

HÜLYA AYDINLI

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2022



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

ENDOMETRİOZİSTE UZUN KODLAMAYAN RNA'LARIN
İNFLAMASYONLA İLİŞKİLENDİRİLMESİ

HÜLYA AYDINLI

DANIŞMAN
PROF. DR. AYŞE EVRİM BAYRAK

GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI

İSTANBUL-2022

İTHAF

Kızım Güneş'ime ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca, bana her konuda yol gösteren, emeğini, bilgisini ve anlayışını esirgemeyen, desteğini her zaman hissettiğim danışmanım, değerli hocam Prof. Dr. Ayşe Evrim BAYRAK’a,

Proje oluşturulmasında ve tez hastalarımın toplanmasında emeği geçen Doç. Dr. Meryem Hocaoglu’na ve yine, tez hastalarımın toplanmasında emeği geçen Uzm. Bio. Esra Kaynak ve Uzm. Bio. Aslı Karacan arkadaşlarıma,

Özellikle teknik destek ve ekipman kullanımı konusunda yardımcı olan Aziz Sancar DETAE Lab3 çalışma arkadaşlarıma,

Yüksek lisans sürecinde yanımda olan ‘Event Team’ üyeleri canım dostlarıma,

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini hiç esirgemeyen, yanımda olup beni destekleyen, bana güvenen ve inanan canım aileme,

Hayatıma girdiği andan itibaren bana ışık olan, her zaman yanımda olup beni cesaretlendiren, destek olan can eşime ve ömrüme ömür katan biricik kızıma sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: TYL-2020-36393). Ayrıca, kısmi olarak TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir (Proje No: 118S298).

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
BEYAN.....	iii
İTHAF.....	iv
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
TABLolar LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	ix
ÖZET	xi
ABSTRACT.....	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. ENDOMETRİOZİS	3
2.1.1. Tanım	3
2.1.2. Sınıflandırma.....	3
2.1.3. Etiyopatogenezi.....	6
2.1.4. Tanı	12
2.1.5. Tedavi.....	14
2.2. UZUN KODLAMAYAN RNA'LAR (lncRNA).....	17
2.2.1. Tanım	17
2.2.2. lncRNA'ların Hastalık İlişkileri.....	23
2.2.3. Endometrioziste lncRNA'lar.....	24
2.2.4. Araştırmaya Dahil Edilen lncRNA'lar.....	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	33
3.1. Gereçler.....	33
3.1.1. Araştırma Grupları	33
3.1.2. Kullanılan Kimyasallar	34
3.1.3. Kullanılan Kitler	34
3.1.4. Kullanılan Cihazlar	34
3.1.5. Kullanılan Çözeltiler	35

3.2. Yöntem.....	35
3.2.1. Periferik kandan ve endometriozis dokularından total RNA izolasyonu ve RNA kalitesinin belirlenmesi	35
3.2.2. cDNA Sentezi	37
3.2.3. Gerçek Zamanlı (Real-Time) Kantitatif PZR	38
3.2.4. Rölatif kantitasyon ile lncRNA ifade düzeylerinin belirlenmesi	39
3.2.5. İstatistiksel Analizler.....	43
4. BULGULAR.....	45
5. TARTIŞMA	59
KAYNAKLAR	67
HAM VERİLER	79
FORMLAR	80
ETİK KURUL KARARI	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
PATENT HAKKI İZNİ	81
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	82
ÖZGEÇMİŞ	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1: Endometriozis İçin Tıbbi Tedaviler	15
Tablo 2: Kullanılan kimyasallar	34
Tablo 3: Kullanılan kitler.....	34
Tablo 4: Kullanılan cihazlar	34
Tablo 5: cDNA sentezi için reaksiyon içerikleri	37
Tablo 6: cDNA reaksiyon protokolü	37
Tablo 7: Kullanılan lncRNA'lara ait primer dizileri	38
Tablo 8: RT-PZR protokolü.....	38
Tablo 9: qRT-PZR reaksiyon koşulları.....	39
Tablo 10: Endometriozis hasta grubu ve kontrol grubunun demografik ve klinik özellikleri	45
Tablo 11: Preoperasyon dönemindeki endometriozis hasta ve kontrol grupları arasındaki lncRNA'ların lökositlerdeki ifade düzeyleri.....	47
Tablo 12: Birinci ay takip dönemindeki endometriozis hasta ve kontrol grupları arasındaki lncRNA'ların lökositlerdeki ifade düzeyleri.....	48
Tablo 13 : Endometriozis hastalarının preoperasyon ve birinci ay takip dönemleri arasındaki lncRNA'ların lökositlerdeki ifade düzeyleri.....	49
Tablo 14: Endometriozis hasta ve kontrol grupları arasındaki lncRNA'ların dokulardaki ifade düzeyleri.....	50
Tablo 15: Endometriozis hastalarında peritoneal lezyon varlığına göre lncRNA'ların dokulardaki ifade düzeyleri	51
Tablo 16: Endometriozis hastalarında derin infiltratif endometriozis varlığına göre lncRNA'ların dokulardaki ifade düzeyleri	52
Tablo 17: Endometriozis hastalarında klinik parametreler ve lncRNA düzeyleri arasındaki korelasyon	56
Tablo 18: Çalışma gruplarının lökositlerinde lncRNA'ların ROC (Receiver operating characteristic) analizi	57

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Endometriozis lezyon tipleri (12).....	5
Şekil 2: Amerikan Üreme Tıbbı Derneği (ASRM) skorum sistemi (12).....	6
Şekil 3: Retrograd menstrüasyondan endometriozis gelişimi (MMT: mezotelyal-mezenkimal transformasyon) (13).....	7
Şekil 4: Endometriozis temelli kısırlık (infertilite) tedavisi akış şeması (2)	17
Şekil 5: lncRNA'ların genomik lokalizasyonları. (Protein kodlayan genler ve ekzonları mavi renkle, lncRNA'lar ve ekzonları ise kırmızı renkle temsil edilmektedir.) (65).....	19
Şekil 6: Uzun kodlamayan RNA'ların (lncRNA) işlevleri.....	20
Şekil 7:lncRNA'ların moleküler fonksiyonları (77).....	21
Şekil 8 : <i>UBOX5</i> 'in kromozomal lokasyonu (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=lncRNA%20UBOX5-AS1)	27
Şekil 9 : <i>MALAT1</i> geninin kromozom lokasyonu (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/378938#gene-expression)	28
Şekil 10 : <i>MALAT1</i> 'in çeşitli dokulardaki ekspresyon profili (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/378938#gene-expression)	29
Şekil 11: <i>MALAT1</i> biyogenezi (122).....	30
Şekil 12: <i>BAT5</i> kromozomal lokasyonu (130).....	31
Şekil 13: <i>UBOX5</i> kodlamayan RNA transkriptine ait örneklerde elde edilen amplifikasyon eğrileri.....	40
Şekil 14 : <i>MALAT1</i> kodlamayan RNA transkriptine ait örneklerde elde edilen amplifikasyon eğrileri.....	40
Şekil 15: <i>BAT5</i> kodlamayan RNA transkriptine ait örneklerde elde edilen amplifikasyon eğrileri.....	41
Şekil 16: β - <i>AKTIN</i> transkriptine ait örneklerde elde edilen amplifikasyon eğrileri	41
Şekil 17: <i>UBOX5</i> kodlamayan RNA transkriptine ait örneklerde elde edilen erime eğrileri.....	42
Şekil 18: <i>MALAT1</i> kodlamayan RNA transkriptine ait örneklerde elde edilen erime eğrileri.....	42
Şekil 19: <i>BAT5</i> kodlamayan RNA transkriptine ait örneklerde elde edilen erime eğrileri	43
Şekil 20: β - <i>AKTIN</i> transkriptine ait örneklerde elde edilen erime eğrileri	43

Şekil 21: Lökositlerde <i>BAT5</i> rölatif kantitasyon değerleri	53
Şekil 22: Lökositlerde <i>MALAT1</i> rölatif kantitasyon değerleri.....	54
Şekil 23: Lökositlerde <i>UBOX5</i> rölatif kantitasyon değerleri.....	54
Şekil 24: Dokularda <i>BAT5</i> rölatif kantitasyon değerleri.....	55
Şekil 25:Dokularda <i>MALAT1</i> rölatif kantitasyon değerleri	55
Şekil 26: Dokularda <i>UBOX5</i> rölatif kantitasyon değerleri	56
Şekil 27: Operasyon öncesi lncRNA'ların ROC analizi eğrisi.....	58
Şekil 28: Birinci aylık takip dönemi lncRNA'ların ROC analizi eğrisi	58



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

- ASRM:** Amerikan Üreme Tıbbı Derneği
- MMT:** Mezotelyal-mezenkimal transformasyon
- SF1:** Steroidojenik faktör-1
- ER- β :** östrojen reseptörü β
- PR:** Progesteron reseptörü
- ROS:** Reaktif oksijen radikalleri
- LCM:** Lazer yakalamalı mikrodiseksiyon
- CGH:** Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon
- GWAS:** Tüm genom çapı ilişkilendirme çalışmaları
- NK:** Doğal öldürücü hücre
- IL-1 β :** İnterlökin-1 β
- ICAM-1:** İnterselüler adezyon molekülü-1
- COX-2:** Siklooksijenaz-2
- VEGF:** Vasküler endotelial büyüme faktörü
- TNF- α :** tümör nekroz faktörü- α
- MCP-2:** C-C motif kemokin 2
- NF- κ B:** Nükleer faktör-kappa B
- MRG:** Magnetik rezonans görüntüleme
- CT:** Bilgisayarlı tomografisi
- CA-125:** Kanseri antijeni 125
- IVF:** İn vitro fertilizasyon
- mRNA:** Haberci RNA
- ncRNA:** Kodlamayan RNA
- sncRNA:** Küçük kodlamayan RNA
- miRNA:** mikroRNA
- lncRNA:** Uzun kodlamayan RNA
- lincRNA:** İntergenik lncRNA
- XCI:** X inaktivasyonu
- NF- γ A:** Nükleer Faktör- γ 'nin A subünitesi
- RNP:** Ribonükleoprotein
- SNP:** Tek nükleotid polimorfizm

EMT: Epitelyal-mezenkimal geçiş

NEAT2: Nüklear zenginleştirilmiş bol transkript 2

MMP-9: Metalloproteinaz 9

TNF: Tümör nekroz faktörü

MHC III: Majör histo-uyumluluk kompleksi sınıf III

qRT-PZR: Kantitatif eř-zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

Hb: Hemogloblin

Hct: Hematokrit

WBC: Beyaz kan hücreleri

BMI: Vücut kütle indeksi

SD: Standart sapma

CCL5: Kemokin (C-C motifi) ligandı 5

iNOS: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz

ÖZET

Aydınlı, H. (2022). Endometrioziste Uzun Kodlamayan RNA'ların İnflamasyonla İlişkilendirilmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Endometriozis, uterus kavitesi dışında endometrium dokusu ve stromanın varlığı ve çoğalması ile karakterize edilen, üreme çağındaki kadınlarda sıklıkla görülen jinekolojik bir hastalıktır. Uzunluğu 200 nükleotitten daha büyük olan az karakterize edilmiş bir molekül sınıfı olan uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA) çeşitli biyolojik işlemlerde önemli roller oynamaktadır. Bu çalışmada, endometriozis hastalarının lökositleri ve dokularında uzun kodlamayan RNA'ların ifade düzeylerinin analizi ve hastalık ile ilişkilerinin belirlenmesi amaçlandı.

Bu amaçla, endometriozis tedavisi amacı ile başvuran ve operasyon planlanan hastalardan (n:32) ovarian endometriozis (endometrioma) dokusu (n:23) ve periferik kanları (n:28), kontrol grubu olarak endometriozis olmayan kadınlardan periferik kan örnekleri (n=27) ve endometriozis olmayan iki bireyden normal over dokusu temin edildi. Ayrıca hastalardan 1. aylık takip döneminde periferik kan örnekleri (n:20) alındı. Bu örneklerde aday lncRNA'ların ifade düzeyleri kantitatif RT-PZR ile belirlenerek, endometriozis ile ilişkisi istatistiksel olarak değerlendirildi.

Bu çalışmada, endometriozis hasta grubunda kontrollere kıyasla *BAT5* ifade düzeyinin lökositlerde 3 kat ($p=0.103$), dokularda ise 20,70 kat ($p=0.329$) arttığı, *MALAT1* ifade düzeyinin ise lökositlerde 4,3 kat ($p=0.005$), dokularda 1,21 kat ($p=0.443$) arttığı ve ayrıca *UBOX5* ifade düzeyinin lökositlerde 1,08 kat ($p=0.029$) azalırken, dokularda 5,35 kat ($p=0.749$) arttığı bulundu. Bunun yanında operasyon sonrası birinci aylık takip hastalarında operasyon öncesi durumlarına kıyasla, lökositlerde, *BAT5* ifade düzeyinin 2,07 kat ($p=0.414$) ve *MALAT1* ifade düzeyinin 2,64 kat ($p=0.048$) azaldığı, *UBOX5* ifade düzeyinin ise 2,02 kat ($p=0.594$) arttığı bulundu. Yapılan ROC analizlerinde lökositlerde değişen ifade düzeyleri ile seçilen aday lncRNA'ların endometriozis tanısı için aday biyobelirteçler olabileceği belirlendi.

Sonuç olarak bu çalışmada seçilen lncRNA'ların endometriozis patogeneğinde inflamasyonla ilişkili olabileceği ve tanı için biyobelirteç olabilme potansiyeli olduğu gösterildi.

Anahtar Kelimeler : Endometriozis, inflamasyon, uzun kodlamayan RNA, ifade düzeyi, biyobelirteç

Bu çalışma, Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: TYL-2020-36393). Ayrıca, kısmi olarak TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir (Proje No: 118S298).

ABSTRACT

Aydınlı, H. (2022). Association of Long Non-coding RNA Candidates with Inflammation in Endometriosis. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Genetics. Master Thesis. İstanbul.

Endometriosis is a gynecological disease frequently seen in women of reproductive age, characterized by the presence and proliferation of endometrial tissue outside the uterine cavity. Long non-coding RNAs (lncRNAs), a class of molecules over 200 nucleotides in length, play important roles in a variety of biological processes. In this study, it was aimed to analyse the expressions of lncRNAs in leukocytes and tissues of endometriosis patients and to determine their relationship with the disease.

For this purpose, tissue (n=23) and peripheral blood (n=28) were collected from endometriosis patients (n=32). Peripheral blood (n=27) and normal ovarian tissue (n=2) were taken from healthy women as a control group. In addition, peripheral blood (n=20) was taken from the patients in the 1st month follow-up. Expression levels of candidate lncRNAs in these samples were determined by quantitative RT-PCR and their association with endometriosis was statistically evaluated.

In this study, in the endometriosis patient group compared to the controls; *BAT5* expression increased 3-fold in leukocytes and 20.70-fold in tissues. *MALAT1* expression increased 4.3 times in leukocytes and 1.21 times in tissues. In addition, it was found that *UBOX5* expression decreased 1.08 times in leukocytes and increased 5.35 times in tissues. In addition, in the first-month follow-up patients after the operation, compared to their preoperative status; in leukocytes, *BAT5* expression decreased 2.07-fold, *MALAT1* expression 2.64-fold, while *UBOX5* expression increased 2.02-fold. In ROC analysis, it was determined that candidate lncRNAs could be candidate biomarkers for the diagnosis of endometriosis, with varying expression levels in leukocytes.

In conclusion, it has been shown that selected lncRNAs in this study might be associated with inflammation in the pathogenesis of endometriosis and have the potential to be a biomarker for diagnosis.

Key Words: Endometriosis, inflammation, long non-coding RNA, expression level, biomarker

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University (Project No. TYL-2020-36393). It was also partially supported by TUBITAK (Project No: 118S298).

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Endometriozis, uterus dışında endometrial dokunun varlığı, pelvik ağrı ve infertilite ile yakından ilişkili bir hastalıktır. Üreme çağındaki kadınların %10'unu etkiler; ancak kronik pelvik ağrısı olan kadınlarda görülme sıklığı daha yüksektir ve endometriozis hastalarının %30-50'sinde infertilite bildirilmiştir. Bu nedenle, bireyler ve toplum için önemli derecede sosyo-ekonomik etkileri vardır (1).

Endometriozis dokusundaki hücreler kanser hücreleri gibi adezyon, aşırı proliferasyon, anjiyogenez ve apoptoz inhibisyonu özellikleri göstermektedir. İnflamasyon, endometriozisin bir başka tipik özelliği olup periton boşluğundaki bu ektopik dokunun varlığı, prostaglandinlerin, sitokinlerin ve kemokinlerin aşırı üretimi ile ilişkilidir (2). Her ne kadar endometriozisin patogenezi hakkındaki birçok araştırma, hastalık gelişimi ile ilgili hormonal ve hormonal olmayan mekanizmaların rolünü göstermiş olsa da terapötik yaklaşım ve erken tanı yöntemleri hala eksiktir. Günümüzde endometriozis tanısı için altın standart yöntem laparoskopik cerrahidir. Kesin tanısının yüksek maliyetli ve morbiditeyi beraberinde getiren cerrahi girişimler ile konulması nedeniyle halen endometriozisin non-invazif tanısında etkili biyobelirteç varlığı araştırılmaktadır (3).

Genom çapında yapılan insan transkripsiyonel araştırmaları, kısa ve uzun kodlamayan RNA'lar dahil olmak üzere çok sayıda protein kodlamayan RNA'yı (ncRNA'lar) ortaya çıkarmıştır. Uzunluğu 200 nükleotidden daha büyük olan daha az karakterize edilmiş bir molekül sınıfı olan uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA'lar) çok çeşitli biyolojik işlemlerde önemli roller oynamaktadır. lncRNA'ların hastalığın klinik teşhisi için potansiyel biyobelirteçler olmasının yanı sıra, aynı zamanda hastalık gelişiminde de rolü olabileceğini öne sürmektedir (4). Ayrıca yapılan birçok çalışma inflamasyon oluşumunda etkili birçok lncRNA olduğunu göstermektedir (5).

Endometriozisde çok sayıda lncRNA belirlenmiş olup bunların hastalık patogenezindeki rolleri halen tam olarak bilinmemektedir. Örneğin H19 lncRNA infertilite (6) ile, diğer bir çok kanser türünde de gösterilmiş olan MALAT1 endometriozis hücrelerinin proliferasyonu ve migrasyonu ile ilişkilendirilmiştir (7). Anjiyogenez yolağında etkisi iyi bilinen aHIF (antisense hypoxi-inducible factor) lncRNA'nın da endometriozis hastalarında aşırı ekspresyon gösterdiği gösterilmiştir.

Bu çalışma kapsamında literatür bilgilerine göre seçilecek aday lncRNA'ların endometriozis hastalığı ilişkisinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Daha önce inflamasyonda etkili lncRNA'ların endometriozis ile doğrudan ilişkisi gösterilmemiştir, bu çalışma bu konuda ilk olduğundan özgün bir çalışma olacaktır. Bu çalışmada, endometriozis tanısı alan hastalarda son literatür bilgilerine ve biyoinformatik araçlar kullanılarak yapılan analizlere göre üç adet lncRNA seçildi. Daha sonra, endometriozis tanısı alan hastaların hem periferik kanındaki lökositlerde hem de endometriozis dokularındaki aday lncRNA'ların ifade düzeylerinin belirlenerek gruplar arasında karşılaştırılması ve hastalık ciddiyeti arasındaki ilişkiler ile biyobelirteç niteliklerinin araştırılması planlandı. Çalışmanın amacı, endometriozis tanısı alan hastalarda sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak hem periferik kan örneklerinde hem de operasyon sırasında toplanacak ovarian endometriozis dokularında (endometrioma) uzun kodlamayan RNA'ların belirlenmesi ve düzeylerinin endometriozis semptomları, hastalığın evresi, pelvik ağrı persistansı/rekürrensi ve inflamasyon ile ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Tespit edilebilecek lncRNA'lar ile noninvaziv biyobelirteç seçenekleri ile endometriozis için erken ve cerrahi müdahale gerektirmeden teşhis mümkün olabilmesi hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. ENDOMETRİOZİS

2.1.1. Tanım

Endometriozis, üreme çağındaki kadınlarda sıklıkla görülen jinekolojik bir hastalıktır. Uterus kavitesi dışında endometrium dokusu ve stromanın varlığı ve çoğalması ile karakterize edilmiştir. Endometriozis pelvik periton, overler ve rektovajinal septum başta olmak üzere ektopik alanda hemorojiye sebep olarak, çoğu zaman lokal inflamasyonla meydana gelen onarım sürecinde skar dokusu oluşturur. Endometriozis vakalarının çoğunda dismenore, disparoni ve pelvik ağrı görülebilmektedir ve etkilenen kadınların yaşam kalitesini önemli ölçüde bozmaktadır (8). Endometriozisin kliniği karmaşık ve heterojendir. Semptomatik olarak, belirgin ancak spesifik olmayan çeşitli ağrı türleri ve artan infertilite (kısırılık) riskinin yanı sıra yaygın yorgunluk içermektedir. Endometriotik lezyonların kaba görünümü, birden fazla alt tipi düşündürmektedir. Endojen ortamın değişen yönleri, lokal östrojen üretimi ve progesteron direncinin yanı sıra kronik lokal ve sistemik inflamasyonu içerir (9).

Dünya Bankası'nın 2017 yılı için nüfus tahminleri göz önüne alındığında, endometriozisin, dünya çapında üreme çağındaki yaklaşık 190 milyon kadının %10'unu etkilediği tahmin edilmektedir. Bununla birlikte, endometriozisin gerçek prevalansı belirsizdir; çünkü kesin tanı cerrahi operasyon gerektirir ve olguların bir kısmı asemptomatiktir. Asemptomatik kadınlarda prevalans %2-11, infertil kadınlarda %5-50 ve pelvik ağrı nedeniyle hastaneye yatırılan kadınlarda %5-21 arasında değişmektedir. Semptomatik adolesanlarda endometriozis prevalansı kronik pelvik ağrısı olanlarda %49'dan medikal tedaviye yanıt vermeyen ağrısı olanlarda %75'e kadar değişmektedir (10).

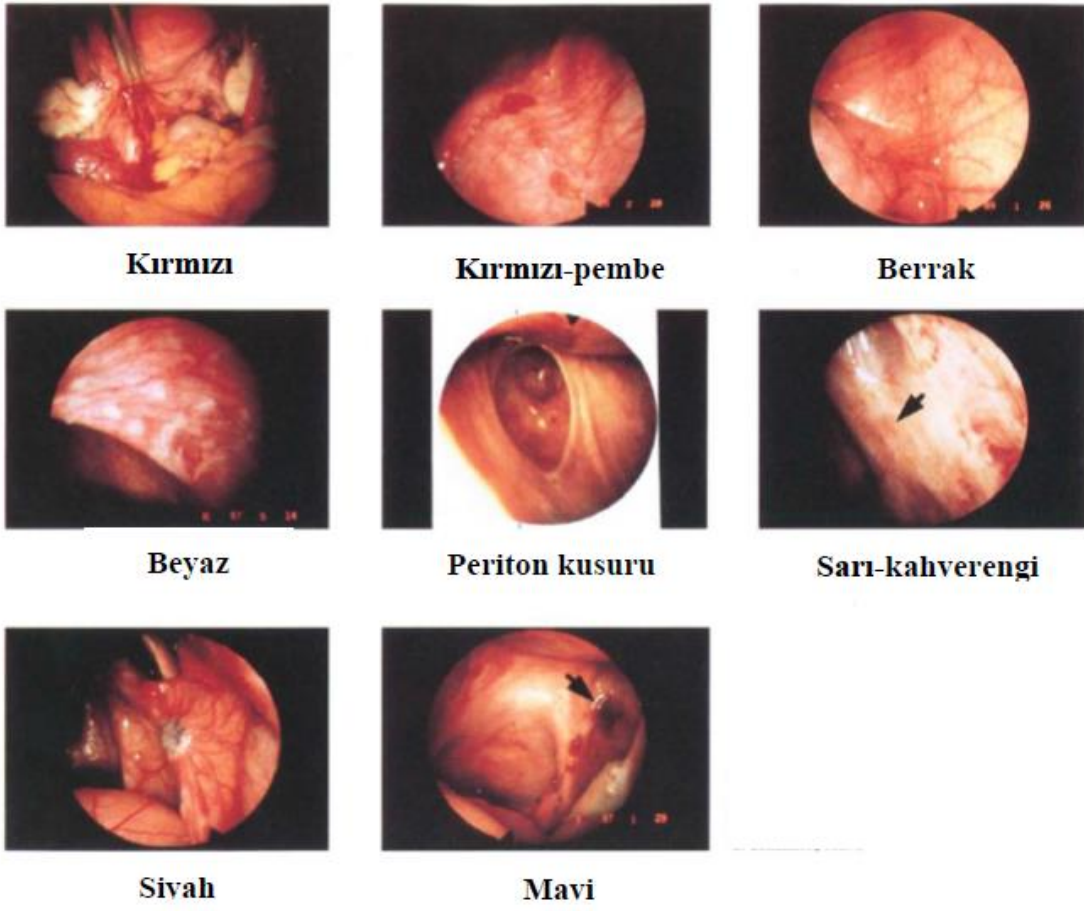
2.1.2. Sınıflandırma

Endometriozis sınıflandırılması, patolojik bulguların kaydedilmesi ve standart bir tedavi yaklaşımı sağlayabilmek için önemlidir. Şu anda en yaygın kabul gören sınıflama sistemi Amerikan Üreme Tıbbı Derneği (ASRM) tarafından oluşturulan skrolama sistemidir. Skrolama sisteminin doğruluğunu artırmak için, over endometriotik kisti histoloji veya aşağıdaki özelliklerin varlığı ile doğrulanmalıdır: [1] kist çapı < 12 cm; [2] pelvik yan duvara ve/veya geniş bağa yapışma; [3] over

yüzeyinde endometriozis; ve [4] katranlı, kalın, çikolata renkli sıvı içeriği. Periton ve over implantlarının morfolojisi kırmızı (kırmızı, kırmızı-pembe ve berrak lezyonlar), beyaz (beyaz, sarı-kahverengi ve peritoneal defektler) ve siyah (siyah ve mavi lezyonlar) olarak kategorize edilir (11)(Şekil 1) .

Endometriozis, tanı ve tedaviye birlikte imkan tanıyan cerrahi operasyon esnasında Amerikan Üreme Cemiyeti (ASRM) tarafından revize edilmiş evreleme sistemi kullanılarak cerrahi olarak evrelenir (Revised ASRM classification, 1996) (Şekil 2)

- ✓ **Evre I (Düzey I):** İzole implantlar ve anlamlı olmayan adezyonlar içeren minimal endometriozis evresi
- ✓ **Evre II (Düzey II):** Peritonda ve overlerde sınırlı, < 5 cm, yüzeysel implantlar içeren hafif endometriozis evresi. Anlamlı adezyonlar izlenmez.
- ✓ **Evre III (Düzey III):** Yüzeysel ve derin olmak üzere multiple implantlar içeren orta derece endometriozis evresi. Peritubal ve periovaryen adezyonlar mevcuttur.
- ✓ **Evre IV (Düzey IV):** Büyük endometriomaları içeren, multiple yüzeysel ve derin implantlar olan ağır endometriozis evresi. Sıklıkla zayıf ve sıkı adezyonlar gözlenir. (12).



Şekil 1: Endometriozis lezyon tipleri (12)

Düzey 1-Minimal			Düzey 2- Hafif			Düzey 3- Orta		
								
Periton			Periton			Periton		
yüzeysel endometriosis	1-3cm	- 2	derin endometriosis	- >3cm	- 6	derin endom.	- >3cm	- 6
sağ over			sağ over			douglas boşluğu		
yüzeysel endometriosis	< 1cm	- 1	yüzeysel endom.	- < 1cm	- 1	kısmi tıkanıklık		- 4
zayıf adezyon	< 1/3	- 1	zayıf adezyon	< 1/3	- 1	sol over		
toplam puan		- 4	sol over			derin endom.	- 1-3cm	- 16
			yüzeysel endom.	< 1cm	- 1	toplam puan		26
			toplam puan		- 9			
Düzey 3- Orta			Düzey 4- Ağır			Düzey 4- Ağır		
								
Periton			Periton			Periton		
yüzeysel endom.	- >3cm	- 4	yüzeysel endom.	- >3cm	- 4	derin endom.	- >3cm	- 6
sağ fallop tüpü	- < 1/3	- 1	sol over			douglas boşluğu		
zayıf adezyonlar	- < 1/3	- 1	derin endom.	- 1-3cm	- 32**	tam tıkanıklık		- 40
sağ over	- < 1/3	- 1	sıkı adezyonlar	- < 1/3	- 8**	sağ over		
sol fallop tüpü	- < 1/3	- 16*	sol fallop tüpü	- < 1/3	- 8**	derin endom.	- 1-3cm	- 16
sıkı adezyonlar	- < 1/3	- 16*	derin adezyonlar	- < 1/3	- 8**	sıkı adezyonlar	- < 1/3	- 4
sol over	- < 1 cm	- 4	toplam puan		52	sol fallop tüpü	- >2/3	- 16
derin endom.	- < 1/3	- 4				sıkı adezyonlar	- >2/3	- 16
sıkı adezyonlar	- < 1/3	- 4				sol over	- 1-3cm	- 16
toplam puan		30				derin endom.	- 1-3cm	- 16
						sıkı adezyonlar	- >2/3	- 16
						toplam puan		114

Şekil 2: Amerikan Üreme Tıbbı Derneği (ASRM) skrolama sistemi (12)

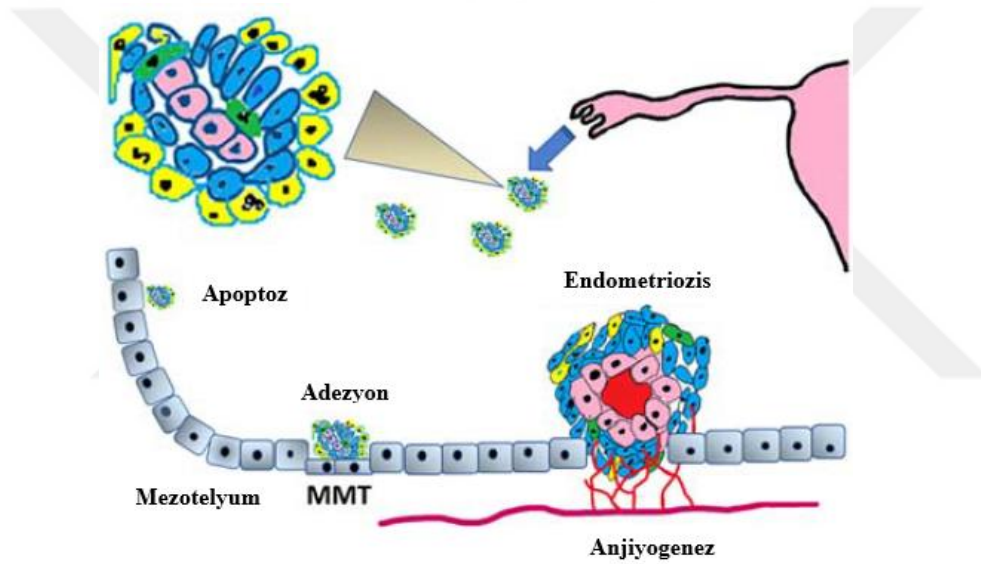
2.1.3. Etyopatogenezi

Endometriosis oluşum mekanizmaları halen tam olarak anlaşılabilmiş değildir; bununla birlikte, endometriosisin nedenini tanımlayabilmek için ortaya atılan birkaç teori vardır (13). Endometriosis oluşumu ile ilgili bu teoriler ve etkili olduğu düşünülen diğer faktörler aşağıda sıralanmıştır.

