T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

DENEYSEL OLUŞTURULAN ENDOMETRİAL HİPERPLAZİ MODELİNDE METFORMİN VE PROGESTERON TEDAVİSİNİN SURVİVİN, BCL-2, KASPAZ-9, BAD VE BAX GENLERİ EKSPRESYONLARI ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Proje No: 5591

Proje Türü
Tıpta uzmanlık tezi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Prof. Dr. Bülent ÖZÇELİK
Kadın Hastalıkları ve Doğum A.B.D

Dr. Erdem ŞAHİN
Kadın Hastalıkları ve Doğum A.B.D

Ağustos 2015
KAYSERİ

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

DENEYSEL OLUŞTURULAN ENDOMETRİAL HİPERPLAZİ MODELİNDE METFORMİN VE PROGESTERON TEDAVİSİNİN SURVİVİN, BCL-2, KASPAZ-9, BAD VE BAX GENLERİ EKSPRESYONLARI ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Erdem ŞAHİN

KAYSERİ - 2015

Bu tez çalışması Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırma ve Proje başkanlığı tarafından 5591 proje kodu ile desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Beni bu araştırmaya yönlendiren, çalışmanın her aşamasında desteğini esirgemeyip büyük emek veren, çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Bülent ÖZÇELİK'e teşekkürü bir borç bilirim.

Uzmanlık eğitimim boyunca benden bilgi, beceri ve ilgilerini esirgemeyen, mesleki incelikleri kazanmamda çok büyük emekleri olan değerli hocalarıma şükranlarımı sunuyorum. Ayrıca birlikte çalısmaktan her zaman mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarım, servis hemşire ve personeline teşekkür ederim.

Tüm eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini her zaman yanımda hissettiğim değerli aileme ve tezimin hazırlanması esnasında bana gösterdiği sabır ve destekten dolayı sevgili eşime sonsuz sevgi ve saygılarımı sunar, teşekkür ederim.

Erdem ŞAHİN

Ağustos 2015, KAYSERİ

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR 4

İÇİNDEKİLER 5

KISALTMALAR ..... **Error! Bookmark not defined.**

TABLOLAR LİSTESİ ..... **Error! Bookmark not defined.**

RESİMLER LİSTESİ ..... **Error! Bookmark not defined.**

ÖZET 6

ABSTRACT 7

1. GİRİŞ VE AMAÇ ..... **Error! Bookmark not defined.**

2. GENEL BİLGİLER 11

2.2. APOPTOSİS (PROGLAMLANMIŞ HÜCRE ÖLÜMÜ) 21

2.2.1. Apopitosis 21

2.2.2. Apoptosisin regulasyonunda rol oynayan genler 24

3. YÖNTEM VE GEREÇLER 27

4. BULGULAR 29

5. TARTIŞMA 33

6. SONUÇLAR 42

KAYNAKLAR 44

TEZ ONAY SAYFASI ..... **Error! Bookmark not defined.**

ÖZET

Amaç: Deneysel oluşturulan endometrial hiperplazi modelinde Survivin, Bcl-2, Kaspaz-9, Bad ve Bax genleri ekspresyonları üzerine metformin ve progesteron tedavisinin etkilerinin araştırılması

Yöntem ve Gereçler: Çalışmada ağırlıkları 180-260 g olan 40 adet 8 haftalık dişi Wistar-Albino ratlar kullanıldı. Ratlar toplam 3 gruba ayrıldı. Medikasyon yapılmadan önce tüm ratlara bilateral ooferektomi yapıldı. Tüm ratlara 20 gün boyunca 4mg/kg 17β estradiol hemihydrate aralıksız vererek endometrial hiperplazi gelişimi indüklendi(76). Önceki çalışmalar ile 17β Estradiol hemihydrate ile 10 günlük medikasyon sonrası endometrial hiperplazi geliştiği kanıtlanmış olduğu için, 17β Estradiol hemihydrate ile medikasyonun 10. gününde gruplara uygun ek diğer medikasyonlar başlandı(76). 13 rattan oluşan estradiol+ metformin(E+M) grubuna 4mg/kg 17β estradiol hemihydrate'a ek olarak 50 mg/kg metformin, 13 rattan oluşan estradiol+progesteron(E+P) grubuna 17β estradiol hemihydrate'a ek olarak 1mg/gün medroxiprogesteron asetat verildi. 12 rattan oluşan estradiol(E) grubu ise 20 gün boyunca sadece 17β estradiol hemihydrate alan grup oldu. Medikasyon sonrası 20. günde ratlar yüksek doz eter inhale ettirilerek öldürüldü ve ikinci kez laparotomi ile histerektomileri yapıldı. Endometrial dokudan gen ekspresyon analizleri ve patolojik değerlendirmeleri yapıldı.

Bulgular: Çalışmada her üç grupta medikasyon sonrası endometrial hiperplazi ve gen ekspresyon düzeyleri değerlendirildi. Metformin ve progesteronun endometrial hiperplaziyi anlamlı şekilde tedavi ettiği ve metforminin en az progesteron kadar tedavide etkili olduğu tespit edildi. Gruplar arasında Survivin, Kaspaz-9, Bad, Bax, Bcl- 2 gen ekspresyonları ve Bcl-2/Bax oranı karşılaştırıldı. Gen ekspresyonlarının ortalama, minimum ve maksimum değerleri belirlenerek istatistiksel analizleri yapıldı. Gruplar arasında Survivin, Kaspaz-9, Bad, Bax, Bcl-2 gen ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamakla beraber Bcl-2/Bax oranında estradiol ve metfomin(E+M) ile estradiol ve medroksiprogesteron asetat(E+P) alan gruplar sadece estradiol(E) alan grup ile kıyaslandığında metformin ve medroksiprogesteron asetat alan gruplarda Bcl-2/Bax oranının anlamlı şekilde azaldığı ve bu azalış ile beraber hücre apoptosisinin uyarılarak endometrial hiperplazinin geriletmiş olabileceği gösterildi.

Sonuç: Çalışmamızda, endometrial hiperplazi tedavisinde etkinliği kanıtlanmış progesteron ile metformini kıyasladığımızda metforminin de progesterona benzer şekilde hiperplaziyi gerilettiğini tespit ettik. Gen ekspresyonları değerlendirildiğinde progesteronun endometrial dokuda Bcl-2/Bax oranını anlamlı şekilde azalttığı, metforminin de yine progesterona benzer şekilde Bcl-2/Bax oranını azaltalarak apoptosisi uyardığı gösterdik. Metforminin literatürde bilinen etkilerine ek olarak, apoptosisin regülasyonunda önemli rol oynayan ve hücrenin apoptosise uğrayıp uğramayacağını belirleyen Bcl-2/Bax oranını anlamlı şekilde azaltarak hücreyi oluşabilecek anormal çoğalmaya karşı apoptosise yönlendirdiği tespit ettik. Diğer gen ekspresyonları değerlendirildiğinde endometrial hiperplazi tedavisinde kullanılan progesteron ve metforminin Survivin, Kaspaz-9 ve Bad gen ekspresyonları üzerine etkili olmadığını anlaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: endometrial hiperplazi, metformin, progesteron, apoptosis, Bcl-2, Survivin, Kaspaz-9, Bad, Bax, Bcl-2/Bax

ABSTRACT

Objective: The aim of our study is Survivin, Bcl-2, Bad, Bax and Caspase- 9 gene expression levels after treatment metformin and medroksiprogeseron asetat with created endometrial hyperplasia rat model.

Materials and Methods: We use famale Winstar- Albino rats for our study. Before the medication we performed bilateral oophorectomy all this rats. We given 4mg/kg 17β Estradiol hemihydrate all rats for 20 days after first surgery. The rats were divided into 3 groups. Within 10 days after started 4mg/kg 17β estradiol hemihydrate we add 50 mg/kg metformin for E+M group and 1mg/day medroxiprogesteron asetat for E+P group. Only 4mg/kg 17β estradiol hemihydrate was used for 20 days in group E. The rats were sacrificed after 20 days with high-dose inhalted ether and hysterectomies were performed by second laparatomy. RNA isolation was performed from tissiue for genetic analysis. cDNA was obtained using the reverse transcriptase enzyme. Real time PCR used for detected Survivin, Bcl-2, Caspase-9, Bad and Bax gene mRNA expressions. Endometrial hystopathologic samples were stained with hematoxylin and eosin evaluation for examination.

Results: Endometrial hyperplasia treatment and gene expression levels compared all three groups. Between groups, we have shown that metformin and progesterone treatment with endometrial hyperplasia to be effective and metformin treatment is smillar with progesterone. Between groups, Survivin, Bcl-2, Caspase-9, Bad and Bax gene expressions were not statistical significant after treatment. Bcl-2/Bax ratio was a significant differance between E+P and E+M groups to E group (p:0,020).

Conclusions: We showed that metformin treatment with endometrial hyperplasia is effective and smillar than progesterone treatment. After endometrial hyperplasia treatment with progesterone, Bcl-2/Bax ratio is significantly decreased and we showed that metformin is smillar to progesterone on the Bcl-2/Bax ratio. There were no significant differences aceording to Survivin and Caspase-9 gene expression ratios between treatment groups.

Key words: endometrial hiperplasia, metformin, medroksiprogesteron asetat, apoptosis, Bcl-2, Survivin, Caspase-9 ,Bad, BaX, Bcl-2/Bax ratio

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Endometrial hiperplazi progesteron ile karşılanmamış endojen veya ekzojen östrojenik stimülasyonuna bağlı olarak endometrial gland ve stromada oluşan morfolojik ve biyolojik değişiklikler olarak tanımlanmaktadır. Endometrial hiperplazi endometriumun persistan östrojenik stimulasyonu sonucunda ortaya çıkmaktadır ve en sık nedeni anovulatuar sikluslardır(1). Endometrial hipeplazinin klinik önemi endometrium kanseri ile olan ilişkisidir. Özellikle menopoz sonrasında ve atipi içeren hiperplazilerde endometrium kanseri gelişme riski artmaktadır(2,3). Tanı, endometrial kaviteden alınan örneğin histopatolojik incelenmesi ile konulmaktadır.

Endometrial hiperplazinin tedavisi hastanın yaşına ve sitolojik atipinin varlığına bağlıdır. Öncelikle medikal tedavi tercih edilirken atipi varlığında cerrahi tedavi diğer bir seçenek olmaktadır. Medikal tedavide progestinler, oral kontraseptifler, levonorgestrel içeren rahim içi sistem, danazol ve GnRH analogları kullanılmaktadır. Atipi olmayan endometrial hiperplazide 3 ile 6 aylık düşük doz progestin tedavisi kullanmak günümüzde kabul gören en etkili tedavi yöntemidir. Aylık 12 ile 14 gün süreyle günlük 10 ile 20 mg dozda oral olarak verilen siklik medroksiprogesteron veya Megestrol 20-40 mg/g pratikte yaygın olarak kullanılmaktadır(8). Metformin ise biguanid grubu bir oral antihiperglisemik ajandır ve tip 2 diabet tedavisinde kullanılmaktadır. Kadın hastalıkları ve doğum kliniğinde polikistik over sendromu olan hastalarda insülin direncini azaltmak amacıyla kullanılmaktadır(5). Metfrominin PCOS'un uzun dönem komplikasyonları olan endometrial patolojiler üzerinde olumlu etkisi olduğu gösterilmiştir. Son yıllarda metforminin endometrium üzerine antiproliferatif etkileri olduğuna dair vaka sunumları ve hayvan deneyleri vardır(6,7).

Çalışmamızın amacı deneysel oluşturulan endometrial hiperplazi modelinde Survivin, Bcl-2, Kaspaz-9, Bad ve Bax genleri ekspresyonları üzerine metformin ve progesteron tedavisinin etkilerini değerlendirmektir. Gen ekspresyonu yüksek olan hastalarda medikal tedaviye rağmen gelişebilecek malignite riskinden dolayı, hastaların takip ve tedavilerinin planlanmasında yol gösterici olabilmesi açısından böyle bir çalışma planlanmıştır. Etik nedenlerden dolayı endometrial hiperplazi etiyolojisi ve tedavi yöntemlerinin araştırılması için insan yerine tavşan ve rat modelleri kullanılmıştır.(9)

2. GENEL BİLGİLER

2.1. ENDOMETRİAL HİPERPLAZİ

Endometrial hiperplazi, normal proliferatif endometriuma kıyasla artmış bez ve stroma oranı ile düzensiz şekil ve boyutlardaki bez proliferasyonu olarak tanımlanmaktadır(10). Anormal kanama şikayeti ile başvuran tüm kadınların yaklaşık %1,5'unda endometrial hiperplazi saptanmaktadır. Karşılanmamış östrojen bilinen en önemli risk faktörüdür. Etiyolojik nedenler arasında anovulatuar sikluslar (adölesan dönem, polikistik over, perimenopozal dönem), aşırı üretilen endojen östrojen, eksojen östrojen alımı, overyan stromal hiperplazi ve tamoksifen kullanımı bulunmaktadır(Tablo-1). En sık premenopozal dönemde görülse de anovulasyona bağlı olarak daha genç yaşlarda da görülebilmektedir(11).

Tablo 1. Endometrial hiperplazinin etiyolojisi

Endometrial hiperplazinin etiyolojisi
Anovulatuar sikluslar (adölesan dönem, polikistik over, perimenopozal dönem)
Aşırı endojen olarak üretilmiş östrojen (granüloza hücreli tm, tekoma, obezite)
Eksojen östrojen alımı
Overyan stromal hiperplazi
Tamoksifen kullanımı
Aile hikayesi

(Berek JS. Novak Jinekoloji. In: Lurain JR, ed. Uterus kanseri. Nobel Tıp Kitabevleri, 2004; Bölüm IV:1144-5).

Endometrial hiperplazi açısından değerlendirilmesi gereken hasta grubularına bakıldığında;

- 40 yaş üzeri anormal uterin kanama
- 40 yaş altında anormal kanamaları olup yukarıdaki risk faktörlerini taşıyan hastalar
- Medikal tedaviye yanıt vermeyen her türlü anormal kanamalar
- Karşılanmamış postmenopozal östrojen replasman tedavisi alanlar

- Pap smearde atipik glandüler hücrelerin saptandığı hastalar

- 40 yaş üstünde pap smearde endometrial hücre saptanan hastalar

- Herediter non-polipozis kolorektal kanseri olan hastalardır.

