

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**İLERİ EVRE ENDOMETRİYOZİS OLGULARINDA MEYDANA GELEN
GENETİK DEĞİŞİKLİKLERİN
FLORESANS İN SİTU HİBRİDİZASYON (FISH)
YÖNTEMİ İLE İNCELENMESİ**

Şükrü KELEŞ

**Danışman Öğretim Üyesi
Prof. Dr. Fulya Tekşen**

**ANKARA
2006**

Prof. Dr. Fulya Tekşen Danışmanlığında Sağlık Eğitimcisi Şükrü Keleş tarafından hazırlanan bu çalışma. 12 / 06 / 2006 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Fulya TEKŞEN
(Sağlık Eğitim Fakültesi)

İmza:

Üye: Prof. Dr. Hakan ŞATIROĞLU
(Tıp Fakültesi, Ankara Üniv.)

İmza:

Üye: Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU
(Tıp Fakültesi, Ankara Üniv.)

İmza:

Üye: Prof. Dr. Serap EMRE
(Tıp Fakültesi, Hacettepe Üniv.)

İmza:

Üye: Prof.Dr. Davut GÜL
(Tıp Fakültesi, GATA)

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof.Dr. Nejat Akar
Enstitü Müdürü

ÖZET

Endometriyozis, üreme çağındaki kadınların % 10-15 oranında etkilendiği ve infertilite ile pelvik ağrıya neden olan bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Anormal hücre büyümesi ile karakterize olan endometriyozis olgusunun genetik mekanizması tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir. Çalışmamızda ileri evre endometriyozis vak'alarında somatik hücrelerde meydana gelen kromozom değişiklikleri floresans in situ hibridizasyon (FISH) yöntemi uygulanarak saptanmıştır. Ayrıca çalışmamızda endometriyozis ve normal endometriyum dokuları ile periferik kan örnekleri incelenmiştir. Sentromerik problar kullanılarak 11 ve 18 numaralı kromozomlar sayısal açıdan değerlendirilmiş, lokus spesifik prob kullanılarak da 17 numaralı kromozomda lokalize olan p53 lokusu yapısal açıdan incelenmiştir. Değerlendirmede monozomi, dizomi ve trizomi gözlenen hücrelerin frekansları saptanmıştır.

Çalışmamızda altı (n:6) endometriyozisli hastanın endometriyozis dokusu (çalışma grubu), aynı hastaların endometriyum dokusu ve periferik kan örnekleri ile beş (n:5) sağlıklı kadının endometriyum dokusu ve periferik kan örnekleri çalışılmıştır. Çalışma grubunu oluşturan endometriyozis örneklerinde 11 numaralı kromozomda % 3.6 oranında trizomi, % 0.4 oranında monozomi, 18 numaralı kromozomda % 1.3 oranında monozomi ve 17 numaralı kromozomda lokalize olan 17p13 (p53) lokusunda ise % 16.4 oranında monozomi, % 2.1 oranında trizomi saptanmıştır. I. Kontrol grubunu oluşturan hastalardan temin edilen endometriyum örneklerinde, 11 numaralı kromozomda % 1.3 oranında trizomi, 18 numaralı kromozomda % 2.7 oranında monozomi, % 1.0 oranında trizomi ve 17 numaralı kromozomda lokalize olan 17p13 (p53) lokusunda ise % 3.2 oranında monozomi tespit edilmiştir. Çalışma grubu ve I. Kontrol grubu arasında 11 ve 18 numaralı kromozomlar ile 17p13 lokusunda gözlenen genetik değişiklikler açısından anlamlı bir farklılık olduğu belirlenmiştir ($p<0.0001$). Bulgular endometriyozisin oluşum ve/veya gelişiminde somatik hücrelerde genetik değişikliklerin meydana geldiğini destekler niteliktedir.

Anahtar Kelimeler: Endometriyozis, Floresans İn Situ Hibridizasyon, Anöploidi, p53, Familiyal Kalıtım

ABSTRACT

Endometriosis affects 10-15 % of women of reproductive age and is a common cause of infertility and pelvic pain. Although endometriosis is characterized by abnormal growth or turn-over cells, the genetic changes involved remain unclear. We employed multi-color fluorescence in situ hybridization (FISH) strategy to determine the incidence of somatic chromosomal numeric alterations in late stage endometriosis. We performed three color FISH using centromeric DNA probes for chromosomes 11, 18 and locus specific p53 probes (17p13) localized to chromosome 17 in endometriotic tissue specimens, normal endometrial tissue, and peripheral blood lymphocytes. We performed to evaluate the frequency of monosomic, disomic, and trisomic cells in normal controls and endometriotic tissue specimens.

Totally six endometriosis samples (n:6), normal endometrium samples (n:6), and peripheral blood lymphocytes (n:6) were studied and normal endometrium samples (n:5) with peripheral blood lymphocytes were also studied from healthy women. In endometriosis samples (n:6) were a significantly higher frequency of trisomy (3.6 %), monosomy (0.4 %) for chromosome 11, frequency of monosomy (1.3 %) for chromosome 18, higher frequency of monosomy (16.4 %), trisomy (2.1 %) for chromosome 17 p53 (17p13) locus. In endometrium samples (n:6) were frequency of trisomy (1.3 %) for chromosome 11, frequency of monosomy (2.7 %), frequency of trisomy (1.0 %) for chromosome 18, frequency of monosomy (3.2 %) for chromosome 17 p53 (17p13) locus. Apart from chromosome 11, 18 and chromosome 17 p53 (17p13) locus genetic alterations was significantly greater ($p < 0.0001$) in the endometriosis specimens than in normal endometrial cells. These findings support a multistep pathway involving somatic genetic alterations in the development and/or progression of endometriosis.

Key words: Endometriosis, Fluorescence in situ hybridization (FISH), aneuploidy, p53, familial inheritance

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü tarafından 157 numaralı “İleri Evre Endometriyozis Olgularında Meydana Gelen Genetik Değişikliklerin Floresans İn Situ Hibridizasyon (FISH) Yöntemi İle İncelenmesi” konulu Yüksek Lisans tez projesi kapsamında desteklenmiştir.

Bu projenin gerçekleştirilmesinde her türlü teknolojik imkan ve desteği sağlayan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Fulya Tekşen’e (Ankara Üniversitesi, Sağlık Eğitim Fakültesi, Öğretim Üyesi), hasta ve kontrol gruplarına ulaşılmasında organizasyonu sağlayan Sayın Prof. Dr. Hakan Şatıroğlu’na (Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Öğretim Üyesi), doku preparatların hazırlanması, tekniğin uygulanması ve değerlendirilmesi sürecinde yardımlarını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Volkan Baltacı’ya (Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Öğretim Üyesi), doku takibi ve alımı konusundaki katkılarından dolayı sayın Prof. Dr. Sertaç Batuoğlu’na (Dr.Zekai Tahir Kadın Hastalıkları ve Doğum Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Başhekim Yard.), Sayın Prof. Dr. Fulya Dökmeci’ye (Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Öğretim Üyesi), Sayın Uzm. Dr. Turgut Var’a (Dr. Zekai Tahir Kadın Hastalıkları ve Doğum Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Uzman Dr.), Sayın Uzm. Dr. Batuhan Özmen’e, (Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı,Uzman Dr.), Sayın Uzm. Dr. Ayşe Elif Karlı’ya (Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Uzman Dr.), istatistiksel değerlendirme sürecinde destek aldığımız Yrd. Doç. Dr. Kenan Köse’ye (Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı, Öğretim Üyesi), çalışma arkadaşlarıma ve proje sürecinin oluşum, gelişim ve tamamlanma sürecini paylaştığım sevgili aileme içtenlikle teşekkür ederim.

Şükrü KELEŞ
Ankara, Haziran 2006

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	3
3. KURAMSAL TEMELLER.....	6
3.1. TARİHÇE.....	6
3.2. ENDOMETRİYOZİS VE SINIFLANDIRILMASI.....	6
3.3. ENDOMETRİYOZİSİN EPİDEMİYOLOJİSİ.....	8
3.3.1. Risk Faktörleri.....	8
3.3.2. Temel faktörler.....	9
3.3.3. Sağlık Alışkanlıkları.....	9
3.3.4. Menstrasyon ve Üreme Faktörleri.....	10
3.4. ENDOMETRİYOZİSİN FİZYOPATOLOJİSİ.....	11
3.5. ENDOMETRİYOZİS GENETİĞİ.....	14
3.5.1. Familial Kalıtım.....	14
3.5.2. Olası Kalıtım Modelleri: Poligenik/Multifaktöriyel.....	17
3.5.3. Endometriyoziste meydana gelen kromozomal değişiklikler.....	17
3.5.4. Endometriyoziste etkin olan onkogen ve tümör süpresör genler.....	21
4. MATERYAL VE YÖNTEM.....	23
4.1. ÇALIŞMA GRUPLARININ OLUŞTURULMASI.....	23
<u>4.2. FLORESANS İN SİTU HİBRİDİZASYON (FISH).....</u>	<u>24</u>
4.3. PREPARATLARIN HAZIRLANMASI.....	27
4.3.1. Endometriyozis ve Endometriyum doku preparatlarının hazırlanması.....	27
4.3.2. Periferik Kan preparatlarının hazırlanması.....	28
<u>4.4. YÖNTEM.....</u>	<u>29</u>
4.4.1. Fish (Floresans İn Situ Hibridizasyon) Problemleri.....	29
4.4.2. Fish Protokolü.....	29
5. BULGULAR.....	32
6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	47
7. KAYNAKLAR.....	52
ÖZGEÇMİŞ.....	59

SİMGELER DİZİNİ

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AÜTD	Amerikan Üreme Tıbbı Derneği
BİAP	Bilimsel Araştırma Projesi
°C	Santigrat derece
CI	Güven aralığı
cm	Santimetre
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DNA	Deoksiribonükleik asit
dk	Dakika
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
E	Endometriyum
gr	Gram
HLA	İnsan lökosit antijen birlikteliği
KCL	Potasyum klorür
ml	Mililitre
OK	Oral kontraseptif
p	Kromozomun kısa kolu
PK	Periferik kan
q	Kromozomun uzun kolu
R.R	Relatif Risk
rpm	Dakikadaki dönüş sayısı
SSC	Sodyum klorür ve sodyum sitrat
TSG	Tümör süpresör gen
µl	Mikrolitre
X ²	ki-kare testi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil.3.1.	Yaygın olarak gözlenen endometriyozis alanları.....	7
Şekil 5.1.	Çalışma grubumuzdan E2006/05 No'lu olguya ait endometriyozis dokusunun LSI p53 (17p13) / Cep 11 / Cep 18 Prob FISH analiz görüntüsü.....	33
Şekil 5.2.	Çalışma grubumuzdan E2006/01 No'lu olguya ait endometriyozis dokusunun LSI p53 (17p13) / Cep 11 / Cep 18 Prob FISH analiz görüntüsü.....	34
Şekil 5.3.	Çalışma grubumuzdan E2006/01 No'lu olguya ait endometriyum dokusunun LSI p53 (17p13) / Cep 11 / Cep 18 Prob FISH analiz görüntüsü.....	35
Şekil 5.4.	I. Kontrol grubumuzdan E2006/02 No'lu olguya ait endometriyum dokusunun LSI p53 (17p13) / Cep 11 / Cep 18 Prob FISH analiz görüntüsü...	36
Şekil 5.5.	II. Kontrol grubumuzdan E2006/04 No'lu olguya ait Periferik Kan örneğinin LSI p53 (17p13) / Cep 11 / Cep 18 Prob FISH analiz görüntüsü.....	39
Şekil 5.6.	I. Kontrol grubumuzdan E2006/05 No'lu olguya ait endometriyum dokusunun LSI p53 (17p13) / Cep 11 / Cep 18 Prob FISH analiz görüntüsü.....	40
Şekil 5.7.	Çalışma grubumuzdan E2006/05 No'lu olguya ait endometriyozis dokusunun LSI p53 (17p13) / Cep 11 / Cep 18 Prob FISH analiz görüntüsü.....	43
Şekil 5.8.	Çalışma grubumuzdan E2006/06 No'lu olguya ait endometriyozis dokusunun LSI p53 (17p13) / Cep 11 / Cep 18 Prob FISH analiz görüntüsü.....	44

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1.	Endometriyozis ve kontrol grubunu oluşturan bireylerin birinci derece akrabalarında gözlenen endometriyozis frekansının ifadesi.....	15
Çizelge 3.2.	Endometriyozis olgusunda sıklıkla incelenen kromozomlar.....	18
Çizelge 5.1.	11 numaralı kromozom için çalışma ve kontrol gruplarının değerlendirme sonuçları.....	37
Çizelge 5.2.	18 numaralı kromozom için çalışma ve kontrol gruplarının değerlendirme sonuçları.....	41
Çizelge 5.3.	17 numaralı kromozomda lokalize olan 17p13 gen lokusu (p53) için çalışma ve kontrol gruplarının değerlendirme sonuçları.....	45

1.GİRİŞ

Endometriyozis, normal olarak uterus iç yüzeyini örten endometriyum dokusunun, uterus iç yüzeyi dışında bulunması olarak tanımlanmaktadır. Endometriyozis kompleks bir jinekolojik hastalık olup menapoz öncesi üreme çağındaki kadınların %10-15'ini etkilemektedir (Shin vd 1997, Bischoff ve Simpson 2004). Epidemiyolojik çalışmalar bu hastalığın multifaktöriyel / poligenik olarak kalıtılan genetik bir hastalık olduğunu işaret etmektedir (Wenzl vd 2003).

Endometriyozisli hastaların % 30-40 oranında infertil olduğu, infertil olan kadınların ise % 6-15 oranında endometriyozis tanısı aldığı bildirilmektedir (Muse ve Wilson 1982). Diğer taraftan endometriyozis olgusunda familial geçişin olduğu bildirilmekte olup, birinci dereceden akrabalarında endometriyozis saptanmış bir kadın için hastalığın ortaya çıkma riskinin % 5 ile % 8 arasında olduğu ifade edilmekte ancak genetik geçişin şekli tam olarak bilinmemektedir (Frey ve Bluefield 1957, Ranney 1971, Simpson vd 1980, Lamb vd 1986, Coxhead ve Thomas 1993, Bischoff ve Simpson 2000, Cramer ve Missmer 2002, Simpson ve Bischoff 2002, Simpson vd 2003, Simpson ve Elias 2003, Simpson vd 2003). Öte yandan somatik hücrelerdeki proto onkogenlerin aktivasyonu (örn, k-ras) ve tümör supresör genlerin (TSG) kaybı endometriyozis oluşumuna neden olan faktörlerin bazılarını oluşturmaktadır (Fearon ve Vogelstein 1990).

Genetik değişimde altta yatan sebepler henüz aydınlatılmamış olmakla birlikte özellikle onkogen (c-myc, c-fms, k-ras, c-erb, ras, B-1 ve B-2) ile tümör süpresör gen (p53) mutasyonlarının endometriyozis olgusunda rol oynadığı düşünülmektedir (Simpson vd 1984, Moen vd 1984, Maxwell vd 1989).

Bu çalışmada endometriyozis, normal endometriyum doku örnekleri ve periferik kan lenfositlerindeki sitogenetik ve moleküler değişiklikler Floresans İn Situ Hibridizasyon (FISH) yöntemiyle incelenmiş olup çalışmada kromozom spesifik problemler kullanılarak anöploidi frekansının yüksek olarak bildirildiği 11 ve 18 numaralı kromozomlar sayısal yönden ve 17 numaralı kromozomda lokalize olan 17p13 gen lokusu lokus-spesifik DNA problemleri kullanılarak yapısal açıdan değerlendirilmiştir. Çalışmamızda ayrıca endometriyozisli vak'aların aile hikayeleri incelenerek hastalığın familial geçişinin irdelenmesi de hedeflenmiştir

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Günümüze kadar yapılan araştırmalarda, kanser olgusuyla oldukça benzer özellikler taşıyan endometriyozisin oluşumu ve/veya gelişiminde, somatik hücrelerde genetik değişikliklerin meydana geldiği ifade edilmektedir (Kennedy vd 1995). Bu çalışmalarda genellikle 7, 8, 11, 12, 16, 17 ve 18 numaralı kromozomlarda yüksek sıklıkta anöploidinin gözleendiği belirlenmiştir (Shin vd 1997). 16 ve 17 numaralı kromozomlarda monozomi, 11 numaralı kromozomda ise trizomi daha sık olarak gözlenmiştir. Tümör süpresör genler ve onkogenlerin 11, 16 ve 17 numaralı kromozomlarda lokalize olduğu ve bu bölgelerdeki kromozom kayıplarının endometriyozisin oluşumu ve/veya gelişiminde rol oynayabileceği ifade edilmektedir. 17 numaralı kromozomda anöploidi frekansının yüksek bulunduğu bir başka çalışmada ise endometriyozis olgusunun somatik hücrelerdeki genetik değişiklikleri desteklediği ifade edilmektedir (Bischoff vd 2002). Gogusev ve arkadaşları tarafından 1, 2, 3, 5, 7, 16 ve 20 numaralı kromozomlar ile 6p 17q, 21q ve 22q kromozom bölgelerinde ekstra bir artışın olduğu ve 9, 12, 18 numaralı kromozomlar, X cinsiyet kromozomu ve 6q, 11p, 13q kromozom bölgelerinde ise kromozom kaybının olduğu bildirilmektedir (Gogusev vd 2000). Diğer birtakım araştırma bulgularında ise 1p, 5p, 6q, 7p, 9q, 16, 17q ve 22q kromozom bölgelerinde kromozom kayıplarının olduğu gösterilmiştir (Vercellini vd 1994, Bischoff vd 2002).

Bizim çalışmamızda 18 numaralı kromozomda gözlenen kromozom kaybı ve 11 numaralı kromozomda gözlenen yüksek trizomi frekansı nedeniyle bu kromozomların sayısal açıdan değerlendirilmesine karar verilmiştir.

