T.C

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ENDOMETRİOZİS ZEMİNİNDE GELİŞMİŞ OVER KANSERLERİNDE MİKRORNA'LARIN KARSİNOGENEZİS ÜZERİNDEKİ ETKİSİ VE KLİNİKOPATOLOJİK PARAMETRELER İLE İLİŞKİSİ

E. CANAN KELTEN TALU

ORCID: 0000-0001-8767-4265

Moleküler Patoloji Anabilim Dalı

Moleküler Patoloji Doktora Programı

Doktora Tezi

İZMİR

KASIM

2024

TEZ KODU: DEU.HSI. PhD -2018970141

T.C

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ENDOMETRİOZİS ZEMİNİNDE GELİŞMİŞ OVER KANSERLERİNDE MİKRORNA'LARIN KARSİNOGENEZİS ÜZERİNDEKİ ETKİSİ VE KLİNİKOPATOLOJİK PARAMETRELER İLE İLİŞKİSİ

E. CANAN KELTEN TALU

ORCID: 0000-0001-8767-4265

Moleküler Patoloji Anabilim Dalı

Moleküler Patoloji Doktora Programı

Doktora Tezi

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Merih Güray Durak

ORCID: 0000-0001-9136-5635

İZMİR

KASIM

2024

TEZ KABUL ONAYI

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Patoloji Anabilim Dalı, Moleküler Patoloji Doktora programı öğrencisi Esra Canan KELTEN TALU tarafından hazırlanan "Endometriozis zemininde gelişmiş over kanserlerinde mikrorna'ların karsinogenezis üzerindeki etkisi ve klinikopatolojik parametreler ile ilişkisi" başlıklı tez çalışması 20.11.2024 günü, 10.00/12.00 saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ/OY ÇOKLUĞU ile DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Safiye Aktaş

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Tıbbi Patoloji AD.

Tezi onaylıyorum/onaylamıyorum

ORCID:
İmza

Üye: Doç. Dr. Anıl Aysal Ağalar
Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Tıbbi Patoloji AD.
Tezi onaylıyorum/onaylamıyorum
ORCID:

Üye: Doç. Dr. Serap Karaarslan
Tınaztepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Tıbbi Patoloji AD.
Tezi onaylıyorum/onaylamıyorum
ORCID:
İmza

Üye: Doç. Dr. İbrahim Halil Erdoğdu
Adnan Menderes Üniversitesi,
Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji AD.
Tezi onaylıyorum/onaylamıyorum
ORCID:
İmza

Üye: Doç. Dr. Burçin Pehlivanoğlu
Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Tıbbi Patoloji AD.
Tezi onaylıyorum/onaylamıyorum
ORCID:
İmza

Doç. Dr. Merih Güray Durak

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi

Tıbbi Patoloji AD
(Danışman, Oy Kullanmıyor)
ORCID:
İmza

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
ETİK BEYANI

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlayıp sunduğum "Endometriozis zemininde gelişmiş over kanserlerinde mikrorna'ların karsinogenezis üzerindeki etkisi ve klinikopatolojik parametreler ile ilişkisi" başlıklı Doktora tezim için elde ettiğim verileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

İmza

Öğrencinin Adı Soyadı: Dr. Esra Canan KELTEN

TALU

Tarih: 01.11.2024

TEŞEKKÜR

Moleküler Patoloji Anabilim Dalı'nın kurulmasında büyük emeği olan, tüm doktora süreci boyunca ufkumuzu açan ve yol gösteren Prof. Dr. Sülen Sarıoğlu'na;

Başta Moleküler Patoloji Anabilim Dalı başkanlığı görevini yapmakta olan ve tez çalışmamın laboratuvar süreçlerinde büyük desteği olan Prof. Dr. Safiye Aktaş'a, birlikte çalışmaktan büyük bir mutluluk ve onur duyduğum Prof Dr Emine Çağnur Ulukuş ve Doç Dr Merih Güray Durak olmak üzere anabilim dalının tüm değerli öğretim üyelerine;

Tez çalışmamın laboratuvar süreçlerinde yardım ve desteği olan Merve Özdemir'e,

Bu yola birlikte baş koyduğumuz Moleküler Patoloji Doktora Programı öğrencisi arkadaşlarıma,

Tüm eğitim hayatım boyunca her zaman yanımda olan aileme, sevgili eşim A. Yalın Talu'ya, bu süreçte bana gösterdikleri sonsuz anlayış, destek ve fedakarlıkları için çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TABLOLAR DİZİNİ……..

ŞEKİLLER DİZİNİ……..

KISALTMALAR……..

ÖZET……

ABSTRACT……..

1. GİRİŞ VE AMAÇ……

2. GENELBİLGİLER……

2.1.Endometriozis Zemininde Gelişmiş Over Karsinomları ……

2.2. MicroRNA (Mirna) ……

2.3. Endometriozis Zemininde Gelişmiş Over Karsinomları ve MİRNA ilişkisi……..

3. GEREÇ VE YÖNTEM……

3.1. Örneklem seçimi ve Grupların oluşturulması**……**

3.2. Arşiv materyallerine ulaşılması**……**

3.3. Histopatolojik değerlendirme ve uygun doku alanlarının seçilmesi**……**

3.4. Gerçek zamanlı (RT) PCR Analizi……

3.4.1 Parafin Dokulardan RNA İzolasyonu (Norgen Biotek FFPE RNA Purification Kit)……

3.4.2 MikroRNA cDNA Sentezi……

3.4.3 RT-PCR Reaksiyonu ile Mir-21 ve Mir-200B Ekspresyonlarının Analizi…….

3.5 İstatiksel Analiz……..

3.6 Etik Kurul Onayı…….

4. BULGULAR …….

4.1. Klinikopatolojik Bulgular ……

4.2. RT-PCR mirna 21 ve mirna200b Analizi Bulguları …….

4.3. Bulguların Özeti……..

5. TARTIŞMA……

6. SONUÇ VE ÖNERİLER. ……...……

7. KAYNAKLAR.....

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. EİOK olgularında serum/plazma, doku ya da asit sıvısında bakılan mirna düzeyleri…….

Tablo 2. cDNA Reaksiyon Karışımı…….

Tablo 3. cDNA Reaksiyon Protokolü…….

Tablo 4. RT-PCR Miksi Hazırlanışı……

Tablo 5. RT-PCR Aşamaları……..

Tablo 6. Olguların klinikopatolojik özellikleri ve RT-PCR moleküler analiz sonuçları……

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Grup 1: Ötopik endometriyum

Şekil 2. Grup 2: Endometriotik kist odağı izlenmekte (over dokusu)

Şekil 3. Grup 3: Over dokusunda endometriozis odağı (sağda follikül yapısı izlenmekte)

Şekil 4. Grup 3: Berrak hücreli over karsinomu

Şekil 5. Grup 3: Endometrioid tip over karsinomu

Şekil 6. Grup 3: Yüksek Dereceli Seröz Over Karsinomu (sağda SET paterni)

KISALTMALAR

EİOK : Endometriozis ilişkili over karsinomu

RNA : Ribonükleik asit

cDNA : Tamamlayıcı DNA

YDSOK : Yüksek dereceli seröz over karsinomu

RT-PCR : Real-time Polimeraz zincir reaksiyonu (Gerçek zamanlı PCR)

ENDOMETRİOZİS ZEMİNİNDE GELİŞMİŞ OVER KANSERLERİNDE MİKRORNA'LARIN KARSİNOGENEZİS ÜZERİNDEKİ ETKİSİ VE KLİNİKOPATOLOJİK PARAMETRELER İLE İLİŞKİSİ

Doktora Tezi

E. Canan KELTEN TALU

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Moleküler Patoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Endometriozis, endometriyal gland ve stromanın uterin kavite dışında bulunmasıdır. Reprodüktif çağdaki kadınların %5-15'ini etkiler. Endometriozisli olguların yaklaşık %1'inde over kanseri gelişmektedir. Endometriozisli olgular arasında over kanseri gelişecekleri önceden belirleyebilecek biyobelirteç çalışmaları güncel araştırma konuları arasındadır. Bu çalışma ile mirna 200b ve mirna 21'in EİOK'de rolünü açığa çıkarmayı amaçladık. Mirna 200b, endometriozis olgularında ekspresyon düzeyi değişiklikleri önceki çalışmalarda gösterilmiş, tümör supresör etkili mirna 200 ailesi üyelerindendir. Mirna 21 ise epitelyal over kanserleri dahil pek çok solid organ kanserinde ekspresyon düzeyi artan onkojenik etkili mirna'ların başında gelmektedir. Bu amaçla, çalışmaya, 2015-2023 yılları arasında EİOK tanısı almış 13 hasta ve bu hastalara ait endometriozis ve ötopik endometriyum dokuları (Grup 3: 13 hastaya ait 39 doku örneği) alınmıştır. Bu olgularla karşılaştırmak üzere iki ayrı grup daha oluşturulmuştur. Buna göre, EİOK olmayan, sadece tuba-ovaryan endometriozis içeren 10 olgu ve bu olgulara ait ötopik endometiryum dokusu (Grup 2: 10 olguya ait 20 doku örneği) yanı sıra endometriozisi de olmayan 10 olguya ait ötopik endometriyum dokusu (Grup1) dahil edilmiştir. Bu hastalara ait Hematoksilen ve Eozin (H&E) boyalı doku kesitleri değerlendirilerek, Grup 1 için ötopik endometriyum; Grup 2 için ötopik endometriyum ve endometriozis odakları ve Grup 3 için ötopik endometriyum, endometriozis ve over karsinomu odakları işaretlenmiştir. H&E kesitlerde işaretlenen

odaklar, ilgili parafin bloktaki izdüşüm alanından belirlenerek küçük bir doku örneği Real-Time PCR ile çalışmak üzere tüplere alınmıştır. Analizler sonucunda over kanseri olguları (Grup 3) kendi içinde değerlendirildiğinde, ötopik endometriyum, endometriozis ve kanser odakları arasında mirna 21 ve mirna 200b ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı fark saptanmadı. Bununla birlikte, over kanserli olguların ötopik endometriyum dokusundaki mirna 21 ve mirna 200b ekspresyon düzeyleri, endometriozisi olan ve olmayan olgulardaki ötopik endometriyum dokularından anlamlı olarak daha yüksekti.

Bu çalışma, endometriyozisli olguların ötopik endometrium dokusunda saptanan artmış mirna 200b ve mirna 21 ekspresyon düzeylerinin EİOK gelişebilecek olguları belirlemede katkı sağlayabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: endometriozis, endometriozis-ilişkili over kanserleri, mirna 200b, mirna 21

Tez Sayfa Adedi:

Danışman: Doç Dr Merih Güray Durak

THE EFFECT OF MICRORNAS ON CARCINOGENESIS IN ENDOMETRIOSIS-ASSOCIATED OVARIAN CANCERS AND RELATIONSHIP WITH CLINICOPATHOLOGICAL PARAMETERS

PhD Thesis

E. Canan KELTEN TALU

DOKUZ EYLUL UNIVERSITY HEALTH SCIENCE INSTITUTE
Department of Molecular Pathology

ABSTRACT

Endometriosis is the presence of endometrial gland and stroma outside the uterine cavity. It affects 5-15% of women of reproductive age. Ovarian cancer develops in approximately 1% of cases with endometriosis. Biomarker studies that can predict those with endometriosis who will develop ovarian cancer are among the current research topics. With this study, we aimed to reveal the role of miRNA 200b and miRNA 21 in EAOC. Mirna 200b is a member of the miRNA 200 family with tumor suppressor effect, whose expression level changes in endometriosis cases have been shown in previous studies. Mirna 21 is one of the miRNAs with oncogenic effects, whose expression level increases in many solid organ cancers, including epithelial ovarian cancers. For this purpose, 13 patients diagnosed as EAOC between the year of 2015 and 2023 were collected with their endometriosis and eutopic endometrium tissues (Group 3: 13 patients with 39 tissue samples). Two separate groups were then constituted to compare with these cases. Group 2 composed tuba-ovarian endometriosis with its eutopic endometrium (10 patients with 20 tissue samples) and Group 1 composed eutopic endometrium only (10 patients with 10 tissue samples). Hematoxylin and Eosin (H&E) stained tissue sections of these patients were evaluated and then eutopic endometrium was determined for Group 1; eutopic endometrium and endometriosis foci were marked for Group 2, and eutopic endometrium, endometriosis and ovarian carcinoma foci were marked for Group 3. The foci marked on H&E sections were determined from the projection area on the relevant paraffin block and a small tissue sample was taken into

tubes to be studied with Real-Time PCR. As a result of the analyses, when ovarian cancer cases (Group 3) were evaluated within themselves, no significant difference was detected for miRNA 21 and miRNA 200b expression levels among eutopic endometrium, endometriosis and cancer foci. However, miRNA 21 and miRNA 200b expression levels in the eutopic endometrial tissue of cases with ovarian cancer were significantly higher than the eutopic endometrial tissues of cases with and without endometriosis. This study suggests that increased miRNA 200b and miRNA 21 expression levels detected in eutopic endometrial tissue of patients with endometriosis may contribute to identifying cases that may develop EIOC.

