

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**2D VE 3D İSHİKAWA ENDOMETRİAL KARSİNOM
HÜCRE KÜLTÜRÜNDE LİTYUM, METFORMİN VE
EVEROLİMUS MADDELERİNİN HÜCRE BÜYÜMESİ
ÜZERİNE ETKİLERİ**

UZMANLIK TEZİ
DR. EMİNE TURAL

DANIŞMAN
PROF. DR. GÜLÇİN METE

DENİZLİ – 2020

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**2D VE 3D İSHİKAWA ENDOMETRİAL KARSİNOM
HÜCRE KÜLTÜRÜNDE LİTYUM, METFORMİN VE
EVEROLİMUS MADDELERİNİN HÜCRE BÜYÜMESİ
ÜZERİNE ETKİLERİ**

UZMANLIK TEZİ
DR. EMİNE TURAL

DANIŞMAN
PROF. DR. GÜLÇİN METE

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma
Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 08.10.2019 tarih ve
2019TIPF015 nolu kararı ile desteklenmiştir.

DENİZLİ – 2020

Prof. Dr. Gülçin METE danışmanlığında, Dr. Emine TURAL tarafından yapılan “2D ve 3D İshikawa Endometrial Karsinom Hücre Kültüründe Lityum, Metformin ve Everolimus Maddelerinin Hücre Büyümesi Üzerine Etkileri” başlıklı tez çalışması/...../..... tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonrası yapılan değerlendirme sonucu jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN: Prof. Dr. Gülçin METE

ÜYE:

ÜYE:

Yukarıda imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.

...../...../.....

**Prof. Dr. Osman ÇİFTÇİ
Pamukkale Üniversitesi
Tıp Fakültesi Dekanı**

TEŞEKKÜR

Pamukkale Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalındaki eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleri ile eğitimime katkı sağlayan, tezimin hazırlanması süresinde değerli katkıları ve emekleriyle yardımını esirgemeyen, beni yönlendiren kıymetli hocam, tez danışmanım Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Gülçin METE'ye,

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndan değerli hocalarım Prof. Dr. Hülya Çetin, Prof. Dr. Saim Özdamar, Doç. Dr. Nazan Keskin, Dr. Öğr.Üyesi Nazlı ÇİL'e, Dr. Öğr. Üyesi M. Serkant ÜNAL'a,

Tez çalışmama fikir ve tecrübeleri ile katkı sağlayan, tanıştığımız günden beri desteğini eksik etmeyen Atlas Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekan'ı kıymetli hocam Prof. Dr. Ayhan BİLİR'e,

Tezimdeki bazı çalışmalar için laboratuvarın kapısını açıp imkanlarından yararlanmamı sağlayan değerli hocam, İstinye Üniversitesi Rektörü sayın Prof. Dr. Erdal KARAÖZ'e ve Dr. Öğr. Üyesi Hakan DARICI'ya,

Asistanlığımın başlangıcından bugüne kadar beraber çalışmış olduğum tüm asistan arkadaşlarım ve anabilim dalı çalışanlarımıza,

Tez deneylerimi yaparken bilgi ve desteğini esirgemeyen, her aşamada yanımda olan Araş. Gör. Dr. Mücahit SEÇME ve Araş. Gör. Dr. Gizem KABASAKAL'a,

Tez aşamasındaki katkılarından dolayı Araş. Gör. Dr. Fatih ALTINTAŞ ve Araş. Gör. Dr. Mehmet DEMİRCİ'ye,

Tezimi yaparken desteğini benden eksik etmeyen, hayatımın her döneminde hep yanımda olan, güven kaynağım, candan öte biricik kardeşim Uzm. Dr. Mehmet TURAL'a,

Ve en büyük mutluluk sebeplerim, yaşam enerjimin kaynakları sevgili annem Perihan TURAL ve babam Ahmet TURAL'a,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	II
İÇİNDEKİLER	III
SİMGELER VE KISALTMALAR	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
TABLolar DİZİNİ	XII
ÖZET.....	XIII
SUMMARY	XV
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER.....	3
UTERUS ANATOMİSİ	3
UTERUS EMBRİYOLOJİSİ	4
UTERUS HİSTOLOJİSİ.....	4
Miyometriyum	5
Endometriyum	5
Perimetriyum	8
ENDOMETRİAL HİPERPLAZİ	9
ENDOMETRİUM KANSERİ.....	11
1.Epidemiyoloji	11
2.Endometrial Kanser Sınıflandırılması	13
3.Endometrial Kanser Risk Faktörleri.....	16
4.Klinik Belirtiler.....	22
5. Tanı	22
6. Tarama	23
7. Endometrial Kanserın Alt Tipleri (Histopatolojik Sınıflama). 23	
8. Endometrial Kanserde Prognostik Faktörler	26
9. Endometrial Kanserde Evreleme	29
10. Endometrial Kanserde Tedavi	30
11.Apoptoz ve Kanser Tedavisindeki Yeri.....	30
12.Everolimus.....	33

13. Metformin	34
14. Lityum Klorür (LiCl)	35
15. Midkine	36
MATERYAL VE METOT	37
ÇALIŞMALARDA KULLANILAN KİMYASALLAR VE SARF	
MALZEMELER	37
ÇALIŞMALARDA KULLANILAN CİHAZLAR	37
ÇALIŞMALARDA KULLANILAN KİTLER	38
ISHIKAWA HÜCRE HATTININ TEMİNİ VE HÜCRE KÜLTÜRÜ ...	38
XTT TESTİ (HÜCRE CANLILIĞI TESTİ)	40
TRİZOL REAGENT İLE TOTAL RNA İZOLASYONU	41
cDNA SENTEZİ	43
GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (REAL-	
TİME PCR, RT-PCR)	44
ELİSA DENEYİ	47
Human Phosphorylated Adenosine Monophosphate Activaed	
Protein Kinase (AMPK) ELİSA KIT:	47
Human Mammalian Target of Rapamycin ELİSA KIT:	48
Human Phospho-AKT ELİSA KIT:	49
Human Phosphotylinosital 3Kinase ELİSA KIT	49
Human Midkine ELİSA KIT	50
İNVAZYON KAPASİTESİNİN BELİRLENMESİ (MATRİGEL-	
İNVAZYON TESTİ)	51
KOLONİ OLUŞUM DENEYİ	52
WOUND HEALİNG (YARA İYİLEŞME) DENEYİ	52
FLOW SİTOMETRİ: ANNEXİN V İLE APOPTOZ TESPİTİ	53
ÜÇ BOYUTLU (3D) HÜCRE KÜLTÜRÜ YÖNTEMİ İLE SPHEROİD	
OLUŞUMU DENEYİ	53
VERİLERİN İSTATİSTİKSEL OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ ..	54
İstatistiksel analiz	54
BULGULAR	55
XTT TESTİ (HÜCRE CANLILIĞI TESTİ) SONUÇLARI	55

TRİZOL REAGENT İLE TOTAL RNA İZOLASYONU SONUÇLARI	57
GERÇEK-ZAMANLI PCR (REAL-TİME PCR, RT-PCR)	
SONUÇLARI	58
MATRİGEL İNVAZYON TESTİ SONUÇLARI	60
KOLONİ OLUŞUM DENEYİ SONUÇLARI	63
WOUND HEALİNG DENEYİ SONUÇLARI	64
FLOW SİTOMETRİ SONUÇLARI	66
ÜÇ BOYUTLU (3D) HÜCRE KÜLTÜRÜ YÖNTEMİ İLE SPHEROİD OLUŞUMU DENEYİ SONUÇLARI	70
ELİSA DENEYİ SONUÇLARI	75
TARTIŞMA	77
SONUÇ	84
KAYNAKLAR	85

SİMGELER VE KISALTMALAR

a. ovarica: Arteria Overica

a. uterina : Arteria Uterina

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

AKT: Serine/Threonine Protein Kinaz

AMP: Adenosin Monofosfatın

AMPK: 5'AMP İle Aktive Olan Protein Kinaz (Human Phosphorylated Adenosine Monophosphate Activaed Protein Kinase)

Annexin-V-FITC / PI: Annexin-V-Floresanin İzotiyosiyanat / Propidyum İyodür

ARID1A: AT Bakımından Zengin, Etkileşim Alanı İçeren 1A

ATP: Adenosin Trifosfat

BI: Biological Industries

Ca²⁺: Kalsiyum iyonu

CaCl₂: Kalsiyum klorür

CASP3: Kaspaz3, Apoptoz-İlişkili Sistein Peptidaz

CASP8: Kaspaz8, Apoptoz-İlişkili Sistein Peptidaz

CASP9: Kaspaz9, Apoptoz-İlişkili Sistein Peptidaz

cDNA: Komplementer (Tamamlayıcı) Deoksiribo Nükleik Asit

cm: Santimetre

CO₂: Karbondioksit

CS: Cowden Sendromu

CTNNB1: Catenin Beta-1

°C: Santigrad Derece

DISC: Ölüm İndükleyici Sinyal Kompleksi

dk: Dakika

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Dimetil Sülfoksit

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

2D: 2 Boyutlu

3D: 3 Boyutlu

EC: Endometrial Karsinom

EIN: Endometrial Intraepitelyal Neoplazi
ELİSA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ERBB2: Erb-B2 Reseptörü Tirozin Kinaz 2
ERT: Östrojen Replasman Tedavisi
Eve: Everolimus
FADD: Fas İle İlişkili Ölüm Alanı
FAS: CD95
FasL: Fas Ligandı
FBS: Fötal Bovin Serum
FBXW7: F-Box Ve WD Tekrar Alanları İçeren Protein 7
FGFR2: Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü 2
FİGO: Uluslararası Jinekoloji Ve Obstetrik Federasyonu
FSH: Folikül Stimüle Edici Hormon
GAPDH: Gliseraldehit 3-Fosfat Dehidrojenaz
GSK3 β : Glikojen Sentaz Kinaz 3-Beta
HER-2 / Neu: Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 /c-erbB-2
HLA-DRB1: İnsan Lökosit Antijeni DRB1 Beta Zincir
HNPC: Herediter Nonpolipozis Kolon Kanseri
HOXA10: Homebox Geni
IC50 (LD50) : Letal Doz 50
IGF: İnsülin Like Growth Faktör
IGF-1: İnsülin Like Growth Faktör 1
ISGyP: Uluslararası Jinekolojik Patologlar Topluluğu
KRAS: Kirsten Sıçan Sarkoma Viral Onkogen Homoloğu
KT: Kemoterapi
L: Litre
LH: Luteinize Edici Hormon
LiCl: Lityum Klorür
Lit: Lityum
MAP1LC3A: Mikrotübülle İlişkili Proteinler 1A / 1B Hafif Zincir 3A
MAP1LCA3B: Mikrotübülle İlişkili Proteinler 1A / 1B Hafif Zincir 3B
Met: Metformin

MDK, MK: Midkine, Nörit Büyümesini Teşvik Edici Faktör 2
µg: Mikrogram
µl: Mikrolitre
µM: Mikromolar
ml: Mililitre
mM: Milimolar
mRNA: Mesajcı Ribo Nükleik Asit
MLH-1: MutL Homolog1
MSH-2: MutS Homolog2
MSH-6: MutS Homolog 6
mTOR: Mammalian Target of Rapamycin
NaCl: Sodyum Klorür
ng: Nanogram
nm: Nanometre
nM: Nanomolar
OD: Absorbans Değerleri
OXPHOS: Oksidatif fosforilasyon
p53, TP53: Tümör Protein 53
PAX 2: Paired Box Gene 2
PBS: Fosfat Buffered Salin
PCOS: Polikistik Over Sendromu
PI: Propidyum İyodür
PI3K: Fosfatidilinositol 3-Kinaz
PIK3CA: Fosfatidilinositol-4,5-Bisfosfat 3-Kinaz Katalitik Alt Birim Alfa,
PIK3CB: Fosfatidilinositol-4,5-Bisfosfat 3-Kinaz Katalitik Alt Birim Beta
PIK3R1: Fosfoinositide-3-Kinase, Regulatory Subunit 1 (Alpha)
pM: Pikomolar
pmol: Pikomol
POLE: Polimeraz-Epsilon Geni
PR: Progesteron Reseptörü
PTEN: Fosfataz Ve Tensin Homoloğu
RNA: Ribo Nükleik Asit

RPM: Dakikadaki Devir Sayısı

RPMI: Roskuyucuklu Park Memorail Institute

RT: Radyoterapi

RT: Revers Transkriptaz Enzimi

RT-PCR: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

SERM: Selektif Östrojen Reseptör Modülatörüdür

sn: Saniye

sp: Sapma

std: Standart

subt: Substrat

TGCA: Kanser Genom Atlası

TNF: Tümör Nekroz Faktör

TNFR1: TNF Reseptörü 1

TRADD: TNF Reseptörü İle İlişkili Ölüm Alanı

U: Universal Unite

v.İliaca İnterna: Vena İliaca İnterna

VKİ: Vücut Kitle İndeksi

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

XTT: 2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5- Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Dünyadaki en yaygın 10 kanser için insidans ve mortalite dağılımı [GLOBOCAN 2018 (Global Cancer Incidence, Mortality and Prevalence- Küresel Kanser Sıklığı, Ölüm Oranı ve Yaygınlığı)]	12
Şekil 2. Apoptozun ekstrinsik ve intrinsik yolları.	32
Şekil 3. Endometrial kanser hücresi içinde Metforminin etki mekanizmaları (158) PI3K/AKT/MTOR ve AMPK yollarının şematik gösterimi.....	35
Şekil 4. Çalışmamızda kullandığımız Ishikawa hücrelerinin 4X inverted mikroskopik görüntüsü.....	38
Şekil 5. Everolimus'un çeşitli konsantrasyonlarda zamana göre hücre canlılığına etkisinin sütun grafiği gösterimi	55
Şekil 6. Lityum'un çeşitli konsantrasyonlarda zamana göre hücre canlılığına etkisinin sütun grafiği gösterimi	56
Şekil 7. Metformin'in çeşitli konsantrasyonlarda zamana göre hücre canlılığına etkisinin sütun grafiği gösterimi	57
Şekil 8. Kombine dozların zamana göre hücre canlılığına etkisinin sütun grafiği gösterimi.....	57
Şekil 9. RT-PCR sonucuna göre kontrol grubuna göre değişiklik gösteren genler ...	59
Şekil 10. Kontrol grubunda invaze olan hücrelerin mikroskop görüntüsü (10X).....	60
Şekil 11. Everolimus IC ₅₀ grubunda invaze olan hücrelerin mikroskop görüntüsü (10X)	61
Şekil 12. Metformin IC ₅₀ grubunda invaze olan hücrelerin mikroskop görüntüsü (10X)	61
Şekil 13. Lityum IC ₅₀ grubunda invaze olan hücrelerin mikroskop görüntüsü (10X)	61
Şekil 14. Everolimus IC ₅₀ + Lityum IC ₅₀ grubunda invaze olan hücrelerin mikroskop görüntüsü (10X)	62
Şekil 15. Everolimus IC ₅₀ + Metformin IC ₅₀ grubunda invaze olan hücrelerin mikroskop görüntüsü (10X)	62
Şekil 16. Everolimus IC ₅₀ + Metformin IC ₅₀ + Lityum IC ₅₀ grubunda invaze olan hücrelerin mikroskop görüntüsü (10X).....	62

Şekil 17. Everolimus IC ₅₀ + Metformin 29,73 mM grubunda invaze olan hücrelerin mikroskop görüntüsü (10X)	63
Şekil 18. Ishikawa hücrelerinde kontrol ve doz gruplarında koloni görüntüsü	64
Şekil 19. Wound healing deneyi 0. Saat sonuçları (4X)	65
Şekil 20. Wound healing deneyi 16. Saat sonuçları (4X)	65
Şekil 21. Wound healing deneyi 24. Saat sonuçları (4X)	66
Şekil 22. Flow sitometri kontrol grubu sonuçları	67
Şekil 23. Flow sitometri Everolimus IC ₅₀ grubu sonuçları	67
Şekil 24. Flow sitometri Metformin IC ₅₀ grubu sonuçları	68
Şekil 25. Flow sitometri Lityum IC ₅₀ grubu sonuçları	68
Şekil 26. Flow sitometri Everolimus IC ₅₀ + Metformin IC ₅₀ grubu sonuçları	69
Şekil 27. Flow sitometri Everolimus IC ₅₀ + Metformin IC ₅₀ + Lityum IC ₅₀ grubu sonuçları	69
Şekil 28. Flow sitometri Everolimus IC ₅₀ + Metformin 29,73mM grubu sonuçları .	70
Şekil 29. Kontrol sferoid görüntüsü (5X)	71
Şekil 30. Kontrol sferoid görüntüsü (10X)	71
Şekil 31. Everolimus IC ₅₀ grubu 48.saat sferoid görüntüsü (10X).....	72
Şekil 32. Lityum IC ₅₀ grubu 48.saat sferoid görüntüsü (10X).....	72
Şekil 33. Metformin IC ₅₀ grubu 48.saat sferoid görüntüsü (10X)	73
Şekil 34. Everolimus IC ₅₀ + Metformin IC ₅₀ grubu 48.saat sferoid görüntüsü (10X)	73
Şekil 35. Everolimus IC ₅₀ + Lityum IC ₅₀ grubu 48.saat sferoid görüntüsü (10X)....	74
Şekil 36. Everolimus IC ₅₀ + Metformin IC ₅₀ + Lityum IC ₅₀ grubu 48.saat sferoid görüntüsü (10X)	74
Şekil 37. A) PI3K ve B) MTOR ELİSA sonuçları sütun grafiği	76
Şekil 38. A) Midkine ve B) AKT ELİSA sonuçları sütun grafiği	76
Şekil 39. AMPK ELİSA sonuçları sütun grafiği	76

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. Menstrual siklus sırasında meydana gelen olayların özeti	8
Tablo 2. WHO 2014 ile EIN sınıflamasının karşılıklı gelen grupları	10
Tablo 3. Bokhman'ın Endometrium Kanseri Sınıflaması (10).	14
Tablo 4. WHO endometrial hiperplazi sınıflandırması	20
Tablo 5. Endometrial kanser risk faktörleri.....	21
Tablo 6. Postmenopozal anormal uterin kanama nedenleri.....	22
Tablo 7. Endometrial kanserin histopatolojik alt tipleri	23
Tablo 8. Histolojik alt tiplerin görülme oranları	24
Tablo 9. Yapısal grade.....	24
Tablo 10. Endometrial kanserde prognostik faktörler	26
Tablo 11. Evre ve histolojik tipe göre 5 yıllık sağ kalım oranları.....	27
Tablo 12. Endometrium kanserinde FIGO evrelemesi.....	29
Tablo 13. RT-PCR'da analiz edilen genlerin primer listesi	45
Tablo 14. RT-PCR Reaksiyon Karışımı.....	46
Tablo 15. İzole edilen RNA ait konsantrasyon ve saflık değerleri	57
Tablo 16. Ishikawa hücrelerinde kontrol ve doz gruplarında koloni sayıları.....	64
Tablo 17. ELİSA kontrol ve doz grupları sonuçları	75

ÖZET

2D VE 3D İSHİKAWA ENDOMETRİAL KARSİNOM HÜCRE KÜLTÜRÜNDE LİTYUM, METFORMİN VE EVEROLİMUS MADDELERİNİN HÜCRE BÜYÜMESİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Dr. Emine TURAL

Gelişmiş ülkelerde en sık görülen jinekolojik kanser endometrial kanserdir. Biyolojik, moleküler ve klinikopatolojik özelliklerine göre iki tipe ayrılır. Vakaların %80 i Tip I (endometrioid histoloji) tümörlerden oluşmaktadır. Tip I tümörler düşük dereceli (FIGO grade 1 ve grade 2) tümörlerdir, genellikle endometrial hiperplazi ile ortaya çıkarlar ve iyi prognozludurlar.

Tip II tümörler yüksek dereceli (FIGO grade 3 ve üstü) ve endometrioid olmayan histolojik alt tipleri içerirler. Genellikle atrofik endometrium zemininde ortaya çıkarlar, östrojen bağımlı değildirler ve yüksek gradeli kötü prognozlu neoplazmlardır. Her yıl binlerce hasta bu nedenle ölmektedir.

Günümüzde kanser çalışmalarında ve kişiye özel kemoterapi planlamalarında iki boyutlu hücre kültürü çalışmalarından vazgeçilmektedir. 3 boyutlu (3D) hücre kültürlerinin in vivo ortamı 2 boyutlu (2D) kültürlerden daha iyi taklit ettiği düşünülmektedir

Endometrial kanserlerde erken evre ve metastatik olmayan rezektabl tümörlerde cerrahi uygulanmaktadır. Nihai tedavi patolojik tanıyla kesinleşen histolojik alt tipe göreler. Orta riskli endometrial kanser hastalarında ameliyat sonrası radyoterapi (RT) ve kemoterapi (KT) uygulanmaktadır. Yüksek riskli hastalarda ameliyat sonrası KT mutlaka uygulanmaktadır. Karboplatin, sisplatin ve doksorubisin sık kullanılan ilaçlar arasındadır.

Çalışmamızın amacı endometrial kanser hücresi olan Ishikawa hücre hattında everolimus, metformin ve lityumun hücre canlılığına olan etkilerini araştırmak, IC₅₀ (the half maximal inhibitory concentration; bir ilacın hücrelerin yarısını öldürdüğü doz) dozlarını saptamak, hücre proliferasyonuna, invazyonuna, koloni oluşumuna, hücre döngüsü ve apoptoz mekanizmalarına etkilerini ve terapötik etkinliklerini in

vitro koşullarda belirlemektir. Ayrıca Midkine, PI3K, AKT, AMPK protein seviyelerine ELİSA testiyle, CASP3, CASP8, CASP9, FADD, TRADD, MAP1LC3A, MAP1LCA3B, MTOR, BECLİN1, PIK3CA, PIK3CB, AKT, TNF, FASL' ı RT-PCR ile apoptozu ise Flow sitometride Annexin V ile değerlendirmektedir.

Everolimus, metformin ve lityumun IC₅₀ değerleri 48. Saate sırasıyla 37,46 nM, 48,59 mM, 100 µM olarak bulunmuştur. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) sonuçlarına göre maddelerin ve kombinasyon şekillerinin hücre döngüsü ve apoptoz ile ilişkili genler üzerine etkileri olduğu tespit edilmiştir. ELİSA deneyi ile bakılan protein düzeylerinde anlamlı değişiklikler saptanmıştır. Matrigel invazyon testi ile kontrol gruplarına göre doz gruplarında Ishikawa hücrelerinin invazyon kapasitelerinin azaldığı belirlenmiştir. Koloni formasyon testi ile de kontrol gruplarına oranla doz gruplarında koloni oluşumunun belirgin oranda baskıladığı tespit edilmiştir. Wound healing deneyi sonuçları ile doz gruplarında hücre g ve hücre-hücre etkileşiminin belirgin oranda azaldığı gösterilmiştir. Flow sitometri ile kullandığımız tekli ve kombine dozların apoptozu ve hücre ölümünü belirgin olarak artırdığı gösterilmiştir. Çalışma sonuçları Everolimus, Lityum ve Metformin kombinasyonlarının endometrial kanser tedavisinde anti kanserojen ajan olarak daha düşük dozlar şeklinde kullanılabileceğini göstermiş ve daha detaylı çalışmalar için veriler ortaya koymuştur.

Anahtar kelimeler: 3D hücre kültürü, everolimus, metformin, lityum, endometrial kanser

SUMMARY

THE EFFECTS OF LITHIUM, METFORMIN AND EVEROLIMUS SUBSTANCES ON CELL GROWTH IN 2D AND 3D ISHIKAWA ENDOMETRIAL CARCINOMA CELL CULTURE

Dr. Emine TURAL

Endometrial cancer is the most common gynaecological cancer in developed countries. It is divided into 2 groups on the basis of biological, molecular and clinicopathological features. 80% of the cases consist of Type I (endometrioid histology) tumors. Type I tumors are low grade (FIGO grade 1 and grade 2) and usually occur with endometrial hyperplasia and have a good prognosis.

Type II tumors include high grade (FIGO grade 3 and above) and non-endometrioid histological subtypes. They usually occur on the atrophic endometrium background and they are estrogen independent, high grade neoplasms with poor prognosis. Thousands of patients have died for this reason.

Currently, two-dimensional cell culture studies are abandoned in cancer studies and personal chemotherapy planning. 3-dimensional (3D) cell cultures are thought to mimic the in vivo environment better than 2-dimensional (2D) cultures.

Surgery is an option at an early stage and non-metastatic resectable tumors in endometrial cancers. The final treatment is based on the histological subtype which is confirmed by the pathological diagnosis. Patients with intermediate risk endometrial cancer get post-operative radiotherapy (RT) and chemotherapy (CT). Post-operative chemotherapy should be given to high risk patients. Carboplatin, cisplatin and doxorubicin are among commonly used drugs.

The aim of our study is to investigate the effects of Everolimus, Metformin and lithium on cell viability in the Ishikawa cell line, to determine the IC_{50} (the half maximal inhibitory concentration; the dose at which a drug kills half of the cells) dosage effects on cell proliferation, invasion, colony formation, cell cycle, apoptosis mechanisms and therapeutic activities in in vitro conditions. Additionally, Midkine, PI3K, AKT, AMPK protein levels Evaluated with ELISA test, CASP3, CASP8, CASP9, FADD, TRADD, MAP1LC3A, MAP1LCA3B, MTOR, BECLIN1,

PIK3CA, PIK3CB, AKT, TNF, FASL Evaluated with RT-PCR and Annexin V is Evaluated with PCR.

IC₅₀ levels of Everolimus, Metformin and lithium were found as 37.46 nM, 48.59 mM and 100 µM at 48th hour, respectively. According to the results of Real Time PCR (RT-PCR), it has been determined that the substances and their combination types have effects on cell cycle and genes associated with apoptosis. Significant changes were detected in protein levels measured by ELISA test. With the Matrigel invasion test, it was determined that the invasion capacity of Ishikawa cells decreased in the dose groups compared to the control groups. The colony formation test has been shown that colony formation was significantly suppressed shown in the dose groups compared to the control groups. With the results of Wound healing experiment, it has been shown that cell migration and cell-cell interaction are significantly reduced in dose groups. Flow cytometri has been revealed that the single and combined doses significantly increase apoptosis and cell death. The results of the study has been presented that the combinations of Everolimus, lithium and Metformin could be used in lower doses as an anticarcinogenic agent in the treatment of endometrial cancer and has provided data for more detailed studies.

Keywords: 3D cell culture, everolimus, metformin, lithium, endometrial cancer

GİRİŞ

Kanserler, hastalıklara bağılı ölümlerde kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sırada yer almaktadır. Endometrial kanser, gelişmiş ülkelerde en sık, gelişmekte olan ülkelerde serviks kanserinin ardından ikinci en sık görülen jinekolojik kanserdir. Kadınlarda en sık görülen kanserler sırasıyla meme, akciğer, kolorektal ve endometrial kanserdir (1, 2, 3, 4).

Bilinen risk faktörleri arasında geç yaşta menopoza girme, nulliparite, obezite, polikistik over sendromu (PCOS), menopozal dönemde progesteron eklenmeden östrojen tedavisi verilmesi, tamoksifen kullanımı, östrojen salgılayan tümörler, diyabet ve Herediter Nonpolipozis Kolon Kanseri (HNPCC) sayılabilir (5, 6, 7, 8).

Endometrial kanserler biyolojik, moleküler ve klinikopatolojik özelliklerine göre iki tipe ayrılır. Vakaların %80'i Tip I (endometrioid histoloji) tümörlerden oluşmaktadır. Tip I tümörler düşük dereceli (FIGO grade 1 ve grade 2) tümörlerdir, genellikle endometrial hiperplazi ile orataya çıkarlar ve iyi prognozludurlar. Tip I endometrial kanser için belirtilen risk faktörleri; obezite, östrojen replasman tedavisi (ERT), nulliparite, östrojen salgılayan over tümörleri ve polikistik over sendromu gibi yüksek östrojen seviyeleri ile giden durumlardır. Endometrial karsinom en sık görülen alt tiptir. Patogenezinde hormonal ve metabolik mekanizmalar önemlidir. Yaşam tarzı değişikliği ve kemoterapi mortalitesini azaltmaktadır (4, 9-12) AN3CA, ECC-1, HEC1A, HEC1B ve Ishikawa en sık kullanılan ve PI3K / Akt yolunda değişiklikler barındıran tip I tümör kaynaklı hücre hatlarıdır ve endometrial kanserlerin çoğunluğunu temsil ederler (4, 13).

Tip II (FIGO grade 3) endometrioid olmayan histolojik alt tipleri içerirler. Genellikle atrofik endometrium zemininde ortaya çıkarlar, östrojen bağımlı değildir ve yüksek gradeli kötü prognozlu neoplazmlardır (10, 14).

Endometrioid karsinomlar obeziteyle ilişkili olup obezite artışına bağılı olarak yıllık insidansının artacağı tahmin edilmektedir (1). Her yıl ortalama 76.000 hasta bu nedenle ölmektedir (4).

Endometrial kanserin erken evrede teşhis edilmesi durumunda sağkalım oranı yüksektir. Adjuvan tedavi uygulanmadığında %10'dan fazla nüks meydana gelir. Bu evredeki olgularının bazılarında sağkalım 5 yıldan daha azdır (15). Evre III ve IV

olgular tüm olguların %14'lük bölümünü oluşturmasına rağmen, ölümlerin yaklaşık %54'ü bu grupta meydana gelir (16).

Endometrial kanserde erken evre, metastatik olmayan rezektabl tümörlerde cerrahi uygulanmaktadır. Nihai tedavi patolojik tanıyla kesinleşen histolojik alt tipe görelerdir. Orta riskli endometrial kanser hastalarında ameliyat sonrası radyoterapi (RT) ve kemoterapi (KT) uygulanmaktadır.

Tip I tümörler sıklıkla PI3K/AKT yolunda değişiklikler gösterdiği için anti-PI3K/AKT tedavilerine cevap verme potansiyelleri vardır (17).

Sıklıkla ilişkili olan genetik değişiklikler fosfatase ve tensin homologu (PTEN) delesyonları veya mutasyonları (%36-83), fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat 3-kinaz katalitik alt birim alfa (PIK3CA), mikro-uydu kararsızlığını (%20-40), KRAS protoonkogen mutasyonlarını (%15-30), β -katenindeki fonksiyon mutasyonlarını (%25-40) ve fibroblast büyüme faktörü reseptörü 2 (FGFR2) mutasyonlarını içerir (12, 18, 19, 20).

Çalışmamızda endometrial karsinomun bir hücre hattı olan İshikawa hücrelerinden iki boyutlu (2D, monolayer) ve üç boyutlu (3D, sferoid) hücre kültürleri yapıp, Lityum klorid, Metformin ve Everolimus maddelerinin farklı dozları tekli ve kombine şekilde uygulandı. Ardından monolayer hücre hattında;

XTT testi (sitotoksisite testi), ELİSA testi (Midkine, PI3K, AKT, MTOR, AMPK genlerinin protein düzeyi tespiti), Flow sitometri (Annexin V ile apoptoz değerlendirilmesi), trizol reagent ile total RNA izolasyonu, cDNA sentezi, Real-Time PCR (gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu), koloni oluşum testi, wound healing assay (yara iyileşme-migrasyon deneyi), matrigel invasion chamber invazyon kapasitesinin belirlenmesi) deneyleri yapıldı.

GENEL BİLGİLER

UTERUS ANATOMİSİ

Uterus; armut biçimli, kalın duvarlı, içi boş, kaslı bir organdır. Ön kısmında mesane, arka kısmında rektum ile komşu, pelvik boşlukta yer alan, fibromuskuler bir organdır. Ortalama nulliparlarda 40-80 gr ağırlığında, 7-8 cm uzunluğunda ve 2,5 cm kalınlığındadır. Bu değerler yaşa, menstrüel siklusa ve doğurganlığa bağlı değişmektedir. Fundus, korpus, istmus ve serviks olmak üzere anatomik olarak dört bölüme ayrılır.

Fundus, kubbe şeklindeki kısımdır ve fallop tüplerinin giriş seviyesinin üzerinde yer alır. Korpus, uterusun gövde kısmıdır ve fundusun altında yer alır. Uterus, isthmus olarak adlandırılan hafif bir daralma ile serviksten ayrılır. Serviks, uterusun alttaki silindirik şeklindeki kısmıdır. Serviksin servikal kanal denilen lümeni, her iki ucunda dar açıklara sahiptir. İnternal os uterin kaviteye, eksternal os vajinaya açılır.

Periton, fundus ve corpus uteriye örterek uteroservikal bileşkede sırasıyla önde mesane ve arkada rektum üzerine yayılır bu sırada vesicouterin ekskavasyo ve rektouterin ekskavasyoyu (Cul-de-sac, Douglas çıkması) oluşturur (21, 22).

Uterusa tutunan sekiz ligament vardır. Bunlar iki lateral (broad), bir anterior, bir posterior, iki uterosakral ve iki round ligamenttir. Uterin damarları ve efferent lenfatik trunkuslar Broad ligament (ligamentum latum uteri) içindedir. Uterus'u a. uterina ve a. ovarica besler. A. uterina ile a. ovarica'nın terminal uçları anastomoz yaparlar. Oluşturdukları anastomoz kavsinden çıkan dallar da uterusu besler. Uterus'un venleri arterleri takip ederek v.iliaca interna'ya dökülür (23). Uterus'un lenfatikleri başlıca, nodi aortici laterales, nodi preaortici ve nodi iliacy externi'ye açılırlar. Sinirleri plexus uterovaginalis ve plexus pelvicus'tan gelir. Sempatik lifler kontraksiyon ve vazokonstruksiyon, parasempatik lifler inhibisyon ve vasodilatasyon yaptırır (21, 22, 23).

UTERUS EMBRİYOLOJİSİ

Embriyonun genetik ve kromozomal cinsiyeti, ovumu dölleyen spermın X veya Y olması ile feritilizasyon sırasında belirlensede, dişi ve erkek morfolojik özellikler, embriyonik dönemin 7. haftasına kadar gelişime başlamaz. Erken dönemde genital sistem her iki cinstede benzerdir. Bu nedenle başlangıç dönemine seksüel gelişimin farklanmamış safhası denir. Farklanmamış safhada iki çift genital kanal bulunmaktadır. Paramezonefrik kanallar (müllerian duktus) dişi üreme sistemi gelişiminde, mezonefrik kanallar (Wolffian duktus) erkek üreme sistemi gelişiminde rol oynamaktadır.

Paramezonefrik kanallar, mezotelin longitüdünel invaginasyonlarından, mezonefrik kanallar ve gonadların lateralinde, mezonefrozlardan lateral yüzeyinde oluşurlar. Kanalların kranial periton boşluğuna açılmaktadır. Embriyonun gelecekteki pelvik bölgesine ulaşana kadar paramezonefrik kanallar, mezonefrik kanallara paralel olarak kaudale doğru uzanırlar. Pelvik bölgeye ulaşınca orta planda birbirleriyle birleşip kaynaşarak Y şekilli uterovaginal primordiyumu oluştururlar. Ardından ürogenital sinüsün dorsal duvarı içine uzanarak, sinüs tüberkülünü oluşturur. Dişi genital yollarının çoğunluğunu paramezonefrik kanal oluşturur. Kranialdeki birleşmemiş bölümünden tuba uterina'lar, kaudal birleşmiş kısmından ise uterovaginal primordiyum farklanır. Bu yapı, uterusu ve vaginanın superior kısmını oluşturur.

Komşu splanknik mezodermden, endometrial stroma ve miyometrium gelişmektedir. Homeobox geni olan HOXA10 tarafından uterus gelişimi düzenlenir. Paramezonefrik kanalların birleşmesi ile iki peritoneal kompartman olan rektouterin ve vezikouterin cepler ve peritoneal bir katlantı olan kalın (broad) ligament oluşur. Kalın ligamentin tabakaları arasında mezenkim prolifer ve diferansiye olarak parametriumu oluşturur (24, 25).

UTERUS HİSTOLOJİSİ

Uterus duvarı üç tabakadan meydana gelir. Endometriyum içteki mukoza tabakasıdır. Miyometriyum düz kas demetlerinden oluşan en kalın tabakasıdır. Dışta

ise perimetriyum denilen seröz tabaka yer alır ve visseral peritondan oluşur (26, 27, 28).

Miyometriyum

Miyometrium uterusun en kalın tabakasıdır. Birbirinden ayırt edilmeyen üç düz kasa tabakasından oluşur. İç ve dış tabakalardaki düz kas demetleri uterusun uzun eksenine paralel yerleşir. Orta kas tabakası en kalın tabakasıdır. Kasları sirküler ya da spiral iç içe geçen düz kas demetlerinden oluşur. Lenfatikler ve çok sayıda büyük kan damarlarını içerir ve stratum vaskulare adını alır.

