



T.C
AFYONKARAHİSAR
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**ENDOMETRİYUM KANSER VAKALARINDA HE-4 ve
KALPROTEKTİN SEVİYELERİ ile miRNA-9 ve miRNA-186
SEVİYELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ
Arş.Grv.Dr. Volkan SAVAŞ

DANIŞMAN
Prof.Dr. Ahmet KAHRAMAN
AFYONKARAHİSAR 2020

T.C.
AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKULTESİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

ENDOMETRİYUM KANSER VAKALARINDA HE-4 ve
KALPROTEKTİN SEVİYELERİ ile miRNA-9 ve miRNA-186
SEVİYELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Arş.Grv.Dr. Volkan SAVAŞ

DANIŞMAN

Prof.Dr. Ahmet KAHRAMAN

AFYONKARAHİSAR 2020

T.C
AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Tez Başlığı : Endometriyum Kanser Vakalarında HE-4 ve Kalprotektin Seviyeleri ile miRNA-9 ve miRNA-186 Seviyelerinin Değerlendirilmesi
Tez Hazırlayan : Arş.Grv.Dr. Volkan SAVAŞ
Tez Savunma Tarihi :
Tez Kabul Tarihi :
Tez Danışmanı : Prof. Dr. Ahmet KAHRAMAN

İş bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan

Prof. Dr. Ahmet KAHRAMAN

Üye

Prof. Dr. Güngör KANBAK

Üye

Prof. Dr. Sefa ÇELİK

DEKAN

Prof. Dr. Necip BECİT

Bu tez Afyon Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 19.TUS.003 Proje numarası ile desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Üstün tecrübesi, kapsamlı bilgisi, olağanüstü tahammülü ve çok kıymetli desteği ile bu tezin konusunun belirlenip çalışmamın yürütülmesinde eşsiz katkılarından dolayı öncelikle danışmanım ve Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı başkanı sayın hocam Prof. Dr. Ahmet KAHRAMAN'a, çalışmamın moleküler düzeyde olması ve çok fazla teknik zorlayıcı faktör barındırması sebebi ile karşılaştığım her güçlüğü aşmamda bana yol gösteren kıymetli hocam Prof. Dr. Sefa ÇELİK'e, laboratuvar tıbbı dalında değerli bilgilerini benimle paylaşan, fikirlerinden her an yararlandığım değerli hocam Prof. Dr. Tülay KÖKEN'e, tez hastalarımın seçimi konusunda yardımlarını esirgemeyen Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı öğretim üyesi değerli hocam Prof. Dr. Dağıstan Tolga ARIÖZ'e, tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Tez yazım aşamasında en zorlu anlarda varlığıyla beni cesaretlendirip devam etmemi sağlayarak olağanüstü sabır gösterip beni destekleyen sevgili eşim Kübra Tuğçe SAVAŞ'a sonsuz kez teşekkür ederim.

Laboratuvar eğitimin boyunca büyük alışma Őevki gösterip, her yerde bulunmayacak üstün iş ahlakıyla çalışan, güler yüzünü eksik etmeyen samimi biyokimya ailesine tüm kalbimle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	II
İÇİNDEKİLER	III
ŞEKİLLER.....	V
TABLolar	VI
KISALTMALAR	VII
I. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
II. GENEL BİGİLER	2
2.1. UTERUS ANATOMİSİ	2
2.2. UTERUS HİSTOLOJİSİ.....	3
2.3. UTERUS FİZYOLOJİSİ.....	4
2.4. ENDOMETRİYUM KANSERİ.....	6
2.4.1. EPİDEMİYOLOJİ	6
2.4.2. ETYOLOJİ VE RİSK FAKTÖRLERİ	9
2.4.3. KLİNİK.....	13
2.4.4. TANI.....	14
2.4.5. SINIFLANDIRILMASI.....	14
2.4.6. EVRELEME	16
2.4.7. HİSTOLOJİK GRADE DEĞERLENDİRMESİ	17
2.4.8. PROGNOZ.....	17
2.4.9. TEDAVİ.....	20
2.5. TESTLERİN KLİNİK KULLANIMI	21
2.5.1. TANISAL DOĞRULUK.....	21
2.5.2. DUYARLILIK (SENSİTİVİTE) VE ÖZGÜLLÜK (SPESİFİTE).....	22
2.5.3. POZİTİF PREDİKTİF DEĞER (PPD).....	24
2.5.4. NEGATİF PREDİKTİF DEĞER (NPD)	25
2.5.5. TEST ETKİNLİĞİ.....	25
2.5.6. OLABİLİRLİK ORANLARI.....	26
2.5.6.1. POZİTİF OLABİLİRLİK ORANI (LR+)	26
2.5.6.2. NEGATİF OLABİLİRLİK ORANI (LR-).....	26
2.5.6.3. TEST ÖNCESİ VE SONRASI OLMA ORANI	27
2.5.7. BAYES TEOREMİ.....	29

2.5.8. ARDIŞIK TESTLER	30
2.5.9. ROC EĞRİLERİ	31
2.6. miRNA'LAR	33
2.6.1. KODLANMAYAN RNA MOLEKÜLLERİ (ncRNA).....	33
2.6.2. miRNA NEDİR?	34
2.6.3. miRNA'LARIN KEŞİF SÜRECİ	35
2.6.4. miRNA OLUŞUMU (BİYOGENEZ).....	36
2.6.5. miRNA'LARIN FONKSİYONU	38
2.6.6. miRNA VE KANSER.....	39
2.6.6.1. TÜMÖR SUPRESÖR miRNA'LAR.....	40
2.6.6.2. ONKOJENİK miRNA'LAR.....	43
2.6.7. miRNA'DAN BEKLENTİLER.....	46
2.7. KANSER VE SERBEST RADİKALLER.....	46
2.8. TÜMÖR BELİRTEÇLERİ.....	49
III. GEREÇ VE YÖNTEM	51
3.1. ÖRNEKLERİN TOPLANMASI.....	51
3.2. miRNA İZOLASYONU.....	51
3.3. cDNA ELDESİ.....	53
3.4. RT-PCR AŞAMASI	54
3.5. ELISA ÖLÇÜMLERİ	57
3.5.1. KALPROTEKTİN ANALİZİ	57
3.5.2. HUMAN EPIDIDYMAL PROTEIN 4 (HE-4) ANALİZİ	57
3.5.3. SÜPEROKSİD DİSMUTAZ (SOD) ANALİZİ	58
3.5.4. MALONDİALDEHİD (MDA) ANALİZİ.....	58
3.5.5. REDÜKTE GLUTATYON (GSH) ANALİZİ	59
3.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	59
IV. BULGULAR.....	60
V. TARTIŞMA	67
VI. SONUÇ	75
VII. ÖZET	77
VIII. ABSTRACT	79
IX. KAYNAKÇA.....	81

ŞEKİLLER

Şekil 1. Uterus anatomisi	3
Şekil 2. Menstrüel Siklus	6
Şekil 3. Dünyada her iki cinsiyete ait kanser insidansları	7
Şekil 4. Dünyada Uterin korpus kanser insidans ve mortalite oranları	7
Şekil 5. Türkiye'de kanser dağılımı	8
Şekil 6. Türkiye'de kadınlarda kanser dağılımı.....	8
Şekil 7. Türkiye'de kadınlarda en sık görülen 10 kanser türü dağılımı (%).....	9
Şekil 8. Test sonucunu hasta ve sağlıklı grup arasındaki kestirim değeri belirler	23
Şekil 9. Test öncesi olasılığın test sonrası olasılığa etkisi	28
Şekil 10. Fagan nomogramı	30
Şekil 11. ROC eğrisi.....	32
Şekil 12. miRNA biyogenezi	38
Şekil 13. Normal dokularda miRNA fonksiyonu.....	41
Şekil 14. miRNA onkogen etkisi.....	44
Şekil 15. Melting curve analiz sonuçları (a: miRNA-9, b: miRNA-186, c: U6)	56
Şekil 16. Vaka ve kontrol grubuna göre miRNA fold change düzeyleri, (ortalama \pm std hata)	60
Şekil 17. Vaka ve kontrol grubuna göre belirteç düzeyleri (ortalama \pm std hata).....	61
Şekil 18. Doku miRNA-9 ve miRNA-186 ROC eğrileri.....	63
Şekil 19. Serum miRNA-9 ve miRNA-186 ROC eğrileri	64
Şekil 20. Serum miRNA'lar ve belirteçlerin ROC analizi.	65

TABLULAR

Tablo 1. Endometriyum hiperplazilerinin kansere ilerleme ihtimali	11
Tablo 2. Endometriyum kanser risk faktörleri	13
Tablo 3. Endometriyum kanserlerinin Bokhman sınıflaması	15
Tablo 4. Endometriyum kanserlerinin histolojik sınıflaması.....	16
Tablo 5. FIGO 2009 Endometriyum kanser evrelemesi	17
Tablo 6. Endometriyum kanserinde prognostik faktörler.....	18
Tablo 7. Çalışma ve Dernek Kılavuzlarında Yer Alan Risk Faktör Sınıflamalarındaki Farklılıklar.....	19
Tablo 8. Duyarlılık, özgüllük, PPD, NPD, test etkinliği hesaplanması.....	25
Tablo 9. Kodlanmayan RNA'ların Sınıflandırılması	34
Tablo 10. Primer dizileri.....	54
Tablo 11. cDNA reaksiyonunda bileşenler.....	54
Tablo 12. RT-PCR reaksiyon bileşenleri.....	55
Tablo 13. Forward (F) ve Reverse (R) primer dizileri	55
Tablo 14. Doku ve serum miRNA fold change verileri	60
Tablo 15. Gruplara göre belirteçlerin düzeyleri.....	61
Tablo 16. Testlerin normallik analizi	62
Tablo 17. Doku miRNA-9 ve miRNA-186 ROC eğrisinde AUC değerleri.....	64
Tablo 18. Serum miRNA-9 ve miRNA-186 ROC eğrisinde AUC değerleri	65
Tablo 19. Serum miRNA'lar ve diğer belirteçlerin AUC değerleri.....	66

KISALTMALAR

AGO2	: Argounate 2 proteini
AML	: Akut Miyeloid Lösemi
BRCA1	: Breast Cancer 1 geni
BRCA2	: Breast Cancer 2 geni
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EGFR	: Epidermal Growth Faktör Reseptörü
EK	: Endometriyum Kanseri
ESMO	: Avrupa Medikal Onkoloji Derneği
FIGO	: Uluslararası Jinekoloji ve Obstetri Federasyonu
FSH	: Folliküler Stimulan Hormon
GnRH	: Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
GOG	: Jinekolojik Onkoloji Grubu
HE-4	: İnsan Epididimal Protein-4
HNPCK	: Herediter Non-Polipozis Kolorektal Kanser
KLL	: Kronik Lenfositik Lösemi
LH	: Lüteinizan Hormon
LR	: Olabilirlik oranı
LVSI	: Lenfovasküler alan invazyonu
MI	: Myometriyal invazyon
miRNA	: Mikro RNA
mRNA	: Messenger RNA
ncRNA	: Kodlanmayan RNA (Non-Coding RNA)
NPD	: Negatif Prediktif Değer
NSAİİ	: Non-Steroid anti-inflamatuar ilaçlar
OD	: Otozomal Dominant
OKS	: Oral kontraseptif
ORF	: Okunmaya açık RNA bölgesi (open reading frame)

p53	: Tumor protein 53
PORTEC	: Endometriyal Kanserde Post-Operatif Radyasyon Tedavisi
PPD	: Pozitif Prediktif Değer
pre-miRNA	: Prekürsör miRNA
pri-miRNA	: Primer miRNA
PTEN	: Protein Tirozin Fosfataz ve tensin homolog geni
RISC	: RNA induced silencing complex
ROC	: ROC eğrisi (Receiver Operating Characteristics Curve)
RT-qPCR	: Ters Transkripsiyon kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SHBG	: Seks Hormon Bağlayıcı Globülin
USG	: Ultrason

I. GİRİŞ VE AMAÇ

Endometriyum kanseri tüm dünyada görülen jinekolojik kanserler içinde en sık olanıdır. Kadınlar içinde ise meme, akciğer, kolorektal kanserlerden sonra dördüncü sırada görülür (1,2). Beş yıllık sağ kalım ise %75'in üstündedir (3).

Endometriyum kanserinin erken tanınması da diğer tüm kanserlerde olduğu gibi morbidite ve mortalite açısından önemlidir. Ancak endometriyum kanseri için yüksek risk taşıyan vakaların belirlenmesinde non-invaziv etkili bir yöntem henüz yoktur (2). Günümüzde tanıda altın standart olarak transvaginal USG, endometrial örnekleme, biyopsi ve dilatasyon-küretaj materyali kullanılmaktadır. Bu yöntemler invazif girişimler olması sebebiyle komplikasyonları da beraberinde getirebilmektedir (1). Vakaların büyük çoğunluğu (%70) erken evrede anormal kanama gibi semptomlarla teşhis edilebilirken diğer kısmı da (%30) asemptomatik seyredip ileri evrelerde teşhis edilebilmektedir (1,2). Amacımız endometriyum kanseri için yüksek risk taşıyan ancak asemptomatik olan vakaları ve tedavi sonrası rekürrensleri non-invazif yöntemlerle hızlı bir şekilde tanıyabilmektir.

Hem asemptomatik hem de endometriyum kanseri için yüksek risk taşıyan vakaları non-invaziv olan yöntemlerle belirlemek için son yıllarda serumda ölçülebilen bazı yeni belirteçler ortaya çıkmıştır (1-3). Özellikle doku ve serumda ölçülebilen seviyede olduğu gösterilmiş miRNA'lar bu konuda umut vadetmektedir (4,5). Bu çalışmada, yeni belirteçlerden miRNA-9 ve miRNA-186'nın doku ve serum düzeyinde ölçümleri ile son yıllarda ortaya çıkıp potansiyel tümör belirteç özelliği olan serum insan Epididimal protein-4 (Human Epididymal Protein 4, HE-4) ve akut faz proteinlerinden olan serum kalprotektin seviyelerinin karşılaştırılıp endometriyum kanseri için yüksek risk taşıyan vakaların belirlenmesindeki performansını belirlemek amaçlanmıştır.

II. GENEL BİGİLER

2.1. UTERUS ANATOMİSİ

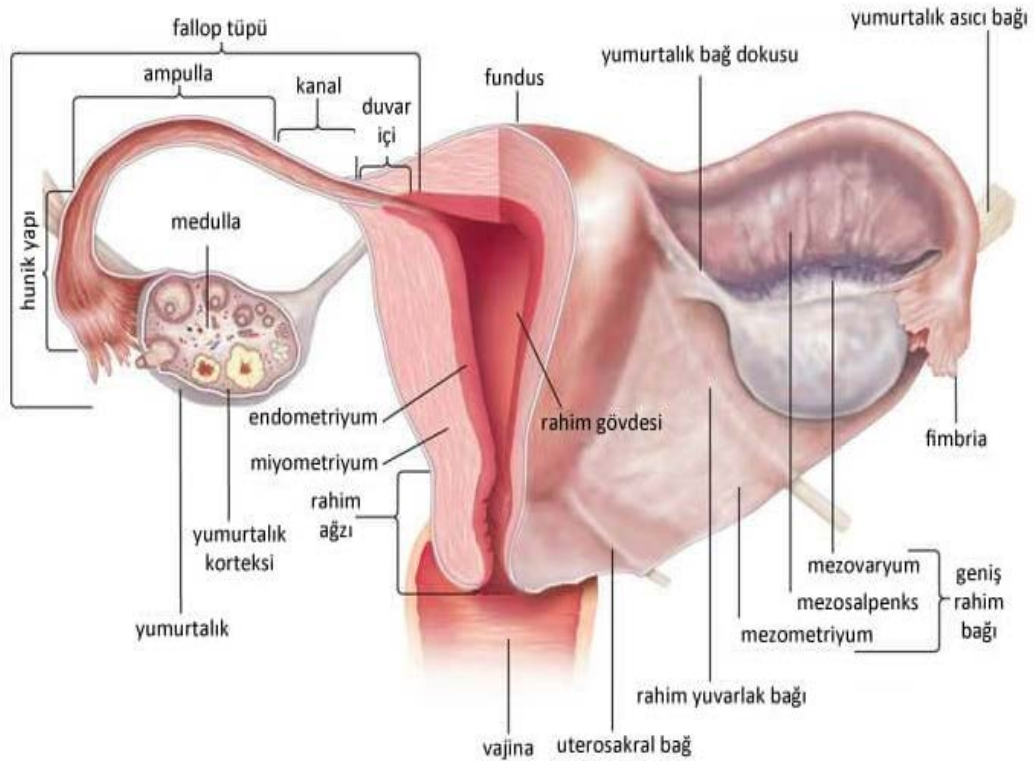
Uterus, pelvis boşluğunda, önünde mesane, arkasında rektumun yer aldığı bir organdır (6). Uterus boyutu yaş ve hormonal faktörlere göre değişkenlik gösterir. Erişkin nulliparlarda (doğum yapmamış) 8 cm uzunluğunda, 5 cm genişliğinde ve 2,5 cm kalınlığında olup, 60 gram ağırlığındadır (7). Uterus anatomik olarak fundus, korpus, istmus ve serviks olmak üzere dört bölümde incelenir (8). Fundus, uterusun en üst bölümüdür ve tuba uterinaların uterusu açıldıkları seviyenin üzerinde kalır. Korpus, uterusun esas parçası olup tuba uterinaların uterusu açıldıkları seviyeden istmusa kadar uzanır. İstmus serviks ve korpusu birleştiren kısımdır (6). Serviks, vajinada sona eren uterusun son bölümüdür. Uterus içindeki alan kavum uteri olarak isimlendirilir. Kavum uteri üstte fallop tüpleri vasıtası ile periton boşluğuna, altta servikal kanal vasıtası ile de vajinaya açılır. Servikal kanalın uterus boşluğuna açılan bölümü internal os, vajinaya açılan bölümü ise eksternal os olarak isimlendirilir. Uterus, uterovesikal çıkmazla mesaneyle, douglas çıkmazı ile de ileum ve kolon ile komşuluk yapar. Her iki yanda ligamentum latum uteri, a.v. uterina ve ureterler ile komşuluk yapar (Şekil 1).

Uterusu tesbit eden beş adet bağ mevcuttur. Ligamentum latum uteri; uterusun etrafını saran peritondan meydana gelir, uterusu pelvisin iç yan duvarlarına asarak paryetal periton olarak devamlılık gösterir. Ligamentum rotundum (ligamentum teres uteri); uterusun yan taraflarından başlayıp inguinal kanaldan geçerek labium majore uzanır. Ligamentum kardinale (Mackenrodt bağı) serviks ile vajinanın üst kısmını pelvis iç yan duvarlarına bağlayan fibromusküler dokudan yoğun olan pelvik fasyanın bir bölümüdür. Ligamentum uterosakrale, serviks ve sakrum arasında uzanan fibromusküler dokudur. Ligamentum puboservikale uterusu alttan destekler (6).

Uterus bilateral a.iliaca interna dalı olan uterin arter ve a. abdominalis dalı olan a. ovarica ile beslenir. Uterin ven, arterlere eşlik ederek v.iliaca interna'ya dökülür (6).

Fundusun lenf drenajı a. ovarica ile seyrederek L1 vertebra hizasında paraaortik lenf nodlarına drene olur. Korpus ve serviks lenfatikleri ise internal ve eksternal iliak lenf nodlarına drene olur (6). Bazı lenf damarları da ligamentum rotundum boyunca devam ederek süperfisyel inguinal lenf nodlarına drene olur.

Uterus sempatik lifleri T12 ve L1'den, parasempatik lifleri de S2-S4'den gelir (6). Sempatik innervasyon uterusu ve damarlarında kasılma, parasempatik lifler ise gevşemeye neden olurlar.



Şekil 1. Uterus anatomisi (8).

2.2. UTERUS HİSTOLOJİSİ

Uterus duvarı nispeten kalın olup, üç tabakadan meydana gelir. En dışta bulunan uterus bölümüne tunika serosa, ortadaki kalın kas tabakası tunika muscularis (miyometriyum) ve en içteki mukoza tabakası tunika mucosa (endometriyum) dır.

➤ Tunika serosa (Perimetrium):

Uterusu örten periton, arkada korpus ve serviksin supravajinal kısmını, önde ise yalnızca korpusu örter. İnce bir bağ dokusu ile desteklenmiş, tek sıra mezotel hücrelerinden ibarettir.

➤ Tunica muscularis (Miyometriyum):

Uterus yapısının büyük bir kısmını oluşturur. Düz kas tabakasından oluşan uterusun en kalın tabakasıdır. Kas demetleri arasında kan damarları, lenf damarları ve sinirlerden zengin bir bağ dokusu vardır. Servikste ki kas lifleri korpusa nazaran daha fazla kollajen ve elastik fibril içerir (4). Gebelik döneminde, kas liflerinin hacmi ve kitlesi artar. Bu tabaka doğumda kuvvetli kontraksiyonlar oluşturarak fetüsün dışarı atılmasını sağlar.

➤ Tunica mucosa (Endometrium):

Uterusun mukozası tuba uterina'ların fimbrialarının bulunduğu uca kadar uzanır. Altta da vajinanın mukozası ile devam eder. Endometrium, epitel ile basit tübüler bezler içeren lamina propriadan oluşur. Epitel tek katlı prizmatik olup silyalı hücreler ile sekretuar hücrelerden oluşur. Lamina proprianın bağ dokusu fibroblastlardan zengindir. Endometrium, ovaryan siklus nedeniyle devamlı değişir. Siklus boyunca proliferasyon, deskuamasyon ve rejenerasyon evrelerinden geçer (9).

2.3. UTERUS FİZYOLOJİSİ

Endometriumun başlıca işlevi, geç blastokist dönemindeki zigotun gömülmesi için ortam hazırlamak ve plasentanın anneye ait olan kısmını oluşturmaktır. Ovaryum siklusu ile eş zamanda ve ovaryumdan salgılanan hormonlara bağlı olarak endometriyum, yapısal ve işlevsel değişimler gösterir.

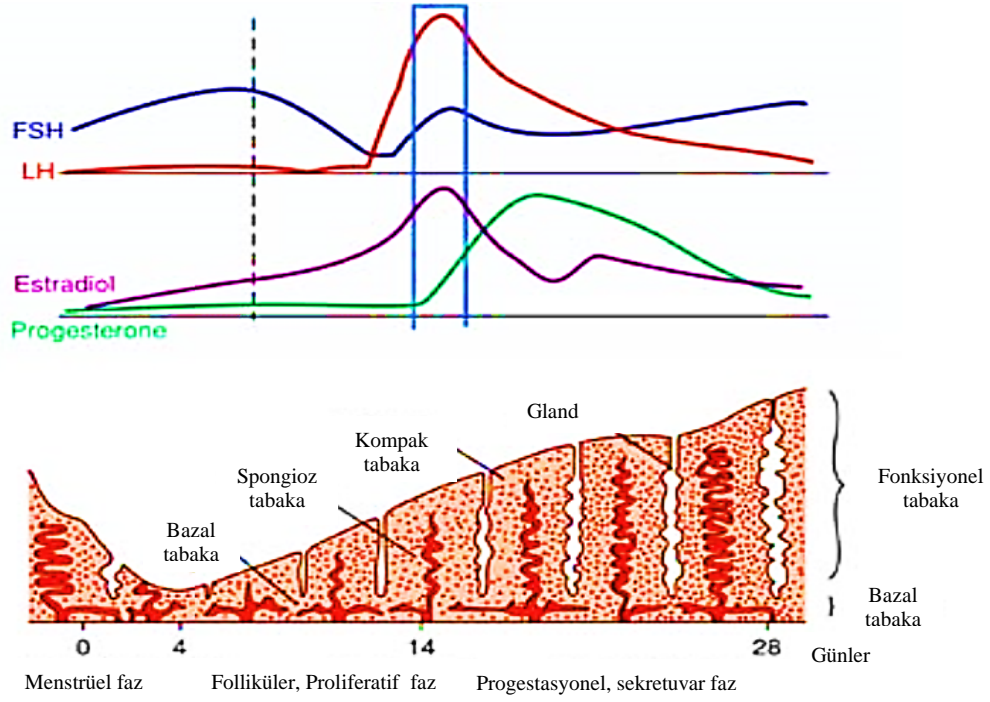
Normal menstrüel siklusun gerçekleşebilmesi için hipotalamus, hipofiz, overler arasındaki hormonal ilişkiye ve bu hormonların etkilerini gösterebilmeleri için normal anatomik gelişim gösteren endometriyum, serviks ve vajene ihtiyaç vardır. Hipotalamus'dan pulstatil olarak salgılanan GnRH, adenohipofizden FSH ve LH salınımını uyarır. FSH folikül gelişimini uyarırken granülosa hücrelerinden de östrojen

salınımını uyarır. LH ise teka hücrelerinden androstenedion sentezlenmesini sağlar ve pik yaparak olgunlaşan folikülün yırtılmasını sağlayarak ovumun atılmasını sağlar. Daha sonra yırtılmış folikülün korpus luteuma dönüşüp progesteron sentezlemesini sağlar. Bu hormonal değişimler sırasıyla ovaryuma göre foliküler ve lüteal fazları ifade eder. Bu fazlar endometriyumda ise proliferatif ve sekretuar fazlara karşılık gelir. Normalde endometriyum iki tabakadan oluşur (Şekil 2);

- Zona fonksiyonalis: Her menstrüasyon sonrası dökülen endometriyumu ifade eder. İki tabakadan oluşur, pars kompakta ve pars spongiosa.
- Zona basalis: Endometriyumun en derin tabakasıdır. Menstrüasyon esnasında dökülmez. Menstrüasyondan sonra dökülen endometriyumun rejenerasyonu için bu tabakada proliferasyon olur.

Menstrüasyon döngüsü boyunca endometriyumdaki değişiklikler dört faza ayrılır (10);

- Proliferatif Faz: Östrojenin etkisi ile endometrial glandlar proliferer olur. Östrojenlerin en potent formu 17β estradiol bu dönemde bezlerde meydana gelen proliferasyondan ve progesteron reseptör sentez artışından sorumludur. Psödostratifikasyon bu dönemde meydana gelir.
- Sekretuar faz: Ovulasyon sırasında salgılanan progesteron etkisi ile endometrial glandlarda glikojen sekresyonu ve stromal ödem gelişir ve glikojen depolanmasına bağlı subnükleer intra stoplazmik vakualizasyon meydana gelir. Eğer blastokist implante olursa enerji kaynağı bu glikojenden sağlanır.
- Desidual faz: Eğer gebelik meydana gelirse korpus luteum dejenerer olmaz ve progesteron salgılamaya devam eder. Yüksek doz progesteron endometriyumda stromal hücrelerde desidual reaksiyona neden olur. Gebelik endometriyumuna desidua denir. Hormonal olarak çok aktiftir. Özellikle sentezlediği prolaktin ile amniyon sıvısının sıvı-elektrolit regülasyonunda görevlidir.
- Menstrüel faz: Progesteronun çekilmesi ile spiral arterlerde oluşan vazospazm sonucunda endometriyum fonksiyonel kısmının iskemik nekroza bağlı dökülmesidir (9)

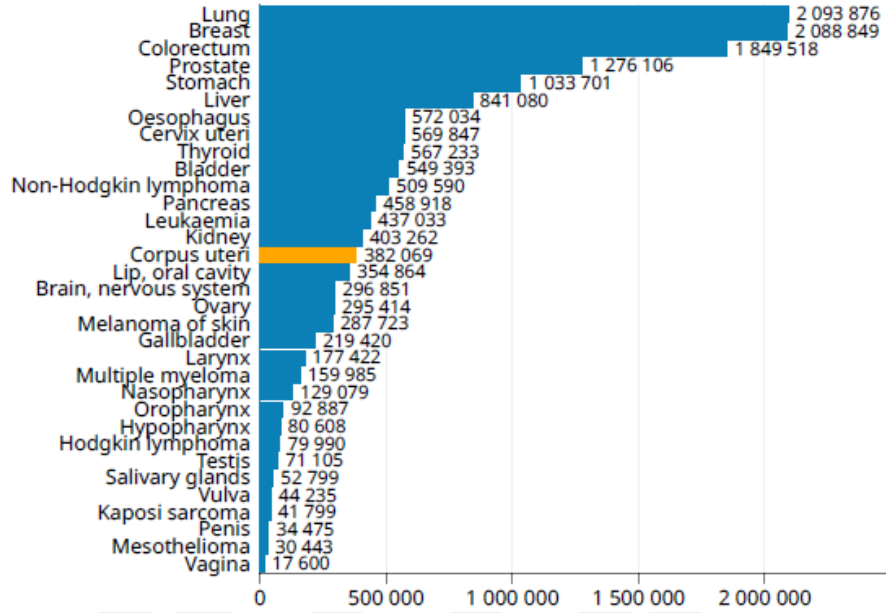


Şekil 2. Menstrüel Siklus (10).

2.4. ENDOMETRİYUM KANSERİ

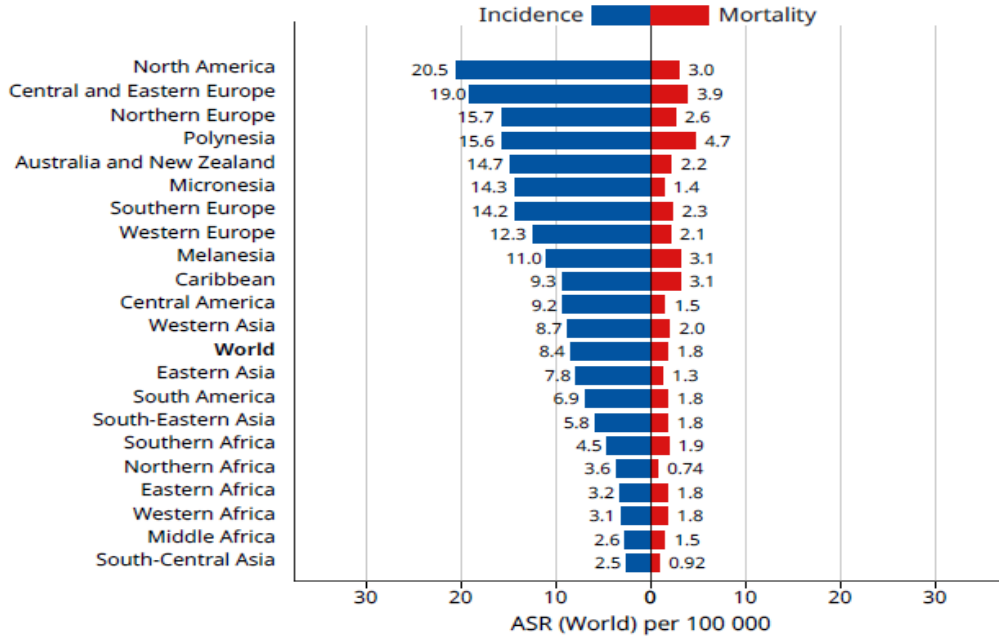
2.4.1. EPİDEMİYOLOJİ

Endometriyum kanseri (EK), tüm kanserler içinde en sık on beşinci (şekil 3), kadınlarda dördüncü, jinekolojik kanserler içinde ise en sık görülen malignite olup, majör morbidite ve mortalite sebebi olması yönüyle kadın hayatında oldukça önemli bir yere sahiptir (11). İnsidans bölgeler arasında farklılık göstermekle birlikte dünya çapında 2018 yılında yaklaşık 382.069 yeni vaka tanı almıştır (Şekil 3)(12).