Keywords: endometriosis, endometriosis-associaed ovarian cancer, mirna, clinicopathological findings

Page Number:

Advisor: Doç Dr Merih Güray Durak

1. AMAÇ

Over kanserleri klinik semptomlara neden olduğunda genellikle ileri evrededir. Bu nedenle over kanseri erken tanısına yardımcı olacak biyobelirteçlerin tanımlanması önem kazanmaktadır.

Endometriozli olguların yaklaşık %1'inde over tümörü gelişmektedir. Endometriozisli hangi olgularda over kanseri gelişebileceğini mirna'lar üzerinden araştırmak.

Bu projenin amacı;

- Endometriozis ilişkili over kanseri gelişmiş olguları saptamak, bu olgulara ait ötopik ve ektopik endometriyum dokuları ile kanser dokusu arasındaki mirna 200b ve mirna 21 ekspresyon düzeyi farklılıklarını ortaya koymak (Kanserli olguları kendi içinde karşılaştırmak)
- Endometriozisi olan olgularda, ötopik ve ektopik endometriyal dokular arasındaki mirna 200b ve mirna 21ekspresyon düzeyi farklılıklarını göstermek (kanseri olmayan olguları kendi içinde ötopik ve ektopik endometriyal dokuları ile karşılaştırmak)
- Over kanseri ya da endometriyozisi bulunmayan olgulardaki ötopik endometriyumda mirna 200b ve mirna 21 düzeylerini belirlemek

2. GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER

2.1.Endometriozis Zemininde Gelişmiş Over Karsinomları

Endometriozis, endometriyum benzeri dokuların (endometrial gland epiteli ve stromal doku) uterin korpus dışında bir bölgede bulunmasıdır. Reprodüktif çağdaki kadınların %5-15'ini etkileyen endometriozis, kronik pelvik ağrı, dismenore ve infertilite gibi çeşitli klinik sorunlara neden olarak hayat kalitesini önemli ölçüde düşürebilmektedir (1). Endometriozis odakları, % 2 – 30 oranında pelvik bölgede izlenirken, %4'ten az oranda ekstrapelvik bölgede lokalizedir (2). Pelvik bölgede en sık görüldüğü lokalizasyon overlerdir.

Endometriozis patogenezi tartışmalı olsa da, multifaktöriyel olduğuna yönelik görüşler ağırlık kazanmaktadır (3). Endometriozis gelişimi için en olası mekanizma, endometrial kavitedeki dokuların, transtubal yayılım ile periton boşluğuna dökülmesi ve peritona implante olabilmesidir. Bu mekanizmayı destekleyen bir bulgu, endometriozisli hastaların ötopik endometriyumlarında, implantasyon kapasitesini arttıracak ve anjiogenezi uyaracak değişiklikler yanı sıra hücre siklusu düzeninde de değişiklikler saptanmış olmasıdır (1, 4). Özellikle overi tutan endometriozis odaklarında monoklonalite saptanmış olması, monoklonalite karsinogenezisin önemli bir bulgusu olduğu için önem kazanmaktadır (5).

Endometriozisli olguların yaklaşık %1'inde neoplastik dönüşüm görülmektedir. Bu zemininde sık gelişen over karsinomlarının başında endometrioid karsinom ve berrak hücreli karsinom gelir (3). Bu iki karsinomun görülme sıklığı batı ülkeleri ve uzak doğu ülkelerinde farklılık gösterebilmektedir. Endometriozis ilişkili over kanserlerinin az bir

kısmı Lynch Sendromu ile ilişkilidir. Endometriozis zemininde en çok gelişen tümörler göz önüne alındığında, sık saptanan moleküler değişikliklerin başında ARİD1A mutasyonları gelmektedir. Daha az sıklıkta PTEN, PIK3CA, CTNNB1, BRCA1/BRCA2, TP53 ve KRAS mutasyonları görülebilmektedir (3, 4, 6). Endometriozis zemininde gelişen diğer over tümörleri arasında serömüsinöz tümörler, adenosarkom, karsinosarkom ve endometrial stromal sarkomlar bulunmaktadır (2, 3). Atipik endometriozis, endometriozis ve endometriozis zemininde gelişen over karsinomları arasında bir geçiş basamağını oluşturur (7). Atipik endometriozis odakları, morfolojik, immünhistokimyasal ve içerdikleri moleküler değişiklikler bakımından, endometriozis zemininde gelişmiş kanserlerde izlenen bulgulara benzerlik göstermektedir (3, 7).

Endometriozis tanısında günümüzde altın standart halen invaziv cerrahi prosedürler ve histopatolojik örneklemedir (8). Bu nedenle endometriozis tanısını koymak ve tedaviye yanıtı değerlendirmek için, ölçümü kolay ve gereksiz invaziv yöntemlerin kullanımını önleyecek yeni biyobelirteçlere ihtiyaç bulunmaktadır. Bu amaçla, serum ve/ya plazma düzeyleri değerlendirilen pek çok molekül (9) mevcuttur. Bu moleküller arasında rutin pratikte en sık kullanılanı, bir glikoprotein olan Ca125'dir. Çeşitli mirna'ların, endometriozisli olgularda serum /plazma düzeyleri araştırılmış ve normal endometriyum dokusundan farklı düzeyde olduğu bildirilmiştir (1).

2.2. MikroRNA (Mirna)

Mirna'lar, tek iplikli, 21-23 nükleotid uzunluğunda, DNA'dan transkripsiyonu yapılan ancak proteine çevirisi yapılmayan (kodlanmayan) bir RNA molekülüdür (1). İlk kez 1993 yılında Lee ve ark. tarafından, Ambros laboratuvarlarında Caenorhabditis elegans nematodunun gelişimi araştırılırken keşfedilmiş, 2001 yılında terim olarak kullanıma girmiştir. Bu küçük moleküllerin temel görevi mesajcı RNA'ları etkilemek yoluyla gen ifadesinin postranskripsiyonel düzenlenmesini sağlamaktır (1). Bir miRNA, birden fazla mesajcı RNA'yı

etkileyebileceği gibi, birden fazla miRNA da aynı mesajcı RNA üzerinde etkili olabilmektedir. MiRNA'lar, karsinogenezis sürecindeki temel etkilerini, onkogen ve tümör süpresör genlerin ekspresyon düzeylerini etkilemek yoluyla göstermektedir (10, 11). Bununla birlikte, karsinogenezisin pek çok basamağında (büyümeyi inhibe eden sinyallere duyarsızlık, büyüme sinyallerinde kendine yeterlilik, apoptozisten kaçınma, sınırsız hücre çoğalması, invazyon, metastaz, anjiogenez ve genomik instabilite vb gibi) etkili oldukları bilinmektedir (11).

Mirna'lar, tek iplikli, 21-23 nükleotid uzunluğunda, DNA'dan transkripsiyonu yapılan ancak proteine çevirisi yapılmayan (kodlanmayan) bir RNA molekülüdür (1). İlk kez 1993 yılında Lee ve ark. tarafından, Ambros laboratuvarlarında Caenorhabditis elegans nematodunun gelişimi araştırılırken keşfedilmiş, 2001 yılında terim olarak kullanıma girmiştir. Bu küçük moleküllerin temel görevi mesajcı RNA'ları etkilemek yoluyla gen ifadesinin postranskripsiyonel düzenlenmesini sağlamaktır (1). Bir miRNA, birden fazla mesajcı RNA'yı etkileyebileceği gibi, birden fazla miRNA da aynı mesajcı RNA üzerinde etkili olabilmektedir. MiRNA'lar, karsinogenezis sürecindeki temel etkilerini, onkogen ve tümör süpresör genlerin ekspresyon düzeylerini etkilemek yoluyla göstermektedir (10, 11). Bununla birlikte, karsinogenezisin pek çok basamağında (büyümeyi inhibe eden sinyallere duyarsızlık, büyüme sinyallerinde kendine yeterlilik, apoptozisten kaçınma, sınırsız hücre çoğalması, invazyon, metastaz, anjiogenez ve genomik instabilite vb gibi) etkili oldukları bilinmektedir (11).

Mirna'lar, hedef aldıkları mesajcı RNA'nın moleküler özelliklerine göre, tümör süpresör veya onkogenik etki gösterebilir. Bazı miRNA'lar protoonkogen translasyonunu inhibe ederek, onkogenlerin ekspresyonunu sınırlar. Bu tip mirna'lar tümör süpresör etki gösterdiği için 'tümör süpresör mirna'lar' olarak adlandırılır. Tersine, tümör süpresör genlerin translasyonunu inhibe eden mirna'lar

ise onkogenik etki gösterdiği için onkogenik mirna'lar olarak adlandırılır (10, 11). Bazı mirna'lar pek çok solid tümörde daha genel bir onkojenik veya tümör süpresör etkiye sahiptir. Daha çok onkojenik etki gösterdiği bilinen mirna'ların başında miR-21 ve miR-155 gelirken, tümör supresör etki gösterdiği bilinen miRNA'ların başında miR-200 ve miR-let 7 aileleri gelmektedir (10, 11).

Mirna'ların karsinogenezis süreci ile ilişkisinin ortaya konması, ekspresyon seviyelerinin doku ve tümöre özgü olması, değişen ortam koşullarına dirençli ve stabil olmaları, plazma ve seruma geçebilmeleri ve minimal invaziv işlemler ile saptanabilmeleri, bir biyobelirteç olarak kullanılmalarını elverişli hale getirmektedir (1, 12). İdeal bir biyobelirtecin, kanser tanısı, tedavisi ve/ya prognoz tayininde kullanılabilmesi, non-invaziv yöntemlerle saptanabilmesi, fiyat/performans oranının düşük olması, tekrarlanan ölçümlerde benzer sonuçlar vermesi, yüksek sensitivite ve spesifite göstermesi beklenmektedir. Rutin kanser araştırmalarında tercih edilen biyobelirteçler, öncelikle kanserin erken tanısı, rekürrens tespiti ve prognoz tayini gibi amaçlar için kullanılmaktadır.

