedir. Bu kadınlarda tümör hiperplazik endometriyum olarak başlamakta ve kansere ilerlemektedir. Bu östrojen bağımlı tümörler daha iyi diferansiye olma eğilimi gösterirler ve hiperöstrojenizm ile birlikte olmayan tümörlere oranla daha iyi prognoza sahiptirler. Ayrıca vakaların büyük çoğunluğunu (%75-85) oluşturmaktadırlar (Setiawan ve ark. 2011; Siegel ve ark. 2011).

Tip 2 endometriyum kanseri, endometriyum uyaracak östrojen kaynağı bulunmayan kadınlarda gelişmektedir ve endometriyum kanserlerinin %10-15'ini oluşturmaktadırlar. Seröz veya berrak hücreli tümörler gibi histolojik alt tiplerden ibaret yüksek dereceli tümörlerdir (Ellenson 2011; Silverberg 2003). Kendiliğinden gelişen bu kanserler patolojik olarak endometrial hiperplazi ile birlikte değildir ve çoğunlukla östrojen bağımlı tümörlere göre daha kötü prognozludurlar (Silverberg 2003). Bu östrojen bağımlı olmayan tümörler daha yaşlı, postmenopozal, zayıf kadınlarda görülme eğilimini gösterirler (Setiawan ve ark. 2011; Siegel ve ark. 2011).

4.2.3. Risk faktörleri

Endometriyum kanserinin risk faktörleri olarak obezite, erken menarş, geç menopoz, Diabetes Mellitus (DM), nulliparite, sadece östrojen içeren hormon replasman tedavisi (HRT), progesteron ile karşılanmamış östrojene maruz kalma (kronik ovulasyon, polikistik over sendromu), ailede endometriyum kanseri hikayesi, meme kanseri, herediter nonpolipozis kolorektal kanser, atipili endometriyal hiperplazi gibi pek çok sebep gösterilebilir (Erenel 2012). (Şekil 6)

Şekil 6. Endometriyum Kanserine İlişkin Belirlenen Risk Faktörleri

RİSK FAKTÖRLERİ
Kişisel risk faktörleri
Postmenopozal dönem
Erken menarj (<12 y)
Geç menopoz (>50 y)
Geçmiş tıbbi öyküye ait riskler
Anormal kanama ya da lekelenme
Postmenopozal kanama
Sürekli anormal akıntı
Endometriyum hiperplazisi
Hipertansiyon(>140/90 mmHg)
Abdominal ya da pelvik ağrı
Tamoksifen kullanma
Kronik anovulasyon/polikistik over
Ailesel Riskler
Endometriyum kanseri öyküsü
Kolon kanseri öyküsü
Meme kanseri öyküsü
Over kanseri öyküsü
Yaşam Biçimi ve çevresel faktörler
Nulliparite
Düşük parite (bir gebelik)
Yüksek sosyoekonomik düzey
Yüksek hayvansal yağ içeren diyet
Obesite (BKİ>29; şişman)
Karşılanmamış östrojen hormon replasman tedavisi (5> yıl)
Geçmişte oral kontraseptif kullanma
İnfertilite

4.2.4. Evrelendirme

Evre, tümörün nerede olduğu ve ne ölçüde yayıldığını gösteren bir kavramdır ve tedavi seçeneklerini belirlemedeki en önemli etkidir. Endometrium kanserinin evrelendirmesinde Uluslararası Jinekoloji ve Onkoloji Federasyonu (FIGO) evreleme sistemi kullanılmaktadır.

FIGO evreleme sistemine göre endometrium kanseri evrelemesi aşağıda belirtilmiştir. Bu gruplara ait şekiller sırasıyla **Resim 7 A-D**'de şematik olarak gösterilmiştir.

IA: Tümör uterusu sınırlı, < ½ miyometriyal invazyon

IB: Tümör uterusu sınırlı, < ½ miyometriyal invazyon

II: Tümör uterusu sınırlı servikal stromal invazyon vardır

IIIA: Tümör seroza veya adnekslere yayılmıştır

IIIB: Vajinal ve/veya parametrial tutulum vardır

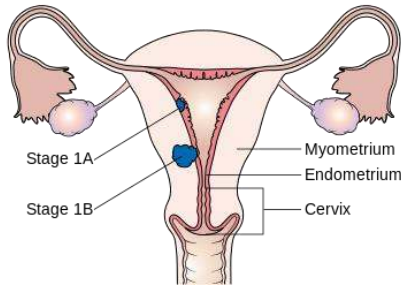
IIIC1: Pelvik lenf nodu tutulumu

IIIC2: Para-aortik lenf nodu tutulumu, pelvik lenf nodu tutulumu olan veya olmayan

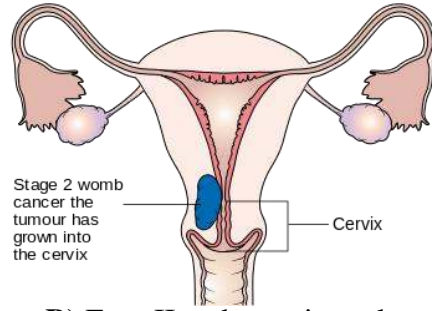
IVA: Mesane mukozası ve/veya barsak mukozasının tutulumu

IVB: Uzak metastaz, karın metastazı ve ve/veya kasık lenf düğümleri de dahildir (FIGO 2014).

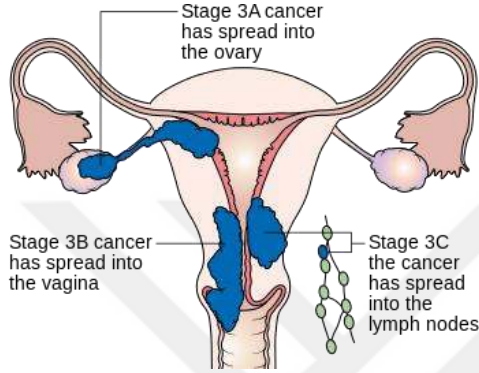
Aynı tip ve aynı evrede kanseri olan ve aynı tedaviyi alan kadınlarda bile hastalığın seyri farklı olabilir. Endometrium kanseri yayılırken ilk olarak uterus yakınındaki tuba uterinaller, ovaryumlar, ve lenf nodları gibi organlara gider. Serviks, vajina ve akciğerlere de yayılabilir. İlerlemiş kanser mesane ve kalın barsağı da tutabilir. Vücudun başka bölgelerine yayılmış kansere metastatik kanser ve bu olaya metastaz denir (Robins ve ark.2011).



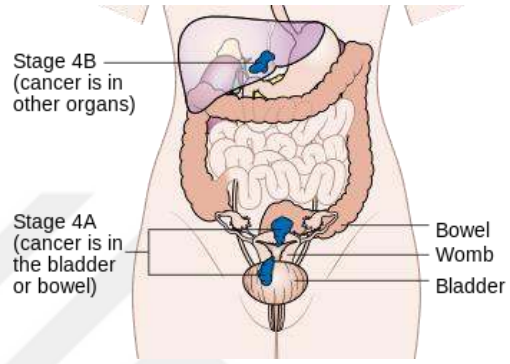
A) IA ve IB endometriyum kanseri



B) Evre II endometriyum kanseri



C) Evre III endometriyum kanseri



D) Evre IV endometriyum kanseri

Şekil 7. FIGO Evreleme Sistemine Göre Endometriyum Kanseri Evrelemesine Ait Şematik Görüntüler

4.2.5. Tanı kriterleri

Hastaların gerek operasyon öncesinde, gerekse operasyon sonrasında yapılan değerlendirilmesinde uzun süreli sağ kalımı belirlemede etkili olan bir grup faktör vardır. Bu prognostik faktörler aşağıda özetlenmiştir (Maneschi ve ark. 2011; Héту ve ark. 2009).

Histopatolojik tip: Tümörün grade'inden bağımsız olarak adenoskuamoz tip, uterin papiller adenokarsinom ve şeffaf hücreli adenokarsinom, endometroid tipe göre daha kötü prognozludur.

Grade: Endometriyum kanserinde histolojik grade prognozu belirlemede önemli bir faktördür. Tümörün diferansiyasyon derecesi azaldıkça derin myometriyal invazyon, servikal tutulum, lenf nodu tutulumu, lokal nüks ve uzak metastaz oranı artmaktadır.

Myometriyal invazyon: Myometriyal invazyon tümörün agresif davranışını gösteren bir kriterdir. Myometriyal invazyonda myometriyumdaki tümörün infiltrasyon derinliği kadar seroza ile olan ilişkisi de prognozu belirleyicidir.

Lenf nodu tutulumu: Lenf nodu tutulumu erken evre endometriyum kanserinde en önemli prognostik faktördür. Pelvik lenf nodu tutulumu paraaortik lenf nodlarının tutulumu için iyi bir göstergedir. Kliniği evre 1 olan hastaların yaklaşık %11’inde paraaortik metastaz vardır.

Adneksiyal metastaz: Adneksiyal yayılım kötü prognozu gösterir ve bu hastalarda rekürrensler siktir. Evre 1 hastaların % 10’da over metastazı vardır.

Serviks tutulumu: Ekstrauterin hastalık, rekürrens riskindeki artışla birlikte dir. Ekstrauterin hastalık tutulumu yok ve servikal tutulum varsa rekürrens hızı %16’dır.

Tümör boyutu: Tümör boyutu, lenf nodu metastazı ve hastaların sağ kalım süresini belirleyen önemli bir faktördür. Tümör çapı < 2 cm ise lenf nodu metastazı %4; tümör çapı >2 cm ise lenf nodu metastazı %15; tümör kaviteyi dolduruyorsa lenf nodu metastazı %35’tir.

Lenfovasküler boşluk tutulumu: Rekürrens ve sağ kalım sürelerini belirleyen bağımsız bir faktördür. Erken evre endometrium karsinomunda LVI %15 olup tümörün myometriyal invazyonu ve grade’i arttıkça LVI artar (Maneschi ve ark. 2011; Héту ve ark. 2009).

4.3. EZH-2 proteini

4.3.1. Genel özellikleri

Enhancer of zeste ilk olarak Drosophila melanogaster de tanımlanmıştır ve daha sonra da EZH1(Enhancer of zeste homolog 1) ve EZH2 (Enhancer of zeste homolog 2) adı verilen memeli homologlarına tanımlanmıştır (Laible ve ark. 1997). EZH2 ve homologları bitkilerde, böceklerde, balıklarda ve memelilerde gelişmede, hücre farklılaşmasında ve hücre bölünmesinde temel rol oynamaktadır (Tan ark. 2014; O’meara ve Simon 2012). EZH2 (Enhancer of Zeste Homolog 2), bir Histon-lisin N-metiltransferaz enzimi olup EZH2 geni tarafından kodlanmaktadır. DNA metilasyonuna ve transkripsiyonel baskılamaya katılmaktadır. Ayrıca EZH2, kofaktör S-adenosil-L-methionin kullanımıyla Histon H3 lisin 27 metil grubunun eklenmesini katalizlemektedir. EZH2 metilasyonu aktivitesi heterokromatin oluşumunu kolaylaştırır, böylece gen fonksiyonunu susturur. EZH2 ile kromozomal heterokromatin modellemesi hücrenin mitoz sürecinde de gereklidir (Vire ve ark. 2006).

PcG (Polycomb Grup) protein ailesinin bir üyesidir ve 7. kromozom üzerinde bulunur. PcG ailesi proteinler, epigenetik transkripsiyonal repressör proteinlerdir. Bu proteinler hedef genin inaktivasyonu veya silinmesinde aktif görev alırlar. Söz konusu hedef genler, hücre ölümü, hücre siklus regülasyonu, hücre yaşlanması, differansiyasyonu ve kanser gelişimi ile ilgilidirler (He ve ark. 2012; Lee ve Choe 2012). EZH2 aynı zamanda histon lizin metil transferaz olarakta bilinir ve hücre gelişiminin embriyonik gen ekspresyonları ve çeşitlenmesi evresinde yüksek bir ekspresyon paternine sahiptir. Dokuların matürasyonu ve differansiyasyonu ile birlikte ekspresyonu azalmaktadır (Chang ve Hung 2012).

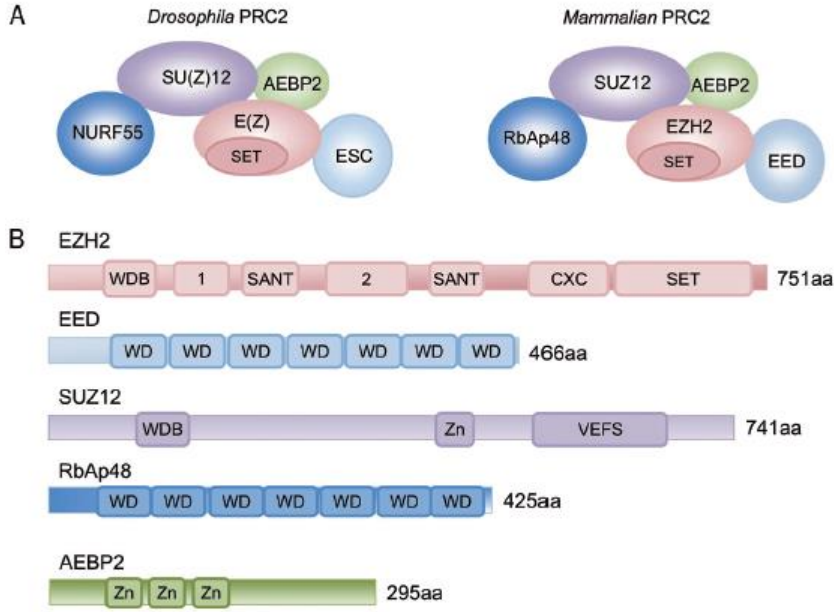
Karsinoma, lenfoma, malign melanoma ve yumuşak doku sarkomları gibi pek çok kanserde EZH2'nin aşırı eksprese edildiği bilinmektedir. EZH2'nin aşırı ekspresyonu tümör progresyonu ve agresif tümör davranışı ile ilişkilidir (Chang ve Hung 2012; Varambally ve ark. 2008; Ahsen 2012).

EZH2, gelişme ve farklılaşmayı düzenleyen sorumlu genlerin epigenetik bakımı boyunca sağlıklı embriyo gelişiminden sorumlu olan polikomb baskılayıcı kompleks 2 (PRC2)'nin fonksiyonel enzimatik bileşenidir (Morey ve Helin 2010). Ayrıca PRC2'nin metilasyon aktivitesinden sorumludur (Margueron ve Reinberg 2011).

PRC2 bitkilerden sineklere kadar organizmalar ve insanlar arasında korunan önemli bir kromatin değiştiricidir (O'Meara ve Simon 2012). Bu kompleks histon 3 (H3K27me3) üzerindeki lizin 27 ve trimetilasyon yoluyla hedef genlerin transkripsiyonunu baskılamaktadır ve bu özellik onun in vivo baskın fonksiyonu olarak görülmektedir.

PRC2 katalitik alt birim olarak EZH2 ya da homoloğu olan EZH1'i kullanır. İnsan PRC2 kompleksi beş alt birim içerir. Bunlar; EZH2, EED (End-to-end distance), SUZ12 (Supressor of Zeste Homolog 12), RbAp46/48 ve AEBP2 (Adipocyte Enhancer-Binding Protein)'dir (Tan ve ark. 2014) (**Şekil 8**).

PRC2'nin yaygın biyolojik fonksiyonu, farklılaşmada rol oynayan genlerin transkripsiyonel bastırılmasıdır.



Şekil 8. PRC2 Kompleksinin Bileşenleri (Tan ve ark. 2014).

A. İnsan ve sinekte PRC2 kompleksinin modelleri

B. İnsan PRC2 kompleksinde her bir alt birimin organizasyon alanları.
kompleksinde her bir alt birimin organizasyon alanları.

EZH2 inhibitör genleri tümör gelişimini baskılamadan sorumludurlar ve EZH2 aktivitesini engelleyerek tümör büyümesini yavaşlatabilirler. Göğüs, prostat, melanoma ve mesane dahil olmak üzere pek çok kanser türünde inhibisyonu kontrol altındadır.

Çünkü EZH2'nin bu tip kanserler de artmış ifadesi söz konusudur (Yoo ve Hennighausen 2012; Varambally ve ark. 2002; Zingg ve ark. 2015; Arisan ve ark. 2005).

Ayrıca EZH2 genindeki mutasyonlar nadir görülen bir konjenital bozukluk olan Weaver sendromu ile ilişkilidir. EZH2 sinir sistemi bozukluğunda nörodejeneratif belirtilere neden olan ve pek yaygın görülmeyen genetik bir nörolojik bozukluk olan ataxia telangiectasia da rastlanmıştır (Gibson ve ark. 2012; Li ve ark. 2013).

4.3.2. Kanserde EZH-2 proteini

EZH2, policomb represif kompleks 2 (PRC2)'nin katalitik alt birimidir ve histon 3'ün lizin 27 ile metillenmesi(H3K27) gen ekspresyonunu baskılar. EZH2 aracılı metilasyon kanserde tümör süpresör genlerinin epigenetik suskunluğu için bir potansiyel bağımsız mekanizmadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar EZH2'nin prostat, meme ve mesane gibi kanser çeşitlerinde aşırı eksprese edildiğini göstermiştir (Tan ve ark. 2014) (**Şekil 9**).

EZH2'nin hiperaktivasyonu ya da aşırı ekspresyonu ya da mutasyonları aracılığıyla prostat, meme, uterus, gastrik, renal hücre kanserleri ve ek olarak da melanoma dahil olmak üzere çeşitli maligniteler de bulunmaktadır (Simon ve Lange 2008).

EZH2 ekspresyonu bu kanserlerin çoğunda agresiflik, metastaz ve kötü prognoz ile ilişkilidir. Güncel bir çalışmada EZH2'nin küçük hücreli olmayan akciğer kanserleri ve lenfoma da aşırı eksprese edildiği bulunmuştur. Kanserli dokular da artmış EZH2'nin fonksiyonel sonucu genlerin susturulması bu farklılaşmayı desteklemek ve proliferasyonu sınırlandırmayı içerir (Tan ve ark. 2014).

Kanser Tipi	Kanserle İlişkisi	Muhtemel İlişkili Mekanizmalar
Prostat	Aşırı ekspresyonu	p130 / RB-bağımlı yollar
Meme	Aşırı ekspresyonu ve Y641F mutanlığı	pRB-E2F, PI3K / Akt ve östrojen reseptör yolları
B-hücre lenfoması	Aşırı ekspresyonu ve Y641F mutanlığı	Myc sinyal yolağı
Küçük hücreli olmayan akciğer kanserleri	Aşırı ekspresyonu	pRB-E2F/Hücre döngüsü

Şekil 9. EZH2 Hiperaktivasyonu ve Kanserler (Tan ve ark. 2014).

Bir gen profillemesi çalışmasında, EZH2'nin metastatik prostat kanserinde onkogenlerin upregüle edildiğini ve EZH2'nin kaybı prostat kanseri hücrelerinin büyümesini engellediği gösterilmiştir (Tan ve ark. 2014).

Meme kanseri en yaygın görülen malignitedir ve kadınlarda kansere bağlı ölümlerin ikinci önde gelen nedenidir. Anormal derecede yükselen EZH2 seviyeleri meme karsinomlarının invazyonları ve artan proliferasyon oranları ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Backmann ve ark. 2012).

EZH2'nin aşırı ekspresyonu pRB-E2F, PI3K / Akt ve östrojen reseptör sinyal yolları gibi pek çok meme kanseri sinyal yolları ile ilişkilidir (Hervouet ve ark. 2013; Bracken ve ark. 2003). Örneğin Gonzales ve ark. meme kanseri hücrelerinde EZH2 aşırı ekspresyonunun özellikle Akt izoformunun aktivasyonu boyunca PI3K/Akt sinyal yolağı ile aktive olabildiğini göstermiştir (Gonzalez ve ark. 2014).

Deneyisel kanıtlara dayanarak malignensi süresince EZH2'nin aşırı ekspresyon olduğunda bir ko-aktivatör olarak işlev görebileceğini ve östrojen sinyal yolağını geliştirmek ve çoğalmasını teşvik etmek için östrojen sinyal yolunu kuvvetlendirebilir (Deb ve ark. 2013).

4.3.3. Endometriyum kanserinde EZH-2

Endometriyum kanseri, kadın genital sisteminin en sık görülen kanseridir (Ferlay ve ark. 2012). Amerika Birleşik Devletlerinde (ABD) 2012 yılında 47130 yeni vaka ve 8010 ölüm meydana gelmiştir (Sorosky 2012). Erken evre aşamasında olan kadınların çoğunluğu (% 80-85) histerektomi ve bilateral salpingo-forektomi ile cerrahi tedavi uygulamalar sonucunda iyileşmiştir. Ancak, kötü yaşam ile ilişkilendirilen vakalarda ilerlemiş hastalık, tekrar gelişen hastalık ya da metastazlar gözlenmektedir (Singh ve ark. 2013). Daha önceden yapılmış olan çalışmalar EZH2'nin serviks kanseri ile ilişkili olduğunu gösterilmiştir.

EZH2 ekspresyonu ve klinikopatolojik özellikleri korelasyon analiziyle, EZH2 ekspresyonunun miyometriyum invazyonu ve endometriyal kanserin lenf vasküler alan invazyonu ile ilişkili olduğu kanıtlanmıştır.

Ayrıca small interferons RNA endometriyal karsinoma hücre proliferasyonundaki EZH2 rolünü araştırmak için kullanılmıştır ve EZH2 knockdownun in vitro endometriyal karsinoma hücrelerinin çoğalmasını bastırdığı gösterilmiştir.

Bu nedenle bu tür bulgular EZH2 ekspresyonunun endometriyum kanserlerinde daha agresif biyolojik davranışlardan sorumlu olabileceği ve EZH2'nin endometriyum kanseri tedavisi için potansiyel terapötik hedefler içinde yer alabileceği ileri sürülmüştür (Jia ve ark. 2014).

4.3.4. Ishikawa Hücre Hattı

İnsan endometriyum kanser hücre hattı olan Ishikawa hücre hattı 39 yaşındaki bir kadından üretilmiştir. Biyolojik kaynağı insan uterusu olup östrojen ve progesteron reseptörlerini içerir. Atimik farelere uygulandığında iyi diferansiye tümör oluşturmaktadır. Düşük malign potansiyeli olan **Ishikawa hücreleri** inverted mikroskop altında değerlendirildiklerinde epitel- benzeri yapıda ve mekik biçimli görüntü sergilemektedirler ve hücre kültür kabına yapışarak çoğalmaktadırlar. Laboratuvar ortamında Ishikawa hücrelerinin ikilenme zamanları 30 saat olarak belirlenmiştir.

Bu hücre hattında kullanılacak medium içeriği; MEM + 2mM Glutamine + %1 Non Essential Amino Acids (NEAA) + %5 Foetal Bovine Serum (FBS)'dir.

4.3.5. MFE-319 (ACC423) Hücre Hattı

MFE-319 (ACC423- DSMZ) hücre hattı endometriyum adenokarsinoma hücre hattıdır. Orta düzeyde farklılaşmış endometriyal adenokarsinoma ilk olarak 81 yaşındaki bir kadının primer tümöründen üretilmiştir. Nude farelere uygulandığında kötü diferansiye tümör oluşturmaktadır. Östrojen ve progesteron reseptörleri negatif **MFE-319 hücrelerinin** inverted mikroskop altında değerlendirildiklerinde hücrelerin epitel benzeri-mekik biçimli oldukları, kültür kabına yapışarak çoğaldıkları ve kümelenme yaparak düzenlenme göstermektedirler. Yuvarlak büyük çekirdek ve belirgin nükleolus içermektedirler. MFE-319 hücrelerinin ikilenme zamanları 100 saat olarak tespit edilmiştir.

Bu hücre hattı için önerilen medyum içeriği; %40 RPMI 1640 + %40 MEM (with Earle's salts) + %20 ısı ile inaktive edilmiş Foetal Bovine Serum (FBS)'dir.

5. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada, malignite yönünden farklı iki insan endometriyum kanser hücre hatlarında ve formalin ile tespit edilmiş, parafine gömülmüş normal endometriyum, endometriyal hiperplazi ve endometriyum kanser örneklerinde histopatolojik değerlendirme sonrasında EZH2'nin rolünün indirek immunohistokimyasal, Western Blotting ve TUNEL yöntemleri ile değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla çalışma, iki aşamalı olarak yürütülmüştür.

A) İnvitro hücre kültür çalışması olarak insan endometriyum kanseri hücre hatları'nın TUNEL, indirek immunohistokimyasal ve Western Blotting yöntemleri ile değerlendirilmesi yapılmıştır.

1. Ishikawa hücre hattı: Östrojen ve progesteron reseptörleri pozitif insan endometriyum adenokanser hücre hattı,

2. MFE-319 (ACC-423): İnvaziv, östrojen ve progesteron reseptörleri negatif insan endometriyum adenokanser hücre hattı,

B) Patolojik endometriyum doku örneklerinin histopatolojik değerlendirmesi sonrasında indirek immunohistokimyasal ve TUNEL yöntemleri ile değerlendirilmesi yapılmıştır. Çalışma için Etik kurul onayı alındıktan sonra; T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Kamu Hastaneleri Kurumu, İzmir Kuzey Kamu Hastaneleri Birliği, Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde (İzmir Ege Doğumevi ve Kadın Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi) opere edilen hastalardan alınan ve patoloji laboratuvarında incelenerek tanısı konulan formalin ile tespit edilmiş ve parafine gömülmüş doku örnekleri kullanılmıştır (n: 60).

Grup 1: Normal proliferasyon evresi endometriyum (n:10),

Grup 2: Normal sekresyon evresi endometriyum (n:10),

Grup 3: Basit atipisiz endometriyal hiperplazi (n:10),

Grup 4: Kompleks atipili endometriyal hiperplazi (n:10),

Grup 5: Tip I endometriyal adenokanser (n:10),

Grup 6: Tip II endometriyal adenokanser (n:10) olmak üzere 6 grup altında yürütülmüştür.