2.1.3.1. Retrograd Menstrüasyon Teorisi

Endometriosis oluşumu ile ilgili ilk ortaya atılan ve en yaygın olarak kabul edilen teori, 1921'de Sampson tarafından önerilen retrograd menstrüasyon teorisidir. Uterus boşluğuna materyal enjekte ederek yaptığı bir dizi deney sonucunda bu teoriyi ortaya atmıştır. Retrograd menstrüasyon, canlı endometriyal hücreler içeren adet kalıntılarının Fallop tüpleri yoluyla periton boşluğuna geri akışı anlamına gelmektedir (14). Şekil 3'te anlatıldığı gibi; Fallop tüpünden gelen endometriyal doku parçaları genellikle epitelyal (pembe) ve stromal hücrelerden (mavi) oluşur ve birkaç kök hücreyle (yeşil) karışır ve inflamatuvar hücrelerle (sarı) çevrilidir. Bu hücre kümeleri, sağlam mezotelyum üzerinde herhangi bir lezyon oluşturmaz ve apoptoza uğrar.

Bununla birlikte, yaralanma veya mezotelyal-mezenkimal transformasyon (MMT) nedeniyle mezotelyumun bulunmadığı alanlarda, bu hücre kümeleri kök hücreler ve inflamatuvar hücreler tarafından desteklenerek tutunabilir ve gelişebilir. Daha sonra anjiyogenez, hormonların etkisi altında lezyonların kalıcılığı ve ilerlemesi ile sonuçlanır (13). Bununla birlikte, Fallop tüpleri açık olan kadınların %76-90'ında retrograd menstrüasyon görülür ancak bu kadınların hepsinde endometriozis yoktur (15). Sağlıklı kadınlara kıyasla endometriozisli hastaların pelvislerinde bulunan daha büyük retrograd menstrüel sıvı hacmi, endometriotik lezyon implantasyonu riskini artırabilir (16). İnsan olmayan primat modellerinde, retrograd menstrüasyonu simüle eden otolog menstrüel ürünleri aşılıyarak endometriozisi indüklemek mümkün olabilmektedir (17).



Şekil 3: Retrograd menstrüasyondan endometriozis gelişimi (MMT: mezotelyal-mezenkimal transformasyon) (13)

2.1.3.2. Çölomik Metaplazi

Retrograd menstrüasyonun olmadığı diyafram, plevra, akciğer ve perikard gibi dokularda endometriozis gözlenmiştir. Bu gözlemler endometriozis patogenezinde çölomik metaplazi kavramının ortaya çıkmasına neden olmuştur. 1942'de Gruenwald, vücut iç organlarını örten çölomik epitel duvarlarının embriyolojik olarak Müller kanalları ile ilişkili olduğu ve dolayısıyla endometriozisin diğer organlarda ve diğer tüm çölomik duvar türevlerinde gelişebileceğini gösteren çölomik metaplazi teorisini tanımlamıştır (13). Çölomik metaplazi teorisi, endometriozisin visseral ve abdominal peritonun mezotelyal astarında bulunan özelleşmiş hücrelerin metaplazisinden kaynaklandığını varsaymaktadır. Hormonal veya immünolojik faktörlerin, normal

peritoneal doku/hücrelerin endometriyum benzeri dokuya dönüşümünü uyardığı düşünülmektedir. Adet görmeyen kadınlarda ve hormon tedavisi gören erkeklerde endometriozis varlığının görülebilmesi bu teoriye dayandırılmaktadır (18).

2.1.3.3. Embriyojenik Dinlenme Teorisi

Dişi fetüslerde ektopik endometriyal doku tespit edilmiş ve bunun kusurlu embriyogenez sonucu olabileceği öne sürülmüştür. Bu, östrojene yanıt olarak endometriotik lezyonlara dönüşebilen Wolff veya Müller kanallarının rezidüel embriyonik hücrelerinin kalıcılığı ile açıklanabilir (19). Bulun ve ark., pelvik doku progenitör hücrelerinde epigenetik değişikliklerin, yani SF1 (Steroidojenik faktör-1) ve ER- β (östrojen reseptörü β) genlerinin promotörlerindeki hipometilasyonunun, çevresel veya genetik faktörler nedeniyle embriyolojik gelişim sırasında meydana gelmesi durumunda endometriozis gelişimine yatkın olabileceğini açıklamıştır (20).

2.1.3.4. Metastaz Teorisi

Pelvik organlardaki endometriozis retrograd menstrüasyon kavramı ile kolayca açıklanabilse de, peritoneal veya pelvik boşluklar dışındaki endometriozis implantlarını açıklayamamaktadır. Vasküler yayılma teorisi, endometriyal hücrelerin menstrüasyon sırasında uterusun vasküler sistemine veya lenfatik sisteme girebileceğini ve diğer bölgelere taşınabileceğini öne sürer. Tıpkı tümör hücreleri gibi, bunlar da uygun doku ortamlarında değişken bölgelerde büyümeye başlayabilir, böylece lenf düğümleri, akciğer, karaciğer ve beyin gibi ekstrapelvik lokasyonlarda endometriozis varlığı bu teori ile açıklanabilir (13).

2.1.3.5. Kök Hücre Kökeni Teorisi

Kök hücreler, kendini yenileme ve özelleşmiş hücreler üretme yeteneğine sahip farklılaşmamış hücrelerdir. Mezenkimal kök hücreler normalde endometriyumda bulunur. Retrograd menstrüasyon, menstrüel döküntüleri uterusun dışına yönlendirse de, endometriozisin gelişmesine neden olan bu geri akış içindeki mezenkimal kök hücrelerin farklılaşması mümkün olabilir. Endometrial implantların kurulması ve hayatta kalması ile ilgili kapsamlı moleküler araştırmalar yapılmış olup bu mekanizma, endometriyal hücrelerin önceki hasar alanlarında pelvik peritona bağlanması, mezotelyuma invazyonu ve hayatta kalma ve ektopik endometriyal hücrelerin proliferasyonu

olması şeklinde açıklanır. Daha sonra, anjiyogenez ile daha fazla büyüme potansiyeli olan endometriozis oluşumu tetiklenebilir (15).

2.1.3.6. Hormonların Rolü

Steroid hormonları, endometriozisin gelişmesinde ve sürdürülmesinde merkezi bir rol oynamaktadır. Ötopik endometriuma benzer şekilde, ektopik lezyonların büyümesinin de ovaryan steroid hormonları tarafından düzenlendiği düşünülmektedir. Bu bağlamda, hem ötopik hem de ektopik endometriyal doku östrojene karşı artan duyarlılığa sahip olabilir ve böylece endometriozis gelişimini artırır. Normalde östrojenin etkisine karşı gelen progesteronun etkisi daha azdır çünkü endometriozisli hastalarda endometriyumda progesteron reseptörleri (PR'ler) azalmıştır. Çalışmalar ayrıca endometriotik stromal hücrelerin kusurlu metilasyonunun PR'lerin baskılanmasına yol açtığını göstermiştir. Reseptör eksikliği, endometriotik dinlenmelerin hayatta kalmasının ve kronik inflamasyonun artmasıyla sonuçlanan progesteron direncine neden olur (18).

2.1.3.7. Oksidatif Stresin Rolü

Lipoproteinlerin artan oksidasyonuna bağlı meydana gelen, reaktif oksijen radikallerinin (ROS) endometriyal hücrelerde DNA hasarına yol açarak lipid peroksidasyonuna neden olduğu ve endometriozis patogenezinde rol aldığı belirlenmiştir (21). Endometriozisli hastalarda artmış peritoneal sıvı hacminde su ve elektrolitlerin varlığı ROS'ne işaret eder (22). Bu hastalarda ayrıca hemoglobinin parçalanmasından dolayı periton boşluklarında aşırı demir birikimi vardır ve bu da redoks reaksiyonlarına neden olur. Proinflamatuvar hem ürünlerinin salınımı ve ROS'tan üretilen oksidatif stres sinyalleri, enzimlerin oksitlenmesini indükleyen ve endotelyal büyümeyi destekleyen sitokinler üreten lenfositlerin ve aktive makrofajların alımına yol açan inflamasyona neden olur (23). Aşırı ROS üretimine de genellikle bu molekülleri ortadan kaldıran azaltılmış bir antioksidan seviyesi eşlik eder. Ortaya çıkan ROS birikimi, endometriozis ve ilişkili semptomların yayılmasına ve korunmasına katkıda bulunabilir (18).

2.1.3.8. Genetiğin rolü

Ailesel ve ikiz çalışmaları, birinci derece akrabalıkta yüksek endometriozis riskini ve ikizlerde endometriozis uyumu gözlemleri endometriozis gelişimi için genetik

bir temel olabileceğini öne sürmektedir (24). Çok sayıda çalışma, genetik polimorfizmleri endometriozis gelişimine katkıda bulunan bir faktör olarak değerlendirmiştir. Endometriozis, çok sayıda lokusu içeren poligenik bir kalıtıma sahiptir ve bazı kromozomal bölgelerin ilgili endometriozis fenotipi ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (25). Kalıtsal ve kazanılmış faktörler, kadınları ektopik endometriyal hücrelerin peritoneal epitele bağlanmasına ve bu lezyonların immün klirensinden kaçınmasına yatkın hale getirebilir (26). Endometriozisi olan ve olmayan hastalar arasında gen ve protein ekspresyonunda farklılıklar olduğu bildirilmiştir (27). Endometriozis patogenezinde rol oynayan genler arasında detoksifikasyon enzimlerini ve östrojen reseptörünü kodlayan genler ile bağışıklık sistemindeki genler yer alır (28). Genetik yatkınlık, hücre hasarın sıklığını artırabilir. Hücre hasarına neden olan genetik varyantlar, endometriozisli kadınların endometriyal hücre davranışını değiştirdiği ve ekstrauterin adezyon ve büyümeyi desteklediği için endometriozisin ilerlemesine olanak tanır (29). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, lazer yakalamalı mikrodiseksiyon (LCM) ve yüksek verimli-yüksek çözünürlüklü karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (CGH) dizileri kullanılarak, endometriozisli kadınların hem ötopik hem de ektopik endometriumunda önemli genomik değişiklikler olduğu belirlenmiştir (30). Tüm genom çapı ilişkilendirme çalışmalarında (GWAS) da endometriozis için yeni lokuslar tanımlanmıştır (25). Bu veriler, belirli hücre fonksiyonel sapmaları düzenleyen gen kümelerinde meydana gelebilecek değişimler ile farklı endometriozis türlerinin ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

2.1.3.9. İmmün Sisteminin Rolü

Endometriozisli kadınlarda otoimmün hastalıkların daha yaygın olduğu gözlenmiştir, bu durum endometriozis patogenezinde kusurlu bir immün yanıt olasılığını desteklemektedir (31). Endometriozisli kadınlarda daha yüksek konsantrasyonda aktive makrofajlar, azalmış hücre bağışıklık ve bastırılmış bir doğal öldürücü (NK) hücre fonksiyonu vardır (32). Endometriyal hücrelerin peritona geri akışı, lokal olarak aktive makrofajları ve lökositleri toplayarak inflamatuvar yanıtı tetikler. Bu inflamatuvar yanıt, menstrüel döküntülerin ortadan kaldırılmasını önleyen ve ektopik bölgelerde endometriyal hücrelerin implantasyonunu ve büyümesini destekleyen kusurlu bir “bağışıklık denetimine” neden olabilir (33). Hem immün hem de endometriyal hücreler, hücre proliferasyonunu ve anjiyogenezi indükleyen sitokinler

ve büyüme faktörleri salgılar; böylece ektopik lezyonların implantasyonunu ve büyümesini teşvik eder. Muhtemelen bir sonuç olarak, endometriozisli kadınların peritoneal sıvılarında endometriyal hücrelerin proliferasyonunu ve anjiyogenezi destekleyen sitokinlerin ve vasküler endotelyal büyüme faktörlerinin daha yüksek ekspresyonu vardır (34).

2.1.3.10. Endometriozis ve İnflamasyon

Endometriozisin başlaması ve ilerlemesinde, inflamasyon oldukça önemli bir role sahiptir (35). İnflamatuar kaskadlar, metalloproteinaz, prostaglandinler, kemokinler ve sitokinler dahil olmak üzere farklı inflamatuvar faktörlerin yukarı modülasyonu ile tetiklenir (36). Son zamanlarda yapılan çeşitli çalışmalarda, endometriozis vakalarının peritoneal, endometriyum ve serumunda artan inflamatuvar mediyatörler saptanmıştır (37). İnterlökin-1 β (IL-1 β), endometriyotik hücrelerin proliferasyonunu artırır. Bu proliferatif etki, endometriyumun sağlıklı hücrelerinde oluşmaz (38). IL-1 β ayrıca endometriyotik dokularda IL-6 ve IL-8 üretimini tetikleyerek daha fazla proliferasyona yol açar ve apoptotik hızın azalmasına neden olur (39). Ayrıca, peritoneal mezotelyal hücreler, IL-1 β tarafından arttırılan interselüler adezyon molekülü-1'i (ICAM-1) serbest bırakabilmektedir, bu da inflamasyonun anjiyogeneizde önemli bir işlevi olduğunu düşündürmektedir (40).

Endometriozis hastalarının periton sıvısında; siklooksijenaz-2 (COX-2), vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), IL-6, tümör nekroz faktörü- α (TNF- α), IL-8, C-C motif kemokin 2 (MCP-1) ve IL-10 ekspresyonunda artış bildirilmiştir (41). Endometriyotik hücrelerde TNF- α , pluripotens aracılığı ve özellikle IL-8 olmak üzere inflamatuvar sitokinlerin üretimi ile ilişkilidir (42). Buna ek olarak, metalloproteinaz ve IL-8'in yüksek ekspresyonu ve üretimi, hücre dışı matris proteinlerine endometriyal stroma yapışmasının artmasına neden olur (43). Endometrial hücreler, interferon- γ 'yı etkileyerek endometriozis patogeneğinde yer alabilecek IL-6'nın üretilmesini sağlar. Endometriozis hastalarının makrofajlarında ICAM-1 ekspresyonunu artırır (44). Ayrıca endometrioziste bulunan progesterona direncin inflamatuvar sitokinlerin anormal ekspresyonu ile ilişkili olduğu kanıtlanmıştır (45).

Endometrioziste çeşitli inflamatuvar ve patolojik yanıtların önemli bir düzenleyicisi olan NF- κ B (nükleer faktör-kappa B), hücre proliferasyonunu ve inflamasyonu indükler ve apoptotik süreci inhibe eder (46). Normal endometriyumda

NF- κ B ekspresyonu düşük olmasına rağmen, hem ektopik hem de ötopik endometriumda yükseldiği gözlenmiştir (47).

2.1.4. Tanı

2.1.4.1. Klinik Tanı

Endometriozisin klinik tanısı için dismenore, dizüri, kronik pelvik ağrı gibi semptomların varlığı ile birlikte; yaş, boy, kilo, aile öyküsü ve infertilite gibi bulgularla hastanın klinik geçmişi detaylı bir şekilde incelenir (48). Bunların yanı sıra tüm endometriozis vakalarının %2 ile %10 kadarında asemptomatik endometriozis olduğu düşünülmektedir ki klinik değerlendirme esnasında gözardı edilmemesi gereken bir durumdur (49).

2.1.4.2. Laparoskopi

Laparoskopi endometriozis tanısında altın standart olarak değerlendirilmektedir. Laparoskopik cerrahide endometriozis, peritoneal implantlar, ovaryan implantlar ve adezyon ilişkili derin infiltrate nodüller olarak üç farklı şekilde incelenir. Endometriyotik lezyonlarda renk, boyut ve morfoloji kişiden kişiye değişkenlik göstermektedir. Histopatolojik olarak endometriozis değerlendirmesinin mümkün olabilmesi için, endometriyal epitel, endometriyal bezler, endometriyal stroma ve hemosiderin yüklü makrofajlar gibi yapılardan en az iki ya da daha fazlasının olması gerekmektedir. Yapılan çalışmalarda endometriozisin görsel tanısının her zaman gerçeği yansıtmayabileceği gösterilmiştir. Şüpheli olarak görülen lezyonların sadece %54-67'si histolojik olarak doğrulanabilmiştir. Bunun yanında, endometriyomaların teşhisinde laparoskopi oldukça kullanışlıdır, çünkü endometriyomaların görüntülenebilmeleri kolaydır ve genellikle over adezyonları ile ilişkilidirler (50).

2.1.4.3. Radyolojik Görüntüleme Yöntemleri

Endometriozisin teşhis edilmesinde görüntüleme yöntemlerinin kullanılması; implantları belirleyebilmek için yeterli çözünürlüğe sahip olmamasından ötürü sınırlıdır. Bunların arasında ultrasonografi kolay ve ucuz bir işlem olmasına rağmen yapılan değerlendirme kullanan kişiye göre değişmektedir. Magnetik rezonans görüntüleme (MRI) daha kesin ve doğru sonuçlar vermekte olup daha pahalı bir işlemdir. Pelvisin bilgisayarlı tomografisi (CT) pelvik organları yeterince iyi görüntüleyememektedir bu nedenle endometriozis teşhisinde kullanışlı olmamaktadır (50). Ultrasonografi cihazı

büyük endometriozis lezyonlarının teşhisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Endometriomaların, mesane lezyonlarının ve rektovajinal septumdaki derin infiltrate nodüllerin teşhisinde transvajinal ultrason yardımcı olur. Transvajinal ultrason deneyimli kişiler tarafından kullanıldığı takdirde yumurtalık endometriozis teşhisi için yüksek özgünlük ve hassaslık sağlamaktadır (48).

2.1.4.4. Serum Belirteçleri

Endometriozis teşhisinde serum belirteçlerinin kullanılabilmesi hala araştırılmakta olan bir konudur. Bu amaçla serum sitokinleri, matriks metalloproteinazları, adezyon molekülleri, anjiyogenez ve inflamasyon ajanları araştırılmaktadır (50). Kanseri antijeni 125 (CA-125), embriyonik gelişim sırasında çöломik epitelde üretilen iyi bilinen bir tümör belirteçidir. Over kanseri tanısında sıklıkla kullanılır (51). Yapılan bir meta-analiz, endometriozis hastalarında artan CA-125 düzeylerini ve hastalığın en ileri evreleriyle korelasyon olduğunu göstermiştir (52). Ancak daha ileri çalışmalar, CA-125 düzeylerinin adet döngüsü boyunca değişkenlik gösterdiğini ve endometriozis sunumunun klinik tipine göre değişebileceğini göstermiştir (53, 54). Birçok fizyolojik ve patolojik durum ve bazı ilaçlar, yanlış pozitif sonuçları artırarak yüksek CA-125 seviyelerine neden olabilmektedir (51). Bu nedenle CA-125, endometrioziste yeterli bir tanı testi için ideal kriterleri karşılamada henüz yeterli değildir.

2.1.4.5. Endometrial Sinir Lifleri

Endometriozis teşhisi için endometriyal biyopsiler de araştırılmaktadır. Son çalışmalar, endometriozisi olmayan kadınlara kıyasla endometriozisi olan kadınların endometriumunda sinir liflerinin sayısının arttığını göstermiştir. Bu sinir liflerinin, endometriumun fonksiyonel tabakasındaki küçük miyelinsiz duyuşal C lifleri olduğu bildirilmektedir. Bazı kanıtlar, hormon tedavisi gören endometriozis hastalarının, hormon tedavisi görmeyen endometriozis hastalarına kıyasla daha az sinir lifine sahip olduğunu göstermektedir. Bu çalışmalarda önemli bir sınırlama, infertilite ve kronik ağrılı bu karma hasta kohortlarında ağrı semptomları hakkında bilgi eksikliği olmasıdır (50).

2.1.5. Tedavi

Endometriozis ile ilişkili pelvik ağrısı olan kadınlarda medikal veya cerrahi yaklaşımlar uygulanabilir. Endometriozisde tedavi kararı, hastaların klinik başvuru nedenleri, (ağrı, infertilite, kitle) şikayetlerin şiddeti, hastalığın yaygınlığı, gebelik isteği, yaş, ilaç yan etkileri, cerrahinin riskleri, maaliyet düşünülerek ve hasta bazlı bireyselleştirilerek verilir. Endometriozis için kullanılan mevcut hormonal tedaviler ovulasyonu baskıladığı için, tedaviye alınacak hastaların spontan gebelik beklentisi olup olmadığı önem taşır. Endometriozisde cerrahi tedavi ile ilişkili riskler olması, iyileşme döneminin varlığı ve işlemin maaliyetli olması nedeniyle medikal tedavi ilk tercihtir. Ancak medikal tedaviye cevap vermeyen ve rekürren semptomları olan hastalarda endometriozisin cerrahi rezeksiyonu önerilir (55, 56).

Ameliyatın ağrı üzerindeki etkisi genellikle geçici olarak tatmin edici olsa da, komplikasyon riski çıkarılan lezyonun tipine göre değişir. Peritoneal implantlar güvenli bir şekilde giderilebilir. Ayrıca konservatif over cerrahisi (yani endometriotik kistlerinin over alınmadan eksizyonu) nispeten güvenli bir prosedürdür. Endometriomaların eksizyonu, kist vaporizasyonu veya pıhtılaşmasına göre daha iyi ağrı kesici ve daha düşük nüks ve daha yüksek gebelik oranları ile ilişkili görünmektedir. Ancak, ovaryan rezerve verilen zararları sınırlamak amacıyla alternatif yöntemler önerilmiştir; bunlar üç aşamalı tedaviyi (yani kist drenajı ve biyopsi ile laparoskopi, 3 ay boyunca GnRH agonistleri, rezidüel kist duvarının lazer vaporizasyonu ile ikinci laparoskopi) ve endometrioma duvarının çoğunun eksizyonunu lazerle birleştiren bir tekniği içerir (57-59).

Medikal tedavinin amaçları, ötopik ve ektopik endometriumun yanıtının büyük ölçüde benzer olduğu kavramına dayalı olarak, ovulasyonun inhibisyonu, menstrüasyonun ortadan kaldırılması ve stabil bir steroid hormon ortamının elde edilmesidir. Ek olarak, bazı ilaçlar endometriyal hücre proliferasyonunu baskılayarak hipoöstrojenik (GnRH agonistleri), hiperandrojenik (danazol, gestrinon) veya hiperprogestojenik (oral kontraseptifler, progestinler) bir ortam yaratır. Farmakolojik tedaviler semptomatiktir ve indirgeyici değildir: lezyonlar herhangi bir ilaçta, herhangi bir dozda, herhangi bir kullanım süresinde hayatta kalır ve tedavi kesildiğinde metabolik aktivitelerine devam etmeye hazırdır (60). Endometriozis tedavisinde kullanılan medikal ilaçlar Tablo 1’de gösterilmiştir (61).

Tablo 1: Endometriozis İçin Tıbbi Tedaviler

Sınıf	Ağrı Giderme Mekanizması	İlaç	Doz	Yan etki
Östrojen-progestin kombinasyonları	✓ Ovulasyon inhibisyonu ✓ Lezyonların desidualizasyonu veya atrofisi	✓ Monofazik östrojen-progestin*	Sürekli günlük oral	Atılım kanaması, meme hassasiyeti, mide bulantısı, baş ağrısı, ruh hali değişiklikleri
Progestinler	✓ Lezyonların desidualizasyonu veya atrofisi ✓ Anjiyogenezin inhibisyonu ✓ Matriks metalloproteinaz ile kolaylaştırılan büyümenin baskılanması ve ektopik endometriyum implantasyonu	✓ Depo Provera* ✓ Etonogestrel salan implant ✓ Noretindron asetat* ✓ Levonorgestrel salan IUS ✓ Medroksiprogesteron asetat ✓ Dienogest†	Her 3 ayda bir 104 mg SC 3 yıl için 1 günde 5 mg 5 yıl için 1 6 ay oral olarak 30 mg, ardından 2 ay boyunca 22 haftada bir 100 mg IM, daha sonra 4 ay boyunca ayda 200 mg IM günde 2 mg	Akne, kilo alımı, ruh hali değişiklikleri, baş ağrısı, ankanama, meme hassasiyeti, lipid anormallikleri (noretindron)
GnRH agonistleri	Gonadotropin sekresyonunun inhibisyonu ve ardından yumurtalık steroidogenezinin aşağı regülasyonu	✓ Löprolid deposu*† ✓ Goserelin*† ✓ Nafarelin*†	Aylık 3,75 mg IM (her 3 ayda bir 11,25 mg IM) Ayda 3,6 mg SC (her 3 ayda bir 10,8 mg IM) Günde iki kez intranazal olarak 200 mikrogram	Azalmış kemik yoğunluğu, atrofik vajinit, sıcak basması, baş ağrısı, eklem ağrısı
Androjenik steroidler	✓ Hipofiz gonadotropin salgısının inhibisyonu ✓ Yerel büyüme inhibitörü ✓ Östrojenik enzimlerin inhibisyonu	✓ Danazol*	Günde iki kez 100-400 mg oral 100 mg vajinal olarak günlük	Saç dökülmesi, kilo alımı, akne, hirsutizm
Antiandrojenler	Androjen reseptörünün rekabetçi bir şekilde inhibisyonu	✓ Siproteron asetat†	12,5 mg oral günlük	Saç dökülmesi, meme hassasiyeti, kilo alımı
GnRH antagonistleri	Gonadotropin sekresyonunun inhibisyonu ve ardından yumurtalık steroidogenezinin aşağı regülasyonu	✓ Elagoliks	150 mg oral günlük	Sıcak basması, lipid anormallikleri, azalmış kemik yoğunluğu
Aromataz inhibitörleri	Androjenlerin östrojenlere enzimatik (aromataz) dönüşümünün lokal blokajı	✓ Letrozol ✓ anastrozol	günde 2,5 mg oral günde 1 mg oral	Sıcak basması, baş ağrısı, azalmış kemik yoğunluğu
Seçici progesteron reseptör modülatörleri	Progesteron reseptöründe ovulasyon, agonist veya antagonist inhibisyonu	✓ Mifepriston ✓ Ulipristal asetat	günde 50 mg oral gün aşırı 15 mg oral	Lekelenme, kramp, baş dönmesi, baş ağrısı, mide bulantısı

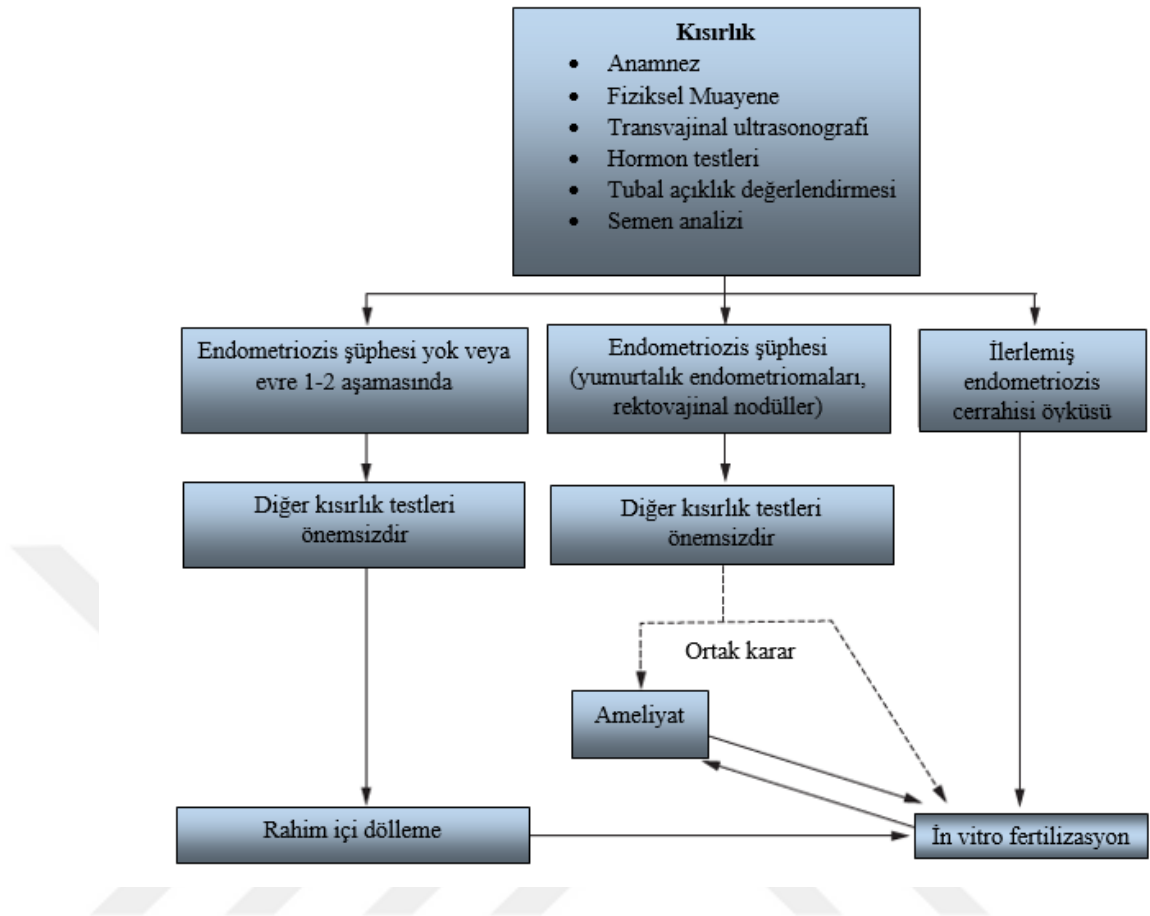
SC, deri altı; IUS, rahim içi sistem; IM, kas içinden; GnRH, gonadotropin salgılatıcı hormon.