Endometriyozis malignant-abnormal morfoloji, düzensiz hücre büyümesi, uterin boşluğu dışındaki dokulara invazyon yapması gibi karakteristik özelliklerle birlikte seyretmektedir (Nibert vd 1995, Jiang vd 1996, Jimbo vd 1997). Endometriyozis ile kanser arasındaki ilişkiye bakıldığında, kanserin genellikle ovaryum'da (% 75 oranında) ortaya çıktığı saptanmıştır (Mostoufizadeh ve Scully 1980, Vercellini vd 1993). Endometriyozis olgusunda malignant transformasyonun % 1 oranında görüldüğü bildirilmektedir (Heaps vd 1990, McMeekin vd 1995, Campbell ve Thomas 2001). Over kanserleri, endometriyotik lezyon (%70) formunda, berrak hücre (clear cell, %14) tipinde ya da karışık halde bulunmaktadır. Ayrıca endometriyozis ve over kanserleri arasındaki patogenezis birbirinden bağımsız olabileceği gibi yapılan son çalışmalarda endometriyotik lezyonların over tümörlerle bitişik olarak

gözlenmesi, endometriyozisin over kanserlerinin bir kısmında tetikleyici bir rolünün olabileceği şeklinde ifade edilmektedir (Heaps vd 1990, McMeekin vd 1995, Campbell ve Thomas 2001).

Endometriyozis olgusundaki somatik DNA mutasyonlarının rolünün incelendiği çalışmaların çoğunda, örneklerin büyük oranda normal dokuları da kapsadığının gözönüne alınması gerekliliği vurgulanmaktadır (Schenken vd 1991). Yapılan immünohistokimyasal çalışmalarda endometriyum dokusu, normal endometriyum dokusu ile karşılaştırılmış özellikle c-myc, c-fms, c-erb B-1/-2 ve ras için yüksek protein oranları ile proto-onkogen ekspresyonları gözlenmiştir (Berqvist vd 1991, Jiang vd 1998). Bu sonuçlar proto-onkogen ekspresyonlarının farklı şekilde olduğunu desteklemekte ve belki de endometriyotik hücrelerin farklılaşması ve büyümesiyle ilişkili olduğunu doğrulamaktadır.

17 numaralı kromozomda lokalize olan p53 tümör süpresör geninin (TSG) premalignant ve malignant dokularda değişime uğradığı, endometriyal ve over epitel kanserlerde de benzer durumun gözlendiği, özellikle ileri evre (III-IV) endometriyozis olgularında bu duruma sık rastlandığı bildirilmektedir. Bishoff ve arkadaşları (2002) tarafından yürütülen bir çalışmada FISH yöntemiyle monozomi 17 ve p53 lokusundaki değişimler gösterilmiştir (Bischoff vd 2002). P53 (17p13) için direkt spesifik prob ve 17 numaralı kromozom için alfa-satellit sentromer probu kullanılarak yapılan söz konusu çalışmada endometriyozis ile normal endometriyum dokusuna ait hücrelere ait analiz sonuçları karşılaştırılmış ve normal endometriyum dokusunda heterozigozite kaybı gözlenmez iken, endometriyozis gözlenen dokularda polimorfik DNA lokusunun DNA analizinde 17 numaralı kromozomda ve diğer lokuslarda heterozigozite kaybı gözlenmiştir. Endometriyotik doku ve periferal kandan ekstrakte edilmiş DNA çalışmasında, erken/geç dönem endometriyoziste; HGH, D17S250, CHRN1 dinükleotit belirteçleri araştırılmıştır. Örneklemedeki 14 endometriyozis dokusunun 12'sinde 17. kromozom sentromer kaybı (monozomisi) saptanmış, aynı zamanda p53 lokusunun kaybı da gözlenmiştir. Diğer 2 endometriyozis dokusunda sadece %14 oranında p53 kaybı gözlenmiştir. 17 numaralı kromozomdaki diğer allellerde heterozigozite kaybı daha az sıklıkta gözlenmiş, sadece 15 dokunun 3 tanesinde HGH, 15 dokunun 1'inde D17S250 belirteçleri gözlenirken, 15 dokunun hiçbirinde CHRN1 dinükleotit belirteci gözlenmemiştir. Aynı çalışmada 17 numaralı kromozom üzerinde DNA polimorfik belirteçleri kullanılarak 15 doku örneğinin 4 tanesinde (%27) heterozigozite kaybı

gösterilmiştir. 3 endometriyozis doku örneğinde kaybın HGH (17q22-q24) belirteci ile birlikte olduğu ve 1 kaybın da D17S250 (17q11.2-q12) belirteci ile birlikteliği gösterilmiştir.

Bir başka çalışmada ise 9p, 11q ve 22q kromozom bölgelerinde gösterilen heterozigozite kaybının endometriyozis olgularının etiolojisinde rol oynadığı gösterilmiştir (Jiang vd 1996, Kosugi vd 1999). Araştırılan kromozom bölgelerinin, önceden over kanserlerle ilgili olduğu bilinen bölgeler olduğu endometriyotik kistlerde monoklonal orjinin daha fazla gösterildiği ifade edilmektedir. Diğer bir çalışmada ise yaygın olan genetik değişikliklerin, 11 endometriyozis doku örneğinin 9'unda over kanserinin ortaya çıktığını ya da endometriyozis dokusuna yakın bölgelerde olduğunu göstermiştir (Gogusev vd 2000). Değişiklikler 5q, 6q, 9p, 11q ve 22q üzerindeki kromozomal bölgelerde gözlenmiş olup, 1 endometriyozis örneğinde ise p53 genindeki 220. kodonda mutasyon gösterilmiştir. (Tyr > Cys)

Literatür taramalarından elde edilen sonuçlar doğrultusunda yapılan incelemelerde 17 numaralı kromozomda lokalize olan p53 tümör süpresör geninin premalignant ve malignant dokularda değişime uğradığı, özellikle ileri evre (III-IV) endometriyozis olgularında bu duruma sık rastlandığı bildirildiğinden 17 numaralı kromozomda 17p13 gen lokusunun değerlendirilmesine karar verilmiştir.

3. KURAMSAL TEMELLER

3.1. Tarihçe

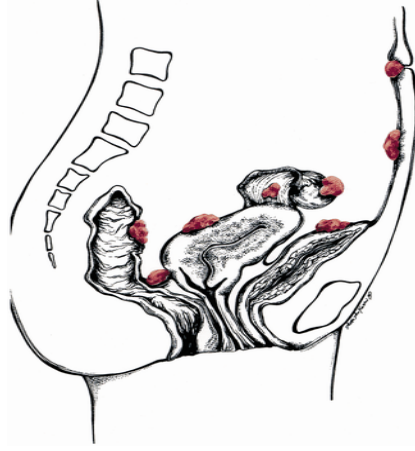
Endometriyozis ilk olarak 1860 yılında tanımlanmıştır. Endometriyozisin familial geçişinin olduğu da bilinmekte olup, vak'a raporlarında familial geçiş, 1927 yılından beri bildirilmektedir (Sampson 1927). Bu konuda 1971 yılında Ranney tarafından yapılan çalışma anket formlarıyla gerçekleştirmiş, 1980 yılında ise Simpson ve arkadaşları ilk makaleyi yayınlamışlardır (Ranney 1971, Simpson vd 1980). Simpson ve arkadaşları, birinci derece akrabalarında endometriyozis olan kadınlarda % 6.9 oranında hastalığın geliştiğini saptamışlar ve kontrol gruplarında hastalığın görülme oranını % 0.9 olarak bildirmişlerdir (Simpson vd 1980). Malinak, endometriyozis olgusunda ailesel geçiş gösteren vak'aları incelediğinde probandların % 62'sinde hastalığın daha ağır seyrettiğini saptamış, bunu ailesel geçiş göstermeyen vak'alar ile kıyasladığında oranın % 23'e düştüğünü bildirmiştir (Malinak vd 1980). Diğer çalışmalarda bu bulguları desteklemektedir (Lamb 1986, Moen ve Magnus 1993, Coxhead ve Thomas 1993). Diğer taraftan monozygotik ikizlerde, % 75-88 oranında gözlenen endometriyozis olgusunun, diziyotik ikizlere oranla daha sık gözleendiği ifade edilmektedir (Moen 1994, Hadfield vd 1997, Treloar vd 1998). Bu veriler ışığında endometriyozisin poligenik / multifaktöriyel olarak kalıtılan bir hastalık olduğu ifade edilmektedir (Malinak vd 1980, Lamb 1986, Coxhead ve Thomas 1993, Moen 1994, Hadfield vd 1997, Treloar vd 1998).

3.2. Endometriyozis ve Sınıflandırılması

Endometriyozisin en belirgin semptomlarından biri dokunun her ay bulunduğu bölgede aynen menstrasyon gibi kanama yapmasıdır. Söz konusu belirtiler, bir yandan kanamanın bölgede yarattığı iltihabi reaksiyona, öte yandan kanamanın kalıntılarının oluşturduğu yapışıklıklara yol açması, Fallop tüplerinin yapışıklıklar tarafından tıkanması, oluşan yapışıklıkların Fallop tüplerinin distal uçlarındaki saçaklarının işlevlerini bozması ve yumurtlama esnasında salınan yumurta hücrelerinin yapışıklıklar nedeniyle tüp içine geçememesi ve bu nedenle gebe kalamama sorunu oluşması, cinsel ilişkide ağrı, pelvik ağrı gibi bulguların gelişmesi ve her ay ortaya çıkan kanama artıklarının birikerek kitle oluşumuna neden olması gibi sonuçları ortaya çıkarmaktadır.

Endometriyozis genellikle yumurtalık ve karın iç zarında (omentum) ortaya çıkmasına karşın vücudun hemen her organında görülebilmektedir. Karın içi dokunun endometriyal dokuya

değişimiyle oluştuğu, endometriyal dokunun ise uterustan karına kan ve lenf akımı yolu ile yayıldığı bildirilmektedir (Wenzl vd 2003). Şekil 3.1’de yaygın olarak gözlenen endometriyozis odakları yer almaktadır. Örneğin apandiks bölgesi, ince barsaklar, mesane, karın duvarı iç zarı (omentum), göbek, kasık (inguinal kanal), akciğerler, lenf bezleri, üst solunum yolları (özellikle burun), böbrek, beyin ve kulak, genital organlar dışında endometriyozisin görüldüğü bölgelerdir (Mendelin vd 1999, Obata ve Hoshiai 2000).



Şekil 3.1. Yaygın olarak gözlenen endometriyozis alanları (Woodward vd 2001 makalesinden değiştirilerek alınmıştır.)

İleri evredeki hastalığın tanı kriterlerinde standardizasyon amaçlandığında Amerikan Üreme Tıbbı Derneği’nin (AÜTD) geliştirdiği sınıflandırma yaygın olarak kullanılmaktadır (American Society for Reproductive Medicine 1997). Ameliyat sırasında pelvik bölgenin görsel olarak değerlendirilmesi sonucunda ölçü, pozisyon ve endometriyal implantın derinliği ve adezyon (yapışma) biçiminden elde edilen skorlar hastalığın evresini belirlemeye yardımcı olmaktadır. Hastalık böylelikle dört evreye ayrılmaktadır. Başlangıç, orta, ılımlı ya da şiddetli olmak üzere sırasıyla evre I, evre II, evre III ve evre IV olarak tanımlanmaktadır.

3.3. Endometriyozisin Epidemiyolojisi

Endometriyozisin 1940’lı ve 1950’li yıllarda insidansı ve prevalansına bakıldığında, hastalık frekansının üreme çağındaki kadınlarda sayısal açıdan farklılık gösterdiği rapor edilmektedir (Burns ve Schenken 1989). Bu duruma seçilen farklı hasta grupları (örneğin fertil veya infertil kadınlar) veya hastalığın hemen göze çarpmayan evrelerinin varlığı ve 1970’li yıllardan önce laparoskopinin sınırlı kullanımının neden olduğu düşünülmektedir. Yapılan geniş ölçekli son çalışmalarda ise fertil kadınlarda prevalansın % 0.5 ile % 5 arasında olduğu, infertil

kadınlarda ise prevalansın % 25 ile % 40 arasında olduğu ifade edilmektedir (Haupt 1982, Strathy vd 1982, Houston vd 1987).

3.3.1. Risk Faktörleri

3.3.1.1. Sosyodemografik faktörler

Yaş: Goldstein ve arkadaşları, Chatman ile Vercellini ve arkadaşları tarafından kronik pelvik ağrı şikayetiyle laparoskopi yapılan 20 yaş altı gruptaki kadınların oranının % 38'den % 65'e yükseldiği belirtilmektedir (Goldstein vd 1980, Chatman ve Ward 1982, Vercellini vd 1989).

Sosyo-ekonomik göstergeler: Ekonomik durumu düşük kadınlarda endometriyozis olgusunda bir artışın varlığı gösterilmektedir (Makhlouf vd 1986). Kuzey İtalya'da vaka-kontrol çalışmalarından elde edilen bilgilere göre 241 endometriyozisli vakanın eğitim düzeyinin, 437 bireyden oluşan kontrol grubuna kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Çalışmadan elde edilen verilerden 7 yıldan az eğitilmiş olanlar ile 12 yıl ve daha fazla eğitim alanlar kıyaslandığında, eğitim düzeyi arttıkça hastalığa yakalanma oranında da bir artış olduğu vurgulanmaktadır (Candiani vd 1991).

Medeni Durum: Makhlouf ve arkadaşları endometriyozis ve medeni durum öyküsü (medeni durum, evlilik yaşı) arasında bir ilişkiye rastlamadıklarını bildirmişler benzer olarak Parazzani ve arkadaşları da böyle bir ilişkilendirme yapmamışlardır (Makhlouf vd 1986, Paparazzini vd 1989).

3.3. 2. Temel faktörler

Familiyal ve genetik faktörler: Endometriyozis olgusunun gelişiminde familiyal geçişin olduğu uzun zamandır belirtilmektedir (Goodall 1943, Frey ve Blufield 1957). 1971 yılında Ranney, endometriyozis operasyonu geçirmiş 350 hastayla yaptığı çalışmada ankete katılan 237 (%22 oranında) kadının 53 tanesinde en az 1 ya da 2. derece akrabalarında endometriyozis olduğunu saptamıştır. (Ranney 1971). Simpson ve arkadaşları (1980) ile Malinak ve arkadaşları (1980) ise aile öyküsü olan hastalarda % 61 oranında hastalığın ağır seyrettiğini, buna karşın aile öyküsü olmayanlarda hastalığın % 24 oranında ağır seyrettiğini belirtmektedirler (Simpson vd 1980, Malinak vd 1980). Aynı çalışmada sağlıklı kadınlarla, 1.

derece akrabaları hasta olan kadınlar kıyaslandığında, hastalık öyküsü bulunan ailelerde bu riskin endometriyozis gelişimini % 7 oranında arttırdığı bildirilmektedir. Bu durumun multifaktöriyel / poligenik etiyojolojiye işaret ettiği ifade edilmektedir (Simpson vd 1980, Malinak vd 1980).

Kilo ve Boy: Crammer ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada yüksek kilolu ve düşük kilolu olan kadınlar arasında endometriyozis riski açısından bir farklılığın olmadığı bildirilmektedir (Cramer vd 1987). Yapılan çalışmada vak'aların çoğunun >1.66 cm. den uzun olduğu işaret edilmektedir (RR 1.4).

3.3.3. Sağlık Alışkanlıkları

Sigara: Crammer ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada 17 yaş öncesi sigaraya başlamış ve günde 1 veya daha fazla paket sigara içen kadınların endometriyozise yakalanma risklerinin, sigara içmeyen kadınlara göre daha düşük olduğunu saptamışlardır (Cramer vd 1987). Bu bulguya karşıt olarak Parazzani ve arkadaşları ise sigara içme alışkanlığının over endometriyozisli ve kontrol gruplarında herhangi bir fark yaratmadığını göstermişlerdir (Paparazzini vd 1989).

Egzersiz: Crammer ve arkadaşları, küçük yaşta egzersize başlayan ve haftada 2 saat düzenli egzersiz yapan kadınlarda egzersizin endometriyozise yakalanma açısından koruyucu bir etkiye sahip olduğunu saptamışlardır (Cramer vd 1987).

3.3.4. Menstrasyon ve Üreme Faktörleri

Menstrasyonun başlama yaşı: Cramer ve arkadaşları endometriyozisli 268 kadının menstrasyon özelliklerini ve 3794 kadını yaş, ırk bakımından karşılaştırmalı kontrol grupları oluşturularak incelemişler ve çalışma grubunda ilk menstrasyon başlama yaşının kontrol grubuna göre daha düşük olduğunu saptamışlardır (Cramer vd 1987). Parazzine ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada ise 15 yaşından sonra adet görmenin ovaryan endometriyozise karşı doğal bir koruyucu etki oluşturduğu ifade edilmektedir (Paparazzini vd 1989).

Menstrasyon Durumu: Sensky ve Liu'nun yaptığı retrospektif bir çalışmada endometriyozisli 148 hastanın % 76'sında aşırı adet kanaması (menorrhagia) olduğunu saptamışlar ancak bir kontrol grubu oluşturmamışlardır (Senksky ve Liu 1980). Cramer ve arkadaşları endometriyozis ve menstural dönemlerin süresi arasında bir ilişki saptamışlar, çalışmalarına oldukça düzensiz görülen periyotları dahil etmemişlerdir (Cramer vd 1987). 27 gün ve daha kısa süreli döngüler için Relatif Risk (R.R) 2.1 (% 95 CI 1.5-2.9) olarak bildirilmiş olup, bu risk 28-34 günlük döngüler ile karşılaştırılmıştır. 34 gün ve daha uzun süreli döngüler için R.R.'in düştüğü belirlenmiştir. 1 haftanın üstüne çıkan döngülerde artan bir RR varlığı saptanmış olup bu oran 2.4 (% 95 CI 1.4-4.0) olarak belirlenmiştir.

Doğurganlık (Parite): Makhlof ve arkadaşları, 156 hiç evlenmemiş hasta grubuyla 162 kontrol grubunu kıyaslamış ve aralarında zayıf negatif bir birliktelik bulmuşlardır (Makhlof vd 1986). Parazzani tarafından yapılan bir çalışmada hiç doğum yapmamış (nulliparöz) kadınlarla doğum yapmış olan kadınlar arasında bir kıyaslama yapılmıştır. Doğum yapmış olan kadınlarda doğum sayısı arttıkça endometriyotid over kistlerin oluşmasında bir düşüşün olduğu saptanmıştır (Paparazzini vd 1989). Doğum yapmış olmanın endometriyozise karşı koruyucu bir etkisi olduğu ve endometriyozisin infertiliteye neden olduğu ifade edilmektedir.

