



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

**YÜKSEK DERECELİ ENDOMETRİUM
KARSİNOMLARININ MOLEKÜLER VE
İMMUNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLERLE
SINIFLANMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Gözde KOCA YILMAZ

Antalya, 2019



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

**YÜKSEK DERECELİ ENDOMETRİUM
KARSİNOMLARININ MOLEKÜLER VE
İMMUNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLERLE
SINIFLANMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Gözde KOCA YILMAZ

Tez Danışmanı : Prof.Dr.Gülgün ERDOĞAN

**Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TSA-2018-3975 Proje No ile desteklenmiştir.**

“Kaynak gösterilerek tezinden yararlanılabilir.”

Antalya, 2019

TEŞEKKÜR

Patoloji uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, ışık tutan, her konuda ilgi ve alakalarını esirgemeyen, başta sevgili tez danışmanı hocam Prof.Dr.Gülgün ERDOĞAN olmak üzere tüm kıymetli hocalarıma,

Asistanlık sürecim boyunca çalışmaktan ve bir arada vakit geçirmekten dolayı kendimi çok şanslı ve mutlu hissettiğim sevgili asistan arkadaşlarıma,

Şu an da uzman olmuş bana çok katkıları olan, patolojiyi sevdiren, beraber çalışmaktan çok zevk aldığım başta Uzm.Dr.Gülşah ÜNAY, Uzm.Dr.Düriye Betül YILMAZ, Uzm.Dr.Zeynep BAYRAMOĞLU ve Uzm.Dr.Erdem AYIK olmak üzere tüm kıdemlilerime,

Beni bu günlere getiren , her zaman ve her koşulda sonsuz sevgisiyle yanımda olan biricik annem Reyhan KOCA' ya ve sevgili aileme,

Bana hayatı her gün daha çok sevdiren, her daim yüzümü güldüren, hayattaki en büyük şansım, her zaman desteğini arkamda hissettiğim sevgili eşim Gökhan YILMAZ' a sonsuz teşekkürlerimle....

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.	vi
TABLolar DİZİNİ.....	vii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Anatomi.....	5
2.2. Embriyoloji.....	6
2.3. Histoloji.....	6
2.4. Normal endometrium morfolojisi ve fizyolojisi.....	7
2.5. Endometrium karsinomu.....	8
2.5.1. Endometrium karsinomlarının morfolojik özellikleri.....	9
2.5.2. Endometrium karsinomlarının morfolojik tipleri.....	10
2.5.2.1. Endometrioid karsinom.....	11
2.5.2.2. Müsinöz karsinom.....	12
2.5.2.3. Seröz karsinom.....	12
2.5.2.4. Berrak hücreli karsinom.....	13
2.5.2.5. Nöroendokrin tümörler.....	14
2.5.2.6. Mikst karsinom.....	15
2.5.2.7. Andiferansiye ve dediferansiye karsinom.....	15
2.5.3. Endometrium karsinomlarında derecelendirme.....	16
2.5.4. Endometrium karsinomlarında evreleme.....	17
2.5.5. Endometrium karsinomlarında prognostik faktörler.....	18
2.5.6. Endometrium karsinomlarının moleküler özellikleri.....	24
2.6. POLE (Polimeraz ε).....	26
2.7. MSI (Mikrosatellit instabilitesi).....	27
2.8. P53.....	29
3. MATERYAL VE METOD.....	31
3.1. Etik Kurul.....	31

3.2. Hasta Seçimi.....	31
3.3. İmmunohistokimyasal inceleme.....	31
3.4. Real time PCR.....	33
3.4.1. Formalinle Fikse Olmuş Parafine Gömülü Dokulardan (FFPE) DNA İzolasyonu.....	33
3.4.2. Real time PCR.....	34
3.5. İstatistiksel Analiz.....	37
4. BULGULAR	38
4.1. Hastaların klinikopatolojik özellikleri.....	38
4.2. MMR hipermutasyonlu grup.....	40
4.3. POLE ultramutasyonlu grup.....	45
4.4. Kopya sayısı düşük grup.....	46
4.5. Kopya sayısı yüksek grup.....	48
4.6. Grupların karşılaştırılması.....	49
4.7. Hastaların sağkalım analiz sonuçları.....	52
5. TARTIŞMA.....	64
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	72
7. ÖZET.....	75
8. ABSTRACT.....	77
9. KAYNAKLAR.....	79

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABN	Aberan
AJCC	Amerikan kanser komitesi
ARİD1A 1A (proteini)	AT (baz dizilimi) bakımından zengin, etkileşim alanı içeren
CCNE1	Siklin E1
CA125	Kanser antijeni 125
CCC	Berrak hücreli karsinom
CDX2	Caudal- type homeobox 2
CERBB2	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2
CD56	Nöral hücre adezyon molekülü
CEA	Karsinoembriyonik antijen
CK7	Sitokeratin 7
CTNNB1	Katenin beta 1
DAB	Dimetilaminoazobenzen
DNA	Deoksiribonükleik asit
DSÖ	Dünya sağlık örgütü
EC	Endometrial karsinom
ECM	Ekstraselüler matriks
EDM	Ekzonükleaz domain mutasyonu
EMA	Epitelial membran antijen
ER	Östrojen reseptörü
FBXW7	F-kutusu/WD tekrar içeren protein 7
FGFR	Fibroblast büyüme faktörü reseptörü
FFPE	Formalin fikse parafine gömülü

FIGO	The International Federation of Gynecology and Obstetrics
GA	Güven aralığı
HE	Hematoksilen eozin
HNPCC	Hereditör nonpolipoz kolon kanseri
HNF1β	Hepatosit nükleer faktör 1 beta
HR	Risk oranı
H₂O₂	Hidrojen peroksit
IGFR1	İnsuline-benzer Büyüme Faktörü Reseptörü-1
İHK	İmmunohistokimya
LS	Lynch sendromu
LVI	Lenfovasküler invazyon
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene
MMR	Mismatch repair
MSI	Mikrosatellit instabilitesi
MLH1	MutL homolog 1
MSH2	MutS homolog 2
MSH6	MutS homolog 6
MMP	Matriks metalloproteinaz
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PIK3CA	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfat 3-kinaz katalitik alt birim alfa
PMS2	PMS1 Homolog 2
POLE	Polimeraz ϵ
PR	Progesteron reseptörü
PPP2R1A	Protein Phosphatase 2 Scaffold Subunit Alpha

PTEN	Fosfotaz ve tensin homologu
SC	Seröz karsinom
SOX17	SRY (Cinsiyet belirleyici bölge Y)-box 2
TCGA	Kanser genom atlası
TNM	Tümör, lenf nodu, metastaz
WT	Wild tip



TABLÖLAR DİZİNİ

<u>TABLO</u>	<u>SAYFA</u>
Tablo 1- Hastaların genel klinik özellikleri.....	39
Tablo 2- Hastaların klinik evrelerinin frekans ve yüzdeleri.....	40
Tablo 3- Hastaların moleküler ve immunohistokimyasal yöntemlere göre belirlenen grupları.....	50
Tablo 4- Çalışma gruplarına göre hastaların klinikopatolojik özelliklerinin karşılaştırılması.....	51
Tablo 5- Hastaların genel klinik özelliklerine göre sağkalım analizi.....	54-55
Tablo 6- Genel sağkalımı etkileyen prognostik faktörler – Tek ve çok değişkenli Cox regresyon analizi bulguları.....	63

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>ŞEKİL</u>	<u>SAYFA</u>
Şekil 1.Uterusun anatomisi.....	5
Şekil 2.Polipoid görünümde fundus yerleşimli endometrium tümörünün makroskopik görünümü.....	10
Şekil 3.Hastaların evrelerinin dağılımı.....	40
Şekil 4.Tümör hücrelerinde nükleer MLH1 boyanması (X100).....	41
Şekil 5.Tümör hücrelerinde MLH1 nükleer boyanma kaybı (X100).....	41
Şekil 6.Tümör hücrelerinde nükleer MSH2 boyanması (X100).....	42
Şekil 7.Tümör hücrelerinde nükleer MSH2 boyanma kaybı (X100).....	42
Şekil 8.Tümör hücrelerinde nükleer MSH6 boyanması (X100).....	43
Şekil 9.Tümör hücrelerinde nükleer MSH6 boyanma kaybı (x100)	43
Şekil 10.Tümör hücrelerinde nükleer PMS2 boyanması (X100).....	44
Şekil 11.Tümör hücrelerinde nükleer PMS2 boyanma kaybı (X100).....	44
Şekil 12.Real time PCR da P286R hot spot mutasyonu gösteren hastalar.....	45
Şekil 13.POLE mutasyonu saptanan grade 3 endometrioid endometrium karsinomu (HE X100).....	46
Şekil 14.Tümör hücrelerinde P53 wild tip boyanma (X100).....	47
Şekil 15.Tümör hücrelerinde P53 wild tip boyanma (X200).....	47

Şekil 16. Tümör hücrelerinde %50 ve üzerinde güçlü nükleer P53 boyanması (P53 mutant tip) (X100).....	48
Şekil 17. Tümör hücrelerinde P53 ün hiç boyanmaması (P53 mutant tip).....	49
Şekil 18. Hastaların genel sağkalımı.....	52
Şekil 19. Yaşa göre genel sağkalım.....	56
Şekil 20. Çalışma gruplarına göre genel sağkalım.....	57
Şekil 21. Histolojik tipe göre genel sağkalım.....	57
Şekil 22. Tümör boyutuna göre genel sağkalım.....	58
Şekil 23. Myometrium invazyonuna göre genel sağkalım.....	58
Şekil 24. Lenfovasküler invazyona göre genel sağkalım.....	59
Şekil 25. Servikal invazyona göre genel sağkalım.....	59
Şekil 26. Adneksial yayılıma göre genel sağkalım.....	60
Şekil 27. Omentum tutulumuna göre genel sağkalım.....	60
Şekil 28. Sitolojiye göre genel sağkalım.....	61
Şekil 29. Paraaortik lenf nodu tutulumuna göre genel sağkalım.....	61
Şekil 30. Pelvik lenf nodu tutulumuna göre genel sağkalım.....	61
Şekil 31. Evreye göre genel sağkalım.....	62

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Endometrium karsinomları gelişmekte olan ülkelerde en sık görülen jinekolojik kanserdir ve kadınlarda tüm kanser tipleri arasında dördüncü sıradadır. Son yıllarda endometrium karsinomlarının görülme oranı artış göstermektedir(1). Endometrium karsinomu tanısı alan %75 ve üzerinde kadın erken evre (evre 1 ve 2) olup iyi prognoz gösterir. Bununla birlikte rekürren hastalar ve ileri evre hastaların kemoterapi cevap oranları düşüktür ve klinik sonuçları kötüdür. Fakat bazı yüksek dereceli kanserlerin mükemmel prognoz gösterdiği izlenmiştir(2).

Endometrium karsinomları, epidemiyolojik faktörlerin değerlendirilmesi temel alınarak 1983'te Bohkman tarafından tip1 ve tip2 tümörler olarak ikiye ayrılmıştır. Düşük dereceli endometrium karsinomları tip 1, yüksek dereceli endometrium karsinomları tip 2 karsinom prototipi olarak kabul edilmiştir ve günümüze kadar da bu şekilde sınıflandırılmıştır(3). Tip 1 karsinomlar en sık görülen (%70-80), endometrioid tipte, düşük dereceli, diploid, hormon reseptörü pozitif, iyi diferansiye, daha çok obez kadınlarda görülen tümörlerdir. Bu tümörler lokalize hastalık olup mükemmel prognozlu olma eğilimindedir. Tip 2 tümörler daha az sıklıkta (%20-30) olup, obez olmayan kadınlarda, non-endometrioid histolojiye sahip, yüksek dereceli, aneuploid, kötü diferansiye, hormon reseptörü negatif, metastaz riski fazla, kötü prognozlu tümörlerdir. Tümör grade ve subtipi histolojik olarak mikroskop altında subjektif olarak değerlendirilir. Nükleer özellikler ve glandlardaki solid tümör oranına göre 1-3 arasında gradelenir. Endometrium kanseri tiplendirmesinde patologlar arasında uyumsuzluk çeşitli çalışmalarda 1/3 veya daha fazla saptanmıştır, özellikle yüksek dereceli endometrium karsinomlarında uzman jinekopatologlar arasında bile uyumsuzluk vardır(%26-37). Kısacası yeterli ve efektif tedavi için histolojik sınıflama yetersizdir. Klinik , morfolojik ve moleküler özelliklerin entegre edilerek yapıldığı yeni bir sınıflamaya ihtiyaç vardır(4).

Endometrium karsinomları için yapılan en kapsamlı moleküler çalışma 2013 de yapılan Kanser Genom Atlası Projesidir ve bu çalışmada tüm genom sekanslama, ekzom sekanslama, mikrosatellit instabilite (MSI) analizi, kopya sayısı analizi yöntemleri kullanılmıştır. Bu yöntemlerle endometrium karsinomları 4

grupta sınıflandırılmıştır; POLE ultramutasyonlu (Polimeraz epsilon ekzonukleaz domain mutasyon), Mismatch repair (MMR) hipermutasyonlu, Kopya sayısı yüksek ve Kopya sayısı düşük gruplar(5).

POLE; DNA polimeraz enzim kompleksinin katalitik alt ünitesidir, DNA replikasyonunun hatasız olmasında ve onarımında etkilidir. POLE ekzonukleaz domain mutasyonu olduğunda DNA zincirinin replikasyonunda düzeltme olmadığından çok fazla sayıda mutasyon olur. Bu gruptaki tümörler çok yüksek mutasyon hızına sahiplerdir. Genç hastalar, fokal nükleer atipi, peritümöral ve tümör infiltrate lenfositler belirgindir. Prognozları daha iyidir(5).

MSI analizi ile MMR genlerindeki fonksiyon kaybına bakılır. Mismatch repair genler (MMR), DNA daki uyumsuzlukları onaran genlerdir, bu genlerdeki fonksiyon kaybı, DNA daki hasarların düzgün bir şekilde tespit edilememesi ve tamir edilememesiyle sonuçlanır ve anormal DNA sekansları ve mutasyonlara yol açar. Mikrosatellite instabilitesi (MSI) tüm endometrium kansinomlarında yaklaşık %30 oranında bulunur ve germline veya sporadik tümörlerle ilişkilidir. MMR genleri MSH2, MLH1, MSH6 ve PMS2'deki germline mutasyonları, kalıtsal nonpolipozisli kolorektal kanser veya Lynch sendromunun bir parçası olarak çeşitli kanserlere neden olur. Kanser genom atlası tarafından sınıflandırılan MMR hipermutasyonlu alt grubu, mikrosatellit stabil endometrioid tümörlerine göre yaklaşık 10 kat daha fazla mutasyon sıklığı ve ARID1A, PIK3CA veya CTNNB1 mutasyonlarının birikimi ile karakterizedir. Belirlenen MSI'nın çoğunda MLH1 promotör metilasyonu vardır ve bu tümörler sık KRAS ve PTEN mutasyonları göstermiştir(6). MSH2 ve MSH6 kaybı daha çok Lynch Sendromu ile ilgilidir ve çoğu endometrioid tiptedir, intratümöral heterojenite, peritümöral lenfositler ve tümör infiltrate lenfositler fazladır. Tümör ilerlemesi olmadan yaşam süresi açısından orta gruptadır(7). Kopya sayısı yüksek grup , hem seröz tümörlerden hem de yüksek dereceli endometrioid tümörlerin yaklaşık %25'inden oluşmaktadır. Bu alt grup, geniş somatik kopya sayı değişiklikleriyle karakterize edilmiştir ve sıklıkla p53 mutasyonu vardır. Genel olarak, kanser genom atlası verilerindeki bu alt tipteki tümörler, diğer alt tiplerdeki tümörlere kıyasla progresyonsuz sağkalımda belirgin olarak daha kötüdür. Bu tümörler genomik instabilite derecesine sahiptir ve hızlı tümör progresyonu ve invazyonuyla ilişkilidir. Bu alt tip, hücre döngüsü

disregülasyonuna yol açan MYC, ERBB2 ve CCNE 1 onkogenlerinde fokal amplifikasyonlar gösterir. Kopya sayısı yüksek alt tip içerisinde tanımlanan diğer ilgili terapötik hedefler, IGF1R, FGFR1 ve FGFR3'teki mutasyonları içerir(5).

Kopya sayısı düşük grup, grade 1 ve grade 2 endometrioid kanserlerinin çoğunu temsil eder ve tüm alt gruplara kıyasla orta derecede prognoza sahiptir. Bu tümörlerde TP53 mutasyonu azdır, fakat Wingless-ilişkili integrasyon bölgesi (WNT) sinyali (CTNNB1, KRAS, SOX17), PTEN, PIK3CA ve ARID1A ile ilgili genlerde sık mutasyon vardır(6).

İnsan genom atlası projesine göre yüksek gradeli endometrium karsinomları her 4 grup arasında dağılım göstermektedir. Bu projede moleküler özelliklerin histomorfolojiye eklenmesinin tedaviye daha doğru yaklaşım getireceği vurgulanmıştır fakat burada kullanılan yöntemler her merkezde uygulanamayacak çok pahalı yöntemlerdir. Bu nedenle daha basit ve uygulanabilir moleküler temelli sınıflama yöntemleri araştırılmaktadır(5).

Stello ve ark. TRANSPORTEC grubunda (LEIDEN GRUP) POLE mutasyonuna sanger sekanslama ile, MMR genlerine immunohistokimyasal yöntemle (MLH1 ,MSH6 ,PMS2 ,MSH2), kopya sayısının düşük veya yüksek oluşuna immunohistokimyasal olarak p53 ile bakılmıştır ve endometrium karsinomları POLE mutasyonlu, p53 mutasyonlu, MSI olan ve nonspesifik moleküler profilli olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır(8).

Talhok ve ark. PROMİSE (VANCOUVER GRUP) grubunda öncelikle immunohistokimyasal yöntemle MSI olan grup belirlenmiş, sonrasında MSI olmayan yani MSS grupta POLE ye sekanslama yöntemi ile bakılmıştır. POLE mutasyonu olmayan grupta p53 mutasyonu immunohistokimyasal yöntemle bakılmıştır. Böylece MMR hipermutasyonlular, POLE ultramutasyonlular, p53 mutant (kopya sayısı yüksek grup) ve p53 mutasyonu olmayan (kopya sayısı düşük grup) grup daha kolay ve ekonomik yöntemlerle belirlenmiştir(4).

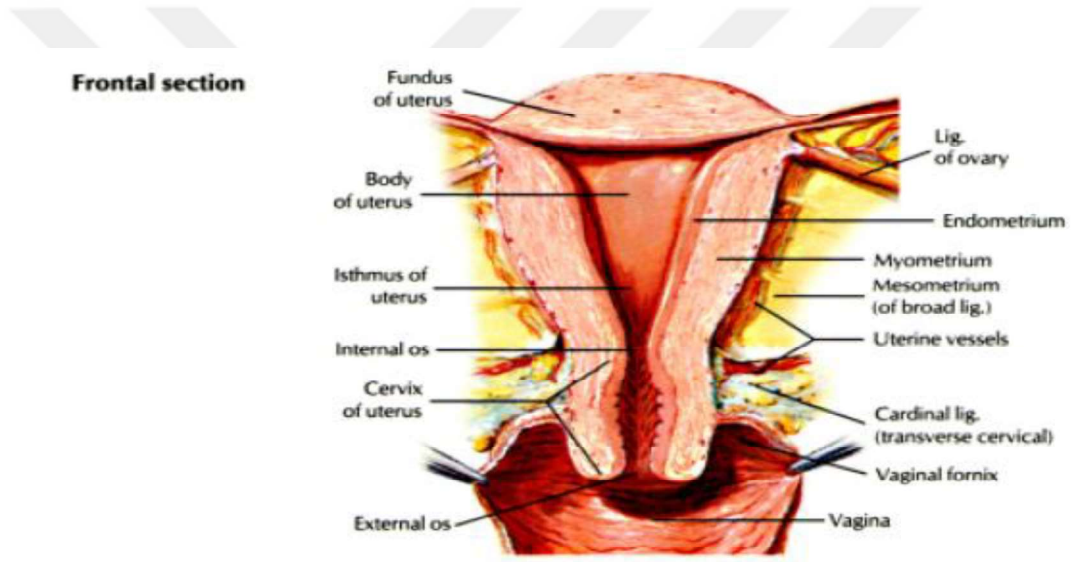
Planladığımız çalışma ile amacımız Talhok ve ark. gibi yüksek dereceli endometrium karsinomu olgularını içerecek bir hasta popülasyonunda moleküler ve immunohistokimyasal yöntemlerle endometrium karsinomunu yeniden sınıflamak ve prognozu daha doğru bir şekilde saptamaktır. Böylelikle hastaların daha doğru

bir tedavi alması, bu olguların moleküler özelliklerinin araştırılarak yeni moleküler temelli tedavi olanaklarının gündeme gelmesi, hastaların aşırı veya eksik tedavi almasının önlenmesi amaçlanmıştır. Akdeniz Bölgesi'ne ait bir popülasyonunda izlenen yüksek dereceli endometrium karsinomu olguları içinde POLE mutasyon sıklığını real-time PCR yöntemi ile tespit etmek, MMR proteinlerine (MLH1 ,MSH2,PMS2 ,MSH6) immunohistokimyasal yöntemle bakılarak hereditör kanser sendrom (lynch sendromu gibi) riskini tespit etmek ve immunohistokimyasal yöntemle p53 e bakılarak kopya sayısı düşük ve yüksek grubu belirleyerek olguları dört moleküler subgrupta sınıflamak yanı sıra hastaların demografik, histolojik ve klinik özellikleri kaydedilip, tedavi protokolleri, evre gibi klinik parametrelerle ilişkilendirmek amaçlanmıştır. Endometrium karsinomlarını klinik, patolojik ve moleküler özellikleriyle entegre ederek 4 moleküler subgruba daha kolay, birçok merkezde uygulanabilen ve daha ucuz yöntemlerle doğru sınıflamak için geliştirilmeye çalışılan algoritmalar nedeniyle literatüre katkı sağlamak da amaçlarımız arasındadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Anatomi

Uterus rektum ve mesane arasında pelvis yerleşimli iç genital organdır. Anatomik olarak 4 kısımdan oluşur: fundus, korpus, istmus ve serviks. Uterusun boyutları ve ağırlığı yaş ve hormonal duruma göre farklılık göstermektedir. Nullipar bir kadında yaklaşık 7-8 cm uzunluğunda, 2,5 cm kalınlığında, 40-100 gr ağırlığındadır(9).



Şekil 1. Uterusun Anatomisi(10).

Uterus başlıca serviks ve korpus olarak 2 bölümde incelenir. Bu iki bölüm arasında isthmus yer alır(11). Fundus, uterusun en üst kısmıdır. Korpus, tuba uterinaların uterusu açıldıkları seviyeden istmusa kadar uzanır. İstmus yaklaşık 1 cm uzunluktadır. Inferior üçte birlik kısım serviks adını alır. Servikal kanalın uterus kavitesine açılan kısmı internal os, vaginaya açılan kısmı ise eksternal os adını alır(12).

Uterusu yerinde tutan beş adet ligament bulunmaktadır. Ligamentum latum uteri, (broad ligament) uterusu pelvis yan duvarlarına bağlayıp parietal periton ile

devam eder. Ligamentum rotundum (ligamentum teres uteri) uterustan başlayıp inguinal kanal yolu ile labium majusa tutunur. Ligamentum kardinale (Mackenrodt bağı) serviks ve vaginanın üst kısmını pelvis lateral duvarlarına bağlar. Ligamentum uterosakrale serviks ile sakrum üzerindeki fasya arasına uzanan fibromüsküler dokudur. Ligamentum puboservikale uterusu alttan destekler(11, 13).

Uterus internal iliyak arterlerin dalı olan uterin arterlerle beslenir. Uterin ven, arterleri takip ederek internal iliyak vene dökülür. Fundusun lenfatikleri ovaryan arter boyunca paraaortik lenfatiklere, korpus ve serviksin lenfatikleri ise internal ve eksternal iliyak lenf düğümlerine dökülür. Uterusun sempatik sinirleri torakal 12. ve lumbal 1. sinirden, parasempatik sinirleri de sakral 2, 3 ve 4. Sinirden gelir(9).

2.2.Embriyoloji

Kadın genital sistemi paramezonefrik duktus ve ürogenital sinüs (Müller kanalları) olmak üzere iki embriyolojik oluşumdan meydana gelir. Sekizinci ve dokuzuncu haftalarda bu iki oluşumun füzyonu sonucunda uterovajinal primordium meydana gelir(14). Birleşmemiş kısımlardan fallop tüpleri, birleşmiş kısımlardan uterus ve vajinanın üst bölümü, ürogenital sinüsten ise vajinanın alt bölümü ve vestibül gelişir(15, 16).

2.3.Histoloji

Uterus dıştan içe doğru seroza, myometrium ve endometrium olmak üzere 3 tabakadan oluşur. Seroza ince bir bağ dokusu ile desteklenen peritondan oluşur. Myometrium kan ve lenf damarlarının ana dalları ve uterusu gelen sinirlerin bulunduğu düz kas liflerinden meydana gelir, en kalın katmandır. Endometrium uterusun iç yüzünü döşeyen katmandır(17, 18).

Endometrium; glandlar ve stromadan oluşur. Derin yerleşimli bazal tabaka ve yüzeysel yerleşimli fonksiyonel tabaka olmak üzere ikiye ayrılır. Bazal tabaka; menstrüasyon sonrası endometriumun rejenerasyonundan sorumlu rezerv

tabakasıdır, zayıf proliferatif glandlar ve içsi stromadan oluşur. Fonksiyonel tabaka; kompakt tabaka (yüzey kısmı) ve spongios tabaka (bazale yakın kısım) olmak üzere iki kısma ayrılır. Stroma, başlıca menstrüel siklus boyunca görünümü değişen endometrial stromal hücreler ve spiral arteriollerden oluşur(19, 20).

2.4.Normal endometrium morfolojisi ve fizyolojisi

Endometrium sürekli olarak yenilenmekte ve steroid hormonlar tarafından etkilenmektedir, bu durum menstrual döngü sırasında her zaman değişiklik gösterir. Menstrual döngü üç aşamadan oluşur: östrojen etkisi altındaki proliferasyon fazı; progesteronun etkisi altındaki sekretuar faz; korpus luteum kaybının bir sonucu olarak progesteron hormonunun azalmasının etkisi altında menstruasyon fazı. Menstrual döngüye yanıt olarak ortaya çıkan bu değişikliklerin tümü endometriumda morfolojik değişikliklere sebep olur(21).

Endometrial siklus süresi değişmekle birlikte genel olarak 28 gündür. Bu değişkenlik proliferatif fazın uzamasına bağlıdır. Ondördüncü günde ovulasyon meydana gelir(14).

Proliferasyon fazı: Menstrual siklusun ilk günü menstruasyon ile başlar. Menstruasyon sonrasında uterus bazal endometrium ile döşelidir. Siklusun 3. ve 4. gününde endometrium prolifer olmaya başlar, kalınlığı 4 -5 mm olur. 5- 14 . günler arasında ovulasyona kadar progresif olarak glandular, stromal ve vasküler büyüme gerçekleşir. Glandlar uniform, birbirine uzak ve düzgün yerleşimli ve tübüler görünümündedir. Epiteli bazofilik sitoplazmalı oval/yuvarlak nükleuslu psödostratifiye kübik ya da kolumnar hücrelerden oluşur. Mitotik figür kolaylıkla seçilir. Stromal hücreler küçük koyu nükleuslu sitoplazma sınırları belirsiz hücrelerdir(14, 22).

Sekretuar faz: Erken, orta ve geç olmak üzere 3 e ayrılır. Bu fazda progesteron baskındır(23). Ovülasyondan 3 gün sonra epitel proliferasyonu durur. Bu kontrol veya inhibisyon progesteron ile sağlanır. Subnükleer vakuolizasyon ve kıvrıntılı glandlar görülür. Glandların en az %50'sinde vakuolizasyon olması ovulasyonun göstergelerinden biridir. Onyedinci ve onsekizinci günlerde subnükleer vakuolizasyon maksimum düzeyde olup, nükleuslar glandların bazalinde yerleşir

ve bazal membrana perpendiküler dizilim gösterirler. Ondokuzuncu ve yirminci günde stromal değişiklikler, glandüler değişikliklerden daha ön plana geçmeye başlar. Glandlardaki apokrin tipte sekresyon glandüler lümene geçmeye başlar. Sekretuar eksudasyon 24 ve 25. günde daha belirgindir. Yirmi üç ile 28 günlerde predesidualizasyon görülür(14, 24).