Çalışmada kullanılan histokimyasal, immünohistokimyasal inceleme ve Western blotting değerlendirme için gerekli kimyasal malzemeler ve cihazlar Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2014-169 nolu proje ile desteklenmiştir. Çalışmamız, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu'nun 19/11/2014 tarih, 20478486-370 protokol numaralı onayı ile yapılmıştır.

5.1. İn vitro İnsan Endometriyum Adenokanser Hücre Hatlarının Hücre Kültürü

Çalışmada, diferansiyasyon, invaziv özellikleri ve malignite yönlerinden farklı Ishikawa hücre hattı ve MFE-319 (ACC-423) hücre hattı olmak üzere 2 farklı insan endometriyum kanseri hücre hattı kullanılmıştır. Endometriyum kanseri hücrelerinin göç, çoğalma ve invazyon gibi özelliklerini modelleyen bu hücre hatları, *in vitro* koşullarda çalışılmak için uygun modellerdir.

1. **Ishikawa hücre hattı:** 39 yaşındaki bir kadından üretilmiştir. Biyolojik kaynağı insan uterusu olup östrojen ve progesteron reseptörlerini içerir. Atimik farelere uygulandığında iyi diferansiye tümör oluşturmaktadır. Bu hücre hattı için önerilen medyum içeriği; MEM + 2mM Glutamine + %1 Non Essential Amino Asit (NEAA) + %5 Fötal Bovine Serum (FBS)'dir.
2. **MFE-319 (ACC-423) hücre hattı:** Endometriyum adenokarsinoma hücre hattıdır. Orta düzeyde farklılaşmış endometriyal adenokarsinoma ilk olarak 81 yaşındaki bir kadının primer tümöründen üretilmiştir. Nude farelere uygulandığında kötü diferansiye tümör oluşturmaktadır. Bu hücre hattı için önerilen medyum içeriği; %40 RPMI 1640 + %40 MEM (with Earle's salts) + %20 ısı ile inaktive edilmiş FBS'dir.

Endometriyum adenokanser hücre hatları alındıktan sonra, hücre kültürü laboratuvarımızda, uygun medyumlar hazırlanarak, %1 antibiyotik (penisilin-streptomisin) içeren medyum ile dilüe edilerek 4 kültür kabına eşit olarak paylaştırılmıştır. Kültür kaplarında, %5 karbondioksit içeren, 37°C nemli inkübatörde çoğaltılmaya bırakılan hücrelerin 2 günde bir medyumları değiştirilerek, konfluent olunca Tripsin-EDTA solusyonu ile 37°C ile 5 dakika bırakılarak hücreler alınıp, 1000 rp'de 5 dk. santrifüj edildikten sonra pasajlanmıştır. 4. pasaja kadar yeterli miktarda çoğaltılan hücrelerin bir kısmı azot tankı içerisinde, bir kısmı -80°C'de dondurma medyumunu ile yedeklenmiştir. Ishikawa insan endometriyum hücre hattının ikilenme zamanı 30 saat, MFE-319 insan endometriyum hücre hattının ikilenme zamanı 100 saat olarak tespit edilmiştir. Deney aşamasında, Endometriyum adenokanser hücre hatlarının açılması, Hücrelerin dondurulması, Hücrelerin ikilenme zamanının belirlenmesi, Hücrelerin pasajlanması ve İmmunohistokimyası ve Western Blotting uygulamaları sırasıyla gerçekleştirilmiştir.

5.2. Hücreler için İndirekt İmmünohistokimya Protokolü

Dondurulan Ishikawa hücreleri steril edilen yuvarlak lamel yerleştirilmiş olan 24 gözlü hücre kültür kaplarına ekildikten 24 saat sonra %4'lük paraformaldehid ile tespit edildikten sonra hücre kültürü için indirek immunohistokimyasal protokol uygulanmıştır.

MFE-319 insan endometriyum kanseri hücreleri ise 8 gözlü chamber slide içine ekilerek 72 saat çoğaltıldıktan sonra %4'lük paraformaldehid ile tespit edildikten sonra hücre kültürü için indirek immunohistokimyasal protokol uygulanmıştır. Anti-EZH2 primer antikoru kullanılarak uygulanan avidin-biyotin peroksidaz yöntemi ile indirekt immünohistokimya protokolü **Tablo 1**'da, kullanılan malzemeler **Tablo 2**'de belirtilmiştir. Boyanan preperatlar, Olympus Bx-40 ışık mikroskobu altında incelenerek, Nikon kamera aracılığı ile fotoğrafları çekilmiştir.

Tablo 1. Hücre Kültürü İçin Uygulanan İndirekt İmmünohistokimya Protokolü

İŞLEM	MADDE	SÜRE
FİKSASYON	%4'LÜK PARAFORMALDEHİT	30 DAKİKA
YIKAMA	PBS	ODA SICAKLIĞINDA 3X5 DAKİKA
	%3'LÜK HİDROJEN PEROKSİT	5 DAKİKA
YIKAMA	PBS	3X5 DAKİKA
PERMEABİLİZASYON	TRİTON X-100 BUZ ÜZERİNDE	15 DAKİKA
BLOKLAMA	BLOKLAMA SOLÜSYONU	60 DAKİKA
	PRİMER ANTİKOR EZH2	18 SAAT +4°C'DE NEMLİ ORTAMDA
YIKAMA	PBS	3X5 DAKİKA
	BİOTİNLENMİŞ SEKONDER ANTİKOR	30 DAKİKA
YIKAMA	PBS	3X5 DAKİKA
	STREPTAVİDİN	30 DAKİKA
YIKAMA	PBS	3X5 DAKİKA
BOYAMA	DAB	15-60 SANİYE
YIKAMA	PBS	1X5 DAKİKA
YIKAMA	DİSTİLE SU	3X5 DAKİKA
ARTALAN BOYAMA	MAYER'S HEMATOKSİLEN	1 DAKİKA
YIKAMA	DİSTİLE SU	3X5 DAKİKA
KAPAMA	MOUNTİNG MEDIUM	

Tablo 2. İndirekt İmmünohistokimyasal İnceleme İçin Kullanılan Malzemeler

MALZEME	FİRMA	KAT.NO	ÜLKE
ALKOL	Sigma-Aldrich		St. Louis, USA.
KSİLEN	Sigma-Aldrich	Lot no: SZBB0910V	St. Louis, USA.
FOSFAT BUFFER SOLÜSYONU (PBS)	Invitrogen®	Lot no: 72922024A	Cambridgeshire, UK.
HİDROJEN PEROKSİT	Surgipath	Lot no: 071108	Cambridgeshire, UK.
TRİTON X-100	Surgipath		Cambridgeshire, UK.
SEKONDER ANTİKOR	Invitrogen TM Broad spectrum	85-9043 Histostain Plus Bulk Kit	Camarillo, CA, USA
DAB KİT	Surgipath	Lot no: KN00000009156	Cambridgeshire, UK.
MAYER'S HEMATOKSİLEN	Invitrogen®	00-3008	Paisley, UK.
ENTELLAN	Sigma-Aldrich	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA.

Anti-EZH2 primer antikorı kullanılarak yapılan indirek immunoreaktivite boyanma şiddetleri yarı kantitatif yöntemle minimal (-/+), hafif (1), orta (2), şiddetli (3) ve çok şiddetli (4) olarak belirlenmiştir. Daha sonra her bir hücre için yedi farklı alanda pozitif boyanan hücrelerin %'leri belirlenerek immunoreaktivite şiddetleri aşağıda belirtilen formüle uygulanarak ortalama H-skorlar hesaplanmıştır.

H-Skor : $\sum P \times (i+1)$

$\sum P$: pozitif boyanan hücre sayısı %,

i: İmmunoreaktivite şiddeti

EZH 2 immünoreaktivite H-skor sonuçları One Way-ANOVA istatistik testiyle karşılaştırılmıştır. $P < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

5.3. Western Blotting Yöntemi

Çalışmada proje kapsamında alınan MFE-319 ve Ishikawa olmak üzere iki farklı insan endometriyum adenokanser hücre hatları Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı Hücre Kültürü laboratuvarında uygun koşullarda çoğaltılmıştır. Hücreler yeteri kadar çoğaldıktan sonra çoğalan hücrelerin, protein ekstraksiyonu işlemi gerçekleştirilmiştir. Bunun için önce flask içerisinde bulunan ortam uzaklaştırılarak 1 ml PBS ekleyip kazıma işlemi yapılmıştır. Ardından hücreler ependorflara alınmıştır. Homojenizatörde 12.000 rpm'de 15 dakika homojenize edildikten sonra proteaz ve fosfataz inhibitörü içeren RIPA bufferda çözündürülmüştür. Ependorflar içinde RIPA buffer ile karışım halinde olan doku homejanatları 12000 rpm'de +4°C'de 20 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısım ayrılarak yeni ependorflara konulmuştur ve doku artığı kalmaması için 12000 rpm'de +4°C'de 20 dk santrifüj tekrarlanmıştır. Hazır hale gelen protein ekstraktları Western blotting sırasında kullanılmak üzere -80°C'deki derin dondurucuya kaldırılmıştır.

-80°C'de hazır halde ependorflarda bulunan protein ekstraktları, kuru buz üzerinde çalışılmıştır. İlk olarak 1 µl.'deki protein miktarı Qubit fluorometer ile tespit edilmiş ve standartlar jele yüklemek üzere hazırlanmıştır. Ardından jele yüklemek üzere örneklerin hazırlanması sırasında saptanan miktarlarda protein ekstraktları üzerine her örnekte eşit miktarlarda olmak üzere, 5 µl. NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X), 2 µl. NuPAGE® Reducing Agent (10X) ve protein ekstrakt miktarı ile ters orantılı olarak belirlenen miktarda, deiyonize su eklenmiştir. 10000 rpm.'de 10 sn. karıştırılan örnekler, 70°C'de 15 dk. denatüre edilmiştir. Denatürasyonun ardından buz üzerinde soğumaya bırakılmıştır. Tüm örnekler bu haliyle dikey elektroforez için hazır hale getirilmiştir.

Dikey elektroforez işlemi için hazır halde bulunan % 4-12 Bis-Tris Gradient jel tankın içerisine yerleştirilmiştir. Birinci kuyucuğa standart işaretleyici olarak, 10 µl. Invitrogen® NOVEX SeeBlue® Plus2 Prestained Standard kullanılmıştır. Daha sonra belirlenen sıraya göre kuyucuklara eşit miktarda (30 µg.) protein lizat karışımı yüklenmiştir. Jelin yürümesi için 200 Volt'ta 50 dk. örnekler yürümeye bırakılmıştır. Jelin yürümesinin bitmesinin ardından, membrana transfer etmek üzere jeller dikkatli bir şekilde çıkarılıp yıkanırken, i-blot cihazına ilk önce katot membran daha sonra jel, ardından transfer membran ve üzerine anot membran gelecek şekilde yerleştirilmiştir. Membranlar arasında baloncuk kalmaması için rulo ile üzerinden geçilmiştir. Kapağa da süngerin yerleştirilmesinin ardından cihaza daha önceden kurulmuş olan P:3 programı seçildi ve 9 dk. membrana transfer işleminin bitmesi beklenmiştir.

Transfer işlemi düzgün bir şekilde bittikten sonra blotlama işlemi için hazır hale gelen PVDF membran, ilk olarak 3 kez 5'er dk. olmak üzere hazırlanan yıkama solüsyonu (10 ml. wash solution+150 ml. distile su) ile karıştırıcıda muamele edilmiştir. Bloking işlemi için hazırlanan solüsyonda (Blokör/Diluent Part A'dan 2 ml., Blokör/Diluent Part B'den 3 ml. ve ultra filtre edilmiş sudan 5 ml.) membran 30 dk. karıştırıcıda çalkalanmıştır. Tekrar yıkama solüsyonu ile 3 kez 5'er dk. yıkanan membran 1/250 dilüe edilmiş primer antikor karışımı içerisinde 1 saat oda sıcaklığında karıştırıcıda bekletilmiştir. (Primer antikor karışımı: 7 ml. ultra filtre edilmiş su, 2 ml. blokör/diluent part A, 1 ml. blokör/diluent part A ve belirlenen dilüsyon oranına göre antikor ilavesi şeklinde hazırlanmıştır) Primer antikor muamelesinin ardından 3 kez 5'er dk. yıkama solüsyonu ile yıkanan membran, iyice süzöldükten sonra kurumasına izin verilmeden kromojenik substrat ilave edilmiştir. Bantlar 30 dk. bir sürede belirmiştir. Bantlar belirdikten sonra distile su ile yıkanan membranlar elle sallayarak kurutulmuştur ve fotoğraf makinasıyla görüntölenmiştir. Western blotting uygulama protokolü için kullanılan malzemeler **Tablo 3'de** gösterilmiştir.

Tablo 3. Western Blotting İnceleme İçin Kullanılan Malzemeler

MALZEME	FİRMA	KAT.NO	ÜLKE
iBLOT Transfer System	Invitrogen®		Camarillo, CA, USA
RIPA LYSIS BUFFER SYSTEM	Santa-Cruz	SC-24948	Camarillo, CA, USA
QUBIT FLUOROMETER	Invitrogen®		Camarillo, CA, USA
NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X)	Invitrogen®	Lot no: 1105342	Camarillo, CA, USA
NuPAGE® Sample Reducing Agent	Invitrogen®	Lot no: 1085151	Camarillo, CA, USA
Invitrogen® NOVEX SeeBlue® Plus2 Prestained	Invitrogen®	Lot no: 1089578	Camarillo, CA, USA
NuPAGE® 4-12% Tris-Acetate Mini	Invitrogen®	Lot no: 12042671	Camarillo, CA, USA
NuPAGE® Antioxidant	Invitrogen®	NP0005	Camarillo, CA, USA
iBLOT® Gel Transfer Stacks	Invitrogen®	IB4010-01	Camarillo, CA, USA
PVDF, Regular			
Sekonder Kit, WesternBreeze®	Invitrogen® Chromogenic Western Blot Immunodetection	WB7103, WB7105, WB7107	Camarillo, CA, USA
Anti-EZH2 Pierce™ Enhancer Zest Homolog 2 Antibody-	Thermo scientific	144CT2.1.1.5 (Lot No: QH2067281A,	

5.4. Doku Örneklerinin Alınması ve Parafin Doku Takibi

Çalışmada, Etik kurul onayı alındıktan sonra T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Kamu Hastaneleri Kurumu, İzmir Kuzey Kamu Hastaneleri Birliği, Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde (İzmir Ege Doğumevi ve Kadın Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi) opere edilen hastalardan alınan ve patoloji laboratuvarında incelenerek tanısı konulan doku örnekleri kullanılmıştır.

Endometriyum doku örnekleri %10'luk formalin solüsyonu ile 24 - 48 saat süreyle oda sıcaklığında tespit edilmiştir.

Doku örnekleri, rutin ışık mikroskobu parafin doku takibi yöntemi ile takip edilerek; bir gece akarsu altında yıkandıktan sonra, derecesi giderek artan alkol serileri ile dehidratasyon işlemini takiben, ksilen ile şeffaflaştırılarak, parafine infiltrasyon sonrası parafine gömülmüştür. Parafin doku takibi protokolü **Tablo 4**'de gösterilmiştir. Elde edilen parafin bloklardan Leica mikrotom ile 5 µm kesitler alınmıştır.

Çalışma; Blokların Hematoksilen & Eozin ile boyanması ve Olympus mikroskop altında patolog tarafından histopatolojik olarak incelenmesi ve tanı konması sonrasında 6 grup altında yürütülmüştür:

Grup 1: Normal proliferasyon evresi endometriyum (n:10),

Grup 2: Normal sekresyon evresi endometriyum (n:10),

Grup 3: Basit atipisiz endometriyal hiperplazi (n:10),

Grup 4: Kompleks atipili endometriyal hiperplazi (n:10),

Grup 5: Tip I endometriyum adenokarsinom (n:10),

Grup 6: Tip II endometriyum adenokarsinom (n:10)

Tablo 4. Parafin Doku Takibi Protokolü

İŞLEM	KULLANILAN MADDE	SÜRE
A. TESPİT	% 10 FORMALİN	24-48 SAAT
	AKARSU	16 SAAT
B. DEHİDRATASYON	% 60 ALKOL	½ SAAT
	% 70 ALKOL	½ SAAT
	% 80 ALKOL	½ SAAT
	% 95 ALKOL	½ SAAT
	% 100 ABSOLU ALKOL	1 SAAT
	% 100 ABSOLU ALKOL	1 SAAT
C. ŞEFFAFLAŞTIRMA	ALKOL: KSİLEN(1:1)	½ SAAT
	KSİLEN I	1 SAAT
	KSİLEN II	1 SAAT
D. İNFİLTRASYON	KSİLEN-PARAFİN (1:1)	½ SAAT
	PARAFİN I	1 SAAT
	PARAFİN II	1 SAAT
E. GÖMME	PARAFİN	

5.5. Histokimyasal Değerlendirme

5.5.1. Hematoksilen & Eozin Boyama

5 µm kalınlıkta alınan doku örnekleri bir gece 60°C etüvde deparafinize edildikten sonra, 1 saat ksilen ile kimyasal deparafinizasyon işlemi uygulanmıştır. Derecesi giderek azalan alkol serilerinden geçirilerek suya getirilen kesitler önce Hematoksilen solüsyonu ile 6 dakika boyanmıştır. Akar su altında yıkanan kesitler asit-alkol solüsyonu ile diferansiye edildikten sonra Eozin boyası ile 2 dakika boyanmıştır. Kesitler alkol serilerinden geçirilerek ksilen içine alınmıştır. Hematoksilen – Eozin boyama Protokolü **Tablo 5’de** gösterilmiştir. Ksilen içinde 30 dakika bekletilen kesitler entellan kullanılarak lamel ile kapatılmıştır ve Olympus BX40 ışık mikroskop altında incelenerek ve fotoğrafları çekilmiştir.

Tablo 5. Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü

İŞLEM	MADDE	SÜRE
DEPARAFİNİZASYON	60°C etüvde	1 GECE
DEPARAFİNİZASYON	KSİLEN I	30 DAKİKA
	KSİLEN II	30 DAKİKA
REHİDRATASYON	%95 ALKOL	2 DAKİKA
	%80 ALKOL	2 DAKİKA
	%70 ALKOL	2 DAKİKA
	%60 ALKOL	2 DAKİKA
YIKAMA	AKAR SU	5 DAKİKA
BOYAMA	HEMATOKSİLEN	5 DAKİKA
YIKAMA	AKAR SU	5 DAKİKA
DİFERANSİYASYON	ASİT-ALKOL	1-2 SANİYE
YIKAMA	AKAR SU	5 DAKİKA
BOYAMA	EOZİN	3 DAKİKA
YIKAMA	AKAR SU	5 DAKİKA
	%80 ALKOL	1 DAKİKA
	%95 ALKOL	1 DAKİKA
KURUTMA	HAVADA VEYA ETÜVDE	
	KSİLEN	1 SAAT
KAPAMA	ENTELLAN	

5.6. Avidin- Biotin Peroksidaz Yöntemi ile İndirek İmmünohistokimya (İHK)

Aynı dokulardan yapılan ek kesitler indirek immünohistokimyasal boyama için hazırlanmıştır. Deparafinizasyon işlemi yapılan kesitler önce tripsinize edilip dakopen ile çevrelenerek, dokuda bulunan peroksidaz aktivitesini inhibe etmek için %3'lük hidrojen peroksidaz uygulanmıştır. Fosfat tamponu (PBS) ile yıkanan kesitler spesifik boyanma sağlamak için bloklama solüsyonu uygulanmıştır. Kesitler yıkanmadan bloklama solüsyonu uzaklaştırılarak anti-EZH2 (Pierce™ Enhancer Zest Homolog 2 Antibody-144CT2.1.1.5) (Lot No: QH2067281A, Thermo scientific) primer antikoru 1:50 dilüsyonunda kullanılmıştır. 18 saat +4°C'de nemli ortamda inkübe edilmiştir. Sekonder kit olarak avidin-biyotin-peroksidaz sistemi (Invitrogen®-Histostain Plus Bulk Kit, Invitrogen® 2nd Generation LAB-SA Detection System, Cat no: 85-9043, Broad spectrum, Camarillo, CA) kullanılmıştır. PBS ile yıkanan kesitler biyotinle işaretlenmiş hidrojen peroksidaz sekonder antikoru ile 30 dakika inkübe edildi. PBS ile yıkanan kesitlere 30 dakika streptavidin uygulanmıştır. İmmünoreaktivitenin görünür hale gelebilmesi için kromojen olarak Diaminobenzidine (DAB) uygulanan kesitler, Mayer's hematoksilen ile artalan boyaması yapılarak alkolden geçirilip, ksilen ile şeffaflaştırma yapılarak entellan ile kapatılmıştır.

İndirek immünohistokimya protokolü **Tablo 6'**de İmmünohistokimya için kullanılan malzemelerin katalog numaraları **Tablo 7'**de verilmiştir.

İmmünoreaktivitelerin spesifik olup olmadığını test etmek amacı ile bir kesit kontrol boyaması için ayrılmış ve antikor uygulanmadan boyama gerçekleştirilmiştir.

EZH2 boyanmasının immünoreaktivite şiddetine göre minimal (-/+), hafif (1), orta (2), şiddetli (3) ve çok şiddetli (4) olarak skorlanmıştır. Gruplardan elde edilen endometriyum doku örneklerinden elde edilen EZH 2 immünoreaktivite sonuçları One Way-ANOVA istatistik testiyle karşılaştırılmıştır. $P < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Tablo 6. İndirekt İmmunohistokimya Protokolü

İŞLEM	MADDE	SÜRE
DEPARAFİNİZASYON	60°C ETÜVDE	1 GECE
DEPARAFİNİZASYON	KSİLEN I	30 DAKİKA
DEPARAFİNİZASYON	KSİLEN II	30 DAKİKA
REHİDRATASYON	%95 ALKOL	2 DAKİKA
	%80 ALKOL	2 DAKİKA
	%70 ALKOL	2 DAKİKA
	%60 ALKOL	2 DAKİKA
YIKAMA	DİSTİLE SU	10 DAKİKA
	FOSFAT TAMPON	10 DAKİKA
	SOLÜSYONU (PBS)	
HAVUZCUK	DAKO PEN	
	TRİPSİN 37°C ETÜVDE	10 DAKİKA
YIKAMA	PBS	3X5 DAKİKA
PEROKSİDAZ BLOK	%3 HİDROJEN PEROKSİT	5 DAKİKA
YIKAMA	PBS	3X5 DAKİKA
BLOKLAMA	NON-İMMÜN BLOKLAMA	1 SAAT
	SOLÜSYONU	
PRİMER ANTİKOR	ANTİ-EZH2 (+4°C nemli ortamda)	18 SAAT
YIKAMA	PBS	3X5 DAKİKA
SEKONDER ANTİKOR	BİYOTİNLE İŞARETLİ	30 DAKİKA
	SEKONDER	
YIKAMA	PBS	3X5 DAKİKA
	STREPTAVİDİN	30 DAKİKA
YIKAMA	PBS	3X5 DAKİKA
BOYAMA	DAB (Diamino benzidine)	10 DAKİKA
YIKAMA	DİSTİLE SU	3X5 DAKİKA
ARTALAN BOYAMA	MAYER'S HEMATOKSİLEN	3 DAKİKA
YIKAMA	DİSTİLE SU	10 DAKİKA
KAPAMA	ENTELLAN	
İNCELEME	OLYMPUS MARKA IŞIK	
	MİKROSKOPU	

Tablo 7. Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal İnceleme İçin Kullanılan Malzemeler

MALZEME	FİRMA	KAT.NO	ÜLKE
ALKOL	Sigma-Aldrich		St. Louis, USA.
KSİLEN	Sigma-Aldrich	Lot no: SZBB0910V	St. Louis, USA.
HARRİS HEMATOKSİLEN	Invitrogen®	Lot no: 72922024A	Cambridgeshire, UK.
EOZİN SOLÜSYONU	Surgipath	Lot no: 071108	Cambridgeshire, UK.
BONCUK PARAFİN	Surgipath		Cambridgeshire, UK.
MİKROTOM BIÇAĞI	Lieca		
LİZİNLİ LAM	Surgipath	Lot no: KN00000009156	Cambridgeshire, UK.
DAKO PEN	Invitrogen®	00-8877	Paisley, UK.
TRİPSİN	Invitrogen®	00-3008	Paisley, UK.
PBS	Sigma-Aldrich	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA.
H₂O₂	Merck	Lot no: K40391897 935	Darmstadt, Germany.
ANTI-EZH2 Pierce™ Enhancer Zest Homolog 2 Antibody-	Thermo scientific	144CT2.1.1.5 (Lot No: QH2067281A,	
SEKONDER ANTİKOR	Invitrogen®	Histostain Plus Bulk Kit 2nd Generation LAB-SA Detection System, Cat no: 85-9043, Broad spectrum, DAB-Plus Substrate Kit Lot no: 896320A	Camarillo, CA
DAB KİT, Kromojen, Diaminobenzidine	Invitrogen®	DAB-Plus Substrate Kit Lot no: 896320A	Paisley, UK.
MAYER'S HEMATOKSİLEN	ScyTek Laboratories	Lot no: 12081	Logan, Utah, USA.
ENTELLAN	Merck	10-20/21	Logan, Utah, USA.