Oral Kontraseptif (OK) Kullanımı: Bazı çalışmalarda hastalık riskini düşüren etmenlerden biri olarak OK kullanımı vurgulanmaktadır (Sangi-Haghpeykar 1995). Oxford Aile Planlaması Derneği tarafından yürütülen kohort çalışmasında, endometriyozis oranına bakıldığında, OK kullanmaya devam eden veya OK kullanmaya yeni başlayanların hiç OK kullanmamış olanlara göre daha az bir riske sahip olduğu belirlenmiştir. (RR 0.4; %95 Güven Aralığı CI: 0.2-0.7). Oysa hap kullanımını (>2-4 yıl) kesen kadınlarda yüksek riskin varlığı gösterilmektedir. (RR 1.8; %95 CI 1.0-3.1) (Vessey vd 1993). Royal Koleji Pratisyenler Çalışması ile Walnut Creek çalışmalarında da halen OK kullananlarda düşük riskin, eskiden OK kullanmış olanlarda ise yüksek riskin varlığı gösterilmiştir (Royal College of General Practitioners 1974, Walnut Creek Contraseptive Drug Study 1981). Aynı şekilde İtalya'daki vaka-kontrol çalışmalarında hiç OK kullanmamış olanlarda pelvik endometriyozis riskinin yüksekliği gösterilmiş ancak geçmişte OK kullananlar için kısıtlı bir riskin olduğu bildirilmiştir (Moen 1987, Kirshon 1988, Moen 1991, Parazzini vd 1994). Geçici bir süre OK

kullanımının hastalığı durdurucu etkisinin olduğu, önceden OK kullanılmış fakat artık kullanılmıyor olmanın ise riski arttırdığı vurgulanmaktadır.

3.4 ENDOMETRİYOZİSİN FİZYOPATOLOJİSİ

Endometriyozis olgularında ağrı ve infertilite yaygın olarak görülmekle birlikte infertilite için cerrahi müdahaleye karar verilen birçok kadında pelvik ağrı bulunmamaktadır, hastalığı çok şiddetli geçiren kadınların bazılarında ise farklı diğer semptomlar gözlenebilmektedir. Endometriyozis olgusunda Amerikan Üreme Tıbbı Derneği'nin yaptığı sınıflandırma sistemine göre hastalığın şiddeti/evresi ve gebelik oluşumu arasında anlamlı bir ilişki olduğu belirtildiği halde diğer çalışmalar bunu desteklememektedir (Guzick vd 1997). Benzer bir biçimde endometriyozis evreleri ile ağrının şiddeti arasında zayıf bir korelasyon varlığı ifade edilmektedir. Korelasyondaki bu yoksunluk hastalığın evresi, ağrı ya da gebelik oluşumu endometriyozisin fizyopatolojisinin anlaşılmasını daha komplike hale getirmektedir (Guzick vd 1997).

Hastalığın infertiliteye neden olduğu teorisi infertil kadınlarda endometriyozis prevalansının doğurgan kadınlardan daha fazla görüldüğü temeline dayanmaktadır (Strathy vd 1982). Nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte genellikle şiddetli evre (Evre III-IV) endometriyozis olgularında pelvik yapının bozulduğu ifade edilmektedir. Endometriyozisin I. ve II. evrelerinin infertilite üzerindeki etkisi de tam olarak açıklanamamaktadır. İlave bir destekleyici teori de Omland ve arkadaşları (1998) tarafından bildirilmektedir (Omland vd 1998). Araştırmacı grup tarafından yapılan kohort çalışmasından elde edilen bulgulara göre yardımcı üreme teknikleri uygulayan endometriyozisli kadınlarda gebelik oranları, endometriyozisli olmayan kadınlara oranla daha düşük olarak ifade edilmektedir (Omland vd 1998).

Endometriyozisin histogenetik mekanizması “implantasyon teorisi” veya “Sampson teorisi” olarak adlandırılmaktadır. Bu teoriye göre endometriyotik lezyonlar, peritoneal yüzeyden ayrılan canlı endometriyal dokuların reflü yoluyla pelvik organlara ya da peritoneal yüzeye yapışmalarıyla oluşmaktadır (Witz 1999). Bu hipotezi destekleyen birtakım deliller mevcuttur:

- 1) Canlı endometriyal hücreler peritoneal sıvıda ve menstrual sıvıda gösterilmektedir (Keettel ve Stein 1951)
- 2) Endometriyum doku deneysel olarak peritoneal boşluğa implante olabilmektedir (Ridley ve Edwards 1958)
- 3) Bütün kadınlarda belli derecelerde geriye doğru / reflü kanama (retrograde menstürasyon) gözlenmektedir (Halme vd 1984)
- 4) Endometriyozis ile menstrual akış arasında bir birliktelik vardır (Sanfilippo vd 1986, Olive ve Henderson 1987).

Hayvan modelleri de endometriyozisin implantasyon modelini desteklemektedir. Te Linde ve Scott tarafından yürütülen çalışmada 10 maymunun 5 tanesinde yaygın pelvik adezyon tespit edilmiştir (TeLinde ve Scott 1950). Benzer bir çalışma da ise D'Hooghe, dört baboon (*Papio anubis*)'un peritoneal boşluğuna menstrual endometriyum enjekte etmiş ve tümünde endometriyozis geliştiğini gözlemlemiş, vak'aların üç tanesinde ise implantasyonun 12. ayından sonra prognozun kötüye gittiğini tespit etmiştir (D'Hooghe vd 1995).

Programlı hücre ölümü olarak adlandırılan apoptozisin çok hücreli organizmalarda homeostasisi koruyan temel mekanizmalardan sorumlu olduğu belirtilmektedir. Uterus içinde endometriyumun menstrual faz ve ileri sekretör fazı boyunca fonksiyonel tabakada yaşlanan hücrelerin menstrual döngüde elimine edilmesi sürecinde apoptozis, hücresel dengeyi korumaya yardımcı olmaktadır. Proliferatif faz boyunca, bazal tabakadan yeni hücrelerin çoğalması bunu takip etmektedir (Dmowski vd 2001).

Her menstürasyon siklusu sırasında fonksiyonel tabakadaki endometriyum atılmaktadır. Atılan endometriyum dağılmış stroma parçaları, kan pıhtıları ve uterus bezlerini içermektedir. Sağlam uterus bezlerinden bazılarının lümeni kanla dolmaktadır. Endometriyumun daha derin tabakaları, bazal tabaka, uterus salgı bezlerinin tabanları menstürasyon sırasında sağlam kalmaktadır. Gebel ve arkadaşlarına göre, sağlıklı kadınlarda, menstürasyon hücrelerinin çoğu programlı hücre ölümüne uğramakta ve yaşamlarını sürdürmemektedir. (Gebel vd 1998). Endometriyozisli olan kadınlarda ise, apoptozis mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte menstürasyon hücrelerinin büyük bir çoğunluğu apoptozise uğramamakta, böylelikle canlı hücrelerin sayısı artmakta ve fizyolojik aktivitenin devam ettiği bildirilmektedir. Çalışma ekibi, endometriyozisli olan kadınlardan elde edilen endometriyum dokularında,

fertil kontrol grubundan elde edilen endometriyum dokularına oranla anlamlı bir şekilde daha az spontan apoptozis gözlemiştir. Bundan başka azalmış apoptozisin, ötopik endometriyuma nazaran ektopik endometriyum'da gözlemlendiği tespit edilmiştir (Gebel vd 1998). Bu gözlenenler ışığında, endometriyozisli hastalarda, Bcl-2 anti-apoptotik genin endometriyal dokulardaki ekspresyonunun arttığı ifade edilmektedir (Meresmen vd 2000). Bcl-2 ekspresyonu, normal endometriyumda menstural döngü süresince değişmektedir. Meresman ve arkadaşları (2000), endometriyozisli olan kadınlarda proliferatif ötopik endometriyumda Bcl-2 ekspresyonunun kontrol grubu ile karşılaştırdıklarında arttığını gözlemiştir (Meresmen vd 2000). Bcl-2 ekspresyonunun özellikle ektopik endometriyumda, ötopik endometriyumda ise Bcl-2 ekspresyonunun döngüsel değişikliklere bağlı olarak gözlemlendiği belirtilmektedir (Goumenou vd 2001). Ne var ki, Watanabe ve ekibi (1997), ektopik örnekleri ötopik dokularla kıyasladığında Bcl-2 ekspresyonunun artmadığını bildirmiştir (Watanabe vd 1997). Jones ve çalışma arkadaşları ise (1998), ektopik endometriyum hücrelerinde Bcl-2 sayısında ötopik dokularla kıyasladığında anlamlı bir biçimde yüksek olduğunu gözlemiştir (Jones vd 1998).

Moleküler hücre adezyon mekanizmasında, hücre-hücre ve hücre-matrix adezyonu ve bunların ekspresyonunda temel aracı moleküller olan integrin ve kadherinler önemli rol oynamaktadır (Beliard vd 1997). Ötopik endometriyum dokusunda yapılan immünohistokimyasal çalışmalarda E-kadherin ekspresyonu değerlendirildiğinde, peritoneal ile endometriyotik lezyonlarda, bütün dokularda epitel salgı hücrelerinde E-kadherin ekspresyonu gözlenmiştir (Darai vd 1998). E-kadherin geninin sıklıkla karsinoma hücrelerinin metastazında mutasyona uğradığı bildirilmektedir (Frixen vd 1991, Takeichi 1993, Gaetje vd 1997, Starzinski-Powitz vd 1999). Bu güne kadar, endometriyotik doku hücrelerinde mutasyon gösterilememiştir, ektopik dokularda E-kadherin sistemin düzenlenmesi kaldırıldığında ise moleküler fenotipin karsinoma hücrelerinde gözlenen mutasyona benzer olabildiği ifade edilmektedir (Starzinski-Powitz vd 1999)

Endometriyozis, kadınların çoğunda herhangi bir semptom vermemesine rağmen olgularda en sık görülen semptom pelvik ağrı olarak bilinmektedir. Genellikle ağrının başlaması menstrasyondan birkaç gün önce ve/veya cinsel ilişki (dyspareunia) sırasında, nadiren de derin penetrasyonun ardından meydana gelmektedir. Endometriyozis'in ileri evrelerinde ağrı sürekli hale gelebilmektedir. İlave olarak acı, rektum veya mesaneyi etkileyebilmekte ve idrar yaparken veya dışkılama sırasında devam edebilmektedir. Pelvik ağrı birçok kadında yaygın

bir semptom olduğundan endometriyozis tanısı koymak oldukça zordur. Mensturasyon devam ederken bu ağrının normal olduğu şeklinde yorum yapılabilir.

3.5. ENDOMETRİYOZİS GENETİĞİ

3.5.1. Familiyal Kalıtım

Endometriyozisin familiyal kalıtımının olduğu uzun bir süredir bilinmektedir (Bishoff ve Simpson 2000, Simpson 2001). İlk olarak familiyal kalıtım 1940'lı yıllarda vak'a takdimlerinde belirtilmiş, 1971 yılında ise Ranney bu geçişi anket çalışması ile değerlendirmiştir (Ranney 1971). 1984 yılında Simpson ve arkadaşları ilk genetik çalışmayı yayınlamışlardır (Simpson vd 1980). Simpson ve arkadaşları, 123 endometriyozisli hasta ile yaptıkları çalışmada, hastaların kız kardeşlerinin % 5.8 oranında, annelerinin % 8.1 oranında ve 1. derece akrabalarının % 6.9 oranında etkilenmiş olduğunu saptamışlardır, buna karşın eşlerinin annelerinde % 0.9 oranında ve kız kardeşlerinde % 1 oranında endometriyozis olgusunu bildirmişlerdir (Simpson vd 1980). Malinak ve arkadaşları tarafından (1980) ailelerinde veya kardeşlerinde endometriyozis olgusu saptanan kadınların hastalığı daha şiddetli olarak geçirdiği ifade edilmektedir (Malinak vd 1980). Bu çalışmada 1. derece akrabaları etkilenmiş olan 18 probandın (% 61 oranında) 11'inde hastalığın daha şiddetli olarak görüldüğü, birinci derece akrabaları etkilenmemiş olan 105 probandın (% 23 oranında) 25'inde hastalığın şiddetli olarak görüldüğü belirtilmektedir (Malinak vd 1980).

Son zamanlarda yürütülen çalışmalarda bu bulgular desteklenmektedir. (Çizelge 3.1). Lamb ABD.'de Endometriyozis Derneği üyesi 491 hastayı anket çalışması ile değerlendirmiştir (Lamb vd 1986). Pozitif aile öyküsü olan ilgililerin % 18'i raporlanmış ve 43 hasta detaylı bir biçimde değerlendirilmiştir. Probandların annelerinin % 6.2'si ve kızkardeşlerin % 3.8'i endometriyozisli olarak tespit edilmiştir. İkinci derece akrabaların ise % 0.4 oranında endometriyozisli olduğu tespit edilmiştir (Lamb vd 1986).

Çizelge 3.1. Endometriyozis ve kontrol grubunu oluşturan bireylerin birinci derece akrabalarında gözlenen endometriyozis frekansları (Simpson vd 2003 makalesinden değiştirilerek alınmıştır.)

	Anneler (%)	Kızkardeşler (%)	1.derece akrabalar (%)	Kontrol (%)
Simpson vd 1980	5.9	8.1	6.9 (19/276)	0.9 (2/211)*
Lamb vd 1986	6.2	3.8	4.9	2.0
Moen ve Magnus 1993 3.9	3.9	4.8	4.3 (45/1038)	0.6 (2/318)*
Coxhead ve Thomas 1993 -	-	-	5.5 (7/127)	0.8 (2/258)*

*İstatistiksel değerlendirme

Moen ve Magnus'un (1993), Simpson'ın çalışmasına benzer bir biçimde planladıkları çalışmada; 522 vak'a değerlendirilmiş, annelerin % 3.9'u ve kızkardeşlerin % 4.8'i endometriyozisli, sadece endometriyozisli olmayan kadınların kızkardeşlerinin % 0.6'sı (kontrol grubu, diğer sebeplerle laparoskopi geçiren) endometriyozisli olarak saptanmıştır (Moen ve Magnus 1993). Annelerde etkilenmiş kızkardeşlere oranla adenomiyoz (uterus kas tabakası içinde yer yer endometriyum odakların bulunuşu) daha fazla görüldüğü belirtilmektedir (Moen ve Magnus 1993). Malinak ve Simpson tarafından önceden bildirildiği üzere çalışmada ailesel vak'alarda ailesel olmayan vaka'alara oranla endometriyozis daha şiddetli olarak tespit edilmiştir (Simpson vd 1980, Malinak vd 1980). Bir başka çalışmada ise 515 endometriyozis vak'a içerisinde sekiz monozigotik ikizin yer aldığı, bu ikizlerin altısında endometriyozisin gözleendiği aynı zamanda üç annenin de etkilenmiş olduğu bildirilmiştir (Moen 1994).

İngiltere'de, Coxhead ve Thomas 1. derece akrabalarında endometriyozis gözlenen ailelerde altı kuşak boyunca riskin arttığını gözlemişlerdir (Coxhead ve Thomas 1993). Reis ve arkadaşları (1999), Brezilya'da, etkilenmiş 81 probandın 1. derece akrabalarının da % 8.6 oranında etkilenmiş olduğunu, 43 kişilik kontrol grubunda ise böyle bir ilişkilenenin olmadığını bildirmişlerdir (Reis vd 1999). Taiwan ve Puerto Rico'da da ailesel geçişin olduğu vak'alar bildirilmektedir (Chang vd 2002, Flores vd 2002). Stefansson ve arkadaşları tarafından (2002) yapılan çalışmada, 750 İrlanda kökenli endometriyozisli kadın, kontrol gruplarıyla karşılaştırmışlardır. Diğer çalışmalardaki bulguları destekler nitelikte olan bu çalışmada hastalık kızkardeşlerde % 5.2 oranında, kuzenlerde ise % 1.56 oranında saptanmıştır (Stefansson vd 2002).

Hull ve ekibi tarafından (2002), 419 endometriyozisli hastanın üreme çağındaki en az bir kardeşin de hasta olduğu 326 endometriyozis vak'ası tespit edilmiştir (Hull vd 2002). Aynı çalışmanın sonuçlarından bir diğeri ise % 11.2 oranında probandların annelerinde de endometriyozis tespit edilmiş ve bu % 25 oranında pelvik ağrılarla karakterize olarak saptanmıştır. Yaklaşık olarak % 14 oranında ise etkilenmiş kuzenlerin varlığı belirtilmiştir. Etkilenen akrabalara bakıldığında % 10.3'ünün maternal yaşta olduğu bildirilmektedir. Genel olarak probandların % 33'ünün en azından birinin akrabasında bir etkilenme olduğu bildirilmiştir (Hull vd 2002).

Monozigotik ikizlerde dizigotik ikizlere oranla daha yüksek bir sıklıkta endometriyozis gözlenmektedir (Moen 1994, Kennedy vd 1995, Treloar vd 1998, Treloar vd 1998). Bir başka çalışmada pelvik endometriyozisli iki kızkardeşte menstural pnömotoraks (plevra boşluğunda hava (gaz) toplanması) tespit edilmiştir (Hinson vd 1981).

3.5.2. Olası Kalıtım Modelleri: Poligenik/Multifaktöriyel

1. derece akrabaların % 5- % 8 oranında gözlenen poligenik / multifaktöriyel kalıtım kalıbı tek bir mutant gene oranla daha fazla kabul görmektedir. Poligenik bir hastalığın daha şiddetli olacağı genetik değişimlerin sıklıkla gözlendiği endometriyozis olgusunda da ortaya çıkmaktadır (Malinak vd 1980). Böylece etkilenmiş akrabaların oranının yüksekliğine bakıldığında, büyük bir olasılıkla, probandın şiddetli endometritozisli olduğu gözlenmektedir. Endometriyozisdeki bu bulgu ailesel vak'aların sporadik vak'alara oranla hastalığın prognozunun daha şiddetli olduğuna işaret etmektedir. Böylelikle sporadik vak'alarda aile üyelerinden birinin daha etkilenmiş olma olasılığı düşmektedir.

Endometriyozis vakalarının büyük çoğunluğu genetik olmayan (nongenetik) ya da poligenik olmasına karşın, bir ya da birkaç formu mendel kalıtım modellerine uygun olabilmektedir. Bu heterojenite peptik ülserde ya da diğer yetişkin hastalıklarının başlangıcında da görülebilmektedir. Poligenik / Multifaktöriyel kalıtım majör bir genetik açıklama olmasına rağmen, endometriyozis olgusunda insan lökosit antijen (HLA) assosiasyonu görülmemektedir (Simpson vd 1984, Moen vd 1984, Maxwell vd 1989). Son zamanlarda İshii ve arkadaşları, HLA-DRB1 1403 alleli için bir assosiasyon bildirmelerine karşın diğer alleller için böyle bir assosiasyon gösterilememiştir (Ishii vd 2002).