Menstruasyon fazı: Menstruasyon fazı gland ve stromanın dökülmesiyle karakterizedir. Genellikle 4 günde tamamlanır. Endometrial glandlar tırtıklı bazıları halen sekretuar görünümüne sahiptirler. Stroma kondanse olmuş stromal hücreler glandlardan ayrılmış agregat yaparak topçuklar oluşturmuştur. Predesidual görünüm kaybolur yerini nekrotik debris, nötrofil infiltrasyonu, interstisyel hemoraji ve fibrin birikimi alır(14). Menstruasyon, adet öncesi tüm hücre popülasyonunun %40'ını oluşturan endometrial kompartımandaki yüksek lökositlerin vurguladığı enflamatuar bir yanıtı taklit eder(25). Lökositler, pro-enflamatuar sitokinlerin salınmasına yardımcı olurken matriks metalloproteinazlar (MMP), hücre dışı matriksin (ECM) bozulmasına neden olur. Lokal prostaglandinler, iskemiye yol açan spiral arterlerin ani daralmasına ve yüzeysel endometrial desidual hücrelerin dökülmesine neden olur(26).

2.5. Endometrium karsinomları

Endometrium karsinomları (EC) kadın genital traktusunda en sık görülen kanserdir ayrıca kadınlarda en sık görülen 4. kanser tipidir (14). Genellikle 55-65 yaş arasında izlenir ve 40 yaş altında nadiren görülür (15). En sık başvuru şikayeti anormal uterin kanamadır. Yaklaşık %75 i erken evre de tanı alır (27). Demografik ve histopatolojik çalışmalara göre endometrial karsinomlar iki ana gruba ayrılır; tip1 ve tip2 (28).

Tip1 karsinomlar endometrium karsinomlarının %90 ını oluşturur ve karşılanmamış kronik östrojen stimülasyonu nedeniyle gelişir. Genellikle 50-60 yaşlarında, obezlerde görülür. Endometrial intraepitelyal neoplazi öncü lezyonudur. Endometrioid tipte endometrium karsinomu izlenen histolojik alt tiptir. Görülen genetik anomaliler PTEN mutasyonu, MSI, PAX2 kaybıdır. İyi prognozludur (28).

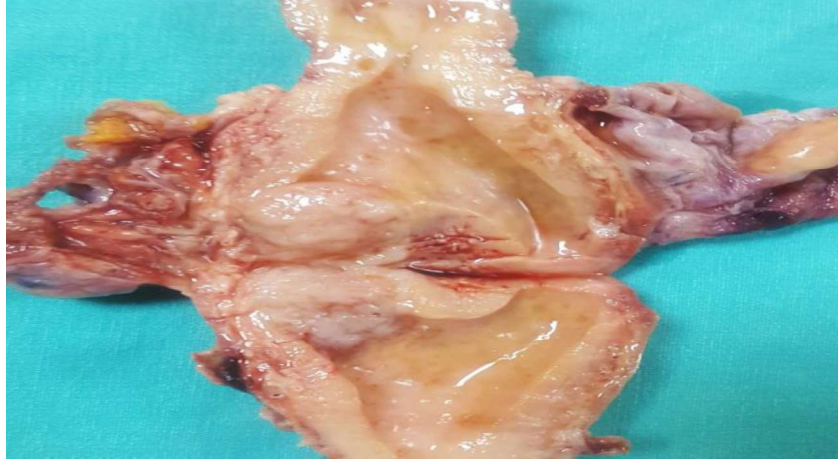
Tip 2 karsinomlar daha az sıklıkta izlenmekte olup 70-80 yaşlarında görülür. Östrojen fazlalığı ile ilişkili değildir. Genellikle kötü diferansiye tümörler olup seröz karsinom bu grubun prototipidir. Görülen genetik anomaliler p53 mutasyonu, 1p delesyonu ve PAX2 kaybıdır. Kötü prognozludur (28).

Yüksek dereceli endometrium karsinomları tipik tip 1 karsinomların yeni genetik değişiklikler kazanması ile ortaya çıkabilir, örn. p53 mutasyonlarının edinilmesiyle bu tür tümörlerin seröz bir histotipi olabilir. Bu nedenle, morfoloji, endometrium karsinomlarında patogenezi öngöremez. Histotipin morfolojik değerlendirmesi de çok önemli gözlemciler arası değişkenliğe maruz kalır. Bu sorun yakın zamanda tümörlerin bir alt kümesinin belirlenmesiyle açıkça kabul edilmiştir. 'Belirsiz fenotipli endometrium karsinomları(29).

Endometrium karsinomları sıklıkla sporadik bir hastalıktır ama bazen kalıtsal kanser sendromlarının da bir parçası olabilir, over, kolon, diğer neoplaziler gibi. En sık Herediter Non Poliposis Koli (HNPPC) sendromunda izlenir. Yüzde ikisi Lynch Sendromuyla ilişkilidir ve bu hastaların yaklaşık %50 sinde görülen ilk tümör endometrium tümörüdür. Dört MMR geni Lynch sendromu ile ilişkilidir; MLH1, MSH2, MSH6, PMS2. Bu genlerde hasar bulunan hastalarda kanserin ortaya çıkma yaşı daha erkendir ve kolorektal kanser için risk taşırlar (28).

2.5.1. Endometrium karsinomlarının morfolojik özellikleri

Makroskopik olarak bazı tümör tipleri seçilemeyebilir. Görülebilen tümörler polipoid görünümde, tüm kaviteyi doldurabilen fokal ya da diffüz nodül veya plak şeklindedir. Nadiren tümörler alt uterin segment ile sınırlıdır. Tümör yüzeyi kabarık ve düzensizdir(30). Özellikle yüksek dereceli olanlarda fokal hemoraji ve nekroz sıktır. Yayılım genellikle doğrudan myometrium invazyonu ile uterus çevresindeki yapılara doğrudan komşuluk yoluyla gerçekleşir. Zamanla bölgesel lenf düğümlerine yayılan tümör, geç evrelerde akciğer, karaciğer, kemik ve diğer organlara metastaz yapabilir(15).



Şekil 2. Polipoid görünümde fundus yerleşimli endometrium tümörünün makroskopik görünümü

2.5.2. Endometrium karsinomlarının morfolojik tipleri

Endometrial karsinomların DSÖ 2014 sınıflaması (31).

1.Endometrioid karsinom

-Skvamöz diferansiasyonlu

-Villoglandüler

-Sekretuar

2.Müsinöz karsinom

3.Seröz endometrial intraepitelyal karsinom

4.Seröz karsinom

5.Berrak hücreli karsinom

6.Nöroendokrin tümörler

-Düşük dereceli nöroendokrin tümör

-Karsinoid tümör

-Yüksek dereceli nöroendokrin tümör

-Küçük hücreli nöroendokrin karsinom

-Büyük hücreli nöroendokrin karsinom

7.Mikst karsinom

8.Andiferansiye karsinom

9.Dediferansiye karsinom

2.5.2.1.Endometrioid karsinom

Endometrium karsinomlarının en sık görülen tipidir. Ortalama tanı yaşı 63 tür. Hastaların %90 ı vaginal kanama ile kliniğe başvurur. Servikal stenoza olan hastalarda pelvik ağrı ve servikal sitolojide atipik glandüler hücreler izlenir. İleri evre hastalıkta abdominal distansiyon, pelvik ağrı izlenir. Endometriyum yüzeyi kabarık, parlak, ten rengi görülür. Tümör derin invaziv olduğunda genellikle ekzofittir. Histopatolojik incelemede tipik olarak glandüler veya villoglandüler yapılanma izlenir. Kolumnar stratifiye epitelle döşeli kalabalık kompleks dallanan bezler görülür. Glandüler yapılar birbirinden ince bir stromayla ayrılır ya da tamamen sırt sırtadır. Neoplastik hücrelerin sitoplazması eozinofilik ve granülerdir. Kötü diferansiye karsinomlar haricinde nükleer atipi hafif-orta derecededir, nükleol belirsizdir, mitotik aktivite değişkendir(31). Müsin izlenmez. Skuamöz metaplazi, papiller sinsityal değişiklikler, mikroglandüler hiperplazi gibi yüzey epiteli değişiklikleri görülebilir(30). Endometrioid karsinom panck, ema, CA125, BerEP4 ve B72.3 ekspres eder. CEA ile nadir olarak apikal membranlarda boyanma izlenir, müsinöz differansiyasyon gösterenlerde daha diffüz ekspresyon görülür. Endometrioid karsinomların neredeyse tamamı CK7 pozitif, CK20 negatiftir. Nadiren müsinöz varyantlar CDX2 ekspres eder. Vimentin ile kuvvetli pozitiflik izlenir. Endometrioid karsinomların yaklaşık yarısı ER ve PR pozitifdir. P53 pozitifliği grade 1 ve 2 tümörlerde beklenmez. PP53 boyanması belirgin olduğunda öncelikle seröz, grade 3 endometrioid, berrak hücreli veya andiferansiye tümörler düşünölmelidir(14).

Endometrioid karsinomların çoğu grade 1 veya 2 olarak sınıflandırılır, Benzer epidemiyolojik ve moleküler özellikleri paylaşır ve genellikle iyi bir prognoza sahiptir. Grade 3 tümörlerin prognozu daha kötüdür ve yaklaşık %50'si düşük dereceli tümörlerde nadir görölen P53 mutasyonlarını göstermektedir(32).

Moleküler seviyede, PTEN, PIK3CA ve ARID1A, FIGO grade 3 endometrioid karsinomların %60'ında mutasyona uğrar. Genel olarak endometrioid karsinomların %20-30 unda MSI si izlenir ve en sık MLH1 kaybı görülür(33). POLE somatik mutasyonları endometrium karsinomlarının %10'undan azında

bulunur ve POLE mutasyonu görülen tümörlerde prognoz çok iyidir. Grade 3 endometrioid karsinomlarda da POLE mutasyonu izlenebilir ve bu tümörler grade 3 olmasına rağmen iyi prognoz gösterirler(4).

2.5.2.2.Müsinöz karsinom

Endometrium karsinomlarının %1-9 arası müsinöz karsinomdur. Tümör hücrelerinin en az %50'sinde intrasitoplazmik müsinin varlığı ile tanımlanır. Endometrioid karsinomlarda bulunabilen intralüminal müsin, müsinöz karsinom için tanısal değildir. Bu tümörler genellikle düşük derecelidir. Tümör hücreleri, morfolojik olarak endoservikal tipteki hücrelere benzer ve sık sık bir nötrofilik infiltrasyon ile ilişkilidir(28). Minimal stratifiye kolumnar, müsinöz, üniform hücreler glandüler veya villoglandüler yapılanma gösterir. Müsin ile dolu kistik glandüler alanlar ve ekstraselüler, nötrofil içeren müsin gölcükleri ile çevrili papiller çıkıntılar tipiktir. Müsin, bazofilik, hafif soluk görünümündedir, müsikarmen ve CEA ile pozitifdir. Nükleer atipi orta-hafif , mitotik aktivite düşüktür. Myometrial invazyon genellikle ½ den azdır. Endoserviksın müsinöz karsinomu ile karışabilir, immunohistokimyasal yöntemlerle ayırt edilebilir(31).

2.5.2.3.Seröz karsinom

Seröz karsinomlar, endometrium karsinomlarının %5-10 unu oluşturur. Sıklıkla ileri aşamada ortaya çıkar. Kötü prognozludur. Tip 2 karsinomların prototipidir(34). En sık 6. dekatta postmenapozal kadınlarda izlenir. En sık klinik bulgu vaginal kanamadır(31). Over, tuba veya periton gibi kadın genital yolların diğer bölgelerinin senkronize tutulumunun görülmesi sıktır. Seröz karsinom genellikle derin myometrial invazyon ve geniş lenfovasküler yayılım ile ilişkilidir. Endometriyal poliplere bağlı olanlar gibi minimal myometrial invazyonu olan veya hiç olmayan tümörlerde bile, tanı anında ekstrauterin yayılma riski vardır(34). Klinik olarak, erken karın içi ve lenfatik yayılma eğilimindedir ve daha çok Afrika kökenli kadınlarda teşhis edilir(35). Seröz karsinom genellikle saf halde ortaya

çıkarsa da, bu tümörlerin üçte biri konvansiyonel endometrioid karsinom veya berrak hücreli karsinom ile birlikte bulunabilir(34).

Seröz endometrial intraepitelyal karsinom sıklıkla polip üzerinde veya atrofik endometriumdan gelişir. Eğer tümör endometriumda sınırlı ise bu tanı kullanılır. Myometrium invazyonu görülmez fakat dökülen tümör hücreleri nedeniyle ektsrauterin yayılım ve metastazlar görülebilir(31).

Kompleks papiller yapılar, uterin seröz karsinom için karakteristiktir. Kısa, dallanan, hyalinize papillalar görülür. Fibrovasküler papillalar büyük atipik nükleuslu, belirgin nükleollü, sitoplazması dar hücrelerle döşelidir. Çok sayıda mitotik figür izlenir(31).

Nadiren seröz karsinom, FIGO grade 3 endometrioid karsinomayı taklit edebilen ağırlıklı olarak glandüler ve/veya solid yapı içerir. Sitoplazmik berraklaşma, berrak hücreli karsinomayı taklit edebilir. Atrofik endometriyum ve / veya bir atrofik polip genellikle arka planda görülür(33).

Seröz karsinomun genel olarak 5 yıllık sağkalımı tüm aşamalar için sadece $30 \pm 9\%$ 'dur ve ameliyat sonrası nüks oranı oldukça yüksektir (% 50-80). Bu kötü prognoz, yeni etkili tedavi yöntemleri geliştirmek umuduyla bu tümörün agresif davranışının moleküler temelini belirlenmesine teşvik eder(35). Genetik seviyede seröz karsinom, TP53 ($>90\%$), PPP2R1A, FBXW7, Her2 amplifikasyonu ve yüksek kopya sayısı değişimlerinde sık mutasyonlarla karakterize edilir; PTEN, ARID1A, DNA MMR genleri ve KRAS 1 içeren tümörler nadirdir(33).

2.5.2.4.Berrak hücreli karsinom

Endometrial berrak hücreli karsinomlar, endometrium karsinomunun nadir görülen bir türüdür. Menopoz sonrası kadınlarda ortaya çıkma eğilimindedir ve radyasyon tedavisi ve platin bazlı tek ajan kemoterapisine zayıf yanıt gösterirler(36). Berrak hücreli karsinomlar tip2 karsinomların prototipidir. Görülme sıklığı %5 in altındadır(34). Renal hücreli karsinoma benzediği için geçmişte mezonefrik orijinli olduğu düşünülmüştür(14). Ortalama görülme yaşı 65 tir. Multipar ve sigara içen kadınlarda daha sık, obez ve diyabetli kadınlarda daha az sıklıkta izlenmiştir. Berrak hücreli karsinom karakteristik olarak, poligonal veya

hobnail şekilli, berrak veya daha az sıklıkta eozinofilik sitoplazmalı, tübülokistik, papiller veya solid yapılanma gösteren tümör hücrelerinden oluşmaktadır. Papillalar kısa, dallanan şekilde, hyalinize stromaya sahiptir. Belirgin nükleer atipi ve pleomorfizm ve değişik boyutlarda nükleol izlenmiştir. Mitotik figürler genellikle görülür. Yaklaşık 2/3 ünde eozinofilik ekstra selüler globüller veya hyalin cisimler izlenir(31). Berrak hücreli karsinom tipik olarak ER ve PR negatif, HNF1 β pozitifdir. Yüksek ki67 indeksi gözlenir. P53 ile pozitiflik görülebilir fakat seröz karsinoma göre daha zayıf ve fokal bir pozitiflik vardır. Nadiren diffüz p53 pozitifliği ya da hiç boyanmaması saptanabilir, bu da prognozunun daha kötü olduğunu seröz karsinoma benzer bir prognoz izleneceğini gösterir(30).

Berrak hücreli karsinomda, TP53, PIK3CA, PPP2R1A, FBX7 ve ARID1A en sık görülen mutasyonlardır. Yaklaşık %20 sinde MSI si , %5 inde POLE mutasyonu görülür. Berrak hücreli karsinomlar hem seröz hem de endometrioid endometrial kanserlere moleküler olarak benzer, ancak bu lezyonların kopya sayısı değişiklikleri ve moleküler alt tipleri hakkında çok az şey bilinmektedir(33, 37).

2.5.2.5. Nöroendokrin tümörler

Morfolojik olarak nöroendokrin fenotip gösteren endometrial tümörlerdir. Düşük dereceli (karsinoid tümör) veya yüksek dereceli (küçük hücreli nöroendokrin karsinom ve büyük hücreli nöroendokrin karsinom) olabilirler. Oldukça nadir izlenir. Endometrial kanserlerin %1 inden azında görülür. Ortalama görülme yaşı 60 dır. Postmenapozal kanama en sık izlenen semptomdur. Küçük hücreli nöroendokrin karsinomlar akciğerdeki gibi görünür. Tümör hücreleri küçük, dar sitoplazmalı, ovoid şekilli, nukleolü belirsiz, kohezyon kaybı izlenen hücrelerdir. Nükleer eklemleşme, çok sayıda mitotik figür, apoptotik cisimler izlenir. Diffüz, trabeküler, yuvalar veya rozet benzeri yapılar yapan büyüme paternleri görülebilir. Büyük hücreli nöroendokrin karsinomda hücreler büyük, vesiküler, poligonal şekilli, hiperkromatik nükleuslu, belirgin nükleollüdür. Yüksek mitotik aktivite ve geniş jeografik nekroz izlenir. İmmunohistokimyasal olarak nöroendokrin tümörler CD56, sinaptofizin ve kromogranin pozitiflerdir. Yüksek dereceli olanlarda ki67 proliferasyon indeksi fazladır(31).

2.5.2.6. Mikst karsinom

Mikst endometrium karsinomları uterusun tüm malign epitel tümörlerinin %3 ila % 10'unu oluşturur(38). Mikst endometrium karsinomu, 2 veya daha fazla farklı histolojik endometrial karsinom tipinin bir arada bulunmasıyla oluşur. Komponentlerden en az birinin tip 2 kategorisinde olması gerekir(31). En sık görülen kombinasyon endometrioid ve seröz karsinomdur(38). Ayrıca bu tanı için bir komponent, tümörün en az %10'unu oluşturmalıdır. Bununla birlikte, herhangi bir tip 2 bileşenin varlığı, önemi henüz kesin olarak belirlenememiş olduğundan patoloji raporunda belirtilmelidir(34). Mikst seröz ve endometrioid karsinom en az %25 seröz komponent içerirse pür seröz karsinom gibi davranır(14). Mikst karsinomların sınıflandırılması zordur ve gözlemciler arası tekrarlanabilirliği kötüdür(33). Mikst endometrium karsinomlarının moleküler değişikliklerini ve klinikopatolojik özelliklerini anlamak, sadece prognoz için değil, aynı zamanda bu hastaların klinik yönetimini geliştirebilecek biyobelirteçlerin tanımlanması içinde önemlidir. Mikst endometrium karsinomlarının immünohistokimyasal ve moleküler genetik özellikleri, saf karsinomlarınkinden farklıdır. Örneğin, eşlik eden p53 ve PIK3-AKT değişiklikleri, mikst endometrioid/seröz karsinomlarda, saf seröz karsinomlardakinden daha sık görülür. Ayrıca, mikst endometrium karsinomlu hastaların prognozu, saf yüksek dereceli karsinomlu hastalarınkinden daha kötüdür(38).

2.5.2.7. Andiferansiye ve dediferansiye karsinomlar

Andiferansiye ve dediferansiye endometrium karsinomları endometrioid karsinomlarla ilgili nadir görülen ancak oldukça agresif bir tümör ailesinin parçasıdır ve ilk olarak Silva ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır(33). Andiferansiye endometrial karsinom, endometrial karsinomların yaklaşık %9'unu temsil eden nadir fakat çok agresif bir uterus kanseri türüdür. Nadiren, andiferansiye endometrial karsinom, düşük dereceli endometrioid karsinom bileşeniyle ilişkilendirilir ve bu kombinasyon “dediferansiye endometrioid

endometrial karsinom” olarak adlandırılır(39). Genellikle postmenapozal kanama ile hasta kliniğe başvurur. Makroskopik olarak büyük, polipoid, intralüminal kitle olarak görülürler. Nekroz izlenir(31).

Monomorfik andiferansiye karsinom küçük-orta boy uniform görünümlü diskoheziv hücrelerden oluşur. Bez yapısı, trabeküler ve yuva yapısı izlenmez. Sıklıkla 10 büyük büyütme alanında 25 den fazla mitoz izlenir. Morfolojik olarak lenfoma, küçük hücreli karsinom, endometrial stromal sarkom, plazmositoma benzer yapılanma gösterir(31).

Dediferansiye karsinomların %40 ından fazlası monomorfik andiferansiye karsinom ve 2. Komponent olarak grade 1 veya 2 endometrioid karsinomdan oluşur(31).

Andiferansiye karsinom immunohistokimyasal olarak pank gibi epiteliyal markerları kaybeder. Vimentin pozitif; ER, PR, E-kadherin negatiftir. Son zamanlarda, bu agresif tümörün patogeneğinde SWI/SNF kromatin remodeling kompleksi için bir rol öne sürdüğü immünohistokimyada sıklıkla ARID1A, SMARCB1 ve SMARCA4 kaybı gösterdiği bildirilmiştir. Rosa-Rosa ve ark. son zamanlarda, farklılaşmamış endometrial karsinomların genetik olarak heterojen olduğunu ve FIGO grade 3 endometrioid karsinomuna benzer şekilde TCGA tarafından tarif edilen endometrial karsinomun dört moleküler alt grubu ile moleküler değişiklikleri paylaşabileceğini göstermiştir(33).

2.5.3. Endometrium karsinomlarında derecelendirme

Endometrioid karsinomlarda derecelendirme önemli bir prognostik göstergedir. Derecelendirme yapısal patern ve nükleer özelliklere göre yapılır. Müsinöz karsinom içinde bu derecelendirme kullanılır. Nonendometrioid karsinomlar yüksek dereceli kabul edilir(30).

Yapısal paterne göre endometrioid karsinomlar 3 gruba ayrılır;

Grade 1: %5 veya altında solid büyüme paterni

Grade 2: %6-50 arası solid büyüme paterni

Grade 3: %50'nin üzerinde solid büyüme paterni

Belirgin nükleer atipi varlığında (nükleer grade 3) hastanın kliniği agresif seyir gösterir, bu nedenle bu durumda yapısal grade bir derece arttırılır(31).

Nükleer grade, nükleer büyüklük ve şekildeki değişkenlik, kromatin dağılımı ve nükleollerin büyüklüğü ile belirlenir. Buna göre endometrioid karsinomlar 3 gruba ayrılır;

Grade 1: Nükleus oval-yuvarlak, hafif genişlemiş, dağınık kromatin

Grade 2: Nükleus genişlemiş yuvarlak , granüler vesiküler kromatin , bazen küçük nükleol

Grade 3: Nükleus genişlemiş, pleomorfik, irregüler, kaba kromatinli , belirgin eozinofilik nükleol

Mitotik figürler genellikle nükleer derece arttıkça sayıca artar ve atipikleşir(14).

2.5.4. Endometrium karsinomlarında evreleme

Endometrium karsinomları için TNM evreleme sistemi (Uluslararası Kanser Kontrol Birliği ve Amerikan Kanser Versiyonları Ortak Komitesi), yaygın olarak kullanılan Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Federasyonu (FIGO) sistemi ile uyumludur. Dünyadaki patoloji raporlama ilkeleri, tümör evresinin, FIGO evresi olarak patoloji raporunda verilmesini önermektedir ve bazı otörlere göre kullanılan sürümü belirterek TNM evrelemesi de eklenmesi önerilir(40).

Endometrial karsinomlarda FIGO evreleme sistemi :

Evre 1: Tümör uterusta sınırlı

Evre 2: Tümör serviksin bağ dokusunu invaze etmiş, fakat uterus dışına çıkmamış

Evre 3: Tümör uterus dışına yayılmış/ lenf düğümü metastazı olabilir/ uzak metastaz yok

Evre 4 : Mesane/barsak mukozasına yayılım / uzak metastaz(40).

Endometrial karsinomlarda TNM evreleme sistemi:

T evresi :

TX : Primer tümör belirlenememiş

T0 : Primer tümör yok

T1 : Tümör korpus uteride sınırlı , endoservikal glandüler tutulum bu grupta
T1a : Tümör endometriumda sınırlı veya myometrium invazyonu ½ den az
T1b : Myometrium invazyonu ½ den fazla
T2 : Tümör servikal stromal bağ dokuya yayılmış ama uterus dışına çıkmamış, endoservikal glandüler tutulum yok
T3 : Seroza , adneks , vagina veya parametrium tutulumu
T3a : Seroza ve/veya adneks tutulumu (direkt yayılım veya metastaz)
T3b : Vagina ve/veya parametrium tutulumu (direkt yayılım veya metastaz)
T4 : Mesane ve/veya barsak mukozasına yayılım
N evresi :
NX : Bölgesel lenf nodu belirlenememiş
N0 : Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N0(i+) : Boyutu 0.2 mm den küçük bölgesel lenf düğümünde izole tümör hücreleri
N1 : Pelvik lenf nodlarında metastaz
N1mi : Pelvik lenf nodlarında 0.2-2 mm boyutunda metastaz
N1a : Pelvik lenf nodlarında 2 mm üzerinde metastaz
N2 : Paraaortik lenf nodlarında metastaz (pelvik lenf nodu metastazı olabilir olmayabilir)
N2mi : Paraaortik lenf nodlarında 0.2-2 mm boyutunda metastaz
N2a : Paraaortik lenf nodlarında 2 mm üzerinde metastaz
M evresi :
M0 : Uzak metastaz yok
M1 : Uzak metastaz var (inguinal lenf nodları, periton tutulumu, akciğer, karaciğer, kemik tutulumu) (pelvik, paraaortik lenf nodu tutulumu, vagina, uterin seroza veya adneks tutulumu M kategorisine girmez, uzak metastaz değildir.)(41)

2.5.5. Endometrium karsinomlarında prognostik faktörler

Endometrium karsinomlu hastalarda, prognozun belirlenmesinde ve postoperatif terapi ihtiyacının belirlenmesinde patoloğ önemli bir rol oynamaktadır. Prognostik parametreler istatistiksel değere ulaştığında faydalıdır, tekrarlanabilir

ve çoklu araştırmalarda anlamlılık göstermektedir(42). Patolojik prognostik faktörler; evre, histolojik grade, histolojik tip, tümör çapı, myometrial invazyon, servikal yayılım, uterin serozal yayılım, adneksiyal yayılım, vaginal yayılım, parametrial invazyon, lenfovasküler invazyon, peritoneal sitoloji, steroid hormon reseptörleri, p53 overekspresyonu, cerbb2 ekspresyonu, DNA plöidi, epidermal büyüme faktörü reseptörü, angiogenesisiz, mikrosatellit instabilite (MSI) dir(40, 43, 44).

Evre : Evre tanı sırasında hastalığın derecesini yansıtır. Prognozu belirlemek ve tedaviyi planlamak ve ayrıca farklı araştırmacılar arasında standart bir raporlama yöntemi sağlamak için evreleme yapılır. Tam evreleme histerektomi ve bilateral salpingooforektomi ile pelvik ve paraaortik lenf nodlarının değerlendirilmesini gerektirir. Uluslararası Jinekolojik Patologlar Topluluğu tarafından 1988’de en son revize edilen sisteme yapılan bir iyileştirmeyi temsil eden yeni bir FIGO evreleme sistemi 2009 yılında kabul edilmiştir ve evreleme bu sisteme göre yapılmaktadır(14).

Histolojik grade : Grade hastanın tedavi planının belirlenmesinde önemli prognostik kriterlerden biridir. En sık kullanılan derecelendirme kriterleri, hem yapısal hem de nükleer özellikleri içeren FIGO ve Dünya Sağlık Örgütü’nün kriterleridir. Nonendometrioid karsinomlar yüksek dereceli kabul edilir, derecelendirme yapılmaz. Evre prognoz ile güçlü bir şekilde ilişkilidir(45). Derece 1 ve 2 tümörlerde sağ kalım (%92 ve %87) benzerdir ve derece 3 için daha belirgin bir azalma görülür(14). Chi ve arkadaşları endometrioid karsinomlarının %23, %52 ve %25’inin sırasıyla grade 1, 2 ve 3 olduğunu buldu. Bu üç aşamalı derecelendirme şeması, evre 1 tümörler için 5 yıllık sağkalımı sırasıyla (%92,%88 ve %75) ve evre 3 tümörler için (% 70,% 63 ve% 40) olarak sınıflandırdı(30).

Histolojik tip : Hücre tipi endometrium karsinomunun biyolojik davranışının önemli bir belirleyicisi olarak kabul edilmiştir. Son 15 yılda, Bokhman’ın endometrial karsinomların patogenezi açıklayan klinik modeline dayanarak, bu tümörler 2 tipte sınıflandırılmıştır(tip 1 ve tip2). Tip 1 tümörlerin prognozu tip 2 ye göre daha iyiyidir(45). Bu tarihsel sınıflama sistemi faydalı olmakla birlikte, tip 1 ve 2 kanserler kendi arasında büyük ölçüde heterojenlik göstermektedir. Tip 1 ve Tip 2 sınıflaması hiçbir zaman resmi evreleme veya risk sınıflandırmasının bir

parçası olmamıştır ve bu nedenle endometriyal kanser patogenezi anlamak için kavramsal bir çerçeve sunmasının ötesinde klinik bir faydası yoktur(4).