Endometrial hiperplazinin en sık görülen semptomları, düzensiz uterin kanama ve endometrial kavite içinde kan ve kan pıhtılarının birikmesine bağlı kramp şeklinde karın ağrısıdır. Ağrının temel nedeni uterin kanama olsa da bu durum kadınlarda endişe ve huzursuzluğa yol açmaktadır. Endometrial kavitenin kan ve kanın pıhtılaşmış ürünlerini dışarıya atmaya çalışması dar olan servikal kanaldan geçişi sırasında kramplara neden olmaktadır. Özellikle genç yaştaki hastalarda ağrı semptomları daha fazla olsa da, orta ve ileri yaş perimenopozal kadınlarda da aynı semptomlar görülebilmektedir(17,18)

Endometrial hiperplazilerin tanısında altın standart yaklaşım endometrial biyopsidir(21,22). Bu hastalığın yönetiminde en önemli nokta yeterli miktarda doku örneklemesi yaparak, hiperplazik lezyonlar ile kanserin ayırımını yapabilmektir. Günümüzde tanı amaçlı non-invaziv ve invaziv yöntemler klinik yaklaşımda kullanılmaktadır. Non-invaziv yönteler değerlendirildiğinde servikal sitoloji tanıda nadiren faydalı olmaktadır. Endometrial sitolojik taramaların (endocyte sampler) rutin kullanımda yeri yoktur ve yeterli çalışma bulunmamaktadır. Klinik çalışmalar transvajinal ultrasonografi (TVUSG) üzerine yoğunlaşmıştır. Ortalama endometrial kalınlık gri skala USG'lerde, endometrial hiperplazi için 21 mm iken, endometrial kalınlığın 5 mm az ölçüldüğü hastalarda endometrium kanseri nadiren izlenmektedir(4,21). Son yıllarda renkli doppler ve 3D power doppler USG'lerle ilgili çalışmalar umut verici olsa da yine de yeterli düzeyde çalışma yoktur(23).

Endometrial hiperplazilerin standart ve kesin tanı methodu endometrial biyopsidir. Eksojen progesteron kullanımı patolojik değerlendirmeleri etkileyebileceğinden biyopsiler çekilme kanamasından sonra alınmalıdır. Hangi teknik ile yapılan örneklemenin daha optimal olduğuna dair birçok çalışma vardır. Maliyet zarar hesaplarına göre kıyaslandığında ofis endometrial biyopsiler, klasik dilatasyon ve küretaj işlemine göre daha uygulanabilirdir. Pipelle methodu ile yapılan örneklemelerde

endometrial hiperplazi saptama oranı %66,7-82,3 olarak rapor edilmiştir(24). Yetesiz örnekleme ya da klinik şüphenin devam ettiği olgularda klasik dilatasyon ve küretaj ile biyopsi yapılması gerekmektedir. Küretaj işlemi invaziv bir işlem olduğundan uterus perforasyonu, enfeksiyon, kanama ve yalancı pasaj oluşması gibi komplikasyonları vardır.

Sonohisterografi klinikte kullanılan bir diğer invaziv tanı yöntemidir. İşlem ultrasonografi eşliğinde uterin kavitenin salin infüzyonu ile doldurularak ultrasonografik görüntülerinin alınmasıyla yapılır. Lezyonun endometrial olup olmadığının ayırımında sıklıkla kullanılmaktadır.

Ofis histereskopi kolay uygulanabilir ve artan oranda kullanılmaya başlanan bir diğer tanı yöntemidir. Kavitenin direk izlenip düzensiz rejenerasyon alanları, nekrotik alanlar, asimetrik kalınlaşma ve polipoid yapılar gibi şüpheli görülen bölgelerden biyopsi alınmasını sağlamaktadır. Ofis histereskopi ile değerlendirme yapmadan önce mutlaka endometrial örnekleme ile malignite ekarte edilmelidir. Kanser olgularında ofis histereskopinin peritoneal sitolojik yayılım yapma riski bilinmektedir.

Endometrial Hiperplazide Dünya Sağlık Örgütünün belirlediği sınıflama kullanılmaktadır (Tablo 2)(11).

Tablo 2. Endometrial Hiperplazide Dünya Sağlık Örgütü Sınıflaması

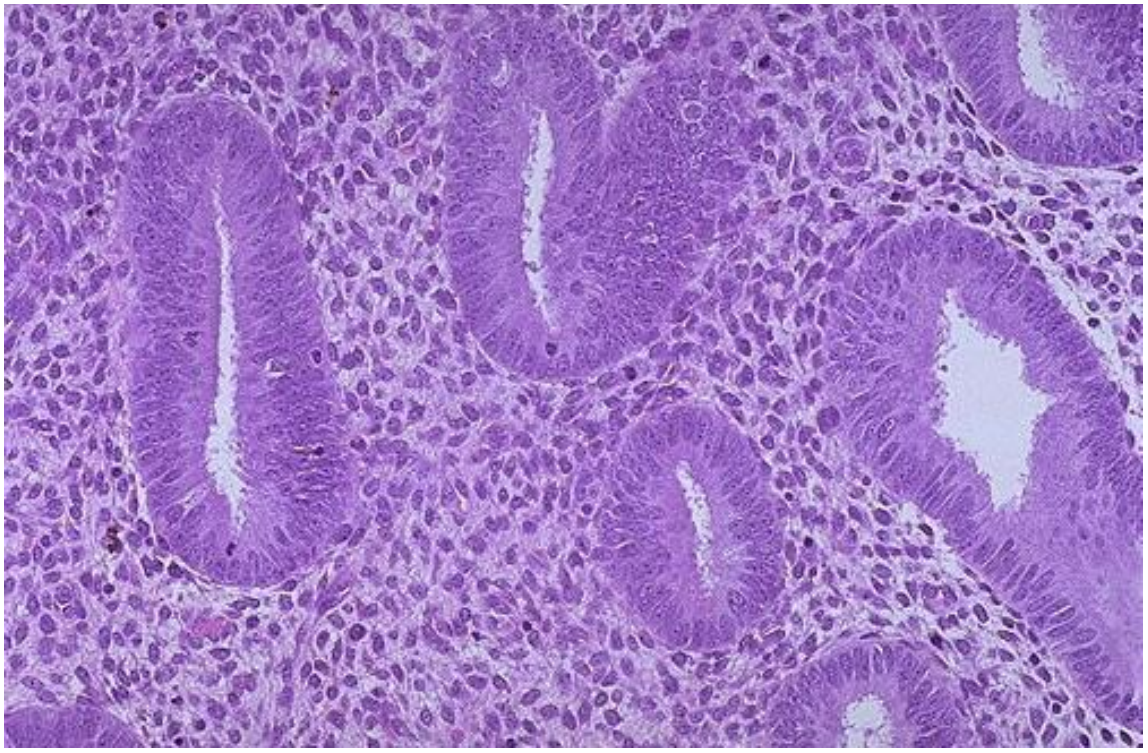
Endometrial Hiperplazide Dünya Sağlık Örgütü Sınıflaması	
Hiperplazi Tipleri	Kansere İlerleme (%)
Basit hiperplazi	1
Kompleks hiperplazi	3
Basit atipili hiperplazi	8
Kompleks atipili hiperplazi	29

Basit hiperplazi en sık rastlanan hiperplazi tipidir. Selluler atipi olmaksızın sayıları artmış ve sırt sırta vermiş glandlar izlenir. Genişlemiş yuvarlak ya da hafif düzensiz şekillerdeki kistik bezler ve glandüler kalabalıklaşma olmaksızın artmış bez stroma oranı ile karakterizedir. Burada glandlarda atipi yoktur(12).

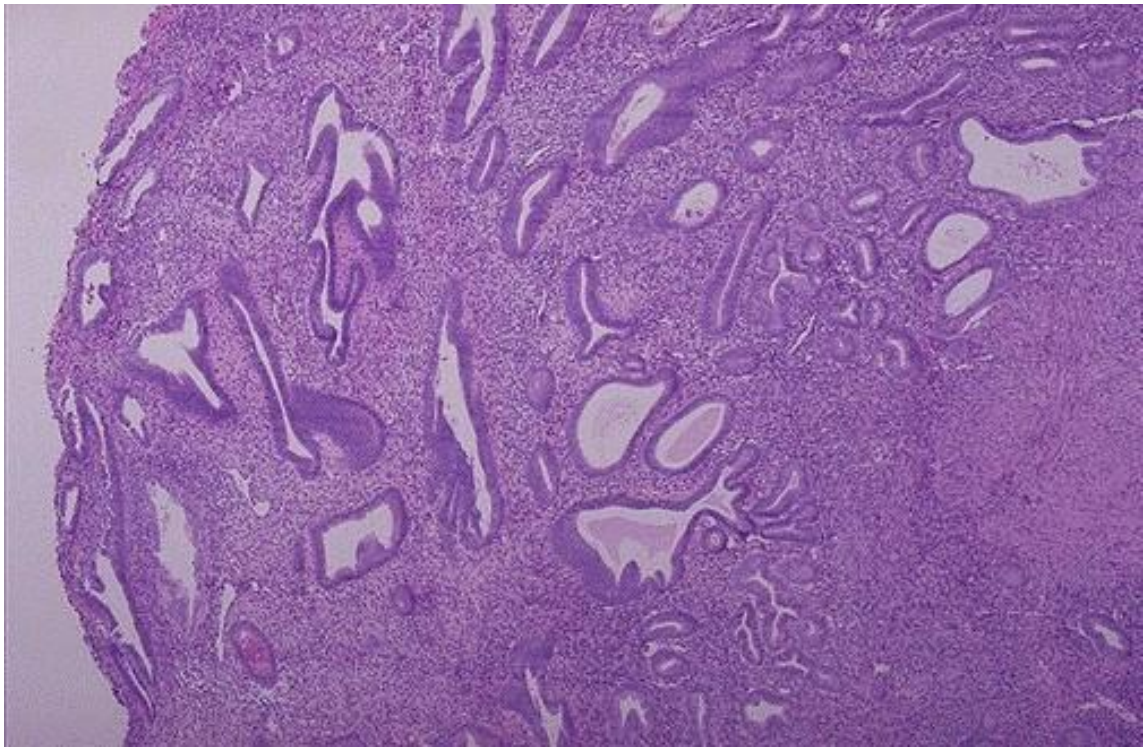
Kompleks hiperplazide selluler atipi olmaksızın sırt sırta vermiş kalabalıklaşma, irreguler konturlu, belirgin yapısal kompleksite gösteren glandlar izlenir. Döşeyici epitelyum hiperplastiktir ve lümeni çevreleyen epitelyumda sıklıkla strafikasyona rastlanmaktadır(13).

Basit atipili hiperplazide glandüler değisiklikler basit endometrial hiperplazideki gibidir ancak sitolojik atipi eşlik etmektedir.

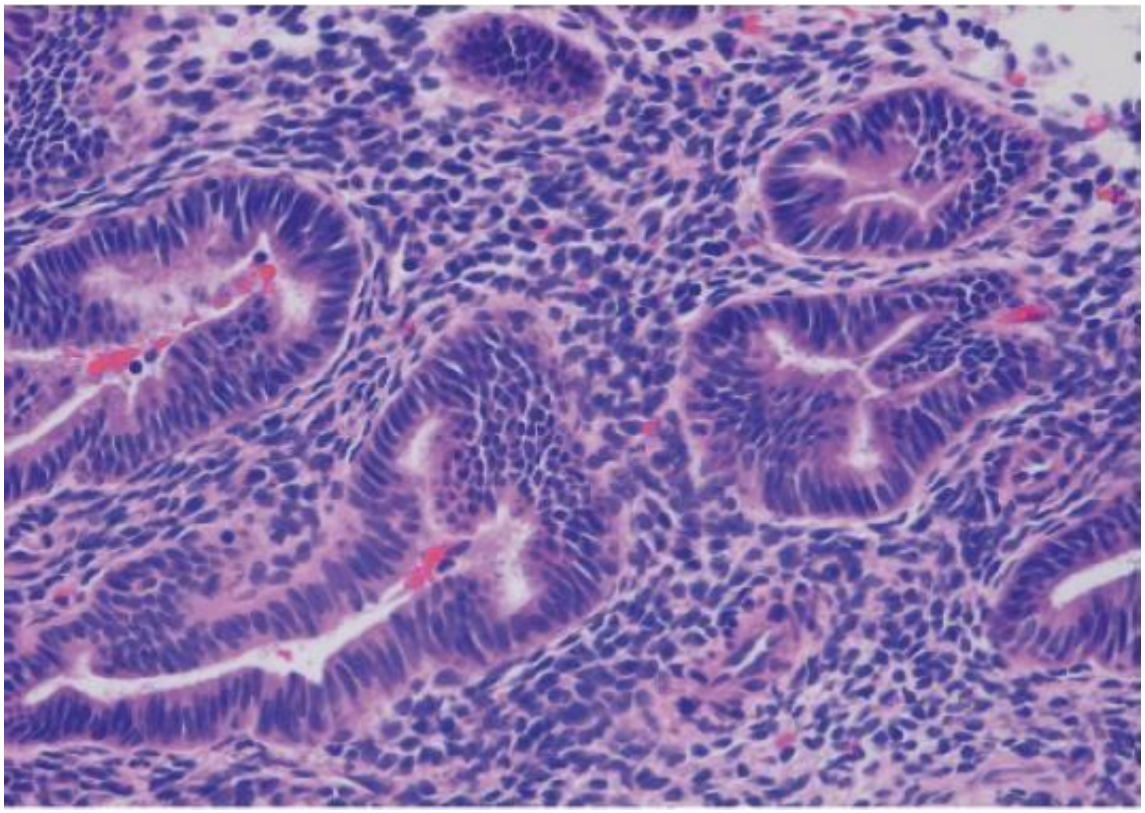
Kompleks atipili hiperplazide glandüler değişiklikler kompleks endometrial hiperplazideki gibidir ancak sitolojik atipi mevcuttur. Bezlerin kompleks yapısına ve kalabalık görünümüne ek olarak tanı koydurucu sellüler atipik özellikler sitomegali, polarite kaybı, hiperkromazi, nükleolus belirginliği ve nüve stoplazma oranı değişiklikleri vardır(14). Patolojik olarak atipi tek tük hücrelerin aksine dikkatli bir araştırmaya gerek kalmadan fark ediliyorsa o zaman atipik hiperplaziden bahsedilmektedir. Endometrial hiperplazinin önemi malignite ile olan ilişkinden kaynaklanmaktadır. Atipinin varlığı malignite için en önemli bulgudur.