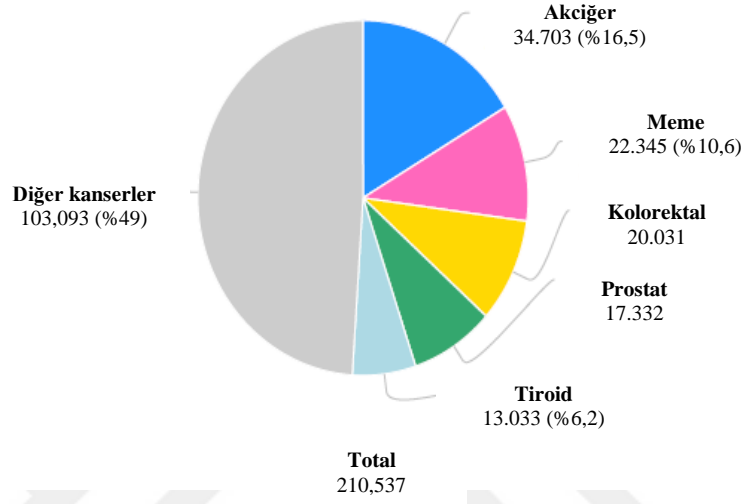
Şekil 3. Dünyada her iki cinsiyete ait kanser insidansları (12).

Dünyada, 2018 Globocan istatistik verilerinde insidans 8.4/100.000, mortalitesi ise 1.8/100.000 olarak belirtilmiştir (Şekil 4).



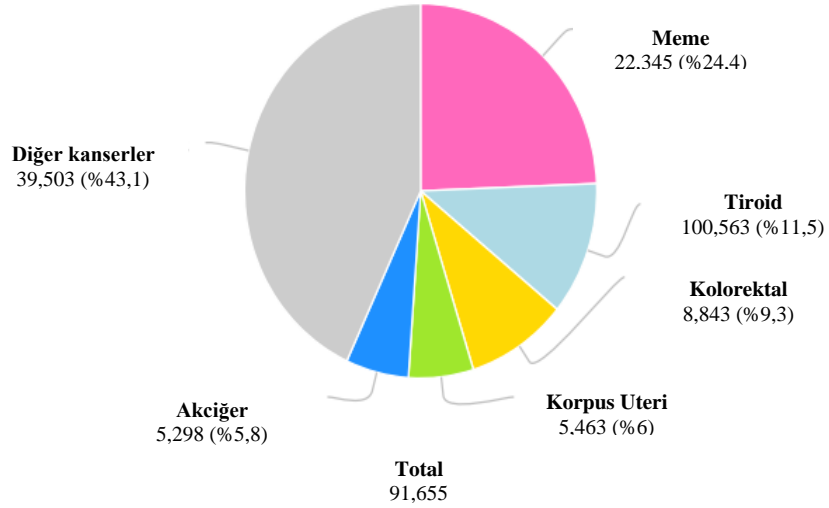
Şekil 4. Dünyada Uterin korpus kanser insidans ve mortalite oranları (12).

Türkiye’de ise 2018 Globocan verilerine göre genel olarak yeni kanser vakaları sayısı 210.537 olarak belirtilmiştir (Şekil 5).



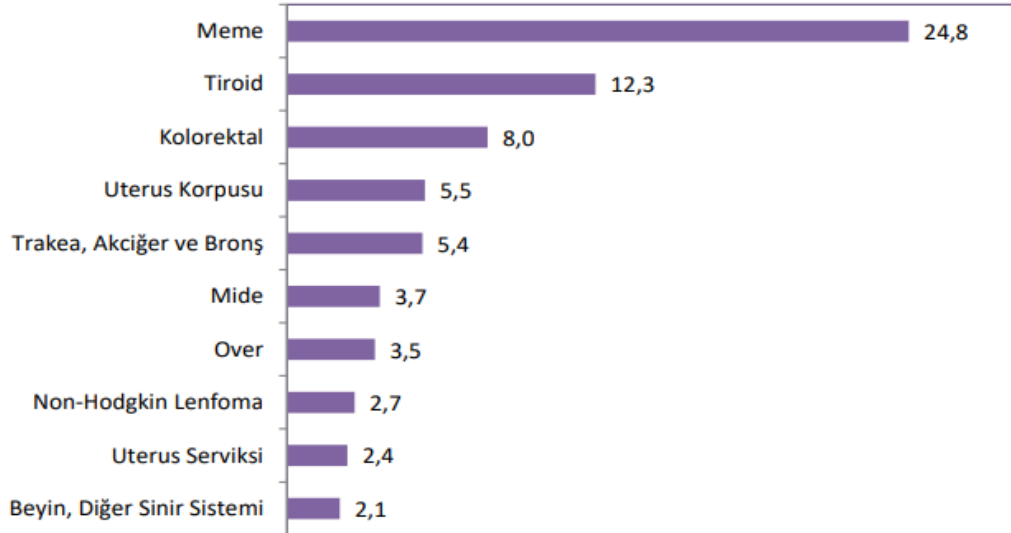
Şekil 5. Türkiye’de kanser dağılımı (13).

Uterin korpus kanseri olarak yaklaşık 5463 yeni vaka tanı almıştır (Şekil 6) (13).



Şekil 6. Türkiye’de kadınlarda kanser dağılımı (13).

Türkiye Halk Sağlığı kurumunun 2016 yılı verilerine göre ise uterin korpus kanserleri ülkemizde kadınlarda en sık görülen kanserlerden 4. sırada olanıdır (şekil 7).



Şekil 7. Türkiye’de kadınlarda en sık görülen 10 kanser türü dağılımı (%).

Endometrium kanseri esas olarak perimenopozal ve postmenopozal yıllarda kadınları etkiler ve en sık 50-65 yaş arası kadınlarda teşhis edilir (14) . Bununla birlikte bu kanserler üreme çağında genç kadınlarda da gelişebilir. Olguların yaklaşık %5'ine 40 yaşından küçük kadınlarda ve yaklaşık %10 ile %15'ine 50 yaşından küçük kadınlarda teşhis konur (15). 50 yaş altında tanı alan kadınlar senkron yumurtalık kanseri olma riski altındadır (16).

2.4.2. ETYOLOJİ VE RİSK FAKTÖRLERİ

Genç premenopozal kadınlarda görülen tipte çoğunlukla ekzojen veya endojen kaynaklı karşılanmamış östrojen öyküsü vardır. Birçok çalışmada da östrojen kullanımının endometrium kanser riskini arttırdığı ve bu riskin östrojen dozu ve kullanım süresi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (17,18). Bu tümörler hiperplastik endometrium zemininden kaynaklanıp endometrial karsinoma dönüşür. Bu tür östrojen bağımlı tümörler daha iyi diferansiyedir ve prognozları daha iyidir. Kötü prognostik subtipler, östrojen kullananlarda daha az sıklıkta görülür. Östrojen bağımsız tümörler

ise postmenapozal, yaşlı kadınlarda daha sık görülür. Bu tip tümörlerin endometrial hiperplazi ile ilişkisi olmadığı gibi atrofik endometrium zemininden de kaynaklanabilir. Genellikle az diferansiye olup, kötü prognoz gösterirler. Nulliparite, obezite ve geç menopoza klasik olarak endometrium kanseri ile ilişkili olarak bilinir. Nullipar ve obez bir kadın geç menopoza girmişse endometrium kanseri (EK) gelişme riski artar (19,20). Endometrium kanserli hastaların yaklaşık dörtte biri nullipardır.

Obezite endometrium kanseri yönünden majör bir risk faktörü olarak belirlenmiştir. Obezite özellikle postmenapozal kadınlarda adrenal ve over kaynaklı androstenediondan östron oluşumu ve periferik yağ dokuda androjenlerin östradiole aromatisasyonu sonrası östrojen sentezini arttırarak risk artışına sebep olur (21,22). Aynı zamanda vücut ağırlığı arttıkça seks hormon bağlayıcı globülin (SHBG) seviyeleri azalır ve proteine bağlı olmayan aktif östradiol'un seviyesi artar. Böylece progesteronla karşılanmamış östrojen miktarında artışa sebep olarak EK riskinde artışa neden olmaktadır (23). Ayrıca, obez kadınlarda yüksek insülin seviyesinin mitojenik ve hücre ölümünü engelleyici etkisi, artmış EK riski ile ilişkili bulunmuştur (24).

Polikistik over, fonksiyone over tümörleri, geç menopoza gibi uzun süre östrojen maruziyeti durumlarında endometrium kanseri riski artar. Kronik anovulasyona sebep olan Polikistik over sendromu ve tiroit fonksiyon bozuklukları da endometrium kanseri için risk taşır (25).

Beyazlarda insidans siyahilere göre daha fazladır, ancak prognoz daha iyidir. Siyahilerde genellikle 70 yaşından sonra görülür ve çoğunlukla kötü prognozludur (26).

Diyabet de endometrium kanseri ile ilişkili olarak bilinir. Endometrium kanserli hastaların %40'ında diyabet vardır. Diğer faktörler kontrol altına alındığında diyabetik hastalarda endometrium kanseri rölatif riski 2,8'dir (27).

Tamoksifen meme dokusunda östrojenin etkisini azalttığından meme kanserinde adjuvan tedavi olarak kullanılan selektif östrojen reseptör modülatörüdür. Meme dokusunda östrojenin antagonisti, endometrial doku ve kemikte ise östrojen agonisti gibi davranarak EK riskini 2-3 kat arttırdığı gösterilmiştir (28).

Endometriyal hiperplaziler kansere öncü olabilen ve karşılanmamış östrojen etkisi sonucu ortaya çıkan ve patolojik inceleme ile tanı konan bir durumdur. Bunlar basit atipisiz, kompleks atipisiz, basit atipili, kompleks atipili olmak üzere Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından 4 sınıfa ayrılmıştır (Tablo 1).

Tablo 1. Endometriyum hiperplazilerinin kansere ilerleme ihtimali

Subtipler	Kansere ilerleme ihtimali (%)
Basit hiperplazi	1
Kompleks hiperplazi	3
Basit atipik hiperplazi	8
Kompleks atipik hiperplazi	29

Atipik endometrial hiperplazi bulunan hastalarda endometrium kanser riski 8-29 kat artar (29). Birinci derece akrabalarda EK varlığı, EK riskini arttırmaktadır (30). Endometriyum kanserinin genetik predispozan hastalıkların başında herediter non poliposiz kolorektal kanseri (HNPCK) gelmektedir. Otozomal dominant geçen HNPCK Lynch 2 sendromu olarak da bilinmektedir. Lynch 2 sendromu EK'nin %2-5'inde mevcuttur. Lynch 2 sendromu DNA mismatch tamir genlerindeki bir mutasyon sonucu meydana gelir (31). Mismatch tamirine katılan Mut L homolog 1 ve 2 (MLH-MLH2) genlerinin mutasyonları, Lynch Sendromunun temel sebebidir. Mutasyona uğrayan diğer genler ise Mut S homolog 2 ve 6 (MSH2-MSH6) ile mayoz sonrası ayrıştırıcı protein 2 (postmeiotic segregation increased 2-PMS2) olup bunlar da yanlış eşleşme tamir mekanizmasının genleridir (32). Lynch 2 sendromlu bir kadında yaşam boyu EK gelişme riski %27-71 arasındadır (30). Endometriyal kanserle yumurtalık kanseri eş zamanlı gelişirken, kolon kanseri erken gelişir (33). Meme kanser antijen 1 ve 2 (Breast Cancer antigen 1,2-BRCA1,BRCA2) genlerinin mutasyon taşıyıcıları artmış meme ve over kanser riskine sahiptir, fakat endometriyal kansere yol açmadığı

bildirilmiştir (32). Cowden Sendromu, tümör baskılayıcı bir gen olan protein tirozin fosfataz ve tensin homolog gen (PTEN) mutasyondan kaynaklanmaktadır (34).

PTEN fonksiyonunun kaybı ile PI3k/Akt/mTOR yolağı yeniden düzenlenir ve hücre gelişimine sebep olur (35). Otozomal dominant kalımlı Cowden Sendromu endometriyal kansere yol açabilir. Bu sendromu taşıyan kadınların endometriyal kanser riskinin % 5-10, etkilenmeyen kadınların endometriyal kanser riskinin ise % 2-3 olduğu yapılan çalışmalarda belirtilmektedir (33). Endometriyal kanserde p53 yolağı da baskılanmış veya fazla aktive edilmiştir. Stres altındaki hücrelerde tepki olarak aktifleşen p53 sinyal yolağı, DNA tamiri ve hücre siklusunun durdurulmasını ayrıca apoptozu da başlatıp tümör oluşumunun baskılanmasını sağlamaktadır (36). p53 mutasyonu ya da fazla ekspresyonu sonrası işlevsel olmayan p53 proteinleri hücre içinde birikerek işlevsel p53 proteinlerinin inhibitörü gibi davranır, bu durum kanser hücrelerinde apoptozun engellenmesine sebep olur (37). Mutant p53'ün fazla ekspresyonu ile kanser daha da agresifleşir (38). Her2/neu insan epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR) tirozin kinaz ailesinden bir transmembran glikoproteindir. EK'nin daha çok seröz tipinde görülmekle beraber genel sağ kalıma olumsuz etki eden bir risk faktörüdür (39,40).

Bütün bu risk faktörlerine ek olarak sigara kullanımı, doğum sayısı, fiziksel aktivite, diyet, doğum kontrol hapları ve progesteron içeren hormon replasman tedavileri EK riskini azaltmaktadır. Sigara kullanımı postmenapozal kadınlarda EK gelişimini azalttığına dair veriler bulunmaktadır. Bu etki östrojenlerin karaciğerdeki metabolizmasını artırarak östrojeni azalttığı içindir (41). Yapılan çok sayıda çalışmaya göre kombine oral kontraseptif (OKS) kullanımı endometrium kanseri gelişme riskini azaltır. Belli bir süre OKS kullanan kadınlarda hiç kullanmayanlara göre endometrium kanseri gelişmesinde rölatif risk 0,5 olarak bulunmuştur. OKS kullanımının koruyucu etkisi kullanımdan 1 yıl sonra başlar ve kestikten 15 yıl sonraya kadar devam etmektedir (15). Non steroid antiinflamatuvar (NSAİİ) ilaçlar siklooksijenaz enzim inhibisyonu yaparak prostoglandin üretimini ve inflamasyonu azaltır. Kronik

inflamasyonun karsinogenez üzerindeki etkisi ise kronik inflamasyon sonucunda ortaya çıkan sitokinlerin hücrel cevabı baskılması ve anjiogenezi artırması ile açıklanabilir (39)(40). Fiziksel aktivite ile EK riskini azaltması; kilo kaybı, SHBG düzeylerinin artması ve aktif östrojen seviyelerinin azalması ile açıklanabilir (Tablo 2)(42).

Tablo 2. Endometriyum kanser risk faktörleri

Risk arttıranlar
1. Obezite
2. Diyabet
3. Nulliparite
4. Düşük parite
5. Erken menarş, Geç menopoza (52 yaş sonrası)
6. Progesteronla birlikte olmayan östrojen kullanımı
7. Aile öyküsü
8. Hayvansal yağ alımı
9. Anovulatuvar infertilite
10. Östrojen salgılayan tümörlerin varlığı
11. Tamoksifen kullanımı
Risk azaltanlar
1. Ovulasyon
2. 49 yaş öncesi menopoza
3. Progesteron terapisi
4. OKS
5. Multiparite
6. Sigara

2.4.3. KLİNİK

Anormal vajinal kanama, endometriyal hiperplazinin en sık görülen semptomudur. Bazen vajinal akıntı ve pyometra ile de birlikte olabilen anormal vajinal kanama, EK'li hastaların yaklaşık %90'ında görülebilmektedir. Genç hastalarda hiperplazi anovulatuvar döngüler sırasında gelişebilir ve hatta uzamış oligomenore veya amenore dönemlerinden sonra bile tespit edilebilir. Üreme yıllarında herhangi bir zamanda ortaya çıkabilir ancak çoğunlukla perimenopozal dönemde görülür (15). Vakaların çoğu, düzensiz vajinal kanamaya bağlı olarak erken tanı almaktadır. Ancak, ileri evre hastalıkta, belirtiler over kanserindeki gibi, abdominal gerginlik, pelvik ya da abdominal ağrı şeklinde olabilmektedir (11). Uzak organ metastazı ise %9 oranında

görülürken, komşu organlara ve lenf noduna metastaz %21 oranındadır (43).

Bir kadının ömrü boyunca EK geçirme ihtimali %2-3 olarak bilinmektedir (44). Beş yıllık sağ kalım ise erken evre hastalarında %90 civarında iken, ileri evrede bu oran %20'ye düşmektedir (45).

2.4.4. TANI

Endometriyum kanseri tanısında anamnez ve fizik muayene bulguları önemlidir. Hastalar genelde kanama ile başvurduğundan pelvik muayenede normal değerlendirilir ve ileri inceleme ile genelde erken evrede tanı alırlar. Pelvik muayenede özellikle servikal tutulum, vajinal metastaz ve adneksiyal tutulum değerlendirilmelidir. Anamnezde endometrial risk faktörleri ve ailede endometriyum, over ve meme kanseri varlığı sorgulanmalıdır. Genellikle ilk olarak pelvik veya transvajinal ultrason görüntüleme (USG) ile uterusun yapısı, endometriyum kalınlığı değerlendirilip anormal uterin kanamaya neden olabilecek diğer patolojiler dışlanabilir. EK'nin kesin tanısı genellikle pipelle endometriyal örnekleme ya da dilatasyon-küretaj ile endometriyal biyopsi veya histerektomi materyalinin patolojik incelenmesi ile konur (46,47).

2.4.5. SINIFLANDIRILMASI

Endometriyum kanserleri farklı histolojik özellikler sergilemesine rağmen, %95'den fazlası iki ana gruba ayrılabilir (48). 1983 yılında Bokhman tarafından ileri sürülen ve günümüzde de kullanılan sınıflandırma sistemine göre endometriyum kanseri, histolojik ve moleküler özelliklerine göre iki tipe ayrılmıştır; Endometrioid adenokarsinomlar olarak ifade edilen tip 1 ve non-endometrioid adenokarsinomlar olarak ifade edilen tip 2 (Tablo 3)(49). EK'nin bu iki tipi; insidans, östrojen progesteron reseptörü bulunması ve prognoz gibi özellikler açısından farklıdır (50). Östrojenik stimulus ile ilişkili olduğu bilinen tip 1 tümör oluşumu, premenopozal ya da perimenopozal dönemde daha sıktır; risk faktörleri arasında östrojene maruziyetin

olduğu infertilite, obezite, anovulasyon, geç menopoz gibi durumlar mevcuttur (51). Endometriyum kanserlerinin %80'ini temsil eden tip 1 tümörleri; skuamöz diferansiasyonun birlikte olduğu veya olmadığı adenokarsinomlar oluşturur ve genellikle iyi diferansiye tümörlerdir.

Tablo 3. Endometriyum kanserlerinin Bokhman sınıflaması

	Tip 1	Tip 2
İlişkili klinik zellikler	Metabolik sendrom: obezite, hiperglisemi, hiperlipidemi ve artmış östrojen düzeyleri	--
Tümöral grade	Düşük	Yüksek
Hormon reseptör ekspresyonu	Pozitif	Negatif
Histoloji	Endometrioid	Non-endometrioid (seröz, berrak hücreli karsinom)
Genomik stabilite	Diploid, Mikrosatellit instabilite sık (%40)	Anöploid
TP53 mutasyonu	Yok	Var
Prognoz	İyi (5-yıllık toplam sağ kalım %85)	Kötü (5-yıllık toplam sağ kalım %55)

Tip 1 endometriyal tümörlerin; basit endometrial hiperplazi ile başlayarak, ardından kompleks atipik hiperplazi ve endometriyal intraepitelyal neoplazi formasyonu oluştuğu ileri sürülmektedir (50). Tip 1 endometrial kanserlerin tanısı sıklıkla erken evrelerde konulur ve prognozu iyi olarak belirtilmektedir (52). Tip 2 olan non-endometrioid tümörler, endometriyum kanserlerinin %10-20'sini oluşturur. Histolojik subtipleri araştırıldığında büyük çoğunluğu uterin papiller seröz karsinom ve berrak hücreli karsinomdan oluşur. Atrofik endometriyumdan türeyen lezyon olan endometrial glandular displazi formasyonu görülmektedir (50). Tip 2 tümörler malesef geç dönemde tanı almaktadır ve kötü prognoza sahiptir (53).

Tip 1 EK'nin %20'sinin nüks etmesi ve tip 2 kanserlerin de %50'sinde nüks görülmemesi nedeniyle bu sınıflamanın prognostik değeri sınırlıdır. Ayrıca EK'nin %15-20'si yüksek gradeli lezyonlardır ve bu sınıflamaya göre hangi tipe uyduğu belirsizdir (54). Dünya Sağlık Örgütü'nün 2014 yılındaki sınıflamasına göre endometriyum kanseri mikroskobik yapılarına göre 9 histolojik sınıfa ayrılmaktadır (Tablo 4)(55).

Tablo 4. Endometriyum kanserlerinin histolojik sınıflaması

-
1. Endometrioid adenokarsinom
 - Skvamöz diferansiyonlu varyant
 - Villoglandüler varyant
 - Sekretuar varyant
 - Silli hücreli varyant
 2. Müsinöz adenokarsinom
 3. Seröz adenokarsinom
 4. Skvamöz hücreli karsinom
 5. Berrak hücreli adenokarsinom
 6. Mikst hücreli adenokarsinom
 7. Küçük hücreli karsinom
 8. Transisyonel hücreli karsinom
 9. Undiferansiye karsinom
-

Daha önce de bahsedildiği gibi endometriyum kanserleri farklı histolojik özellikler sergilemesine rağmen, %95'den fazlası iki klinikopatolojik gruba ayrılmaktadır (48). Bu sınıflamaya göre kanserin klinik özellikleri, davranışı ve prognozu öngörülebilir.

2.4.6. EVRELEME

Endometriyum kanser evrelemede FIGO evreleme sistemi kullanılmaktadır. İlk olarak 1970 yılında yapılan evrelemede pre-operatif olarak değerlendirilen vakanın endometriyum biyopsi ve fizik muayene bulgularına göre evreleme yapılmıştır. Yapılan çalışmalar bu klinik evrelemenin yetersiz olduğunu göstermiştir (56). Uterus kanserlerinde cerrahi ve patolojik evreleme kriterleri içeren FIGO evreleme sistemi 2009 yılında revize edilmiştir (Tablo 5)(57). Peritoneal sitoloji FIGO 2009 evreleme sisteminde bulunmamasına rağmen prognozu etkilemesinden dolayı yapılması önerilmektedir (58,59).

Tablo 5. FIGO 2009 Endometriyum kanser evrelemesi

Evre I	Uterin korpusta sınırlı tümör
IA	Myometriyal invazyon yok ya da %50'den az invazyon
IB	Myometriyal invazyon %50 ya da daha fazla
Evre II	Servikal stromal tutulum *
Evre III	Seroza, adneks, vajina veya parametrium tutulumu
IIIA	Tümör uterin serozaya ulaşmış ve/veya adnekslerde tutulum mevcut
IIIB	Vajinal ve/veya parametrial tutulum mevcut
IIIC	Pelvik ve/veya para-aortik lenf nodlarına metastaz
IIIC1	Pelvik lenf nodu tutulumu
IIIC2	Pelvik lenf nodu tutulumu olsun ya da olmasın para-aortik lenf nodu
Evre IV	Mesane ve/veya barsak mukozası tutulumu ve/veya uzak metastaz
IVA	Mesane ve/veya barsak mukozası tutulumu
IVB	Uzak metastaz (İntra abdominal metastaz ve/veya inguinal lenf nodu)

Bütün evreler için tümoral grade 1,2 ya da 3 olabilir. * Sadece endoservikal bez tutulumu evre I olarak değerlendirilmelidir. Sitoloji pozitifliği evreyi değiştirmez, ayrı olarak belirtilmelidir.

2.4.7. HİSTOLOJİK GRADE DEĞERLENDİRMESİ

Endometrial kanserlerin %80'i endometroid tiptir. Bu tümörler, normal endometrial bezlere benzeyen bezlerden oluşur. Farklılaşmaları azaldıkça solid alanlar fazlalaşır, glandüler formasyon azalır, sitolojik atipi artar. EK grade değerlendirme sistemi Uluslararası Jinekoloji ve Obstetri Federasyonu (International Federation of Gynecology and Obstetrics-FIGO)'nun 3 basamaklı sistemidir. Solid alanlar tümörün %5'inden azını oluşturuyorsa grade 1, solid alanlar tümörün %5-50'ini oluşturuyorsa grade 2, %50'den fazla solid alan içeriyorsa grade 3 olarak tanımlanmaktadır. Grade artıkça prognoz kötüleşir. Histolojik grade değerlendirmesi sadece endometroid ve müsinöz tiplere uygulanır. Seröz, yassı hücreli, berrak hücreli, farklılaşmamış endometriyum kanserlerinde grade değerlendirmesi yapılmaz. Bu tip tümörler grade 3 olarak tanımlanmaktadır (60)(61).

2.4.8. PROGNOZ

Endometriyum kanserinin prognozu genellikle olumludur. EK'nin çoğu (%75) erken evrede (FIGO evre I ya da II) tanı almaktadır ve bunlarda 5-yıllık sağ kalım %74-

91 arasında değişmekteyken; bu oran evre III hastalık için %57-66, evre IV hastalık içinse %20-26 arasındadır (62). EK’de en önemli prognostik faktör evre olmasına rağmen yaşam süresini ve rekürrensi belirleyen çeşitli prognostik faktörler tanımlanmıştır (Tablo 6)(63). Bu faktörler değerlendirilerek radyasyon, kemoterapi, hormon terapisi gibi uygun adjuvan tedavi seçeneklerine karar verilir (60).

Tablo 6. Endometriyum kanserinde prognostik faktörler

Cerrahi Evre
Papiller seröz, Berrak hücreli, skuamöz tip
Yüksek histolojik grade
Myometriyal invazyon >1/2
Lenf Nodu tutulumu
Pozitif Peritoneal sitoloji
Adneksiyal tutulum
İsthmik-servikal tutulum
İntraperitoneal tümör varlığı
Lenfovasküler alan tutulumu
İleri yaş
DNA anöploidinin artması
Tümör büyüklüğü >2 cm
Hormon reseptörlerinin negatif olması

FIGO ve TNM sınıflamasında yer almayan prognostik faktörler; grade, histolojik alt tip, yaş, primer tümör çapı ve lenfovasküler saha invazyonu klinik çalışmalarda nüks açısından riskli grupları belirlemek için araştırılmış (56,63) ve risk sınıflama sistemleri oluşturulmuştur (Tablo 7)(64–66). Temelde benzer olan bu sistemlerin aynı kohortta eş zamanlı karşılaştırılması üzerine yapılan 2014 tarihli çalışmada, Avrupa Medikal Onkoloji Komitesi’nin modifiye sistemi, en belirleyici sistem olarak kabul görmüştür (67).

Tablo 7. Çalışma ve Dernek Kılavuzlarında Yer Alan Risk Faktör Sınıflamalarındaki Farklılıklar

	Düşük Risk	Orta Risk	Yüksek-orta Risk	Yüksek Risk
PORTEC 1	Grade 1 endometriyal Adenokarsinom Evre IA	Endometriyal adenokarsinom Uterin faktörlere bağlı olarak evre I Grade 1 histoloji ve $\geq 50\%$ MI, Grade 2 histoloji ve herhangi bir düzeyde MI, Grade 3 histoloji ve $< 50\%$ MI	> 60 yaş, grade 1 ya da 2 histoloji ve $> 50\%$ MI > 60 yaş, grade 3 histoloji ve $< 50\%$ MI	Evre III-IV hastalık herhangi bir evrede seröz ya da berrak hücreli karsinom
GOG 99	Endometriyuma sınırlı grade 1 ya da 2 endometrioid kanserler evre IA	≤ 50 yaş ve ≤ 2 patolojik risk faktörü* $50-69$ yaş ve ≤ 1 patolojik risk faktörü* ≥ 70 yaş ve patolojik risk faktörü yok*	Herhangi bir yaş ve 3 patolojik risk faktörü $50-69$ yaş ve ≥ 2 patolojik risk faktörü ≥ 70 Yaş ve ≥ 1 patolojik risk faktörü *	Grade ve histolojisine bakılmaksızın Evre III-IV hastalık herhangi bir evrede seröz ya da berrak hücreli karsinom
SEPAL	LVTI olmayan, evre IA ya da IB endometrioid tip kanserler	Evre IA, grade 3 endometrioid adenokarsinom ile herhangi bir grade veya LVTI olsun/olmasın non-endometrioid karsinoma† LVTI olan evre IB, grade 1-2 endometrioid adenokarsinom Grade'ine ve LVTI olup olmadığına bakılmaksızın evre IB, grade 3 endometrioid adenokarsinom Grade'ine ve LVTI olup olmadığına bakılmaksızın Evre IC ve II	—	Grade'ine ve LVTI olup olmadığına bakılmaksızın Evre III-IV hastalık
ESMO	Evre IA grade 1 ve grade 2 endometrioid tip	Evre IA grade 3 endometrioid tip Evre IB grade 1 ve 2 endometrioid tip	—	Evre IB grade 3 endometrioid tip Herhangi bir evrede nonendometrioid hastalık
Modifiye ESMO	LVTI olmayan, evre IA grade 1 ve grade 2 endometrioid tip	LVTI olan evre IA grade 1 ve grade 2 endometrioid tip, LVTI olmayan evre IA grade 3 endometrioid tip, LVTI olmayan Evre IB grade 1 ve grade 2 endometrioid tip	LVTI olan evre IA grade 3 endometrioid tip, LVTI olan evre IB grade 1 ve grade 2 endometrioid, Tip LVTI olmayan evre IB grade 3 endometrioid tip	LVTI olan evre IB grade 3 endometrioid tip herhangi bir evrede non endometrioid hastalık

PORTEC 1=Endometriyal Kanserde Post-Operatif Radyasyon Tedavisi, GOG=Jinekolojik Onkoloji Grubu orta-risk endometriyal kanserlerde adjuvan radyasyon, LVTI=lenfovaskuler saha invazyonu, MI=myometriyal invazyon, SEPAL=Endometriyal Kanserlerde Para-Aortik Lenfadenektominin Sağlıkına Etkisi, ESMO=Avrupa Medikal Onkoloji Demegi, *Risk faktörleri: grade 2 ya da 3 histoloji, pozitif LVTI, dış 1/3 myometriyal invazyon. †Seröz adenokarsinom, berrak hücreli adenokarsinom, ya da diğer karsinom tipi.