Endometrioid (tip1) karsinomların gelişiminde yer alan moleküler değişikliklerin seröz (tip 2) karsinomların gelişiminden farklı olduğu bulunmuştur. Endometrioid tümörler genellikle mikrosatellit instabilitesi (MSI) (%20 ila %30) gösterir, PTEN mutasyonları (%30 ila %50) ve nadiren p53 mutasyonları gösterir (%10). Buna karşın, seröz karsinomların büyük çoğunluğu p53 mutasyonları sergiler ve zaman zaman MSI gösterir. Tümörlerin klinik, patolojik, immünohistokimyasal ve moleküler özelliklerinde sıklıkla örtüşme vardır. Gerçektende, bazı endometrioid olmayan karsinomların (tip 2) önceden mevcut endometrioid karsinomlardan (tip 1) tümör progresyonunun bir sonucu olarak gelişebileceği gösterilmiştir. Bu gibi durumlarda, tümörlerin hem tip 1 hem de tip 2 endometrium karsinomlarının patolojik ve moleküler özelliklerini paylaşabileceği bildirilmiştir. Bu nedenle, rutin uygulamalarda mikst karsinomlar sıklıkla görülür(45).

Tümör çapı : Tümör çapı ilk kez Gusberg tarafından endometriyum karsinomlarında prognostik bir faktör olarak tanımlandı ve 10 cm den büyük tümörlerin kötü prognozlu olduğu bulundu. Tümör boyutu, endometrium kanserli hastalarda genişletilmiş cerrahi evreleme ve adjuvan radyasyon tedavisinin yönlendirilmesinde yararlı, kesin ve ucuz bir prognostik faktördür. Tümör çapı ölçümleri, endometrium kanserli her hasta için daha iyi doğrudan adjuvan tedaviyi sağlamak üzere kaydedilmelidir(46). Çeşitli çalışmalar, tümör büyüklüğünün lenf nodu metastazları ve sağkalımı ile önemli ölçüde ilişkili olduğunu göstermiştir, bu da düşük riskli endometrium kanser hastalarını belirlemek için rutin değerlendirmelere tümör büyüklüklerinin eklenmesini önermektedir. Bununla birlikte, FIGO evreleme sistemi endometrium kanser tanısı için tümör boyutundan bahsetmemektedir(47).

Myometrial invazyon : Figo evre 1A ve 1B myometrial invazyona göre belirlenir. Evre 1A da myometrial invazyon yok veya ½ den azdır, Evre 1B de myometrial invazyon ½ den fazladır. Myometrium invazyonu olmayan endometrium karsinomu ile myometrial invazyonun ½ den az olduğu hastalar arasında sağkalımda neredeyse hiçbir fark yoktur(14). Operasyon öncesi MR ile

değerlendirilen ½ den fazla myometrial invazyon kötü prognozu gösterir. Myometrium invazyonu endometrial karsinomda güçlü bir prognostik faktördür(48).

Servikal yayılım : FIGO evreleme sistemine göre, uterus ile sınırlı ancak servikal stromaya yayılım gösteren tümörler evre 2 dir. Buna karşılık, endoserviks yüzey epiteli veya bezleriyle sınırlı olan neoplazmlar evre 1 hastalığı temsil eder. Servikal stromal tutulum, yüzey epiteli veya önceden var olan endoservikal bezlerle sınırlı olmayan ve tipik olarak stromal bir reaksiyon ortaya çıkaran karsinoma ile karakterize edilir(14). Tarihsel olarak, endometrium karsinomlu hastalarda servikal tutulumun prognostik olarak önemli olduğu düşünülmüştür. Servikal tutulum gösteren tümörleri olan hastaların, tümörleri korpusla sınırlı kalanlara göre daha kötü bir prognoza sahip olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, bu tür hastalar genellikle yüksek tümör derecesi, derin miyometriyal invazyon ve lenfovasküler invazyon gibi bilinen diğer kötü prognostik faktörlere de sahip olabilir(40).

Uterin serozal yayılım : Serozal tutulum FIGO evreleme sistemine göre evre 3A ya dahil edilir. Serozal tutulum olduğu tespit edilen hastalar sıklıkla patolojik evre 3-4 hastaları ile gruplandırılır ve tüm karın radyasyon tedavisi, kemoterapi veya hem radyasyon tedavisi hem de kemoterapi ile tedavi edilir. Evre 3 olarak sınıflandırılması ile uyumlu olarak, serozal yayılım diğer yüksek riskli patolojik faktörlerle ve kötü prognozla ilişkilidir(49).

Adneksiyel yayılım : FIGO ya göre evre 3A da sınıflandırılır. Bu bulgu sağkalımın azalmasıyla ilişkilidir, ancak sıklıkla diğer olumsuz prognostik faktörlerle de ilişkili bulunmuştur(30).

Vajinal yayılım : FIGO ya göre evre 3B de sınıflandırılır. Vajinal nüksler yaygın olmasına rağmen, evre 3B hastalığı nadirdir ve çoğu durumda doğrudan yayılmadan ziyade lenfatikten kaynaklanır. Beş yıllık sağkalım oranı yaklaşık %25'tir(30).

Parametrial invazyon : FIGO ya göre evre 3B de sınıflandırılır. Parametrium, serviksin supravajinal kısmını saran ve serviksin bu kısmını mesanenin önünden ve posteriorda rektumdan ayıran fibrokonnektif dokudan oluşur. Radikal histerektomi, bilateral parametreektomi içerir; bu genellikle servikal karsinoma tedavisi için yapılır ve temiz cerrahi sınırlar elde etmek için alt

uterin segmentinde ortaya çıkan ve/veya sekonder olarak servikse kadar uzanan endometrium karsinomları için de yapılır. Her ne kadar uzun dönem prognozu parametrial yayımlı endometrium kanser hastaları için anlamlı olarak daha zayıf olmasına rağmen, bazı çalışmalarda çok değişkenli analiz bu parametrenin endometrial karsinomda bağımsız bir prognostik faktör olmadığını göstermiştir(40).

Lenfovasküler invazyon : Venöz veya lenfatik invazyon, endotel kaplı kanallardaki neoplastik hücrelerin varlığı ile tanımlanır. Uterusun endometrioid karsinomunda vasküler invazyon nispeten nadir görülür (vakaların yaklaşık %10-20'si), ancak daha derin myometrial invazyon, agresif hücre tipleri ve histolojik farklılaşmanın azalması sıklığı artırır(14). Vakaların yaklaşık %20'sinde, tümör hücreleri lenf bezlerine ve bölgesel organlara yayılır. Lenf düğümü invazyonu söz konusu olduğunda, 5 yıllık sağkalım oranı %60'a düşer. Erken endometrium karsinomlarının yönetimi, jinekolojik onkologlar arasında anlaşmaya varılmaması nedeniyle tüm profesyoneller arasında ortak bir protokole sahip değildir. Lenfovasküler invazyonunun varlığının, lenf nodu metastazlarının yanı sıra uzak nüks oranlarıyla ilişkili kötü prognostik bir faktör olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, lenfovasküler invazyon bilgisi, bu hastaların doğru tedavi edilmesi ve aşırı tedavi görmemesi için esastır(50).

Peritoneal sitoloji : Periton sitolojisi örneğindeki tümör hücreleri sıklıkla adneksiyal, nodal veya omental yayılımla birlikte bulunur, ancak nadiren endometrium karsinomunun ekstrauterin yayılımının tek belirtisidir. Pozitif periton sitolojisinin önemi çeşitli çalışmalarla belirlenmiştir. Bazı çalışmalarda, pozitif periton sitolojisine sahip klinik evre 1 hastaların neredeyse %40'ının negatif periton sitolojisi olanlara kıyasla tümör nüksü olduğu bildirilmiştir(14). Pozitif periton sitolojisi intraperitoneal hastalık prevalansını ve aynı zamanda tümörün agresif davranışını gösterir ve sağkalım negatiflere göre anlamlı olarak daha kötüdür. Ayrıca pozitif peritoneal sitoloji, derin myometrial invazyon, servikal stromal invazyon, tümör büyüklüğü, histolojik tip ve lenfatik metastaz ile ilişkili bulunmuştur(51).

Steroid hormon reseptörleri : Steroid hormonları, özellikle östrojen, endometrial kanserin patogeneğinde önemli bir rol oynar. Steroid reseptörlerinin

varlığı ve miktarı, çeşitli çalışmalarda evre, histolojik derece ve sağkalım ile korele olmuştur ve bazı yazarlar, reseptör durumunun bağımsız bir prognostik faktör oluşturduğunu bildirmiştir(45). Endometrioid karsinomların çoğu, hem östrojen (ER) hem de progesteron reseptörlerine (PR) sahip olan hücreleri farklılaşma belirtisi olarak içerirler. ER'lerin ve PR'lerin değerlendirilmesi esas olarak immünohistokimya ile yapılır. Karakteristik olarak endometrioid karsinomlar ER ve PR dağılımında belirgin heterojenite gösterirler. Steroid reseptörlerinin varlığı ve miktarı FIGO evresi, histolojik derece ve sağkalım ile ilişkilidir(42).

P53 overekspresyonu : P53 geni apoptozun önemli düzenleyicisidir. Endometrium karsinomu dahil olmak üzere farklı kanser türlerinin patogeneğinde önemli roller oynar. P53 geni, hücre siklusunun duraklatılmasına neden olan ve mutasyona uğramış genomları taşıyan hücrelerde apoptozu indükleyen bir tümör baskılayıcıdır. P53 gen aktivitesi kanserli hastalarda prognoz tahmininde kullanılmaktadır(52). P53 tümör baskılayıcı genin aşırı ekspresyonu, özellikle ileri evre endometrioid ve seröz karsinomlarda, düşük hayatta kalma oranları ile ilişkilidir(45).

Cerb-b2 ekspresyonu : Tirozinaz aktivitesini inhibe edebilen C-erbB-2, hücre büyümesinde, çoğalmasında ve farklılaşmasında önemli bir rol oynar ve aşırı ekspresyonu, tümör derecesi ile pozitif korelasyon gösterir(53). Gen amplifikasyonu veya aşırı ekspresyonu, endometrium karsinomlarının yaklaşık %20-40'ında meydana gelir. Cerb-b2 proteininin aşırı ekspresyonu, ileri evre, azalmış diferansiasyon, özellikle berrak hücre tipi dahil agresif hücre tipleri ve artan myometrial invazyon derinliği ile ilişkilendirilmiştir(14).

DNA ploidi : Endometrium karsinomlarında DNA ploidisinin prognostik değeri ilk olarak 1959'da Atkin tarafından yayınlandı. O zamandan beri, birçok çalışma, endometrium karsinomundaki aneuploidi veya diploid olmayan DNA içeriğinin önemini değerlendirdi. DNA ploidi, lenfovasküler invazyonun yanı sıra lenf nodu tutulumu ile koreledir(54). Diploid tümörler genellikle sadece yüzeyel invazyonu olan düşük dereceli endometrioid karsinomlardır ve aneuploid karsinomlardan daha uzun sağkalım ile ilişkilidir. Aşama 1 deki hastalıklı sağkalımdaki farklılıklar, aneuploid karsinomlar için %64 ve diploid karsinomlar

için %94 kadar önemli olmuştur. Bu nedenle, DNA içeriğinin faydalı bir prognostik parametre olduğu düşünülmektedir(42).

Anjiyogenezis : Anjiyogenez, malign tümörlerin büyümesi ve yayılması için kritik bir faktördür. Çeşitli çalışmalar endometrium karsinomundaki yüksek intratumor mikrodamar yoğunluğunun ileri evre, tekrarlayan hastalık riskinin artması ve kötü prognoz ile ilişkili olduğunu göstermiştir(45).

Mikrosatellit instabilitesi (MSI) : Mikrosatellit terimi, DNA içindeki tekrarlayan nükleotit dizilerini ifade eder. Mikrosatellitler tipik olarak, 1 ila 5 nükleotit tekrarı gösterir. Normal insan genomunda kromozomlar boyunca dağılmış 50.000 ila 100.000 mikrosatellite sahiptir. Mikrosatellitler genellikle DNA'nın kodlamayan dizilerini işgal eder, fakat önemli olarak kodlama bölgelerinde de bulunur(55). Tekrarlayan yapıları nedeniyle, mikrosatellitler, replikasyon hatalarına özellikle hassastır, bu da insersiyon veya delesyon mutasyonlarına (yani, MSI) yol açar. MSI'den sorumlu genler, MLH1, MLH6, MSH2, ve PMS2 dir. Bu genler mismatch repairda yer alan proteinleri kodlar. Bu genlerin mutasyonları, hücrelerin replikasyon hatalarını onarma yeteneğini değiştirir. MSI başlangıçta kalıtsal polipozoz olmayan kolon kanseri (HNPCC) sendromu olan hastalardaki kanserlerde bulunmasına rağmen, sporadik tümörlerde de görülmüştür. MSI, özellikle endometrioid tipte olan endometrial karsinomların %30'unda bulunur ve iyi prognoz ile ilişkilendirilir. MSI'li endometrial karsinomların PTEN mutasyonlarına sahip olma olasılığı ve endometrioid olmayan karsinomlarda sıklıkla bulunan moleküler bir anormallik olan p53 overekspresyona sahip olma olasılığı daha düşüktür(42).

2.5.6. Endometrium karsinomlarının moleküler özellikleri

Tip 1 ve tip 2 endometrium kanser alt tipleri farklı bir patogeneze sahiptir. PTEN tümör baskılayıcı geninin mutasyonları endometrioid karsinomların %80'inde tanımlanmıştır. Endometrial karsinomun patogenezi ve normalden neoplastiğe geçişi ayrıca K-ras mutasyonu, beta catenin inaktivasyonu ve sikline bağlı kinaz aktivitesinin kaybı dahil olmak üzere çok çeşitli başka moleküler değişiklikleri de içerir. Endometrioid karsinomların aksine seröz tümörler tipik

olarak PTEN inaktivasyonu veya MSI ile ilişkili değildir. Aksine, bu tümörlerin %80'inden fazlası p53 tümör baskılayıcı geninde mutasyonlara sahiptir. P53'teki mutasyonlar, bu tümörlerin en erken tanımlanabilir belirtilerinde de bulunur ve immunohistokimyasal olarak yoğun diffüz nükleer boyanma veya tam boyama kaybı olarak belirlenebilir(28, 56).

Endometrium karsinomu, herediter non poliposiz kolon karsinomu (HNPCC) hastalarında en sık görülen ikinci tümördür. MSI, HNPCC ile ilişkili endometrium karsinomunun %75'inde görülür, fakat aynı zamanda sporadik endometrium karsinomunun %30'unda görülür. HNPCC hastaları, MLH1, MSH2, MSH6 veya PMS2'de kalıtsal bir germline mutasyonuna sahiptir. MSI, endometrioid endometrial karsinomlarda endometrioid olmayanlara göre daha sık görülür(56).

K-RAS protoonkogen aktivasyonu endometrial karsinomda ilk tanımlanan mutasyonlardan biridir ve endometrioid tümörlerde %20-30 oranında izlenir. Sıklıkla ekzon 1 de bulunur, nadiren ekzon 2 de de görülür(57).

Beta katenin mutasyonu endometrioid tümörlerin yaklaşık %20 sinde izlenir. Beta-katenin, e-cadherin ile birlikte, hücre zarı ile ilişkili olan ve hücre-hücre adezyonundan sorumlu bir protein kompleksi oluşturur. Ek olarak, beta katenin, T hücre faktörü ailesi ile bağlantılı olarak sinyal iletim yolu için önemlidir(57).

Tümör baskılayıcı gen P53'teki mutasyonlar, seröz karsinomların %90'ında ve düşük dereceli endometrioid kanserlerin %10'unda ve yüksek dereceli endometrioid kanserlerin %30'unda bulunur(58).

ARID1A'daki mutasyonlar grade 1 ve 2'nin %29'unda ve grade 3 primer endometrioid endometrial kanserlerin %39'unda, berrak hücreli karsinomların %26'sında ve seröz karsinomların %18'inde tanımlanmıştır(58).

POLE; DNA polimeraz enzim kompleksinin katalitik alt ünitesidir, DNA replikasyonunun hatasız olmasında ve onarımında etkilidir(5). Son zamanlarda, DNA polimeraz ε (POLE) içindeki DNA okuma fonksiyonunun kaybının benzer şekilde endometrial karsinomda tümörögenizde önemli olduğu gösterilmiştir(59). Endometrium karsinomların yaklaşık %7'si, POLE'nin eksonükleaz alanındaki mutasyonları barındırır. POLE eksonükleaz domain mutasyonlu tümörler “POLE ultra mutasyonlu” olarak adlandırılır. Bu moleküler olarak tanımlanmış gruptaki endometrium karsinomları endometrioid histolojiden olup, baskın olarak normal

DNA MMR'ye (mikrosatellit stabil (MSS)) sahiptir ve binlerce somatik mutasyon içerirler. Klinik olarak, POLE ultra mutasyona uğramış gruptaki hastaların progresyonsuz sağkalımının daha iyi olduğu bildirilmiştir(59).

Endometrioid ve seröz karsinomlar ayrıca, ayırt edici moleküler özelliklere sahiptir; PTEN fonksiyonunun kaybı, endometrioid karsinomun ana itici gücü iken p53 fonksiyonunun kaybı, seröz karsinomların çoğunluğunda itici güçtür. Son zamanlarda, kanser genom atlas (TCGA) tarafından endometrioid ve seröz endometrium karsinomlarının analizi, dört ayrı moleküler alt grubun tanımlanmasına yol açtı: POLE mutasyonlu (ultramutasyonlu), mikrosatellit instabilitesi (hipermutasyonlu), kopya sayısı düşük (endometrioid) ve kopya sayısı yüksek (seröz benzeri)(32). POLE, mikrosatellit instabil ve kopya sayısı düşük gruplar çoğunlukla endometrioid histolojide tümörlerinden oluşurken, kopya sayısı yüksek grupta çoğu seröz histolojide tümörler bulunur(60). Bu moleküler sınıflandırma, önemli diyagnostik, prognostik ve terapötik hedefler eklerken endometrial tümörlerin görüntülenmesi ve tanımlanması için alternatif bir olanak sağlar(32).

2.6. POLE (Polimeraz ε)

DNA polimeraz ε, 25 yıl önce bir DNA tamir faktörü olarak tanımlandı, ancak yakın zamanda replikasyon, hücre döngüsü kontrolü ve epigenetik kalıtımda kritik roller oynadığı kabul edildi(61). POLE, Polε DNA polimeraz enzim kompleksinin ana katalitik ve yeniden okuma alt birimlerini kodlar. Polε enzim kompleksi, öncü ipliği sentezler. Düzeltme (eksonükleaz) işlevi, ana iplikçikle başarısız tamamlayıcı eşleşme yoluyla hatalı bazları bulur ve değiştirir. POLE eksonükleaz domain mutasyonlarının, maya ve fare modellerinde tümörögenezise katkıda bulunan spontan mutasyon oranlarını arttırdığı gösterilmiştir(59). POLE gibi DNA polimerazlar, insan hücrelerinde DNA sentezi ve çoğaltılmasından sorumludur. POLE'nin eksonükleaz domain bölgesinin mutasyonları son zamanlarda melanom, akciğer karsinomu, kolorektal karsinom ve endometrial karsinomda bildirilmiştir ve tümör genomu boyunca yüksek sayıda genetik mutasyon ile ilişkilidir. Endometrium karsinomlarında, iki çalışma sırasıyla 167 ve 248 tümörün %8'inde

POLE eksonükleaz domain mutasyonlarını bildirmiştir. Her iki kohortta, POLE eksonükleaz mutasyonları yüksek dereceli (grade 3) endometrium karsinomlarında düşük dereceli (grade 1 veya 2) endometrium karsinomlarından daha yaygındır. Önceki çalışmalarda, yüksek dereceli endometrium karsinomlarındaki POLE eksonükleaz domain mutasyonlarının potansiyel bir prognostik rolü olduğunu göstermiştir. Yüksek dereceli histolojiye sahip fakat klinik seyri iyi olan bir alt grubun tanımlamasına yardımcı olabilir fakat bu konuda daha fazla çalışmaya gerek vardır(62). 2013 yılında, Tümör Kanseri Genom Atlası (TCGA) Araştırma Ağı, endometrium karsinomlarını, genomik profillerine göre dört ayrı grupta tanımladı; POLE ultramutasyonlu, MSI hipermutasyonlu, kopya sayısı düşük ve kopya sayısı yüksek. POLE ultramutasyonlu tümörler, POLE geninin eksonükleaz domain alanındaki mutasyonlarla karakterizedir. Çoğunlukla FIGO derece 3 endometrioid endometrium karsinomlarında görülür ve iyi prognoz ile ilişkilidir(63). POLE mutasyonlu birçok tümör yüksek derecelidir. Bu hasta gruplarına adjuvan tedavi sıklıkla uygulanır ve klinik seyrinin iyi olmasının tedaviye bağlı olup olmadığı açık değildir. POLE mutasyonu tayini ile hastaların kemoterapi ve radyoterapi gereksiniminin belirlenmesi, gereksiz tedavi alımı, tedavinin toksik yan etkilerinden korunmaları sağlanacaktır ve endometrium karsinomunda hasta yönetimini değiştirecektir(64).

2.7. MSI (Mikrosatellit instabilitesi)

Mikrosatellit bölgeleri, mono-, di- veya daha fazla nükleotid tekrarlarından oluşan genom boyunca tekrarlayan sekanslardır. DNA polimerazları verimli şekilde bağlanamadığından bu tekrarlar daha sık yanlış yazılır. Bu hataların tespitinden ve düzeltilmesinden MMR sistemi sorumludur(65). DNA yanlış eşleşme tamir enzimlerindeki fonksiyon kaybı, anormal DNA dizilerinin düzgün bir şekilde tespit edilememesi ve onarılamaması ile sonuçlanır ve mikrosatellit tekrarları olan genlerdeki mutasyonlara yol açar. Mikrosatellit instabilitesi (MSI) tüm endometrial kanserlerin yaklaşık %30'unda bulunur ve germline veya sporadik tümörlerle ilişkilidir(6). Lynch sendromu bu vakaların yaklaşık %25'ini oluşturur ve çoğunluğu MLH1 promotörünün hipermetilasyonunu veya MMR genlerinin

somatik mutasyonlarını içerir(66). Sistemdeki kusurlar, MMR genlerinden birindeki germline veya somatik mutasyonlar (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) veya bir promotör bölgesinin, en yaygın olarak MLH1'in metilasyonu yoluyla genetik veya epigenetik mekanizmalara ikincil olabilir(65).

Ailevi kanserler kavramı yeni değildir, ancak kalıtsal kanserleri teşhis etme ve müdahale etme olanağı eskiden bu yana önemli ölçüde iyileşmiştir. Lynch sendromu, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 olmak üzere DNA MMR genlerinde kusurlara neden olan otozomal dominant, kalıtsal bir kanser sendromudur(2).

Lynch sendromu geleneksel olarak ilk önce kolorektal kanser konusunda endişeler uyandırır da, veriler Lynch sendromu olan kadınların önemli bir yüzdesinin, ilk kanser teşhisi olarak endometrium kanseri ile ortaya çıkacağını gösteriyor. Şu anda, endometrial tümörün somatik olarak değerlendirilmesi, Lynch sendromu için hastaları değerlendirmenin yaygın bir yoludur. Bu test 2 yoldan biriyle gerçekleştirilir: PCR ile MSI ne bakılarak veya IHC ile MMR genlerinde kayıp var mı diye bakılarak. IHC analizinde en yaygın 4 MMR proteininden herhangi birinin ekspresyon kaybını değerlendirir: MutL homolog 1 (MLH1), MutS protein homologu 2 (MSH2), MutS protein homolog 6 (MSH6) ve PMS1 protein homologu 2 (PMS2). Bu proteinlerin herhangi birinin IHC'de ekspresyon kaybı, Lynch sendromuyla ilişkili genlerden birinde germline mutasyonu olasılığını öne sürer(67). MSI nin tanımlanması birinci derecede akrabalarda kalıtsal test uygulanarak tümöre yatkınlığın araştırılmasına katkı sağlayabilir(65).

TCGA tarafından sınıflandırılan MMR hipermutasyonlu alt grup, MSS endometrioid tümörlerinden yaklaşık 10 kat daha fazla mutasyon sıklığı ile karakterize edilir ve ARID1A, PIK3CA veya CTNNB1 mutasyonlarının birikimini göstermiştir. Tanımlanan MSI'nın çoğunda MLH1 promotör metilasyonu vardır ve bu tümörler sık KRAS ve PTEN mutasyonları gösterir(6).

MMR hipermutasyonlu endometrium karsinomlarında, POLE ultramutasyonlu endometrium karsinomlarında görüldüğü gibi tümör infiltrasyonlu lenfositlerde benzer bir artış görülür, ancak, daha yüksek histolojik dereceler, LVSI varlığı ve ileri yaş gibi negatif prognostik faktörler ve ileri evre (III / IV) ile ilişkilidir. MMR hipermutasyonlu endometrium karsinomları, çoğu hastada orta dereceli bir prognoza sahiptir(68).

2.8. P53

P53 geni, hücre döngüsünün düzenlemesi, DNA onarımı, spontan mutasyonların inhibisyonu, hücrel farklılaşma ve apoptozis gibi birçok önemli hücrel fonksiyonda görevlidir. Ayrıca normal p53'ün kanseri önlemede aktif bir rol oynadığı düşünülmektedir. İn vitro deneylerden ve insan tümörlerinin analizinden elde edilen kanıtlar, hücrel veya viral proteinler ile gen mutasyonu veya etkileşimi p53 proteini ile p53 fonksiyon kaybının, pek çok malign tümör tipinin gelişiminde rol oynadığını göstermiştir(69, 70). P53, insan kanserlerinde mutasyona en fazla uğrayan genlerden biridir. P53 proteini neoplastik transformasyonu, aralarında etkileşen üç mekanizmayla engeller: hücre siklusunun geçici olarak durmasının aktivasyonu, hücre siklusunun kalıcı olarak durmasının başlatılması veya apoptozun tetiklenmesi(15).

P53, insan kanserlerinde en yaygın mutasyona uğramış gendir ve değişiklikler, tüm insan tümörlerinin >%50'sinde bulunmuştur. Tümör baskılayıcı genler genel olarak frame shift veya nonsense mutasyonlar tarafından inaktive edilirken, insan tümörlerinde P53'ü etkileyen mutasyonların çoğu missense mutasyonlardır ve esas olarak proteinin DNA-bağlanma alanını etkiler. Mutant p53 proteinleri çoğunlukla tümör baskılayıcı fonksiyonlarını kaybeder ve baskın-negatif aktiviteler uygulayabilir, fakat aynı zamanda yeni onkojenik özellikler de kazanabilir(71).

P53 mutasyon durumu, endometrium karsinomlarında prognozu öngören en önemli faktörlerden biridir ve P53 mutasyonunun varlığı olumsuz sonuçla ilişkilendirilir. P53 mutasyon durumu, seröz ve endometrioid histotip arasındaki farka yardım etme, belirli bir histotip içindeki klinik seyri öngörme veya birkaç histotipte klinik seyri öngörme gibi farklı şekillerde kullanılabilir(72).

Dört spesifik endometrial karsinom alt grubu ilk olarak TCGA tarafından önerildi, daha sonra, transPORTEC grubu ve Vancouver grubu tarafından onaylandı. Bu çalışmaların tümü, POLE ultramutasyonlu, MMR hipermutasyonlu, kopya sayısı yüksek ve kopya sayısı düşük olmak üzere dört spesifik alt grubun ortaya çıkışını tanımlamıştır. Daha yeni kanıtlar, moleküler sınıflamanın, adjuvan tedaviden faydalanabilecek yüksek nüks riski olan kadınları belirlemede tek başına

standart risk faktörlerinden daha güçlü olduğunu göstermektedir. Ayrıca, meme, yumurtalık ve kolorektal kanserler ile benzerlikleri paylaşan endometrium kanserlerinin, benzer bir tedavi sürecinden faydalanabileceği düşünülmüştür(73, 74). Moleküler sınıflamanın tanı örneklerine, yani biyopsi ve küretaj materyellerine oldukça uyumlu olduğu ve böylece ameliyatın zamanlamasını ve kapsamını planlamak için kullanılabilecek bilgileri sağladığı gösterilmiştir(75).