3.5.3. Endometriyozisde meydana gelen kromozomal değişiklikler

Endometriyozis olgusundaki sayısal ve yapısal kromozomal değişiklikleri sitogenetik ve moleküler teknikler kullanılarak incelenmektedir. Bu çalışmalarda sıklıkla 1, 5, 11, 16, 17, 18 ve 22 numaralı kromozomlar ve X cinsiyet kromozomu floresans in situ hibridizasyon (FISH) yöntemiyle değerlendirilmiştir (Dangel vd 1994, Shin vd 1997, Gogusev vd 1999, Gogusev vd 2000, Gogusev vd 2000). Bu araştırmalarda, kromozom kayıpları genellikle 1, 17, 18, 22 numaralı kromozomlar ile X cinsiyet kromozomunda gözlenmiş, kromozom artışları ise sıklıkla 5, 18 numaralı kromozomlarda saptanmıştır.

Shin ve arkadaşları tarafından (1997) trizomi 11, monozomi 16, monozomi 17, trizomi 18 gibi anöploidiler kromozom spesifik problemler kullanılarak ileri evre (III- IV. Evre) endometriyozis olgularında saptanmıştır (Shin vd 1997). Kromozom kaybı ya da artışının endometriyozisin oluşumunda veya gelişiminde rol oynadığı ve özellikle 17 numaralı kromozomda gözleendiği yaygın olarak bildirilmektedir. Bishoff ve Simpson tarafından (2000) özellikle 17 numaralı kromozomda monozomi frekansının yüksekliği endometriyozis dokularında belirlenmiş ve normal endometriyum dokusu ile kıyaslanmıştır (Bishoff ve Simpson 2000). Somatik hücrelerde meydana gelen değişimler farklı çalışmalarla da desteklenmektedir (Bishoff ve Simpson 2000, Kosugi vd 1999, Simpson ve Bishoff 2002).

Literatür taramalarından elde edilen veriler doğrultusunda aşağıdaki çizelge hazırlanmış olup sıklıkla incelenen kromozom ve kromozom lokusları ile uygulanan sitogenetik ve moleküler teknikler ifade edilmiştir (Çizelge 3.2).

Çizelge 3. 2. Endometriyozis olgusunda sıklıkla incelenen kromozomlar

Kromozom Bölgesi	Bulgu	Uygulanan Teknik	Literatür
1	Artış	KGH (Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon)	Gogusev vd 1999; Gogusev vd 2000; Gogusev vd 2000

1p	Kayıp	FISH	Gogusev vd 1999; Gogusev vd 2000; Gogusev vd 2000
1q	Artış	KGH	Mhaweck vd 2002; Gogusev vd 1998
2	Artış	KGH	Gogusev vd 1999; Gogusev vd 2000; Gogusev vd 2000
3	Artış	KGH	Gogusev vd 1999; Gogusev vd 2000; Gogusev vd 2000
4q	Artış	Sitogenetik R bandlama	Bouquet vd 1997
4q	Kayıp	KGH	Gogusev vd 1998 Gogusev vd 1999;
5	Artış	KGH	Gogusev vd 2000; Gogusev vd 2000
5p	Kayıp	KGH	Gogusev vd 1999; Gogusev vd 1999;
6p	Artış	KGH	Gogusev vd 2000;
6p	Artış	FISH	Gogusev vd 2000 Gogusev vd 1999;
6q	Kayıp	KGH	Gogusev vd 2000; Gogusev vd 2000
	Trizomi	Sitogenetik R bandlama	Bouquet vd 1997 Gogusev vd 1999;
7	Artış	KGH	Gogusev vd 2000; Gogusev vd 2000
7p	Kayıp	KGH	Gogusev vd 1999;
8	Trizomi	Sitogenetik R bandlama	Bouquet vd 1997
8q	Artış	KGH	Mhaweck vd 2002 Gogusev vd 1999;
	Kayıp	KGH	Gogusev vd 2000;

9	Kayıp	KGH	Gogusev vd 2000 Gogusev vd 1998 Gogusev vd 1999;
10	Trizomi	sitogenetik R bandlama	Bouquet vd 1997
10p	Kayıp	KGH	Mhaweck vd 2002 Dangel vd 1994
11	Trizomi	FISH	Shin vd 1997
11p	Kayıp	KGH	Gogusev vd 1999; Gogusev vd 2000; Gogusev vd 2000
	Kayıp	KGH	Gogusev vd 1998
12	Kayıp	KGH	Gogusev vd 1999; Gogusev vd 2000; Gogusev vd 2000
	Kayıp	KGH	Gogusev vd 1998
	Artış		Mhaweck vd 2002
13q	Kayıp	KGH	Gogusev vd 1998 Gogusev vd 1998;
	Monozomi	FISH	Dangel vd 1994
16	Artış	KGH	Gogusev vd 1999; Gogusev vd 2000; Gogusev vd 2000
	Monozomi	FISH	Dangel vd 1994 Shin vd 1997
17	Tetrazomi	sitogenetik R bandlama	Bischoff vd 2002 Bouquet vd 1997
	Artış	FISH	Gogusev vd 1999;
17q	Artış	KGH	Gogusev vd 2000; Kosugi vd 1999
P53, 17p13	Kayıp	FISH	Bischoff vd 2002

sitogenetik R bandlama

	Tetrazomi		Bouquet vd 1997
18	Kayıp	KGH	Gogusev vd 1999; Gogusev vd 2000; Gogusev vd 2000
	Kayıp	KGH	Gogusev vd 1998
19	Tetrazomi	sitogenetik R bandlama	Bouquet vd 1997
	Tetrazomi	sitogenetik R bandlama	Bouquet vd 1997
			Gogusev vd 1999;
20	Artış	KGH	Gogusev vd 2000; Gogusev vd 2000
			Gogusev vd 1999;
21q	Artış	KGH	Gogusev vd 2000; Gogusev vd 2000
	Artış	KGH	Gogusev vd 1999; Gogusev vd 2000;
22q	Kayıp	FISH	Gogusev vd 2000
	Kayıp	FISH	Gogusev vd 1999; Gogusev vd 2000; Gogusev vd 2000
X	Kayıp	KGH	Gogusev vd 1999; Gogusev vd 2000; Gogusev vd 2000
	Monozomi	sitogenetik R bandlama	Bouquet vd 1997

3.5.4. Endometriyozisde etkin olan onkogen ve tümör süpresör genler

Onkogenler, proonkogenlerin aktivasyonu sonucu ortaya çıkmaktadır. Tümör Süpresör Genler (TSG) tümör oluşumunu engelleyen genlerdir ve bu genlerden birinin mutasyona uğraması

durumunda kanser oluşumu gözlenmektedir. 11 numaralı kromozomda WT1, MEN1, ATM, XPE, FANCD, FANCE genleri ile 18 numaralı kromozomda MALT1, SYT gen mutasyonları yoğun olarak çalışılmaktadır. Monoklonal hücre ekspresyonları endometriyozis olgusunda incelenmiş ve burada onkogenlerin (c-myc, c-erg, B1) sürece eşlik ettiği belirlenmiştir (Jimbo vd 1997, Tamura vd 1998). Neoplazi'nin patogenetik mekanizması incelendiğinde tek bir progenitör hücrenin klonal orjini oluşturduğu ve en az iki mutasyonun arka arkaya meydana geldiği ifade edilmektedir (Bishoff ve Simpson 2000, Simpson ve Bishoff 2002, Campbell ve Thomas 2001). Endometriyozis olgusunda birden fazla genin (poligenik) sorumlu olduğu düşünülmektedir. Her iki mutasyonun da sporadik olabildiği ya da bir mutasyonun germline'da meydana geldiği, diğer mutasyonun ise sporadik olarak ortaya çıktığı vurgulanmaktadır. İlk durumda her iki mutasyonun somatik olarak meydana gelme olasılığı düşüktür o nedenle kalıtsal olma olasılığı az olduğu (sporadik vak'a), diğer durumda ise kalıtsal olma durumunun yüksek (ailesel vak'a) olduğu belirtilmektedir. Neoplazinin ortaya çıkmasında iki ya da daha fazla sayıda genin mekanizmada yer alıyor olması, neoplazinin endometriyozis ile benzeştiği biçiminde yorumlanmaktadır (Knudson 2002).

Endometriyozis neoplazi gibi bir oluşum/gelişim süreci geçirmekte ise ve bir tümör süpresör gen (TSG) içeriyorsa heterozigote kaybının da olabileceği ifade edilmektedir. Heterozigote kaybı ilk olarak Jiang tarafından endometriyozis doku çalışmalarında 9p, 11q ve 22q kromozom bölgelerinde gösterilmiştir (Jiang vd 1996). Diğer bir çalışmada ise, kromozomal değişimler 11 vak'anın 9 'unda gösterilmiştir. Bu değişimler sonucunda over karsinoma oluşmuş ve dokunun endometriyozise yakınlığı belirtilmiştir. Kromozomal değişimler 5q, 6q, 9p, 11q ve 22q bölgelerinde gözlenmiş olup ve endometriyozisin % 25 ile % 30 arasında karsinomalar ile ilişkili olduğuna işaret edilmiştir (Jiang vd 1998).

Obata ve çalışma ekibi tarafından, endometriyozis olgusunda 10q23 kromozom bölgesinde lokalize diğer bir TSG olan PTEN çalışılmıştır. PTEN (Phosphatase and Tensin nomolog deleted on chromosome Ten) mutasyonları endometriyozis ile ilişkili over tümörlerinde de rapor edilmiştir. Vak'aların yalnızca % 21'inde endometriyotid tümörlerin PTEN mutasyonlarını içerdiği belirlenmiştir (Obata vd 1998). PTEN mutasyonlarının, benign endometriyotik hücrelerin, malign progenitörlere dönüşümünde erken görülen bir anomali olabileceği ifade edilmektedir (Simpson vd 2003).

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Bu araştırma Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü tarafından desteklenen 157 numaralı Bilimsel Araştırma Projesi (BİAP) kapsamında gerçekleştirilmiştir.

Araştırmamız yaşları 28-48 (ortalama 37.63 ± 6.9) arasında değişen çalışma ve kontrol grubu bireylerinden oluşmuştur. Çalışma grubu bireyleri yaşları 28-36 (ortalama 39.6 ± 7.9) arasında değişen ileri evre endometriyozis tanısı almış toplam 6 (altı) hastadan oluşmuştur. Yaşları 34-48 (ortalama 43.2 ± 6.1) arasında değişen toplam 5 (beş) sağlıklı kadının endometriyum doku örnekleri kontrol grubu olarak değerlendirilmeye alınmıştır.

Çalışmada 6 (altı) endometriyozisli hastanın endometriyozis dokusu (Çalışma grubu), aynı hastaların endometriyum dokusu (1. kontrol grubu) ve periferik kan örnekleri (2. kontrol grubu) ile 5 (beş) sağlıklı kadının endometriyum dokusu (3. kontrol grubu) ve periferik kan örnekleri (4. kontrol grubu) incelenmiştir. Bütün hastaların endometriyozis evrelemesi Amerikan Üreme Tıbbı Derneği (American Society for Reproductive Medicine) sınıflandırmasına göre yapılmış olup çalışma grubu bireyleri endometriyozisin ileri evresinden (III-IV. Evre) seçilmiştir.

Çalışma ve kontrol grubu bireyleri Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Kısırlık Teşhis Tedavi Araştırma ve Uygulama Merkezi ve Dr. Zekai Tahir Burak Kadın Hastalıkları ve Doğum Araştırma ve Eğitim Hastanesi'ne başvuran hastalardan temin edilmiştir. Hastalar ile yüz yüze görüşülerek çalışma hakkında bilgi verilmiş ve çalışmaya gönüllü katıldıklarına dair onay formu alınmıştır.

Çalışmamızda endometriyozis'li vak'aların aile hikayeleri incelenerek konuya bu açıdan da ışık tutulması planlanmıştır. Böylece ailesinde endometriyozis olan kişilere genetik danışma verilirken yararlanılacak sağlıklı verilere ulaşılması da hedeflenmiştir. Çalışmamıza katılan altı endometriyozisli olgunun dördünde 1.derece akrabalarında infertilite varlığı tespit edilmiştir. Kontrol grubunu oluşturan beş endometriyum doku örneği temin edilen sağlıklı kadınlarda ise 1. derece akrabalarında infertiliteye rastanmamış bir olguda 2. derece akrabalarında infertilite varlığı belirlenmiştir

Çalışma grubumuzu oluşturan endometriyozis tanısı almış hastalarımızdan 7 ileri evre (III.-IV. Evre) endometriyozis olgusunun birinden (% 14.2 oranında) ve I. ve II. kontrol grubunu oluşturan aynı hastanın endometriyum dokusundan ve periferik kan örneğinden FISH çalışması için yeterli sayıda ve nitelikte hücre elde edilememiştir.

Çalışma ve kontrol gruplarında 11 numaralı ve 18 numaralı kromozomlar sayısal yönden, 17 numaralı kromozom üzerinde lokalize olan 17p13 gen (p53) lokusu ise yapısal açıdan incelenmiştir.

Dokuların preparat haline getirilmesi, A.Ü. Sağlık Eğitim Fakültesi Temel Sağlık Bilimleri Bölümü Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. FISH yöntemi uygulaması ise Mikrogen Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

4.2. Floresans İn Situ Hibridizasyon

İN Situ Hibridizasyon (ISH) tekniği spesifik DNA ve RNA dizilerinin doku kesitlerindeki her hücrede, kromozom preparasyonlarında veya interfaz nükleuslarında morfolojik olarak gösterilmesini ve nükleik asitlerin kendi doğal hücresel ortamlarında incelenmesini sağlayan bir tekniktir.

İzotopik olmayan (Non-İzotopik) İn Situ Hibridizasyon (NISH), radyoaktif olmayan bir molekül ile kimyasal olarak modifiye edilen DNA problemlerinin immunolojik veya afinite reaksiyonları ile floresan veya enzimatik olarak görüntülendiği bir ISH tekniğidir.

FISH ise probun haptenlerle ya da florokromlarla işaretlenip florokrom maddelerle görüntülenmesinden oluşan, floresan veren sinyaller ile değerlendirilmenin yapıldığı bir ISH tekniğidir.

Artan tarafından bildirildiğine göre (1996), sitolojik preparatlarda RNA'nın DNA ile hibridizasyonu ilk kez 1969 yılında Gall ve Pardeu tarafından gerçekleştirilmiştir (Artan, S. 1996). Araştırmacılar, işaretlenmiş DNA sekanslarının sitolojik preparatlarda lokalize olduklarını göstermişlerdir. Büyümekte olan hücrelere tritium verilmiş ve işaretli nükleik asitler nükleer emülsiyon aracılığı ile belirlenmiştir. Başlangıçta ISH radyoaktif madde kullanılarak uygulamaya konulmuştur. Radyoaktif maddelerin ekonomik olmayışı, yarı ömürleri, toksik etkisi ve uzaklaştırılması gibi zorluklar nedeniyle yöntemin ilk dönemlerde kullanım alanı kısıtlanmıştır. 1970'lerde moleküler klonlama tekniklerinin gelişmesi, 1975 yılında biotin-avidin sisteminin bulunması, hapten molekülleri ile işaretlenmiş olan problemlerin florokrom enzim veya koloidal altın gibi aracı moleküllerle belirgin hale getirilmesi tekniğinin hassasiyet ve güvenilirliğini etkilemiştir. Biotinin yanı sıra digoxigenin ve florescein ile işaretleme, farklı florokrom moleküllerin birlikte kullanılması Horgman ve arkadaşlarının iki renkli, Nedersof ve arkadaşlarının üç renkli hibridizasyonu gerçekleştirilmesini sağlamıştır. 1986'da Pinkel ve Cremer non-radyoaktif işaretli problemler kullanarak FISH tekniğini geliştirmişlerdir (Artan, S. 1996).

4.2.1. FISH Tekniğinde Kullanılan Problemler ve Özellikleri

FISH tekniğinin uygulamasında en önemli aşama prob seçimidir. Kullanılacak probun incelenecek materyale, değerlendirilecek anomali tipine ve bölgesine uygun olması gerekir.

Prob, örneklerde aranan genetik materyale (DNA veya RNA) komplementer, radyoaktif veya nonradyoaktif madde ile işaretli DNA veya RNA segmentidir. Probun hangi yöntemle işaretlendiği, uzunluğu, RNA veya DNA kaynaklı olması, tek veya çift sarmallı olması spesifik olmayan sinyalleri arttırabilir.

FISH tekniğinde sitogenetik alanında kullanılan başlıca problemler şunlardır;

- Tekrarlayan dizi problemleri (satellit problemler)
- Lokusa özgü problemler
- Tüm kromozomu boyayan problemler
- Banda özgü problemler

- Telomer bölgesine özgü problemler

4.2.2. FISH Tekniğinin Temel Mekanizması

FISH prosedürü 6 aşamada gerçekleştirilir;

1. Preparatların Hazırlanması
2. Preparatların Ön Yıkaması
3. Prob ve Hedef DNA Denatürasyonu
4. Prob ve Hedef DNA Hibridizasyonu
5. Hibridizasyon sonrası Yıkamalar
6. Görüntüleme ve İnceleme

Moleküler hibridizasyona dayanan bütün yöntemlerin (Southern blotting, Northern blotting, PCR, ISH) altında yatan mekanizma iki komplementer daldan çift sarmal yapının oluşmasıdır. DNA-DNA hibridizasyonunda prob ve hedef DNA ların denatürasyonunu takiben oluşan DNA fragment karışımı, tek zincir halindeki fragmentlerin tekrar birleşmesini sağlayacak koşullarda gerçekleştirilir.

Bu koşullarda etkili olan dört parametre vardır;

1. Isı
2. pH
3. Monovalent katyon konsantrasyonu
4. Organik solvent varlığı

Hibridizasyonda üç temel aşama önemlidir;

- 1- Hedef dizilerin hibridizasyon sırasında geçirgenliklerini korumaları,
- 2- Proba hedefin yüksek etkinlikle birbirlerine bağlanması,
- 3- Hibridizasyonun spesifik aktivitesi yüksek bir reporter ile en az zemin sinyali olacak biçimde en parlak şekilde görüntülenmesi.

FISH sonrası problemlerden elde edilen sinyaller epifloresan mikroskopta incelenirler. Kullanılan florokromların gözlenebilmesi için doğru prob setleri ve uygun filtrelerin seçilmesi gerekmektedir. Birden fazla hedef dizinin görüntülenmesi gerektiğinde doğru filtreler ile yeşil, akua ve oranj florokromlar gözlenebilmektedir.