5.7. TUNEL Yöntemi

Apoptotik hücreler oldukları düşünülen DNA kırıkları olan hücreleri tespit etmek amacıyla endometriyum doku örnekleri ve kontrol grubundan alınan kesitler, “Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling” (TUNEL) Kiti (Millipore) kullanılarak boyanmıştır. Boyama için ilk önce kesitler kit protokolüne uygun olarak deparafinize edilmiştir. Bunun için önce 5'er dakikalık 3 değişim ksilen uygulanmış, ardından 5'er dakikalık 2 değişim absolü alkol, 5 dakika %90 alkol, 5 dakika %80 alkol uygulanarak, bundan sonra 2 dakika akarsuda yıkanmıştır ve distile suya getirilmiştir. Bu aşamadan sonra her bir kesitin üzerine kit tarafından sağlanan Proteinaz K, 20 µg/µl olarak uygulanmıştır ve kesitler oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra PBS ile 3 defa 5'er dakika yıkanmıştır. Endojen peroksidaz aktivitesinin giderilmesi için 12 ml %30 H₂O₂, 54 ml metanol ve 54 ml distile su karıştırılarak elde edilen ve içinde %3 H₂O₂ bulunan çözelti ile dokular 5 dakika inkübe edilmiş ve sonrasında 3 defa 5'er dakika PBS ile yıkanmıştır. Ardından kit tarafından sağlanan “TdT Enzim”den 5 µl ve “İşaretleme Tamponu”ndan 45 µl karıştırılarak elde edilen “işaretleme reaksiyon karışımından her bir lamın üzerine 50 µl konulmuş ve önceden 37 dereceye kadar ısıtılmış etüv içinde nemlendirilmiş kutuda 90 dakika inkübe edilmiştir. Enzim çözeltisinin dokular üzerinden uzaklaşmasının önlemesi için dokuların çevresi son PBS uygulamasında hidrofobik kalemle çevrilmiş ve enzim uygulamasından sonra üzerlerine birer lamel kapatılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda dokular PBS ile 3 defa 5'er dakika yıkanmak suretiyle reaksiyon sona erdirilmiştir. Takiben her bir doku kesiti üzerine kit tarafından sağlanan “Anti-FITC HRP-bağlı antikordan 70 µl konulmuştur.

Antikoron üzeri, alt taraflarının iki ucundan ince bir şerit halinde kalın bant yapıştırılarak lama yapışması önlenmiş 25x32 mm'lik bir lamelle kapatılarak ve yine 37 derecede 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda PBS ile 3 defa 5'er dakika yıkanmıştır. Yıkandıktan sonra üzerlerine kit tarafından sağlanan “DAB kromojeni” konularak ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilmiş; inkübasyon süresi sonunda distile su ile yıkanarak boyama reaksiyonu sonlandırılmıştır. TUNEL yöntemi protokolü **Tablo 8**'da belirtilmiştir. Üç farklı alanda yüz hücre içinde pozitif boyanan TUNEL hücreleri sayılarak ortalama TUNEL % indeksi hesaplanmıştır.

Sonuçlar One-way ANOVA istatistiksel testi ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. P<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Tablo 8. TUNEL Yöntemi Protokolü

İŞLEM	MADDE	SÜRE
DEPARAFİNİZASYON	60°C ETÜVDE	1 GECE
DEPARAFİNİZASYON	KSİLEN I	30 DAKİKA
DEPARAFİNİZASYON	KSİLEN II	30 DAKİKA
REHİDRATASYON	%90 ALKOL	2 DAKİKA
	%80 ALKOL	2 DAKİKA
	%70 ALKOL	2 DAKİKA
	%60 ALKOL	2 DAKİKA
YIKAMA	DİSTİLE SU	10 DAKİKA
	FOSFAT TAMPON	10 DAKİKA
	SOLÜSYONU(PBS)	
	PROTEİNAZ K	15 DAKİKA
YIKAMA	PBS	2X5 DAKİKA
PEROKSİDAZ BLOK	%3 HİDROJEN PEROKSİT	5 DAKİKA
YIKAMA	PBS	3X5 DAKİKA
	EQUİLİBRAHİTİON BUFFER	5 DAKİKA
	TDT ENZİM (37°C etüvde)	90 DAKİKA
	STOP-WASH BUFFER	10 DAKİKA
	(+4°C nemli ortamda)	
YIKAMA	PBS	3X5 DAKİKA
	ANTİ-DİOKSİGENİN CONJUGATE	30 DAKİKA
YIKAMA	PBS	4X5 DAKİKA
BOYAMA	DAB (Diamino benzidine)	5 DAKİKA
YIKAMA	DİSTİLE SU	3X5 DAKİKA
ARTALAN BOYAMA	MAYER'S HEMATOKSİLEN	1 DAKİKA
YIKAMA	DİSTİLE SU	15 DAKİKA
REHİDRATASYON	%80 ALKOL	1 DAKİKA
	%90 ALKOL	1 DAKİKA
DEPARAFİNİZASYON	KSİLEN	1 SAAT
KAPAMA	ENTELLAN	
İNCELEME	OLYMPUS MARKA IŞIK	
	MİKROSKOPU	

6. BULGULAR

Bu çalışmada, EZH2 proteininin endometriyum kanser gelişimindeki önemi indirek immunohistokimyasal, Western blotting ve TUNEL yöntemleri ile değerlendirilmiştir. İyi diferansiye, düşük malign potansiyeli olan Ishikawa ve kötü diferansiye, yüksek malign potansiyeli olan MFE-319 insan adenokanser hücre hatlarında anti-EZH2 primer antikoru kullanılarak immunoreaktiviteleri ve protein varlığı saptanmıştır.

Histopatolojik olarak incelenen formalin ile tespit edilmiş ve parafine gömülmüş normal endometriyum (proliferasyon ve sekresyon evresi), endometriyal hiperplazi (basit-atipisiz ve kompleks-atipili) ve endometriyum kanserlerinden (Tip I ve Tip II endometriyal adenokanserler) alınan doku örneklerinde EZH2 immunolokalizasyonları, pozitif boyanan % hücre sayıları ve immunoreaktivite şiddetleri belirlenerek H-Skor hesaplanmıştır. Apoptotik % indeksi TUNEL yöntemi ile belirlenerek, gruplardan elde edilen tüm sonuçlar One-way ANOVA istatistik testi ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

6.1. Hücre Kültürü Bulguları

Ishikawa insan endometriyum adenokanser hücre hattı MEM, 2mM L-Glutamine, %1 Non Essential Amino Asit (NEAA), %5 Fötal Bovine Serum (FBS) ve %1 Penisilin/Streptomisin içeren hücre medyumunda, %5 CO₂ ve 37°C şartlarını sağlayan nemli inkübatörde çoğaltılmıştır.

39 yaşındaki endometriyal karsinomlu kadından elde edilen, atimik farelere verildiğinde iyi diferansiye kanser oluşturan, östrojen ve progesteron reseptörleri içeren ve düşük malign potansiyeli olan **Ishikawa hücrelerinin** inverted mikroskop altında değerlendirilmesinde epitel- benzeri yapıda ve mekik biçimli oldukları, hücre kültür kabına yapışarak çoğaldıkları izlenmiştir (**Resim 1**). Ishikawa hücrelerinin ikilenme zamanları 30 saat olarak belirlenmiştir.

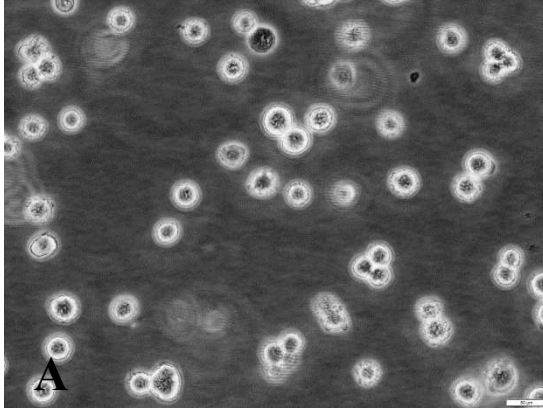
Ishikawa hücrelerinin laboratuvara alındıkları ilk görüntüleri, semi-konfluent ve konfluent görüntüleri sırasıyla **Resim 1 (A-C)**'de gösterilmiştir.

MFE-319 (ACC-423) insan endometriyum adenokanser hücre hattı %40 RPMI, %40 MEM (with Earle's salts), %20 ısı ile inaktive edilmiş FBS, 2 mM L-Glutamin, %1 Penisilin/Streptomisin içeren hücre medyumunda, %5 CO₂ ve 37°C şartlarını sağlayan nemli inkübatörde çoğaltılmıştır.

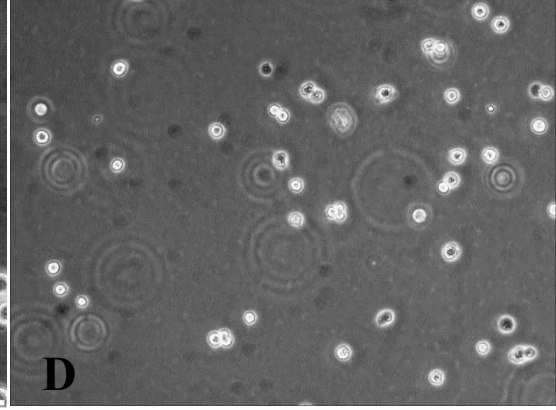
81 yaşındaki primer adenoskuamöz endometriyum karsinomalı kadından elde edilen, nude farelere verildiğinde kötü diferansiye tümör geliştiren, östrojen ve progesteron reseptörleri negatif **MFE-319 hücrelerinin** inverted mikroskop altında değerlendirilmesinde hücrelerin epitel benzeri-mekik biçimli oldukları, kültür kabına yapışarak çoğaldıkları ve kümelenme yaparak düzenlenme gösterdikleri izlenmiştir. Yuvarlak büyük çekirdek ve belirgin nükleolus içerdikleri gözlenmiştir (**Resim 1**). MFE-319 hücrelerinin ikilenme zamanları 100 saat olarak tespit edilmiştir.

MFE-319 hücrelerinin laboratuvara alındıkları ilk görüntüleri, semi-konfluent ve konfluent görüntüleri sırasıyla **Resim 1 (D-F)** 'de gösterilmiştir.

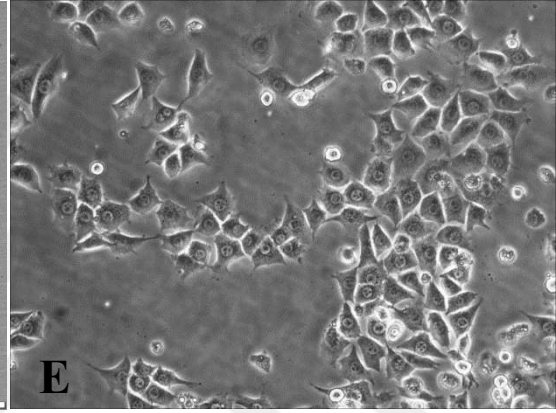
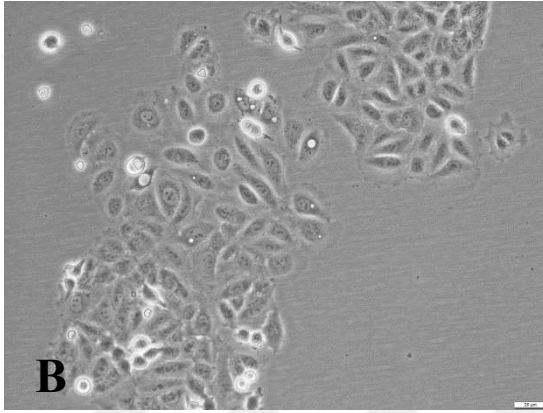
ISHIKAWA
İnsan Endometriyum Adenokanser
Hücre Hattı



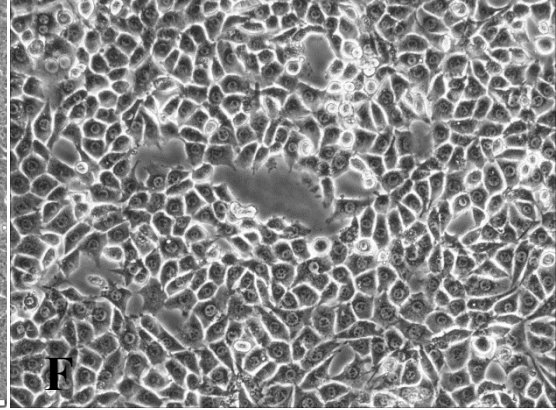
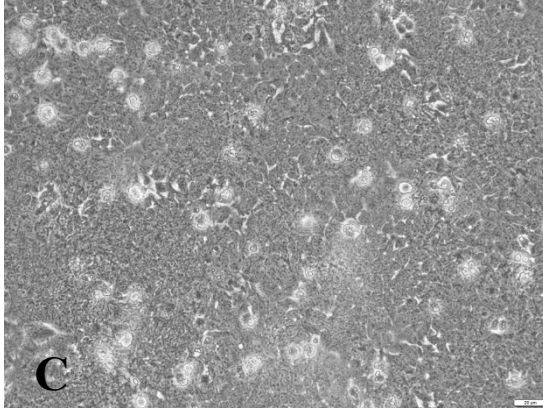
MFE-319 (ACC423)
İnsan Endometriyum Adenokanser
Hücre Hattı



Hücrelerin ilk görüntüleri



Hücrelerin semi-konfluent görüntüleri



Hücrelerin konfluent görüntüleri

Resim 1. Ishikawa (A-C) Ve MFE-319 (ACC423) (D-F) İnsan Endometriyum Adenokanser Hücre Hatlarının İnverted Mikroskop Görüntüleri.

(Orijinal Büyütme: X200)

6.1.1. Endometriyum Adenokanser Hücre Hatlarının İndirek İmmunohistokimya Boyamaları

Atimik farelere verildiğinde iyi diferansiye endometriyum adenokanseri oluşturan **Ishikawa** hücreleri, steril yuvarlak lameller yerleştirilen 24 gözlü kültür kapları içerisinde 24 saat süre ile çoğaltıldıktan sonra, %4'lük paraformaldehid ile tespit edilerek avidin-biyotin peroksidaz yöntemi ile anti-EZH2 primer antikoru kullanılarak indirek immunohistokimyasal olarak değerlendirilmiştir.

Ishikawa hücrelerinin EZH2 immunoreaktivite yoğunlukları hafif (1) ve orta (2) olarak belirlenmiştir (**Resim 2, Tablo 9**). Özellikle bölünen hücrelerde pozitif EZH2 immunoreaktiviteleri izlenmiştir. Yedi farklı alanda hücreler immunoreaktivite yoğunlukları yönünden sayılmış ve toplam pozitif boyanan hücre sayıları ile immunoreaktivite şiddetlerinin 1 ile toplanması ile elde edilen sayının çarpılması ile H-Skor'lar hesaplanmıştır.

Ishikawa hücrelerinin anti-EZH2 primer antikoru ile indirek immunohistokimyasal olarak değerlendirilmesi sonucunda H-Skor ortalaması **137,57 ± 31,45** olarak belirlenmiştir. Sonuçlar karşılaştırmalı olarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (**Grafik 1**).

Nude farelere verildiğinde kötü diferansiye endometriyum kanseri oluşturan **MFE-319 (ACC-423)** insan endometriyum adenokanser hücre hatları 8 gözlü chamber slide içerisinde 72 saat süre ile çoğaltıldıktan sonra %4'lük paraformaldehid ile tespit edilerek avidin-biyotin peroksidaz yöntemi ile anti-EZH2 primer antikoru kullanılarak indirek immunohistokimyasal olarak değerlendirilmiştir.

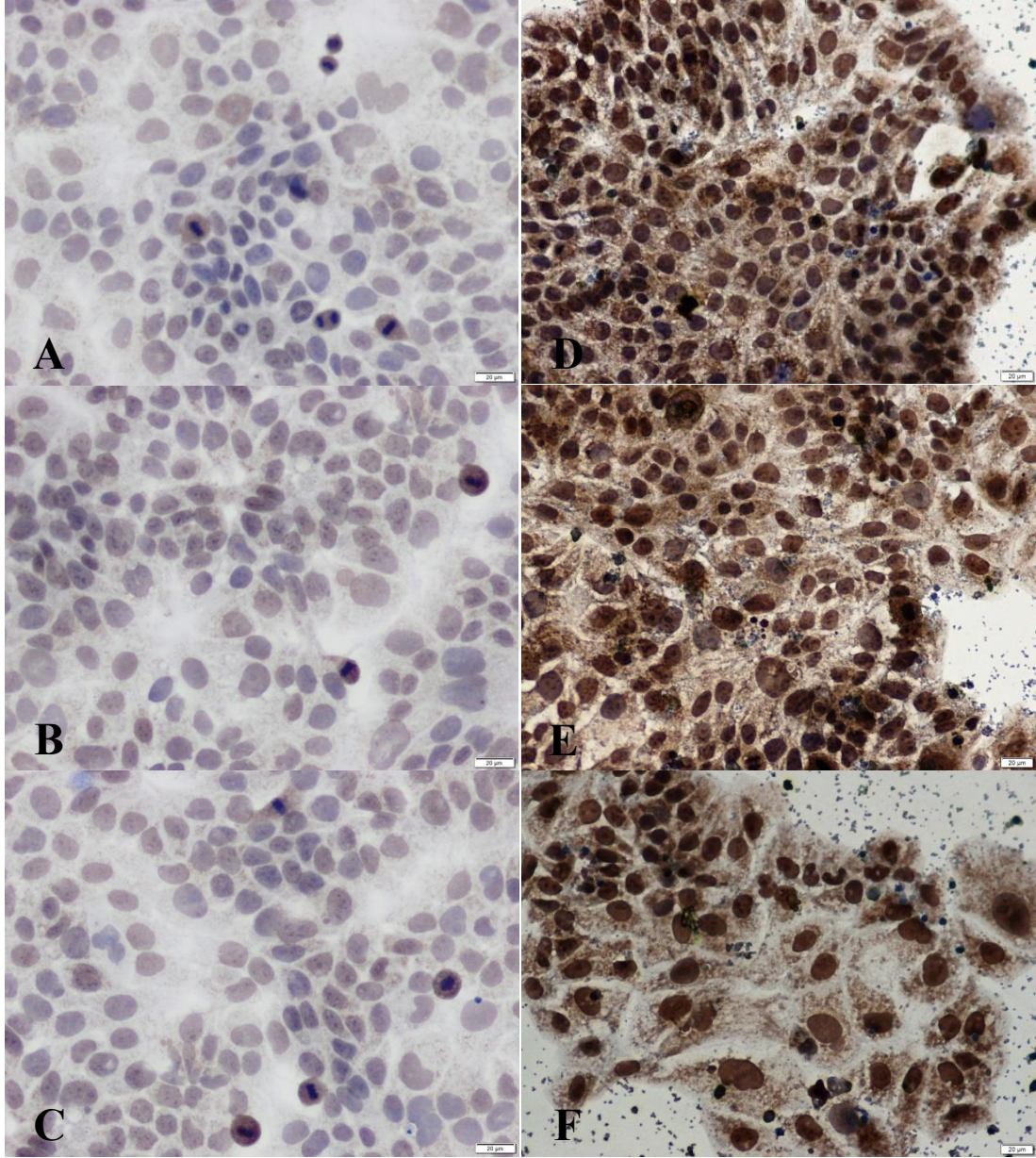
MFE-319 hücrelerinin EZH2 immunoreaktivite yoğunlukları şiddetli (3) ve çok şiddetli (4) olarak belirlenmiştir (**Resim 2, Tablo 10**). Yedi farklı alanda hücreler immunoreaktivite yoğunlukları yönünden sayılmış ve toplam pozitif boyanan hücre sayıları ile immunoreaktivite şiddetlerinin 1 ile toplanması ile elde edilen sayının çarpılması ile H-Skor'lar hesaplanmıştır.

MFE-319 (ACC-423) hücrelerinin anti-EZH2 primer antikoru ile indirek immunohistokimyasal olarak değerlendirilmesi sonucunda H-Skor ortalaması **352,85 ± 78,94** olarak belirlenmiştir. Sonuçlar karşılaştırmalı olarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (**Grafik 1**).

ISHIKAWA
İnsan Endometriyum Adenokanser
Hücre Hattı

MFE-319 (ACC423)
İnsan Endometriyum Adenokanser
Hücre Hattı

Anti-EZH-2 Primer Antikoru



Resim 2. Ishikawa Ve MFE-319 (ACC423) İnsan Endometriyum Adenokanser Hücrelerinin Anti-EZH2 Primer Antikoru İle İndirek İmmunohistokimyasal Yöntemle Elde Edilen İmmunoreaktivite Boyanma Görüntüleri

Kültür kabına yapışarak çoğalan, epitel-benzeri Ishikawa hücrelerinde hafif/orta; MFE-319 (ACC 423) hücrelerinde şiddetli/çok şiddetli EZH2 immunoreaktiviteleri kahverengi olarak izlenmektedir.

Kromojen: DAB, Orijinal büyütme: X 200, Bar: 20 µm

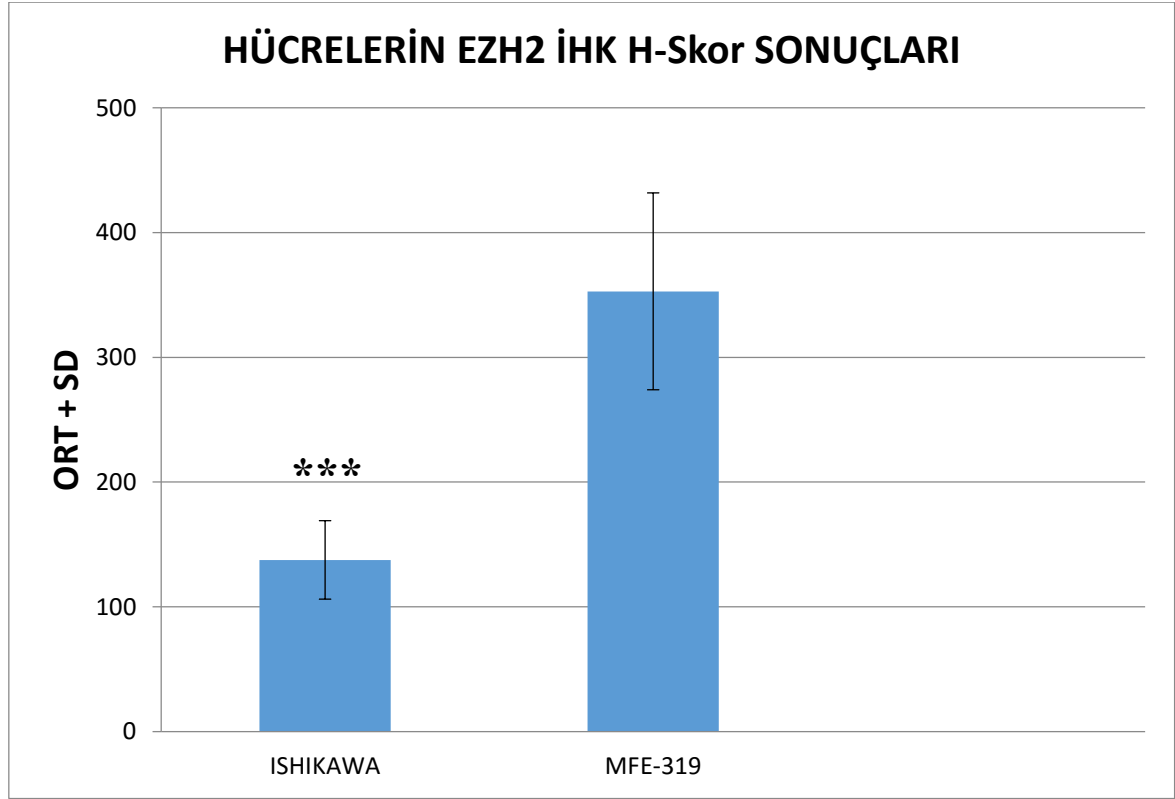
Tablo 9. Ishikawa insan endometriyum adenokanser hücrelerinin anti-EZH2 primer antikoru ile elde edilen H-Skor Sonuçları

ISHIKAWA	Boyama Şiddeti				Toplam pozitif boyanan hücre %	H-Skor
	1	2	3	4		
1. Alan	X				60	120
2. Alan	X				65	130
3. Alan	X				50	100
4. Alan		X			57	171
5. Alan	X				56	112
6. Alan		X			48	144
7. Alan	X				93	186
ORT						137,57 ± 31,45

Tablo 10. MFE-319 (ACC423) insan endometriyum adenokanser hücrelerinin anti-EZH2 primer antikoru ile elde edilen H-Skor Sonuçları

MFE-319 (ACC423)	Boyama Şiddeti				Toplam pozitif boyanan hücre %	H-Skor
	1	2	3	4		
1. Alan				X	90	450
2. Alan			X		75	300
3. Alan				X	60	300
4. Alan				X	57	285
5. Alan				X	95	475
6. Alan			X		90	360
7. Alan			X		75	300
ORT						352,85 ± 78,94

Grafik 1. Ishikawa ve MFE-319 (ACC423) İnsan Endometriyum Adenokanser Hücrelerinin Anti-EZH2 Primer Antikoru İle Elde Edilen H-Skor Sonuçlarının İstatistiksel Karşılaştırmaları



***** Ishikawa EZH2 vs MFE-319 EZH2 p < 0.0001**

İyi diferansiye **Ishikawa** ve kötü diferansiye **MFE-319** insan endometriyum adenokanseri hücre hatlarında **anti-EZH2** primer antikoru ile yapılan immunohistokimyasal boyamaların H-Skor ile değerlendirilmesinde, MFE-319 insan endometriyum adenokanseri hücre hattında istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu izlenmektedir.

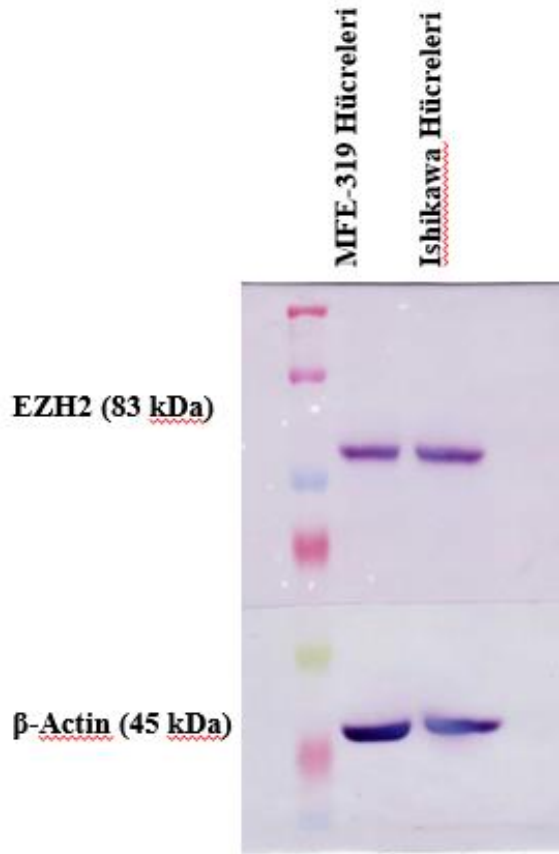
6.2. Western Blotting Bulguları

6.2.1. Ishikawa ve MFE-319 (ACC423) İnsan Endometriyum Adenokanser Hücre Hatlarında EZH2 Protein Tayini

Western Blotting çalışması için uygun koşullarda hücrelerin çoğaltılması işlemi gerçekleştirildikten sonra çoğalan hücrelerin, protein ekstraksiyonu ölçümü işlemleri gerçekleştirilmiştir. Oubit cihazı ile protein miktarları ölçümü yapılmıştır.