Kopya sayısı yüksek moleküler alt gruptaki yüksek P53 mutasyonları göz önüne alındığında, P53'ün mutasyon durumunun analiz edilmesi, moleküler alt sınıfı tanımlamak için yeterli görünmektedir. P53 mutasyonları iki fonksiyonel sonuç ortaya çıkarır: kazanç ve fonksiyon kaybı. Fonksiyon kazancı, isimsiz mutasyonlardan kaynaklanır, çekirdeğin içinde nükleer p53 birikmesi, proteinin parçalanmasındaki bir başarısızlıktan kaynaklanır. Bu, İHK tarafından kolayca tanımlanabilen güçlü ve yaygın nükleer aşırı ekspresyona neden olur. Çok nadiren sitoplazmik birikim ve buna bağlı İHK da sitoplazmik boyanma görülür. Fonksiyon kaybı ise İHK da hiç boyanmama “null patern” olarak izlenir(76).

Kopya sayısı düşük moleküler alt grup, düşük mutasyon oranları gösteren, MSS, derece 1 ve derece 2 endometrioid karsinomların çoğundan oluşmaktadır(77). Genel olarak wild tip immünofenotip hot spot P53 mutasyonunun yokluğu, değişken bir boyama modeli ile karakterize edilir; dokuların çoğu İHK da çekirdeğin <% 50'sinde zayıf ve sporadik boyanma gösterir. Moleküler olarak bu grup kopya sayısı düşük olarak adlandırılır(78).

3.MATERYAL VE METOT

3.1.Etik Kurul

Bu çalışmanın yapılmasına, bilimsel ve etik açıdan sakınca olmadığına 11.04.2018 tarih ve 268 nolu karar ile Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nca karar verilmiştir.

3.2.Hasta seçimi

Çalışmamızda 2005-2017 yılları arasında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde grade 3 endometrium kanseri tanısı ile histerektomi olmuş 60 hasta değerlendirildi. Hasta bilgileri, tanı yaşı, tanı tarihi, tümör histolojik tipi, grade, evre, tümör boyutu, tümör lokalizasyonu, myometrium invazyonu, lenf nodu durumu, peritoneal sitoloji durumu, servikal yayılım olup olmadığı, adneksial yayılım durumu, ölüm tarihi hastane MEDİ-PİS ve MİA-MED sistemi üzerinden tarandı. Ayrıca Akdeniz üniversitesi tıp fakültesi hastanesi kadın hastalıkları ve doğum anabilimdalındaki hasta dosyaları incelendi. Hastaların parafin blokları ve preparatları Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı arşivinden çıkarıldı. Her hasta için yeterli tümör hücresi içeren 2' şer adet blok ve preperat seçildi. Tümör dokusu yeterli olmayan ve arşivde bloğu olmayan 4 hasta çalışmadan çıkarıldı. Çalışma 56 hasta ile yapıldı.

3.3.İmmunohistokimyasal inceleme

Çalışmaya alınan hastaların parafin bloklarının 4 mikronluk kesitleri hematoksilin-eozin ile boyandı. Patoloji Anabilim Dalı mikroskopları (Olimpus) ile üç patolog tarafından incelendi ve en uygun tümör alanları cama yazar suya dayanıklı kalem ile işaretlendi. İşaretlenen preparatların ait oldukları bloklardan İHK'sal değerlendirme için Akdeniz Üniversitesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'na ait mikrotom cihazları kullanılarak her iki hastanın kesitleri bir pozitif şarjlı lama alınarak 4 mikronluk kesitler alındı. Alınan kesitler 50°C'de bir gece boyunca

bekletildi. Alınan kesitlerde immünohistokimyasal MLH1, MSH2, PMS2, MSH6, P53 antikorları tam otomatik Daco boyama makinesinde standart prosedür kullanılarak yapıldı. Makinede uygulanan immunohistokimya prosedürü :

1. Her bir olguya ait uygun parafin bloktan 5 mikronluk kesitler pozitif şarzlı lama alınır. Alınan kesitler bir gece 50 oC de bekletilir.

2. İki seri ksilolde 10' ar dakika, %100 alkolde 5 dakika, %85' lik alkolde 5 dakika ve %75' lik alkolde 5 dakika bekletilerek deparafinizasyon işlemi yapılır.

3. Kesitler, distile suda yıkanır.

4. Kesitler, 90 oC' ye kadar ısıtılmış uygun antijen retrieval solüsyonda önce 20 dakika sonra iki defa 5' er dakika süre ile kaynatılır.

5. Kaynatma işleminden sonra kesitler, 30 dakika soğutulmaya bırakılır.

6. Distile su ve PBS solüsyonunda yıkama yapılır.

7. H₂O₂ (Hidrojen peroksit) solüsyonunda 10 dakika bekletilerek endojen peroksit blokajı yapılır.

8. Süre sonunda distile su ve PBS solüsyonu ile yıkama yapılır.

9. MLH1(G168-15,thermo) 1/25, Anti MSH2(epr210172,abcam) 1/1000, PMS2(163C1251,thermo) 1/300, MSH6(3E1,mab,cell signaling) 1/200, P53 (Pab240,thermo) 1/200 oranlarında dilüe edilip spesifik primer antikorlar, kesitler üzerine damlatılır. Nemli ortamda 1 saat inkübasyon yapılır.

10. Süre sonunda kesitler üzerine sekonder antibodi damlatılır ve 10 dakika bekletilir.

11. Süre sonunda distile su ve PBS ile yıkama yapılır.

12. Kesitler üzerine HRP (Streptavidin Peroksidaz) damlatılarak 10 dakika bekletilir.

13. Süre sonunda distile su ve PBS ile yıkama yapılır.

14. Kesitler üzerine DAB (Diamino Benzidine Solüsyonu) solüsyonu damlatılarak 2 dakika bekletilir.

15. Süre sonunda distile su ve PBS ile yıkama yapılır.

16. Kesitler şale içine alınarak Hematoksilen solüsyonunda 2 dakika bekletilir.

17. Süre sonunda çeşme suyunda yıkama yapılır.

18. %80 alkolde 5 dakika, %96 alkolde 5 dakika, %100 alkolde 5 dakika ve iki seri ksilolde 5' er dakika bekletilerek dehidratasyon işlemi yapılır.

19.Kesitler entellan ile kapatılarak ışık mikroskopunda analiz edilerek her bir antikorun skorlanması yapılır. Her vaka için antikorların değerlendirilmesi yapıldı. MLH1, MSH2, PMS2, MSH6 antikorları için herhangi birinde boyanma kaybı varlığında olgu MMR hipermutasyonlu gruba alındı. P53 hiç boyanmamış veya %50 üzerinde tümör hücresinde güçlü pozitif (+2) ise p53 mutant oldu ve kopya sayısı yüksek gruba dahil edildi. p53 +1 pozitif ise yani %50 nin altında tümör hücresinde boyanma var ise p53 mutant olmayan tip oldu(wild tip), kopya sayısı düşük gruba dahil edildi.

3.4.Real time PCR

Çalışmaya alınan vakalara FFPE DNA izolasyon kiti kullanılarak DNA izolasyonu yapıldı. P286R/S, V411L, F367S/C/L, P436R, A456P, L424P, E396Q, mutasyonlarına spesifik primer ve prob dizileri kullanılarak Real-time PCR tekniği ile hot-spot mutasyonlar açısından tarama yapıldı. Bu mutasyonlardan herhangi birinin varlığında olgu POLE ultramutasyonlu gruba dahil edildi.

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

- 1.FFPE Dokusundan DNA izolasyonuna spesifik kit (Exegene™ Cell SV Mini Kit; GeneAll) kullanılarak kit prosedürüne göre DNA izolasyon işlemleri yapıldı.
- 2.Belirlenen tümör bloklarından 6-7 mikron kalınlığında 6 lam kesit alındı. Tümör alanları lam üzerinden kazındı.
- 3.Deparafinizasyon: Kazınan alanlar steril 2 ml.lik santrifüj tüpüne konuldu. Üzerine 1 ml. ksilol eklendi.Kısa vorteks yapıldıktan sonra 13000 rpm e ayarlı mikrosantrifüjde 5 dakika santrifüj yapıldı. Süpernant atıldı. Bu işlem bir kez daha tekrarlandı.Santrifüj sonunda süpernatant atıldı.Son basamak olarak, santrifüj tüpüne 1 ml. Absolü alkol konuldu ve 13000 rpm de 5 dakika santrifüj yapıldı. Süpernanat atıldı.Alkolün uçması için, tüplerin ağzı açık bir şekilde oda ısısında 15 dakika kurumaya bırakıldı.

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

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

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

7.Nanodrop kullanılarak DNA miktarı ve kalitesi ölçüldü.

8.Elde edilen DNA' lar, -20oC de saklandı.

3.4.2.Real Time PCR

Hedef Diziler:

GACCTGACCCTGTGGTTTTGGCATTTGACATTGAGACGACCAAAGTGC
CCCTCAAGTTTC

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

TCATACCAACAGGGAGATTGTTTCAGAAGATATTGAAGATTTTGAGT
TCACCCCAAGC

CAGAATATGAAGGCCCTTTTGTGTCTTCAATGAACCCGATGAGGCTC
ATCTGATCCAAA
GGTGGTTTGAACACGTCCAGGAGACCAAACCCACCATCATGGTCACCT
ACAACGGGGACT
TT[T/C][T/C/G]TGACTGGCCATTTGTGGAGGCCCGGGCAGCAGTCCACG
GTCTGAGCATGCAGCAGG F367S/C/L
AGATAGGCTTCCAGAAGGACAGCCAGGGG[G/C]AGTACAAGGCGCCCC
AGTGCATCCACATGG E396Q
ACTGCCTCAGGTGG[G/T]TGAAGAGGGACAGTTACCTTCCTGTGGGCA
GTCATAATC[T/C]CAAGG V411L-L424P
CGGCCGCCAAGGCCAAGCTAGGCTATGATC[C/G]CGTGGAGCTAGACC
CGGAGGACATGTGCC P436R
GGATGGCCACGGAGCAGCCCCAGACTCTG[G/C]CCACGTATTCTGTGTC
AGATGCTGTGCGCCA A456P
CTTACTACCTGTACATGAAGTACGTCCACCCATTCATCTTTGCTCTGTG
CACCATTATTC-485

Allel spesifik Realtime PCR Prensi;

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

Her bir mutasyon için ayrı ayrı olmak üzere aşağıdaki PCR kurulumu ile reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir.

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

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

50ng-----Örnek DNA sı

Toplam PCR Hacmi:20uL

Reaksiyonlar CFX96 (Biorad-ABD) Realtime PCR cihazında aşağıdaki koşullarda çalışılmış ve analiz edilmiştir.

95C----15dk

95C----15sn

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

Allel Spesifik Realtime PCR Primerleri:

P286Rfor: ATAATCTGGTCTGTCTCAGCATCGC

P286Rrev: TTTGGCATTGACATTGAG

P286Sfor: CCAAAGTGGCCCTCAAGTTTAT

P286Srev:CCATCGATCATGTAGGAAAT

F367Sfor: ACCTACAACGGGGACTTAC

F367Srev: TCAAATGCTGCCCAGTTACTCA

F367Cfor: CCTACAACGGGGACTTTGC

F367Crev: TCAAATGCTGCCCAGTTACTCA

F367Lfor: ACCTACAACGGGGACTTTCG

F367Lrev: TCAAATGCTGCCCAGTTACTCA

E369Qfor: CAGAAGGACAGCCAGGGAC

E369Qrev: GAGGCAGTCCATGTGGAT

V411Lfor: GAAGGTAAGTGTCCCTCTTCGA

V411Lrev: TGTTAGAATCATCCTGGCTTCT

L424Pfor: CTCCTGTGGGCAGTCATAATAC

L424Prev: TAGCTCCACGGGATCATAG

P436Rfor: CCGGGTCTAGCTCCACAC

P436Rrev: TGAAGAGGGACAGTTACCTT

A456Pfor: GTTCTCTCCTCAGACTCTAC

A456Prev: CAGGTAGTAAGTGGCGACAG

3.5.İstatistiksel Analiz

Tanımlayıcı istatistikler n(%) ve ortalama±standart sapma (SS) ve medyan(minimum-maksimum) değerleri ile sunulmuştur. Kategorik değişkenler arasındaki ilişkilerin analizinde Pearson ki-kare testi kullanılmıştır. Normallik varsayımının analizinde Shapiro Wilks testi kullanılmıştır. Çalışma gruplarının ölçümlerinin parametrik olmayan karşılaştırmasında Kruskal Wallis testi, anlamlı çıkan durumlar için post-hoc test olarak Bonferroni-Dunn testi kullanılmıştır. Sağkalım analizlerinde Kaplan-Meier analizi kullanılırken, gruplar arasında sağkalım oranları bakımından farklılık olup olmadığına Log-Rank testi ile bakılmıştır. Tek değişkenli analizde istatistiksel olarak anlamlı çıkan çalışma parametrelerinin genel sağkalım üzerine birbirinden bağımsız olarak etkilerinin incelenmesinde çok değişkenli Cox regresyon analizi kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar risk oranları (Hazard ratio (HR)) ve %95'lik güven aralığı ile sunulmuştur. Çalışmada elde edilen veriler değerlendirilirken, istatistiksel analizler SPSS 23.0 paket programı ile yapılmıştır. 0,05'den küçük p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Çalışmamızda istatistikçi desteği alınmıştır.

4.BULGULAR

Bu çalışmada, yüksek dereceli endometrium karsinomu olgularını içerecek bir hasta popülasyonunda moleküler ve immunohistokimyasal yöntemlerle endometrium karsinomunu yeniden sınıflamak ve prognozu daha doğru bir şekilde saptamak amacıyla hastalar POLE ultramutasyonlu grup, MMR hipermutasyonlu grup, kopya sayısı yüksek grup (P53 ABN) ve kopya sayısı düşük grup (P53 WT) olmak üzere 4 ana grupta sınıflandırılmıştır. Bu bölümde çalışmaya dahil edilen hastalara ait tanımlayıcı istatistikler, çalışma gruplarına göre hastaların genel klinik özelliklerinin karşılaştırılması ve hastaların genel klinik özelliklerine göre elde edilen sağkalım analizi sonuçlarına değinilmiştir.

4.1. Hastaların klinikopatolojik özellikleri

Çalışmaya toplam 56 hasta dahil edilmiştir. Tablo 1’de hastaların genel klinik özelliklerine ait tanımlayıcı istatistikler sunulmuştur. Hastaların yaş ortalaması $62,9 \pm 10,4$ yıl olarak hesaplanmış, en küçüğünün 27 ve en büyüğünün ise 84 yaşında olduğu görülmüştür. Hastaların çoğunluğunun %62,5 ile 60 yaş ve üzeridir. Hastalardan 36 (%64,3)’sı endometrioid, 13 (%23,2)’ü seröz ve 7 (%12,5)’si mikst (endometrioid+seröz) histolojik alt tipte gözlenmiştir. Hastaların ortalama tümör boyutu $4,4 \pm 2,5$ cm olarak bulunurken, en küçük tümör boyutunun 1 cm ve en büyük tümör boyutunun ise 11 cm olduğu saptanmıştır. Hastaların %7,4’ü 2 cm’den küçük tümör boyutuna sahipken, %92,6 ile büyük bölümünün tümör boyutunun 2 cm’den büyük olduğu görülmüştür. Myometrium invazyonu 19 (%35,2) hastanın $\frac{1}{2}$ ’den az iken, 35 (%64,8) hastanın $\frac{1}{2}$ ’den fazladır. Yirmiiki hastada (%39,3) LVİ, 16 (%28,6) hastada servikal invazyon, 9 (%16,1) hastada adneksial yayılım ve 8 (%14,3) hastada omentum tutulumu görülmüştür. Sitoloji pozitifliği 5 (%8,9) hastada gözlenirken, 10 (%18,2) hastada paraaortik lenf nodu ve 15 (%27,3) hastada pelvik lenf nodu pozitifliği saptanmıştır.

Tablo 1- Hastaların genel klinik özellikleri

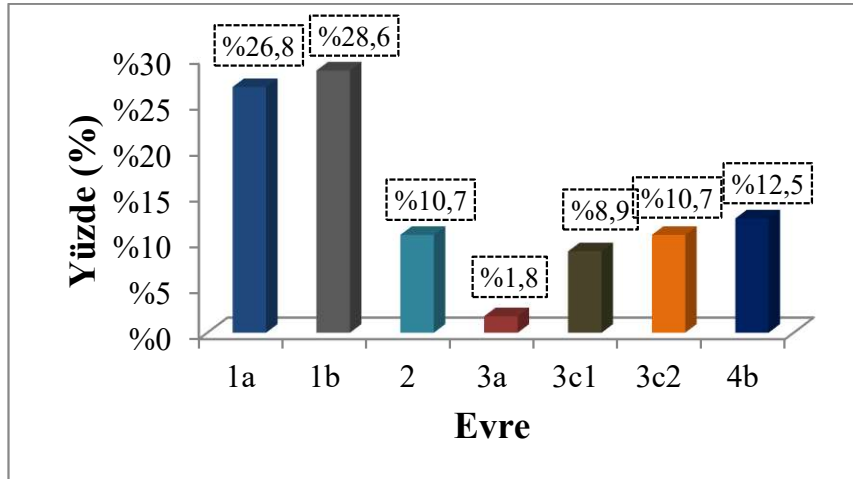
	N	%
Yaş, $\bar{X} \pm SS$ (min-maks)	62,9 $\pm$ 10,4	27-84
<60 yıl	21	37,5
$\geq$ 60 yıl	35	62,5
Histolojik tip		
Endometrioid	36	64,3
Seröz	13	23,2
Endometrioid+Seröz	7	12,5
Tümör boyutu (cm), $\bar{X} \pm SS$ (min-maks)	4,4 $\pm$ 2,5	1-11
<2 cm	4	7,4
$\geq$ 2 cm	50	92,6
Miyometrium invazyonu		
1/2'den az	19	35,2
1/2'den fazla	35	64,8
LVI		
Yok	34	60,7
Var	22	39,3
Servikal invazyon		
Yok	40	71,4
Var	16	28,6
Adneksial yayılım		
Yok	47	83,9
Var	9	16,1
Omentum tutulumu		
Yok	48	85,7
Var	8	14,3
Sitoloji		
Negatif	51	91,1
Pozitif	5	8,9
Paraaortik lenf nodu		
Negatif	45	81,8
Pozitif	10	18,2
Pelvik lenf nodu		
Negatif	40	72,7
Pozitif	15	27,3

Çalışmaya dahil edilen hastaların klinik evrelerine ait frekans ve yüzdelere bakıldığında (Tablo 2), hastaların %26,8'inin evre 1A, %28,6'sının evre 1B, %10,7'sinin evre 2, %1,8'inin evre 3A, %8,9'unun evre 3C1, %10,7'sinin evre 3C2 ve %12,5'inin evre 4B olduğu tespit edilmiştir (Şekil 1).

Tablo 2- Hastaların klinik evrelerinin frekans ve yüzdeleri

Evre	n	%
1A	15	26,8
1B	16	28,6
2	6	10,7
3A	1	1,8
3C1	5	8,9
3C2	6	10,7
4B	7	12,5

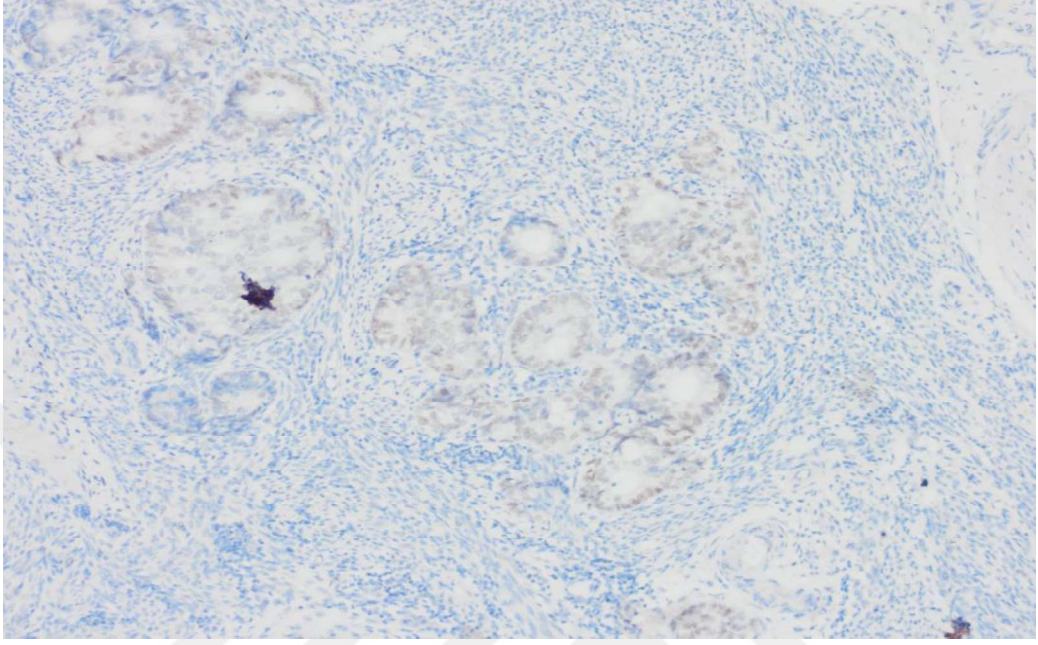
Şekil 3-Hastaların evrelerinin dağılımı



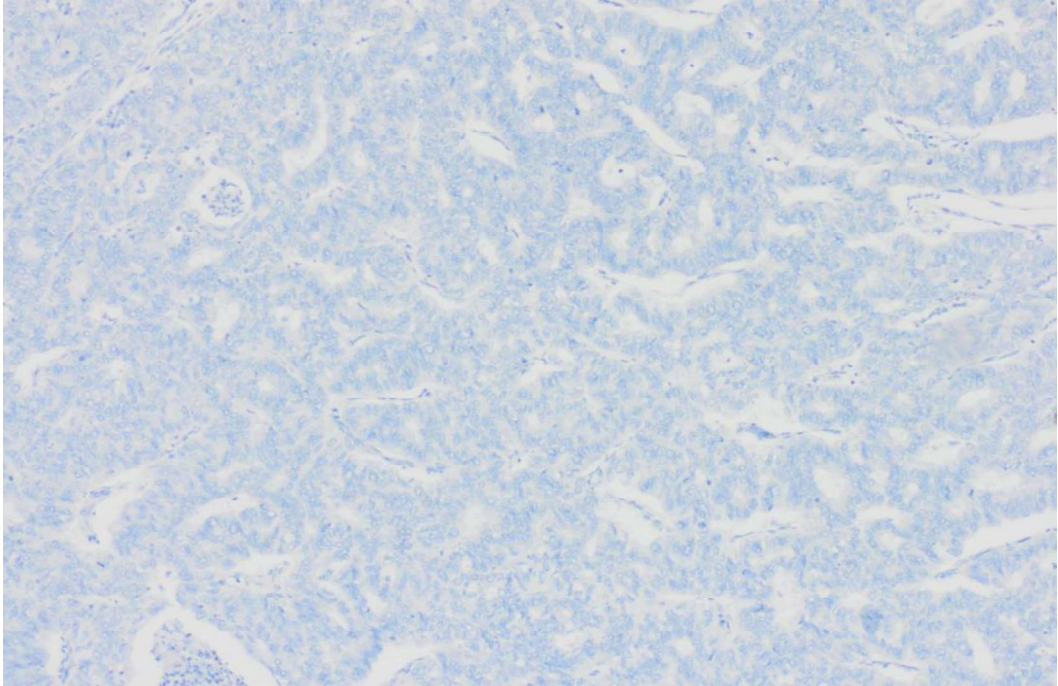
4.2.MMR Hipermutasyonlu Grup

Çalışmaya alınan 56 hastanın parafin bloklarından hazırlanan kesitlere immunohistokimyasal yöntemle MLH1, MSH2, PMS2, MSH6 antikoru

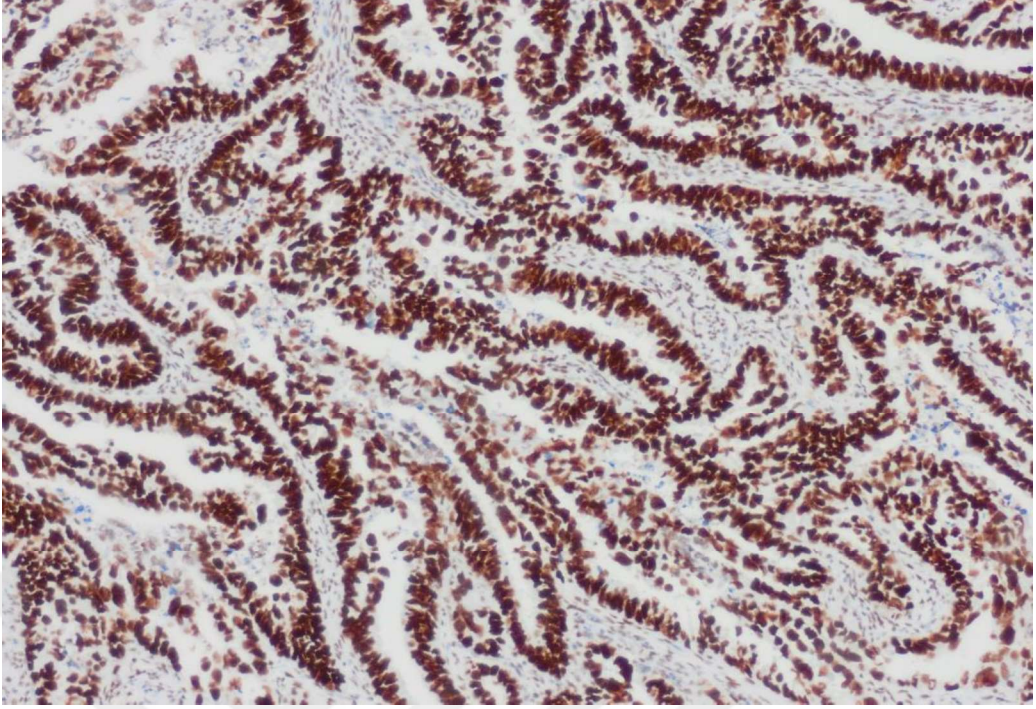
uygulandı. MLH1, MSH2, PMS2, MSH6 antikorları için herhangi birinde boyanma kaybı varlığında olgu MMR hipermutasyonlu gruba alındı.