4.3. Preparatların Hazırlanması

Doku örnekleri 1 cm x 0.5 cm ebatında olup, alımı takiben serum fizyolojik içinde 3- 24 saat içerisinde laboratuvara ulaştırılmıştır. Taze endometriyozis ve endometriyum doku örnekleri vakit kaybedilmeden 5 ml RPMI 1640 + 0.5 ml gentamisin içeren falkon tüplerine aktarılmıştır. Ayrıca her hastadan 7 ml. yeşil kapaklı heparinli tüp içine tam kan alınmıştır.

4.3.1. Endometriyozis ve endometriyum doku preparatlarının hazırlanması

- 1) Dokuların 1 x Hanks dengeli tuz solüsyonu içerisinde 10 dk. süre ilk yıkaması yapılır.
- 2) Yıkama sonunda doku örnekleri ayıklanır. Bu ayıklamadaki amaç preparat hazırlarken düşük kalitedeki dokuların ayrılmasıdır.
- 3) Seçilen doku örnekleri pastör pipeti ile ependorf tüpleri içerisine aktarılır.
- 4) 2 ml TRİPSİN EDTA C ilave edilerek enzim etkisi ile dokunun parçalanması sağlanır. 37 °C de 30 dk. bekletilir.
- 5) Süre sonunda dokular pipetle falkon tüpe aktarılarak üzerine 3 ml hipotonik solüsyon (KCl) ilave edilir.
- 6) 5 dk. sonunda üzerine 3 ml taze Karnoy's Fiksatif (metanol:asetik asit, 3:1) eklenerek 1200 rpm de 10 dk. santrifüj edilir.
- 7) Santrifüj sonunda süpernatant atılır.
- 8) Pellet üzerine 3 ml taze Karnoy's Fiksatif eklenir ve tekrar santrifüj edilir.
- 9) Bu işlem 3 kez tekrarlanır.
- 10) Hücreler temiz bir lam üzerine hedef bölgeye yayılır.
- 11) Lamlar havada kurutularak FISH uygulanmak üzere -20 °C'de saklanır.

4.3.2. Periferik Kan preparatlarının hazırlanması

- 1) 5 ml RPMI 1640 üzerine 20 damla kan ilave edilir.

- 2) 1500 rpm'de 15 dk. santrifüj edilir.
- 3) Süpernatant dökülür ve pelet elde edilir.
- 4) 5 ml KCl daha önceden 37 °C'ye ısıtılır.
- 5) Pelet vortekslenir ve peletin üzerine damla damla KCl ilave edilir.
- 6) Bu karışım 37 °C'de 25 dk bekletilir.
- 7) Karnoy's Fiksatif (metanol:asetik asit, 3:1) önceden hazırlanır ve -20 °C'de bekletilir.
- 8) 0.5-1 ml. Karnoy's Fiksatif KCl'li çözeltiye ilave edilir, vortekslenir.
- 9) Çözelti 1500 rpm'de 7 dk. santrifüj edilir.
- 10) Süpernatant dökülür, pelet üzerine 5 ml olacak şekilde tekrar Karnoy's Fiksatif ilave edilir.
- 11) 1500 rpm'de 7 dakika santrifüj edilir.
- 12) Bu işlem 3 kez tekrarlanır.
- 13) Son yıkamayı takiben elde edilen hücreler lam üzerine yayılır.
- 14) Lamlar havada kurutulur FISH uygulanmak üzere -20 °C'de saklanır.

4.4. YÖNTEM

4.4.1. FISH PROBLARI

Çalışmada 11 (Cep 11; yeşil, Vysis Inc.) ve 18 (Cep 18; akua, Vysis Inc.) numaralı kromozomlar için sentromerik proplar, 17p13 (LSI, p53; oranj, Vysis Inc.) gen bölgesi için ise lokus spesifik prob kullanılmıştır.

4.4.2. FISH PROTOKOLÜ

Hibridizasyon sonrası fiksasyon tekniğinde CEP 18 (spektrum akua, p11.1-q11.1), CEP 11 (spektrum yeşil, p11.11-q11) ve LSI p53 (spektrum oranj, 17p13.1) proplarını kullanılmıştır (Vyysis-Downers Grove IL). Uygulamada hazırlanan preparatlar 2 defa 2xSSC (sodyum klorür ve sodyum sitrat) solüsyonunda çalkalanmış ve dehidrasyon için (%70, 85, 90 oranında) etanol serisinden geçirilerek havada kurutulmuştur. Preparatlar daha sonra 73 °C'de %70 formamidide / 2xSSC denatüre edilmiş ve hibridizasyon için 5 saat 37 °C'de bekletilmiştir. 11, 18 numaralı kromozomlar ve 17p13 gen lokusu için çok renkli (multicolor) FISH protokolü uygulanmıştır. Tüm proplar doğrudan işaretlenmiştir. (Vysis Inc., Downer's Grove, IL, USA) Post-hibridizasyon yıkaması 0.4x SSC / 0.3 NP40 solüsyonunda 73 °C'de 2 dk. tamamlanmıştır.

Preparatlar Choromo Teknoloji filtre setinde (Santa Clara, USA) değerlendirilmiştir. Oranj (17 numaralı kromozomun 17p13 lokusu), yeşil (11 numaralı kromozom) ve akua (18 numaralı kromozom) sinyaller gözlenmiş olup, değerlendirme Applied Imaging (Cytovision version 2.7; ENGLAND) sisteminde yapılmıştır.

4.4.2.1. Preparatların Ön Yıkaması

2 x SSC önceden 37 °C ye getirilir.

- 1) Lamlar 2 defa 37 °C'de 2 x SSC içeren şalede çalkalanır.
- 2) Lamlar oda ısısında kurumaya bırakılır.

4.4.2.2. Denatürasyon / Hibridizasyon

Oda ısısında % 70, %85, %100'lük etanol içeren 3 şale hazırlanır.

- 3) Lamlar oda ısısında 3 dk. süre ile % 70'lik etanol içeren şalede bekletilir.
- 4) Lamlar oda ısısında 3 dk. süre ile % 85'lik etanol içeren şalede bekletilir.
- 5) Lamlar oda ısısında 3 dk. süre ile % 100'lik etanol içeren şalede bekletilir.
- 6) Lamlar oda ısısında kurutulur.
- 7) Lamlar önceden 73 °C ye getirilmiş denatürasyon çözeltisi içinde 5 dk. %70 formamidide / 2x SSC bekletilir.
- 8) Lamlar oda ısısında kurutulur.

Bundan sonraki işlemler olabildiğince karanlık ortamda gerçekleştirilir.

- 9) Önceden oda ısısına getirilen prob tüpü vortekslenir ve spin edilir.
- 10) 1 µl prob, 2 µl distile su ve 7 µl buffer ayrı bir ependorf tüpüne konulur ve 73 derecede 5 dk. süreyle denatürasyona tabi tutulur.
- 11) Prob denatüre edildikten sonra vortekslenir, mikrosantrifüjde santrüfuj edilir (spin atılır) ve tekrar vortekslenir.
- 12) 10 µl prob lamın hedef alanına konulur ve hemen uygun boyutta bir lamelle hava kabarcığı kalmayacak şekilde kapatılır.
- 13) Lamellerin etrafı plastik izolasyon maddesi (rubber cement) ile sıkıca kapatılır.
- 14) Lamlar 37 °C de 5 saat tutulur. Hibridizasyon ortamının nemli olmasına dikkat edilir.

4.4.2.3. Hibridizasyon Sonrası Yıkama

- 15) Lamlardan plastik izolasyon maddesi (rubber cement) çıkarılır, lameller düşürülür.
- 16) Önceden 73 °C ye getirilen birinci yıkama solüsyonu içinde birkaç saniye çalkalanır ve 2 dk. süreyle bekletilir.
- 17) Lamlar oda ısısında karanlıkta kurumaya bırakılır.
- 18) DAPI tüpü vortekslenir, mikrosantrifüjde santrüfuj edilir (spin atılır) ve tekrar vortekslenir.
- 19) Karanlıkta 10 µl DAPI hedef alana konur ve büyük lamelle kapatılır.
- 20) Lamlar 30 dk. boyunca -20 °C'de bekletilir.

21) Preparatlar değerlendirilmeye hazırdır.

4.4.2.4. Çözeltilerin Hazırlanması:

20 x SSC (pH: 5.3):

132 gr. 20 x SSC 400 ml saf su ile karıştırılır. Son hacim 500 ml olacak şekilde saf su eklenir. pH: 5.3'e getirilir.

2 x SSC (pH: 7.0):

100 ml 20 x SSC (pH:5.3) 850 ml saf su ile karıştırılır. Son hacim 1 lt olacak şekilde saf su eklenir. pH: 7.0'e ayarlanır.

5. BULGULAR

Bu projede endometriyozis, normal endometriyum doku örnekleri ve periferik kan lenfositleri Floresans İn Situ Hibridizasyon (FISH) yöntemiyle değerlendirilmiştir. Çalışmamızda kromozom spesifik problemler kullanılarak 11 ve 18 numaralı kromozomlar sayısal yönden ve

lokus-spesifik DNA problemleri kullanılarak 17 numaralı kromozomda lokalize olan 17p13 gen lokusu (p53) yapısal açıdan incelenmiştir.

Çalışma grubunu oluşturan ileri evre (III- IV. Evre) endometriyozis hastalarından elde edilen endometriyozis dokusu (Çalışma grubu) ve aynı hastaların endometriyum dokuları (I. Kontrol grubu) ve periferik kan örnekleri (II. Kontrol Grubu) ile sağlıklı kadınlardan temin edilen endometriyum doku örnekleri (III. Kontrol Grubu) ve periferik kan örnekleri (IV. Kontrol Grubu) anöploidî açısından değerlendirilmiştir. İstatistiksel analizler, çalışma grubundaki endometriyozis doku örnekleri ve aynı hastaların endometriyum doku (I. Kontrol grubu) örnekleri kendi aralarında ve diğer kontrol gruplarıyla karşılaştırılarak, X^2 (ki-kare) testi uygulanarak yapılmıştır.

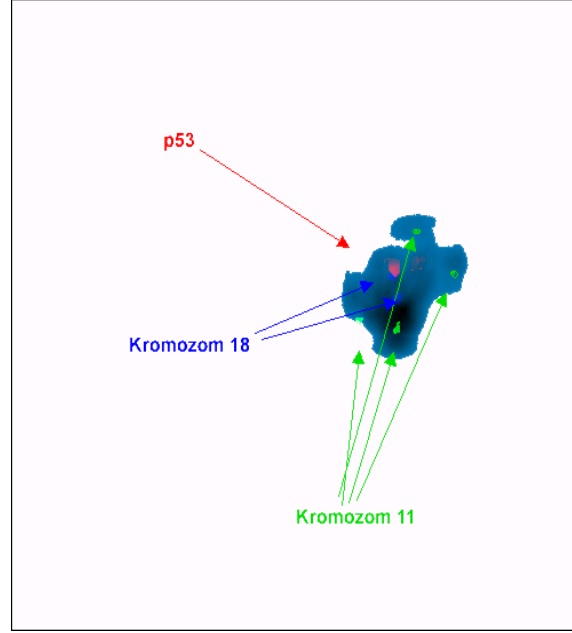
Prob karışımından elde edilen sinyallerin herbiri için ortalama 100-250 nükleus değerlendirilmiş, uygulama yapılan laboratuvarında Fish Problemlerinin hibridizasyon etkililiği % 99.8 olarak belirlenmiştir. Hücrelerin yanlış sinyaller verebileceği ihtimaline karşı, preparat üzerinde beklenmedik büyüklükte sinyaller tespit edildiğinde, hücre zarı dışında sinyaller gözlemlendiğinde değerlendirilmeye alınmamıştır. Sinyallerin değerlendirmesinde sinyallerin ölçüsü ve parlaklığı diğer homologundan az ise değerlendirmeye dahil edilmemiştir. Anöploidî gözlenen tüm nükleuslar fotoğraflanmış ve 3. bir gözlemci tarafından değerlendirilmiştir.

Çalışmada çalışma grubunda 11 numaralı kromozomda % 0.4 oranında monozomi, % 3.6 oranında trizomi ve % 96 oranında ise dizomi saptanmıştır. 18 numaralı kromozomda ise % 1.3 oranında monozomi, % 98.8 oranında dizomi saptanmış olup trizomiye rastlanmamıştır. 17 numaralı kromozomda lokalize olan 17p13 gen lokusunda ise % 16.4 oranında monozomi, % 2.1 oranında trizomi ve % 81.5 oranında dizomi saptanmıştır. Endometriyozis vak'alarında 11 ve 18 numaralı kromozom ile 17 numaralı lokalize olan 17p13 gen lokusu için yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda anlamlı bir farklılık olduğu saptanmıştır ($p < 0.0001$).

Çalışmamızda Çalışma grubu ve I. Kontrol grubu kendi aralarında ve Çalışma grubu diğer Kontrol gruplarıyla karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

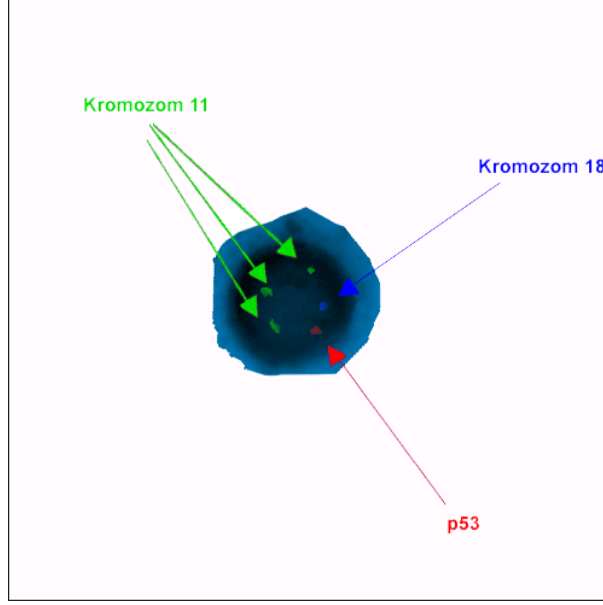
11 numaralı kromozom için çalışma grubu kapsamında değerlendirilen toplam 896 hücreye ilave olarak 1 (bir) hücrede tetrazomi tespit edilmiştir. Bu oran X^2 (ki-kare) testinde

değerlendirilmeye alınmamıştır. Poliploidi tespit edilen hücrenin görüntüsü Şekil 5.1’de sunulmaktadır.



Şekil 5.1. Çalışma grubumuzdan E2006/05 no.lu olguya ait endometriyozis dokusunun LSI p53 (17p13) / Cep 11 / Cep 18 Prob FISH analiz görüntüsü. Ok ile gösterilen p53 (17p13) bölgesinin homolog kromozomunda sinyal gözlenmemiştir (*Monozomi p53*). Cep 11 bölgesinde dört sinyal gözlenmiştir (*Tetrazomi 11*). (*LSI p53 30190008 (17p13) Spektrum Oranj, Cep 11 32-132011 Spektrum Yeşil, Cep 18 32-131018 Spektrum Akua*)

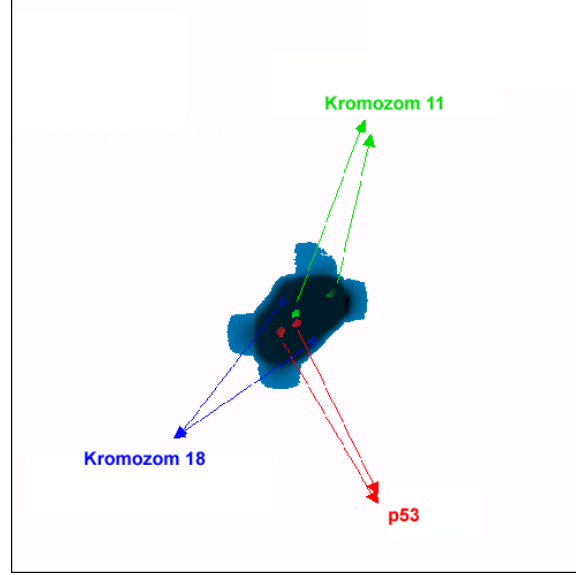
Çalışma grubu ile I. Kontrol grubu 11 numaralı kromozom için karşılaştırıldığında, çalışma grubunda % 0.4 oranında monozomi, % 3.6 oranında ise trizomi tespit edilmiştir (Çizelge 5.1). I. Kontrol grubunda ise % 1.3 oranında trizomi saptanmış ancak monozomiye rastlanmamıştır. I. Kontrol grubuna ait 11 numaralı kromozomun trizomisine ait görüntü Şekil 5.2’de gösterilmektedir. Çalışma ve I. Kontrol grubunda monozomi ve trizomi frekansları açısından anlamlı bir farklılık olduğu gözlenmiştir ($p < 0.0001$).



Şekil 5.2. Çalışma grubumuzdan E2006/01 no.lu olguya ait endometriyum dokusunun LSI p53 (17p13) / Cep 11 / Cep 18 Prob FISH analiz görüntüsü. Ok ile gösterilen p53 (17p13) bölgesinin homolog kromozomunda sinyal gözlenmemiştir (*Monozomi p53*). Cep 18 bölgesinde bir sinyal gözlenmiştir (*Monozomi 18*) Cep 11 bölgesinde üç sinyal gözlenmiştir (*Trizomi11*). (*LSI p53 30190008 (17p13) Spektrum Oranj, Cep 11 32-132011 Spektrum Yeşil, Cep 18 32-131018 Spektrum Akua*)

Çalışma grubu ile II. Kontrol grubu 11 numaralı kromozom için karşılaştırıldığında, çalışma grubunda % 0.4 oranında monozomi, % 3.6 oranında ise trizomi tespit edilmiştir. II. Kontrol grubunda ise monozomi ve trizomiye rastlanmamıştır. Çalışma ve II. Kontrol grubunda monozomi ve trizomi frekansları açısından anlamlı bir farklılığın ($p < 0.0001$) olduğu tespit edilmiştir.

Çalışma grubu ile III. Kontrol grubu 11 numaralı kromozom için karşılaştırıldığında, çalışma grubunda % 0.4 oranında monozomi, % 3.6 oranında ise trizomi tespit edilmiştir. III. Kontrol grubunda ise monozomi ve trizomiye rastlanmamıştır. Endometriyozis vak'alarında % 96 oranında, III. Kontrol grubunda ise %100 oranında dizomi tespit edilmiştir (Şekil 5.3). Çalışma ve III. Kontrol grubunda monozomi ve trizomi frekansları açısından anlamlı bir farklılığın olduğu gözlenmiştir ($p < 0.0001$).