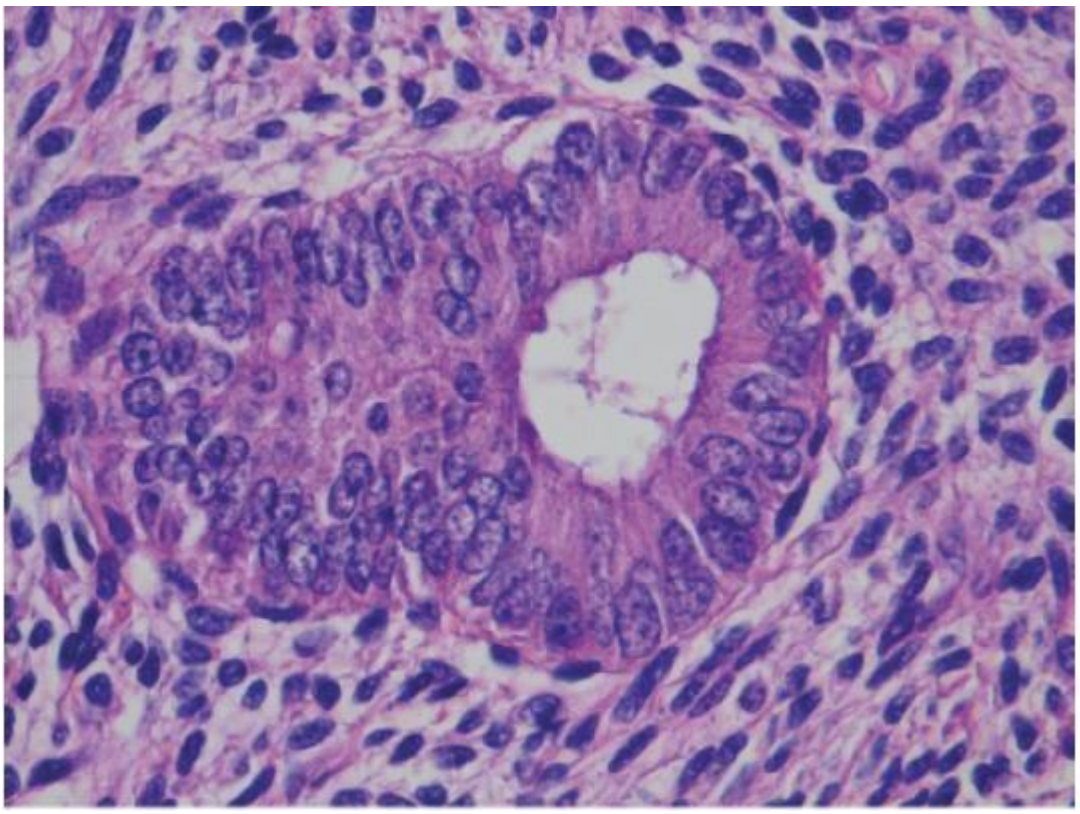
Resim 1: Normal endometrium



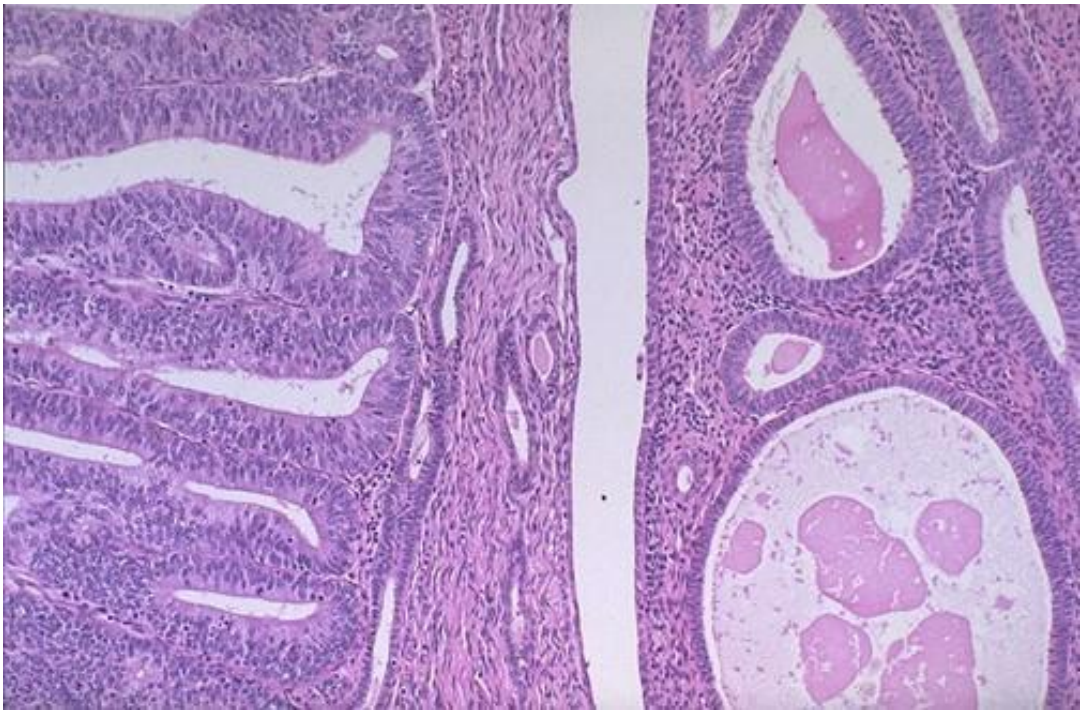
Resim 2: Basit endometrial hiperplazi



Resim 3: Kompleks endometrial hiperplazi



Resim 4: Basit atipili endometrial hiperplazi



Resim 5. Kompleks atipili endometrial hiperplazi

Endometrial hiperplazinin ayırıcı tanısında hiperplastik endometrial polip, atipik polipoid leiomyoma, endometrial metaplaziler, kronik non-spesifik endometrit, normal proliferasyon ve kistik atrofi akla gelmektedir. Kronik nonspesifik endometritde plazma hücreleri, granulomlar, stromal hücrelerde iğsileşme ve stromal ödem vardır. Poliplerde polipoid oluşum, dilate kalın duvarlı damarlar ve stromal fibrozis ayırıcı tanıda önemlidir. Kistik atrofide bez epiteli atrofiktir, mitoz izlenmez. Prolifertif endometriumun ayırımında ise bezlerin yapı olarak proliferatif özellikte olması yeterlidir. Atipili hiperplazi ayırıcı tanısında ise karsinom, metaplaziler, mekanik travma sonrası gelişen atipi ve reaktif atipi yer almaktadır.

Endometrial hiperplazide tedavi, hiperplazinin tipi ve buna bağlı malignite potansiyeline, hastanın yaşı ve fertilite arzusuna, genel sağlık durumuna ve over tümörleri gibi birlikte olan diğer jinekolojik problemlerin varlığına bağlıdır. Genel olarak tedavi seçenekleri medikal ve cerrahi olarak iki gruba ayrılabilir.

Medikal Tedavi Seçenekleri

1. Progestinler

a. Düşük doz (her ay 12-14 gün)

Medroksiprogesteron Asetat 10-20mg/gün

Norethindron Asetat 5mg/gün

Mikronize progesteron 200mg/gün

Megestrol Asetat 20-40 mg/gün

b. Yüksek doz (Her ay 21 gün)

Medroksiprogesteron Asetat 40-100mg/gün

Mikronize progesteron 300-400 mg/gün

Megestrol Asetat 80-160 mg/gün

2. Oral Kontraseptifler

3. Levonorgestrel içeren IU sistem

4. Danazol (400mg/gün, 3ay)

5. GnRH analogları(3,75mg/ay, 3-6 ay)

Cerrahi Tedavi Seçenekleri

- Dilatasyon küretaj (D&C)
- Endometrial ablasyon veya rezeksiyon
- Histerektomi

Medikal tedavide kullanılan birçok standart ajana ek olarak, gerek literatürde gerekse kliniğimizde uygulanmış olan metformin tedavisinin hem endometrial odaklar üzerine hem de endometrial hiperplazi üzerine olan olumlu tedavi edici etkisi gösterilmiştir.

Hiperplazi tedavisinde atipsiz olgularda ilk tercih düşük doz progesteron tedavisidir(26). Progestinlerin tedavi edici etkisi antiöstrojenik etkisine (östrojen reseptörlerini down regüle eder, sellüler östrojen dehidrogenaz seviyelerini artırması) ,antimitotik özelliğine (G1 fazında mitotik aktivite blokajı, DNA sentezi inhibisyonu) ve androjenik özelliğine bağlıdır(26). Atipi olmayan endometrial hiperplazide premenopozal kadınlar 3 ile 6 aylık düşük doz progestin ile tedavi edilmektedir. Aylık 12 ile 14 gün süreyle günlük 10 ile 20 mg dozda oral olarak verilen siklik medroksiprogesteron asetat veya Megestrol asetat 20-40 mg/g yaygın olarak kullanılmaktadır. Atipisiz olgularda düşük doz progestan tedavisinde cevap oranı %80, persistans %6, rekürrens %14 olarak saptanmıştır(27). Medikal tedavilerde 3-6 ay ara ile endometrial biyopsi ile kontrol yapılmalıdır. Tekrarlanan biyopsilerde persistan hastalığı olan kadınlarda tedavi günlük oral 40 ile 100 mg MPA ya da 160mg megestrol asetat gibi yüksek doz rejimleriyle değiştirilmelidir(28,29).

Atipili olgularda yüksek doz progesteron tedavisi ya da fertilite arzusu olmayan hastalarda cerrahi tedaviler tercih edilebilir. Atipili olgularda yuksek doz progestan tedavisine yanıt oranları değişkendir. Kullanılan progestanların tipine bağlı olarak tedavide belirgin ve anlamlı farklılıklar bulunmamaktadır. Medikal tedaviye direnç var ise histerektomi seçenek olarak düşünülmelidir(30,31). Over tümörleriyle birlikte olan hiperplazilerin varlığında en az bir jinekolog onkolog işbirliği ile tedavi yapılmalıdır.

Metformin, biguanid grubu bir oral antihiperglisemik ajandır ve tip 2 diabet tedavisinde kullanılır. Metformin, moleküler seviyede adenozin monofosfatla aktive protein kinaz aktivitesini artırır. Hepatik glukoz outputunu baskılar, glukozun intestinal emilimini azaltır, periferal dokularda insülin aracılı glukoz kullanımını artırır ve yağ asit konsantrasyonlarını düşürerek glukoneogenezi azaltarak antilipolitik etki gösterir(25,32). Oral olarak alındıktan sonra ince barsaklardan hızla emilir ve iki saat sonra plazma pik konsantrasyonuna ulaşır. Hedef dozu 1500 mg'dan 2550 mg'a kadar değişebilir. Günlük 1000 mg'ın altında düzenli bir klinik cevap gözlenmez.

En sık yan etkileri diyare, bulantı, kusma, şişkinlik, hazımsızlık ve karında rahatsızlık hissidir. Gastrointestinal sistem(GİS) yan etkilerinin barsaklarda metformin konsantrasyonunun artmasıyla barsak duvarında laktik asit yapımının artırması sonucu

ortaya çıktıgı bilinmektedir. Metformin gastroinestinal yan etkilerinin azalması için yemeklerle birlikte alınması önerilmelidir. Birçok klinisyen GİS yan etkilerini azaltmak için yemeklerle birlikte ve 500mg/gün dozunda başlar, tedavi tolere edilebilirse dozu öğlen ve akşam yemeklerinde de 500'er mg alınacak şekilde artırılır. Maksimum doz günde üç kere 850 mg'dır (2550 mg). Metformin FDA'ye göre kategori B bir ilaçtır. Bazı klinisyenler gebelerdeki diabetin tedavisinde rutin olarak metformin kullanmaktadır. Ancak birçok klinik deneyim gebelikte kan sekeri regülasyonu için en uygun ajanın insülin olduğu yönündedir(35,36).

Kadın hastalıkları ve doğum kliniğinde PKOS'un patogenezinde insülin direncinin rolü belirlendikten sonra metformin, insülin direncini tedavi etmek için en sık kullanılan medikal ajan olmuştur. Hiperandrojenizm üzerine olan etkisini karaciger tarafından üretilen SHBG yapımını arttırıp, bunun sonucunda dolaşımdaki serbest testosteron seviyelerini azaltarak sağlar(33,34). Aynı zamanda sitokrom P450c17X aktivitesinin etkisini baskılayarak adrenal androjen üretimini düzenlediği ve overyan androjen üretimini azalttığı gösterilmistir(37). Metformin böylece SHBG seviyesinde artma, menstruel siklusta düzelme, kıllanmada azalma, kilo kaybı ve neticede ovulasyonu sağlayarak gebeliğin oluşmasını kolaylaştırıcı etki sağlamaktadır. Gebelik boyunca kullanımında ise ilk trimesterde spontan düşük ve gestasyonel diabet insidansında azalma sağlamaktadır. Uzun dönemde ise DM insidansında azalma, trigliserit ve LDL seviyesinde azalma, HDL seviyesinde artma, PAI-1 ve lipoprotein-a düzeyinde azalma sağlamıştır(38). Çalısmalarda metforminin vasküler yapılar üzerine koruyucu etkisinin 26 aya kadar uzadıgı tespit edilmiştir(39). PKOS'daki kullanım dozu 2 veya 3 x 850 mg/gün'dür.

Metformin ile ilgili son yıllarda yapılmış çalışmalarda in vitro olarak endometrioziste enflamatuar etkiyi azalttığı, aromataz enzim inhibisyonunu ve endometriotik stromal hücrelerin çoğalmasını önlediği gösterilmiştir. Metformin, aromataz enzim inhibisyonuna bağlı olarak bu enzim aktivasyonunun yüksek olduğu alanlarda östrojenin etkisini azaltmaktadır. Metformin ayrıca SHBG seviyelerini artırıp dolaşımdaki estradiol seviyelerinin sistemik olarak da azalmasına neden olur(40). Metformin ile yapılan rat modeli çalışmalarında endometrial hiperplaziyi gerilettiği ve endometrial hücrelerde moleküler düzeyde proliferasyonu durdurduğu gösterilmiştir(6,41). PKOS'lu hastalarda

yapılmış çalışmalarda metformin kullanan hastalarda endometrial proliferasyonun azaldığı ve dolaşımdaki östrojenin normal seviyelere düştüğü tespit edilmiştir(42).

2.2. APOPTOSİS (PROGLAMLANMIŞ HÜCRE ÖLÜMÜ)

2.2.1. Apopitosis

Apoptosis fizyolojik hücre ölümünü ifade eder. Teorik olarak ise genetik faktörlerle aktive edilen ve hücrenin kendisi tarafından programlanmış bir mekanizma vasıtasıyla hücre ölümünü kontrol eden aktif bir işlem olup, hücrenin intiharı olarak tanımlanmaktadır(43,44). Fizyolojik bir işlem olarak apoptosis, normal gelişim sırasında ve olgun mekanizmadaki çeşitli hücre tiplerinin tahribi esnasında spesifik hücrelerin kaybından sorumludur. Hücre büyümesi, farklılaşması ve apoptozu arasındaki denge vücutta bulunan net hücre sayısını etkiler ve bu dengedeki hata tümör oluşmasına neden olur. Apoptosis vücuttaki ana tümör baskılama mekanizmasıdır, çünkü yoğun DNA hasarı gelişen ve kanser meydana gelme potansiyeline sahip olan hücreleri yok edilmesinden sorumludur. Apoptosis, hücrenin büzülmesi, tomurcuklanması, kromatin kondensasyonu ve fragmentasyonu ile karakterizedir ve bu özellikleri ile patolojik hücre ölümü olan nekrozdan farklıdır(45,46,54).