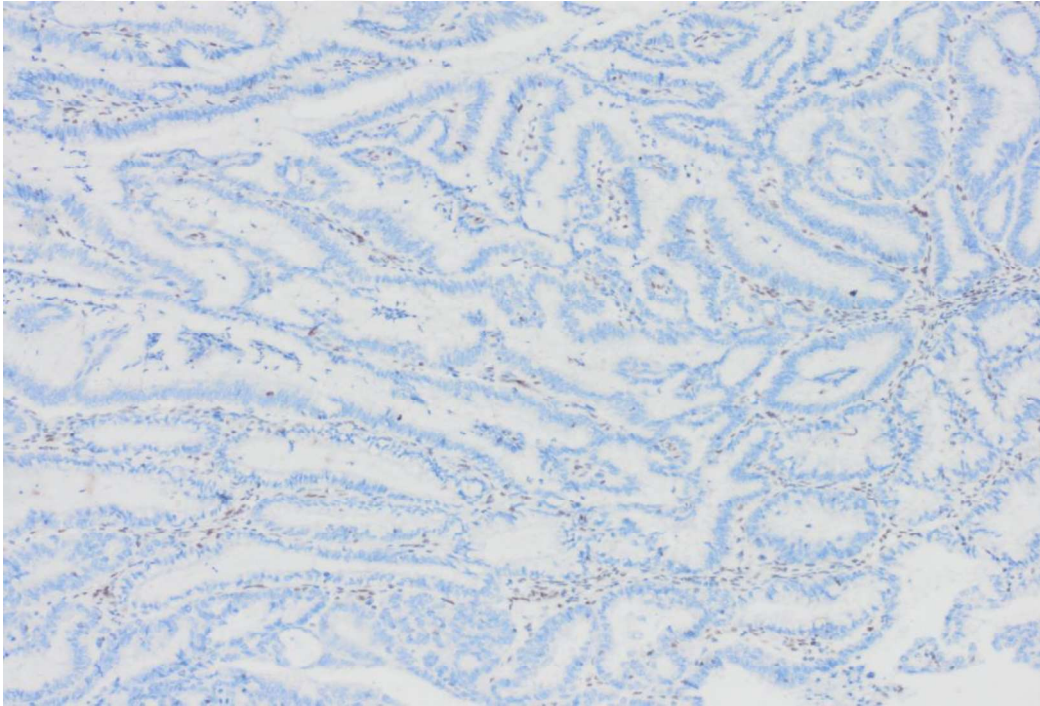
Şekil 4. Tümör hücrelerinde nükleer MLH1 boyanması (X100)



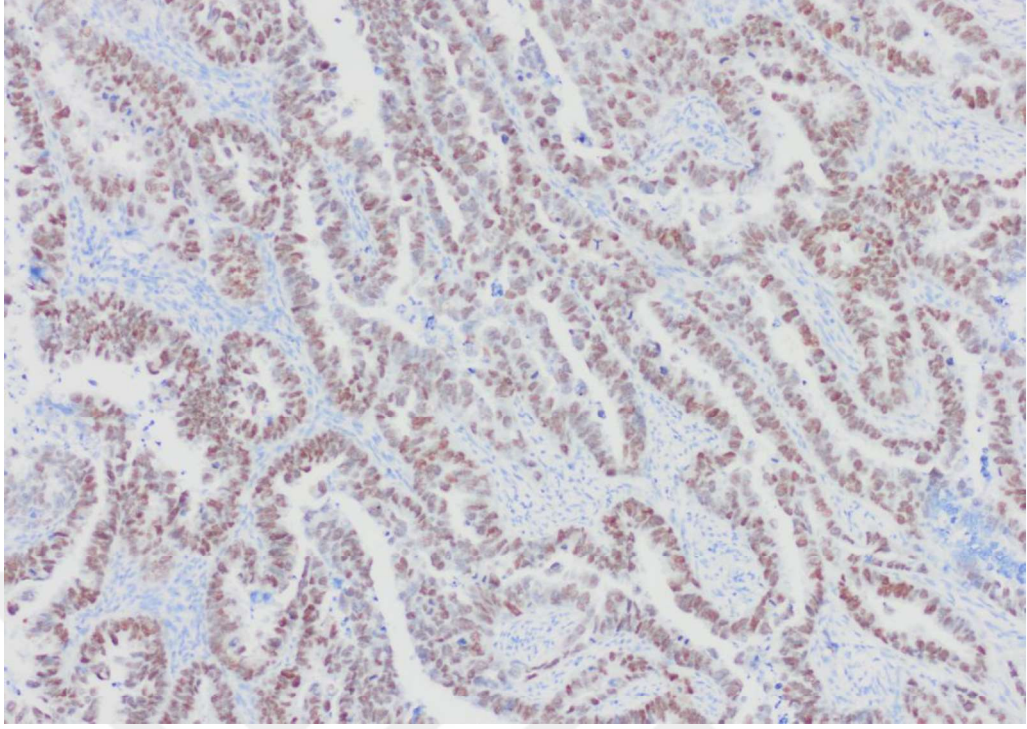
Şekil 5. Tümör hücrelerinde MLH1 nükleer boyanma kaybı (x100)



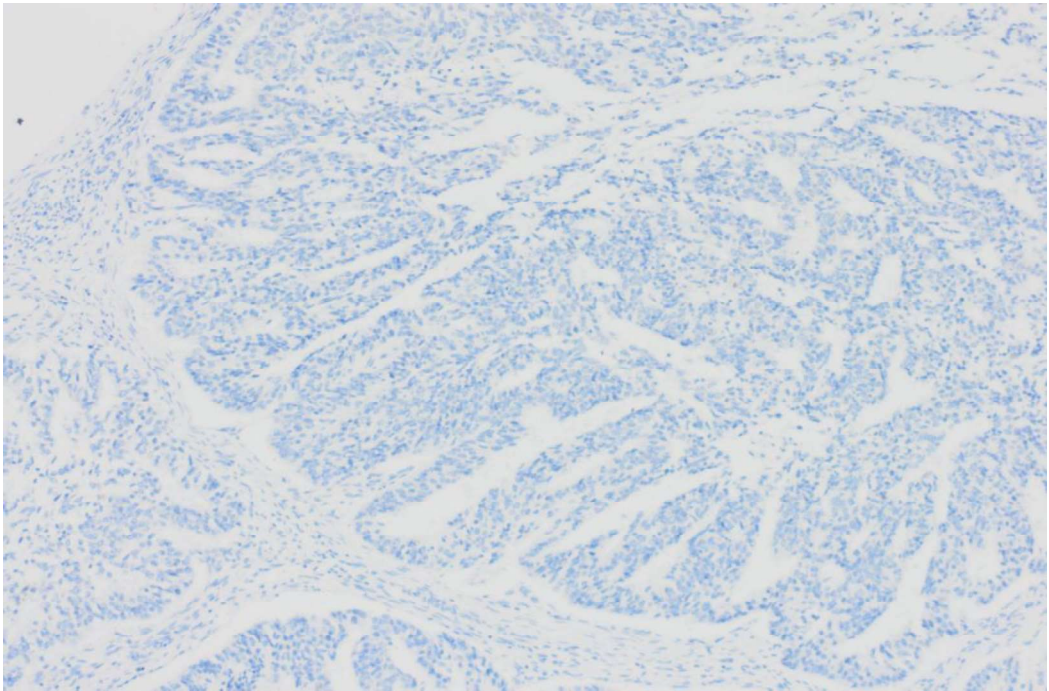
Şekil 6. Tümör hücrelerinde nükleer MSH2 boyanması (x100)



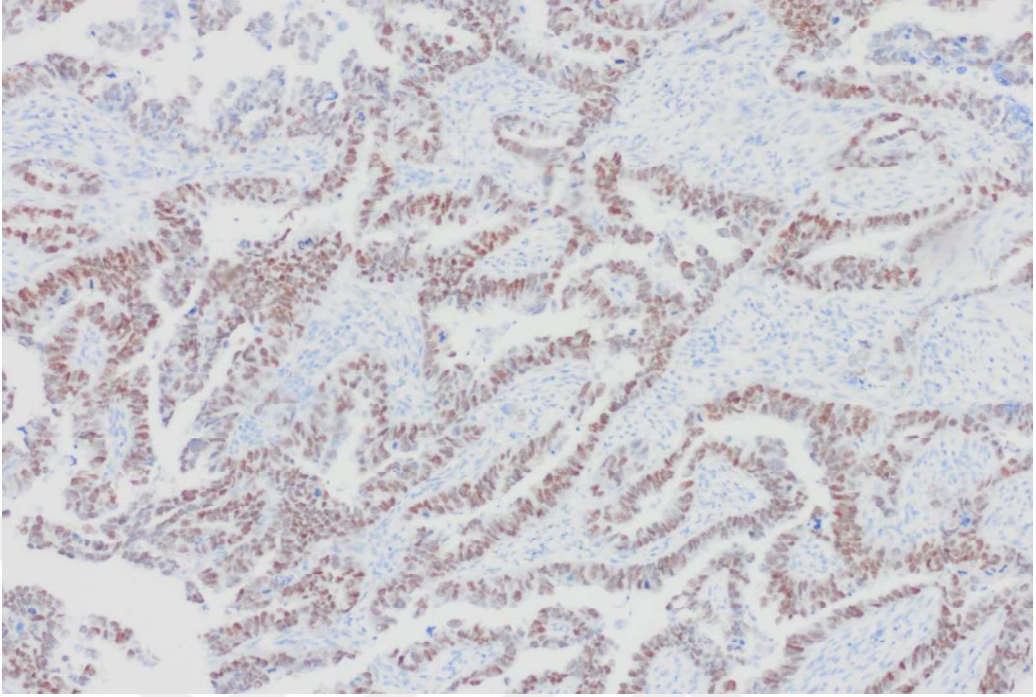
Şekil 7. Tümör hücrelerinde MSH2 nükleer boyanma kaybı (x100)



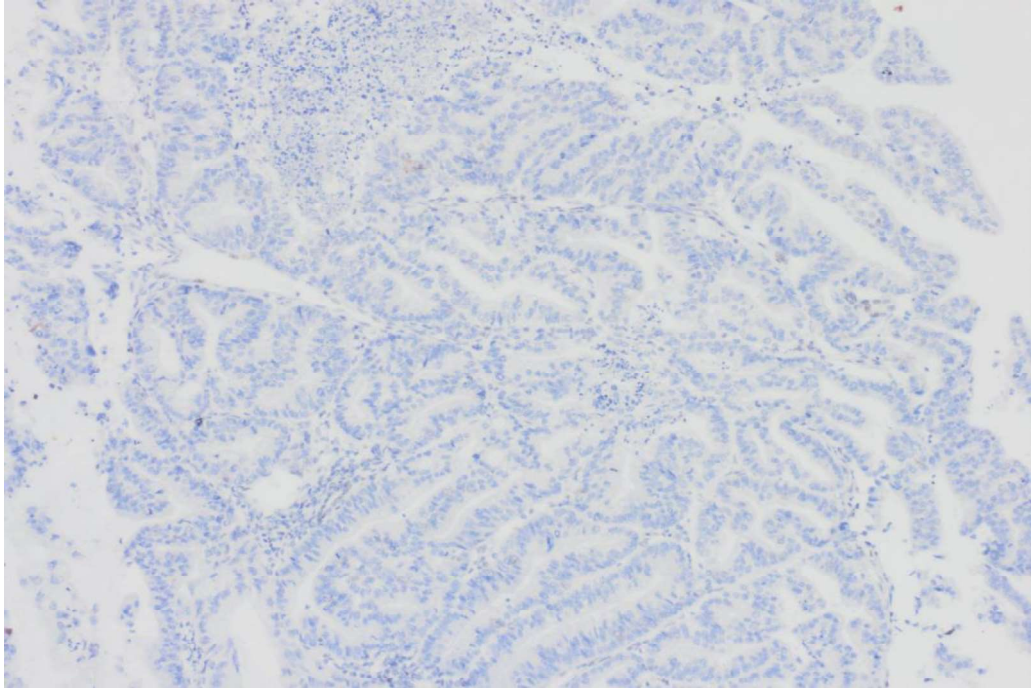
Şekil 8. Tümör hücrelerinde nükleer MSH6 boyanması (x100)



Şekil 9. Tümör hücrelerinde nükleer MSH6 boyanma kaybı (x100)



Şekil 10. Tümör hücrelerinde nükleer PMS2 boyanması (x100)

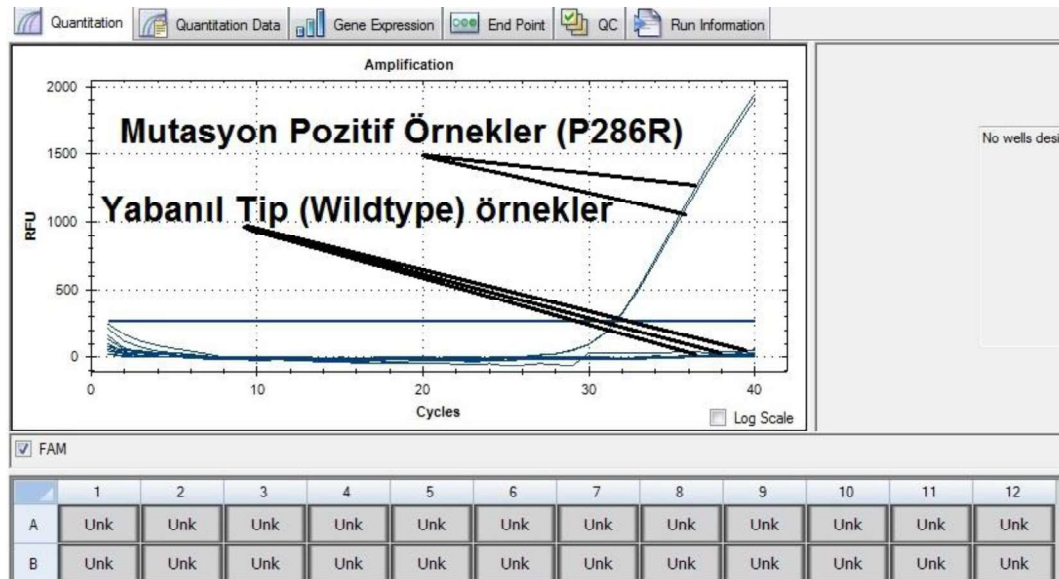


Şekil 11. Tümör hücrelerinde nükleer PMS2 boyanma kaybı (x100)

Çalışmaya alınan 56 hastanın 17 (%30.4)'si MMR hipermutasyonlu gruba dahil edildi. Bu hastaların 4 (%23,5)'ü 60 yaş altında , 13 (%76,5)'ü 60 yaş üstündedir. Hastaların 14 (%82,4)'ü endometrioid alt tipte, 3 (%17,6)'ü mikst(endometrioid+seröz) tipte iken seröz alt tipte hasta yoktur. Tümör boyutu bütün hastalarda 2 cm ve üzerindedir. Myometrium invazyonu 4 (%25) hastada $\frac{1}{2}$ den az iken, 12 (%75) hastanın myometrium invazyonu $\frac{1}{2}$ den fazladır. Hastalardan 5 (%29,4)'inde LVİ , 6 (%35,3) hastada servikal invazyon, 2 (%11,8) hastada adneksial yayılım, 1 (%5,9) hastada omentum tutulumu, 1 (%5,9) hastada pozitif peritoneal sitoloji, 1 (%5,9) hastada pelvik lenf nodu pozitifliği, 1 (%5,9) hastada paraaortik lenf nodu pozitifliği görülmüştür. Hastaların 14 (%82,4)'ü evre 1 ve 2 , 3 (%17,6)'ü evre 3 ve 4 olarak saptanmıştır.

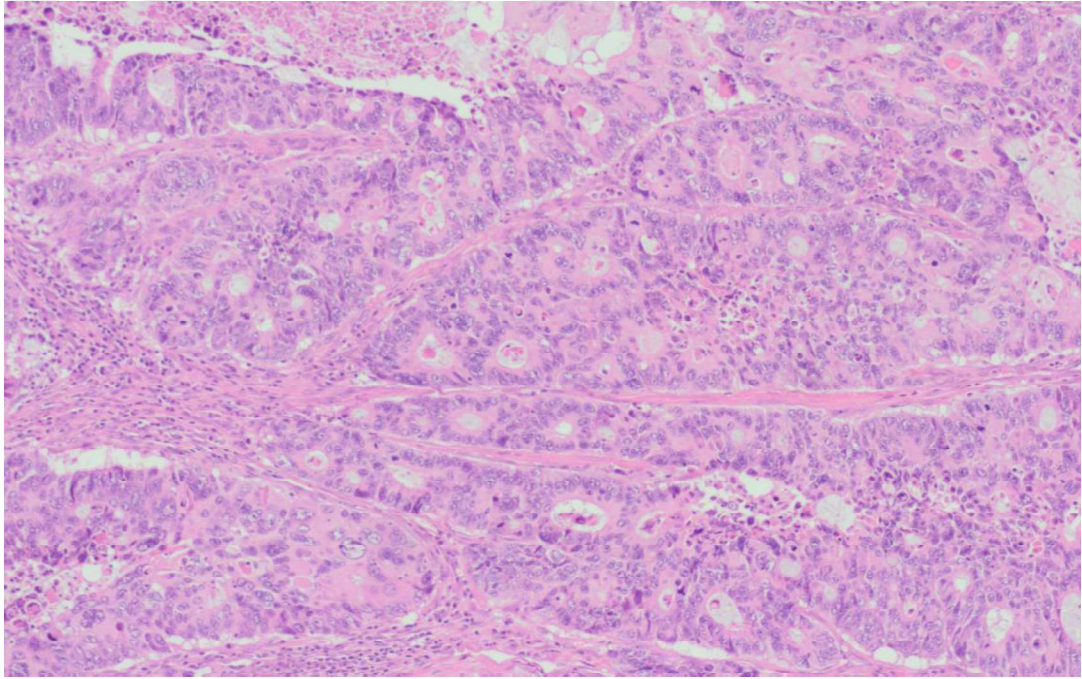
4.3.POLE Ultramutasyonlu Grup

MMR mutasyonları olmayan 39 hastanın, real time pcr ile hot spot mutasyonlara bakılarak POLE mutasyon durumu saptandı. Buna göre 8 (%14,3) hasta POLE ultramutasyonlu gruba dahil edildi. Sekiz hastanın 2 (%25)'sinde P286R, 1 (%12,5)'inde F367L, 3 (%37,5)'ünde E369Q, 2 (%25)'sinde V411L hot spot mutasyonları tespit edildi.



Şekil 12. Real time PCR da P286R hot spot mutasyonu gösteren hastalar

Hastalardan 3 (37,5)'ü 60 yaş altı, 5 (%62,5)'i 60 yaş üzerindedir. Hastaların 5 (%62,5)'i endometrioid alt tipte, 1 (%12,5)'i seröz alt tipte, 2 (%25)'si mikst tipte (endometrioid+seröz) izlendi. Tümör boyutu 1 (%12,5) hastada 2 cm altında, 7 (%87,5) hastada da 2 cm ve üzerindedir. Myometrium invazyonu 3 (%37,5) hastada $\frac{1}{2}$ den az, 5 (%62,5) hastada $\frac{1}{2}$ den fazladır. Hastaların 2 (%25)'sinde LVI, 2 (%25)'sinde servikal invazyon, 2 (%25)'sinde adneksial yayılım, 2 (%25)'sinde omentum tutulumu, 3 (%37,5)'ünde paraaortik lenf nodu pozitifliği, 5 (%62,5)'inde pelvik lenf nodu pozitifliği izlenmiştir. Pozitif peritoneal sitoloji hastaların hiçbirinde görülmemiştir. Hastaların 3 (%37,5)'ü evre 1 ve 2, 5 (%62,5)'i evre 3 ve 4 olarak saptanmıştır.

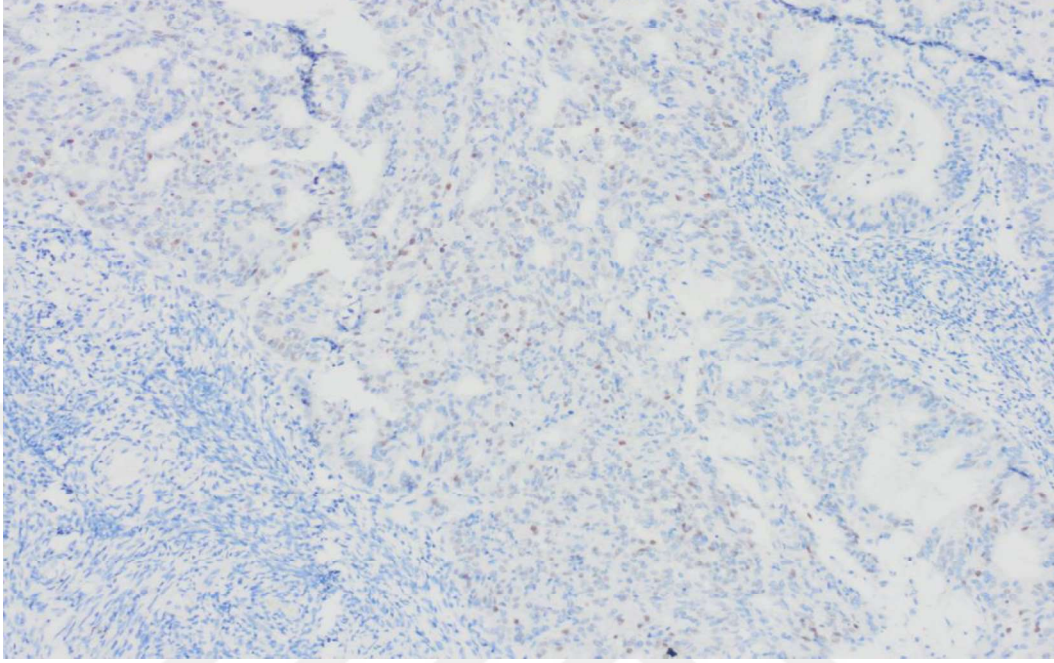


Şekil 13. POLE mutasyonu saptanan grade 3 endometrioid endometrium karsinomu (HEX100)

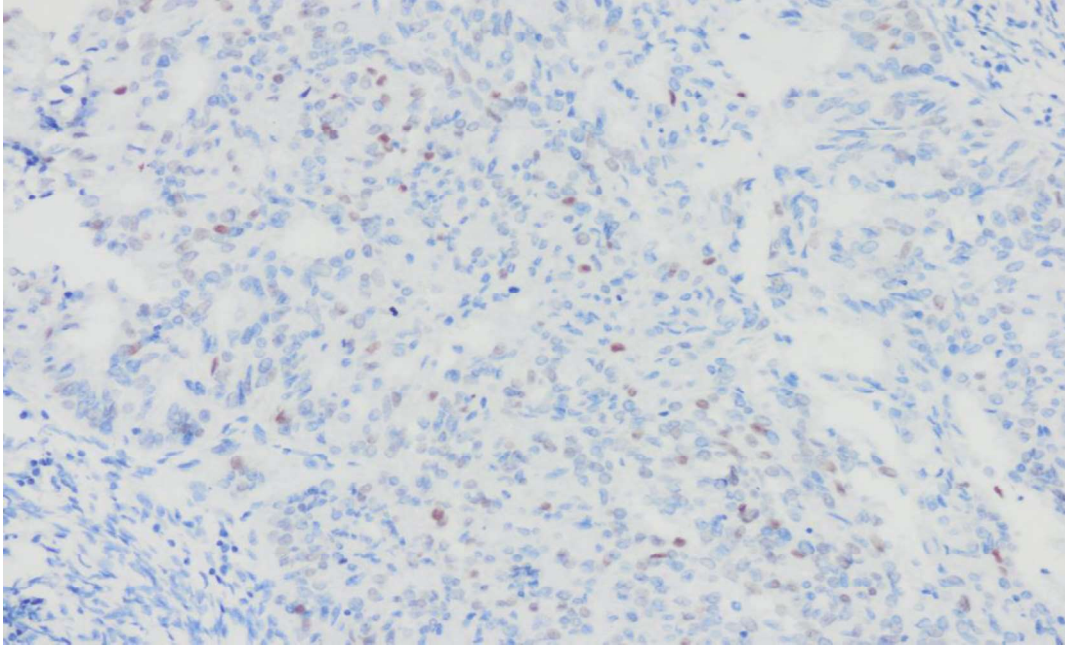
4.4.Kopya Sayısı Düşük Grup

POLE mutasyonu saptanmayan 31 hastaya immunohistokimyasal olarak p53 bakılmıştır. P53 +1 pozitif ise yani %50 nin altında tümör hücresinde boyanma

var ise p53 mutant olmayan tip (wild tip) olup, bu şekilde kopya sayısı düşük gruba 16 (%28,6) hasta dahil edildi.



Şekil 14. Tümör hücrelerinde P53 wild tip boyanma (x100)

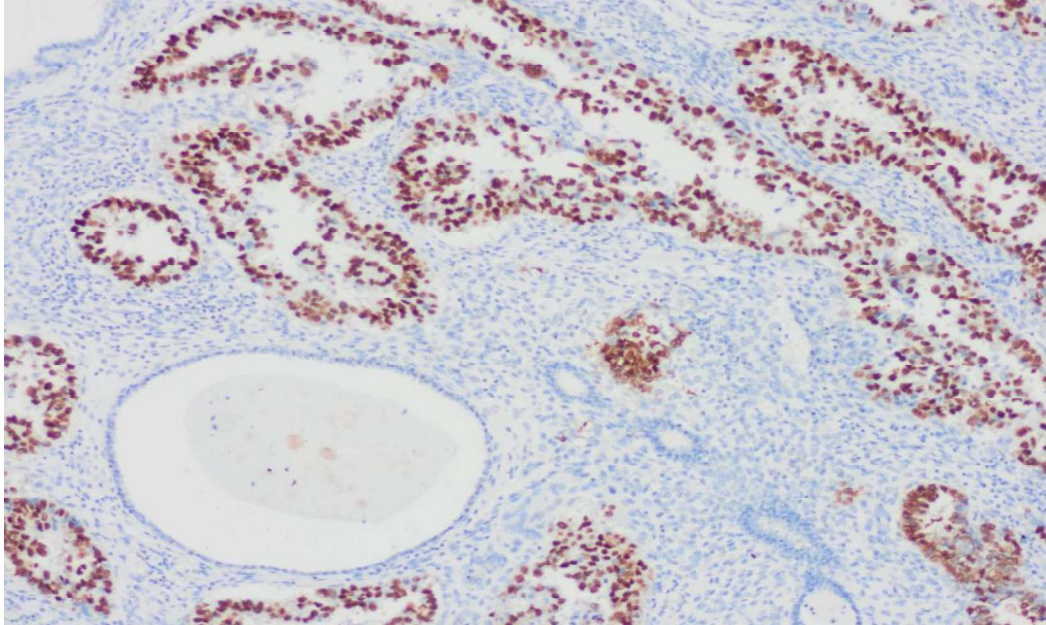


Şekil 15. Tümör hücrelerinde P53 wild tip boyanma (x200)

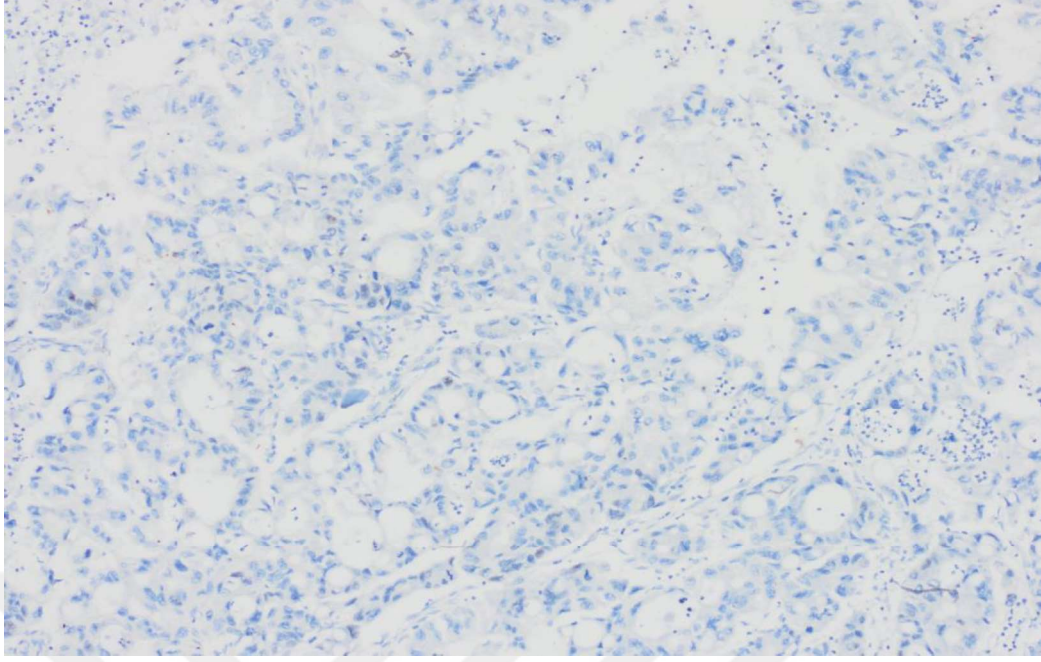
Hastalardan 11 (%68,8)'i 60 yaş altı, 5 (%31,3)'i 60 yaş üzerindedir. Histolojik olarak 14 (%82,4) hasta endometrioid alt tipte, 1 (%6,3) hasta seröz alt tipte, 1 (%6,3) hasta mikst (endometrioid+seröz) tipte izlenmiştir. Tümör boyutu 1 (%6,7) hastada 2 cm altında, 14 (%93,3) hastada 2 cm ve üzerindedir. Myometrium invazyonu 5 (%33,3) hastada ½ den az, 10 (%66,7) hastada ½ den fazladır. Hastalardan 9 (%56,3)'unda LVI, 6 (%37,5)'sında servikal invazyon, 1 (%6,3)'inde adneksial yayılım, 1 (%6,3)'inde pozitif peritoneal sitoloji, 3 (%18,8)'ünde paraaortik lenf nodu pozitifliği, 6 (%37,5)'sında pelvik lenf nodu pozitifliği izlendi. Hiçbir hastada omentum tutulumu görülmedi. Hastaların 9 (%56,3)'u evre 1 ve 2, 7 (%43,7)'si evre 3 ve 4 olarak saptanmıştır.

4.5.Kopya Sayısı Yüksek Grup

POLE mutasyonu saptanmayan 31 hastaya immunohistokimyasal olarak p53 bakılmıştır. P53 hiç boyanmamış veya %50 üzerinde tümör hücresinde güçlü pozitif (+2) ise p53 mutant olup 15 (%26,8) hasta kopya sayısı yüksek gruba dahil edilmiştir.



Şekil 16. Tümör hücrelerinde %50 ve üzerinde güçlü nükleer P53 boyanması (P53 mutant tip) (X100)



Şekil 17. Tümör hücrelerinde P53 ün hiç boyanmaması (P53 mutant tip) (x100)

Hastaların 3 (%20)'ü 60 yaş altı , 12 (%80'si 60 yaş üzerindedir. Histolojik olarak 3 (%20) hasta endometrioid alt tipte, 11 (%73,3) hasta seröz alt tipte, 1 (%6,7) hasta mikst (endometrioid+seröz) tiptedir. Tümör boyutu 2 (%13,3) hastanın 2 cm altında, 13 (%86,7) hastanın 2 cm ve üzerindedir. Myometrium invazyonu 7 (%46,7) hastanın ½ den az, 8 (%53,3) hastanın ½ den fazladır. Hastalardan 6 (%40)'sında LVI , 2 (%13,3)'sinde servikal invazyon, 4 (%26,7)'ünde adneksial yayılım, 5 (%33,3)'inde omentum tutulumu, 3 (%20)'ünde pozitif peritoneal sitoloji, 3 (%21,4)'ünde paraaortik lenf nodu tutulumu, 3 (%21,4)'ünde pelvik lenf nodu tutulumu izlendi. Hastaların 11 (%73,3)'i evre 1 ve 2 , 4 (%26,7)'ü evre 3 ve 4 olarak saptanmıştır.