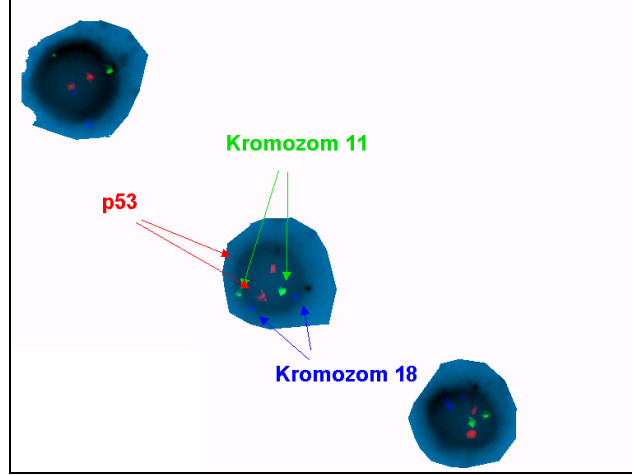


Şekil 5.3. Çalışma grubumuzdan E2006/01 no.lu olguya ait endometriyozis dokusunun LSI p53 (17p13) / Cep 11 / Cep 18 Prob FISH analiz görüntüsü. Ok ile gösterilen p53 (17p13), Cep 11 ve Cep 18 bölgelerinde iki sinyal gözlenmiştir (Dizomi). (LSI p53 30190008 (17p13) Spektrum Oranj, Cep 11 32-132011 Spektrum Yeşil, Cep 18 32-131018 Spektrum Akua)

Çalışma grubu ile IV. Kontrol grubu 11 numaralı için karşılaştırıldığında, çalışma grubunda % 0.4 oranında monozomi, % 3.6 oranında ise trizomi tespit edilmiştir. IV. Kontrol grubunda ise monozomi ve trizomiye rastlanmamıştır. Çalışma ve IV. Kontrol grubunda monozomi ve trizomi frekansları açısından anlamlı bir farklılığın olduğu gözlenmiştir ($p < 0.0001$).

I. Kontrol grubu ile II. Kontrol grubu kendi aralarında kıyaslandığında, I. Kontrol grubunda gözlenen % 1.3 oranındaki trizomi frekansının II. Kontrol grubuna göre (trizomi, % 0) yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.0001$). Benzer bir şekilde I. Kontrol grubu ile III. Kontrol grubu kıyaslandığında, I. Kontrol grubunda tespit edilen trizomi frekansı % 1.3 oranında olup, III. Kontrol grubu (trizomi, % 0)'ndan yüksek olarak belirlenmiştir ($p < 0.0001$). Benzer bir şekilde I. Kontrol grubu ile IV. Kontrol grubu kendi aralarında kıyaslandığında, I. Kontrol grubunda % 1.3 oranındaki trizomi tespit edilmiş ancak IV. Kontrol grubunda trizomi gözlenmemiştir. I. Kontrol grubunda % 98.7 oranında, II., III. ve IV. Kontrol gruplarında ise % 100 oranında dizomi saptanmıştır (Şekil 5.4). Bu durum, hasta bireylerden elde edilen

endometriyum dokusundaki somatik hücrelerde genetik bir değişimin olduğunu düşündürmektedir.



Şekil 5.4. I. Kontrol grubumuzdan E2006/02 no.lu olguya ait endometriyum dokusunun LSI p53 (17p13) / Cep 11 / Cep 18 Prob FISH analiz görüntüsü. Ok ile gösterilen p53 (17p13), Cep 11 ve Cep 18 bölgelerinde iki sinyal gözlenmiştir (Dizomi). (LSI p53 30190008 (17p13) Spektrum Oranj, Cep 11 32-132011 Spektrum Yeşil, Cep 18 32-131018 spektrum Akua)

Çizelge 5.1. 11 numaralı kromozom için çalışma ve kontrol gruplarının değerlendirme sonuçları

11. kromozom		HÜCRE SAYISI			TOPLAM
		Dizomi	Monozomi	Trizomi	
GRUP	Çalışma Grubu	860 % 96.0	4 % 0.4	32 % 3.6	896 %100.0

Kontrol I	1338 % 98.7	0 % 0	17 % 1.3	1355 % 100.0
Kontrol II	1519 % 100.0	0 % 0	0 % 0	1519 % 100.0
Kontrol III	859 % 100.0	0 % 0	0 % 0	859 % 100.0
Kontrol IV	1135 % 100.0	0 % 0	0 % 0	1135 % 100.0
TOPLAM	5711 % 99.1	4 % 0.1	49 % 0.9	5764 % 100.0

Çalışma Grubu: İleri evre (III-IV.Evre) Endometriyozis hastalarından elde edilen endometriyozis doku örnekleri

I. Kontrol : Hastalardan elde edilen Endometriyum doku örnekleri

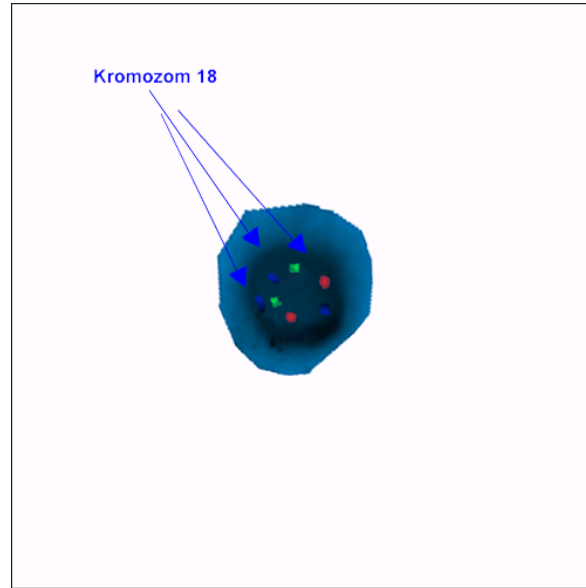
II. Kontrol : Hastalardan elde edilen Periferik Kan örnekleri

III. Kontrol : Sağlıklı kadınlardan temin edilen Endometriyum doku örnekleri

IV. Kontrol : Sağlıklı kadınlardan temin edilen Periferik Kan örnekleri

18 numaralı kromozom için çalışma grubu kapsamında değerlendirilen toplam 880 hücre değerlendirilmiştir (Çizelge 5.2). Çalışma grubu ile I. Kontrol grubu 18 numaralı kromozom açısından karşılaştırıldığında, çalışma grubunda % 1.3 oranında monozomi tespit edilmiş trizomiye rastlanmamıştır. I. Kontrol grubunda ise % 2.7 oranında monozomi, % 1.0 oranında ise trizomi tespit edilmiştir. I. Kontrol grubunda çalışma grubuna oranla yüksek bulunan monozomi ve trizomi frekansları hastadan alınan endometriyum dokusundaki somatik hücrelerdeki değişimleri işaret ettiği düşünülmektedir. Çalışma ve I. Kontrol grubunda monozomi ve trizomi frekansları açısından anlamlı bir farklılığın olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.0001$).

Çalışma grubu ile II. Kontrol grubu 18 numaralı kromozom için karşılaştırıldığında, çalışma grubunda % 1.3 oranında monozomi tespit edilmiş, trizomiye rastlanmamıştır. II. Kontrol grubunda ise monozomi ve trizomi frekansı sırasıyla % 0 ve % 0.9 olarak saptanmıştır. (Şekil 5.5) II. Kontrol grubunu oluşturan hasta bireylerden temin edilen Periferik Kan örneğinde gözlenen trizomi frekansının hasta gruba kıyasla yüksek olması hücre düzeyinde gözlenen, mekanizmadaki bir bozukluğu düşündürmektedir. Çalışma ve II. Kontrol grubunda monozomi ve trizomi frekansları açısından anlamlı bir farklılığın ($p<0.0001$) olduğu belirlenmiştir.

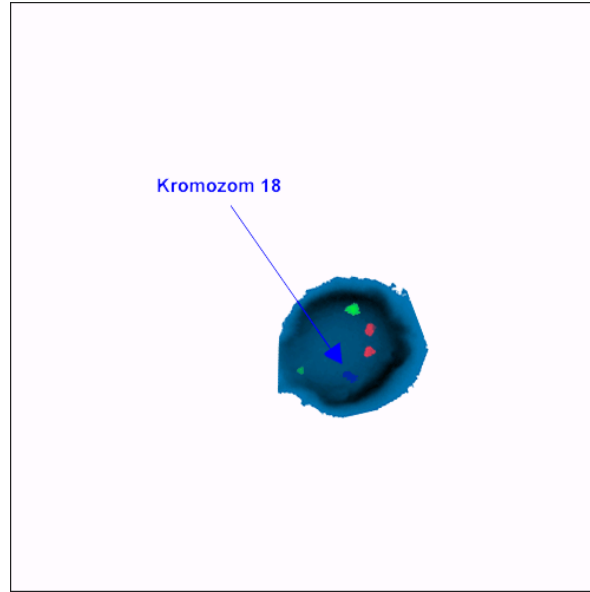


Şekil 5.5. II. Kontrol grubumuzdan E2006/04 no.lu olguya ait Periferik Kan örneğinin LSI p53 (17p13) / Cep 11 / Cep 18 Prob FISH analiz görüntüsü. Ok ile gösterilen Cep 18 bölgesinde üç sinyal gözlenmiştir (Trizomi18). (LSI p53 30190008 (17p13) Spektrum Oranj, Cep 11 32-132011 Spektrum Yeşil, Cep 18 32-131018 Spektrum Akua)

Çalışma grubu ile III. Kontrol grubu 18 numaralı kromozom için karşılaştırıldığında, çalışma grubunda % 1.3 oranında monozomi tespit edilmiştir. III. Kontrol grubunda ise monozomiye rastlanmamıştır. Çalışma ve III. Kontrol grubunda gözlenen monozomi frekansı açısından anlamlı bir farklılık olduğu belirlenmiştir ($p<0.0001$).

Çalışma grubu ile IV. Kontrol grubu 18 numaralı kromozom açısından karşılaştırıldığında, çalışma grubunda % 1.3 oranında monozomi tespit edilmiştir. III. Kontrol grubunda ise monozomiye rastlanmamıştır. Çalışma ve IV. Kontrol grubunda gözlenen monozomi frekansı için anlamlı bir farklılığın ($p<0.0001$) olduğu tespit edilmiştir.

I. Kontrol grubu ile II. Kontrol grubu 18 numaralı kromozom için kendi aralarında karşılaştırıldığında, I. Kontrol grubunda gözlenen % 2.7 oranındaki monozomi frekansı ve % 1.0 oranındaki trizomi frekansının II. Kontrol grubuna göre (monozomi, % 0; trizomi % 0.9) yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0.0001$) (Şekil. 5.6). I. Kontrol grubu ile III. Kontrol grubu kıyaslandığında ise, I. Kontrol grubunda tespit edilen trizomi frekansı % 1.0 oranında ve monozomi frekansı ise % 2.7 oranında olup, III. Kontrol grubu (monozomi ve trizomi, % 0)'ndan yüksek olarak tespit edilmiştir ($p<0.0001$). Benzer bir şekilde I. Kontrol grubu ile IV. Kontrol grubu kendi aralarında kıyaslandığında, I. Kontrol grubunda gözlenen % 1.0 oranındaki trizomi frekansı ve % 2.7 oranında gözlenen monozomi frekansı, IV. Kontrol grubunda gözlenen trizomi ve monozomi frekansından yüksek ($p<0.0001$) olarak tespit edilmiştir.



Şekil 5.6. I. Kontrol grubumuzdan E2006/05 no.lu olguya ait endometriyum dokusunun LSI p53 (17p13) / Cep 11 / Cep 18 Prob FISH analiz görüntüsü. Ok ile gösterilen Cep 18 bölgesinin homolog kromozomunda sinyal gözlenmemiştir (monozomi 18). (LSI p53 30190008 (17p13) Spektrum Oranj, Cep 11 32-132011 Spektrum Yeşil, Cep 18 32-131018 spektrum Akua)

Çizelge 5.2. 18 numaralı kromozom için çalışma ve kontrol gruplarının değerlendirme sonuçları

18. kromozom		HÜCRE			TOPLAM
		Dizomi	Monozomi	Trizomi	
GRUP	Çalışma Grubu	869 % 98.8	11 % 1.3	0 % 0	880 % 100.0
	Kontrol I	1289 % 96.3	36 % 2.7	14 % 1.0	1339 % 100.0
	Kontrol II	1507 % 99.1	0 % 0	13 % 0.9	1520 % 100.0
	Kontrol III	856 % 100.0	0 % 0	0 % 0	856 % 100.0
	Kontrol IV	1135 % 100.0	0 % 0	0 % 0	1135 % 100.0
TOPLAM		5656 % 98.7	47 % 0.8	27 % 0.5	5730 % 100.0

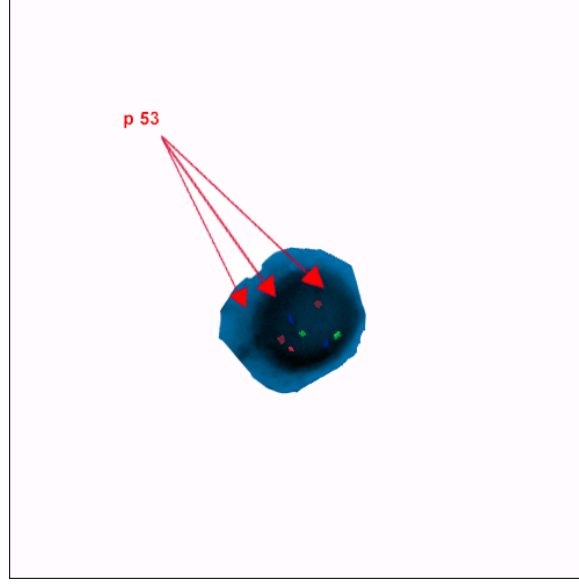
Çalışma Grubu: İleri evre (III-IV.Evre) Endometriyozis hastalarından elde edilen endometriyozis doku örnekleri

- I. Kontrol** : Hastalardan elde edilen Endometriyum doku örnekleri
II. Kontrol : Hastalardan elde edilen Periferik Kan örnekleri
III. Kontrol : Sağlıklı kadınlardan temin edilen Endometriyum doku örnekleri
IV. Kontrol : Sağlıklı kadınlardan temin edilen Periferik Kan örnekleri

17 numaralı kromozomda lokalize olan 17p13 (p53) lokusu için çalışma grubu kapsamında toplam 906 hücre değerlendirilmiştir. (Çizelge 5.3). Çalışma grubu ile I. Kontrol grubu 17 numaralı kromozomda lokalize olan 17p13 gen lokusu (p53) açısından karşılaştırıldığında, çalışma grubunda %16.4 oranında monozomi, %2.1 oranında ise trizomi tespit edilmiştir. I. Kontrol grubunda ise monozomi % 3.2 oranında tespit edilmiş, trizomi saptanmamıştır. Çalışma ve I. Kontrol grubunda monozomi ve trizomi frekansları için anlamlı bir farklılık olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.0001$). Çalışma grubunda % 81.5 oranında dizomi, I. Kontrol grubunda ise %96.8 oranında dizomi tespit edilmiştir.

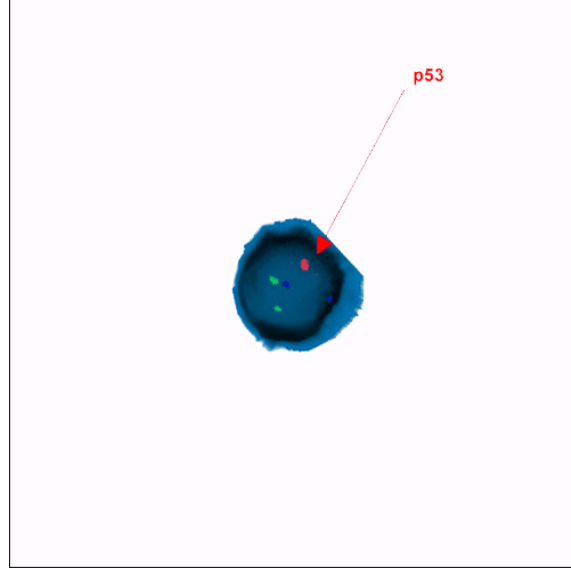
Çalışma grubu ile II. Kontrol grubu 17 numaralı kromozomda lokalize olan 17p13 gen lokusu (p53) açısından karşılaştırıldığında, çalışma grubunda % 16.4 oranında monozomi, % 2.1 oranında ise trizomi tespit edilmiş, II. Kontrol grubunda ise monozomi gözlenmezken trizomi % 0.3 oranında saptanmıştır. Çalışma ve II. Kontrol grubunda monozomi ve trizomi frekansları açısından anlamlı bir farklılığın ($p < 0.0001$) olduğu tespit edilmiştir. Çalışma ve kontrol gruplarında dizomi frekansı ise sırasıyla % 81.5 ve % 99.7 olarak belirlenmiştir.

Çalışma grubu ile III. Kontrol grubu 17 numaralı kromozomda lokalize olan 17p13 gen lokusu (p53) için karşılaştırıldığında, çalışma grubunda % 16.4 oranında monozomi, % 2.1 oranında ise trizomi tespit edilmiş, III. Kontrol grubunda ise monozomi ve trizomiye rastlanmamıştır (Şekil 5.7). Çalışma ve III. Kontrol grubunda monozomi ve trizomi frekansları açısından anlamlı bir farklılığın olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.0001$). Çalışma grubunda % 81.5 oranında dizomi, I. Kontrol grubunda ise % 100 oranında dizomi tespit edilmiştir.



Şekil 5.7. Çalışma grubumuzdan E2006/05 no.lu olguya ait endometriyozis dokusunun LSI p53 (17p13) / Cep 11 / Cep 18 Prob FISH analiz görüntüsü. Ok ile gösterilen p53 (17p13) bölgesinde üç sinyal gözlenmiştir (Trizomi p53). (LSI p53 30190008 (17p13) Spektrum Oranj, Cep 11 32-132011 Spektrum Yeşil, Cep 18 32-131018 Spektrum Akua)

Çalışma grubu ile IV. Kontrol grubu 17 numaralı kromozomda lokalize olan 17p13 gen lokusu (p53) için karşılaştırıldığında, çalışma grubunda % 16.4 oranında monozomi, % 2.1 oranında ise trizomi tespit edilmiş, IV. Kontrol grubunda ise monozomi ve trizomiye rastlanmamıştır (Şekil 5.8). Çalışma ve IV. Kontrol grubunda monozomi ve trizomi frekansları için anlamlı bir farklılık vardır ($p < 0.0001$). Çalışma grubunda % 81.5 oranında dizomi, IV. Kontrol grubunda ise % 100 oranında dizomi tespit edilmiştir.