Ishikawa hücrelerinin protein miktarı 3,72 µg/ µl; MFE-319 hücrelerinin protein miktarı ise 3,86 µg/ µl olarak belirlenmiştir.

Hücre ekstraksiyonları anti-EZH2 primer antikoru kullanılarak Western Blotting yöntemi ile moleküler ağırlığı 83kDa olan EZH2 protein varlığı saptanmıştır. Kontrol olarak 45kDa moleküler ağırlığı olan β Aktin kullanılmıştır (**Resim 3**). Her iki endometriyal adenokanser hücre hatlarında EZH2 proteininin saptanmış olması, immunohistokimyasal olarak belirlenen EZH2 varlığının doğrulanmasını sağlamıştır.



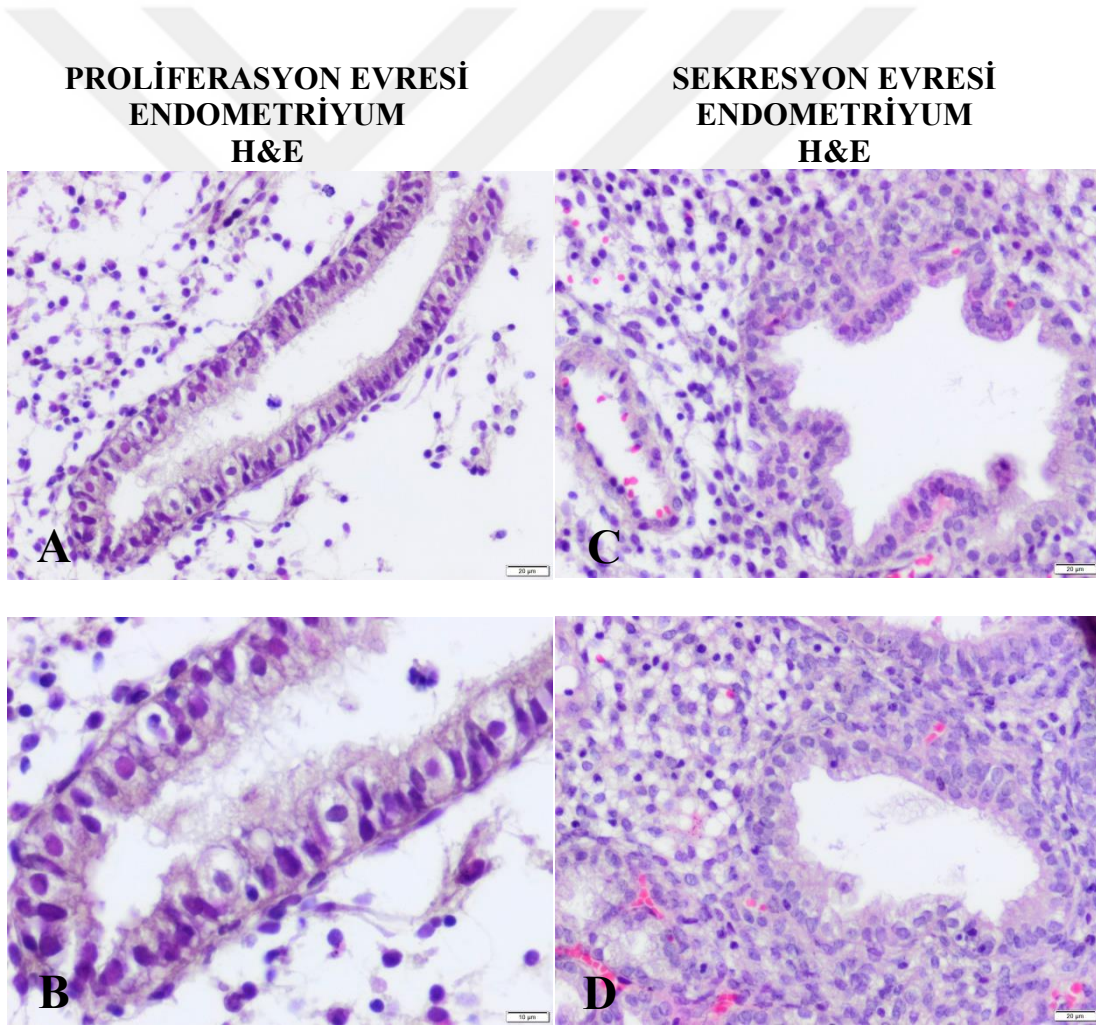
Resim 3. Ishikawa Ve MFE-319 (ACC423) İnsan Endometriyal Adenokanser Hücre Hatlarında Western Blotting Yöntemi Sonuçları.

Moleküler ağırlığı 83kDa olan EZH2 protein varlığı her iki endometriyal kanser hücre hattında görülmektedir. Kontrol olarak 45kDa moleküler ağırlığı olan β Aktin kullanılmıştır.

6.3. Histopatolojik Değerlendirme Bulguları

Bu çalışmada; formalin ile tespit edilmiş ve parafine gömülmüş proliferasyon ve sekresyon evrelerinde alınan normal endometriyum; basit- atipisiz ve kompleks atipili endometriyal hiperplazi; tip I ve tip II endometriyum adenokanser örnekleri Hematoksilen&Eozin (H&E) boyaması ile ışık mikroskop altında değerlendirilmiştir.

Proliferasyon evresinde alınan doku örneklerinde; kinosilya içeren tek katlı prizmatik yüzey epitelinin, endometriyal stroma içerisine invagine olarak, çok sayıda tübüler tipte uterus bezlerini oluşturduğu ve hücrelerin çoğaldıkları gözlenmiştir (**Resim 4 A-B**). **Sekresyon evresinde** alınan doku örneklerinde; endometriyum bezlerinin fazla kıvrıntılı, spiral biçimde oldukları, epitel hücrelerinin nukleuslarının üstünde salgı vakuollerinin olduğu ve salgı ürünlerinin bezlerin lümenlerini genişlettikleri izlenmiştir (**Resim 4 C-D**).

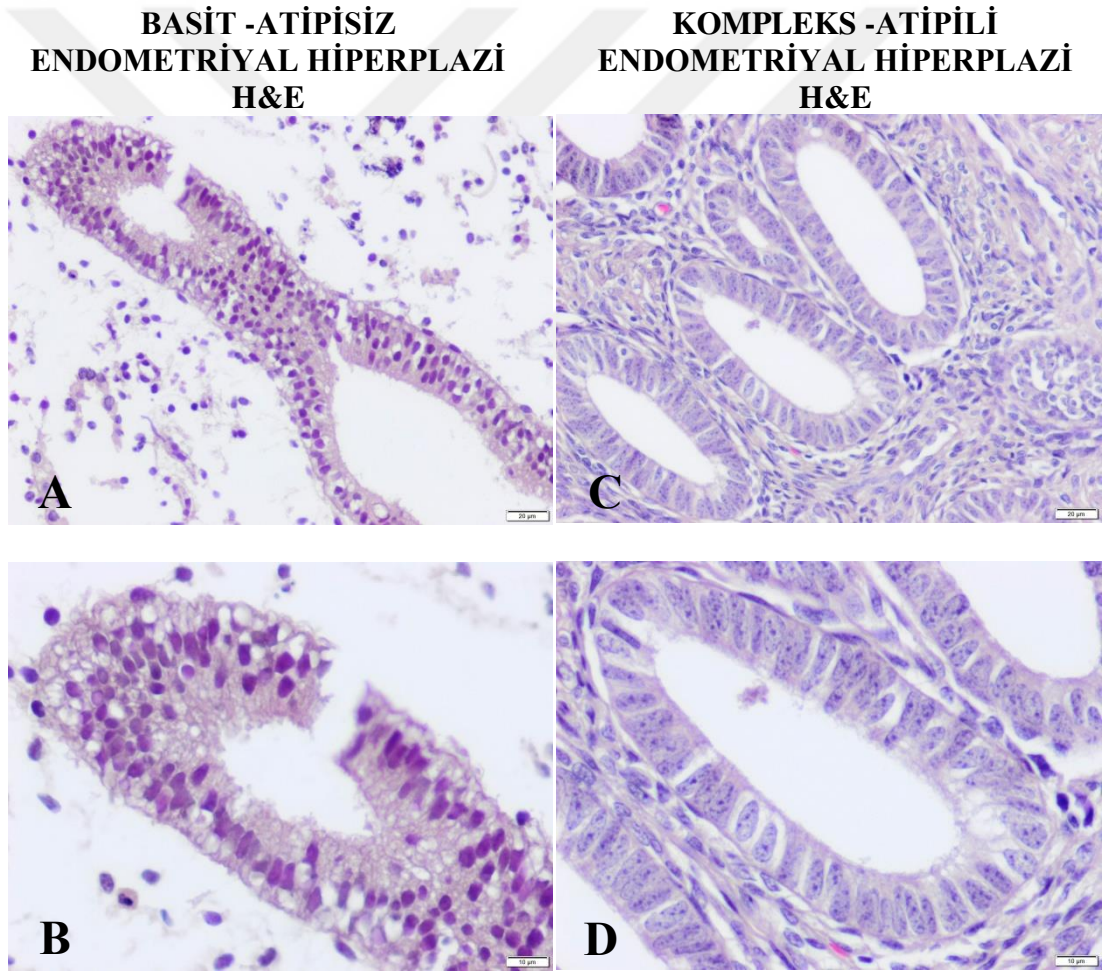


Resim 4. Proliferasyon (A-B) ve Sekresyon (C-D) Evrelerinde Alınan Endometriyum Örneklerinin H&E Boyalı Preperatlarının Işık Mikroskopik Görüntüleri

Orijinal büyütme: X 200 (A-C) X100 (B-D)

Histopatolojik olarak **basit-atipisiz endometriyal hiperplazi** olarak tanı konulan doku örneklerinde; hücreden zengin stroma içinde kistik genişlemiş, yer yer dallanma gösteren bez yapılarının varlığı izlenmiştir. Bezleri döşeyen hücrelerin yalancı çok katlı ve prizmatik olduğu izlenirken, sitolojik atipi gözlenmemiştir. Mitozun değişken olduğu ve proliferasyon evresindeki endometriyumdan farklı olarak stromal hücrelerin daha yoğun olduğu izlenmiştir (**Resim 5 A-B**)

Histopatolojik olarak **kompleks-atipili endometriyal hiperplazi** olarak belirlenen doku örneklerinde; hücrelerde mitoz, bezlerin sayıca artmış olduğu, sırsırta dizilim, düzensiz dallanmalar ve hücrel atipi olduğu gözlenmiştir. Bezlerin artmış olmasına bağlı olarak stromanın azalmış olduğu izlenmiştir. Atipik hücrelerin nükleuslarının büyümüş olduğu, dağınık, ince kromatin içerdiği gözlenmiştir (**Resim 5 C-D**).

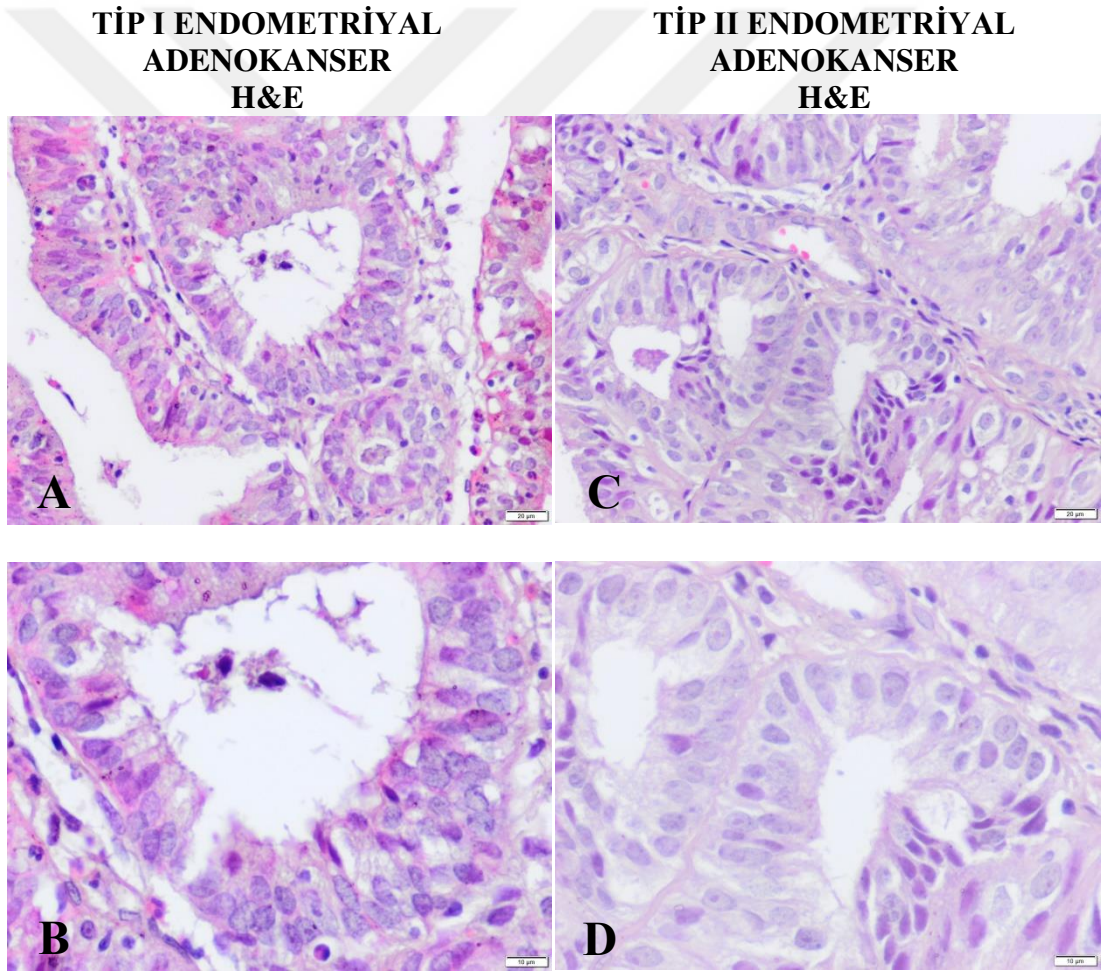


Resim 5. Basit- Atipisiz (A-B) ve Kompleks-Atipili (C-D) Endometriyal Hiperplazi Tanısı Alan Endometriyum Örneklerinin H&E Boyalı Preperatlarının Işık Mikroskopik Görüntüleri.

Orijinal büyütme: X 200 (A-C), X 400 (B-D)

Histopatolojik olarak **Tip I endometriyal adenokanseri** olarak tanı konulan endometriyum doku örneklerinde; mitozun değişken olduğu izlenmiştir. Endometriyum bezlerinin düzensiz, kripriform ve intra glandüler köprüleşmeler içerdikleri, boyutlarının değişken olduğu, stromanın daralmış olduğu gözlenmiştir (**Resim 6 A-B**).

Histopatolojik olarak **Tip II endometriyal adenokanseri** olarak tanı konulan endometriyum doku örneklerinde; hücrelerde mitozun artmış olduğu, hücrelerin sitoplazmalarının soluk ve nükleusların büyük ve düzensiz görünümlü olduğu izlenmiştir. Bezlerin düzensiz ve sayıca artmış olduğu, hücresel atipi ve stroma invazyonu olduğu gözlenmiştir. Bezlerin artmış olmasına bağlı olarak stromanın azalmış olduğu izlenmiştir. Atipik hücrelerin pleimorfik, belirgin nukleolus ve düzensiz kaba kromatin içerdiği gözlenmiştir (**Resim 6 C-D**).



Resim 6. Tip I Endometriyal Adenokanser (A-B) ve Tip II Endometriyal Adenokanser (C-D) Tanısı Alan Endometriyum Örneklerinin H&E Boyalı Preperatlarının Işık Mikroskopik Görüntüleri.

Orijinal büyütme: X 200 (A-C), X 400 (B-D)

6.4. İmmunohistokimyasal Değerlendirme Bulguları

Anti-EZH2 Primer Antikoru Bulguları

Bu çalışmada, normal endometriyum (proliferasyon ve sekresyon evreleri), endometriyal hiperplazi (basit-atipisiz ve kompleks-atipili) ve endometriyum kanseri (Tip I ve Tip II endometriyal adenokanserler) doku örneklerinden alınan kesitlerde **anti-EZH2** primer antikoru kullanılarak avidin-biotin peroksidaz yöntemi ile indirek immunohistokimyasal değerlendirme yapılmıştır (n: 10, herbir grup).

Kesitlerde pozitif boyanan hücre sayıları, immunoreaktivite şiddetleri ve immunolokalizasyonları belirlenerek değerlendirme yapılmıştır. İmmünoreaktivite şiddetleri 1 (hafif), 2 (orta), 3 (şiddetli) ve 4 (çok şiddetli) olarak yarı-kantitatif yöntemle belirlenmiştir. Gruplardan 3 farklı alandan elde edilen sonuçlar ile H-Skorlar hesaplanmıştır ve sonuçlar One-Way ANOVA istatistik testi ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

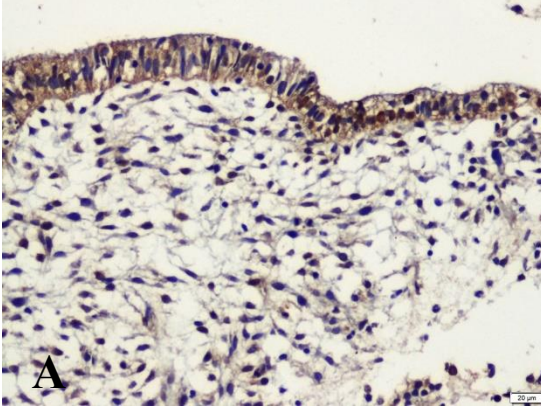
Normal endometriyumun **proliferasyon evresinden** elde edilen 10 örneğin, anti-EZH2 primer antikoru ile immunohistokimyasal olarak değerlendirilmesinde; sitoplazmik ve nükleer immunolokalizasyonlarda orta, şiddetli ve çok şiddetli immunoreaktivite boyanmaları izlenmiştir. 4 örnekte sitoplazmik **orta immunoreaktivite**; 2 örnekte nükleer, 2 örnekte sitoplazmik **şiddetli immunoreaktivite**; 1 örnekte nükleer, 1 örnekte sitoplazmik **çok şiddetli immunoreaktivite** izlenmiştir (Tablo 11, Resim 7).

Bu gruptan elde edilen H-Skoru **231,50 ± 59,26** (Ortalama ± SD) olarak bulunmuştur. One-way ANOVA istatistik testi ile grupların karşılaştırmalı olarak değerlendirilme sonuçları **Grafik 2'**de sunulmuştur.

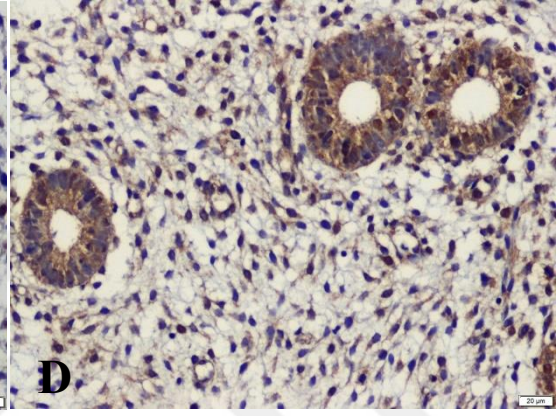
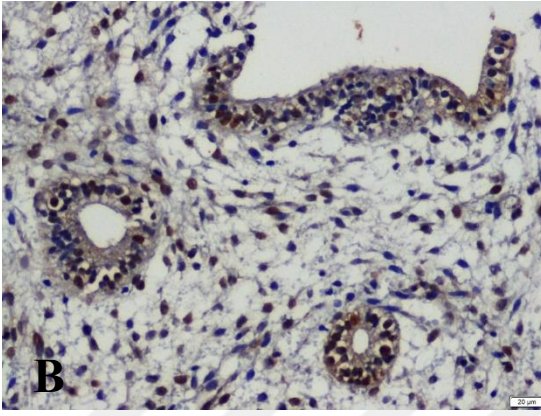
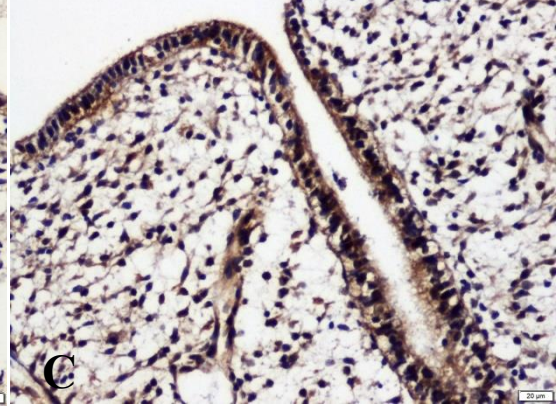
Tablo 11. Normal Proliferasyon Evresi Endometriyum Örneklerinde anti-EZH2 Primer Antikoru İmmunoreaktivite Şiddeti ve İmmunolokalizasyon Sonuçları (n:10)

Proliferasyon Evresi	İmmunoreaktivite şiddeti ve immunolokalizasyonu							
	1		2		3		4	
Preperat No	Nükleer	Sitoplazmk	Nükleer	Sitoplazmk	Nükleer	Sitoplazmk	Nükleer	Sitoplazmk
3665-15						X		
3739-15							X	
3828-15						X		
3831-15				X				
3852-15				X				
3855-4/15				X				
4005-15								X
4009-2/15					X			
4117-15					X			
4023-15				X				

**PROLİFERASYON EVRESİ
ENDOMETRİYUM
EZH2 İHK**



**PROLİFERASYON EVRESİ
ENDOMETRİYUM
EZH2 İHK**



Resim 7. Proliferasyon Evresinde Alınan Normal Endometriyum Örneklerinde Anti-EZH2 Primer Antikoru İle İndirek İmmunohistokimyasal Yöntemle Boyalı Preperatlarının Işık Mikroskopik Görüntüleri.

Endometriyum Yüzey Epiteli Ve Endometriyal Bezlerde Sitoplazmik Ve Nükleerpozitif EZH2 İmmunoreaktiviteleri Kahverengi Olarak İzlenmektedir.

Kromojen: DAB, Artalan boyaması: Mayer's Hematoksilen, Orijinal büyütme: X 200

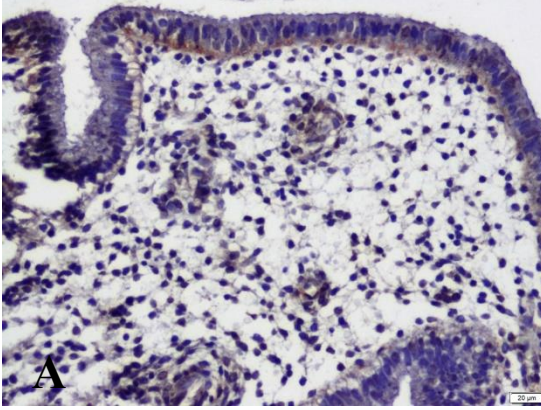
Normal endometriyumun **sekresyon evresinden** elde edilen 10 örneğin, **anti-EZH2** primer antikoru ile immunohistokimyasal olarak değerlendirilmesinde; sitoplazmik ve nükleer immunolokalizasyonlarda hafif, orta, şiddetli ve çok şiddetli immunoreaktivite boyanmaları izlenmiştir. 4 örnekte sitoplazmik **hafif immunoreaktivite**; 3 örnekte sitoplazmik **orta immunoreaktivite**; 1 örnekte nükleer, 1 örnekte sitoplazmik **şiddetli immunoreaktivite**; 1 örnekte sitoplazmik **çok şiddetli immunoreaktivite** izlenmiştir (Tablo 12, Resim 8).

Bu gruptan elde edilen H-Skoru **190,50 ± 52,41** (Ortalama ± SD) olarak bulunmuştur. One-way ANOVA istatistik testi ile grupların karşılaştırmalı olarak değerlendirilme sonuçları **Grafik 2**'de sunulmuştur.