2.3. Endometriozis Zemininde Gelişmiş Over Karsinomları ve MİRNA ilişkisi

Endometriozis ile ilişkili over kanserlerinde (EİOK), insan doku ve biyolojik sıvılarında mirna ekspresyon düzeyi değişikliklerinin araştırıldığı çalışmalar literatürde bulunmakla birlikte sınırlı sayıdadır (Tablo 1). Bu çalışmalarda, sağlıklı kontrol olguları, endometriozisli olgular yanı sıra bir ya da birden fazla EİOK tipinde çeşitli mirna ekspresyon düzeyleri araştırılmıştır. Tablo 1, EİOK olgularında serum/plazma, doku ya da asit sıvısındaki değişen mirna düzeylerini özetlemektedir. Bu çalışmalarda önemli bir kısıtlayıcı husus, her grubun farklı hasta populasyonundan oluşmasıdır. Bu nedenle aynı hastaya ait örnekler arasında mirna ekspresyon düzeyi farklılıkları ortaya

konulamamaktadır. mirna ekspresyon düzeylerinin dokuya özgü olduğu ve kişiye özel faktörlerden (yaş, cinsiyet, hormonal durum vb) etkilendiği göz önüne alındığında bu durum önem kazanmaktadır.

Endometriozis ile ilişkili over kanserlerinde (EİOK), insan doku ve biyolojik sıvılarında mirna ekspresyon düzeyi değişikliklerinin araştırıldığı çalışmalar literatürde bulunmakla birlikte sınırlı sayıdadır (Tablo 1). Bu çalışmalarda, sağlıklı kontrol olguları, endometriozisli olgular yanı sıra bir ya da birden fazla EİOK tipinde çeşitli mirna ekspresyon düzeyleri araştırılmıştır. Tablo 1, EİOK olgularında serum/plazma, doku ya da asit sıvısındaki değişen mirna düzeylerini özetlemektedir. Bu çalışmalarda önemli bir kısıtlayıcı husus, her grubun farklı hasta populasyonundan oluşmasıdır. Bu nedenle aynı hastaya ait örnekler arasında miRNA ekspresyon düzeyi farklılıkları ortaya konulamamaktadır. mirna ekspresyon düzeylerinin dokuya özgü olduğu ve kişiye özel faktörlerden (yaş, cinsiyet, hormonal durum vb) etkilendiği göz önüne alındığında bu durum önem kazanmaktadır.

Literatürde aynı hastaya ait farklı doku örneklerinde (normal parankimal doku / kontrol dokusu; endometriozis ve EİOK'deki kanser dokusu) mirna ekspresyon düzeylerinin karşılaştırıldığı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu noktadan yola çıkarak, çalışmamızda üç ayrı hasta grubu oluşturmayı planladık. Böylece, hem aynı hastalara ait doku örnekleri arasında hem de farklı hasta grupları arasında belirlediğimiz mirna'lar bakımından ekspresyon düzeyi farklılıklarını ortaya koyabilmeyi amaçladık.

Tablo 1: EİOK olgularında serum/plazma, doku ya da asit sıvısında bakılan mirna düzeyleri

Otör, Referans no	**Materyal**	**Olgu sayısı, materyal**	**Kanser dokusunda saptanan mi-RNA düzeyleri**
Suryavanshi S, **2013** (13)	plazma	14 EİOK 33 endometriozis 20 sağlıklı kontrol olguları	Artmış düzeyde: miR-15b, miR-16, miR-21 ve miR-195

Dong M, **2015** (14)	Serum ve doku	12 EİOK 12 endometriozis 12 sağlıklı kontrol olguları	Artmış düzeyde: miR-191
Tian X, **2015** (15)	Doku	10 EİOK 10 overde endometrioma 10 sağlıklı kontrol olguları	Artmış düzeyde: miR-191
Braicu OL, **2017 (16)**	Doku	8 EİOK (Endometrioid Ca) 9 endometriozis 5 sağlıklı kontrol over dokusu	Azalmış düzeyde: miR-200b
Nakamura N, **2020** (17)	Serum ve asit sıvısı	7 EİOK (4 Endometrioid Ca + 3 Berrak Hücreli Ca) 34 overde endometrioma	Artmış düzeyde: miR-486-5p
Kumari P, **2021** (18)	Doku	10 Endometriozis 10 Endometrioid tip over ca 10 Sağlıklı kontrol dokusu	Artmış düzeyde: miR-99b, miR-125a, miR-143, miR-145 Azalmış düzeyde: miR-16, miR-20a

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Örneklem seçimi ve grupların oluşturulması

Bu retrospektif kesitsel çalışmaya; hastane bilgisayar sisteminden taranarak 2015-2023 yılları arasında opere olan ve eksizyon materyallerinde endometriozis yanı sıra endometriozise eşlik eden over karsinomu (endometrioid tip karsinom, berrak hücreli karsinom, Yüksek dereceli seröz karsinom) tanısı almış, uygulanacak analizler için yeterli tümör dokusu içeren, tüm olgular dahil edilmiştir (Grup 3). Benzer şekilde geçmiş kayıtlar bilgisayar sisteminden taranarak aynı yıl aralığında opere olmuş, eksizyon materyallerinde endometriozis tanısı almış, bununla birlikte klinik takip süreçlerinde over kanseri ya da başka tip bir kanser gelişmemiş olgular belirlenmiştir (Grup 2). Geçmiş kayıtlarında endometriozis tanısı bulunmayan, tümüyle farklı nedenlerle opere olmuş (leiomyoma uteri vb gibi) kadın hastalara ait eksizyon materyallerindeki normal endometriyum dokusu ise önceki iki grup ile karşılaştırmak üzere ayrıldı (Grup 1). Grup 1, 2 ve 3'deki tüm olguların Kadın hastalıkları ve Doğum Kliniğinde takip edilen ve klinik

bilgilerine ulaşılabilen olgular olmasına dikkat edildi.

Çalışma Grupları:

Grup 1: ötopik endometriyum (n= 10 olgu, 10 doku örneği)

Grup 2: ötopik endometriyum + endometriyozis (n= 10 olgu, 20 doku örneği)

Grup 3: ötopik endometriyum + endometriyozis + EİOK (n= 13 olgu, 39 doku örneği)

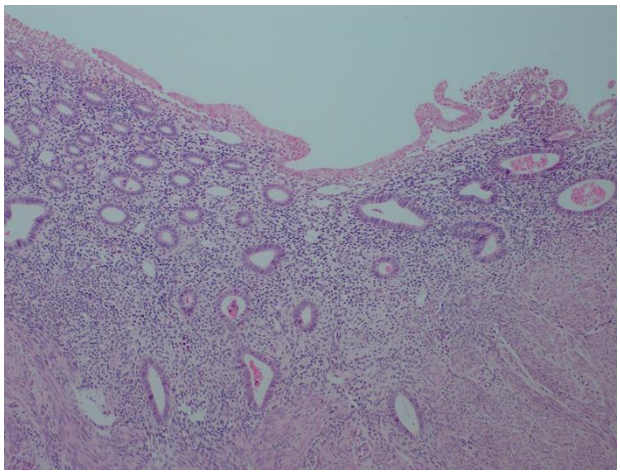
3.2. Arşiv materyallerine ulaşılması

2015-2023 yılları arasında opere olmuş ve eksizyon materyallerinde tanı almış hastalar belirlenmiş ve bu hastalara ait Patoloji arşivinde bulunan lam ve ilgili bloklar toplanmıştır.

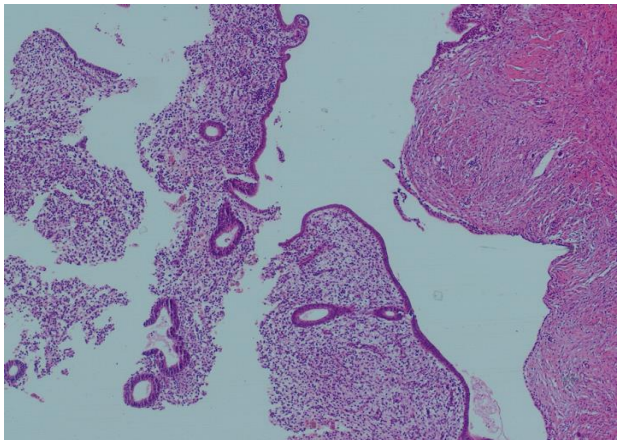
3.3. Histopatolojik değerlendirme ve uygun doku alanlarının seçilmesi

Tüm olgulara ait Hematoksilen-eozin boyalı doku kesitleri uzman patolog tarafından ışık mikroskobu altında yeniden değerlendirilmiş ve Grup 1-2 ve 3 için uygun doku alanları H&E kesitlerde belirlenmiştir. Buna göre Grup 1 için, histerektomi materyalinde, yeterli miktarda ve olağan görünümde endometriyum dokusu içeren kesitler belirlenmiştir. H&E kesitlerde endometriyum dokusu işaretlenerek parafin blokta bu alana karşılık gelen bölge bistüri ucu ile kazınarak parafin dokusu itilmiş ve hemen altından çok küçük bir doku parçası tüp içine alınmıştır. Histopatolojik değerlendirmede, endometriyum dokusu içermeyen, tümüyle dökülmüş, sadece bazal endometriyum içeren ya da ek lezyon barındıran (endometriyal polip vb gibi) olgular çalışma dışı bırakılmıştır. Grup 2 için, normal endometriyal doku örneklemesi yukarıda açıklandığı şekliyle yapılmıştır. Buna ek olarak tuba veya over bölgesindeki endometriozis odakları H&E kesitler üzerinde belirlenmiş, bununla uyumlu alanlar parafin bloklar üzerinde tespit edilerek uygun doku alanı tüp içine alınmıştır. Grup 3'de her bir olgu için normal endometriyum, endometriozis örneklemesi benzer şekilde yapılmış, ek olarak tubaovaryan bölgede gelişmiş over kanseri dokusundan örnek alınmıştır. Tümör dokusu

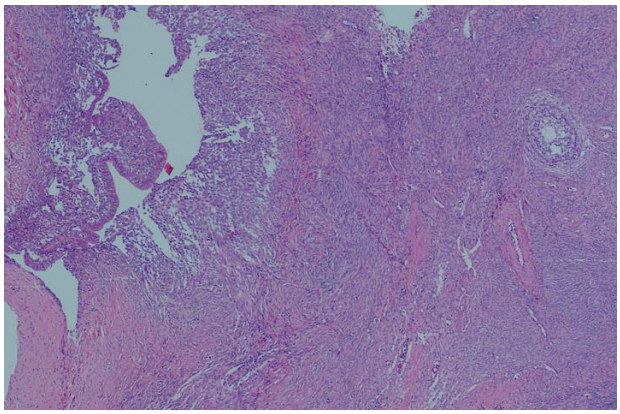
örneklemesi, nekroz ve hemorajiden fakir, canlı tümör hücresinden zengin alanlardan yapılmıştır.