4.6. Grupların Karşılaştırılması

Tablo 4'te çalışma gruplarına göre hastaların klinik özelliklerinin karşılaştırılmasına ait analiz sonuçları verilmiştir. Buna göre, kopya sayısı yüksek grubundaki hastaların yaşlarının kopya sayısı düşük grubundaki hastalara göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu belirlenmiştir (p=0,045). Hastaların yaşları

60 yaş altı ve 60 yaş ve üstü şeklinde gruplandırıldığında, kopya sayısı yüksek grubundaki hastaların yaşlarının 60 yaş ve üstü olma yüzdesinin kopya sayısı düşük grubundaki hastalara göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu görülmüştür ($p=0,018$). Çalışma gruplarına göre hastaların tümör boyutu, myometrium invazyonu görülme sıklıkları, LVİ varlığı ve evreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$). POLE ultramutasyonlu (%62,5), MMR hipermutasyonlu (%82,4) ve kopya sayısı düşük grubunda (%87,5) endometrioid ve kopya sayısı yüksek grubunda (%73,3) ise seröz histolojik tipinin görülme yüzdesinin yüksek olduğu gözlenmiş, fakat hasta sayısı yetersiz olduğu için istatistiksel açıdan değerlendirilememiştir. Benzer şekilde, servikal invazyon varlığı MMR hipermutasyonlu (%35,3) ve kopya sayısı düşük (%37,5) gruplarda daha sık izlenmiştir. Adneksial yayılım POLE ultramutasyonlu (%25) ve kopya sayısı yüksek (%26,7) gruplarda daha sık izlenmiştir. Omentum tutulumu ve sitoloji pozitifliği kopya sayısı yüksek (%33,3 ,%20) grupta daha sık izlenmiştir. Paraaortik lenf nodu ve pelvik lenf nodu pozitifliği POLE ultramutasyonlu (%37,5 , %62,5) grupta daha sık izlenmiştir. Fakat hasta sayısı yetersiz olduğu için tüm bu parametreler istatistiksel açıdan değerlendirilememiştir.

Tablo 3-Hastaların moleküler ve immunohistokimyasal yöntemlere göre belirlenen grupları

	n	%
Grup		
POLE ultramutasyonlu	8	14,3
MMR hipermutasyonlu	17	30,4
Kopya sayısı düşük (P53WT)	16	28,6
Kopya sayısı yüksek (P53ABN)	15	26,8

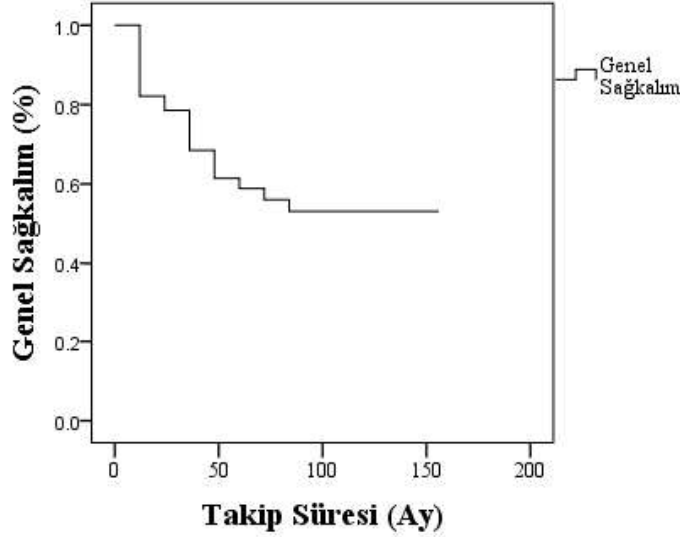
Tablo 4- Çalışma gruplarına göre hastaların klinik özelliklerinin karşılaştırılması

	POLE (n:8)	MMRD (n:17)	P53 WT (n:16)	P53ABN (n:15)	P
Yaş	61,5(27-80) ^{a,b}	62(53-71) ^{a,b}	56,5(44-84) ^a	69(52-84) ^b	0,045
<60 yıl	3(37,5) ^{a,b}	4(23,5) ^{a,b}	11(68,8) ^a	3(20) ^b	0,018
≥60 yıl	5(62,5) ^{a,b}	13(76,5) ^{a,b}	5(31,3) ^a	12(80) ^b	
Histolojik tip					
Endometrioid	5(62,5)	14(82,4)	14(87,5)	3(20)	NA
Seröz	1(12,5)	0(0)	1(6,3)	11(73,3)	
Endometrioid+Seröz	2(25)	3(17,6)	1(6,3)	1(6,7)	
Tümör boyutu (cm)	3,6(1-11)	3,8(2,2-11)	3,7(1,7-10)	3,2(1,3-10)	0,921
<2 cm	1(12,5)	0(0)	1(6,7)	2(13,3)	NA
≥2 cm	7(87,5)	16(100)	14(93,3)	13(86,7)	
Miyometrium invazyonu					
1/2'den az	3(37,5)	4(25)	5(33,3)	7(46,7)	0,651
1/2'den fazla	5(62,5)	12(75)	10(66,7)	8(53,3)	
LVİ					
Yok	6(75)	12(70,6)	7(43,8)	9(60)	0,346
Var	2(25)	5(29,4)	9(56,3)	6(40)	
Servikal invazyon					
Yok	6(75)	11(64,7)	10(62,5)	13(86,7)	NA
Var	2(25)	6(35,3)	6(37,5)	2(13,3)	
Adneksial yayılım					
Yok	6(75)	15(88,2)	15(93,8)	11(73,3)	NA
Var	2(25)	2(11,8)	1(6,3)	4(26,7)	
Omentum tutulumu					
Yok	6(75)	16(94,1)	16(100)	10(66,7)	NA
Var	2(25)	1(5,9)	0(0)	5(33,3)	
Sitoloji					
Negatif	8(100)	16(94,1)	15(93,8)	12(80)	NA
Pozitif	0(0)	1(5,9)	1(6,3)	3(20)	
Paraaortik lenf nodu					
Negatif	5(62,5)	16(94,1)	13(81,3)	11(78,6)	NA
Pozitif	3(37,5)	1(5,9)	3(18,8)	3(21,4)	
Pelvik lenf nodu					
Negatif	3(37,5)	16(94,1)	10(62,5)	11(78,6)	NA
Pozitif	5(62,5)	1(5,9)	6(37,5)	3(21,4)	
Evre					
1 ve 2	3(37,5)	14(82,4)	9(56,3)	11(73,3)	0,113
3 ve 4	5(62,5)	3(17,6)	7(43,7)	4(26,7)	

Bulgular n(%) ve medyan(min-max) değerler ile sunulmuştur. Kruskal-Wallis test, Pearson ki-kare test. Gruplar arası istatistiksel farklar farklı küçük harflerle gösterilmiştir. NA: Yetersiz veri sayısı.MMRD :MMR hipermutasyonlu grup , P53WT : Kopya sayısı düşük grup , P53ABN : Kopya sayısı yüksek grup

4.7. Hastaların Sağkalım Analizi Sonuçları

Şekil 18’da çalışmaya katılan hastaların genel sağkalım oranları gösterilmiştir. Tüm hastalarda ortalama sağkalım süresi 98,9 ay (81,3-116,5) olarak hesaplanmıştır.



Şekil 18. Hastaların genel sağkalımı

Tablo 5 te hastaların demografik özelliklerine göre yapılan sağkalım analizi sonuçları sunulmuştur. Yapılan analiz sonucunda, yaşı <60 olan hastaların ortalama sağkalım süresi 135,97 ay (115,3-156,7) ve ≥ 60 olanların 77,95 ay (56,1-99,8) olarak hesaplanmıştır. Çalışma gruplarına göre sağkalım sonuçları incelendiğinde, kopya sayısı düşük grupta olan hastaların ortalama sağkalım süresinin 119,63 ay (90-149,2), MMR hipermutasyonlu grubunda olanların 108 ay (76,9-139,1), POLE ultramutasyonlu grupta olanların 96 ay (54,1-137,9) ve kopya sayısı yüksek grupta olanların ise 45,2 ay (28,9-61,5) olduğu görülmüştür. Histolojik tipe göre sağkalım sonuçları incelendiğinde, endometrioid olan hastaların ortalama sağkalım süresinin 113,3 ay (92,5-134,2), seröz olanların 49,5 ay (28,8-70,2) ve endometrioid+seröz olanların ise 111,4 ay (60,4-162,5) olduğu görülmüştür. Tümör boyutu 2 cm’den küçük olan hastaların ortalama sağkalım süresi 78 ay (19,8-136,2) ve 2cm ve üstü olanların 98,4 ay (79,97-116,9) olarak hesaplanmıştır. Myometrium invazyonu $\frac{1}{2}$ ’den az olan hastaların ortalama

sağkalım süresi 99,1 ay (66,98-131,2) ve $\frac{1}{2}$ 'den fazla olanların 98,48 ay (76,7-120,3) olarak belirlenmiştir. LVI olan hastalarda ortalama sağkalım süresi 100,2 ay (72,4-128,1) ve olmayanlarda 97,65 ay (74,97-120,3) olarak bulunmuştur. Servikal invazyon olan hastalarda ortalama sağkalım süresi 105 ay (72,6-137,4) ve olmayanlarda 96,5 ay (75,9-117,2) olarak belirlenmiştir. Adneksial yayılım olan hastalarda ortalama sağkalım süresi 46,2 ay (25,8-66,6) ve olmayanlarda 108,4 ay (89,7-127,2) olarak hesaplanmıştır. Omentum tutulumu olan hastalarda ortalama sağkalım süresi 28,9 ay (18,5-39,2) ve olmayanlarda 109,99 ay (91,8-128,2) olarak gözlenmiştir. Peritoneal sitolojisi pozitif olan hastaların ortalama sağkalım süresi 28,8 ay (14,7-42,9) olarak bulunurken, negatif olanların 106,8 ay (88,8-124,8) olarak belirlenmiştir. Paraaortik lenf nodu pozitif olan hastalarda ortalama sağkalım süresinin 68,4 ay (39,4-97,4) ve negatif olanlarda 105,5 ay (85,8-125,1) olduğu görülmüştür. Pelvik lenf nodu pozitif olan hastalarda ortalama sağkalım süresinin 96,3 ay (64,7-127,95) ve negatif olanlarda 99,7 ay (78,5-120,8) olduğu gözlenmiştir. Evreye göre sağkalım sürelerine bakıldığında, 1 ve 2. evre hastaların ortalama sağkalım süresinin 109,8 ay (88,6-131) ve 3 ve 4. evre hastaların ise 79,7 ay (50,9-108,4) olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 5-Hastaların genel klinik özelliklerine göre sağkalım analizi

	Ortalama sağkalım Ay (%95 GA)	p
Yaş		
<60 yaş	135,97(115,3-156,7)	0,003
≥60 yaş	77,95(56,1-99,8)	
Grup		
Kopya sayısı düşük	119,63(90-149,2) ^a	0,018
MMR hipermutasyonlu	108(76,9-139,1) ^a	
POLE ultramutasyonlu	96(54,1-137,9) ^{a,b}	
Kopya sayısı yüksek	45,2(28,9-61,5) ^b	
Histolojik tip		
Endometrioid	113,3(92,5-134,2) ^a	0,015
Seröz	49,5(28,8-70,2) ^b	
Endometrioid+Seröz	111,4(60,4-162,5) ^{a,b}	
Tümör boyutu (cm)		
<2 cm	78(19,8-136,2)	0,734
≥2 cm	98,4(79,97-116,9)	
Miyometrium invazyonu		
1/2'den az	99,1(66,98-131,2)	0,866
1/2'den fazla	98,48(76,7-120,3)	
LVI		
Yok	97,65(74,97-120,3)	0,956
Var	100,2(72,4-128,1)	
Servikal invazyon		
Yok	96,5(75,9-117,2)	0,756
Var	105(72,6-137,4)	

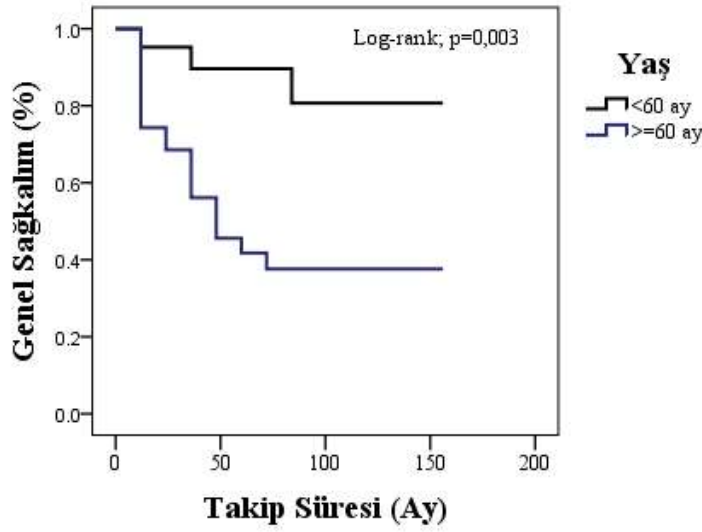
Gruplar arası istatistiksel farklar farklı küçük harflerle gösterilmiştir.

Tablo 5- Hastaların genel klinik özelliklerine göre sağkalım analizi (devam)

	Ortalama sağkalım Ay (%95 GA)	p
Adneksial yayılım		
Yok	108,4(89,7-127,2)	0,015
Var	46,2(25,8-66,6)	

Omentum tutulumu		
Yok	109,99(91,8-128,2)	<0,001
Var	28,9(18,5-39,2)	
Sitoloji		
Negatif	106,8(88,8-124,8)	0,002
Pozitif	28,8(14,7-42,9)	
Paraaortik lenf nodu		
Negatif	105,5(85,8-125,1)	0,140
Pozitif	68,4(39,4-97,4)	
Pelvik lenf nodu		
Negatif	99,7(78,5-120,8)	0,866
Pozitif	96,3(64,7-127,95)	
Evre		
1-2	109,8(88,6-131)	0,109
3-4	79,7(50,9-108,4)	

Şekil 19’da yaşa göre hastaların sağkalım oranları verilmiştir. Buna göre, hastaların yaşa göre sağkalım oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir (p=0,003; Log-rank test). Yaşı 60 dan küçük olan hastaların genel sağkalım oranları 60 ve üstü hastalara göre istatistiksel olarak daha yüksektir.



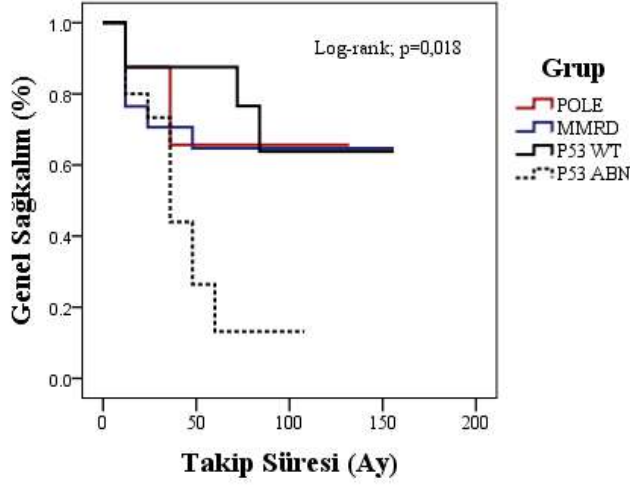
Şekil 19. Yaşa göre genel sağkalım

Şekil 20’de çalışma gruplarına göre hastaların sağkalım oranları verilmiştir. Yapılan analiz sonucunda, kopya sayısı yüksek grupta olan hastaların genel sağkalım oranlarının, POLE ultramutasyonlu, MMR hipermutasyonlu ve kopya sayısı düşük gruptaki hastalara göre istatistiksel olarak daha düşük olduğu tespit edilmiştir (p=0,018; Log-rank test).

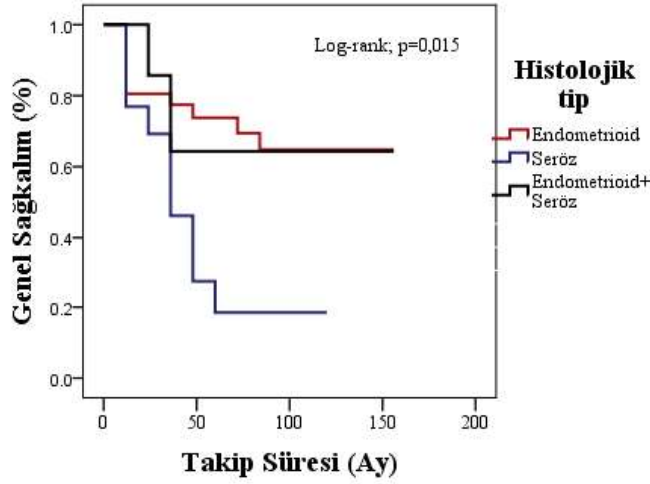
Şekil 21’de histolojik tipe göre sağkalım oranları verilmiştir. Bulgular incelendiğinde, histolojik tipi seröz olan hastaların sağkalım oranlarının endometrioid olan hastalara göre istatistiksel olarak daha düşük olduğu görülmüştür (p=0,015; Log-rank test).

Şekil 22 de tümör boyutuna göre sağkalım oranları verilmiştir. Buna göre, tümör boyutuna göre hastaların sağkalım oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür (p=0,734; Log-rank test).

Şekil 23’de miyometrium invazyonu varlığına göre sağkalım oranları verilmiştir. Buna göre, miyometrium invazyonu varlığına göre hastaların sağkalım oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür (p=0,866; Log-rank test).

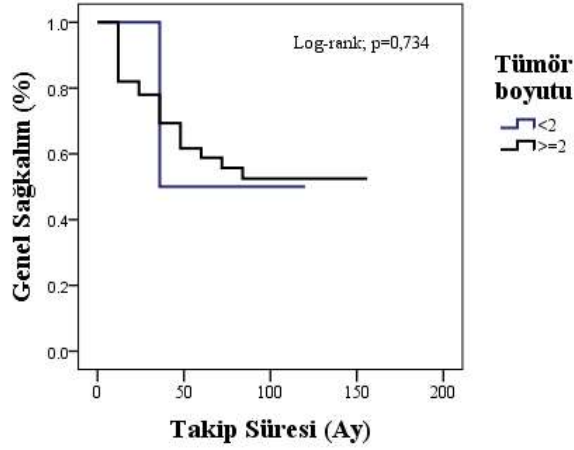


Şekil 20- Çalışma gruplarına göre genel sağkalım



Şekil 21. Histolojik tipe göre genel sağkalım

Şekil 24’de LVI varlığına göre sağkalım oranları verilmiştir. Buna göre, LVI varlığına göre hastaların sağkalım oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür (p=0,956; Log-rank test).

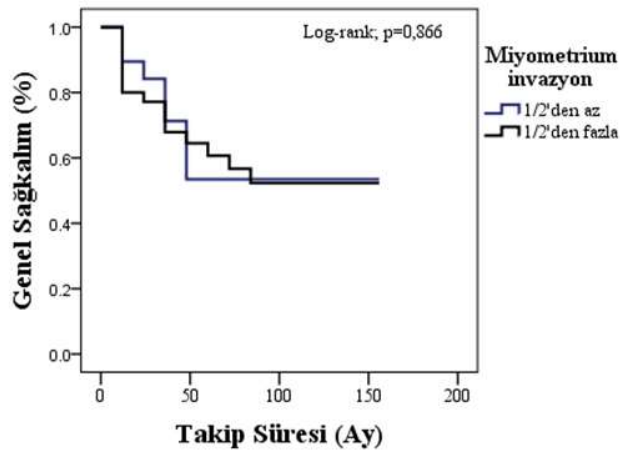


Şekil 22. Tümör boyutuna göre genel sağkalım

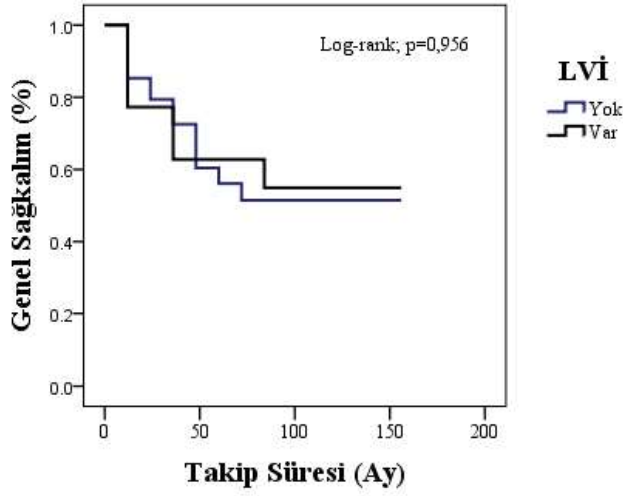
Şekil 25’de servikal invazyon varlığına göre sağkalım oranları verilmiştir. Buna göre, servikal invazyon varlığına göre hastaların sağkalım oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür ($p=0,756$; Log-rank test).

Şekil 26’da adneksial yayılıma göre sağkalım oranları verilmiştir. Bulgular incelendiğinde, adneksial yayılımı olan hastaların sağkalım oranlarının olmayan hastalara göre istatistiksel olarak daha düşük olduğu görülmüştür ($p=0,015$; Log-rank test).

Şekil 27’de omentum tutulumuna göre sağkalım oranları verilmiştir. Buna göre, omentum tutulumu olan hastaların sağkalım oranlarının olmayan hastalara göre istatistiksel olarak daha düşük olduğu tespit edilmiştir ($p<0,001$; Log-rank test).



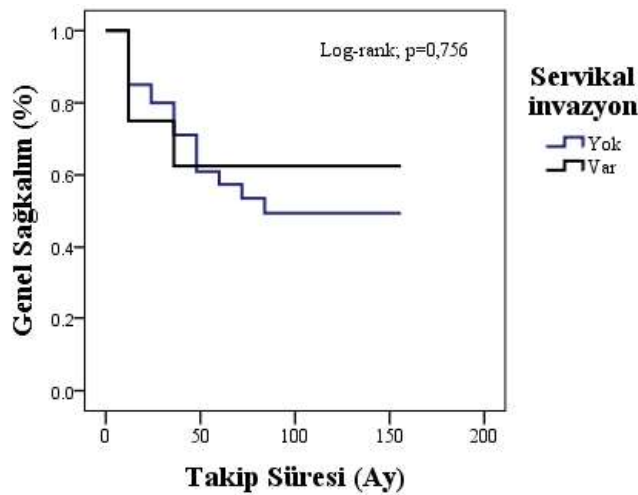
Şekil 23. Myometrium invazyonuna göre genel sağkalım



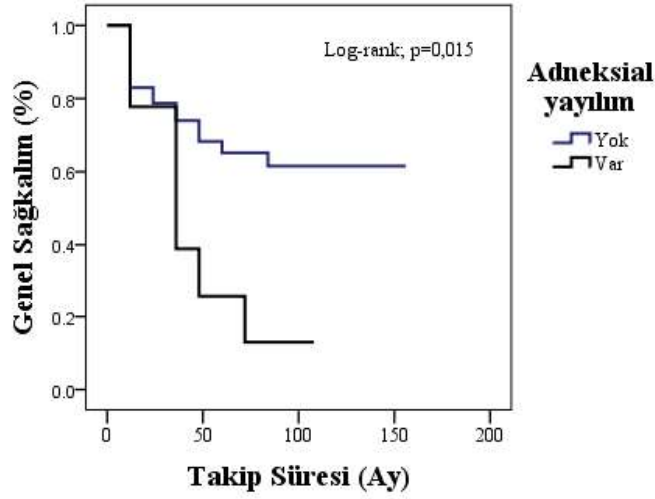
Şekil 24. LVI na göre genel sağkalım

Şekil 28’de sitolojiye göre sağkalım oranları verilmiştir. Buna göre, sitolojisi pozitif olan hastaların sağkalım oranlarının negatif olanlara göre istatistiksel olarak daha düşük olduğu gözlenmiştir ($p=0,002$; Log-rank test).

Şekil 29’da paraaortik lenf nodu pozitifliğine göre sağkalım oranları verilmiştir. Buna göre, paraaortik lenf nodu pozitifliğine göre hastaların sağkalım oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür ($p=0,140$; Log-rank test).



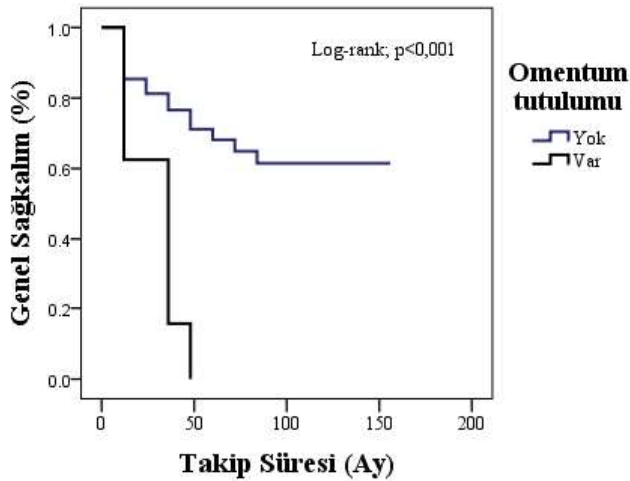
Şekil 25. Servikal invazyona göre genel sağ kalım



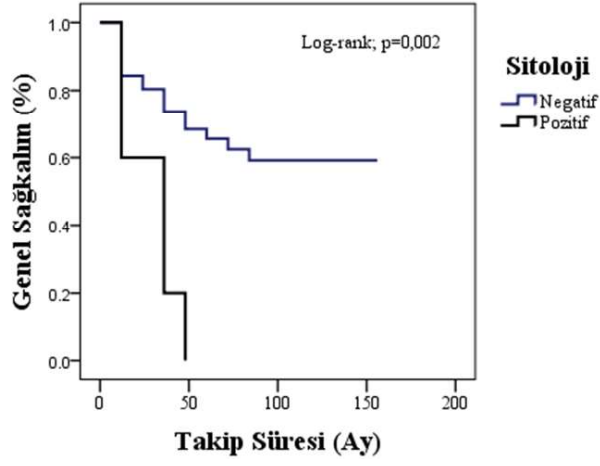
Şekil 26. Adneksial yayılıma göre genel sağkalım

Şekil 30'da pelvik lenf nodu pozitifliğine göre sağkalım oranları verilmiştir. Buna göre, pelvik lenf nodu pozitifliğine göre hastaların sağkalım oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir ($p=0,866$; Log-rank test).

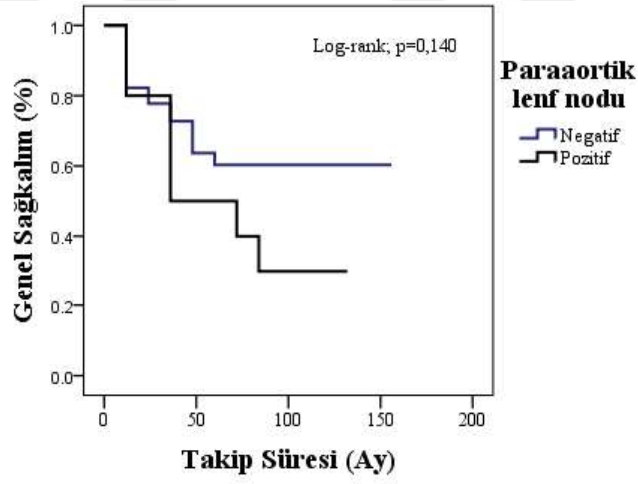
Şekil 31'da evreye göre sağkalım oranları verilmiştir. Elde edilen bulgular sonucunda, evreye göre hastaların sağkalım oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür ($p=0,109$; Log-rank test).