2.4.9. TEDAVİ

Evre I endometriyal kanserli olgular için standart cerrahi yaklaşım total histerektomi ve bilateral salpingooferektomidir (61). Ancak, orta-yüksek risk endometrioid kanserde (evre IA G3 ve IB) lenfadenektomi ile birlikte tam bir cerrahi evreleme önerilmektedir (62,68). Evre II endometriyal kanserde radikal histerektomi, bilateral salpingooferektomi ve pelvik lenfadenektomi uygun bir yaklaşım olarak görülmektedir (64,65). Evre III ve IV endometriyal kanserli hastalarda mümkün olduğunca maksimum cerrahi debulking (paraaortik lenfadenektomi dahil) uygulanmalıdır (66). Uzak metastazı olan olgularda da palyatif cerrahi bir seçenek olarak değerlendirilebilir (69).

Endometriyal kanserli olguların çoğunu postmenapozal dönem kadınlar oluştururken yaklaşık %20 vaka reproduktif çağıdadır. İyi seçilmiş, bazı genç hastalarda overler korunabilmektedir (70). Çocuk istemi olan kadınlarda endometriyal kanserlerde progestajenik ajanlar kullanılabilir. Ayrıca progestajen tabanlı tedavi alan hastalarda, cerrahi tedavi yapılan hastalara göre nüks daha sıktır ve bu yüzden hastalar çok yakın takip edilmelidir (71).

Adjuvan radyoterapi; düşük ve orta riskli hastalarda tartışılan bir konudur. Grade 1 ve 2 endometriyuma sınırlı tümörü olan kadınlar çok iyi prognoza sahiptir ve düşük risk olarak değerlendirilirler. Bu hastalarda prognozun iyi olması nedeniyle adjuvan tedavi genellikle ilk aşamada düşünülmez (72). Direkt tümöre yönelik (Lokorejyonel) nüks riskini azaltmaya yönelik uygulanan pelvik radyoterapi ile ilişkili morbiditeyi azaltmak için günümüzde orta-risk vakalarda vajinal brakiterapi yaygın olarak kullanılmaktadır (73).

Adjuvan kemoterapi; ileri evre hastalığın (evre III ve IV) yönetiminde baş rolü oynamaktadır.

Kombine Radyoterapi ve Kemoterapi; İleri evre hastalarda, orta-risk vakalarda olduğu gibi genellikle multimodal tedavi yöntemleri kullanılmaktadır. Multimodal tedavi, kemoterapinin sistemik etkilerini ve radyoterapinin üstün lokal kontrol etkisini birleştirmektedir (74).

Nüks hastalıkta; özellikle pelvik nüksü ya da tek bölgede metastatik hastalığı olan vakalarda cerrahi ya da lokal radyoterapi, tedavi seçeneği olarak uygulanabilmektedir. Lokal tedaviye uygun olmayan nüks hastalar için karboplatin-paklitaksel kombinasyonu, paklitaksel-adriamisin-cisplatin kombinasyonu kadar etkili ve ondan daha az toksik olması nedeniyle nüks hastalarda ilk tercih edilen kombinasyon haline gelmiştir (75).

2.5. TESTLERİN KLİNİK KULLANIMI

Hastalık tanısı koymak için laboratuvarından elde edilen veriler kritik öneme sahiptir. Bundan dolayı laboratuvar sonuçlarını doğru yorumlamak klinikte teşhis koyarken veya teşhisten uzaklaşırken ciddi şekilde faydalı olacaktır. Laboratuvar sonuçlarını doğru değerlendirmek için ise laboratuvar testlerinin tanısal gücünün iyi bilinmesi zorunludur. Sağlıklı toplumdaki kişilerin olası hastalık açısından taranmasında ve hastalıkların tanısı ile takibinde testlerin performans karakteristikleri önem taşımaktadır. Mümkün olduğu kadar duyarlı ve özgül testlerin kullanımı, doğru tanı koymada büyük yarar sağlayacaktır. Bununla birlikte bir tanı testinin duyarlılığı ve özgüllüğü ne kadar yüksek olursa olsun, görülme sıklığı çok düşük olan hastalıklarda kullanıldığında getirmiş olacağı yarar sınırlı olacaktır. Bu nedenle kullanılan testlerin uygulandığı toplumdaki veya klinikteki hastaların test öncesi bulunma olasılığı testin başarısını doğrudan etkilemektedir (76).

2.5.1. TANISAL DOĞRULUK

Tanısal doğruluk, bir testin farklı sağlık durumlarını doğru olarak ayırabilme kapasitesidir. Tanı testinin gücü, hasta ve sağlamları ayırmada kullanılan testin vermiş olduğu sonuçlar ile ilgilidir. Bir testin teşhisdeki değerini ifade etmek için bazı

kriterlere ihtiyaç duyarız. Bunlar; tanısal duyarlılık, tanısal özgüllük, prediktif değer, tanısal etkinlik gibi kriterlerdir. Bir test kullanıma girmeden önce bu gibi parametreler belirlenmelidir; eğer hastalıklı ve sağlıklı durumu ayırma gücü yeterli değilse, test yararlı bir test değildir. Diğer taraftan bir testin sağlıklı ve hastalıklı durumu birbirinden ayırma kapasitesi iyi olabilir, fakat hastanın tıbbi bakımı yönünden çok değerli olmayabilir. Testin uygulanışı girişimsel olabilir, pahalı olabilir veya üstün bir teknik donanım ve cihaz gerektirebilir. Maliyeti daha düşük ve daha az invazif bir test aynı tanıda benzer şekilde yardımcı olabilir. Bundan dolayı tanısal yeterliliği iyi bir test teşhisde kullanımı zor olması sebebiyle tercih edilmeyebilir (76,77).

2.5.2. DUYARLILIK (SENSİTİVİTE) VE ÖZGÜLLÜK (SPESİFİTE)

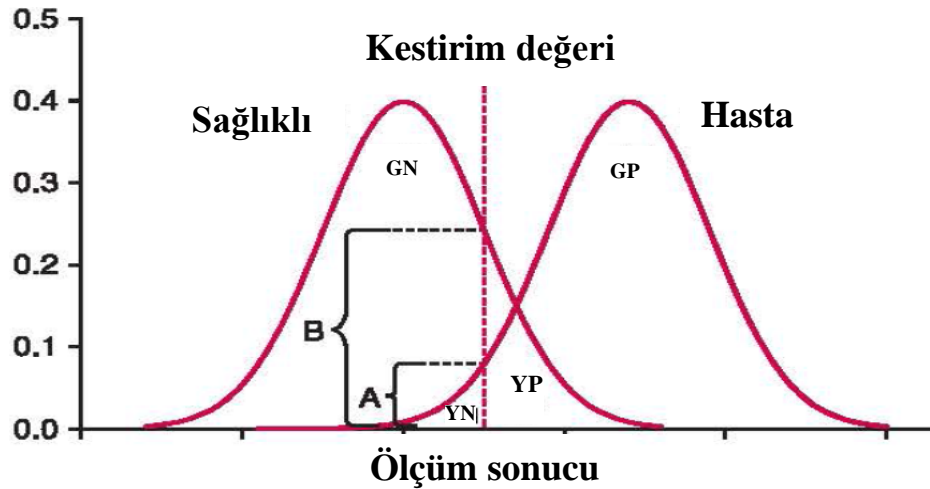
Duyarlılık testin hastalığı saptama gücüdür ve hastalığı olanlarda test pozitifliğinin yüzdesi olarak ifade edilir. Duyarlılığı %90 olan bir test hastaların %90'ında pozitif sonuç verirken %10'unda negatif sonuç verir (yanlış negatiflik). Genel olarak duyarlılığı yüksek olan bir test herhangi bir tanıyı dışlamakta yararlıdır, çünkü duyarlılığı yüksek bir testin yanlış negatifliği düşüktür. Diğer bir ifade ile duyarlılığı yüksek bir testin negatif çıkması hastalığı ekarte ettirebilir. Yüksek duyarlılık hastaların çoğunu saptarken, yüksek özgüllükte sağlam olanların çoğunu saptar. Diğer bir ifade ile tanısal duyarlılık gerçekte hastalık bulunan kişilerde testin pozitif olması, tanısal özgüllük ise hastalık bulunmayan kişilerde testin negatif çıkma durumunun bir ölçüsüdür. Bir test sonucunda dört olasılık vardır. Test pozitifdir ve olgu hastalıklıdır, test pozitifdir olgu sağlıklıdır, test negatiftir olgu sağlıklıdır, test negatiftir ve olgu hastalıklıdır. Bu dört durum değerlendirilip testin tanısal duyarlılık ve tanısal özgüllüğü belirlenir (78,79).

Bir testin özgüllüğü (spesifite) hastalık olmadığını belirler ve hastalığı olmayanlarda test negatifliğinin yüzdesi olarak ifade edilir. Bir testin özgüllüğü %90 ise hastalığı olmayanların %90'ında negatif sonuç verir, %10'unda ise pozitif sonuç verir (yanlış pozitiflik). Genel olarak özgüllüğü yüksek bir test tanıyı doğrulamak

bakımından yararlıdır çünkü yanlış pozitifliği düşük olacaktır. Diğer bir ifade ile özgüllüğü yüksek bir testin pozitif çıkması hastalığı gösterir (78,79).

Herhangi bir hastalığa yönelik test duyarlılık ve özgüllüğünü belirlemek için test bağımsız bir altın standart test ile ya da hastanın gerçek hastalık durumunu tanımlayan standart tanı kriterleri ile karşılaştırılmalıdır (76).

Duyarlılık genel anlamda hasta olanların, özgüllük ise sağlam kişilerin doğru olarak saptanması ile ilgilidir. Bir testin değerlendirilmesinde en önemli araçlardan biri, testin o hastalık için duyarlılık ve özgüllüğüdür. Bir testin verilen duyarlılık ve özgüllük değerleri, normal ve anormal test sonuçlarını ayırt etmek için kullanılan analit düzeyine (eşik-kestirim değeri) bağlıdır (80). Kestirim değeri düşerse duyarlılık artar ama özgüllük azalır, yükseltirse duyarlılık azalır ama özgüllük artar (Şekil 8).



Şekil 8. Test sonucunu hasta ve sağlıklı grup arasındaki kestirim değeri belirler. GN: Gerçek Negatif, GP: Gerçek Pozitif, YN: Yalancı Negatif, YP: Yalancı Pozitif, (81).

Genel olarak bir laboratuvar testinin kabul edilebilmesi için testin duyarlılık ve özgüllüğünün %80'in üstünde olması gerekir. %50 duyarlı ve %50 özgül olan

bir testin yararı yoktur, test sonrası hastalık olasılığı yazı-tura atmak ile aynı şansa sahiptir. Bununla birlikte testin duyarlılığı ve özgüllüğünün bilinmesi testin gücünü gösterse bile, test ile ilgili pozitif veya negatif öngörü değerleri hastalığın o toplumdaki görülme sıklığını da değerlendirmeye aldığı için testin gücü hakkında daha fazla bilgi vermektedir.

Duyarlılık ve özgüllük gibi veriler test hakkında önemli bilgi vermesine rağmen, test için sınırlı bir değeri vardır. Asıl önemli olan bir testin pozitif çıkması durumunda hastalık olma olasılığı veya testin negatif çıkması durumunda hastalığın olmama olasılığıdır. Teşhis koyma sürecinde duyarlılık ve özgüllük verileri haricinde test öncesi olasılık, test öncesi olma oranı, olabilirlik oranı, test sonrası olma oranı, test sonrası olasılık, pozitif prediktif değer, negatif prediktif değer gibi diğer parametreler bize testin tanıda kullanımını ile ilgili önemli yararlar sağlar (82).

2.5.3. POZİTİF PREDİKTİF DEĞER (PPD)

Pozitif test sonucu olan bir kişinin gerçekten hasta olma olasılığıdır ya da pozitif sonuç veren bir testin hastalığı gösterme olasılığıdır da diyebiliriz. PPD sonucuna göre testin hastalığı ayırt edebilme olasılığı hesaplanabilir. Bu yüzden bazı kaynaklarda presizyon oranı olarak da adlandırılır. Hastalıkların olma olasılıkları test bazında incelenecek olursa test öncesi olasılığa prevalans, test sonrası olasılığa ise PPD diyebiliriz. Örneğin test öncesi bir kişinin tip 2 DM olma olasılığı toplumdaki prevalansa eşittir ama açlık glukoz testi yapıldıktan sonra testin PPD değeri kişinin hasta olma olasılığını gösterir (78). İki şekilde hesaplanır (Tablo 8);

$$1. \text{ PPD} = \text{GP} / \text{GP} + \text{YP} \quad (\text{GP: Gerçek pozitif, YP: Yalancı pozitif})$$

$$2. \text{ PPD} = \frac{(\text{prevalans}) (\text{duyarlılık})}{(\text{prevalans}) (\text{duyarlılık}) + (1 - \text{prevalans}) (1 - \text{özgüllük})} \times 100$$

2.5.4. NEGATİF PREDİKTİF DEĞER (NPD)

Negatif test sonucu olan kişinin gerçekten sağlam olma olasılığıdır ya da negatif olan bir testin sonucunun sağlam kişileri gösterme olasılığıdır. Böylece NPD sonucuna göre testin sağlam kişileri ayırt etme olasılığını hesaplayabiliriz. Bu yüzden tanı amaçlı değil de tarama amaçlı testlerde NPD'nin yüksek olmasını beklenir yani yanlış negatiflik düşük olmalıdır (78). İki şekilde hesaplanır (Tablo 8).

$$1. \text{ NPD} = \text{GN} / \text{GN} + \text{YN} \text{ (GN: Gerçek Negatif, YN: Yalancı negatif)}$$

$$2. \text{ NPD} = \frac{(1-\text{prevalans})(\text{özgüllük})}{(1-\text{prevalans})(\text{özgüllük}) + (\text{prevalans})(1-\text{duyarlılık})} \times 100$$

2.5.5. TEST ETKİNLİĞİ

Testin toplam performansı hakkında bilgi verir ve ne kadar etkin, verimli, geçerli olduğunu gösterir, bazı kaynaklarda tanısal doğruluk olarak da tabir edilir. Gerçek pozitif ve gerçek negatiflerin toplamının tüm çalışma grubu sayısına bölünmesi ile hesaplanır (Tablo 8) (78). Eğer prevalansı biliyorsak sensitivite ve spesifiteden de tanısal etkinlik hesaplanabilir (78).

$$\text{Tanısal etkinlik} = (\text{sensitivite}) \times (\text{prevalans}) + (\text{spesifite}) \times (1 - \text{prevalans})$$

Tablo 8. Duyarlılık, özgüllük, PPD, NPD, test etkinliği hesaplanması

	Hastalık var	Hastalık yok	Toplam
Test Pozitif	a	b	a + b
Test Negatif	c	d	c + d
Toplam	a + c	b + d	a+b+c+d

Duyarlılık	: a / a+c
Özgüllük	: d / b+d
Pozitif Prediktif Değer	: a / a+b
Negatif Prediktif Değer	: d / c+d
Test toplam etkinliği	: a+d/ a+b+c+d

2.5.6. OLABİLİRLİK ORANLARI

Test sonrası olasılığı tahmin etmede, klinik açıdan daha kullanışlı bir başka ölçüt olabirlik oranıdır. Pozitif ve negatif olabirlik oranları duyarlılık ve özgülüğün birlikte ifade edilmesidir. Tek başına duyarlılığa veya tek başına özgülüğe göre testin gücü hakkında daha fazla bilgi verir. Yüksek ve düşük olabirlik oranları klinik tanıda hastalığın varlığı veya yokluğu ile ilgili klinisyenin ciddi bir görüş oluşturmasını sağlar (83). Bir test sonucu için olabirlik oranı, hasta olanlarda gerçekleşme olasılığının, hasta olmayanlar arasındaki gerçekleşme olasılığına oranıdır. Test sonucu pozitif veya negatif olabilir. Bu nedenle bu iki sonuç için pozitif ve negatif olabirlik oranı hesaplanmaktadır (84,85).

2.5.6.1. POZİTİF OLABİLİRLİK ORANI (LR+)

Pozitif olabirlik oranı; Duyarlılık/1-Özgüllük şeklinde ifade edilir. Bu oran duyarlılık ve özgülük oranlarını birlikte değerlendirerek bir test eğer pozitif ise, testin doğru pozitifliğinin yanlış pozitifliğe göre kaç kat olası olduğunu gösterir. Yani test pozitif ise gerçek hasta tanılarının, yanlış hasta tanılarına göre kaç kat fazla olduğunu gösterir. Olabirlik oranı hesap edilirken hastalık prevalansı hesaba katılmaz. Bir test için pozitif olabirlik oranı ne kadar yüksek ise, test pozitif olduğunda hastalık bulunma oranı o kadar fazladır (86).

2.5.6.2. NEGATİF OLABİLİRLİK ORANI (LR-)

Negatif olabirlik oranı; 1-Duyarlılık/Özgüllük olarak ifade edilir. Gerçekte hasta olan bir kişide test sonucunun negatif çıkma olasılığının, sağlam olan bir kişide test sonucunun negatif çıkma olasılığına oranıdır. Negatif olabirlik oranı 1'den küçük olması hasta insanlarda testin negatif çıkma olasılığının hasta olmayan insanlarda testin negatif çıkma olasılığından daha düşük olduğunu göstermektedir. Genel olarak LR- 10'dan büyük olması hastalık olasılığını kuvvetlendirirken, 0.1'den az olması ise hastalık olmaması olasılığını güçlendirir. Negatif olabirlik oranı birden ne kadar

küçükse, test negatif çıktığında gerçekten hastalık bulunmama olasılığı da o kadar yüksektir (86).

Bu oranları kullanarak test sonrası olasılıklar hesaplanabilir. Bu şekilde hastalığın görülme sıklığını da değerlendirerek o topluluk için daha gerçekçi bir hastalık olasılığı hesap edilebilir (79).

Bire yakın olabilirlik oranları testin hastalık tanısında gücünü zayıflatır ve yeni test ihtiyacı doğururken, çok yüksek veya çok düşük olabilirlik oranları tanı koymada çok yardımcı olur. Bu durumda tanı güçlü olarak doğrulanabilir veya dışlanabilir. Genelde pozitif olabilirlik oranları 10'un üzerinde ise testin tanı koydurma gücü vardır denebilir. Diğer taraftan negatif olabilirlik oranının da 0.1'den küçük olması tanın dışlanmasını sağlayabilir. Olabilirlik oranının 1 olması duyarlılık ve özgüllüğün %50 olduğu anlamına gelir ki böyle bir testin hiçbir yararı yoktur (78).

2.5.6.3. TEST ÖNCESİ VE SONRASI OLMA ORANI

Günümüzde, klinik karar verme sürecinde, tanı testleri ve görüntüleme yöntemleri, hastanın öyküsü ve fizik muayene bulgularının önüne geçmiş ve ağırlık kazanmıştır. Sadece tanı testleri kullanılarak karar verilen örneklere de rastlamak mümkündür (87). Test öncesi hastalık olasılığını hesaplarken, hekim, öykü, fizik muayene sonuçları, kendi klinik tecrübesi ve hastalık prevalansını dikkate almalıdır. Bu durumda test öncesi hastalık olasılığı hastalık prevalansından az veya çok etkilenebilir. Test sonrası hastalık olasılığını hesaplarken klinisyenin kullanacağı birkaç araç vardır. Olabilirlik oranı ve test öncesi olma oranı (pre-test odds ratio) kullanılarak toplum içerisinde geçerli test değeri için hastalık bulunma olasılığını hesap edilebilir. Bunun için olabilirlik oranını test öncesi olma oranı ile çarparak test sonrası olma oranını buluruz. Bulunan test sonrası olma oranı aşağıdaki formül kullanılarak test sonrası olasılık hesap edilebilir. Test sonrası olasılık aynı zamanda PPD'e eşittir.

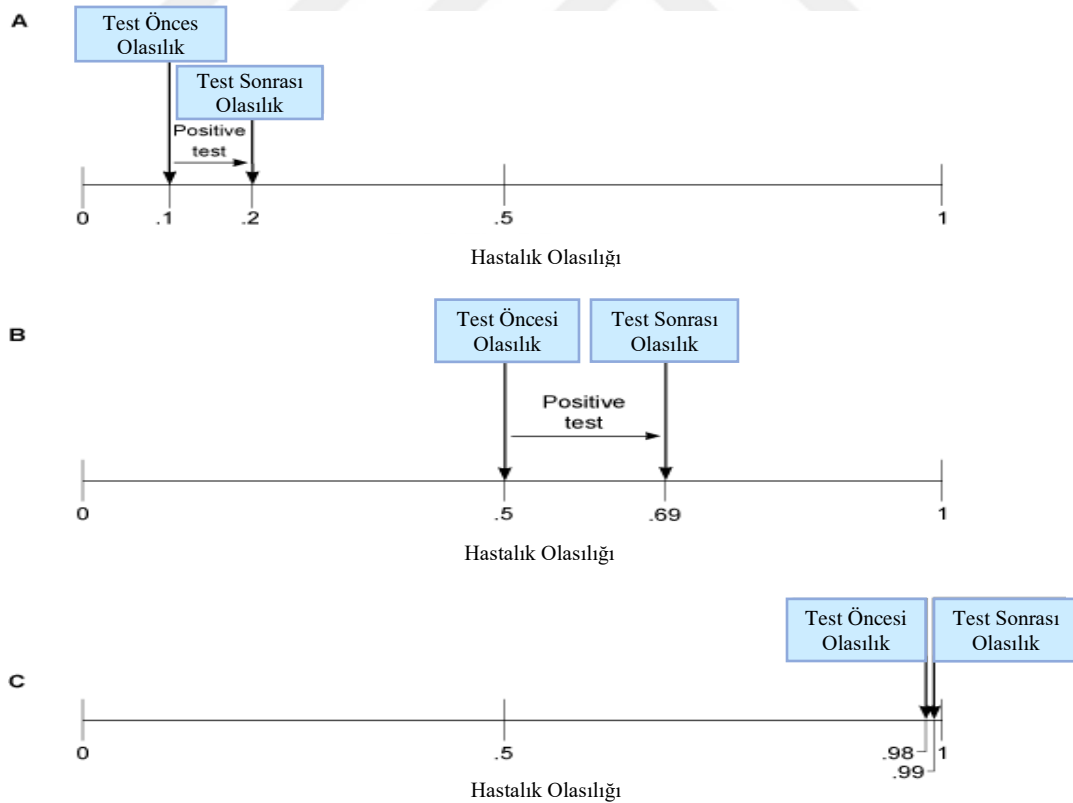
Olabilirlik oranları ile test sonrası olasılığın bulunması, hastalığın varlığıyla ilgili çok daha güçlü bir kanıt sağlar.

Test sonrası odds oranı = Test öncesi odds oranı *Pozitif olabilirlik oranı (LR+)

Test sonrası olasılık = Test sonrası odds / Test sonrası odds + 1

Test sonrası Odds = Test sonrası olasılık / 1- Test sonrası olasılık

Test öncesi olasılık ya da prevalans hastalığın test sonrası olasılığı üzerinde önemli etki gösterir. %90 duyarlılığı ve özgüllüğü olan bir test kullanıldığında hastalığın test öncesi olasılığına bağlı olarak test sonrası olasılık %8 ila %99 arasında değişebilir (Şekil 9)(79). Ayrıca hastalığın test öncesi olasılığı azaldıkça testin yanlış pozitif verme olasılığı artar (79).



Şekil 9. Test öncesi olasılığın test sonrası olasılığa etkisi (A ve C durumlarında testin faydası sınırlı iken, en fazla faydası B durumundaki gibidir.)

2.5.7. BAYES TEOREMİ

Bayes teoremi, daha önce elde edilen bilgilere yeni bilgiler eklendikten sonra bir durumun olasılığını hesaplamak için kullanılan bir yöntemdir. Temel teorem genellikle aşağıdaki gibi yazılır:

$$P(D/R) = P(R/D) \times P(D) / P(R)$$

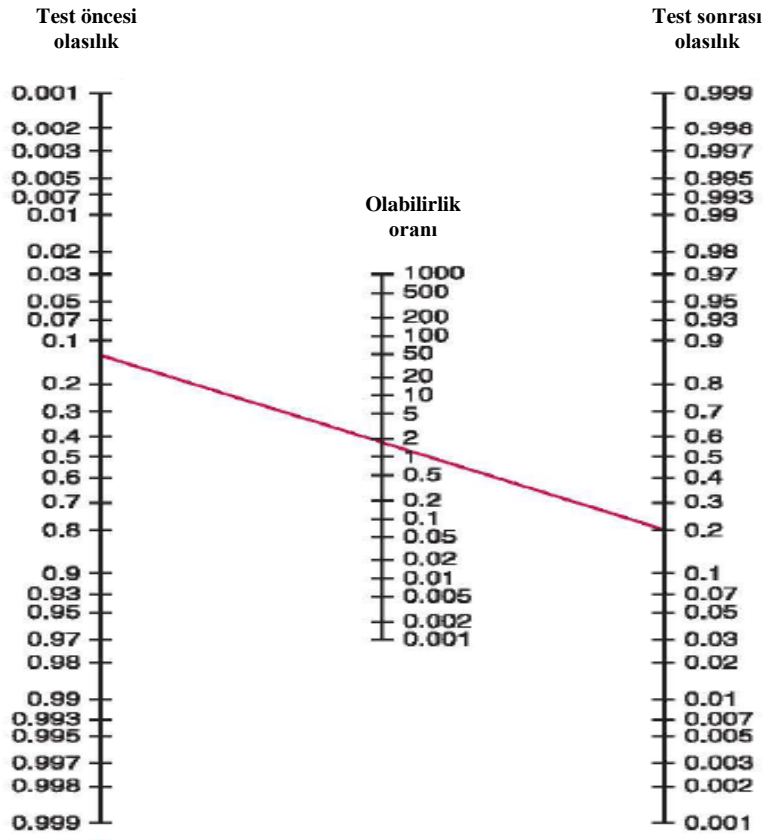
(D: Hastalığın görülme ihtimali, R: Testin pozitif sonuçlanma ihtimalidir)

Yukarıdaki denklem belirli bir sensitivite değeri, hastalık olasılığı (yaygınlığı) ve testin pozitif olduğu tüm olasılıkların olma ihtimalinin bilinmesi ile hesaplanabilir. Böylece, Bayes teoremi, pozitif test sonucu verilen bir durumda hastalık olasılığını hesaplamak için aşağıdaki gibi ifade edilerek yeniden yazılabilir;

$$P(D/R) = \frac{\text{Sensitivite} \times \text{Prevalans}}{\text{Sensitivite} \times \text{Prevalans} + (1 - \text{Spesivite}) \times (1 - \text{Prevalans})}$$

Bayes teoreminin formülü, hızlı çözüm için bilgisayar yardımı gerektirir. Bilgisayar kullanılmadan da Bayes teoreminin olabilirlik versiyonunun kullanımı vardır. Bir hastalığın ortaya çıkma ihtimal oranı, test sonucu bilinmeden önce hesaplanır (test öncesi odds oranı), bu bilgi daha sonra LR ile birleştirilir ve test sonrası odds hesaplanır. Nihai sonuç yine istenirse daha önce açıkladığımız formül kullanılarak olasılığa dönüştürülerek verilebilir. Bu yöntemin avantajları, nispeten kolay ezberlenmesidir ve çok az işlem gerektirir (81).

Eğer test için olabilirlik oranları ve test öncesi olasılık da biliniyorsa matematiksel işlem yapmadan daha önce hazırlanmış olan nomogramlardan faydalanarak test sonrası olasılık hesaplanabilir. Aşağıda fagan nomogramı olarak adlandırılan bir nomogram örneği görülmektedir (Şekil 10). Nomogramı klinisyenler cebinde taşıyabilir ve bunları hasta başında kullanabilirler (83,88).



Şekil 10. Fagan nomogramı (87).

2.5.8. ARDIŞIK TESTLER

Çoğu zaman tanı amaçlı çalışmada klinisyenler klinik bilgiyi ardışık testler kullanarak edinirler. Örnek olarak 3 test yapıldıktan sonra klinisyen test sonrası odds değerini belirlemek için test öncesi odds değerini bilmeli sonra her bir test için kendine özgü olabilirlik oranları kullanmalıdır.

$$\text{Test sonrası odds} = \text{Test öncesi odds} \times LR_1 \times LR_2 \times LR_3$$

Ancak bu yaklaşım kullanıldığında klinisyen şu temel yaklaşımın farkında olmalıdır; seçilen testler ya da bulgular koşullar bakımından bağımsızdır. Örneğin

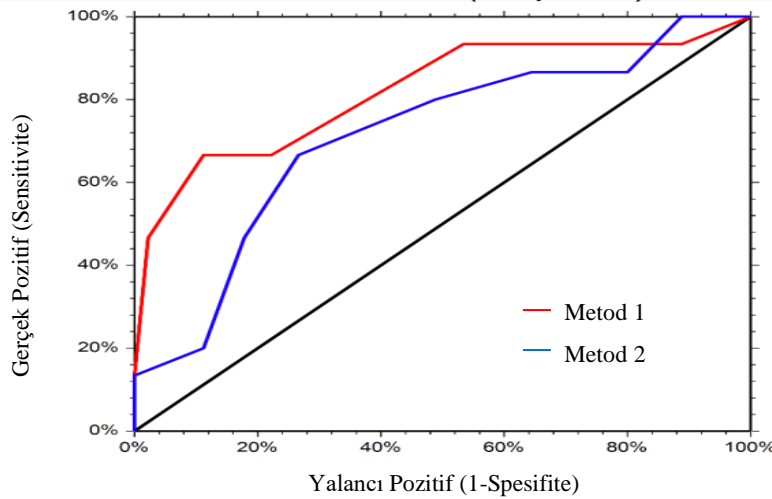
karaciğer hücre hasarında AST ve ALT enzimleri aynı süreçle salınırlar dolayısıyla koşullar açısından bağımlıdır. Eğer bağımlı testler kullanılırsa bu ardışık yaklaşım ile test sonrası olasılık yanlış hesaplanacaktır (89).