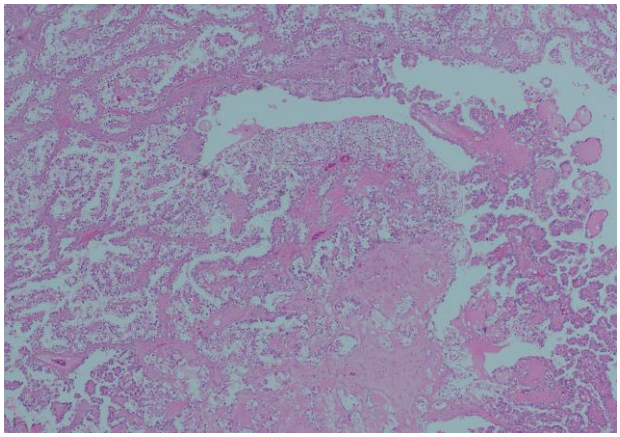
Grup 1: ötopik endometriyum



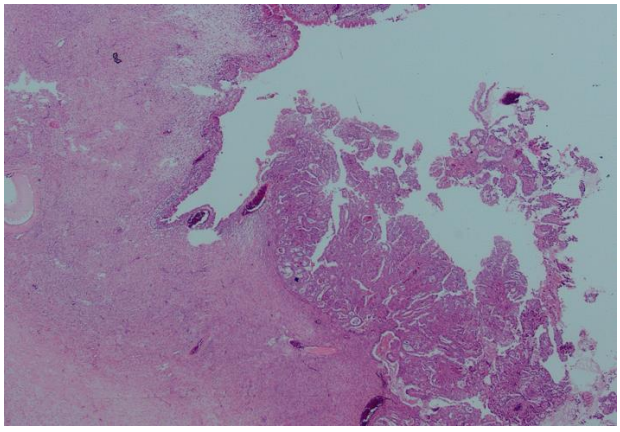
Grup 2: endometriotik kist odağı izlenmekte (over)



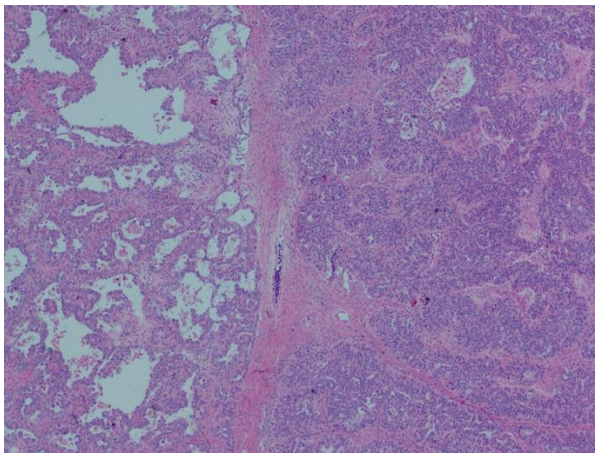
Grup 3: Over dokusunda endometriozis odağı (sağda follikül yapısı izlenmekte)



Grup 3: Berrak hücreli over karsinomu



Grup 3: Endometrioid tip over karsinom



Grup 3: Yüksek Dereceli Seröz Over Karsinomu (sağda SET paterni)

3.4. Gerçek zamanlı (RT) PCR Analizi

3.4.1 Parafin Dokulardan RNA İzolasyonu (Norgen Biotek FFPE RNA Purification Kit)

Deparafinizasyon

Mikrosantrifüj tüplerin içindeki parafin doku kesitlerinin üzerine, 1 mL ksilen eklenip vorteks ile karıştırıldı. 50 ^{o}C 'de 5 dakika boyunca ısıbloğunda inkube edildi.Inkübasyon sonrasında, 2 dakika boyunca 14000 RPM'da santrifüj edildi. Mikrosantrifüjlerden dokuya değmeyecek şekilde, ksilen uzaklaştırılır. Kalan pelletin üzerine 1 mL etil alkol (%99) eklendi ve vortekslendi. Daha sonra, 2 dakika boyunca 14000 RPM'da santrifüj edildi.Santrifüj sonrası, etil alkol dokudan uzaklaştırıldı. Bu aşama iki kez tekrar edildi.Tüplerin içersindeki etil alkolün tamamemn uzaklaşması için 10 dakika boyunca ağzı açık oalcak şekilde oda scıaklığında bekletildi.

Lizat Hazırlanması

Etil alkolün tamamen uzaklaştığından emin olunca, dokuların üzerine 300 µL Digestion Buffer A ve 10 µL proteinaz K eklendi ve vortekslendi.15 dakika boyunca, 55 ^{o}C ısı bloğunda inkübe edildi. Daha sonrasında, 15 dakika boyunca, 80 ^{o}C ısı bloğunda inkübe edildi. Ara sıra

vortekslendi.İnkübasyon bitiminde, örneklerin üzerine 300 µL Buffer RL eklendi ve vorteklendi.Sonrasında, örneklerin üzerine 600 µL etil alkol (%99) eklendi ve vortekslendi.

1.) RNA'nın Kolona Bağlanması

Kolonlar toplama tüplerine takıldı. Her bir RNA örneği için, her bir kolon isimlendirildi. 600 µL lizat kolonlara aktarıldı. 8000 RPM'da santriüj edildi. Bu aşama iki kez tekrar edildi.

2.) DNA'nın uzaklaştırılması ve yıkama

400 µL Wash Buffer A solüsyonu her bir kolona eklendi ve 2 dakika boyunca 14000 RPM'da santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında, toplama tüpündeki sıvı atıldı ve kolon toplama tüpüne geri takıldı. Her bir örnek için, 4 µL DNase I ve 96 µL Enzyme Incubation buffer A karışımı hazırlandı. 100 µL karışım her bir kolona eklendi.14000 RPM'da 1 dakika boyunca santrifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı çekilerek tekrardan kolona aklatarıldı ve 15 dakika inkübe edildi. 400 µL Wash Buffer A solüsyonu her bir kolona eklendi ve 1 dakika boyunca santrifüje edildi. Toplama tüpündeki sıvı uzaklaştırılıp, kolon tekrardan tüpe takıldı ve tekrardan santrifüj edildi.

3.) RNA Elüsyonu

Santrifüj sonrası, alt tüp atılıp, kolonlar elüsyon tüplere takıldı. 30 µL Elution Solution A kolonlara aktarıldı. 1 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Sonrasında, 2 dakika boyunca 2000 RPM'da santrifüj edildi. 1 dakika boyunca 14000 RPM'da spin yapıldı. RNA örnekleri -80 ^{o}C'de saklandı.

3.4.2 MikroRNA cDNA Sentezi (Norgen Biotek MicroScript microRNA cDNA Synthesis Kit)

RNA örneklerinden cDNA sentezlenmesi için, Tablo 2'deki bileşenlere göre reaksiyon kuruldu.

Tablo 2: cDNA reaksiyon karışımı

Bileşen	Hacim
2x Reaction Mix	10 µL
TruScript microRNA Enzyme Mix	1 µL
RNA template (1 pg to 1 µg total RNA or	x L

enriched microRNA)	
Nuclease-Free Water	x µL
Total Hacim	**20 µL**

Reaksiyon miksi hazırlandıktan sonra, termal döngü cihazında Tablo 3'deki gibi reaksiyon protokolü hazırlandı

Tablo 3: cDNA Reaksiyon Protokolü

Sıcaklık	**Zaman**
37 °C	30 dk
50 °C	30 dk
70 °C	15 dk
4 °C	Hold

Protokol bitiminde, cDNA'lar 1:2 oranında dilue edildi ve -20 °C'de saklandı.

3.4.3 Gerçek Zamanlı PCR Reaksiyonu ile Mir-21 ve Mir-200B Ekspresyonlarının Analizi

Her bir cDNA örneği için, PCR reaksiyonu Tablo 4'teki gibi hazırlandı. Hazırlanan mikslerden her bir örnek için 18 ul olacak şekilde striptlere eklendi. Daha sonra 2 ul cDNA örneği eklendi. Stripler spin yapıldıktan sonra, Light Cycler Nano termal döngücihazına yerleştirildi.

Tablo 4: PCR miksi hazırlanışı

Bileşenler	**Hacim [µL]**
Water, PCR Grade	7.2
PCR Primers	0,8
Master Mix, 2x conc.	10.0
cDNA	2.0
Total hacim	**20.0**

PCR striptleri Light Cycler Nano termal döngü cihazına yerleştirildikten sonra, Tablo 5 'teki gibi PCR programı kuruldu.

Tablo 5: PCR aşamaları

Aşama	**Sıcaklık [°C]**	**Ramp [°C/s]**	**Zaman (s)**
Pre-inkübasyon	95	4.4	600
	95	4.4	10

3-aşama amplifikasyon	53	2.2	15
	72	4.4	20
Hold	40	2.2	30

PCR bitiminde, sonuçlar, Light CyclerNano yazılım programıyla analiz edildi.

3.5 İstatiksel Analiz

Grup 1-2 ve 3 tümüyle farklı hasta popülasyonundan oluşmaktadır. Gruplar arasında mirna 21 ve mirna 200b ekspresyon düzeyleri arasındaki farklılıklar Mann Whitney U testi ile değerlendirilmiştir.

3.6 Etik Kurul Onayı

Çalışmamız Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 11.09.2024 tarihinde 2024/30-54 karar numarası ile onaylanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Klinikopatolojik Bulgular

Çalışmamız, Grup 1'de on kadın hasta (10 adet doku örneği), Grup 2'de on kadın hasta (20 adet doku örneği) ve Grup 3'de on üç kadın hasta (39 doku örneği) olmak üzere toplam 33 hasta ve bu hastalara ait 69 adet parafin blok doku örneğinden oluşmaktadır. Parafin blok doku örneklerinden yapılan gerçek zamanlı PCR analizleriyle bu gruplardaki mirna seviyeleri incelenmiştir. Grup 1 de hastaların ortalama yaşı: 54 (ortanca yaş: 51, yaş aralığı 40-74), Grup 2'de hastaların ortalama yaşı: 43.6 (ortanca yaş: 43, yaş aralığı 39-49), Grup 3'de hastaların ortalama yaşı: 50.5 (ortanca yaş: 51, yaş aralığı 37-78). Grup 3'de bulunan toplam 13 over karsinomunun histopatolojik incelemesinde, 6 tümör berrak hücreli karsinom *(%46.2),* 4 tümör

endometrioid karsinom *(%30.8)*, 3 tümör yüksek dereceli seröz karsinom morfolojisinde saptanmıştır (*% 23.1*; YDSOK). Tümörlerin tamamı tuba-over bölgesinden kaynaklanmıştır. Klinikopatolojik veriler Tablo 6'de gösterilmiştir.

Tablo 6. Olguların klinikopatolojik özellikleri ve RT-PCR moleküler analiz sonuçları

Grup	Yaş	Histopatolojik değerlendirme (Tanı)	Olgu	Sample	mir-21	mir-200b
1	54	olağan endometriyum	1	**1E1**	0,773	0,001
1	69	olağan endometriyum	2	**1E2**	0,588	0,033
1	74	olağan endometriyum	3	**1E3**	0,111	0,006
1	48	olağan endometriyum	4	**1E4**	1,133	0,002
1	48	olağan endometriyum	5	**1E5**	13,002	0,003
1	47	olağan endometriyum	6	**1E6**	0,252	0,003
1	49	olağan endometriyum	7	**1E7**	195,971	0,002
1	58	olağan endometriyum	8	**1E8**	0,254	0,002
1	53	olağan endometriyum	9	**1E9**	0,028	0,001
1	40	olağan endometriyum	10	**1E10**	9,771	0,002
2	47	endometriozis	1	**2E1**	0,102	0,088
2	45	endometriozis	2	**2E2**	0,123	0
2	42	endometriozis	3	**2E3**	0,122	0
2	44	endometriozis	4	**2E4**	0,08	0,002
2	41	endometriozis	5	**2E5**	0,146	0
2	41	endometriozis	6	**2E6**	0,241	0
2	39	endometriozis	7	**2E7**	0,047	0
2	49	endometriozis	8	**2E8**	0,958	0,001
2	48	endometriozis	9	**2E9**	0,009	0
2	40	endometriozis	10	**2E10**	0,014	0
2	47	endometriozis	1	**2H1**	0,144	0,015
2	45	endometriozis	2	**2H2**	23,388	0,042
2	42	endometriozis	3	**2H3**	1,065	0,013
2	44	endometriozis	4	**2H4**	24,602	0,238
2	41	endometriozis	5	**2H5**	15,781	0,043
2	41	endometriozis	6	**2H6**	35,013	0,021
2	39	endometriozis	7	**2H7**	3,372	0,011
2	49	endometriozis	8	**2H8**	çalışılmadı	çalışılmadı
2	48	endometriozis	9	**2H9**	çalışılmadı	çalışılmadı