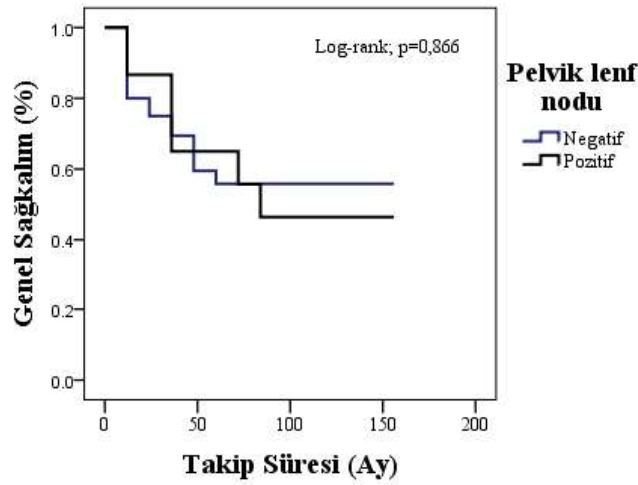
Şekil 27. Omentum tutulumuna göre genel sağkalım



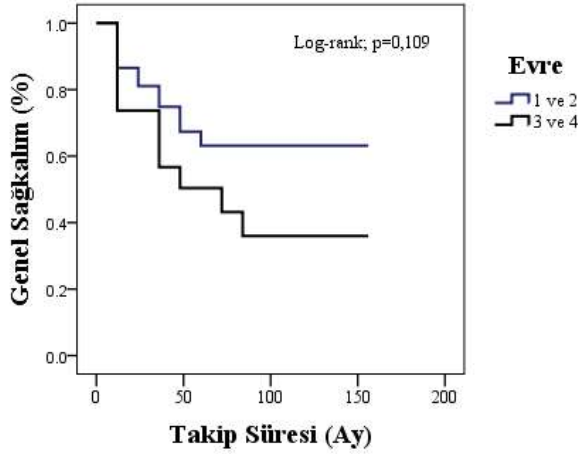
Şekil 28. Sitolojiye göre genel sağkalım



Şekil 29. Paraaortik lenf nodu tutulumuna göre genel sağkalım



Şekil 30. Pelvik lenf nodu tutulumuna göre genel sağkalım



Şekil 31. Evreye göre genel sağkalım

Tablo 6 da genel sağkalımı etkileyen prognostik faktörleri belirlemek amacıyla yapılan tek ve çok değişkenli Cox regresyon analizi sonuçları sunulmuştur. Yapılan tek değişkenli analiz sonucunda, tümör boyutu, myometrium invazyonu, LVI, servikal invazyon, paraaortik lenf nodu, pelvik lenf nodu ve klinik evrenin genel sağkalım üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi olmadığı görülmüştür ($p>0,05$). Yaşı 60 ve üstü olan hastaların genel sağkalımının 60'tan küçük olan hastalara göre istatistiksel olarak daha kötü olduğu belirlenmiştir (HR: 4,915; %95 GA: 1,456-16,587; $p=0,010$). Kopya sayısı yüksek grubun genel sağkalımının kopya sayısı düşük gruba göre daha kötü olduğu gözlenmiştir (HR: 3,974; %95 GA: 1,244-12,696; $p=0,020$). Hastalarda seröz histolojik tipinin bulunmasının genel sağkalımı negatif yönde etkilediği belirlenmiştir (HR: 3,031; %95 GA: 1,275-7,206; $p=0,012$). Bunun yanı sıra, hastalarda adneksial yayılım varlığı (HR: 2,718; %95 GA: 1,11-6,655; $p=0,029$), omentum tutulumu olması (HR: 4,39; %95 GA: 1,717-11,226; $p=0,002$) ve sitolojisinin pozitif olmasının (HR: 4,135; %95 GA: 1,491-11,472; $p=0,006$) genel sağkalım üzerinde olumsuz bir etkisi olduğu tespit edilmiştir. Tek değişkenli analizde anlamlı çıkan tüm değişkenlerle yapılan çok değişkenli analiz sonuçları incelendiğinde, hastaların yaşının 60 ve üstü olmasının bağımsız olarak genel sağkalımı negatif yönde etkilediği tespit edilmiştir (HR: 4,125; %95 GA: 1,074-15,846; $p=0,039$). Adneksial yayılım omentum tutulumu ile yüksek korelasyona sahip olduğu için çok değişkenli analize dahil edilmemiştir.

Tablo 6- Genel sağkalımı etkileyen prognostik faktörler – Tek ve çok değişkenli Cox regresyon analizi bulguları

	Univariate		Multivariate	
	HR (%95 GA)	p	HR (%95 GA)	p
Yaş				
<60 yıl	1	-	1	-
≥60 yıl	4,915(1,456-16,587)	0,010	4,125(1,074-15,846)	0,039
Grup				
Kopya sayısı düşük	1	-	1	-
MMR hipermutasyonlu	1,374(0,387-4,878)	0,623	0,753(0,194-2,925)	0,682
POLE ultramutasyonlu	1,205(0,22-6,593)	0,830	0,398(0,047-3,345)	0,397
Kopya sayısı yüksek	3,974(1,244-12,696)	0,020	0,764(0,117-5,001)	0,779
Histolojik tip				
Endometrioid	1	-	1	-
Seröz	3,031(1,275-7,206)	0,012	1,961(0,415-9,27)	0,396
Endometrioid+Seröz	1,054(0,233-4,766)	0,945	0,96(0,185-4,976)	0,961
Tümör boyutu (cm)				
<2 cm	1	-	-	-
≥2 cm	1,39(0,186-10,366)	0,748	-	-
Miyometrium invazyonu				
1/2'den az	1	-	-	-
1/2'den fazla	1,076(0,438-2,644)	0,873	-	-
LVİ				
Yok	1	-	-	-
Var	0,978(0,423-2,26)	0,958	-	-
Servikal invazyon				
Yok	1	-	-	-
Var	0,87(0,343-2,207)	0,769	-	-
Adneksial yayılım				
Yok	1	-	-	-
Var	2,718(1,11-6,655)	0,029	-	-
Omentum tutulumu				
Yok	1	-	1	-
Var	4,39(1,717-11,226)	0,002	5,32(0,796-35,578)	0,085
Sitoloji				
Negatif	1	-	1	-
Pozitif	4,135(1,491-11,472)	0,006	0,507(0,069-3,724)	0,504
Paraaortik lenf nodu				
Negatif	1	-	-	-
Pozitif	1,866(0,767-4,539)	0,169	-	-
Pelvik lenf nodu				
Negatif	1	-	-	-
Pozitif	1,075(0,442-2,615)	0,873	-	-
Evre				
1-2	1	-	-	-
3-4	1,865(0,823-4,228)	0,136	-	-

5.TARTIŞMA

Endometrium karsinomu Kanada ve Amerika Birleşik Devletleri'nde kadınlarda en sık görülen jinekolojik malignite ve dünyada en sık görülen 4. Kanser olmasına rağmen bu konuda araştırmaların ve klinik ilerlemenin diğer kanserlerle karşılaştırıldığında tartışmasız bir şekilde geciktiği görülmektedir. Bunun nedeni endometrium kanseri tanısı alan kadınların %75'inden fazlasının erken evre hastalığa (evre I veya II) ve olumlu sonuçlara sahip olması (5 yıllık genel sağkalım %75–90) olabilir. Bununla birlikte, nükseden kadınlar veya daha ileri hastalığı olanlarda, geleneksel kemoterapiye cevap oranları düşüktür ve klinik sonuçlar da oldukça kötüdür. Buna rağmen bazı ileri evre hastaların mükemmel prognoz gösterdiği izlenmiştir(2, 4).

Endometrium karsinomları 1983'ten beri histomorfolojiye göre sınıflandırılmaktadır. Fakat yüksek dereceli endometrium karsinomlarının sınıflandırılmasında uzman jinekopatologlar arasında bile uyumsuzluk görülmüştür. Yeterli ve efektif tedavi için histolojik sınıflama yetersizdir. Klinik, morfolojik ve moleküler özelliklerin entegre edilerek yapıldığı yeni bir sınıflamaya ihtiyaç vardır(3, 4).

Kanser Genom Atlası (TCGA) kısa süre önce, DNA metilasyonu, reverse faz protein dizilimi ve mikrosatellit dengesizlik analizleri ile birlikte, büyük ölçüde paralel sıralama ve dizi bazlı teknolojiler kullanarak 373 endometrial karsinomun genomik, transkriptomik ve proteomik analizi hakkında rapor verdi. Somatik gen mutasyonları, mikrosatellit kararsızlığı ve somatik kopya sayısı değişikliklerine dayanarak, endometrium karsinomları dört genomik gruba ayrılmıştır: POLE ultramutasyonlu grup (Tüm mutasyonları barındıran çok yüksek mutasyon oranları ile karakterize); MMR hipermutasyonlu grup; Kopya sayısı düşük grup (düşük bir mutasyon oranına sahip olan mikrosatellit stabil grade 1 ve grade 2 endometrioid karsinomların çoğundan oluşur); Kopya sayısı yüksek grup (Kapsamlı kopya sayısı sapmaları, düşük mutasyon oranları, tekrarlayan TP53 mutasyonları)(79). Baskın şekilde seröz benzeri tümörlerden oluşan kopya sayısı yüksek grup, en kötü prognozla; POLE ultramutasyonlu grup, en iyi prognoz ile ilişkilidir. MSI tümörler

veya POLE mutasyonu içeren tümörler 10-100 veya daha fazla mutasyon barındırabilir(80).

Son yıllarda, yeni nesil dizileme, insan kanserinde mutasyon yükü, immün tanıma ve prognoz arasındaki ilişkinin sistematik olarak değerlendirilmesine olanak sağlamıştır. DNA polimeraz epsilondaki (POLE) mutasyonları barındıran endometrium karsinomlarının son çalışmaları, mutasyonlar, T hücreleri ve klinik sonuçlar arasındaki etkileşime dair daha fazla bilgi sağlamıştır. POLE, yüksek kalitede DNA replikasyonu için gerekli olan bir DNA polimerazıdır. POLE'deki işlev kaybı mutasyonlarını barındıran endometrium karsinomları, melanomdaki gibi ultramutasyona uğramış bir fenotipe sahip olur. POLE mutant endometrium karsinomları son derece iyi bir prognoz taşır(81).

Kolorektal karsinom (CRC) ve endometrium karsinomlarından (EC) somatik POLE ekzonükleaz domain mutasyonlarına (EDM) sahip olan ekzom sekanslama verileri, bu tümörlerin tek başına kodlama bölgelerinin ortalama olarak yaklaşık 5000 somatik baz edindiğini gösterir. EDM olmayan kanserler ile karşılaştırıldığında tüm baz türleri frekansta artmaktadır ve C:G → T:A değişiklikleri en yaygın olanıdır. EDM'li kanserler arasındaki mutasyon sayısında önemli farklılıklar olmasına rağmen, spesifik mutasyonların mutasyon spektrumu üzerinde farklı etkileri olduğuna dair bazı kanıtlar vardır. Örneğin, Pro286Arg taşıyan kanserler, transversiyonlara karşı Val411Leu ile karşılaştırıldığında daha güçlü bir ilgi gösterir. İlginç bir şekilde, ekzom sekans verileri, eksik ekzonükleaz prova okumadan kaynaklanan somatik mutasyonların, T, G veya C'den ziyade pozitif DNA zinciri üzerindeki bir A bazının kuşattığı bölgelerde meydana gelme eğiliminde olduğunu göstermektedir. Bu gözlemin nedenleri şu anda bilinmemektedir, ancak bir olasılık, mutasyonların MMR proteinleri tarafından düzeltilebilmesidir. POLE mutasyonlarına dayanan yeni bir CRC ve EC türünün keşfedilmesi, gelecekteki benzer keşiflerin ortaya çıkma olasılığını yükseltir ve potansiyel olarak DNA analizine dayalı olarak gen veya protein ekspresyonunun analizinden daha sağlam daha kanser sınıflandırmasına yol açar(82).

Jinekolojik Onkoloji Derneği, endometrium kanseri tanısı alan tüm kadınların, aile öyküsünün yanı sıra kişisel öykü ve/veya moleküler taramayı da gözden geçirmesi gerektiğini ve kesin tarama kriterlerini klinisyenlere bırakmasını

savunuyor. Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı kılavuzları Lynch sendromu testi için kolorektal kanser perspektifinden gelen bilgilere dayanmaktadır, ancak <50 yaş endometrium kanser tanısı alan tüm hastaların testini onaylamaktadır(83).

Endometrium kanseri, PI3K /AKT yolunda, TCGA'nın bugüne kadar çalışılan diğer tüm tümör tiplerinden daha sık mutasyonlara neden olur. Endometrioid endometrium karsinomları, ultra yüksek mutasyon oranlarına yol açan ve WNT/CTNNB1 sinyalleme sisteminin sık aktivasyonunu içeren kolorektal karsinom ile birçok özelliği paylaşır; ancak endometrium karsinomları, KRAS ve CTNNB1 mutasyonunun farklı bir aktivasyon mekanizmasına sahiptir. Uterin seröz karsinomları, tümörlerin %27'sinde ERBB2 amplifikasyonuna ve %42'sinde PIK3CA mutasyonlarına sahiptir, bu da hedeflenen terapötik ilaçlar için olanak sağlar. Erken evre endometrioid tümörler sıklıkla adjuvan radyoterapi ile tedavi edilirken, seröz tümörler ve diğer tip2 tümörler kemoterapi ile tedavi edilir. Yüksek dereceli seröz ve endometrioid endometrial karsinomların doğru şekilde alt tiplerinin belirlenmesi zordur ve jinekopatologlar arasında gözlemci uyumu düşüktür. Moleküler karakterizasyon verileri, patologlar tarafından yüksek dereceli endometrioid olarak sınıflandırılan tümörlerin yaklaşık %25'inin, sık P53 mutasyonları ve uterus seröz karsinomuna benzer bir moleküler fenotipe sahip olduğunu göstermektedir. Bu endometrioid tümör alt grubu ve uterus seröz karsinomları arasındaki çarpıcı benzerlikler, genomik bazlı sınıflamanın bu hastaların tedavisinin daha iyi yönetilmesine yol açabileceğini düşündürmektedir. Klinisyenler, adjuvan radyoterapiden ziyade kopya sayısı değişmiş endometrioid hastalarını kemoterapiyle tedavi etmeyi dikkatlice düşünmeli ve ileriye dönük klinik denemelerde bu hipotezlerini test etmelidir. Ayrıca, endometrioid ve seröz benzeri tümörler arasındaki belirgin moleküler farklılıklar, bu tümörlerin, tedavi prensiplerini geliştirmek için ayrı klinik denemeler gerektirdiğini göstermektedir(5).

Abdulfatah ve ark.yaptığı çalışmada endometrium tümörlü hastaların ortalama görülme yaşı 60 ve ortalama tümör boyutu 4 cm dir(84). Bizim çalışmamızda ise ortalama yaş 62,9±10,4 , ortalama tümör boyutu ise 4,4±2,5 cm bulunmuştur.

Meng ve ark. mevcut serilerinde sadece endometrioid karsinom grade 3 te POLE ekzonükleaz alan mutasyonlarını belirlerken 26 seröz karsinom, 16 berrak hücreli karsinom ve 5 dediferansiye karsinomun hiçbiri bu mutasyonları barındırmamıştır. POLE ekzonükleaz domain mutasyonu olan yüksek gradeli endometrium karsinomlu hastaların hiçbirinin, tümör teşhisinde 5 yıl içerisinde tümörlerinden ölmediği bildirilmiştir. En yaygın hot spot mutasyon P286R'yi içeren 15 tümör ile, ikinci en yaygın hot spot mutasyonu V411L'yi içeren 7 tümör bulunmuştur(62). Bizim çalışmamızda POLE mutasyonu olan hastaların 5 (%62,5) i endometrioid , 1 (%12,5)'i seröz , 2 (%20)'si mikst tiptedir. 2 (%25)'sinde P286R, 1 (%12,5)'inde F367L, 3 (%37,5)'ünde E369Q, 2 (%25)'sinde V411L hot spot mutasyonları tespit edilmiştir.

Hussein ve ark. yaptığı çalışmada POLE ultramutasyonlu 17 tümörünün 13'ü (%76) Pro286Arg (n¼48) ve Val411Leu'da (n¼45) hot spot mutasyonları barındırırken, kalan 4 vakada da POLE geninin ekzonükleaz alanını hedefleyen başka değişkenler vardı. Bizim çalışmamızda ise en fazla 3 hasta ile E369Q hot spot mutasyonu izlenmiştir. Hussein ve ark. yaptığı çalışmada histolojik olarak, POLE ultramutasyonlu tümörler hemen hemen her zaman en azından fokal olarak endometrioid özellikleri tanımlamaktadır(79). Bizim çalışmamızda da POLE mutasyonu gösteren 8 hastanın 5'i endometrioid alt tiptedir, 2 hasta mikst tipte olup komponentlerden biri endometrioiddir , 1 hasta ise seröz alt tiptedir, endometrioid alan izlenmemiştir.

Bellona ve ark. göre hem Tip I hem de Tip II endometrium kanser hastalarındaki son raporlar, POLE ekzonükleaz mutasyonlu tümörleri barındıran hastaların, kalan endometrium kanser hastaları grubuna kıyasla anlamlı derecede daha iyi bir prognoz yaşayabileceğine dair güçlü kanıtlar sağlamıştır(85). Fakat bizim çalışmamızda diğer 2 gruba (Kopya sayısı düşük, MMR hipermutasyonlu) göre POLE mutant grubun genel sağkalımı daha düşük bulunmuş fakat istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir.

Stelloo ve ark. MSI nin azalmış nüks ve uzak metastaz riskiyle ilişkili olduğunu buldu. Toplu olarak verileri, POLE ekzonükleaz domain mutasyonları ve mikrosatellit instabilitesinin, aslında iyi derecede prognozu olan ve yoğun postoperatif radyoterapi veya hatta kemoterapi gerektirmeyen klinik olarak yüksek

riskli hastaları tanımlamak için biyobelirteçler olarak yararlı olabileceğini göstermektedir(8). Bizim çalışmamızda da genel sağ kalıma bakıldığında MMR hipermutasyonlu grup 2. en iyi prognozlu grup olmuştur. Bu hastaların 14 (%82,4)'ü evre 1 ve 2 saptanmıştır. POLE mutasyonlu grup ise genel sağ kalıma bakıldığında 3. sıradadır ve hastaların 5 (%62,5)'i evre 3 ve 4 olarak saptanmıştır. Fakat bu parametreler istatistiksel olarak anlamlı çıkmamıştır.

Billingsley ve ark POLE mutasyonlu endometrium karsinomunun genç yaşla ilişkili olduğunu bulmuşlardır. Tümörleri POLE mutasyonu barındıran kadınların %70'i, tanı anında 60 yaş altındadır(59). Bizim çalışmamızda ise POLE mutasyonu olan 8 hastanın 3 (%37,5)'ü 60 yaş ve altındadır. Fakat hasta sayısı az olduğu için bu sonuç istatistiksel olarak yorumlanamamıştır. Billingsley ve ark. yaptığı çalışmada mutasyon ile değerlendirilen diğer klinikopatolojik faktörler (grade,evre,LVSI,myometrial invazyon,adjuvan terapi, ırk, BMI) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Bizim çalışmamızda da POLE mutant hastalarda adneksial yayılım, pelvik ve paraortik lenf nodu pozitifliği daha sık izlense de hasta sayısı yetersiz olduğu için istatistiksel açıdan değerlendirilememiştir. Billingsley ve ark. nın endometrioid tümörlerin analizinde 535'in 30'unda (%5.6) mutasyon saptanmıştır(59). Bizim çalışmamızda ise endometrioid, seröz ve mikst tipteki 56 olgunun 8 (%14,3)'inde POLE mutasyonu izlendi.

Churc ve ark. yaptığı çalışmada sporadik endometrium karsinomlarının %7 sinde POLE mutasyonu bulunmaktadır ve yüksek grade ile ilişkilidir. POLE mutasyonu olmayan endometrium karsinomlarıyla karşılaştırıldığında, POLE mutant tümörleri genç kadınlarda, grade 3, LVSI ve derin (>%50) miyometriyal invazyonun daha az görüldüğü vakalarda olduğu bulunmuştur(86). Bizim çalışmamızda ise bütün vakalar yüksek gradeliydi ve POLE mutant tümörlerde myometrium invazyonun ½ den fazla olduğu tümörler daha sık (%62,5) , LVİ (%25) daha az görüldü.

Halen ultra mutasyona uğramış / hiper mutasyona uğramış fenotipli hastaların diğer endometrium kanser gruplarına kıyasla neden daha iyi prognoza sahip oldukları anlaşılamamıştır. Çok sayıda somatik mutasyon mevcuttur. Çok sayıda mutasyona uğramış epitop nedeniyle bu kanserleri konakçı için yüksek oranda

immünojenik hale getirebilir. Bu görüş ile uyumlu olarak, POLE mutasyonlu ve MMR geninde kusurlu endometriyum kanserleri, yüksek oranda T lenfositlerinin infiltrasyonu ile karakterize histopatolojik görünüme sahiptir(87).

Talhok ve ark. yaptığı çalışmada kopya sayısı yüksek tip ileri evre ve agresif klink ile ilişki bulunmuştur. Bu hastaların %96,5'u grade 3, %80,2'si nonendometrioid histolojili, %61,3'ü LVSI na sahip, %14,5'unda lenf nodu pozitifliği izlendi (88). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde kopya sayısı yüksek grup olan hastaların genel sağkalım oranlarının, POLE ultramutasyonlu, MMR hipermutasyonlu ve kopya sayısı düşük grubundaki hastalara göre istatistiksel olarak daha düşük olduğu tespit edildi (p=0,018; Log-rank test). Bizim çalışmamızdaki kopya sayısı yüksek grupta olan hastalarda hepsi grade 3, %73,3'ü seröz histolojili, %6,7'si mikst (endometrioid+seröz) histolojili , %40 LVİ , %21,4 paraaortik lenf nodu pozitifliği , %21,4 pelvik lenf nodu pozitifliği izlendi.

Hussein ve ark. yaptığı çalışmada 143 yüksek dereceli endometrium karsinomu değerlendirilmiştir. Bu hastaların %9'u POLE ultramutasyonlu, %32'si MMR hipermutasyonlu, %18'si kopya sayısı düşük, %39'u kopya sayısı yüksek grupta sınıflandırılmıştır. Bu çalışmada POLE ultramutasyonlu grup yüksek dereceli ve ileri evre olmasına rağmen iyi prognozla ilişkili bulunmuştur. Bu tümörlerde zengin tümör infiltre edici ve peritümöral lenfositler izlenmiştir. Bu çalışmada POLE ultramutasyonlu ve MMR hipermutasyonlu endometrium karsinomlarının, yüksek histolojik derece, lenfovasküler invazyon varlığı ve yüksek klinik evre gibi prognostik göstergeler ile ilişkili olduğunu, diğer prognostik faktörlerle ilişkili olmadıkları izlenmiştir(33). Bizim çalışmamızda ise hastaların %14,3'ü POLE ultramutasyonlu, %30,4'ü MMR hipermutasyonlu, %28,6 kopya sayısı düşük , %26,8 kopya sayısı yüksek olarak tespit edildi. Çalışmamızda POLE mutasyonlu grubun %62,5'i evre 3 ve 4 tü fakat istatistiksel olarak ileri evre ile POLE mutasyonu arasında anlamlı ilişki bulunamadı. MMR hipermutasyonlu grupta endometrioid alt tip , servikal invazyon daha sık saptandı, fakat hasta sayısı yetersiz olduğu için bu parametreler istatistiksel açıdan değerlendirilemedi. MMR hipermutasyonlu grupta hastaların %17,6'sı evre 3 ve 4 tü , hastaların çoğunluğu erken evreydi fakat istatistiksel olarak erken evre ve MMR mutasyonlu grup arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı.

Haruma ve ark. yaptığı çalışmada tek değişkenli analizlerde FIGO evresi, derecesi, histolojisi, miyometriyal invazyon derinliği, LVSI ve POLE / MSI durumu, genel sağ kalım ile anlamlı olarak ilişkiliydi(89). Bizim çalışmamızda ise tek değişkenli analizlerde yaş , POLE/MMR/P53 mutasyon durumu , histolojik tip, adneksial yayılım, omentum tutulumu, petirtoneal sitoloji, genel sağ kalım ile anlamlı olarak ilişkiliydi.

Bosse ve ark. yaptığı çalışmada histotip ile ilgili olarak hemen hemen tüm kopya sayıları düşük, POLE mutant ve MMR mutasyonlu tümörlerin endometrioid; kopya sayısı yüksek tümörlerin çoğunun seröz histolojik alt tipte olduğu saptanmıştır. POLE mutasyonlu grup erken evre ve genç yaş ile ilişkili bulunmuştur. Ayrıca POLE mutant grup mükemmel genel sağ kalım ile ilişkili iken, kopya sayısı yüksek grup belirgin şekilde daha kötü bir prognoz ile ilişkili bulunmuştur(90). Bizim çalışmamızda da POLE mutasyonlu hastaların %62,5'u, MMR hipermutasyonlu hastaların % 82,4'ü, kopya sayısı düşük hastaların %87,5'u endometrioid histolojik alt tipte, kopya sayısı yüksek hastaların %73,3'ü seröz histolojik alt tipte izlenmiştir. Fakat bizim çalışmamızda kopya sayısı düşük grup iyi prognoz ile ilişkili iken kopya sayısı yüksek grubun genel sağ kalımının istatistiksel olarak daha düşük olduğu tespit edilmiştir.

Cosgrove ve ark. yaptığı çalışmada POLE mutasyonlu hastalar diğer üç gruptan (57.4 ortalama) anlamlı olarak daha genç bulunmuştur(91). Bizim çalışmamızda ise kopya sayısı düşük gruptaki hastaların yaşları diğer 3 gruptan daha gençtir(56,5 ortalama). Fakat sadece kopya sayısı düşük gruptaki hastaların kopya sayısı yüksek gruptaki hastalara göre daha genç olduğu istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

Cosgrove ve ark. yaptığı çalışmada kopya sayısı düşük gruptaki kadınlarda öncelikle düşük dereceli, endometrioid tümörler izlenmiştir. Genel olarak, tümörleri MMR hipermutasyonlu, POLE ultramutasyonlu veya kopya sayısı yüksek olarak sınıflandırılan hastalar, kötü sonuçlarla ilişkili klinikopatolojik özelliklere sahip bulunmuştur(91). Bizim çalışmamızda da kopya sayısı düşük gruptaki hastalar sıklıkla endometrioid ve erken evre olmakla birlikte bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Van goal ve ark. yaptığı çalışmada %90 POLE mutant tümörde MMR gen defekti saptanmadı. Tüm kopya sayısı yüksek grup normal MMR gen ekspresyonu gösterirken kopya sayısı düşük grupta 1 hastada MMR gen defekti izlendi(92). Bizim çalışmamızda ortak moleküler özellik gösteren vaka saptanmadı çünkü gruplar aşamalı olarak belirlendi.

Britton ve ark.yaptığı çalışmada kopya sayısı düşük tümörler düşük dereceli (%78 derece 1), düşük evreli (% 85 sınırlı), endometrioid (%97), lenf düğümü negatif (%95) ve LVSI negatif (%94 tümörler iken kopya sayısı yüksek gruptaki tümörler ileri evre (evre 3-4) ile ilişkili bulunmuştur(93). Bizim çalışmamızda ise kopya sayısı düşük tümörler %87,5 endometrioid , %43,8 LVİ içermeyen, %81,3 paraaortik lenf düğümü negatif, %62,5 pelvik lenf düğümü negatif, %56,3 evre 1 ve 2 izlendi. Ama LVİ ve paraaotik pelvik lenf düğümü ve kopya sayısı düşük grup ilişkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Moroney ve ark. yaptığı çalışmada MMR mutasyonu olan kadınların, sağlam MMR'li kadınlardan daha düşük progresyonsuz sağkalıma sahip olduğunu bulmuşlardır(94). Bizim çalışmamızda ise kopya sayısı düşük gruptaki hastaların genel sağkalımı diğer 3 gruptan (POLE mutant , MMR hipermutasyonlu, kopya sayısı yüksek) istatistiksel açıdan anlamlı olarak daha iyi bulunmuştur.

Endometrium karsinomunun moleküler patogenezinin zaman içerisinde daha iyi anlaşılması, özellikle tümör gelişiminde rol oynayan başlıca mutasyonların rolü ve kanser genom projesinin sunduğu veriler endometrium karsinomuyla ilgilenen pek çok araştırmacıya yeni çalışma alanı sunmuştur. Güncel yaklaşımlara göre endometrium karsinomlarının sadece histolojiye göre sınıflamak yetersizdir. Bu nedenle moleküler ve histolojik özellikleri bir arada kullanarak yeni bir sınıflamaya ihtiyaç vardır.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Endometrium karsinomları kadınlarda en sık görülen 4.kanserdir, görülme sıklığı giderek artmaktadır. 1983 ten beri morfolojik özelliklerine göre iki gruba ayrılmıştır: tip 1 ve tip2. Tip 1 tümörler daha çok iyi prognozlu tip 2 tümörler kötü prognozlu olarak düşünülmüştür. Fakat günümüzde yapılan çalışmalarla yüksek dereceli bazı endometrial karsinomların çok iyi prognozlu olduğu görülmüş ve sadece morfolojik özelliklere dayanarak yapılan sınıflamanın yetersiz kaldığı bazı hastaların fazla tedavi aldığı gösterilmiştir.

Endometrium karsinomları için en kapsamlı moleküler çalışma kanser genom atlası projesidir. Bu projede tüm genom sekanslama, ekzom sekanslama, MSI analizi, kopya sayısı analizi yöntemleri kullanılmıştır. Bu yöntemlerle endometrium karsinomları 4 grupta sınıflandırılmıştır; POLE ultramutasyonlu (Polimeraz epsilon ekzonukleaz domain mutasyon), MMR hipermutasyonlu (Mismatch repair mutasyonlu), Kopya sayısı düşük ve Kopya sayısı yüksek gruplar.