2.5.9. ROC EĞRİLERİ

ROC eğrileri sonuç değişkeninin özellikle iki olasılıklı (depresyon var-yok, remiyon var-yok, nüks var-yok gibi) olduğu, buna karşılık karar vermede kullanılacak değişkenin sürekli olduğu durumlarda (kortizol, glisemi düzeyi gibi) kullanılırlar. ROC eğrileri bu sürekli değişken için olası tüm kesim noktalarını gösterir ve her kesim noktasında değişik sonuçların doğru pozitif (DP), doğru negatif (DN), yanlış pozitif (YP) ve yanlış negatif (YN) sıklığı hakkında kestirimler yapılmasına olanak sağlarlar. Verilen bir test için en iyi kesim noktasının saptanmasında, doğru ve yanlış kararların yararlarının hesaplanmasında kullanılırlar (90).

Duyarlılık ve özgüllük oranlarını sadece tablo halinde göstermek bazı sınırlamalar getirmektedir. Bununla beraber eğer bu değerler duyarlılık ve özgüllük grafik şeklinde gösterilirse, değişik eşik değerlere göre duyarlılığı ve özgüllüğü daha iyi ifade etmek mümkündür. ROC eğrisinde duyarlılık y ekseninde, 1-özgüllük ise x ekseninde yer alır (Şekil 11). Bu grafik gerçek pozitif oranları yalancı pozitif oranlarına karşı çizilerek hazırlanır (91). Değişik eşik değerlere karşılık gelen noktalar belirlenir, bu noktalar birleştirilir ve eğri elde edilir. İki eksenin başladığı alt noktadan başlayan ve 45 derecelik açı ile uzayan çizgi hastalık ve sağlıklı ayırımını göstermeyen bir eğridir. Bu eğri üzerindeki her noktada duyarlılık da, özgüllük de %50 oranındadır ve eğri üzerinde testi pozitif çıkanların gerçek pozitif olma şansı %50'den fazla değildir. Aynı şekilde negatif çıkan sonuçların da gerçekten negatif olma durumu, yani sağlıklıyı ayırt edebilme yeteneği %50'den fazla değildir. Bu bozuk para atıldığında yazı veya tura gelme şansına eşit bir şanstır. Bir tanı testi bu doğrusal eğriden yukarıya doğru ne kadar uzakta ise duyarlılığı ve özgüllüğü o kadar yüksektir. Y ekseninde en üsteki noktada ise testin başarısı duyarlılık ve özgüllükte %100'dür (92). ROC eğrisi ile

değişik testlerin performanslarını da birbirleriyle karşılaştırabiliriz. Dört gözlü tabloda duyarlılık ve özgüllük gösterilse bile, iki testin değişik eşik değerlere göre karşılaştırılması zordur. ROC eğrisinde bir testin en sensitif ve spesifik olduğu noktalar belirlenebilir. İki farklı testin ROC eğrisi ile değerlendirilmesinde, eğriler grafik üstünde çakışsalar bile, eğri altında kalan alan hangisinde daha fazlaysa, genel anlamda o testin performansı görece daha iyi denebilir (93). Buna rağmen bir testin eğri altında kalan alanı itibariyle performansı diğerine göre düşük olsa bile, farklı bir eşik değerde duyarlılığı ve özgüllüğü diğer teste göre daha iyi olabilir ve bu nokta özelinde klinik önemi diğerine göre daha fazla olabilir. Eğer bu belirli bölgede yüksek duyarlılığa sahipse ve yüksek duyarlılık seçilecekse o noktada bu test tercih edilebilir (92). Eşik değerler, eğriyi oluşturmak için gerekli olmalarına rağmen grafik üstünde gösterilmez. Bir laboratuvar testinin toplam performansının değerlendirirken testin toplam etkinliği kullanılabileceği gibi, ROC eğrisinin altında kalan alan bulunarak testin genel performansı değerlendirilebilir. Eğri altındaki alan toplam testin tanısal doğruluğunun bir ölçüsü olup 0.5 ile 0.7 düşük bir tanısal doğruluğu gösterirken, 0.7 ile 0.9 arası orta ve 0.9 üstü ise testin yüksek bir tanısal doğruluğa sahip olduğunu gösterir. 0.9'luk bir alan; hasta olan gruptan seçilmiş bir birey, sağlıklı gruptan seçilmiş bir bireye göre %90 olasılıkla daha fazla pozitif test sonucu vereceğini gösterir (92).



Şekil 11. ROC eğrisi

Kliniklerde birçok durumda bir hastalık için iki farklı testin performansı karşılaştırılır. İki testin korelasyonuna bakılarak testlerin uyumu konusunda bilgi edinilebilir. Bu değerlendirmede hangisinin daha doğru olduğu konusunda yorum yapmak zordur. Doğru olan testlerin hastalık için duyarlılık ve özgüllüğüne göre değerlendirilerek karşılaştırılmasıdır. Bu yöntemde testlerin performansı ROC eğrileri kullanılarak testlerin eğri altındaki alanları hesap edilerek hangisinin daha etkin olduğu söylenebilir (78). ROC eğrilerinin avantajları olarak grafiksel olarak gösterilmesi nedeniyle anlaması daha kolaydır. Birçok eşik değere göre test performansı değerlendirilebilir. Görülme sıklığından bağımsızdır. İki farklı testin performansı görsel olarak incelenebilir. Duyarlılık ve özgüllük değerleri grafikten doğrudan elde edilebilir.

2.6. miRNA'LAR

2.6.1. KODLANMAYAN RNA MOLEKÜLLERİ (ncRNA)

Yüksek organizmalı canlılarda genetik materyal DNA olup, DNA'daki bilgi RNA'ya transkript edildikten sonra RNA'nın da işlevi bu şifrenin proteine çevrilmesidir. RNA; proteine çevrilebilen mRNA ile proteine çevrilmeyen yani kodlanmayan RNA (ncRNA) olarak ifade edilen kısımlardan meydana gelir (94). Memeli genomunun sadece %3'lük kısmı protein kodlayan mesajcı RNA (mRNA)'ları ifade etmektedir. Geri kalan %97'lik kısmın çoğu uzun ve kısa protein kodlamayan RNA'lardan (ncRNA) oluşmaktadır (95)(96). Önceleri sadece bilgiyi depolayan ve DNA ile protein arasında basit bir bilgi taşıyıcısı olarak görülen RNA'nın, organizmaların gelişiminde önemli bir rol oynadığı ve kilit bir molekül olduğu artık bilinmektedir (97).

Kodlanmayan RNA'lar, biyolojik reaksiyonların katalizlenmesinden hücrel savunmaya, gelişimsel süreçlerden hücrel cevaba kadar pek çok göreve sahiptir. Kodlanmayan RNA'ların diğer işlevleri arasında transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel gen susturulması ve kromozomların yeniden modellenmesi de yer almaktadır (98). Tanımlanan ve fonksiyonu aydınlatılan ncRNA'ların sayısı her geçen

gün artmaktadır. ncRNA'lar yaygın olarak uzunluklarına göre sınıflandırılmaktadır (Tablo 9)(99).

Tablo 9. Kodlanmayan RNA'ların Sınıflandırılması

İsim	Uzunluk	Fonksiyon
Kısa ncRNA'lar		
miRNA	18-24 bç	miRNA'ların düzenlenmesi, Translasyonel düzenleyici gen ailesi
piRNA	26-31 bç	Germ hücrelerinde transpozon baskılanması, DNA metilasyonu
siRNA	20-25 bç	miRNA'ların düzenlenmesi, Translasyonel düzenleyici gen ailesi
Orta ncRNA'lar		
snRNA	40-200	mRNA'nın splicing tipi modifikasyonlarında rol oynar
snoRNA	60-300	rRNA'nın modifikasyonları
Uzun ncRNA'lar		
lncRNA	>200 bç	DNA-kromatin kompleksinde scaffold işlevi
Diğer lncRNA	>200 bç	X kromozomunun inaktivasyonu

miRNA: mikro RNA, piRNA: piwi protein ilişkili RNA, siRNA: küçük interferan RNA, snRNA: küçük nükleolar RNA, snoRNA: küçük nükleolar RNA, lncRNA: uzun kodlanmayan RNA.

Kodlanmayan RNA'lar birçok önemli işleve sahiptir bu nedenle bu RNA'larda meydana gelen bozukluklar hastalıklarla doğrudan ilişkilidir (100). Örneğin miRNA'lar çok farklı kanser türlerinde (101,102); şizofreni ve Alzheimer hastalığı gibi merkezi sinir sistemi hastalıklarında (103) ve kardiovasküler hastalıklarda (104) farklı ekspresyon profilleri göstermektedir. miRNA'ların onkogen veya tümör baskılayıcı gibi görevlere sahip olmalarından ötürü tümör oluşumunda kilit bir rol oynadıkları düşünülmektedir.

2.6.2. miRNA NEDİR?

miRNA'lar, yüksek seviyede korunan DNA bölgelerinden kodlanan fakat proteine translasyonu gerçekleşmeyen, yaklaşık 18-24 nükleotid uzunluğunda, küçük RNA molekülleridir. Bu protein kodlamayan RNA molekülleri kendi nükleotid dizilerinin tamamlayıcısı olan hedef mRNA'lara bağlanıp translasyonel baskılama veya mRNA yıkımı ile transkripsiyon sonrası gen ekspresyonunun düzenlenmesini

gerçekleştirirler. miRNA'lar bu yolağı kullanarak hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması ve hücre ölümü gibi homeostatik süreçlerde önemli roller oynamaktadır. Yakın zamanda yapılan gen ekspresyon çalışmaları, kontrolsüz hücre bölünmesinin gerçekleştiğı kanser hücrelerinde değışikliğe uğramış miRNA ekspresyonlarını göz önüne sermiştir. Kanserın başlamasında ve ilerlemesinde, miRNA'lar hedefledikleri genin karakterine göre tümör supresörler veya onkogenler gibi fonksiyon göstermektedirler (105).

2.6.3. miRNA'LARIN KEŞİF SÜRECİ

İnsan genomunda bulunan DNA'nın büyük kısmı, RNA kodlanmasında görev alırken genomun çok küçük bir kısmı (%1,5-3) fonksiyonel proteinlerin sentezlenmesinde kullanılmaktadır. Yaklaşık 20 yıl önceye kadar genomun geri kalan kısmının çok az önemli olduğu düşünülüyordu. Ancak bu fikir, küçük RNA moleküllerinin keşfi ile geçerliliğini yitirmiştir. Küçük RNA molekülleri grubu içine giren miRNA'lar, protein kodlamasına katılmayan (non-coding) diziler olarak isimlendirilmiştir. Bilim insanları, miRNA'ların hücre içinde çok sayıda önemli yaşamsal fonksiyonun idame ettirilmesinde rolü olduğunu, ek olarak hücrede miRNA düzeylerinin anormal şartlar altında anormal ekspresyonunun insanlarda kanser oluşumu ile ilgili olabileceğini öne sürmüşlerdir. Bu şekilde miRNA moleküllerinin tümöröenez aşamasında onkogen veya tümör supresör faktörler olarak işlev görebildikleri gün yüzüne çıkarıldı. Bu sebeble miRNA molekülleri konusundaki ilerlemelerin kanserin erken tanı ve tedavisi için mühim sonuçlar ortaya koyabileceğı açıktır (106). miRNA molekülleri, genomda protein kodlamayan bölgelerdeki RNA genlerinden transkripsiyonu sağlanan, fakat proteine translasyonu gerçekleşmeyen, işlevsel RNA yapılarıdır (107). İnsan genomunda miRNA genlerini içeren yüksek seviyede korunmuş yüzlerce gen bölgesi keşfedilmiştir. Şu an itibarıyla (Haziran, 2020) insan genomunda 1917 miRNA tanımlanmıştır (108).

İlk miRNA, Lee ve arkadaşları tarafından 1993 yılında gösterilmiş olup (109), miRNA ifadesi 2001 yılından sonra literatürde kullanılmıştır (110). Lee ve arkadaşları 1993 yılında yuvarlak solucan *Caenorhabditis Elegans* genomunu araştırırken, lin-4 ismini verdikleri genin protein kodlamasına katılmamasına rağmen, 22 nükleotidlik baz uzunluğuna sahip küçük RNA molekülünü transkribe ettiğini göstermişlerdir (109). 2000 yılında Reinhart ve arkadaşları yine *C. Elegans* genomunu incelerken 22 nükleotid uzunluğa sahip, let-7 ismi verilen, organizmanın gelişme süreçlerinin düzenlenmesinde yer alan yeni bir miRNA keşfetmişlerdir (111). Let-7 geninin insan genomunu da içeren birçok canlının genetik yapısında var olup korunduğu gösterilmiş olup (112), let-7 ekspresyonunun ciddi biyolojik işleve haiz olduğunu ortaya çıkarmıştır. Sonraki süreçte let-4 ve let-7 gibi çok sayıda küçük RNA molekülü, hemen bütün çok hücreli organizmalarda gösterilmiş ve miRNA olarak isimlendirilmişlerdir (113).

2.6.4. miRNA OLUŞUMU (BİYOGENEZ)

miRNA oluşumu birbirini takip eden üç aşamalı işlem sonrasında ortaya çıkar. Birinci aşamada miRNA gen transkripsiyonu sonrasında primer miRNA (pri-miRNA) sentezi meydana gelir. İkinci aşamada pri-miRNA, prekürsör miRNA (pre-miRNA) yapısına çekirdekte oluşturulur. Üçüncü aşamada miRNA yapısı sitoplazmada maturasyonu tamamlanarak oluşumu gerçekleşir (105,114).

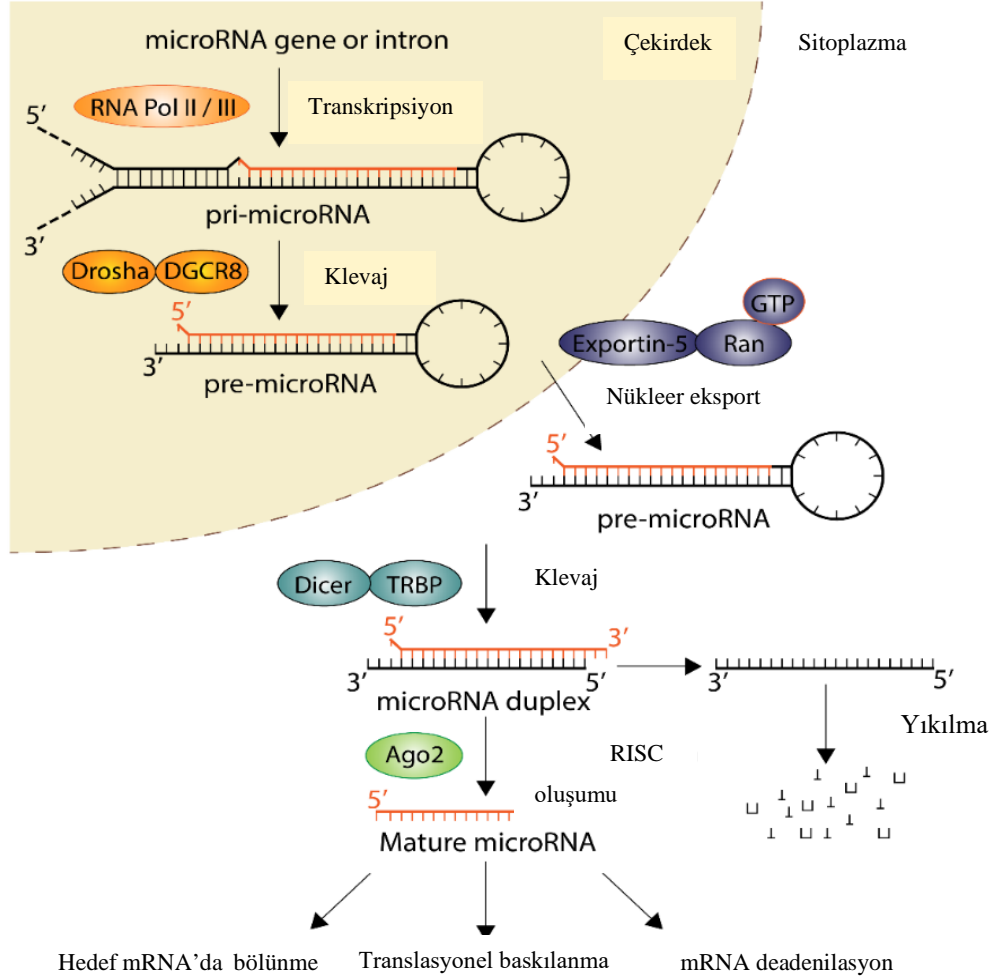
miRNA, primer transkript (pri-miRNA) olarak RNA polimeraz II enzimi kullanılarak DNA'dan sentezlenir. Pri-miRNA (500-3000 baz), "cap" ve "poli A" olarak ifade edilen başlık ve kuyruk eklerine sahip sap-ilmik yapısı şeklindedir. Nükleusda pri-miRNA, RNAaz III enzim ailesinden bir endonükleaz olan Drossha ve kofaktörü Pasha (DGCR8) tarafından hemen hemen 70 nükleotidlik uzunluğa sahip olan pre-miRNA yapısına çevrilir (115). Bir nükleaz yapısında olan Drossha ve çift iplikli RNA bağlayıcı protein yapısında olan Pasha'nın oluşturduğu bu kompleks yapı mikro işlemci kompleks olarak isimlendirilir (105,116).

Pre-miRNA yapısı nüklear transport reseptörü Exportin-5 ve nüklear protein olan RAN-GTP'ye bağlanarak sitozole geçirilir. Daha sonra, pre-miRNA yapısı sitozolde RNAaz III enzim ailesinden Dicer ismi verilen endonükleaz ile kesilir ve 18-24 nükleotid uzunluğa sahip çift zincirli miRNA (miRNA dubleksine) molekülüne çevrilir (117,118). Dicer, eş zamanlı olarak RNA ile aktiflenmiş susturucu kompleksi (RNA induced silencing complex; RISC) formasyonunun başlatılmasında görevlidir.

Dicer, pre-miRNA molekülünden sap-ilmik yapısını ayırmasının ardından miRNA dubleksinden (çift iplikli RNA yapısı) RISC kompleksinde bulunan RNAaz yapısındaki argonaute vasıtası ile 5' ucu daha kararlı olan iplik seçilir ve tek iplikli yapıdaki miRNA RISC kompleksine katılır. Buradaki ipliğe kılavuz iplik (guide strand) denirken diğer iplik anti-kılavuz veya yolcu iplik şeklinde isimlendirilir. Yolcu iplik RISC kompleks substratı olarak yıkıma uğrar. miRNA molekülü RISC kompleksi içine yerleştikten sonra, argonaute protein vasıtası ile mRNA yıkılmasına ya da protein translasyonu inhibe edilmesine sebep olarak işlevlerini yerine getirirler (117–120).

miRNA molekülleri fonksiyonlarını kendi nükleotid dizilerine komplementer hedef genleri tanıma özelliği sayesinde gerçekleştirirler. miRNA molekülünün eklenmesi ile oluşan RISC kompleksi baz eşleşme özelliği ile mRNA'ya bağlanır ve translasyonunun baskılanmasına veya mRNA'nın degrade edilmesine neden olur (111). miRNA, hedef mRNA'nın 3' ucundaki translate edilmeyen bölümü (untranslated region-UTR) veya hedef mRNA'nın ORF (open reading frame) bölümüne bağlanır. Bu bölgelerden hangisine ve hangi şartlarda bağlandığı hedef mRNA'nın sonunun ne olacağını belirler. 3'UTR bölgesine bağlanma tam olmayan, eksik komplementer şekildedir ve translasyonun inhibe olmasına sebep olur. ORF bölgesi içine bağlanma ise tam komplementerliği ifade eder ve Argonaute 2 proteini vasıtası ile mRNA yıkımı ile sonuçlanır (Şekil 12)(121).

Ayrıca, miRNA molekülleri birden fazla mRNA molekülünün ekspresyonunu düzenlenmesinde yer alabildiği ve mRNA moleküllerinin her birinin de birden fazla miRNA ile hedeflenebildiği gösterilmiştir (122,123).



Şekil 12. miRNA biyogenez (117)

2.6.5. miRNA'LARIN FONKSİYONU

miRNA'lar, hedefledikleri mRNA'nın moleküler düzeydeki özelliklerine göre onkojenik veya tümör supresör özellik kazanabilirler. Normal dokularda miRNA'lardan bazılarının protoonkogenlerin translasyonunu inhibe ettiği rapor edilmiştir. İşlevleri tümör supresyonu açısından önemli olan bu miRNA'lar "tümör supresör miRNA'lar" olarak bilinmektedir. Dolayısıyla tümör baskılayıcı miRNA'ların

ekspresyonunun artması onkogenin ekspresyonunun azalması ve anti-kanser etkilere sebep olurken azalması onkogenin ekspresyonunun artmasına ve tümör oluşumuna sebep olacaktır. Bunun tersi olarak, "onkojenik miRNA" olarak ifade edilen bazı miRNA'ların ekspresyonunun artması yine kanser gelişimini arttırırken azalması anti-kanser etkilere sebep olacaktır. Sonuçta miRNA molekülleri, onkogen ve tümör supresör mRNA'ların her ikisini de muhtemel hedef alıp, işlevlerini bu mRNA'lara bağlanarak gerçekleştirirler (124).

2.6.6. miRNA VE KANSER

Hücre döngüsü kontrol mekanizmaları çalışmadığında ve hücre apoptoz fonksiyonlarını yitirdiğinde kanserleşme sürecine geçer. Son yıllarda tümör oluşumunda miRNA'ların fonksiyonlarının etkili olduğu anlaşılmasıyla kanserin genetik nedenlerinin çok daha karmaşık olduğu belirlenmiştir (125). Kanserle ilişkilendirilmiş genomik bölgelerin %50'den fazlasının miRNA'yı kodlayan genlerden oluşması miRNA'ların kanser patogenezinde etkili olduğunu ortaya koymuştur (125).

Çok sayıda çalışma miRNA'ların hücre poliferasyonu ve ölüm mekanizmaları gibi yaşamsal süreçlerde anahtar moleküller olduklarını göstermiştir. miRNA'ların karsinogeneizde etkili olabileceğinin anlaşılmasıyla birlikte, farklı kanser türlerinde ve spesifik hücre tiplerinde miRNA'ların ekspresyon seviyeleri belirlenerek çalışmalarda miRNA'ların kanserdeki potansiyel fonksiyonlarını anlayabilmek için çalışılmaktadır. Ayrıca miRNA'ların sadece karsinogeneizde değil birçok hastalığın oluşumunda rol oynadıkları belirlenmiştir (126).

miRNA'ların kanserleşme sürecine olan katkısı ile ilgili yapılan ilk çalışma Calin ve ark. 2001 yılında KLL vakaları üzerine yapılan moleküler çalışma ile tespit

edilmiştir. Yapılan çalışmada doku miRNA-15a ve miRNA-16-1 düzeylerinin azalma gösterdiği belirlenmiştir (127). KLL olan hastaların yaklaşık %50'sinde 13q14 bölgesinde delesyon gerçekleştiği tespit edilmiştir.

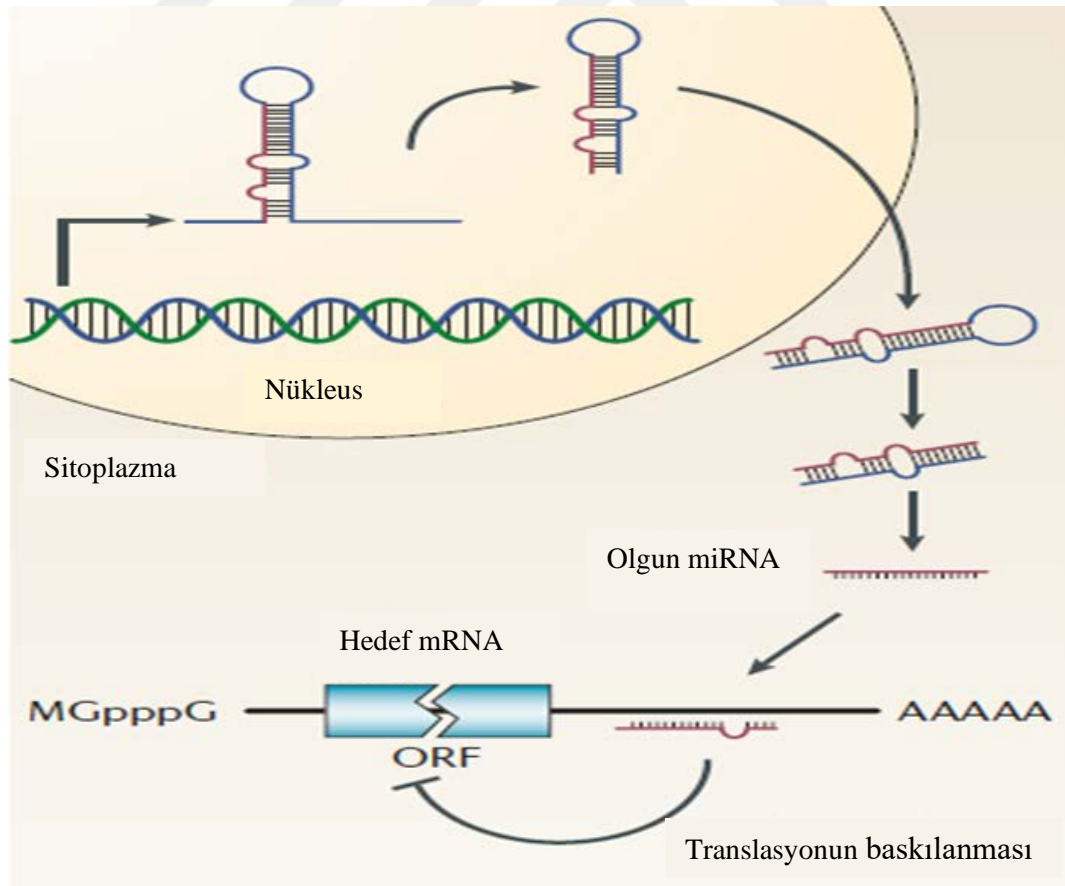
Michael ve ark. (2003) yaptıkları ilk çalışmada insanlardaki solid tümörler (rektal ve kolon adenokarsinom) normal dokular ile kıyaslandığında ekspresyon düzeylerinin değişmiş olduğu miRNA'lar tespit edildi (128).

miRNA molekülleri, hedefleri olan mRNA özelliklerine göre onkojenik veya tümör supresör olarak işlev görebilirler (129). Bazı miRNA'ların normal dokularda protoonkogenlerin translasyonunu baskıladıkları tespit edilmiştir. İşlevi bir onkogenin ekspresyonunu kontrol etmek olan bu miRNA'lara tümör supresör miRNA'lar denir. Dolayısı ile tümör supresör miRNA'ların ekspresyonlarının azalması, onkojenik mRNA'ların ekspresyon düzeylerinin artmasına ve tümör oluşumuna neden olur. Bunun tam tersi olarak, onko-miRNA'ların ise kanser gelişimini arttırdığı belirlenmiştir. Onkojenik miRNA'lar ise tümör supresör mRNA'ların baskılanmasına neden olurlar. miRNA'lar tümör supresör veya onkogen mRNA'ların ikisini de hedef olarak seçebilirler. Bundan dolayı, belirli bir miRNA'nın asıl işlevi tümör supresör veya onkojenik mRNA'ların özelliğine bağlı değişebilir (124).

2.6.6.1. TÜMÖR SUPRESÖR miRNA'LAR

miRNA'lar normal dokularda transkribe edilip olgun miRNA'ya dönüştükten sonra gidip hedef mRNA'ya bağlanıp translasyonu bloke eder (129). Translasyonun baskılanması sonucu hücrede normal oranda çoğalma, farklılaşma ve hücre ölümü gerçekleşir (Şekil 13)(116).

miRNA moleküllerinin kanserogenez sürecinde etkili olabileceği ilk kez 2001 yılında miRNA-15a ve miRNA16-1 moleküllerinin keşfedilmesi ile öne sürülmüştü ancak miRNA moleküllerinin kanserleşme sürecinde nasıl etkili oldukları 2005 yılında Cimmino ve arkadaşlarının KLL (Kronik Lenfositik Lösemi) vakalarında yaptıkları çalışmalar vasıtası ile meydana çıkarıldı (129). Çalışmalar sonrasında ilgili iki miRNA ekspresyon düzeyleri KLL hücrelerinde, apoptozu engelleyen protein olan Bcl-2 seviyeleri ile ters ilişkili olduğu gösterildi (128). Cimmino ve arkadaşları devamında miRNA-15a ve miRNA16-1'in düşük seviyelerinin (tümör supresör fonksiyon kaybı) Bcl-2 proteini artmış düzeyleri ile ilgili olduğunu, dolayısıyla anormal hücre büyümesine sebep olduğunu, bu iki miRNA'nın yüksek seviyelerinin (normal tümör supresör aktivite) ise apoptoz ile ilgili olduğunu ve tümör supresör aktivitelerini ortaya çıkarmış oldu (130).



Şekil 13. Normal dokularda miRNA fonksiyonu (118)

Tümör supresyon özelliği sergileyen diğer miRNA, let-7 ailesidir (let-7b, let-7c, let-7d, let-7f ve let-7g). Kanserli vakaların akciğer dokusu ile sağlıklı akciğer dokusu kıyaslandığında kanserli akciğer dokuların büyük kısmında azalmış let-7 düzeyleri gösterilmiştir. Yapılan akciğer kanser hücre kültüründe let-7 seviyeleri, hasta akciğer dokusundaki let-7 düzeylerinden daha fazla seviyeye çıkarıldığında, kanser hücrelerinin büyüme ve çoğalmasının önemli şekilde azaldığı gösterilmiştir (131).