* ABD Gıda ve İlaç İdaresi – endometriozis için onaylanmıştır.

† Amerika Birleşik Devletleri dışında monoterapi olarak kullanılır.

‡ Ekleme ile, yani günlük 5 mg noretindron asetat artı günlük 800 uluslararası birim D vitamini artı günlük 1.25 g kalsiyum.

Endometrioziste infertilite tedavisi için pelvik inflamatuvar etkilere dayanarak, iki olası terapötik seçenek düşünülebilir: değişen anatominin cerrahi olarak normalleştirilmesi veya elverişsiz pelvik ortamın bypas edilmesi. İlk durumda, adezyolizis pelvik organlar arasında normal ilişkileri yeniden kurabilir ve endometriotik lezyonların çıkarılması kalıcı inflamatuvar tetikleyiciyi durdurabilir. İkinci durumda, in vitro fertilizasyon (IVF) yapılabilir, böylece yapışıklık ve tüp açıklığı ile ilgili problemlerin üstesinden gelinebilir. Oositler doğrudan overlerden alınır ve embriyolar endometriyal boşluğa aktarılır, böylece pelvik ortamın zararlı etkilerine doğrudan maruz kalmaktan kaçınılır. Bununla birlikte, hem folikülogenez hem de endometriyal alıcılığın en azından kısmen bitişik zararlı peritoneal ortamdan etkilenebileceği göz önüne alındığında, bu yaklaşım endometriozisin olumsuz etkilerinin tam olarak üstesinden gelmeyebilir (1). Günümüzde daha farklı yaklaşımlar uygulansa da endometriozis ile ilişkili infertilite için 2014 yılında açıklanmış bir olası bir terapötik algoritma Şekil 4’te gösterilmiştir.



Şekil 4: Endometriozis temelli kısırlık (infertilite) tedavisi akış şeması (2)

2.2. UZUN KODLAMAYAN RNA'LAR (lncRNA)

2.2.1. Tanım

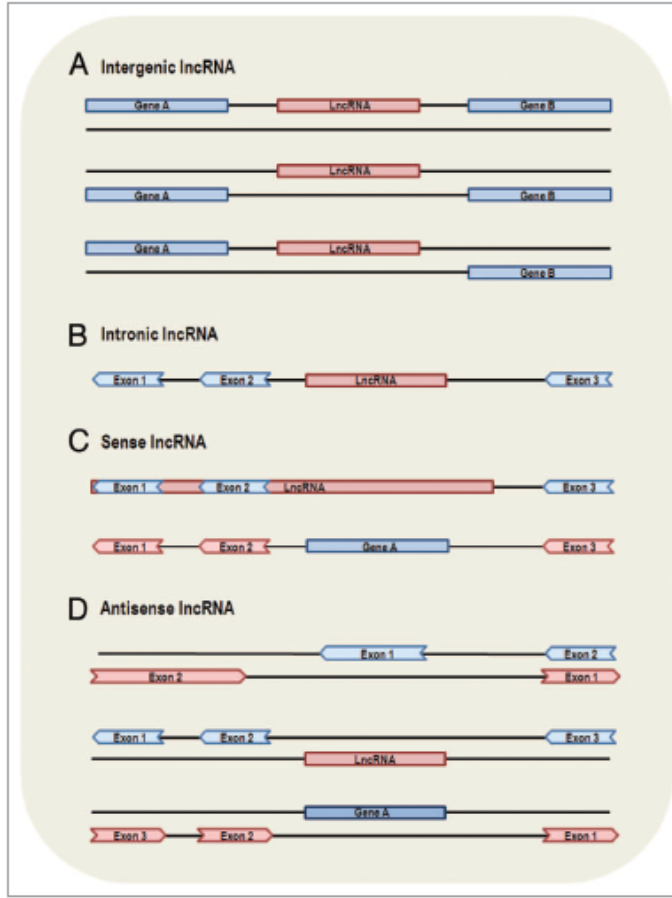
İnsan genomundan sentezlenen transkriptlerin sadece küçük bir kısmı protein ürünlerine dönüştürülmektedir (62). Protein kodlama kapasitesi olmayan transkriptler, kodlamayan RNA (ncRNA) olarak adlandırılmaktadır. Bu kodlamayan RNA'lar, uzunluklarına bağlı olarak iki ana gruba ayrılır. Küçük kodlamayan RNA'lar (Small Non-coding RNA: sncRNA), uzunlukları 200 nükleotidden daha kısadır ve büyük oranda mikroRNA'lar (miRNA) ve küçük nükleolar RNA'ları (snoRNA) içermektedir. Uzun kodlamayan RNA'lar (Long Non-coding RNA: lncRNA) ise; 200 nükleotidden daha uzun ve proteine translasyonu yapılmayan transkriptleri içeren bir gruptur. Yapılan

çalışmalar, insan genomu tarafından transkribe edilen 15,000 farklı lncRNA'nın olduğunu göstermektedir (63).

lncRNA ve mRNA arasında benzer ve farklı özellikler mevcuttur. lncRNA'lar genom boyunca transkribe olurlar. lncRNA'lar mRNA'lar gibi; RNA polimeraz II tarafından sentezlenir ve benzer olarak alternatif kırılmaya uğrar, 3'-poliadenilasyonu ve 5'-şapka eklenir. Farklı olarak ise, lncRNA'lar mRNA'lar gibi açık okuma çerçeveleri içermezler. lncRNA'lar mRNA'lar ile kıyaslandığında türler arasında daha az korunmuşluk özelliği gösterirler (64).

lncRNA'lar genomik lokalizasyonlarına göre, intergenik veya intronik lncRNA'lar, sens (kodlayan, 5'>3') veya antisens (kalıp, 3'>5') yönelimli olarak gruplandırılabilir. Genomda kodlama bölgeleri arasına serpiştirilmiş çok sayıda kodlamayan bölge vardır. Genler arasında yer alan intergenik bölgelere lokalize olan lncRNA genlerden intergenik lncRNA'lar (lincRNA'lar) sentezlenir (Şekil 5A) ve bunun aksine, tamamen protein kodlayan genlerin intronlarına lokalize genlerden transkribe edilenler intronik lncRNA'lar olarak adlandırılır (Şekil 5B) (65). lincRNA'ların ve intronik lncRNA'ların farklı transkripsiyon aktivasyon mekanizmaları yoluyla düzenlendiği ve farklı poli(A) modifikasyonlarına sahip olduğu düşünülmektedir (66). İşlevleriyle ilgili olarak intronik lncRNA'ların yalnızca küçük bir kısmı araştırılmıştır. Buna karşılık, farklı mekanizma türleri aracılığıyla işlev gören çok sayıda lincRNA vardır (67, 68). lincRNA'ların mRNA'lara benzer şekilde transkripsiyonel olarak aktive oldukları, intronlardan ve antisens transkriptlerinden daha fazla korundukları, protein kodlayan genlerden daha dokuya özel olarak ifade edildikleri ve intronik lncRNA'lardan daha kararlı oldukları bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda, lincRNA'ların, embriyonik kök hücre pluripotensinden hücre proliferasyonu ve kanser ilerlemesine kadar birçok hücresel süreçte önemli işlevleri yerine getirdiği gösterilmiştir (69-71). Sens lncRNA'lar, ekzon içeren protein kodlayan genler gibi anlamlı ("sense") dizisinden kopyalanır. Sens lncRNA genleri protein kodlayan genlerin bir kısmı ile örtüşebilir veya bir protein kodlayan genin tüm dizisini kapsayabilirler (Şekil 5C). Antisens lncRNA'lar, protein kodlayan genlerin antisens (kalıp zincir, anlamsız) dizisinden kopyalanır. GENCODE veritabanına göre, antisens lncRNA'lar üç şekilde görünebilir: protein kodlayan genlerin antisens dizisinden sentezlenen antisens lncRNA genlerinin, ekzonları bir sens geninin ekzonuyla örtüşebilir, bir sens genin intronunda

olup, bu sens geni ile ekzon-ekzon örtüşmesi olmayabilir veya bir antisens lncRNA geninin intronunda bir sens genin tüm dizisini kapsayabilir (Şekil 5D) (72).

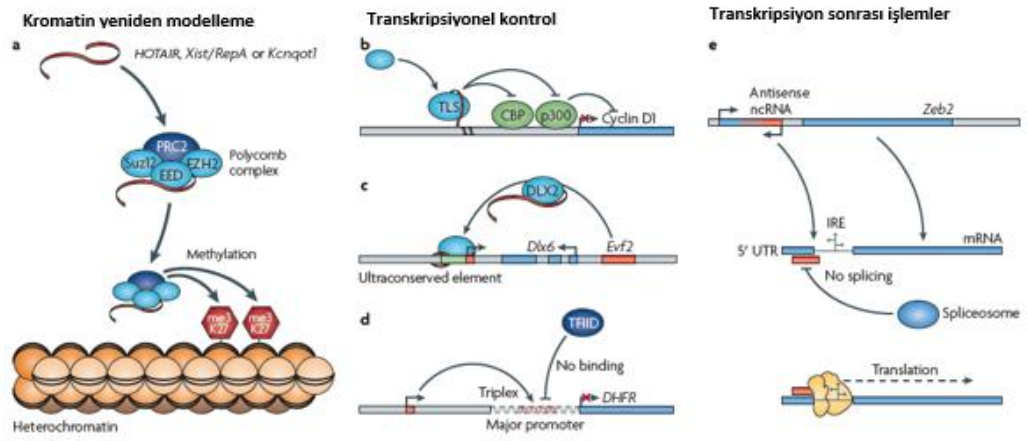


Şekil 5: lncRNA'ların genomik lokalizasyonları. (Protein kodlayan genler ve ekzonları mavi renkle, lncRNA'lar ve ekzonları ise kırmızı renkle temsil edilmektedir.) (65)

lncRNA'ların hücre içerisindeki lokalizasyonlarına bakıldığında ise; sitoplazmada bulunabildikleri, ancak özellikle çekirdeğin kromatin bölümlerinde yoğun olarak bulunduğu görülmüştür (72). Aynı zamanda diğer hücre içi alanlara da lokalize olabilirler. Yapılan çalışmalar, ribozomların sıklıkla sitoplazmik lncRNA'nın konumlandığı alan olduğunu göstermektedir (73). Son zamanlarda yapılan lncRNA in situ hibridizasyon çalışmaları, *Drosophila* lincRNA'larının, gelişim dönemlerinde spesifik lokalizasyonlarda bulunduğunu göstermiştir (74).

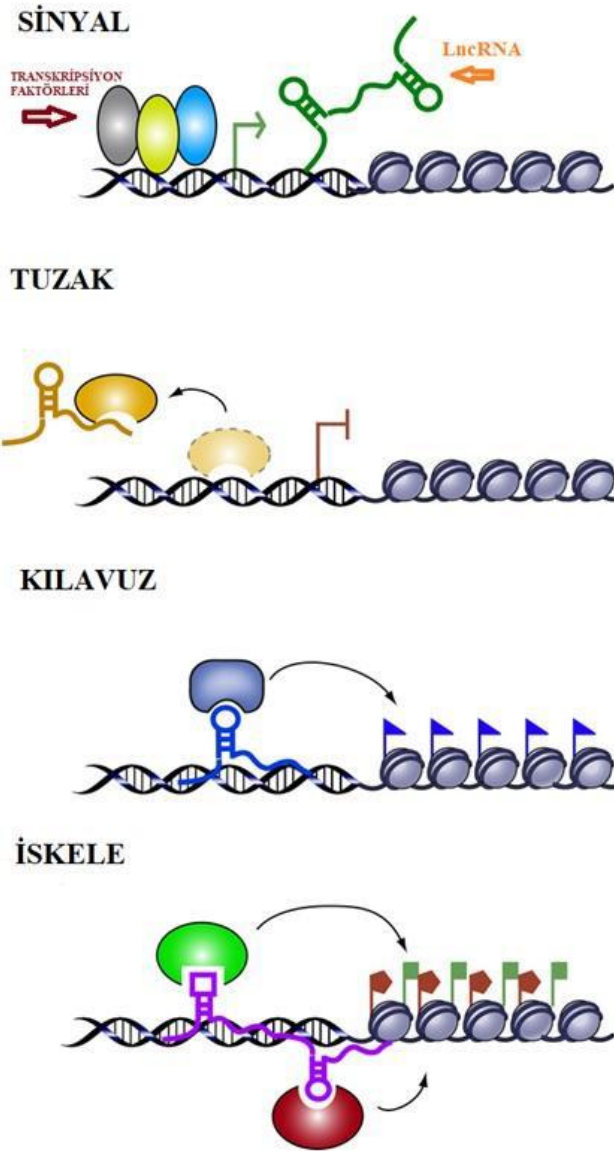
lncRNA'lar kromatin modifikasyonu, transkripsiyon ve transkripsiyon sonrası işleme düzeyinde gen ekspresyonunun düzenlemesinde rol alırlar (Şekil 6) (75). lncRNA'lar, kromatin yeniden modelleme komplekslerini spesifik genomik lokuslara olarak epigenetik değişikliklere aracılık edebilir. Kromatin değiştirici komplekslerin

lncRNA'lar ile işbirliği içinde olması, genomik damgalama/baskılanma (“imprinting”) gibi epigenetik mekanizmaları aydınlatmıştır. Bunun en spesifik örneği, X kromozomu inaktivasyonuna aracılık eden lncRNA Xist'tir (76). lncRNA'ların tamamlayıcı dizileri tanıma yeteneği, aynı zamanda, mRNA'ların transkripsiyon sonrası işlenmesindeki çeşitli adımları düzenlemeye uygun olan yüksek düzeyde spesifik etkileşimlere de izin verir, bunlara ekleme, düzenleme, taşıma, çeviri ve bozunma dahildir (75).



Şekil 6: Uzun kodlamayan RNA'ların (lncRNA) işlevleri.

lncRNA'ların moleküler mekanizmaları; sinyal, tuzak, kılavuz ve iskele olmak üzere 4 farklı şekilde sınıflandırılabilir (Şekil 7) (77).



Şekil 7:lncRNA'ların moleküler fonksiyonları (77)

lncRNA'lar hücre tipine özgü ekspresyon gösterir ve çeşitli uyarılara yanıt verir, bu da ekspresyonlarının önemli ölçüde transkripsiyonel kontrol altında olduğunu gösterir. Bu nedenle, lncRNA'lar moleküler sinyaller olarak görev alır, gen düzenlenmesinde zamanı ve lokalizasyonu belirleyen moleküller olarak işlev gösterirler (77). lncRNA'ların moleküler sinyal olarak görev aldığı baskılanma, parental durumuna göre allel özgüllüğü kavramını en iyi şekilde gösteren bir epigenetik düzenleyici mekanizmadır. Memeliler, biri anneden diğeri babadan kalıtılan her otozomal genin iki alelini taşıyan diploid organizmalardır. Çoğu durumda, her iki ebeveyn allel eşit olarak ifade edilirken, bir grup genin ifadesi bir epigenetik mekanizma tarafından anne

(maternal) veya baba (paternal) allel ifadesi ile sınırlandırılan bir baskılanmaya sahiptir (77). X inaktivasyonu (XCI), dişi hücrelerde bir X'i inaktive ederek memeli erkekleri ve dişileri arasındaki gen ekspresyonunu eşitleyen bir süreçtir. *Xist*, XCI'de önemli bir rol oynayan iyi bilinen bir lncRNA'dır (78). Dişi gelişimi sırasında, *Xist* RNA, aktif olmayan X'ten eksprese edilir ve kopyalandığı X kromozomunu kaplayarak gen ifadesinin kromozom çapında baskılanmasına yol açar. *Tsix* adlı örtüşen bir antisens lncRNA, cis olarak *Xist* ifadesini bastırırken, ifadesi XCI sırasında biriken lncRNA *Jpx*, etkin olmayan X üzerinde *Xist*'i etkinleştirir (79). Dış uyaranlara yanıt olarak gen aktivitesinin modülasyonunun başka bir örneği, DNA hasarı üzerine birkaç lncRNA'nın kopyalandığı memeli *CDKN1A* geninin promotöründe bulunur. *PANDA* adlı bu lncRNA p53'e bağlı olarak indüklenir. *PANDA*, p53'ün yokluğunda DNA hasarı ile aktive edilemez. DNA hasarından sonra p53, doğrudan *CDKN1A* promotörüne bağlanır ve *PANDA*'yı aktive eder; *PANDA* daha sonra proapoptotik genlerin ekspresyonunu sınırlamak için transkripsiyon faktörü NF-YA (CCAAT dizisi ile bağlanan transkripsiyon faktörü, Nüklear Faktör-Y'nin A subünitesi) ile etkileşime girer ve hücre döngüsünün durdurulmasını sağlar, bu da hücre büyümesi kontrolünde lncRNA'ların potansiyel olarak önemli rolleri olduğunu göstermektedir (80).

Bazı lncRNA'lar hedefleri olan proteinlere bağlanarak yem görevi görür. Bu şekilde transkripsiyon faktörlerini ve diğer proteinleri kromatinden uzaklaştırır ve hedef proteinin işlevini aşağı regüle etmiş olur. Bu şekilde 'tuzak' işlevi görürler (77). Son zamanlarda, lncRNA *GAS5* (büyüme durmasına özgü 5 "growth arrest-specific transcript 5"), hücrelerin nispi bir glukokortikoid direnci durumu yaratabileceği yeni bir mekanizma olarak tanımlanmıştır. *GAS5*, kök halka yapılarından birinden bir RNA motifi oluşturarak glukokortikoid reseptörünü baskılar ve glukokortikoide duyarlı genlerin promotör bölgelerinde bulunan hormon yanıt elemanlarına eşdeğer DNA motifini taklit eder. *GAS5* daha sonra moleküler bir tuzak görevi görerek glukokortikoid reseptörünün DNA bağlama alanına bağlanmak için rekabet eder ve kromozom ile etkileşimini etkin bir şekilde engeller. Bu lncRNA, hedef dokudaki steroid hormon aktivitesinin modülasyonunda önemli bir bileşen olarak değerlendirilmiştir (81).

lncRNA'nın üçüncü fonksiyonunu kılavuz oluşturur, RNA proteini bağlar, ardından ribonükleoprotein (RNP) kompleksinin lokalizasyonunu spesifik hedeflere yönlendirir. lncRNA'lar, cis (komşu genler üzerinde) veya trans (uzak konumlu genler)

gen ifadesindeki değişiklikleri yönlendirebilir (77). *AIR*, *XIST* ve *Kcnq1ot* molekülleri, komşu bölgelerin susturulmasını sağlayan cis etkili lncRNA'lara örnek verilebilirken (82, 83), *HOTAIR* ve *lincRNA-p21* ise kromozomlar boyunca trans etki gösteren moleküllere örnektir (84, 85).

Dördüncü grup ise iskele ("scaffold") görevi gören lncRNA grubudur. Bu lncRNA'lar RNP komplekslerini oluşturabilmek için çok sayıda proteini bir araya getirebilir. lncRNA-RNP ise kromatin üzerinde histon modifikasyonlarını etkileyecek şekilde hareket eder (77). *LincRNA-p21* bu gruba örnek verilebilir ve hnRNP-K ile işbirliğine girerek hedef genlerin baskılanmasını sağlar (69).

2.2.2. lncRNA'ların Hastalık İlişkileri

lncRNA'lar nörolojik hastalıklar, kanser gibi çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Çoğu araştırma, hastalık ve hastalıkla ilişkili olmayan durumlar arasındaki lncRNA'ların ekspresyon seviyelerindeki farklılıklara dayanmaktadır (86). Daha kesin kanıtlar elde edebilmek için, genom çapında yaklaşımlardan elde edilen sonuçların incelenmesi önerilmektedir (87). Hastalık ilişkisine ilişkin kanıtlar, fare gibi model organizmalardaki yönlendirilmiş deneylerden de elde edilebilir. Böyle bir örnek çalışma, kemirgenlere özgü kodlamayan bir RNA olan nöronal translasyonel kontrol ile ilişkili BC1 ("brain cytoplasmic") ile ilgilidir. BC1 eksikliği olan fareler, yarı doğal bir ortamda tutulduklarında, daha az keşfetme ve artan kaygı sergilerler ve yabani tipe göre artan ölüm oranına sahiptir (88). BC1'in nöronal fenotipi, hem fragil X zeka geriliği geninin (*FMR1*) ürünü olan FMRP ile hem de FMRP tarafından düzenlenen mRNA'lar ile etkileşimi ile bağlantılıdır. FMRP etkileşimi için gerekli olan, translasyonu baskılayan stabil bir FMRP-BC1-mRNA kompleksi oluşturan BC1'in 5' "stem-loop" yapısıdır (89).

Kodlamayan RNA'lardaki mutasyonların hastalıkla ilişkisini belirlemek için yapılan bir diğer çalışma ise, insan spinoserebellar ataksi tip 8'in (SCA8) bir fare modeli üzerinde gösterilmesidir (90). Hastalarda, *KLHL1* genine antisens transkript olarak kopyalanan ataksin 8 karşı iplikçik (*ATXN8OS*) olarak adlandırılan bir kodlamayan RNA'daki trinükleotit (CUG) artışının olduğu gösterilmiştir (91). DNA'da bu patojenik CTG artışına sahip transgenik fareler, insanlarda da olduğu gibi en yüksek CTG sayısı olan farelerin ilerleyici bir nörolojik fenotipe sahip en kötü etkilenen fareler olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada, hem kodlamayan RNA'da (*ATXN8OS*) hem de karşı

zincirden sentezlenen işlev kazanma mekanizmaları yoluyla poliglutamin ekspansiyonuna sahip bir proteini kodlayan gendeki (*ATXN8*) trinükleotit artışının SCA8 hastalığına neden olduğu gösterilmiştir (90).

lncRNA'ların ekspresyon değişimleri, kanser gelişiminde de etkin olarak rol almaktadır (92, 93). İlk olarak, spesifik ncRNA'ların aşırı ekspresyonunun birkaç tümörle ilişkili olduğu bulunmuştur. Örneğin, *MALAT1*'in artan ekspresyonu, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, uterus endometriyal stromal sarkom ve hepatoselüler karsinom ile ilişkilidir (94-96). İkincisi, baskılanan ncRNA'ların anormal ekspresyonu, farklı kanser türlerinde gösterilmiştir; lncRNA ile ilgili genomik baskılanma gösteren *KCNQ1* gen kümesinin bozulması, insan Beckwith-Wiedemann sendromu ve Wilms tümörü ile ilişkilidir (97). Ayrıca, *IGF2* lokusundan kopyalanan baba tarafından eksprese edilen antisens *PEG8/IGF2AS*, Wilms tümör örneklerinde, tümörlere komşu normal böbrek dokularında gözlenen on ila yüz kat daha yüksek seviyelere kadar aşırı eksprese edilir (98). İlginç bir şekilde, *H19* lncRNA'nın kendisinin *IGF2*'nin baskılanan ifadesinde belirgin bir işlevi olmamasına rağmen, tümörögenез için esastır. Bu nedenle, c-Myc, tümörögenез sırasında doğrudan *H19* transkripsiyonunu indükler ve *H19* lncRNA, insan tümör büyümesi için temel bir faktör olarak gösterilir (99).

lncRNA'lar, önemli bir ölüm nedeni olan kardiyovasküler hastalıklarla da bağlantılıdır ve hem hasta verilerinde hem de fare modellerinde incelenmiştir. Miyokard enfarktüsü ile önemli ölçüde ilişkili birkaç genomik bölgede, örneğin *MIAT* ve *ANRIL* lncRNA genlerinin lokalize olduğu belirlenmiştir (87, 100). *ANRIL* lokusunun büyük bir bölümünü içeren 70 kb'lik bir bölgenin delesyonu, yapılan fare deneylerinde mortalitenin artmasına neden olmuştur (101).

2.2.3. Endometrioziste lncRNA'lar

Endometriozis patogenezi ile lncRNA ilişkisine dair bulgular, hasta örnekleri ve hayvan modellerinden faydalanılarak kontrol ve hastalık kohortları arasındaki farkları saptamak için yüksek verimli tarama teknolojileri kullanılarak büyük ölçüde ortaya çıkarılmıştır (102). Diğer birçok hastalıkta olduğu gibi endometriozis için de genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (GWAS) yapılmıştır. Bu yaklaşım, hastalık ile ilişkili

varyantları ve genomik bölgeleri belirlemek için geniş bir kohortta genom boyunca tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP'ler) belirlenmesini sağlar. GWAS çalışmaları ile tanımlanan SNP'ler genellikle intergenik bölgelerde bulunur ve bu nedenle yakındaki genlerin düzenlenmesi ile ilişkili olabilirler. Bu değişimler, bir lncRNA geninde olabilir ve dolayısıyla düzenleyici işlevini etkileyebilir (103, 104). Genom çapında yapılan bu çalışmalarda, lncRNA lokuslarında endometriozis patogeneziinde etkili olabilecek genetik varyantlar tanımlanmıştır. Bu çalışmalar, endometriozis ile ilişkili genetik varyantların, çeşitli mekanizmalar aracılığı ile lncRNA'ların gen düzenleyici işlevini bozarak hastalığa yatkın hale getirebileceğini ileri sürmektedir (103, 104) .

Bugüne kadar yapılan genom çapında transkriptom çalışmaları, temelde tanımlayıcı olmakla birlikte deneysel doğrulama sadece birkaç seçilmiş aday ncRNA ile sınırlı kalmaktadır. Yapılan ilk çalışmalarda, çoğunlukla lncRNA'ların ve mRNA'ların ekspresyonunu değerlendirmek için mikrodizin platformları kullanılmıştır. Bu konuda yapılan ilk çalışma, Sun ve ark. tarafından yapılmıştır (105). Bu çalışmada, lncRNA ekspresyon mikrodizin profillemesi ile otolog ötopik endometriyal örneklerle kıyasla over endometriozis lezyonlarında lncRNA ve mRNA ekspresyonu arasındaki ilişki genom çapında incelenmiştir. Çalışma kohortunda farklı şekilde ifade edilen 948 lncRNA ve 4088 mRNA tanımlanmış ve qRT-PCR kullanarak ilk 10 lncRNA adayının farklı ifadeye sahip oldukları doğrulanmıştır. mRNA'ların ekspresyon seviyeleri ile de karşılaştırma yapıldığında, bu çalışmadaki lncRNA'ların, endometriozis patogenezi ile ilişkili olduğu bilinen anjiyogenez, östrojen üretimi ve immün yanıt gibi süreçlerde yer aldıkları belirlenmiştir (105).

Yapılan başka bir çalışmada Cai ve ark., bir endometriozis sıçan modelinde lncRNA ve mRNA ekspresyonunun profilini belirlemek için mikrodizinler kullanmış, 115 yukarı regüle ve 51 aşağı regüle edilen lncRNA ve 182 farklı şekilde eksprese edilen mRNA transkriptleri tanımlanmıştır (106). Karşılaştırmalı ekspresyon analizinde, endometriozisle olası bir fonksiyonel ilişkiyi gösteren, dört protein kodlayan mRNA'ya (*Adamts7*, *P2ry6*, *Dlx3* ve *TP53*) benzer bir ekspresyon paterni gösteren beş lncRNA (*LOC102551276*, *NONRTT006252*, *LOC103691820*, *LOC102546604* ve *NONRATT003997*) belirlenmiştir (106).

Wang ve ark., bir transkriptom dizileme ile, endometriozisi olan ve olmayan hastalardan alınan serum ve doku örneklerinde lncRNA'ların ekspresyon profilini

araştırmıştır. Farklı olarak eksprese edilen lncRNA'ların qRT-PCR doğrulaması yapılmış ve ardından, hastalık için invaziv olmayan biyobelirteçler olarak kullanılabileceğini öne sürdükleri kan dolaşımındaki beş lncRNA (*NR_038395*, *NR_038452*, *ENST00000482343*, *ENST000000544649* ve *ENST00000393610*) tanımlanmıştır (107).

Liu ve ark. yaptıkları çalışmalarında endometriozis için bir biyobelirteç olarak *H19* lncRNA ekspresyon düzeyini analiz etmiştir. Endometriozis hastalarının hem ektopik hem de ötopik endometriyumundaki *H19* ekspresyon seviyesinin normal endometriyumdan anlamlı derecede yüksek olduğunu bulmuşlardır. Endometriozis lezyonlarında *H19* 'un aşırı ekspresyonu, infertilite, hastalığın tekrarlama, iki taraflı yumurtalık lezyonları, artan CA125 seviyesi ve hastalık evresinde ilerleme ile ilişkilendirilmiştir (108).

lncRNA-*HOTAIR*, *HOX* gen ailesi ekspresyonunun kritik bir düzenleyicisi olarak bilinmektedir. *HOXA10* ve *HOXA11* ekspresyonunda meydana gelen değişiklikler endometriozise bağlı infertilite ile ilişkilendirilmiştir (109). Mekanik olarak, *HOTAIR*, hedef gen lokuslarında H3K27 tri-metilasyonu veya H3K4-demetilasyonunun sağlanmasına öncülük etmek için PRC2 veya REST/CoREST kromatin yeniden modelleme kompleksi ile etkileşime girer ve bu da hedef gen susturulmasına neden olur (110). Bu değişiklikler, *HOTAIR*'ın termostabilitesini değiştirerek *HOXD10* ve *HOXA5* genlerinin epigenetik susturulmasına yol açar ve daha ciddi endometriozis ile ilişkilidir (111).

Yapılan çalışmalar, lncRNA'ların endometrioziste miRNA süngerleri gibi davranabileceğini göstermektedir (112-114). Bu durumda, hem lncRNA'da hem de hedeflenen protein kodlayan gende miRNA için bir bağlanma bölgesi mevcuttur ve lncRNA'nın ifadesi ile protein kodlayan gen arasında bir ilişki vardır. Endometrioziste bu durumun ilk kanıtlandığı örnekte, *H19* lncRNA'nın azalan ekspresyon seviyelerinin, endometrial stroma hücrelerinin proliferasyonunun azalmasıyla sonuçlanan *IGF1R* ekspresyonunu inhibe eden let-7 miRNA aktivitesindeki artış ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (6).