2	40	endometriozis	10	**2H10**	çalışılmadı	çalışılmadı
3	48	Berrak hücreli	1	**3E1**	0,028	0
3	49	Berrak hücreli	2	**3E2**	76,278	0,248
3	52	Berrak hücreli	3	**3E3**	25,026	0,028
3	52	Berrak hücreli	4	**3E4**	7,599	0,013
3	46	Berrak hücreli	5	**3E5**	91,578	0,003
3	52	YDSOK	6	**3E6**	57,939	0,031
3	51	Berrak Hücreli	7	**3E7**	640,722	0,345
3	39	Endometrioid	8	**3E8**	577,104	0,012
3	56	YDSOK	9	**3E9**	3,632	0,002
3	78	Endometrioid	10	**3E10**	1288,13	0,544
3	37	Endometrioid	11	**3E11**	21,197	0,024
3	53	Endometrioid	12	**3E12**	5,885	0,002
3	44	YDSOK	13	**3E13**	54,793	0,008
3	48	Berrak hücreli	1	**3H1**	0,038	0,001
3	49	Berrak hücreli	2	**3H2**	91,103	0,011
3	52	Berrak hücreli	3	**3H3**	8,343	0,005
3	52	Berrak hücreli	4	**3H4**	397,011	0,004
3	46	Berrak hücreli	5	**3H5**	136,171	0,007
3	52	YDSOK	6	**3H6**	23,863	0,041
3	51	Berrak Hücreli	7	**3H7**	çalışılmadı	çalışılmadı
3	39	Endometrioid	8	**3H8**	33	0,015
3	56	YDSOK	9	**3H9**	24,337	0,014
3	78	Endometrioid	10	**3H10**	çalışılmadı	çalışılmadı
3	37	Endometrioid	11	**3H11**	çalışılmadı	çalışılmadı
3	53	Endometrioid	12	**3H12**	1,158	0,004
3	44	YDSOK	13	**3H13**	33,382	0,007
3	48	Berrak hücreli	1	**3T1**	0,877	0,006
3	49	Berrak hücreli	2	**3T2**	çalışılmadı	çalışılmadı
3	52	Berrak hücreli	3	**3T3**	0,229	0,021
3	52	Berrak hücreli	4	**3T4**	0,026	0,007
3	46	Berrak hücreli	5	**3T5**	0,48	0,029
3	52	YDSOK	6	**3T6**	585,308	0,044
3	51	Berrak Hücreli	7	**3T7**	525,55	0,023
3	39	Endometrioid	8	**3T8**	5068,62	7
3	56	YDSOK	9	**3T9**	2,516	0,008
3	78	Endometrioid	10	**3T10**	2,984	0,01
3	37	Endometrioid	11	**3T11**	160,117	0,027

3	53	Endometrioid	12	**3T12**	7,214	0,001
3	44	YDSOK	13	**3T13**	6,264	0,002
				STD 1	1	1
				STD 2	1	1
				STD 3	1	1
				STD 4	1	1
				STD 5	1	1
				STD 6	1	1

Sample: Gruplara göre doku örnekleri kodlamaları, PCR: polimeraz zincir reaksiyonu, YDSOK: Yüksek dereceli Seröz Over Karsinomu, STD: Standart

4.2. RT-PCR mirna 21 ve mirna200b Analizi Bulguları

Grup 1'deki ötopik endometriyum dokusu ile Grup 3'deki kanserli olguların normal endometriyum dokuları arasında her iki mirna ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı fark saptandı (*mirna 21 için p değeri: 0.010, mirna 200b için p değeri: 0.036*). Buna göre Grup 3'deki kanserli olguların normal endometriyum dokusunda mirna 21 ve mirna 200b ekspresyonu daha yüksekti.

Grup 1'deki ötopik endometriyum dokusu ile Grup 2'deki endometriozisli olguların normal endometriyum dokuları arasında her iki mirna ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı fark saptandı (*mirna 21 için p değeri: 0.011, mirna 200b için p değeri: 0.007*). Buna göre Grup 1 ötopik endometriyum dokularında mirna 21 ve mirna 200b ekspresyonu daha yüksekti.

Grup 2'deki endometriozisli olguların normal endometriyum dokusu ile Grup 3'deki kanserli olguların normal endometriyum dokuları arasında her iki mirna ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı fark saptandı (*mirna 21 için p değeri: 0.0001, mirna 200b için p değeri: 0.002*). Buna göre Grup 3'deki kanserli olguların normal endometriyum dokusunda mirna 21 ve mirna200b ekspresyonu daha yüksekti.

Grup 2 olgularında normal endometriyum dokusu aynı gruptaki endometriozis dokuları ile karşılaştırıldığında, her iki mirna ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı fark saptandı (*mirna 21 için p*

değeri: 0.001, mirna 200b için p değeri: 0.003). Buna göre Grup 2'deki endometriozis odaklarında aynı olguların normal endometriyum dokusuna göre mirna 21 ve mirna 200b ekspresyon düzeyleri daha yüksekti.

Grup 3'deki kanserli olgular kendi içinde değerlendirildiğinde, normal endometriyum dokuları ile aynı olguların endometriozis odakları arasında her iki mirna ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı fark saptanmadı (mirna 21 için p değeri: 0.648, mirna 200b için p değeri: 0.376). Normal endometriyum dokuları ile aynı olguların kanser odakları arasında her iki mirna ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı fark saptanmadı (mirna 21 için p değeri: 0.225, mirna 200b için p değeri: 0.852). Endometriozis dokuları ile kanser odakları arasında her iki mirna ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı fark saptanmadı (mirna 21 için p değeri: 0.539, mirna 200b için p değeri: 0.228).

Grup 1'deki ötopik endometriyum dokusu ile Grup 2'deki endometriozisli olguların endometriozis dokuları arasında mirna ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı fark sadece mirna 200b için saptandı (mirna 21 için p değeri: 0.133, *mirna 200b için p değeri: 0.001*). Buna göre Grup 2'deki endometriozis odaklarında mirna 200b ekspresyon düzeyi, endometriozis içermeyen Grup 1 ötopik endometriyum dokusundan daha yüksekti.

Grup 1'deki ötopik endometriyum dokusu ile Grup 3'deki kanserli olguların endometriozis dokuları arasında her iki mirna ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı saptandı (*mirna 21 için p değeri: 0.029*, *mirna 200b için p değeri: 0.023*). Buna göre Grup3'deki kanserli olguların endometriozis odaklarında mirna21 ve mirna 200b ekspresyon düzeyleri ötopik endometriyum dokusundan daha yüksekti.

Grup 2'deki endometriozisli olguların endometriozis dokuları ile Grup 3'deki kanserli olguların endometriozis odakları arasında anlamlı fark sadece mirna 200b için saptandı (mirna 21 için p değeri: 0.230, *mirna 200b için p değeri: 0.010*). Buna göre mirna 200b düzeyleri kanser gelişmemiş Grup 2 olgularındaki endometriozis odaklarında daha yüksekti.

Grup 3'deki kanserli olguların kanser dokuları ile Grup 1'deki ötopik endometriyum odakları arasında mirna ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı fark sadece mirna 200b için saptandı (mirna 21 için p değeri: 0.228, *mirna 200b için p değeri: 0.014*). Buna göre mirna 200b düzeyleri Grup 3'deki kanserli olguların kanser dokusunda daha yüksekti.

4.3. Bulguların Özeti

- Over kanserli olgular (Grup 3) kendi içinde değerlendirildiğinde, ötopik endometriyum, endometriozis ve kanser odakları arasında mirna 21 ve mirna 200b ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı fark saptanmadı.
- Over kanserli olguların ötopik endometriyum dokusundaki mirna 21 ve mirna 200b ekspresyon düzeyleri, endometriozisli olguların (Grup 2) ötopik endometriyum dokusundan daha yüksekti.
- Over kanserli olguların ötopik endometriyum dokusundaki mirna 21 ve mirna 200b ekspresyon düzeyleri, endometriozis içermeyen olguların (Grup 1) ötopik endometriyum dokusundan daha yüksekti.
- Over kanserli olguların endometriozis odaklarındaki mirna 21 ve mirna 200b düzeyleri endometriozis içermeyen olguların (Grup 1) ötopik endometriyum dokusundan daha yüksekti.
- Over kanserli olguların kanser odaklarında yalnızca mirna 200b düzeyleri, endometriozis içermeyen olguların (Grup 1) ötopik endometriyum dokusundan daha yüksekti.
- Over kanserli olguların endometriozis odaklarındaki mirna 200b düzeyleri, endometriozisli olguların (Grup 2) endometriozis odaklarından daha yüksekti.
- Endometriozisli olguların (Grup 2) endometriozis odaklarındaki mirna 21 ve mirna 200b ekspresyon düzeyleri aynı olguların ötopik endometriyum dokusundan daha yüksekti.
- Endometriozisli olguların (Grup 2) endometriozis odaklarındaki mirna 200b ekspresyon düzeyi, endometriozis içermeyen Grup 1 ötopik endometriyum dokusundan daha yüksek idi.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada elde ettiğimiz sonuçlar aşağıdaki gibidir;

- Over kanseri olguları (Grup 3) kendi içinde değerlendirildiğinde; ötopik endometriyum, endometriozis ve kanser odakları arasında mirna 21 ve mirna 200b ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı fark yoktu.
- Over kanserli olguların (Grup 3) ötopik endometriyum dokusundaki mirna 21 ve mirna 200b ekspresyon düzeyleri, endometriozisi olan (Grup 2) ve olmayan (Grup 1) olguların ötopik endometriyum dokularından anlamlı olarak daha yüksekti.
- Over kanseri olmayan endometriozisli olgulara ait (Grup 2) endometriozis dokularındaki mirna 200b ekspresyon düzeyi, endometriozisi olmayan Grup 1 ötopik endometriyum dokusundan daha yüksek idi.

Endometriozis gelişimi ile ilgili pek çok teori bulunmaktadır. Bununla birlikte endometriozis odaklarının görüldüğü lokasyonlar göz önüne alındığında, bu teorilerden hiçbiri endometriozis gelişimini tek başına açıklayamamaktadır (1). Konuyla ilgili moleküler çalışmalar, hipotezler arasından daha çok 'retrograd menstrasyon' ve 'kök hücre orjini' üzerinde yoğunlaşmıştır (1, 6). Bunun dışında, endometriyal hücrelerin hemotajen veya lenfatik kanal ile yayılması, peritoneal mezotel hücrelerinin transformasyonu ve müllerian kalıntılardan gelişme gibi diğer teoriler de mevcuttur. Retrograd menstrüasyon teorisi, menstrüel siklus boyunca ötopik endometrial dokuların tuba uterina yoluyla peritona döküldüğünün saptanmasıyla ifade bulmuştur. Kök hücre teorisinde ise, iki odak, kök hücre için rezerv olarak görülmektedir; i) uterin endometriyum (ötopik endometriyum) ve ii) kemik iliğinden köken alan hücreler (4). Östrojen hormonu etkisinde proliferatif faz boyunca yetişkin kök hücrelerin katkısıyla bazal endometriyal tabaka rejenere olur. Menstürel siklus boyunca yetişkin kök hücreleri de içeren fonksiyonel tabaka atılmaktadır. Bu aşamada, tuba uterina aracılığıyla retrograd menstrasyona

uğrayan dokuların dağılarak ektopik bölgelerde lokalize olduğu kabul edilir (4). Çalışmamızda, tuba-over kaynaklı endometriozisleri olan ve EİOK gelişmiş olgularda, araştırdığımız her iki mirna düzeylerinin ötopik endometriyum-ektopik endometriyum ve kanser dokuları arasında anlamlı fark göstermeyişi, yukarıda açıkladığımız retrograd menstrasyon ve kök hücre teorisini desteklemektedir. Her iki mirna düzeyinin over kanseri gelişmemiş diğer iki gruptaki ötopik endometriyum dokularında düşük olmasının da bununla uyumlu bir bulgu olduğu düşüncesindeyiz. Bu durum, over kanseri gelişecek olguların belirlenmesinde asıl bilginin ötopik endometriyumda saklı olabileceğini akla getirmektedir.