Johnson ve arkadaşları 2005’de let-7 tümör supresör geninin insanlarda bulunan önemli onkogenlerden RAS aktivitesini kontrol altında tuttuğunu gösterdiler. Bu çalışmada düşük seviyede let-7 bulunan akciğer tümör dokularında, önemli şekilde artmış RAS protein seviyesi içerdiği gösterildi. Ayrıca RAS onkogeninin translasyonu ile oluşan mRNA yapısının, let-7'ye komplementer bağlanma bölgeleri içerdiği gösterildi. let-7 bu mRNA'ya bağlanarak proteine translasyonunun engellenmesi sağlanır. Bu şekilde kanserli hücrelerdeki let-7 azalmış düzeyleri, RAS onkogeninin kontrol dışı şekilde eksprese olduğu gösterildi (124,130–134). Sonuçta let-7 ailesinin, RAS onkogen mRNA'sını hedef alan bir tümör supresör işleve haiz olduğu kanıtlanmış oldu. Buna ek olarak son yapılan çalışmalarda, let-7 miRNA ailesinin çok iyi bilinen onkogenlerden olan HMGA230 ve c-Myc31'nin mRNA ekspresyonlarını baskıladıkları gösterilmiştir (134).

Üç izoformu mevcut olan miRNA-29 (miRNA-29a, miRNA-29b, miRNA-29c), tümör baskılayıcı özellik gösteren miRNA'lar içindedir. miRNA-29 ailesi, kronik lenfosittik lösemi (KLL), akciğer kanseri, meme kanseri, akut miyeloid lösemi (AML) ve kolanjiyokarsinom hücrelerini baskılayıcı işlev gösterdiği yapılan çalışmalarla ortaya çıkarılmıştır (135,136).

miRNA-143 molekülü de çeşitli tümör türlerini ve anormal büyümeyi azalttığı gösterilmiştir. B-hücreli kanserler, meme, serviks, kolorektal, mesane ve hipofiz

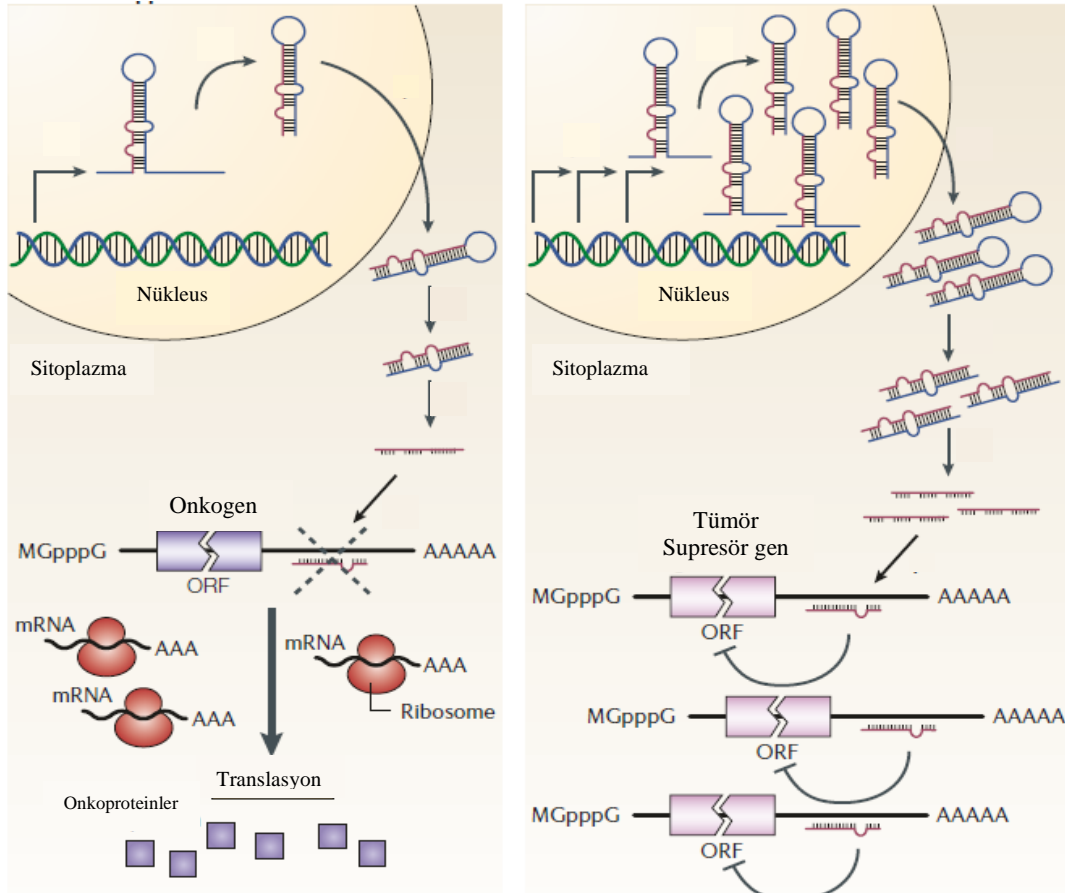
tümörlerinde, miRNA-143 molekülünün tümör baskılayıcı olarak işlev gördüğü ileri sürülmüştür. Serviks kanserinde miRNA-143'ün hücre çoğalmasını azalttığı, kolorektal kanser hücrelerinde ise K-RAS ve sinyal yolağını baskıladığı ortaya çıkarılmıştır (137,138).

2.6.6.2. ONKOJENİK miRNA'LAR

miRNA bir tümör supresör miRNA gibi davranırsa ve hedef aldığı gen onkogen olmasına rağmen miRNA gidip hedef genin mRNA'sına bağlanamayıp translasyonel baskılama gerçekleşmez ise sonuçta Onkojenik protein sentezlenir ve ardından tümör formasyonu oluşabilir ya da miRNA'lar onkogen gibi davranırsa ve hedef aldığı gen bir tümör supresör gen ise gidip hedef genin mRNA'sına bağlanıp translasyonel baskılama gerçekleşirse yine sonuçta tümör formasyonu oluşabilir (Şekil 14)(116).

Tümör supresör miRNA'lardan farklı şekilde işlev gösteren, Onkojenik miRNA'lar genellikle kanserde kontrolsüz şekilde büyümeyi arttırıcı ve/veya anti-apoptotik yönde fonksiyon gösterirler. miRNA-155, ilk keşfi gerçekleşen ve proteine translate olmayan gen olan BIC ile birlikte eksprese olan onkojenik miRNA'lardan bir tanesidir. miRNA-155'in hedef aldığı mRNA'lar tam olarak belirlenememiş ve ekspresyon düzeyinin tavukta lösemi ve lenfoma oluşumunu arttırdığı tespit edilmiştir (116).

miRNA-21'in onkogen ailesine ait bir miRNA olarak fonksiyon gösterdiği tespit edilmiştir, miRNA-21'in KLL, AML gibi hematolojik tümörlerde ve glioblastoma mide, prostat, pankreas, akciğer, meme ve kolon kanseri gibi birçok kanserde yüksek düzeyde eksprese edildiği görülmüştür (135,139,140).



Şekil 14. miRNA onkogen etkisi (112)

miRNA-17-92 gen kümesi, insan genomu üzerinde kromozomun 13q31.3 bölgesine yerleşiktir. Bu gen ailesi altı farklı miRNA (miRNA-17, miRNA-18a, miRNA-19a, miRNA-20a, miRNA-19b-1, miRNA-92-1) kodlamaktadır. C-myc onkogeninin fazla sentezinin gerçekleştiği transgenik farelerde miRNA17-19 gen kümesinin yüksek seviyede ekspresyonu B hücreli lenfomanın gelişimini arttırdığı belirlenmiştir. miRNA-17-92 gen kümesi üyelerinin çok çeşitli solid tümörlerde, meme, hematolojik malignansilerde, akciğer, pankreas, prostat, mide, kolon ve lenfomaları da içine alan kanser çeşitlerinde yüksek seviyede ekspresyonlarının gerçekleştikleri belirlenmiştir (136).

2011 yılında Saydam ve arkadaşlarının yaptığı derlemede, miRNA-155 molekülü B hücreli lenfoma, akciğer, meme, pankreas ve Hodgkin lenfoma gibi kanser türlerinde artmış düzeyde eksprese edildiği belirtilmiştir (105).

Bazı miRNA molekülleri buldukları şartlara göre hem tümör baskılayıcı hem de onkojenik işlev gösterebilir. Bu gruba örnek olarak kronik lenfosittik lösemi ve akciğer kanserinde tümör baskılayıcı, meme kanserinde ise bir onkogen gibi işlev gören miRNA-29a'dır (141).

Birçok kanser çeşidinde çalışılan miRNA-9'un da kanser türüne göre tümör supresör veya onkogen gibi işlev gösterebildiği saptanmıştır (142). 2019'da Orangi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada meme kanser vakalarında miRNA-9'un anlamlı şekilde down regüle olduğunu gösterilmiştir (143). Migdalska-Sek ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; küçük hücreli olmayan akciğer kanser vakalarında miRNA-9 anlamlı şekilde up regüle olurken, miRNA-9'un hedefi olduğu düşünülen proinflamatuvar sitokin IL-17a geninin ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (144). Park ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise kolorektal kanser vakalarında miRNA-9 ekspresyonunun down regüle olduğu gösterilmiştir (145). Torres ve arkadaşlarının 2013 yılında yaptıkları çalışmada EK'lı vakalarda miRNA-9 ekspresyon seviyeleri sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı olarak up regüle olduğu gösterilmiştir (146).

Farklı kanser türlerinde çalışılmış miRNA-186 da kanser çeşidine göre tümör supresör gen veya onkogen gibi özellikler sergilediği gösterilmiştir. Küçük hücreli olmayan akciğer kanser vakalarında farklı çalışmalarda farklı hedef genleri etkileyerek hem tümör supresör hem onkogen özelliği gösterdiği belirtilmiştir (147,148). Farklı çalışmalarda prostat, mesane, kolorektal pankreas gibi organ kanserlerinde farklı hedefleri etkileyerek down-up regülasyon göstermiştir (149). Yapılan çalışmalarda EK'lı vakalarda miRNA-186 up regüle olduğu gösterilmiştir (150,151).

2.6.7. miRNA'DAN BEKLENTİLER

Kanser gelişiminde miRNA'lar hedefledikleri mRNA'ya bağlı olarak tümör baskılayıcı veya onkogen olarak işlev yapabilirler. Buldukları şartlara bağlı olarak da bazı miRNA'lar hem tümör baskılayıcı hem de onkogen özellik sergileyebilir. miRNA molekülleri özellikle kanserin erken teşhis, tedavi, prognoz ve rekürrensini farkedilmesinde; kanserli hücrelerdeki mevcudiyeti, ekspresyon düzeyindeki değişiklikler ve hedefledikleri mRNA moleküllerinin gösterilmesi ile önemli sonuçlar meydana çıkacağı açıktır. Bu mevzuda gerçekleştirilen çok sayıda çalışmayla bazı miRNA moleküllerinin dokuya ve hastalık türüne spesifik sayılabilecek özellikte olduğu gösterilmiştir. Bu durum genetikteki hızlı gelişimle birlikte gen tedavisi başta olarak yeni tedavi seçeneklerini gündeme getirecektir (125).

2.7. KANSER VE SERBEST RADİKALLER

Karsinogenez olarak adlandırılan kanser gelişim süreci inisiyasyon (başlangıç), promosyon (artma) ve progresyon (ilerleme) olmak üzere üç safhadan oluşur. Başlangıç safhası, gen ekspresyonunu düzenleyen epigenom, kromozom ve DNA hasarı ile kendini gösterir. Başlangıç safhasını uzun bir süreç takip eder. İnflamasyonla birlikte genomik olarak kararsız hücrelerin büyüdüğü görülür. İlerleme safhasında ise hücreler çoğalırken, genomlarına daha fazla zarar vererek kötü huylu tümöre dönüşür (152).

Serbest radikaller, dış yörüngesinde çift oluşturmamış bir elektron içeren reaktif bileşiklerdir. Diğer moleküllere elektron verebildiklerinden ya da onlardan elektron alabildiklerinden vücutta indirgeyici veya yükseltgeyici olarak davranırlar. Serbest radikaller oksijen ve nitrojen kaynaklı olabilirler. Bunlardan reaktif oksijen türleri (ROS) de kendi arasında non-radikal ROS ve serbest ROS olarak ayrılır. Serbest ROS arasında; süperoksit, hidroksil, peroksil, lipid peroksil ve alkoksil radikalleri sayılabilir. Non-radikal ROS içinde hidrojen peroksit (H_2O_2), hipoklorit (HOCl) gibi moleküller mevcuttur. Reaktif nitrojen türleri (RNS) ise nitrik oksit ve nitrojen dioksit'den oluşur.

Serbest radikaller endojen ve eksojen kaynaklar tarafından meydana getirilebilir (153).

Hücrelerin zarar görmesini önlemek için ROS düzeylerinin devamlı surette korunması gerekir. Ne zaman ki bu denge korunamaz o zaman vücut hemen antioksidan savunma sistemini devreye sokar. ROS'un detoksifikasyonu için enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan moleküller devreye girer. Bunlar doğal olarak vücutta üretilir veya gıdalar ve takviyeler yoluyla tedarik edilir. Antioksidan enzimler süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) ve glutatyon redüktaz (GRx)'dir. Bunlar ROS'un nötralize edilmesinde doğrudan etkilidir. Enzimatik olmayan antioksidanlar ise metabolik antioksidanlar ve besinsel antioksidanlar olarak ikiye ayrılır. Metabolik antioksidan olarak lipoik asit, glutatyon, L-arjinin, koenzim Q, melatonin, ürik asit, bilirubin, metal-bağlayıcı proteinler, transferrin örnekleri verilebilir. Vitamin E, vitamin C, karotenoidler, iz elementler (selenyum, manganez, çinko), flavonoidler, omega-3 ve omega-6 yağ asitleri besinsel antioksidanlardır (154).

Oluşan bir hasar sonrası doku iyileşirken inflamasyona sebep olan ROS türleri oluşur. Aşırı bir üretim gerçekleşirse dokuda hasar daha da artarken, yeterince olmaması ise doku iyileşmesini olumsuz etkiler. Bu sebeple bu sürecin dengede ilerlemesi çok önemlidir. ROS'un aşırı üretilmesi sonucunda eğer hücreler bu aşırılıkları yeterince yok edemezse hücrelerde "oksidatif stres" adı verilen durum ortaya çıkar (155). Canlıda serbest radikaller yoğunlukları arttığı durumlarda lipitler, proteinler ve nükleik asitler üzerinde yapısal bozukluklara neden olurlar ve bunun sonucunda da kanser, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklar gibi kronik rahatsızlıklar ortaya çıkabilir (156).

Bu çalışmada oksidan stresi değerlendirmek için malondialdehid (MDA), antioksidan cevabı değerlendirmek için de Süperoksit Dismutaz (SOD) ve redükte glutatyon (GSH); bir akut faz reaktanı olup inflamasyon durumlarında yükselebilen Kalprotektin seviyelerinin ölçümü gerçekleştirilmiştir.

Membranlardaki birçok molekül ve bileşik, serbest radikallerden etkilenir. Hücre membranında bulunan kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünlerini oluştururlar. Lipit peroksidasyonu kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve oldukça zararlıdır. Hücre membranlarında lipit peroksit radikalleri ve lipit serbest radikalleri oluşması, reaktif oksijen türlerinin neden olduğu hücre hasarının önemli bir göstergesi olarak kabul edilir. Serbest radikallerin sebep olduğu lipit peroksidasyonuna "nonenzimatik lipid peroksidasyonu" denir. Lipit peroksidasyonunun son ürünlerinden biri olan MDA oksidatif hasarın bir indikatörüdür. MDA ölçümü ile lipit peroksidasyonunun değerlendirilmesi yapılabilir. MDA üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu ile meydana gelir. Peroksidasyon sonucunda oluşan MDA iyon geçirgenliğinin değişimi ve membranların parçalanması gibi olumsuzluklara da neden olabilir. Bu nedenle biyolojik materyalde malondialdehit ölçülmesi lipit peroksit seviyelerinin indikatörü olarak kullanılır (157).

Süperoksit dismutaz antioksidan savunmanın ilk basamağı olan süperoksitin (O_2^-)'in hidrojen peroksid (H_2O_2)'e dismutasyonunu katalizleyen enzimdir. Süperoksit, oksijen metabolizmasının bir yan ürünü olarak üretilir ve düzenlenmezse birçok hücre hasarına neden olur. Hidrojen peroksit de zararlıdır ve katalaz, glutatyon peroksidaz gibi enzimler tarafından parçalanır. Bu nedenle SOD, oksijene maruz kalan hemen hemen tüm canlı hücrelerde önemli bir antioksidan savunmadır (158).

Redükte glutatyon (GSH) glutamik asit, sistein ve glisinden oluşan düşük molekül ağırlıklı fakat fonksiyonu büyük bir tripeptiddir. Glutatyon biyosentezi, glutatyon sentetaz ve γ -glutamilsisteinil sentetaz adı verilen iki enzimin katalizlediği reaksiyon sonucunda ATP'ye bağımlı olarak iki adımda gerçekleşir. Glutatyon, hücrenin oksidasyon-redüksiyon dengesinde önemli bir rol oynar. Hücreden ROS metabolitlerini uzaklaştırır ve indirgenmiş formu sayesinde hücrelerdeki sülfhidril grubunun devamlılığını sağlar. Redükte glutatyon aynı zamanda glutatyon peroksidaz (GSH-px) ve glutatyon-s-transferaz (GST) enzimlerinin de substratıdır. Glutatyon,

dokularda birbiriyle dengede bulunan, glutatyon (GSH) ve okside glutatyon (GSSG) olmak üzere iki formda bulunur. GSH serbest bir sülfhidril grubuna sahiptir. Bunun sayesinde hücre içi proteinlerin tiyol gruplarını (-SH) indirgenmiş halde tutar. Protein ve enzimlerin tiyol gruplarının indirgenmesi ile redükte formlarının yeterli seviyede kontrolü sağlanmaktadır. Bu döngüde glutatyon kendisi okside olup tiyol gruplarını tekrar indirgeyerek bunların aktivasyonunu sağlar. GSH'ın üretimi ve tüketilmesi arasındaki dengeyi hücrenel GSH düzeyi belirlemektedir. GSH'ın hücrenel miktarı de novo sentez ya da Glutatyon redüktaz varlığıyla NADP kullanılarak GSSG'nin GSH'a çevrimiyle sağlanmaktadır. Hücre içi GSH içeriği hücrenin indirgeme yeteneğinin önemli bir ölçüsüdür (159).

Kalprotektin kanser ve inflamasyon yakından ilişkilidir. Kalprotektin proteini çeşitli inflamatuvar yanıtlarda görevi olan bir proteindir ve s100 protein ailesinin bir üyesidir, nötrofiller de çok miktarda bulunur. Anti mikrobiyal, sitotoksik ve sitokin benzeri etkileri olan Ca ve Zn bağlayan bir proteindir. İnflamatuvar hastalıklar, otoimmün hastalıklar, enfeksiyonlar ve bazı kanserlerde özellikle mide, meme, prostat ve endometriyum kanseri gibi birçok hastalıkta plazma seviyesi yükselir (3). Tek başına tanı ve takipte kullanılmamasına rağmen diğer belirteçlerle birleştirildiğinde önemli sonuçları olabilir.

2.8. TÜMÖR BELİRTEÇLERİ

Tümör belirteçleri, ilgili tümör veya doku tarafından salınan maddelerdir. Tümör belirteçleri hücre içinde, yüzeyinde bulunabileceği gibi bazıları dolaşıma katılarak serumda saptanabilir (160). Tümör belirteçleri hormon, reseptör, onkofetal antijen, tümör ilişkili antijenler, enzim, karbohidrat, metabolit, immunoglobulin, protein ve gen yapısında olabilir (161).

Tümör belirteçleri de klinisyene diğer bulgu ve test sonuçları ile birlikte yardımcı olan testlerdir. Klinikte risk belirlenmesi, erken kanser taraması, prognozun

belirlenmesi, tedavi seçimi ve hastalık rekürrensi ya da progresyonu için takip aşamasında tümör belirteçleri kullanılmaktadır (160). Ancak çoğu tümör belirteci normal veya benign durumlarda da yükselebilmektedir, kanser tanısını koydurmak için yeterince özgül değildir, çoğu bir tümöre özgül değildir (161).

İdeal tümör belirteci o tümör için özgül olmalı, minimum yanlış pozitif ve yanlış negatif değerlere sahip olmalı, hastalığın yaygınlığını ve tedaviye yanıtını gösterebilir olmalıdır (161).

EK'nin mevcut non-invaziv tanısı ultrason ve opsiyonel olarak manyetik rezonans görüntüleme ve tümör belirleyici kanser antijeni 125'in (CA-125) kombinasyonuna dayanmaktadır ancak bunlardan hiçbiri tek başına yeterli değildir (162). Günümüzde EK'de rutin olarak kullanımı önerilen belirteç bulunmamaktadır (163).

CA-125: ilk olarak over hücre hattında Bast ve arkadaşları tarafından gösterilmiş bir glikoproteindir (164). Plevra, perikard, periton gibi zar yapıların mezotel hücrelerinde ve mülleryen kanaldan gelişen tubalar, endometriyum ve endoservikal hücrelerden sentezlenebilir. Çok sayıda jinekolojik ve non-jinekolojik patolojilerden dolayı yükselebilir, bu sebeble duyarlılık ve spesifitesi yeterli değildir (2).

Human Epididimis protein 4 (HE-4): İlk kez epididim hücrelerinden izole edilmiştir ve ismini bu şekilde almıştır ancak daha sonra çeşitli dokulardan da izole edilmiştir. Çeşitli malignitelerde mide, meme, over ve akciğer kanserlerinde potansiyel tümör belirteç özellikleri araştırılmıştır. Endometrial kanser vakalarında da değerlendirilen bu marker özellikle CA-125 ile birlikte ölçümlerinde performansı tek başına çalışılmasından daha iyi sonuçlar vermiştir (165).

III. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. ÖRNEKLERİN TOPLANMASI

Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum kliniğine haziran 2018 ile Mayıs 2019 tarihleri arasında başvurusu benign ya da malign nedenlerle histerektomi yapılan toplam 42 hasta çalışmaya dahil edilmiştir.

Endometriyum kanser tanısı alan ve histerektomi yapılan 20 hasta ile, yine histerektomi yapılan ama benign hastalıkları olan örneğin myoma uteri, anormal uterin kanamalar, uterus sarkması, endometriozis, uterus kaynaklı kronik ağrılar gibi semptomları olan 22 vaka da kontrol grubu olarak kabul edilip prospektif olarak dizayn edilmiştir.

Malign ve benign nedenlerle histerektomi olan vaka ve kontrol grubundan alınan doku örnekleri patoloji laboratuvarında değerlendirildikten sonra parafinize edilerek oda sıcaklığında saklanmıştır. Elde edilen serum örnekleri ise rutin tetkikler yapıldıktan sonra serumları ayrılarak analize kadar -80 °C’de saklanmıştır.

Çalışmamız Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya A.D.’nda yapılmış olup Afyon Kocatepe Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul (Toplantı Numarası: 2018/5) onayı aldıktan sonra başlamıştır.

3.2. miRNA İZOLASYONU

Öncelikle dokudan izolasyon için parafinize dokular deparafinize edildi.

1. Parafin dokular 1.5 ml lik ependorf tüplere alındı (25 mg üzeri).

Opsiyonel: Dokular birkaç dakika 37° de bekletildi.

2. 1200 µL ksilen eklendi. Kuvvetlice vortekslendi. 5 dakika santrifüj edildi (>13,000xg). Süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı.
3. 1200uL absolut etanol eklendi. Ksileni uzaklaştırmak için vorteks yapıldı ve 5 dakika santrifüj edildi (>13,000xg). Süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı.
4. 3. Adım 3-4 kez tekrarlandı.
5. Eppendorf tüpler 10-15 dakika kapakları açık bir konumda inkübe edilerek etanol' un ortamdaki uzaklaşması sağlandı.
6. Örnekler izolasyon için hazırdır.

Serum örnekleri de öncelikle +4 °C'ye ardından oda sıcaklığına getirilerek izolasyona hazır hale getirildi. Örneklerden miRNA izolasyonu spesifik bir izolasyon kiti (GeneAll, Hybrid-R miRNA-Seul, Güney Kore; Kat no: 325-150) kullanılarak yapılmıştır. İzolasyon işlemine ait basamaklar aşağıdaki gibidir;

1. 200 µL serum+500 µL RiboEx pipetaj yaparak eklendi (RiboEx içerdiği fenol ve guanidin tuzu ile hücreyi hızla parçalar ve nükleazları inaktive eder).
2. 5 dk oda ısısında inkübe edildi.
3. 1,5 ml lik tüp üzerine 100 µL kloroform eklendi. Kloroform RiboEx ve serum örneğine karışması için alt üst yapıldı ve 2 dk oda ısısında bekletildi. (Kloroform ile elde ettiğimiz lizat sulu ve organik faza kolayca ayrılır).
4. 12,000xg de 1 dk 4°C de santrifüj yapılır ve sulu faz başka bir eppendorfa aktarıldı (DNA ve protein ara fazda ve organik fazda kalırken, total RNA sulu fazda bulunur).
5. Alınan sulu faz kadar üzerine %50 ethanol eklendi. Pipetaj yapıldı. Vorteks bu aşamada yapılmaz.
6. Elde edilen mix type B (kırmızı kapaklı olan) kolona aktarılır. 700 µL olacak şekilde aktarıldı (Burada büyük RNA membrana bağlanırken, küçük RNA lar kolondan aşağı doğru iner).
7. 11,000 rpm de 1 dk oda ısısında santrifüj edildi.

8. Altta kalan tüpün üzerine kalan sıvının hacmi kadar %100 etanol eklendi. Pipetaj yapıldı. Vorteks yapılmaz.
9. Bu karışım (yaklaşık 650 µL) type W kolona aktarıldı (Bu kolon küçük RNA ların bağlanmasını sağlar).
10. 11,000 rpm de 1 dk oda ısısında santrifüj edildi.
11. Collection tüp yenisi ile değiştirildi ve üzerine 500 µL RBW Buffer eklendi (Bu basamakta deterjan içeriğinde bulunan yıkama basamağı gerçekleştirildi. Böylece membrana bağlanmış olan küçük RNA dışında ki artıklar uzaklaştırıldı).
12. 11,000 rpm de 1 dk oda ısısında santrifüj edildi.
13. Collection tüp yenisi ile değiştirildi ve üzerine 500 µL RNW Buffer eklendi.
14. 11,000 rpm de 1 dk oda ısısında santrifüj edildi.
15. Collection tüp yenisi ile değiştirildi ve üzerine 500 µL RNW Buffer eklendi.
16. 11,000 rpm de 1 dk oda ısısında santrifüj edildi.
17. Collection tüp yenisi ile değiştirildi ve üzerine hiçbir şey eklenmeden 11,000 rpm de 2 dk santrifüj edildi (Herhangi bir yıkama buffer kalmasına karşı böyle bir önlem alınır).
18. Daha sonra membranın tam merkezine gelecek şekilde 50µL RNase-free su eklendi. 2dk oda sıcaklığında bekletildi.
19. 11,000 rpm de 2 dk santrifüj edildi.
20. Elde edilen örnek -20°C ye aktarıldı.

3.3. cDNA ELDESİ

miRNA'lara özgün dizayn edilen ve sentezlettirilen stem-loop primerleri (Tablo 10) kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. İnsan u6 geni internal kontrol gen olarak PCR çalışmasında kullanıldı.

Tablo 10. Primer dizileri

u6	GCUUCGGCAGCACAUUAUACUAAAAU
hsa-mir-186-5p	CAAAGAAUUCUCCUUUUGGGCU
hsa-mir-9-5p	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA

Bu primerler; miRNA'dan cDNA sentezi yaparken miRNA dizisi ile spesifik bağlandığı için en güvenilir yöntem olarak kabul edilir. Elde edilen miRNA'lardan her bir miRNA'ya özgü primerler kullanılarak cDNA sentezi yapılmıştır.

Elde edilen miRNA ile WizScript™ cDNA Synthesis Kit (High Capacity) W2211 (Seongnam, Güney Kore) kullanılarak komplementer DNA (cDNA) sentezi yapılmıştır (Tablo 11).

Tablo 11. cDNA reaksiyonunda bileşenler

10X Reaction Buffer	2 µL
Stem-loop primer	2 µL
20X dNTP mix	1 µL
miRNA	10 µL
WizScript™ RTase	1 µL
RNase inhibitör	0,5 µL
RNase free Water	3,5 µL
Toplam	20 µL

cDNA sentezinde ortam öncelikle 25 °C'de 10 dk, 37 °C'de 120 dk, 85 °C'de 5 dk bekletilip +4 °C'ye indirilip sentez tamamlanır.

3.4. RT-PCR AŞAMASI

Elde edilen cDNA'lardan SYBR Green temelli Real Time PCR yapılmıştır. Reaksiyon bileşenleri Tablo 12'de verilmiştir.

Tablo 12. RT-PCR reaksiyon bileşenleri

2X SYBR GREEN MASTER MIX (Cat No:801-520)	10 µL
F(10pm)	1 µL
R(10pm)	1 µL
ROX	1 µL
cDNA	1 µL
Water	6 µL
Toplam	20 µL

RT-PCR bileşenlerinde yer alan Forward (F) ve Reverse (R) primerlerin dizileri ise aşağıdaki gibidir (Tablo 13).

Tablo 13. Forward (F) ve Reverse (R) primer dizileri

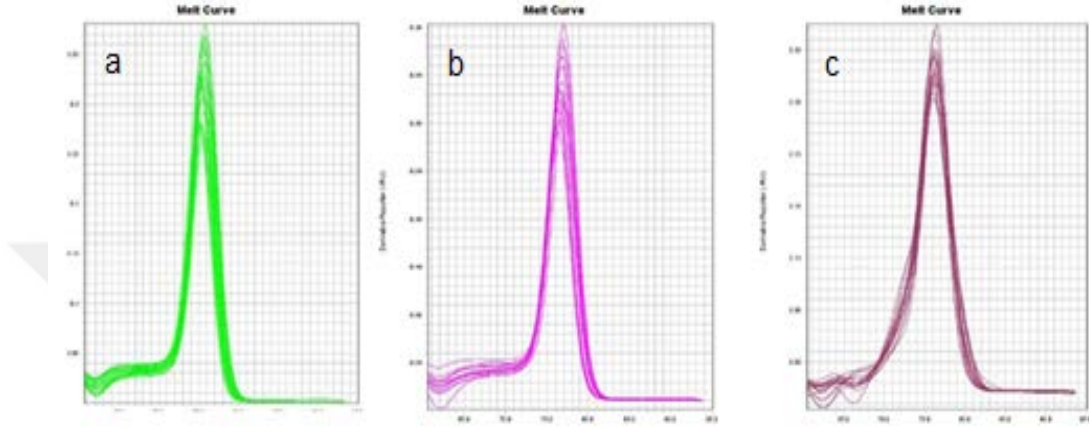
Transkript isimleri	Primer dizileri
miRNA-186	F-5'CAAAGAATTCTCCTTTTGGGCT3'
miRNA-186	R-5'CGAGGAAGAAGACGGAAGAAT3'
miRNA-9	F-5'TCTTTGGTTATCTAGCTGTATGA3'
miRNA-9	R-5'CGAGGAAGAAGACGGAAGAAT3'
RN-U6	F-5'GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT3'
RN-U6	R-5'CGCTTCACGAATTTGCGTGTTCAT3'

Çalışma; Applied Biosystems StepOnePlus cihazı ile yapılmıştır (California, USA).