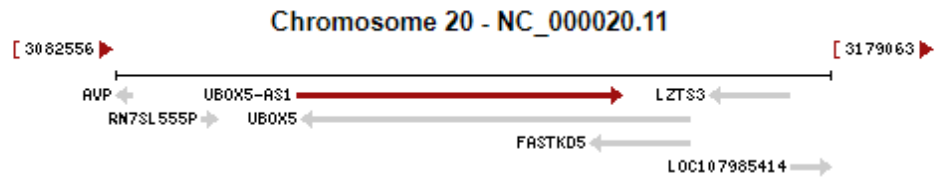
Hudson ve ark.'ları tarafından yayınlanan derleme makalede, endometriozis patogenezinin, spesifik lncRNA'ların anormal ekspresyonu ile ilişkilendirildiği belirtilmiştir. lncRNA'ların ekspresyon profilindeki değişiklikler, genetik yatkınlık veya

bilinmeyen bir çevresel faktöre bağlı olabilir. Bu da epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT), anjiyogenez, lezyon oluşumu ve büyümesi, endometriozis hücresinin hayatta kalması, proliferasyon ve invazyon, oksidatif stres, otofaji ve endometrial reseptivite dahil olmak üzere patogenetik süreçleri etkiliyor olabilir (102).

2.2.4. Araştırmaya Dahil Edilen lncRNA'lar

2.2.4.1. UBOX5

Yapılan bir çalışmada, ovaryan endometriozisinde insan transkriptom dizisi kullanılarak araştırılan 1682 lncRNA'lardan biri, kromozom üzerindeki lokasyonu 20p13 (Şekil 8) olan *UBOX5* antisens RNA 1 veya *UBOX5-AS1* (*UBOX5*)'dir (Kromozom 20: 3.106.913-3.150.867/NR_038395). *UBOX5* lncRNA'nın, ovaryan endometriozisin ektopik endometriyumunda yüksek oranda eksprese edildiği belirlenmiştir (107). Ancak endometrioziste işlevi hakkında henüz çok az bilgi mevcuttur.



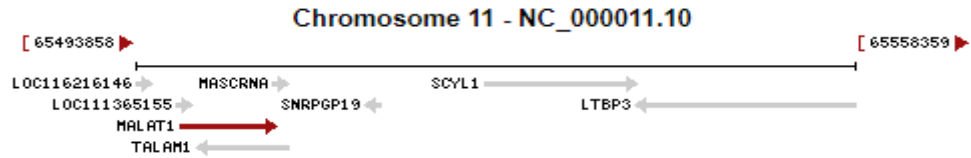
Şekil 8 : *UBOX5*'in kromozomal lokasyonu
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=lncRNA%20UBOX5-AS1>)

Endometriozis patogeneğinde önemli bir mikroçevresel faktör, hipoksidir (115). Hipoksi ile indüklenebilir faktör-1 α (HIF-1 α), hücresel hipoksik tepkilere aracılık eden anahtar düzenleyicidir (116). Yapılan çalışmalarda, HIF-1 α 'yı kodlayan genin yukarı regülasyonu, apoptoz, proliferasyon, migrasyon, invazyon ve EMT gibi önemli biyolojik olayların düzenlenmesinde yer alan sayısız genin aktivasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (117). İnsan endometriozisinin patogeneğinde önemli bir rolü olan EMT ise, hücre göçü, istila ve metastazın başlamasıyla ilgili iyi bilinen bir fizyolojik süreçtir (118). Bu süreç, hipoksi ile ilişkili sinyal yolları tarafından düzenlenir. Liu ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, hipoksik endometriyal epitel hücrelerinde *UBOX5*'in ekspresyon modellerini ve işlevi araştırılmıştır. Bu çalışmada, *UBOX5*'in HIF-1 α sinyal yoluyla hipoksi tarafından aktive edildiğini gösterilmiştir. *UBOX5*'in hipoksi ile

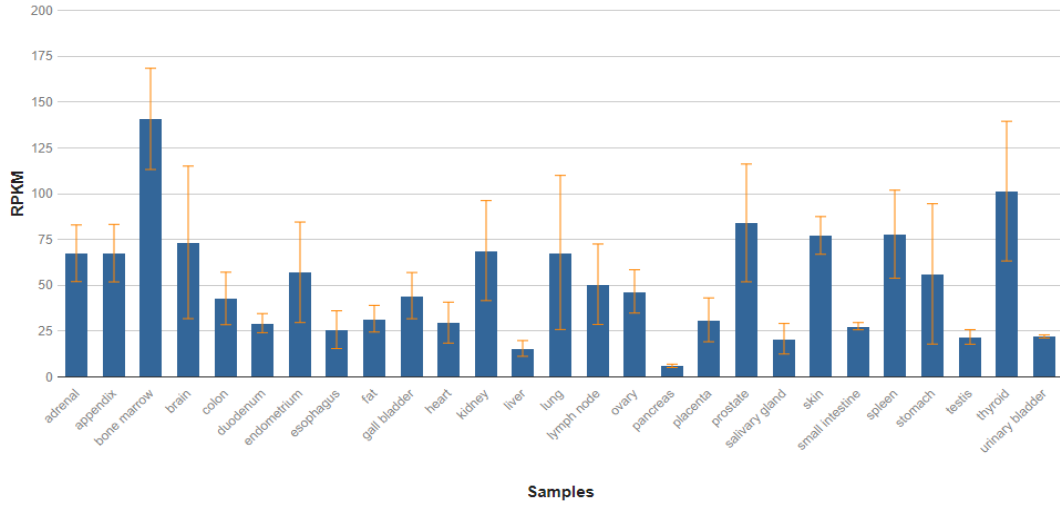
indüklenen ekspresyonu, endometriyal epitel hücrelerinin istilasını ve EMT'sini desteklemektedir. Hipoksi, hem *UBOX5* ekspresyonunu HIF-1 α 'ya bağımlı bir şekilde artırabilir hem de endometriyal epitel hücrelerinde EMT'yi uyarabildiği gösterilmiştir (119). Bu tez çalışmasında araştırılmak üzere seçilen lncRNA adaylarından biri *UBOX5* olup, endometriozis hastalarının doku ve lökositlerindeki ifade seviyelerindeki değişimleri araştırıldı.

2.2.4.2. *MALAT1*

MALAT1, metastazla ilişkili akciğer adenokarsinomu transkript 1 (ing: "metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1"), en kapsamlı olarak araştırılan lncRNA'lardan biridir. Ayrıca nükleer zenginleştirilmiş bol transkript 2 (*NEAT2*), *HCN*, *LINC00047*, *NCRN00047* ve *PRO2853* olarak da isimlendirilir. *MALAT1* geni 8000'den fazla baz içerir ve 33 memeli türü boyunca yüksek düzeyde korunmuşluk seviyesi gösterir (120). Kromozom üzerindeki lokasyonu 11q13.1 (kromozom 11: 65,497,688-65,506,516) şeklindedir (Şekil 9). *MALAT1*, hemen hemen tüm insan dokularında eksprese edilir (121) (Şekil 10). Keşfedilmesinden bu yana, çeşitli çalışmalardan elde edilen veriler, biyogenezi, hücrel ve moleküler işlevleri hakkında bilgi sağlamıştır (122).

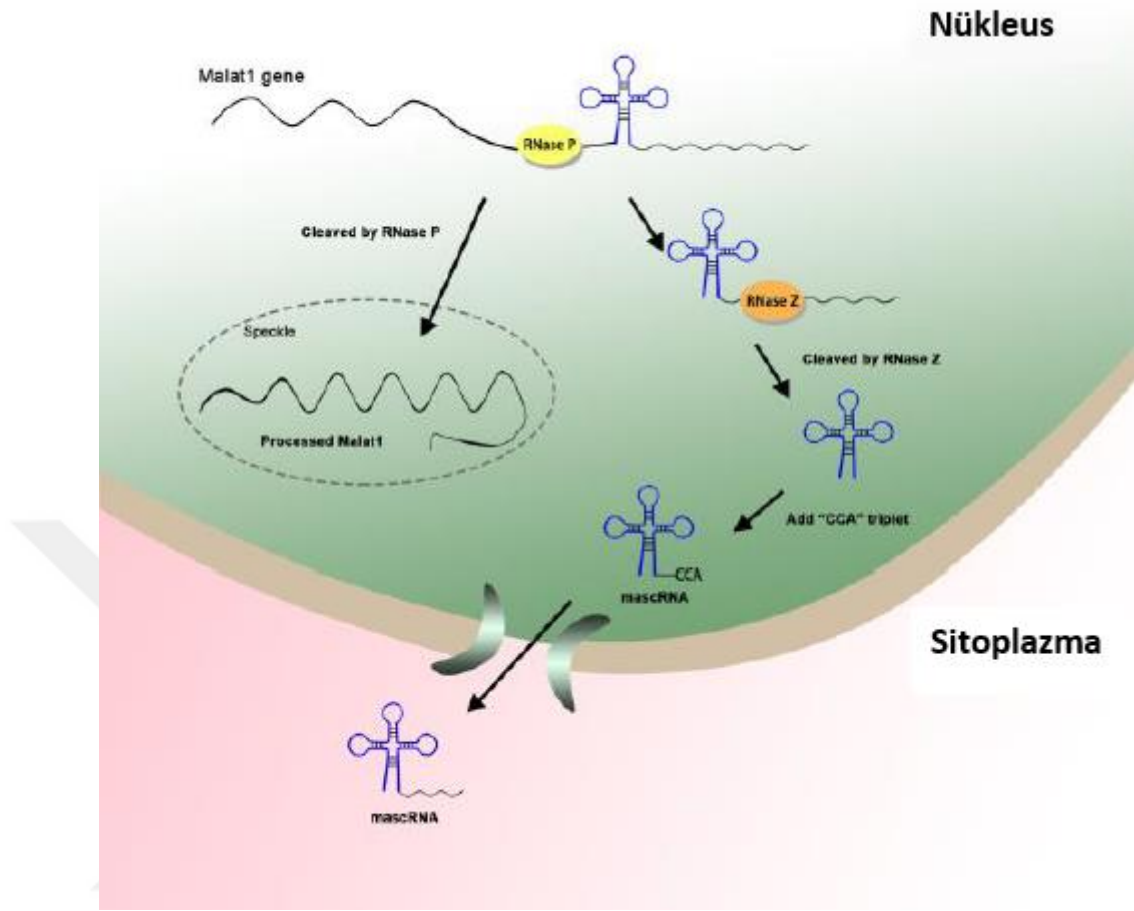


Şekil 9 : *MALAT1* geninin kromozom lokasyonu
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/378938#gene-expression>)



Şekil 10 : *MALAT1* 'in çeşitli dokulardaki ekspresyon profili
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/378938#gene-expression>

MALAT1 geni, 3' ucundan tRNA benzeri küçük bir ncRNA'nın (mascRNA) RNase P işlenmesi ile uzun kodlamayan bir RNA'ya dönüşen öncü bir transkript üretir. Elde edilen olgun transkript, kanonik bir poli(A) kuyruğundan yoksundur, ancak bunun yerine 3' ucu üçlü yonca yapısı ile korunmuştur. Bu transkript, ribonükleoprotein kompleksleri için moleküler yapı iskeleleri oluşturduğu düşünülen çekirdekte tutulur. *MALAT1* işlenme mekanizması Şekil 11'de gösterilmiştir (122).



Şekil 11: MALAT1 biyogenezi (122)

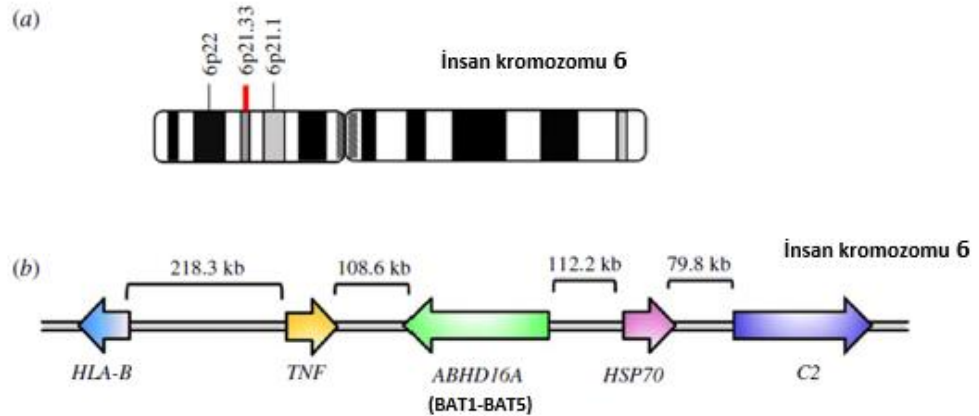
MALAT1 lncRNA ilk olarak akciğer kanseri metastazı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (94). Daha sonra yapılan çalışmalarda *MALAT1*'in, tümör hücrelerinin çoğalması, apoptoz, hücre göçü, istila ve metastatik yayılmasında rol oynadığı ortaya çıkarılmıştır (123). Endometriozis de iyi huylu bir metastatik hastalık olarak kabul edilebilir ve ayrıca endometriyal dokunun istila etme, metastaz yapma ve tekrarlama yeteneği nedeniyle kansere çok benzer olduğu bilinmektedir (124). Liang ve ark. yaptıkları bir çalışmada, *MALAT1* ekspresyonunun ektopik endometriyal dokularda ötopik endometriyal dokulara kıyasla önemli ölçüde yukarı regüle olduğunu göstermiştir (7). J. Yu ve ark.'nın yaptıkları çalışma sonuçlarında, *MALAT1*'in, NF- κ B/iNOS sinyal yoluyla endometriyal hücre apoptozunu kolaylaştırabildiğini ve endometriyal hücre proliferasyonunu veya invazyonunu baskılamak için MMP-9 (metalloproteinaz 9) ekspresyonunu değiştirerek endometriozis patogenezi modüle edebildiğini

göstermiştir (125). Bu tez çalışmasında, *MALAT1*, endometriozis hastalarındaki ifade seviyelerindeki değişimlerini gözlemlemek ve inflamasyonla ilişkisini ortaya çıkarabilmek için aday lncRNA olarak seçildi.

2.2.4.3. *BAT5*

BAT5 (insan lenfosit antijeni B-ilişkili transkript 5, ayrıca *ABHD16A* olarak da isimlendirilir), ABHD metabolik serin hidrolaz ailesi içerisinde yer alan, 63 kDa'lık bir proteindir (126). *BAT5* aktivitesinin biyokimyasal fonksiyonu, substratları ve ürünleri henüz yeterince tanımlanmamıştır. Yapılan bir çalışmada, insanlarda *BAT5* genindeki bir polimorfizmin, Kawasaki hastalığına ve koroner arter anevrizmasına duyarlılıkla ilişkilendirilmiştir (127). Başka bir çalışmada ise, domuzlarda, *BAT5*'teki tek bir nükleotid polimorfizminin sırt yağ kalınlığı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (128), bu da *BAT5*'in adipoz doku fonksiyonu ve lipid metabolizmasında rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

İnsan *ABHD16A* geni, 6p21.33 kromozomunda bulunur. Bu genin 21 ekzonu ve ikisi proteinleri kodlayan (NM_001177515.1 ve NM_021160.2), diğer iki transkripti ise uzun kodlamayan RNA'lara (NR_033488.1 ve NR_033489.1) transkribe olan dört farklı transkripti vardır. *ABHD16A* ve *BAT2-BAT5* genleri, tümör nekroz faktörü (TNF) ve kompleman gen kümesi C2 genleri ile yakından ilişkilidir ve insan majör histouyumluluk kompleksi sınıf III (MHC III) bölgesinde yer alır (129). *ABHD16A* geninin konum özellikleri nedeniyle, *BAT1-BAT5* proteinlerinin bağışıklıkla ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (Şekil 12) (130).



Şekil 12: *BAT5* kromozomal lokasyonu (130)

Yapılan bir mikrodizin tabanlı uzun kodlamayan RNA (lncRNA) ekspresyon profili çalışmasında, *BAT5* lncRNA'nın koroner arter anevrizmanının yeni bir biyolojik belirteci olabileceğini göstermiştir (131), bu çalışmada *BAT5* lncRNA olarak tanımlanmıştır. Bu verilere göre, *BAT5*, endometriozisde ekspresyon seviyelerini belirlemek amacıyla bu tez çalışmasında aday lncRNA olarak seçilmiştir.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Araştırma Grupları

Göztepe Prof. Dr. Süleyman Yalçın Şehir Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği'ne tedavi amacı ile başvuran ve operasyon planlanan hastalardan (n:32) menstruel siklusun foliküler fazında ovarian endometriozis (endometrioma) dokusu (n:23) ve periferik kanları (n:28) elde edilebildi. Toplam 32 hastanın dördünde operasyon esnasında lezyonlu doku alınmış olmasına rağmen operasyon öncesinde periferik kan alınamamıştır, 9 hastadan ise lezyon dokusu temini yapılamamıştır. Kontrol grubu, benign nedenler ile laparotomik veya laparoskopik cerrahi operasyona karar verilmiş klinik değerlendirme ve cerrahi operasyon sonucunda endometriozis tanısı almamış kadınlardan oluştu. Kontrol grubu kadınlardan periferik kan örnekleri (n=27) ve bunlar arasında iki bireyden, kantitasyon analizleri için gerekli kalibratör örneği olarak kullanılmak üzere en fazla 100 mg olarak minimal miktarda normal over dokusu temin edildi. Her iki grup için dışlama kriterleri, vücut kitle indeksinin (BMI) ≥ 30 kg/m² olması, 3 ay öncesine kadar hormonal tedavi alınması, gebelik, kanser, polikistik over sendromu, diyabetes mellitus, arteriyel hipertansiyon, renal veya metabolik sendrom, akut veya kronik inflamatuvar hastalık ve karaciğer sirozu varlığının olması şeklinde belirlendi. Operasyon ile alınan endometriozis şüpheli doku örnekleri histopatolojik tanı ile doğrulandı. Ayrıca endometriozis hastalarından 1. Aylık takip döneminde periferik kan örnekleri (n:20) alındı. Doku ve kan örnekleri uygun şartlarda İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı ekibine iletildi. Alınan periferik kan örneklerinden total RNA izolasyonları yapıldı. Hastalara operasyon sonrası dönemde hormonal tedaviyi de içeren herhangi bir tedavi başlanmadı.

Bu proje için 2019/1314 dosya numarası ile İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi klinik araştırmalar etik kurulundan onay alınarak çalışmaya dahil edilen gönüllülerden bilgilendirilmiş onamları alındı.

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar

Tablo 2: Kullanılan kimyasallar

Kimyasallar	Markası
Amonyum Klorür (NH₄Cl)	Merck
Potasyum bikarbonat (KHCO₃)	Merck
PBS (Phosphate buffered saline)	Biomatik
DEPC (Diethyl pirokarbonat)	Sigma
Trizol	Qiagen
İsopropanhol	Sigma
Etanol	Sigma
RNaz ZAP	Sigma

3.1.3. Kullanılan Kitler

Tablo 3: Kullanılan kitler

Kitler	Markası
iTaq SYBR Green PZR Kiti	Biorad
iScript cDNA Sentez Kiti	Biorad

3.1.4. Kullanılan Cihazlar

Tablo 4: Kullanılan cihazlar

Cihazlar	Markası
Soğutmalı santrifüj	Thermo Scientific™
Masaüstü santrifüj	Thermo Scientific™
Buzdolabı	+4°C Sanyo, -80°C Thermo, -20°C Uğur

Çeker ocak	Kermanlar
Hassas terazi	Shimadzu
Nanodrop	Thermo Scientific™
PZR Cihazı	Techne TC-412 Thermal Cycler, Techne TC-512 Thermal Cycler Light Cycler*480 roche diagnostic
Buz makinesi	Cornelius

3.1.5. Kullanılan Çözeltiler

Gey's Solüsyonu

10X konsantrasyonu için: 8,291 gr NH_4Cl ve 1,001 gr KHCO_3 tartılır ve 1000 ml DEPC'li su içerisinde çözülmesi sağlanır. Otoklavlanarak oda sıcaklığında saklanır.

1X konsantrasyon için: 100 ml 10X Gey's solüsyonu alınarak 1 litre olacak şekilde DEPC'li su ile tamamlanır.

1X PBS Solüsyonu

1 adet PBS tablet 100 ml otoklavlanmış su içerisine atılır ve iyice karıştırılarak çözülmesi sağlanır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Periferik kandan ve endometriozis dokularından total RNA izolasyonu ve RNA kalitesinin belirlenmesi

Hastalardan 10 ml EDTA'lı tüpe alınan periferik kanlar en geç 4 saat içerisinde soğuk taşımayla laboratuvara getirildi ve lökosit ayırımı yapıldı. 10 ml EDTA'lı tüpteki kan 50 ml falkonlara aktarıldı. Aktarılan kanın üzerine kan miktarının iki katı olacak şekilde Gey's Solüsyonu eklendi. İyice karıştırılan tüpler $+4^\circ\text{C}$ 'de buzdolabında 20 dakika bekletildi. Oda sıcaklığında 1500 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Supernatant uzaklaştırıldı ve dipte çöken pellet dağıtıldı. Pelletin üzerine kanın baştaki miktarı kadar 1X Gey's solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında 1500 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Supernatant uzaklaştırılıp pellet dağıtıldıktan sonra 1 ml 1X PBS eklendi. Oda sıcaklığında 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi ve supernatant uzaklaştırıldı. Çeker ocak

içerisinde buz üzerinde pellet 800 µl trizol solüsyonu ile homojenize edildikten sonra örnek -80°C’de saklanmak üzere kaldırıldı.

miRNAeasy kiti (Qiagen) ile izole edilen hastalardan cerrahi operasyon esnasında alınmış endometriozis doku örnekleri ve kontrol grubundan alınan over doku örnekleri 100 mg olacak şekilde tartılıp kesildikten sonra hızlıca buz üzerinde 1 ml QIAzol içinde alındı. QIAzol solüsyonu içerisindeki dokular bıçaklı homojenizatör yardımı ile buz üzerinde parçalandı. . Üzerine 140 µl chloroform eklendi ve 20 sn elle kuvvetlice çalkalandı. Buz üzerinde 2-3 dk örnekler inkübe edildi. Santrifüj 12000 rpm, 20 dk, +4°C’de yapıldı. Yeni bir tüpe (RNaz free) şeffaf üst faz (aköz faz yaklaşık 350 µl) alındı ve volümün 1.5 katı %100 (525 µl) etanol eklendi. Karıştırıldıktan sonra 2 ml “collection” tüp içindeki RNAeasy mini kolon üzerine 700 µl örnek pipetlendi. Oda ısısında 15 sn 12.000 rpm santrifüj yapıldı. Spin kolon üzerine 500 µl Buffer RPE pipetlendi ve 12.000 rpm’de 15 sn santrifüj yapıldı. Spin kolon üzerine tekrar 500 µl Buffer RPE pipetlendi ve 12.000 rpm’de 2dk santrifüj yapılarak kolon membranı kurutuldu. Spin kolon yeni bir 1.5 ml’lik kolleksiyon tüpe transfer edildi. Spin kolonun membranı üzerine 30 µl direkt olarak RNaz-free su eklendi ve 12.000 rpm’de 1 dk santrifüj yapıldı. Dokulardan izole edilen total RNA örnekleri daha sonra kullanılmak üzere -80°C’ye kaldırıldı.

-80°C’de QIAzol solüsyonu içerisinde homojenat halinde bekletilen lökosit örnekleri buz üzerinde çözölmeye bırakıldı. Çözölen örneklerin üzerine 200µl +4°C’de soğutulmuş kloroform eklendi. 15 saniye boyunca vortekslendikten sonra buz üzerinde 2 dk bekletildi. 12000 g’de +4°C’de 20 dk boyunca santrifüj edildi. Oluşan aköz faz dikkatlice yeni 1,5 ml’lik mikrosantrifüj tüplerine alındı. Üzerine alınan aköz faz miktarı kadar +4°C’de soğutulmuş %100 isopropanol eklendi ve yavaşça karıştırıldı. Gece boyunca -20°C’de bekletildi. Devamında örnekler 12000 g’de +4°C’de 10 dk santrifüj edildi. Supernatant dikkatlice uzaklaştırıldı. DEPC’li dH₂O ile hazırlanmış soğutulmuş 1 ml %75’lik ethanol ile alt üst edilerek yıkama yapıldıktan sonra 9000 g’de +4°C’de 5 dk santrifüj edildi. Supernatant dikkatlice uzaklaştırıldıktan sonra pelletler çeker ocak içerisinde kurumaya bırakıldı. Kuruyan pelletler 40µl RNaz-DNazsız su ile çözöldü. Lökositlerden izole edilen total RNA örnekleri daha sonra kullanılmak üzere -80°C’ye kaldırıldı.

Kan ve doku örneklerinden izole edilen total RNA'ların konsantrasyonunun, protein ve kimyasal kontaminasyonu olup olmadığının belirlenmesinde NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™, ABD) cihazı kullanıldı. 1 µl örnek alınarak ölçülen A260 nm/ A280 nm oranının 1,8-2,0 aralığında olduğu RNA konsantrasyon ölçümleri kaliteli kabul edilerek sonraki çalışmalara dahil edildi.

3.2.2. cDNA Sentezi

BIORAD iScript™ cDNA Sentez Kiti kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. Lökositlerden ve dokulardan elde edilen ve -80°C'de saklanan total RNA örnekleri buz üzerinde çözündürüldü. Konsantrasyonları, RNazsız su kullanılarak 100 ng/µl olacak şekilde ayarlandı. cDNA sentezi için kullanılan reaksiyon içerikleri ve reaksiyon protokolü Tablo 5 ve 6' da gösterilmiştir.

Sentezlenen cDNA'lar daha sonra kullanılmak üzere -20°C buzdolabına kaldırıldı.

Tablo 5: cDNA sentezi için reaksiyon içerikleri

Reaksiyon bileşenleri	Her bir örnek için
5X iScript Reaksiyon miksi	4 µl
iScript ters transkriptaz	1 µl
Nükleazsız su	x µl
RNA	x µl

Tablo 6: cDNA reaksiyon protokolü

Aşamalar	Sıcaklık	Süre
İnkübasyon	25°C	5 dk
Ters Transkripsiyon	46°C	20 dk
Ters Transkriptaz İnaktivasyonu	95°C	1 dk
Soğutma	4°C	∞

3.2.3. Gerçek Zamanlı (Real-Time) Kantitatif PZR

Seçilen lncRNA adaylarının ifade düzeylerini kantitatif eş-zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PZR) ile belirlemek için SYBR-Green (BIORAD) kiti kullanıldı. Bu lncRNA adaylarının ifade düzeylerinin normalizasyonu için endojen gen olarak β -aktin kullanıldı. Kullanılan primer çiftleri Tablo 7’de gösterilmektedir. Çalışma protokolü, kullanılan kite göre LightCycler 480 cihazında dizayn edildi.

Tablo 7: Kullanılan lncRNA’lara ait primer dizileri

GEN ADI	İleri Yönlü Primer F (5’-3’)	Ters Yönlü Primer R (5’-3’)
<i>BAT5</i>	ATTCCAGCTCCTGGGTTAC TTG	TCCGATGTGTTGCTTCCA AGA
<i>MALAT1</i>	GAATTGCGTCATTAAAGC CTAGTT	GTTTCATCCTACCACTCC CAATTAAT
<i>UBOX5</i>	TGACAAGCAAGACCCAAG GA	CAGAGTTAGGCAGGCAT TTCA
<i>ACBT (B-AKTİN)</i>	GACCCAGATCATGTTTGAG ACC	TGGTGGTGAAGCTGTAGC C

SYBR Green süpermiksi ve diğer donmuş bileşenler oda sıcaklığında çözüldü, spin yapılarak iyice çözülmesi sağlandı. Buz üzerinde ışıktan koruyarak kullanıldı. cDNA örnekleri, 1/3 oranında seyreltildi. Her örnek çift olarak çalışılacak şekilde reaksiyon karışımı Tablo 8’deki değerlere göre hazırlandı. Hazırlanan karışımlar ve cDNA’lar 96’lık plakalarda pipetleme yapılarak dağıtıldı. Tablo 9’da verilen çalışma protokolü koşulları uygulandı.