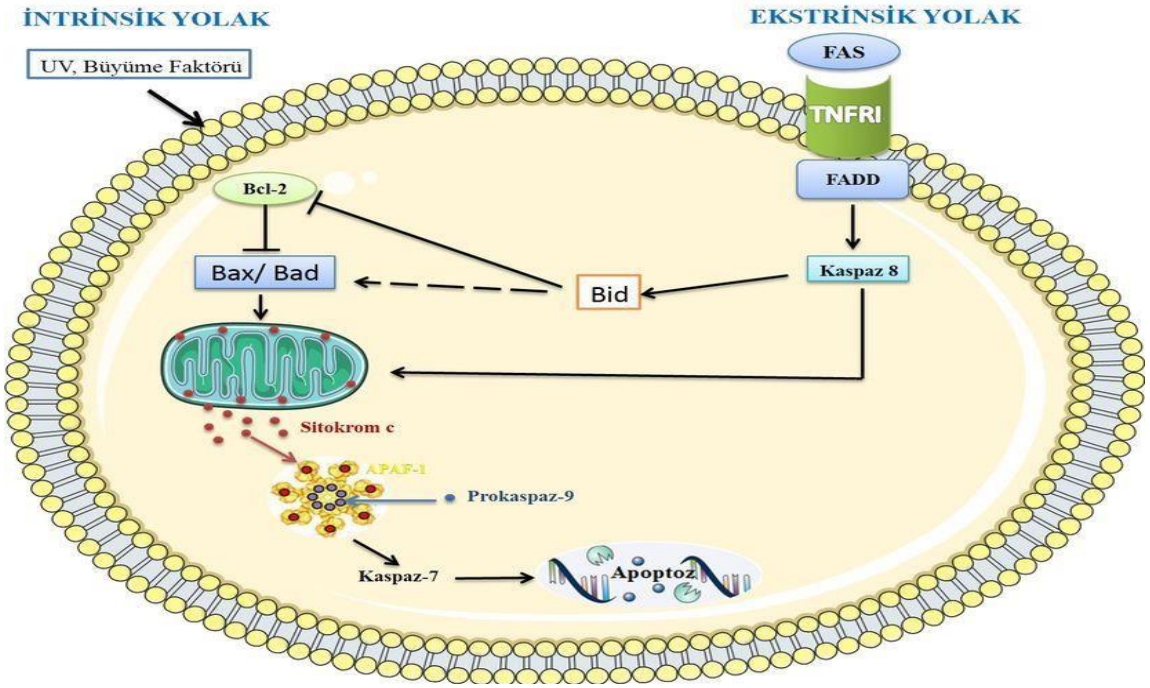
Programlı hücre ölümü, hücrelerin genetik olarak belleklerinde var olan intihar programının çeşitli sinyallerle aktive olmasıyla başlamaktadır(47,48). Apoptosis mekanizması, uyarana ve hücre tipine göre farklılıklar göstermektedir. Apopitosis sürecinde Bcl-2 ailesi proteinleri, kaspazlar ve Apaf-1(Apoptotic protease activating factor-1) proteinleri görev almaktadır. Bu bileşenlerin biyokimyasal aktivasyonu, apopitosisde gözlenen mitokondiriyal hasar, çekirdek zarı kırılması, DNA fragmentasyonu, kromatin kondensasyonu ve apoptotik cisimlerin eklenmesi gibi morfolojik değişikliklerden sorumludur(53).

Apoptosis süreci intrinsik ve ekstrinsik iki mekanizmayla sağlanır. İntrinsik yolağın düzenlenmesinde mitokondri önemli bir rol oynamaktadır. Burada mitokondrinin

aktivasyonunda rol oynayan en önemli faktör Bcl-2 ailesidir. Bu ailenin üyelerinin mitokondri üzerinde hem pro-apoptotik hem de anti-apoptotik etkileri bulunmaktadır. Bu aileden Bcl-2 ve Bcl-xL gibi anti-apoptotik proteinler mitokondri membranının dışında bulunurlar ve hücrenin yaşamının devamlılığında görev alırlar(49,50,51).

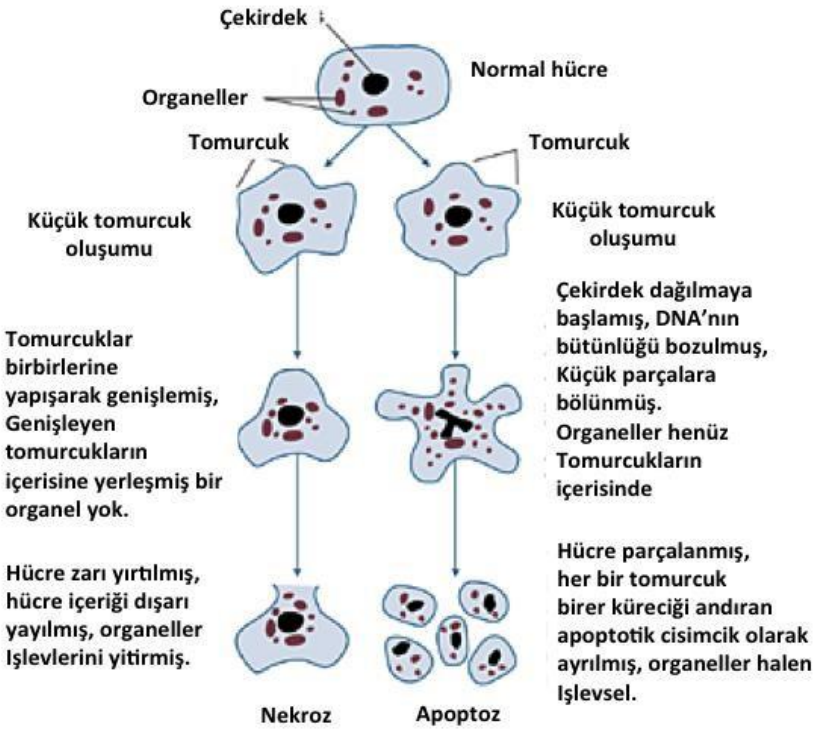
Bad ve Bax gibi pro-apoptotik proteinler ise mitokondri membranı ile doğrudan ilişki kurarak mitokondri üzerinden etkilerini gösterirler. Bax proteini mitokondri dış membranında bir transmembran por oluşturur ve membranın yapısını bozarak sitokrom-c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınmasını sağlar. Sitokrom-c sitoplazmada prokaspaz-9, Apaf-1 ve ATP ile kompleks oluşturarak apoptozom kompleksi meydana getirir. Bu durumda aktif hale gelen kaspaz-9, kaspaz kaskadının uyarılmasına yol açarak apoptosisin son basamağını tamamlar(52,53).

Ekstrinsik yolak ise hücre ölüm reseptörleri olan Fas (diğer isimleriyle APO-1, CD95) ve tümör nekroz faktör reseptörü-1 (TNFR-1)'in ilgili ligandlar ile etkileşme sonucu apoptozu uyaran diğer mekanizmadır. Fas ve TNFR-1'in sitoplazmik uzantısı ölüm alanını içermektedir. Fas'ın sitoplazmik bölümü FADD (Fas Associating protein with a Death Domain protein) ve RIP (Receptör Interacting Protein) ile etkileşimdedir. Ölüm alanlarını içeren bu TRADD ve RIP proteinleri, prokaspaz-8'in aktivasyonu ile apoptozu doğrudan uyarırlar. Aktive olan kaspaz–8 daha sonra diğer kaspazları aktive ederek apoptotik mekanizmayı oluşturur.



Şekil 1. Apoptozis mekanizması

Nekroz apoptosisden farklı olarak patolojik hücre ölümüdür. Nekrozun nedenleri arasında hipertermi, oksidatif fosforilasyon-Krebs siklusu ya da glikolizisin inhibisyonu, otolizis, hipoksi ve çeşitli toksinler yer almaktadır(54,55,56). Hücre tarafından genlerle programlanmayan ve çeşitli dış etkenlerle gerçekleşen nekrotik hücre ölümünde, enerji depolarında ani azalma ile birlikte hücre zarının geçirgenliği bozulur ve sodyum ile su içeri girerek hücresel şişmeye neden olmaktadır. Organeller plazma içinde dağılmakta, hücre zarının bozulmasıyla hücre bütünlüğü bozulmakta, proteolitik enzimler plazma hücreler arası boşluğa sızmakta ve doku çevresinde inflamasyon ile birlikte zedelenme oluşmaktadır(57,58,59).



Şekil 2. Apoptosis ve nekrozun farkı

2.2.2. Apoptosisin regulasyonunda rol oynayan genler

Apoptosisin düzenlenmesi p53 ile başlayan ve kaspazlara kadar devam eden bir süreçtir. Bir tümör süpresör gen olarak çalışan p53 mutasyona uğradığı zaman hücre yaşamı uzamaktadır. Genotoksik olaylarla oluşan hücre hasarı, transkripsiyon regülatör gen olan p53'ü aktive etmektedir. p53 DNA'ya doğrudan bağlanarak hasarı tanıdıktan sonra, ya G1'de hücre siklusunun durmasını indükleyerek tamir için gerekli zamanı kazandırmakta ya da hasar fazlaysa hücreyi apoptosise yönlendirmektedir. Ayrıca p53'ün Bcl-2/Bax gruplarının oranlarını düzenlediğide bilinmektedir(61,62).

Apoptosis regülasyonu bir diğer gen ailesi olan Bcl-2/Bax ailesiyle de sağlanmaktadır(63). Bu ailenin yaklaşık 20 üyesi tanımlanmıştır(64,65). Bcl-2 proteinlerinin bir grubu apoptosisi inhibe (anti-apoptotik) eder, diğeri ise aktive eder (pro-apoptotik). Pro-apoptotik moleküllerden oluşan grup içinde BH3 only proteinleri olarak isimlendirilen alt grup vardır.

Tablo 3. Pro-apopitotik ve anti-apopitotik Bcl-2 ailesi üyeleri

Anti-apopitotik üyeler	**Pro-apopitotik**	**BH3-only pro-apopitotik genler**
Bcl-2	Bax	Bid
Bcl-xL	Bak	Bad
Bcl-w	Bok	Bim
Mcl-1	Bcl-G	Bik
Bcl2110	Bcl-rambo	Noxa
Bfl-1	Bfk	Puma
Bcl2112		

Apoptosis programının merkez bileşeni kaspazlardır(65,66). Kaspazlar, proteinleri sadece aspartik asit bulunan bölgelerden keserler, bu nedenle c-asp-ases adını almışlardır. Kaspazlar TNF reseptör gen ailesindendir. Bu reseptör polipeptidlerin sitoplazmik bölümleri, ölüm alanı (Death Domain) adı verilen bir aminoasit dizisini içermektedir. Bilinen altı tane ölüm reseptörü, CD95 (APO-1/Fas), TRAIL (TNF- Related Apoptosis-Inducing Ligand)-R1, TRAIL- R2, TNF-R1, DR3 ve DR6 vardır(67,68). Adaptör proteinler reseptörle gelen sinyal sonucunda kaspazlara bağlanıp onları aktive ederler. Bu reseptörlerin en çok bilinenleri TNF reseptörü-1 (TNFR1) ve Fas (CD95) dır. Fas'ın etkisiyle kaspaz kaskadı aktive olur ve kaspazla aktive olan DNaz (caspase- activated DNase; CAD) aracılığı ile DNA yıkımı başlar. Sistein proteaz ailesinden olan kaspazların aktif merkezinde sistein yer alır ve sitoplazmada inaktif prekrüsörler olarak bulunur. Sitokrom c nin sitoplazma içine salınması ile apoptozun son basamaklarından sorumlu enzim sistemi olan kaspazlar aktive olur. Günümüzde sitozolde bulunan 14 kaspaz tanımlanmıştır(69,70). İnflamasyonu uyaran ve ilk kez bir proteaz olarak tanımlanan prokaspaz-1dir. Kaspazlar bir seri olaylar dizisinde diğer prokaspazları aktive ederler. (Kaspaz 1,4,5,13) Proteolizisin başlatıcıları (Kaspaz 2,8,
10) ya da uygulayıcıları (Kaspaz 3,6,7) olarak sınıflandırılırlar(51,53).

Kaspaz aktivasyonu hücreye özgüdür ve kaspaz inhibitörlerinin efektör kaspazları inhibe ederek apoptozu engellediği gösterilmiştir. Ayrıca IAP ailesinin kaspazlardan ayrı olarak transkripsiyon faktörlerin modülasyonu ve hücre siklusunun kontrolünde de yer alarak

apoptozu inhibe ettiği bilinmektedir. Bu inhibitörler malign hücrelerde aşırı olarak gözlenmektedirler.

Survivin, apoptosis inhibitör protein ailesinin bir üyesi olup 27q25 kromozomunda kodlanan 142 aminoasitten oluşur. Apoptosis düzenlemesinde ana rol oynayan bir diğer gendir. Normal prolifere olan hücrelerde çok az düzeyde bulunmakla beraber aşırı çoğalan hücrelerde ekspresyonu artmaktadır. Endometrial dokuda hiperplazi ve malignite gelişen olgularda aşırı eksprese olduğu gösterilmiştir. Survivin hücre ölümünü etkileyen proteazlardan kaspaz-3 ve kaspaz-7'yi doğrudan veya dolaylı olarak inhibe ederek apoptozisin regülasyonuna katılır(45). İntrinsek ve ekstrinsek iki etki mekanizması vardır. İntrinsek olarak programlanmış hücre ölüm uyaranı alındıktan sonra mitakondride sitokrom c sentezlenmeye başlar ve membran geçirgenliği artarak kaspaz-9 uyarımı gerçekleşir. Ekstrinsek etki olarak hücre ölümü için hücre yüzey reseptörleri uyarı geldikten sonra TNF alfa reseptörleri uyarılmasını ve kaspaz aktivasyonu ile hücre ölümü gerçekleşmesini sağlamaktadır. Diğer IAP proteinlerin aksine, survivin embriyonik ve fetal gelişim sırasında bulunmaktadır. Normal yetişkin dokularda saptanamayacak kadar az bulunmakta ve malignitelerin tümünde belirgin olarak exprese olmaktadır.