Dolaşımdaki miRNA'ların heterojen orjini göz önüne alındığında, tümör kaynaklı bir miRNA'yı, diğer tümör dışı hücre kaynaklı (kan hücreleri gibi) miRNA'lardan ayırt etmek sorun oluşturabilir (1). Bununla birlikte, kanser hücrelerinden salınan miRNA'lar, genellikle ekstraselüler veziküller içinde bulunur ve bu miRNA'lar, içerik ve yüzey belirleyicileri bakımından normal hücrelerden farklı, spesifik bir moleküler profile sahiptir. Dolaşımdaki miRNA'lar ile ilgili kısıtlayıcı bir durum, miRNA ekspresyon düzeylerinin yaş, cinsiyet, etnik köken ve örnek tipinden (tam kan, serum, plazma gibi) etkilenebilmesidir. Bununla birlikte, mirna'lar, normal doku ve o dokunun neoplastik formunda farklı düzeylerde eksprese edildikleri için güvenilir bir tanısal biyobelirteç olarak görülmektedir. Bu nedenle, tamamı kadın hastadan oluşan bu çalışmayı planlarken, öncelikle aynı hastalara ait doku örneklerinde mirna 200b ve mirna 21 düzeylerini değerlendirmeyi, böylece, hasta yaşı, doku ve hormonal düzeyden kaynaklanabilecek mirna düzeyi farklılıklarını minimalize etmeye çalıştık. Ardından gruplar arası mirna ekspresyon düzeyi farklılıklarını gösterdik. miRNA'lar PCR dışında yeni gelişen in situ hibridizasyon teknikleri ile doku düzeyinde de gösterilmeye başlanmıştır (19). Bu durum, ışık mikroskobik incelemelerde H&E kesitlerde tümör morfolojisi ile eş zamanlı mirna ekspresyonu değerlendirme avantajı sağlayabilir.

Mirna 200 ailesi, mirna 200a, 200b, 200c, mirna 141 ve mirna 429'u içeren beş mirna üyesini kapsar ve tümör supresör etki gösterdiği iyi bilinen mirna ailelerinin başında gelir (12). Bu

nedenle bu grup mirna düzeylerinde azalma tümör progresyonunu uyarmaktadır. Buna ek olarak bu mirna grubu, çeşitli çalışmalarda, hücre büyümesi, apopitozis ve epitelyal mezenşimal transizyon ile ilişkili olarak bildirilmiştir (12). EİOK'ni de kapsayan çeşitli over kanserlerinde, Mirna 200 ailesi üyelerinden başta mirna 200a, 200b ve 200c düzeyleri araştırılmıştır (16, 20-23). Meng ve ark ait çalışmada, mirna 200b'nin içinde bulunduğu dörtlü mirna paneli (mirna 200a, mirna 200b, mirna 200c ve mirna 373), EİOK'in tanısında 0.882 duyarlılık ve 0.90 spesifite göstermiştir (22). Başka bir çalışmada, Mirna 200b'nin, aynı zamanda kök hücre fenotipini düzenleme, proliferasyon ve ZEB1, ZEB2 ve KLF4'ü hedefleyerek endometriotik hücrelerde invaziv uzantılar oluşturmak yoluyla endometriozis patogenezinde rol oynadığı bildirilmiştir (**24**). Biz de, çalışmamızda, over kanseri olmayan endometriozisli olgulara ait (Grup 2) endometriozis dokularındaki mirna 200b ekspresyon düzeyini, endometriozisi olmayan Grup 1 ötopik endometriyum dokusundan daha yüksek saptadık. Bu bulgudan sonuçla mirna 200b'nin bir endometriozis belirteci olabileceğini düşünmekteyiz. Szubert ve ark., endometriozis ve farklı tiplerde over karsinomu (EİOK ve Yüksek dereceli seröz over karsinomu) nedeniyle opere olan toplam 135 hastaya ait doku örneğinde 7 ayrı mirna düzeyini değerlendirmiştir (25). Kontrol dokusu olarak sağlam over parankimi kullanılmıştır. Buna göre, mirna 200b ekspresyonu, over kanseri dokusunda, normal over parankimi ve endometriozis odaklarına göre daha az düzeyde saptanmıştır. Bununla birlikte mirna 200b düzeyi over kanseri histolojik tipleri arasında bir ayrım göstermemiştir (25).

Mirna 200b'nin içinde olduğu mirna panelleri (özellikle mirna 200a ve mirna 200c ile birlikte), metaanalizlerde ve in silico temelli (GEO: Gene Expression Omnibus database) çeşitli araştırmalarda, yüksek spesifite ve sensitivite değerleri nedeniyle klinik uygulamalarda over karsinomu tanısında bir biyobelirteç olarak önerilmiştir (12). Mirna 200b, diğer bazı çalışmalarda, yine belirli mirna panellerine dahil edilerek, EİOK'de, kötü sağkalımı gösteren prognostik bir belirteç olarak da bildirilmiştir (21, 22). Bir başka çalışmada, mirna 200b düzeyindeki artışın, DNA Metiltransferazı hedefleyerek sisplatin tedavisine olan direnci azalttığı ve kanser hücresi ölümünü uyardığına dair bulgular mevcuttur (26).

Mirna 21, karsinogenezis süreci en çok araştırılan ve onkojenik etki gösterdiği iyi bilinen mirnaların başında gelir. Epitelyal over kanserlerinde de serumda mirna 21 ekspresyon düzeyinde artış bildirilmiştir (13, 27, 28). Xu ve ark ait çalışmada, serum mirna 21 düzeyi, epitelyal over kanserlerinde sağlıklı kontrol hasta grubuna göre daha yüksek düzeyde saptanmıştır. Artmış serum mirna 21 düzeyi, daha kısa toplam sağkalım, ileri FİGO evresi ve yüksek tümör derecesi ile ilişkili bildirilmiştir. Bu bakımdan tanısal ve prognostik değeri nedeniyle mirna 21, epitelyal over kanserlerinde bir biyobelirteç olarak önerilmiştir (29). Over kanserleri ile ilgili diğer çalışmalar, mirna 21 ekspresyonunun, *PTEN*'in negatif regülasyonu ve sisplatin tedavisine direnç ile ilişkisine dairdir (27, 30). Mirna 21 doku düzeyi ile EİOK arasında spesifik bir bulgu, bilgimiz dahilinde literatürde bildirilmemiştir. Biz, çalışmamızda, over kanseri olgularında, ötopik endometriyum, endometriozis ve kanser odakları arasında mirna 21 ve mirna 200b ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı bir fark saptamadık. Bununla birlikte, kanserli olguların ötopik endometriyumundaki mirna 21 ve mirna 200b düzeyleri, kanseri olmayan olguların ötopik endometriyumundan daha yüksekti. Bu bulgu, ötopik endometriyumdaki artmış mirna 21 ve 200b düzeylerinin, endometriozis zemininde over kanseri gelişebilecek olguları belirlemede yardımcı olabileceğini düşündürmektedir.

Hastalıkların erken dönem tespitinde kullanılmak amacıyla, günümüzde mirna-temelli biyosensör'lerin geliştirilmesi üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır (12). Over kanserleri genellikle ileri evrede tanı aldığı için erken dönemde tanıya katkı sağlayacak araştırmalar önem kazanmaktadır. Epitelyal over kanserlerinin erken tanısında, tek başına veya panel halinde, serum ya da doku düzeyinde bakılabilen, özellikle mirna 21'i içeren çeşitli biyosensör tipleri tanımlanmıştır (12, 31). Biyosensörler, kanser tanısında kullanılan, mirna düzeylerinin tespiti için kullanım alanı hızla gelişen, hızlı ve güvenilir sonuç verme kapasitesine sahip cihazlardır (12).

Bu çalışmanın kısıtlayıcı yanları; retrospektif dizaynı, az sayıda hasta ve az sayıda mirna içermesidir. Bununla birlikte, bu retrospektif çalışmanın metodolojisinde, grupları oluştururken, aynı hastalara ait doku örneklerinde mirna ekspresyon düzeylerini karşılaştırmayı amaçladık.

Böylece ötopik endometriyum - ektopik endometriyum - kanser dokusu arasındaki mirna ekspresyon düzeyi farklılıklarını gösterebildik. Bu çalışma için iki mirna belirledik. Mirna 200b'yi, araştırma konumuzla ilgili etkileri daha önceki çalışmalar ve in silico incelemelerde ortaya konduğu için tercih etik. Mirna 21'i ise epitelyal over kanserleri dahil çok sayıda solid organ tümöründe onkojenik etkisi gösterildiği için, özellikle mirna 21'i saptamaya yönelik biyosensörler geliştirildiği için, over kanserlerinin genellikle ileri evrede tanı alması ve agresif seyretmesi bakımından erken dönem tanısının önemli olması nedeniyle belirledik. Bu çalışma, bilgimiz dahilinde, aynı bireylere ait ötopik endometriyum, ektopik endometriyum ve over kanseri dokularında mirna düzeylerini karşılaştıran literatürdeki ilk çalışmadır. Buna göre, mirna 200b ve mirna 21 düzeyleri, EİOK olgularındaki ötopik endometriyumda, kanser olmayan olguların ötopik endometriyumundan daha yüksek düzeyde idi. Bu durum, endometriyozisli olgularda ötopik endometrium dokusunda saptanan artmış mirna 200b ve mirna 21 ekspresyon düzeylerinin EİOK gelişebilecek olguları belirlemede katkı sağlayabileceğini düşündürmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda vaka sayısı çok olmamakla birlikte, oluşturulan gruplar ile aynı hastalara ait ötopik endometriyum, ektopik endometriyum ve endometriozis ilişkili over kanseri dokularında mirna düzeylerini değerlendirme olasılığı sağlamıştır. Bu bakımdan bulgularımız literatüre önemli katkı sağlamaktadır. Mirna seçimi, önceki çalışmalar göz önüne alınarak, endometriozis yanı sıra epitelyal over kanseri ile ilişkisi ortaya konmuş mirna'lar arasından yapılmıştır. Buna göre endometriozis zemininde gelişebilecek over kanserlerinin erken tanısında, endometriozisli olguların ötopik endometriyal dokularında mirna 200b ve mirna 21 düzeylerinin ölçümü katkı sağlayabilir. Benzer metodolojiye sahip, daha fazla sayıda vakayı kapsayan, mirna panelleri eşliğinde uygulanan ek çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

7. KAYNAKLAR

1.Kelten Talu C. MikroRNA' lar ve mikroRNA' ların biyobelirteç olarak endometriozis ve endometriozis ilişkili epitelyal over kanserlerindeki rolü (Review, Türkçe). J DEU Med. 2021;35(3):401-14.

2.Oliva E. WHO classifications of tumours Editorial Board. Female genital tumours. Endometriosis and related conditions. In: 5th ed. 2020. p. 169–73.

3.Matias-Guiu X, Stewart CJR. Endometriosisassociated ovarian neoplasia. Pathology (Phila). 2018 Feb;50(2):190–204

4.Adilbayeva A, Kunz J. Pathogenesis of Endometriosis and Endometriosis-Associated Cancers. Int J Mol Sci. 2024 Jul 11;25(14):7624. doi: 10.3390/ijms25147624.

5.Yano T, Jimbo H, Yoshikawa H, Tsutsumi O, Taketani Y. Molecular analysis of clonality in ovarian endometrial cysts. Gynecol Obstet Invest. 1999;47 Suppl 1:41–5; discussion 46.

6.Steinbuch SC, Lüß AM, Eltrop S, Götte M, Kiesel L. Endometriosis-Associated Ovarian Cancer: From Molecular Pathologies to Clinical Relevance. Int J Mol Sci. 2024 Apr 13;25(8):4306. doi: 10.3390/ijms25084306.

7.Taniguchi F. New knowledge and insights about the malignant transformation of endometriosis. J Obstet Gynaecol Res. 2017 Jul;43(7):1093–100

8.Agarwal SK, Chapron C, Giudice LC, Laufer MR, Leyland N, Missmer SA, et al. Clinical diagnosis of endometriosis: a call to action. Am J Obstet Gynecol. 2019 Apr;220(4):354.e1-354.e12.