Tablo 8: RT-PZR protokolü

İçerik	Miktar
Supermiks (2X)	5 μ l
İleri Primer (2 μ M)	1 μ l
Geri Primer (2 μ M)	1 μ l

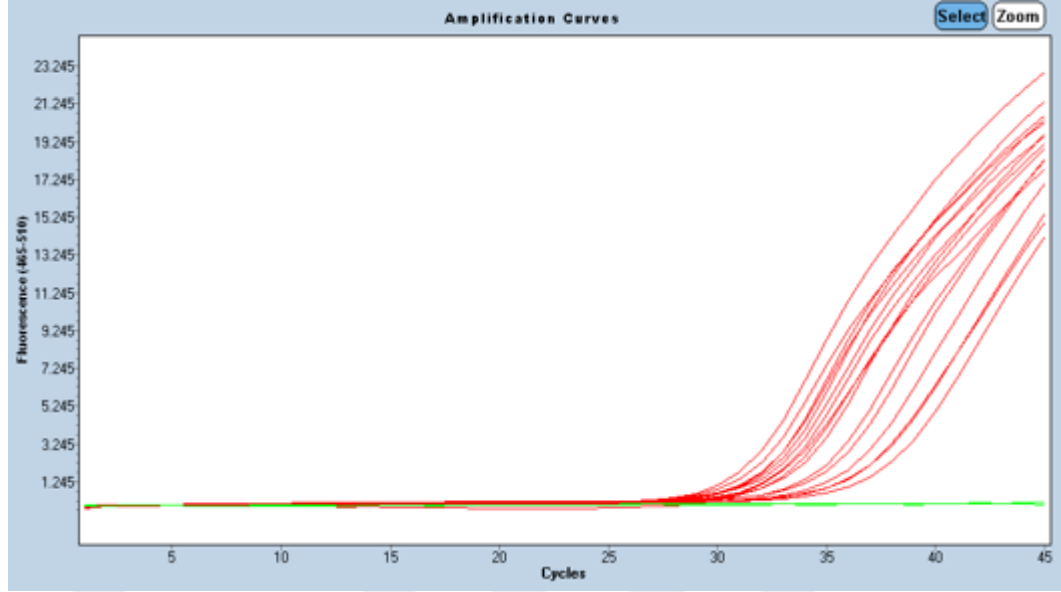
cDNA	3 µl
Toplam	10 µl

Tablo 9: qRT-PZR reaksiyon koşulları

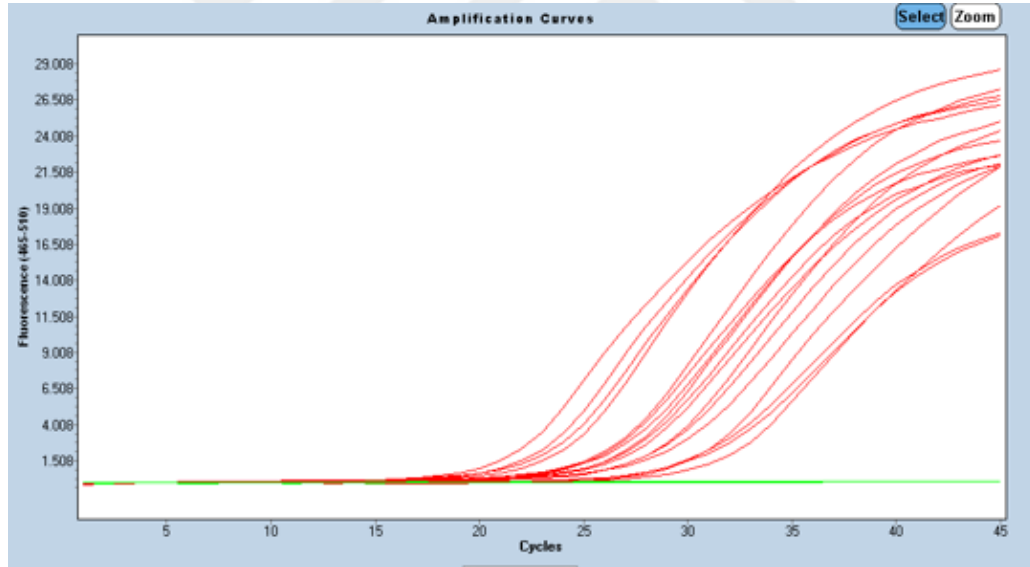
Program 1: Ön denatürasyon (1 döngü)	
Sıcaklık	Süre
95 °C	2 dakika
Program 2: Amplifikasyon (45 döngü)	
Sıcaklık	Süre
95 °C	20 saniye
60 °C	10 saniye
72 °C	10 saniye
Program 3: Erime Eğrisi (1 döngü)	
Sıcaklık	Süre
95 °C	5 saniye
65 °C	1 dakika
97 °C	-
Program 4: Soğutma (1 döngü)	
Sıcaklık	Süre
40 °C	20 saniye

3.2.4. Rölatif kantitasyon ile lncRNA ifade düzeylerinin belirlenmesi

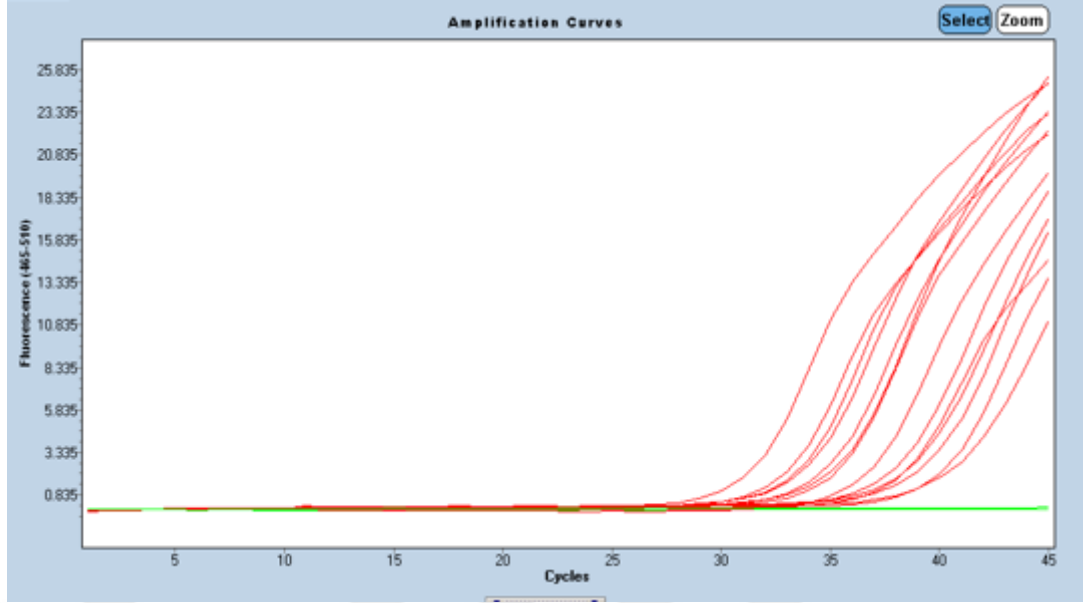
LC480 cihazında PCR programının sonlanması ile LC480 yazılımı ile örneklerin erime eğrileri (*T_m calling*) ile amplifikasyon eğrileri kontrol edildi ve “Release Absolute Quantification/2nd Derivative Max” analizi ile Ct değerleri belirlendi. Çift çalışılan örnekler ile yapılan RT-PZR sonucunda elde edilen Ct değerleri kontrol edildi ve Excel dosyalarına aktarıldı. Δ Ct değeri elde etmek için her bir örneğin Ct değeri endojen kontrol genlerin Ct değerlerinden çıkarıldı. Kontrol grubunun bu yöntemle elde edilmiş Δ Ct değerlerinin ortalaması, kalibratör olarak kullanılmak üzere alındı. $\Delta\Delta$ Ct değerlerinin hesaplanması için, elde edilmiş olan Δ Ct değerlerinden, kalibratör olarak seçilmiş kontrol grubu Δ Ct değerleri çıkarıldı. Bu hesaplamayla elde edilen, çift olarak çalışılmış örneklerin $\Delta\Delta$ Ct değerlerinin ortalaması alındı. Rölatif kantitasyon değerinin bulunması için, $2^{-(\text{ortalama } \Delta\Delta\text{Ct değeri})}$ formülasyonu kullanılarak hesaplama yapıldı. Şekil 13-20’de araştırılan örneklerdeki kodlamayan RNA’ların RT-PZR amplifikasyon eğrileri ve erime eğrileri verilmektedir.



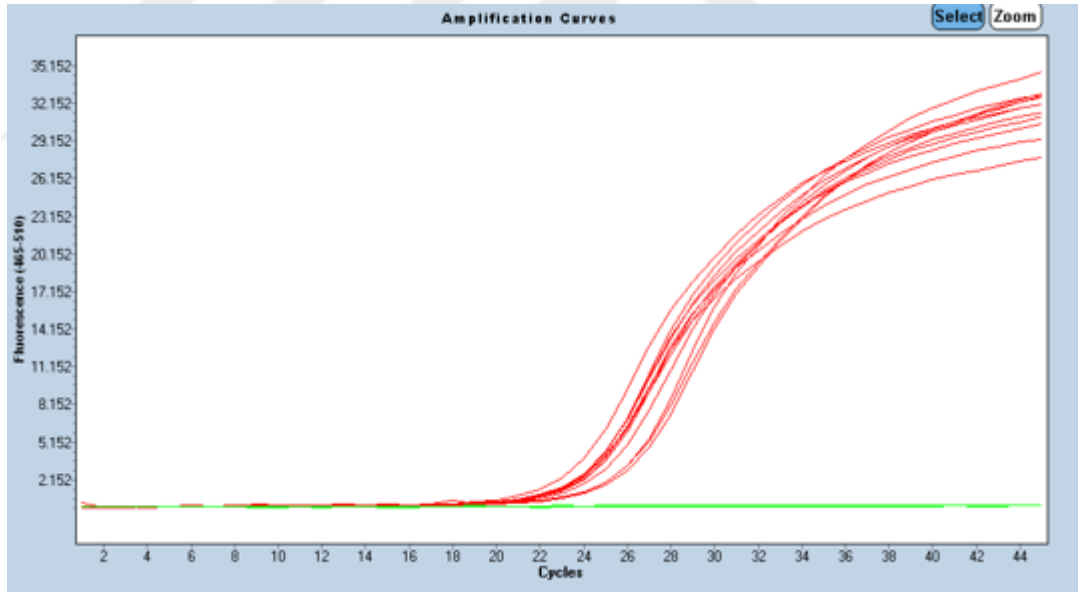
Şekil 13: *UBOX5* kodlamayan RNA transkriptine ait örneklerde elde edilen amplifikasyon eğrileri



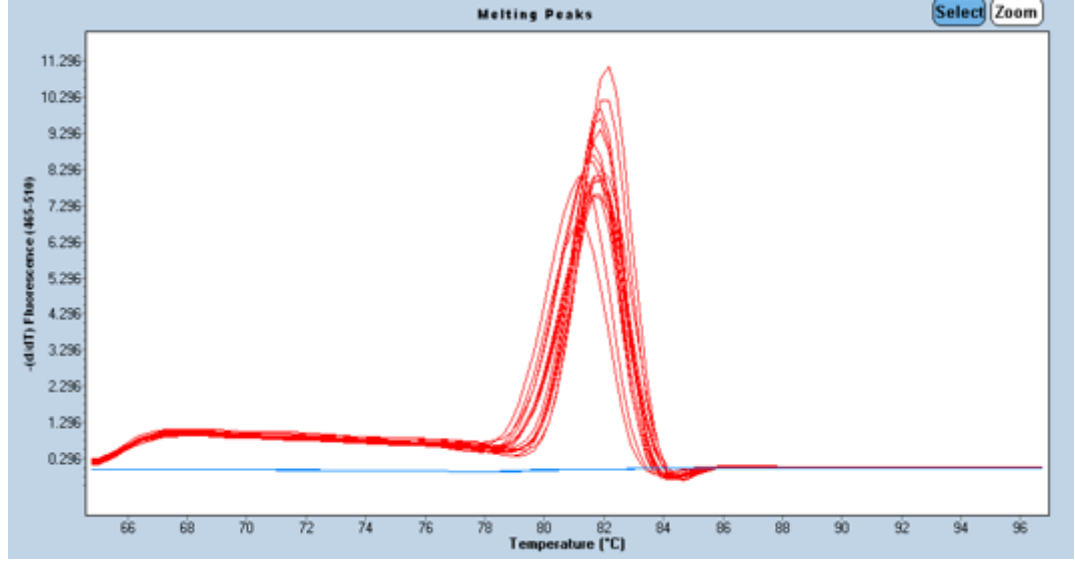
Şekil 14 : *MALAT1* kodlamayan RNA transkriptine ait örneklerde elde edilen amplifikasyon eğrileri



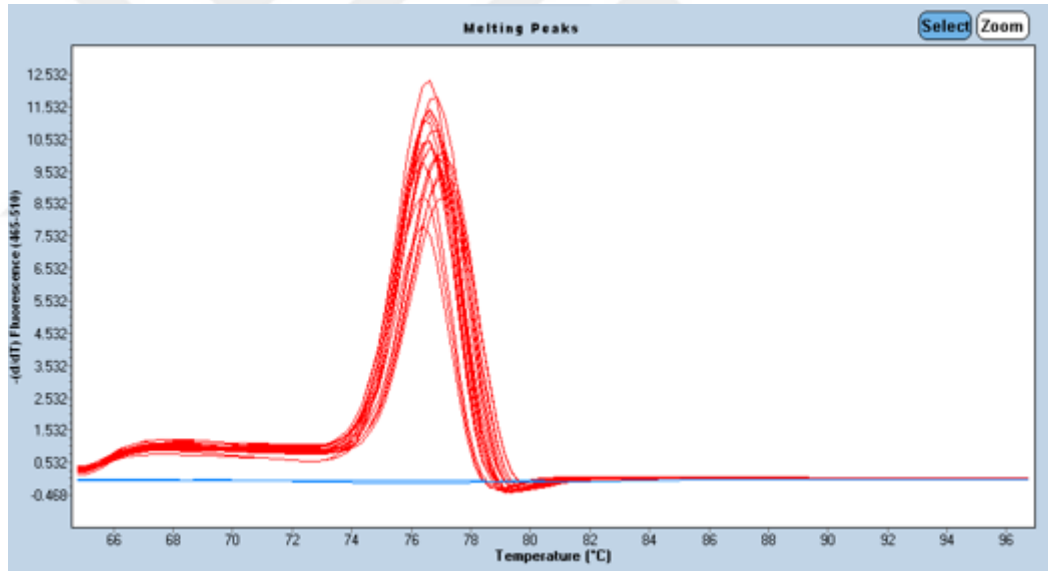
Şekil 15: *BAT5* kodlamayan RNA transkriptine ait örneklerde elde edilen amplifikasyon eğrileri



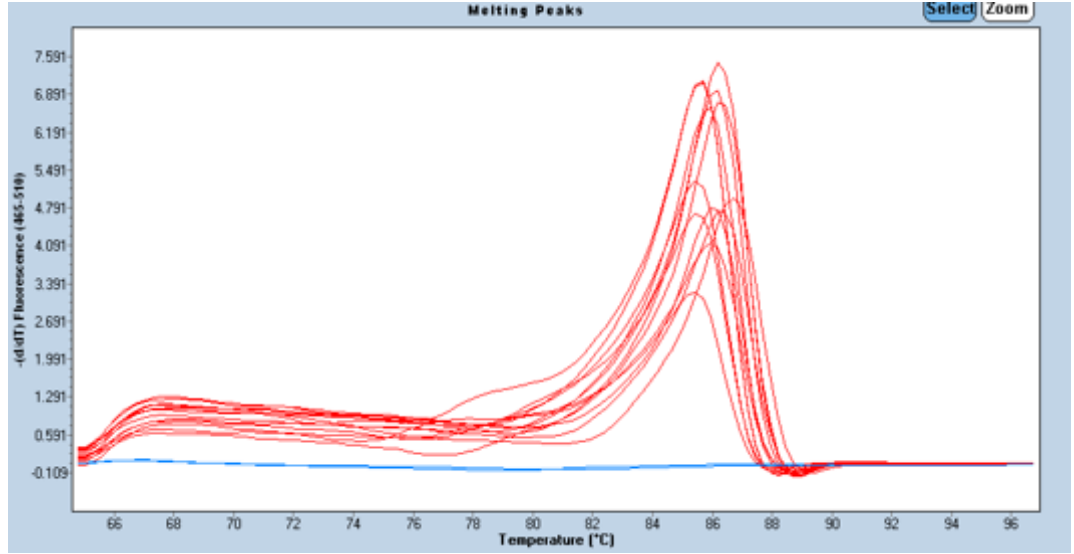
Şekil 16: β -*AKTIN* transkriptine ait örneklerde elde edilen amplifikasyon eğrileri



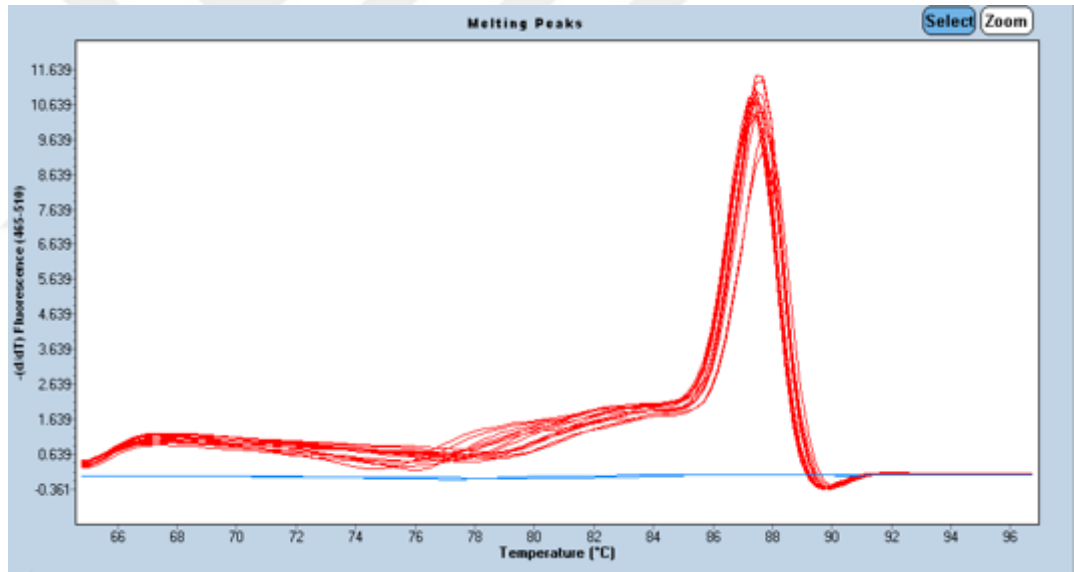
Şekil 17: *UBOX5* kodlamayan RNA transkriptine ait örneklerde elde edilen erime eğrileri



Şekil 18: *MALAT1* kodlamayan RNA transkriptine ait örneklerde elde edilen erime eğrileri



Şekil 19: *BAT5* kodlamayan RNA transkriptine ait örneklerde elde edilen erime eğrileri



Şekil 20: β -*AKTİN* transkriptine ait örneklerde elde edilen erime eğrileri

3.2.5. İstatistiksel Analizler

lncRNA'ların hasta, takip ve kontrol gruplarındaki ifade düzeyleri (rölatif kantitasyon değerleri) istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Araştırma gruplarında lncRNA'ların ifade düzeyleri ile klinik datadaki sürekli değişkenlerin normalliği, "Shapiro-Wilk" testi ile analiz edildi ve %95 güvenle verilerin normal dağılıma uymadığı belirlendi. Bu nedenle ifade düzeyleri, gruplar arasında Mann-Whitney U testi

ile değerlendirildi. Klinik datadaki normal dağılıma uyan sürekli değişkenler student-t testi ile, kategorik değişkenler ise X^2 testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi. Kodlamayan RNA ifade düzeylerinin klinik datadaki sürekli değişken veriler ile korelasyonunda Sperman's testi kullanıldı. Kodlamayan RNA'ların lökositlerdeki ifade düzeylerinin endometriozis için tanısal önemini belirlemek için ROC eğrileri kullanılarak duyarlılık ve özgüllükleri incelendi. İstatistik analizlerde SPSS yazılımı (20.0 versiyonu, Chicago, IL) kullanıldı ve $p<0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.



4. BULGULAR

Bu tez çalışmamıza Göztepe Prof. Dr. Süleyman Yalçın Şehir Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği'ne başvuran, 32 endometriozis hasta ile 27 gönüllü birey kontrol grubu olarak dahil edildi. Ayrıca hastaların operasyon sonrası birinci ay takip dönemlerinde de periferik kan alınarak, lökositlerindeki ifade düzeyleri belirlendi. Çalışma gruplarının klinik ve demografik özellikleri Tablo 10'da verilmektedir.

Tablo 10: Endometriozis hasta grubu ve kontrol grubunun demografik ve klinik özellikleri

	Endometriozis Grup (n=32) Ortalama $\pm$ SD	Kontrol Grup (n=27) Ortalama $\pm$ SD	P
Yaş (yıl)	38.00 $\pm$ 7.72	39.44 $\pm$ 6.68	0.568*
BMI (kg/m ²)	24.92 $\pm$ 5.01	25.06 $\pm$ 4.12	0.912
BMI (kg/m ²) (1. Ay takip)	25.12 $\pm$ 4.48	25.00 $\pm$ 4.19	0.925
Endometrioma çapı, mm	6.09 $\pm$ 2.71	-	-
Bilateral endometrioma varlığı(%)	18.8	-	-
Açlık kan glukozu (mg/dL)	86.38 $\pm$ 16.40	88.26 $\pm$ 7.69	0.891*
HbA1c (%)	5.45 $\pm$ 0.29	5.37 $\pm$ 0.36	0.477*
Sedimantasyon	15.65 $\pm$ 10.86	12.22 $\pm$ 9.76	0.154*
CA-125 (U/mL)	66.97 $\pm$ 62.02	20.65 $\pm$ 15.78	0.0001*
CA-125 (U/mL)(1. Ay takip)	24.87 $\pm$ 15.35	20.65 $\pm$ 15.78	0.111*
CA-19-9 (U/mL)	22.80 $\pm$ 24.67	16.98 $\pm$ 11.79	0.346*
CA-19-9 (U/mL)(1. Ay takip)	14.61 $\pm$ 7.71	16.98 $\pm$ 11.79	0.805*
CRP (mg/L)	0.54 $\pm$ 0.95	0.22 $\pm$ 0.17	0.209*
Hb (g/dL)	11.88 $\pm$ 1.36	12.17 $\pm$ 1.88	0.493
Htc (%)	36.24 $\pm$ 3.23	36.99 $\pm$ 4.61	0.465
WBC, (x10 ³ / ul)	6.73 $\pm$ 2.42	6.92 $\pm$ 1.95	0.518*

Trombosit (x103/ ul)	276.44 ± 61.20	271.78 ± 50.19	0.753
İnfertilite, var (%)	25.0	40.7	0.197
Seksüel aktivite, var (%)	81.2	92.6	0.205
Sigara kullanımı, var (%)	31.2	37.0	0.640
Gravide, 1-6 gebelik sayısı(%)	62.5	70.9	0.294
0 (%)	37.5	29.1	
Parite, 1-5 doğum sayısı (%)	56.2	63	0.646
0 (%)	43.8	37	

Hb, hemoglobin; Hct, hematokrit; WBC, beyaz kan hücreleri; BMI, vücut kütle indeksi; SD, standart sapma, p değerleri student t test ve * Mann-Whitney U test ile elde edildi.

Bu çalışmaya dahil edilen endometriozis hastalarının, ASRM skora göre %96,9 'u (n:31) evre III-IV yani şiddetli hastalık durumunda iken sadece 1 olgu (%3,1) evre I-II tanısı almıştır. Ayrıca endometriozis tanısı almış olan hastaların %56,2'sinde (n:18) peritoneal lezyon mevcut iken hastaların %40,6'sında (n:13) derin infiltratif endometriozis olduğu görüldü.

Endometriozis hastalarının ve kontrol grubunun ağrı durumlarına baktığımızda; dispareni durumu kontrol grubunun (n=27) %81,5'inde (n=22) hiç yokken, %14,8'inde (n=4) hafif, %3,7'sinde (n=1) orta düzeyde görülmektedir. Endometriozis hastalarının ise (n=32) %56,2'sinde (n=18) hiç yok, %25'i (n=8) hafif ve orta şiddette iken, %18,8'inde (n=6) şiddetli ve olabilecek en kötü düzeydedir.

Dismenore durumu, kontrol grubunun %77,8'inde (n=21) hiç yokken, %14,8'inde (n=4) hafif ve orta düzeyde, %7,4'ünde (n=2) şiddetli ağrı durumundadır. Endometriozis hastalarının ise %12,5'inde (n=4) hiç yokken, %25'inde (n=8) hafif ve orta düzeyde, %62,5'inde (n=20) şiddetli ve olabilecek en kötü durumdadır.

Nonsiklik kronik pelvik ağrı durumu, kontrol grubunun %88,9'unda (n=24) hiç yokken %7,4'ünde (n=2) orta düzeyde, %3,7'sinde (n=1) olabilecek en kötü durumdadır. Endometriozis hastalarının ise %31,2'sinde (n=10) hiç yokken, %43,8'inde (n=14) hafif ve orta düzeyde, %26'sında (n=8) şiddetli ve olabilecek en kötü durumdadır.

Endometriozis hastalarının operasyon sonrası birinci aylık takip dönemlerinde de bu ağrı durumlarına bakılmıştır. Buna göre, dispareni durumu hiçbir hastada (n=20) görülmemiştir. Dismenore durumu, %55'inde (n=11) hiç yokken, %35'inde (n=7) hafif

ve orta düzeyde, %10'unda (n=2) şiddetli düzeydedir. Nonsiklik pelvik ağrı durumu ise %70'inde (n=14) hiç yokken, %30'unda (n=6) hafif ve orta düzeyde görülmüştür.

Bu çalışma kapsamında, operasyon öncesi endometriozis hastalarında, operasyon sonrası birinci ay dönemi takip hastalarında ve kontrol gruplarında aday lncRNA ifade düzeyleri hem dokularda hem de lökositlerde belirlendi. Operasyon öncesi endometriozis hasta ve kontrol gruplarına dahil olan bireylerin lökositlerindeki lncRNA'ların ifade düzeyleri Tablo 11'de karşılaştırıldı. *BAT5* ifade düzeyi hasta grubunda, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da 3 kat ($p=0.103$), *MALAT1* ifade düzeyinde ise 4,3 kat ($p=0.005$) artış tespit edildi. *UBOX5* ifade düzeyinde ise 1,08 kat ($p=0.029$) azalma tespit edildi. Araştırma gruplarının rölatif kantitasyon hesabında, endojen transkript olarak *B-AKTIN* (Ct değerleri ortalaması, 23) tespit edilebilse de bazı vakalarda lncRNA düzeyleri, Ct değerleri >35 olduğu için hesaplanamadı. Tablo 11'de lncRNA'ların çalışma gruplarının sayıları, hesaplanabilen lncRNA ifade düzeyleri olarak verilmektedir.

Tablo 11: Preoperasyon dönemindeki endometriozis hasta ve kontrol grupları arasındaki lncRNA'ların lökositlerindeki ifade düzeyleri

BAT5 Rölatif Kantitasyon değerleri		
Çalışma grupları	Ortalama ± SD	p*
Kontrol grup (n=22)	3.05 ± 4.28	0.103
Endometriozis grup (n=25)	9.25 ± 16.02	
MALAT1 Rölatif Kantitasyon değerleri		
Çalışma grupları	Ortalama ± SD	p*
Kontrol grup (n=26)	10.30 ± 19.75	0.005
Endometriozis grup (n=27)	44.33 ± 83.15	
UBOX5 Rölatif Kantitasyon değerleri		

Çalışma grupları	Ortalama $\pm$ SD	p*
Kontrol grup (n=25)	15.09 $\pm$ 36.29	0.029
Endometriozis grup (n=27)	13.92 $\pm$ 17.44	

SD, standart sapma, p* değerleri Mann-Whitney U test ile elde edildi.

Tablo 12’de ise operasyon sonrası birinci ay dönemi takip hasta grubu ve kontrol grubu arasında lökositlerdeki lncRNA’ların ifade düzeyleri karşılaştırıldı. İfade düzeylerini karşılaştırdığımızda istatistiksel olarak anlamlı olmasa da birinci ay takip dönemindeki hastalarda kontrollere kıyasla, *BAT5* ifade düzeyi 1,46 kat (p=0.239), *MALAT1* ifade düzeyi 1,62 kat (p=0.244) ve *UBOX5* ifade düzeyi 1,86 kat (p=0.112) artış göstermektedir.

Tablo 12: Birinci ay takip dönemindeki endometriozis hasta ve kontrol grupları arasındaki lncRNA’ların lökositlerindeki ifade düzeyleri

BAT5 Rölatif Kantitasyon değerleri		
Çalışma grupları	Ortalama ± SD	p*
Kontrol grup (n=22)	3.05 ± 4.28	0.239
Endometriozis takip grup (n=19)	4.46 ± 10.17	
MALAT1 Rölatif Kantitasyon değerleri		
Çalışma grupları	Ortalama ± SD	p*
Kontrol grup (n=26)	10.30 ± 19.75	0.244
Endometriozis takip grup (n=20)	16.77 ± 34.17	

UBOX5 Rölatif Kantitasyon değerleri		
Çalışma grupları	Ortalama ± SD	p*
Kontrol grup (n=25)	15.09 ± 36.29	0.112
Endometriozis takip grup (n=18)	28.17 ± 67.30	

SD, standart sapma, p* değerleri Mann-Whitney U test ile elde edildi.

Tablo 13'te ise operasyon sonrası birinci ay dönemi takip ve operasyon öncesi endometriozis hasta grubu arasında lökositlerdeki lncRNA'ların ifade düzeyleri karşılaştırıldı. İfade düzeylerini karşılaştırdığımızda istatistiksel olarak anlamlı olmasa da birinci ay takip dönemindeki hastalarda operasyon öncesi durumlarına kıyasla, *BAT5* ifade düzeyi 2.07 kat (p=0.414), *MALAT1* ifade düzeyi 2.64 kat (0.048) azalma gösterirken, *UBOX5* ifade düzeyi 2.02 kat (p=0.594) artış göstermektedir.

Tablo 13 : Endometriozis hastalarının preoperasyon ve birinci ay takip dönemleri arasındaki lncRNA'ların lökositlerindeki ifade düzeyleri

BAT5 Rölatif Kantitasyon değerleri		
Çalışma grupları	Ortalama ± SD	p*
Endometriozis preop grup (n=25)	9.25 ± 16.02	0.414
Endometriozis takip grup (n=19)	4.46 ± 10.17	
MALAT1 Rölatif Kantitasyon değerleri		
Çalışma grupları	Ortalama ± SD	p*
Endometriozis preop grup (n=27)	44.33 ± 83.15	0.048
Endometriozis		

takip grup (n=20)	16.77 ± 34.17	
UBOX5 Rölatif Kantitasyon değerleri		
Çalışma grupları	Ortalama ± SD	p*
Endometriozis preop grup (n=27)	13.92 ± 17.44	0.594
Endometriozis takip grup (n=18)	28.17 ± 67.30	

SD, standart sapma, p* değerleri Mann-Whitney U test ile elde edildi.

Endometriozis hasta grubuna dahil olan bireylerden cerrahi operasyon sırasında alınan ovaryan endometriozis (endometrioma) doku örneklerinde ve kontrol grubunda yer alan bireylerden alınan sağlıklı over doku lncRNA ifade düzeyleri Tablo 14'te karşılaştırıldı. Bu dokulardaki ifade düzeyleri hastalarda kontrollere kıyasla, *BAT5* için 20,70 kat, *MALAT1* için 1,21 kat ve *UBOX5* için ise 5,35 kat artış gösterdiği belirlense de kontrol grubunda sağlıklı doku sayısının yetersizliği sebebi ile istatistiksel olarak anlamlı değişimler belirlenemedi.

Tablo 14: Endometriozis hasta ve kontrol grupları arasındaki lncRNA'ların dokulardaki ifade düzeyleri

BAT5 Rölatif Kantitasyon değerleri		
Çalışma grupları	Ortalama ± SD	p*
Kontrol grup (n=2)	0.99 ± 0.007	0.327 ¹
Endometriozis grup (n=9)	20.50 ± 41.22	
MALAT1 Rölatif Kantitasyon değerleri		
Çalışma grupları	Ortalama ± SD	p*

Kontrol grup (n=2)	1.03 ± 0.35	0.443 ¹
Endometriozis grup (n=21)	1.25 ± 2.41	
UBOX5 Rölatif Kantitasyon değerleri		
Çalışma grupları	Ortalama ± SD	p*
Kontrol grup (n=2)	1.12 ± 0.72	0.749 ¹
Endometriozis grup (n=17)	6.00 ± 10.07	

SD, standart sapma, p* değerleri Mann-Whitney U test ile elde edildi.