Kas oryantasyonu belirgin değildir. Histolojik kesitlerde kas demetleri rastgele dizilmiş gibi gözüktür. Uterus kontraksiyonu sırasında her üç tabaka fonksiyonel bir sınıyım gibi beraber çalışır (26, 27, 28).

Normal şartlarda uterusun peristaltik hareketleri sadece myometriyumun subendotelyal tabakasında gerçekleşir. Bu kasılma yanıtının oluşumunda overden sentezlenen östrojen ve progesteronun rolü önemlidir. Miyometriyal fonksiyonun endometriozis, dismenore gibi pek çok hastalıkta ve sperm, embriyo transferi, implantasyon gibi fizyolojik süreçlerde önemi çok büyüktür. Düzensiz ve uygun olmayan uterus aktivitesi anormal implantasyon, erken doğum, doğum sırasında zayıf uterus kontraksiyonu, infertilite gibi patolojik sorunlara neden olabilir (29, 30, 31).

Miyometriyum gebelik sırasında, hiperplazi ve hipertrofi ile çok büyür ayrıca pek çok düz kas hücresi kolajen sentezi yapar. Gebelik sonrasında, kolajen enzim etkisi ile azalır, düz kas hücrelerinde bozulmalar olur ve boyutları azalır. Uterus boyutları yaklaşık gebelik öncesine döner (27).

Endometriyum

Miyometriyuma yakın alt bölümlerde bazen dallanmalar yapan basit tübüler bezler içeren lamina propria ve tek katlı silyalı prizmatik epitel den oluşur. Endometriyum yapısal ve fonksiyonel olarak iki bölüme ayrılır.

Stratum bazale: Miyometriyuma komşu olan en alttaki bölüm. Menstrasyon sırasında korunup stratum fonksiyonelinin rejenerasyonu için kaynak görevi üstlenir.

Stratum fonksiyonale: Kalın tabaka olup, menstrual siklus sırasında proliferere ve dejenere olan kısımdır.

Endometriyumu besleyen damarlar bu tabaka için büyük öneme sahiptir. Miyometriyumun ortasında dairesel yerleşen arkuat arterlerden endometriyumu besleyen iki grup damar çıkar. Bunlar bazalisi besleyen düz arterler ve fonksiyonalise kan taşıyan kıvrımlı/spiral arterlerdir (26, 27, 28, 32, 33).

Endometriyal kalınlık, menstrual siklus fazları sırasında 1-6 mm arasında değişir. Bu kalınlık farkı hücre farklılaşması ve hücre-dışı matriksin yeniden yapılanması, proliferasyon, anjiyogenez ve vaskülogenez gibi bir takım olaylar ile yeniden düzenlenir (34, 35, 36).

Serviksin endometriyumunun yapısı uterusun geri kalan kısmından farklıdır. Endoserviks bölgesi tek katlı prizmatik epitel ile döşeliyken vajinaya çıkıntı yapan ekstoserviks denilen bölgesi ise çok katlı yassı epitel ile döşelidir (27).

Endometriyum yapısı hormonal değişikliklere bağlı olarak her ay siklik değişiklik gösterir. Menstrual siklus sırasındaki bu siklik değişimler proliferasyon fazı, sekretuar faz ve menstrual faz olarak tarif edilir (27). Menstrual siklus hipotaloma-hipofizer-ovaryan aks ile düzenlenen, stratum fonksiyonaledeki gelişimsel evrelerin arka arkaya devam etmesi ile meydana gelen bir süreçtir (37, 38). Pitüiter bezin pars distalisinden salgılanan ve ovaryumun steroid salgılarını düzenleyen gonadotropinler başta olmak üzere birçok büyüme faktörü, sitokin ve sinyal molekülleri tarafından kontrol edilmektedir (27, 28, 37, 39, 40).

Siklus genellikle 12-15 yaşlarında başlar, ortalama 28 günde bir tekrar eder ve 45-50 yaşına kadar devam eder. Bu sırada endometriyum ardışık fonksiyonel ve morfolojik değişikliklerden geçer. Menstrual siklus üç fazdan oluşur. Bunlar:

- Proliferasyon fazı, foliküler maturasyon ile aynı anda gerçekleşen ve ovaryan östrojen salgılanmasından etkilenen fazdır.
- Sekretuar faz, korpus luteumun fonksiyonel aktivitesi ile aynı anda gerçekleşir ve esas olarak progesteron salgısından etkilenir.
- Menstrual faz, korpus luteumun dejenerasyonu ile ovaryumun hormon üretiminin azalması ile başlar.

Fazlar arasında ani geçişler olmaz çünkü hepsi devamlı bir sürecin parçasıdır.

Normal siklusta, menstruasyonda dökülen endometriyumun yeniden oluşması östrojenik uyarıyla meydana gelir. Bu dönemde, folikül stimüle edici hormon (FSH) seviyesindeki artış overlerde folikül gelişimine neden olur. Gelişen foliküller tarafından östrojen hormonu sentezlenir (26, 27, 28). Östrojen konsantrasyonunun artması iki fazda gerçekleşir. Proliferasyon fazında, büyüyen foliküllerden sentezlenirken, ovulasyondan sonraki luteal fazda korpus luteum tarafından sentezlenir (35). Proliferasyon fazı boyunca, endometriyal bezler büyür ve kıvrıntılı hale gelir. Epitel hücrelerinde bulunan östrojen reseptörleri hormonal uyarılarla hücrenin yapısal ve fonksiyonel değişikliğe uğramasından sorumludur. Hormonal etki sonucunda hücrelerin çekirdekleri ökromatik hale gelir, protein üretimi yapan organellerin sayısı artar. Östrojenik etki sonucunda, bezlerin sayısı ve kıvrımları artarken, stromal hücrelerde mitotik aktivite artışı gözlenir (37). Artan östrojen seviyesi FSH salgısını baskılar, östrojen belli bir seviyeye gelince luteinize edici hormon (LH) salgısını uyarır ve ortalama 24-36 saat sonra ovulasyon meydana gelir (27).

Etkinliği ve miktarı değişen diğer önemli hormon progesterondur (35). Progesteron, ovulasyon sonrası endometriyumun proliferatif aktivitesini inhibe eder. Bez epiteli hücrelerinde salgı granüllerinin ve glikojenin artmasına yol açar. Endometriyal bağ dokudaki arteriyollerin sayısının ve kıvrımlarının artışı da luteal fazdaki diğer önemli etkisidir. Fonksiyonel tabakada progesterona bağlı gelişen tüm bu değişiklikler fertilizasyonun oluşması durumunda zigotun endometriyal implantasyonu ve gelişiminde çok önemlidir (27, 37, 41). Ovulasyon sonrası progesteron seviyesindeki artış FSH ve LH düzeylerini baskılar. Fertilizasyon oluşmazsa overlerden progesteron ve östrojen salgısı azalır ve buna bağlı olarak menstrual faz meydana gelir. Hormon seviyesindeki ani düşüş, endometriyumun fonksiyonel tabakasındaki spiral arterlerin periyodik kasılmalarına ve kan akımının değişmesine neden olur. Buna bağlı fonksiyonel tabaka iskemik hale gelir ve bezlerin salgı aktiviteleri durur. Arteriyel kasılmanın uzun sürmesiyle yüzey epitelinde bozulma ve kan damarlarında rüptür oluşur. Uterin sıvı, kan ve stromal ve epitelyal hücreler (fonksiyonel tabakadan dökülen) vajinal akıntıyı oluşturur. Endometriyumdan ayrılan doku parçaları venlerin, arterlerin ve bezlerin kopan uçlarını ortaya çıkarır. Arteriyel kan akımı spiral arterlerin duvarının gevşediği kısa

periyotlar dışında sınırlandırılır. Venlerin açık uçlarından dEvemli kan sızmaktadır. Kanın pıhtılaşması bu dönemde inhibe edilir. Bazal tabakayı düz arterlerdeki kan akımı korumaktadır (26, 27, 41).

Tablo 1. Menstrual siklus sırasında meydana gelen olayların özeti

Menstrual Siklus				
	Proliferasyon fazı	Sekretuar faz		Menstrual faz
Hipofiz hormonlarının etkisi	FSH over foliküllerinin büyümesini uyarır.	Başta östrojen uyarısı ile salgılanan LH en yüksek düzeydedir ve ovulasyon ile korpus luteumun oluşmasına neden olur		
Ovaryumda oluşan olaylar	Foliküller büyür, baskın folikül ovulasyon öncesi evreye ulaşır.	Ovulasyon gelişimi	Korpus luteum gelişimi	Korpus luteum bozulması
Baskın ovaryum hormonu	Foliküllerden üretilen östrojenler vajina, tuba ve uterus üzerine etki eder	Korpus luteumdan üretilen progesteron başlıca uterusu etkiler	Progesteron üretimi durur	
Endometrium olan olaylar	Menstruasyon sonrası mukoza gelişimi	Mukoza gelişimi ilerler, uterus bezleri kıvrımlı hale gelir, salgı fonksiyonu başlar		Ovulasyondan yaklaşık 14 gün sonra mukozanın bir kısmı dökülür

Perimetriyum

Uterusu kaplayan, dıştaki ince seröz tabakasıdır. Visseral peritondan meydana gelir. Abdominal ve pelvik periton ile devam eder. Altında belirgin bir elastik tabaka olan mezotelyum ve ince bir gevşek bağ dokusu tabakasından meydana gelir. Perimetriyum uterusun posteriyor yüzeyinin tamamını anterior yüzeyinin bir kısmını kaplar.

Anteriyor yüzeyin kalan kısmı bağ dokusu ya da adventisya ile kaplıdır (26, 27, 28, 42, 43).

ENDOMETRİAL HİPERPLAZİ

Endometriyum kanseri dünyada kadınlar arasında tanı konulan 6. en sık kanserdir. Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri dahil olmak üzere gelişmiş ülkelerde çok sıktır (44, 45).

Son yıllarda birçok ülkede endometriyal kanser insidansı artmıştır, bunun artan obezite prevalansı, kadın üreme tekniklerinde meydana gelen değişikliklerden kaynaklandığı düşünülmektedir (46, 47).

Günümüzde endometriyal kanser için iyi gelişmiş tarama programları yok ancak endometriyal hiperplazi, endometriyal kanser türünün en yaygın olan endometrioid tipin bilinen öncü lezyonudur. Bu nedenle endometriyal hiperplazi tespiti kanseri önleme fırsatları sunar (48).

Endometrial hiperplazi insidansı 133/100.00 kadındır ve sıklığı yaşla beraber artar. Otuz yaş altındaki kadınlarda nadir görülürken 50-54 yaşlarında pik yapar (49).

Endometriyum üreme çağındaki kadınlarda çok aktif bir dokudur. Östrojen ile proliferatif endometrium oluşurken, gebelik ve human koryonik gonadotropin üretimi olmadığında, korpus luteum progesteron üretmediği için hormonal çekilmeye bağlı menstruasyon gerçekleşir. Sürekli östrojene maruz kalmak siklusun bozulmasına neden olur. Progesteron yokluğunda ya da hormonal uyarıya aşırı yanıt sonucu endometrial hiperplazi meydana gelebilir. Progesteron tarafından karşılanmamış östrojen, proliferatif endometrium, endometrial hiperplazi ve endometrium kanseri gibi farklı kliniklere sebep olabilir.

Endometriyal hiperplazi, histolojik olarak endometriyal bezlerin proliferasyonunun varlığında bez-stroma oranında (>%50) artış olması ile tespit edilir. Çoğalan bezlerin şekli ve boyutu değişir ve hücrelerde sitolojik atipiye rastlanabilir (45, 50).

Endometrial hiperplazi için 2014 Dünya Sağlık Örgütü (WHO- World Health Organization) ve Endometrial Intraepitelyal Neoplazi (EIN) sistemi olmak üzere iki ana sınıflandırma kullanılır.

1. WHO sınıflandırması (2014)

a. Atipisiz endometrial hiperplazi, endometrial karsinom ile aynı genetik mutasyonları taşımaz, nadiren karsinoma (%1-%3) ilerler ve spontan remisyon oranı yaklaşık olarak %70'tir. Konservatif olarak tedavi edilebilir.

b. Atipili endometrial hiperplazi (EIN) endometrial karinomlarla benzer genetik değişiklikler ve monoklonal büyüme profili içerdiği için Tip I endometrial karsinoma öncü bir lezyon olduğu düşünülmektedir. EIN'li hastaların %60 'ı invaziv bir endometrial karsinom geliştirecektir ya da çoktan geliştirmiştir. Spontan remisyon oranı %25-30 dur. Daha radikal tedavi yöntemleri gerektirir (51, 52, 53, 54).

2. Endometrial Intraepitelyal Neoplazi (EIN) sınıflaması

Tanı kriterleri; klinik, moleküler değişiklikler ve bilgisayarlı histomorfometrinin histopatolojik korelasyonunu temel alarak geliştirilmiştir ve 2 sınıfa ayrılır:

a. Bening endometrial hiperplazi (non-neoplastik); anovulasyon ve östrojene uzun süre maruz kalmaya bağlı gelişir. Morfolojisi proliferatif endometriumdan farklıdır. Endometrium çok sayıdaki dilate ve kıvrımlı gland nedeniyle büyümüştür ve kistik yapılar şeklinde görülür. Basit hiperplazi, hafif hiperplazi veya kistik glandüler hiperplazi olarak adlandırılır.

b. Endometrial intraepitelyal neoplazi (EIN); prekanserözdür. Tanısı için; sitolojik olarak hücresel farklılık, gland/stroma oranının >1 olması, monoklonalite olması, tek odakta minimum 1mm'lik boyutta lezyonların varlığı ve sekretuar endometrium gibi benzer lezyonlar ya da invaziv kanser ekartasyonu gibi özellikler mutlaka olmalıdır (51, 55).

Tablo 2. WHO 2014 ile EIN sınıflamasının karşılıklı gelen grupları

WHO 2014 SINIFLAMA SİSTEMİ	EIN SINIFLAMA SİSTEMİ	TOPOGRAFI	FONKİYONEL KATEGORİ
Atipisiz hiperplazi	Bening endometrial hiperplazi	Yaygın	Östrojen etkisi
Atipili hiperplazi	Endometrial intraepitelyal neoplazi	Bölgesel Fokal, Yaygın diffuze ilerleyen	Premalign

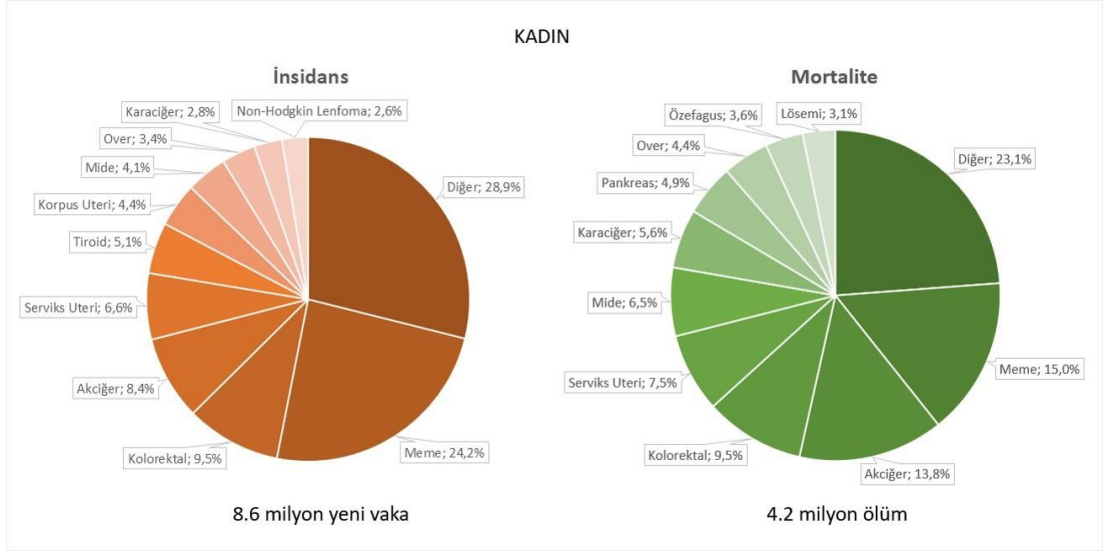
ENDOMETRİUM KANSERİ

1.Epidemiyoloji

Endometrium kanseri, gelişmiş ülkelerde en sık, gelişmekte olan ülkelerde serviks kanserinden sonra ikinci en sık görülen jinekolojik kanserdir (1). Güçlü bir endometrial karsinom (EC) risk faktörü olan obezitenin prevalansının yükselişine bağlı olarak, yıllık insidansının artacağı tahmin edilmektedir. Dünyada her yıl yaklaşık 320.000 yeni vaka teşhis edilmekte ve her yıl 76.000 hasta bu hastalıktan ölmektedir (4). Gelişmiş ülkelerde düzenli periyodik muayene, smear ve kolposkopi gibi erken tanı yöntemleri serviksin preinvaziv lezyonlarının invaziv kansere dönüşmeden tanınmasını sağlamıştır. Tüm bunlar sayesinde serviks kanseri insidansı önemli derecede azalmıştır. Uterusun histolojik tip ve bölge açısından en sık görülen kanseri endometrium adenokarsinomudur (44, 46, 56).

Endometrial kanserler etiyolojik, biyolojik ve klinik olarak çeşitli olsalar da en sık görülen alt tip endometrial karsinomun patogenezinde hormonal ve metabolik mekanizmalar ön planda yer alır. Bu nedenle endometrial karsinom mortalitesini azaltmada erken teşhis, yaşam tarzı değişikliği ve kemoterapi tedavileri önemli bir fırsat sunmaktadır (9).

Endometrium kanser insidansı 60-70 yaş arasında pik yapar. Vakaların %2-5'i 40 yaş öncesinde ortaya çıkar. Dünya da en yaygın 6. malignite endometrium kanseridir. Yıllık ortalama 320.000 yeni vaka tanısı almaktadır. Gelişmiş ülkelerde insidansı %5,9 gelişmekte olan ülkelerde %4'tür. İnsidans düşüklüğüne rağmen gelişmekte olan ülkelerde ölüm oranı daha yüksektir (57, 58).



Şekil 1. Dünyadaki en yaygın 10 kanser için insidans ve mortalite dağılımı [GLOBOCAN 2018 (Global Cancer Incidence, Mortality and Prevalence- Küresel Kanser Sıklığı, Ölüm Oranı ve Yaygınlığı)]

Bokhman, ilk olarak endometrial kanserin başlıca iki klinikopatolojik tipini tanımladı ve endometrial kanser gelişmeden çok önce ortaya çıkan endokrin ve metabolik bozukluk kompleksinin tümörün biyolojik özelliklerini, klinik seyrini ve hastalığın prognozunu belirlediğinden bahsetti (10, 11).

Gelişmiş ülkelerdeki obezite, fiziksel aktivite azlığı ve artmış yaşam süresi yüksek endometrial kanser insidansının temel nedenleridir. Postmenopozal dönemde obez kadınlardaki östrojen seviyesi yüksekliği endometrium kanseri için önemli bir risk oluşturur (58).

Endometriumda gelişen en malign neoplazmlar karsinomlardır (epitelyal malign neoplazmalar) (10). Endometrial kanserler biyolojik, moleküler ve klinikopatolojik özelliklerine göre iki tipe (tip I ve tip II) ayrılır. Vakaların %80'i Tip I veya endometrioid histolojinin tümörlerinden oluşmaktadır (12, 16).

Tip 1 neoplazmalar, endometrial kanserlerin çoğunluğunu oluşturan düşük dereceli endometrioid karsinomlardır (Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Federasyonu (FIGO) grade I ve II). Östrojen tarafından uyarılırlar. Tipik olarak önce endometrial hiperplazi (ayrıca endometrial intraepitelyal neoplazi (EIN) olarak da bilinir) ile ortaya çıkarlar. Erken evrede tespit edilirler ve iyi bir prognoza sahiptirler. İlginç bir biçimde obezite erken yaşta tanı alan endometrioid tip endometrium kanseri ile ilişkilidir.

Tip 2 neoplazmalar, FIGO grade 3 endometrial kanserleri ve endometrioid olmayan seröz, berrak hücreli, karışık hücre ve farklılaşmamış histolojik alt tipleri içerirler. Bu neoplazmalar östrojen duyarlı değildir. Genellikle atrofik bir endometriyum varlığında ortaya çıkarlar. Farklı tümörögenез yolları gösterilmiştir. Fiziksel aktivite ve uzun dönem kombine oral kontraseptif kullanımı riski azaltmıştır. Yüksek grade ve kötü prognozlu durlar. Karsinosarkomlar da bu gruba girer (10, 11, 16, 35, 60, 61).

Kuzey Amerika ve Avrupa en yüksek endometrial kanser insidansına sahip yerlerdendir. Bu bölgelerde kadın genital sisteminin en sık görülen malignitesidir. Meme, akciğer ve kolorektal kanserden sonra kadınlarda görülen en yaygın kanserdir (36).

Amerika Birleşik Devletleri'deki yaklaşık 61.880 kadının 2019 yılında endometrial kanser tanısı aldığı tahmin edilmiştir. Tanı sonrası 5 yıllık sağ kalım oranı %81'dir. Bazı alt tipleri kötü prognozlu olduğu için 2019 yılında ABD'de endometrial kanserden beklenen ölüm oranı 12.170'dir (57).

Hormon replasman tedavilerinin menopozal dönemde kullanımının yaygınlaşması endometrial kanser insidans artışının bir diğer nedenidir. Avrupa Birliği üyesi ülkelerde geliştirilmiş kanser tedavileri ve sağlık hizmetlerine hızlı ulaşım sayesinde artmış insidans oranına rağmen mortalite oranı azalmıştır (37, 57).

2.Endometrial Kanser Sınıflandırılması

Bokhman, 1983 yılında EC'nin başlıca iki klinikopatolojik tipini tanımladı. Buna göre EC tip I endometrioid karsinom, tip II ise seröz karsinomdur (10, 11, 62).

Tablo 3. Bokhman'ın Endometrium Kanseri Sınıflaması (10).

	Tip 1	Tip 2
Klinik özelliklerle ilişkisi	Metabolik sendrom; obezite, hiperlipidemi, hiperglisemi ve artmış östrojen seviyesi	Yok
Grade	Düşük	Yüksek
Hormon reseptör ekspresyonu	Pozitif	Negatif
Histoloji	Endometrioid	Non-endometrioid (seröz, berrak hücreli karsinom)
Genomik stabilite	Diploid, sıklıkla mikrosatellit instabilite (%40)	Anöploid
İlişkili genler	PTEN, CTNN1B, KRAS, PIK3CA, PIK3R1, ARID1A	p53, HER2
Prognoz	İyi (5 yıllık sağkalım oranı %85)	Kötü (5 yıllık sağkalım oranı %55)

Endometrial kanserlerin ilk geniş kapsamlı genomik özellikleri 2013 yılında The Cancer Genome Atlas Research Network (TCGA- Kanser Genom Atlası) tarafından sunuldu. Bu çalışmaya göre endometrial kanser mikrosatellit instabilitesi, somatik mutasyon oranları ve kopyas sayısına göre dört farklı genomik alt tipe ayrıldı (54, 63, 64, 65).

Genel olarak endometrial kanserlerinin başlıca iki klinikopatolojik tipi tanımlanmıştır (10,11).

1.Endometrioid karsinomlar (Tip I); Endometrial kanserlerin %75'den fazlasını oluşturan düşük dereceli endometrial karsinomlardır [Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Federasyonu (FIGO) grade I ve II] (10, 11, 16, 35, 60, 61). Tanı anında çoğunlukla uterusu sınırlıdır. Nadir de olsa uzak metastaz tanı sırasında saptanabilir. Tipik olarak önce endometrial hiperplazi ile ortaya çıkarlar. İyi ve orta derece diferansiye hücreler ile karakterizedir ve karşılanmayan östrojene uzun süre maruziyet ile ilişkilidir. Uzun süreli progesteron ile karşılanmayan östrojen sonrası endometrium

prolifere olur ve endometrial hiperplazi sonrasında da adenokarsinoma neden olur (10, 11, 66).

Endometrioid karsinomlar, polikistik over sendromu (PCOS), kronik anovulasyon veya obezitesi olan genç kadınlarda ortaya çıkabilmesine rağmen en sık postmenopozal kadınlarda görülür. Endometrioid tipte progesteron reseptörü (PR) genellikle pozitifdir (35, 67).

Tip I tümörler sıklıkla PI3K/AKT yolunda değişiklikler gösterdiği için anti-PI3K/AKT tedavilerine cevap verme potansiyelleri vardır (17). AN3CA, ECC-1, HEC1A, HEC1B ve Ishikawa en sık kullanılan ve PI3K/AKT yolunda değişiklikler barındıran tip I tümör kaynaklı hücre çizgileridir ve endometrial kanserlerin çoğunluğunu temsil ederler (4, 13).

Sıklıkla ilişkili olan genetik değişiklikler PTEN delesyonları veya mutasyonları (%36-83), Phosphatidylinositol-4,5- bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha (Fosfatidil inozitol-3-kinaz katalitik alfa polipeptid, PIK3CA), mikrosatelit instabilitesi (%20-40), KRAS (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog- Kirsten sıçan sarkoma viral onkogen homologu) protoonkogen mutasyonlarını (%15-30), β -katenindeki fonkiyon mutasyonlarını (%25-40), fibroblast büyüme faktörü reseptörü 2 (FGFR2) mutasyonlarını, özellikle MSH-6 (mutS homolog 6) başta olmak üzere DNA mismatch repair genlerindeki mutasyonları içerir (12, 18, 19, 20, 68). Ayrıca ARID1A (AT-Rich Interaction Domain 1A- AT bakımından zengin, etkileşim alanı içeren 1A) gibi farklı genetik değişiklik de tarif edilmiştir (63).

2.Non-endometrioid tip endometrial kanserler (Tip II); karsinosarkom, seröz ve berrak hücreli karsinomları içerir. Seröz ve berrak hücreli karsinomlar genellikle östrojen ve progesteron reseptörü bulundurmazlar ve östrojen tarafından uyarılmazlar. Seröz karsinomlar bu grubun prototipidir ve çoğu zaman ileri evre tümörler şeklinde karşımıza çıkarlar. Endometrial kanserlerden meydana gelen ölümlerin %40'ından sorumlu olan seröz adenokarsinomlardır (69). Tip I ve tip II tümörlerde bulunan farklı genetik değişiklikler, bu alt tiplerin farklı etiyojilere sahip olabileceğini düşündürmektedir (68, 70, 71). Tümör süpresör gen olan PTEN tüm vakaların yaklaşık %50'sinde, onkogen olan KRAS vakaların %25'inde değişikliğe uğramıştır (4, 72).

Tip II endometrial kanserler tümör protein p53 (TP53) mutasyonları, F-box ve WD tekrar alanları içeren protein 7 (FBXW7), AT-zengin etkileşim alanı 1A (ARID1A) mutasyonları ve Erb-b2 reseptörü tirozin kinaz 2 (ERBB2) amplifikasyonları ile karakterizedirler (4, 20). Yüksek oranda Ki67 proliferasyonu ve Non-diploid karyotip ve HER-2/neu (Human Epidermal growth factor Receptor 2/c-erbB-2- İnsan epidermal büyüme faktörü reseptör-2) overekspresyonu tespit edilir (3, 63, 68).

Tip II endometrial kanserler postmenopozal dönemde tipik olarak atrofik endometriyumda veya endometrial polipte ortaya çıkar. Obezite ile ilişkili değildir (73).

Tip II endometrial kanserler kötü diferansiyedir ve vakaların sadece % 10 ile %20'sini oluşturmalarına rağmen ölümlerin %40'ına neden olurlar (7). Ekstrauterin hastalık riski fazla, yüksek grade ve kötü prognozlu kanserlerdir. Kötü diferansiye veya undiferansiye hücreler ile karakterizedir. Sıklıkla FIGO'ya göre evre 3 ya da 4'te tanı alırlar. Nüks ve metastaz riski yüksektir. Endometrial intraepitelyal karsinomun prekürsör lezyonudur (63, 68).

3.Endometrial Kanser Risk Faktörleri

Tip I tümörler östrojen bağımlı tümörlerdir ve progesteronu azaltan faktörler de Tip I riskinde artış ile ilişkilidir. Tip I için belirtilen risk faktörleri; obezite, östrojen replasman tedavisi (ERT), nulliparite, östrojen salgılayan over tümörleri ve polikistik over sendromu gibi yüksek östrojen seviyeleri ile giden durumlardır. Ayrıca Tip I pre ve perimenapozal dönemde Tip II ye göre daha yaygın görülmektedir (74).

Bilinen risk faktörleri şunlardır:

- Karşılanmamış östrojen tedavisi
- Obezite
- Tamoksifen
- Kronik anovulasyon
- Diyabet
- Östrojen sekrete eden tümörler
- Lynch sendromu
- Cowden sendromu (multiple hamartom sendromu)

- Aile öyküsü
- Endometrial hiperplazi
- Erken menarş ve geç menapoz
- Diğer faktörler

Karşılanmamış Östrojen Hormon Tedavisi

Östrojen kullanım süresi ile orantılı olarak risk artacağı gibi beraber progesteron kullanımı ile azalır. Endometrial kanser riskinde 20 kat artış yapar (5). Bir yıl boyunca ılımlı ya da yüksek doz karşılanmamış östrojen kullanımı ve 18-24 ay düşük doz hormon tedavisi sonrası endometrial hiperplazi (herhangi bir tip) gelişimindeki risk artışı anlamlı bulunmuştur (6). Sadece östrojen kullanan kadınlarda endometrial kanser riskinin artmış olduğu ve kullanım dozuna ve süresine bağlı olarak rölatif riskin 1,5 ile 10 kat arasında arttığı tespit edilmiştir. Endometrial karsinomun mutlak riskinin postmenapozal kadınlarda yaklaşık 1/1000 olduğu tahmin edilmektedir. Karşılanmayan östrojen kullanan kadınlarda mutlak risk 1/100'e kadar yükselmektedir (7, 8).

Obezite

Endometrial karsinom gelişimi için bugüne kadar belirlenen en önemli risk faktörü obezitedir. Alta yatan mekanizma ise yüksek östrojen maruziyetidir. Sonuç olarak, obezite ve endometriyal kanser arasındaki bağlantı östrojene bağımlı tümör grubu olan Tip I tümörlü olgular için daha güçlüdür (75). Periferik yağ dokuda bulunan androstenedionun östrona dönüşümü ve androjenlerin östradiole aromatisasyonu nedeniyle obez kadınlarda endojen östrojen yüksek seviyededir. Ayrıca dolaşımdaki düşük seks hormon bağlayıcı globülin seviyesi, insülin direnci, IGF (insülin like growth faktör- İnsülin benzeri büyüme faktörü) ve IGF bağlayıcı protein konsantrasyonu değişiklikleri obez kadınlarda endometrial kanser riskinde artışa neden olur (76, 77).

Yüksek karbonhidratlı diyet ilişkili hiperinsülinemi, insülin direnci ve yüksek seviyelerde insülin benzeri büyüme faktörleri, endometrial proliferasyon ve endometrial karsinom gelişiminde rol oynayabilir (67, 78, 79).

Setiawan ve ark. (2013) 10 kohort ve 14 vaka-kontrol çalışması ile yaptıkları 14000'den fazla endometrial kanser ve 35000'den fazla kontrolün birleştirilmiş

analizinde; Tip 1 endometrial kanser oranını vücut kitke indeksi (VKİ) ile değerlendirmişlerdir. VKİ'nin normal aralığı $20 \leq VKİ < 25 \text{ kg/m}^2$ 'dir. Çalışmaların sonucunda aşırı kilo için OR 1.5 ($25 \leq VKİ < 30 \text{ kg/m}^2$), sınıf 1 obezite için OR 2.5 ($30.0 \leq VKİ < 35 \text{ kg/m}^2$), sınıf 2 obezite için OR 4.5 ($35.0 \leq VKİ \leq 39,9 \text{ kg/m}^2$) ve sınıf 3 obezite için OR 7.1 ($\geq 40 \text{ kg/m}^2$)'dir (80). Amant ve ark. (2005) yaptıkları çalışmada ise VKİ 25 kg/m^2 'den yüksek ise 2 kat, 30 kg/m^2 'den yüksek ise 3 kat endometrial kanser risk artışı saptanmıştır (81)

Tamoksifen Kullanımı

Tamoksifen kadınlarda akciğer kanserinden sonra kansere bağlı ölümlerde ikinci sırada yer alan meme kanserinin tedavisinde kullanılan trifeniletilen yapısında, östrojen reseptörü için mikst agonist-antagonist olabilen selektif östrojen reseptör modülatörüdür (SERM). En önemli yan etkilerini endometrium üzerine göstermektedir. Menopoz sonrası kadınlarda (östrojen seviyeleri düşük) östrojen agonisti, premenopoz kadınlarda (östrojen seviyeleri yüksek) ise östrojen antagonisti gibi davranır. Doza ve kullanım süresine bağlı olarak postmenopozal dönemde endometrial adenokarsinom riskini artırır. Premenopozal kadınlarda ise risk artışı tespit edilmemiştir (82, 83, 84, 85).

Kronik Anovulasyon

Perimenopozal dönem ve PCOS, endojen olarak karşılanmayan östrojen üretiminin olduğu sık karşılaşılan anovulatuvar durumlardır. Bu kadınlarda, seks streoidleri siklik olmayan bir şekilde sürekli üretilir. Normal bir endometrial siklus gerçekleşmediği ve kronik östrojen yeterli progesteron üretimi ile karşılanmadığı için devamlı endometrial doku proliferasyonu sonucu endometrial hiperplazi ve endometrial kanser meydana gelebilir (75, 86, 87).

Diyabet

Diyabetin endometrial kanser riskini 1.3-2.8 kat artırdığı bilinmektedir (67). İnsülin direnci, kronik inflamasyon ve serbest overyan steroid hormon seviyelerinin yüksek olması diyabetli kadınlarda endometrial kanser için olası mekanizmalardır (88). Artmış östrojen seviyesi, yüksek IGF-1 seviyesi ile birleştiğinde endometrial

kanser riskindeki artışı açıkladığı düşünülür. İnsülin direnci bağımsız bir rol oynayabilir. Diyabet ile ilişkili artmış riskin tek başına mı kanser riski oluşturduğu ya da birlikte var olan obezite ile mi ilişkili olduğu net değildir (67, 88).

Östrojen Sektore Eden Tümörler

Granüloza hücreli tümörü olan kadınların endometrial hiperplazi oranı %25-50, endometrial kanser oranı ise %5-10 arasında tespit edilmiştir. Endometrial kanser granüloza hücreli tümörler ile baraber tespit edildiğinde genellikle erken evre ve iyi diferansiyedir (89, 90, 91).

Lynch II Sendromu (Hereditör Nonpolipozis Kolorektal Kanser-HNPCC)

Endometrial kanser vakalarının çoğu sporadiktir. Ancak Lynch II sendromu olarak bilinen HNPCC ile de ilişkili olduğu saptanmıştır. HNPCC, otozomal dominant kalıtsal bir hastalıktır. DNA mismatch repair (DNA yanlış eşleşme tamir) gen ailesinden MSH2, MSH6 (mutS homolog2, mutS homolog6) ve MLH1 (mutL homolog1)'i içeren genlerden birinde germline mutasyon ile karakterizedir. HNPCC olanlarda endometrial kanser gelişme riski %30 - %61 arasındadır (92, 93, 94, 95, 96).

Cowden Sendromu (Multiple Hamartom Sendromu)

Cowden Sendromu (CS), PTEN tümör süpresör geninde mutasyon olan, otozomal dominant, karakteristik mukokutanöz lezyonlar ile giden bir hastalıktır. CS ile önemli derecede ilişkisi olduğu bilinen tek jinekolojik kanser endometrial kanserdir. CS'da endometriyal kanser için bildirilen risk yaşam boyu %5 ile % 28 arasında değişir (97, 98, 99, 100). Endometriyal kanser riskinin 25 yaş civarında başladığı düşünülüyor. CS da ayrıca endometrial, meme, tiroid, kolorektal ve böbrek kanseri riskinde artış vardır (99, 100).

Aile Öyküsü

Birinci derece akrabasında endometrial kanser öyküsü olan kadınların daha fazla endometrial kanser riski altında olduğunu gösteren çalışmalar yapılmıştır (101).

Endometrial Hiperplazi

2015 senesinde WHO'nun yeni tanımladığı endometrial hiperplazi ve onun endometrial kanser ilişkisi aşağıdaki tablodaki gibidir (102).