9.Tang L, Bian C. Research progress in endometriosis-associated ovarian cancer. Front Oncol. 2024 Apr 25;14:1381244. doi: 10.3389/fonc.2024.1381244. eCollection 2024.

10.Vannini I, Fanini F, Fabbri M. Emerging roles of microRNAs in cancer. Curr Opin Genet Dev. 2018 Feb;48:128-133. doi: 10.1016/j.gde.2018.01.001. Epub 2018 Feb 8.

11.Menon A, Abd-Aziz N, Khalid K, Poh CL, Naidu R. miRNA: A Promising Therapeutic Target in Cancer. Int J Mol Sci. 2022 Sep 29;23(19):11502. doi: 10.3390/ijms231911502.

12.Bhadra M, Sachan M, Nara S. Current strategies for early epithelial ovarian cancer detection using miRNA as a potential tool. Front Mol Biosci. 2024 Apr 16;11:1361601. doi: 10.3389/fmolb.2024.1361601. eCollection 2024.

13.Suryawanshi S, Vlad AM, Lin H-M, MantiaSmaldone G, Laskey R, Lee M, et al. Plasma MicroRNAs as Novel Biomarkers for Endometriosis and Endometriosis-Associated Ovarian Cancer. Clin Cancer Res. 2013 Mar 1;19(5):1213–24.

14.Dong M, Yang P, Hua F. MiR-191 modulates malignant transformation of endometriosis through regulating TIMP3. Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res. 2015 Mar 28;21:915–20.

15.Tian X, Xu L, Wang P. MiR-191 inhibits TNF-α induced apoptosis of ovarian endometriosis and

endometrioid carcinoma cells by targeting DAPK1. Int J Clin Exp Pathol. 2015;8(5):4933–42.

16.Braicu OL, Budisan L, Buiga R, Jurj A, Achimas-Cadariu P, Pop LA, Braicu C, Irimie A, Berindan-Neagoe I. miRNA expression profiling in formalin-fixed paraffin-embedded endometriosis and ovarian cancer samples. Onco Targets Ther. 2017 Aug 28;10:4225-4238. doi: 10.2147/OTT.S137107. eCollection 2017.

17.Nakamura N, Terai Y, Nunode M, Kokunai K, Konishi H, Taga S, et al. The differential expression of miRNAs between ovarian endometrioma and endometriosis-associated ovarian cancer. J Ovarian Res. 2020 Dec;13(1):51.

18.Kumari P, Sharma I, Saha SC, Srinivasan R, Minhas P. Diagnostic potential of differentially regulated microRNAs among endometriosis, endometrioid ovarian cancer, and endometrial cancer. J Cancer Res Ther. 2021 Jul-Sep;17(4):1003-1011. doi: 10.4103/jcrt.JCRT_969_19.

19.Sethi S, Sethi S, Bluth MH. Clinical Implication of MicroRNAs in Molecular Pathology: An Update for 2018. Clin Lab Med. 2018 Jun;38(2):237–51.

20.Prislei, S., Martinelli, E., Mariani, M., Raspaglio, G., Sieber, S., Ferrandina, G., et al. (2013). MiR-200c and HuR in ovarian cancer. BMC cancer 13, 72–14. doi:10.1186/1471-2407-13-72

21.Cao, Q., Lu, K., Dai, S., Hu, Y., and Fan, W. (2014). Clinicopathological and prognostic implications of the miR-200 family in patients with epithelial ovarian cancer. Int. J. Clin. Exp. Pathology 7 (5), 2392–2401.

22.Meng, X., Müller, V., Milde-Langosch, K., Trillsch, F., Pantel, K., and Schwarzenbach, H. (2016). Diagnostic and prognostic relevance of circulating exosomal miR-373, miR200a, miR-200b and miR-200c in patients with epithelial ovarian cancer. Oncotarget 7 (13), 16923–

16935. doi:10.18632/oncotarget.7850

23.Oliveira, D. N. P., Carlsen, A. L., Heegaard, N. H., Prahm, K. P., Christensen, I. J., Høgdall, C. K., et al. (2019). Diagnostic plasma miRNA-profiles for ovarian cancer in patients with pelvic mass. PLoS One 14 (11), e0225249. doi:10.1371/journal.pone.0225249

24.Eggers, J.C.; Martino, V.; Reinbold, R.; Schäfer, S.D.; Kiesel, L.; Starzinski-Powitz, A.; Schüring, A.N.; Kemper, B.; Greve, B.; Götte, M. microRNA miR-200b affects proliferation, invasiveness and stemness of endometriotic cells by targeting ZEB1, ZEB2 and KLF4. Reprod. Biomed. Online 2016, 32, 434–445.

25.Szubert M, Nowak-Glück A, Domańska-Senderowska D, Szymańska B, Sowa P, Rycerz A, Wilczyński JR. miRNA Expression Profiles in Ovarian Endometriosis and Two Types of Ovarian Cancer-Endometriosis-Associated Ovarian Cancer and High-Grade Ovarian Cancer. Int J Mol Sci. 2023 Dec 14;24(24):17470. doi: 10.3390/ijms242417470.

26.Liu, J.; Zhang, X.; Huang, Y.; Zhang, Q.; Zhou, J.; Zhang, X.; Wang, X. miR-200b and miR-200c co-contribute to the cisplatin sensitivity of ovarian cancer cells by targeting DNA methyltransferases. Oncol. Lett. 2019, 17, 1453–1460.

27.Ji K, Wang X, Zhang A, Wen H. Prognostic value of microRNA-21 in epithelial ovarian carcinoma: A protocol for systematic review and meta analysis. Medicine (Baltimore). 2020 Dec 24;99(52):e23849. doi: 10.1097/MD.0000000000023849.PMID: 33350775

28.Qiu L, Weng G. The diagnostic value of serum miR-21 in patients with ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis. J Ovarian Res. 2022 May 2;15(1):51. doi: 10.1186/s13048-022-00985-3.PMID: 35501921

29.Xu, Y.-Z., Xi, Q.-H., Ge, W.-L., and Zhang, X.-Q. (2013). Identification of serum

microRNA-21 as a biomarker for early detection and prognosis in human epithelial ovarian cancer. Asian Pac. J. Cancer Prev. 14 (2), 1057–1060. doi:10.7314/apjcp.2013.14. 2.1057

30.Ralser DJ, Condic M, Egger E, Koensgen D, Mustea A, Stope MB. Evaluation of the Diagnostic Potential of Circulating MicroRNAs miR-1 and miR-21 in Patients With Ovarian Cancer. Anticancer Res. 2022 Dec;42(12):5839-5845. doi: 10.21873/anticanres.16092.PMID: 36456138

31.Zoughi S, Faridbod F, Moradi S. Rapid enzyme-free detection of miRNA-21 in human ovarian cancerous cells using a fluorescent nanobiosensor designed based on hairpin DNA-templated silver nanoclusters. Anal Chim Acta. 2024 Sep 1;1320:342968. doi: 10.1016/j.aca.2024.342968. Epub 2024 Jul 11.PMID: 39142796

EKLER

EK 1. ETİK KURUL ONAYI

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

Sayın Doç.Dr. Merih Güray Durak

Araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı aşağıda sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

ETİK KOMİSYONUN ADI	**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**
AÇIK ADRES	**Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR**
TELEFON	**0 232 412 22 54-0 232 412 22 58**
FAKS	**0 232 412 22 43**
E-POSTA	**goaek@deu.edu.tr**

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	9121-GOA	
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐ MÜNFERİT ARAŞTIRMA ☐ ÖÇM ☐ YÜKSEKLİSANS ☐ DOKTORA ☒	
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	**Endometriozis zemininde gelişmiş over kanserlerinde mikrorna'ların karsinogenezis üzerindeki etkisi ve klinikopatolojik parametreler ile ilişkisi**	
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU		
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Doç.Dr. Merih Güray Durak Tıbbi Patoloji A.D.	
	TEZ SAHİBİNİ ADI SOYADI	E. Canan Kelten Talu	
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ☐

	Belge Adı	**Tarihi**	**Versiyon Numarası**	**Dili**
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe ☐ İngilizce ☒ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐

KARAR BİLGİLERİ	**Karar No:2024/30-09**	**Tarih:11.09.2024**
	Doç.Dr. Merih Güray Durak'ın sorumlusu olduğu **"Endometriozis zemininde gelişmiş over kanserlerinde mikrorna'ların karsinogenezis üzerindeki etkisi ve klinikopatolojik parametreler ile ilişkisi"** isimli bilimsel araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, araştırmanın mevcut haliyle etik yönden uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ

ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu

ETİK KURUL ÜYELERİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile İlişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Mehmet Birhan Yılmaz (Başkan)	Kardiyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Şükran Köse (Başkan Yardımcısı)	Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	DEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Aylin Özgen Alpaydın	Göğüs Hastalıkları	DEÜ Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Özgür Er	Endodonti A.D.	Diş Hekimliği Fakültesi	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Hatice Şimşek Keskin	Halk Sağlığı	DEÜ Tıp Fakültesi Halk Sağlığı Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Nil Hocaoğlu Aksay	Tıbbi Farmakoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Seher Özyürek	Muskuloskeletal Fizyoterapi	DEÜ Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Fakültesi	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Meryem Öztürk Haney	Halk Sağlığı Hemşireliği	Hemşirelik Fakültesi Halk Sağlığı Hemşireliği	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr. Şule Özbilgin	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	DEÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Tıp Bilimleri Bölümü	Kadın	E ☐	H ☒	Katılamadı
Doç.Dr.Tolga Şahin	Spor Yönetim Bilimleri	Necat Hepkon Spor Bilimleri Fakültesi	Erkek	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Gamze Tuna	Tıbbi Biyokimya	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Kadın	E ☐	H ☒	Katılamadı

EK 2. TEZ İLE İLİŞKİLİ YAYIN 1

- Usul G, **Kelten Talu EC**, Yılmaz İ, Issın GN, Bektaş S, Can Trabulus D. The Association of Neuroendocrine Differentiation with MicroRNA 21 and MicroRNA let7f Expression and the Clinicopathological Parameters in Primary Invasive Breast Carcinomas with Neuroendocrine Features.. Diagnostics (Basel). 2024 Oct 3;14(19):2211. doi: 10.3390/diagnostics14192211.
- Makelede her iki yazar da (Usul G, **Kelten Talu EC**) ilk isim hakkına sahiptir. Makale ön sayfasında belirtilmiştir. Makalenin ilk sayfası ekte verilmiştir.
- SCI-E'de indekslenen "Diagnostics" Dergi'sinde kabul edilmiş ve yayınlanmıştır.
- Journal Rank**:** JCR - Q1 (Medicine, General and Internal) / CiteScore - Q2 (Internal Medicine)

Diagnostics

Diagnostics is an international, **peer-reviewed**, open access journal on medical diagnosis published semimonthly online by MDPI. The **British Neuro-Oncology Society (BNOS)**, the **International Society for Infectious Diseases in Obstetrics and Gynaecology (ISIDOG)** and the **Swiss Union of Laboratory Medicine (SULM)** are affiliated with *Diagnostics* and their members receive a discount on the article processing charges.

- **Open Access** — free for readers, with **article processing charges (APC)** paid by authors or their institutions.
- **High Visibility:** indexed within **Scopus**, **SCIE (Web of Science)**, **PubMed**, **PMC**, **Embase**, **Inspec**, **CAPlus / SciFinder**, and **other databases**.
- **Journal Rank:** JCR - Q1 (Medicine, General and Internal) / CiteScore - Q2 (Internal Medicine)
- **Rapid Publication:** manuscripts are peer-reviewed and a first decision is provided to authors approximately 20.5 days after submission; acceptance to publication is undertaken in 2.7 days (median values for papers published in this journal in the first half of 2024).
- **Recognition of Reviewers:** reviewers who provide timely, thorough peer-review reports receive vouchers entitling them to a discount on the APC of their next publication in any MDPI journal, in appreciation of the work done.
- Companion journal: ***LabMed***.