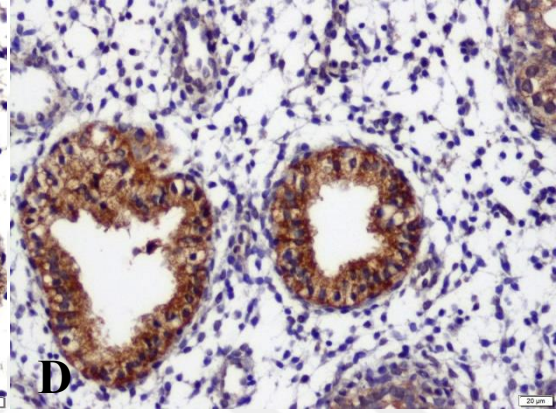
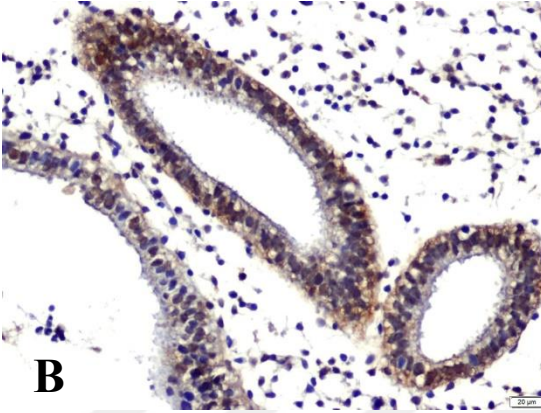
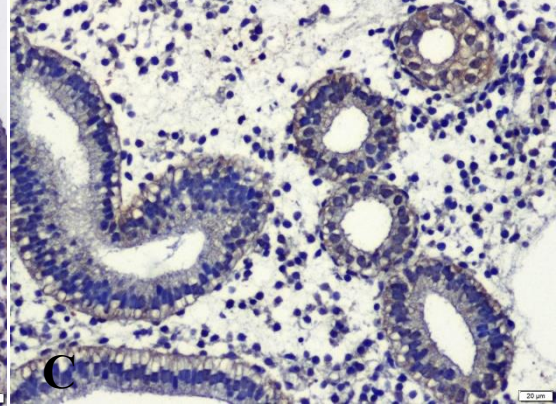
Tablo 12. Normal Sekresyon Evresi Endometriyum Örneklerinde anti-EZH2 Primer Antikoru İmmunoreaktivite Şiddeti ve İmmunolokalizasyon Sonuçları (n:10)

Sekresyon Evresi	İmmunoreaktivite şiddeti ve immunolokalizasyonu							
	1		2		3		4	
Preperat No	Nükleer	Sitoplazmik	Nükleer	Sitoplazmik	Nükleer	Sitoplazmik	Nükleer	Sitoplazmik
3951-15						X		
3953-15				X				
3974-2/15		X						
4006-15					X			
4060-1/15								X
4068-2/15		X						
4109/15				X				
4119/15		X						
4338-15				X				
4546-15		X						

**SEKRESYON EVRESİ
ENDOMETRİYUM
EZH2 İHK**



**SEKRESYON EVRESİ
ENDOMETRİYUM
EZH2 İHK**



Resim 8. Sekresyon Evresinde Alınan Normal Endometriyum Örneklerinde Anti-EZH2 Primer Antikoru İle İndirek İmmunohistokimyasal Yöntemle Boyalı Preperatlarının Işık Mikroskopik Görüntüleri.

Endometriyum yüzey epiteli ve endometriyal bezlerde sitoplazmik ve nükleer pozitif EZH2 immunoreaktiviteleri kahverengi olarak izlenmektedir.

Kromojen: DAB, Artalan boyaması: Mayer's Hematoksilen, Orijinal büyütme: X 200

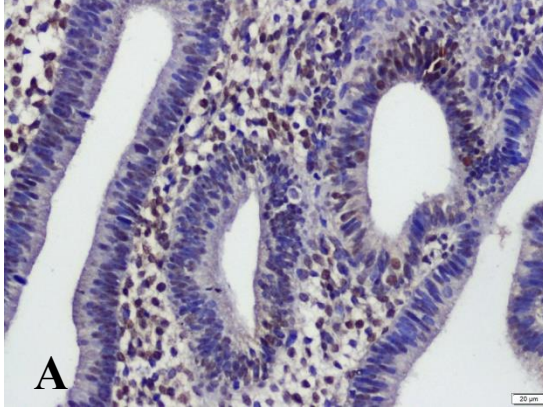
Histopatolojik olarak **basit-atipisiz endometriyal hiperplazi** olarak tanı konulan 10 örneğin, anti-EZH2 primer antikoru ile immunohistokimyasal olarak değerlendirilmesinde; sitoplazmik ve nükleer immunolokalizasyonlarda orta, şiddetli ve çok şiddetli immunoreaktivite boyanmaları izlenmiştir. 4 örnekte sitoplazmik **orta immunoreaktivite**; 2 örnekte nükleer, 3 örnekte sitoplazmik **şiddetli immunoreaktivite**; 1 örnekte sitoplazmik **çok şiddetli immunoreaktivite** izlenmiştir (Tablo 13, Resim 9).

Bu gruptan elde edilen H-Skoru **261,00 ± 56,85** (Ortalama ± SD) olarak bulunmuştur. One-way ANOVA istatistik testi ile grupların karşılaştırmalı olarak değerlendirilme sonuçları **Grafik 2'**de sunulmuştur.

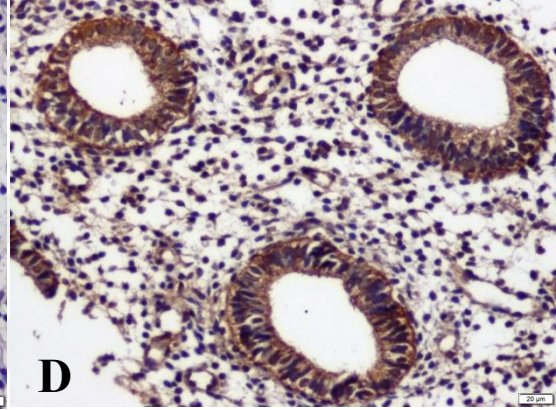
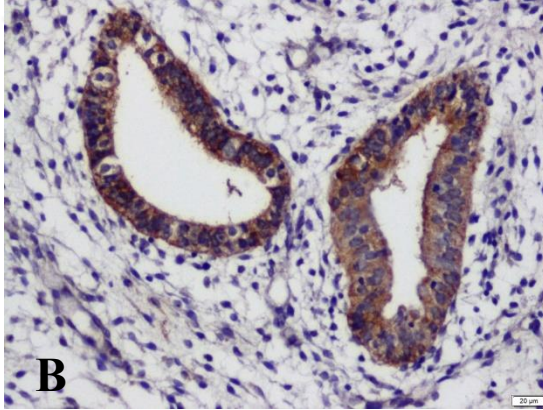
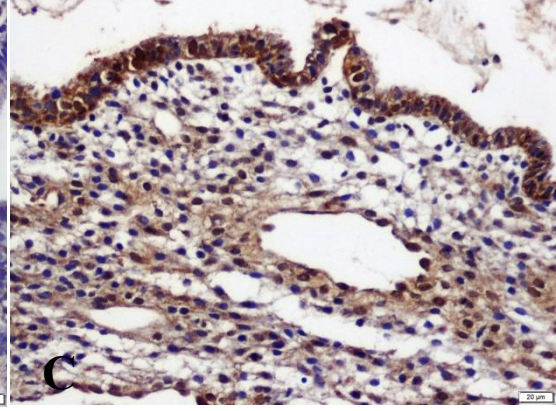
Tablo 13. Basit-Atipisiz Endometriyal Hiperplazi Örneklerinde anti-EZH2 Primer Antikoru İmmunoreaktivite Şiddeti ve İmmunolokalizasyonu Sonuçları (n:10)

Basit Atipisiz EH	İmmunoreaktivite şiddeti ve immunolokalizasyonu							
	1		2		3		4	
Preperat No	Nükleer	Sitoplazmik	Nükleer	Sitoplazmik	Nükleer	Sitoplazmik	Nükleer	Sitoplazmik
3694-3/14				X				
3703/15								
3704-1/15						X		
3813-2/15				X				
3845-2/15				X		X		
4001-15								
4066-3/15					X			X
4203-15					X			
4228-15				X				
4255-3/15						X		

**BASİT ATİPİSİZ
ENDOMETRİYAL HİPERPLAZİ
EZH2 İHK**



**BASİT ATİPİSİZ
ENDOMETRİYAL HİPERPLAZİ
EZH2 İHK**



Resim 9. Basit-Atipisiz Endometriyal Hiperplazi Örneklerinde Anti-EZH2 Primer Antikoru İle İndirek İmmunohistokimyasal Yöntemle Boyalı Preperatlarının Işık Mikroskopik Görüntüleri.

Endometriyum yüzey epiteli ve endometriyal bezlerde sitoplazmik ve nükleer pozitif EZH2 immunoreaktiviteleri kahverengi olarak izlenmektedir.

Kromojen: DAB, Artalan boyaması: Mayer's Hematoksilen, Orijinal büyütme: X 200

Histopatolojik olarak **kompleks-atipili endometriyal hiperplazi** olarak tanı konulan 10 örneğin, anti-EZH2 primer antikoru ile immunohistokimyasal olarak değerlendirilmesinde; sitoplazmik ve nükleer immunolokalizasyonlarda orta, şiddetli ve çok şiddetli immunoreaktivite boyanmaları izlenmiştir. 2 örnekte sitoplazmik **orta immunoreaktivite**; 3 örnekte nükleer, 2 örnekte sitoplazmik **şiddetli immunoreaktivite**; 2 örnekte nükleer, 1 örnekte sitoplazmik **çok şiddetli immunoreaktivite** izlenmiştir. Bu grupta nükleer boyanan hücrelerin artmış olduğu gözlenmiştir (**Tablo 14, Resim 10**).

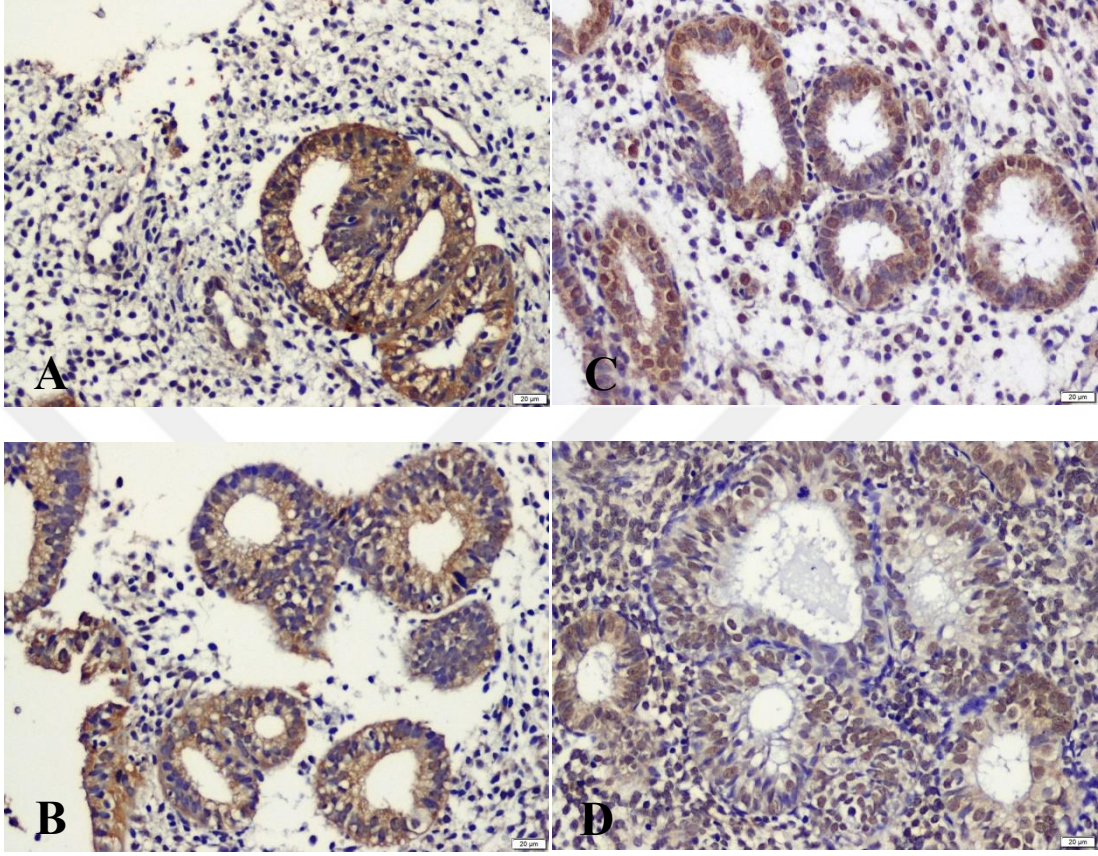
Bu gruptan elde edilen H-Skoru $270,50 \pm 70,73$ (Ortalama $\pm$ SD) olarak bulunmuştur. One-way ANOVA istatistik testi ile grupların karşılaştırmalı olarak değerlendirilme sonuçları **Grafik 2'**de sunulmuştur.

Tablo 14. Kompleks-Atipili Endometriyal Hiperplazi Örneklerinde anti-EZH2 Primer Antikoru İmmunoreaktivite Şiddeti ve İmmunolokalizasyon Sonuçları (n:10)

Kompleks Atipili EH	İmmunoreaktivite şiddeti ve immunolokalizasyonu							
	1		2		3		4	
Preperat No	Nükleer	Sitoplazmik	Nükleer	Sitoplazmik	Nükleer	Sitoplazmik	Nükleer	Sitoplazmik
2649-2/15				X				
2889-8/15							X	
3394-1/15								X
3524-3/15							X	
3569-10/15					X			
3623-3/15						X		
3805-12/15					X			
4199-1/15						X		
5201-12					X			
5307-23				X				

**KOMPLEKS ATİPİLİ
ENDOMETRİYAL HİPERPLAZİ
EZH2 İHK**

**KOMPLEKS ATİPİLİ
ENDOMETRİYAL HİPERPLAZİ
EZH2 İHK**



Resim 10. Kompleks-Atipili Endometriyal Hiperplazi Örneklerinde Anti-EZH2 Primer Antikoru İle İndirek İmmunohistokimyasal Yöntemle Boyalı Preperatlarının Işık Mikroskopik Görüntüleri.

Endometriyum yüzey epiteli ve endometriyal bezlerde sitoplazmik ve nükleer pozitif EZH2 immunoreaktiviteleri kahverengi olarak izlenmektedir.

Kromojen: DAB, Artalan boyaması: Mayer's Hematoksilen, Orijinal büyütme: X 200

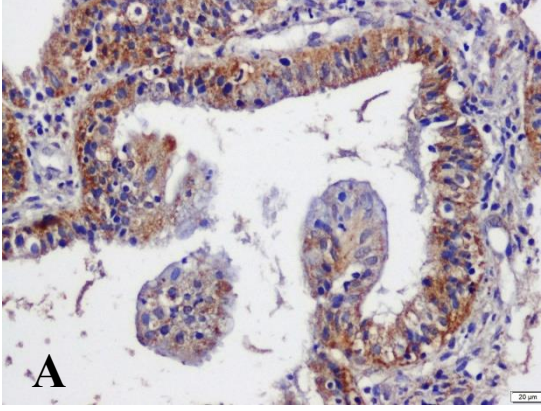
Histopatolojik olarak **Tip I endometriyal adenokanser** olarak tanı konulan 10 örneğin, anti-EZH2 primer antikoru ile immunohistokimyasal olarak değerlendirilmesinde; sitoplazmik ve nükleer immunolokalizasyonlarda orta, şiddetli ve çok şiddetli immunoreaktivite boyanmaları izlenmiştir. 3 örnekte sitoplazmik **orta immunoreaktivite**; 2 örnekte nükleer, 2 örnekte sitoplazmik **şiddetli immunoreaktivite**; 2 örnekte nükleer, 1 örnekte sitoplazmik **çok şiddetli immunoreaktivite** izlenmiştir. Bu grupta nükleer boyanan hücrelerin artmış olduğu gözlenmiştir (**Tablo 15, Resim 11**).

Bu gruptan elde edilen H-Skoru **270,50 ± 70,73** (Ortalama ± SD) olarak bulunmuştur. One-way ANOVA istatistik testi ile grupların karşılaştırmalı olarak değerlendirilme sonuçları **Grafik 2'**de sunulmuştur.

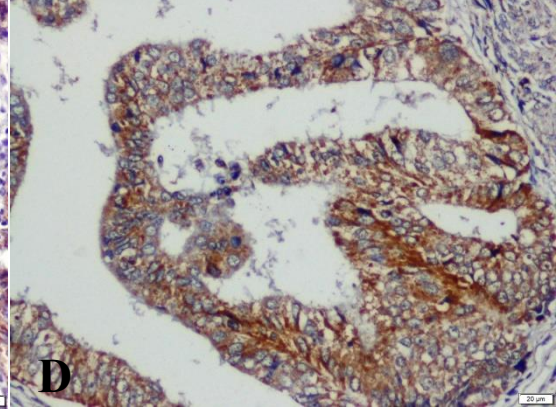
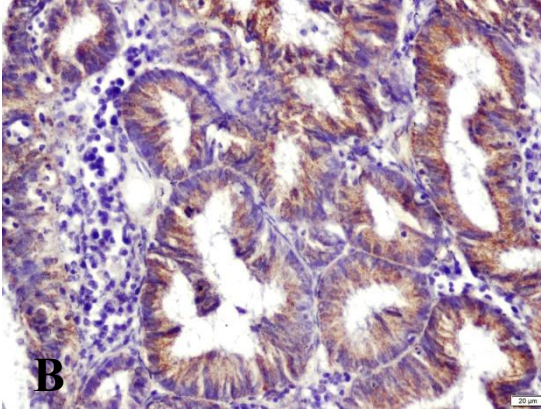
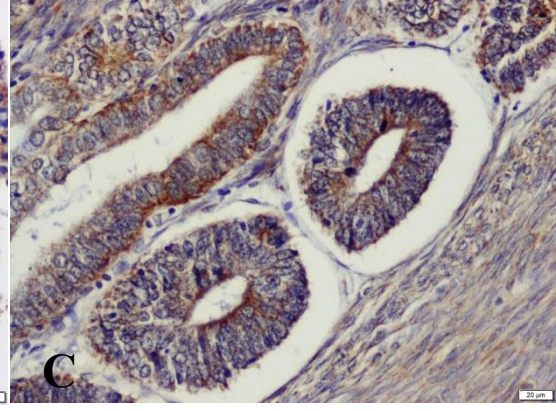
Tablo 15. Tip I Endometriyal Adenokanser Örneklerinde anti-EZH2 Primer Antikoru İmmunoreaktivite Şiddeti ve İmmunolokalizasyon Sonuçları (n:10)

Tip I Endometriyal Adenokanser	İmmunoreaktivite şiddeti ve immunolokalizasyonu							
	1		2		3		4	
Preperat No	Nükleer	Sitoplazmik	Nükleer	Sitoplazmik	Nükleer	Sitoplazmik	Nükleer	Sitoplazmik
1934-5/15						X		
2137-15								X
2219-11/15				X				
2275-15					X			
2844-3/15							X	
3421-3/15					X			
3478-15				X				
4028-7/15				X				
4463-7/15							X	
4771-4/15						X		

**TİP I ENDOMETRİYAL
ADENOKANSER
EZH2 İHK**



**TİP I ENDOMETRİYAL
ADENOKANSER
EZH2 İHK**



Resim 11. Resim 11. Tip I Endometriyal Adenokanser Örneklerinde Anti-EZH2 Primer Antikoru İle İndirek İmmunohistokimyasal Yöntemle Boyalı Preperatlarının Işık Mikroskopik Görüntüleri.

Endometriyum yüzey epiteli ve endometriyal bezlerde sitoplazmik ve nükleer pozitif EZH2 immunoreaktiviteleri kahverengi olarak izlenmektedir.

Kromojen: DAB, Artalan boyaması: Mayer's Hematoksilen, Orijinal büyütme: X 200

Histopatolojik olarak **Tip II endometriyal adenokanser** olarak tanı konulan 10 örneğin, anti-EZH2 primer antikoru ile immunohistokimyasal olarak değerlendirilmesinde; sitoplazmik ve nükleer immunolokalizasyonlarda orta, şiddetli ve çok şiddetli immunoreaktivite boyanmaları izlenmiştir. 1 örnekte sitoplazmik **orta immunoreaktivite**; 2 örnekte nükleer, 2 örnekte sitoplazmik **şiddetli immunoreaktivite**; 3 örnekte nükleer, 2 örnekte sitoplazmik **çok şiddetli immunoreaktivite** izlenmiştir. Bu grupta nükleer boyanan hücrelerin artmış olduğu gözlenmiştir (**Tablo 16, Resim 12**).

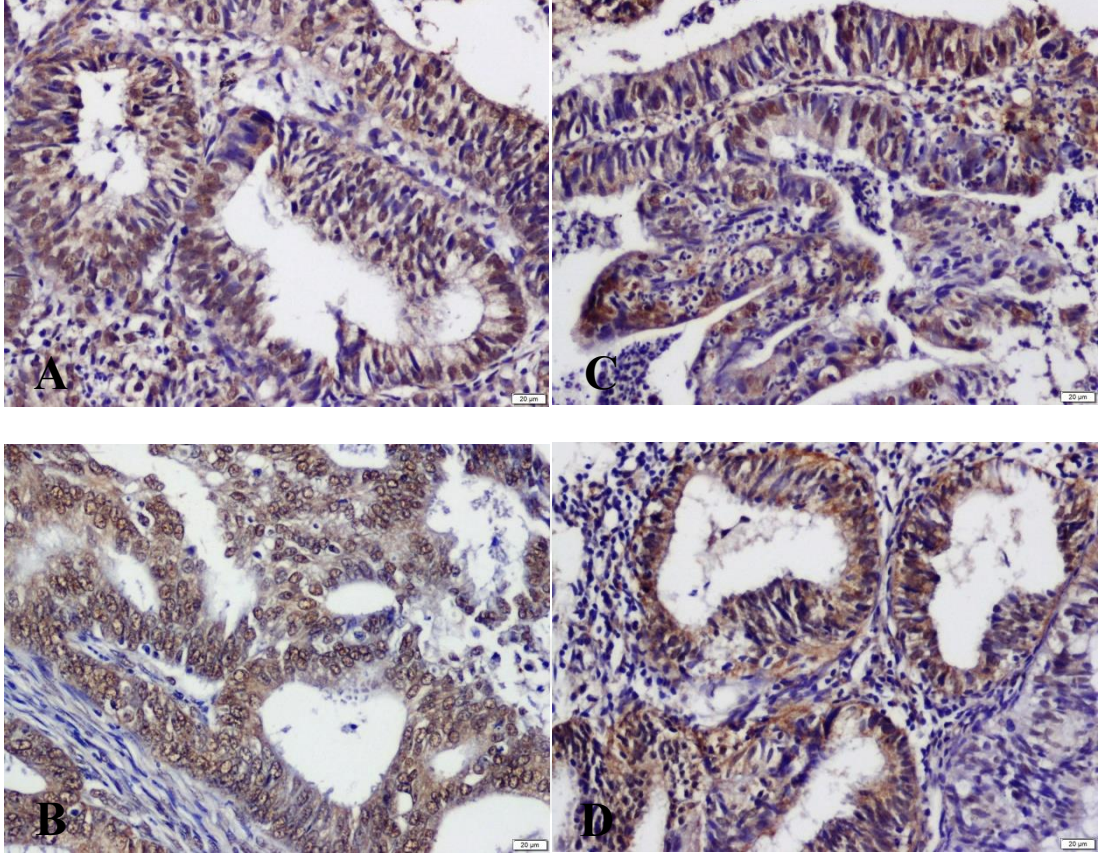
Bu gruptan elde edilen H-Skoru **366,00 ± 63,67** (Ortalama ± SD) olarak bulunmuştur. One-way ANOVA istatistik testi ile grupların karşılaştırmalı olarak değerlendirilme sonuçları **Grafik 2**'de sunulmuştur.

Tablo 16. Tip II Endometriyal Adenokanser Örneklerinde anti-EZH2 Primer Antikoru İmmunoreaktivite Şiddeti ve İmmunolokalizasyon Sonuçları (n:10)

Tip II Endometriyal Adenokanser	İmmunoreaktivite şiddeti ve immunolokalizasyonu							
	1		2		3		4	
Preperat No	Nükleer	Sitoplazmik	Nükleer	Sitoplazmik	Nükleer	Sitoplazmik	Nükleer	Sitoplazmik
3325-15						X		
3384-15								X
3466-15							X	
3730-4/15					X			
3777-15							X	
4100-17/15				X				
4105-9/15					X			
4301-29/15							X	
4301-38/15								X
4362-15						X		

**TİP II ENDOMETRİYAL
ADENOKANSER
EZH2 İHK**

**TİP II ENDOMETRİYAL
ADENOKANSER
EZH2 İHK**

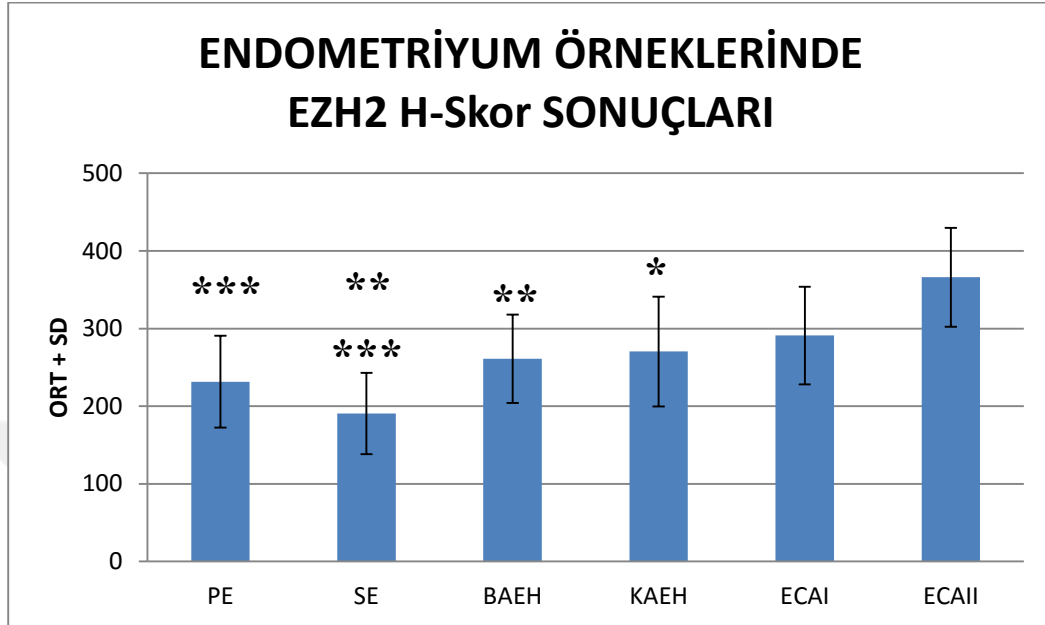


Resim 12. Tip II endometriyal adenokanser örneklerinde anti-EZH2 primer antikoru ile indirek immunohistokimyasal yöntemle boyalı preperatlarının ışık mikroskopik görüntüleri.