Şekil 5.8. Çalışma grubumuzdan E2006/06 no.lu olguya ait endometriyozis dokusunun LSI p53 (17p13) / Cep 11 / Cep 18 Prob FISH analiz görüntüsü. Ok ile gösterilen p53 (17p13) bölgesinin homolog kromozomunda sinyal gözlenmemiştir (*Monozomi p53*). (*LSI p53 30190008 (17p13) Spektrum Oranj, Cep 11 32-132011 Spektrum Yeşil, Cep 18 32-131018 Spektrum Akua*)

I. Kontrol grubu ile II. Kontrol grubu kendi aralarında kıyaslandığında, I. Kontrol grubunda gözlenen %3.2 oranındaki monozomi frekansının II. Kontrol grubuna göre (monozomi, %0) yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.0001$). Benzer bir şekilde I. Kontrol grubu ile III. Kontrol grubu kendi aralarında kıyaslandığında, I. Kontrol grubunda tespit edilen monozomi frekansı % 3.2 oranında olup, III. Kontrol grubunda monozomiye rastlanmamıştır ($p < 0.0001$). Bu durum, hasta bireylerden elde edilen endometriyum dokusunun somatik hücrelerinde genetik bir değişimin olduğunu düşündürmektedir.

Çizelge 5.3. 17 numaralı kromozomda lokalize olan 17p13 gen lokusu (p53) için çalışma ve kontrol gruplarının değerlendirme sonuçları

17p13 (p53)		HÜCRE SAYISI			TOPLAM
		Dizomi	Monozomi	Trizomi	
GRUP	Çalışma Grubu	738 % 81.5	149 % 16.4	19 % 2.1	906 % 100.0
	Kontrol I	1288 % 96.8	42 % 3.2	0 % 0	1330 % 100.0
	Kontrol II	1515 % 99.7	0 % 0	4 % 0.3	1519 % 100.0
	Kontrol III	857 % 100.0	0 % 0	0 % 0	857 % 100.0
	Kontrol IV	1135 % 100.0	0 % 0	0 % 0	1135 % 100.0
TOPLAM		5533 % 96.3	191 % 3.3	23 % 0.4	5747 % 100.0

Çalışma Grubu: İleri evre (III-IV.Evre) Endometriyozis hastalarından elde edilen endometriyozis doku örnekleri

I. Kontrol : Hastalardan elde edilen Endometriyum doku örnekleri

II. Kontrol : Hastalardan elde edilen Periferik Kan örnekleri

III. Kontrol : Sağlıklı kadınlardan temin edilen Endometriyum doku örnekleri

IV. Kontrol : Sağlıklı kadınlardan temin edilen Periferik Kan örnekleri

Sonuç olarak çalışma ve kontrol gruplarında 11 ve 18 numaralı kromozomlar ile 17 numaralı kromozomda lokalize olan 17p13 gen lokusunda yapısal değişiklik varlığı tespit edilmiştir.

İleri evre endometriyozis vak'alarında 11 numaralı kromozomda % 3.6 oranında trizomi ve % 0.4 oranında monozomi; 18 numaralı kromozomda % 1.3 oranında monozomi; 17 numaralı kromozomda lokalize olan 17p13 gen lokusunda ise % 16.4 oranında monozomi ve % 2.1 oranında trizomi saptanmıştır. Bu bulgular kontrol grupları ile karşılaştırıldığında endometriyozis olgularında sayısal ve yapısal açıdan genetik değişiklerin varlığını göstermektedir.

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Uterus iç yüzeyini örten endometriyum dokusunun, uterus iç yüzeyi dışında bulunması olarak tanımlanan endometriyozis, kompleks bir jinekolojik hastalık olup menapoz öncesi üreme çağındaki kadınların %10-15'ini etkilemektedir (Shin vd 1997; Bischoff ve Simpson 2004). Günümüzde geniş ölçekli kohort çalışmaları bu hastalığın multifaktöriyel / poligenik olarak kalıtılan genetik bir hastalık olduğunu işaret etmektedir (Wenzl vd 2003). Poligenik kavramında birden fazla genin etken olduğu nitelikler anlaşılırken, multifaktöriyel kavramında ise hem genlerin hem de çevresel etkenlerin bir arada rol oynadığı ifade edilmektedir. Bu tür hastalıklarda klinik tablonun ortaya çıkabilmesi için birden çok değişkenin birarada bulunması söz konusu olmaktadır. Hastalığın oluşum ve/veya gelişim sürecinde etkili olan faktörler bir araya geldiklerinde bireyde bulgular ortaya çıkmaktadır. Çalışmamızda çevresel etmenlerin (Sigara içme, alkol kullanımı, egzersiz yapma, diyet uygulama, hijyen ve düzenli sağlık kontrolü alışkanlığı) etkisi hastalarımız için hazırlanan ayrıntılı bilgi formlarından elde ettiğimiz veriler bizi çalışmanın detaylandırılması gerektiği konusunda yönlendirmektedir.

Endometriyozisli hastaların % 30-40 oranında infertil olduğu, infertil olan kadınların ise % 6-15 oranında endometriyozis tanısı aldığı bildirilmektedir (Muse vd 1982). Diğer taraftan endometriyozis olgusunda familiyal geçişin olduğu bildirilmekte olup, birinci dereceden akrabalarında endometriyozis saptanmış bir kadın için hastalığın ortaya çıkma oranının % 5 ile % 8 arasında olduğu ifade edilmektedir (Frey ve Bluefield 1957; Ranney 1971; Simpson vd 1980; Lamb vd 1986; Coxhead ve Thomas 1993; Bischoff ve Simpson 2000; Cramer vd 2002; Simpson ve Bischoff, 2002; Simpson vd 2003; Simpson ve Elias 2003; Simpson vd 2003). Bizim araştırmamızda da hasta bilgi formlarından saptadığımız verilerde 6 (altı) endometriyozis tanısı almış hastalarımızdan 4 proband (% 66.6) (hastalığın ilk tespit edildiği kişi) ile daha önce operasyon geçirmiş 2 (% 33.3) vak'amızın dördünde infertilite varlığı tespit edilmiştir. Endometriyozis vak'asının Türk toplumundaki epidemiyolojisinde anlamlı verilere ulaşılması için hasta sayısının arttırılmasının uygun olacağı düşünülmektedir.

Shin ve arkadaşları (1997) tarafından, ileri evre endometriyozis tanısı alan 4 olguda (E1-E4) alfa satellit sekans spesifik DNA problemleri kullanılarak FISH analizi gerçekleştirilmiştir.

Çalışmaya kontrol grubunu oluşturan 2 endometriyum dokusu (NE1-NE2) ile kültür edilmemiş 2 periferik kan örneği de (P.K 1-PK 2) eklenmiştir. Çalışmada 7, 8, 11, 12, 16, 17 ve 18 numaralı kromozomlara iki-üç renkli FISH uygulayarak kromozomları sayısal açıdan değerlendirilmişlerdir. Monozomik, dizomik ve trizomik hücreleri endometriyozis, endometriyum ve periferik kan lenfositlerinde saptamışlardır. 12 (yeşil), 17 (sarı) ve 18 (kırmızı) numaralı kromozomlara üç renkli, 11 (kırmızı) ve 16 (yeşil) numaralı kromozomlara iki renkli, 7 (yeşil) ve 8 (kırmızı) numaralı kromozomlara da iki renkli prob kombinasyonları oluşturmuşlardır. Çalışma sonucunda; 4 endometriyozis doku örneğinin bir tanesinde (E2) 11. kromozom için trizomi frekansını %14.8 oranında ($X^2=96.2$, $p<0,0001$) saptamışlardır. Kontrol grubunu oluşturan normal endometriyum doku örneklerinin anöploidi oranına bakıldığında; monozominin % 3.4 oranında (% 2.2-5.8 aralığında), trizominin ise % 1.2 oranında (%0-1.9 aralığında) olduğu tespit edilmiştir. Bizim çalışma grubumuzda 11 numaralı kromozomun trizomi frekansı %3.6 olarak bulunmuştur. I. Kontrol grubumuzu oluşturan normal endometriyum doku örneklerinin anöploidi frekansına bakıldığında monozominin % 3.2 oranında, trizominin ise gözlenmediği belirlenmiştir.

Gogusev ve arkadaşları (2000) tarafından, Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon (KGH), FISH ve konvansiyonel karyotipleme metodlarını kullanarak 1, 2, 3, 5, 6p, 7, 16, 17q, 20, 21q ve 22q numaralı kromozom ve kromozom bölgelerinde kromozomal bir artışın olduğunu bununla birlikte 6q, 9, 11p, 12, 13q, 18 ve X cinsiyet kromozomlarında ise kromozom kaybının olduğunu saptamışlardır. Endometriyozis dokusundan ekstrakte edilen DNA kullanılarak yapılan KGH çalışmasında 17 numaralı kromozomun q kolunda bir artış tespit edilmiştir. Bizim çalışma grubu vak'alarımızın endometriyozis dokusunda gözlediğimiz 18 numaralı kromozomun monozomisi % 1.3 oranında ve 11 numaralı kromozomun monozomisi % 0.4 oranında tespit edilmiştir.

Gogusev ve arkadaşları (1999) tarafından, 18 endometriyozis dokusuna KGH çalışması uygulamışlardır. Bu çalışmada kromozom artışları ve kayıplarını araştırmışlardır. 18 endometriyozis dokusunun 3 tanesinden DNA amplifiye edilemediğinden çalışmaya dahil etmemişlerdir. 15 vak'ada yaygın olarak kromozom kayıplarının olduğunu belirlemişlerdir. 5p (% 33), 6q (% 27), 7p (% 22), 9p (% 22), 16 (% 22) numaralı kromozomların kaybı ile vak'aların birinde 17q'da kromozom kaybı tespit etmişlerdir. Üç vaka'da ise 6q, 7q ve 17q bölgelerinde bir artışın olduğunu tespit etmişlerdir. KGH bulgularına ilave olarak sentromerik

problar kullanılarak 1p36, 7p22.1, 22q12 kromozom lokuslarına FISH uygulaması yapılmıştır. Nükleusların % 30'undan daha az bir kısmında 2 sinyal gözlemlenmiştir. Kontrol grubunda ise % 85'den daha fazla iki sinyal gözlemlenmiştir. Bizim çalışmamızda endometriyozis dokularının 4 tanesinde 17 p13 (p53) monozominin % 16.4 oranında gözlemlendiği ve trizominin de % 2.1 oranında varlığı tespit edilmiştir.

Son zamanlarda yapılan endometriyozisin genetik mekanizmasını açıklamaya yönelik çalışmalarda somatik hücrelerdeki proto onkogenlerin aktivasyonu (örn, k-ras) ve tümör supresör genlerin kaybı (p53) endometriyozisin oluşumuna neden olan faktörleri oluşturduğuna ilişkin yaygın olarak kabul gören hipotezler mevcuttur.

Kosugi ve arkadaşları (1999) tarafından, yapılan çalışmada sentromer spesifik ve lokus spesifik prob kullanarak 17 numaralı kromozom ve 17p13 gen lokusunu p53 yönünden değerlendirmişlerdir. Çalışmada ileri evre (III-IV. Evre) endometriyozisli 8 doku örneğini ve arşivdeki endometriyum doku örneklerini incelemişlerdir. Endometriyozis dokularında % 65 oranında anöploidi ve kontrol grubunu oluşturan normal endometriyum dokularında ise % 25 oranında anöploidi tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise endometriyozis dokularında gözlenen anöploidi oranı % 18.5 olup bu oran kontrol grubunda % 3.2 olarak tespit edilmiştir.

Bishoff ve arkadaşları (2002) tarafından, ileri evre endometriyozis olgusunda somatik DNA değişimlerinin rolünü değerlendirmişlerdir. Çalışma kapsamında arşivde bulunan ileri evre (III-IV. Evre) ye ait 6 endometriyozis dokusu ile 8 taze endometriyozis dokusunda 17. kromozomun monozomisi ile p53 (17p13.1) delesyonunu FISH yöntemini kullanarak incelemişlerdir. Toplam 14 endometriyozis dokusunun bazı hücrelerinde 17 numaralı kromozomun sentromer kaybını (monozomisi) ve p53 delesyonunu saptamışlardır. Toplam 14 örneğin 12'sinde (hücrelerin % 8 ile 42 oranında) 17 numaralı kromozomun monozomisini ve bu bulguya ilave olarak p53 lokusunun kaybını da saptamışlardır. Diğer iki doku örneğinde sadece p53 kaybı hücrelerin % 8 ile 14 oranında belirtmişlerdir. 17 numaralı kromozomdaki 17p13 gen lokusu (p53) delesyon oranını %3.4 olarak tespit etmişlerdir. Periferik kan örneğinde ise p53 kaybının % 0-3 arasında olduğunu saptamışlardır. Bizim çalışmamızda çalışma grubumuzu oluşturan 6 (altı) vaka'nın 4 (dört) tanesinin bazı hücrelerinde 17 numaralı kromozomda lokalize olan 17p13 (p53) lokusunda % 16.4 oranında monozomi tespit edilmiştir. II. Kontrol grubumuzu oluşturan endometriyozisli hastalara ait periferik kan

örneklerinde ise monozomiye rastlanmamış, bu bulguya ilave olarak % 0-1 arasında ise trizomi tespit edilmiştir.

Son dönemlerde yapılan araştırmalarda ileri evre endometriyozis olgusunda tespit edilen kromozoma spesifik anöploidilerin insidansı hızla bölünen hücrelerdeki anöploidi frekansı ile kıyaslanmaktadır. Bizim sonucumuzda da kromozom sayısal anomaliler belki de endometriyozisin gelişimine/oluşumuna neden olmaktadır. Bu bulgular karsinogenezisin modeline göre; tek bir hücrede mutasyon meydana geldiğinde ve/veya genetik bir değişim geçirdiğinde o hücreye komşu diğer hücre kolonileri de etkilenmektedir, hipotezini desteklemektedir. 2. bir mutasyon/genetik değişim kolonilerin birinde meydana geldiğinde, ilave olarak yeni değişime uğramış hücreler meydana gelmektedir. Bu mutasyon döngüsü süresince malignant tümör popülasyonu artmaktadır. Benzer bir biçimde orta ve şiddetli endometriyozis evrelerinin gelişiminde somatik hücrelerde meydana gelen değişiklikler onkogenlerin aktivasyonları ve tümör süpresör genlerin (TSG) aktivasyonlarını içermektedir. Bizim bulgularımızda da endometriyozisin oluşumunda kromozom spesifik sayısal anomalilerin meydana gelmesiyle anöploidi gözlenen kromozom hücrelerin klonal bir biçimde yayılması desteklenmektedir. Birçok onkogen ve tümör süpresör gen (TSG) 11, 16 ve 17 numaralı kromozomlar üzerinde haritalanmaktadır ve bu kromozomlarda meydana gelen kromozom kaybı veya artışı endometriyozisin oluşumu /gelişimini desteklemektedir.

Sonuç olarak, çalışmamızda ileri evre (III-IV. Evre) endometriyozis tanısı almış hastalar ile kontrol grupları karşılaştırıldığında, çalışma grubunda sayısal ve yapısal değişiklikler olduğu tespit edilmiştir.

Türkiye'de endometriyozisin genetik mekanizması üzerine yapılan ilk çalışmalardan biri olması sebebiyle, elde edilen bulgular gözönüne alınarak, mevcut hasta sayısı arttırılarak farklı moleküler tekniklerle çalışmanın devam ettirilmesinin hastalığın patogenezinin açıklanmasında yararlı olacağı düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

- American Society for Reproductive Medicine . 1997.** Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis. *Fertil Steril*.67:817-21.
- Artan, S. 1996.** Rutin FISH uygulamaları, Teorik ve Pratik İn Situ Hibridizasyon. Ed. Başaran, N. ETAM, Eskişehir, s.57-9.
- Bergqvist, A., Borg, A., Ljungberg, O., 1991.** Proto-oncogenes in endometriotic and endometrial tissue. *Ann. New York Acad. Sci*, 626, 276-283.
- Beliard, A., Donnez, J., Nisolle, M., Foidart, J.M. 1997.** Localization of laminin, fibronectin, E-cadherin and integrins in endometrium and endometriosis. *Fertility and Sterility*,67;266-272.
- Bischoff, F.Z. and Simpson, J.L. 2000.** Heritability and molecular genetic studies of endometriosis. *Human Reproduction Update*, 6, 37-44.
- Bischoff, F.Z., Heard, M., Simpson, J.L., 2002.**Somatic DNA alterations in endometriosis: high frequency of chromosome 17 and p53 loss in late-stage endometriosis. *J Reproductive Immunology*, 55; 49-64.
- Bischoff, F.Z. and Simpson, J.L. 2004.** Genetics of endometriosis: heritability and candidate genes. *Best Practise & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 219-232.
- Bouquet D.J., Validire P., Canis M., Doussau M., Levardon M., Gogusev J. 1997.** Human Endometriosis derived permanent cell line (FbEM-1): establishment and characterization. *Hum Reprod Update*3;117-23.
- Burns, W.N. and Schenken , R.S. 1989.** Pathophysiology. In Schenken, R.S. (ed.) *Endometriosis: Contemporary Concepts in Clinical Management*, pp.83-126 (Philadelphia:J.B. Lippincott Company).
- Candiani, G.B., Danesino, V., Gastaldi, A., Parazzini, F. And Ferraroni, M.1991.** Reproductive and menstrual factors and risk of peritoneal and ovarian endometriosis. *Fertil. Steril.* 56, 230-34.
- Campbell, I.G., Thomas, E.J. 2001.** Endometriosis:candidate genes. *Hum.Reprod.,Update* 7,15-20.
- Chang, C.C, Hsieh, Y.Y., Tsai, C.H, Tsai, H.D, Lin, C.C. 2002.** The proline form of p53 codon 72 polymorphism is associated with endometriosis. *Fertil Steril*, 77:43-5.
- Cramer, D.W. and Missmer, S.A. 2002.** The epidemiology of endometriosis. *Ann N Y Acad Sci*, Mar, 955: 11-22.
- Coxhead, D. and Thomas, E.J. 1993.** Familial inheritance of endometriosis in a British population. A case control study. *J. Obstet Gynecol Neonatal Nurs*, 13; 42-44.
- Chatman, D.L. and Ward, A.B. 1982.** Endometriosis in adolescent *J.Reprod. Med.*,27, 156-60.