- Çalışmaya başlamadan önce ilk olarak plate dizaynı yapılır.
- cDNA hariç bütün PCR bileşenleri mix yapılır.
- Mixten eşit miktarda plate'e koyulur.
- cDNA örneğinden dizayna göre her bir kuyuya eklenir.
- Plate sailing film ile kapatılır.
- Örnekler cihaza yüklenir.

Cihaza yüklenen örnekler önce 95 °C'de 10 dk, daha sonra 95 °C'de 15 saniye, 60 °C'de 1 dk inkübe edilerek 40 döngü olarak reaksiyon tamamlanmıştır.

Primerlerin sağlıklı bir dizaynı olduğunu görmek ve kontaminasyonu değerlendirmek için melt curve (erime eğrisi) analizi yapılmıştır (Şekil 15).



Şekil 15. Melting curve analiz sonuçları (a: miRNA-9, b: miRNA-186, c: U6)

Gen ekspresyonları kantitasyonu; U6 geni referans olarak kullanılıp kontrol gurubuna göre normalize edilerek hesaplanmıştır. Relatif kantitasyon hesaplaması olan $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi kullanılmıştır (166). Real time PCR işlemi sonucunda elde edilen değer Ct (siklus eşik değeri-threshold cycle) olarak ifade edilir. PCR ürünlerinin miktarındaki ilk önemli artışı ifade eder.

Her bir örneğe ait, her bir genin Ct değerleri, o örneğin housekeeping Ct değerinden çıkartılarak delta siklus eşik (ΔCt) değerleri hesaplandı. Daha sonra her bir hastanın ΔCt değerleri kontrol grubunun Ct değerinden çıkartılarak delta delta siklus eşik ($\Delta\Delta Ct$) değerleri hesaplandı. Son olarak; her bir genin ne kadar eksprese olduğu hesaplamak için, son değer başlangıca olan oranı alınarak (fold change) $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değeri belirlendi. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değeri 1'in üzerindeyse artış altındaysa ekspresyonda azalma olmuştur şeklinde yorumlanır.

3.5. ELISA ÖLÇÜMLERİ

3.5.1. KALPROTEKTİN ANALİZİ

Kalprotektin ölçümü sandviç ELISA yöntemi ile Human Calprotectin ELISA Kiti kullanarak (Shanghai, China; Kat. No E4010Hu) Heales (London, UK) marka cihaz ile çalışılmıştır.

Bu kit enzime bağlı immünosorbent ölçüm (ELISA) yöntemi ile çalışır. Plate önceden insan kalprotektin antikorları ile kaplanmıştır. Kalprotektin içeren numune kuyucuğa eklendiğinde kaplanmış antikorlara bağlanır. Buradan sonra biyotinlenmiş insan kalprotektin antikorları kuyucuğa eklenir ve katı fazda bağlanmış kalprotektinlere bağlanarak sandviç yapı oluşturulur. Daha sonra Streptavidin-HRP eklenir ve Biyotinlenmiş kalprotektin antikoruna bağlanır. İnkübasyondan sonra bağlanmamış Streptavidin-HRP yıkama basamağı sırasında uzaklaştırılır. Daha sonra substrat çözeltisi eklenir ve insan kalprotektin miktarı ile orantılı olarak renk gelişir. Reaksiyon, asidik stop solüsyonu ilave edilerek sonlandırılır ve absorbans, 450 nm'de ölçülür. 5 noktalı kalibrasyon standart eğrisi çizilir ve ölçülen absorbansdan kalibrasyon eğrisi yardımı ile konsantrasyonlar hesaplanır.

3.5.2. İNSAN EPIDİDİM PROTEİN 4 (HE-4) ANALİZİ

HE-4 ölçümü sandviç ELISA yöntemi ile Human Epididymal Protein 4 ELISA Kiti (Shanghai, China; Kat. No E3309Hu) kullanarak Heales (London, UK) marka cihaz ile yapılmıştır. Bu kit enzime bağlı immünosorbent ölçüm (ELISA) yöntemi ile çalışır. Plate önceden insan HE-4 antikorları ile kaplanmıştır. HE-4 içeren numune kuyucuğa eklendiğinde kaplanmış antikorlara bağlanır. Buradan sonra biyotinlenmiş HE-4 antikorları kuyucuğa eklenir ve katı fazda bağlanmış HE-4'e bağlanarak sandviç yapı oluşturulur. Daha sonra Streptavidin-HRP eklenir ve biyotinlenmiş HE-4 antikoruna bağlanır. İnkübasyondan sonra bağlanmamış Streptavidin-HRP yıkama basamağı sırasında uzaklaştırılır. Daha sonra substrat çözeltisi eklenir ve HE-4 miktarı

ile orantılı olarak renk gelişir. Reaksiyon, asidik stop solüsyonu ilave edilerek sonlandırılır ve absorbans, 450 nm'de ölçülür. 5 noktalı kalibrasyon standart eğrisi çizilir ve ölçülen absorbansdan kalibrasyon eğrisi yardımı ile konsantrasyonlar hesaplanır.

3.5.3. SÜPEROKSİD DİSMUTAZ (SOD) ANALİZİ

SOD aktivitesi Superoxide Dismutase (SOD) Assay Kit (Shanghai, China; Kat. No SH0053) kullanarak WST-1 Metoduna göre WST-1 ürünlerinin kolorimetrik analizi ile belirlenmiştir. Ksantin Oksidaz (XO), suda çözünür bir formazan boyası oluşturmak için WST-1 ile O₂'nin reaksiyona girmesini katalizler, SOD ise süperoksit anyonu ile reaksiyona girerek O₂ ve H₂O₂ oluşturur. Böylece WST-1'in süperoksit ile reaksiyonunu azaltıp renk değişimine sebep olan formazan boya oluşumunu azaltır. Yani SOD aktivitesi oluşan formazan boya miktarı ile ters orantılıdır. Böylece WST-1 ürünü formazan boyasının optik dansitesinin kolorimetrik ölçümü ile SOD aktivitesi belirlenebilir. Kontrol ve kör numunesi kullanarak numunelerin SOD aktivitesi aşağıdaki formül ile hesaplanır.

$$\frac{(\text{OD kontrol}-\text{OD kör kontrol})-(\text{OD numune}-\text{OD kör numune})}{(\text{OD kontrol}-\text{OD kör kontrol})} \times 100 \%$$

3.5.4. MALONDİALDEHİD (MDA) ANALİZİ

MDA ölçümü; Malondialdehyde (MDA) Assay Kit (Houston, US; Kat. No: E-BC-K025-S) kullanılarak kolorimetrik olarak yapılmıştır. Ölçüm prensibi; Lipid peroksidaz katabolitlerinden MDA, tiobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girer ve kırmızı renk veren bileşik üretir, 532 nm'de absorbans verir. Kontrol ve kör numunesi kullanılarak MDA konsantrasyonu aşağıdaki formüle göre hesaplanır;

$$\frac{\text{OD numune}-\text{OD kontrol}}{\text{OD standart}-\text{OD kör}} \times \text{Standart Konsantrasyonu}$$

3.5.5. REDÜKTE GLUTATYON (GSH) ANALİZİ

GSH ölçümü; Glutathione (GSH) Assay Kit (Shanghai, China; Kat. No: SH0028) kullanılarak kolorimetrik olarak yapılmıştır. Ölçüm prensibi GSH'nın içerdiği sülfidril grupları ile reaksiyona girerek sarı renk veren bir bileşik oluşturur. Bu bileşik 405 nm de absorbanısı pik yapar. GSH konsantrasyonu bileşiğin absorbanısı ile doğru orantılı olarak belirlenebilir. Kontrol ve kör numunesi kullanılarak GSH konsantrasyonu aşağıdaki formüle göre hesaplanır;

$$\frac{OD_{\text{numune}} - OD_{\text{kontrol}}}{OD_{\text{standart}} - OD_{\text{kör}}} \times \text{Standart Konsantrasyonu}$$

3.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel analizde SPSS 22,0 paket programı kullanıldı. Vaka ve kontrol grupları arasındaki miRNA-186 gen ekspresyon seviyeleri arasındaki fark öncelikle doku ve serum düzeyinde ayrı ayrı Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi. Aynı şekilde vaka ve kontrol grupları arasında miRNA-9 gen ekspresyon seviyeleri arasındaki fark doku ve serum düzeyinde ayrı ayrı Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi. Sonuçlar ortalama \pm std hata olarak ifade edildi. Analizlerde anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edildi. Tüm gruplarda miRNA-9 düzeyleri için doku ve serum arasındaki korelasyon ilişkisi spearman testi ile, yine tüm gruplarda miRNA-186 için doku ve serum arasında korelasyon ilişkisi spearman testi ile değerlendirildi. Bu markerların tanı güçleri miRNA-9 ve miRNA-186 için doku ve serum olarak ayrı ayrı ROC analizi ile değerlendirildi. Kalprotektin, HE-4, MDA, GSH, SOD belirteçleri ile birleştirildiğinde tanı gücünü ne kadar geliştirdiği yine ROC analizi ile değerlendirildi.

IV. BULGULAR

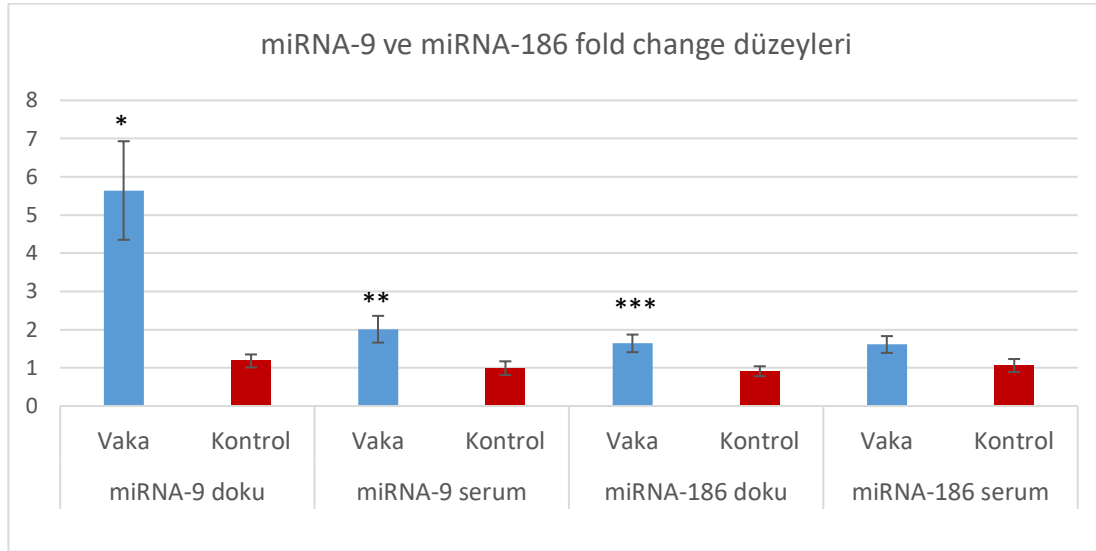
Çalışmamızda 20 vaka ile 22 kontrolden elde edilen doku ve serumlardaki miRNA-9 ve miRNA-186 gen ekspresyon seviyelerine ait veriler aşağıdaki tablodaki gibidir (Tablo 14).

Tablo 14. Doku ve serum miRNA fold change verileri

miRNA'lar	Yer	Grup	Sayı	Ortalama±Std hata	P değeri
miRNA-9	Doku	Vaka	18	5,64±1,29*	0,011
		Kontrol	17	1,18±0,17	
	Serum	Vaka	18	2,01±0,35**	0,047
		Kontrol	17	0,99±0,18	
miRNA-186	Doku	Vaka	17	1,64±0,23***	0,03
		Kontrol	17	0,91±0,13	
	Serum	Vaka	19	1,61±0,22	0,077
		Kontrol	19	1,06±0,17	

*Kontrol grubuna göre (p=0,011), **Kontrol grubuna göre (p=0,047), ***Kontrol grubuna göre (p=0,03).

Bu verilere ait grafik ise aşağıdaki gibi oluşmuştur (Şekil-16).



Şekil 16. Vaka ve kontrol grubuna göre miRNA fold change düzeyleri, (ortalama ± std hata). *Kontrol grubuna göre (p=0,011), **Kontrol grubuna göre (p=0,047), ***Kontrol grubuna göre (p=0,03).

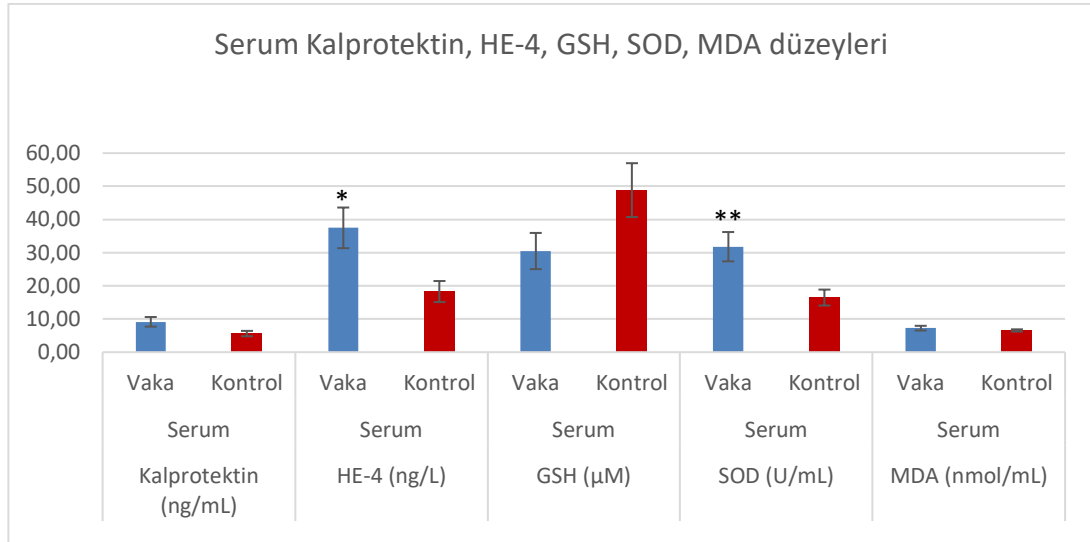
Vaka ve kontrol grubunun serum numuneleri kullanılarak ölçülen kalprotektin, HE-4, GSH, SOD, MDA analizine ait veriler ise aşağıdaki gibidir (Tablo 15).

Tablo 15. Gruplara göre belirteçlerin düzeyleri

Parametre	Yer	Grup	Sayı	Ortalama \pm Std hata	p değeri
Kalprotektin (ng/mL)	Serum	Vaka	17	9,15 \pm 1,45	0,156
		Kontrol	18	5,61 \pm 0,81	
HE-4 (ng/L)	Serum	Vaka	17	37,48 \pm 6,13*	0,023
		Kontrol	19	18,28 \pm 3,17	
GSH (μ M)	Serum	Vaka	15	30,49 \pm 5,46	0,140
		Kontrol	19	48,85 \pm 8,12	
SOD (U/mL)	Serum	Vaka	19	31,80 \pm 4,42**	0,008
		Kontrol	19	16,47 \pm 2,4	
MDA (nmol/mL)	Serum	Vaka	20	7,24 \pm 0,71	0,206
		Kontrol	19	6,56 \pm 0,33	

* Kontrol grubuna göre (p=0.023), ** Kontrol grubuna göre (p= 0.008).

Bu değişkenlere ait grafik ise aşağıdaki gibi oluşmuştur (Şekil-17).



Şekil 17. Vaka ve kontrol grubuna göre belirteç düzeyleri (ortalama \pm std hata). *Kontrol grubuna göre (p=0.023), ** Kontrol grubuna göre (p= 0.008).

Testlerin yapılan Kolmogorov-Smirnov analizine göre normallikleri değerlendirildi (Tablo 16). miRNA-9 ve kalprotektin analiz sonuçları normal olmayan dağılım gösterirken diğer parametrelerin dağılımı normal saptanmıştır ancak grup sayıları 30'un altında olduğu için gruplar karşılaştırılırken Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.

Tablo 16. Testlerin normallik analizi

Değişkenler	Kolmogorov-Smirnov ^a
	Sig.
miRNA-9 Doku	0,000 *
miRNA-9 Serum	0,179
miRNA-186 Doku	0,200
miRNA-186 Serum	0,200
Kalprotektin	0,006 *
HE-4	0,168
GSH	0,200
MDA	0,200
SOD	0,200

* p <0.05 normal dağılımdan anlamlı farklı dağılım.

Vaka ve kontrol grupları miRNA-9 gen ekspresyon seviyeleri arasındaki fark öncelikle doku düzeyinde değerlendirildi ve anlamlı fark bulundu (p=0.011).

Vaka ve kontrol grupları miRNA-9 gen ekspresyon seviyeleri arasındaki fark serum düzeyinde değerlendirildi ve anlamlı fark bulundu (p=0,047).

Vaka ve kontrol grupları arasında miRNA-186 gen ekspresyon seviyeleri arasındaki fark doku düzeyinde değerlendirildi ve anlamlı farklı bulundu (p=0.03).

Vaka ve kontrol grupları arasında miRNA-186 gen ekspresyon seviyeleri arasındaki fark serum düzeyinde değerlendirildi ve anlamlı farklı bulunmadı (p=0.077).

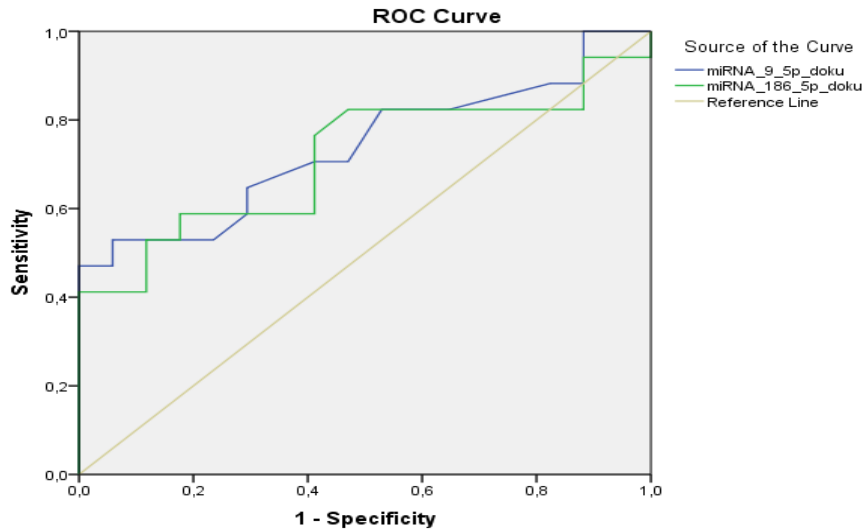
Tüm gruplarda miRNA-9 düzeyleri için doku ve serum arasındaki korelasyon ilişkisi değerlendirildi ve anlamlı korelasyon saptandı ($p=0.001$, $r=0,751$).

Tüm gruplarda miRNA-186 düzeyleri için doku ve serum arasındaki korelasyon ilişkisi değerlendirildi ve anlamlı korelasyon saptandı ($p=0.001$, $r=0,789$).

Tüm gruplarda miRNA-9 ve miRNA-186 için doku düzeyinde korelasyon ilişkisi değerlendirildi ve anlamlı olarak ilişkili bulundu ($p =0.001$, $r=0,888$).

Tüm gruplarda miRNA-9 ve miRNA-186 için serum düzeyinde korelasyon ilişkisi değerlendirildi ve anlamlı olarak ilişkili bulundu ($p =0.001$, $r=0,870$).

Doku miRNA-9 ve miRNA-186 için ayırt edici güçleri ROC analizi ile değerlendirildi (Şekil 18).



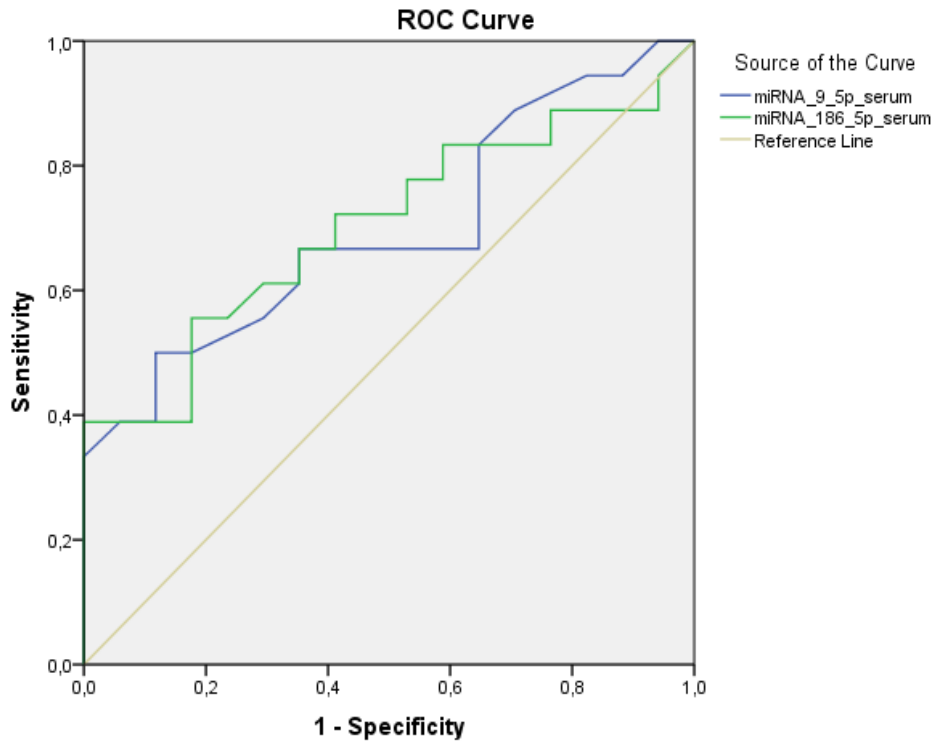
Şekil 18. Doku miRNA-9 ve miRNA-186 ROC eğrileri

Doku miRNA-9 ve miRNA-186 için yapılan ROC analizinde eğri altında kalan alan (AUC) ise sırasıyla 0,737 ve 0715 olarak belirlenmiştir (Tablo 17).

Tablo 17. Doku miRNA-9 ve miRNA-186 ROC eğrisinde AUC değerleri

Değişken	Eğri altında kalan alan (AUC)
Doku miRNA-9	0,737 (%95 CI 0,565-0,909)
Doku miRNA-186	0,715 (%95 CI 0,533-0,896)

Aynı şekilde serum miRNA-9 ve miRNA-186 için ayırt edici güçleri ROC analizi ile değerlendirildi (Şekil 19).



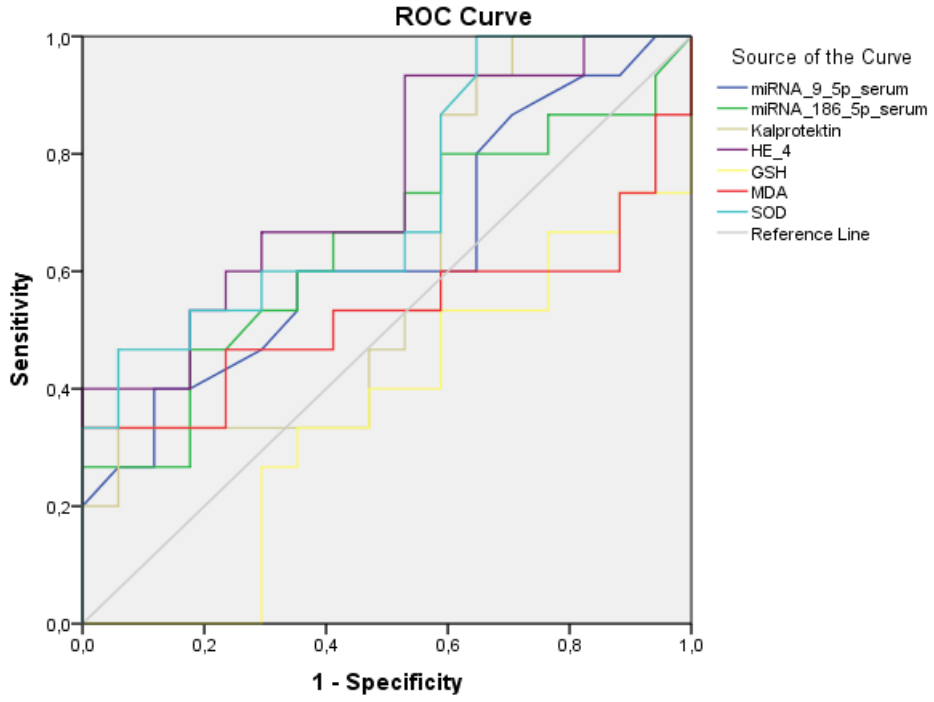
Şekil 19. Serum miRNA-9 ve miRNA-186 ROC eğrileri

Serum miRNA-9 ve miRNA-186 için yapılan ROC analizinde eğri altında kalan alan (AUC) ise sırasıyla 0,696 ve 0703 olarak belirlenmiştir (Tablo 18).

Tablo 18. Serum miRNA-9 ve miRNA-186 ROC eğrisinde AUC değerleri

Değişken	Eğri altında kalan alan (AUC)
Serum miRNA-9	0,696 (%95 CI 0,520-0,872)
Serum miRNA-186	0,703 (%95 CI 0,526-0,879)

Serumda miRNA gen ekspresyon seviyelerinin ayırt edici gücü, serum Kalprotektin, HE-4, MDA, GSH, SOD markerları ile birleştirildiğinde ayırt edici gücü ne kadar geliştirdiği yine ROC analizi ile değerlendirildi (Şekil 20).



Şekil 20. Serum miRNA'lar ve belirteçlerin ROC analizi.

Serum miRNA gen ekspresyon seviyelerinin yanısıra serum Kalprotektin, HE-4, MDA, GSH, SOD markerlarının ROC eğrisinde hesaplanan AUC değerleri sırasıya 0.608, 0.745, 0.361, 0.525, 0.724 olarak belirlenmiştir (Tablo 19).

Tablo 19. Serum miRNA'lar ve diğer belirteçlerin AUC değerleri

Değişkenler	Eğri altında kalan alan (AUC)
Serum miRNA-9	0,696 (%95 CI 0,520-0,872)
Serum miRNA-186	0,703 (%95 CI 0,526-0,879)
Kalprotektin	0,608 (%95 CI 0,404-0,811)
HE-4	0,745 (%95 CI 0,573-0,917)
GSH	0,361 (%95 CI 0,166-0,576)
MDA	0,525 (%95 CI 0,303-0,748)
SOD	0,724 (%95 CI 0,545-0,942)



V. TARTIŞMA

EK, gelişmiş dünya ülkelerinde en yaygın jinekolojik malignitedir. Kadınlardaki tüm kanserler içinde ise dördüncü sırada olup en fazla ölüme sebep olan sekizinci kanser türüdür. Dünya çapında 2018 yılında yaklaşık 382.069 yeni vaka tanı almıştır (12). Dünyada 2018 verilerinde insidans 8.4/100.000, mortalitesi ise 1.8/100.000 olarak Globocan istatistiklerinde belirtilmiştir.

EK hastalarının çoğu postmenopozal kadınlardır; bununla birlikte vakaların %14'ü premenopozal dönemde, %4'ü 40 yaşından daha erken teşhis edilir (145,146). Gelişmiş ülkelerde EK ve mortalite görülme sıklığı artmaktadır (167), bu da obezite ve metabolik sendrom prevalansının artmasıyla ilişkili olabilir (168).

Sanayileşmiş ülkelerde, kadınların %2-3 yaşam boyu EK geliştirme riski taşır (169). Hastaların çoğuna erken evrede tanı konulmasına ve histerektomi ile tedavi edilmesine rağmen, lokal ilerlemiş veya metastatik hastalık belirtisi olmayan hastaların %15-20'sinde kanser nükseder (170).

Endometrial kalınlığın transvajinal ultrason ile ölçümü, EK için bir tarama yöntemi olarak önerilmiştir ancak biyopsi veya dilatasyon-küretaj ile endometriyal örnekleme, tanı için altın standart olmaya devam etmektedir (1). Endometriyal biyopsi veya dilatasyon-küretaj gibi altın standart tanı yöntemleri invazif olup morbidite riski taşır. EK için yüksek risk taşıyan vakaların belirlenmesinde non-invaziv tanı araçlarına ihtiyaç vardır. Bu şekilde seçilmiş vakalar kesin tanı için invazif yöntemlere yönlendirilebilir. Ancak, şu anda güvenilir non-invaziv bir tarama stratejisi mevcut değildir (171).

Belirteçler, yüksek EK riski olan popülasyonda endometriyal biyopsi gereksinimini azaltabilir. Bu tür non-invaziv teşhis yöntemleri, özellikle tamoksifen kullanıcıları ve Lynch sendromlu kadınlar gibi asemptomatik yüksek riskli vakalarda kanserin erken teşhisine ve uygun tedaviye olanak tanıyacağı için büyük önem taşımaktadır (1).

Tamoksifen ile tedavi edilen meme karsinomu vakaları, ciddi obez kadınlar, diyabet hastaları ve Lynch sendromlu hastalar gibi yüksek riskli popülasyonlarda, erken tanı için uygun maliyetli bir teşhis yöntemi çok değerli olacaktır (172).

EK'nin prognostik değerlendirmesinde de yeni belirteçlere büyük bir ihtiyaç vardır. Belirteçler, ameliyat öncesi EK hastalarının yüksek riskli ve düşük riskli kategorilere ayrılmasında yardımcı olabilir, böylece tedavinin daha fazla bireye özgü olmasına imkan sağlar (173).