Tablo 4. Apoptosisi baskılayan ve indükleyen genler

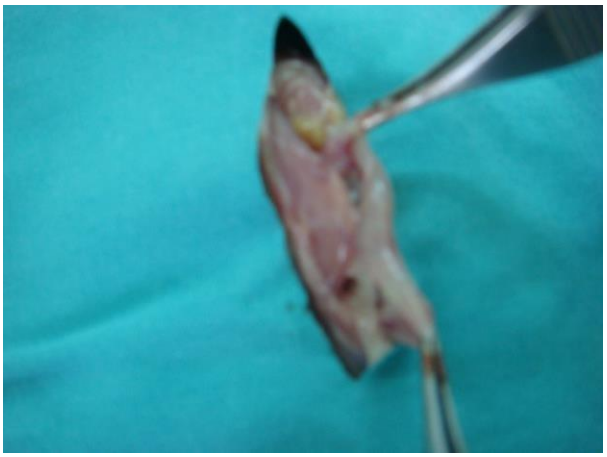
Apoptosisi baskılayan genler	**Apoptosisi indükleyen genler**
Bcl-2 grubundan BHRL-1 bcl-xL bcl-w brag-1, mcl-1	Bcl-2 grubundan Bad, Bax, Bak, Bcl-xS, Bid
c-abl geni	c-myc
Ras onkogeni	P53, p21
Survivin	Fas(CD95/APO1)
P35	İnterlökin dönüştürücü enzim benzeri proteinler(İCE)
A20	

3. YÖNTEM VE GEREÇLER

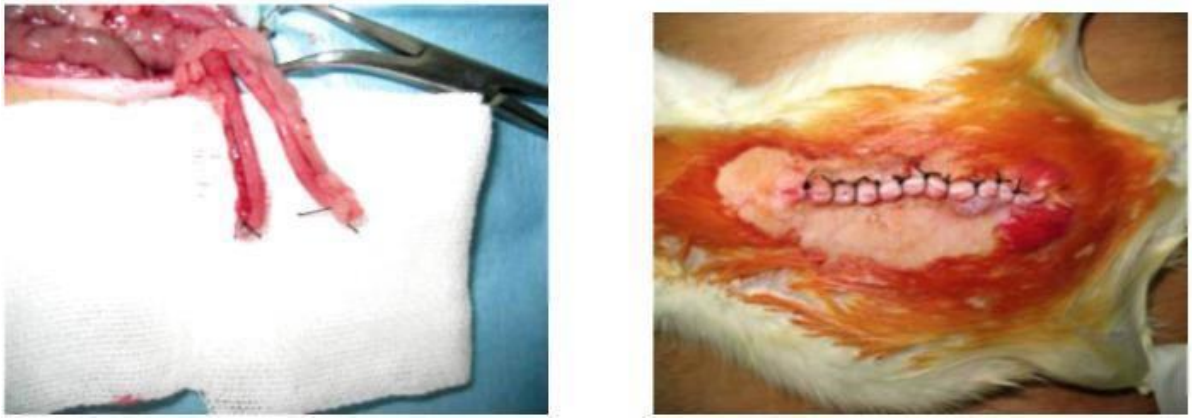
Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hakan Çetinkaya Klinik ve Deneysel Araştırma Merkezi'nde yapıldı. Araştırmada ağırlıkları 180-260 g olan 8 haftalık dişi Wistar-Albino ratlar kullanıldı. Yapılan bu çalışma Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi etik kuruluna ve dünya hayvan hakları bildirgesine uygun olarak yapıldı. Denekler 12 saat aydınlık/karanlık ışıklandırması olan, ısısı 24±2oC ve nemi %55±5 olarak ayarlanmış ortamda yaşatıldı. Hayvanlar deneye başlamadan 1 hafta önce kafeslere konularak ortam koşullarına adaptasyonları sağlandı. Su ve besin ihtiyaçları günlük olarak sağlandı ve sağlık durumları kontrol edildi. Tüm ratlar, intraperitoneal olarak 50 mg/kg dozda ketamin hidroklorit (Ketalar flakon, Eczacıbaşı), 7 mg/kg xylazine hidroklorit (Rompun, Bayer) kullanılarak anestezi verildikten sonra abdomen traşı yapıldı. Saha temizliği povidon iyot ile sağlandı. Steril kompreslerle abdomen örtüldü, laparotomi orta hat insizyon ile yapıldı. Uterin hornlar eksplore edildi, bilateral ooferektomi gerçekleştirildi(Şekil 3, 4).



Resim 6: Uterin hornlar



Resim 7: Bilateral överler



Resim 8: Bilateral Ooforektomi ve İnsizyonun Kapatılması

Abdomen iki tabaka halinde kapatıldı. Birinci tabakada 3.0 polyglactin, ikinci tabakada 4.0 polypropylene sutür kullanıldı. Tüm operasyon süresince mikro cerrahi prensiplerine ve steriliteye azami dikkat gösterildi. 1 hafta süre ile bakımı ve takibi yapılan ratlara hiçbir ilave medikasyon yapılmadı. İlk operasyonu takiben iki rat bu süre içerinde öldü. Tüm ratlara 20 gün boyunca 4mg/kg 17β estradiol hemihydrate aralıksız vererek endometrial hiperplazi gelişimi indüklendi(76). Önceki çalışmalar ile 17β Estradiol hemihydrate ile 10 günlük medikasyon sonrası endometrial hiperplazi geliştiği kanıtlanmış olduğu için, 17β Estradiol hemihydrate ile medikasyonun 10. gününde gruplara uygun ek diğer medikasyonlar başlandı(76). Medikasyonun 10. gününde 13 rattan oluşan estradiol+ metformin(E+M) grubuna 4mg/kg 17β Estradiol hemihydrate'a ek olarak 50 mg/kg metformin, 13 rattan oluşan estradiol+progesteron(E+P) grubuna 17β Estradiol hemihydrate'a ek olarak 1mg/gün Medroxiprogesteron verildi. 12 rattan oluşan estradiol (E) grubu ise 20 gün boyunca sadece 17β Estradiol hemihydrate alan grup oldu. Ratlar toplam 3 gruba ayrıldı. Ratlara ilaçlar günlük

bir kez beslenme tüpü ile verildi. E grubundan bir rat bu süre içerisinde öldüğü için çalışmadan çıkarıldı. 20 gün sonra yüksek doz eter inhale ettirilerek ratların hepsi öldürüldü ve ikinci kez laparotomi ile histerektomileri yapıldı. Uterin hornların 1 tanesi 1ml trizol solusyonuna konularak genetik inceleme için -80 dereceye ayrıldı. RNA kalitesi ve miktarları spektrofotometride ölçüldü. Her örnekten en az 1000 ng RNA elde edileceği öngörüldü. Çalışma yapılana kadar alınan örnekler –80ºC'de saklandı. Her rata gruplarına gore birer numara verildi. Genetik analiz için Trizol içerisine alınan dokular homojenizatör yardımı ile parçalandı. Parçalanmış dokuların her birinin trizol ile RNA'ları izole edildi. RNA'lardan Ters Transkriptaz enzimi kullanılarak cDNA elde edildi ve Real Time PCR yöntemi ile cDNA 'lardan Survivin, Bcl-2, , kaspaz-9 ve Bad ve Bax genlerinin mRNA ekspresyonları tespit edildi. Ekspresyon değerleri birbirleriyle ve grublar arasında karşılaştırılarak değerlendirme yapıdı.

Diğer uterin horn formol içerisine konulup uterus uzun ekseni boyunca kesitler yapılarak formolin tesbiti sonrası parafin bloklardan hazırlanan dokulardan 5'er mikrometrelik kesitler alındı hematoksilen eosin ile boyandı. Alınan kesitlerde ışık mikroskobunda endometrium kalınlığı(µm) ile endometrial gland sayıları ve dansiteleri (her bir alana düşen bez yoğunuluğu) incelendi. Endometrial kalınlık ve endometrial gland sayısı 400x büyütmede 10 sahada 100 hücre içeren alandan sayılıp ölçüldü ve gruplara göre karşılaştırıldı.

Çalışmanın sonunda istatistiksel analiz için SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 15.0 yazılımı kullanıldı. Nicel veriler ortalama ± standart deviasyon (x±s.d.) olarak tanımlandı. Gruplara arasındaki gen ekspresyonları farklılıkları ve hiperplazi tedavisi one-way ANOVA kullanılarak gösterildi. Gruplar arasında ikili gen ekspresyonları simple T-Test kullanılarak karşılaştırıldı. İstatistiksel analizlerde $p<0,05$ ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Chi Square test kullanılarak çalışmanın %99 güven aralığında olduğu tespit edildi.

4. BULGULAR

Çalışma toplam 40 rattan ve 3 gruptan oluşturuldu. Gruplarda estradiol alan kontrol grubunda 14 diğer iki grupta 13 rat bulunmaktaydı. Cerrahi sonrasında kontrol grubundan 2 ve medikasyon sırasında yine kontrol grubundan 1 rat daha öldü. Patolojik inceleme sonucunda estrodiol ve medroksiprogesteron alan grupta (E+P)1 preparatının tubal epitelyum gelmesi üzerine çalışmadan çıkarıldı.

Sadece östradiol (E), östrodiol ile metformin(E+M) ve östrodiol ile medroksiprogesteron asetat(E+P) alan gruplarda endometrial hiperplazi gelişimi değerlendirildi. Metformin ve medroksiprogesteron asetatın endometrial hiperplaziyi anlamlı şekilde tedavi ededileceği gösterildi(Tablo 5).

Tablo 5. Tedavi sonuçlarının ve çalışma gruplarının endometrial hiperplazi açısından kıyaslanması

	Grup			Toplam	
	E	E+M	E+P		p<0.05
Hiperplazi bulunan grup	6 % 54,6	4 % 36,1	1 % 9,1	11 % 29,7	
Hiperplazi bulunmayan grup	5 [a] % 46,4	9 [b] % 63,9	11 [c] % 90,9	25 % 70,3	
Toplam	11 %100	13 %100	12 %100	36 %100	

(İstatistiksel değerlendirmede a ile b karşılaştırıldığında p<0.048, a ile c karşılaştırıldığında p<0.006, b ile c karşılaştırıldığında p<0,580 olarak tespit edilmiştir. Değerlendirmede b ile c grubu ararsında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmaz iken a ile b ve a ile c grupları arasında anlamlı farklılık tespit edilmiştir).

Tablo 6. Tedavi sonuçlarının ve çalışma gruplarının gen ekspresyonları açısından kıyaslanması

	Ortalama (Min- Max) ± Standart deviasyon	p<0,05
Survivin E	5,20 (1,12-13,61) ± 3,49	
E+M	4,15 (2,12-6,09) ± 1,43	0,56
E+P	4,64 (1,46- 8,99) ±2,18	
Kaspaz-9 E	1,09 (0,09- 3,16) ± 1,01	
E+M	1,18(0,01- 10,79±2,87	0,767
E+P	0,64 0,02-1,18) ±0,47	
Bad E	1,82 (0,17-5,54) ± 1,58	
E+M	3,69 (0,16-16,6) ± 5,73	0,625
E+P	1,65 (0,37-6,81) ± 1,75	
Bax E	1,54 (0,36-3,48) ± 1,21	
E+M	1,51 (0,09-10,9) ±3,00	0,383
E+P	2,04 (0,10-4,71) ± 1,27	
Bcl- 2 E	0,68 (0,07-1,73) ± 0,51	
E+M	0,61 (0,01- 5,51) ±1,48	0,816
E+P	0,31 (0,02- 0,82) ±0,25	
Bcl2/Bax E	0,52 (0,16- 1,10) ± 0,35 [a]	
E+M	0,39 (0,05-1,51) ± 0,38 [b]	0,02
E+P	0,14 (0,04- 0,26) ±0,06 [c]	

(İstatistiksel değerlendirmede a ile b karşılaştırıldığında p<0.032, a ile c karşılaştırıldığında p<0.001, b ile c karşılaştırıldığında p<0,074 olarak tespit edilmiştir. Değerlendirmede b ile c grubu ararsında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmaz iken a ile b ve a ile c grupları arasında anlamlı farklılık tespit edilmiştir).

Çalışmada her üç grupta da belirlenen pro-apopitotik ve anti-apopitotik gen ekspresyon düzeyleri değerlendirildi. Survivin, Kaspaz-9, Bad, Bax, Bcl-2 ve Bcl-2/Bax oranları karşılaştırıldı. Gen ekspresyonlarının ortalama, minimum ve maksimum değerleri belirlenerek istatistiksel analizleri yapıldı. Gruplar arasında Survivin, Kaspaz-9, Bad, Bax, Bcl-2 gen ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Bcl-2/Bax oranı estradiol ve metfomin(E+M) ile estradiol ve medroksiprogesteron asetat(E+P) alan gruplar sadece estradiol(E) alan grup ile kıyaslandığında metformin ve medroksiprogesteron asetat alan gruplarda oranının anlamlı şekilde azaldığı ve bu azalış ile beraber hücre apoptosisinin uyarılarak endometrial hiperplazinin geriletmiş olabileceği gösterildi.

Menstual siklus sırasında Bcl-2 ve Bax genlerinin endometrial dokuda aktif oldukları bilinmektedir. Özellikle Bcl-2/Bax oranı ile hücre siklusu kontrol altında tutulmaktadır. Oranın yüksek olması ile apopitozise karşı direnç gelişmekte olup Bcl-2 geninin aşırı eksprese olması ile endometrial hiperplazi ve malignite gelişmektedir(56). Çalışmamızda endometrial dokuda apoptosis regulasyonunun en önemli belirleyicisi olan Bcl-2/Bax oranının progesteron ve metformin tedavisiyle azaldığı böylelikle moleküler düzeyde endometrial hiperplazin gerilediği tespit edildi.

5. TARTIŞMA

Endometrium, hipofiz gonadal aksı tarafından regüle edilen endokrin bir son yanıt bölgesidir. Bu regülasyon gonadlardan salınan hormonların reseptörleri ile etkileşmesyle sağlanmaktadır. Endometrium epiteli ve stroması östrojen ile progesteron reseptörlerini eksprese etmektedir. Hormonal etkinin oluşmasında östrojen ve progesteron seviyelerine ek olarak reseptör ekspresyon seviyeleri de önemlidir. Östrojen reseptörleri, proliferatif fazda en yüksek konsantrasyonda görülür ancak luteal faz sırasında yükselen progesteron düzeyleri östrojen reseptör ekspresyonunu azaltır. Endometrial progesteron reseptör düzeyleri, artan östrojen düzeyine yanıt olarak siklusun ortasında pik yapar ve progesteron uyarısına cevabın artması sağlanır. Progesteron erken embriyonik gelişim, implantasyon, plasentasyon ve fetal gelişim için gerekli olan uterin fonksiyonların devamını sağlamaktadır.