Tablo 4. WHO endometrial hiperplazi sınıflandırması

Yeni Terim	Genetik değişiklikler	Eşlik eden invaziv endometrial kanser	İnvaziv endometrial kanserine ilerleme oranı
Atipisiz Hiperplazi	Dağılmış glandlarda düşük derece somatik mutasyonlar, hemotoksin ve eozin boyamada morfolojide değişiklik yok	<%1	RR: 1.01–1.03
Atipili hiperplazi	Endometrioid endometrial kanser için tipik olan genetik değişikliklerin çoğu mevcuttur,	%25-33	RR: 14-45
Endometrioid intraepitelyal neoplazi	mikrosatellit instabilite, PAX2 inaktivasyonu, PTEN, KRAS ve CTNNB1 mutasyonu	%59	

(RR: Rölatif Risk, PAX 2: Paired Box Gene 2, PTEN: Phosphatase and Tensin homologue, KRAS: Kirsten Rat Sarcoma, CTNNB1: Catenin Beta-1)

Erken Menarş Geç Menopoz

Bazı çalışmalarda erken yaşta menarşın endometrial kanser için risk faktörü olduğu, geç menopozun ise risk artışı ile daha az ilişkili olduğu gösterilmiştir (103).

Diğer Faktörler

Yapılan bir çalışmada, hipertansiyonu olan kadınların, endometrial kanser geliştirme riskinde %61'lik artış olabileceği düşünülmüştür. Ancak yaş, vücut kitle indeksi ve diyabet durumuna göre belirlenen ilişki ve altta yatan mekanizma açıklığa kavuşturulmalıdır (104).

Fitoöstrojenler; birçok bitki, sebze ve meyvede bulunan östrojenik ve antiöstrojenik özellikleri olan steroid olmayan bileşiklerdir. 3500'den fazla endometrial kanserli kadını içeren bir çalışmanın analizinde, yüksek soya alımının endometrial kanser riskini %30 azalttığı bulunmuştur (105).

Nulliparite, erken menarş, infertilite ve geç menopoz gibi reproduktif farklılıklar endometrial kanser riskini değiştirmektedir. Nulliparite, endometrial kanser riskinde 2-3 kat artış ile ilişkilidir. İnfertil kadınlarda bu risk 3-8 kat daha fazladır (36, 81, 86).

Endometrial atrofi, postmenopozal dönemde olmak ve pelvik radyoterapi özellikle tip 2 endometrial kanser risk faktörleri iken sigara tip 2 endometrial kanser riskini artırken, tip 1 endometrial kanser riskinde azalma ile ilişkilidir. Sigara postmenopozal dönemde riskte azalma gösterirken premenopozal dönemde böyle bir etkisi yoktur (63, 106).

Kombine oral kontraseptif kullanımının, endometrial kanser riskini %30-40 oranında azalttığı tespit edilmiştir (107).

Endometrium kanserinin bazı risk faktörler ve rölatif risk değerleri Tablo 5'te gösterilmiştir (108, 109).

Tablo 5. Endometrial kanser risk faktörleri

Faktör	Rölatif risk
Obezite	
VKİ: 20-50	3.0
VKİ > 50	10.0
Nulliparite karşılaştırması	
1 çocuğa karşı	2.0
2 çocuğa karşı	5.0
Geç Menopoz (>52-40 yaş)	2.4
Diabetes mellitus	2.7
Karşılanmayan östrojen tedavisi	6.0
Tamoksifen	2.0
Kombine oral kontraseptifler	0.5
Cowden sendromu (PTEN mutasyonu)	3 ila 5 kat artmış risk
Hereditör nonpolipozis kolorektal kanser sendromu	Yaşam boyu %40-60 artmış risk
Aile üyelerinde endometrial kanser varlığı	3.4

4.Klinik Belirtiler

Endometrial kanserin ana semptomu anormal uterin kanamadır ve en sık postmenopozal dönemde görülür. Bu dönemdeki kadınlarda aksi ispat edilene kadar malignite düşünülmelidir. Postmenopozal kanaması olanların %5'inde primer veya sekonder malignite bulunur. En sık endometrial kanser (%80) bulunur. Postmenopozal kadınlardaki diğer belirtiler ise vajinal akıntı, lekelenme tarzında vajinal kanama, pelvik ağrı ve abdominal distansiyondur (3, 110, 111, 112).

Tablo 6. Postmenopozal anormal uterin kanama nedenleri

SebeP	Sıklık
Ekzojen östrojenler	% 30
Atrofik endometrit /vajinit	% 30
Endometrial kanser	% 15
Endometrial veya servikal polipler	% 10
Endometrial hiperplazi	% 5
Diğerleri (servikal kanser, uterin sarkom, üretral karinkül, travma vb.)	% 10

Premenopozal kadınlarda menometroraji şeklindeki kanama genellikle ilk geliş şikayetidir. Bu kadınlar eğer 40 yaş üstüdeyse ve obezite gibi diğer risk faktörleri de bulunuyorsa malignite açısından araştırılmalıdır (3, 110, 111, 112).

5. Tanı

Kuşkulu bulgular ile başvuran kadınlarda ilk aşamada abdominal ve pelvik muayene yapılması gerekmektedir ardından gelen basamakta ise transvajinal ultasonografi ve endometrial biyopsi yapılmalıdır. Spekulum muayenesi normal olsa bile uterus transvajinal ultrasonografi ile incelenmelidir.

Postmenopozal kadınlarda transvajinal ultrasonografide endometrial kalınlık <4 mm, düşük endometrial hastalık riskini gösterir, kalınlık 20mm'ye ulaştıkça kanser riski artar (113). Postmenopozal kanaması olan kadınlarda transvajinal ultrasonografi veya endometrial örnek alınması tanıda ilk basamak kabul edilmektedir. Premenopozal kadınlarda endometrial kalınlık malignite ile ilişkili bulunmamıştır.

Endometrial biyopsi, küretaj veya gerektiğinde histerektomi tanıda kullanılan yöntemlerdir. Tanı histolojik bulgular ile konur (3, 110, 111, 113).

6. Tarama

Henüz etkili, non-invaziv ve ucuz bir tarama yöntemi endometrium kanseri için geliştirilememiştir.

7. Endometrial Kanserin Alt Tipleri (Histopatolojik Sınıflama)

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Uluslararası Jinekolojik Patologlar Topluluğu (ISGyP- International Society of Gynecological Pathologists) tarafından sınıflandırılmıştır (81, 114, 115). (Tablo 7)

Tablo 7. Endometrial kanserin histopatolojik alt tipleri

Endometrioid adenokarsinom <ul style="list-style-type: none">• Squamöz diferansiyasyon gösteren• Villoglandüler• Sekretuar
Müsinöz karsinom
Seröz karsinom
Berrak hücreli karsinom
Nöroendokrin tümörler <ul style="list-style-type: none">• Düşük dereceli nöroendokrin tümör Karsinoid tümör• Yüksek dereceli nöroendokrin tümör Küçük hücreli nöroendokrin karsinom Büyük hücreli nöroendokrin karsinom
Mikst hücreli adenokarsinom
Andiferansiye karsinom
Dediferansiye karsinom

Tablo 8. Histolojik alt tiplerin görülme oranları

Histolojik tip	Görülme oranı (%)
Endometrioid	77
Müsinöz	1
Seröz	7
Berrak hücreli	2
Mikst hücreli	8
Karsinosarkom	3

(Histolojik alt tiplerin görülme oranları Tablo 8'deki gibidir)(114, 115)

Endometrioid Adenokarsinom

Vakaların %75 - 80'ini oluşturan en yaygın endometrial kanser tipidir ve farklı derecelerde differansiyasyon gösteren endometrial glandlardan meydana gelir (81, 114). Endometrioid adenokarsinomlar histolojik olarak Uluslararası Jinekoloji ve Obstetri Federasyonu tarafından (International Federation of Gynecology and Obstetrics-FIGO) yapısal ve nükleer grade olarak değerlendirilir.

a. Yapısal grade

Seröz papiller adenokarsinom ve berrak hücreli karsinom yüksek grade, skuamöz adenokarsinom ise glandüler komponentin nükleer 'grade'ine göre derecelendirilir (116).

Tablo 9. Yapısal grade

Grade	Özelliği
Grade 1(İyi diferansiye)	% 5'in altında solid patern varlığı
Grade 2 (Orta diferansiye)	% 5-50 arasında solid patern varlığı
Grade 3 (Kötü ya da andiferansiye)	% 50'den fazla solid patern varlığı

b.Nükleer grade

Grade 1: Nükleus oval/yuvarlak şekildedir, kromatin dağılımı düzgün ve nükleolus belirgin değildir.

Grade 2: Düzensiz oval nükleus, kromatin kümelenmesi ve orta büyüklükte nükleolus vardır.

Grade 3: İri, pleomorfik nükleus, kaba kromatin ve iri düzensiz nükleolus belirgindir (117).

Müsinöz Karsinom

Tipik olarak iyi prognozlu, %50 den fazlasını müsinöz hücrelerin oluşturduğu, geri kalanının endometrioid morfoloji gösterdiği, düşük dereceli tümörlerdir (114). KRAS mutasyonlarına sık rastlanır (118).

Seröz Karsinom

İkinci en yaygın tip olmasına rağmen vakaların %10 luk kısmını oluşturan, tanı anında sıklıkla ekstrauterin yayılımı olan, kötü prognozlu endometrial karsinom tipidir (114, 119). Psammoma cisimcikleri bulunabilir. Genellikle myometriumu diffüz invaze ederler ve geniş lenfovasküler alan invazyonu ve peritoneal yayılım gösterebilirler (120). Seröz karsinomda genellikle p53 proteini güçlü bir şekilde pozitifdir (54) ayrıca yüksek seviyede anöploidi, insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) amplifikasyonu ve p16 değişiklikleri gösterir (77).

Berrak Hücreli Karsinom

Nadir görülen bir alt tiptir (<%5). Genellikle yüksek derecelidir ve tanı anında ileri evredir. Bol miktarda berrak sitoplazmaya sahip hücrelerden oluşan papiller, glandüler, tubulokistik ve diffüz tipleri vardır. Anormal çekirdekleri, kabara çivisi (hobnail), papillaların stroması karakteristik hyalinize camsı bir görünüme sahip olabilir (122). Mutasyon analizinde, POLE (Polimeraz-epsilon geni), PTEN ve CTNNB1'de bir değişiklik olmadığı ve nadiren p53 mutasyonu olduğu gösterilmiştir (123).

Mikst Hücreli Adenokarsinom

Tip 1 (endometrioid) ve tip 2 (non-endometrioid) endometrial adenokarsinomların birlikte olması ile oluşur. Prognozu bileşene katılanlardan en agresif olanın tipi ve oranına bağlıdır (124,125).

Nadir Histolojik Alt Tipler

Nadir olarak uterusunda nöroendokrin karsinomlar (düşük dereceli ve yüksek dereceli) ve undiferansiye endometrial karsinomlar ortaya çıkabilir.

Dediferansiye karsinom, yapısal paterni olmayan malign hücre tabakalarından oluşan, FIGO ya göre grade 1 veya 2 endometrioid adenokarsinomdan meydana gelen, genellikle Lynch sendromu ile ilişkilendirilen alt tiptir (124, 126).

Uterin karsinosarkomlar başlangıçta sarkom olarak sınıflandırılan son çalışmalarla artık metaplastik karsinom olarak kabul edilen, hem malign epitel bileşeni hem de malign stromal bileşeni olan nadir görülen endometrial karsinomlardır (<5%) (127).

8. Endometrial Kanserde Prognostik Faktörler

Endometrial kanserli hastaların çoğunda endometrioid histoloji olduğu için prognoz iyidir. Tanı anında erken evredir. Endometrial kanser prognozunda en önemli faktörler evre ve histolojidir. Bunun yanı sıra prognozu etkileyen başka faktörler vardır. Prognostik faktörler Tablo 10' da belirtilmiştir (128, 129, 130).

Tablo 10. Endometrial kanserde prognostik faktörler

Cerrahi evreleme
Histolojik tip
Histolojik grade
Yaş
İrk
Tümör büyüklüğü
Myometrial invazyon derinliği
Lenfovasküler alan invazyonu
Peritoneal sitoloji pozitifliği
Moleküler değişiklikler
DNA kromozom sayısı
Hormon reseptör yapısı
Tedavi şekli (cerrahi, radyoterapi)

Cerrahi Evreleme

En önemli prognostik faktördür, evrelere ve histolojik tipe göre 5 yıllık sağ kalım oranları Tablo 11'deki gibidir (128).

Tablo 11. Evre ve histolojik tipe göre 5 yıllık sağ kalım oranları

Histoloji	Evre 1 (%)	Evre 2 (%)	Evre 3 (%)	Evre 4 (%)
Endometrioid	% 90.1	%79.5	%67.7	%25.8
Seröz	%79.7	%40.7	%37.7	-
Berrak hücreli	%85.1	%63.4	%48.5	-

Evre 1 de tümörün myometriuma invazyon derinliği önemli bir prognostik faktördür. Evre 2 (servikal tutulumu olan kadınlar) için prognoz Evre 1 hastalıktan daha kötüdür çünkü ekstrauterin hastalık yayılımı veya lokal nüks riski için bir belirteçdir. Evre 3A hastalık, adneksiyal veya serozal tutulumu olan hastalar olarak kategorize edilir.

Evre 4 veya uzak metastazı (intraperitoneal, akciğer, karaciğer) olanlar kötü prognaza sahiptir ve 5 yıllık sağ kalım oranı %20'den azdır (130).

Histolojik Tip ve Grade

Histolojik farklılaşma derecesi (grade), prognoz için önemli bir göstergedir. WHO'a göre, Grade 1 (G1) ve Grade 2 (G2) endometrioid karsinomlar, tip 1 endometrial kansere dahildir. Grade 3 (G3) endometrioid adenokarsinom, uterin papiller seröz karsinom, berrak hücreli karsinom ve östrojene bağımlı olmayan yüksek dereceli histolojiye sahip tipler, tip 2 endometrial kansere dahildir (14, 131) Çalışmalar, endometrioid tip adenokarsinomda 5 yıllık sağkalım oranını %74, seröz papiller adenokarsinomda %42, şeffaf hücreli adenokarsinomda ise %27 olarak göstermiştir. 5 yıllık sağ kalım oranları ise G1'de %92, G2'de %86, G3'te %64 açıklanmıştır (14, 131, 132).

Yaş

Genç hastalarda tip 1, endometrioid histolojide, düşük grade, endometrial invazyon derinliği az olan kanser görülmesinden dolayı yaşlı hastalara göre prognoz daha iyidir (129).

İrk

Siyahi kadınlarda Kafkas ırkına göre daha kötü prognoz gösterir. Bu sıklıkla kötü prognozlu G3 ve non-endometrioid tümör insidansı nın siyah ırkta yüksek olmasına bağlanmıştır (133).

Tümör Büyüklüğü

Evre 1'de, 2 cm'den küçük çaptaki tümörlerde lenf nodu metastazı riski %4,2 cm'den büyük tümörlerde %15, bütün kaviteyi kaplayan tümörlerde ise %35'dir. Bu vakalarda 5 yıllık yaşam süresi sırasıyla %98, %84 ve %64'tür (134).

Myometrial İnvazyon (MI) Derinliği

İnvazyon derinliğinin artmasıyla lenfatik sistem invazyon riski de artar. Aynı zamanda derin invazyon rekürrens ihtimalini arttırır, genel sağ kalma oranını da olumsuz etkiler(129).

Lenfovasküler Alan İnvazyonu

Lenfatik kanallar ve kan damarlarındaki tümöral emboli olarak tariflenir ve nodal metastazlarla yüksek ilişkisi nedeniyle nükslerin ve kötü sonuçların bağımsız bir belirteci olarak gösterilmiştir (135,136).

Pozitif Periton Sitolojisi

Ektrauterin hastalık durumunda, G3 tümör, derin MI, adneksiyal metastaz, pelvik ve paraaortik lenf nodu tutulumu ile pozitif peritoneal sitoloji arasında doğru orantılı ilişki vardır.

Moleküler Değişiklikler

Tip I endometrial kanserler; PTEN delesyonları veya mutasyonları, PIK3CA, mikrosatelit instabilitesi, KRAS protoonkogen mutasyonlarını, β -katenindeki fonkiyon mutasyonların, FGFR2 mutasyonlarını, özellikle MSH-6 başta olmak üzere DNA mismatch repair genlerindeki mutasyonları içerir (12, 18, 19, 20, 68).

Tip II endometrial kanserler; tümör protein p53 mutasyonları, FBXW7, AT-zengin etkileşim alanı 1A (ARID1A) mutasyonları ve ERBB2 amplifikasyonları ile karakterizedir (4, 20).

9. Endometrial Kanserde Evreleme

Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Federasyonu (FIGO) endometrial kanserin sınıflandırılmasını 2009 yılında tekrar yaptı (138).

Tablo 12. Endometrium kanserinde FIGO evrelemesi

FIGO EVRELEME	
EVRE 1 ^a	Tümör corpus uteride sınırlı
1A ^a	Myometrial invazyon yok ya da ½ den az
1B ^a	Myometrial invazyon ½ ye eşit ya dadaha fazla
EVRE 2 ^a	Tümör servikal stromayı invaze etmiş ancak uterusu aşmamış ^b
EVRE 3 ^a	Lokal ve/veya rejyonel yayılım
3A ^a	Tümör serozayı ve/veya adneksi invaze etmiş ^c
3B ^a	Vajinal ve/veya parametrial tutulum ^c
3C ^a	Pelvik ve/veya paraaortik lenf nodu metastazı ^c
3C1 ^a	Pozitif pelvik lenf nodu
3C2 ^a	Pozitif para-aortik lenf nodu (pelvik lenf nodu tutulumu ile birlikte veya olmaksızın)
EVRE 4 ^a	Mesane ve/veya barsak mukoza invazyonu ve/veya uzak metastaz
4A ^a	Mesane ve/veya barsak mukoza invazyonu
4B ^a	Uzak metastaz (intra-abdominal ve/veya inguinal lenf nodu metastazı)

^a Grade 1, grade 2 ve grade 3 ün herbiri için geçerli.

^b Endoservikal glandüler tutulum sadece Evre 1 olarak düşünülmeli

^c Pozitif sitoloji evreyi değiştirmez, evreden bağımsız olarak ayrıca raporlanmalıdır

10. Endometrial Kanserde Tedavi

Total abdominal histerektomi, bilateral salpingo-ooferektomi ve pelvik, paraaortik lenf nodu diseksiyonu standart cerrahi tedavi prosedürüdür. Cerrahi tedavinin laparatomik, laparoskopik ve robotik şekilde yapılması üzerine çalışmalar vardır çünkü laparoskopik müdahaleler, önemli cerrahi komplikasyonların azalmasına, daha kısa hastanede kalış süresine, daha az ağrı ve daha hızlı iyileşmeye yardımcı olur (140).

Endometrium kanserinde erken evre, metastatik olmayan rezektabl tümörlerde cerrahi uygulanmaktadır. Nihai tedavi patolojik tanıyla kesinleşen histolojik alt tipe göreler. Orta riskli endometrial kanser hastalarında ameliyat sonrası RT ve KT uygulanmaktadır. Yüksek riskli endometrial kanser hastalarında ameliyat sonrası KT mutlaka uygulanmaktadır. Neoadjuvan kemoterapi, ileri evre hastalık ve nükseden hastalıkta kullanılır. Evre 4 endometrial kanser hastaları için en etkili neoadjuvan kemoterapötik ajanların optimal kombinasyonlarını araştırılmış şimdiye kadar doksorubisin, sisplatin-paklitaksel ve karboplatin-paklitaksel kombinasyonlarının etkili olduğu gösterilmiştir. İlk kombinasyon daha toksik bulunmuş ve tedaviye bağlı ölümlerle sonuçlanmıştır (141, 142, 143).

11. Apoptoz ve Kanser Tedavisindeki Yeri

Organizmadaki yeni hücreler sentezlenirken var olan hücrelerin bir kısmı ölmekte ve bu sayede homeostazi sağlanmaktadır. Gelişmiş organizmalarda ihtiyaç duyulmayan ve işlevi bozulan hücrelerin, programlı ölümüne apoptoz denir. Apoptoz, organizmanın bazı dokularında ve hücrelerinde sürekli olarak oluşmaktadır ve bu oluşum ömür boyu devam eder. Bu şekilde ölüm ve yapım ile dokulardaki denge korunur. Bu dengenin bozulması bazı hastalıkların ortaya çıkmasına neden olur. Apoptozun olması gerekenden fazla meydana gelip hızlanması, nörodejeneratif hastalıklar, arteriosklerozis gibi hastalıklara, yavaşlaması veya gerçekleşmemesi kanser ve bazı otoimmün hastalıklara neden olur (143, 144).

Apoptoz aynı zamanda zararlı etkenler veya hastalıklar ile hasar görmüş hücrelerin ortadan kaldırılmasında ve immün sistem reaksiyonları sırasında savunma

mekanizması olarak kullanılabilir. Fizyolojik, patolojik birçok uyarı durumu apoptoza zemin hazırlayabilir. Hücrelerin bazıları ilaçlar veya radyasyon gibi DNA hasarı yapan ajanlarla p53 bağımlı yolak üzerinde, bazı hücreler ise Fas ve TNF reseptörleri ile apoptotik hücre ölümüne yönlendirilirler. Ayrıca hormonlar ve büyüme faktörleri gibi sağ kalma faktörleri tarafından bloke edilmiş hücre ölüm yolları da vardır.

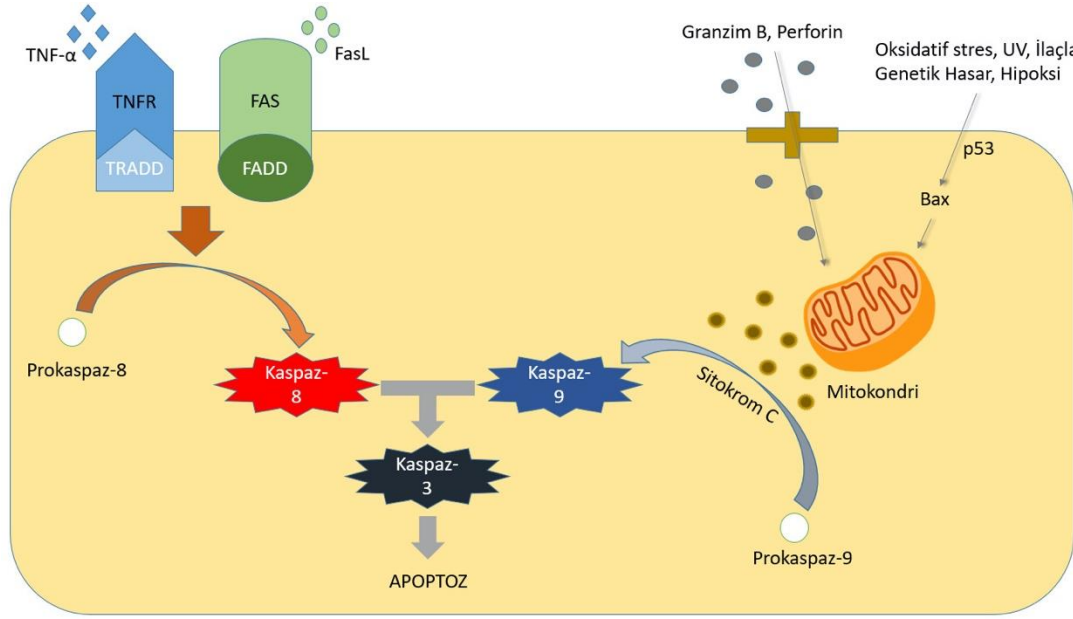
Apoptozda, bir dizi enzime bağlı biyokimyasal süreçle birlikte hücrenin yapısında da karakteristik morfolojik değişiklikler meydana gelir ve çevredeki dokulara minimum hasarla vücuttan işlevsiz veya zararlı hücreler temizlenir. Apoptozun nekroz gibi diğer hücre ölüm tiplerinden ayrılması gerekmektedir.

Nekroz, hücrenin kontrolsüz ölümüdür ve konağın immün sistemi uyarılır. Nekroz şiddetli bir saldırıyı takiben meydana gelir, hücrenin membran bütünlüğü ve mitokondri gibi intraselüler organellerin yapısı bozulur ve bütün hücre içeriği ekstraselüler sıvıya dağılır.

Apoptozda sitoplazma, organeller, nükleus ve plazma membranında planlı değişiklikler oluşur. Bunlar; mitokondriyal hasar, DNA fragmentasyonu, kromatin kondensasyonu, çekirdek zarının parçalanması ve apoptotik cisimlerin oluşmasıdır. Mitokondri zarında apoptoza bağlı porlar oluşmasına rağmen diğer organeller yapısal bütünlüğünü korur. Daha yuvarlak görüntüsüyle hücre komşu hücrelerden ayrılır. Sonrasında hücre içeriği membran tarafından sarılmış halde apoptotik cisimcikler halinde parçalara ayrılır ve komşu hücrelerce fagositoza uğrar (145, 146, 147, 148).

Apoptozda, kaspazlar adı verilen sistein proteaz ailesine ait bir grup enzimin aktive olması özelliği bir özelliktir. Aktive edilmiş kaspazlar, birçok hayati hücresel proteini, çekirdeği ve hücre iskeletini parçalayıp DNAazı aktive ederler (146).

Başlatıcı ve uygulayıcı oldukları için kaspazlar apoptoz mekanizmasının merkezidir. Kaspazların etkinleştirilebildiği üç yol vardır. Daha çok açıklanan apoptozun intrinsik (mitokondriyal) ve ekstrinsik (ölüm reseptörü) başlangıç yolları ve ortak yoldur. Daha az bilinen üçüncü yol ise endoplazmik retikulum aracılı oksidatif stres yolağı gibi programlı hücre ölümünü aktive eden yoldur (149).



Şekil 2. Apoptozun ekstrinsik ve intrinsik yolları.

Ekstrinsik yolak, ligandların hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerine bağlanması üzerine bu reseptörlerde meydana gelen konformasyon değişiklikleri ile başlar. En iyi bilinen ölüm reseptörleri tip 1 TNF reseptörü (TNFR1) ve Fas (CD95) denilen ilgili bir proteindir. Bunların ligandları ise sırasıyla TNF ve Fas ligandı(FasL)'dır. Reseptörler; TNF reseptörü ile ilişkili ölüm alanı (TRADD) ve Fas ile ilişkili ölüm alanı (FADD) gibi adaptör proteinleri ve kaspaz 8 gibi sistein proteazlarını içeren hücre içi ölüm alanına sahiptir. Ölüm ligandının ölüm reseptörüne bağlanması, adaptör protein için bağlanma bölgesinin oluşumuna neden olur. Tüm ligand-reseptör-adaptör protein kompleksi, ölüm indükleyici sinyal kompleksi (DISC) olarak bilinir. DISC daha sonra pro-kaspaz 8'in aktivasyonunu başlatır. Aktive edilmiş kaspaz 8, başlatıcı kaspazdır ve diğer kaspazları parçalayarak apoptozu başlatır (146). Onarılamayan genetik hasar, büyüme faktörlerinin eksikliği, kortikosteroidler, radyasyon veya sitolojik ilaçlar nedeniyle DNA hasarı, hipoksi, aşırı artan hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonlar ve şiddetli oksidatif stres gibi iç uyaranlar intrinsik mitokondriyal yolağın başlamasını tetikleyen bazı nedenlerdir. Uyarandan bağımsız olarak artan mitokondriyal geçirgenlik sonucu sitokrom C gibi proapoptotik moleküller sitoplazmaya salınır. Sitoplazmik sitokrom c salınımı, sitokrom c, Apaf-1 ve kaspaz 9'dan oluşan apoptozom olarak bilinen bir kompleks oluşumu yoluyla kaspaz 3'ü aktive eder. Sitokrom c'nin sitozole çıkması Bcl-2 protein ailesi tarafından

kontrol edilir. Bcl-2 proteinlerinin iki ana grubu vardır. Pro-apoptotik olanlar; Bax, Bad, Bak, Bid, Bcl-Xs, ve anti-apoptotik olanlar; Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Mcl-1'dir. Pro-apoptotik olanlar sitokrom c'nin salınımını indükleyerek anti-apoptotikler ise sitokrom c'nin salınımını baskılayarak etki apoptoz üzerinde etki gösterir. Apoptozun başlayıp başlamayacağını belirleyen miktar değil iki grup arasındaki dengedir (148, 149, 150).

Bid, Bak ve Bax gibi pro-apoptotik üyeler normal şartlarda hücrede sessiz halde bulunurlar. Bu üyelerin aktive edilmeleri ile sitokrom c'nin sitoplazmaya geçmesi sağlanır. Kaspaz 8 aktivasyonu, Bid'in kırılmasına ve aktifleşmesine neden olur ve sitokrom c salınımını gerçekleştirir (146).

Apoptoz ile hasarlı hücreler ortadan kaldırılarak bir sonraki nesle aktarım ve kansere neden olabilecek olası genetik mutasyonların da sayısı azaltılır. Anti kanserojen ilaçların hücreyi apoptoza yönelttiği tespit edilmiş ve son yıllarda apoptozu indükleyen ajanlar üzerinde çalışmalar çok artmıştır.

12.Everolimus

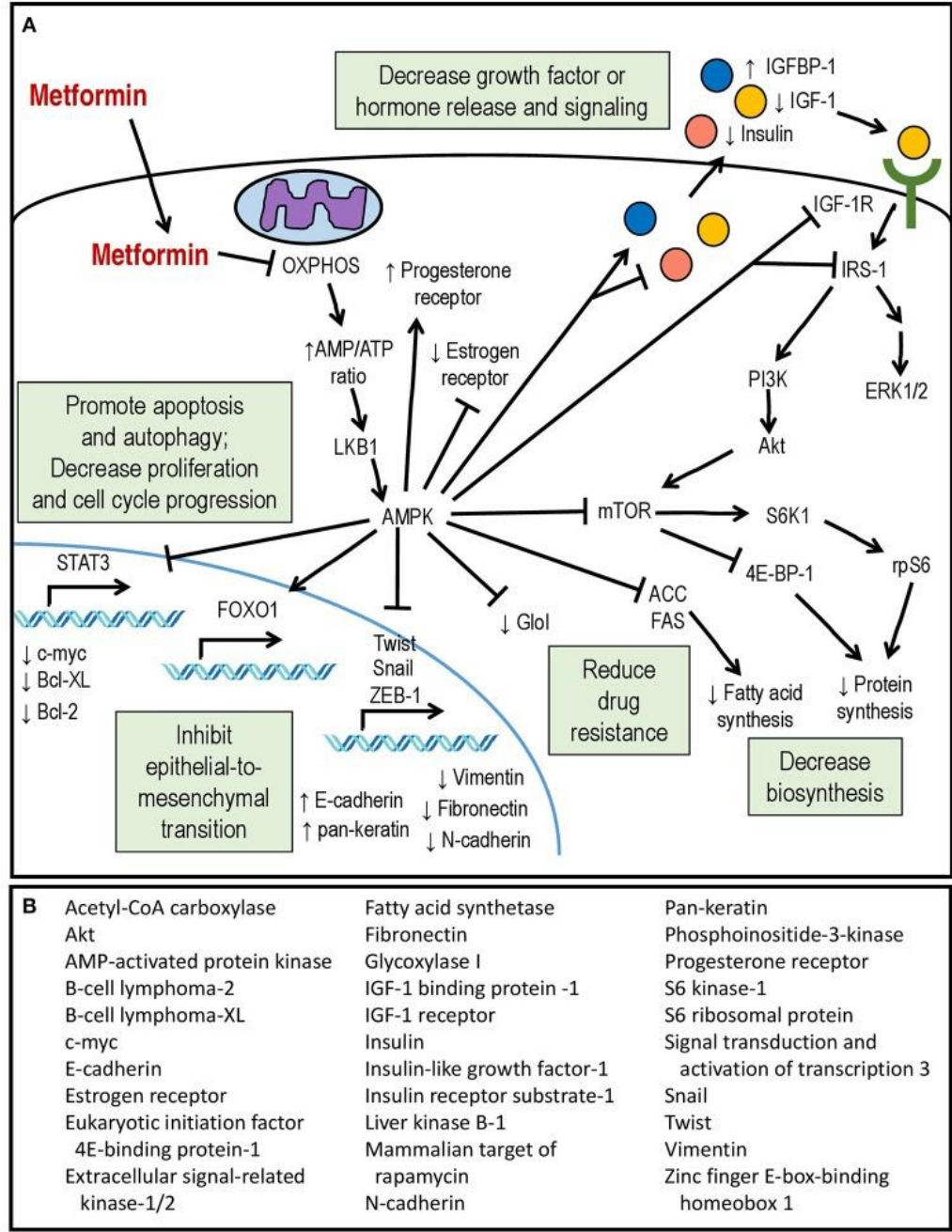
Hücre sel büyüme ve hayatta kalma sürecinde önemli rol oynayan bir sinyal yolu olan PI3K / AKT / mTOR yolunun aşırı aktivasyonu, son zamanlarda endometriyal kanser patogeneğinde önemlidir. PI3K / AKT / mTOR yolunun inhibisyonu terapötik olarak ilgi çekmektedir. Klinik öncesi ve klinik çalışmalar, farklı PI3K / AKT / mTOR yolu inhibitörlerinin antitümör etkilerinin aydınlatılmasında ve bu inhibitörlerin hangi hasta popülasyonlarında en etkili olabileceğini belirlemede yararlıdır. PI3K / AKT / mTOR yolağı, geleneksel tedavilere direnç kazandırmakla ilişkilendirilmiştir ve bu nedenle PI3K / AKT / mTOR yolağı inhibitörleri hormonal ve / veya sitotoksik ajanlarla kombinasyon halinde değerlendirilmektedir (151, 152, 153, 154)

Everolimus, şu anda çeşitli ülkelerde tedaviye dirençli renal hücreli karsinom ilerleyici, geri dönüşümsüz, ilerlemiş pankreas nöroendokrin tümörleri, renal anjiyomiyolipom ve tübüler skleroz kompleksi ile ilişkili subependimal dev hücreli astrositomalar için onaylanmış bir mTOR inhibitörüdür. Klinik öncesi veriler, mTOR inhibisyonunun, gelişmiş endometrial kanserde fayda sağlayabileceğini göstermektedir (155, 156, 157).

13. Metformin

Obezite, diyabet, hiperinsülinemi ve endometrial kanser arasındaki ilişki, Metformin gibi glukoz metabolizmasını hedef alan ilaçların, bu tür malignitelerin önlenmesinde veya tedavisinde etkili olabileceği hipotezine yol açmıştır. Bu alanda dikkat çeken bir ilaç, tip 2 diyabet tedavisinde kullanılan birinci basamak oral antihiperglisemik ajan olan Metformin [1,1-dimetilbiguanid] olmuştur. Genel olarak etkileri, kan şekeri konsantrasyonlarının düşürülmesini, insülin duyarlılığının artırılmasını ve plazma açlık insülin seviyelerinin azaltılmasını içerir. Ayrıca, bazı oral hipoglisemik ilaçların ve insülinin aksine, Metformin kullanıcıları sürekli kilo kaybına doğru bir eğilim göstermektedir. Metforminin düşük toksisitesi, onu potansiyel bir yardımcı tedavi veya hatta kemoterapiye kontrendikasyonları olan veya doğurganlığı koruma isteği gibi düşünceler için monoterapi olarak ilginç kılmaktadır (158, 159).

Birçok grup, Metforminin, oksidatif fosforilasyonu (OXPHOS) mitokondriyal seviyede inhibe etme kabiliyetinin biyolojik aktivitesinin önemli bir aracı olduğunu göstermiştir. Sonuçta, iç mitokondriyal zar boyunca proton gradyanında bir azalma meydana gelir, sonuçta proton güdümlü adenosin trifosfat (ATP) sentezinde azalma ve ATP'ye hücrel adenosin monofosfatın (AMP) oranının artmasına neden olur. ATP'deki düşüş, Metformin tedavisinin anahtar etkisidir. 5'AMP ile aktive olan protein kinaz (AMPK) enzimi hücrel enerji homeostazında, büyük ölçüde glikoz ve yağ asidi alımını sağlayan, hücrel enerji düşük olduğunda ise oksidasyonun aktifleşmesinde rol alan bir enzimdir. AMPK'nin aktivasyonu, AMPK aracılı fosforilasyon ve ATP tüketen sentetik yollarda (örneğin, glikoz, lipid ve protein) yer alan anahtar enzimlerin ve transkripsiyon faktörlerinin inhibisyonu yoluyla hücreleri katabolik duruma geçirir (158, 159). Ayrıca AMPK aktivasyonunun bilinen aşağı akım etkileri arasında, mTOR yolağının inhibisyonuna bağlı olarak protein sentezinin azalması da vardır (160, 161). Metformin ile tedavi edilen endometriyal kanser hücrelerinde PI3K/Akt sinyalinin inhibisyonu da gözlenmiştir (162).