- Cramer, D.W., Wilson, E., Stillman, R.J., Berger, M.J., Belisle, S., Schiff, I., Albrecht, B., Gibson, M., Stadel, B.V. and Scoenbaum, S.C. 1987.** The relation of endometriosis to menstrual characteristics, smoking and exercise. *J. Am. Med. Assoc.*, 255, 1904-8.
- Dangel, A., Medchill, M.T., Davis, G., Meloni, A.M., Sandberg, A.A., 1994.** Cytogenetic studies in endometriosis tissue. *Cancer Genet Cytogenet*, 78;172-4.
- Darai, E., Leblanc, M., Walker-Combrouze, F. 1998.** Expression of cadherins and CD44 isoforms in ovarian endometrial cysts. *Human Reproduction*, 13;1346-1352.
- D'Hooghe, T.M., Bambra, C.S., Raeymaekers B.M. 1995.** Intrapelvic injection of menstrual endometrium causes endometriosis in baboons (*Papio cynocephalus* and *Papio anubis*). *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 173;125-134.
- Dmowski, W.P., Diang, J., Shen, J. 2001.** Apoptosis in endometrial glandular and stromal cells in women with and without endometriosis. *Human Reproduction*, 16; 1802-1808.
- Fearon E.R, and Vogelstein B. 1990.** A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61: 759-764.
- Flores, I., Abreu, S, Fumero, F., DeJesus, Y, Rios-Bedoya, C.F. 2002.** Prevalence of endometriosis in Puerto Rico. *Fertil Steril*, 77;S31.
- Frey, G.H. and Bluefield, W.V. 1957.** The familial occurrence of endometriosis. *Am J. Obstet Gynecol*, 73: 418-422.
- Frixen, U.H., Behrens, J., Sachs. 1991.** M.E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *Journal of Cell Biology*, 113; 173-185.
- Goumenou, A., Panayiotides, I., Matalliotakis, I. 2001.** *European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology*, 99;256-260.
- Gogusev, J., Bouquet de Jolier, L., Telvi, M., Doussau, S., du Manoir, A., Stojkoski and M. Levardon. 2000.** Genetic abnormalities detected by comparative genomic hybridization in a human endometriosis-derived cell line, *Molecular Human Reproduction*, Vol.6, No.9, 821-827, Sep 2000.
- Gogusev, J., Bouquet de Jolier, L., Telvi, M., Doussau, S., Stojkoski, A., and Levardon. M. 2000.** Cellular and genetic constitution of human endometriosis tissues. *J. Soc. Gynecol Investigation*, Mar-Apr;7(2):79-87.
- Gogusev, J., Bouquet de Jolier, L., Telvi, M., Doussau, S., Stojkoski, A., and Levardon, M. 1999.** Detection of DNA copy number changes in human endometriosis by comparative genomic hybridization. *Human Genet*, 105: 444-451.
- Gogusev J.J., Bouquet De Jolier, L., Doussau, M. 1998.** Detection of genetic abnormalities in human endometriosis by comparative genomic hybridization. Presented at the American Society for Reproductive Medicine, Toronto, Canada.
- Gaetje, R., Kotzian, S., Hermann, G. 1997.** Nonmalignant epithelial cells, potentially invasive in human endometriosis, lack the tumor suppressor molecule E-cadherin. *American*

- Journal of Pathology,150;461-467.
- Gebel, H.M., Braun, D.P., Tambur, A.1998.** Spontaneous apoptosis of endometrial tissue is impaired in women with endometriosis. *Fertility and Sterility*,69;1042-1047.
- Guzick, D.S., Silliman, N.P., Adamson, G.D. 1997** Prediction of pregnancy in infertile women based on the American Society for Reproductive Medicine's revised classification of endometriosis. *Fertil Steril*, 67:822-9.
- Goldstein, D.P., deCholnoky, C.,Emans, S.J. and Leventhal, J.M. 1980.** Laparoscopy in the diagnosis and management of pelvic pain in adolescents. *J. Reprod., Med.*, 24, 251-6
- Goodall, J.R. 1943.** Endometriosis (Philadelphia: J.B. Lippincott Company)
- Hasson, H.M. 1976.** Incidence of endometriosis in diagnostic laparoscopy. *J.Reprod. Med.*, 16,135-8.
- Hadfield, R.M., Mardon, H.J., Barlow, D.H. 1997.** Endometriosis in monozygotic twins. *Fertil.Steril.* 68,941-942.
- Halme, J., Hammond, M.G., Hulka, J.F. 1984.** Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstetrics and Gynecology*, 64;151-154.
- Haupt, B.J., 1982.**Utilization of short-stay hospitals: annual summary for the United States. *Vital Health Stat*, 13:1-60.
- Hinson, J.M., Brigham, K.L., Daniell, J. 1981.** Catamenial pneumothorax in sisters. *Chest*,80:634-5.
- Heaps, J.M., Nieberg RK., Berek JS. 1990.** Malignant neoplasm arising in endometriosis. *J. Obstet Gynecol*, 75:1023-1028.
- Housten, D.E., Noller, K.L., Melton, L.J. 3rd, et al. 1987.** Incidence of pelvic endometriosis in Rochester, Minnesota, 1970-1979. *Am J Epidemiol*,125:959-69
- Hull, A. Gibson, Hart. 2002.** The heritability of endometriosis in large Utah families. *Fertility and Sterility* 77, S21.
- Ishii, K., Takakuwa, K. Mitsui, T. Tanaka, K. 2002.** Studies on the human leukocyte antigen-DR in patients with endometriosis:genotyping of HLA-DRB1 alleles. *Hum.Reprod*, 17:560-3.
- Jiang X., Hitchcock A., Bryan E. 1996.** Microsatellite analysis of endometriosis reveals loss of heterozygosity at candidate ovarian tumor suppressor gene loci. *Cancer Res* , 3534-3537.
- Jimbo H., Hitomi Y., Yoshikawa H. 1997.** Evidence for monoclonal expansion of epithelial cells in ovarian endometrial cysts. *Am. J. Pathol* , 150, 1173-1178.
- Jiang, X., Morland, S.J., Hitchcock, A. 1998.** Allelotyping of endometriosis with adjacent ovarian carcinoma reveals evidence of a common lineage. *Cancer Res.*, 58, 1707-1711.
- Jones, R.K., Searle, R.F., Bulmer, J,N. 1998.** Apoptosis and bcl-2 expression in normal human endometrium, endometriosis and adenomyosis. *Human Reproduction*,13; 3496-3502.
- Knudson, A.G. 2002.** Cancer genetics. *Am J. Med Genet.*, 111:96-102.

- Kennedy S., Mardon H., Barlow D. 1995.** Familial endometriosis. *J. Assist Reprod Genet.* 12: 32-34.
- Kosugi, Y., Elias S., Malinak, L.R., Nagata, J., Isaka, K., Takayama, M., Simpson, J.L., Mhaweck, P., Kinkel K., Vlastos, G., Pelte, MF. 2002.** Ovarian carcinomas in endometriosis: an immunohistochemical and comparative genomic hybridization study. *Int. J. Gynecol Pathol.*, Oct;21 (4):401-6.
- Kosugi, Y., Elias, S., Malinak, L.R., Nagata, J., Isaka, K., Takayama, M., 1999.** Increased heterogeneity of chromosome 17 aneuploidy in endometriosis. *Am J Obstet Gynecol*, 180;792-7.
- Keettel, W.C. ve Stein, R.J. 1951.** The viability of the cast-off menstrual endometrium. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 61; 440-442.
- Kirshon B., and Poindexter III AN. 1988.** Contraception: a risk factor for endometriosis. *Obstetrics and Gynecology*, 829-831.
- Lamb, K., Hoffman, R.G, Nichols, T.R. 1986.** Family trait analysis: a case control study of 43 women with endometriosis and their best friends. *Am J.Obstet Gynecol*, 154:596-601.
- Moen, M.H.,1994.** Endometriosis in monozygotic twins. *ActaObstet.Gynecol.Scand.* 73,59-62.
- Mendelin, J., Grayson, M., Wallis, T., Visscher, DW. 1999.** Analysis of chromosome aneuploidy in breast carcinoma progression by using fluorescence in situ hybridization. *Lab. Invest*, April; 79(4): 387-93.
- Moen, M., Bratlie, A., Moen, T. 1984.** Distribution of HLA-antigens among patients with endometriosis. *Acta Obstet. Gynecol, Suppl.* 123, 25-27.
- Maxwell, C., Kilpatrick, D.C., Haining, R. 1989.** No HLA-DR specificity is associated with Endometriosis. *Tissue Antigens*, 34, 145-147.
- Mostoufizadeh, M., Scully, R.E. 1980.** Malignant tumor arising in endometriosis. *Clin. Obste.Gynecol.*, 23, 951-963.
- Muse, K.N and Wilson, E.A. 1982.** How does mild endometriosis cause infertility? *Fertil Steril*, Aug; 38(2): 145-52.
- McMeekin, C., Burger ,R., Manetta, A. 1995.** Endometrioid adenocarcinoma of the ovary and its relationship to endometriosis. *Gynecol Oncol.*, 59, 81-85.
- Meresman, G.F., Vighi, S., Buquet, R.A.** Apoptosis and expression of Bcl-2 and Bax in eutopic endometrium from women with endometriosis. *Fertility and Sterility*, 2000. 4;760-766.
- Malinak, L.R. Buttram, V.C., Elias Jr.,S. et al., 1980.** Heritage aspects of endometriosis. II. Clinical characteristics of familial endometriosis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 137 pp.332-337.
- Moen, M.H., and Magnus, P. 1993,** The familial risk of endometriosis. *Acta Obstetrica et Gynecologica scandinavica*, 72 8, pp 560-564.

- Miyazawa, K. 1976.** Incidence of endometriosis among Japanese women. *Obstet. Gynecol*, 4,407-9.
- Makhlouf Obermeyer, C., Armenian, H.K. and Azoury, R.1986.** Endometriosis in Lebanon: a case-control study. *Am.J.Epidemiol.*, 124,762-7.
- Moen, MH. 1987.** Endometriosis in women at interval sterilization,1987. *ActaObstetrica et Gynecologica Scandinavica*,66:451-454.
- Moen, M.H. 1991.** Is a long period withpit childbirth a risk factor for developing endometriosis? *Human Reproduction*, 6:1404-1407.
- Nibert, M., Pejovic T., Mandahl N. 1995.** Monoclonal origin of endometriotic cysts. *Int. J. Gynecol. Cancer*, 5, 61-63.
- Obata, K. and Hoshiai, H. 2000.** Common genetic changes between endometriosis and ovarian cancer. *Gynecol Obstet Invst.*, 50 Supp 1:39-43.
- Obata, K. Morland, S.J., Watson, R.H., Hitchcock, A., Chenevix-Trench, G., Thomas, E.J. 1998.** Frequent PTEN/MMAC mutations in endometrioid but not serous or mucinous epithelial ovarian tumors. *Cancer Res.*58:2095-7.
- Olive, D. ve Henderson, D.Y. 1987.** Endometriosis and mullerian anomalies. *Obstetrics and Gynecology*,69; 783-790.
- Omland, A.K., Tanbo, T., Dale, P.O. 1998.** Artificial insemination by husband in unexplained infertility compared with infertility associated with peritoneal endometriosis. *Hum Reprod*, 13:2602-5.
- Parazzini F., Ferraroni M., Bocciolone L.1994.** Contaseptive methods and risk of pelvic endometriosis, *Contraseption*, 49:423-426.
- Paparazzini, F., La Vecchia, C., Franceschi, S., Negri, E. and Cecchetti, G. 1989.** Risk factors for endometrioid, mucionus and serous benign ovarian cysts. *Int.J.Epidemiol.*, 18, 108-12.
- Royal College of General Practitioners. 1974.** Oral Contraceptives and health: an interim report from the oral contraseptive study of the Royal College of General Practitioners, London: Pitman Medical.
- Reis, R.M, Moura, M.D., Nogueira, A.A., Ribeiro, J.U, Ramos E.S. 1999.** Familial risk among patients with endometriosis. *J. Assist Reprod Genet.* 16:500-3.
- Ranney, B. 1971.** Endometriosis. IV. Hereditary tendency. *Obstet Gynecol*, 37: 734-737.
- Ridley, J.H. and Edwards, I.K.1958.** Experimental endometriosis in the human. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*,76; 783-790.
- Ranney, B. 1971.** Endometriosis IV. Hereditary tendency. *Obstet. Gynecol.*, 37, 734-7.
- Sensky, T.E. ve Liu, D.T.Y., 1980.** endometriosis: associations with menorrhagia, infertility and oral contraceptives. *Int. J. Gynaecol Obstet.*, 17, 573-576.
- Simpson, J.L. and Bischoff, F.Z. 2002.** Heritability and molecular genetic studies of

- endometriosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 955, pp.239-251.
- Simpson, J.L., Bischoff, F.Z., Kamat, A. 2003.** Genetics of endometriosis. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*, 1, 21-40.
- Simpson, J.L. and Elias, S. 2003.** Genetics in Obstetrics and Gynecology, (third edit.); WB Saunders, Philadelphia, PA,
- Simpson, J.L., Bischoff, F.Z., Kamat A., Buster J.E., Carson S.A. 2003.** Genetics of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am.*, Mar; 30 (1): 21-40.
- Simpson, J.L., Elias, S., Malinak, L.R., Buttram, V.C. 1980.** Heritable aspects of endometriosis. I. Genetic Studies. *Am J. Obstet Gynecol*, 137: 327-331.
- Simpson, J.L., Malinak, L.R., Elias, S. 1984.** HLA association in endometriosis I. Genetic studies. *Am J. Obstet. Gynecol*, 148, 395-397.
- Simpson, J.L. 2001.** Genetic factors in common disorders of female infertility. *Reprod Med Rev*;8:173-202.
- Schenken, R.,S., Johnson, J.V, Riehl, R. N. 1991.** C-myc proto-oncogene polypeptide expression in Endometriosis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* , 164, 1031-1037.
- Shin, J.C., Ross, H.L.,Elias, S.,Nguyen, D.D.,Mitchell-Leef, D.,Simpson, J.L.1997.**Detection of chromosomal aneuploidy in endometriosis by multicolor florescence in situ hybridization (FISH) *Hum. Genet*,100 (3-4);401-6.
- Sanfilippo, J.S., Wakim, N.G.,Schkler, K.N. ve Yussman, M.A.1986.** Endometriosis in association with uterine anomaly. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*,154;39-43.
- Starzinski-Powitz, A., Handrow-Metzmacher, H. ve Kotzian, S. 1999.** The putative role of cell adhesion molecules in endometriosis: can we learn from tumour metastasis? *Molecular medicine Today*, 5;304-309.
- Strathy, J.H., Molgaard, C.A., Coulam, C.B., 1982,** Endometriosis and infertility: a laparoscopic study of endometriosis among fertile and infertile women., *Fertil Steril*, 38:667-75.
- Sampson, J.A.,1924.** Benign and maligant endometrial implants in the peritoneal cavity and their relation to certain ovarian tumours. *Surg Gynecol Obstet*, 38:287-311.
- Stefansson, H., Geirsson, R.T., Steinhorsdottir et al.V. 2002.** Genetic factors contribute to the risk of developing endometriosis. *Human Reproduction* 17 , pp.555-559.
- Sangi-Haghepykar, H & Poindexter III A.1995.** Epidemiology of endometriosis among paraus women. *Obstetrics and Gynecology*, 85:983- 992.
- Treloar, S.,Martin, N., Health, A., 1998.** Longitudinal genetic analysis of menstrual flow, pain and limitation in a sample of Australian twins, *Behav. Genet.* 28,107-116.
- Treloar, S.A., Do, K.A, Martin, N.G. 1998.** Genetic influences on the age at menopause. *Lancet*, 352:1084-5.
- Tamura, M., Fukaya, T. Murakami, T., Uehara, S., Yajima, A. 1998.** Analysis of clonality in human endometriotic cysts based on evaluation of X chromosome

- inactivation in archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Lab Invest*, 78:213-8.
- Teorik ve Pratik Floresans İn Situ Hibridizasyon. 1996.** Ed. Başaran,N., ETAM, Eskişehir, s:34-39.
- TeLinde, R.W. ve Scott, R.B. 1950.** Experimental endometriosis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 60;1147-1173.
- Takeich, M. 1993.** Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Current Opinion in Cell Biology*, 5;806-811.
- Vercellini, P., Parazzini, F., Bolis, G. 1993 .** Endometriosis and ovarian cancer. *Am. J. Obstet Gynecol*, 169, 181-184
- Vercellini, P., Fedele, L., Arkaini, L., Bianchi, S., Rogmoni, M.T. and Candiani, G.B.1989.** Laparoscopy in the diagnosis of chronic pelvic pain in adolescent women.” *J.Reprod. Med.*, 34,827-30
- Vessey MP., Villard-Mackintosh L & Painter R.1993.** Epidemiology of endometriosis in women attending family planning clinics. *BMJ*,306:182-184.
- Witz, C.A., 1999.** Current concepts in the pathogenesis of endometriosis. *Clinical Obstetrics and Gynecology*,24; 566-585.
- Watanabe, H., Kanzaki, H., Narakuwa, S.1997.** Bcl-2 and Fas expression in eutopic and ectopic human endometrium during the menstrual cycle in relation to endometrial cell apoptosis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*,176;360-368.
- Walnut Creek Contraseptive Drug Study.1981.** A prospective study of the side effects of oral contraseptives vol. 3.Bethesda,M: National Institute of Health.
- Wenzl, R., Kiesel, L., Huber, J.C., Wieser, F. 2003.** Endometriosis: a genetic disease. *Drugs Today (Barc)*, Dec; 39(12): 961-72.
- Woodward P. J., Roya S., T.P., Mezetti. 2001.** Endometriosis:Radiologic-Pathologic Correlation. *Radiographics*. 21:193- 216.

ÖZGEÇMİŞ

Antakya’da 1978 yılında doğdu. İlk, orta, lise öğrenimini Antakya’da tamamladı. 1998 yılında girdiği Ankara Üniversitesi Sağlık Eğitim Fakültesi Sağlık Eğitim Bölümü’nden 2003 yılında Sağlık Eğitimi ünvanıyla mezun oldu. Haziran 2003 - Haziran 2006 yılları arasında Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans öğrenimini tamamladı.