Hormonal etkinin belirleyicileri endometrial östrojen ve progesteron reseptörleridir. ER'nün α ve β alt grupları PR'nün ise A ve B olarak iki majör izoformu bulunmaktadır. ERα ve ERβ ekspresyon oranı ile PR-A ve PR-B oranları normal bir mestural siklus için belirli bir düzen içinde tutulmaktadır. ERα ve ERβ östradiol ile yüksek bağlanma eğilimindedir. Son yıllarda bu reseptörlerin gen bağımlı transkripsiyon ile uyarıldığı ve etkilerinin bu gen bağımlı transkripsiyon ile düzenlendiği gösterilmiştir(77). PR geninde fonksiyonel polimorfizm ve buna bağlı artmış PR-B transkripsiyonu ve PR-B ile PR-A dengesindeki değişiklik ile endometrium kanseri ilişkisi bilinmektedir. ERα ve PR-A'nın evre, histolojik derece ve survey ile korelsyon gösterdiği ayrıca ER ve PR'nün bağımsız prognostik faktörler olabilecekleri tespit edilmiştir(78). ERβ/ERα mRNA oranları invaziv karsinomda yüksek olduğunu. ERβ'nın myometrial invazyon ile iliştili olduğu ve azalmış PR-B ekspresyonunun kötü diferansiye endometrium kanser ile birliktelik gösterdiğini ortaya koyan çalışmalar bulunmaktadır.

Endometrial hiperplazi için bilinen en önemli risk faktörü karşılanmamış östrojendir. Persiste östrojenik etki endometrial bezlerde ve stroma hücrelerinde kanserojenik etkiye neden olmaktadır. Bu nedenle karşılanmamış hiperöstrojenik tüm durumlar endometrial hiperplazi ve endometrium kanseri ile ilişkilidir. Endometrial hiperplazilerin kansere dönüşme potansiyeli ve hangi oranda dönüşebileceği yapılacak tedavi yöntemini belirleyeceğinden konu ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Kurman ve ark. tedavi edilmemiş endometrial hiperplazisi

olan ve ortalama 13.4 yıl takip edilen 170 hastanın endometrial küretaj sonuçları üzerinde çalışmışlardır. Bu çalışmanın bulgularına göre kansere ilerleme riski basit hiperplazili hastalarda % 1, kompleks hiperplazili hastalarda % 3, atipik basit hiperplazili hastalarda % 8, atipik kompleks hiperplazili hastalarda % 29 olarak tespit edilmiştir. Hiperplazilerin çoğunun değişmeden kaldığı (% 74) ya da düzeldiği (% 18) gözlenmiştir(15). Endometrial hiperplazide Dünya Sağlık Örgütü bu sınıflamayı kullanılmaktadır. Yapılan birçok çalışma endometrial hiperplazinin prognozunu saptamada en önemli kriterin atipinin varlığı veya yokluğu olduğunu göstermektedir.

Endometrial hiperplazinin tedavisi standarttır. Tedavi planlanırken hiperplazinin tipi özellikle atipi olup olmadığı, hastanın yaşı, çocuk istemi olup olmadığı, genel sağlık durumu gibi parametreleri değerlendirmek gerekir. Tedavi şemasına bakıldığında kabul gören birçok medikal ve cerrahi tedavi seçeneği vardır. Burada önemli olan doğru hastaya doğru tedavi seçeneğini sunabilmektir(26). Tedavi planlanırken atipisiz endometrial hiperplazi varlığında ilk tercih düşük doz progesteron tedavisi olmalıdır. Progesteron ile yapılan tedavi günümüzde halen en ucuz ve en etkin tedavidir. Atipili olgularda fertilitenin korunması isteniliyorsa yüksek doz progesteron tedavisi tercih edilmeli, çocuk istemi olmayan atipili olgularda ise cerrahi tedavi seçenek olarak sunulmalıdır. Medikal tedavilerde 3-6 ay ara ile endometrial biyopsi ile kontrol yapılmalıdır. Progesteron kullanılırken alınacak biyopsi karışıklığa neden olacağından işlem çekilme kanamasından sonra yapılmalıdır. Cerrahi önerilecek hastaların doğru seçilmesi gerekmektedir. Atipinin varlığı burada en önemli belirleyicidir. Basit veya kompleks atipisiz hiperplazilerde progesteron ilk tercih edilecek tedavi olmalı ve bu hastalara yapılacak gereksiz histerektomilerin beraberinde cerrahi morbidite riskini artıracağı unutulmamalıdır.

Endometrial hiperplazinin kansere dönüşümü değerlendirildiğinde hücre döngüsü, gen polimorfizmi, proonkogen ve onkogenler ile apopitotik süreç önem kazanmaktadır. Hücre döngüsünü düzenleyen birçok bileşenin kanserle ilişkisi gösterildiğinden, kanseri bir hücre döngüsü bozukluğu olarak tanımlamak doğru olacaktır. G1, S, G2 ve M evrelerinden oluşan hücre döngüsünün bir evresinden diğerine geçişi döngüye özel olan siklin proteinleri ile denetlenir. G1/S fazının denetlenmesi siklinlere bağlanan ve döngü boyunca aktivasyondan sorumlu olan siklin-bağımlı kinaz kompleksi ve bu kompleksin inhibitörleri ile sağlanır. Endometrial hiperplazi tedavisinde kullanılan progesteronun antimitotik özelliği yani G1

fazında mitotik aktiviteyi bloke etmesi bilinen en önemli tedavi mekanizmalarından biridir. G1 in ilerleyişinden sorumlu en önemli tümör baskılayıcı gen Retinoblastoma(Rb) genidir. Aktif hale gelmesiyle birlikte G1 evresinden S evresine geçiş için gerekli siklin A, siklin E, siklin- bağımlı kinaz, dihidrofolat redüktaz ve timidin kinaz gibi enzimlerin kontrolunu sağlamaktadır.

Hücre döngüsünün diğer bir düzenleyicisi tümör süpresör p53 genidir. DNA hasarına yanıt olarak p53 aktive olarak hücre döngüsünü durdurarak DNA onarımını sağlar. DNA hasarı onarılamayacak kadar fazlaysa apoptosis süreci başlatılır. p53 DNA hasarına yanıt olarak siklin-bağımlı kinaz inhibitörlerinden olan p21 proteini ile etkisini sağlar. Programlı hücre ölümü olan apoptosis hem hücresel devamlılığın ve hücre eleminasyonunun sağlanması için gerekli fizyolojik bir olaydır. Bu süreçte ki pro- apoptotik ve anti-apoptotik genlerin birçok kanserle ilişkisi bilinmekle beraber, bu genlerin ekspresyonları ile kanser prognozunun belirlenmesine dair güncel çalışmalar yapılmaktadır. Apoptosisin azalması tümör oluşumu ile sonuçlanacağından apoptosisi negatif düzenleyen genlere onkogen, pozitif düzenleyici genlere de tümör süpresör genler denilmektedir. Apopitosisin süreci intrinsik ve ekstrinsik iki mekanizmayla sağlanır. İntrinsik yolağın düzenlenmesinde mitokondri önemli rol oynamaktadır. Burada mitokondrinin aktivasyonunda rol oynayan en önemli faktör Bcl-2 ailesidir(49,50). Ekstirnsik yolak ise hücre ölüm reseptörleri olan Fas (diğer isimleriyle APO-1, CD95) ve tümör nekroz faktör reseptörü-1(TNFR-1)'in ilgili ligandlar ile etkileşime girerek apoptosisi uyarması ile sağlanmaktadır(51).

Apoptosisin intrinsik yol regülasyonu Bcl-2/Bax ailesiyle sağlanmaktadır(63). Bu ailenin yaklaşık 20 üyesi tanımlanmış tır(64,65). Bcl-2 proteinlerinin bir grubu apoptosisi inhibe (anti-apoptotik) eder, diğeri ise aktive eder (pro-apoptotik). Pro-apoptotik moleküllerden oluşan grup içinde BH3 only proteinleri olarak isimlendirilen alt grup vardır.

Bcl-2, Bad ve Bax gibi pro-apoptotik proteinler mitokondri membranı ile doğrudan ilişki kurarak mitokondri üzerinden etkilerini gösterirler. Mitokondri dış membranı üzerinde biraraya gelen Bcl-2 ailesinden Bax ve Bad molekülleri mitokondri dış membranında bir transmembran por oluşturur. Bax ve Bad proteinleri sitoplazmada bulunur. Apoptotik sinyalin alınmasından sonra Bax ve Bad proteinleri mitokondiri zarının permeabilite geçiş poruna doğru yönelip burada transmembran por oluştururlar. Bu olay BH3 only proteinlerinden Bid ve

Bim tarafından indüklenir. Transmembran porun yapısını bozarak sitokrom-c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınmasını sağlar. Sitoplazmaya serbestlenen Sitokrom c sitoplazmada prokaspaz-9, Apaf-1 ve ATP ile kompleks oluşturarak apoptozom kompleksini meydana getirir. Halkasal kompleks içerisinde CARD adı verilen bir domain bulunur. Apaf-1 bir kofaktör proteindir ve prokaspaz-9 aktivasyonu için gereklidir. Kaspaz-9 intrinsik yolağın anahtarıdır ve başlatıcı kaspazıdır. Kaspaz-9 aktivasyonundan sonra kaspaz 3,6 ve 7 aktive olur ve apopitosis süreci başlar(52,53).

Apoptosis sürecinin merkezi bileşeni kaspazlardır ve kaspas aktivasyonu hücreye özgüdür(65,66). Kaspazlar, proteinleri sadece aspartik asit bulunan bölgelerden keserler, bu nedenle *c-asp-ases* adını almışlardır. TNF(Tumour Necrosis Factor) reseptör gen ailesindendirler. Bu reseptör polipeptidlerin sitoplazmik bölümleri ölüm alanı (Death Domain) adı verilen bir aminoasit dizisini içermektedir. Adaptör proteinler reseptörle gelen sinyal sonucunda kaspazlara bağlanıp onları aktive ederler. Fas'ın etkisiyle kaspaz dizisi (kaskadı) aktive olur ve kaspazla aktive olan DNaz (caspase- activated DNase; CAD) aracılığı ile DNA yıkımı başlar. Sistein proteaz ailesinden olan kaspazların aktif merkezinde sistein yer alır ve sitoplazmada inaktif prekürsörler olarak bulunur. Sitokrom c nin sitoplazma içine salınması ile apoptozun son basamaklarından sorumlu enzim sistemi olan kaspazlar aktive olur. Günümüzde sitozolde bulunan 14 kaspaz tanımlanmış tır(69,70). İnflamasyonu uyaran ve ilk kez bir proteaz olarak tanımlanan prokaspaz-1dir. Kaspazlar bir seri olaylar dizisinde diğer prokaspazları aktive ederler(Kaspaz 1,4,5,13). Proteolizisin başlatıcıları(Kaspaz2,8,10) ya da uygulayıcıları(Kaspaz3,6,7) olarak sınıflandırılırlar(51,53).

Çalışmamızda endometrial hiperplazi tedavisinde kullanılan metformin ve progesteronun kaspaz-9 ekspresyonunu üzere olan etkisini değerlendirildik. Çalışmamız endometrial hiperplazi tedavisinde hem progesteronun hem de metforminin kaspaz-9 ekspresyonu üzerine etkisini değerlendiren literatürdeki ilk çalışmadır. Gruplar arasında kaspaz-9 ekspresyonu üzerine anlamlı istatistiksel farklılık saptanmamış olsa da çalışmamızın gelecekteki bu apoptotik yolak ile yapılacak diğer çalışmalara yol gösterebileceğini düşünmekteyiz.

Endometrium, meme ve kolorektal kanserler değerlendirildiğide fizyolojik olarak benzer reseptörler taşımaları, ailesel kanserlere bakıldığında birliktelik göstermeleri ve benzer

genlerin aktivasyonuyla malignitelerinin gelişmesinden dolayı, literatürdeki meme ve koleraktal kanser için yapılan çalışmalar endometrium kanseri içinde yol gösterici olmaktadır.

Bcl-2 ve Bax oranının hücre siklusunun düzenlenmesinde anahtar rol oynadığı yapılan birçok güncel çalışmada gösterilmiştir. Oranlamada Bcl-2 gen ekspresyonunun artması hücrenin yaşamını sürdürmesini sağlarken, Bax gen ekspresyonunun artmasıyla siklus hücre apopitozisi ile sonuçlanmaktadır(56). Literatürde bu genler ile ilgili olarak endometrium, meme ve kolorektal kanserler ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Kolorektal adenokarsinom tanısı alan 22 hastada Bcl-2 ve Bax gen ekspresyonları ve Bcl-2/Bax oranları değerlendirilmiştir. Bcl-2/Bax oranının kolorektal adenokarsinomda anlamlı olduğu, oranın yüksek olduğu hatalarda daha agresif tümör geliştiği, hepatik metestazı olan kolorektal kanserli hastalarda Bax gen ekspresyonunun azalmış olduğu ve yüksek Bax gen ekspresyonun daha iyi prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir(79). Kolorektal adenokarsinom tanısı alan ve kolon kanserinde kemoperoptik olarak kullanılan Triphala ekstraktı adı verilen kemoperopatik ajanın Bcl-2/Bax ve c-myc/siklin D1 oranları üzerine olan etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada Bax gen ekspresyonunun anlamlı şekilde arttığı, Bcl-2 gen ekspresyonun azaldığı ve Bcl-2/Bax oranının anlamlı şekilde azaldığı gösterilmiştir(80). Östrojen reseptörü pozitif meme kanseri tanısı alan hastaların değerlendirildiği çalışmada hastaların %85'inde Bcl-2 geninin aşırı eksprese olduğu ve östrojen reseptör pozitifliği ile Bcl-2 gen ekspresyonun korelasyon gösterdiği, tedavide yeni hedef olarak Bcl-2 geni üzeinde durulması gerektiği savunulmuştur(81). Endometrium üzerine yapılan çalışmalarda endometrial kanser tanısı alan 1028 hastada Bcl-2, Bad ve Bax gen ekspresyonları ile kanserin progresyonu ve prognozu karşılaştırılmıştır. Daha agresif ve hızlı progresyon gösteren hastalarda Bcl-2 gen ekspresyonun fazla olduğu saptanmıştır(82). Tommi E. ve ark. çalışmalarında normal endometrium, endometrial hiperplazi ve endometrial karsinomu olan hastalarda Bcl-2, Bax ve Bad genlerinin ekspresyonları değerlendirmişlerdir. Çalışmada Bcl-2, Bax ve Bad genlerinin normal ve hiperplazi gelişen endometrial dokuda da eksprese olduğunu, endometrial kanser gelişen durumlarda ise Bcl-2 ekspresyonunun artıp Bax ve Bad gen ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir(74).