Impact Factor: 3.0 (2023); 5-Year Impact Factor: 3.1 (2023)

diagnostics

MDPI

Article

The Association of Neuroendocrine Differentiation with MicroRNA 21 and MicroRNA let7f Expression and the Clinicopathological Parameters in Primary Invasive Breast Carcinomas with Neuroendocrine Features

Gamze Usul [1,†], Esra Canan Kelten Talu [1,2,*,†], İsmail Yılmaz [3], Gizem Narlı Issın [4], Sibel Bektaş [5] and Didem Can Trabulus [6]

[1] Department of Pathology, Istanbul Training and Research Hospital, Hamidiye Faculty of Medicine, University of Health Sciences, Istanbul 34098, Türkiye
[2] Department of Molecular Pathology, Faculty of Medicine, Institute of Health Sciences, Dokuz Eylul University, İzmir 35410, Türkiye
[3] Department of Pathology, Sultan Abdülhamid Han Training and Research Hospital, Hamidiye Faculty of Medicine, University of Health Sciences, Istanbul 34668, Türkiye
[4] Mengücek Gazi Education and Research Hospital, Faculty of Medicine, Binali Yıldırım University, Erzincan 24180, Türkiye
[5] Department of Pathology, Gaziosmanpaşa Training and Research Hospital, Hamidiye Faculty of Medicine, University of Health Sciences, Istanbul 34255, Türkiye
[6] Department of General Surgery, Istanbul Training and Research Hospital, Hamidiye Faculty of Medicine, University of Health Sciences, Istanbul 34098, Türkiye
* Correspondence: esracanankelten.talu@sbu.edu.tr
† These authors contributed equally to this work.

check for updates

Citation: Usul, G.; Kelten Talu, E.C.; Yılmaz, İ.; Issın, G.N.; Bektaş, S.; Can Trabulus, D. The Association of Neuroendocrine Differentiation with MicroRNA 21 and MicroRNA let7f Expression and the Clinicopathological Parameters in Primary Invasive Breast Carcinomas with Neuroendocrine Features. *Diagnostics* **2024**, *14*, 2211. https://doi.org/10.3390/diagnostics14192211

Abstract: MiRNAs have been reported as biomarkers with diagnostic, prognostic, and predictive value for many different diseases. Therapeutic agents targeting some miRNAs are currently being developed. We aimed to compare BC-NEFs (carcinoma of the breast with neuroendocrine features) with IDC (invasive ductal carcinoma) cases without neuroendocrine features in terms of the level of miRNA expression known to show the oncogenic (miR-21) and tumor-suppressor effects (miR-let7f) and the clinicopathological features. A total of 29 patients with a diagnosis of BC-NEFs (15 cases with neuroendocrine differentiation >50% of the whole section of tumor and 14 cases with neuroendocrine differentiation 10–50% of the tumor) and 30 patients with a diagnosis of IDC (no neuroendocrine differentiation) were retrospectively re-evaluated. Expression levels of miR-21 and miR-let7f were determined by the qRT-PCR method in paraffin tissue blocks. MiR-21 expression was significantly higher in the IDC group than in the group with BC-NEFs. miR-let7f expression was significantly lower in the group with BC-NEFs compared to the IDC group. A high expression level of miR-21

EK 3. TEZ İLE İLİŞKİLİ YAYIN 2

- SCI-E kapsamındaki Cell Mol Biol dergisinde yayınlandı.

› Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 2019 Dec 31;65(8):1-6.

Gene variants of TCF7L2 are histopathologically important in colorectal cancers but do not have direct association with MYC expression

Nazlı Ezgi Ozkan Kucuk [1], Cem Horozoglu [2], Ozlem Timirci Kahraman [1], Soykan Arikan [3], Ammad Ahmad Farooqi [4], Saime Turan [1], Gurbet Korkmaz [1], Esra Canan Kelten Talu [5], Uteuliyev Yerzhan Sabitaliyevich [6], Ilhan Yaylim [1]

Affiliations + expand

PMID: 32133972

Abstract

Rapidly accumulating preclinical and clinical studies have helped us to unveil underlying mechanisms of colorectal cancer development and progression. Deregulated signaling pathways play instrumental role in carcinogenesis, drug resistance and metastasis. Wnt signaling cascade has attracted considerable attention in colorectal cancer as many ground-breaking researches have highlighted central role of Wnt pathway in pathogenesis of colorectal cancer. T-Cell Transcription Factors (TCFs) have been shown to work synchronously with β-catenin to fuel colorectal cancer development and progression. Chromatin immuno-precipitation coupled with high-throughput sequencing (ChIP-Seq) data sets has deepened our knowledge about critical role of risk-associated SNPs. Increasingly it is being reported that many risk-associated SNPs are located within binding sites for transcription factors and consequently risk status of these SNPs may modify binding pattern of transcriptional factors and thus rewire the transcriptional regulation. DNA was extracted from peripheral blood samples of 117 colorectal cancer patients and 127 healthy subjects. TCF7L2 variants (rs6983267, rs7903146) were examined by the PCR-RFLP method.

EK 4. TEZ İLE İLİŞKİLİ YAYIN 3

'Mol Biol Rep' dergisinde yayınlandı (2023).

> Mol Biol Rep. 2023 Jun;50(6):5157-5163. doi: 10.1007/s11033-023-08433-1. Epub 2023 Apr 29.

Expression of genes related to iron homeostasis in breast cancer

Tuba Mutlu [1], Emre Ozoran [2], Didem Can Trabulus [3], Canan Kelten Talu [4], Duygu Erhan [5], Meltem Mete [5], Mehmet Guven [6]

Affiliations + expand

PMID: 37119411 DOI: 10.1007/s11033-023-08433-1

Abstract

Background: The dysfunctions in the metabolism of iron have an important role in many pathological conditions, ranging from disease with iron deposition to cancer. Studies on malignant diseases of the breast reported irregular expression in genes associated with iron metabolism. The variations are related to findings that have prognostic significance. This study evaluated the relationship of the expression levels of transferrin receptor 1 (TFRC), iron regulatory protein 1 (IRP1), hepcidin (HAMP), ferroportin 1 (FPN1), hemojuvelin (HFE2), matriptase 2 (TMPRSS6), and miR-122 genes in the normal and malignant tissues of breast cancer patients.

Methods & results: The normal and malignant tissues from 75 women with breast malignancies were used in this study. The patients did not receive any treatment previously. Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used in figuring the levels of gene expression associated with iron metabolism. When the malignant and normal tissues gene expression levels were analyzed, expression of TFRC increased (1.586-fold); IRP1 (0.594 fold) and miR-122 (0.320 fold) expression decreased; HAMP, FPN1, HFE2, and TMPRSS6 expressions did not

EK 5. TEZ İLE İLİŞKİLİ YAYIN 4

'Mol Biol Rep' dergisinde yayınlandı (2022).

> Mol Biol Rep. 2022 Jan;49(1):531-537. doi: 10.1007/s11033-021-06910-z. Epub 2021 Nov 2.

Investigation of SRP9 protein expression in breast cancer

Gizem Erdoğan [1], Didem Can Trabulus [2], Canan Kelten Talu [3], Mehmet Güven [4]

Affiliations + expand

PMID: 34727289 DOI: 10.1007/s11033-021-06910-z

Abstract

Background: Signal recognition particle (SRP) promotes co-translational translocation of the proteins through or into the endoplasmic reticulum membrane and it also has elongation arrest function. SRP9 is one of the six protein subunits of SRP and functions in elongation arrest activity by forming a heterodimeric structure with SRP14. It is one of the substrates of ADAR, which has been found to have a role in breast cancer. This study was conducted to investigate the SRP9 protein expression in normal and tumor tissues of patients with breast cancer and determine its prognostic significance.

Methods and results: A total of 32 female patients who were diagnosed as having primary breast cancer and underwent surgery were included in the study. Western Blotting was performed to detect SRP9 protein expression levels in normal and tumor tissue samples. Clinical and pathologic characteristics were analyzed to assess the prognostic significance. SRP9 protein expression was statistically higher in the breast cancer tissue samples compared to normal matched tissue, and the mean SRP9 protein expression levels of breast cancer tissue normal tissue samples were 1.019 ± 1.011 and 0.551 ± 0.456, respectively (p = 0.001). SRP9 protein expression levels in tumor tissue of

EK 6. TEZ İLE İLİŞKİLİ YAYIN 5

'Biomed Rep' dergisinde yayınlandı (2020).

› Biomed Rep. 2020 Oct;13(4):29. doi: 10.3892/br.2020.1336. Epub 2020 Jul 23.

Impact of histone methyltransferase SUV420H2 in breast cancer

Hüsniye Isin [1], Emre Özgür [1], Canan Kelten Talu [2], Didem Can Trabulus [3], Didem Karaçetin [4], Ugur Gezer [1]

Affiliations + expand

PMID: 32765868 PMCID: PMC7403839 DOI: 10.3892/br.2020.1336

Abstract

Breast cancer is the most common type of cancer in women worldwide. Triple methylation of H4 lysine 20 (H4K20me3), a key component of epigenetic regulation of genomic integrity, is catalyzed by the methyltransferase, SUV420H2. Data on the expression status of SUV420H2 in breast cancer are limited. In the present study, the influence of SUV420H2 suppression on the proliferation of breast cancer cells was experimentally investigated. Subsequently, SUV420H2 expression was assessed in resectable breast cancer along with H4K20me3 status. SUV420H2 expression was knocked down in breast cells using small interfering RNA oligonucleotides. SUV420H2 expression was determined semi-quantitatively at the mRNA level. H4K20me3 was measured on extracted histone proteins using an approach similar to ELISA. Suppression of the SUV420H2 gene resulted in increased cell proliferation. Although the median SUV420H2 expression values were similar in tumor tissues and non-cancerous regions in the entire cohort (0.0022 and 0.0015, respectively; P=0.46), there was a notable difference in expression between tumor tissues and the adjacent non-cancerous region in the majority of patients. Increased SUV420H2 expression in tumors compared with healthy tissue was predominantly observed in patients with early-stage breast cancer, whereas reduced SUV420H2 expression was observed in tumors more frequently in patients with

EK 7. TEZ İLE İLİŞKİLİ YAYIN 6

'Mol Biol Rep' dergisinde yayınlandı (2020).

› Mol Biol Rep. 2020 Jun;47(6):4225-4231. doi: 10.1007/s11033-020-05498-0. Epub 2020 May 8.

An investigation of the relationship between TMPRSS6 gene expression, genetic variants and clinical findings in breast cancer

Meltem Mete [1], Didem Can Trabulus [2], Canan Kelten Talu [3], Emre Ozoran [4], Tuba Mutlu [1], Bulent Tekin [1], Mehmet Guven [5]

Affiliations + expand

PMID: 32385772 DOI: 10.1007/s11033-020-05498-0

Abstract

Breast cancer is one of the most common types of cancer among women worldwide. The TMPRSS6 (Transmembrane Serine Protease 6) gene encodes matriptase-2, which plays an important role in iron hemostasis as the hepcidin regulator and may play a role in breast cancer susceptibility. In this study, we examined the expression levels of the TMPRSS6 gene in healthy tissues and tumor tissues of breast cancer patients; and the relationship between these levels and pathological findings. The relationship between TMPRSS6 polymorphisms (rs733655, rs5756506, rs2413450, rs855791, rs2235324, rs4820268) and patients' hematological parameters. The gene expression study encompassed 47 breast cancer patients and the gene polymorphism study consisted of 181 breast cancer patients and 100 healthy controls. Gene expression analysis was performed by qRT-PCR. The genotyping of TMPRSS6 polymorphisms was performed by RT-PCR.