Şekil 3. Endometrial kanser hücresi içinde Metforminin etki mekanizmaları (158) PI3K/AKT/MTOR ve AMPK yollarının şematik gösterimi

14.Lityum Klorür (LiCl)

Lityum klorür (LiCl), psikotik hastalıklarda özellikle bipolar bozuklukta 19. yüzyıldan beri kullanılan güvenlik aralığı iyi bilinen bir ajandır. LiCl ile yapılan önceki

çalışmalar kolorektal kanser, mide kanseri ve nöroblastomunda içinde yer aldığı çeşitli kanserlerde antineoplastik etkilere sahip olduğunu göstermiştir (12, 163, 164).

LiCl'nin özellikle glikojen sentaz kinaz 3-beta inhibisyonuna bağlı antineoplastik etkisi olduğu gösterilmiştir (165).

15. Midkine

Midkine (MDK), kanserojenezde antiapoptotik ve anjiyojenik bir faktör olarak merkezi bir rol oynayan heparin bağlayıcı bir büyüme faktörüdür. Çeşitli insan tümörlerinde yüksek MDK ekspresyonu ve MDK inhibisyonundan sonra kazanılan başarı, spesifik tedaviler için umut verici bir hedef haline getirmektedir (12, 166). Nöroblastom, astrositom ve malign periferik sinir kılıfı tümörlerinin tümörgenezinde rol oynadığı kanıtlanmış ve kolon, akciğer, pankreas, mide, özofagus tümörleri, hepatosellüler karsinom ve endometriyal karsinom gibi tümörlerde yüksek bir MDK ekspresyonu tespit edilmiştir (12, 166). Normal endometrial hücrelerin 17-beta östradiol ile tedavisinin MDK düzeylerini arttırdığı gösterilmiştir.

MATERYAL VE METOT

ÇALIŞMALARDA KULLANILAN KİMYASALLAR VE SARF MALZEMELER

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Biological Industries), RPMI(Roskuyucuklu Park Memorail Institute) (Biological Industries), Fetal Bovin Serum (Gibco), Penicillin-streptomisin (Wisent Bioproducts), Phosphate buffered saline (PBS)(Hyclone), Trypsin-EDTA (Wisent Bioproducts), Trizol (Ambion), İsoopropanol (Sigma) , Etanol (Riedel), Metanol (Merck) , Primerler (Sentebiolab), Noble Agar (Biomatik), Kristal Viyole (BioShop), Dimetil sülfoksit (DMSO) (Roche), DNAaz/RNase free su (Invitrogen), Steril kültür kapları (Petri), 6, 24, 96 kuyucuklu hücre kültür kabı (Corning), 96- Kuyucuklu PCR Array Plak (Thermo), T25 flask ve T75 Flask (Cellstar), Falcon Tüpü (Cellstar), RIPA (Milipor), Metformin (AkScientific,%95), Lithium Chloride (Bio Basic,%99), Everolimus (Sigma,%95)

Çalışmada kullanılan diğer tüm kimyasal maddeler analitik derecede ve yüksek saflıkta olacak şekilde ticari kaynaklardan elde edilmiştir.

ÇALIŞMALARDA KULLANILAN CİHAZLAR

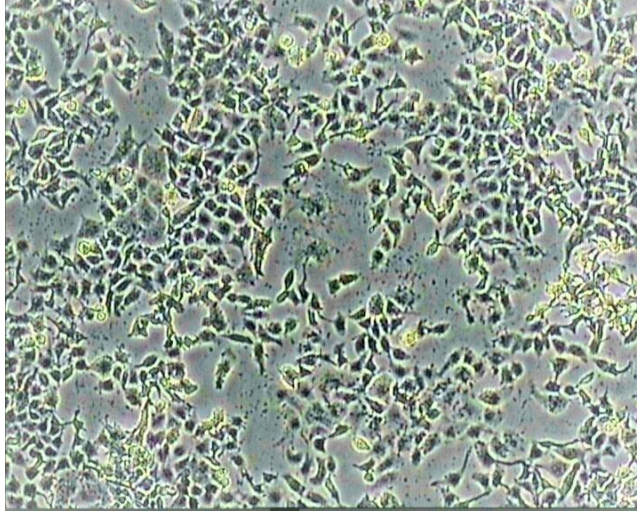
CO₂'li inkübatör (Nuair), Biological Safety Cabinets Class II Laminar Flow (Nuair), inverted Mikroskop (Olympus), Otomatik mikropipetler (10, 20, 100, 200, 1000 µl'lik) (Biohit), Hassas Terazi (Denver Instrument), Nanodrop Spectrophotometer ND-1000 (Thermo), Santrifüj (Hettich Zentrifugen), Mikro Santrifüj (Hettich Zentrifugen), Soğutmalı Santrifüj (Hettich Zentrifugen), RT- PCR (Thermo Scientific PikoReal 96), -20 Derin Dondurucu (BEKO), No Frost Buzdolabı (BEKO), Otoklav (Nuve), Vorteks (IKA Yellow Line), Güç Kaynağı(Bio-Rad), Mikrodalga Fırın (BEKO MD1500), -80°C Dondurucu (Nuair), Flow Cytometry (BD FACS Callibur)

ÇALIŞMALARDA KULLANILAN KİTLER

Cell Proliferation Kit (XTT) (Biological Industries), Matrigel Invasion Chamber(Corning) WizScript™ cDNA Synthesis Kit (High Capacity) with Rnase Inhibitor (wizbiosolutions), BrightGreen 2X qPCR MasterMix-ROX (abm), ELİSA KİT'leri (Bioassay Technology Laboratory), FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD)

ISHİKAWA HÜCRE HATTININ TEMİNİ VE HÜCRE KÜLTÜRÜ

Ishikawa hücreleri iyi diferansiye olmuş insan endometrial adenokarsinom hücreleridir. Çalışmamızda kullanılan hücreler kendi stoklarımızdan kullanılmış olup, deneyler Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı hücre kültürü laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4. Çalışmamızda kullandığımız Ishikawa hücrelerinin 4X inverted mikroskobik görüntüsü.

Ishikawa hücrelerinin rutin kültür basamakları; hücrelerin kültür ortamında çoğaltılması ve pasajlanması, ekim için sayılması ve kullanılacak kültür plakalarına ekilmesi, dondurulması ve çözülmesini kapsamaktadır.

In vitro koşullarda yapılan hücre kültürü için kullanılan besi ortamı, hücrelerin in vitro koşullarda yaşamaları, büyüme ve bölünmeleri için gereksinim duydukları maddeleri içerecek düzeyde olmalıdır. Çalışmamızda kullanılan besi ortamı %10 fetal bovin serum (FBS), %1 L-glutamin, penisilin (100 U/ml) + streptomisin (100 µg/ml) içeren RPMI 1640 besi yeridir. Hücrelerin proliferasyonu, pasajlanmaları ve takip işlemleri inverted mikroskop ile izlenmiştir. Hücreler kendileri için uygun kültür ortamı olan 37°C de %95 nem ve %5 CO₂'li etüvde inkübe edilmişler, % 80-90 sıklığa eriştiklerinde çalışmalar yapılmıştır.

Hücreler çoğaltılma ve pasajlanma işleminde; RPMI 1640 besi yeri ile T75 flaska ekilmiş ve 37°C de %95 nem ve %5 CO₂'li etüvde iki günde bir besi ortamları tazelenerek inkübe edilmiştir. Monolayer olup tutunarak üreyen hücrelerin pasajlanması için ilk olarak yapıştıkları yüzeyden ayrılmaları gerekir. Flasklar öncelikle PBS ile yıkanıp ölü hücrelerden ve hücre atıklarından iyice arındırılıp aspire edilmiş sonrasında tripsin ilave edilerek hücrelerin flask yüzeyinden kalkması sağlanmıştır. Flask içerisindeki hücre-ortam karışımı 15 ml'lik falkonlara aktarılıp 1500g'de 4 dakika santrifüj edilip süpernatant uzaklaştırılmıştır. Çöken hücreler besi yerinde homojenize edilerek uygun oranda flasklara ekimi gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin yeniden flaska yapışıp çoğalmalarının sağlanması için inkübasyona bırakılmıştır. Hücrelerin sayılması için tripan mavisi boyası kullanılmıştır. Tripan Mavisi sadece ölü hücrelerin membranlarından geçebildiği için ölü hücreler mavi (boya almış) ve canlı hücreler boya almamış olarak görülür. Hücreleri flask yüzeyinden kaldırmak için, tripsinizasyon işlemi ile hücreler kaldırılıp santrifüj edildikten sonra üzerine besi yeri eklenmiştir. Ependorfta, 10 µl hücre süspansiyonunun içine 10 µl tripan mavisi eklenerek hücreler 2 kat dilüe edilmiştir. Bu karışımdan 10 µl alınarak Neubauer lamına eklenmiştir. Böylece canlı hücre sayımı gerçekleştirilmiş ve bu aşama hücre ekimi yapılacak her bir deney testi için ayrı ayrı yapılmış, çalışmaya göre çeşitli sayılarda ekim gerçekleştirilmiştir.

Hücrelerin dondurularak saklanması, kriyotüpler içerisinde DMSO kullanılarak yapılmıştır. Hücrelerin dondurulması, tripsinizasyon ve santrifüj basamakları

yapıldıktan sonra, 1,5 ml hacimli kriyotüplere, 9:1 oranında besiyeri ile süspansiyon hücre ve DMSO (%10 DMSO) konularak gerçekleştirilmiştir. Kriyotüplere konulan hücreler daha sonraki çalışmalar için -80 derecede muhafaza edilmiştir.

Dondurulmuş hücrelerin yeniden çözülüp ekilmesinde, kriyotüpteki hücreler hızlı bir şekilde 37°C de su banyosunda çözülüp biraz taze besi yeri eklenerek önce falkona alınıp santrifüj edilmiş, DMSO içeren besi yeri uzaklaştırılmıştır. Ardından yeni besi yeri eklenip, kültür kaplarına ekilip, uygun kültür ortamında inkübe edilmiştir.

XTT TESTİ (HÜCRE CANLILIĞI TESTİ)

Everolimus, Lityum ve Metforminin değişen dozlarda Ishikawa hücrelerine uygulanıp zamana ve doza bağımlı olarak hücre canlılığının tespiti ve hücrelerin yüzde ellisinin (%50) yaşadığı dozu (IC50) saptamak için XTT hücre proliferasyon testi kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan Metformin (AkScientific) %95 saflıkta, Lithium Chloride (Bio Basic) %99 saflıkta, Everolimus (Sigma) %95 saflıkta temin edilmiştir.

Bu testte suda eriyebilen bir madde olan XTT (2,3-bis (2-methoxy-4 nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide)'nin canlı hücrelerde turuncu renkli formazon bileşenlerine indirgenmesi prensibi kullanılmaktadır. Boyanın yoğunluğu bir spektrometre okutulmakta ve metabolik olarak aktif hücrelerin sayısı ile orantılı olan formazon oluşumu sayesinde hücre canlılığı testi sonuçları hızlı bir şekilde değerlendirilebilmektedir.

Kullandığımız maddelerin sitotoksitesisi ve doz ile zamana bağlı etkisi “BI (Biological Industries) Cell Proliferation Kit XTT based Colourimetric Assay (REF: 20-300-1000, LOT: 2002010)” ile yapılmıştır. Toz halinde bulunan maddeler çeşitli dozlarda %10 serumlu tam besi ortamında binde bir oranında DMSO içinde çözülmüş ve konsantrasyonları ayarlanarak etkileri araştırılmıştır. Seçilen konsantrasyon aralığı literatür bilgileri dikkate alınarak belirlenmiş test kit protokolüne göre gerçekleştirilmiştir.

Hücreler 96 kuyucuklu plak içine her kuyucukta 2.000 Ishikawa hücresi olacak şekilde 100 µl büyüme medyumunu olan RPMI içinde ekildi. Hücreler 37 °C’de %5 CO₂ içeren inkübatörde 24 saat bekletildi. 24 saatin sonunda medyum aspire edildi.

Ardından Metformin için; 0.1mM, 1mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, 50 mM, 100 mM, Lityum için; 50 µM, 100 µM, 200 µM, 400 µM, Everolimus için; 2nM, 10nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM, 200 nM, 300 nM çalışma konsantrasyonları %10 serumlu tam besi ortamı içinde hazırlandı. Hazırlanan dozlar 100 µl besi yeri ortamı içinde kontrol kuyucukları dışındaki kuyucuklara uygulandı. Aynı zamanda zamana bağlı etkiyi de araştırmak için 24, 48 ve 72 saatler için doz uygulanmıştır. 24 saat sonunda her kuyucuk için 100 µl besi yeri, 50 µl XTT reagent solution A, 1 µl XTT activator solution (aktivatör) karışımı hazırlanıp kuyucuk başına 150 µl ilave edilmiştir (Kit kullanımına göre). Ardından hücreler 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde 4 saat inkübe edilip çalışılan grupların absorbans değerleri ELİSA cihazında 450 nm dalga boyunda ve 630 nm referans aralığında okunmuştur. Hücre canlılığı yüzdesi her bir kuyucukta ölçülen optik dansite değerinin kontrol optik dansite değerine bölünmesi ve yüz ile çarpılması ile hesaplanarak IC₅₀ oranı belirlenmiştir.

Hücre canlılığı (%) = (Madde uygulanan grubun absorbans değeri /Kontrol grubunun absorbans değeri) x100

24, 48 ve 72 saat değerlerine göre çıkan sonuçlar Graph pad prism 8.01 programı kullanılarak IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır.

Ardından elde edilen IC₅₀ dozları üzerinden kombine dozlar için XTT deneyleri 24, 48, 72 saat için 3 tane 96 kuyucuklu plakaya kuyucuk başına 5 bin hücre ekilerek uygulanmıştır. Kombine dozlar aşağıdaki gibi seçilmiştir.

Eve IC₅₀ + Met IC₅₀

Eve IC₅₀ + Met 29,73 mM

Eve IC₅₀ + Lit IC₅₀

Eve IC₅₀ + Lit IC₅₀ + Met IC₅₀

TRİZOL REAGENT İLE TOTAL RNA İZOLASYONU

Gen düzeyinde ekspresyon değerlendirmesi yapabilmek amacıyla kontrol ve doz gruplarında RNA izolasyonu yapıldı.

1. Her kuyucuk başına 3×10^6 hücre olacak şekilde 6'lık kuyucuklu plaklara hücre ekimi yapıldı. XTT ile tespit edilen IC_{50} dozları ve kontrol gruplarına madde uygulaması ve IC_{50} süresi kadar inkübe edildi. Dozlar aşağıdaki gibi seçildi.

1. Kontrol
2. Lityum $100 \mu\text{M}$ (IC_{50})
3. Eve $37,46 \text{ nM}$ (IC_{50})
4. Met $48,59 \text{ mM}$ (IC_{50})
5. Eve IC_{50} + Lit IC_{50}
6. Eve IC_{50} + Met IC_{50}
7. Eve + Lityum+ Met IC_{50}
8. Eve IC_{50} + Met $29,73 \text{ mM}$

2. Hücrelerin 6'lık kültür kaplarından bir plaka başına $500 \mu\text{l}$ olacak şekilde Trizol ilave edilip scraper kazıyıcı ile tamamen kaldırılıp, ependorf tüplere (1 ml 'lik) aktarıldı. Bu aşamada hücreler ependorf tüplerde -20°C de muhafaza edilebilir.

3. Her bir ependorf tüpe $200 \mu\text{l}$ kloroform eklenip ve iyice pipetlenip vortex yapıldıktan sonra tekrar oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildi.

4. Soğutmalı santrifüj ile $+4^\circ\text{C}$ ' de 15.000 rpm 'de 15 dk santrifüj edilip renksiz olan üst faz toplandı, ependorf tüplere alındı.

5. Toplanan üst fazın üzerine $250 \mu\text{l}$ izopropanol eklenip pipetlendi ve 10 dk oda sıcaklığında inkübasyonu yapıldı.

6. Soğutmalı santrifüjde $+4^\circ\text{C}$ 'de 15.000 rpm 'de 15 dk santrifüj edildi.

7. Peletin üzerine $500 \mu\text{l}$ moleküler biyolojik grade %70'lik ethanol eklendi. (%70'lik yapmak için moleküler grade steril water kullanıldı)

8. Soğutmalı santrifüjde $+4^\circ\text{C}$ 'de 15.000 rpm 'de 15 dk santrifüj yapıldı.

9. Süpernatant atılıp, pelet kısa bir süre hava ile kurutuldu.

10. Pelletin $40 \mu\text{l}$ RNase-DNase free water ile çözüldü.

İzole edilen RNA'nın konsantrasyonu ve saflığı Nanodrop cihazı (Thermo) yardımı ile tespit edildi. Nanodrop ile RNA örneklerinin ölçülmesinde öncelikle uygun konsantrasyonlarda (cihazın ölçebileceği RNA konsantrasyon aralığı $2-3000 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 'dir) RNA örnekleri olmalıdır. Ardından $1 \mu\text{l}$ RNase free water ile Nanodrop cihaz kaidesi üzerine bir damla bırakıldı ve bilgisayardaki program analizi (ND1000 V3.6.0) ile kör

alındı. Sonrasında RNA örneklerinden 1µl olacak şekilde pipetlenip 260,280 nm'de okuma yapıldı.

Elde edilen RNA lar ependorf içinde -20 veya -80 de saklanabilir. Nanodrop cihazında 260-280 dalga boyunda ve konsantrasyon için ng/µl olarak bakıldı.

cDNA SENTEZİ

İzole edilen RNA'lardan, cDNA sentezi için Wiz Script tm cDNA Synthesis Kit (high capacity) ile oligo d(T) primeri ve Revers Transkriptaz enzimi (RT) kullanılarak üretici firmanın protokolü doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

Kit içeriği:

- 1.WizScript™ RTase (200U/µl)
- 2.10X Reaction Buffer
- 3.RNase Inhibitor (40U/µl)
- 4.20X dNTP mix (2.5mM each)
- 5.Random hexamer (50pM)
6. RNase free water

Total RNA: 10ng-5µg

Poly(A)+ RNA:1ng-500ng

Protokol:

1. 2X RT master mix hazırlanışı: hacim toplamı 10 µl olmalı

Without RNase inh:		With RNase inh
10X Reaction Buffer---	→ 2 µl	2 µl
20X dNTP mix	1 µl	1 µl
Random hexamer.	2 µl	2 µl
WizScript™ RTase.	1 µl	1 µl
RNase Inhibitor.	-	0,5 µl
RNase free water.	4 µl	3,5 µl

(İşlemlerin hepsi buz üstünde yapılmalı)

2.10 µl 2X RT master mix den mikrosantrifüj tüpe alınır.

3.10 µl RNA semple eklenir. Pipetlenir.

4. Mini santrifüj ile baloncuklar elimine edilir.

5. Termal cycle a yerleştirilir. Termal cycle programı :

25 °C → 10 dk

37°C → 120 dk

85 °C → 5 dk

+4 °C de → bir süre kalabiliyor

Bitince ependorflar RT-PCR yapmak üzere -20°C’de muhafaza edilmiştir.

GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (REAL-TİME PCR, RT-PCR)

Gen ekspresyon ürününün kantitasyonu amacıyla kullanılan hassas moleküler bir metottür. Bu yöntem ile RNA örnekleri kalitatif ve kantitatif olarak kısa sürede analiz edilebilmekte, çok sayıda örnek çalışılabilmektedir. Gerçek zamanlı RT-PCR’da ürünlerin analizi reaksiyon esnasında yapılmaktadır. Bu yüzden elektroforez, PCR ürününün mor ötesi ışık altında görüntülenmesi gibi işlemlere gerek kalmamaktadır. Çalışmamızda 96 kuyucuklu mikropılaka okuyabilen RT-PCR sistemi kullanılmıştır. Everolimus, Lityum ve Metformin muamelesi sonrasında ilgili hücre dizini kullanılarak, hücre döngüsünde rol alan genlerin RNA düzeyindeki ekspresyonları belirlenmiştir. Hücre dizininden total RNA izolasyonu yapılmış ve takiben elde edilen RNA’ların miktar ve kalitesi tespit edilmiştir. Sonrasında, total RNA’lardan Wiz Script tm cDNA Synthesis Kit ile cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemle aynı anda ve kantitatif olarak RT-PCR (Thermo Scientific PikoReal 96) ile analiz yapılabilmektedir. Her panelde referans–housekeeping genler PCR kontrol grubunda yer alarak hedef genlerdeki rölatif değışikliğı analiz etme imkanımız olmaktadır. PCR sırasında elde edilen amplikonlar, doğrudan logaritmik artışa geçtikleri döngü sayısına göre değerlendirilmiştir. Önce konsantrasyonları bilinen GAPDH ve diğler housekeeping genlerin bir standart amplifikasyon eğrisi oluşturulmuş ardından çalışılan örnekteki geçiş noktasına göre cDNA’nın rölatif miktarı kantitasyon

software tarafından belirlenmiştir. Elde edilen veriler Cq olarak kaydedilmiştir. Analizi gerçekleştirilen apoptoz ile ilişkili genlerin ve referans gen olarak normalizasyonda kullanılan housekeeping genin (GAPDH) primer dizileri Tablo 13'te gösterilmiştir.

Tablo 13. RT-PCR'da analiz edilen genlerin primer listesi

Genler	Primer Dizisi
CASP3	F: GGAAGCGAATCAATGGACTCTGG R: GCATCGACATCTGTACCAGACC
CASP8	F: AGAAGAGGGTCATCCTGGGAGA R: TCAGGACTTCCTTCAAGGCTGC
CASP9	F: GTTTGAGGACCTTCGACCAGCT R: CAACGTACCAGGAGCCACTCTT
MAP1LC3A	F: GCTACAAGGGTGAGAAGCAGCT R: CTGGTTCACCAGCAGGAAGAAG
MTOR	F: GCTTGATTTGGTCCCAGGACAGT R: GTGCTGAGTTTGCTGTACCCATGT
BECLIN1	F: CTGGACACTCAGCTCAACGTCA R: CTCTAGTGCCAGCTCCTTTAGC
MİDKİNE	F: GCTACAATGCTCAGTGCCAGGA R: CTTGGCGTCTAGTCCTTTCCCT
AKT1	F: TTCTGCAGCTATGCGCAATGTG R: TGGCCAGCATACCATAGTGAGGTT
PIK3CA	F: GGTGTCTGTCAATCGGTGACTGT R: GAACTGCAGTGCACCTTTCAAGC
PIK3CB	F: TTGTCTGTCACTTCTGTAGTT R: AACAGTTCCCATTGGATTCAACA
BETA ACTİN	F: CACCATTGGCAATGAGCGGTTTC R: AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT
BAX	F: TCAGGATGCGTCCACCAAGAAG R: TGTGTCCACGGCGGCAATCATC
PTEN	F: TGAGTTCCCTCAGCCGTTACCT

	R: GAGGTTTCCTCTGGTCCTGGTA
FADD	F: GCTGGCTCGTCAGCTCAAA R: ACTGTTGCGTTCTCCTTCTCT
TRADD	F: GCTGTTTGAGTTGCATCCTAGC R: CCGCACTTCAGATTTTCGCA
HLADRB1	F: GAGCAAGATGCTGAGTGGAGTC R: CTGTTGGCTGAAGTCCAGAGTG
HLADRB5	F: GAACAGCCAGAAGGACTTCCTG R: GCAGGATACACAGTCACCTTAGG
FASL	F: GGTTCTGGTTGCCTTGGTAGGA R: CTGTGTGCATCTGGCTGGTAGA
TNF	F: CTCTTCTGCCTGCTGCACTTTG R: ATGGGCTACAGGCTTGTCACCTC
P53	F: ATCTACAAGCAGTCACAGCACAT R: GTGGTACAGTCAGAGCCAACC

Gerçek zamanlı RT-PCR ile kontrol grubu ve dozların uygulanmış olduğu gruplar arasındaki hücre döngüsünde rol alan genlerin ekspresyonlarının nasıl değiştiği custom olarak dizayn edilen plaka ile belirlenmiştir (Sentebiolab). Primerlerin gömülü olduğu plakalar için Real-Time PCR'da reaksiyon karışımı oranı, kite göre hazırlanıp çoklu mikropipet yardımıyla plakalara yüklenmiştir. (Tablo 14)

Tablo 14. RT-PCR Reaksiyon Karışımı

Gerçek Zamanlı PZR Reaksiyon Karışımı (96 kuyucuklu plaka için; bir reaksiyon)	
Master Mix	5 µl
cDNA	1 µl
Nüklease Free Water	3,4 µl
F-R mix den	0,6 µl
Son Hacim	10 µl

(Bir kuyucuk için 10 µl koyuyoruz)

Firmanın belirtmiş olduğu (Sentegen) sulandırma katsayıları doğrultusunda 100pmol luk reverse ve forward ana stokları oluşturulmuştur. Sonrasında 10pmol luk PCR stokları hazırlanmıştır. Bunun için; 10 µl Forward, 10 µl Reverse, 80 µl Nüklease Free Water'dan alınıp 100 µl lik 10 pmol lük PCR için hazırlanmış stok elde edilmiştir. Hepsi deney zamanına kadar -20 °C de muhafaza edilmiştir.

ELİSA DENEYİ

Her grup için 2 kuyucuk olacak şekilde 6 kuyucuklu plak'e kuyucuk başına 3×10^5 hücre ekimi yapıldı. Ertesi gün hücreler confluent hale geldiğinde ilaç dozları uygulandı, IC50 süresi olan 48 saat dolduğunda hücrelerin besi yeri alındı. PBS ile kuyucuklar yıkandı. Ardından her kuyucuğa 350 µl RIPA solüsyonu koyuldu. Hücreler kazıyıcı yardımı ile kaldırılıp ependorflara toplandı.-20 ye kaldırılıp deney gününe kadar muhafaza edildi. Çalışmamızda Ishikawa hücreleri üzerinde Metformin, Everolimus ve Lityum maddelerinin tekli ve kombine uygulamalarının Aktine, PI3K, AKT, MTOR, AMPK protein seviyelerine olan etkisi ELİSA yöntemi ile değerlendirilmiştir.

Human Phosphorylated Adenosine Monophosphate Activated Protein Kinase (AMPK) ELİSA KIT:

Cat no: E5873 Hu

Bioassay Technology Laboratory

Ana stok std(standart): 240ng/L

Standartlarımız:

120 ng/L=120 µl std diluent + 120 µl orginal std

60 ng/L=120 µl std diluent + 120 µl 120 ng/L std

30 ng/L=120 µl std diluent + 120 µl 60 ng/L std

15 ng/L=120 µl std diluent + 120 µl 30 ng/L std

7,5 ng/L=120 µl std diluent + 120 µl 15 ng/L std

Wash buffer hazırla:

25x ana stok + 500ml distile su

Her bir konsantrasyon için ependorflara standart koyuyoruz 120 µl

Assay procedur:

1. 50 µl std lar yüklenir. (NOT: stdlara biotilyated antibody eklenmez)

2. 40 µl örnek yüklenir. 10 µl AMPK antibody eklenir. Üzerlerine hem std lara hem de örneklere 50 µl streptavidin HRP eklenir. (NOT: blank kontrollere koyulmaz). Seal ile kapat 60 dk 37°C'de inkübe edilir.
3. Seal kaldırılıp 5 defa yıkama yapılır. (en az 350 µl koyulup 30 sn kadar beklenir)
4. Sonra 50 µl substrat A eklenir. Sonra 50 µl subt B eklenir. Seal ile kapatılıp 10 dk 37°C'de inkübe edilir.
5. 50 µl stop solüsyonu eklenir.
6. 450 nm mikropilaka okuyucuda 10 dk içinde okunur.

Human Mammalian Target of Rapamycin ELİSA KIT:

Cat no: E3693 Hu

Bioassay Technology Laboratory

Ana stok std (standart): 48ng/mL (120 µl)

Wash buffer hazırla:

25x ana stok + 500ml distile su

Her bir konsantrasyon için ependorflara standart koyuyoruz 120 µl

Standartlarımız:

24 ng/mL=120 µl std dilüent + 120 µl orginal std

12 ng/L=120 µl std dilüent + 120 µl 24 ng/L std

6 ng/L=120 µl std dilüent + 120 µl 12 ng/L std

3 ng/L=120 µl std dilüent + 120 µl 6 ng/L std

1,5 ng/L=120 µl std dilüent + 120 µl 3 ng/L std

Assay procedur:

1. 50 µl std lar yüklenir. (NOT: stdlara biotilyated antibody eklenmez)
2. 40 µl örnek yüklenir. 10 µl mTOR antibody eklenir. Üzerlerine hem std lara hem de örneklere 50 µl streptavidin HRP eklenir. (NOT: blank kontrollere koyulmaz). Seal ile kapat 60 dk 37°C'de inkübe edilir.
3. Seal kaldırılıp 5 defa yıkama yapılır. (en az 350 µl koyulup 30 sn kadar beklenir)
4. Sonra 50 µl substrat A eklenir. Sonra 50 µl subt B eklenir. Seal ile kapatılıp 10 dk 37°C'de inkübe edilir.
5. 50 µl stop solüsyonu eklenir.

6. 450 nm mikropilaka okuyucuda 10 dk içinde okunur.

Human Phospho-AKT ELİSA KİT:

Cat no: E4531 Hu

Bioassay Technology Laboratory

Ana stok std(standart): 8000 ng/L (120 µl)

Wash buffer hazırla

25x ana stok + 500ml distile su

Her bir konsantrasyon için ependorflara standart koyuyoruz 120 µl

Standartlarımız:

4000 ng/L=120 µl std dilüent + 120 µl orginal std

2000 ng/L=120 µl std dilüent + 120 µl 24 ng/L std

6 ng/L=120 µl std dilüent + 120 µl 12 ng/L std

3 ng/L=120 µl std dilüent + 120 µl 6 ng/L std

1,5 ng/L=120 µl std dilüent + 120 µl 3 ng/L std

Assay procedur:

1. 50 µl std lar yüklenir. (NOT: stdlara biotilyated antibody eklenmez)
2. 40 µl örnek yüklenir. 10 µl AKT antibody eklenir. Üzerlerine hem std lara hem de örneklere 50 µl streptavidin HRP eklenir. (NOT: blank kontrollere koyulmaz). Seal ile kapat 60 dk 37°C'de inkübe edilir.
3. Seal kaldırılıp 5 defa yıkama yapılır. (en az 350 µl koyulup 30 sn kadar beklenir)
4. Sonra 50 µl substrat A eklenir. Sonra 50 µl subt B eklenir. Seal ile kapatılıp 10 dk 37°C'de inkübe edilir.
5. 50 µl stop solüsyonu eklenir.
6. 450 nm mikropilaka okuyucuda 10 dk içinde okunur.

Human Phosphotylinosital 3Kinase ELİSA KİT

Cat no: E0896 Hu

Bioassay Technology Laboratory

Ana stok std(standart): 80 ng/mL (120 µl)

Wash buffer hazırla

25x ana stok + 500ml distile su

Her bir konsantrasyon için ependorflara standart koyuyoruz 120 µl

Standartlarımız:

40 ng/mL=120 µl std dilüent + 120 µl orginal std

20 ng/mL=120 µl std dilüent + 120 µl 40 ng/mL std

10 ng/mL=120 µl std dilüent + 120 µl 20 ng/mL std

5 ng/mL=120 µl std dilüent + 120 µl 10 ng/mL std

2,5 ng/mL=120 µl std dilüent + 120 µl 5 ng/mL std

Assay procedur:

1. 50 µl std lar yüklenir. (NOT: stdlara biotilyated antibody eklenmez)
2. 40 µl örnek yüklenir. 10 µl PI3K antibody eklenir. Üzerlerine hem std lara hem de örneklere 50 µl streptavidin HRP eklenir. (NOT: blank kontrollere koyulmaz). Seal ile kapat 60 dk 37°C'de inkübe edilir.
3. Seal kaldırılıp 5 defa yıkama yapılır. (en az 350 µl koyulup 30 sn kadar beklenir)
4. Sonra 50 µl substrat A eklenir. Sonra 50 µl subt B eklenir. Seal ile kapatılıp 10 dk 37°C'de inkübe edilir.
5. 50 µl stop solüsyonu eklenir.
6. 450 nm mikropilaka okuyucuda 10 dk içinde okunur.

Human Midkine ELİSA KIT

Cat no: E1633 Hu

Bioassay Technology Laboratory

Ana stok std(standart): 2400 ng/mL (120 µl)

Wash buffer hazırla

25x ana stok + 500ml distile su

Her bir konsantrasyon için ependorflara standart koyuyoruz 120 µl

Standartlarımız

1200 ng/mL=120 µl std dilüent + 120 µl orginal std

600 ng/mL=120 µl std dilüent + 120 µl 1200 ng/mL std

300 ng/mL=120 µl std dilüent + 120 µl 600 ng/mL std

150 ng/mL=120 µl std diluent + 120 µl 300 ng/mL std

75 ng/mL=120 µl std diluent + 120 µl 150 ng/mL std

Assay procedur:

1. 50 µl std lar yüklenir. (NOT: stdlara biotylated antibody eklenmez)
2. 40 µl örnek yüklenir. 10 µl MK antibody eklenir. Üzerlerine hem std lara hem de örneklere 50 µl streptavidin HRP eklenir. (NOT: blank kontrollere koyulmaz). Seal ile kapat 60 dk 37°C'de inkübe edilir.
3. Seal kaldırılıp 5 defa yıkama yapılır. (en az 350 µl koyulup 30 sn kadar beklenir)
4. Sonra 50 µl substrat A eklenir. Sonra 50 µl subt B eklenir. Seal ile kapatılıp 10 dk 37°C'de inkübe edilir.
5. 50 µl stop solüsyonu eklenir.
6. 450 nm mikropilaka okuyucuda 10 dk içinde okunur.

İNVAZYON KAPASİTESİNİN BELİRLENMESİ (MATRİGEL-İNVAZYON TESTİ)

Deney gruplarındaki hücrelerin invazyon kapasitesi ‘matrigel invasion chamber’ invazyon kapları (Corning) kullanılarak 24 kuyucuklu kültür plaklerinde araştırıldı. Bu deney sayesinde hücrelerin in vitro şartlar altında invaziv özellikleri saptanabilmektedir. İnvazyon odacıkları 8 mikron çaplı porlar içeren matrigel matrix kaplı bir membran ile örtülüdür. Bu membran invaziv özelliği olmayan hücrelerin membranın diğer yüzeyine geçmesini engellemekte, invaziv özelliği olan hücreler ise membranın diğer yüzeyine geçebilmektedir. Bu sayede matrijel kaplı membran invaziv ve invaziv olmayan hücreleri birbirinden ayırabilmektedir.

Deneyde kısaca, 12 kuyucuklu plakaya matrigel chamberı yerleştirmeden önce 750 µl completed besi yeri koyduk. Dozları completed olmayan, içinde penicilin-streptomisin olan ama FBS (serum) olmayan besi yerinde hazırladık. Her kuyucukta 25 bin hücre olacak FBS içermeyen besi yerinde dozları hazırladık. Her kuyucukta 500 µl olacak şekilde kuyucuklara dozlu hücreleri uyguladık. Hücreler 48 saat 37°C'de CO₂'li inkübatörde inkübe edildi.

48 Saat sonra

- 1.Kuyucuklardaki besi yerleri döküldü.

2. 2 defa PBS ile yıkandı.
3. 750 µl dışarı 500 µl chamber içine daha önceden -20 ye soğuması için bıraktığımız metanol uygulandı.
4. -20 de 10 dk inkübe edildi.
5. Methanoller pipetle çekildi.
6. 750 µl dışına 500 µl içine kristal viyole boyası konuldu. 3-5 dk arasında kabin içinde bekletildi.
7. PBS ile boyadan arınana kadar yıkandı.
8. Işık mikroskopunda fotoğrafları çekildi

KOLONİ OLUŞUM DENEYİ

Deney gruplarımız için uyguladığımız dozların maruziyeti sonrası Ishikawa endometral karsinom hücrelerinin koloni oluşumunu nasıl etkilediğini belirlemek için deney için 6 kuyucuklu plakalara kontrol ve doz grupları için kuyucuk başına 1×10^3 hücre ekildi. Deney gruplarının her biri için triplice hücre ekimi yapıldı. 14 gün boyunca hücrelerin 2 günde bir ortamlarını değiştirerek 37°C’de, %5 CO₂’li ortamda inkübe edildi. On dört günün sonunda hücreler soğuk metanolla -20°C’de 10 dakika fikse edildi. Fikse olan koloniler kristal viyole boyası ile 15 dakika boyandı. Boyanan koloniler kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak sayılıp değerlendirildi.