Endometriozis hastalarında peritoneal lezyon varlığına göre lncRNA'ların dokulardaki ifade düzeyleri Tablo 15'te karşılaştırıldı. Peritoneal lezyon olan hastalarda olmayanlara göre, *BAT5* ifade düzeyi 4,64 kat, *UBOX5* ifade düzeyi 3,17 kat azalırken, *MALAT1* ifade düzeyi ise 1,38 kat artış gösterdiği belirlense de gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu.

Tablo 15: Endometriozis hastalarında peritoneal lezyon varlığına göre lncRNA'ların dokulardaki ifade düzeyleri

BAT5 Rölatif Kantitasyon değerleri		
Peritoneal lezyon	Ortalama ± SD	p*
yok (n=5)	30.42 ± 55.17	1.00 ¹
var (n=5)	6.55 ± 9.58	
MALAT1 Rölatif Kantitasyon değerleri		
Peritoneal lezyon	Ortalama ± SD	p*

yok (n=9)	0.93 ± 0.92	0.643 ¹
var (n=14)	1.29 ± 2.93	
UBOX5 Rölatif Kantitasyon değerleri		
Peritoneal lezyon	Ortalama ± SD	p*
yok (n=8)	9.42 ± 13.96	0.743 ¹
var (n=9)	2.97 ± 3.19	

SD, standart sapma, p* değerleri Mann-Whitney U test ile elde edildi.

Endometriozis hastalarında derin infiltratif endometriozis varlığına göre lncRNA'ların dokulardaki ifade düzeyleri Tablo 16'da karşılaştırıldı. Derin infiltratif endometriozis olanlarda olmayanlara göre ifade düzeylerine baktığımızda *BAT5* 6.16 kat, *UBOX5* 2.56 kat azalma gösterirken, *MALAT1* ifade düzeyinde 2.48 kat artış gösterdiği belirlense de gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu.

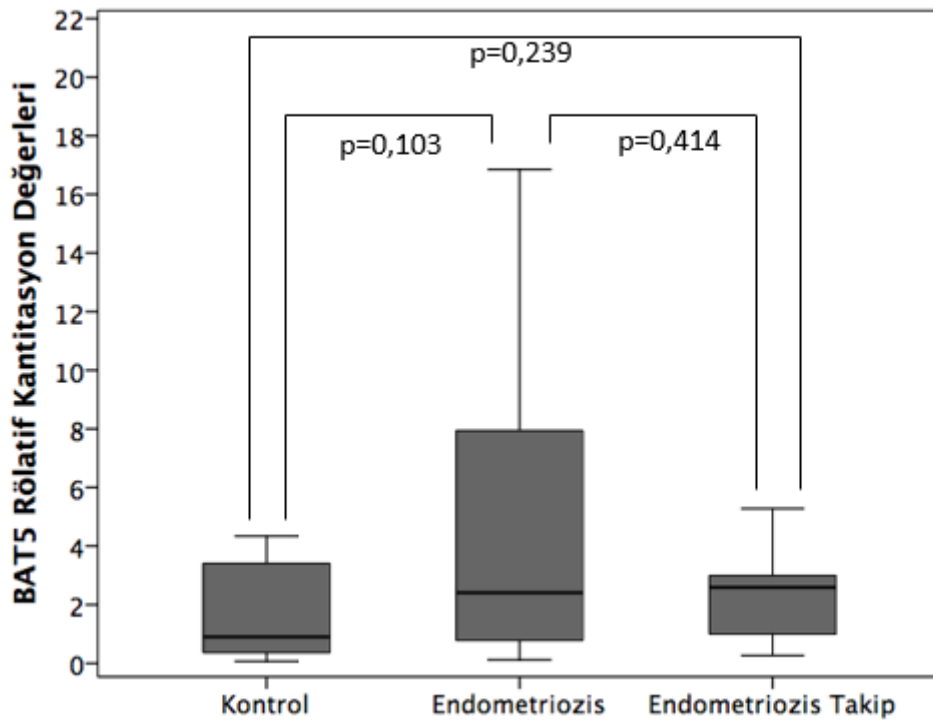
Tablo 16: Endometriozis hastalarında derin infiltratif endometriozis varlığına göre lncRNA'ların dokulardaki ifade düzeyleri

BAT5 Rölatif Kantitasyon değerleri		
Derin infiltratif endometriozis	Ortalama ± SD	p*
yok (n=8)	22.20 ± 43.76	1.00 ¹
var (n=2)	3.60 ± 1.20	
MALAT1 Rölatif Kantitasyon değerleri		
Derin infiltratif endometriozis	Ortalama ± SD	p*

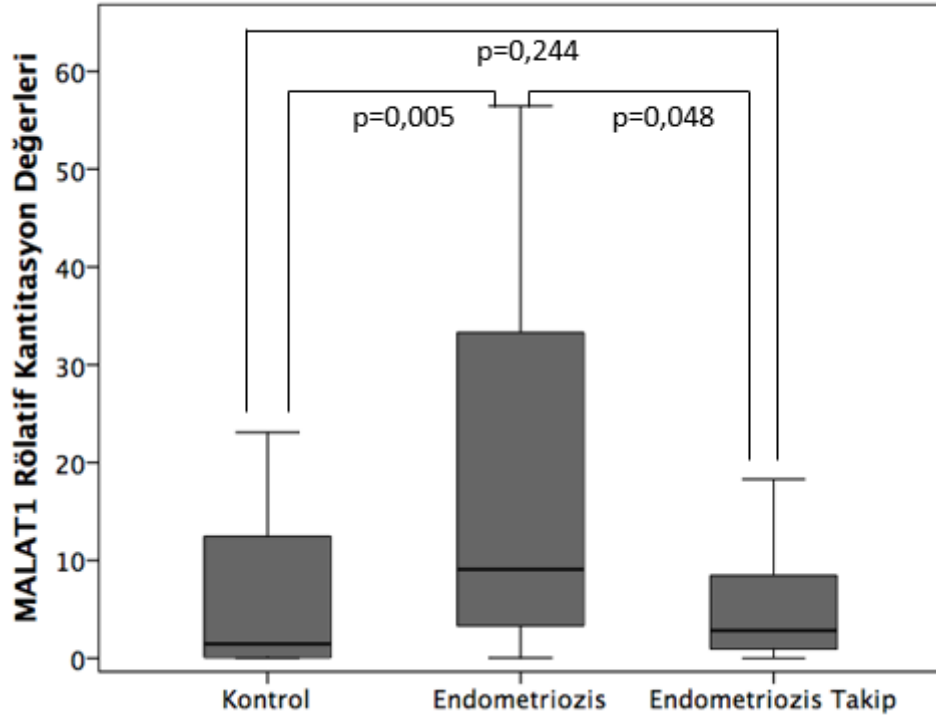
yok (n=13)	0.70 ± 0.83	1.00 ¹
var (n=10)	1.74 ± 3.41	
UBOX5 Rölatif Kantitasyon değerleri		
Derin infiltratif endometriozis	Ortalama ± SD	p*
yok (n=9)	8.42 ± 13.39	0.815 ¹
var (n=8)	3.28 ± 3.27	

SD, standart sapma, p* değerleri Mann-Whitney U test ile elde edildi.

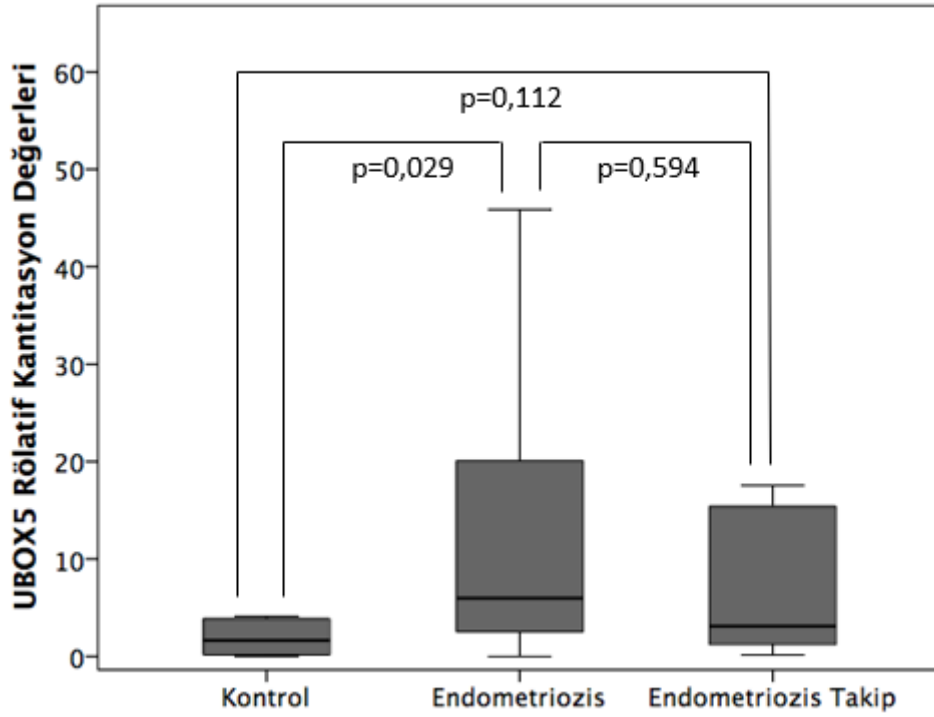
Şekil 21, 22 ve 23'te lökositlerde, *BAT5*, *MALAT1* ve *UBOX5* lncRNA'larının rölatif kantitasyon değerleri ve ikili gruplar arasındaki p değerleri grafik üzerinde gösterilmiştir.



Şekil 21: Lökositlerde *BAT5* rölatif kantitasyon değerleri

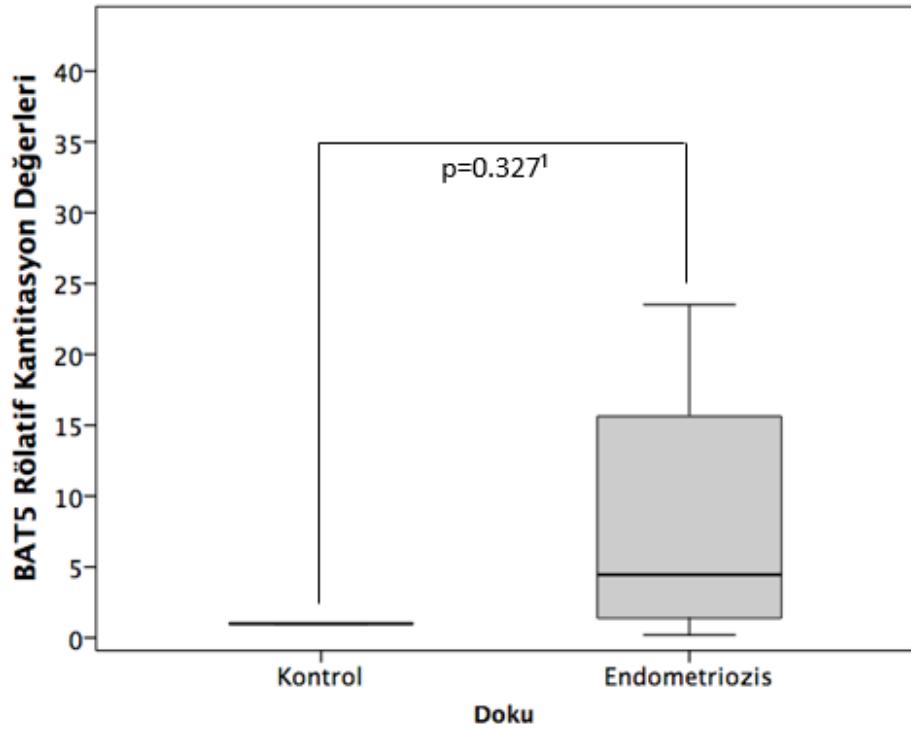


Şekil 22: Lökositlerde *MALAT1* rölatif kantitasyon değerleri

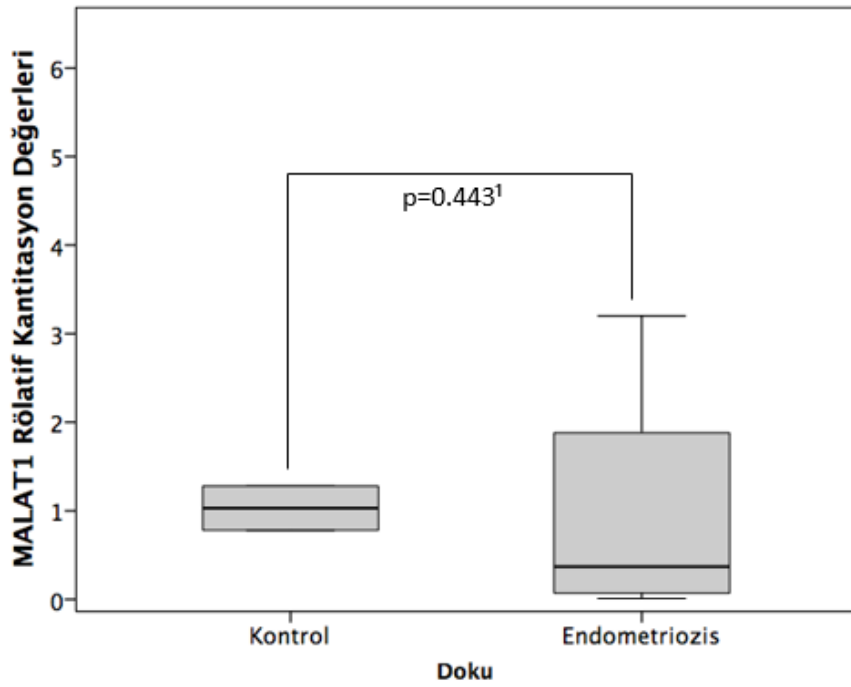


Şekil 23: Lökositlerde *UBOX5* rölatif kantitasyon değerleri

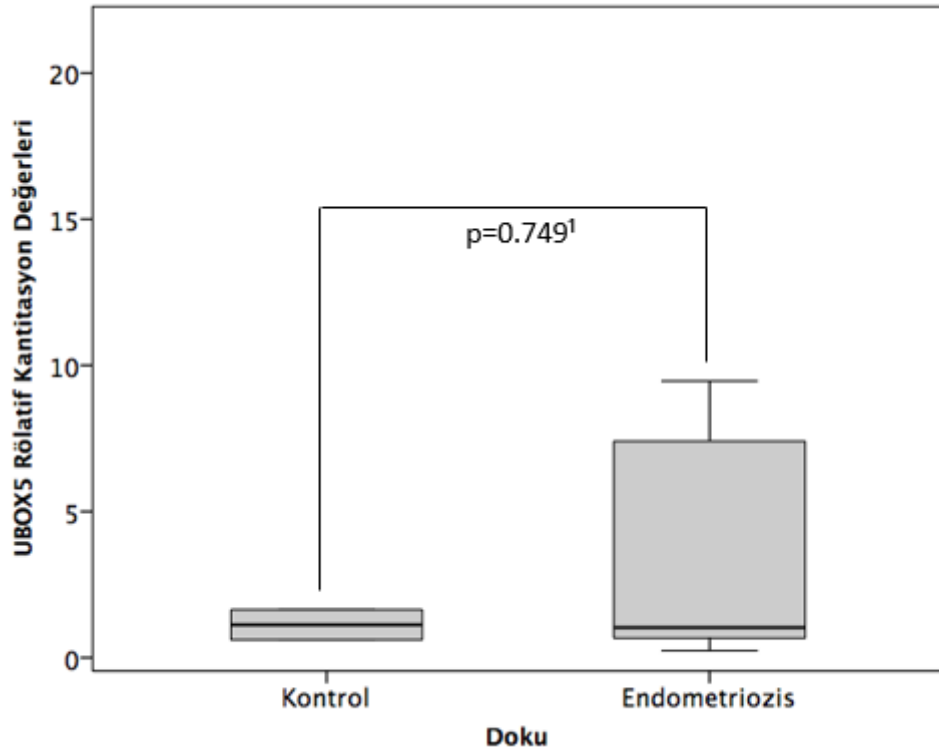
Şekil 24, 25 ve 26’da lezyonlu ve sağlıklı dokularda, *BAT5*, *MALAT1* ve *UBOX5* lncRNA’larının rölatif kantitasyon değerleri grafik üzerinde gösterilmiştir.



Şekil 24: Dokularda *BAT5* rölatif kantitasyon değerleri



Şekil 25: Dokularda *MALAT1* rölatif kantitasyon değerleri



Şekil 26: Dokularda UBOX5 rölatif kantitasyon değerleri

Endometriozis hastaları ve kontroller için klinik parametreler ile korelasyon analizi yapıldı. Kontrol grubunda lncRNA ifade düzeyleri ile klinik parametreler arasında anlamlı bir korelasyon bulunamadı. Endometriozis hastaları için korelasyon değerleri Tablo 17’de verilmektedir. *BAT5* ifade düzeyi ve CA19-9 arasında anlamlı bir pozitif korelasyon ($r=0.422$, $p=0.036$) görülürken, *UBOX5* ifade düzeyi ve trombosit miktarı arasında anlamlı bir negatif korelasyon ($r=-0.487$, $p=0.010$) görülmektedir.

Tablo 17: Endometriozis hastalarında klinik parametreler ve lncRNA düzeyleri arasındaki korelasyon

	<i>BAT5</i> Korelasyon katsayısı (r), p	<i>MALAT1</i> Korelasyon katsayısı (r), p	<i>UBOX5</i> Korelasyon katsayısı (r), p
BMI	(0.169), 0.421	(0.038), 0.849	(0.001), 0.997
Yaş	(0.212), 0.309	(0.190), 0.342	(0.144), 0.473
Endometrioma çapı, mm	(-0.029), 0.889	(-0.084), 0.677	(-0.132), 0.511
CA-125 (U/mL)	(0.072), 0.731	(-0.261), 0.188	(-0.094), 0.641
CA-19-9 (U/mL)	(0.422), 0.036	(-0.273), 0.168	(-0.056), 0.782
WBC, (x103/ ul)	(-0.003), 0.990	(-0.379), 0.051	(-0.172), 0.392

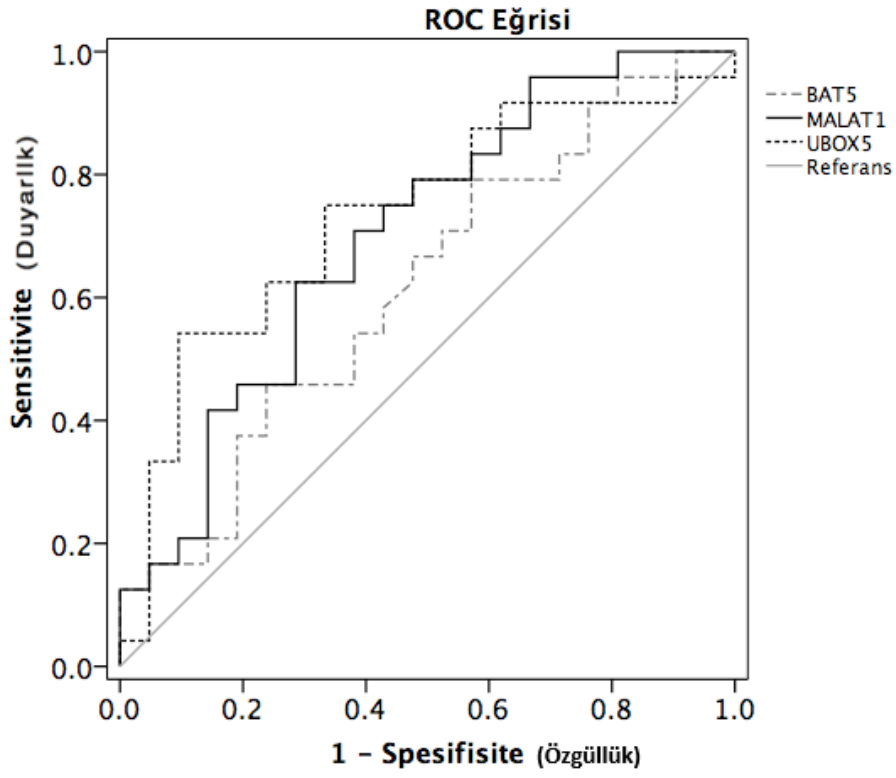
Hb (g/dl)	(-0.082), 0.698	(0.186), 0.353	(0.050), 0.805
Htc (%)	(-0.080), 0.705	(0.248), 0.212	(-0.046), 0.819
Trombosit (x103/ ul)	(-0.312), 0.129	(-0.143), 0.475	(-0.487), 0.010
CRP (mg/L)	(0.104), 0.621	(-0.126), 0.532	(0.021), 0.918
Sedimentasyon	(0.205), 0.327	(0.134), 0.505	(-0.051), 0.801
Açlık kan glukozu (mg/dL)	(-0.179), 0.391	(0.340), 0.083	(0.277), 0.161
HbA1c, (%)	(0.129), 0.539	(0.011), 0.958	(0.004), 0.982

Tez çalışmamıza dahil edilen lncRNA'ların endometriozisteki tanısal değerinin belirlenebilmesi için ROC analizi yapıldı. Operasyon öncesi ve birinci aylık takip dönemine ait veriler Tablo 18'de gösterilmiştir. operasyon öncesi lncRNA'ların ROC analizi eğrisi, Şekil 21'de, birinci aylık takip dönemi lncRNA'ların ROC analizi eğrisi Şekil 22'de verilmektedir.

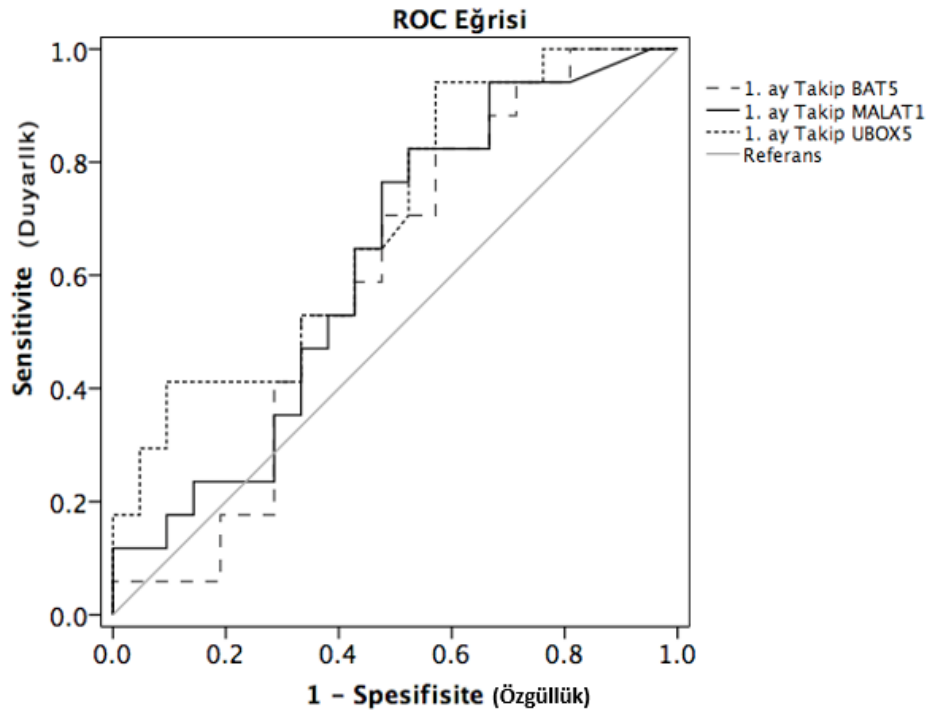
Tablo 18: Çalışma gruplarının lökositlerinde lncRNA'ların ROC (Receiver operating characteristic) analizi

lncRNA	Durum	AUC	95% CI	p değeri	Cut-off	Sensitivite, % (Duyarlılık)	Spesifite, % (özellik)
BAT5	Preop	0.62	0.45-0.78	0.176	0.60	79.2	43.0
MALAT1	Preop	0.70	0.55-0.86	0.022	5.83	62.5	71.0
UBOX5	Preop	0.73	0.58-0.88	0.008	4.37	54.2	91.0
T1_BAT5	Takip	0.59	0.41-0.77	0.325	0.60	82.0	43.0
T1_MALAT1	Takip	0.62	0.44-0.80	0.196	1.32	82.0	48.0
T1_UBOX5	Takip	0.69	0.52-0.86	0.046	0.36	94.0	43.0

Not. AUC, ROC eğrisinin altındaki alan; CI, güven aralığı; 0.5 AUC ile karşılaştırıldığında p değeri



Şekil 27: Operasyon öncesi lncRNA'ların ROC analizi eğrisi



Şekil 28: Birinci aylık takip dönemi lncRNA'ların ROC analizi eğrisi

5. TARTIŞMA

Endometriozis, uterus kavitesinin dışında endometrial glandüler doku ve stromanın varlığı ile karakterize edilen bir jinekolojik hastalıktır. Retrograd menstrüasyon süreci boyunca periton boşluğuna kaçan endometriyal fragmanlardan kaynaklandığı teorize edilen endometriozis hastalarında, endometriozisi olmayan kadınlara kıyasla nonsiklik pelvik ağrı, disparoni ve infertilite gibi semptomlardaki artış nedeniyle yaşam kalitesinde önemli ölçüde azalma gözlenir (132). Bu çalışmadaki hasta grubunun %25’inde infertilite görülürken, ASRM skorlama sistemine göre %96,9’unun evre III-IV’de ağır olduğunu tespit ettik. Endometriozis hasta ve kontrol grubunun endometriozis ile ilişkili olabilecek ağrı durumlarını karşılaştırdığımızda ise, disparoni, dismenore ve nonsiklik pelvik ağrı düzeyleri, endometriozis hastalarında kontrol grubuna kıyasla daha yüksek şiddette görülmektedir. Ancak yine kontrol grubunda az sayıda da olsa ağrı potansiyeli olan bireyler olması, bu ağrı durumlarının endometriozis dışında bir kökeni olduğunu gösterirken, endometriozisi olan hastaların bazılarında ağrı sorunu yaşanmamasına rağmen endometriozis varlığı, endometriozis hastalığının asemptomatik durumlarının da olduğunu açıkça göstermektedir. Bu durum, tanıyı güçleştiren durumlardan biridir. Bu tez çalışmasında ek olarak, cerrahi operasyon sonrası birinci aylık takip döneminde de ağrı durumları sorgulanmış ve operasyonun başarı durumu gözlenmiştir. Buna göre, hastanın birinci ay sağlık kontrolünde, disparoni durumu artık hiç görülmezken, dismenore durumunda %55, nonsiklik pelvik ağrı durumunda ise %70’e varan oranlarda iyileşme gözlenmiştir.

İnflamasyon, endometriozis patogeneğinde etkili olan en temel faktörlerden biridir. Endometriozisin patogeneğinin ana teorilerinden biri, ilk olarak Sampson (1927) (133) tarafından tarif edilen retrograd menstrüasyon yani endometriyal hücrelerin Fallop tüpleri yoluyla batin boşluğuna yayılmasıdır. Bununla birlikte, bu olayın üreme çağındaki kadınların çoğunda meydana geldiğı, ancak hepsinde hastalık oluşturmadiğı bilinmektedir. Bu aşamada inflamasyonun kritik bir rolü vardır. Sağlıklı kadınlarda endometriyal hücreler periton boşluğuna ulaştıklarında implante olmazlar ve apoptoz yoluyla bir “immunosurveillance” sistemi tarafından elimine edilirler (134). Endometriozisli kadınlarda hücre aracılı ve hümorale immünitedeki değışikliklerin hastalığın gelişimine katkıda bulunabileceğı öne sürülmektedir (135). Bu değışiklikler

muhtemelen periton boşluğuna ulaşan endometriyal hücrelerin temizlenmesini engeller ve implantasyon ve gelişimlerine izin verir (134). Literatürü incelediğimizde inflamasyon ve endometriozis ilişkisini periton sıvısında, lökositlerde ve endometriotik lezyonlarda inceleyen birçok çalışma mevcuttur. Endometriozisli kadınların ötopik endometriyumunda M1 makrofajlarında bir dengesizlik gösterilmiştir (136). Bununla birlikte, M2 CD163+/CD206+ makrofajları ise, hasta kadınların (137) peritonunda ve lezyonlarında önemli ölçüde yukarı regüle edilmiştir. İnterlökin (IL)-6, endometriozisdeki inflamatuvar kaskattaki ana sitokinlerden biridir. IL-6 düzeyinin hastaların periton boşluğunda ve kanında yükselerek ve hastalık aktivitesi ile korele olduğu gösterilmiştir (138). IL-13 ise, endometrioziste azaldığı gösterilen başka bir anti-inflamatuvar sitokindir. Makrofaj aktivasyonunun güçlü bir düzenleyicisidir; bu nedenle endometriozisli kadınların periton sıvısındaki azalma hastalığın patogeneziye katkıda bulunabilir (139). Yapılan bir çalışmada (140), endometriozisin rAFS evreleri ile PF'deki TNF- α konsantrasyonu arasında pozitif bir korelasyon bulunmuştur. PF'deki TNF- α konsantrasyonu, evre III/IV hastalığı olan hastalarda (168 pg/ml), evre I/II hastalığı olan kadınlara (60.2 pg/ml) veya kontrol hastalarına (3,3 pg/ml) göre anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur (140). Periton sıvısındaki TNF- α ve IL-8 konsantrasyonlarının da aktif lezyonların boyutu ve sayısı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (141). Kemokin (C-C motifi) ligandı 5 (CCL5) olarak da bilinen RANTES, T hücreleri de dahil olmak üzere birçok inflamatuvar hücre için kemotaktik bir sitokindir ve lökositlerin inflamatuvar bölgelere alınmasında aktif bir rol oynar. Endometrioziste, ektopik endometriozis implantları tarafından RANTES salgılanması, inflamasyonda peritoneal lökosit toplanmasına katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir. Endometriozisli kadınlarda periton sıvısında ve endometriyal dokularda RANTES ekspresyonları kontrollere göre artmıştır (40, 142). Bunun, in vivo olarak kısa süreli aralıklarla erken endometrial-peritoneal etkileşimi incelemek için ideal bir modeldir. Babunlarda, hem spontan retrograd menstrüasyon hem de deneysel intrapelvik endometriyum enjeksiyonu, artan PF hacmi ve beyaz kan hücrelerinin ve inflamatuvar sitokinlerin artan PF konsantrasyonu ile işaretlenen intrapelvik inflamasyon ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (143, 144). Yapılan bütün bu çalışmalar bize, periton sıvısında, endometriotik dokularda ve lökositlerdeki ekspresyon profillerindeki değişimlerin endometriozis patogenezi ve inflamasyon ile ilişkili olabileceğini göstermektedir. Biz de bu tez çalışmasında, endometrioz hastalarının lökosit ve

dokularda, daha önce kanser ve kardiyovasküler hastalıklarla da ilişkilendirilmiş olan aday lncRNA ifade düzeylerini inceleyerek endometriozis ve bu hastalıklarda ortak patogenez olan inflamasyon ile ilişkisini ortaya çıkarmayı amaçladık.