Endometriyum yüzey epiteli ve endometriyal bezlerde sitoplazmik ve nükleer pozitif EZH2 immunoreaktiviteleri kahverengi olarak izlenmektedir.

Kromojen: DAB, Artalan boyaması: Mayer's Hematoksilen, Orijinal büyütme: X 200

Grafik 2. Normal Endometriyum, Endometriyal Hiperplazi ve Endometriyum Kanser Örneklerinde Anti-EZH2 Primer Antikoru İle Edilme Edilen İmmunoreaktivitelerin H-Skor Sonuçları



PE vs ECAII

***** P<0.001**

BAEH vs ECAII

**** P<0.01**

SE vs ECAI

**** P<0.01**

KAEH vs ECAII

*** P<0.05**

SE vs ECAII

***** P<0.001**

ECAI vs ECAII

P>0.05

Endometriyum Örneklerinde EZH2 H-Skor Sonuçları

	PE	SE	BAEH	KAEH	ECAI	ECAII
1	300	140	180	400	400	400
2	240	160	260	375	375	450
3	180	130	210	300	320	375
4	320	150	240	280	300	425
5	300	240	240	240	320	450
6	160	225	200	260	240	320
7	180	180	300	220	220	330
8	170	200	350	180	240	300
9	225	180	320	210	270	340
10	240	300	310	240	225	270
ORT	231,50	190,50	261,00	270,50	291,00	366,00
SD	59,26	52,41	56,85	70,73	63,02	63,67

Sonuçlar karşılaştırmalı olarak değerlendirildiğinde gruplarda normalden endometriyal hiperplazi ve kanser sürecine geçişte nükleer ve sitoplazmik EZH2 immunoreaktivitesinde artış olduğu belirlenmiştir. Kötü diferansiye olan Tip II endometriyal kanser örneklerinde istatistiksel olarak anlamlı EZH2 artışı olduğu izlenmiştir.

6.5. TUNEL Yöntemi Bulguları

Apoptotik hücreler oldukları düşünülen DNA hasarı ve kırıkları olan hücreleri tespit etmek amacıyla; formalin ile tespit edilmiş ve parafine gömülmüş normal ve patolojik endometriyum doku örneklerinden alınan kesitler, “Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling” (TUNEL) Kiti kullanılarak boyanmıştır. Apoptoz programlanmış hücre ölümü olup, vücutta ihtiyaç duyulmayan veya anormalleşmiş hücrelerden kurtulmanın normal yoludur. Apoptotik hücreler TUNEL pozitif olarak kromatinleri yoğunlaşmış ve küçülmüş hücreler olarak kahverengi alanlar olarak belirlenmişlerdir.

TUNEL boyaması yapılan proliferasyon ve sekresyon evrelerindeki normal endometriyum, basit-atipisiz ve kompleks-atipili endometriyal hiperplazi ve Tip I ve Tip II endometriyal adenokanser preparatlarında her grup için rastgele seçilmiş 3 alanda her 100 hücre içinde TUNEL pozitif hücreler sayılarak % TUNEL indeksi belirlenmiştir.

Proliferasyon ve Sekresyon evrelerindeki örneklerden alınan alınan endometriyum kesitlerinin TUNEL boyalı preparatlarının ışık mikroskopik görüntüleri sırasıyla **Resim 13 A-B** ve **Resim 13 C-D**’de ;

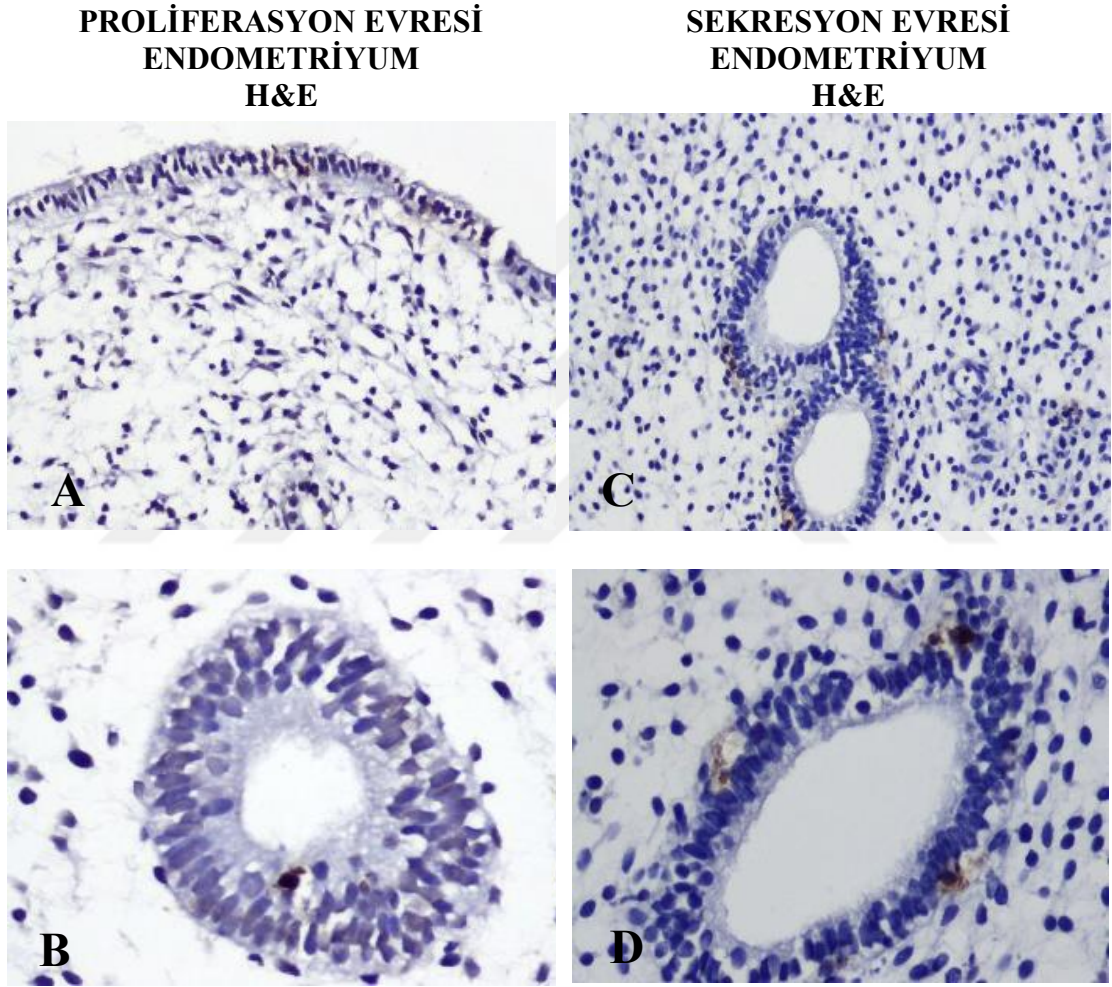
Basit-atipisiz ve kompleks-atipili endometriyal hiperplazi örneklerinden alınan endometriyum kesitlerinin TUNEL boyalı preparatlarının ışık mikroskopik görüntüleri sırasıyla **Resim 14 A-B** ve **Resim 14 C-D**’de;

Tip I ve Tip II endometriyal adenokanser örneklerinden alınan endometriyum kesitlerinin TUNEL boyalı preparatlarının ışık mikroskopik görüntüleri sırasıyla **Resim 15 A-B** ve **Resim 15 C-D**’de;

Gruplardan elde edilen TUNEL pozitif % hücre indeksleri ve istatistiksel analizleri **Grafik 3**’de gösterilmiştir.

Proliferasyon evresinde alınan doku örneklerinde; TUNEL pozitif hücrelerinin oldukça az sayıda oldukları ve epitel içinde lokalizasyon gösterdikleri izlendi. Bu gruptan elde edilen TUNEL pozitif hücrelerin % indeksi $2,31 \pm 0,55$ olarak belirlenmiştir (**Resim 13 A-B**).

Sekresyon evresinde alınan doku örneklerinde; TUNEL pozitif hücrelerinin oldukça az sayıda oldukları ve epitel içinde lokalizasyon gösterdikleri izlendi. Bu gruptan elde edilen TUNEL pozitif hücrelerin % indeksi $1,56 \pm 0,73$ olarak belirlenmiştir (**Resim 13 C-D**).

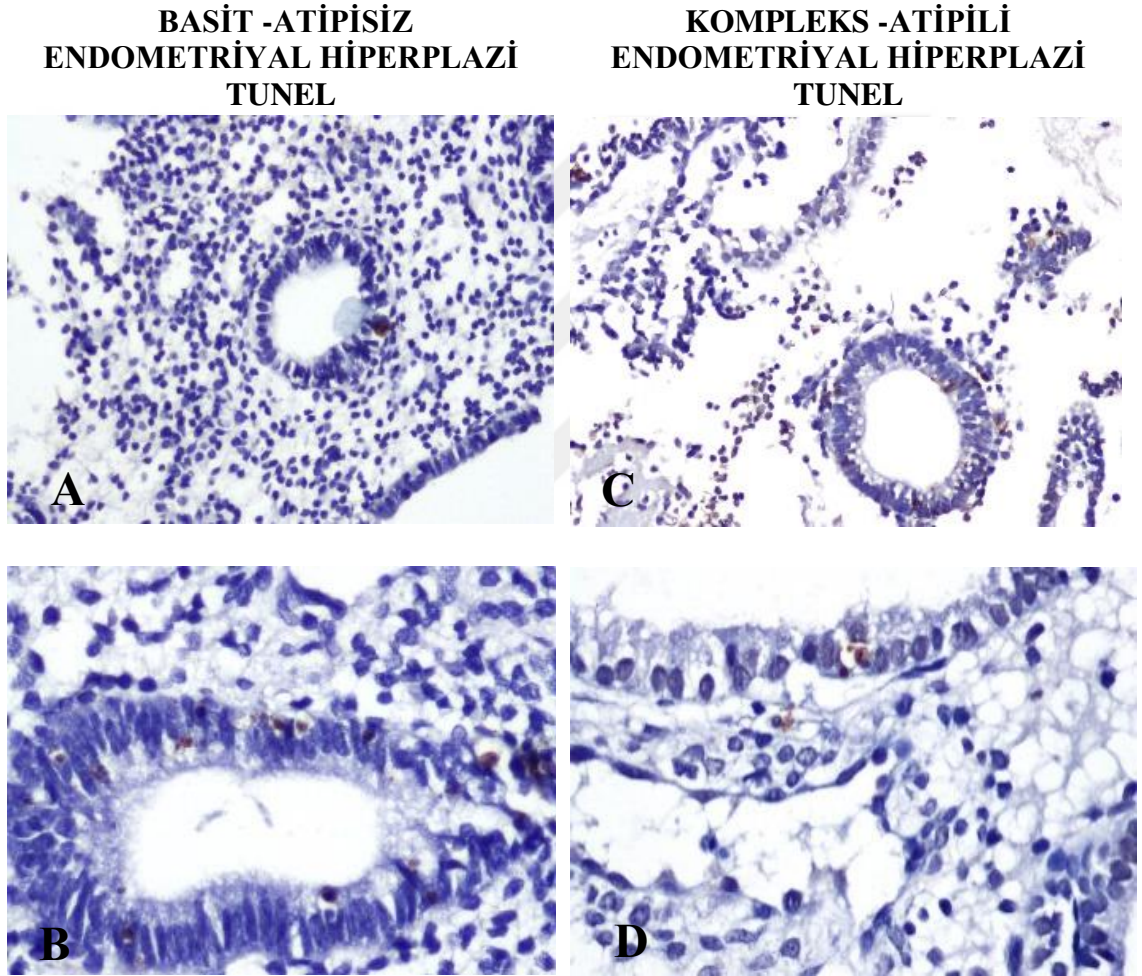


Resim 13. Proliferasyon (A-B) ve Sekresyon (C-D) Evrelerinde Alınan Endometriyum Örneklerinin TUNEL Yöntemi İle Boyalı Preperatlarının Işık Mikroskopik Görüntüleri.

TUNEL pozitif hücreler kahverengi olarak izlenmektedir. Orijinal büyütme: X 200 (A-C) X100 (B-D)

Histopatolojik olarak **basit-atipisiz endometriyal hiperplazi** olarak tanı konulan doku örneklerinde; TUNEL pozitif hücrelerinin oldukça az sayıda oldukları ve epitel içinde lokalizasyon gösterdikleri izlendi. Bu gruptan elde edilen TUNEL pozitif hücrelerin % indeksi $1,75 \pm 0,53$ olarak belirlenmiştir (**Resim 14 A-B**).

Histopatolojik olarak **kompleks-atipili endometriyal hiperplazi** olarak belirlenen doku örneklerinde; TUNEL pozitif hücrelerinin kontrol ve basit-atipisiz endometriyal hiperplazi gruplarına göre bir miktar artmış olduğu epitel içinde lokalizasyon gösterdikleri izlendi. Bu gruptan elde edilen TUNEL pozitif hücrelerin % indeksi $3,54 \pm 1,46$ olarak belirlenmiştir (**Resim 14 C-D**).



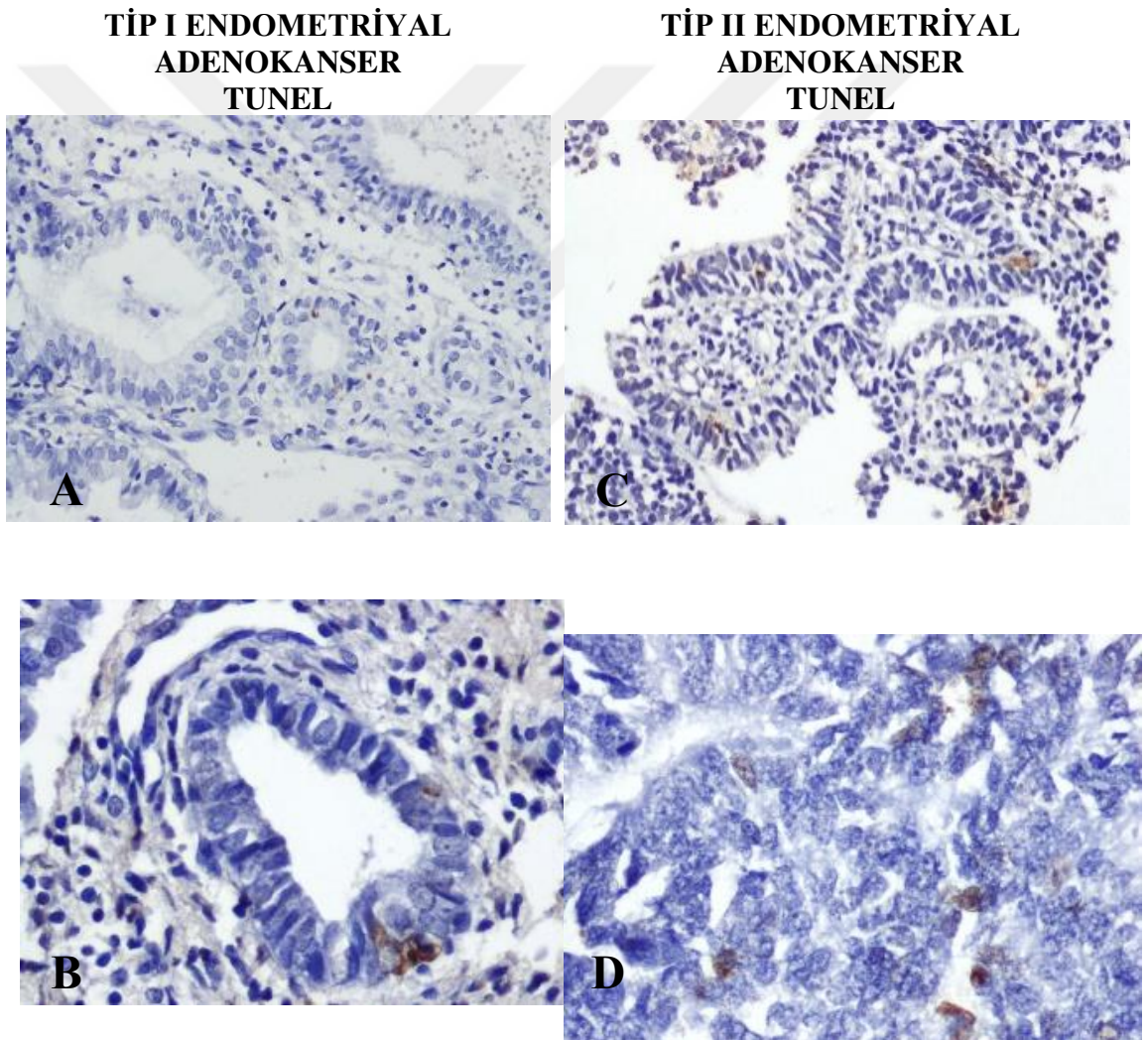
Resim 14. Basit- Atipisiz (A-B) ve Kompleks-Atipili (C-D) Endometriyal Hiperplazi Tanısı Alan Endometriyum Örneklerinin TUNEL Yöntemi İle Boyalı Preperatlarının Işık Mikroskopik Görüntüleri.

TUNEL pozitif hücreler kahverengi olarak izlenmektedir.

Orijinal büyüme: X 200 (A-C), X 400 (B-D)

Histopatolojik olarak **Tip I endometriyal adenokanseri** olarak tanı konulan endometriyum doku örneklerinde; TUNEL pozitif hücrelerinin artmış oldukları ve epitel içinde lokalizasyon gösterdikleri izlendi. Bu gruptan elde edilen TUNEL pozitif hücrelerin % indeksi $7,81 \pm 1,55$ olarak gözlenmiştir (**Resim 15 A-B**).

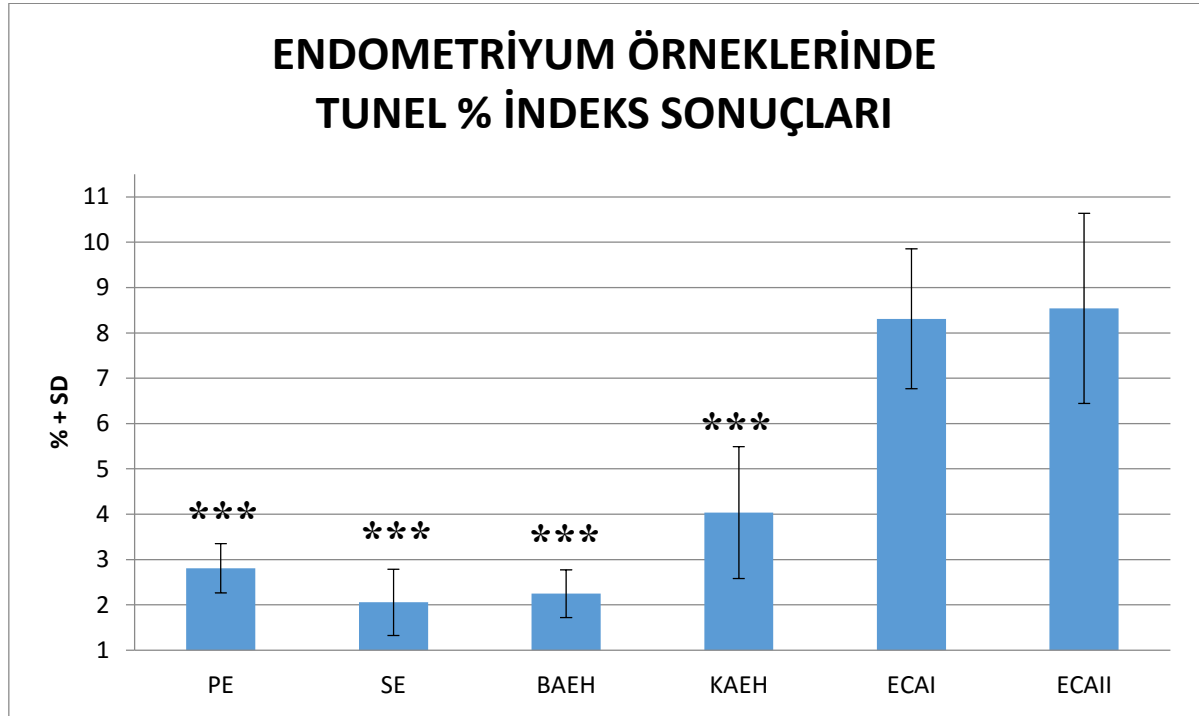
Histopatolojik olarak **Tip II endometriyal adenokanseri** olarak tanı konulan endometriyum doku örneklerinde; TUNEL pozitif hücrelerinin artmış oldukları ve epitel içinde ve stromada lokalizasyon gösterdikleri izlendi. Bu gruptan elde edilen TUNEL pozitif hücrelerin % indeksi $8,04 \pm 2,10$ olarak belirlenmiştir (**Resim 15 C-D**).



Resim 15. Tip I Endometriyal Adenokanser (A-B) ve Tip II Endometriyal Adenokanser (C-D) Tanısı Alan Endometriyum Örneklerinin TUNEL Boyalı Preperatlarının Işık Mikroskopik Görüntüleri. TUNEL pozitif hücreler kahverengi olarak izlenmektedir.

Orijinal büyütme: X 200 (A-C), X 400 (B-D)

Grafik 3. Normal Endometriyum, Endometriyal Hiperplazi ve Endometriyum Kanser Örneklerinde TUNEL % İNDEKSİ Sonuçları



PE vs ECAI, ECAII * P<0.001**

BAEH vs ECAI, ECAII * P<0.001**

SE vs ECAI, ECAII * P<0.001**

KAEH vs ECAI, ECAII * P<0.001**

Endometriyum Örneklerinde TUNEL % İNDEKS Sonuçları

Örnek	PE	SE	BAEH	KAEH	ECAI	ECAII
1	2,68	0,623	1,09	6,77	9,65	7,18
2	2,4	0,61	2,42	5,03	7,77	10,1
3	2,13	2,66	1,94	2,28	9,19	7,69
4	3,19	1,78	1,46	2,67	8,82	12,31
5	1,23	2,35	1,81	2,39	8,87	6,03
6	1,74	0,98	1,6	2,43	7,38	5,58
7	2,69	1,19	2,8	2,69	8,92	10,02
8	2,38	2,25	1,62	4,33	5,9	7,31
9	2,52	1,26	1,54	3,09	5,11	7,01
10	2,11	1,88	1,2	3,68	6,5	7,18
ORT	2,31	1,56	1,75	3,54	7,81	8,04
SD	0,55	0,73	0,53	1,46	1,55	2,10

Endometriyum örneklerinde TUNEL % indeksinin karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesinde Tip I ve Tip II endometriyal adenokanser örneklerinde istatistiksel olarak artmış **TUNEL pozitif hücreler** olduğu belirlenmiştir.

7. TARTIŞMA

Bu çalışmada malignite yönünden iki farklı insan endometriyal adenokanser hücre hattında ve normal endometriyum (proliferasyon ve sekresyon evresi), endometriyal hiperplazi (basit-atipisiz ve kompleks-atipili) ve endometriyum kanserlerinde (Tip I ve Tip II endometriyal adenokanser) anti-EZH2 primer antikoru kullanılarak proteinin immunolokalizasyonu, dağılımları ve varlığı indirek immunohistokimyasal ve Western Blotting yöntemleri ile değerlendirilmiştir. Apoptotik olabileceği düşünülen hücrelerin belirlenmesi amacıyla TUNEL boyaması yapılarak, pozitif hücreler sayılarak TUNEL indeksi belirlenmiştir. EZH2 proteini endometriyum doku örneklerinde karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiş ve normal endometriyumdan, endometriyal hiperplaziye geçiş ve endometriyum kanser gelişiminde önemli rolü bu çalışma ile gösterilmiştir.

Endometriyum kanseri, gelişmiş ülkelerde en sık görülen jinekolojik kanserler arasında dördüncü sırada (Allen ve ark. 2008) kadınlar arasında kansere bağlı ölümler arasında ise sekizinci sırada yer almaktadır. Bu nedenle, endometriyum kanserinin erken tanısı için prognostik ve tedavide hedeflenecek yeni moleküllerin tanımlanmasına gereksinim bulunmaktadır. Bu kanserin epidemiyoloji, patofizyoloji ve yönetim stratejilerinin anlaşılması riskleri azaltma yönünde katkıda bulunmayı ve erken tanıyı kolaylaştırmayı sağlamaktadır. (Jemal ve ark. 2009). Jinekolojik Onkoloji Klinik Uygulama Komitesi Derneği endometriyum kanseri tanı ve tedavileri için literatür ve oluşturulan kanıta dayalı uygulama önerilerini belirlemişlerdir.

Burke ve ark. endometriyum kanserinde genetik eğilim, risk faktörleri, tanı ve metastatik değerlendirme, erken tanı ile kanserin erken ve ileri kanser cerrahi tedavisini değerlendirmişlerdir (Burke ve ark. 2014). Bu çalışmalarında, güncel tedavi seçeneklerinin risklerini, avantaj ve dezavantajlarını belirlemişler ve endometriyum kanseri olan kadınlar için tedavi seçeneklerinin optimize edilmesini sağlamışlardır (Burke ve ark. 2014).

Endometriyum kanseri, etiyolojik ve klinik bulgulara göre Tip 1 ve Tip 2 olarak sınıflandırılmaktadır. En yaygını Tip 1 olup, endometriyum kanserine menopoza öncesi ve peri-menopozal kadınlarda sıklıkla rastlanır ve östrojene bağımlıdır. Tip 2 endometriyum kanseri ise vakaların % 10-20 kadarını oluşturmaktadır. İleri yaşta gözlenen bu kanser tipi östrojenden bağımsızdır ve atrofik zeminde gelişmektedir (Setiawan ve ark. 2013).

Kanser hücrelerindeki genetik mutasyonlar, hücrelerde protein kayıpları veya birikimleriyle sonuçlanabilmektedir. Hücrelerde biriken veya kayba uğrayan bu proteinler hücre çoğalmasında artışa veya neoplastik hücrelerin yayılması gibi istenmeyen etkilere neden olabilmektedir (Liu ve Crawford 2009).