WOUND HEALING (YARA İYİLEŞME) DENEYİ

Hücre migrasyonunu ve hücre-hücre etkileşimini incelemek için yapılan bir deney olan yara iyileşme deneyi, Ishikawa hücrelerinde Everolimus, Lityum, Metformin maddelerinin tekli ve kombine dozlarının etkisini belirlemek için yapıldı. Wound healing deneyi için 12 kuyucuklu plakaya %100 confluent olacak şekilde hücre ekim yapıldı. Hücrelerin plak yüzeyine tutunması gözlemlendikten sonra besi yeri kaldırıldı. PBS ile 3 kere yıkama yapıldı. 200 µl lik pipet ucu yardımı ile “+” şeklinde plak zeminine çizim yapıldı. Çizimin amacı, hücrelerin göç etmesini ve boşluğu kapatmasını gözlemlemek amacıyla hücresiz bir alan oluşturmaktır. Sonrasında PBS

ile tekrar yıkanıp doz grupları besi yeri içinde uygulandı. 0, 16 ve 24 saatte 4X büyütme ile resimler çekilip kontrol grubu ile karşılaştırılıp analizi yapıldı.

FLOW SİTOMETRİ: ANNEXİN V İLE APOPTOZ TESPİTİ

Apoptotik indeks, flow sitometrik Annexin-V-floresanin izotiyosiyanat / propidyum iyodür (Annexin-V-FITC / PI) boyama kullanılarak değerlendirildi. Kitin kullanma kılavuzundaki talimatlardan sonra (BD Pharmingen, San Diego, CA, ABD), hücreler iki kez PBS ile yıkandı ve 0.01 M HEPES, 0.14 mM NaCl, ve 2.5 mM CaCl₂ ihtiva eden bağlama tamponu ile yeniden süspansiyon haline getirildi. Hücre süspansiyonu içindeki (1×10^5 bağlanma tamponu içindeki 100 µL) hücreler, 5 µL FITC etiketli Annexin V (BD Pharmingen) boya ve PI ile karanlıkta oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, PI floresansı ve Annexin V, BD FACS Calibur'da aynı anda ölçülüp cihazın işletim yazılımıyla analiz edildi (CellQuest: BD Pharmingen).

ÜÇ BOYUTLU (3D) HÜCRE KÜLTÜRÜ YÖNTEMİ İLE SPHEROİD OLUŞUMU DENEYİ

Bir liquidoverlay tekniği kullanılarak in vitro çok hücreli bir Ishikawa sferoid modeli oluşturulmuştur.

Ishikawa hücreleri öncelikle; RPMI 1640 besi yeri ile T75 flaska ekilmiş ve 37°C de %95 nem ve %5 CO₂'li etüvde iki günde bir besi ortamları tazelenerek inkübe edilmiştir. Hücreler %90 confluent olduğunda flasklar öncelikle PBS ile yıkanıp ölü hücrelerden ve hücre atıklarından iyice arındırılıp aspire edilmiş sonrasında tripsin ilave edilerek hücrelerin flask yüzeyinden kalkması sağlanmıştır. Flask içerisindeki hücre- ortam karışımı 15 ml'lik falkonlara aktarılıp 1500g'de 4 dakika santrifüj edilip süpernatant uzaklaştırılmıştır. Ardından hücre sayımı yapıp % 100 canlılığa sahip hücreler her kuyucukta 1×10^6 hücre olacak şekilde % 3'lük Noble agar kaplı altı kuyucuklu kültür plakasına RPMI-1640 kullanılarak kültürize edilmiş ve belli aralıklar ile hücrelerin inverted mikroskopta resimleri çekilmiş boyutları ölçülmüştür.

VERİLERİN İSTATİSTİKSEL OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

Verilerin analizi $\Delta\Delta$ CT metodu kullanılarak bilgisayar programı ile kantitasyonu yapılmış, web tabanlı "RT² Profiler™ PCR Array Data Analysis" programında bulunan, Volcano Plot analizleri kullanılmıştır. Metodun amacı, iki ekspresyon sonucunun $\pm 3SD$ karşılaştırılması esasına dayanmaktadır. Böylelikle, gen ekspresyonunun karşılaştırılması yapılan durumlarda kontrol ve doz grubu ilgili genlerin ekspresyon değerleri rölatif olarak belirlenebilmiştir. Grupların karşılaştırılması "RT² Profiler™ PCR Array Data Analysis" programında bulunan "Student t-testi" analizi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

İstatistiksel analiz

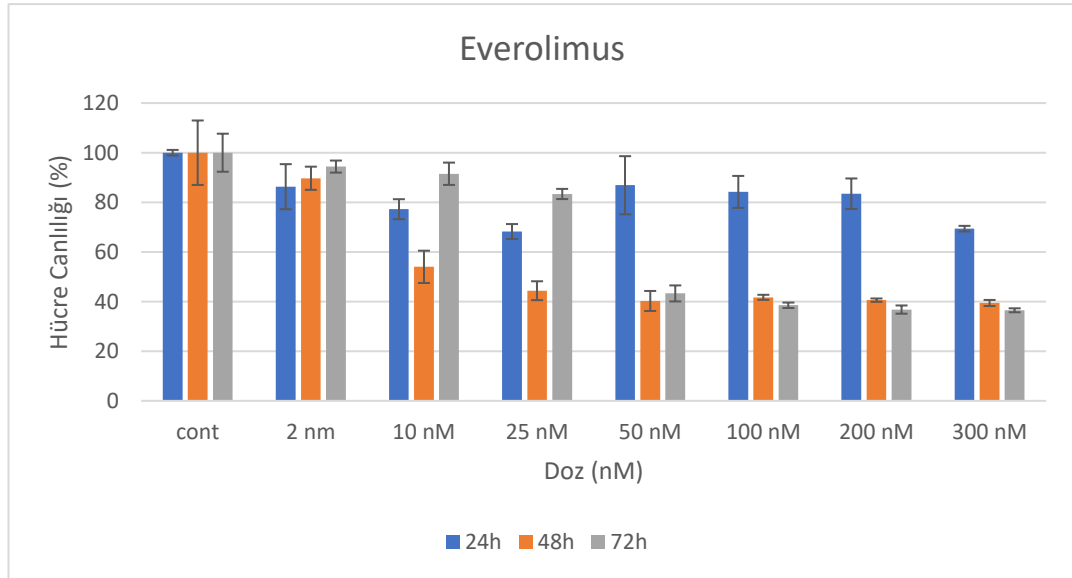
Veriler SPSS 24.0 paket programıyla analiz edilmiştir. Sürekli değişkenler ortalama \pm standart sapma, ortanca(en küçük -- en büyük değerler) ve kategorik değişkenler sayı ve yüzde olarak verilmiştir. Verilerin normal dağılıma uygunluğunun incelenmesinde Shapiro Wilk testi kullanılmıştır. Bağımsız grup farklılıklarının karşılaştırılmasında KruskalWallis Varyans Analizi (Post-hoc olarak Bonferroni Düzeltmeli Mann Whitney U testi) kullanılmıştır.

BULGULAR

XTT TESTİ (HÜCRE CANLILIĞI TESTİ) SONUÇLARI

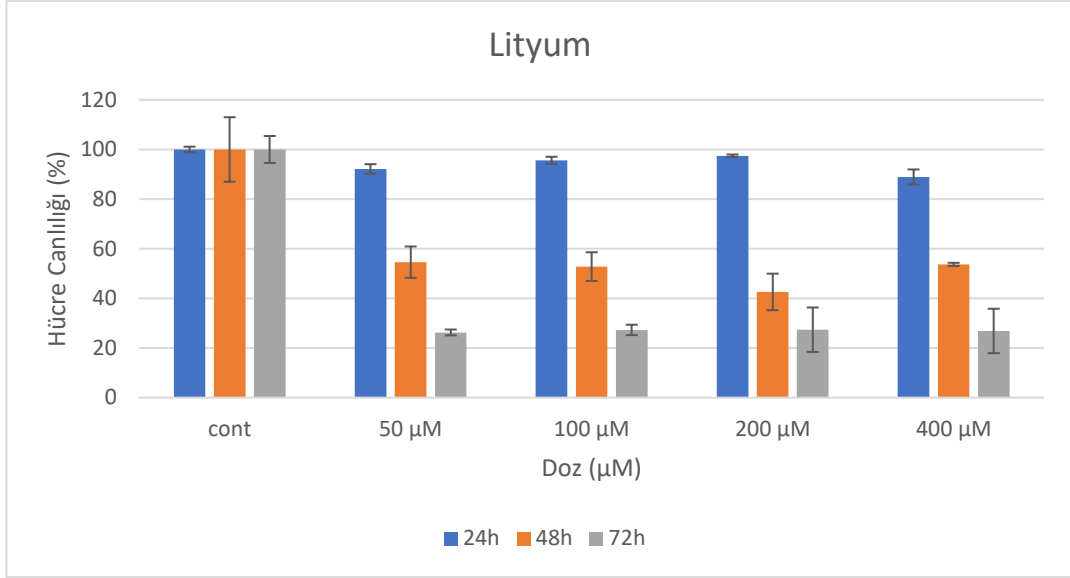
24, 48 ve 72 saat değerlerine göre çıkan sonuçlar Graph pad prism 8.01 programı kullanılarak IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır.

48. saate 37,46 nM olarak saptanmıştır. 24 saatlik hücre canlılığı testi sonuçlarında, hücre proliferasyonunun %50'lerin altına düşmemesi sebebiyle, 48. saatteki doz oranı IC₅₀ olarak kabul edilmiştir. Everolimusun değişen doz aralıkları ve zamana göre etkisi Şekil 5'de görülmektedir.



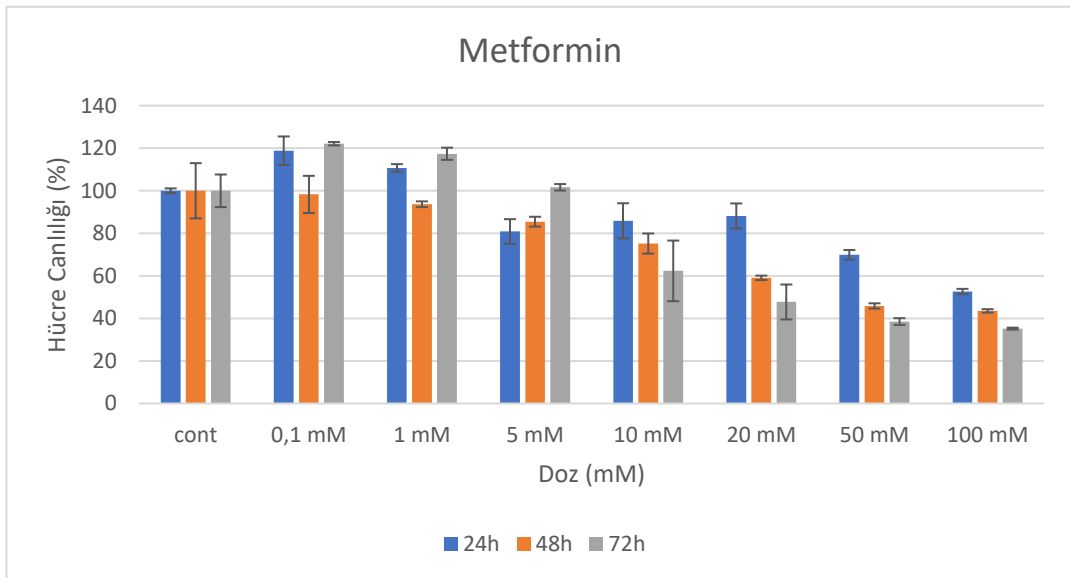
Şekil 5. Everolimus'un çeşitli konsantrasyonlarda zamana göre hücre canlılığına etkisinin sütun grafiği gösterimi

48. saate 100 µM olarak saptanmıştır. 24 saatlik hücre canlılığı testi sonuçlarında, hücre proliferasyonunun %50'lerin altına düşmemesi sebebiyle, 48. saatteki doz oranı IC₅₀ olarak kabul edilmiştir. Lityumun değişen doz aralıkları ve zamana göre etkisi Şekil 6'da görülmektedir.



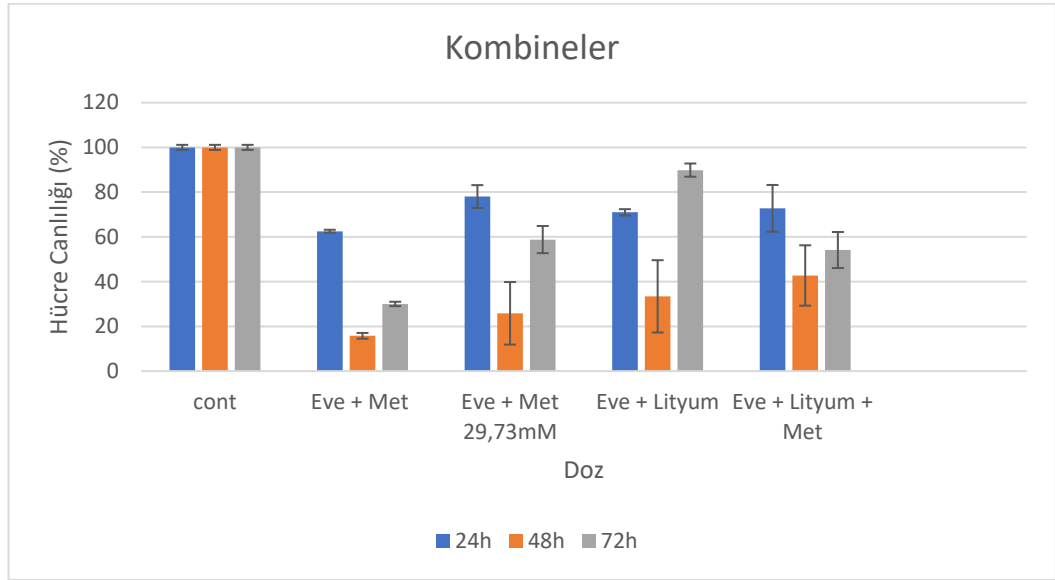
Şekil 6. Lityum'un çeşitli konsantrasyonlarda zamana göre hücre canlılığına etkisinin sütun grafiği gösterimi

48. saate 48,59 mM olarak saptanmıştır. 24 saatlik hücre canlılığı testi sonuçlarında, hücre proliferasyonunun %50'lerin altına düşmemesi sebebiyle, 48.saatteki doz oranı IC_{50} olarak kabul edilmiştir. Metforminin değişen doz aralıkları ve zamana göre etkisi Şekil 7'de görülmektedir.



Şekil 7. Metformin'in çeşitli konsantrasyonlarda zamana göre hücre canlılığına etkisinin sütun grafiği gösterimi

Kombine dozlar; Eve IC₅₀ + Met IC₅₀, Eve IC₅₀ + Met 29,73 mM, Eve IC₅₀ + Lit IC₅₀, Eve IC₅₀ + Lit IC₅₀ + Met IC₅₀ şeklinde seçilmiş, kombine dozlarında etkili zamanı 48. saat olarak tespit edilmiş ve doz aralıkları ve zamana göre etkisi Şekil 8'de gösterilmiştir.



Şekil 8. Kombine dozların zamana göre hücre canlılığına etkisinin sütun grafiği gösterimi

TRİZOL REAGENT İLE TOTAL RNA İZOLASYONU SONUÇLARI

Trizol Reagent yardımı ile kontrol grubu ve doz grubu Ishikawa hücrelerinden RNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen total RNA'ların konsantrasyon ve saflık oranları Nanodrop ile saptanmıştır. Sonuçlar Tablo 15'deki gibidir.

Tablo 15. İzole edilen RNA ait konsantrasyon ve saflık değerleri

Grup	Konsantrasyon (ng/µl)	260/280 nm (OD)
Kontrol	90,3	1,58
Everolimus IC ₅₀	165,8	1,66

Lityum IC ₅₀	361,1	1,88
Metformin IC ₅₀	426,6	1,95
Eve + Met	108,2	1,73
Eve + Lit	295,2	1,74
Eve + Met 29,73	399	1,90
Eve + Lit + Met	165,9	1,66

GERÇEK-ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (RT-PCR) SONUÇLARI

Deneylerin prosedürü materyal metotta belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sonucunda elde edilen Cq değeri dikkate alınarak kontrol ve doz gruplarındaki gen ifadelerindeki değişim hesaplanmıştır. Çalışmamız sonucunda araştırmamızda incelediğimiz genlerden istatistiksel olarak anlamlı değişim görülen genler ve değişim durumları Şekil 9’da verilmiştir.

Position	Gene Symbol	Fold Regulation (comparing to control group)					
		Everolimus 37,46 nM		Lityum 100 µM		Metformin 48,59 mM	
		Fold Regulation	p-Value	Fold Regulation	p-Value	Fold Regulation	p-Value
1	BETA ACTIN	1.00	nan	1.00	nan	1.00	nan
2	CASP8	1.13	0.645009	-4.92	0.010544	-1.16	0.404120
3	FASL	2.11	0.029231	-1.38	0.472891	1.87	0.042288
4	PTEN	-1.46	0.052442	1.02	0.900916	3.46	0.002528
5	FADD	6.88	0.230884	23.75	0.109012	32.90	0.057808
6	PIK3CA	2.72	0.666939	6.93	0.423246	40.13	0.136592
7	AKT1	-1.39	0.195002	2.73	0.110426	2.05	0.206835
8	MTOR	1.11	0.381506	1.50	0.872234	1.46	0.425658
9	CASP3	1.65	0.045914	1.39	0.461035	1.38	0.062247
10	HLADR5	3.05	0.376845	7.91	0.196560	12.50	0.052076
11	PIK3CB	-54.07	0.241874	-1.64	0.355884	2.41	0.769215
12	CASP9	-1.63	0.569353	4.75	0.132903	2.30	0.001503
13	BAX	-1.45	0.312039	3.12	0.149680	1.98	0.196937
14	TNF	10.51	0.091175	5.64	0.194588	2.60	0.355634
15	TRADD	-1.71	0.907765	3.54	0.152477	13.83	0.002030
16	MİDKİNE	-211,82	0.001157	-2.54	0.585566	1.51	0.348708
17	P53	1.21	0.791866	-1.94	0.916061	5.75	0.274792
18	MAP1LC3A	-2.09	0.024961	-4.52	0.269443	2.50	0.000993
19	BECLIN1	-1.01	0.844450	1.54	0.154482	7.24	0.367245
20	HLADR1	2.59	0.020564	-3.15	0.775086	-16.56	0.001066

Position	Gene Symbol	Fold Regulation (comparing to control group)							
		Eve 37,46 + Met 48,59		Eve 37,46 + Lit 100		Eve 37,46 + Met 29,73		Eve 37,46 + Met 48,59 + Lit 100	
		Fold Regulation	p-Value	Fold Regulation	p-Value	Fold Regulation	p-Value	Fold Regulation	p-Value
1	BETA ACTIN	1.00	nan	1.00	nan	1.00	nan	1.00	nan
2	CASP8	-1.57	0.393692	2.80	0.161598	1.44	0.160094	-1.13	0.472837
3	FASL	-1.77	0.412627	-2.14	0.766185	3.41	0.032464	1.47	0.183583
4	PTEN	2.79	0.240488	1.78	0.116897	-1.29	0.150138	-2.76	0.003879
5	FADD	18.55	0.004589	15.21	0.037809	2.18	0.276390	-2.43	0.003633
6	PIK3CA	21.51	0.373337	15.93	0.173168	1.98	0.388529	-2.47	0.417923
7	AKT1	2.08	0.192898	3.42	0.157738	2.74	0.092755	5.51	0.362474
8	MTOR	6.56	0.626632	4.77	0.416028	7.14	0.360309	1.40	0.423993
9	CASP3	2.44	0.218682	1.32	0.425642	1.55	0.236757	-1.10	0.573405
10	HLADRB5	7.59	0.303511	8.92	0.124644	1.02	0.570797	-2.98	0.163254
11	PIK3CB	4.52	0.508824	-3.18	0.281296	2.14	0.292188	-9.49	0.265937
12	CASP9	7.43	0.019736	7.91	0.065631	6.85	0.034519	-1.31	0.417141
13	BAX	4.41	0.020768	2.35	0.253896	1.56	0.232126	1.17	0.644500
14	TNF	7.24	0.310771	34.70	0.000209	14.29	0.000365	8.42	0.026061
15	TRADD	66.72	0.336781	33.59	0.371609	2.45	0.182108	-2.12	0.069969
16	MIDKİNE	2.16	0.073670	1.01	0.788236	-2.35	0.013235	-1.69	0.063051
17	P53	100.66	0.373471	12.35	0.101769	11.34	0.000743	4.34	0.030314
18	MAP1LC3A	1.50	0.445109	2.13	0.148012	1.69	0.016891	-1.44	0.350144
19	BECLİN1	1.01	0.808726	2.69	0.123639	1.84	0.018625	1.17	0.468777
20	HLADRB1	-8.04	0.019559	2.48	0.002866	2.93	0.012768	-1.39	0.711760

Şekil 9. RT-PCR sonucuna göre kontrol grubuna göre değişiklik gösteren genler

RT-PCR sonucuna göre;

Everolimus IC₅₀ dozu uygulanan grupta, FASL, CASP3, MİDKİNE, MAP1LC3A ve HLADRB1 istatistiksel anlamlı değişim (p değeri <0,05) ayrıca FADD, PIK3CA, HLADRB5 ve TNF değerlerinde belirgin artış, PIK3CB değerinde belirgin azalma tespit edilmiştir.

Lityum IC₅₀ dozu uygulanan grupta, CASP8' de anlamlı değişim ayrıca FADD değerinde istatistiksel anlamlı değişim (p değeri <0,05), ayrıca PIK3CA, AKT1, HLADRB5, CASP9, BAX, TNF, TRADD değerlerinde belirgin artış, MİDKİNE, MAP1LC3A, HLADRB1 değerlerinde belirgin azalma tespit edilmiştir.

Metformin IC₅₀ dozu uygulanan grupta; FASL, PTEN, CASP9, TRADD, MAP1LC3A, HLADRB1 değerlerinde istatistiksel anlamlı değişim (p değeri <0,05), ayrıca FADD, PIK3CA, AKT1, HLADRB5, PIK3CB, CASP9, TNF, TRADD, P53, MAP1LC3A, BECLİN1 değerlerinde belirgin artış tespit edilmiştir.

Everolimus IC₅₀ + Metformin IC₅₀ dozu uygulanan grupta; FADD, CASP9, BAX, HLADRB1 değerlerinde istatistiksel anlamlı değişim (p değeri <0,05), PIK3CA, AKT1, MTOR, CASP3, HLADRB5, PIK3CB, TNF, TRADD, P53 değerlerinde belirgin artış tespit edilmiştir.

Everolimus IC₅₀ + Lityum IC₅₀ dozu uygulanan grupta; FADD, TNF ve HLADRB1 değerlerinde istatistiksel anlamlı değişim (p değeri <0,05), CASP8, PIK3CA, AKT1, MTOR, HLADRB5, CASP9, BAX, TRADD, P53, MAP1LC3A,

BECLİN1 değerlerinde belirgin artış, FASL ve PIK3CB değerinde belirgin azalma tespit edilmiştir.

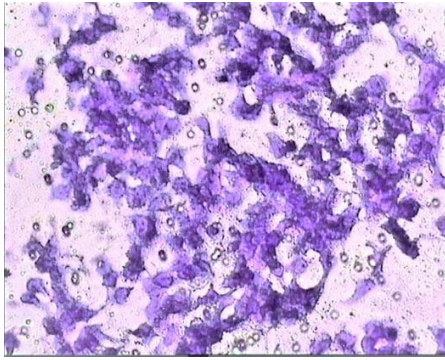
Everolimus IC₅₀ + Metformin 29,73 mM dozu uygulanan grupta, FASL, CASP9, TNF, MİDKİNE, P53, MAP1LC3A, BECLİN1, HLADRB1 değerlerinde istatistiksel anlamlı değişim (p değeri <0,05), ayrıca FADD, AKT1, PIK3CB ve TRADD değerlerinde belirgin artış tespit edilmiştir.

Everolimus IC₅₀ + Metformin IC₅₀ + Lityum IC₅₀ dozu uygulanan grupta; PTEN, FADD, TNF, P53 değerlerinde istatistiksel anlamlı değişim (p değeri <0,05), ayrıca AKT1 değerinde belirgin artış, PIK3CA, HLADRB5, PIK3CB ve TRADD değerlerinde belirgin azalma tespit edilmiştir.

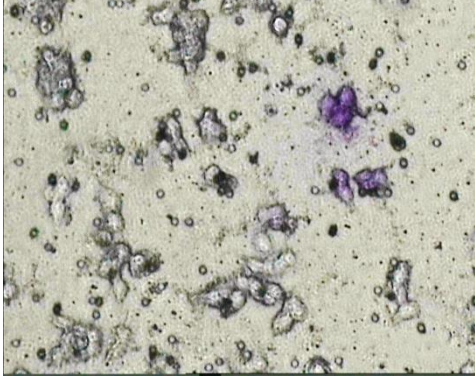
Tüm veriler Şekil 9'da ayrıntılı olarak verilmiştir.

MATRİGEL İNVAZYON TESTİ SONUÇLARI

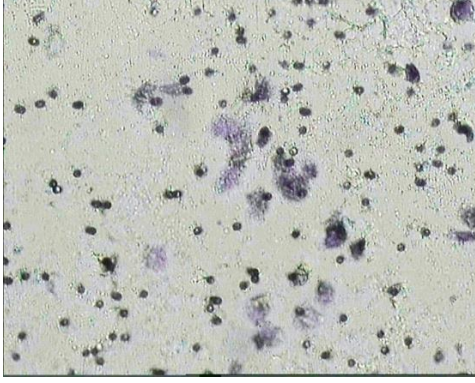
Matrigel invazyon deneyi sonucunda, dozların uygulanmış olduğu Ishikawa hücrelerinin invazyon durumlarının kontrol grubuna göre belirgin bir şekilde azaldığı görülmektedir.



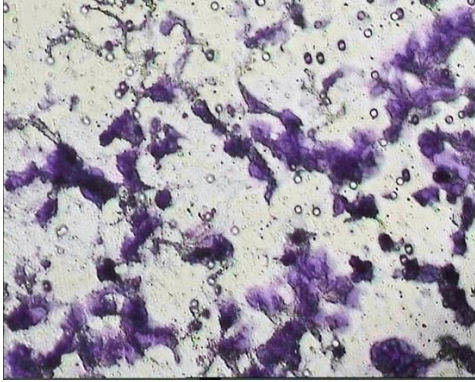
Şekil 10. Kontrol grubunda invaze olan hücrelerin mikroskop görüntüsü (10X)



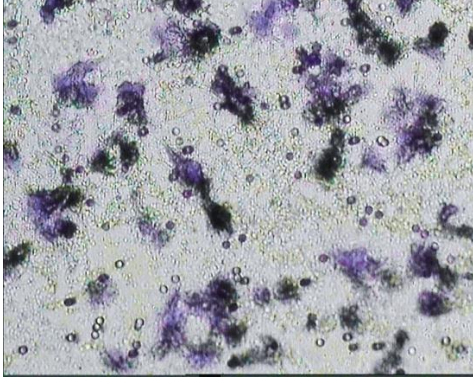
Şekil 11. Everolimus IC₅₀ grubunda invaze olan hücrelerin mikroskop görüntüsü (10X)



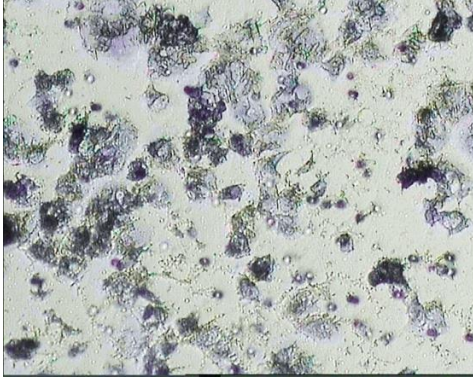
Şekil 12. Metformin IC₅₀ grubunda invaze olan hücrelerin mikroskop görüntüsü (10X)



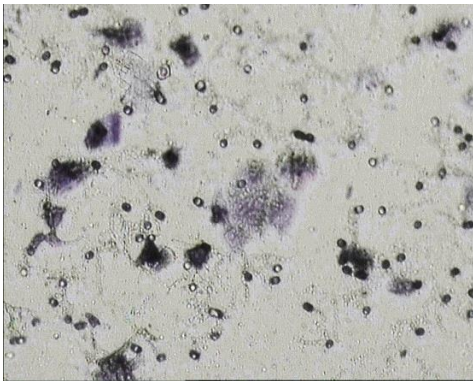
Şekil 13. Lityum IC₅₀ grubunda invaze olan hücrelerin mikroskop görüntüsü (10X)



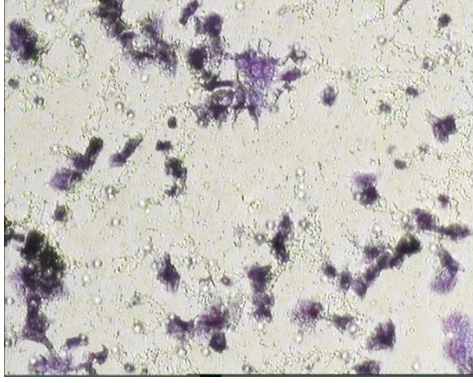
Şekil 14. Everolimus IC₅₀ + Lityum IC₅₀ grubunda invaze olan hücrelerin mikroskop görüntüsü (10X)



Şekil 15. Everolimus IC₅₀ + Metformin IC₅₀ grubunda invaze olan hücrelerin mikroskop görüntüsü (10X)



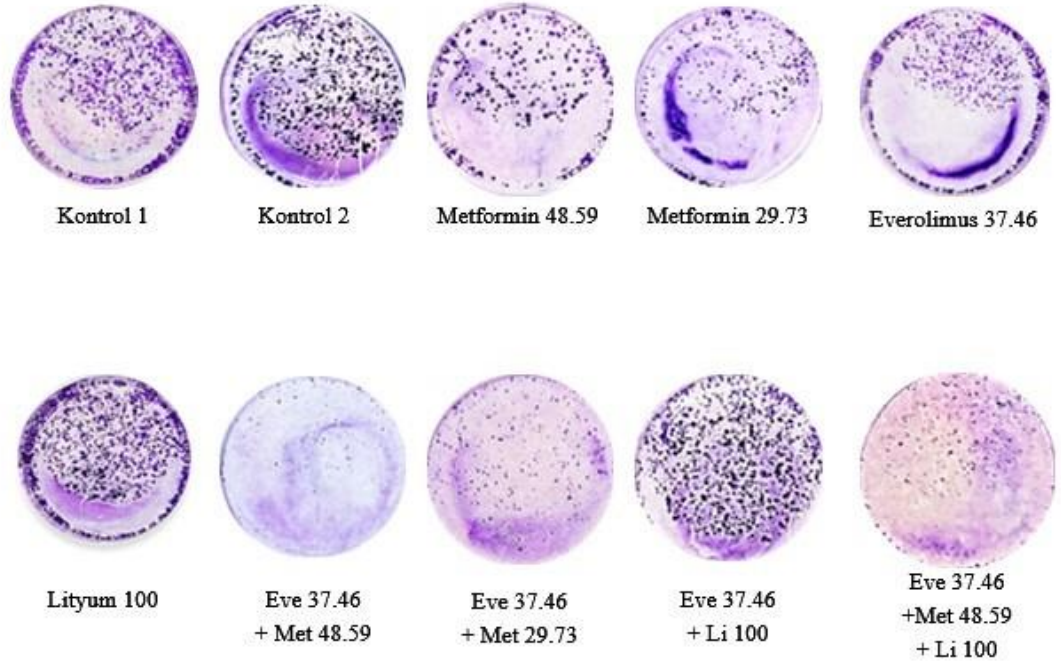
Şekil 16. Everolimus IC₅₀ + Metformin IC₅₀ + Lityum IC₅₀ grubunda invaze olan hücrelerin mikroskop görüntüsü (10X)



Şekil 17. Everolimus IC₅₀ + Metformin 29,73 mM grubunda invaze olan hücrelerin mikroskop görüntüsü (10X)

KOLONİ OLUŞUM DENEYİ SONUÇLARI

Kontrol grubu hücrelerde koloni ortalaması $382,33 \pm 16,75$ iken, doz guruplarında koloni sayısı Everolimus IC₅₀ grubunda $200 \pm 8,16$, Metformin IC₅₀ grubunda 126 ± 7 , Lityum IC₅₀ grubunda $223,3 \pm 12,4$, Everolimus IC₅₀ + Lityum IC₅₀ grubunda $246 \pm 14,3$, Everolimus IC₅₀ + Metformin IC₅₀ grubunda $50,3 \pm 13,5$, Everolimus IC₅₀ + Metformin IC₅₀ + Lityum IC₅₀ grubunda $62,6 \pm 12,5$, Everolimus IC₅₀ + Metformin 29,73mM grubunda $104,3 \pm 10,2$ bulunmuştur. Şekil 18’de görüldüğü gibi koloni formasyonunun doz guruplarında kontrole göre belirgin şekilde azaldığı dikkati çekmektedir. Sonuç olarak, özellikle başta Everolimus IC₅₀ + Metformin IC₅₀ grubu olmak üzere, Everolimus IC₅₀ + Metformin IC₅₀ + Lityum IC₅₀ grubu olmak üzere tüm guruplarda Ishikawa hücrelerinde koloni sayısı kontrol grubuna göre belirgin olarak baskılanmıştır. Şekil 18’de kontrol ve doz guruplarının görüntüsü gösterilmektedir.