LncRNA'ların hücre proliferasyonu, apoptoz, farklılaşma, anjiyogenez ve bağışıklık fonksiyonları dahil olmak üzere hücresel süreçlerin çeşitli yönlerini kontrol ettikleri bildirilmiştir (145, 146). LncRNA'lar genellikle oldukça kararlı ikincil yapılar oluşturarak, serum gibi vücut sıvılarındaki serbest RNA'ları nicel olarak tespit etmeyi mümkün kılar. Bu özellikler, lncRNA'ların yalnızca hastalığın klinik teşhisi için potansiyel biyobelirteçler olabileceğini değil, aynı zamanda hastalık gelişiminde önemli faktörler olabileceğini öne sürmektedir (107). Cui ve ark. (2018), 17 ovaryan endometriozis hastasının ötopik endometrium dokularında, normal endometrium dokuları ile karşılaştırıldığında, görünür endometriozisi olmayan 17 hastadan elde edilen farklı şekilde eksprese edilmiş 86 lncRNA ve farklı şekilde eksprese edilmiş 1.228 mRNA tanımlamıştır. Yolak analizi ve gen ontolojisi analizi, lncRNA'ların biyolojik süreçlerde ve proliferasyon, adezyon, göç, anjiyogenez, steroidogenez ve Notch sinyali gibi endometriozis gelişiminde rol oynayan sinyal yollarında yer aldığını gösterdi (147). Bu çalışma, gerek endometriozis gerekse çeşitli inflamasyon ile ilişkili hastalıkların moleküler etiopatogenezini araştıran çalışmaların bulgularına göre seçilmiş aday lncRNA'ların endometriozis hastalarının lökositlerindeki ifade düzeylerinin, hastalık tanı ve takibindeki öngördürücü etkisinin olabileceği hipotezine dayanmaktadır.

Literatürde, endometrioziste lncRNA ifade düzeyleri ile ilgili sonuçlar incelendiğinde, Wang ve arkadaşlarının yaptığı bir ekspresyon profillemeye çalışmasında, endometriozis serum (n=110) ve doku (n=24) örnekleri içinde tanımlanan 1682 lncRNA'dan biri olan *UBOX5* lncRNA'nın ovaryan endometriozis ektopik dokularında yüksek oranda ifade edildiği belirlenirken, endometriozis hastaların serumlarında kontrol grubuna kıyasla *UBOX5* ifade düzeyinin azaldığı gösterilmiştir (107). Hipoksik endometriyal epitel hücrelerinde *UBOX5*'in ekspresyon modellerini ve işlevini araştırmak için yapılan başka bir çalışmada da, *UBOX5*'in HIF-1 α sinyal yoluyla hipoksi tarafından aktive edilerek ifade düzeyinin arttığı gösterilmiştir (119). HIF-1 α /lncRNA-*UBOX5* ekseninin hipoksi ile yukarı regülasyonu, EMT sürecinin aktivasyonuna neden olarak endometrioziste hücre istila potansiyelinin artmasına neden

olmaktadır. Artan *UBOX5* ifadesi, hipoksi ile düzenlenen EMT'ye ve endometriozis invazivliğine aracılık etmede önemli bir rol oynar, bu da *UBOX5*'in endometriozis için önemli bir potansiyel terapötik hedef olabileceğini düşündürmektedir (119). Bu tez çalışmasında, literatüre uyumlu olarak endometriozis hastalarında kontrol grubuna kıyasla lökositlerde *UBOX5* ifade düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı, bu anlamlı azalışın, hastaların birinci aylık kontrollerinde ise ifade düzeyinin kontrol grubundan da fazla olarak artış göstererek anlamlılığını kaybettiği diğer bir bakış açısı ile kontrol grubu ile benzer ifade düzeylerine eriştiği tespit edildi. Bu sonuç, daha önce serumda azaldığı bulunan çalışma ile (102) benzer olup bu çalışmadan farklı olarak literatürde ilk defa hastaların takibinde ifade düzeyinin kontrol grubu seviyelerine ve hatta daha yüksek seviyelere arttığını göstermesi açısından önem taşımaktadır. Diğer yandan çalışmamızda, endometrial dokularda *UBOX5* ifade düzeylerinin hastalarda kontrole göre ve ek olarak hastalarda peritoneal lezyonu olmayanlarda olanlara göre ve derin infiltratif endometriumu olmayanlarda olanlara göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da artmış olduğu tespit edildi. Bu sonuçlar, daha önce hipoksik koşullarda artan *UBOX5* ifade düzeylerinin belirlendiği çalışma sonuçları ile (115) uyumludur. İstatistiksel olarak anlamlı bir değişim belirlenememiş olmasının kontrol grubunda sağlıklı over doku sayısının az olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Endometriozis lezyonları farklı doku/hücre kökenli olabileceğinden uygun kontrol grubunun oluşturulması, hastalık patogeneze katkısının açıklanabilmesinde önem taşımaktadır. Bu çalışmada, hastaların patolojik lezyon bölgelerinden dokular cerrahi operasyonla temin edilmiş olup, normal endometrium dokuları ile kıyaslanması mümkün olamamıştır.

MALAT1 için literatürü incelediğimizde, Liang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, *MALAT1*'in miR-200c'nin bir hedefi olduğunu göstererek, *MALAT1* ifadesinin normal endometrium dokularına kıyasla ektopik lezyonlu endometrium dokularında önemli ölçüde yukarı regüle edildiğini tespit etmişlerdir (121). Bunun yanında *MALAT1* seviyesi miR-200c seviyesi ile anlamlı ölçüde negatif korelasyon göstermiştir. Ayrıca yaptıkları fonksiyonel çalışmalarda, *MALAT1* yıkımının HESC'lerin (Primary endometrial stromal cells) çoğalmasını ve göçünü engellediğini, miR-200c ifadesinin aşağı regülasyonu ise HESC'lerde bu yetenekleri geri kazandırdığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar, *MALAT1*'in HESC'lerin çoğalmasını ve göçünü miR-200c'ye bağlı bir şekilde düzenlediğini göstermiştir. *MALAT1*/miR-200c yapısı,

endometriotik stromal hücrelerin proliferasyonunu ve göçünü önemli ölçüde etkilediği ve bu yapının endometriozis tanı ve tedavisi için yeni bir hedef olabileceği gösterilmiştir (7). Liu ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada da *MALAT1*'in endometrioziste yüksek oranda eksprese edildiği ve hipoksi tarafından yukarı regüle edildiği bildirilmiştir (145). Hipoksi, hücre koruyucu mekanizma olarak hareket edebilen otofajiyi de indükleyebilir. Bununla birlikte, endometrioziste hipoksi koşulları altında *MALAT1* ve otofaji arasındaki ilişki bilinmemektedir. Bu çalışmada, endometriozisli hastalardan alınan ektopik lezyonlu endometriumda hem *MALAT1* hem de otofaji seviyesinin yukarı regüle edildiği ve ekspresyon seviyesinin hipoksi ile indüklenebilir faktör-1 α (HIF-1 α) ile pozitif korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir. Bu çalışma, *MALAT1*'in endometrioziste endometriyal stromal hücrelerin hipoksi ile indüklenen hayatta kalma yanlısı otofajisine aracılık ettiğini tanımlamaktadır (148). Yu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmanın sonuçları ise, endometriozis dokularında kontrollere kıyasla önemli ölçüde daha yüksek *MALAT1* seviyesi olduğunu gösterdi ve *MALAT1*'in, NF- κ B/iNOS sinyal yolağı üzerinden endometriyal hücre apoptozisini kolaylaştırabildiğini ve endometriyal hücre proliferasyonunu veya invazyonunu baskılamak için MMP-9 ekspresyonunu değiştirerek endometriozis patogenezi modüle edebildiğini gösterdi (122). Bir nükleer transkripsiyon faktörü olarak NF- κ B, inflamatuvar yanıt ve immün reaksiyona veya diğer fizyolojik süreçlere katılmaktadır. Bağışıklık veya inflamasyon ile ilgili NF- κ B ve indüklenebilir nitrik oksit sentazın (iNOS) birlikte aktivasyonu da önemli roller üstlenir. MMP-9, çeşitli vücut patolojik ve fizyolojik süreçlerine katılır ve hücre çoğalması ve göçünde önemli roller oynar. Ayrıca, *MALAT1* ifadesi, MMP-9 ekspresyonu üzerinde daha fazla inhibisyon için NF- κ B/iNOS sinyal yolunun aşağı regüle edilebileceğini ve böylece endometriozisin ilerlemesinin düzenlemesine katılabileceği gösterilmiştir (125). Bu tez çalışmasında da, *MALAT1* ifade düzeyinin literatüre uyumlu olarak endometriozis lökosit ve doku örneklerimizde kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde artış gösterdiği tespit edildi. Ek olarak ilk defa bu çalışmada, operasyon sonrası birinci aylık takip hastalarında operasyon öncesine göre, lökositlerde *MALAT1* ifade düzeylerinin kontrol grubu seviyelerine kadar gerileyerek hastalık takibinde önemli bir belirteç olabileceği tespit edildi. Bu sonuçlar literatürü destekler nitelikte olup, özellikle inflamatuvar etkileri dikkate alındığında lezyonlu dokulardaki artmış *MALAT1* ifade düzeyinin endometriozis patogenezinde

etkili olduğunu ve lökositlerdeki ifade düzeylerinin ise biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Bu tez çalışmasında son aday lncRNA olarak seçilen *BAT5* bulgularına baktığımızda, Cai ve arkadaşları yaptıkları mikrodizin tabanlı ekspresyon profillemeye çalışmasında *BAT5*'i bir lncRNA olarak ilk defa tanımlamış ve 20 koroner arter hastalığı bulunan hastanın periferik kan mononükleer hücrelerinde *BAT5*'in ifade düzeylerini kontrol grubuna (n=20) kıyasla 2 kat arttığını göstermişlerdir (128). *BAT5*, insan majör histo-uyumluluk kompleksi (MHC) sınıf III içindeki bir gen kümesine aittir ve *BAT5*'in bağışık sistemi ile ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (131). Bu çalışmadaki sonuçlarımızda ise, endometriozis hastaların lökositlerinde kontrollere ve hastaların birinci aydaki takiplerine göre ve ek olarak lezyonlu doku örneklerinde kontrole kıyasla *BAT5* ifade düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da bir artış belirlenmiştir. Lökositlerdeki ifade düzeyleri daha önce monositlerde belirlenen bir yönde (131) belirlenmesi yine inflamasyonda rol aldığı koroner arter hastalığı gibi endometriozisde de *BAT5*'in etkisini olabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, operasyon sonrası birinci ay takip hastalarında operasyon öncesi durumlarına kıyasla lökositlerde *BAT5* ifade düzeyinde azalma tespit edildi. Bu da hastalarda iyileşme durumu oluştuğunu göz önüne aldığımızda yine literatürle uyumlu bir veri olmuştur. Koroner arter hastalıkları patogenezinde inflamasyonun etkili olduğu bilinmektedir (128). *BAT5* ifade düzeyinin endometriozis hastalarında da benzer bir ifade profili sergilemesi, endometriozis patogenezinde de inflamasyonla ilişkili olabileceğini ve *BAT5* lncRNA'nın rolü olabileceğini düşündürmektedir.

Bu tez çalışmasında, lökositlerde ve dokularda seçilen aday lncRNA'ların ifade düzeyleri hem hastalığın inflamasyonla ilişkili olabileceğini göstermek amacıyla gruplar arasında karşılaştırıldı hem de endometriozis tanısı için biyobelirteç niteliklerini göstermek için ROC analizleri ile değerlendirildi. Wang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, ROC analizleri verilerine göre NR_038395 (*UBOX5*), NR_038452, ENST00000482343, ENST00000544649 ve ENST00000393610 dahil olmak üzere kan dolaşımındaki beş lncRNA'nın kombinasyonunun endometriozis için potansiyel invaziv olmayan biyobelirteçler olabileceğini öne sürmüşlerdir (102). Yapılan çalışmada, *UBOX5*'in belirli lncRNA'lar arasında %84.75 ile en yüksek duyarlılığa sahip olduğu, buna karşın ENST00000544649'un %91.67 ile en yüksek özgüllüğe

sahip olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak, endometriozis olan ve olmayan hastaları ayırt etmek için *UBOX5*, NR_038452, ENST00000482343, ENST00000544649 ve ENST00000393610'un kombinasyonunun %89,66 duyarlılık ve %73,17 özgüllük ile kesme noktası değeri olarak 0,8795 [%95 CI: 0,8109-0,9482, $p < 0,001$] belirlenmiştir (107). *MALAT1*'in endometriozis için potansiyel bir biyobelirteç olarak özelliğini araştırmak için yapılan bir çalışmada, 104 hastanın kohortundan alınan qRT-PCR verileri kullanılarak *MALAT1* ifade düzeyleri belirlenmiş olup (36 Evre I-II, 16 Evre III-IV ve 52 kontrol) AUC, tüm endometriozis hastaları ve kontrolleri için 0.705 (%95 GA: 0.606-0.804; $P < 0.001$), Evre I-II endometriozis ve kontroller için 0.651 (%95 GA: 0.536-0.767; $P = 0.016$) ve 0.827 (Evre III-IV endometriozis ve kontroller için %95 CI: 0.718-0.936; $P < 0.001$), *MALAT1*'in endometrioziste potansiyel tanısal değeri olduğunu düşündürür; bu sonuçlar, Evre III-IV endometriozis hastaları ile kontrol grubu arasında güçlü bir ayrımı göstermektedir (149). Bu tez çalışmasında endometriozis hastalık tanısı için, operasyon öncesi hastalarda lökosit örneklerinde, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da *BAT5* (AUC:0.62) için %79.2 duyarlılık ve %43 özgüllük, *MALAT1* (AUC:0.70), %62.5 duyarlılık ve %71 özgüllük, *UBOX5* (AUC:0.73), %54.2 duyarlılık ve %91 özgüllük ile anlamlı olarak biyobelirteç olarak değerlendirilebilecekleri belirlendi. Ayrıca operasyon sonrası birinci aylık takip hastalarının lökosit örneklerinde ise, *BAT5* (AUC:0.59), %82 duyarlılık ve %43 özgüllük, *MALAT1* (AUC:0.62), %82 duyarlılık ve %48 özgüllük ve sadece istatistiksel olarak anlamlı derecede *UBOX5* (AUC:0.69), %94 duyarlılık ve %43 özgüllük ile ifade düzeylerinin takipte değerlendirilebileceği belirlendi. Analiz edilen lncRNA ifade düzeylerinin tanı ve takipte biyobelirteç olarak kullanılabilmesi için daha önceki çalışmadaki (102) gibi optimal kombinasyonun belirlenmesi önemli olabilir. Böylece ek çalışmalar ile daha yüksek duyarlılık ve özgüllük ile bu lncRNA'ların biyobelirteç olarak kullanılması mümkün olabilir.

Bu tez çalışmasında, *UBOX5*, *MALAT1* ve *BAT5* lncRNA'ların ifade düzeylerinin literatürle uyumlu bir ifade profili sergilediği gösterildi. Bu bulgular, aday olarak belirlenen bu lncRNA'ların endometriozis patogeneğinde inflamasyonla ilişkili olarak rol alabileceğini düşündürmektedir. Özellikle *UBOX5* ve *BAT5* lncRNA'ları için var olan kısıtlı literatür bilgisine bu tez çalışmasında elde ettiğimiz verilerin katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

Bu tez çalışması, özellikle operasyon sonrası takip hastalarında lökositlerde ve hastaların dokularının da sınıflandırılması ile ifade düzeylerinin incelenmesi yönünden özgün nitelik taşımaktadır. Ancak istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edebilmek için hasta ve kontrol gruplarının özellikle doku örneği sayılarının artırılması ve endometriozisin moleküler etyopatogenezindeki rollerini belirlemek için fonksiyonel çalışmaların yapılarak elde edilen bulguların desteklenmesi gerekmektedir.



KAYNAKLAR

1. Dominique de Ziegler, B.B., Charles Chapron, *Endometriosis and infertility: pathophysiology and management*. Lancet. 2010;376(9742):730-738. doi:10.1016/S0140-6736(10)60490-4
2. Paolo Vercellini, P.V., Edgardo Somigliana and Luigi Fedele, *Endometriosis: pathogenesis and treatment*. Nat Rev Endocrinol. 2014;10(5):261-275. doi:10.1038/nrendo.2013.255
3. Alessandro La Ferlita, R.B., Francesca Andronico, Salvatore Caruso, and M.P.a.C.D.P. Antonio Cianci, *Non-Coding RNAs in Endometrial Physiopathology*. Int J Mol Sci. 2018;19(7):2120. Published 2018 Jul 20. doi:10.3390/ijms19072120
4. Wang, Y.W.Y.L.Z.Y.K.L.D., *Genome-Wide Microarray Analysis of Long Non-Coding RNAs in Eutopic Secretory Endometrium with Endometriosis*. Cell Physiol Biochem. 2015;37(6):2231-2245. doi:10.1159/000438579
5. Jose Luiz Marques-Rocha, M.S., Fermin I. Milagro, Josefina Bressan, and J. Alfredo Martínez, and Amelia Marti, *Noncoding RNAs, cytokines, and inflammation-related diseases*. FASEB J. 2015;29(9):3595-3611. doi:10.1096/fj.14-260323
6. Ghazal1, S., et al., *H19 lncRNA alters stromal cell growth via IGF signaling in the endometrium of women with endometriosis*. EMBO Mol Med. 2015;7(8):996-1003. doi:10.15252/emmm.201505245
7. Liang, Z., et al., *miR-200c suppresses endometriosis by targeting MALAT1 in vitro and in vivo*. Stem Cell Res Ther. 2017;8(1):251. Published 2017 Nov 7. doi:10.1186/s13287-017-0706-z
8. Starzinski-Powitz, P.A.B.K.a.A., *Molecular and Cellular Pathogenesis of Endometriosis*. Curr Womens Health Rev. 2018;14(2):106-116. doi:10.2174/1573404813666170306163448
9. Krina T. Zondervan, D.P., Christian M. Becker, M.D., and S.D. and Stacey A. Missmer, *Endometriosis*. N Engl J Med. 2020;382(13):1244-1256. doi:10.1056/NEJMr1810764
10. A.L. Shafrir, L.V. Farland, D.K. Shah e, H.R. Harris f, and h. M. Kvaskoff g, K. Zondervan, S.A. Missmer, *Risk for and consequences of endometriosis: A critical epidemiologic review*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2018;51:1-15. doi:10.1016/j.bpobgyn.2018.06.001
11. Foti PV, Farina R, Palmucci S, et al. *Endometriosis: clinical features, MR imaging findings and pathologic correlation*. Insights Imaging. 2018;9(2):149-172. doi:10.1007/s13244-017-0591-0
12. *Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996*. American Society for Reproductive Medicine.
13. Maria Arafah, M., Sameera Rashid, MD, and M. and Mohammed Akhtar, FCAP, FRCPath, FRCPA, *Endometriosis: A Comprehensive Review*. Adv Anat Pathol. 2021;28(1):30-43. doi:10.1097/PAP.0000000000000288
14. Joi A. SAMPSON, M., *METASTATIC OR EMBOLIC ENDOMETRIOSIS, DUE TO THE MENSTRUAL DISSEMINATION OF ENDOMETRIAL TISSUE INTO THE VENOUS CIRCULATION*. THE AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, 1927.

15. Isaac E. Sassona and Hugh S. Taylor, *Stem Cells and the Pathogenesis of Endometriosis*. Ann N Y Acad Sci. 2008;1127:106-115. doi:10.1196/annals.1434.014
16. P R Koninckx, S.H.K., D H Barlow, *Endometriotic disease: the role of peritoneal fluid*. Hum Reprod Update. 1998;4(5):741-751. doi:10.1093/humupd/4.5.741
17. P Harirchian, I.G., S T Lipskind, A G Braundmeier, J M Hastings, M R Olson, A T Fazleabas, *Lesion kinetics in a non-human primate model of endometriosis*. Hum Reprod. 2012;27(8):2341-2351. doi:10.1093/humrep/des196
18. Samer Sourial, N.T., and Dharani K. Hapangama, *Theories on the Pathogenesis of Endometriosis*. International Journal of Reproductive Medicine, 2014. doi:10.1155/2014/179515
19. Jean Bouquet de Jolinière, J.M.A., Guy Lesec, Pierre Validire, Alexandre Goguin, Luca Gianaroli, Jean Bernard Dubuisson, Anis Feki, Jean Gogusev, *Identification of displaced endometrial glands and embryonic duct remnants in female fetal reproductive tract: possible pathogenetic role in endometriotic and pelvic neoplastic processes*. Front Physiol. 2012;3:444. Published 2012 Dec 3. doi:10.3389/fphys.2012.00444
20. Serdar E. Bulun, M.D., *Mechanisms of Disease Endometriosis*. The new england journal of medicine, 2009.
21. Ann A. Murphy, M.D., Wulf Pallnskl, M.D., Sara Rank/n, Ph.D., and M.D. Arlene J. Morales, and Sampath Parthasarathy, Ph.D., *Evidence for oxidatively modified lipidprotein complexes in endometrium and endometriosis*. Fertil Steril. 1998;69(6):1092-1094. doi:10.1016/s0015-0282(98)00087-9
22. Yongjin Wang, M.D.J.G., M.D., P.D.A.A. Rakesh K. Sharma, Ph.D., and M.D. Tommaso Falcone, *Importance of reactive oxygen species in the peritoneal fluid of women with endometriosis or idiopathic infertility*. Fertil Steril. 1997;68(5):826-830. doi:10.1016/s0015-0282(97)00343-9
23. Gupta1, S., A.A., Natalie Krajcir1, and J.G.A., *Role of oxidative stress in endometriosis*. Reprod Biomed Online. 2006;13(1):126-134. doi:10.1016/s1472-6483(10)62026-3
24. Emre Seli, M., Murat Berkkanoglu, MD, Aydin Arici, MD, *Pathogenesis of endometriosis*. Obstet Gynecol Clin N Am, 2003. 30(1):41-61. doi:10.1016/s0889-8545(02)00052-9
25. Hans M. Albertsen, R.C., Pamela Farrington, Kenneth Ward, *Genome-Wide Association Study Link Novel Loci to Endometriosis*. PLOS ONE, 2013 ;8(3):e58257. doi:10.1371/journal.pone.0058257
26. Richard O. Burney, M.D., M.S., and Linda C. Giudice, M.D., Ph.D., *Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis*. PLoS One. 2013;8(3):e58257. doi:10.1371/journal.pone.0058257
27. Juliana Meola, P.D., Julio Cesar Rosa e Silva, M.D., Ph.D., Daniel Blassioli Dentillo, Ph.D., et al., *Differentially expressed genes in eutopic and ectopic endometrium of women with endometriosis*. Fertil Steril. 2010;93(6):1750-1773. doi:10.1016/j.fertnstert.2008.12.058
28. A.A.A.A.M.C. and N.V.I. Lambrinoudaki, *Pathogenesis of endometriosis: the role of genetics, inflammation and oxidative stress*. Arch Gynecol Obstet. 2012;286(1):99-103. doi:10.1007/s00404-012-2357-8

29. P.R. Koninckxa, .D.B.S.K., *Implantation versus Infiltration: The Sampson versus the Endometriotic Disease Theory*. Gynecol Obstet Invest. 1999;47 Suppl 1:3-10. doi:10.1159/000052853
30. Khan, M.A., J.S. , and S.M.a.D.G. , *Genome-wide expressions in autologous eutopic and ectopic endometrium of fertile women with endometriosis*. Reprod Biol Endocrinol. 2012;10:84. Published 2012 Sep 24. doi:10.1186/1477-7827-10-84
31. N.Sinaii, S.D.C., M.L.Ballweg, L.K.Nieman¹ and P.Stratton, *High rates of autoimmune and endocrine disorders, fibromyalgia, chronic fatigue syndrome and atopic diseases among women with endometriosis: a survey analysis*. Hum Reprod. 2002;17(10):2715-2724. doi:10.1093/humrep/17.10.2715
32. Yutaka Osuga, K.K., Yasushi Hirota, Testuya Hirata, Osamu Yoshino, Yuji Taketan, *Lymphocytes in Endometriosis*. Am J Reprod Immunol. 2011;65(1):1-10. doi:10.1111/j.1600-0897.2010.00887.x
33. George Christodoulakos, A.A., Irene Lambrinoudaki, Vasilios Sioulas and George Creatsas, *Pathogenesis of endometriosis: The role of defective 'immunosurveillance'*. Eur J Contracept Reprod Health Care. 2007;12(3):194-202. doi:10.1080/13625180701387266
34. Laschke, M.W. and C.G. , and M.D. Menger, *Vasculogenesis: a new piece of the endometriosis puzzle*. Hum Reprod Update. 2011;17(5):628-636. doi:10.1093/humupd/dmr023
35. A.S.L.O.T.F.M.S., et al., *Natural Killer T cell subsets in eutopic and ectopic endometrium: a fresh look to a busy corner*. Hum Reprod Update. 2011;17(5):628-636. doi:10.1093/humupd/dmr023
36. Vetvicka V, Laganà AS, Salmeri FM, et al. *Regulation of apoptotic pathways during endometriosis: from the molecular basis to the future perspectives*. Arch Gynecol Obstet. 2016;294(5):897-904. doi:10.1007/s00404-016-4195-6
37. Yan-Yan Fan, H.-Y.C., Wei Chen, Yi-Nan Liu, Yan Fu & Li-Na Wang, *Expression of inflammatory cytokines in serum and peritoneal fluid from patients with different stages of endometriosis*. Gynecol Endocrinol. 2018;34(6):507-512. doi:10.1080/09513590.2017.1409717
38. Dan I. Lebovic, M.D., Russell A. Baldocchi, Ph.D., Michael D. Mueller, M.D., and and M.D. Robert N. Taylor, Ph.D., *Altered expression of a cell-cycle suppressor gene, Tob-1, in endometriotic cells by cDNA array analyses*. Fertil Steril. 2002;78(4):849-854. doi:10.1016/s0015-0282(02)03319-8
39. Nick A Bersinger, A.R.G., Brett McKinnon, Silke Johann, Michael D Mueller, *Dose-response effect of interleukin (IL)-1 β , tumour necrosis factor (TNF)- α , and interferon- γ on the in vitro production of epithelial neutrophil activating peptide-78 (ENA-78), IL-8, and IL-6 by human endometrial stromal cells*. Arch Gynecol Obstet. 2011;283(6):1291-1296. doi:10.1007/s00404-010-1520-3
40. Cleophas M. Kyama, M.S., Lutgart Overbergh, Ph.D., Attila Mihalyi, Ph.D., M.D. Christel Meuleman, Jason M. Mwenda, Ph.D., Chantal Mathieu, M.D. Ph.D., and, and M.D.P.D.. Thomas M. D'Hooghe, *Endometrial and peritoneal expression of aromatase, cytokines, and adhesion factors in women with endometriosis*. Fertil Steril. 2008;89(2):301-310. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.02.057
41. J.S.M.S.-K.A.M.-P. and Z. Kondera-Anasz, *Abnormal peritoneal regulation of chemokine activation—The role of IL-8 in pathogenesis of endometriosis*. Am J Reprod Immunol. 2017;77(4):10.1111/aji.12622. doi:10.1111/aji.12622

42. Yasuko Sakamoto, T.H., Sayako Horie, Yumiko Iba, Fuminori Taniguchi, Souichi Yoshida, Tomio Iwabe, Naoki Terakawa, *Tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-8 (IL-8) expression in endometriotic stromal cells, probably through nuclear factor-kappa B activation: gonadotropin-releasing hormone agonist treatment reduced IL-8 expression.* J Clin Endocrinol Metab. 2003;88(2):730-735. doi:10.1210/jc.2002-020666
43. Kalu1, E., et al., *Cytokine profiles in serum and peritoneal fluid from infertile women with and without endometriosis.* J Obstet Gynaecol Res. 2007;33(4):490-495. doi:10.1111/j.1447-0756.2007.00569.x
44. Vicky J. Young, J.K.B., Philippa T.K. Saunders, and a.A.W. Horne, *The role of the peritoneum in the pathogenesis of endometriosis.* Hum Reprod Update. 2013;19(5):558-569. doi:10.1093/humupd/dmt024
45. Lih-Yuh C Wing, P.-C.C., Meng-Hsing Wu, Hsiu-Mei Chen, Shaw-Jenq Tsai, *Expression and mitogenic effect of fibroblast growth factor-9 in human endometriotic implant is regulated by aberrant production of estrogen.* J Clin Endocrinol Metab. 2003;88(11):5547-5554. doi:10.1210/jc.2003-030597
46. Ki-Hyung Kim, Eun Na Lee, Jin Kyeong Park, Ja-Rang Lee, Ji-Hyun Kim, and B.-S.K. Hak-Jong Choi, Hee-Woo Lee, Kyu-Sup Lee and Sik Yoon, *Curcumin Attenuates TNF-a-induced Expression of Intercellular Adhesion Molecule-1, Vascular Cell Adhesion Molecule-1 and Proinflammatory Cytokines in Human Endometriotic Stromal Cells.* Phytother Res. 2012;26(7):1037-1047. doi:10.1002/ptr.3694
47. O. CELIK, A.E., M. ACET, N. CELIK, Y. BAYKUS, and E.O. R. DENIZ, I. OZEROL, *Disulfiram, as a candidate NF- κ B and proteasome inhibitor, prevents endometriotic implant growing in a rat model of endometriosis.* Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2016;20(20):4380-4389.
48. Marc Bazot, M.D., and Emile Daraï, M.D., Ph.D., *Diagnosis of deep endometriosis: clinical examination, ultrasonography, magnetic resonance imaging, and other techniques.* Fertil Steril. 2017;108(6):886-894. doi:10.1016/j.fertnstert.2017.10.026
49. Robert Z. Spaczynski, M.D., Ph.D. and Antoni J. Duleba, M.D., *Diagnosis of Endometriosis.* Semin Reprod Med. 2003;21(2):193-208. doi:10.1055/s-2003-41326
50. ALBERT L. HSU, M., IZABELLA KHACHIKYAN, MD, and M. and PAMELA STRATTON, *Invasive and Noninvasive Methods for the Diagnosis of Endometriosis.* Clin Obstet Gynecol. 2010;53(2):413-419. doi:10.1097/GRF.0b013e3181db7ce8
51. Larissa M. Coutinho, Márcia C. Ferreirab, Ana Luiza L. Rochab, and F.M.R. Márcia M. Carneirob, *New biomarkers in endometriosis.* Adv Clin Chem. 2019;89:59-77. doi:10.1016/bs.acc.2018.12.002
52. Ben W. J. Mol, M.D., Neriman Bayram, M.D., Jeroen G. Lijmer, M.D., M.D. Maarten A. H. M. Wiegerinck, Ph.D., Marlies Y. Bongers, M.D., and M.D. Fulco van der Veen, Ph.D., and Patrick M. M. Bossuyt, Ph.D., *The performance of CA-125 measurement in the detection of endometriosis: a meta-analysis.* Fertil Steril. 1998;70(6):1101-1108. doi:10.1016/s0015-0282(98)00355-0
53. Kafali, H. and H.I.A. , Nurettin Demir, *Use of CA125 fluctuation during the menstrual cycle as a tool in the clinical diagnosis of endometriosis; a preliminary report.* Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2004;116(1):85-88. doi:10.1016/j.ejogrb.2004.02.039