Epigenetik transkripsiyonal baskılayıcı proteinler olan, Polycomb Grup (PcG) protein ailesinin bir üyesi olan **Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2)**, insanlarda EZH2 geni tarafından kodlanmaktadır. Bu gen için tanımlanmış olan iki farklı izoform bulunmaktadır. İlk kez Drosophila proteini homologu olarak tanımlanmış olup, kromatin düzenlenmesini kontrol ederek homeotik gen baskılanması yapmaktadır. 7q35 üzerinde EZH2 gen lokusunda bulunmaktadır. EZH2 proteini, hücre çoğalması, hücre ölümü, hücre siklusu, hücre yaşlanması ve farklılaşması ile ilgili hedef genlerin düzenlenmesinde önemli rol oynarlar (He ve ark. 2012; Lee ve Choe 2012). EZH2, özel bir Histon 3 Lizin 27 metiltransferaz (H3K27) içerir ve kromatinin yeniden düzenlenmesinde önemli bir rol oynar.

EZH2 aynı zamanda histon lizin metil transferaz olarak da bilinir ve hücre gelişiminin embriyonik gen ekspresyonları ve çeşitlenmesi evresinde yüksek bir ekspresyon paternine sahiptir. Dokuların matürasyonu ve differansiasyonu ile birlikte ekspresyonu azalmaktadır (Chang ve Hung 2012). Son yıllarda kanser araştırmalarında ve kanserlerin biyolojik davranışlarının belirlenmesinde EZH2 proteini oldukça önem kazanan bir proteindir. EZH2'nin aşırı ekspresyonu tümör baskılayıcı genlerin baskılanması ve gen yerlerinin yeniden düzenlenmesiyle ilişkilidir (Simon ve Lange 2008).

Mimori ve ark. ilk kez kolorektal kanserler üzerinde yaptıkları çalışmada EZH2'nin kolorektal kanserlerde bir onkogen ve kötü prognozu işaret eden bir marker olduğunu ileri sürmüşler ve klinik önemini belirtmişlerdir (Mimori ve ark. 2005). Daha sonra karsinoma, lenfoma, malign melanoma ve yumuşak doku sarkomları gibi pek çok solid kanserde EZH2'nin aşırı eksprese edildiği bildirilmiştir (Bachmann ve ark. 2006; Chai ve ark. 2010). EZH2'nin aşırı ekspresyonunun tümör ilerlemesi ve agresif tümör davranışı ile ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (Varambally ve ark. 2008; Chang ve Hung 2012; Ahsen 2012; Bachmann ve ark. 2006).

Wang ve ark. yaptıkları 119 kolorektal karsinom olgusundan oluşan araştırmalarında kolorektal tümör lokalizasyonu ile EZH2 ekspresyonu arasında bir ilişki bulamamışlar da, EZH2'nin artmış ekspresyonunun malign fenotip ve kötü prognoza işaret ettiğini saptamışlardır (Wang ve ark. 2010).

Wang ve ark. 2012 yılında yaptıkları bir diğer çalışmada, polikomb grup proteini olan EZH2 ekspresyonunun artmasını, değişik evrelerdeki mesane kanserlerinin invaziv ve metastatik ilerlemesi ile ilişkilendirmişlerdir. Üroteliyal karsinoma, hastalarından alınan mesane dokusu örneklerinde EZH2 protein ekspresyonu seviyeleri incelenmiş olup, EZH2 protein ekspresyonunun ve klinik sonuçlar arasındaki bağlantı araştırılmıştır (Wang ve ark. 2012).

Doku microarray'leri, 1994-2002 yılları arasında üroteliyal karsinoma için gerçekleştirilen radikal mesane operasyonu ile elde edilen mesane dokusu hücreleri kullanarak oluşturulmuştur. Artmış EZH2 protein ekspresyonları, invaziv yüksek grade'li üroteliyal karsinomalarda komşu benign üroteliyumlara, non-invasiv düşük grade'li üroteliyal karsinomlara göre artmış olarak bulunmuştur. Aynı zamanda düşük grade'li üroteliyal karsinomalardan elde edilen sonuçlar da benign üroteliyumlardan fazla olarak izlenmiştir. Mesane kanserlerinde EZH2'nin biyolojik marker olarak kullanılabileceği ileri sürülmüştür (Wang ve ark. 2012).

EZH2 proteininin aşırı ekspresyonu, oral skuamöz hücre karsinomu'nda da (OSCC) gösterilmiştir OSCC oluşumu ve gelişimi, birçok genin aktivasyonunu ve sinyal yollarının aktivasyonunu içerir ve gelişiminin mekanizması belirsizdir. Zhao ve ark. yaptıkları bir çalışmada OSCC'da EZH2'nin biyolojik fonksiyonunun hücre çoğalması, apoptoz, metastaz ile ilişkisini açıkça ortaya koymuşlardır (Zhao ve ark. 2014).

Vries ve ark. 2014 yılında yaptıkları bir çalışmada glioblastomalarda uzun süreli EZH2 yokluğunun hücre çoğalmasındaki bazı anahtar molekülleri güçlü bir şekilde değiştirerek tümörün ilerlemesine sebep olduğunu göstermişlerdir (Vries ve ark. 2014).

Ayakannu ve ark. yapmış oldukları çalışmada Ishikawa hücre hatlarında, bir endokannabinoid olan anandamid (AEA)'in artan konsantrasyonlarda endometrial karsinoma dokularında ve kanser hücresi sayısını azaltmayı bildirmişlerdir. Bu etkinin hücre ölümünden çok hücre çoğalmasının inhibisyonu sebebiyle olduğu bildirilmiştir (Ayakannu ve ark. 2015).

Cai ve ark. yapmış oldukları çalışmada ise servikal karsinoma dokularında yüksek oranda EZH2 ekspresyonuna rastlamış ve bu dokularda EZH2 ekspresyon miktarı arttıkça da servikal kansere karşı en iyi kemoterapi ajanı olan cisplatin'e karşı hücrelerde direncin de bununla doğru orantılı olarak arttığını bulmuştur. Dokulardan elde edilen primer kültürlerde EZH2'nin knockdown edilmesi ise hücrelerde Cisplatin'e karşı ilaç direncinin azalmasına sebep olduğu, yapılan metastaz analizlerinde de EZH2 knockdown hücrelerin metastaz yeteneğinin azaldığı gözlemlenmiştir.

Ayrıca yine Cai ve ark. yaptıkları çalışmada EZH2'nin Dicer ekspresyonunda rol alabileceği ve bunun da servikal kanserlerde kemoterapi resistanslarını arttırabileceği saptanmıştır (Cai ve ark. 2015).

Eskander ve ark. yapmış oldukları çalışmada malign olmayan endometrial kanser hücre hatlarında T-HESC, ECC-1, RL95-2 ve HEC 1-A' da EZH2'nin ekspresyon seviyesini araştırmışlardır. Endometrial kanser doku örneklerinde EZH2 ekspresyonunu immünohistokimyasal ve Western Blotting yöntemleri ile belirlemişlerdir.

Kararlı EZH2 knockdown hücre hatları oluşturulmuş ve hücresel proliferasyon, göç ve işgali üzerine etkisini tespit etmişlerdir. Floresan aktif hücre ayırtırmayı hücre döngüsü ilerlemesi üzerinde susturulmuş EZH2'nin etkilerini araştırmak için kullanmışlardır. EZH2 protein ekspresyonu kanser hücre hatlarında ve insan endometrial kanser dokusu örneklerinde kontrol gruplarına göre artış gösterdiğini gözlemlemişlerdir. ECC-1, RL95-2 ve HEC1-A' da EZH2 ekspresyonunun RNA interferansının önemli bir şekilde hücre proliferasyonunda, migrasyonunda ve invazyonunda düştüğünü tespit etmişlerdir. EZH2 ekspresyonunun down regülasyonunda G2/M de tutuklanan hücrelerin oranında önemli bir artış olduğunu gözlemlemişlerdir. EZH2 ekspresyonunun RNA interferansını Wnt sinyal yolu inhibitörleri sFRP1 ve DKK3'ün ekspresyon artışı ile ve beta katenininde azalması ile ilişkilendirmişlerdir (Eskander ve ark. 2013).

Jia ve ark. yapmış oldukları çalışmada Hec-1a ve Ishikawa insan endometrial kanser hücre hatlarında EZH2 ekspresyonunu ve klinopatolojik özellikleri arasındaki ilişkiyi in vitro hücre proliferasyon deneyi ile araştırmışlardır. EZH2 ekspresyonunun miyometrial invazyon ve endometrial kanserin lenf vasküler boşluk invazyonu ile ilişkilendirmişlerdir ve siRNA'yı endometrial karsinoma hücre proliferasyonunda EZH2'nin rolünü araştırmak için kullanmışlardır. EZH2 knockdownunun in vitro endometrial karsinoma proliferasyonunu önlediğini tespit etmişlerdir (Jia ve ark. 2014).

Son çalışmalarda, benzer şekilde EZH2'nin aşırı ekspresyonunun endometrium, prostat, mesane ve meme karsinomları gibi birçok genito-üriner sistem ile ilişkili kanserde önemli prognostik parametrelerle ilişkili olduğu ileri sürülmektedir (Yamaguchi ve Hung 2014; Jia ve ark. 2014). Bu konuda son yıllarda yapılan bir çalışmada yüksek grade'li endometrial karsinoma örneklerinde EZH2 ile hücre sinyal yollarıyla düzenlenen bir protein tirozin kinaz olan, Fokal adhezyon kinaz (FAK) ve pFAK'ın ekspresyonları değerlendirilmiştir. EZH2'nin artmış ekspresyonu Tip I endometrial adenokanserlerin %7,6'sında, TipII endometrial adenokanserlerin %63'ünde pozitif bulunmuştur (Zhou ve ark. 2013).

EZH2, FAK, pFAK ve PTEN ekspresyonları arasında korelasyon olduğu gözlenmiştir. EZH2, FAK ve pFAK'ın birlikte artmış olduğu örneklerde yüksek histolojik grade, anjiyolenfatik invazyon, lenf nodu metastazı, miyometriyal invazyon ve servikal tutulum ile korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (Zhou ve ark. 2013).

Polikomb grubu proteinleri, kromatin modifikasyonu ile genlerin susturulmasını başlatıp devam ettirebilen ve bu sayede kök hücrelerde kendi-kendini yenileyen özelliğin korunmasında yardımcı olabilen proteinlerdir. Polycomb repressive complex 2 (PRC2) histon H3 lizin 27 metillenmesini (H3K27me3) indükleyen ve spesifik gen transkripsiyonunu susturan epigenetik bir regülatördür. EZH2, PRC2'nin bir enzimatik alt-birimidir ve bunun sonucunda EZH2'nin kanseri başlatması, geliştirmesi, ilerletmesi, metastaz ve ilaç direnci önemli bir rol oynamaktadır.

EZH2'nin ekspresyonu çeşitli onkogenik transkripsiyon faktörleri, tümör bastırıcı miRNA'ların ve kanserle ilişkili kodlayıcı olmayan RNA ile düzenlenir. Ayrıca EZH2 aktivitesi kanserde düzenlenimleri bozulan post-translasyonel modifikasyonlar tarafından kontrol edilir. EZH2'nin kanonik rolü, H3K27me3 aracılığıyla gen susturmaktır.

PRC2 metilleyen histon h3 lizin 27 aracılığıyla gen susturmasını başlatabilmekte ve PRC1 gen susturmasını histon H2A lizin 119'un mono-ubikitinasyonu ile devam ettirebilmektedir. PRC1'in bir çekirdek komponenti olan Bmi1'in hepatik kök/progenitör hücrelerini kontrol ettikleri gösterilmiştir. Aoki ve ark. yaptıkları bir çalışmada, mürin hepatik kök/progenitör hücrelerinde hücre çoğalması ve farklılaşmasının EZH2 ile kontrol edildiğini bildirmişlerdir (Aoki ve ark. 2010). PRC2'nin majör bir komponenti olan EZH2'nin fonksiyonlarını belirlemek amacıyla, EZH2'nin lentivirüs-aracılı knockdown'ı uygulamışlardır (Aoki ve ark. 2010). EZH2'nin embriyonik mürin hepatik kök/progenitör hücrelerindeki işlev kaybının, bu hücrelerde çoğalma ve kendi-kendini yenileme kapasitesini belirgin olarak bozduğunu belirlemişlerdir. Bu çalışmada EZH2'nin hepatosit kök/progenitör hücrelerin çoğalması, farklılaşması ve kendi-kendini yenilemesinde anahtar rol oynadığı bildirilmiştir (Aoki ve ark. 2010).

Yamaguchi ve Hung yaptıkları derlemede, EZH2'nin hormonlara bağlı olarak hücre çoğalması, göç, invazyonu, ilaç direncinde önemli rol oynadığı ve malignite, invazyon ve metastatik süreçlerde artmış ekspresyonu olduğunu bildirmişlerdir (Yamaguchi ve Hung 2014).

EZH2 proteini, embriyonik ektoderm gelişimi, VAV1 onkoprotein ve X'e bağlı nükleer protein (XNP) ile ilişkili bir proteindir. Aynı zamanda, hematopoetik ve santral sinir sistemleri üzerinde de önemli rol oynamaktadır. EZH2 gen mutasyonları Weaver sendromuna neden olmaktadır.

Normalde, mikroRNA miR-101, EZH2 için kodlanan mRNA translasyonunu inhibe etmektedir. Bu mikroRNA genin kaybı, EZH2'nin üretiminin artmasına yol açmaktadır. Histon metilasyonunun artışının tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonlarının susturulmasına neden olmasından dolayı, EZH2 fazla ekspresyonu kanser gelişiminde önemli rol oynayabileceği düşünülmüştür.

EZH2-hedefleyen ilaçların beyin ve prostat kanserlerinde progresyonu inhibe ettiğine yönelik olarak pre-klinik çalışmalar devam etmektedir.

Yapılan çalışmada in vitro hücre kültüründe östrojen ve progesteron reseptörleri pozitif olan, iyi diferansiye **Ishikawa** insan endometriyal adeonokanser hücre hattı ile östrojen ve progesteron reseptörleri negatif olan, kötü diferansiye, agresif **MFE-319 (ACC-423)** hücrelerinde **anti-EZH2** primer antikoru kullanılarak indirek immunohistokimyasal ve Western Blotting yöntemleri ile proteinin immunolokalizasyonu, immunoreaktivitesi ve varlığı karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

Ishikawa hücrelerinde hafif/orta olarak belirlenen EZH2 immunoreaktivite şiddetinin, MFE-319 (ACC-423) şiddetli/çok şiddetli olduğu belirlenmiş ve istatistiksel anlamlı olarak farklılık olduğu belirlenmiştir.

EZH2 proteininin agresif MFE-319 (ACC-423) insan endometriyal adenokanser tümör hücrelerinde artmış olarak bulunması karsinogenez sürecinde invazyon ve metastazda önemli rol oynayabileceğini düşündürmüştür.

Seçilen iki insan endometriyal adenokanser hücrelerinde Western Blotting yöntemi ile 83kDA moleküler ağırlıktaki EZH2 proteinini varlığı gösterilmiştir.

Bu yöntemle de proteinin her iki kanser hücre hattında gösterilmiş olması indirek immunohistokimya sonuçlarında elde edilen veriler ile birlikte bu proteininin kanser gelişiminde, hücre çoğalması ve farklılaşması süreçlerinde etkili olduğunu göstermektedir.

İn vitro hücre kültüründe çalışılan Ishikawa ve MFE-319 (ACC-423) insan endometriyal hücre hatları sırasıyla Tip I ve Tip II endometriyal adenokarsinomlarını temsil etmektedir.

Farklı invazyon, diferansiyasyon ve malignite özellikleri olan kanser hücrelerinden Ishikawa hücreleri daha genç yaşlarda gözlenen, kanser hücrelerinin çoğalmasının östrojen ile ilişkili olduğu, iyi differansiye ve daha yavaş yayılan tip I endometriyal kanserlere benzerlik göstermektedir. MFE-319 (ACC-423) ise daha nadir görülen, kanser hücrelerinin çoğalması östrojen hormonuna bağımlı olmayan, agresif, kötü diferansiye ve hızlı yayılan özellikleri ile Tip II endometriyal adenokanserlere benzerlik göstermektedir.

Endometriyal adenokanser hücrelerinde pozitif EZH2 immunoreaktivitenin gözlenmesi ve agresif MFE-319 (ACC423) kanser hücre hattında artmış olarak immunoreaktivitenin belirlenmesinden sonra çalışmada, normal proliferasyon ve sekresyon evresinden alınan endometriyum örneklerinde, basit-atipisiz endometriyal hiperplazi, kompleks-atipili endometriyal hiperplazi, Tip I ve TipII endometriyal adenokanser örneklerinde (n:10, herbiri) anti-EZH2 primer antikor kullanılarak indirek immunohistokimyasal analiz yapılmıştır. Pozitif boyanan hücrelerin % sayıları ve immunoreaktivite şiddetleri kullanılarak H-Skorlar belirlenmiş ve istatistiksel olarak karşılaştırmalı olarak değerlendirmeleri yapılmıştır.

Çalışmanın sonuçlarına göre proliferasyon evresinde alınan endometriyum örneklerinde menstrüel siklusa dökülmüş olan fonksiyonel tabakanın östrojen hormonu etkisinde yenilenmesinin sağlandığı düşünülen bazal hücrelerde mitotik aktivitenin olduğu ve çoğalan epitelyal hücrelerde pozitif EZH2 immunoreaktivitesinin nükleer ve sitoplazmik lokalizasyonlarda bulundukları gözlenmiştir. Gruplar arasında en düşük düzeyde immunoreaktivitelerin izlendiği evre sekresyon evresi olarak belirlenmiştir. Bu dönemde proliferasyon evresinde çoğalmış olan hücrelerin progesteron hormonu etkisinde salgı ile dolu oldukları ve hücrelerin implantasyon için hazırlık içinde oldukları düşünülmüştür. Ancak proliferasyon ve sekresyon evrelerinde istatistiksel olarak farklılık gözlenmemiştir.

Basit-atipisiz endometriyal hiperplazi ve kompleks-atipili endometriyal hiperplazi örneklerinde immunoreaktivite şiddetleri ve H-Skorların birbirine yakın olmasına ve istatistiksel farklılık çıkmamasına karşın kompleks-atipili örneklerde nükleer boyanmanın dikkat çekici olduğu belirlenmiştir.

Bu örneklerde, EZH2 proteininin nükleer boyanmış olmasının, hücrelerde, basit-atipisiz endometriyal hiperplazden, kompleks-atipili endometriyal hiperplaziye geçiş sürecinde EZH2 proteinin atipik hücrelerin gelişimini sağlayan gen transkripsiyonu etkilediği ve hücre çoğalması ile kanserleşme yolunda post-transkripsiyonel modifikasyonların gerçekleştirilmesinde EZH2 proteininin önemli olduğu düşünülmüştür.

EZH2 immunoreaktiviteleri ve pozitif boyanan hücrelerin istatistiksel değerlendirilmesi yapıldığında sekresyon evresi ile Tip I endometriyal kanser arasında anlamlı farklılık gözlenirken, proliferasyon, sekresyon, basit-atipisiz hiperplazi ve kompleks-atipili hiperplazi örneklerinden elde edilen H-Skorların karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesinde Tip II endometriyal adenokanserden EZH2 immunoreaktiviteleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklı oldukları saptanmıştır. Tip I ve Tip II endometriyal adenokanserlerin H-Skorları arasında istatistiksel anlamlı farklılık izlenmemekle beraber Tip II endometriyal adenokanser örneklerinde daha yüksek H-Skor elde edilmiştir.

Bu sonuçlar kanser gelişiminde EZH2 proteinini önemli rol oynadığını göstermektedir. Agresif ve kötü diferansiye hücrelerde daha fazla immunoreaktivitenin ve nükleer immunolokalizasyonların izlenmesi kanser gelişiminde tetikleyici faktör olarak görev alabileceğini düşündürmüştür.

Tip I ve Tip II endometriyal adeonkanserler arasında EZH2 immunoreaktivite sonuçları arasında farklılık olmaması invitro hücre kültürü sonuçlarından Ishikawa ve MFE-319 (ACC423) arasında gözlenen istatistiksel olarak farklılık ile uyumlu olmasa da, Western Blotting sonuçlarında elde edilen protein konsantrasyonları açısından uyumlu olarak gözlenmiştir. Hücrelerde protein olarak Western Blotting ile tespit edilen EZH2 proteininin kanser gelişiminde önemli olduğu, genetik mutasyon ve gen transkripsiyonlarının etkilendiğini düşündürmüştür. İnvitro olarak Tip I endometriyal kanser benzeri olarak kullanılan Ishikawa hücre hattında immunoreaktivite şiddetinin az çıkması, bu hücrelerinin invazivliği az olan bir tümör hattı olması ile ilişkilendirilmiştir. Ancak bu hücrelerde de, Western Blotting yöntemi ile protein varlığının gözlenmesi EZH2 proteininin kanser gelişiminde, hücre çoğalmasında rol oynadığını, MFE-319 hücrelerinde artmış immunoreaktivitesinin ise göç, invazyon ve agresifliği etkilediğini düşündürmüştür.

Yapılan çalışmada, apoptotik olabileceği düşünülen TUNEL pozitif hücreler değerlendirilerek TUNEL % indeksi belirlenmiştir. Apoptoz, belirli bir moleküler işlemler serisinin sonunda, kontrollü hücre ölümü olup, hücre membranlarının bütünlüğünde bozulma olmaksızın hücrenin ölümünü sağlar. Normal şartlarda organizmanın yaşam döngüsü için gerekli ve yararlıdır.

Apoptoz sinyali alan bir hücrenin kromatini yoğunlaşmaya başlar, sitoplazma da yoğunlaşır ve hücrenin boyutları küçülmeye başlar. Bir süre sonra hücre apoptotik cisimcik olarak adlandırılan parçalara bölünür. Apoptotik cisimler yüzeylerindeki sinyal molekülleri aracılığıyla yakınlarındaki hücreler tarafından ortadan kaldırılırlar. Apoptotik süreç, kadınlarda, menstrüel siklusta endometriyal hücrelerin yıkımı, DNA hasarı olan hücrelerin yıkımı, tümör hücrelerinin ortadan kaldırılmasından sorumludur.

Bu çalışmada TUNEL boyaması ile değerlendirilen apoptotik oldukları düşünülen kahverengi boyalı hücrelerin % indeksleri belirlenmiş ve normal endometriyum örneklerinde oldukça az gözlenen TUNEL pozitif hücrelerin, endometriyal hiperplazi örneklerinde az olarak arttıkları, kanser örneklerinde ise hem Tip I hem de Tip II endometriyal kanser örneklerinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde sayıca TUNEL pozitif hücrelerin artmış oldukları belirlenmiştir.

TUNEL pozitif hücrelerin artışının atipik, kanser hücrelerinin ortadan kaldırılması ve stromaya yayılan tümör hücreleri için yer açılması ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. EZH2'nin tümör saldırganlığını belirlemede yeni bir marker ve molekül olarak hedef alınması için tedavide aday olabileceği ve bu proteinin potansiyel terapötik olarak düzenlenmesinin endometriyal kanserin tedavisi için uygun olacağı düşünülmüştür.

8. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan çalışmada, EZH2 proteininin invazyon, malignite ve diferansiyasyon yönlerinden farklı iki endometriyum kanseri hücre hattında ve normal endometriyum, endometriyal hiperplazi ve endometriyum kanserlerinden alınan doku örneklerinde immunolokalizasyonları, immunoreaktivite şiddetleri ve varlığı avidin-biyotin peroksidaz yöntemi ile immunohistokimyasal olarak ve Western blotting yöntemleri ile belirlenmiştir.

EZH2 proteininin, östrojen ve progesteron reseptörleri pozitif, Tip I endometriyal adenokanser benzeri, iyi diferansiye **Ishikawa** insan endometriyal adenokanser hücreleri ile karşılaştırıldığında; östrojen ve progesteron reseptörleri negatif, agresif, Tip II endometriyal adenokanser benzeri, kötü diferansiye **MFE-319 (ACC-423)** insan endometriyal adenokanser hücrelerinde istatistiksel anlamlı olarak artmış immunoreaktiviteleri izlenmiştir.

EZH2 proteininin proliferasyon ile sekresyon evrelerinde alınan normal endometriyum örnekleri ile, basit-atipisiz ve kompleks-atipili endometriyal hiperplaziler ile karşılaştırıldığında; Tip II endometriyal adenokanser’de istatistiksel olarak anlamlı olarak artmış olarak bulunmuştur.

Tip I ve Tip II endometriyal adenokanser örneklerinde normal endometriyum ve endometriyal hiperplazi örnekleri ile karşılaştırıldığında apoptotik olabileceği düşünülen TUNEL pozitif hücre % indeksinde istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu izlenmiştir. EZH2 proteinini artışı ile apoptoza giren artışının korelasyon göstermesi kanser gelişiminde çoğalan kanser hücreleri yanı sıra kontrollü hücre ölümünün korelasyon gösterdiği düşünülmüştür.

Tüm bu bulgular değerlendirildiğinde, EZH2 proteininin endometriyal kanser gelişim sürecinde, malignite, hücre çoğalması, farklılaşması, invazyon, metastaz ve hücre göçünde önemli anahtar rolü oynayabileceği sonucuna varılmıştır. Kanser gelişiminde önemli bir prognostik bir faktör olarak kanser belirteci olarak kullanılabileceği ve kanser tedavisinde olası terapötik yaklaşımlar için EZH2 proteinini hedef alan yeni stratejilerin geliştirilmesinin önemli olduğu düşünülmüştür. Bu proteine karşı geliştirilecek olan inhibitör ilaçların endometriyum kanserlerinde kullanılması bu hastalar için bir umut ışığı olacaktır.

Sonuç olarak bu çalışma ile; EZH2 proteininin normal endometriyumdan, endometriyal hiperplazi ve kansere geçiş süreçlerindeki rolü moleküler yöntemler ile aydınlatılmıştır.