Şekil 18. Ishikawa hücrelerinde kontrol ve doz gruplarında koloni görüntüsü

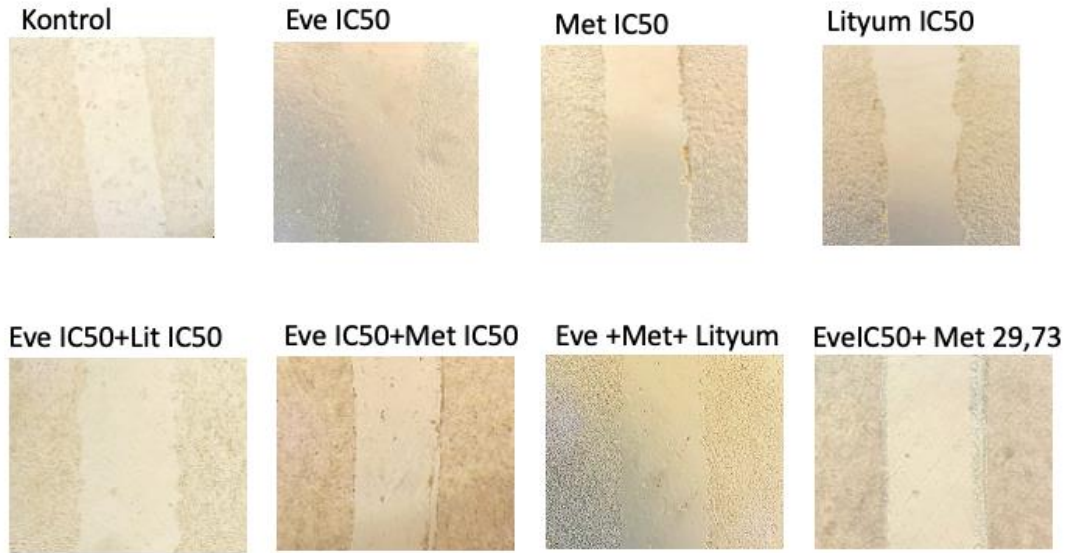
Tablo 16. Ishikawa hücrelerinde kontrol ve doz gruplarında koloni sayıları

	Grup1	Grup2	Grup3	Ortalama	Std sp
Kontrol	377	365	405	382,3333	16,7597
Eve IC ₅₀	190	200	210	200	8,1649
Met IC ₅₀	133	119	126	126	7
Lit IC ₅₀	240	220	210	233,3333	12,4721
Eve IC ₅₀ +Lit IC ₅₀	230	245	265	246,6666	14,3372
Eve IC ₅₀ +Met IC ₅₀	68	48	35	50,3333	13,5521
Eve+Lit+Met	70	73	45	62,6666	15,5521
EveIC ₅₀ +Met29,73	116	106	91	104,3333	10,2740

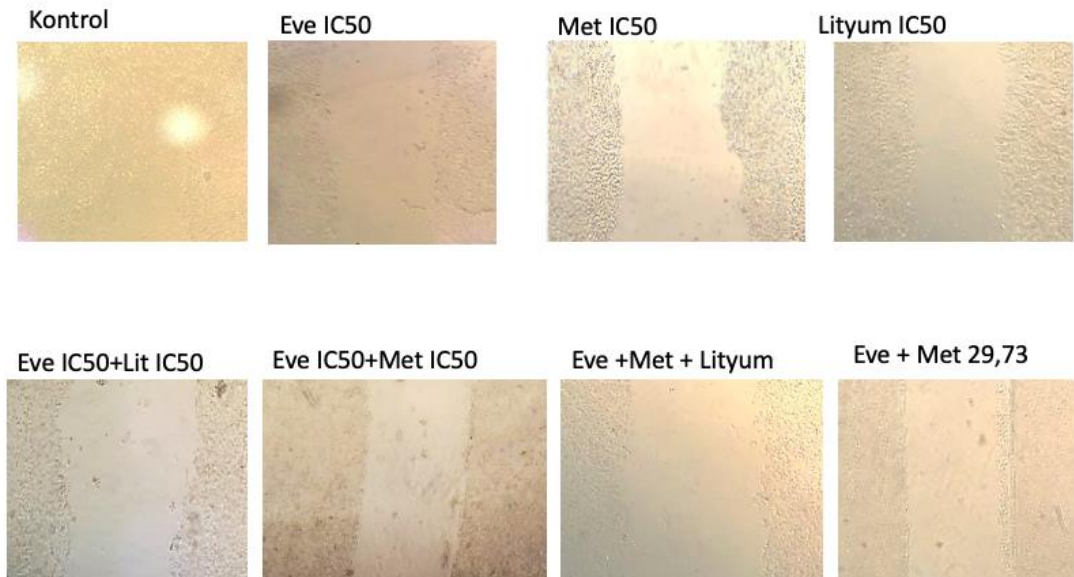
WOUND HEALING DENEYİ SONUÇLARI

Ishikawa hücrelerinde Everolimus, Lityum, Metformin maddelerinin tekli ve kombine dozlarının hücre-hücre etkileşimi ve hücre migrasyonuna etkisini belirlemek

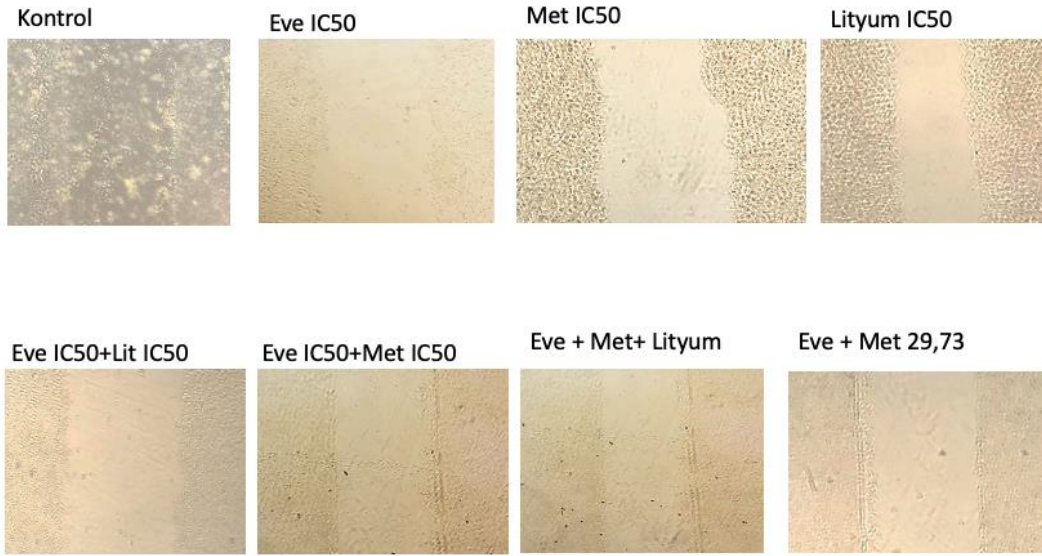
için yaptığımız wound healing deneyi sonuçlarının 0, 16 ve 24 saatte 4X büyütme ile resimleri çekilip kontrol grubu ile karşılaştırılıp analizi yapıldı.



Şekil 19. Wound healing deneyi 0. Saat sonuçları (4X)



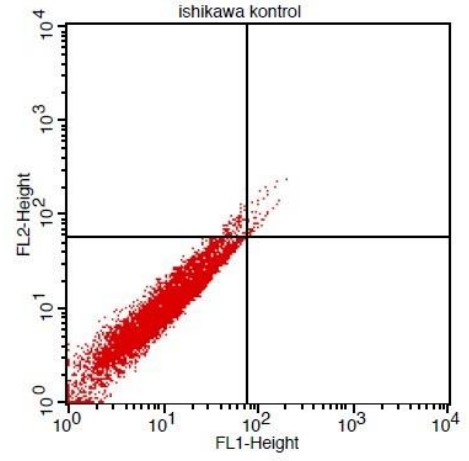
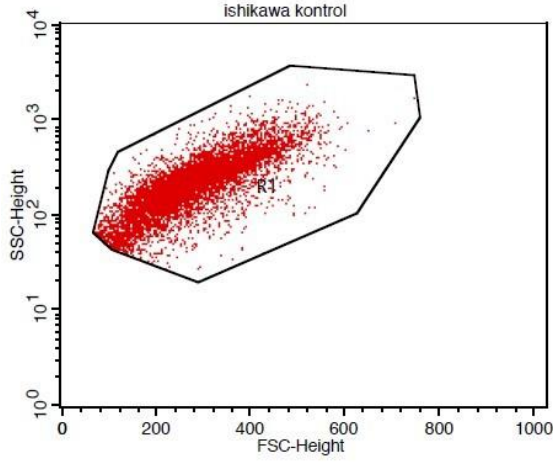
Şekil 20. Wound healing deneyi 16. Saat sonuçları (4X)



Şekil 21. Wound healing deneyi 24. Saat sonuçları (4X)

FLOW SİTOMETRİ SONUÇLARI

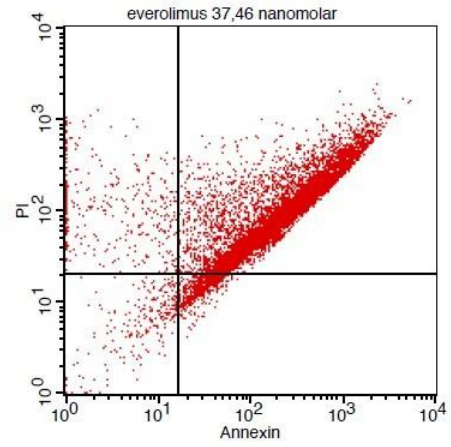
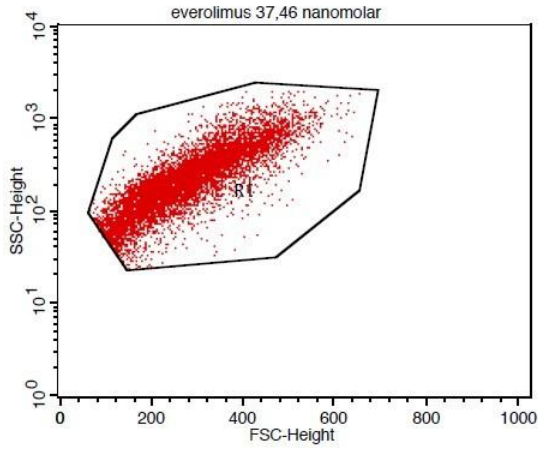
Flow sitometri deneyi, doz gruplarında apoptozun kontrol grubuna oranla belirgin şekilde arttığını, ayrıca hücre canlılığının kontrol grubuna oranla azaldığını göstermiştir. Tüm sonuçlar Şekil 21-27’de gösterilmiştir.



File: ishikawa kontrol
 Panel: Apoptosis Total Events: 10000

Quad	Events	% Gated
UL	93	1.07
UR	56	0.65
LL	8503	98.28
LR	0	0.00

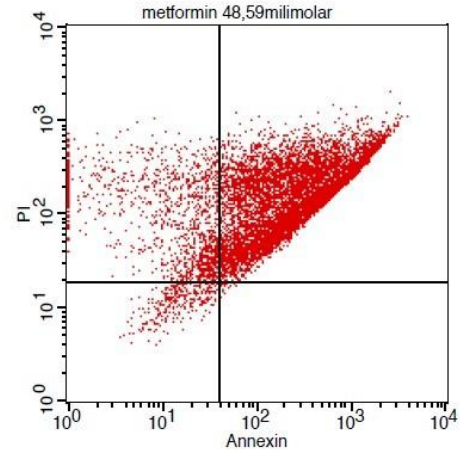
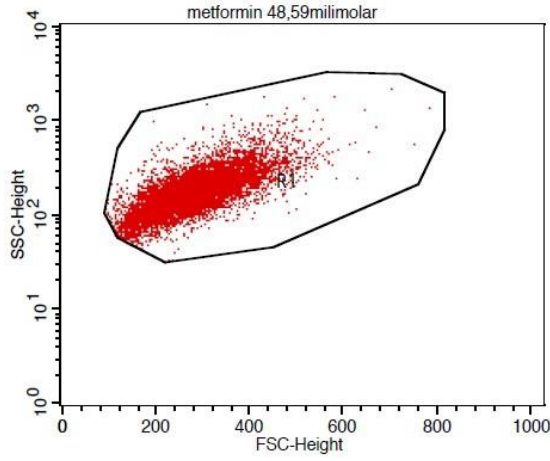
Şekil 22. Flow sitometri kontrol grubu sonuçları



File: everolimus 37,46 nanomolar
 Panel: Apoptosis Total Events: 10000

Quad	Events	% Gated
UL	361	4.07
UR	7654	86.22
LL	232	2.61
LR	630	7.10

Şekil 23. Flow sitometri Everolimus IC₅₀ grubu sonuçları



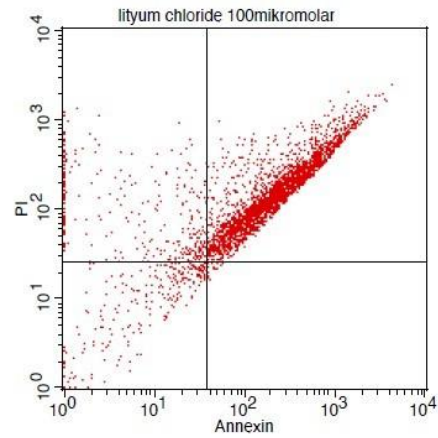
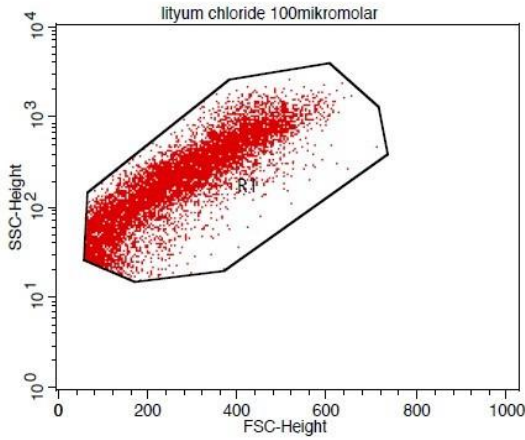
File: metformin 48,59mikromolar

Panel: Apoptosis

Total Events: 10000

Quad	Events	% Gated
UL	1234	13.26
UR	7750	83.29
LL	298	3.20
LR	23	0.25

Şekil 24. Flow sitometri Metformin IC₅₀ grubu sonuçları



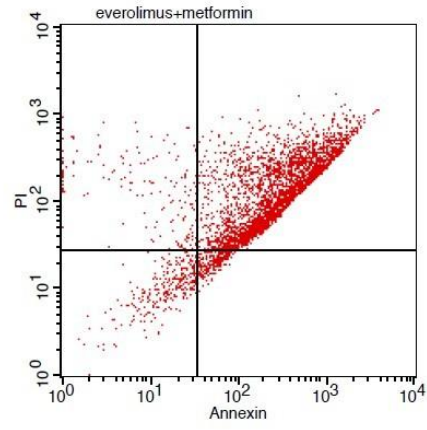
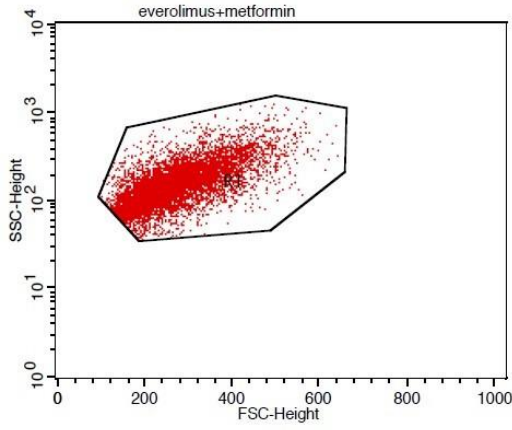
File: lityum chloride 100mikromolar

Panel: Apoptosis

Total Events: 10000

Quad	Events	% Gated
UL	855	9.47
UR	7418	82.18
LL	693	7.68
LR	60	0.66

Şekil 25. Flow sitometri Lityum IC₅₀ grubu sonuçları

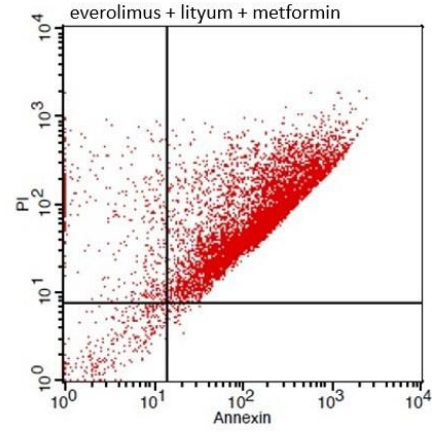
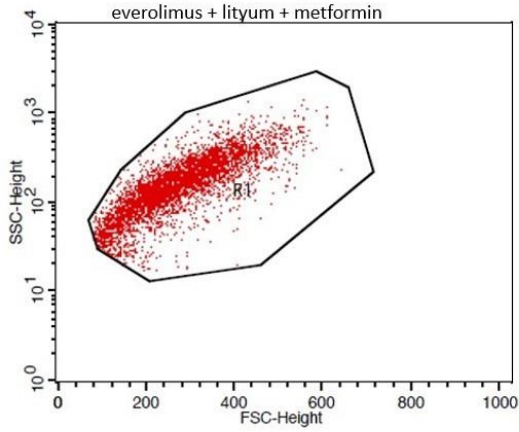


File: everolimus+metformin
Panel: Apoptosis

Total Events: 10000

Quad	Events	% Gated
UL	320	4.34
UR	6011	81.49
LL	529	7.17
LR	516	7.00

Şekil 26. Flow sitometri Everolimus IC₅₀ + Metformin IC₅₀ grubu sonuçları

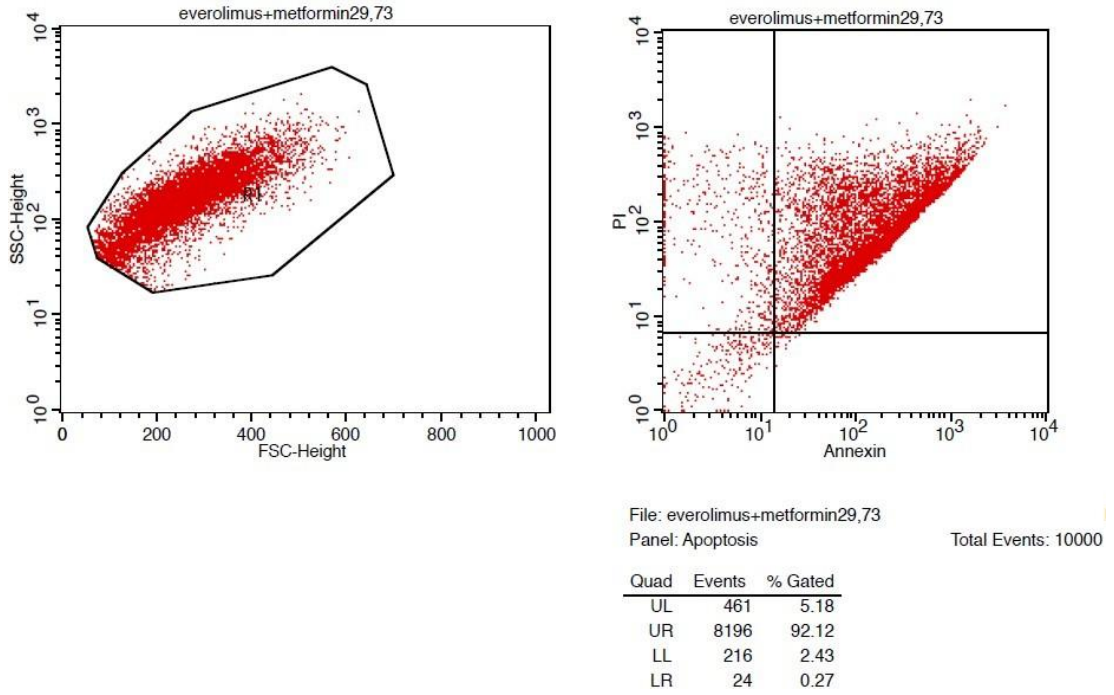


File: everolimus+lityum+metform#157C2
Panel: Apoptosis

Total Events: 10000

Quad	Events	% Gated
UL	437	5.05
UR	7881	91.14
LL	291	3.37
LR	38	0.44

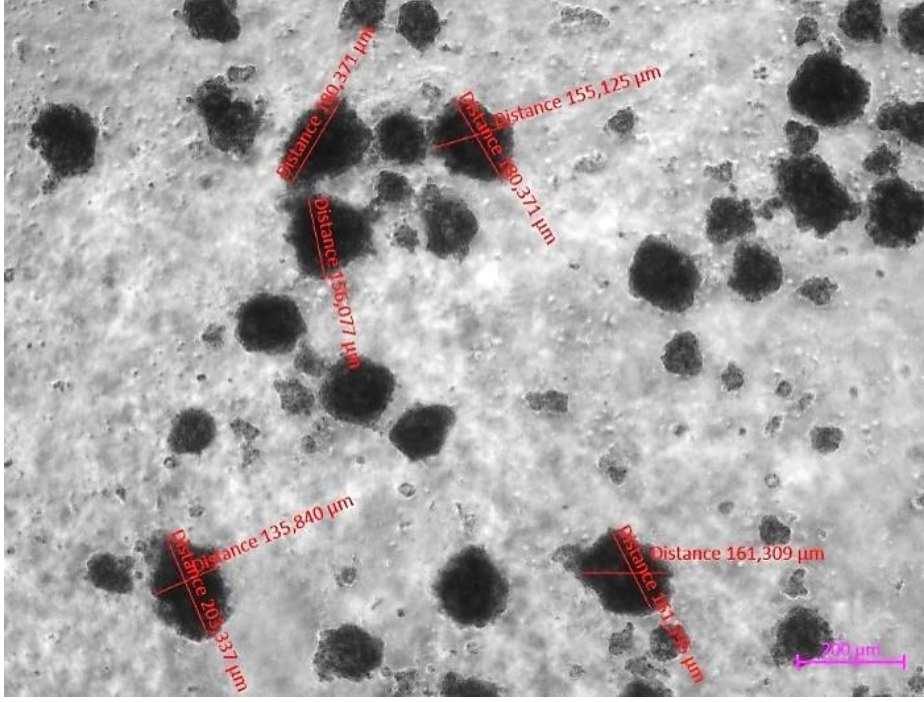
Şekil 27. Flow sitometri Everolimus IC₅₀ + Metformin IC₅₀ + Lityum IC₅₀ grubu sonuçları



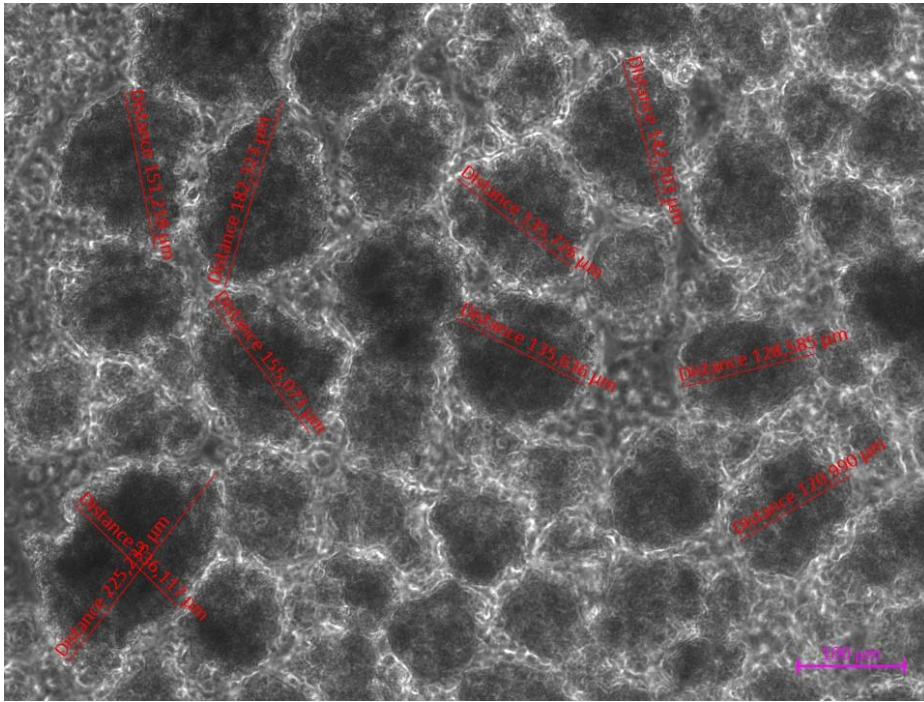
Şekil 28. Flow sitometri Everolimus IC₅₀ + Metformin 29,73mM grubu sonuçları

ÜÇ BOYUTLU (3D) HÜCRE KÜLTÜRÜ YÖNTEMİ İLE SPHEROİD OLUŞUMU DENEYİ SONUÇLARI

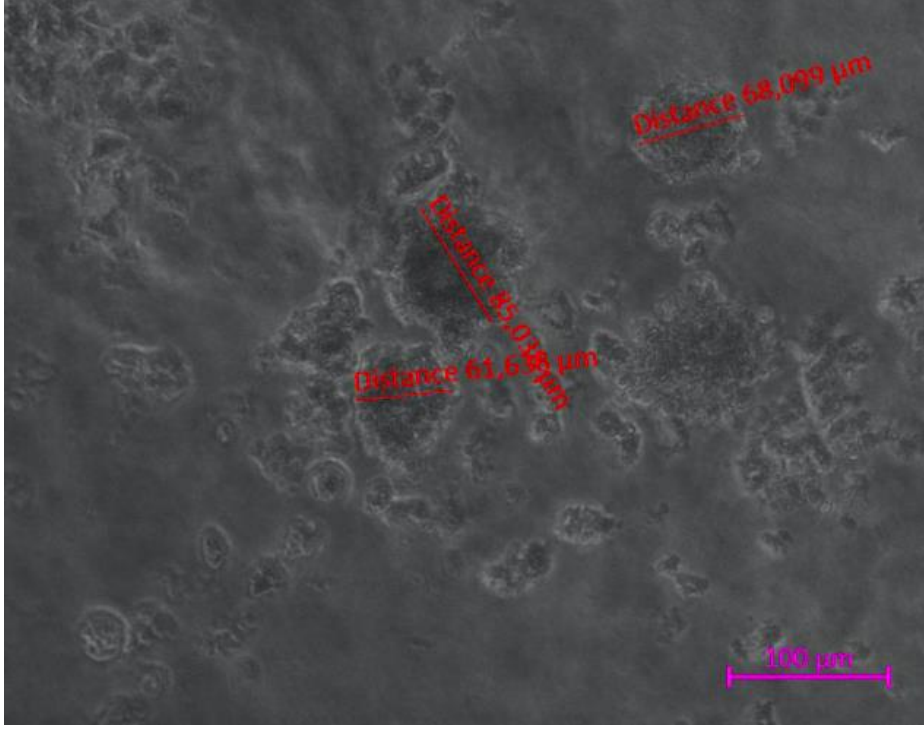
Kontrol ve doz grupları belirli saat aralıklarla inverted mikroskop ile görüntülenmiştir. Dozların IC₅₀ süresi olan 48. saat görüntülerinde sferoidlerin sayısında azalma, boyutlarında küçülme ve sınır düzensizlikleri tespit edilmiştir. Kontrol grubunda en küçüğü 120 µm, en büyükleri 225 µm olmak üzere ortalama 160-180 µm olan çok sayıda sferoid görülmüştür. Doz gruplarında Everolimus IC₅₀ grubundaki sferoidlerin ortalamaları 71,33 µm, Lityum IC₅₀ grubundaki sferoidlerin ortalamaları 90 µm, Metformin IC₅₀ grubu 97,5 µm, Everolimus IC₅₀ + Metformin IC₅₀ grubundaki sferoidlerin ortalamaları 96,4 µm, Everolimus IC₅₀ + Lityum IC₅₀ grubundaki sferoidlerin ortalamaları 97 µm, Everolimus IC₅₀ + Metformin IC₅₀ + Lityum IC₅₀ grubundaki sferoidlerin ortalamaları 80 µm olarak tespit edilmiştir. Sonuçlar Şekil 29-36'daki resimlerde gösterilmiştir.



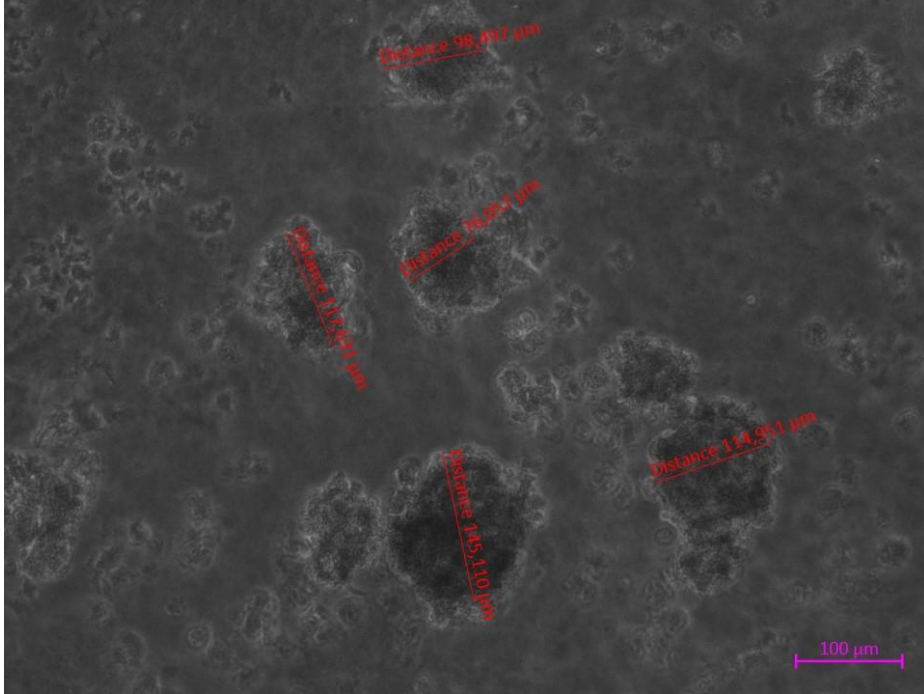
Şekil 29. Kontrol sferoid görüntüsü (5X)



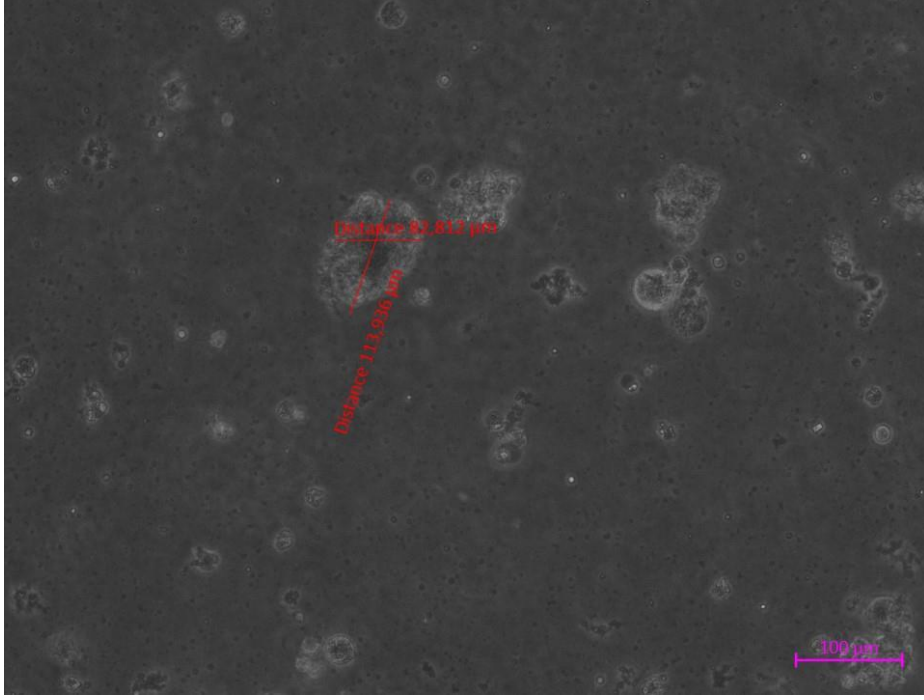
Şekil 30. Kontrol sferoid görüntüsü (10X)



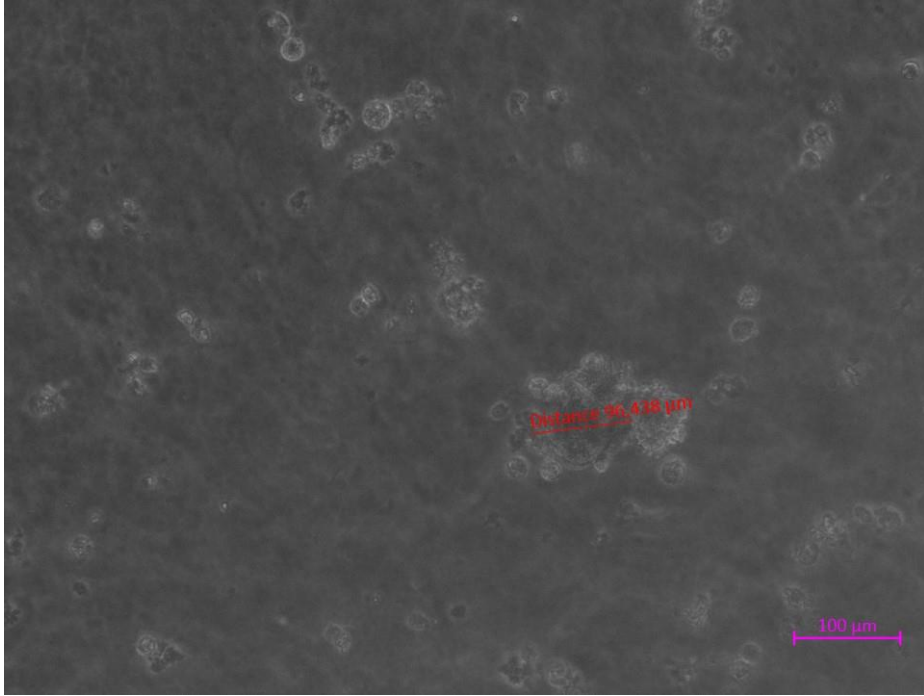
Şekil 31. Everolimus IC₅₀ grubu 48.saat sferoid görüntüsü (10X)



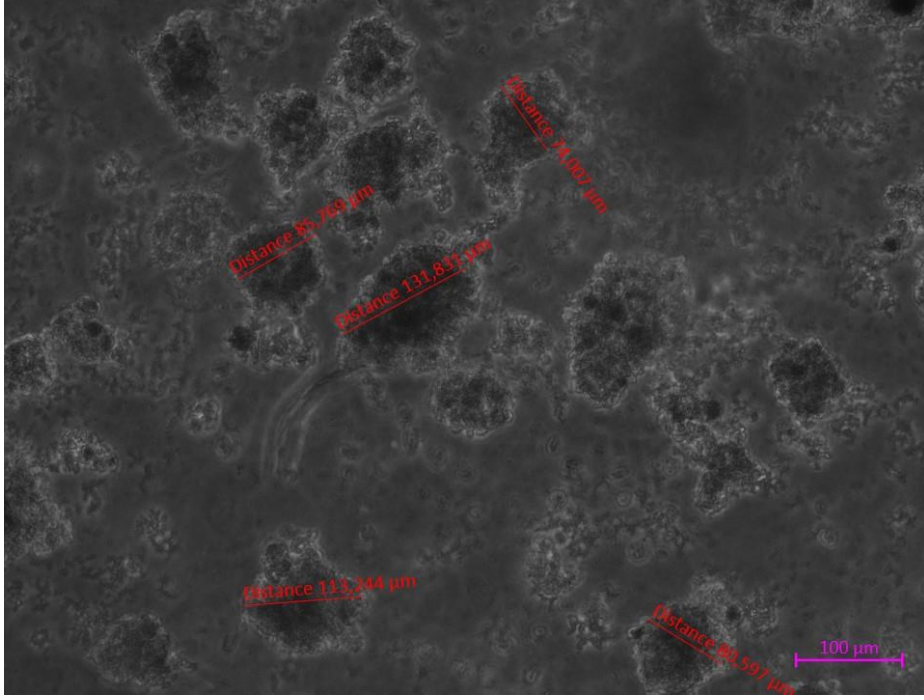
Şekil 32. Lityum IC₅₀ grubu 48.saat sferoid görüntüsü (10X)



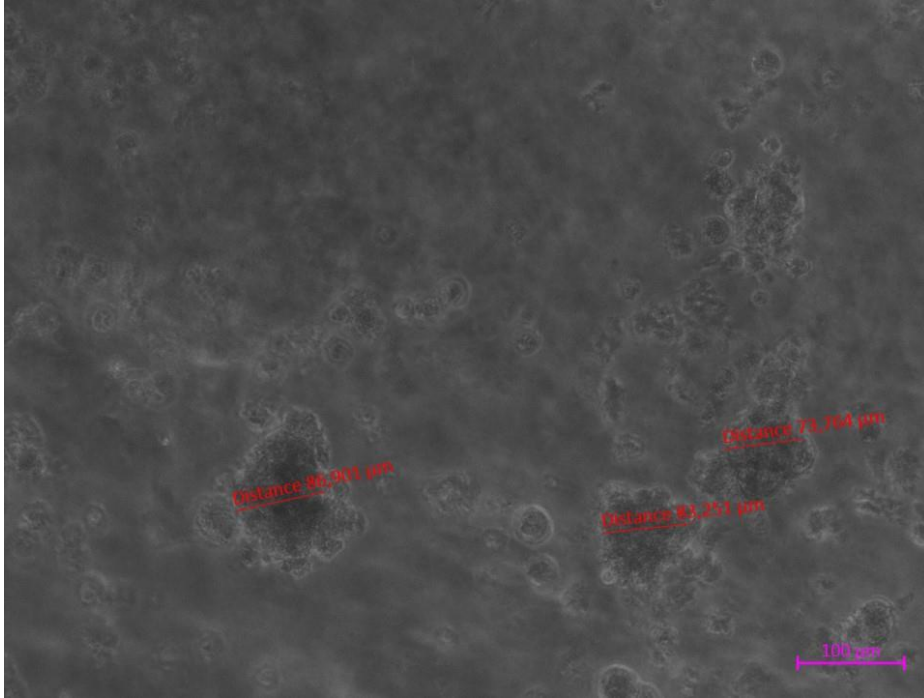
Şekil 33. Metformin IC₅₀ grubu 48.saat sferoid görüntüsü (10X)



Şekil 34. Everolimus IC₅₀ + Metformin IC₅₀ grubu 48.saat sferoid görüntüsü (10X)



Şekil 35. Everolimus IC₅₀ + Lityum IC₅₀ grubu 48.saat sferoid görüntüsü (10X)



Şekil 36. Everolimus IC₅₀ + Metformin IC₅₀ + Lityum IC₅₀ grubu 48.saat sferoid görüntüsü (10X)

ELİSA DENEYİ SONUÇLARI

ELİSA sonuçları incelendiğinde; PI3K için kontrol grubuna göre en yüksek değer Everolimus IC₅₀ + met29,73mM grubunda (0,752±0,062), en düşük değer ise Everolimus IC₅₀ + Lityum IC₅₀ grubunda bulundu (0,333 ±0,0007).

Kontrol grubuna göre en yüksek mTOR değeri Everolimus IC₅₀ grubunda (0,499± 0,012) en düşük değer ise Everolimus IC₅₀ + Metformin IC₅₀ grubunda (0,178 ±0,07) izlendi.