54. Kitawaki1, J., H.I. , Hisato Koshiba, Miyo Kiyomizu, Mariko Teramoto, and Y.K.a.H. Honjo, *Usefulness and limits of CA-125 in diagnosis of endometriosis without associated ovarian endometriomas*. Hum Reprod. 2005;20(7):1999-2003. doi:10.1093/humrep/deh890
55. Paolo Vercellini, .L.C., Tommaso Rubino Giusy Barbara, and L.F. Annalisa Abbiati a, *Surgery for Deep Endometriosis: A Pathogenesis-Oriented Approach*. Gynecol Obstet Invest. 2009;68(2):88-103. doi:10.1159/000219946
56. Nicola Berlanda, M., Paolo Vercellini, MD Edgardo Somigliana, MD, PhD and M.L.B. Maria Pina Frattaruolo, MD Umberto Gattei, MD, *Role of Surgery in Endometriosis-Associated Subfertility*. Semin Reprod Med. 2013;31(2):133-143. doi:10.1055/s-0032-1333478
57. P. Vercellini, P.G. Crosignani, A. Abbiati, E. Somigliana, and a.L.F. P. Vigano`, *The effect of surgery for symptomatic endometriosis: the other side of the story*. Hum Reprod Update. 2009;15(2):177-188. doi:10.1093/humupd/dmn062
58. Martin Healey, M.D., W. Catarina Ang, M.B., B.S., and Claudia Cheng, M.B., B.S., *Surgical treatment of endometriosis: a prospective randomized double-blinded trial comparing excision and ablation*. Fertil Steril. 2010;94(7):2536-2540. doi:10.1016/j.fertnstert.2010.02.044
59. Hart RJ, H.M., Maouris P, Buckett W, *Excisional surgery versus ablative surgery for ovarian endometriomata (Review)*. Cochrane Database Syst Rev. 2008;(2):CD004992. Published 2008 Apr 16. doi:10.1002/14651858.CD004992.pub3
60. Paolo Vercellini, E.S., Paola Vigano`, G.B.a. Annalisa Abbiati, and P.G. Crosignani1, *Endometriosis Current Therapies and New Pharmacological Developments*. Drugs. 2009;69(6):649-675. doi:10.2165/00003495-200969060-00002
61. Tommaso Falcone, M., and Rebecca Flyckt, MD, *Clinical Management of Endometriosis*. Obstet Gynecol. 2018;131(3):557-571. doi:10.1097/AOG.0000000000002469
62. Djebali, S., et al., , *Landscape of transcription in human cells*. Nature. 2012;489(7414):101-108. doi:10.1038/nature11233
63. Erman, E.D.B., *Long noncoding RNA (lincRNA), a new paradigm in gene expression control*. Funct Integr Genomics. 2017;17(2-3):135-143. doi:10.1007/s10142-016-0524-x
64. Moran N. Cabili, Cole Trapnell, Loyal Goff, Magdalena Koziol, Barbara Tazon-Vega, and Aviv Regev, and John L. Rinn, *Integrative annotation of human large intergenic noncoding RNAs reveals global properties and specific subclasses*. Genes Dev. 2011;25(18):1915-1927. doi:10.1101/gad.17446611
65. Lina Ma, V.B.B.a.Z.Z., *On the classification of long non-coding RNAs*. RNA Biol. 2013;10(6):925-933. doi:10.4161/rna.24604
66. Jill Cheng 1, P.K., Jorg Drenkow, Sujit Dike, Shane Brubaker, Sandeep Patel, Jeffrey Long, David Stern, Hari Tammana, Gregg Helt, Victor Sementchenko, Antonio Piccolboni, Stefan Bekiranov, Dione K Bailey, Madhavan Ganesh, Srinka Ghosh, Ian Bell, Daniela S Gerhard, Thomas R Gingeras, *Transcriptional maps of 10 human chromosomes at 5-nucleotide resolution*. Science. 2005;308(5725):1149-1154. doi:10.1126/science.1108625
67. Guttman M, Garber M, Levin JZ, et al. *Ab initio reconstruction of cell type-specific transcriptomes in mouse reveals the conserved multi-exonic structure of*

- lincRNAs* [published correction appears in Nat Biotechnol. 2010 Jul;28(7):756]. Nat Biotechnol. 2010;28(5):503-510. doi:10.1038/nbt.1633
68. Ahmad M. Khalila, Mitchell Guttman, Maite Huarte, Manuel Garbera, Arjun Rajd, Dianali Rivea Moralesa., Kelly Thomasa, Aviva Pressera, Bradley E. Bernstein, Alexander van Oudenaardend, Aviv Regeva, c., and c. Eric S. Landera, and John L. Rinn, *Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression*. Proc Natl Acad Sci USA. 2009;106(28):11667-11672. doi:10.1073/pnas.0904715106
 69. Maite Huarte, et al., *A large intergenic non-coding RNA induced by p53 mediates global gene repression in the p53 response*. Cell. 2010;142(3):409-419. doi:10.1016/j.cell.2010.06.040
 70. Mitchell Guttman, Ido Amit, Manuel Garber, Courtney French, Michael F. Lin, David, et al., *Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals*. Nature. 2009;458(7235):223-227. doi:10.1038/nature07672
 71. Ulf Andersson Örom, T.D., Malte Beringer, Kiranmai Gumireddy, G.B. Alessandro Gardini, Fan Lai, Matthias Zytnicki, Cedric Notredame, and R.G. Qihong Huang, and Ramin Shiekhattar, *Long non-coding RNAs with enhancer-like function in human*. Cell. 2010;143(1):46-58. doi:10.1016/j.cell.2010.09.001
 72. Thomas Derrien, Rory Johnson, Giovanni Bussotti, Andrea Tanzer, et al., *The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: Analysis of their gene structure, evolution, and expression*. Genome Res. 2012;22(9):1775-1789. doi:10.1101/gr.132159.111
 73. Carlevaro-Fita J, Rahim A, Guigó R, Vardy LA, Johnson R. *Cytoplasmic long noncoding RNAs are frequently bound to and degraded at ribosomes in human cells*. RNA. 2016;22(6):867-882. doi:10.1261/rna.053561.115
 74. Ronit Wilk, Jack Hu, Dmitry Blotsky, and Henry M. Krause, *Diverse and pervasive subcellular distributions for both coding and long noncoding RNAs*. Genes Dev. 2016;30(5):594-609. doi:10.1101/gad.276931.115
 75. Tim R. Mercer, M.E.D.a.J.S.M., *Long non-coding RNAs: insights into functions*. Nat Rev Genet. 2009;10(3):155-159. doi:10.1038/nrg2521
 76. Jing Zhao, Bryan K. Sun, Jennifer A. Erwin, Ji-Joon Song, and Jeannie T. Lee, *Polycomb proteins targeted by a short repeat RNA to the mouse X-chromosome*. Science. 2008;322(5902):750-756. doi:10.1126/science.1163045
 77. Kevin C. Wang and Howard Y. Chang, *Molecular Mechanisms of Long Noncoding RNAs*. Mol Cell. 2011;43(6):904-914. doi:10.1016/j.molcel.2011.08.018
 78. Gribnau, D.B.P.J., *Xist regulation and function explored*. Hum Genet. 2011;130(2):223-236. doi:10.1007/s00439-011-1008-7
 79. Di Tian, S.S., and Jeannie T. Lee, *The long noncoding RNA, Jpx, is a molecular switch for X-chromosome inactivation*. Cell. 2010;143(3):390-403. doi:10.1016/j.cell.2010.09.049
 80. Tiffany Hung, Yulei Wang, Michael F. Lin, Ashley K. Koegel, Yojiro Kotake, et al., *Extensive and coordinated transcription of noncoding RNAs within cell cycle promoters*. Nat Genet. 2011;43(7):621-629. Published 2011 Jun 5. doi:10.1038/ng.848
 81. Tomoshige Kino, D.E.H. , Takamasa Ichijo, Nancy Nader, and George P., and Chrousos, *Noncoding RNA Gas5 Is a Growth Arrest and Starvation Associated*

- Repressor of the Glucocorticoid Receptor*. Sci Signal. 2010;3(107):ra8. Published 2010 Feb 2. doi:10.1126/scisignal.2000568
82. David Umlauf, P.F., Takashi Nagano, *The role of long non-coding RNAs in chromatin structure and gene regulation: variations on a theme*. Biol Chem. 2008;389(4):323-331. doi:10.1515/BC.2008.047
 83. Ringrose, B.H.L., *Non-coding RNAs in Polycomb/Trithorax regulation*. RNA Biol. 2009;6(2):129-137. doi:10.4161/rna.6.2.8178
 84. Bonasio, R., S.T. , and a.D.R. , *Molecular Signals of Epigenetic States*. Science. 2010;330(6004):612-616. doi:10.1126/science.1191078
 85. Chang, T.H.a.H.Y., *Long noncoding RNA in genome regulation Prospects and mechanisms*. RNA Biol. 2010;7(5):582-585. doi:10.4161/rna.7.5.13216
 86. Maciej Szymanski, M.Z.B., Volker A Erdmann, Jan Barciszewski, *A new frontier for molecular medicine: noncoding RNAs*. Biochim Biophys Acta. 2005;1756(1):65-75. doi:10.1016/j.bbcan.2005.07.005
 87. Helen M. Broadbent¹, et al., *Susceptibility to coronary artery disease and diabetes is encoded by distinct, tightly linked SNPs in the ANRIL locus on chromosome 9p*. Hum Mol Genet. 2008;17(6):806-814. doi:10.1093/hmg/ddm352
 88. L. Lewejohann, B.V. Skryabin, N. Sachser, C. Prehn, P. Heiduschka, S. Thanos, et al., *Role of a neuronal small non-messenger RNA: behavioural alterations in BC1 RNA-deleted mice*. Behav Brain Res. 2004;154(1):273-289. doi:10.1016/j.bbr.2004.02.015
 89. Francesca Zalfa, M.G., et al., *The Fragile X Syndrome Protein FMRP Associates with BC1 RNA and Regulates the Translation of Specific mRNAs at Synapses*. Cell. 2003;112(3):317-327. doi:10.1016/s0092-8674(03)00079-5
 90. Melinda L Moseley, T.Z., Yoshio Ikeda, Wangcai Gao, Anne K Mosemiller, Randy S Daughters, Gang Chen, Marcy R Weatherspoon, H Brent Clark, Timothy J Ebner, John W Day, Laura P W Ranum, *Bidirectional expression of CUG and CAG expansion transcripts and intranuclear polyglutamine inclusions in spinocerebellar ataxia type 8*. Nat Genet. 2006;38(7):758-769. doi:10.1038/ng1827
 91. M D Koob, M.L.M., L J Schut, K A Benzow, T D Bird, J W Day, L P Ranum, *An untranslated CTG expansion causes a novel form of spinocerebellar ataxia (SCA8)*. Nat Genet. 1999;21(4):379-384. doi:10.1038/7710
 92. Spector, K.V.P.a.D.L., *Eukaryotic regulatory RNAs: an answer to the 'genome complexity' conundrum*. Genes Dev. 2007;21(1):11-42. doi:10.1101/gad.1484207
 93. Ryan J Taft, K.C.P., Timothy R Mercer, Marcel Dinger¹ and John S Mattick¹, *Non-coding RNAs: regulators of disease*. J Pathol. 2010;220(2):126-139. doi:10.1002/path.2638
 94. Ping Ji, S.D., Wenbing Wang, Sebastian Böing, Ralf Metzger, Paul M Schneider, Nicola Tidow, Burkhard Brandt, Horst Buerger, Etmar Bulk, Michael Thomas, Wolfgang E Berdel, Hubert Serve, Carsten Müller-Tidow, *MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer*. Oncogene. 2003;22(39):8031-8041. doi:10.1038/sj.onc.1206928
 95. R Lin, S.M., C Liu, M Karin, T S Edgington, *A large noncoding RNA is a marker for murine hepatocellular carcinomas and a spectrum of human carcinomas*. Oncogene. 2007;26(6):851-858. doi:10.1038/sj.onc.1209846

96. Kazumi Yamada, 2Junko Kano,1Hajime Tsunoda,2 Hiroyuki Yoshikawa,2Chigusa Okubo,1 Tadashi Ishiyama1and Masayuki Noguchi1,3, *Phenotypic characterization of endometrial stromal sarcoma of the uterus*. Cancer Sci. 2006;97(2):106-112. doi:10.1111/j.1349-7006.2006.00147.x
97. O'Neill, M.J., *The influence of non-coding RNAs on allele-specific gene expression in mammals*. Hum Mol Genet. 2005;14 Spec No 1:R113-R120. doi:10.1093/hmg/ddi108
98. Tomohisa Okutsu, Y.K., Fusako Kagitani,` Masayuki Kai,', O.T. Kohzo Aisaka, t Yasuhiko Kaneko, Kinji Yokomori, M. Azim Surani, and t.T.K.-I. Takashi Kohda, and Fumitoshi Ishino°, *Expression and Imprinting Status of Human PEG8/IGF2AS, a Paternally Expressed Antisense Transcript from the IGF2 Locus, in Wilms' Tumorsl*. J Biochem. 2000;127(3):475-483. doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022630
99. Dalia Barsyte-Lovejoy, et al., *The c-Myc Oncogene Directly Induces the H19 Noncoding RNA by Allele-Specific Binding to Potentiate Tumorigenesis*. Cancer Res. 2006;66(10):5330-5337. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0037
100. Ishii N, Ozaki K, Sato H, et al. *Identification of a novel non-coding RNA, MIAT, that confers risk of myocardial infarction*. J Hum Genet. 2006;51(12):1087-1099. doi:10.1007/s10038-006-0070-9
101. Axel Visel, Yiwen Zhu, Dalit May, Veena Afzal, Elaine Gong, Catia Attanasio, and Matthew J. Blow, Jonathan C. Cohen, Edward M. Rubin, and Len A. Pennacchio, *Targeted Deletion of the 9p21 Noncoding Coronary Artery Disease Risk Interval in Mice*. Nature. 2010;464(7287):409-412. doi:10.1038/nature08801
102. Quanah J. Hudson, K.P., Alexandra Perricos, Lorenz Kuessel, Heinrich Husslein, and R.W.a.I.Y., *The Role of Long Non-Coding RNAs in Endometriosis*. International Journal of Molecular Sciences, Int J Mol Sci. 2021;22(21):11425. Published 2021 Oct 22. doi:10.3390/ijms222111425
103. Gallagher CS, Mäkinen N, Harris HR, et al. *Genome-wide association and epidemiological analyses reveal common genetic origins between uterine leiomyomata and endometriosis*. Nat Commun. 2019;10(1):4857. Published 2019 Oct 24. doi:10.1038/s41467-019-12536-4
104. Aashiq H. Mirza1., Simranjeet Kaur., Caroline A. Brorsson1 and F.P. , *Effects of GWAS-Associated Genetic Variants on lncRNAs within IBD and T1D Candidate Loci*. PLoS One. 2014;9(8):e105723. Published 2014 Aug 21. doi:10.1371/journal.pone.0105723
105. Peng-ran Sun, P.D., Shuang-zheng Jia, Ph.D., Hong Lin, M.D., Jin-hua Leng, M.D., and Jing-he Lang, M.D., *Genome-wide profiling of long noncoding ribonucleic acid expression patterns in ovarian endometriosis by microarray*. Fertil Steril. 2014;101(4):1038-46.e7. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.12.035
106. Cai H, Zhu X, Li Z, Zhu Y, Lang J. *lncRNA/mRNA profiling of endometriosis rat uterine tissues during the implantation window*. Int J Mol Med. 2019;44(6):2145-2160. doi:10.3892/ijmm.2019.4370
107. Wen-Tao Wang, Yu-Meng Sun, Wei Huang, Bo He, Ya-Nan Zhao & Yue-Qin Chen, *Genome-wide Long Non-coding RNA Analysis Identified Circulating LncRNAs as Novel Non-invasive Diagnostic Biomarkers for Gynecological Disease*. Sci Rep. 2016;6:23343. Published 2016 Mar 18. doi:10.1038/srep23343

108. Hua, S.L.W.X.X.T.J.Q.Y.Z.K., *LncRNA H19 Overexpression in Endometriosis and its Utility as a Novel Biomarker for Predicting Recurrence*. *Reprod Sci*. 2020;27(9):1687-1697. doi:10.1007/s43032-019-00129-x
109. Taylor, H.D.a.H.S., *The Role of Hox Genes in Female Reproductive Tract Development, Adult Function, and Fertility*. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015;6(1):a023002. Published 2015 Nov 9. doi:10.1101/cshperspect.a023002
110. Miao-Chih Tsai, O.M., Yue Wan, Nima Mosammaparast, Jordon K. Wang, Fei and Lan, Yang Shi, Eran Segal, and Howard Y. Chang, *Long Noncoding RNA as Modular Scaffold of Histone Modification Complexes*. *Science*. 2010;329(5992):689-693. doi:10.1126/science.1192002
111. Cherry Yin-Yi Chang, Chung-Chen Tseng, Ming-Tsung Lai, An-Jen Chiang, LunChien Lo, et al., *Genetic impacts on thermostability of oncolncRNA HOTAIR during the development and progression of endometriosis*. *PLoS One*. 2021;16(3):e0248168. Published 2021 Mar 5. doi:10.1371/journal.pone.0248168
112. Sixue Wang, M.Y., Xinyue Zhang, Tingting Zhang, Li Jiang, Le Cao, and X.F. Yuxin Zhou, *Effects of CDKN2B-AS1 on cellular proliferation, invasion and AKT3 expression are attenuated by miR-424-5p in a model of ovarian endometriosis*. *Reprod Biomed Online*. 2021;42(6):1057-1066. doi:10.1016/j.rbmo.2021.02.004
113. Yang, L.C.S.C.D.W.Q., *LINC01116 promotes proliferation and migration of endometrial stromal cells by targeting FOXP1 via sponging miR-9-5p in endometriosis*. *J Cell Mol Med*. 2021;25(4):2000-2012. doi:10.1111/jcmm.16039
114. Yanjun Liu, X.H., Dan Lu, Yuelan Feng, Ruonan Xu, Xuan Li, Chenghong and B.X. Yin, Huanying Zhao, Shuyu Wang, Yanmin Ma, Chanwei Jia, *LncRNA SNHG4 promotes the increased growth of endometrial tissue outside the uterine cavity via regulating c-Met mediated by miR-148a-3p*. *Mol Cell Endocrinol*. 2020;514:110887. doi:10.1016/j.mce.2020.110887
115. Kuei-Yang Hsiao, S.-C.L., Meng-Hsing Wu, Shaw-Jenq Tsai, *Pathological functions of hypoxia in endometriosis*. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2015;7(2):309-321. Published 2015 Jan 1. doi:10.2741/E736
116. Hengwei Liu, Z.Z., Wenqian Xiong, Ling Zhang, Yao Xiong, Na Li, Haitang and Y.D. He1, and Yi Liu1, *Hypoxia-Inducible Factor-1 α Promotes Endometrial Stromal Cells Migration and Invasion by Upregulating Autophagy in Endometriosis*. *Reproduction*. 2017;153(6):809-820. doi:10.1530/REP-16-0643
117. A Weidemann1 and RS Johnson, *Biology of HIF-1 α* . *Cell Death Differ*. 2008;15(4):621-627. doi:10.1038/cdd.2008.12
118. Thierry JP, A.H., Huang RY, et al. , *Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease*. *Cell*. 2009;139(5):871-890. doi:10.1016/j.cell.2009.11.007
119. Hengwei Liu, H.H., Zhibing Zhang, Lili Wang, Ling Zhang, Yi Liu, Wenqian Xiong, *Upregulation of the long noncoding RNA UBOX5 antisense RNA 1 (UBOX5-AS1) under hypoxic conditions promotes epithelial-mesenchymal transition in endometriosis*. *Ann Transl Med*. 2021;9(9):790. doi:10.21037/atm-20-4546
120. Ji, P., et al.,, *MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin b4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer*. *Oncogene*. 2003;22(39):8031-8041. doi:10.1038/sj.onc.1206928

121. Tano K, Mizuno R, Okada T, et al. *MALAT-1 enhances cell motility of lung adenocarcinoma cells by influencing the expression of motility-related genes*. FEBS Lett. 2010;584(22):4575-4580. doi:10.1016/j.febslet.2010.10.008
122. Xuejing Zhang, M.H.H.K.-J.Y., *The Long Noncoding RNA Malat1: Its Physiological and Pathophysiological Functions*. RNA Biol. 2017;14(12):1705-1714. doi:10.1080/15476286.2017.1358347
123. Diederichs, T.G.M.H.S., *MALAT1 — a paradigm for long noncoding RNA function in cancer*. J Mol Med (Berl). 2013;91(7):791-801. doi:10.1007/s00109-013-1028-y
124. Johnson NP, Hummelshoj L; World Endometriosis Society Montpellier Consortium. *Consensus on current management of endometriosis*. Hum Reprod. 2013;28(6):1552-1568. doi:10.1093/humrep/det050
125. J. YU, L.-H.C., B. ZHANG, Q.-M. ZHENG, *The modulation of endometriosis by lncRNA MALAT1 via NF- κ B/iNOS*. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2019;23(10):4073-4080. doi:10.26355/eurev_201905_17908
126. Caleb C. Lord, G.T., and J. Mark Brown, *Mammalian alpha beta hydrolase domain (ABHD) proteins: lipid metabolizing enzymes at the interface of cell signaling and energy metabolism*. Biochim Biophys Acta. 2013;1831(4):792-802. doi:10.1016/j.bbalip.2013.01.002
127. Yao-Yuan Hsieh, Ying-Ju Lin, Chi-Chen Chang, Da-Yuan Chen, Chin-Mu Hsu, and K.-H.H. Ming-Min Lo, and Fuu-Jen Tsai, *Human Lymphocyte Antigen B-Associated Transcript 2, 3, and 5 Polymorphisms and Haplotypes are Associated With Susceptibility of Kawasaki Disease and Coronary Artery Aneurysm*. J Clin Lab Anal. 2010;24(4):262-268. doi:10.1002/jcla.20409
128. L. Fontanesi, G.G., D. G. Calò, R. Fronza, P. L. Martelli, E. Scotti, and G.S. M. Colombo, R. Casadio, L. Buttazzoni, and V. Russo, *Identification and association analysis of several hundred single nucleotide polymorphisms within candidate genes for back fat thickness in Italian Large White pigs using a selective genotyping approach*. J Anim Sci. 2012;90(8):2450-2464. doi:10.2527/jas.2011-4797
129. Spies T, Bresnahan M, Strominger JL. *Human major histocompatibility complex contains a minimum of 19 genes between the complement cluster and HLA-B*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989;86(22):8955-8958. doi:10.1073/pnas.86.22.8955
130. Jun Xu1, W.G., Kai Ji1, Zhao Xu1, Haihua Zhu, and Wenming Zheng, *Sequence analysis and structure prediction of ABHD16A and the roles of the ABHD family members in human disease*. Open Biol. 2018;8(5):180017. doi:10.1098/rsob.180017
131. Yue Cai1, Yujia Yang, Xiongwen Chen, Genze Wu, Xiaoqun Zhang, Yukai Liu, Junyi Yu, XinquanWang, Jinjuan Fu, Chuanwei Li, and Pedro A. Jose, Chunyu Zeng, and Lin Zhou, *Circulating 'lncRNA OTTHUMT00000387022' from monocytes as a novel biomarker for coronary artery disease*. Cardiovasc Res. 2016;112(3):714-724. doi:10.1093/cvr/cvw022
132. Soo Hyun Ahn, M.S., Vinay Singh, Ph.D., and Chandrakant Tayade, D.V.M., Ph.D.a, *Biomarkers in endometriosis: challenges and opportunities*. Fertil Steril. 2017;107(3):523-532. doi:10.1016/j.fertnstert.2017.01.009
133. Joi A. Sampson, M., *metastatic or embolic endometriosis, due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the venous circulation**. The American Journal Of Pathology, 1927.

134. WPaul DmowskiMD, P.P.o.O.a.G.D.P.P., *Immunology of endometriosis*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2004;18(2):245-263. doi:10.1016/j.bpobgyn.2004.02.001
135. Levent M. Senturk, A.A., *Immunology of endometriosis*. J Reprod Immunol. 1999;43(1):67-83. doi:10.1016/s0165-0378(98)00079-5
136. Takebayashi, A., et al., *Subpopulations of Macrophages within Eutopic Endometrium of Endometriosis Patients*. Am J Reprod Immunol. 2015;73(3):221-231. doi:10.1111/aji.12331
137. Monica Bacci, A.C., et al., *Macrophages Are Alternatively Activated in Patients with Endometriosis and Required for Growth and Vascularization of Lesions in a Mouse Model of Disease*. Am J Pathol. 2009;175(2):547-556. doi:10.2353/ajpath.2009.081011
138. Engin Oral, M.D., and Aydin Arici, M.D, *Peritoneal Growth Factors and Endometriosis*. Semin Reprod Endocrinol. 1996;14(3):257-267. doi:10.1055/s-2007-1016335
139. A. Gallinelli, G.C., L. Giannella, T. Marsella, A. D. Genazzani and A. Volpe, *Different concentrations of interleukins in the peritoneal fluid of women with endometriosis: relationships with lymphocyte subsets*. Gynecol Endocrinol. 2004;18(3):144-151. doi:10.1080/09513590310001653044
140. Nasir Rana, M.D., M.P.H., et al., *Basal and stimulated secretion of cytokines by peritoneal macrophages in women with endometriosis*. Fertil Steril. 1996;65(5):925-930.
141. Nagano, T.H.A.E.M.M.Y., M.I.T.T.F.T.T. Iwabe, and M.T.N. Terakawa, *Role of Cytokines in Progression of Endometriosis*. Gynecol Obstet Invest. 1999;47 Suppl 1:34-40. doi:10.1159/000052857
142. Nick A. Bersinger, P., Ste'phanie von Roten, MD, Dorothea M. Wunder, MD, and M. Luigi Raio, Ekkehard Dreher, MD, Michael D. Mueller, MD, *PAPP-A and osteoprotegerin, together with interleukin-8 and RANTES, are elevated in the peritoneal fluid of women with endometriosis*. Am J Obstet Gynecol. 2006;195(1):103-108. doi:10.1016/j.ajog.2005.12.010
143. Thomas M. D'Hooghe, M., PhD, Charanjit S. Bamba, PhD, Ling Xiao, MD, and B. Karen Peixe, and Joseph A. Hill, MD, *Effect of menstruation and intrapelvic injection of endometrium on inflammatory parameters of peritoneal fluid in the baboon (Papio anubis and Papio cynocephalus)*. Am J Obstet Gynecol. 2001;184(5):917-925. doi:10.1067/mob.2001.111715
144. Thomas M. D'Hooghe, M.D., Ph.D., P.D. Charanjit S. Bamba, and M. Barbara M. Raeymaekers, and Joseph A. Hill, M.D., *Pelvic inflammation induced by diagnostic laparoscopy in baboons*. Fertil Steril. 1999;72(6):1134-1141. doi:10.1016/s0015-0282(99)00406-9
145. X.L., et al., *Long Non-coding RNA MALAT1 Promotes Proliferation, Angiogenesis and Immunosuppressive Properties of Mesenchymal Stem Cells by Inducing VEGF and IDO*. J Cell Biochem. 2017;118(9):2780-2791. doi:10.1002/jcb.25927
146. Wang, H., et al., *LINC00261 functions as a competing endogenous RNA to regulate BCL2L1 expression by sponging miR-132-3p in endometriosis*. Am J Transl Res. 2019;11(4):2269-2279. Published 2019 Apr 15.
147. Ding Cui, J.M., Yang Liu, Kaiqing Lin, Xiuxiu Jiang, Yang Qu, and K.X. Jun Lin, *Analysis of Long Non-coding RNA Expression Profiles Using RNA*

- Sequencing in Ovarian Endometriosis*. Gene. 2018;673:140-148. doi:10.1016/j.gene.2018.06.046
148. Hengwei Liu, Zhibing Zhang, W.X.L.Z.Y.D. and Y.L.X. Xiong, *Long non-coding RNA MALAT1 mediates hypoxia-induced pro-survival autophagy of endometrial stromal cells in endometriosis*. J Cell Mol Med. 2019;23(1):439-452. doi:10.1111/jcmm.13947
149. Ying Li , Y.-d.L., Shi-ling Chen, Xin Chen, De-sheng Ye, and J.Z. Xing-yu Zhou, and Jun Zhang, *Down-regulation of long non-coding RNA MALAT1 inhibits granulosa cell proliferation in endometriosis by up-regulating P21 via activation of the ERK/MAPK pathway*. Mol Hum Reprod. 2019;25(1):17-29. doi:10.1093/molehr/gay045



HAM VERİLER



FORMLAR

PATENT HAKKI İZNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

ENDOMETRİOZİSTE UZUN KODLAMAYAN RNA'LARIN İNFLAMASYONLA İLİŞKİLENDİRİLMESİ

ORJİNALLIK RAPORU

% 9	% 8	% 2	% 3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 4
2	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	% 1
3	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	% 1
4	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 1
5	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	<% 1
6	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<% 1
7	Submitted to Bülent Ecevit Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
8	libratez.cu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1

pubmed.ncbi.nlm.nih.gov