Çalışmamızda 56 yüksek dereceli endometrium karsinomu vakamız bu 4 moleküler subgruba ayrıldı. Öncelikle MMR mutasyonları (MLH1,MSH2MSH6,PMS2) immunohistokimyasal yöntemle araştırıldı. MMR hipermutasyonlu 17 hasta izlendi. MMR mutasyonu olmayan 39 hastaya real time PCR ile POLE mutasyonu bakıldı, POLE mutasyonu olan 8 hasta tespit edildi. Geri kalan 31 hastaya immunohistokimyasal yöntemle p53 mutasyonu bakıldı, 16 hasta kopya sayısı düşük (P53WT), 15 hasta kopya sayısı yüksek (P53ABN) gruba dahil oldu. Bu gruplarla histopatolojik özellikler karşılaştırıldı, sağkalım analizi yapıldı.

Çalışma gruplarına göre hastaların tümör boyutu, miyometrium invazyonu görülme sıklıkları, LVİ varlığı ve evreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$).

POLE ultramutasyonlu, MMR hipermutasyonlu ve kopya sayısı düşük grupta endometrioid ve kopya sayısı yüksek grupta ise seröz histolojik tipin görülme yüzdesinin yüksek olduğu gözlemlendi, fakat hasta sayısı yetersiz olduğu için istatistiksel açıdan değerlendirilemedi. Benzer şekilde, servikal invazyon varlığı MMR hipermutasyonlu ve kopya sayısı düşük, adneksial yayılım POLE ultramutasyonlu ve kopya sayısı yüksek, omentum tutulumu ve sitoloji pozitifliği

kopya sayısı yüksek ve paraaortik lenf nodu ve pelvik lenf nodu pozitifliği POLE ultramutasyonlu grupta daha sık olarak gözlemlendi, fakat hasta sayısı yetersiz olduğu için istatistiksel açıdan değerlendirilemedi.

Kopya sayısı yüksek gruptaki hastaların yaşlarının kopya sayısı düşük gruptaki hastalara göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu belirlendi ($p=0,045$). Hastaların yaşları 60 yaş altı ve 60 yaş ve üstü şeklinde gruplandırıldığında, kopya sayısı yüksek gruptaki hastaların yaşlarının 60 yaş ve üstü olma yüzdesinin kopya sayısı düşük gruptaki hastalara göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu görüldü ($p=0,018$).

Çalışma gruplarına göre hastaların sağkalım oranları karşılaştırıldığında yapılan analiz sonucunda, kopya sayısı yüksek grupta olan hastaların genel sağkalım oranlarının MMR hipermutasyonlu, POLE ultramutasyonlu ve kopya sayısı düşük gruplardaki hastalara göre istatistiksel olarak daha düşük olduğu tespit edildi ($p=0,018$; Log-rank test).

Genel sağ kalımı etkileyen prognostik faktörlerin değerlendirilmesinde tek değişkenli analiz sonucunda yaşı 60 ve üstü olan hastaların genel sağkalımının 60'tan küçük olan hastalara göre istatistiksel olarak daha kötü olduğu belirlendi (HR: 4,915; %95 GA: 1,456-16,587; $p=0,010$).

Hastalarda seröz histolojik tipinin bulunmasının genel sağkalımı negatif yönde etkilediği belirlendi (HR: 3,031; %95 GA: 1,275-7,206; $p=0,012$). Hastalarda adneksial yayılım varlığı (HR: 2,718; %95 GA: 1,11-6,655; $p=0,029$), omentum tutulumu olması (HR: 4,39; %95 GA: 1,717-11,226; $p=0,002$) ve sitolojisinin pozitif olmasının (HR: 4,135; %95 GA: 1,491-11,472; $p=0,006$) genel sağkalım üzerinde olumsuz bir etkisi olduğu tespit edildi. Ayrıca tümör boyutu, miyometrium invazyonu, LVİ, servikal invazyon, paraaortik lenf nodu, pelvik lenf nodu ve klinik evrenin genel sağkalım üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi olmadığı görüldü ($p>0,05$).

Tek değişkenli analizde anlamlı çıkan tüm değişkenlerle yapılan çok değişkenli analiz sonuçları incelendiğinde, hastaların yaşının 60 ve üstü olmasının bağımsız olarak genel sağkalımı negatif yönde etkilediği tespit edildi (HR: 4,125; %95 GA: 1,074-15,846; $p=0,039$).

Bizim verilerimizle literatüdeki veriler karşılaştırıldığında literatürle uyumlu olarak kopya sayısı yüksek grubun en kötü prognoza sahip olduğu izlenmiştir fakat POLE mutant grubun iyi prognozla ve genç yaşla ilişkisi bulunamamıştır. Bu durumun vaka sayımızın az olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Yine çalışma grupları ve histopatolojik özelliklerin karşılaştırılmasında vaka sayımız az olduğu için birçok parametre istatistiksel olarak değerlendirilememiştir. Sonuç olarak bu gibi çalışmaların çok merkezli daha fazla hasta sayısı ile yeterli maddi kaynak sağlanarak yapılması gerekmektedir.



7.ÖZET

YÜKSEK DERECELİ ENDOMETRİUM KARSİNOMLARININ MOLEKÜLER VE İMMUNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLERLE SINIFLANMASI

Endometrium karsinomları kadınlarda en sık görülen 4.kanserdir, görülme sıklığı giderek artmaktadır. Günümüzde yapılan çalışmalarla yüksek dereceli bazı endometrium karsinomlarının çok iyi prognozlu olduğu görülmüş ve sadece morfolojik özelliklere dayanarak yapılan sınıflamanın yetersiz kaldığı gösterilmiştir.

Endometrium karsinomları için en kapsamlı moleküler çalışma kanser genom atlası projesidir. Endometrium karsinomları moleküler ve immünohistokimyasal özelliklerine göre 4 grupta sınıflandırılmıştır; POLE ultramutasyonlu (Polimeraz epsilon ekzonukleaz domain mutasyon) ,MSI hipermutasyonlu (Mismatch repair mutasyonlu) , Kopya sayısı düşük ve Kopya sayısı yüksek gruplar.

Çalışmamızda 2005-2017 yılları arasında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi hastanesinde tanı alan 56 yüksek dereceli endometrium kanseri hastalarının parafin bloklarından alınan kesitlere öncelikle MMR genlerine (MLH1,MSH2,MSH6,PMS2) immunohistokimya ile bakarak MMR gen defekti olan 17 hasta saptandı, MMR gen defekti olmayan 39 hastaya POLE mutasyonunu saptamak amacıyla 10 hot spot mutasyona (P286R/S, V411L, F367S/C/L, P436R, A456P, L424P, E396Q) real-time PCR yöntemi ile bakıldı. 8 hasta POLE ultramutasyonlu gruba dahil oldu, POLE mutasyonu olmayan 31 hastaya immunohistokimyasal olarak p53 bakıldı ve böylece 16 hasta kopya sayısı düşük, 15 hasta kopya sayısı yüksek grupta yer aldı. Daha sonra bu grupların klinik, histopatolojik özellikleri karşılaştırıldı. Genel sağkalım ve ortalama sağ kalım süreleri hesaplandı.

Çalışma gruplarına göre hastaların sağkalım oranları karşılaştırıldığında yapılan analiz sonucunda, kopya sayısı yüksek grupta olan hastaların genel sağkalım oranlarının MMR hipermutasyonlu, POLE ultramutasyonlu ve kopya sayısı düşük gruplardaki hastalara göre istatistiksel olarak daha düşük olduğu tespit

edildi ($p=0,018$; Log-rank test). Çalışma gruplarına göre hastaların tümör boyutu, miyometrium invazyonu görülme sıklıkları, LVI varlığı ve evreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı bulunmadı ($p>0,05$).

Hastaların yaşları 60 yaş altı ve 60 yaş ve üstü şeklinde gruplandırıldığında, kopya sayısı yüksek gruptaki hastaların yaşlarının 60 yaş ve üstü olma yüzdesinin kopya sayısı düşük gruptaki hastalara göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu görüldü ($p=0,018$).

Çalışma grupları ve histopatolojik özelliklerin karşılaştırılmasında vaka sayımız az olduğu için birçok parametre (histolojik tip, servikal invazyon, adneksial yayılım, omentum tutulumu, sitoloji durumu, paraaortik ve pelvik lenf nodu durumu) istatistiksel olarak değerlendirilememiştir. Sonuç olarak; çok merkezli, daha fazla hasta sayısı ile yeterli maddi kaynak sağlanarak bu gibi çalışmaların sayısının artırılması gerekmektedir.

Anahtar kelimeler : POLE , mismatch repair, endometrium karsinomu , P53

8.ABSTRACT

CLASSIFICATION OF HIGH-GRADE ENDOMETRIUM CARCINOMAS BY MOLECULAR AND IMMUNOHISTOCHEMICAL METHODS

Endometrial carcinomas are the 4th most common cancer in women, and the incidence is increasing. Some studies have shown that high-grade endometrial carcinomas have a very good prognosis and the classification based on morphological features has been shown to be insufficient.

The most comprehensive molecular study for endometrial carcinomas. Endometrial carcinomas are classified into 4 groups according to their molecular and immunohistochemical properties; POLE ultramutated (Polymerase epsilon exonuclease domain mutation), MMR hypermutation (Mismatch repair mutation), Low copy number and high copy number groups.

In our study, 17 patients with MMR (Mismatch repair) gene defect were firstly examined for Mismatch repair genes (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) by paraffin blocks of 56 high-grade endometrial cancer patients diagnosed at Akdeniz University Faculty of Medicine between 2005-2017. In order to detect POLE mutation in 39 patients without MMR gene defect, 10 hot spot mutations (P286R / S, V411L, F367S / C / L, P436R, A456P, L424P, E396Q) were evaluated in real-time PCR method. 31 patients without POLE mutations were immunohistochemically examined for p53. 16 patients were included in the low copy number and 15 patients were included in the high number of copies. Later, clinical, histopathological features of these groups were compared. Overall survival and mean survival time were calculated.

When the survival rates of the patients were compared according to the study groups, the overall survival rates of the patients with high copy number were found to be statistically lower than the patients with MMR hypermutation, POLE ultramutations and low copy number ($p = 0.018$; Log-rank test). There was no

statistically significant difference between tumor size, incidence of myometrial invasion, presence of LVI and stages according to study groups ($p > 0.05$).

When the patients' ages were grouped as below 60 years and 60 years and above, it was found that the percentage of patients in the high copy number group was higher than the age of 60 and higher than the low number of copy group patients ($p = 0.018$).

In the comparison of the study groups and histopathological features, many parameters could not be evaluated statistically because of the small number of cases. The number of such studies should be increased by providing more multicenter, more patients and sufficient financial resources.

Key words : POLE, mismatch repair, endometrial carcinoma, P53

KAYNAKLAR

1. Talhouk A, McConechy M, Leung S, Li-Chang H, Kwon J, Melnyk N, et al. A clinically applicable molecular-based classification for endometrial cancers. 2015;113(2):299.
2. McAlpine JN, Temkin SM, Mackay HJJC. Endometrial cancer: not your grandmother's cancer. 2016;122(18):2787-98.
3. Hoang LN, Kinloch MA, Leo JM, Grondin K, Lee C-H, Ewanowich C, et al. Interobserver agreement in endometrial carcinoma histotype diagnosis varies depending on The Cancer Genome Atlas (TCGA)-based molecular subgroup. 2017;41(2):245-52.
4. Talhouk A, McAlpine J, Gor, practice. New classification of endometrial cancers: the development and potential applications of genomic-based classification in research and clinical care. 2016;3(1):14.
5. Cancer Genome Atlas Research Network KC, Schultz N, Cherniack AD, Akbani R, Liu Y, Shen H, Robertson AG, Pashtan I, Shen R, Benz CC, Yau C, Laird PW, Ding L, Zhang W, Mills GB, Kucherlapati R, Mardis ER, Levine DA. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. Nature. 2013 Aug 8;volume 497.
6. Uppendahl L, Mullany SA, Winterhoff BJCOiO, Gynecology. Molecular characterization of endometrial cancer and therapeutic implications. 2017;29(1):35-9.
7. Sherman ME, Mazur MT, Kurman RJJ, BspotfgtteNYS-V. Benign diseases of the endometrium. 2002:421-66.
8. Stelloo E, Bosse T, Nout RA, MacKay HJ, Church DN, Nijman HW, et al. Refining prognosis and identifying targetable pathways for high-risk endometrial cancer; a TransPORTEC initiative. 2015;28(6):836.
9. Gray H, Goss C. The urogenital system. Anatomy of the human body: Lea & Febiger, Philadelphia, PA; 1973. p. 1309-10.
10. Netter FH, Hansen JT, Lambert DRJU, New Jersey: Icon Learning Systems. Netter's clinical anatomy. 2005.

11. Morton DA, Peterson KD, Albertine KH. Gray's dissection guide for human anatomy: Churchill Livingstone Elsevier; 2007.
12. Baggish M. General aspects of operative hysteroscopy in: Baggish M, Guedj H, Valle R,(ed). Hysteroscopy: Visual perspectives of uterine anatomy, physiology and pathology. London Lippincott Williams&Wilkins; 2007.
13. Moore KL, Dalley A. Clinically oriented Anatomy. Williams and Wilkins. Lippincott; 1999.
14. Kurman, Ellenson, Ronnett. Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract 6ed2011. 394-441 p.
15. Kumar A, Aster. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 9 ed2015. 681-715 p.
16. Yılmaz T. Hiperplastik endometriyumda, endometriyumun endometriyoid ve seröz karsinomlarında, siklin D1, P53 ve PAX8 ekspresyonunun tanısal önemi. 2015.
17. Mills S. Histology for pathologists: Lippincott Williams & Wilkins; 2019.
18. Eroschenko VP. DiFiore's atlas of histology with functional correlations: Lippincott Williams & Wilkins; 2008.
19. Rosai J. Rosai and Ackerman's surgical pathology e-book: Elsevier Health Sciences; 2011.
20. Robboy SJ, Bentley R, Russell R, Anderson M, Mutter G, Prat J. Pathology of the female reproductive tract. London: Churchill Livingstone. Elsevier; 2009.
21. Noyes R, Hertig A, Rock JJO, Survey G. Dating the endometrial biopsy. 1950;5(4):561-4.
22. feyza B. Endometrium karsinomu ve prekanseröz lezyonlari arasında immunohistokimyasal olarak glipikan 3, glut1, galektin 3 ve gata 3 ekspresyonlarının karşılaştırılması. 2015.
23. Jabbour HN, Kelly RW, Fraser HM, Critchley HOJEr. Endocrine regulation of menstruation. 2005;27(1):17-46.
24. Salamonsen LAJTEM, Cellular, Perspectives C. Menstrual and estrous cycles. 2008;2.
25. Salamonsen LA, Zhang J, Brasted MJJori. Leukocyte networks and human endometrial remodelling. 2002;57(1-2):95-108.

26. Teklenburg G, Salker M, Heijnen C, Macklon NS, Brosens JJMhr. The molecular basis of recurrent pregnancy loss: impaired natural embryo selection. 2010;16(12):886-95.
27. Sorosky JJO, Gynecology. Endometrial cancer. 2008;111(2):436-47.
28. Crum, Nucci, Lee. Diagnostic Gynecologic and Obstetric Pathology. 2th ed2011. 517-74 p.
29. Bakhsh S, Kinloch M, Hoang LN, Soslow RA, Köbel M, Lee CH, et al. Histopathological features of endometrial carcinomas associated with POLE mutations: implications for decisions about adjuvant therapy. 2016;68(6):916-24.
30. Clement PB, H.Young R. Atlas of Gynecologic Surgical Pathology. 2014;3th ed.:181-211.
31. Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS, Young RH. WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs. 4th edition ed2014.
32. Bell DW, Ellenson LHJARoPMoD. Molecular Genetics of Endometrial Carcinoma. 2019;14:339-67.
33. Hussein YR, Soslow RAJP. Molecular insights into the classification of high-grade endometrial carcinoma. 2018;50(2):151-61.
34. Nucci MR, Oliva E. Gynecologic Pathology: elseiver; 2009.
35. Zhao S, Choi M, Overton JD, Bellone S, Roque DM, Cocco E, et al. Landscape of somatic single-nucleotide and copy-number mutations in uterine serous carcinoma. 2013;110(8):2916-21.
36. Hoang LN, McConechy MK, Meng B, McIntyre JB, Ewanowich C, Gilks CB, et al. Targeted mutation analysis of endometrial clear cell carcinoma. 2015;66(5):664-74.
37. DeLair DF, Burke KA, Selenica P, Lim RS, Scott SN, Middha S, et al. The genetic landscape of endometrial clear cell carcinomas. 2017;243(2):230-41.
38. Espinosa I, D'Angelo E, Palacios J, Prat JTAjosp. Mixed and ambiguous endometrial carcinomas. 2016;40(7):972-81.
39. Espinosa I, Lee C-H, D'Angelo E, Palacios J, Prat JTAjosp. Undifferentiated and dedifferentiated endometrial carcinomas with POLE exonuclease domain mutations have a favorable prognosis. 2017;41(8):1121-8.

40. Singh N, Hirschowitz L, Zaino R, Alvarado-Cabrero I, Duggan MA, Ali-Fehmi R, et al. Pathologic Prognostic Factors in Endometrial Carcinoma (Other Than Tumor Type and Grade). 2019;38(1 Suppl 1):S93.
41. cancer Ajco. AJCC Cancer Staging. eighth ed2017.
42. Prat JH. Prognostic parameters of endometrial carcinoma. 2004;35(6):649-62.
43. Morrow CP, Bundy BN, Kurman RJ, Creasman WT, Heller P, Homesley HD, et al. Relationship between surgical-pathological risk factors and outcome in clinical stage I and II carcinoma of the endometrium: a Gynecologic Oncology Group study. 1991;40(1):55-65.
44. Maxwell GL, Risinger JI, Alvarez AA, Barrett JC, Berchuck AJO, Gynecology. Favorable survival associated with microsatellite instability in endometrioid endometrial cancers. 2001;97(3):417-22.
45. Uharček PJO, Research G. Prognostic factors in endometrial carcinoma. 2008;34(5):776-83.
46. Schink JC, Miller DS, Lurain JR, Rademaker AWJC. Tumor size in endometrial cancer. 1991;67(11):2791-4.
47. Nakamura K, Nakayama K, Ishikawa N, Minamoto T, Ishibashi T, Ohnishi K, et al. Preoperative tumor size is associated with deep myometrial invasion and lymph node metastases and is a negative prognostic indicator for patients with endometrial carcinoma. 2018;9(33):23164.
48. Ytre-Hauge S, Husby JA, Magnussen IJ, Werner HM, Salvesen ØO, Bjørge L, et al. Preoperative tumor size at MRI predicts deep myometrial invasion, lymph node metastases, and patient outcome in endometrial carcinomas. 2015;25(3):459-66.
49. Ashman JB, Connell PP, Yamada D, Rotmensch J, Waggoner SE, Mundt AJGo. Outcome of endometrial carcinoma patients with involvement of the uterine serosa. 2001;82(2):338-43.
50. Gorostidi MP, de la Noval Diaz B, Gil-Ibañez B, Lago VL, Jaunarena IM, Padilla PIJjogcojotIGCS. Lymphovascular Space Invasion for Endometrial Cancer: Undertreatment and Overtreatment Risks. 2017;27(6):1191-9.

51. Cetinkaya K, Atalay FJTJ. Peritoneal cytology in endometrial cancer. 2015;101(6):697-700.
52. Mirakhor Samani S, Ezazi Bojnordi T, Zarghampour M, Merat S, Fouladi DFJJoO, Gynaecology. Expression of p53, Bcl-2 and Bax in endometrial carcinoma, endometrial hyperplasia and normal endometrium: a histopathological study. 2018;38(7):999-1004.
53. Yu C-G, Jiang X-Y, Li B, Gan L, Huang J-FJAPJoCP. Expression of ER, PR, C-erbB-2 and Ki-67 in Endometrial Carcinoma and their Relationships with the Clinicopathological. 2015;16(15):6789-94.
54. Proctor L, Pradhan M, Leung S, Cheng A, Lee C, Soslow R, et al. Assessment of DNA Ploidy in the ProMisE molecular subgroups of endometrial cancer. 2017;146(3):596-602.
55. Karamurzin Y, Rutgers JKJljogp. DNA mismatch repair deficiency in endometrial carcinoma. 2009;28(3):239-55.
56. Yeramian A, Moreno-Bueno G, Dolcet X, Catusus L, Abal M, Colas E, et al. Endometrial carcinoma: molecular alterations involved in tumor development and progression. 2013;32(4):403.
57. Lax SFJVA. Molecular genetic pathways in various types of endometrial carcinoma: from a phenotypical to a molecular-based classification. 2004;444(3):213-23.
58. Murali R, Soslow RA, Weigelt BJTLO. Classification of endometrial carcinoma: more than two types. 2014;15(7):e268-e78.
59. Billingsley CC, Cohn DE, Mutch DG, Stephens JA, Suarez AA, Goodfellow PJJ. Polymerase ϵ (POLE) mutations in endometrial cancer: Clinical outcomes and implications for Lynch syndrome testing. 2015;121(3):386-94.
60. Roque DR, Makowski L, Chen T-H, Rashid N, Hayes DN, Bae-Jump VJGo. Association between differential gene expression and body mass index among endometrial cancers from The Cancer Genome Atlas Project. 2016;142(2):317-22.
61. Henninger EE, Pursell ZFJII. DNA polymerase ϵ and its roles in genome stability. 2014;66(5):339-51.

62. Meng B, Hoang LN, McIntyre JB, Duggan MA, Nelson GS, Lee C-H, et al. POLE exonuclease domain mutation predicts long progression-free survival in grade 3 endometrioid carcinoma of the endometrium. 2014;134(1):15-9.
63. Wong A, Kuick CH, Wong WL, Tham JM, Mansor S, Loh E, et al. Mutation spectrum of POLE and POLD1 mutations in South East Asian women presenting with grade 3 endometrioid endometrial carcinomas. 2016;141(1):113-20.
64. McConechy MK, Talhouk A, Leung S, Chiu D, Yang W, Senz J, et al. Endometrial carcinomas with POLE exonuclease domain mutations have a favorable prognosis. 2016;22(12):2865-73.
65. McConechy M, Talhouk A, Li-Chang H, Leung S, Huntsman D, Gilks C, et al. Detection of DNA mismatch repair (MMR) deficiencies by immunohistochemistry can effectively diagnose the microsatellite instability (MSI) phenotype in endometrial carcinomas. 2015;137(2):306-10.
66. Kunitomi H, Banno K, Yanokura M, Takeda T, Iijima M, Nakamura K, et al. New use of microsatellite instability analysis in endometrial cancer. 2017;14(3):3297-301.
67. Kurnit KC, Westin SN, Coleman RLJC. Microsatellite instability in endometrial cancer: New purpose for an old test. 2019.
68. Wortman BG, Nout RA, Bosse T, Creutzberg CLJCor. Selecting Adjuvant Treatment for Endometrial Carcinoma Using Molecular Risk Factors. 2019;21(9):83.
69. Sherman ME, Bur ME, Kurman RJJHp. p53 in endometrial cancer and its putative precursors: evidence for diverse pathways of tumorigenesis. 1995;26(11):1268-74.
70. Berchuck A, Boyd JJC. Molecular basis of endometrial cancer. 1995;76(S10):2034-40.
71. Schultheis AM, Martelotto LG, De Filippo MR, Piscuoglio S, Ng CK, Hussein YR, et al. TP53 mutational spectrum in endometrioid and serous endometrial cancers. 2016;35(4):289.
72. Köbel M, Ronnett BM, Singh N, Soslow RA, Gilks CB, McCluggage WGJljogpojotISoGP. Interpretation of P53 Immunohistochemistry in Endometrial Carcinomas: Toward Increased Reproducibility. 2019;38(1 Suppl 1):S123-S31.

73. Edmondson R, Crosbie E, Nickkho-Amiry M, Kaufmann A, Stelloo E, Nijman H, et al. Markers of the p53 pathway further refine molecular profiling in high-risk endometrial cancer: a TransPORTEC initiative. 2017;146(2):327-33.
74. Tomczak K, Czerwińska P, Wiznerowicz MJCo. The Cancer Genome Atlas (TCGA): an immeasurable source of knowledge. 2015;19(1A):A68.
75. Kommoss S, McConechy M, Kommoss F, Leung S, Bunz A, Magrill J, et al. Final validation of the ProMisE molecular classifier for endometrial carcinoma in a large population-based case series. 2018;29(5):1180-8.
76. McAlpine J, Leon-Castillo A, Bosse TJTJop. The rise of a novel classification system for endometrial carcinoma; integration of molecular subclasses. 2018;244(5):538-49.
77. Hussein YR, Broaddus R, Weigelt B, Levine DA, Soslow RAJjogpojotISoGP. The genomic heterogeneity of FIGO grade 3 endometrioid carcinoma: impacts on diagnostic accuracy and reproducibility. 2016;35(1):16.
78. Fadare O, Roma AA, Parkash V, Zheng W, Walavalkar VJAiap. Does a p53 “Wild-type” Immunophenotype Exclude a Diagnosis of Endometrial Serous Carcinoma? 2018;25(1):61-70.
79. Hussein YR, Weigelt B, Levine DA, Schoolmeester JK, Dao LN, Balzer BL, et al. Clinicopathological analysis of endometrial carcinomas harboring somatic POLE exonuclease domain mutations. 2015;28(4):505.
80. Bregar A, Deshpande A, Grange C, Zi T, Stall J, Hirsch H, et al. Characterization of immune regulatory molecules B7-H4 and PD-L1 in low and high grade endometrial tumors. 2017;145(3):446-52.
81. Nelson BH, McAlpine JNJGo. The more tumors change, the more they stay tame: Do T cells keep POLE ultramutated endometrial carcinomas in check? 2015;138(1):1-2.
82. Briggs S, Tomlinson IJTJop. Germline and somatic polymerase ϵ and δ mutations define a new class of hypermutated colorectal and endometrial cancers. 2013;230(2):148-53.
83. Konstantinopoulos PA, Matulonis UAJC. POLE mutations as an alternative pathway for microsatellite instability in endometrial cancer: Implications for Lynch syndrome testing. 2015;121(3):331-4.

84. Abdulfatah E, Wakeling E, Sakr S, Al-Obaidy K, Bandyopadhyay S, Morris R, et al. Molecular classification of endometrial carcinoma applied to endometrial biopsy specimens: Towards early personalized patient management. 2019.
85. Bellone S, Centritto F, Black J, Schwab C, English D, Cocco E, et al. Polymerase ϵ (POLE) ultra-mutated tumors induce robust tumor-specific CD4⁺ T cell responses in endometrial cancer patients. 2015;138(1):11-7.
86. Church DN, Stelloo E, Nout RA, Valtcheva N, Depreeuw J, ter Haar N, et al. Prognostic significance of POLE proofreading mutations in endometrial cancer. 2015;107(1).
87. Santin AD, Bellone S, Buza N, Choi J, Schwartz PE, Schlessinger J, et al. Regression of chemotherapy-resistant polymerase ϵ (POLE) ultra-mutated and MSH6 hyper-mutated endometrial tumors with nivolumab. 2016;22(23):5682-7.
88. Talhouk A, McConechy MK, Leung S, Yang W, Lum A, Senz J, et al. Confirmation of ProMisE: A simple, genomics-based clinical classifier for endometrial cancer. 2017;123(5):802-13.
89. Haruma T, Nagasaka T, Nakamura K, Haraga J, Nyuya A, Nishida T, et al. Clinical impact of endometrial cancer stratified by genetic mutational profiles, POLE mutation, and microsatellite instability. 2018;13(4):e0195655.
90. Bosse T, Nout RA, McAlpine JN, McConechy MK, Britton H, Hussein YR, et al. Molecular Classification of Grade 3 Endometrioid Endometrial Cancers Identifies Distinct Prognostic Subgroups. 2018;42(5):561-8.
91. Cosgrove CM, Trichtler DL, Cohn DE, Mutch DG, Rush CM, Lankes HA, et al. An NRG Oncology/GOG study of molecular classification for risk prediction in endometrioid endometrial cancer. 2018;148(1):174-80.
92. Van Gool IC, Ubachs JE, Stelloo E, de Kroon CD, Goeman JJ, Smit VT, et al. Blinded histopathological characterisation of POLE exonuclease domain-mutant endometrial cancers: sheep in wolf's clothing. 2018;72(2):248-58.
93. Britton H, Huang L, Lum A, Leung S, Shum K, Kale M, et al. Molecular classification defines outcomes and opportunities in young women with endometrial carcinoma. 2019;153(3):487-95.

94. Moroney MR, Davies KD, Wilberger AC, Sheeder J, Post MD, Berning AA, et al. Molecular markers in recurrent stage I, grade 1 endometrioid endometrial cancers. 2019;153(3):517-20.