Midkine sonuçlarına bakıldığında tüm grupların kontrol grubundan düşük olduğu saptandı. Gruplar arasında en düşük Midkine değeri Metformin IC₅₀ grubunda (9,485± 5,205) en yüksek değer ise Everolimus IC₅₀ + Metformin IC₅₀ (25,4± 2,47) grubunda gözlemlendi.

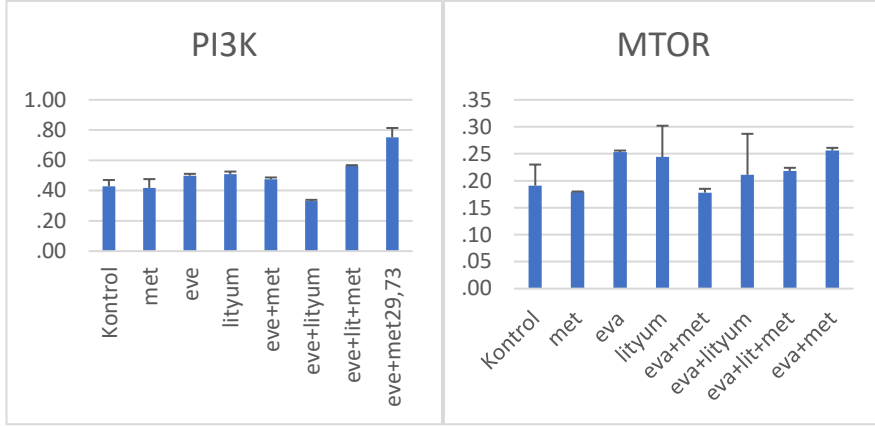
AKT değerlerinden kontrol grubuna göre en yüksek değer Everolimus IC₅₀ + Lityum IC₅₀ grubunda (139,49± 4,5) en düşük değer ise Metformin IC₅₀ grubunda (11,32 ±2,69) belirlendi.

AMPK değeri ise kontrol grubuyla karşılaştırıldığında en yüksek Everolimus IC₅₀ + met29,73mM grubunda (4,241± 0,731) en düşük ise Metformin IC₅₀ grubunda (0,652 ±0,148) bulundu.

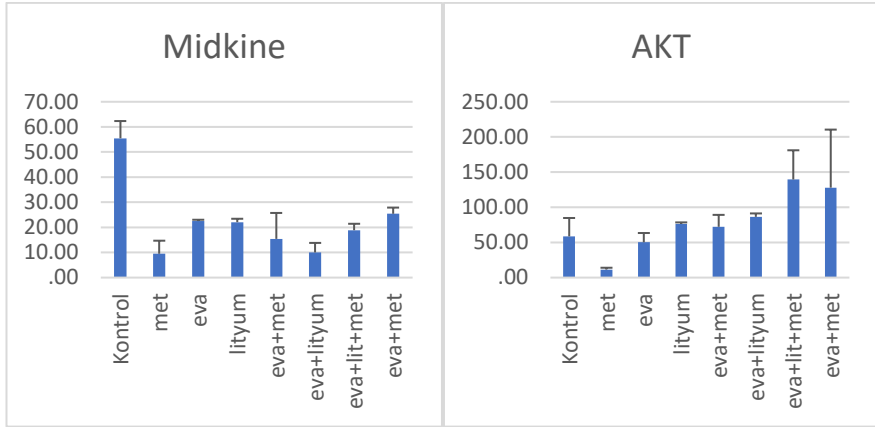
Çalışmada elde ettiğimiz veriler Tablo 17' de ve Şekil 37,38,39'da verilmiştir.

Tablo 17. ELİSA kontrol ve doz grupları sonuçları

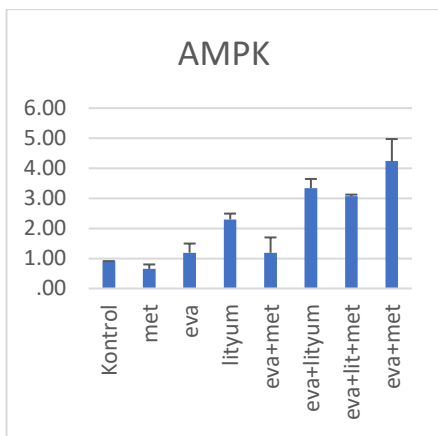
		PI3K	MTOR	Midkine	AKT	AMPK
Kontrol	A.O±S.S.	0.428 ± 0.042	0.191 ± 0.039	55.44 ± 6.89	58.56 ± 26.19	0.897 ± 0.014
	min - maks	0.386 - 0.47	0.152 - 0.229	48.55 - 62.33	32.37 - 84.75	0.883 - 0.911
Met IC50	A.O±S.S.	0.418 ± 0.058	0.179 ± 0.001	9.485 ± 5.205	11.321 ± 2.669	0.652 ± 0.148
	min - maks	0.36 - 0.476	0.178 - 0.18	4.28 - 14.69	8.652 - 13.99	0.505 - 0.8
Eve IC50	A.O±S.S.	0.499 ± 0.012	0.253 ± 0.003	22.49 ± 0.54	50.19 ± 13.2	1.192 ± 0.304
	min - maks	0.488 - 0.511	0.25 - 0.256	21.95 - 23.03	36.99 - 63.39	0.888 - 1.496
Lityum IC50	A.O±S.S.	0.508 ± 0.018	0.244 ± 0.058	22.05 ± 1.37	76.427 ± 2.055	2.296 ± 0.196
	min - maks	0.49 - 0.526	0.186 - 0.303	20.68 - 23.42	74.37 - 78.48	2.1 - 2.492
eve+met	A.O±S.S.	0.476 ± 0.011	0.178 ± 0.007	15.409 ± 10.322	72.167 ± 16.995	1.187 ± 0.512
	min - maks	0.465 - 0.488	0.171 - 0.186	5.086 - 25.73	55.17 - 89.16	0.675 - 1.699
eva+lityum	A.O±S.S.	0.332 ± 0.007	0.211 ± 0.076	10.009 ± 3.801	86.337 ± 4.875	3.342 ± 0.302
	min - maks	0.326 - 0.339	0.135 - 0.288	6.208 - 13.81	81.46 - 91.21	3.041 - 3.644
eva+lit+met	A.O±S.S.	0.564 ± 0.004	0.218 ± 0.006	18.86 ± 2.56	139.497 ± 41.505	3.07 ± 0.053
	min - maks	0.56 - 0.568	0.212 - 0.223	16.3 - 21.42	97.99 - 181	3.017 - 3.123
eva+met 29,73mM	A.O±S.S.	0.752 ± 0.062	0.256 ± 0.005	25.4 ± 2.47	127.87 ± 82.545	4.241 ± 0.731
	min - maks	0.69 - 0.815	0.251 - 0.261	22.93 - 27.87	45.31 - 210.4	3.511 - 4.972



Şekil 37. A) PI3K ve B) MTOR ELİSA sonuçları sütun grafiği



Şekil 38. A) Midkine ve B) AKT ELİSA sonuçları sütun grafiği



Şekil 39. AMPK ELİSA sonuçları sütun grafiği

TARTIŞMA

Hücrelerin çeşitli nedenlerle kontrolü kaybedip, anormal biçimde çoğalmaları ile karakterize kompleks bir hastalık olan kanser, normal vücut işleyişini durdurmakta ve bazen ölüme neden olabilecek durumlara yol açmaktadır.

Endometriumun primer malign epitelyal tümörü olan endometrial kanser, kadın genital sisteminin en sık görülen malignitesidir (86, 110). Batı Avrupa'daki kadınlarda (kansere nedeniyle tüm ölümlerin %1-2'si) ölüm nedeni olarak 7. sırada yer almaktadır (2, 167). Bu yıl tahmini 61.880 yeni tanı ve beklenen 12.160 ölümlerle Amerika Birleşik Devletleri'nde en yaygın jinekolojik malignitedir. Endometrial kanser ile ilişkili hem insidans hem de ölüm oranı artmaya devam ediyor. Taksan bazlı kemoterapi ile daha önce tedavi görmemiş, ilerlemiş veya nükseden endometriyal kanseri olan kadınlarda, Paclitaxel yanıt oranı % 27,3'tür. Şu anda, paklitaksel ve karboplatin kombinasyonu genellikle ileri veya nükseden endometriyal kanserde birinci basamak tedavide kullanılmaktadır. Ancak ikinci basamak tedavinin odak noktası, taksan dışı tedavi olmuştur. Etoposide, lipozomal doksorubisin ve topotekan dahil olmak üzere incelenen diğer ajanlar, % 4-13 arasında yanıt oranı ile umut verici sonuçlardan daha azını göstermiştir. Sonuç olarak, klinik araştırma çalışmalarının ana odağı alternatif tedavi stratejilerini içermektedir (157,168).

Mutter ve ark. Kanser Genom Atlası ve diğer moleküler çalışmalarında, PI3K / AKT / mTOR yolağındaki anormalliklerin endometrioid endometriyal kanserde (tip I) yaygın olduğunu ve tümörlerin % 80'ine kadar PTEN kaybı bulunduğunu tespit etmiştir (169). PTEN ve PIK3CA'daki mutasyonlar, tümörlerin %50'sine kadar tanımlanmıştır.

Çalışmamızda Everolimus IC₅₀ + Metformin IC₅₀ + Lityum IC₅₀ dozu uyguladığımız grupta ve Metformin IC₅₀ dozu uygulanan grupta PTEN tümör süpresif geninde RT-PCR sonucunda kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı artış saptanmıştır.

Soliman ve ark. bir dizi çalışma, tek ajan mTOR inhibisyonunun rekürren endometriyal kanserde tedavi olarak değerlendirmiştir (157).

Obezite, diyabet, hiperinsülinemi ve endometrial kanser arasındaki ilişki, Metformin gibi glukoz metabolizmasını hedef alan ilaçların, bu tür malignitelerin önlenmesinde veya tedavisinde etkili olabileceği hipotezine yol açmıştır. Bu alanda

dikkat çeken bir ilaç, tip 2 diyabet tedavisinde kullanılan birinci basamak oral antihiperglisemik ajan olan Metformin (1,1-dimetilbiguanid) olmuştur. Genel olarak etkileri, kan şekeri konsantrasyonlarının düşürülmesini, insülin duyarlılığının artırılmasını ve plazma açlık insülin seviyelerinin azaltılmasını içerir. Ayrıca, bazı oral hipoglisemik ilaçların ve insülinin aksine, Metformin kullanıcıları sürekli kilo kaybına doğru bir eğilim göstermektedir. Metforminin düşük toksisitesi, onu potansiyel bir yardımcı tedavi veya hatta kemoterapiye kontrendikasyonları olan veya doğurganlığı koruma isteği gibi düşünceler için monoterapi olarak ilginç kılmaktadır (158, 159).

Birçok grup, Metforminin, oksidatif fosforilasyonu (OXPHOS) mitokondriyal seviyede inhibe etme kabiliyetinin biyolojik aktivitesinin önemli bir aracı olduğunu göstermiştir. Sonuçta, iç mitokondriyal zar boyunca proton gradyanında bir azalma meydana gelir, sonuçta proton güdümlü adenosin trifosfat (ATP) sentezinde azalma ve ATP'ye hücrel adenosin monofosfatın (AMP) oranının artmasına neden olur. ATP'deki düşüş, Metformin tedavisinin anahtar etkisidir. 5'AMP ile aktive olan protein kinaz (AMPK) enzimi hücrel enerji homeostazında, büyük ölçüde glikoz ve yağ asidi alımını sağlayan, hücrel enerji düşük olduğunda ise oksidasyonun aktifleşmesinde rol alan bir enzimdir. AMPK'nin aktivasyonu, AMPK aracılı fosforilasyon ve ATP tüketen sentetik yollarda (örneğin, glikoz, lipid ve protein) yer alan anahtar enzimlerin ve transkripsiyon faktörlerinin inhibisyonu yoluyla hücreleri katabolik duruma geçirir (158, 159). Ayrıca AMPK aktivasyonunun bilinen aşağı akım etkileri arasında, mTOR yolağının inhibisyonuna bağlı olarak protein sentezinin azalması da vardır (160, 161). Metformin ile tedavi edilen endometriyal kanser hücrelerinde PI3K/AKT sinyalinin inhibisyonu da gözlenmiştir (162).

Daha önce, endometriyal kanser cerrahisinden önce kullanılan kısa bir oral Metformin kürünün doku düzeyinde AKT/mTOR yolunun aşağı regülasyonu ile sonuçlandığı gösterilmiştir.

Soliman ve ark. tarafından yapılan bir dizi çalışmada endometriyal kanserin bir ksenograft fare modeli kullanılmış, metforminin hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini, apoptozu indüklediğini ve KRAS mutasyonlarını aktive eden hücrelerde tümör büyümesini azalttığını göstermiştir (168, 170).

Iglesias ve ark. ile Soliman ve arkadaşlarının yaptıkları iki ayrı çalışmada metforminin, MAPK sinyal yolunun ayrılmasına neden olarak, yapısal olarak aktif KRAS'ı hücre zarından uzaklaştırdığını göstermiştir (170,171).

Ayrıca Soliman ve ark. metforminin AMPK' ı aktive edip mTOR inhibisyonu yaptığını ve endometriyal kanserdeki diğer birçok çalışmada olduğu gibi, PTEN veya PIK3CA mutasyonunun varlığının, mTOR inhibisyonuna yanıt ile ilişkili bulunmadığını tespit etmiştir (168).

Yapılan bazı çalışmalarda; PI3K/AKT/mTOR yolağı, geleneksel tedavilere direnç kazandırmakla ilişkilendirilmiştir ve bu nedenle PI3K/AKT/mTOR yolağı inhibitörleri hormonal ve/veya sitotoksik ajanlarla kombinasyon halinde değerlendirilmektedir (151, 152, 153, 154).

Everolimus, şu anda çeşitli ülkelerde tedaviye dirençli renal hücreli karsinom ilerleyici, geri dönüşümsüz, ilerlemiş pankreas nöroendokrin tümörleri, renal anjiyomiyolipom ve tübüler skleroz kompleksi ile ilişkili subependimal dev hücreli astrositomalar için onaylanmış bir mTOR inhibitörüdür.

Yapılan bazı çalışmaların klinik öncesi verileri, mTOR inhibisyonunun, endometrial kanserde fayda sağlayabileceğini göstermektedir (155, 156, 157).

Çalışmamızda RT-PCR sonuçlarında mTOR ve AKT değerlerinde istatistiksel anlamlı azalma saptanmamıştır.

Yaptığımız ELİSA deneyi sonuçlarında ise, kontrol grubuna göre en yüksek mTOR değeri Everolimus IC₅₀ grubunda (0,499 ± 0,012) en düşük değer ise Everolimus IC₅₀ + Metformin IC₅₀ grubunda (0,178 ± 0,07) izlendi. Ayrıca AKT değerlerinden kontrol grubuna göre en yüksek değer Everolimus IC₅₀ + Lityum IC₅₀ + Metformin IC₅₀ grubunda (139,49 ± 4,5) en düşük değer ise Metformin IC₅₀ grubunda (11,32 ± 2,69) belirlendi.

AMPK değeri ise kontrol grubuyla karşılaştırıldığında en yüksek Everolimus IC₅₀ + Metformin 29,73mM grubunda (4,241 ± 0,731) en düşük ise Metformin IC₅₀ grubunda (0,652 ± 0,148) bulundu.

Endometrial kanserlerin en yaygın olanı tip 1 (endometrioid)'dir ve östrojen bağımlıdır. Genellikle var olan endometrial hiperplazi zemininde gelişir (86, 117). GSK3β, AKT'nin hedefleri arasındadır. Uterin epitel hücrelerinde, PI3K-AKT-GSK3β sinyal yolu, östrojen ve progesteron ile düzenlenir (172). Endometrial kanserde,

GSK3 β aktivitesinin inhibisyonu, in vitro ve in vivo hücre proliferasyonunun inhibisyonu ile ilişkilidir. GSK3 β 'nin endometrial kanserde aşırı eksprese edildiği gösterilmiştir bu kanser evresiyle koreledir (173). Lityum klorür (LiCl), psikotik hastalıklarda özellikle bipolar bozuklukta 19. yüzyıldan beri kullanılan güvenlik aralığı iyi bilinen bir ajandır. LiCl ile yapılan önceki çalışmalar kolorektal kanser, mide kanseri ve nöroblastomunda içinde yer aldığı çeşitli kanserlerde antineoplastik etkilere sahip olduğunu göstermiştir (12, 163, 164). LiCl'nin özellikle GSK3 β inhibisyonuna bağlı antineoplastik etkisi olduğu gösterilmiştir (165).

Çalışmamızda; RT-PCR sonucunda lityumun AKT değerlerine istatistiksel anlamlı bir değişimi saptanmamıştır.

ELISA sonuçlarımızda ise; PI3K için kontrol grubuna göre en yüksek değer Everolimus IC₅₀ + met29,73mM grubunda (0,752 \pm 0,062) ve Everolimus IC₅₀ + Lityum IC₅₀ + Metformin IC₅₀ (0,564 \pm 0,004), en düşük değer ise Everolimus IC₅₀ + Lityum IC₅₀ grubunda bulundu (0,333 \pm 0,0007).

Ayrıca AKT değerlerinden kontrol grubuna göre en yüksek değer Everolimus IC₅₀ + Lityum IC₅₀ + Metformin IC₅₀ grubunda (139,49 \pm 4,5) ve Everolimus IC₅₀ + met29,73mM grubunda (127,87 \pm 82,545) en düşük değer ise Metformin IC₅₀ grubunda (11,32 \pm 2,69) belirlendi.

Bu sonuçlara göre Everolimus IC₅₀ + Lityum IC₅₀ + Metformin IC₅₀ grubu ve Everolimus IC₅₀ + met29,73mM grubununun PI3K-AKT-GSK3 β sinyal yolu üzerinden Ishikawa hücre proliferasyonu azalttığını tespit ettik.

Midkine (MK) heparin bağlayıcı büyüme faktörüdür. Embriyogenez sırasında retinoik aside yanıt veren bir genin ürünü olarak bildirilmiştir. Şu anda normal doku homeostazı ve hastalık gelişimine katkıda bulunan çok yönlü bir faktör olarak tarif edilmiştir. Çeşitli kanser türlerinde artmış MK ekspresyonuna sahiptir. Hücre büyümesi, hayatta kalma, metastaz, göç ve anjiyogenez dahil olmak üzere kanser hücrelerinin kritik özellikler edinmesi için bir aracı görevi vardır.

Tanabe ve ark. nın yaptığı çalışmalar ile Filippou ve ark. yaptığı çalışmalar endometrial kanser hastalarında MK ekspresyonunu normal endometriyuma göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmalarda preoperatif serum MK seviyeleri prognoz ve lenf nodu metastazının varlığı ile önemli ölçüde ilişkili bulunmuştur. Ayrıca, preoperatif serum MK seviyeleri prognoz ve lenf nodu metastazının varlığı ile

ilişkili bulunmuştur ve MK'nin yüksek riskli endometriyal karsinom hastalarını tanımlamak için yararlı bir serum biyobelirteci olabileceğinden bahsedilmiştir (175,176).

Biz çalışmamızda yaptığımız RT-PCR sonuçlarında; Everolimus IC₅₀ uygulanan grupta MK ekspresyonu kontrol grubuna göre 211,82 kat düşük bulunmuştur. Everolimus IC₅₀ + Metformin 29,73 mM uygulanan grupta 2,35 kat, Lityum IC₅₀ uygulanan grupta 2,54 kat düşük bulunmuştur. Diğer gruplarda belirgin bir değişiklik gözlenmemiştir.

Midkine değerlerine ELİSA ile baktığımızda ise; tüm gruplardaki değerlerin kontrol grubuna göre düşük olduğu saptandı. Gruplar arasındaki en düşük Midkine değeri Metformin IC₅₀ grubunda (9,485± 5,205) en yüksek değer ise Everolimus IC₅₀ + Metformin IC₅₀ (25,4± 2,47) grubunda gözlemlendi.

p53'ün normalde esas fonksiyonu, DNA hasar aldığı anda, hücre döngüsü ve proliferasyonunu durdurup hasar tamiri için hücreye zaman kazandırmaktadır. p53, p21'in sentezini arttırarak hücre proliferasyonunu bloke eder ve hücre döngüsü inhibitörlerinin transkripsiyonel aşırı düzenlenmeleri hücreyi G2-M arrestine götürür.

Sonuç olarak, p53 hem G1-S hem de G2-M arrestine aracılık yapmıştır. Hücre siklusunun durması hücreye zaman kazandırır ve hasarlanmış DNA'nın tamir edilmesi için hücre zaman kazanır.

Oda ve ark. yaptığı çalışmaya göre hasar tamir edilemeyecek kadar büyükse bu kez p53 hücreyi apoptoza götürür (174).

Çalışmamızdaki RT-PCR sonuçlarında; Everolimus IC₅₀ + Metformin 29,73 mM ve Everolimus IC₅₀ + Metformin IC₅₀ + Lityum IC₅₀ maruziyeti sonucunda p53 ekspresyonu kontrol grubuna göre 11,34 ve 4,34 katlık bir artış göstermiştir. Buna göre bu gruplarda apoptozun p53 üzerinden tetiklendiğini göstermiş olduk.

Apoptoz temel olarak; TNF (TNF α) varlığı veya büyüme faktörü yokluğuna bağlı ekstrinsik yol veya DNA hasarı, ER stresi ya da mitokondriden tetiklenen intrinsik yol ile başlatılır. Apoptotik süreç hücre içi ya da hücre dışında başlamış olsada kaspazlar adı verilen proteolitik enzimler tarafından gerçekleştirilir. Ekstrinsik yoldan, ölüm reseptörleri adı verilen birçok reseptör tarafından aktif olarak uyarılır. TNF α ve Fas reseptörleri en iyi örnekleridir ve hücre zarında bulunan integral membran protein yapısındadırlar. Hücre zarında bulunan kendileri için özgün

reseptörlere bağlanan ligandlar prokaspaz-8'i iki farklı büyüklükte parçaya böler. Başlatıcı kaspaz denen aktif kaspaz-8, inaktif durumda olan kaspaz 9, kaspaz 6 ve kaspaz7'nin aktifleşmesini sağlar. Aktif kaspaz8, Bcl-2 ailesi üyelerinden proapoptotik bir protein olan bid'in aktifleşmesini bu da mitokondriden sitokrom c salınımı ve kaspazların aktifleşmesine yol açar.

Çalışmamızın RT-PCR sonucuna göre Eve IC₅₀ + Lit IC₅₀ , Eve IC₅₀ + Lit IC₅₀ + Met IC₅₀ ve Eve IC₅₀ + Met 29,73 dozlarının uygulandığı gruplarda TNF değerlerinde sırasıyla; 34,70 kat, 14,29 kat ve 8,42 katlık istatistiksel anlamlı artış saptanmıştır. Bu gruplarda Bax geninde anlamlı değişiklikler bulunmaması apoptotik yolağın intrinsik yoldan ziyade TNF gibi hücre yüzey reseptörleri ekspresyonundaki artış ile ekstrinsik yoldan gerçekleştiğini düşündürmüştür.

Eve IC₅₀ + Met IC₅₀ dozu uygulanan grupta, TNF de istatistiksel anlamlı artış gözlenmeyip, Bax ekspresyonunda 4,41 kat ve kaspaz 9 ekspresyonunda 7,43 kat istatistiksel anlamlı artış gözlenmiştir. Bu artış bu doz grubunda apoptozun intrinsik yolla indüklendiğini düşündürmektedir.

Eve IC₅₀ dozu uygulanan grupta, FASL da 2,11, Metformin IC₅₀ dozu uygulanan grupta 1,87 kat istatistiksel anlamlı artış gözlenmesi apoptozun ekstrinsik yolla aktive olduğunu düşündürmüştür.

Lit IC₅₀ uygulanan grupta kaspaz 8 de 4,92 kat azalma, kaspaz 9 da 4,75 kat artış olması da bize apoptotik yolağın intrinsik mekanizma ile gerçekleşmiş olabileceğini düşündürmüştür.

Farklı kanser hücrelerinde yapılan çalışmalarda uygulanan maddelerin apoptoza etkisi flow sitometri ile değerlendirilmiştir. Ariaans ve arkadaşları, glukoz bağımlı meme kanseri hücre hatlarında, metformin ve everolimusun apoptozu artırdığını göstermişlerdir. Tai ve ark. prostat kanseri üzerinde, everolimusun otofaji ve apoptozu artırdığını bildirmişlerdir. Wu ve arkadaşları over kanserinde; Park ve arkadaşları ilaca dirençli rektal kanser üzerinde yaptıkları çalışmalarda metforminin apoptozu artırdığını flow sitometrik olarak tespit etmişlerdir. Ayrıca lityumun da kolorektal ve pankreas kanserinde apoptozu artırdığı bildirilmiştir (181,182).

Çalışmamızda everolimus, metformin ve lityumun Ishikawa hücrelerine olan apoptotik etkilerini flow sitometri testi ile değerlendik. Sonuçlarımızda kontrol grubunda: % 98,28 canlı hücre, %1,07 nekrotik hücre, % 0,65 geç apoptotik hücre

tespit edildi ve erken apoptozda hücreye rastlanmadı. Doz gruplarında ise canlı hücre %2,43 - 7,68, nekrotik hücre % 4,07 - 13,26, geç apoptotik hücre % 81,49 – 92,12, erken apoptotik hücre % 0,27 – 7,10 arasında tespit edilmiştir. En düşük canlı hücre yüzdesi Everolimus IC₅₀ dozu grubunda; en yüksek geç apoptoz yüzdesi ise Everolimus IC₅₀ + Metformin 29,73 mM doz grubunda gözlenmiştir.

Araujo ve arkadaşlarının kolorektal kanser üzerinde yaptıkları çalışmada; lityumun kanser hücrelerinde invazyon ve migrasyon kapasitesini düşürdüğü ve koloni oluşumunu azalttığı gösterilmiştir (182).

Çalışmamızda kontrol ve doz grupları kıyaslandığında invazyon kapasitesinin kontrol grubuna göre belirgin şekilde azaldığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda yaptığımız migrasyon deneyi ile de tüm gruplarda kontrole oranla migrasyon ve hücre-hücre etkileşiminin azalmış olduğunu görüntüledik.

Bazı kanser çalışmalarında; metformin, everolimus ve lityumunun koloni formasyonunu azalttığı ortaya konmuştur (177,178,180,182).

Bizim çalışmamızda özellikle başta Everolimus IC₅₀ + Metformin IC₅₀ grubu ve Everolimus IC₅₀ + Metformin IC₅₀ + Lityum IC₅₀ grubu olmak üzere tüm gruplarda Ishikawa hücrelerinde koloni sayısı kontrol grubuna göre belirgin olarak baskılanmıştır.

Ishikawa hücrelerinde Everolimus, Lityum, Metformin maddelerinin tekli ve kombine dozlarının hücre-hücre etkileşimi ve hücre migrasyonuna etkisini belirlemek için Wound healing deneyi yapıp 0, 16 ve 24. saatte ışık mikroskopi ile görüntülerini aldık. Çalışmamızda, doz gruplarında hücre migrasyonunun kontrol grubuna göre belirgin şekilde baskılandığı tespit edilmiştir.

Çalışmamızda in vitro Ishikawa sferoid modeli oluşturulmuştur. Kontrol grubunda ortalama 160-180 µm boyutlarında çok sayıda sferoid görülmüştür. Dozların uygulandığı gruplarda sferoid sayısı azalmış, boyutları küçülmüş ve şekil düzensizlikleri oluşmuştur. Literatürde benzer bir çalışma bulunmadığı için kıyaslama yapılamamış olup, çalışmamızın dozlarını kendi içinde kıyasladığımızda kontrol grubuna göre sferoid boyutundaki küçülme en fazla everolimus IC₅₀ grubunda (sferoid ortalamaları 71,33 µm) gözlenmiştir.

SONUÇ

Artan kanser insidansı ve tedavide karşılaşılan zorluklar alternatif yöntemlerin araştırılması açısından ilgi çekmektedir. Hücre döngüsündeki olayları düzenleyen ve kontrol eden çok kompleks mekanizmalar vardır. Kemoterapi tedavisinde kullanılan mevcut ilaçlar olmakla beraber yan etkisi az ve etki gücü yüksek olabilecek yeni potansiyel ajanlar açısından apoptoz ilişkili mekanizmalar büyük öneme sahiptir.

Yaptığımız çalışmalar sonucunda everolimus, metformin, lityumun tekli ve kombine dozları Ishikawa hücrelerinde;

- Hücre proliferasyonunu azaltmıştır.
- Flow sitometride kontrol grubu ile tüm doz grupları arasında apoptoz ve hücre canlılığı açısından anlamlı fark bulundu. Ayrıca en düşük canlı hücre yüzdesi Everolimus IC₅₀ dozu grubunda; en yüksek geç apoptoz yüzdesi ise Everolimus IC₅₀ + Metformin 29,73 mM doz grubunda gözlenmiştir.
- Hücre invazyonunu ve migrasyonun azaltılmasında etkili olmuştur.
- Kontrol grubuna göre koloni sayısını anlamlı derecede azaltmıştır. En düşük koloni sayısı Everolimus IC₅₀ + Metformin IC₅₀ grubunda (50,3 ± 13,5) bulunmuştur.
- Üç boyutlu hücre kültüründeki sferoidlerin boyutlarında azalma, şekil düzensizliği ve sayıca azalmaya yol açmıştır. kontrol grubuna göre sferoid boyutundaki küçülme en fazla Everolimus IC₅₀ grubunda (sferoid ortalamaları 71,33 µm) gözlenmiştir.

Tüm bu sonuçlar Everolimus, Lityum ve Metforminin, endometrial karsinom tedavisinde alternatif potansiyel ajan olarak kombine dozlar olarak kullanılabileceği konusunda umut vermiştir.

KAYNAKLAR

1. UpToDate. <https://www.uptodate.com/contents/endometrial-carcinoma-clinical-features-diagnosis-prognosis-and-screening> Erişim tarihi: 1 Mayıs 2020.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* . 2015 Mar 1 136(5):E359–86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25220842/>
3. Colombo N, Creutzberg C, Amant F, Bosse T, González-Martón A, Ledermann J, et al. ESMO-ESGO-ESTRO consensus conference on endometrial cancer: Diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* . 2016 Jan 1 27(1):16–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26634381/>
4. Nyen T Van, Moiola CP, Colas E, Annibaldi D, Amant F. Modeling endometrial cancer: Past, present, and future . Vol. 19, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2018 p. 2348. Available from: www.mdpi.com/journal/ijms
5. Practice Bulletin No. 149: Endometrial cancer. *Obstet Gynecol* . 2015 Apr 1 125(4):1006–26. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25798986/>
6. Furness S, Roberts H, Marjoribanks J, Lethaby A. Hormone therapy in postmenopausal women and risk of endometrial hyperplasia. *Cochrane Database Syst Rev* . 2012 Aug 15 (2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19370558/>
7. Henderson BE. The cancer question: An overview of recent epidemiologic and retrospective data. *Am J Obstet Gynecol*. 1989. 161(6):1859–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2690639/>
8. Strom BL, Schinnar R, Weber AL, Bunin G, Berlin JA, Baumgarten M, et al. Case-control study of postmenopausal hormone replacement therapy and endometrial cancer. *Am J Epidemiol*. 2006. 164(8):775–86. Available from: <https://ohsu.pure.elsevier.com/en/publications/case-control-study-of-postmenopausal-hormone-replacement-therapy--2>
9. Felix AS, Yang HP, Bell DW, Sherman ME. Epidemiology of endometrial carcinoma: Etiologic importance of hormonal and metabolic influences. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology* . Springer New York LLC; 2017 p. 3–46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27910063/>
10. Bokhman J V. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol*. 1983. 15(1):10–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6822361/>

11. Piulats JM, Guerra E, Gil-Martín M, Roman-Canal B, Gatius S, Sanz-Pamplona R, et al. Molecular approaches for classifying endometrial carcinoma . Vol. 145, *Gynecologic Oncology*. Academic Press Inc.; 2017 p. 200–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28040204/>
12. Bilir A, Erguven M, Ermis E, Sencan M, Yazihan N. Combination of imatinib mesylate with lithium chloride and medroxyprogesterone acetate is highly active in Ishikawa endometrial carcinoma in vitro. *J Gynecol Oncol*. 2011;22(4):225–32.
13. Korch C, Spillman MA, Jackson TA, Jacobsen BM, Murphy SK, Lessey BA, et al. DNA profiling analysis of endometrial and ovarian cell lines reveals misidentification, redundancy and contamination. *Gynecol Oncol* . 2012 Oct 127(1):241–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22710073/>
14. Mendivil A, Schuler KM, Gehrig PA. Non-endometrioid adenocarcinoma of the uterine corpus: A review of selected histological subtypes . Vol. 16, *Cancer Control*. H. Lee Moffitt Cancer Center and Research Institute; 2009 p. 46–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19078929/>
15. Huvila J, Laajala TD, Edqvist PH, Mardinoglu A, Talve L, Pontén F, et al. Combined ASRGL1 and p53 immunohistochemistry as an independent predictor of survival in endometrioid endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* . 2018 Apr 1 149(1):173–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29486992/>
16. Behbakht K, Yordan EL, Casey C, DeGeest K, Massad LS, Kirschner C V., et al. Prognostic indicators of survival in advanced endometrial cancer. *Gynecol Oncol*. 1994. 55(3):363–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0090825884713072>
17. Janku F, Yap TA, Meric-Bernstam F. Targeting the PI3K pathway in cancer: Are we making headway? . Vol. 15, *Nature Reviews Clinical Oncology*. Nature Publishing Group; 2018. p.273–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29508857/>
18. Abal M, Planaguma J, Gil-Moreno A, Monge M, Gonzalez M, Baro T, et al. Molecular pathology of endometrial carcinoma: Transcriptional signature in endometrioid tumors . Vol. 21, *Histology and Histopathology*. *Histol Histopathol*; 2006. p.197–204. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16329044/>
19. Lax SF. Molecular genetic pathways in various types of endometrial carcinoma: From a phenotypical to a molecular-based classification . Vol. 444, *Virchows Archiv*. *Virchows Arch*; 2004 p. 213–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14747944/>
20. Getz G, Gabriel SB, Cibulskis K, Lander E, Sivachenko A, Sougnez C, et al. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature*. 2013 497(7447):67-73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23636398/>
21. Arıncı K, Elhan A. *Anatomi* ., 4. Baskı, Ankara: Güneş Tıp Kitabevi, 2005: 337-345

22. Netter's Obstetrics and Gynecology E-Book - Roger P. Smith - Google Kitaplar. https://books.google.com.tr/books?hl=tr&lr=&id=9GclDgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Netter's+Obstetrics+and+Gynecology.&ots=jz1J6QSxTW&sig=EA1d1K7DLQNYZmeLNKL12u5dcT8&redir_esc=y#v=onepage&q=Netter's+Obstetrics+and+Gynecology.&f=false Erişim tarihi: 19 Mayıs 2020
23. Michael HR, Kristen AA. and Richard KL. Female Genital System. In: Stacey E. Mills. Histology For Pathologists. 3th Ed, USA: Lippincott Williams&Wilkins 2007: 1011- 1063.
24. Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi. Dalçık H. Çev. Ed, 10. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2016: 264-266
25. Sadler TW. Ürogenital Sistem. Başaklar AC. Medikal Embriyoloji. 6. Baskı, Ankara: Palme Yayıncılık, 1990: 246-280.
26. Mescher AL. Junqueira's Temel Histoloji. Solakoğlu S, Çev. Ed, 13. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2016: 462-471
27. Ross MH, Pawlina W. Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas. Baykal B, Çev. Ed, 6. Baskı, Ankara: Palme Yayıncılık, 2014: 845-861
28. Eroschenko VP. diFiore'nin HİSTOLOJİ ATLASI fonksiyonel ilişkileriyle. Demir R, Çev. Ed. 12. Baskı, Ankara: Palme Yayıncılık, 2016: 505-531
29. Noe M, Kunz G, Herbertz M, Mall G, Leyendecker G. The cyclic pattern of the immunocytochemical expression of oestrogen and progesterone receptors in human myometrial and endometrial layers: Characterization of the endometrial-subendometrial unit. Hum Reprod . 1999 14(1):190–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10374119/>
30. Kim A, Lee JY, Ji Y II, Lee HH, Lee ES, Kim HY, et al. Do endometrial movements affect the achievement of pregnancy during intrauterine insemination? Int J Fertil Steril. 2015. 8(4):399–408. Available from: </pmc/articles/PMC4355927/?report=abstract>
31. Aguilar HN, Mitchell BF. Physiological pathways and molecular mechanisms regulating uterine contractility. Hum Reprod Update . 2010 Jun 14 16(6):725–44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20551073/>
32. Surgical female pelvic anatomy - UpToDate . Available from: <https://www.uptodate.com/contents/surgical-female-pelvic-anatomy>
33. Techniques Used for Imaging in Gynecology Williams Gynecology, 3e AccessMedicine McGraw-Hill Medical. Available from: <https://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1758§ionid=118166717>
34. Groothuis PG, Dassen HHNM, Romano A, Punyadeera C. Estrogen and the endometrium: Lessons learned from gene expression profiling in rodents and human . Vol. 13, Human Reproduction Update. Hum Reprod Update; 2007 p. 405–17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17584823/>