Dünya’da ve Türkiye’de en sık görülen ve öldürücü olan jinekolojik kanserlerinden endometrium kanserlerinin moleküler mekanizmalarını açıklayıcı ve dolayısıyla tedavi olanakları ile invazyon ve metastazların önlenmesine yönelik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Endometriyum kanseri kadınlarda en sık görülen kanserler arasında yer almaktadır. Gelişim sürecinde, kanser hücrelerinin büyüme faktörlerinde kendine yeterlilik, hücre döngüsü kontrolünü kaybetme, apoptozdan kaçma, sınırsız ve kontrolsüz çoğalma ve anjiyogeneze desteğini sağlamaları çeşitli moleküler yollar ve faktörler aracılığı ile desteklenir. Kanser ortaya çıktıktan sonra, hücrelerin invazyon ve metastaz yapmaları için mikroçevrede bulunan stromal hücrelerin aktivasyonları, epitelyal-mezenşimal geçiş, anjiyogenezin desteklenmesi ve otofajinin aktivasyonu ile kanserin ilerlemesi gerçekleşir.

EZH2 gibi transkripsiyon faktörlerinde oluşan mutasyonlar, tümör supresör genlerin aktivasyonu ve hücre çoğalmasına yol açan genlerin susturulmasında rol oynayan moleküler faktörlerin fazla salınmalarının ve metilasyon süreçlerine etki ederek hücre çoğalmasında susturucu rolündeki işlev kayıplarının kanser gelişim süreçlerinde önemli rol oynayabileceği düşünülmüştür.

9. KAYNAKLAR

- Ahsen H. Gastrointestinal Sistem Karsinomlarında EZH2'nin E-Kaderin, Ki67 ve P53 Ekspresyonları ve Klinikopatolojik Parametrelerle İlişkisi. AİBÜ, Tıp Fakültesi Patoloji Anabilimdalı, Uzmanlık Tezi, 2012, Bolu (Danışman: Prof. Dr. Ç. Boran).
- Allen NE, Key TJ, Dossus L, Rinaldi S, Cust A, Lukanova A, Peeters PH, Onland-Moret NC, Lahmann PH, Berrino F, Panico S, Larrañaga N, Pera G, Tormo MJ, Sánchez MJ, Ramón Quirós J, Ardanaz E, Tjønneland A, Olsen A, Chang-Claude J, Linseisen J, Schulz M, Boeing H, Lundin E, Palli D, Overvad K, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, Bingham S, Khaw KT, Bueno-de-Mesquita HB, Trichopoulou A, Trichopoulos D, Naska A, Tumino R, Riboli E, Kaaks R. Endogenous sex hormones and endometrial cancer risk in women in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Endocr Relat Cancer*. 2008 Jun;15(2):485-97.
- Aoki R, Chiba T, Miyagi S, Negishi M, Konuma T, Taniguchi H, Ogawa M, Yokosuka O, Iwama A. The polycomb group gene product Ezh2 regulates proliferation and differentiation of murine hepatic stem/progenitor cells. *J Hepatol*. 2010 Jun;52(6):854-63.
- Arisan S, Buyuktuncer ED, Palavan-Unsal N, Caşkurlu T, Cakir OO, Ergenekon E. Increased expression of EZH2, a polycomb group protein, in bladder carcinoma. *Urol Int*. 2005; 75(3): 252-7.
- Ayakannu T, Taylor A, Willets J, Marczylo T, Brown L, Davies Q, Moss E, Konje J. Effect of anandamide on endometrial adenocarcinoma (Ishikawa) cell numbers: implications for endometrial cancer therapy. *Lancet*. 2015 Feb 26;385
- Bachmann IM, Halvorsen OJ, Collett K, Stefansson IM, Straume O, Haukaas SA, Salvesen HB, Otte AP, Akslen LA. EZH2 expression is associated with high proliferation rate and aggressive tumor subgroups in cutaneous melanoma and cancers of the endometrium, prostate, and breast. *J Clin Oncol*. 2006 Jan 10;24(2):268-73.
- Bakkum-Gamez JN, Gonzalez-Bosquet J, Laack NN, Mariani A, Dowdy SC. Current issues in the management of endometrial cancer. *Mayo Clin Proc*. 2008 Jan;83(1):97-112.
- Bentley RC, JF, Mutter GL, Robboy SJ. The Normal Endometrium. Robboy SJ, Mutter GL, Prat J, Bentley RC, Russel P, Anderson MC (editors): Robboy's Pathology of the Female Reproductive Tract. 2.nd edition, China. Churchill Livingstone Elsevier, 2009; 12: 297-324.

- Bracken AP, Pasini D, Capra M, Prosperini E, Colli E, Helin K. EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. EMBO J. 2003 Oct 15;22(20):5323-35.
- Burke WM, Orr J, Leitaio M, Salom E, Gehrig P, Olawaiye AB, Brewer M, Boruta D, Villella J, Herzog T, Abu Shahin F; Society of Gynecologic Oncology Clinical Practice Committee. Endometrial cancer: a review and current management strategies: part I. Gynecol Oncol. 2014 Aug;134(2):385-92.
- Cai L, Wang Z, Liu D. Interference with endogenous EZH2 reverses the chemotherapy drug resistance in cervical cancer cells partly by up-regulating Dicer expression. Tumour Biol. 2015 Dec 2.
- Chang CJ, Hung MC. The role of EZH2 in tumour progression. Br J Cancer. 2012 Jan 17;106(2):243-7.
- Choi JH, Song YS, Yoon JS, Song KW, Lee YY. Enhancer of Zeste Homolog2 Expression is Associated with Tumour Cell Proliferation and Metastasis in Gastric Cancer. Journal Campilation APMIS 2010; 118: 196–202.
- Collett K, Eide GE, Arnes J, Stefansson IM, Eide J, Braaten A, Aas T, Otte AP, Akslen LA. Expression of enhancer of zeste homologue 2 is significantly associated with increased tumor cell proliferation and is a marker of aggressive breast cancer. J. Clin. Oncol. 2006;24:268–273.
- Cormier B, Rozenholc AT, Gotlieb W, Plante M, Giede C; Communities of Practice (CoP) Group of Society of Gynecologic Oncology of Canada (GOC). Sentinel lymph node procedure in endometrial cancer: A systematic review and proposal for standardization of future research. Gynecol Oncol. 2015 Aug;138(2):478-85.
- Davoodi SH, Malek-Shahabi T, Malekshahi-Moghadam A, Shahbazi R, Esmaili S. Obesity as an important risk factor for certain types of cancer. Iran J Cancer Prev. 2013 Fall;6(4):186-94.
- Deb G, Thakur VS, Gupta S. Multifaceted role of EZH2 in breast and prostate tumorigenesis: epigenetics and beyond. Epigenetics. 2013 May;8(5):464-76.
- Dere F. Anatomi Ders Kitabı. 3. Baskı, Adana: Okullar Pazarı Kitabevi, 1994: 688-701.
- Ellenson LH, Ronnett BM, Soslow RA, Zaino RJ, Kurman RJ. Endometrial Carcinoma. Kurman RJ, Ellenson LH, Ronnett BM (editors): Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract, 6th edition, New York. Springer, 2011; 9: 393-452.

- Erenel H. Endometriyum Kanseri ve Selim Endometriyal Patolojilerde 3 Boyutlu Power Doppler Parametreleri ve Serum İnsan Epididimis Proteini 4 Seviyelerinin İncelenmesi. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilimdalı, Uzmanlık Tezi, 2012, İstanbul, (Danışman: Prof. Dr. T. Beşe).
- Eskander RN, Ji T, Huynh B, Wardeh R, Randall LM, Hoang B. Inhibition of enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) expression is associated with decreased tumor cell proliferation, migration, and invasion in endometrial cancer cell lines. Int J Gynecol Cancer. 2013 Jul;23(6):997-1005.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int J Cancer. 2015 Mar 1;136(5):E359-86.
- FIGO Ovarian Cancer Staging Effective Jan. 1, 2014
- Gibson WT, Hood RL, Zhan SH, Bulman DE, Fejes AP, Moore R, Mungall AJ, Eydoux P, Babul-Hirji R, An J, Marra MA; FORGE Canada Consortium, Chitayat D, Boycott KM, Weaver DD, Jones SJ. Mutations in EZH2 cause Weaver syndrome. Am J Hum Genet. 2012 Jan 13;90(1):110-8.
- Gonzalez ME, DuPrie ML, Krueger H, Merajver SD, Ventura AC, Toy KA, Kleer CG. Histone methyltransferase EZH2 induces Akt-dependent genomic instability and BRCA1 inhibition in breast cancer. Cancer Res. 2011 Mar 15;71(6):2360-70.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011 Mar 4;144(5):646-74.
- He LJ, Cai MY, Xu GL, Li JJ, Weng ZJ, Xu DZ, Luo GY, Zhu SL, Xie D. Prognostic significance of overexpression of EZH2 and H3k27me3 proteins in gastric cancer. Asian Pac J Cancer Prev. 2012;13(7):3173-8.
- Hervouet E, Cartron PF, Jouvenot M, Delage-Mourroux R. Epigenetic regulation of estrogen signaling in breast cancer. Epigenetics. 2013 Mar;8(3):237-45.
- Hétu V, Petignat P, Wu Y, Drouin P, Sauthier P, Provencher D, Gauthier P. Gynecol Positive adnexal or uterine serosal involvement in stage IIIC endometrial cancer is an adverse factor for recurrence. Obstet Invest. 2009;67(3):173-7.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. CA Cancer J Clin. 2009 Jul-Aug;59(4):225-49.
- Jia N, Li Q, Tao X, Wang J, Hua K, Feng W. Enhancer of zeste homolog 2 is involved in the proliferation of endometrial carcinoma. Oncol Lett. 2014 Nov;8(5):2049-2054.

- Kierszenbaum, A. L., Tres, L. (2006). Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology (3rd Edition). Mosby. ISBN: 9780323078429.
- Kim KH, Roberts CW. Targeting EZH2 in cancer. Nat Med. 2016 Feb 4;22(2):128-34.
- Laible G, Wolf A, Dorn R, Reuter G, Nislow C, Lebersorger A, Popkin D, Pillus L, Jenuwein T. Mammalian homologues of the Polycomb-group gene Enhancer of zeste mediate gene silencing in Drosophila heterochromatin and at S. cerevisiae telomeres. EMBO J. 1997 Jun 2;16(11):3219-32.
- Lee HW, Choe M. Expression of EZH2 in renal cell carcinoma as a novel prognostic marker. Pathol Int. 2012 Nov;62(11):735-41.
- Li J, Hart RP, Mallimo EM, Swerdel MR, Kusnecov AW, Herrup K. EZH2-mediated H3K27 trimethylation mediates neurodegeneration in ataxia-telangiectasia. Nat Neurosci. 2013 Dec;16(12):1745-53.
- Liu C, Crawford JM. Gastrointestinal Sistem. In: Kumar V, Abbas A.K, Fausto N, Robins and Cotran Hastalığın Patolojik Temeli. Sav A, Özdamar Ş.O çeviri editörü, Güneş Tıp Kitapevi, 2009: 810–826
- Maneschi F, Ceccacci I, Perugini A, Pane C, Simeone A, Manicone A. Endometrial cancer: prognostic significance of risk classification based on pre-intraoperative findings. Arch Gynecol Obstet. 2012 Feb;285(2):521-7.
- Margueron R, Reinberg D. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. Nature. 2011 Jan 20;469(7330):343-9.
- McCluggage WG. Benign Diseases of the Endometrium. Kurman RJ, Ellenson MR, Ronnett BM (editors): Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract, 6th edition, New York. Springer, 2011; 7: 305-358.
- Mimori K, Ogawa K, Okamoto M et al. Clinical Significance of Enhancer of Zeste Homolog 2 Expression in Colorectal Cancer Cases. Eur J Surg Oncol 2005; 31: 376–380.
- Moore, K. L., T. V. N. Persaud and M. G. Torchia (2008). The developing human: clinically oriented embryology, Elsevier Health Sciences.
- Morey L, Helin K. Polycomb group protein-mediated repression of transcription. Trends Biochem Sci. 2010 Jun;35(6):323-32.
- Mutter GL, Matias-Guiu X, Lax SF. Endometrial Adenocarcinoma. Robboy SJ, Mutter GL, Prat J, Bentley RC, Russel P, Anderson MC (editors): Robboy's Pathology of the Female Reproductive Tract. 2.nd edition, China. Churchill Livingstone Elsevier, 2009; 16: 393-426

- O'Meara MM, Simon JA. Inner workings and regulatory inputs that control Polycomb repressive complex 2. Chromosoma. 2012 Jun;121(3):221-34.
- Ougolkov AV, Bilim VN, Billadeau DD. Regulation of pancreatic tumor cell proliferation and chemoresistance by the histone methyltransferase enhancer of zeste homologue 2. Clin Cancer Res.2008;14:6790–6796.
- Ovale WK, Nahirney PC. Netter Temel Histoloji. Noyan S (Çeviren), s: 412-418, Ankara, Güneş Tıp Kitabevleri, 2009.
- Önen H. Endometrium Kanseri Gelişiminde Eritropoietin ve Eritropoietin Reseptör Genlerinin İfade Edilmesi. G.Ü Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2009, Ankara (Danışman: Prof. Dr. A. Ekmekçi).
- Robbins, S. L. Kumar, V.Abbas, A. K. Aster, J. C, (2011). Robbins Basic Pathology.
- Rosai J. Female Reproductive System, Uterus: corpus. Rosai J MD (editor): Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. Vol 2, 10th edition. Edinburgh, London, New York, Oxford, Mosby, Elsevier, 2011; 19: 1477-1540.
- Rosai J. Female reproductive system. In: Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. St Louis: Mosby-Year Book; 2004. p.1569- 1635.
- Ross MH, Pawlina W. Histology a Text And Atlas. Çeviri Editörü: Barış Baykal 6. basım, Palme Yayıncılık Ankara; 2014, s:848-849.
- Sadler TW. Langman Medikal Embriyoloji. Çeviren Prof. Dr. A. Can Başaklar. 11. Basım, Palme yayıncılık Ankara; 2011, s:13-30.
- Setiawan VW, Yang HP, Pike MC, McCann SE, Yu H, Xiang YB, Wolk A, Wentzensen Weiss NS, Webb PM, Brandt PA, Vijver K, Thompson PJ; Australian National Endometrial Cancer Study Group, Strom BL, Spurdle AB, Soslow RA, Shu XO, Schairer C, Sacerdote C, Rohan TE, Robien K, Risch HA, Ricceri F, Rebbeck TR, Rastogi R, Prescott J, Polidoro S, Park Y, Olson SH, Moysich KB, Miller AB, McCullough ML, Matsuno RK, Magliocco AM, Lurie G, Lu L, Lissowska J, Liang X, Lacey JV Jr, Kolonel LN, Henderson BE, Hankinson SE, Håkansson N, Goodman MT, Gaudet MM, Garcia-Closas M, Friedenreich CM, Freudenheim JL, Doherty J, De Vivo I, Courneya KS, Cook LS, Chen C, Cerhan JR, Cai H, Brinton LA, Bernstein L, Anderson KE, Anton-Culver H, Schouten LJ, Horn-Ross PL. Type I and II endometrial cancers: have they different risk factors? J Clin Oncol. 2013 Jul 10;31(20):2607-18.

- Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. CA Cancer J Clin. 2011 Jul-Aug;61(4):212-36.
- Silverberg SG, Kurman RJ, Nogales F, Mutter GL, Kubik-Huch RA, Tavassoli FA. Tumours of the uterine corpus. Tavassoli FA, Devilee P (editors): Tumours of the Breast and Female Genital Organs. In World Health Organization Classification of Tumours. IARC press, 2003; 4: 217-258.
- Simon JA, Lange CA. Roles of the EZH2 histone methyltransferase in cancer epigenetics. Mutat Res. 2008 Dec 1;647(1-2):21-9.
- Singh S, Raidoo S, Pettigrew G, Debernardo R. Management of early stage, high-risk endometrial carcinoma: preoperative and surgical considerations. Obstet Gynecol Int. 2013;2013:757249.
- Sorosky JI. Endometrial cancer. Obstet Gynecol. 2008 Feb;111(2 Pt 1):436-47.
- Sorosky JI. Endometrial cancer. Obstet Gynecol. 2012 Aug;120(2 Pt 1):383-97.
- Tan JZ, Yan Y, Wang XX, Jiang Y, Xu HE. EZH2: biology, disease, and structure-based drug discovery. Acta Pharmacol Sin. 2014 Feb;35(2):161-74.
- Vanderstraeten A, Tuyaerts S, Amant F. The immune system in the normal endometrium and implications for endometrial cancer development. J Reprod Immunol. 2015 Jun;109:7-16.
- Varambally S, Cao Q, Mani RS, Shankar S, Wang X, Ateeq B, Laxman B, Cao X, Jing X, Ramnarayanan K, Brenner JC, Yu J, Kim JH, Han B, Tan P, Kumar-Sinha C, Lonigro RJ, Palanisamy N, Maher CA, Chinnaiyan AM. Genomic loss of microRNA-101 leads to overexpression of histone methyltransferase EZH2 in cancer. Science. 2008 Dec 12;322(5908):1695-9.
- Viré E, Brenner C, Deplus R, Blanchon L, Fraga M, Didelot C, Morey L, Van Eynde A, Bernard D, Vanderwinden JM, Bollen M, Esteller M, Di Croce L, de Launoit Y, Fuks F. The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. Nature. 2006 Feb 16;439(7078):871-4.
- Vries NA, Hulsman D, Akhtar W, Jong J, Miles DC, Blom M, Tellingn O, Jonkers J, Lohuizen M. Prolonged Ezh2 Depletion in Glioblastoma Causes a Robust Switch in Cell Fate Resulting in Tumor Progression. Cell Rep. 2015 Jan 14. pii: S2211-1247(14)01057-2.

- Wang C-G, Ye Y-J, Yuan J et al. EZH2 and STAT6 Expression Profiles are Correlated with Colorectal Cancer Stage and Prognosis. World J Gastroenterol 2010; 16: 2421–2427.
- Wang H, Albadine R, Magheli A, Guzzo TJ, Ball MW, Hinz S, Schoenberg MP, Netto GJ, Gonzalgo ML. Increased EZH2 protein expression is associated with invasive urothelial carcinoma of the bladder. Urol Oncol. 2012;30:428–433.
- Xu F, Liu L, Chang CK, He Q, Wu LY, Zhang Z, Shi WH, Guo J, Zhu Y, Zhao YS, Gu SC, Fei CM, Li X. Genomic loss of EZH2 leads to epigenetic modifications and overexpression of the HOX gene clusters in myelodysplastic syndrome. Oncotarget. 2016 Jan 23.
- Yamaguchi H, Hung MC. Regulation and Role of EZH2 in Cancer. Cancer Res Treat. 2014 Jul;46(3):209-22.
- Yang YA, Yu J. EZH2, an epigenetic driver of prostate cancer. Protein Cell. 2013 May;4(5):331-41.
- Yoo KH, Hennighausen L. EZH2 methyltransferase and H3K27 methylation in breast cancer. Int J Biol Sci. 2012;8(1):59-65.
- Zhao L, Yu Y, Wu J, Bai J, Zhao Y, Li C, Sun W, Wang X. Role of EZH2 in oral squamous cell carcinoma carcinogenesis. Oral Oncology. 2014; 537 (197–202)
- Zhou J, Roh JW, Bandyopadhyay S, Chen Z, Munkarah AR, Hussein Y, Alosch B, Jazaerly T, Hayek K, Semaan A, Sood AK, Ali-Fehmi R. Overexpression of enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) and focal adhesion kinase (FAK) in high grade endometrial carcinoma. Gynecol Oncol. 2013 Feb;128(2):344-8.
- Zingg D, Debbache J, Schaefer SM, Tuncer E, Frommel SC, Cheng P, Arenas-Ramirez N, Haeusel J, Zhang Y, Bonalli M, McCabe MT, Creasy CL, Levesque MP, Boyman O, Santoro R, Shakhova O, Dummer R, Sommer L. The epigenetic modifier EZH2 controls melanoma growth and metastasis through silencing of distinct tumour suppressors. Nat Commun. 2015 Jan 22;6:6051.

10.EKLER/ YEREL ETİK KURULLAR

28.10.2014

İlgili Makama;

CBÜTF Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı tarafından yapılması planlanan "normal endometrium, endometriyal hiperplazi ve endometrium kanserlerinde EZH2 proteininin moleküler yöntemlerle değerlendirilmesi" başlıklı bilimsel çalışmada kullanılacak uterus doku kesitleri, bölümümüzden Uz. Dr. Sevil Sayhan ve Doç Dr. Gülden Diniz'in de projeye ve projeden çıkacak bilimsel yayın veya yayınlara katılması koşuluyla bölümümüz arşiv bloklarından temin edilecektir.

Saygılarımla bilgilerinize sunarım.

Eğitim Görevlisi
Dip. No : 27789
Kadın Hast. ve Doğum, Jinekoloji Uzmanı
Doç. Dr. Muzaffer SANCİ
TEPECİK EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTAHANESİ
TÜRKİYE KAMU HASTAHANELERİ KURUMU
SAĞLIK BAKANLIĞI

Doç. Dr. A. Gülden Diniz Ünü, MD, PhD
Patoloji, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Uzmanı,
Temel Onkoloji Doktoru
Tepecik EAH Patoloji Eğitim Görevlisi.

Doç. Dr. Muzaffer SANCİ



T.C.
Celal Bayar Üniversitesi
Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu
Karar Formu

KARAR TARİH / NO	19 / 11 / 2014 / 20478488 - 370						
ARAŞTIRMANIN ADI	Normal endometriyum, endometriyal hiperplazi ve endometriyum kanserlerinde EZH2 proteininin moleküler yöntemlerle değerlendirilmesi						
SORUMLU ARAŞTIRMACI	Prof. Dr. Sevinç İNAN - CBÜ.Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD						
ARAŞTIRMA EKİBİ	Uzm. Dr. Elgin Türköz Uluç,- Doç. Dr. Muzaffer Sancı,- Uzm. Dr. Sevil Sayhan,- Y.L.Ö Biyolog Oya KORKMAZ,- Doç. Dr. A. Gülşen Diniz Ünlü						
ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	UZMANLIK TEZİ ☐		YÜKSEK LİSANS-DOKTORA TEZİ ☒		AKADEMİK AMAÇLI ☐		
KARAR BİLGİLERİ	Araştırma başvuru formu ve gerekli ekleri incelenmiş; Etik apdan UYGUN olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir. Etik kurulumuzun çalışma prensipleri gereği dosya taraması içeren çalışmalarda başhekimlik onayı gerekmektedir. Diğer araştırmalar için ise günlük işleyişin bozulmaması ve olası hasta mağduriyetlerinin oluşmaması açısından araştırmaya başlamadan önce, mutlaka ilgili anabilim dalı/bilim dalı onayı alınması gerekmektedir.						
Ünvanı/Adı/Soyadı		Araştırma ile İlgili Olan Oye	Toplantıya Katılmayan Oye	Ünvanı/Adı/Soyadı		Araştırma ile İlgili Olan Oye	Toplantıya Katılmayan Oye
Prof. Dr. Ercüment ÖLMEZ Farmakoloji AD		☐	☐	Prof. Dr. Nedip KUTLU Fizyoloji AD		☐	☐
Prof. Dr. Cengiz KIRMAZ Alerji İmmünoloji BD		☐	☐	Prof. Dr. Ece ONUR Tıbbi Biyokimya AD		☐	☐
Prof. Dr. Polin ERTAN Çocuk Sağlığı Hastalıkları AD		☐	☐	Prof. Dr. Canan TIRKIZ F. T. R. Nöroloji AD		☐	☐
Prof. Dr. Erhun KASIRGA Çocuk Sağlığı Hastalıkları AD		☐	☒	Prof. Dr. Gönül Teoman KİLEŞ Anestezi ve Reanimasyon AD		☐	☐
Prof. Dr. Artunur DEVECİ Psikiyatri AD		☐	☐	Prof. Dr. F. Sını ÇAM Tıbbi Genetik AD		☐	☐
Doç. Dr. Selda BİREKET Antrenörlik Eğitimi AD		☐	☒	Doç. Dr. Beyhan Cengiz ÖZYURT Halk Sağlığı AD		☐	☐
Doç. Dr. Peyker TEMİZ Patoloji AD		☐	☐	Yrd. Doç. Dr. Tank ULUÇAY Adebiyat AD		☐	☐
Yrd. Doç. Dr. Selim ALTAN Tıbbi Etik AD		☐	☐	Yrd. Doç. Dr. Dilek ÇİÇEN Cerrahi Hemşirelik AD		☐	☐
Nedip KUTLU Anestezi		☐	☐	Cengiz KUTLU Sivil Üye		☐	☐
Etik Kurulumuzun kararı yukarıda belirtilmiştir. Araştırma Başvuru Formunun Taahhütname – Bölüm E kısmında belirtilmiş olan hususların dikkate alınarak istenilen bilgilerin Etik Kurulumuza zamanında iletilmesi konusunda bilgilerinizi ve gereğini rica ederim. Prof. Dr. Ercüment ÖLMEZ Başkan							

11. ÖZGEÇMİŞ

Adı	OYA	Soyadı	KORKMAZ
Doğum Yeri	TOKAT	Doğum tarihi	28.02.1991
Uyruğu	TC	Tel	05061474811
E-mail	korkmazoya@yahoo.com		
Eğitim düzeyi			
	Mezun olduğu kurumun adı	Mezuniyet yılı	
Doktora			
Yüksek lisans	Celal Bayar Üniversitesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı	2016	
Lisans	Celal Bayar Üniversitesi	2013	
Lise	Mehmet Akif Ersoy Anadolu Lisesi	2007	
Yabancı dilleri	Okuduğunu anlama	Konuşma	Yazma
İngilizce	iyi	iyi	iyi
Yabancı dil sınav notu			
İELTS	5,5		

	Sayısal	Eşit ağırlık	Sözel
Ales Puanı	70		
Bilgisayar Bilgisi			
Program		Kullanma Becerisi	
MS Office		İyi	
Adobe Reader		İyi	
Photoshop		İyi	