EK için son 10 yılda bildirilen potansiyel belirteçlerin çoğu, CA-125 ve HE-4 hariç, geliştirilme aşamasındadır. Drucker ve Krapfenbauer biyobelirteç keşfinden klinik kullanıma geçişteki güçlükleri ve sınırlamaları gözden geçirmiştir (174). Potansiyel belirteçlerin sıklıkla yetersiz duyarlılıkları ve özgüllükleri, belirteç keşif sürecindeki bazı eksikliklere bağlanmıştır. Bunlar; az sayıda numune, numunelerin geçmişi hakkında yetersiz bilgi, vaka ve kontrollerin uygunsuz eşleşmesi, proteom veya metabolomun sınırlı kapsamı, numune için standart çalışma prosedürlerinin eksikliği ve ayrıca seçim, toplama, kullanım, saklama, analitik yöntemler ve veri yorumlamada meydana gelen hatalar olarak sıralanmıştır (174).

Örnek toplama, işleme ve saklama için standart işlem prosedürleri eksikliği preanalitik biasa neden olabilir. Bu eksiklikler, kan tüplerinin tipi, santrifüjleme

adımları, toplama ve işleme arasındaki süre, saklama süresi ve sıcaklığı gibi ayrıntıları içermelidir. Bu veriler genellikle belirteç çalışmalarında verilmemiştir, bu bilgi eksiklikleri belirteç çalışmalarındaki zayıf tekrarlanabilirliği açıklayabilir. Analitik yöntemler genellikle tekrarlamaya izin vermek için yeterli detay ile tarif edilmemiştir. Son yıllarda, araştırmalarda tekrarlanabilirlik önemli bir sorun olarak kabul edilmektedir (175).

miRNA molekülleri, gen ekspresyonunun ana transkripsiyonel regülatörleridir (176). Farklı miRNA tipleri kanser gelişimi ile ilişkilidir ve bunlar onkojenik ve tümör baskılayıcı miRNA'lar olarak sınıflandırılır (177). Çok sayıda çalışma, miRNA'ların farklı kanserlerde anormal bir şekilde eksprese edildiğini göstermiştir (178). miRNA'lar, kan dolaşımında tespit edilebilir (178).

Erişilebilirlikleri ve stabiliteleri nedeniyle, miRNA'lar tanı için ortaya çıkan potansiyel belirteçlerdir. EK'de, bir kanser gelişimini stimüle edecek veya inhibe edebilecek miRNA'lar yakın zamanda tanımlanmış ve incelenmiştir. Kanser tanısı, prognozu ve tedavisinde olası uygulamaları hala araştırılmaktadır (176).

Son yıllarda miRNA'yı EK'nin potansiyel belirteçleri olarak analiz eden dört çalışma bulunmaktadır (146,162,171,179). Bu çalışmaların her biri EK'li 33-49 hastadan ve 14-52 sağlıklı veya benign durumu olan vakaların olduğu kontrol grubundan oluşmaktaydı. Tek tek değerlendirilen miRNA'lar (miRNA-15b, miRNA-27a, miRNA-223, miRNA-222, miRNA-186 ve miRNA-204) için ROC eğrisinde 0.73 ila 0.87 arasında yüksek AUC değerleri bildirmiştir (162,179).

Jia ve arkadaşlarının 2013'de yaptığı çalışmada, dört miRNA'lı bir modelde (miR-222, miR-223, miR-186 ve miR-206), serum numuneleri kullanılarak yapılan

analizin EK'li hastaları sağlıklı kadınlardan ayırt etme gücünü değerlendirmek için yapılan ROC analizinde AUC değeri 0.93 bulundu (179).

Torres ve arkadaşlarının 2012'de yaptığı çalışmada plazma miRNA-99a ve miRNA-199b kombine edilerek değerlendirilmiş ve ROC eğrisinde AUC değeri 0.90 olarak bulunmuştur (171).

Torres ve arkadaşlarının 2013'de yaptığı çalışmada ise EK'li ve sağlıklı kadınlar arasındaki ayrım, plazma miRNA-9 ve miRNA-1228, ayrıca miRNA-9 ve miRNA-92a düzeyleri kombine edilerek değerlendirilmiş ve her ikisinde de ROC eğrisinde AUC değeri 0.91 olarak bulunmuştur (146).

Bu çalışmalarda miRNA'lardan; miRNA-9, miRNA-186, miRNA-200b, miRNA-200c ve miRNA-449'un EK gelişimine katkısı olduğu, miRNA-199b, miRNA-200c, miRNA-203, miRNA-204, miRNA-222 ve miRNA-449'un EK'ye karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir (176). Ancak çalışılan gruplar görece küçük vaka kontrol gruplarından oluşmuştur ve sonuçları çok merkezli çalışmalarla valide edilmesi gerektiği bildirilmiştir (1).

Bizim çalışmamızda miRNA-9 ve miRNA-186 kombine edilerek çalışıldı. Doku düzeyinde ölçülen sonuçlar ROC analizi ile değerlendirildiğinde AUC değerleri sırasıyla 0,737 ve 0,715 olarak bulundu. miRNA-9 ve miRNA-186 doku düzeyinde orta düzeyde tanı gücüne sahip olarak değerlendirildi. Serum düzeyinde bakılan miRNA-9 ve miRNA-186'nın ROC eğrisindeki AUC değerleri sırasıyla 0,696 ve 0,703 olarak bulundu ve yine orta düzeyde ayırt edici güçte performans gösterdi. Doku ve serum düzeyleri arasında korelasyonu değerlendirilen miRNA-9 için yapılan spearman korelasyon analizi anlamlıydı ve güçlü korelasyon gösterdi ($p=0.001$, $r=0.751$). Aynı

şekilde miRNA-186 için yapılan spearman korelasyon analizinde de anlamlı ilişki bulundu ve güçlü korelasyon gösterdi ($p=0.001$, $r=0.789$).

Hücre çoğalmasındaki hücre içi önemli enzimleri inhibe ettiği bilinmesine rağmen (180), kalprotektin'in kanser gelişimindeki rolü tam olarak bilinmemektedir (181) ancak yaygın apoptozisi indükleyici aktivitesi vardır (182). Kalprotektin, primer ve metastatik tümörlerin büyümesinde rol oynayan matriks metalloproteinazları da (MMP'ler) inhibe eder (183). Ayrıca, bazı tümörlerin dokusunda kalprotektin gen ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (184–186).

Guo ve arkadaşları kalprotektini endometriyal karsinom için potansiyel bir protein markeri olarak tanımlamış ve endometriyal karsinom dokusunda artmış kalprotektin protein ekspresyonunu göstermiştir (187).

Hannah ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise EK'li vakalar sağlıklı premenopozal ve post menopozal grupla karşılaştırıldığında anlamlı farklılık bulunmuş ve ROC analizinde AUC değeri 0,90 olarak gösterilmiştir (3).

Bizim çalışmamızda ise serum Kalprotektin vaka-kontrol grubunda anlamlı fark bulunmadı ($p=0,156$). ROC analizinde AUC değeri 0,608 olarak bulundu ve düşük tanı gücüne sahip olarak değerlendirildi.

Yüksek ROS seviyeleri genellikle hücreler için zararlıdır ve kanser hücrelerinin redoks durumu normal hücrelerinkinden farklıdır. Kanser hücreleri, bu nedenle ROS seviyelerini, düşük bir sitostatik seviyenin üstünde, ancak sitotoksik olacak seviyelerin altında, orta derecede yüksek bir tümörojenik düzeyde tutarlar (188).

Karsinogenez DNA hasarlanması sonucu oluşan mutasyonlardan kaynaklanır. DNA hasarının ana sebebi serbest radikallerin sayısını arttıran oksidatif strestir. Reaktif oksijen türleri (ROS) vücutta oksidatif hasara neden olan en önemli serbest radikallerdir (189). Literatürde oksidan, antioksidan moleküller ve farklı insan kanseri türlerinde enzimler hakkında rapor edilen veriler tartışmalıdır (190).

Oksidatif stresin ve inflamasyonunun artmasının kanser riski ile ilişkili olduğu da iyi bilinmektedir (191). Tümörojenik hücrelerin; proliferasyon, hayatta kalma ve metabolik adaptasyonu devam ettirebilmek için normalden yüksek seviyelerde ROS ürettiği düşünülmektedir. Aynı zamanda, kanser hücreleri, hücre ölümünü indükleyebilecek seviyelerde ROS birikmesini önlemek için normalden yüksek seviyede antioksidan aktiviteyi sürdürürler.

Kuran ve arkadaşlarının 2018 yılında yaptığı EK ve kontrol grubunu karşılaştırdığı çalışmada plazma MDA seviyeleri arasında anlamlı fark bulunmamıştır (192). Heidari ve arkadaşlarının 2019'da yaptığı EK ve sağlıklı gönüllü grubu karşılaştırdığı çalışmasında ise serum MDA düzeyleri EK'li grupta anlamlı artmış olarak bulunmuştur (157). Mevcut çalışmamızda ise oksidan stres göstergesi olarak ölçülen serum MDA düzeyleri vaka ve kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunmadı ($p=0,206$). ROC eğrisinde AUC değeri ise 0.525 olarak hesaplandı.

Sahu ve arkadaşlarının 2015'de yaptığı çalışmada meme kanserleri ve kontrol grubunu karşılaştırdığı çalışmada serum MDA seviyeleri anlamlı artmış, serum SOD seviyeleri ise anlamlı azalmış olarak bulunmuştur (193). Aynı çalışmada operasyon öncesi ve sonrası MDA ve SOD düzeyleri ölçülmüş; serum MDA anlamlı azalırken, serum SOD düzeylerinde anlamlı olarak artış gösterilmiş. Arslan ve arkadaşlarının 2014'de karaciğer kanseri (HCC) ve sağlıklı grubu karşılaştırdığı çalışmasında serum MDA seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulunurken, eritrosit SOD ve

GSH düzeyleri ise anlamlı düşük olarak rapor edilmiş (194). Yapılan bir başka benzer çalışmada ise HCC vakaları ve sağlıklı kontrol grubu karşılaştırılmış ve serum SOD ve GSH düzeyleri anlamlı olarak azalmış olarak gösterilmiştir (192). Abel ve arkadaşlarının yaptığı HCC ve kontrol grubunun karşılaştırıldığı çalışmada ise doku GSH seviyeleri daha düşük, SOD seviyeleri ise daha yüksek bulunmuştur (195). Chang ve arkadaşları 2008'de kolorektal kanserli vaka ve sağlıklı kontrol grubunu karşılaştırdığı çalışmasında serum SOD seviyeleri anlamlı azalmışken, GSH seviyeleri arasında anlamlı fark bulunmamıştır (196). Kaynar ve arkadaşlarının 2005'de yaptığı akciğer kanseri ve sağlıklı grubu karşılaştırıldığı çalışmada eritrosit MDA, SOD, GSH düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı yüksek olduğu gösterilmiştir (158). Son yıllarda EK'de serum ya da dokuda SOD ve GSH çalışmasına rastlanılmamıştır.

Mevcut çalışmamızda anti-oksidan moleküllerden SOD ve GSH serum seviyeleri ölçüldü. Vaka ve kontrol grupları arasında SOD için anlamlı farklılık bulundu ($p=0.008$), GSH için anlamlı fark bulunmadı ($p=0.140$). SOD ve GSH için ROC eğrisindeki AUC değerleri de sırası ile 0,724 ve 0,361 olarak hesaplandı.

Proteomik çalışmalarında potansiyel tümör belirteci olabileceği öngörülen, diagnostik ve prognostik değeri olabileceği düşüncesiyle HE-4'e artmış bir ilgi vardır (171,172). Çeşitli malignitelerde mide, meme, over ve akciğer kanserlerinde çalışılmıştır (197). Endometrial kanser vakalarında da değerlendirilen bu marker özellikle CA-125 ile birlikte ölçümlerine göre performansı tek başına çalışılmasından daha iyi sonuçlar vermiştir.

Angioli ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada EK'li hastalar ve kontrol grubunun karşılaştırılmasında serum HE-4 seviyeleri anlamlı farklı, hasta ve sağlıklıları ayırt etme gücünü değerlendirmek için yapılan ROC analizinde ise AUC değeri 0,86 olarak bulunmuştur (198).

Prueksaritanond ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre ise serum HE-4 düzeyi, tümör çapı ve myometriyal invazyonu olan vakalarda karşılaştırılmış ve tümör çapı 2 cm'den az ve fazla olan gruplarda anlamlı farklı bulunmuştur. Ayrıca myometriyal invazyonu %50'den az ve fazla olan gruplarda da serum HE-4 seviyeleri anlamlı farklı bulunmuştur. HE-4 için düşük ve yüksek riskli EK'li vakaları ayırt etme gücü değerlendirilmesi için yapılan ROC analizinde AUC değeri 0,88 olarak belirlenmiştir. Böylece HE-4'ün prognostik değeri olduğu gösterilmiştir (199).

Brennan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise daha önce EK tanısı alıp tedavi olan vakalarda rekürrens değerlendirilmiş. Rekürrensi gelişen ve gelişmeyen olgular karşılaştırıldığında HE-4'ün anlamlı düzeyde yükseldiği ve ayırt edici gücü ROC eğrisi ile değerlendirildiğinde AUC değeri 0,87 olarak bulunmuştur. Böylece CA-125'e göre (AUC: 0.67) rekürrensi öngörmede daha iyi marker olabileceği gösterilmiştir (200).

Çalışmamızda ise serum HE-4 seviyeleri gruplar arası anlamlı farklıydı ($p=0,023$), yaptığımız ROC analizinde AUC değeri 0,745 olarak bulundu, hasta ve sağlıklıları orta düzeyde ayırt edici güce sahip olarak değerlendirildi.

VI. SONUÇ

Çalışmamızda doku miRNA-9 ve miRNA-186 düzeyleri için vaka ve kontroller arasında anlamlı fark bulundu (Sırasıyla $p=0.011$, $p=0.03$). Yapılan ROC analizinde ise AUC değerleri sırasıyla 0.737 ve 0.715 olarak bulundu ve orta düzeyde ayırt edici güce sahip olarak değerlendirildi. Serum miRNA-9 düzeyleri için vaka ve kontroller arası anlamlı fark bulundu ($p=0.047$) ancak serum miRNA-186'nin vaka ve kontroller arasında anlamlı fark bulunmadı ($p=0.077$). Serum miRNA-9 ve miRNA-186 için yapılan ROC analizinde ise AUC değerleri sırasıyla 0.696 ve 0.703 olarak bulundu ve orta düzey ayırt edici güce sahip olarak değerlendirildi. Serum HE-4 ve SOD değerleri için gruplar arası anlamlı fark bulundu (Sırasıyla $p=0.023$, $p=0.008$), ROC eğrisi ile değerlendirildiğinde ayırt edici güçleri sırasıyla 0.745 ve 0.724 olarak bulundu ve orta düzeyde ayırt edici güce sahip olarak değerlendirildi. miRNA'ların doku ve serum değerleri arasındaki korelasyon değerlendirildiğinde miRNA-9'un doku ve serum seviyeleri arasında anlamlı ilişkisi olup güçlü korelasyona sahipti ($p=0.001$, $r=0.751$). Aynı şekilde miRNA-186 için doku ve serum seviyeleri arasında anlamlı ilişki olup güçlü korelasyon mevcuttu ($p=0.001$, $r=0,789$).

Bu bulgular bize serum miRNA-9 ve serum miRNA-186'nin EK'de orta düzeyde yüksek riskli vakaları ayırt edici güçte olduğunu ve seçilmiş vakaların invazif tanı yöntemlerine yönlendirilmesinde potansiyel olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Ayrıca HE-4 ve SOD moleküllerinin ayırt edici gücü arttırabileceği de gösterilmiştir.

Ancak bu çalışmanın küçük bir hasta grubuyla yapılması ve analizlerde non-parametrik yöntemler kullanılması ulaşılan sonuçların sahip olduğu kısıtlılıktır.

Çalışmamız genel olarak literatürle uyumluydu. Özellikle serum miRNA-186 düzeyleri arasında anlamlı fark bulunmaması beklenenden farklı bir sonuçtu ve bu durumun birçok nedeni olabilir. Bu sebepler, kan tüplerinin tipi, santrifüjleme adımları, toplama, saklama süresi, sıcaklık gibi preanalitik sebepler, analitik yöntemler (izolasyon, kontaminasyon, amplifikasyon vb.) ve veri yorumlamada meydana gelebilecek hatalar olarak sınıflandırılabilir.

Ayrıca şimdiye kadar yapılan çalışmalar arasında tutarsızlıklar olmasının sebebi miRNA izolasyonu, kantitasyonu ve veri analizinde standart yöntemlerin bulunmaması olarak söylenebilir.

VII. ÖZET

ENDOMETRİYUM KANSER VAKALARINDA HE-4 ve KALPROTEKTİN SEVİYELERİ ile miRNA-9 ve miRNA-186 SEVİYELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Amaç: Endometriyum kanserleri tüm dünyada jinekolojik kanserler içinde en sık görülen ve en fazla ölüme sebep olan sekizinci kanser türüdür. Yüksek riskli vakalarda biyopsi veya dilatasyon-küretaj ile endometriyal örnekleme tanıda altın standarttır. Bu girişimler invaziftir ve morbidite riskini taşır. Bu sebeble yüksek riskli vakaları belirlemek için non-invazif güvenilir yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Günümüzde EK için yüksek risk taşıyan vakaları ayırt etmede etkili non-invazif bir yöntem olmayıp çalışmamız yeni ortaya çıkan belirteçlerin ayırt edici gücünü ortaya koymayı amaçlamaktadır.

Metod: Çalışma Prospektif olarak dizayn edilerek Endometriyum kanser tanısı alıp histerektomi yapılan 20 vaka ile, benign hastalık tanısı alıp histerektomi yapılan 22 kontrolden oluşmuştur. miRNA-9 ve miRNA-186 kendilerine özgü kitle doku ve serumdan izole edilmiş ve qRT-PCR yöntemi ile analiz edilmiştir. Kalprotektin, HE-4, SOD, MDA, GSH serum seviyeleri ise ELISA yöntemi kullanılarak kolorimetrik olarak analiz edilmiştir. miRNA moleküllerinin ayırt edici gücü ROC eğrileri ile belirlenip serum belirteçleriyle birleştirildiğinde tanı gücünü ne kadar arttırabileceği gösterilmiştir.

Bulgular: Doku miRNA-9 ve miRNA-186 düzeyleri vaka grubu kontrole göre anlamlı olarak farklıydı ($p=0.011$, $p=0.03$; sırasıyla), ROC analizinde AUC değerleri sırasıyla 0.737 ve 0.715 olarak hesaplandı. Serum miRNA-9 düzeyleri vaka grubu kontrole göre anlamlı olarak farklıydı ($p=0.047$). Serum miRNA-186 düzeylerinde vaka grubu kontrole göre anlamlı farklı değildi ($p=0.077$). Serum miRNA-9 ve miRNA-186 için yapılan ROC analizinde AUC değerleri sırasıyla 0.696 ve 0.703 olarak hesaplandı.

Serum HE-4 ve SOD vaka grubu kontrole göre anlamlı fark vardı ($p=0,023$, $p= 0,008$; sırasıyla), ROC analizindeki değerleri sırasıyla 0,745 ve 0,724 olarak hesaplandı. Serum kalprotektin, GSH, MDA düzeylerinde vaka grubunda kontrole göre anlamlı fark yoktu ($p=0.156$, $p=0.140$, $p=0.256$; sırasıyla), ROC eğrisi AUC değerleri ise sırasıyla 0.608, 0.361, 0.525 olarak hesaplandı. Doku ve serum miRNA-9 seviyeleri arasında anlamlı ilişki olup güçlü korelasyona sahipti ($p=0.001$, $r=0.751$; sırasıyla). Aynı şekilde doku ve serum miRNA-186 düzeyleri arasında anlamlı ilişki olup, güçlü korelasyon mevcuttu ($p=0.001$, $r=0,789$).

Sonuç: Elde edilen bulgulara göre doku ve serum miRNA-9 ve miRNA-186 düzeyleri EK'li vakalarda anlamlı olarak yüksek bulundu. ROC analizine göre ise orta derecede ayırt edici güce sahip olarak değerlendirildi. miRNA-9 ve miRNA-186 doku ve serum düzeyleri arasında ayrı ayrı anlamlı ve yüksek derecede korelasyon saptandı. ROC analizinde Serum HE-4 ve SOD düzeylerinin EK'li vakalarda ayırtedici gücü yükselttiği belirtildi. Sonuç olarak, serum miRNA-9, miRNA-186, HE-4 ve SOD moleküllerinin EK için yüksek risk taşıyan vakaların ayırt edilmesinde yeri olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: miRNA-9, miRNA-186, Endometriyum Kanseri, Kalprotektin, HE-4, SOD, GSH, MDA.

VIII. ABSTRACT

EVALUATION OF HE-4 AND CALPROTECTIN WITH miRNA-9 AND miRNA-186 LEVELS IN ENDOMETRIUM CANCER CASES

Objective: Endometrium cancers are the most common type among gynecological cancers and the eighth cancer type that causes the death worldwide. In high-risk cases, biopsy or dilatation-curettage are the gold standard in diagnosis. These interventions are invasive and carry the risk of morbidity. Therefore, to distinguish the cases that have high risk for EC, non-invasive reliable methods are needed. Hence there is no effective non-invasive method to distinguish cases today, our study aims to reveal the effectiveness of emerging markers to distinguish cases that have high risk for EC.

Method: The study was designed prospectively and consisted of 20 cases diagnosed with endometrium cancer underwent hysterectomy, and 22 controls with benign disease underwent hysterectomy. miRNA-9 and miRNA-186 were isolated from their tissue and serum, after that analyzed by the qRT-PCR method. Calprotectin, HE-4, SOD, MDA, GSH serum levels were analyzed colorimetrically using ELISA method. The effectiveness of miRNA molecules in early diagnosis has been shown by ROC curves and combined with serum markers to increase the diagnostic effectiveness.

Results: Tissue miRNA-9 and miRNA-186 levels were significantly different between case and control group ($p=0.011$, $p=0.03$; respectively), AUC values in ROC analysis were calculated as 0.737 and 0.715, respectively. There was significant difference in serum miRNA-9 levels between case and control group ($p = 0.047$), no significant difference in serum miRNA-186 levels between case and control group ($p = 0.077$). AUC values in ROC analysis of serum miRNA-9 and miRNA-186 levels, were calculated as 0.696 and 0.703, respectively. There was a significant difference in serum HE-4 and SOD levels between case and control group ($p = 0.023$, $p = 0.008$; respectively), AUC values in ROC analysis were calculated as 0.745 and 0.724,

respectively. There was no significant difference in serum calprotectin, GSH, MDA levels between case and control group ($p = 0.156$, $p = 0.140$, $p = 0.256$; respectively), AUC values in ROC analysis were calculated as 0.608, 0.361, 0.525, respectively. miRNA-9 levels was significantly correlated between tissue and serum and had a strong correlation ($p = 0.001$, $r = 0.751$). In the same way, there was a significant relationship between tissue and serum miRNA-186 levels and there was a strong correlation ($p = 0.001$, $r = 0.789$).

Conclusion: According to the findings in EC cases, miRNA-9 and miRNA-186 have a significant increase in tissues and serum. According to the ROC analysis, it was evaluated as a moderately distinctive effectiveness. There was a significant correlation between miRNA-9 and miRNA-186 levels in tissue and serum separately. In ROC analysis, serum HE-4 and SOD levels were shown to increase the discriminative effectiveness. Therefore, we consider that; serum miRNA-9, miRNA-186, HE-4 and SOD analyses could be useful for cases that have high risk for EC.

Key words: miRNA-9, miRNA-186, Endometrial Cancer, Calprotectin, HE-4, SOD, GSH, MDA.

IX. KAYNAKÇA

1. Rižner TL. Discovery of biomarkers for endometrial cancer: current status and prospects. *Expert Rev Mol Diagn.* 2016;16(12):1315–36.
2. Capriglione S, Plotti F, Miranda A, Lopez S, Scaletta G, Moncelli M, et al. Further insight into prognostic factors in endometrial cancer: the new serum biomarker HE4. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2017;17(1):9–18.
3. Bhriain N, Trovik J, Wik E, Stefansson I, Akslen L, Salvesen H, et al. Plasma calprotectin concentrations in women with endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2009;114(3):491–5.
4. Wang Q, Xu K, Tong Y, Dai X, Xu T, He D, et al. Novel miRNA markers for the diagnosis and prognosis of endometrial cancer. *J Cell Mol Med.* 2020;24(8):4533–46.
5. Yang C, Ota-Kurogi N, Ikeda K, Okumura T, Horie-Inoue K, Takeda S, et al. MicroRNA-191 regulates endometrial cancer cell growth via TET1-mediated epigenetic modulation of APC. *J Biochem.* 2020;
6. Cunningham FG, Leveno KJ, Bloom SL, Dashe JS, Hoffman BL, Casey BM, et al. *Williams Obstetrics.* 25th ed. 2018. p. 66–73.
7. Sheikhzadi A, Sadr SS, Ghadyani MH, Taheri SK, Manouchehri AA, Nazparvar B, et al. Study of the normal internal organ weights in Tehran's population. *J Forensic Leg Med.* 2010;17(2):78–83.
8. Rogers K. Uterus Definition, Function, & Anatomy, Britannica [Internet]. [cited 2020 Jun 22]. Available from: <https://www.britannica.com/science/uterus>
9. Ferenczy A. Anatomy and Histology of the Uterine Corpus. In: Blaustein's *Pathology of the Female Genital Tract.* Springer New York; 1994. p. 327–66.

10. Teixeira J, Rueda B, Pru J. Uterine Stem cells [Internet]. StemBook. Stem Book; 2008 [cited 2020 Jun 22]. Available from: <https://www.stembook.org/>
11. Ekin A, Mat E, Dereli L, Gezer C, Ayaz D. Endometriyum Kanserinde Güncel Yaklaşımlar. *Türk Jinekolojik Onkol Derg.* 2016;1:7–16.
12. International Agency for Research on Cancer. Corpus uteri Source: Globocan 2018 [Internet]. 2018 [cited 2020 Feb 4]. Available from: <http://gco.iarc.fr/today>
13. International Agency for Research on Cancer. Globocan 2018 Turkey. 2018.
14. Madison T, Schottenfeld D, James SA, Schwartz AG, Gruber SB. Endometrial cancer: Socioeconomic status and racial/ethnic differences in stage at diagnosis, treatment, and survival. *Am J Public Health.* 2004;94(12):2104–11.
15. Soliman PT, Lu KH. Neoplastic Diseases of the Uterus. In: *Comprehensive Gynecology.* 7th ed. 2017. p. 714–7.
16. Soliman PT, Slomovitz BM, Broaddus RR, Sun CC, Oh JC, Eifel PJ, et al. Synchronous primary cancers of the endometrium and ovary: A single institution review of 84 cases. *Gynecol Oncol.* 2004;94(2):456–62.
17. Henderson BE. The cancer question: An overview of recent epidemiologic and retrospective data. *Am J Obstet Gynecol.* 1989;161(6):1859–64.
18. Persson I, Adami H-O, Bergkvist L, Lindgren A, Pettersson B, Hoover R, et al. Risk Of Endometrial Cancer After Treatment With Oestrogens Alone Or In Conjunction With Progestogens: Results Of A Prospective Study. *BMJ Br Med J.* 1989;298(6667):147–51.
19. Purdie DM, Green AC. Epidemiology of endometrial cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2001;15(3):341–54.
20. Fader AN, Arriba LN, Frasure HE, von Gruenigen VE. Endometrial cancer and

obesity: Epidemiology, biomarkers, prevention and survivorship. *Gynecol Oncol.* 2009;114(1):121–7.

21. Key TJA, Pike MC. The dose-effect relationship between ‘unopposed’ oestrogens and endometrial mitotic rate: Its central role in explaining and predicting endometrial cancer risk. *Br J Cancer.* 1988;57(2):205–12.
22. Vitoratos N, Gregoriou O, Hassiakos D, Zourlas PA. The role of androgens in the late-premenopausal woman with adenomatous hyperplasia of the endometrium. *Int J Gynecol Obstet.* 1991;34(2):157–61.
23. Lukanova A, Lundin E, Micheli A, Arslan A, Ferrari P, Rinaldi S, et al. Circulating levels of sex steroid hormones and risk of endometrial cancer in postmenopausal women. *Int J Cancer.* 2004;108(3):425–32.
24. Gunter MJ, Hoover DR, Yu H, Wassertheil-Smoller S, Manson JE, Li J, et al. A prospective evaluation of insulin and insulin-like growth factor-I as risk factors for endometrial cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17(4):921–9.
25. Chandeying P, Pantasri T. Prevalence of conditions causing chronic anovulation and the proposed algorithm for anovulation evaluation. *J Obstet Gynaecol Res.* 2015;41(7):1074–9.
26. Olson SH, Atoria CL, Cote ML, Cook LS, Rastogi R, Soslow RA, et al. The impact of race and comorbidity on survival in endometrial cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2012 May 1;21(5):753–60.
27. Friberg E, Orsini N, Mantzoros CS, Wolk A. Diabetes mellitus and risk of endometrial cancer: A meta-analysis. *Diabetologia.* 2007 Jul;50(7):1365–74.
28. Chen JY, Kuo SJ, Liaw YP, Avital I, Stojadinovic A, Man YG, et al. Endometrial cancer incidence in breast cancer patients correlating with age and duration of tamoxifen use: A population based study. *J Cancer.* 2014;5(2):151–

- 5.
29. Hoffman BL, Schorge JO, Schaffer JI, Halvorson LM, Bradshaw KD, Cunningham FG. Williams Gynecology. 2012. 819 p.
 30. Win AK, Reece JC, Ryan S. Family history and risk of endometrial cancer : A systematic review and meta-analysis. *Obstet Gynecol.* 2015;125(1):89–98.
 31. Lynch HT, Lynch PM, Lanspa SJ, Snyder CL, Lynch JF, Boland CR. Review of the Lynch syndrome: History, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. *Clin Genet.* 2009;76(1):1–18.
 32. Burke WM, Orr J, Leitao M, Salom E, Gehrig P, Olawaiye AB, et al. Endometrial cancer: A review and current management strategies: Part i. *Gynecol Oncol.* 2014;134(2):385–92.
 33. Ma J, Ledbetter N, Glenn L. Testing Women With Endometrial Cancer for Lynch Syndrome: Should We Test All? *J Adv Pract Oncol.* 2013;4(5):322–30.
 34. Eng C. Genetics of Cowden syndrome: Through the looking glass of oncology (Review). *Int J Oncol.* 1998;12(3):701–10.
 35. Chappell WH, Steelman LS, Long JM, Kempf RC, Abrams SL, Franklin RA, et al. Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR inhibitors: Rationale and importance to inhibiting these pathways in human health. *Oncotarget.* 2011;2(3):135–64.
 36. Vazquez A, Bond EE, Levine AJ, Bond GL. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7(12):979–87.
 37. Ma X, Ma CX, Wang J. Endometrial Carcinogenesis and Molecular Signaling Pathways. *Am J Mol Biol.* 2014;04(03):134–49.
 38. Thaker P, Sood A. Molecular Oncology in Gynecologic Cancer. In:

Comprehensive Gynecology. 6th ed. 2012.