Endometrium kanseri tanısı alan 98 hasta değerlendirildiğinde Bcl-2 gen ekspresyonunun klinik stage ve survey ile ilişkili olduğu, Tip 2 endometrium kanserinde Tip 1 endometrium kanserine oranla daha fazla eksprese olduğu gösterilmiştir. Farklı bir çalışmada P53 ve Bcl-2

gen ekspresyonlarının histolojik tip, tümör grade'i, myometrial invazyon derinliği ve lenf nodu pozitifliği ilişkisi değerlendirilmiştir. 48 endometrial kanser tanısı alan hasta primer cerrahi tedavileri sırasında değerlendirmiş P53 ekspresyonu %39,6, Bcl-2 ekspresyonu %58,3 olarak hesaplanmıştır. P53 ekspresyonu ile undiferansiye tümör ve lenf nodu pozitifliği arasında anlamlı ilişki tespit edilirken Bcl-2 ekspresyonu ile belirtilen parametreler arasında ilişki saptanmamıştır(83). Vereide ve ark. yaptıkları çalışmada endometrial hiperplazi tanısı alan 57 hastanın 26'sına intrauterin levonorgestrel içeren rahim içi araçlar ile tedavi planlanırken diğer 31 hastaya yüksek doz medroksiprogesteron asetat ile tedavi başlanmıştır. Tedavi öncesi ve sonrası Bcl-2, Bax ve Bad genlerinin ekspresyonları değerlendirilmiş ve progesteron tedavisi sonrası Bcl-2 gen ekspresyonunda anlamlı oranda down regülasyon, Bax ve Bad genlerinde upregulasyon izlenmiştir(75).

Literatürdeki çalışmalarda, endometrial hiperplazi tedavisinde kullanılan progesteronun Bcl-2, Bad ve Bax gen ekspresyonları ile Bcl-2/Bax oranına etkisi kanıtlanmıştır. Biz ise çalışmamızda progesteronun gen ekpresyonu üzerine bilinen bu etkisi ile metforminin bu genlerin ekspresyonu üzerine olan etkisini karşılaştırmayı amaçladık. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda endometrial hiperplazi tedavisinde kullanılan progesteronun endometrial dokuda Bcl-2/Bax oranını anlamlı şekilde azaltığını, metforminin ise progesterona benzer şekilde Bcl-2/Bax oranını azaltarak apoptosisi uyardığını gösterdik. Çalışmamız endometrial hiperplazi tedavisinde kullanılan metforminin progesteron ile kıyaslanarak Bcl-2, Bad ve Bax ekspresyonları ile Bcl-2/Bax oranı üzerine etkisini değerlendiren literatürdeki ilk çalışmadır.

Genetik çalışmalar sonucunda kısa süre önce bulunan ve BIRC5 olarakta bilinen Survivin, apoptoz inhibe edici proteinler ailesindendir. 17q25 kromozomda yer alan Survivin geni, 3 intron ve 4 ekzondan meydana gelen 142 aminoasitlik bir proteini kodlar. Bu güne kadar 8 (BIRC1-8) adet rapor edilen bu anti-apoptotik proteinler, başlatıcı kaspaz-9 ve efektör kaspaz 3 ve kaspaz 7'yi inhibe ederek apoptozisi inhibe ederler. Survivin geni yapısında sadece BIR(bacolovirus IAP repeat) domaini içermesi, RING ve CARD(caspase activation recruiment) domainini içermemesi sebebi ile diğer anti-apoptotik genlere göre farklılık arz eder. Hücre döngüsünün G2/M fazına etki ederek hücrenin mitoz bölünmesini uyarır. Survivin geninin en önemli özelliklerinden biri kanser dokusunda normal dokuya göre çok daha fazla

eksprese olmasıdır. Genellikle embriyonik dokuda ve fetal dokuda eksprese edilen survivinin normal dokuda ekspresyonu tayin edilemeyecek kadar azdır.

Literatürde survivin ekspresyonu ile birçok malignitenin ilişkisi gösterilmiştir. Akciğer, mesane, kolorektal, endometrial, meme, ösefagial, mide, hepatoselüler, pankreas ve renal hücreli karsinomda survivinin ekspresyonu ve survivin gen polmorfizmi tespit edilmiştir(84). Meme kanseri ve survivin gen ekspresyonu ilişkisi değerlendirildiğinde HER-2 ve survivin ekspresyonun yüksek olduğu meme kanseri olgularında kemo/endokrin tedaviye ve iyonize radyosyon tedavisine direnç geliştiği, survivin ekspresyonunun meme kanseri için kötü prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir(85). Survivinin meme kanserinde kötü prognoz kriteri olan HER-2 ve VEGF ile benzerlik gösterdiği ve gelecekte bu kriterlerle beraber sınıflandırılması gerektiği savunulmaktadır. Kolerektal kanserlerde Survivin ve anjiyotensin-converting enzim(ACE) polimorfizmi ile kolerektal kanser ilişkisi değerlendirilmiştir. Meta-analizde 2000-2014 yılları arasında yayınlanan toplam 11 çalışma gözden geçirilmiş ve 1840 hasta analiz edilmiştir. Survivinin -31G/C ve ACE I/D polimorfizmi ile kolerektal kanser gelişimi ilişkili bulunmuştur. Aynı şekilde -31G/C promotor bölgesindeki polimorfizm ile mide kanseri ve hepatik kanser gelişimi ilişkili bulunmuştur(86). 2695 mide kanseri tanısı alan hastada hem immünohistokimyasal hemde real time PCR ile survinin gen ekspresyonu değerlendirilmiş olup survivinin mide kanserinde anlamlı olarak eksprese olduğu ve mide kanseri için prognostik faktör olabileceği savunulmuştur. Benzer şekilde 1997-2013 yılları arasında toplam 14 makale analiz edildiğinde mesane kanseri ile ilişkili olarak survivinin mesane kanserin progresyonu, tümör rekürrensi ve mortalite ile ilişkili olduğu kabul edilmiştir. Endometrial hiperplazide ve endometrium kanserinde survivin ile ilgili az sayıda çalışma bulunsa da meme, kolerektal ve mide kanserindeki sonuçlar endometrum kanseri üzerine yapılacak çalışmalar için yol göstericidir. Xiaojun ve ark. endometrial hiperplazi tanısı alan 23 hastaya 4 ay süre ile progesteron tedavisi verip tedavi sonrası hiperplaziyi yeniden değerlendirmişlerdir. Tedavi sonrası 8 hastada endometrial değişiklikler persiste etmiştir. Persiste değişiklikleri olan 8 hasta için immunohistokimyasal olaral survivin ekspresyonu değerlendirilmiş ve survivin gen ekspresyonunun anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir(71). A. Brunner ve ark. 106 endometrial kanser tanısı alan (81 hasta tip 1 endometrium kanseri, 18 hasta tip 2 endometrium kanseri) hastada survivin gen ekspresyonunu değerlendirmişlerdir. Tip 2 endometrium kanseri olan ve yüksek grade tümör tanısı olan hastalarda survivin gen ekspresyonunun daha fazla olduğu gösterilmiştir(73). Bilinen bu bilgiler doğrultusunda

survivin geninin kanser tedavisinde yeni hedef olacağı ve gen ekspresyonu azaltmaya amaçlayan yeni ilaçların kanser tedavisine yeni bir boyut katacağı düşüncesi kabul görmektedir.

Survivinin normal hücrelerde bulunmadığı, endometrial hiperplazi ve endometrium kanserinde aşırı eksprese olduğu bilinmektedir. Bizim çalışmamızda 4mg/kg 17β Estradiol hemihydrate(E), 4mg/kg 17β Estradiol hemihydrate ile 50 mg/kg metformin (E+M) ve 17β Estradiol hemihydrateile ile 1mg/gün Medroxiprogesteron asetat(E+P) verilen gruplarda survivin ekspresyonunu değerlendirdik. Survivin ekspresyonu açısından gruplar arasında anlamlı farklılık izlenmedi. Literatürde progesteron tedavisi ile survivinin ekspresyonunu değerlendiren az sayıda çalışma bulunmakla beraber çalışmamız endometrial hiperplazide metformin tedavisinin survivin gen ekspresyonu üzerine etkisini değerlendiren literatürdeki ilk çalışmadır. Özellikle metforminin Bcl-2/Bax oranı üzerine olan olumlu etkisi göz önüne alınacak olur ise hiperplaziye ek olarak atipisi olan ve olmayan gruplar ile hiperplazinin persiste ettiği ve etmediği hastaların karşılaştırılacağı çalışmalar metformin tedavisinin survivin gen ekspresyonu üzerine olan etkisini daha net ortaya koyacaktır.

Metforminin hepatik glukoz outputunu baskılaması, glukozun intestinal emilimini azaltması, periferal dokularda insülin aracılı glukoz kullanımını artırması, yag asit konsantrasyonlarını düşürerek glukoneogenezi azaltarak antilipolitik etki göstermesi, karaciger tarafından üretilen SHBG yapımını arttırıp, bunun sonucunda dolasımdaki serbest testosteron seviyelerini azaltması günümüzde bilinen tedavi mekanizmalarıdır. Metformin ile ilgili son yıllarda yapılmış çalışmalarda metforminin aromataz enzim inhibisyonuna bağlı olarak bu enzim aktivasyonunun yüksek olduğu alanlarda östrojenin etkisini azaltığı gösterilmiştir. Metformin ayrıca SHBG seviyelerini arttırıp dolaşımdaki estradiol seviyelerinin sistemik olarak da azalmasına neden olmaktadır(40). Metformin ile yapılan bir rat modeli çalışmasında endometrial hiperplaziyi regrese ettiği gösterilmiştir(41). Ayrıca PKOS'lu hastalarda yapılmış bir çalışmada metformin kullanan hastalarda endometrial proliferasyonun azaldığı ve dolaşımdaki östrojenin normal seviyelere düştüğü tespit edilmiştir(42). Başka bir çalışmada ise metforminin PKOS'lu hastalarda hiperinsulineminin neden olduğu aromataz enzim ve lokal östrojen artışına bağlı oluşan endometrial hiperplazileri ve kanseri önleyebileceğini ortaya koymuştur.

Çalışmamızda metforminin tüm bu bilinen etkilerine ek olarak, apoptosisin regülasyonunda önemli rol oynayan ve hücrenin apoptosise uğrayıp uğramayacağını belirleyen Bcl-2/Bax oranını anlamlı şekilde azaltarak hücreyi oluşabilecek anormal hücre çoğalmasına karşı apoptosise yönlendirdiğini tespit ettik.

Bu bilgiler ışığındaprogesterona göre benzer histopatolojik regresyon sonuçları sağlayan metformin tedavisinin moleküler düzeyde deprogesterona eşdeğer biçimde apoptosisi indüklediği görülmektedir. Özellikle hiperplazi ve malignite riskinin yüksek olduğu gerek premenopozal gerekse menopoz dönemi kadınlarında progesterona altarnatif olabileceği gösterilmiştir. Böylece ek medikal problemler nedeniyle hormon tedavisi kontraendike olan ya da eşlik eden obezitesi nedeniyle malignite riski yüksek olan kadın gruplarında gerek tedavi gerekse de idamede metforminin metforminin güçü bir alternatif olarak göz önünde bulundurulabilir.

6. SONUÇLAR

Çalışmanın sonuçları şu şekilde özetlenebilir:

1.Endometrial hiperplazi tedavisinde kullanılan progesteronun histopatolojik düzeyde hiperplaziyi regrese ettiğini gösterdik.

2. Tedavide kullanılan metforminin etkinliği kanıtlanmış progesteron tedavisine benzer şekilde histopatolojik düzeyde hiperplaziyi gerilettiğini böylelikle ek medikal problemler nedeni ile hormon tedavisinin kullanılamadığı ve ya obezite nedeniyle hiperplazi ve malignite riski yüksek olankadınlarda progesterona altarnatif olarak kullanılabileceğini gösterdik.

3.Endometrial hiperplazi tedavisinde kullanılan progesteronun endometrial dokuda Bcl-2 gen ekspresyonunu azaltıp Bax gen ekspresyonunu artırarak hücre çoğalmasının belirleyicisi olan Bcl-2/Bax oranını anlamlı şekilde azaltığını böylelikle apoptosisi uyarark hiperplaziyi moleküler düzeyde regrese ettiğini tespit ettik. Tedavide kullanılan metforminin ise progesterona benzer şekilde Bcl-2/Bax oranını azaltarak bilinen etkilerine ek olarak moleküler düzeyde apoptosisi uyararak hiperplaziyi regrese ettiğini gösterdik.

4. Çalışmamız endometrial hiperplazide metformin tedavisinin survivin gen ekspresyonu üzerine etkisini değerlendiren literatürdeki ilk çalışmadır. Metformin ve progesteron tedavisinin survivin gen ekspresyonunu üzerine etkisi değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı farklılık tespit edilmedi. Metformin ve progesteronun Bcl-2 ve Bax genleri üzerine olan olumlu etkisi düşünülürse atipisi olan ve olmayan, hiperplazinin persiste ettiği ve etmediği hastaların karşılaştırılacağı çalışmalar metformin ve progesteron tedavisinin survivin gen ekspresyonu üzerine olan etkisini daha net ortaya koyacaktır.

5. Çalışmamız endometrial hiperplazi tedavisinde kaspaz-9'un değerlendirildiği literatürdeki öncü çalışmalardan olup metformin ve progesteron tedavisinin endometrial dokuda ki kaspaz-9 gen ekspresyonuna etkisi değerlendirildiğinde, hiperplazinin regrese olduğu gruplarda kaspaz-9 gen ekspresyonunda değişiklik izlenmemiştir.

6- Çalışamamızda Bcl-2 gen ailesinin üyesi olan Bad gen ekspresyonları değerlendirildiğinde hem metformin hemde progesteron ile hiperplazi regresyonu sağlanan gruplarda Bad gen ekspresyon seviyelerinde anlamlı değişiklik tespit edilmemiştir.

KAYNAKLAR

1- Bengisu E, Ermiş H: Endomctriyal Hiperplaziler. Jinekolojik Onkoloji1996:312-35.

2- Woodruff JD, Pickar JH: Incidence of endometrial hyperplasia in postmenopausal women taking conjugated estrogens (Premarin) with medroxyprogesterone acetate or conjugated estrogens alone. Am J Obstet Gynecol. 1994; 170: 1213-23.

3- Smith-Bindman R, Kerlikowske K, Feldstein VA, Subak L, Scheidler J, Endovaginal ultrasound to exclude endometrial cancer and other endometrial abnormalities 1998; 280: 1510-7.

4- Mc Campbell et al, Metformin taking away the candy for cancer. 2010 Sep;46(13):2369-80

5- Oner G, Ozcelik B, et al. The effects of metformin and letrozole on endometriosis and comparison of the two treatment agents in a rat model. 2010 April;25(4):932-7.

6- Takemura Y, Osuga Y,et al. Metformin suppresses interleukin (IL)-1beta-induced IL-8 production, aromatase activation, and proliferation of endometriotic stromal cells. J Clinical Endocrinol 2007;92:3213–3218.