35. Cust AE. Physical Activity and Gynecologic Cancer Prevention. In: *Recent Results in Cancer Research* . 2010 p. 159–85. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-04231-7_7
36. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*. 2018 68(1):7-30. Available from: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/caac.21442>
37. Wartko P, Sherman ME, Yang HP, Felix AS, Brinton LA, Trabert B. Recent changes in endometrial cancer trends among menopausal-age US women. *Cancer Epidemiol*. 2013 Aug 37(4):374–7. Available from: </pmc/articles/PMC3679300/?report=abstract>
38. Baerwald AR, Pierson RA. Endometrial development in association with ovarian follicular waves during the menstrual cycle. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2004. 24(4):453–60. Available from: <https://europepmc.org/articles/PMC2891966>
39. Yu J, Berga SL, Johnston-MacAnanny EB, Sidell N, Bagchi IC, Bagchi MK, et al. Endometrial stromal decidualization responds reversibly to hormone stimulation and withdrawal. *Endocrinology* . 2016 Jun 1 157(6):2432–46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27035651/>
40. Deligdisch L. Hormonal pathology of the endometrium. *Mod Pathol* . 2000 13(3):285–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10757339/>
41. Deachapunya C, Poonyachoti S, Krishnamra N. Regulation of electrolyte transport across cultured endometrial epithelial cells by prolactin. *J Endocrinol*. 2008 Jun;197(3):575–82.
42. Gartner LP. *Color Atlas and Text of Histology 7th Ed*. USA: Wolters Kluwer 2018: 1342-1344.
43. The OECD. <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/43754782.pdf> Erişim tarihi: 30 Ağustos 2020
44. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* . 2018 Nov 68(6):394–424. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30207593/>
45. Doherty MT, Sanni OB, Coleman HG, Cardwell CR, McCluggage WG, Quinn D, et al. Concurrent and future risk of endometrial cancer in women with endometrial hyperplasia: A systematic review and meta-analysis. Beiki O, editor. *PLoS One*. 2020 Apr 28. 15(4):e0232231. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0232231>
46. Lortet-Tieulent J, Ferlay J, Bray F, Jemal A. International patterns and trends in endometrial cancer incidence, 1978-2013. *J Natl Cancer Inst* . 2018 Apr 1 110(4):354–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29045681/>
47. Morice P, Leary A, Creutzberg C, Abu-Rustum N, Darai E. Endometrial cancer. In: *The Lancet* . Lancet Publishing Group; 2016 p. 1094–108. Available from:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26354523/>

48. Sanderson PA, Critchley HOD, Williams ARW, Arends MJ, Saunders PTK. New concepts for an old problem: The diagnosis of endometrial hyperplasia. *Hum Reprod Update*. 2017. 23(2):232–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27920066/>
49. Reed SD, Newton KM, Clinton WL, Epplein M, Garcia R, Allison K, et al. Incidence of endometrial hyperplasia. *Am J Obstet Gynecol*. 2009 200(6):678.e1-678.e6. /pmc/articles/PMC2692753/?report=abstract
50. Ellenson LH, Ronnett BM, Kurman RJ. Precursor Lesions of Endometrial Carcinoma. In: Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract. Springer US; 2011. p.359–91. https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-1-4419-0489-8_8
51. Sobczuk K, Sobczuk A. New classification system of endometrial hyperplasia WHO 2014 and its clinical implications. Vol. 16, *Przegląd Menopauzalny*. Termedia Publishing House Ltd.; 2017 p. 107–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29507578/>
52. Abu Hashim H, Ghayaty E, El Rakhawy M. Levonorgestrel-releasing intrauterine system vs oral progestins for non-atypical endometrial hyperplasia: A systematic review and metaanalysis of randomized trials. Vol. 213, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. Mosby Inc.; 2015 p. 469–78. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25797236/>
53. Zaino R, Carinelli SG, Ellenson LH, et al: WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs. Lyon, France: WHO: 2014: 125-126.
54. Getz G, Gabriel SB, Cibulskis K, Lander E, Sivachenko A, Sougnez C, et al. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature*. 2013 497(7447):67–73. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23636398/>
55. Baak JP, Mutter GL, Robboy S, Van Diest PJ, Uytterlinde AM, Ørbo A, et al. The molecular genetics and morphometry-based endometrial intraepithelial neoplasia classification system predicts disease progression in endometrial hyperplasia more accurately than the 1994 world health organization classification system. *Cancer*. 2005 Jun 1 103(11):2304–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15856484/>
56. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015 Mar 1 136(5):E359–86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25220842/>
57. Epidemiology of Endometrial Cancer Consortium(E2C2) EGRP/DCCPS /NCI/NIH Available from: <https://epi.grants.cancer.gov/eccc/>
58. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2015 Mar 1 65(2):87–108. Available from: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/caac.21262>

59. Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet* . 2008 371(9612):569–78. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18280327/>
60. Nevadunsky NS, Van Arsdale A, Strickler HD, Moadel A, Kaur G, Levitt J, et al. Obesity and age at diagnosis of endometrial cancer. *Obstet Gynecol* . 2014 124(2PART1):300–6. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25004350/>
61. Friedenreich CM, Neilson HK, Lynch BM. State of the epidemiological evidence on physical activity and cancer prevention. *Eur J Cancer*. 2010. 46(14):2593-604. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959804910007069>
62. Talhouk A, McAlpine JN. New classification of endometrial cancers: the development and potential applications of genomic-based classification in research and clinical care. *Gynecol Oncol Res Pract* . 2016 Dec 3(1). Available from: </pmc/articles/PMC5154099/?report=abstract>
63. Murali R, Soslow RA, Weigelt B. Classification of endometrial carcinoma: More than two types . Vol. 15, *The Lancet Oncology*. Lancet Publishing Group; 2014 Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24872110/>
64. Bell DW, Ellenson LH. Molecular Genetics of Endometrial Carcinoma . Vol. 14, *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. Annual Reviews Inc.; 2019 p. 339–67. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30332563/>
65. Akhtar M, Al Hyassat S, Elaiwy O, Rashid S, Al-Nabet ADMH. Classification of Endometrial Carcinoma: New Perspectives beyond Morphology . Vol. 26, *Advances in Anatomic Pathology*. Lippincott Williams and Wilkins; 2019 p. 421–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31567131/>
66. Shapiro S, Kelly JP, Rosenberg L, Kaufman DW, Helmrich SP, Rosenshein NB, et al. Risk of Localized and Widespread Endometrial Cancer in Relation to Recent and Discontinued Use of Conjugated Estrogens. *N Engl J Med* . 1985 Oct 17 313(16):969–72. <https://europepmc.org/article/med/2995807>
67. Soliman PT, Wu D, Tortolero-Luna G, Schmeler KM, Slomovitz BM, Bray MS, et al. Association between adiponectin, insulin resistance, and endometrial cancer. *Cancer* . 2006 Jun 1 106(11):2376–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16639730/>
68. Hecht JL, Mutter GL. Molecular and pathologic aspects of endometrial carcinogenesis . Vol. 24, *Journal of Clinical Oncology*. J Clin Oncol; 2006 p. 4783–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17028294/>
69. Havrilesky LJ, Alvarez Secord A, Bae-Jump V, Ayeni T, Calingaert B, Clarke-Pearson DL, et al. Outcomes in surgical stage I uterine papillary serous carcinoma. *Gynecol Oncol* . 2007 Jun 105(3):677–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17355889/>
70. Sherman ME. Theories of endometrial carcinogenesis: A multidisciplinary approach. *Mod Pathol* . 2000 13(3):295–308. Available from:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10757340/>

71. Prat J, Gallardo A, Cuatrecasas M, Catasús L. Endometrial carcinoma: Pathology and genetics. *Pathology* . 2007 39(1):72–87. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17365824/>
72. Ellenson LH, Wu TC. Focus on endometrial and cervical cancer . Vol. 5, *Cancer Cell*. *Cancer Cell*; 2004 p. 533–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15193256/>
73. 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. Available from: <http://www.gynecologiconcology-online.net/article/S0090825813000942/fulltext>
74. Doll A, Abal M, Rigau M, Monge M, Gonzalez M, Demajo S, et al. Novel molecular profiles of endometrial cancer-new light through old windows. *J Steroid Biochem Mol Biol* . 2008 Feb 108(3–5):221–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18061438/>
75. Obesity, endogenous hormones, and endometrial cancer risk: a synthetic review. PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12496040/> Erişim tarihi: 30 Ağustos 2020
76. Siiteri PK. Adipose tissue as a source of hormones. . Vol. 45, *The American journal of clinical nutrition*. Oxford Academic; 1987 p. 277–82. Available from: <https://academic.oup.com/ajcn/article/45/1/277/4694899>
77. Shaw E, Farris M, McNeil J, Friedenreich C. Obesity and endometrial cancer. In: *Recent Results in Cancer Research* . Springer New York LLC; 2016 p. 107–36. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27909905/>
78. Mulholland HG, Murray LJ, Cardwell CR, Cantwell MM. Dietary glycaemic index, glycaemic load and endometrial and ovarian cancer risk: A systematic review and meta-analysis . Vol. 99, *British Journal of Cancer*. Nature Publishing Group;2008. p.434–41. </pmc/articles/PMC2527795/?report=abstract>
79. Zendejdel K, Nyren O, Östenson CG, Adami HO, Ekblom A, Ye W. Cancer incidence in patients with type 1 diabetes mellitus: A population-based cohort study in Sweden. *J Natl Cancer Inst* . 2003 Dec 3 95(23):1797–800. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14652242/>
80. Setiawan VW, Yang HP, Pike MC, McCann SE, Yu H, Xiang YB, et al. Type I and II endometrial cancers: Have they different risk factors? *J Clin Oncol*. 2013 Jul 10;31(20):2607–18.
81. Amant F, Moerman P, Neven P, Timmerman D, Van Limbergen E, Vergote I. Endometrial cancer. In: *Lancet* . *Lancet*; 2005 p. 491–505. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16084259/>
82. Mourits MJE, De Vries EGE, Willemse PHB, Ten Hoor KA, Hollema H, Van Der Zee AGJ. Tamoxifen treatment and gynecologic side effects: A review. Vol.

- 97, *Obstetrics and Gynecology*. 2001. p. 855–66.
83. GOLDSTEIN SR. The Effect of SERMs on the Endometrium. *Ann N Y Acad Sci* . 2006. 949(1):237–42. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1749-6632.2001.tb04027.x>
 84. Sanchez-Spitman AB, Swen JJ, Dezentje VO, Moes DJAR, Gelderblom H, Guchelaar HJ. Clinical pharmacokinetics and pharmacogenetics of tamoxifen and endoxifen . Vol. 12, *Expert Review of Clinical Pharmacology*. Taylor and Francis Ltd; 2019. p.523–36. Available from: <https://doi.org/10.1080/17512433.2019.1610390>
 85. Emons G, Mustea A, Tempfer C. Tamoxifen and endometrial cancer: A janus-headed drug . Vol. 12, *Cancers*. MDPI AG; 2020 p. 1–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32906618/>
 86. Hanby AM, Walker C, Tavassoli FA, Devilee P: *Pathology and Genetics: Tumours of the Breast and Female Genital Organs. WHO Classification of Tumours series - volume IV*. Lyon, France: IARC Press: 2003. 250pp. ISBN 92 832 2412 4. *Breast Cancer Res* . 2004 Mar 31 6(3):133. Available from: <http://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr788>
 87. Purdie DM, Green AC. Epidemiology of endometrial cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2001 15(3):341–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11476557/>
 88. Anastasi E, Filardi T, Tartaglione S, Lenzi A, Angeloni A, Morano S. Linking type 2 diabetes and gynecological cancer: An introductory overview . Vol. 56, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. Walter de Gruyter GmbH; 2018 p. 1413–25. Available from: <https://doi.org/10.1515/cclm-2017-0982>
 89. Evans AT, Gaffey TA, Malikasian GD, Annegers JF. Clinicopathologic review of 118 granulosa and 82 theca cell tumors. *Obstet Gynecol* . 1980 Feb 1 55(2):231–8. Available from: <http://europepmc.org/article/med/6243409>
 90. Szewczuk W, Szewczuk O, Czajkowski K, Grala B, Semczuk A. Ovarian adult-type granulosa cell tumor concomitant with simple endometrial hyperplasia: a case study with selected immunohistochemistry. *J Int Med Res* . 2019 48(4):1–8. Available from: <https://us.sagepub.com/en-us/nam/open-access-at-sage>
 91. Ukah CO, Ikpeze OC, Eleje GU, Eke AC. Adult granulosa cell tumor associated with endometrial carcinoma: A case report. *J Med Case Rep* . 2011 Dec 2 5(1):340.<http://jmedicalcasereports.biomedcentral.com/articles/10.1186/1752-1947-5-340>
 92. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Rüschoff J, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* . 2004. 96(4):261–8. <https://academic.oup.com/jnci/article/96/4/261/2606710>
 93. Lu KH, Dinh M, Kohlmann W, Watson P, Green J, Syngal S, et al. Gynecologic cancer as a “sentinel cancer” for women with hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. *Obstet Gynecol* . 2005 Mar 1 105(3):569–74.

<https://creighton.pure.elsevier.com/en/publications/gynecologic-cancer-as-a-sentinel-cancer-for-women-with-hereditary>

94. Meyer LA, Broaddus RR, Lu KH. Endometrial cancer and lynch syndrome: Clinical and pathologic considerations. *Cancer Control* . 2009 Jan 1 16(1):14–22. <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/107327480901600103>
95. Kempers MJE, Kuiper RP, Ockeloen CW, Chappuis PO, Hutter P, Rahner N, et al. Risk of colorectal and endometrial cancers in EPCAM deletion-positive Lynch syndrome: A cohort study. *Lancet Oncol*. 2011 Jan 1;12(1):49–55.
96. Hampel H, Frankel W, Panescu J, Lockman J, Sotamaa K, Fix D, et al. Screening for Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) among endometrial cancer patients. *Cancer Res* . 2006 Aug 1 66(15):7810–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16885385/>
97. Gammon A, Jasperson K, Champine M. Genetic basis of Cowden syndrome and its implications for clinical practice and risk management . Vol. 9, *Application of Clinical Genetics*. Dove Medical Press Ltd.; 2016 p. 83–92. Available from: </pmc/articles/PMC4948690/?report=abstract>
98. Pilarski R. Cowden syndrome: A critical review of the clinical literature . Vol. 18, *Journal of Genetic Counseling*. J Genet Couns; 2009 p. 13–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18972196/>
99. Tan MH, Mester JL, Ngeow J, Rybicki LA, Orloff MS, Eng C. Lifetime cancer risks in individuals with germline PTEN mutations. *Clin Cancer Res* . 2012 Jan 15 18(2):400–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22252256/>
100. Pilarski R, Burt R, Kohlman W, Pho L, Shannon KM, Swisher E. Cowden syndrome and the PTEN hamartoma tumor syndrome: Systematic review and revised diagnostic criteria . Vol. 105, *Journal of the National Cancer Institute*. J Natl Cancer Inst; 2013 p. 1607–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24136893/>
101. Win AK, Reece JC, Ryan S. Family History and Risk of Endometrial Cancer. *Obstet Gynecol*. 2015 Jan 1 125(1):89–98. Available from: <http://journals.lww.com/00006250-201501000-00016>
102. Emons G, Beckmann MW, Schmidt D, Mallmann P. New WHO Classification of Endometrial Hyperplasias. *Geburtshilfe Frauenheilkd* . 2015 75(2):135–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25797956/>
103. Xu WH, Xiang YB, Ruan ZX, Zheng W, Cheng JR, Dai Q, et al. Menstrual and reproductive factors and endometrial cancer risk: Results from a population-based case-control study in urban shanghai. *Int J Cancer* . 2004 Feb 4 108(4):613–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14696129/>
104. Aune D, Sen A, Vatten LJ. Hypertension and the risk of endometrial cancer: A systematic review and meta-analysis of case-control and cohort studies. *Sci Rep* . 2017 Apr 7 7(1):1–10. Available from: www.nature.com/scientificreports
105. Myung S-K, Ju W, Choi H, Kim S. Soy intake and risk of endocrine-related

gynaecological cancer: a meta-analysis. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol* . 2009 116(13):1697–705. <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1471-0528.2009.02322.x>

106. 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):501-508.e3. <http://www.amjmed.com/article/S0002934308001940/fulltext>
107. Iversen L, Sivasubramaniam S, Lee AJ, Fielding S, Hannaford PC. Lifetime cancer risk and combined oral contraceptives: the Royal College of General Practitioners' Oral Contraception Study. *Am J Obstet Gynecol*. 2017 Jun 1 216(6):580.e1-580.e9. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28188769/>
108. Mills AM, Sloan EA, Thomas M, Modesitt SC, Stoler MH, Atkins KA, et al. Clinicopathologic Comparison of Lynch Syndrome–associated and “Lynch-like” Endometrial Carcinomas Identified on Universal Screening Using Mismatch Repair Protein Immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol* . 2015 Oct 1 40(2):1. Available from: <http://journals.lww.com/00000478-900000000-98353>
109. Garg K, Leitao MM, Kauff ND, Hansen J, Kosarin K, Shia J, et al. Selection of endometrial carcinomas for DNA mismatch repair protein immunohistochemistry using patient age and tumor morphology enhances detection of mismatch repair abnormalities. *Am J Surg Pathol* . 2009 Jun 33(6):925–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19238076/>
110. Burke WM, Orr J, Leitao M, Salom E, Gehrig P, Olawaiye AB, et al. Endometrial cancer: A review and current management strategies: Part i . Vol. 134, *Gynecologic Oncology*. Academic Press Inc.; 2014 p. 385–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24905773/>
111. Braun MM, Grumbo RJ. *Diagnosis and Management of Endometrial Cancer* . Vol. 93, *American Family Physician*. 2016 Mar Available from: www.aafp.org/afp.
112. Moore K, Brewer MA. Endometrial Cancer: Is This a New Disease? *Am Soc Clin Oncol Educ B*. 2017 May 37(37):435–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28561715/>
113. Grimbizis GF, Tsolakidis D, Mikos T, Anagnostou E, Asimakopoulos E, Stamatopoulos P, et al. A prospective comparison of transvaginal ultrasound, saline infusion sonohysterography, and diagnostic hysteroscopy in the evaluation of endometrial pathology. *Fertil Steril* . 2010 Dec 94(7):2720–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20462577/>
114. IARC Publications – WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs. Fourth Edition – IARC . Available from: <https://www.iarc.fr/news-events/iarc-publications-who-classification-of-tumours-of-female-reproductive-organs-fourth-edition/>

115. Ignatov T, Eggemann H, Costa SD, Ortmann O, Ignatov A. Endometrial cancer subtypes are associated with different patterns of recurrence. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2018 Oct 1 144(10):2011–7. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00432-018-2711-8>
116. Conlon N, Leitao MM, Abu-Rustum NR, Soslow RA. Grading uterine endometrioid carcinoma a proposal that binary is best. *Am J Surg Pathol* . 2014 38(12):1583–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25229772/>
117. Rosai J. Female reproductive system. In: Rosai J. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. Volume 2. 10th ed, China: Mosby; 2010. p.1399-649.
118. Xiong J, He M, Jackson C, Ou JJ, Sung CJ, Breese V, et al. Endometrial carcinomas with significant mucinous differentiation associated with higher frequency of K-ras mutations: A morphologic and molecular correlation study. *Int J Gynecol Cancer* . 2013 Sep 23(7):1231–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23851676/>
119. Huang CY, Tang YH, Chiang YC, Wang KL, Fu HC, Ke YM, et al. Impact of management on the prognosis of pure uterine papillary serous cancer - A Taiwanese Gynecologic Oncology Group (TGOG) study. *Gynecol Oncol* . 2014 May 1, 133(2):221–8. Available from: <http://www.gynecologiconcology-online.net/article/S0090825814001280/fulltext>
120. Wheeler DT, Bell KA, Kurman RJ, Sherman ME. Minimal uterine serous carcinoma: Diagnosis and clinicopathologic correlation. *Am J Surg Pathol* . 2000 Jun.24(6):797–806. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10843281/>
121. Ambros RA, Sherman ME, Zahn CM, Bitterman P, Kurman RJ. Endometrial intraepithelial carcinoma: A distinctive lesion specifically associated with tumors displaying serous differentiation. *Hum Pathol*. 1995 Nov 1;26(11):1260–7.
122. Christopherson WM, Alberhasky RC, Connelly PJ. Carcinoma of the endometrium: I. A clinicopathologic study of clear-cell carcinoma and secretory carcinoma. *Cancer* . 1982 Apr 15 .49(8):1511–23. Available from: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/1097-0142%2819820415%2949%3A8%3C1511%3A%3AAID-CNCR2820490802%3E3.0.CO%3B2-6>
123. Hoang LN, McConechy MK, Meng B, McIntyre JB, Ewanowich C, Gilks CB, et al. Targeted mutation analysis of endometrial clear cell carcinoma. *Histopathology* . 2015 Apr 1 .66(5):664–74. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/his.12581>
124. Brown L. Pathology of Uterine Malignancies. *Clin Oncol* . 2008 Aug .20(6):433–47. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18499412/>
125. Ruhul Quddus M, Sung CJ, Cunxian Zhang, Dwayne Lawrence W. Minor serous and clear cell components adversely affect prognosis in mixed-type endometrial carcinomas: A clinicopathologic study of 36 stage-I cases. *Reprod Sci*. 2010.17(7):673–8. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20393071/>

126. Broaddus RR, Lynch HT, Chen LM, Daniels MS, Conrad P, Munsell MF, et al. Pathologic features of endometrial carcinoma associated with HNPCC: A comparison with sporadic endometrial carcinoma. *Cancer* . 2006. 106(1):87–94. <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cncr.21560>
127. Berton-Rigaud D, Devouassoux-Shisheboran M, Ledermann JA, Leitao MM, Powell MA, Poveda A, et al. Gynecologic cancer intergroup (GCIG) consensus review for uterine and ovarian carcinosarcoma . Vol. 24, *International Journal of Gynecological Cancer*. Lippincott Williams and Wilkins; 2014 .. p. S55–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25341582/>
128. QUINN M, BENEDET J, ODICINO F, MAISONNEUVE P, BELLER U, CREASMAN W, et al. Carcinoma of the Cervix Uteri. *Int J Gynecol Obstet* . 2006 .95(SUPPL. 1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17161167/>
129. Creasman WT, Miller DS. Adenocarcinoma of the Uterine Corpus. In: *Clinical Gynecologic Oncology: Eighth Edition* . Elsevier Inc.; 2012. p. 141–74. Available from: <https://utsouthwestern.pure.elsevier.com/en/publications/adenocarcinoma-of-the-uterine-corporus>
130. Watanabe Y, Satou T, Nakai H, Etoh T, Dote K, Fujinami N, et al. Evaluation of parametrial spread in endometrial carcinoma. *Obstet Gynecol* . 2010 .116(5): 1027–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20966685/>
131. Lax SF, Kurman RJ, Pizer ES, Wu L, Ronnett BM. A binary architectural grading system for uterine endometrial endometrioid carcinoma has superior reproducibility compared with FIGO grading and identifies subsets of advance-stage tumors with favorable and unfavorable prognosis. *Am J Surg Pathol*. 2000.24(9):1201–8. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10976693/>
132. Abeler VM, Kjørstad KE. Endometrial adenocarcinoma with squamous cell differentiation. *Cancer*. 1992. 69(2):488–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1728379/>
133. Schimp VL, Ali-Fehmi R, Solomon LA, Hammoud A, Pansare V, Morris RT, et al. The racial disparity in outcomes in endometrial cancer: Could this be explained on a molecular level? *Gynecol Oncol* . 2006 Sep .102(3):440–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16510175/>
134. Schink JC, Miller DS, Lurain JR, Rademaker AW. Tumor size in endometrial cancer. *Cancer*. 1991. 67(11):2791–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2025843/>
135. 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. In: *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* . Elsevier Inc.; 2015 .. p. 530–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25680597/>

136. Nofech-Mozes S, Ackerman I, Ghorab Z, Ismiil N, Thomas G, Covens A, et al. Lymphovascular invasion is a significant predictor for distant recurrence in patients with early-stage endometrial endometrioid adenocarcinoma. *Am J Clin Pathol.* 2008 Jun. 129(6):912–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18480008/>
137. Palmer DC, Muir IM, Alexander AI, Cauchi M, Bennett RC, Quinn MA. The prognostic importance of steroid receptors in endometrial carcinoma. *Obstet Gynecol.* 1988.72(3):388–93. <https://europepmc.org/article/med/3405554>
138. Petru E, Lück HJ, Stuart G, Gaffney D, Millan D, Vergote I. Gynecologic Cancer Intergroup (GCIIG) proposals for changes of the current FIGO staging system. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2009 Apr 1;143(2):69–74.
139. Gonthier C, Trefoux-Bourdet A, Koskas M. Impact of Conservative Managements in Young Women With Grade 2 or 3 Endometrial Adenocarcinoma Confined to the Endometrium. *Int J Gynecol Cancer* . 2017 27(3):493–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28187090/>
140. Walker JL, Piedmonte MR, Spirtos NM, Eisenkop SM, Schlaerth JB, Mannel RS, et al. Recurrence and survival after random assignment to laparoscopy versus laparotomy for comprehensive surgical staging of uterine cancer: Gynecologic Oncology Group LAP2 study. *J Clin Oncol* . 2012 Mar 1 .30(7):695–700. Available from: </pmc/articles/PMC3295548/?report=abstract>
141. Miller D, Filiaci V, Fleming G, Mannel R, Cohn D, Matsumoto T, et al. Late-Breaking Abstract 1: Randomized phase III noninferiority trial of first line chemotherapy for metastatic or recurrent endometrial carcinoma: A Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* . 2012 Jun 1 .125(3):771. Available from: <http://www.gynecologiconcology-online.net/article/S0090825812002284/fulltext>
142. Fleming GF, Brunetto VL, Cella D, Look KY, Reid GC, Munkarah AR, et al. Phase III trial of doxorubicin plus cisplatin with or without paclitaxel plus filgrastim in advanced endometrial carcinoma: A gynecologic oncology group study. *J Clin Oncol.* 2004. 22(11):2159–66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15169803/>
143. Cruickshanks N, Booth L, Tang Y, Dent P. Apoptosis. In: *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition.* Elsevier Inc.; 2013. p. 166–9.
144. Brown DA, Yang N, Ray SD. Apoptosis. In: *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition.* Elsevier; 2014. p. 287–94.
145. Kaczanowski S. Apoptosis: Its origin, history, maintenance and the medical implications for cancer and aging . Vol. 13, *Physical Biology.* Institute of Physics Publishing;2016. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27172135/>
146. Wong RSY. Apoptosis in cancer: From pathogenesis to treatment . Vol. 30, *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research.* BioMed Central; 2011 p. 87. Available from: <https://jccr.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756->

9966-30-87

147. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy . Vol. 43, *Cell Biology International*. Wiley-Blackwell Publishing Ltd; 2019. p. 582–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30958602/>
148. Fulda S, Gorman AM, Hori O, Samali A. Cellular stress responses: Cell survival and cell death. *International Journal of Cell Biology*. 2010.
149. O'Brien MA, Kirby R. Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease . Vol. 18, *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*. Wiley-Blackwell; 2008 .. p. 572–85. Available from: [/pmc/articles/PMC7169302/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/169302/)
150. Bcl-2 family proteins: regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies - PubMed. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9408956/>
151. Slomovitz BM, Coleman RL. The PI3K/AKT/mTOR pathway as a therapeutic target in endometrial cancer . Vol. 18, *Clinical Cancer Research*. 2012. p. 5856–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23082003/>
152. Barra F, Evangelisti G, Ferro Desideri L, Di Domenico S, Ferraioli D, Vellone VG, et al. Investigational PI3K/AKT/mTOR inhibitors in development for endometrial cancer . Vol. 28, *Expert Opinion on Investigational Drugs*. Taylor and Francis Ltd; 2019. p.131–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30574817/>
153. Stringer EM, Fleming GF. Hormone therapy plus mTOR inhibitors in the treatment of endometrial carcinoma. *Eur Endocrinol* . 2013 .9(1):18–21. Available from: [/pmc/articles/PMC4243922/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24243922/)
154. De Melo AC, Paulino E, Garces ÁHI. A Review of mTOR Pathway Inhibitors in Gynecologic Cancer. Vol. 2017, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Hindawi Limited; 2017.
155. Ray-Coquard I, Favier L, Weber B, Roemer-Becuwe C, Bognoux P, Fabbro M, et al. Everolimus as second- or third-line treatment of advanced endometrial cancer: ENDORAD, a phase II trial of GINECO. *Br J Cancer* . 2013 May 14 .108(9):1771–7. Available from: www.bjccancer.com
156. Slomovitz BM, Lu KH, Johnston T, Coleman RL, Munsell M, Broaddus RR, et al. A phase 2 study of the oral mammalian target of rapamycin inhibitor, everolimus, in patients with recurrent endometrial carcinoma. *Cancer* . 2010. 116(23):5415–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20681032/>
157. Soliman PT, Westin SN, Iglesias DA, Munsell MF, Slomovitz BM, Lu KH, et al. Phase II study of everolimus, letrozole, and metformin in women with advanced/recurrent endometrial cancer. *J Clin Oncol*. 2016 May 20;34(15_suppl):5506–5506.
158. Lee TY, Martinez-Outschoorn UE, Schilder RJ, Kim CH, Richard SD,

- Rosenblum NG, et al. Metformin as a therapeutic target in endometrial cancers . Vol. 8, *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media S.A.; 2018. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30211120/>
159. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* . 2001 .108(8):1167–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11602624/>
 160. Dowling RJO, Zakikhani M, Fantus IG, Pollak M, Sonenberg N. Metformin inhibits mammalian target of rapamycin-dependent translation initiation in breast cancer cells. *Cancer Res* . 2007 Nov 15 .67(22):10804–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18006825/>
 161. Wang Y, Xu W, Yan Z, Zhao W, Mi J, Li J, et al. Metformin induces autophagy and G0/G1 phase cell cycle arrest in myeloma by targeting the AMPK/mTORC1 and mTORC2 pathways. *J Exp Clin Cancer Res* . 2018 Mar 20 .37(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29554968/>
 162. Zhang Y, Li MX, Wang H, Zeng Z, Li XM. Metformin down-regulates endometrial carcinoma cell secretion of IGF-1 and expression of IGF-1R. *Asian Pacific J Cancer Prev*. 2015. 16(1):221–5. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25640355/>
 163. Vidal F, De Araujo WM, Cruz ALS, Tanaka MN, Viola JPB, Morgado-DÍAZ JA. Lithium reduces tumorigenic potential in response to EGF signaling in human colorectal cancer cells. *Int J Oncol* . 2011 May .38(5):1365–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21369697/>
 164. Cho YJ, Kim JH, Yoon J, Cho SJ, Ko YS, Park JW, et al. Constitutive activation of glycogen synthase kinase-3 β correlates with better prognosis and cyclin-dependent kinase inhibitors in human gastric cancer. *BMC Gastroenterol* . 2010. p.10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20704706/>
 165. Zhu H, Han B, Pan X, Qi H, Xu L. Thiazolidenediones induce tumour-cell apoptosis through the Akt-GSK3 β pathway. *J Clin Pharm Ther* . 2012 Feb .37(1):65–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21410737/>
 166. Muramatsu T. Midkine, a heparin-binding cytokine with multiple roles in development, repair and diseases . Vol. 86, *Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and Biological Sciences*. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci; 2010. p. 410–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20431264/>
 167. 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(SUPPL.6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24078661/>
 168. Soliman PT, Westin SN, Iglesias DA, Fellman BM, Yuan Y, Zhang Q, et al. Everolimus, letrozole, and metformin in women with advanced or recurrent endometrioid endometrial cancer: A multi-center, single arm, phase II study. *Clin Cancer Res* . 2020 Feb 1 .26(3):581–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31628143/>

169. Mutter GL, Lin MC, Fitzgerald JT, Kum JB, Baak JPA, Lees JA, et al. Altered PTEN expression as a diagnostic marker for the earliest endometrial precancers. *J Natl Cancer Inst* . 2000 Jun 7 .92(11):924–31. Available from: <https://academic.oup.com/jnci/article/92/11/924/2905846>
170. Soliman PT, Zhang Q, Broaddus RR, Westin SN, Iglesias D, Munsell MF, et al. Prospective evaluation of the molecular effects of metformin on the endometrium in women with newly diagnosed endometrial cancer: A window of opportunity study. *Gynecol Oncol* . 2016 .143(3):466–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27745917/>
171. Iglesias DA, Yates MS, Van Der Hoeven D, Rodkey TL, Zhang Q, Co NN, et al. Another surprise from metformin: Novel mechanism of action via k-Ras influences endometrial cancer response to therapy. *Mol Cancer Ther* . 2013. 12(12):2847–56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24077915/>
172. Chen B, Pan H, Zhu L, Deng Y, Pollard JW. Progesterone inhibits the estrogen-induced phosphoinositide 3-kinase→AKT→GSK-3β→cyclin D1→pRB pathway to block uterine epithelial cell proliferation. *Mol Endocrinol* . 2005 Aug .19(8):1978–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15845746/>
173. Zhou Q, Eldakhakhny S, Conforti F, Crosbie EJ, Melino G, Sayan BS. Pir2/Rnf144b is a potential endometrial cancer biomarker that promotes cell proliferation article. *Cell Death Dis* . 2018 May 1 .9(5). Available from: </pmc/articles/PMC5938710/?report=abstract>
174. Oda K, Ikeda Y, Kashiya T, Miyasaka A, Inaba K, Fukuda T, et al. Characterization of TP53 and PI3K signaling pathways as molecular targets in gynecologic malignancies. *J Obstet Gynaecol Res* . 2016 Jul 1 .42(7):757–62. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/jog.13018>
175. Tanabe K, Matsumoto M, Ikematsu S, Nagase S, Hatakeyama A, Takano T, et al. Midkine and its clinical significance in endometrial carcinoma. *Cancer Sci* . 2008.99(6):1125–30. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1349-7006.2008.00796.x>
176. Filippou PS, Karagiannis GS, Constantinidou A. Midkine (MDK) growth factor: a key player in cancer progression and a promising therapeutic target . Vol. 39, *Oncogene*. Springer Nature; 2020. p.2040–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31801970/>
177. Ariaans, G., Jalving, M., Vries, E. G., & Jong, S. Anti-tumor effects of everolimus and metformin are complementary and glucose-dependent in breast cancer cells. *BMC cancer*, 2017. 17(1), 232.
178. Tai, S., Xu, L., Xu, M., Zhang, L., Zhang, Y., Zhang, K., Zhang, L., & Liang, C. Combination of Arsenic trioxide and Everolimus (Rad001) synergistically induces both autophagy and apoptosis in prostate cancer cells. *Oncotarget*, 2017. 8(7), 11206–11218.
179. Yao Wu, Wei-Nan Gao, Ya-Nan Xue, Li-Chao Zhang, Juan-Juan Zhang, Sheng-Yao Lu, et al. SIRT3 aggravates metformin-induced energy stress and apoptosis

- in ovarian cancer cells. *Experimental Cell Research*, 2018. p. 137-149.
180. Park JH, Kim YH, Park EH, Lee SJ, Kim H, Kim A, et al. Effects of metformin and phenformin on apoptosis and epithelial-mesenchymal transition in chemoresistant rectal cancer. *Cancer Sci*. 2019. 110(9):2834-2845.
 181. Wang, X., Luo, C., Cheng, X., Lu, M.. Lithium and an EPAC-specific inhibitor ESI-09 synergistically suppress pancreatic cancer cell proliferation and survival. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*, 2017. 49(7), 573–580.
 182. De Araujo, W. M., Robbs, B. K., Bastos, L. G., De Souza, W. F., Vidal, F. C. B., Viola, J. P. B., et al. PTEN Overexpression Cooperates With Lithium to Reduce the Malignancy and to Increase Cell Death by Apoptosis via PI3K/Akt Suppression in Colorectal Cancer Cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2016. 117(2), 458–469.