39. Modugno F, Ness RB, Chen C, Weiss NS. Inflammation and endometrial cancer: A hypothesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14(12):2840–7.
40. Wallace AE, Gibson DA, Saunders PTK, Jabbour HN. Inflammatory events in endometrial adenocarcinoma. *J Endocrinol.* 2010;206(2):141–57.
41. Zhou B, Yang L, Sun Q, Cong R, Gu H, Tang N, et al. Cigarette Smoking and the Risk of Endometrial Cancer: A Meta-Analysis. *Am J Med.* 2008;121(6):501–8.
42. Conroy MB, Sattelmair JR, Cook NR, Manson JE, Buring JE, Lee IM. Physical activity, adiposity, and risk of endometrial cancer. *Cancer Causes Control.* 2009;20(7):1107–15.
43. Uterine Cancer - Cancer Stat Facts [Internet]. National Cancer Institute. 2017 [cited 2020 Feb 5].
Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/corp.html>
44. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin.* 2019;69(1):7–34.
45. Lewin SN, Herzog TJ, Medel NIB, Deutsch I, Burke WM, Sun X, et al. Comparative performance of the 2009 international federation of gynecology and Obstetrics' staging system for uterine corpus cancer. *Obstet Gynecol.* 2010;116(5):1141–9.
46. Paul F, Mol BWJ, Brlmann HAM, Peter M Heintz A. The accuracy of endometrial sampling in the diagnosis of patients with endometrial carcinoma and hyperplasia: A meta-analysis. *Cancer.* 2000;89(8):1765–72.
47. Colombo N, Preti E, Landoni F, Carinelli S, Colombo A, Marini C, et al.

Endometrial cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2013;24(6):33–8.

48. Merritt MA, Cramer DW. Molecular pathogenesis of endometrial and ovarian cancer. *Cancer Biomarkers.* 2011;9(1–6):287–305.
49. Bokhman J V. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol.* 1983;15(1):10–7.
50. Felix AS, Weissfeld JL, Stone RA, Bowser R, Chivukula M, Edwards RP, et al. Factors associated with Type I and Type II endometrial cancer. *Cancer Causes Control.* 2010;21(11):1851–6.
51. Prat J. Prognostic parameters of endometrial carcinoma. *Hum Pathol.* 2004;35(6):649–62.
52. Elshaikh M, Burmeister C, Munkarah A. Predictive capacity of three comorbidity indices in estimating survival endpoints in women with early-stage endometrial carcinoma. *Oncol Willist Park.* 2015;26(8):1455–60.
53. Mittal P, Klingler-Hoffmann M, Arentz G, Zhang C, Kaur G, Oehler MK, et al. Proteomics of endometrial cancer diagnosis, treatment, and prognosis. *Proteomics - Clin Appl.* 2016;10(3):217–29.
54. Brinton LA, Felix AS, McMeekin DS, Creasman WT, Sherman ME, Mutch D, et al. Etiologic heterogeneity in endometrial cancer: Evidence from a Gynecologic Oncology Group trial. *Gynecol Oncol.* 2013;129(2):277–84.
55. Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS, Young RH. WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs [Internet]. 4th ed. 2014 [cited 2020 Feb 8]. 307 p. Available from: <https://apps.who.int/bookorders/anglais/detart1.jsp?codlan=1&codcol=70&codcch=4006>
56. Creasman W, Morrow C, Bundy B, Homesley H, Graham J, Heller P. Surgical

Pathologic Spread Patterns of Endometrial Cancer. A Gynecologic Oncology Group Study. *Cancer*. 1987;60(8):2035–41.

57. Creasman W. Revised FIGO staging for carcinoma of the endometrium. *Int J Gynecol Obstet*. 2009;105(2):109.
58. Wethington SL, Barrena Medel NI, Wright JD, Herzog TJ. Prognostic significance and treatment implications of positive peritoneal cytology in endometrial adenocarcinoma: Unraveling a mystery. *Gynecol Oncol*. 2009;115(1):18–25.
59. Takeshima N, Nishida H, Tabata T, Hirai Y, Hasumi K. Positive peritoneal cytology in endometrial cancer: Enhancement of other prognostic indicators. *Gynecol Oncol*. 2001;82(3):470–3.
60. Uharček P. Prognostic factors in endometrial carcinoma. *J Obstet Gynaecol Res*. 2008;34(5):776–83.
61. Creutzberg CL, Van Putten WLJ, Koper PCM, Lybeert MLM, Jobsen JJ, Wárlám-Rodenhuis CC, et al. Surgery and postoperative radiotherapy versus surgery alone for patients with stage-1 endometrial carcinoma: Multicentre randomised trial. *Lancet*. 2000;355(9213):1404–11.
62. Creasman W, Odicino F, Maisonneuve P, Quinn M, Beller U, Benedet J, et al. Carcinoma of the Corpus Uteri. *Int J Gynecol Obstet*. 2006;95(1):105–43.
63. Solmaz U, Mat E, Dereli M, Turan V, Gungorduk K, Hasdemir P, et al. Lymphovascular space invasion and cervical stromal invasion are independent risk factors for nodal metastasis in endometrioid endometrial cancer. *Aust New Zeal J Obstet Gynaecol*. 2015;55(1):81–6.
64. Soliman PT, Frumovitz M, Spannuth W, Greer MJ, Sharma S, Schmeler KM, et al. Lymphadenectomy during endometrial cancer staging: Practice patterns

among gynecologic oncologists. *Gynecol Oncol.* 2010;119(2):291–4.

65. Kitchener H, Swart A, Qian Q, Amos C, Parmar M. Efficacy of systematic pelvic lymphadenectomy in endometrial cancer (MRC ASTEC trial): a randomised study. *Lancet.* 2009;373(9658):125–36.
66. Fotopoulou C, Savvatis K, Kraetschell R, Schefold JC, Lichtenegger W, Sehouli J. Systematic pelvic and aortic lymphadenectomy in intermediate and high-risk endometrial cancer: Lymph-node mapping and identification of predictive factors for lymph-node status. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2010;149(2):199–203.
67. Bendifallah S, Canlorbe G, Raimond E, Hudry D, Coutant C, Graesslin O, et al. A clue towards improving the European Society of Medical Oncology risk group classification in apparent early stage endometrial cancer? Impact of lymphovascular space invasion. *Br J Cancer.* 2014;110(11):2640–6.
68. Creutzberg CL, Van Stiphout RGPM, Nout RA, Lutgens LCHW, Jürgenliemk-Schulz IM, Jobsen JJ, et al. Nomograms for prediction of outcome with or without adjuvant radiation therapy for patients with endometrial cancer: A pooled analysis of PORTEC-1 and PORTEC-2 trials. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2015;91(3):530–9.
69. Todo Y, Kato H, Kaneuchi M, Watari H, Takeda M, Sakuragi N. Survival effect of para-aortic lymphadenectomy in endometrial cancer (SEPAL study): a retrospective cohort analysis. *Lancet.* 2010;375(9721):1165–72.
70. Richter CE, Qian B, Martel M, Yu H, Azodi M, Rutherford TJ, et al. Ovarian preservation and staging in reproductive-age endometrial cancer patients. *Gynecol Oncol.* 2009;114(1):99–104.
71. Ramirez PT, Frumovitz M, Bodurka DC, Sun CC, Levenback C. Hormonal therapy for the management of grade 1 endometrial adenocarcinoma: A

- literature review. *Gynecol Oncol*. 2004;95(1):133–8.
72. Mariani A, Webb MJ, Keeney GL, Haddock MG, Calori G, Podratz KC. Low-risk corpus cancer: Is lymphadenectomy or radiotherapy necessary? *Am J Obstet Gynecol*. 2000;182(6):1506–19.
73. Johnson N, Cornes P. Survival and recurrent disease after postoperative radiotherapy for early endometrial cancer: Systematic review and meta-analysis. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol*. 2007;114(11):1313–20.
74. Alvarez Secord A, Havrilesky LJ, Bae-Jump V, Chin J, Calingaert B, Bland A, et al. The role of multi-modality adjuvant chemotherapy and radiation in women with advanced stage endometrial cancer. *Gynecol Oncol*. 2007;107(2):285–91.
75. Bradford LS, Rauh-Hain JA, Schorge J, Birrer MJ, Dizon DS. Advances in the management of recurrent endometrial cancer. *Am J Clin Oncol Cancer Clin Trials*. 2015;38(2):206–12.
76. Köseoğlu MH, Çuhadar S. Laboratuvar Testlerinde Tanısal Doğruluk, Diagnostic Accuracy in Laboratory Tests. *Türk Klin Biyokim Derg*. 2012;10(3):103–16.
77. Topuzoğlu A, Ay P. Kanıta dayalı tıp, klinik epidemiyolojik çalışmaların eleştirel değerlendirilmesi. 2007. 107–47 p.
78. Evliyaoğlu O, Söğüt E, Yüksel H, Vurgun E. Tanı Koymak için Yeterli mi? In: *Biyostatistik ve Kanıta Dayalı Laboratuvar*. 2017. p. 207–37.
79. Nicoll D, Pignore M, Lu CM, McPhee S. Tanı Testleri ve Tıbbi Karar Oluşumu. In: Yücel D, editor. *Tanı Testleri Cep Kitabı*. 6th ed. 2014. p. 1–24.
80. Kaplan C. Use of the Laboratory. *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*. Butterworths; 1990.

81. Ashwood ER, Bruns DE. Clinical Utility of Laboratory Tests. In: Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 5th ed. 2012. p. 49–59.
82. Spitalnic S. Test properties I; Sensitivity, Specificity and Predictive values. Hosp Physician. 2004;9:27–31.
83. Akobeng AK. Understanding diagnostic tests 2: Likelihood ratios, pre- and post-test probabilities and their use in clinical practice. Acta Paediatr Int J Paediatr. 2007;96(4):487–91.
84. Jaeschke R, Guyatt G, Lijmer J. Users' Guides to the Medical Literature: A Manual for Evidence-Based Clinical Practice,. In: Guyatt G, Rennie D, Meade O, Cook D, editors. American Medical Association. 3rd ed. 2015. p. 121–40.
85. Gordis L. Assessing the Validity and Reliability of Diagnostic and Screening Tests. In: Epidemiology. 5th ed. 2014. p. 88–115.
86. Deeks JJ, Altman DG. Statistics notes - Diagnostic tests 4: Likelihood ratios. Br Med J. 2004;329(7458):168–9.
87. Demir F. Tanı ve Tarama Test Sonuçlarının Klinik Karar Verme Sürecinde Kullanılması. Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilim Derg. 2014;5(2):90–5.
88. Raslich MA, Markert RJ, Stutes SA. Selecting and interpreting diagnostic tests. Biochem Medica. 2007;17(2):151–61.
89. Nicoll D, Detmer WM. Basic Principles of Diagnostic Test Use and Interpretation*. Aids. 1997;(1):1–16.
90. Kılıç S. ROC Analysis in Clinical Decision Making. J Mood Disord. 2013;3(3):135–40.
91. Zou KH, O'Malley AJ, Mauri L. Receiver-operating characteristic analysis for

- evaluating diagnostic tests and predictive models. *Circulation*. 2007;115(5):654–7.
92. Sjø K. Receiver-operating characteristic curve analysis in diagnostic, prognostic and predictive biomarker research. *J Clin Pathol*. 2009;62(1):1–5.
 93. Wians FH. Clinical Laboratory Tests: Which, Why, and What Do The Results Mean? *Lab Med*. 2009;40(2):105–13.
 94. Güzelgöl F, Aksoy K. Kodlanmayan RNA'ların İşlevi ve Tıpta Kullanım Alanları. *Arch Med Rev J*. 2009;18(3):141–55.
 95. Birney E, Stamatoyannopoulos JA, Dutta A, Guigó R, Gingeras TR, Margulies EH, et al. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature*. 2007;447(7146):799–816.
 96. Carninci P, Kasukawa T, Katayama S, Gough J, Frith MC, Maeda N, et al. Molecular biology: The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science (80-)*. 2005;309(5740):1559–63.
 97. Mattick JS. A new paradigm for developmental biology. Vol. 210, *Journal of Experimental Biology*. The Company of Biologists Ltd; 2007. p. 1526–47.
 98. Mette MF, Aufsatz W, Van der Winden J, Matzke MA, Matzke AJM. Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO J*. 2000;19(19):5194–201.
 99. Akkaya ZY, Dinçer P. Tedavi yaklaşımlarında yeni bir dönem: Kodlanmayan RNA'lar ve hastalıklar. *Marmara Med J*. 2013;26(1):5–10.
 100. Voinnet O. Origin, Biogenesis, and Activity of Plant MicroRNAs. *Cell*. 2009;136(4):669–87.
 101. Visone R, Croce CM. MiRNAs and cancer. *Am J Pathol*. 2009;174(4):1131–8.

102. Pang JCS, Kwok WK, Chen Z, Ng HK. Oncogenic role of microRNAs in brain tumors. Vol. 117, *Acta Neuropathologica*. 2009. p. 599–611.
103. Kocerha J, Kauppinen S, Wahlestedt C. microRNAs in CNS disorders. *Neuromolecular Med*. 2009;11(3):162–72.
104. Barringhaus KG, Zamore PD. MicroRNAs regulating a change of heart. *Circulation*. 2009;119(16):2217–24.
105. Saydam F, Değirmenci İ, Güneş HV. MikroRNA'lar ve kanser. *Dicle Med J*. 2011;38(1):113–20.
106. Wijnhoven BPL, Michael MZ, Watson DI. MicroRNAs and cancer. *Br J Surg*. 2007;94(1):23–30.
107. Shenouda SK, Alahari SK. MicroRNA function in cancer: Oncogene or a tumor suppressor? *Cancer Metastasis Rev*. 2009;28(3–4):369–78.
108. Griffiths-Jones S. miRBase [Internet]. [cited 2020 Jun 22]. Available from: <http://www.mirbase.org/summary.shtml?org=hsa>
109. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75(5):843–54.
110. Ruvkun G. Molecular biology: Glimpses of a tiny RNA world. *Science* (80-). 2001;294(5543):797–9.
111. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquienelli AE, Bettlinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2000;403(6772):901–6.
112. Pasquienelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic

- regulatory RNA. *Nature*. 2000;408(6808):86–9.
113. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* (80-). 2001;294(5543):853–8.
114. Kwak PB, Iwasaki S, Tomari Y. The microRNA pathway and cancer. *Cancer Sci*. 2010;101(11):2309–15.
115. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003;425(6956):415–9.
116. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - MicroRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(4):259–69.
117. Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear Export of MicroRNA Precursors. *Science* (80-). 2004;303(5654):95–8.
118. Zhang H, Kolb FA, Brondani V, Billy E, Filipowicz W. Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *EMBO J*. 2002;21(21):5875–85.
119. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*. 2001;409(6818):363–6.
120. Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*. 2005;123(4):631–40.
121. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: MicroRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol*. 2009;11(3):228–34.

122. Sun W, Julie Li Y-S, Huang H-D, Shyy JY-J, Chien S. microRNA: A Master Regulator of Cellular Processes for Bioengineering Systems. *Annu Rev Biomed Eng.* 2010;12(1):1–27.
123. Pillai RS. MicroRNA function: Multiple mechanisms for a tiny RNA? *RNA.* 2005;11(12):1753–61.
124. Cowland JB, Hother C, Gronbaek K. MicroRNAs and cancer. *APMIS.* 2007;115(10):1090–106.
125. Karagün Ş, Antmen B, Şaşmaz İ, Kılınç Y. Mikro RNA and Cancer. *Türk Klin Biyokim Derg.* 2014;12(121):45–56.
126. Akman HB, Erson B, Bensen AE. Noncoding RNAs and cancer. *Turkish J Biology.* 2014;38(6):817–28.
127. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Nov 26;99(24):15524–9.
128. Michael MZ, O'Connor SM, Van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced Accumulation of Specific MicroRNAs in Colorectal Neoplasia. *Mol Cancer Res.* 2003;1(12):882–91.
129. Rothschild SI. microRNA therapies in cancer. *Mol Cell Ther.* 2014;2(1):7.
130. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio M V., Ferracin M, Shimizu M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(39):13944–9.
131. Seveli S, Uzumcu A, Solak M, Ittmann M, Ozen M. The function of microRNAs, small but potent molecules, in human prostate cancer. Vol. 13, *Prostate Cancer and Prostatic Diseases.* Prostate Cancer Prostatic Dis; 2010. p. 208–17.

132. Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, Yamada H, Yanagisawa K, Tomida S, et al. A polycistronic MicroRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res.* 2005;65(21):9628–32.
133. Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, Urashima T, Toyoda H, Okanoue T, et al. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene.* 2006;25(17):2537–45.
134. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell.* 2005;120(5):635–47.
135. Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(7):2257–61.
136. He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S, et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature.* 2005;435(7043):828–33.
137. Lui WO, Pourmand N, Patterson BK, Fire A. Patterns of known and novel small RNAs in human cervical cancer. *Cancer Res.* 2007;67(13):6031–43.
138. Slaby O, Svoboda M, Fabian P, Smerdova T, Knoflickova D, Bednarikova M, et al. Altered expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 is related to clinicopathologic features of colorectal cancer. *Oncology.* 2008;72(5–6):397–402.
139. Garzon R, Volinia S, Liu CG, Fernandez-Cymering C, Palumbo T, Pichiorri F, et al. MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood.* 2008;111(6):3183–9.
140. Ciafrè SA, Galardi S, Mangiola A, Ferracin M, Liu CG, Sabatino G, et al. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem*

Biophys Res Commun. 2005;334(4):1351–8.

141. Gebeshuber CA, Zatloukal K, Martinez J. miR-29a suppresses tristetraprolin, which is a regulator of epithelial polarity and metastasis. *EMBO Rep.* 2009;10(4):400–5.
142. Liu XD, Luo ZY, Peng HX, Jiang H, Xu L. Prognostic role of miR-9 expression in various human malignant neoplasms: A meta-analysis. *Onco Targets Ther.* 2016;9:3039–47.
143. Orangi E, Motovali-Bashi M. Evaluation of miRNA-9 and miRNA-34a as potential biomarkers for diagnosis of breast cancer in Iranian women. *Gene.* 2019;687:272–9.
144. Migdalska-Sęk M, Góralska K, Jabłoński S, Kordiak J, Nawrot E, Kiszalkiewicz JM, et al. Evaluation of the relationship between the IL-17A gene expression level and regulatory miRNA-9 in relation to tumor progression in patients with non-small cell lung cancer: a pilot study. *Mol Biol Rep.* 2020;47(1):583–92.
145. Park YR, Lee ST, Kim SL, Liu YC, Lee MR, Shin JH, et al. MicroRNA-9 suppresses cell migration and invasion through downregulation of TM4SF1 in colorectal cancer. *Int J Oncol.* 2016;48(5):2135–43.
146. Torres A, Torres K, Pesci A, Ceccaroni M, Paszkowski T, Cassandrini P, et al. Diagnostic and prognostic significance of miRNA signatures in tissues and plasma of endometrioid endometrial carcinoma patients. *Int J Cancer.* 2013;132(7):1633–45.
147. Cai J, Wu J, Zhang H, Fang L, Huang Y, Yang Y, et al. MiR-186 downregulation correlates with poor survival in lung adenocarcinoma, where it interferes with cell-cycle regulation. *Cancer Res.* 2013;73(2):756–66.
148. Feng H, Zhang Z, Qing X, French SW, Liu D. miR-186-5p promotes cell

- growth, migration and invasion of lung adenocarcinoma by targeting PTEN. *Exp Mol Pathol.* 2019;108:105–13.
149. Xiang Y, Tian Q, Guan L, Niu SS. The Dual Role of miR-186 in Cancers: Oncomir Battling With Tumor Suppressor miRNA. *Front Oncol.* 2020;10:1–11.
150. Zhou L, Qi X, Potashkin JA, Abdul-Karim FW, Gorodeski GI. MicroRNAs miR-186 and miR-150 down-regulate expression of the pro-apoptotic purinergic P2X7 receptor by activation of instability sites at the 3'-untranslated region of the gene that decrease steady-state levels of the transcript. *J Biol Chem.* 2008;283(42):28274–86.
151. Myatt SS, Wang J, Monteiro LJ, Christian M, Ho KK, Fusi L, et al. Definition of microRNAs that repress expression of the tumor suppressor gene FOXO1 in endometrial cancer. *Cancer Res.* 2010;70(1):367–77.
152. Poirier LA. Stages in carcinogenesis: alteration by diet. *Am J Clin Nutr.* 1987;45(1):185–91.
153. Karabulut H, Gülay MŞ. Serbest Radikaller. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilim Enstitüsü Derg. 2016;4(1):50–9.
154. Nihal Ç. Oksidatif Stresin Kanserdeki Rolü: Antioksidanlar Kansere Progresyonunun Yakıtı Olabilir mi? *Ahi Evran Tıp Derg*; 2017;1:8–13.
155. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci.* 2008;4(2):89–96.
156. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: Where are we now? *J Neurochem.* 2006;97(6):1634–58.
157. Heidari F, Rabizadeh S, Ali M, Mirmiranpoor H. Cytokine Inflammatory , oxidative stress and anti-oxidative markers in patients with endometrial carcinoma and diabetes. *Cytokine.* 2019;120:186–90.

158. Kaynar H, Meral M, Turhan H, Keles M, Celik G, Akcay F. Glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase, catalase, xanthine oxidase, Cu-Zn superoxide dismutase activities, total glutathione, nitric oxide, and malondialdehyde levels in erythrocytes of patients with small cell and non-small cell lung cancer. *Cancer Lett.* 2005;227(2):133–9.
159. Traverso N, Ricciarelli R, Nitti M, Marengo B, Furfaro AL, Pronzato MA, et al. Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013:1–11.
160. Sharma S. Tumor markers in clinical practice: General principles and guidelines. *Indian J Med Paediatr Oncol.* 2009;30(1):1.
161. Malati T. Tumour markers: An overview. *Indian J Clin Biochem.* 2007;22(2):17–31.
162. Wang L, Chen YJ, Xu K, Xu H, Shen XZ, Tu RQ. Circulating microRNAs as a fingerprint for endometrial endometrioid adenocarcinoma. *PLoS One.* 2014;9(10):1–7.
163. Angioli R, Miranda A, Aloisi A, Montera R, Capriglione S, De Cicco Nardone C, et al. A critical review on HE4 performance in endometrial cancer: Where are we now? *Tumor Biol.* 2014;35(2):881–7.
164. Bast RC, Feeney M, Lazarus H, Nadler LM, Colvin RB, Knapp RC. Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. *J Clin Invest.* 1981;68(5):1331–7.
165. Hu L, Du S, Guo W, Chen D, Li Y. Comparison of Serum Human Epididymis Protein 4 and Carbohydrate Antigen 125 as Markers in Endometrial Cancer: A Meta-Analysis. *Int J Gynecol Cancer.* 2016;26(2):331–40.
166. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-

- time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*. 2001;25(4):402–8.
167. Sheikh MA, Althouse AD, Freese KE, Soisson S, Edwards RP, Welburn S, et al. USA Endometrial Cancer Projections to 2030: Should we be concerned? *Futur Oncol*. 2014;10(16):2561–8.
168. Morice P, Leary A, Creutzberg C, Abu-Rustum N, Darai E. Endometrial cancer. *Gynecol Obstet Fertil*. 2016;44(4):239–43.
169. Howlader N, Noone A, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2017 [Internet]. National Cancer Institute. 2019 [cited 2020 Apr 15]. Available from: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2017/
170. Engelsen IB, Akslen LA, Salvesen HB. Biologic markers in endometrial cancer treatment. *APMIS*. 2009;117(10):693–707.
171. Torres A, Torres K, Pesci A, Ceccaroni M, Paszkowski T, Cassandrini P, et al. Deregulation of miR-100, miR-99a and miR-199b in tissues and plasma coexists with increased expression of mTOR kinase in endometrioid endometrial carcinoma. *BMC Cancer*. 2012;12(369):1471–84.
172. Kim HS, Park CY, Lee JM, Lee JK, Cho CH, Kim SM, et al. Evaluation of serum CA-125 levels for preoperative counseling in endometrioid endometrial cancer: A multi-center study. *Gynecol Oncol*. 2010;118(3):283–8.
173. Antonsen SL, Høgdall E, Christensen IJ, Lydolph M, Tabor A, Loft Jakobsen A, et al. HE4 and CA125 levels in the preoperative assessment of endometrial cancer patients: A prospective multicenter study (ENDOMET). *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2013;92(11):1313–22.
174. Drucker E, Krapfenbauer K. Pitfalls and limitations in translation from biomarker discovery to clinical utility in predictive and personalised medicine. *EPMA J*. 2013;4(7):1–10.

175. Baker M, Penny D. Is there a reproducibility crisis? *Nature*. 2016;533(7604):452–4.
176. Sianou A, Galyfos G, Moragianni D, Andromidas P, Kaparos G, Baka S, et al. The role of microRNAs in the pathogenesis of endometrial cancer: a systematic review. *Arch Gynecol Obstet*. 2015;292(2):271–82.
177. Yanokura M, Banno K, Iida M, Irie H, Umene K, Masuda K, et al. Micrnas in endometrial cancer: Recent advances and potential clinical applications. *EXCLI J*. 2015;14(2):190–8.
178. J. Gilabert-Estelles, A. Braza-Boils, L. A. Ramon, E. Zorio, P. Medina, F. Espana, et al. Role of microRNAs in Gynecological Pathology. *Curr Med Chem*. 2012;19(15):2406–13.
179. Jia W, Wu Y, Zhang Q, Gao G, Zhang C, Xiang Y. Identification of four serum microRNAs from a genome-wide serum microRNA expression profile as potential non-invasive biomarkers for endometrioid endometrial cancer. *Oncol Lett*. 2013;6(1):261–7.
180. Murao S, Collart FR, Hubermann E. A Protein Containing the Cystic Fibrosis Antigen Is an Inhibitor of Protein Kinases - PubMed. *J Biol Chem*. 1989;264(14):8356–60.
181. Ødegaard E, Davidson B, Elgaaen BV, Fagerhol MK, Engh V, Onsrud M, et al. Circulating calprotectin in ovarian carcinomas and borderline tumors of the ovary. *Am J Obstet Gynecol*. 2008;198(4):418.e1-7.
182. Yui S, Nakatani Y, Mikami M. Calprotectin (S100A8/S100A9), an inflammatory protein complex from neutrophils with a broad apoptosis-inducing activity. *Biol Pharm Bull*. 2003;26(6):753–60.
183. Nagaset H, Woessner JF. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*.

- 1999;274(31):21491–4.
184. Liu J, Li X, Dong GL, Zhang HW, Chen DL, Du JJ, et al. In silico analysis and verification of S100 gene expression in gastric cancer. *BMC Cancer*. 2008;8(261):1–7.
 185. Arai K, Yamada T, Nozawa R. Immunohistochemical investigation of migration inhibitory factor-related protein (MRP)-14 expression in hepatocellular carcinoma. *Med Oncol*. 2000;17(3):183–8.
 186. Arai K, Teratani T, Kuruto-Niwa R, Yamada T, Nozawa R. S100A9 expression in invasive ductal carcinoma of the breast: S100A9 expression in adenocarcinoma is closely associated with poor tumour differentiation. *Eur J Cancer*. 2004;40(8):1179–87.
 187. Guo J, Yang ECC, DeSouza L, Diehl G, Rodrigues MJ, Romaschin AD, et al. A strategy for high-resolution protein identification in surface-enhanced laser desorption/ionization mass spectrometry: Calgranulin A and chaperonin 10 as protein markers for endometrial carcinoma. *Proteomics*. 2005;5(7):1953–66.
 188. Mittler R. ROS Are Good. *Trends Plant Sci*. 2017;22(1):11–9.
 189. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J*. 2012;5(1):9–19.
 190. Zabłocka-Słowińska K, Płaczkowska S, Skórska K, Prescha A, Pawełczyk K, Porębska I, et al. Oxidative stress in lung cancer patients is associated with altered serum markers of lipid metabolism. *PLoS One*. 2019;14(4):1–20.
 191. Özer ÖF, Güler EM, Selek Ş, Çoban G, Türk HM, Koçyiğit A. Akciğer, meme ve kolon kanserli hastalarda oksidatif stres parametrelerinin değişimi. *Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Derg*. 2019;16(2):235–40.
 192. Kuran SB, İplik ES, Çakmakoglu B, Kahraman ÖT, İyibozkurt AC, Koç A, et

- al. Relation of MPO, MnSOD, NQO1 gene variants in endometrial carcinoma in the line of PCR-RFLP methods. *Cell Mol Biol.* 2018;64(4):59–78.
193. Sahu A, Varma M, Kachhawa K. A Prognostic Study of MDA , SOD and Catalase in Breast Cancer Patients. 2015;4(5):2013–5.
194. Arslan A, Demir H, Ozbay MF, Arslan H. Evaluation of Lipid Peroxidation and Some Antioxidant Activities in Patients with Primary and Metastatic Liver Cancer. *J Cancer Ther.* 2014;05(02):192–7.
195. Abel S, De Kock M, van Schalkwyk DJ, Swanevelder S, Kew MC, Gelderblom WCA. Altered lipid profile, oxidative status and hepatitis B virus interactions in human hepatocellular carcinoma. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids.* 2009;81(5–6):391–9.
196. Chang D, Wang F, Zhao YS, Pan HZ. Evaluation of oxidative stress in colorectal cancer patients. *Biomed Environ Sci.* 2008;21(4):286–9.
197. Tang QF, Zhou ZW, Ji HB, Pan WH, Sun MZ. Value of serum marker HE4 in pulmonary carcinoma diagnosis. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(10):19014–21.
198. Angioli R, Plotti F, Capriglione S, Montera R, Damiani P, Ricciardi R, et al. The role of novel biomarker HE4 in endometrial cancer: A case control prospective study. *Tumor Biol.* 2013;34(1):571–6.
199. Prueksaritanond N, Cheanpracha P, Yanaranop M. Association of serum HE4 with primary tumor diameter and depth of myometrial invasion in endometrial cancer patients at Rajavithi Hospital. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2016;17(3):1489–92.
200. Brennan DJ, Hackethal A, Mann KP, Mutz-Dehbalaie I, Fiegl H, Marth C, et al. Serum HE4 detects recurrent endometrial cancer in patients undergoing routine clinical surveillance. *BMC Cancer.* 2015;15(1):1–9.