7- Management of Endometrial Hyperplasia: A Survey of Members of the Korean Gynecologic Oncology Grou. 2015 Jun 9.

8- Erdemoglu E, Güney M, Giray SG, Take G, Mungan T. Effects of metformin on mammalian target of rapamycin in a Mouse model of endometrial hyperplasia. Eur J Obstet Rep Bio. 2009; 145: 195-199.

9- Erdemoglu E, Güney M, Giray SG, Take G, Mungan T. Effects of metformin on mammalian target of rapamycin in a Mouse model of endometrial hyperplasia. Eur J Obstet Rep Bio. 2009; 145: 195-199.

10- Berek JS. Novak Jinekoloji. In: Lurain JR, ed. Uterus kanseri. Nobel Tıp Kitabevleri,2004;bölümVIII 1345.

11- Gordon MD, Ireland K. Pathology of hyperplasia and carsinoma of the endometrium. Semin Oncol 1994;21: 60-70.

12- Berek JS. Novak Jinekoloji. In: Lurain JR, ed. Uterus kanseri. Nobel Tıp Kitabevleri,2004;Bölüm IV:1144-5.

13- Berek JS. Novak Jinekoloji. In: Lurain JR, ed. Uterus kanseri. Nobel Tıp Kitabevleri,2004;Bölüm IV:1144-5.

14- Berek JS. Novak Jinekoloji. In: Lurain JR, ed. Uterus kanseri. Nobel Tıp Kitabevleri,2004;Bölüm IV:1144-5.

15- Kurman RJ, Kaminski PF, Norris HJ. The behavior of endometrial hyperplasia: a long term study of untreated hyperplasia 1985;56: 403-12.

16- Berek JS. Novak Jinekoloji. In: Lurain JR, ed. Uterus kanseri. Nobel Tıp Kitabevleri,2004;Bölüm IV:1144-5.

17- Caraluaneu A, Lupaşcu IA, Cărăuleanu DM, Socolov R, Socolov D. Clinico-epidemiological study of endometrial hyperplasia a risk factor for the development of endometrialcarcinoma 2015 Jan-Mar;119(1):154-61.

18- Modestil CC. What is new in endometrial hyperplasia treatment or prevention? Best articles from the past year. Obstet Gynecol. 2014 Nov;124(5):1029-30.

19- Mylonas I. et all, immunohistochemical labelling of steroid receptors in normal and malignant human endometrium. 2009;111(4):349-59.

20- Kim MK. et all. Comparison of diagnostic accuracy between endometrial curettage and pipelle aspiration biopsy in patients treated with progestin for endometrial hyperplasia: a Korean Gynecologic Oncology Group Study.Jpn J Clin Oncol. 2015 Jul 22.106.

21- Jindal A. Mohi MK. Kaur M. Kaur B. Endometrial evaluation by ultrasonography hysteroscopy and histopathology in cases of breast carcinoma on Tamoxifen therapy. 2015 Apr-Jun;6.

22- Goldzier JW, Axelrod LR. Clinikal and biocemikal features of the polycystic ovarian disease. Fertil Steril 1963;14:631-638.

23- Emoto M, Tamura R,Shirota K Clinical usefulness of color Dopler ultrasound in patients with endometrial hiperplazia and carsinoma. Cancer. 2002 Feb 1,94(3):700-6.

24- Sanam M. Majid MM. Comparison the Diagnostic Value of Dilatation and Curettage Versus Endometrial Biopsy by Pipelle. a Clinical Trial Asian Pac J Cancer Prev. 2015;16(12):4971-5.

25- Moler DE, Flier JS . Insulin resistance mechanism, sydromes and İmplications. N Engi J Med 1991;325:938-948.

26- Apgar BS, Greenberg G.using progestins in clinical practice. Am Fam Physician. 2000 Oct 15;62(8):1839-46, 1849-50.

27- Rattanachaiyanont M, Angsuwathana S, Techatrisak K, et al: Clinical and pathological responses of progestin therapy for nonatypical endometrial hyperplasia: A prospective study. J Obstet Gynaecol 2005 Apr;31(2):98-106.

28- Horn LC, Schnurrbusch U, Bilek K, et all. Risk of progression in complex and atypical endometrial hyperplasia: Clinicopathologic analysis in cases with and without progestogen treatment. Int J Gynecol Cancer 2004 Mar-Apr;14(2):348-53.

29- Randall TC, Kurman RJ: Progestin treatment of atypical hyperplasia and well-differentiated carcinoma of the endometrium in women under age 40. Obstet Gynecol 1997 Sep;90(3):434-40.

30- Orr J, Chamberlain D: ACOG practice bulletin, clinical management guidelines for Obstet Gynecol 106:413, 2005.

31- Trimble CL, Kauderer J, Zaino R, et al: Concurrent endometrial carcinoma in women with a biopsy diagnosis of atypical endometrial hyperplasia: A Gynecologic Oncology Group study. Cancer 2006 Feb 15;106(4):812-9.

32- Robert L. Barbieri. Metformin for the treatment of polycystic ovary syndrome. Am College of Obstet and Gynecol 2003; 101: 785- 93.

33- Robert L. Barbieri. Metformin for the treatment of polycystic ovary syndrome. Am College of Obstet and Gynecol 2003; 101: 785- 93.

34- Bloomgarden ZT, Futterweit W, Poretsky L: Use of insulin sensitizing agents in patients with polycystic ovary syndrome. Endocr Practice 2001; 7: 279- 86.

35- Avi Ben-Haroush, Yariv Y, Benjamin F. Insulin resistance and metformin in polycystic ovary syndrome. Eur J of Obstet Gynecol and Reprod Biology 2004; 115: 125- 33.

36- Jakubowicz DJ, Iuorno MJ, Jakubowicz S, Roberts KA. Effects of metformin on early pregnancy loss in the polycystic ovary syndrome. J Clin Endocrinol Metab 2002; 87: 524- 29

37- Robert L. Barbieri. Metformin for the treatment of polycystic ovary syndrome. Am College of Obstet and Gynecol 2003; 101: 785- 93.Jakubowicz DJ, Iuorno MJ, Jakubowicz S, Roberts KA. Effects of metformin on early pregnancy loss in the polycystic ovary syndrome. J Clin Endocrinol Metab 2002; 87: 524- 29.

38- Kolodziejczyk B, Duleba AJ, Spaczynski RZ, Pawelczyk L. Metformin therapy decreases hyperandrogenism and hyperinsulinemia in women with polycystic ovary syndrome. Fertil Steril 2000; 73: 1149- 54.

39- Robert L. Barbieri. Metformin for the treatment of polycystic ovary syndrome. Am College of Obstet and Gynecol 2003; 101: 785- 93.

40- Moghetti P, Castello R, Negri C, Tosi F, Perrone F, Caputo M, Zanolin E, Muggeo M. Metformin effects on clinical features, endocrine and metabolic profiles, and insulin sensitivity in polycystic ovary syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled 6-month trial, followed by open, long-term clinical evaluation. J Clin Endocrinol Metab 2000; 85: 139- 146.

41- Erdemoglu E, Güney M, Giray SG, Take G, Mungan T. Effects of metformin on mammalian target of rapamycin in a mouse model of endometrial hyperplasia. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2009; 145: 195- 9.

42- Legro RS, Zaino RJ, Demers LM, Kunselman AR, Gnatuk CL, Williams NI, Dodson WC. The effects of metformin and rosiglitazone, alone and in combination, on the ovary and endometrium in polycystic ovary syndrome. Am J Obstet Gynecol. 2007; 196: 402- 407.

43- Hızel N. Apoptosis (Programlanmılı Hücre Ölümü). Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi 1997; 6: 196-7.

44- Tsitologiia T. Nucleosome fracton of extracellular dna as the apoptosis. 2015;57(2):87-

45- Israels LG, Israels ED. Apoptosis. The Oncologist 1999;4: 332-9.

46- Nagata S. Fas ligand-induced apoptosis. Annual Review of Genetics 1999; 33: 29-55.

47- Kidd VJ. Proteolytic activities that mediate apoptosis. Annual Review of Physiology 1998; 60: 533-73.

48- Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M. The mito- chondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. Annual Review of Physiology 1998; 60: 619-42.

49- Hampton MB, Orrenius S. Redox regulation of apoptotic cell death. Biofactors 1998;8:1-5.

50- King KL, Cidlowski JA. Cell cycle regulation and apop- tosis. Annual Review of Physiology 1998;60: 601-17.

51- Thompson EB. The many roles of c-Myc in apoptosis. Annual Review of Physiology 1998; 60: 575-600.

52- Budihardjo I, Oliver HLM. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. Annual Review of Cell and Developmental Biology 1999; 15: 269-90.

53- Hart S. The drama of cellular death. Bioscience 1994; 44: 451-5.

54- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Molecular Biology of The Cell. New York: Garland Publishing. 1994: 1076.

55. Behnia M, Robertson KA, Martin WJ. Role of apoptosis in host defense and pathogenesis of disease. Official Publication of The American College of Chest Physi- cians (CHEST) 2000; 117:1771-7.

56- Thompson EB. Apoptosis. Annual Review of Physiology 1998; 60: 525-32.

57- Nanji AA, Hiller-Sturmhöfel S. Apoptosis and necrosis: two types of cell death in alcoholic liver disease. Alcohol Health and Research World 1997; 21: 325-30.

58- Hetts SW. To die or not to die. The Journal of The American Medical Association (JAMA) 1998; 279:300-

59- Fadeel B, Orrenius S, Zhivotovsky B. Apoptosis in hu- man disease: A new skin for the old ceremony? Bio- chemical and Biophysical Research Communications 1999;266: 699-717.

60- Kaipia A, Hsueh AJW. Regulation of ovarian follicle atresia. Annual Review of Physiology 1997; 59: 349-63.

61- Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: Signaling and Modulation. Science 2001; 281:1305-8 1998.

62- Gilchrist, D.G. Programmed cell death in plant disease: the purpose and promise of cellular suicide. Annual Re- view of Phytopathology 1998; 36: 393-414.

63- Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. Annual Review of Immunology 1998; 16: 395- 419.

64- Roulston A, Marcellus RC, Branton PE. Viruses and Apoptosis. Annual Review of Microbiology 1999;53: 577-628.

65- Johnson DE. Programmed cell death regulation: basic mechanisms and therapeutic opportunities. Leukemia 2000; 14: 1340-44.

66- Eichhorst ST, Krammer PH. Derangement of apoptosis in cancer. The Lancet 2001; 358:345-6.

67- Wang J, Chun HJ, Wong W, Spencer DM, Lenardo MJ. Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signal- ing. Proceedings of The National Academy of Science of The United States of America (PNAS) 2001; 98: 13884-8.

68- Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signal- ing.Annual Review of Biochemistry 2000; 69: 217-45.

69- Baran A. Tıbbi Biyoloji (Ders Kitabı). Bursa: Güneş Tıp Kitap Evi, 1999: 169-74.

70- Ganea D. Apoptosis and the immune response (book review). Bioscience 1996; 46: 705.

71- Erkani s,Kayeselcuk F, Kuscu E, et alExpression of survivin, Pten and P27 in normal, hiprplaztik carsinamateus endometrium. İnt gynecol canser 2009;161412-1418.

72- Montgomery BE, Daum, Dunton CJ, Endometrial hyperplasia: Obset Gynecol surv 2004, 59;368-378.

73- Depertmant ofobsetrics and gynecology moedeilng vienna 12A-2340 British journal of canser 2012 84-90.

74- Tommi E.vaskivuo et all. Regulation of cell death in human fetal and adult ovaries role of Bok and Bcl-X(L). 2010 Dec 15;330(1-2):17-24.American canser society 2006: 10876.

75- Orbo A. Et all. Levonorgestrel-impregnated intrauterine device as treatment for endometrial hyperplasia: a national multicentre randomised trial. 2014 Mar;121(4):477-86.

76- Tas M, Kutuk MS, Serin IS, Ozgun MT, Oner G, Ozturk F. Comparison of antiproliferative effects of metformine and progesterone on estrogen-induced endometrial hyperplasia in rats. Gynecol Endocrinol 2013; 29(4): 311-4.

77- Regulation of Bcl-2 transcription by estrogen receptor alfa and c-jun in human endometrium. The Japanese Society for Clinical Moleculer Morphology2013:013-0043.

78- Zhou Y, Shen J, Xia L, Wang Y. Estrogen mediated expression of nucleophosmin 1 in human endometrial carcinoma clinical stages throughestrogen receptor-α signaling. 2014 Dec 20;14(1):540.

79- Khodapasand E, Jafarzadeh N, Farrokhi F, Kamalidehghan B, Houshmand M. İs Bax/bcl-2 ratio considered as prognostic marker with age and tumor location in colorektal Canser? Iranian Biomedical Journal april 2015:1366.2015.

80- Vadde R, Radhakrishnan S, Reddivari L, Vanamala JK.Triphala Extract Suppresses Proliferation and Induces Apoptosis in Human Colon Cancer Stem Cells via Suppressing c-Myc/Cyclin D1 and Elevation of Bax/Bcl-2 Ratio. Mar:2015:649263,12.

81- Martin LA, Dowsett M. Bcl-2: A new therapeutic target in estrogen receptor-positive breast cancer? 82-Association of genetic markers in the Bcl-2 family of apoptosis- related genes with endometrial cancer risk ina chinese population depertmant of epidemiyoloji, school of public health July 8,2013:120-129, 0060915.

83- Appel ML, Edelweiss MI, Fleck J, Rivero LF, Rivoire WA. P53 and Bcl-2 as prognostic markers in endometrium carsinoma Pathol. Oncol. Res. 2008 14;23-30.

84- Jaiswal PK, Goel A, Mittal RD. Survivin: A moleculer biomarker in canser Indian J Med Res April 2015141.

85- Pavlidou A, Kroupis C, Dimas K. Association of survivin splice variants with prognosisi and treatment of brest cancer World journol of clinical oncology 2014 December 10;5(5);883-894.

86- Zhou and Lin et all. Hand-assisted laparoscopic surgery compared with open resection for mid and low rectal cancer: a case-matched study with long-term follow-up. World J Surg Oncol. 2015 Jun 10;13:199.

PROJE SONUÇ RAPORU YAZIMINDA UYULMASI GEREKEN KURALLAR

Proje sonuç raporu yazımında A4 ebadında kağıt alanı kullanılmalı, sayfalardaki sağ, sol ve alt boşluk 2.5 cm, üst boşluk ise 3 cm olmalıdır.

Proje sonuç raporunun tam metni, **tek bir pdf dosyası** olarak elektronik ortamda ERÜ-PRODİS sistemi üzerinden birime sunulmalıdır. Dosya isimleri aşağıdaki formata uygun olmalı ve isim verilirken Türkçe karakter kullanılmamalıdır:

projeno.pdf (örnek: FBA_09_1236.pdf)