



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

LEİOMYOMDA ÜROKORTİN'İN ROLÜ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Taner KARTAL

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Aslı GÖKER TAMAY

MANİSA - 2010



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

LEİOMYOMDA ÜROKORTİN'İN ROLÜ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Taner KARTAL

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Aslı GÖKER TAMAY

MANİSA - 2010

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
İÇ KAPAK.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
KISALTMALAR.....	III
RESİM VE TABLO LİSTESİ	IV
TEŞEKKÜR	V
ÖZET.....	VI
ABSTRACT.....	VII
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. LEİOMYOM.....	4
2.2. ÜROKORTİN.....	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	29
4. BULGULAR.....	33
5. TARTIŞMA.....	35
6. SONUÇLAR.....	41
7. TABLO VE RESİMLER.....	42
8. KAYNAKLAR.....	60

KISALTMALAR

ACTH	Adrenocorticotropic hormone
CRF	Corticotropin releasing factor
CRF-R	Corticotropin releasing factor receptor
CRF-BP	Corticotropin releasing faktör-binding protein
EGF	Epidermal growth factor
EGF-R	Epidermal growth factor receptor
ER	Estrogen receptor
FGF	Fibroblast growth factor
GnRH	Gonadotropin releasing hormone
GH	Growth hormone
IGF	Insulin like growth factor
IGF-R	Insulin like growth factor receptor
LM-MM	Leiomyomlu hastalardaki normal myometrium dokusundan alınan örnek
LM+MM	Leiomyom dokusundan alınan örnek
PL+MM	Prolapsuslu hastalardaki normal myometrium dokusundan alınan örnek
MMP-9	Matrix metalloproteinase-9
PDGF	Platelet derived growth factor
PDGF-R	Platelet derived growth factor receptor
PR	Progesteron receptor
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumor nekrosis factor
UK	Urocortin
UKR	Urocortin receptor
VEGF	Vaskular endothelial growth factor

RESİM VE TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1	Leiomyomada görülebilecek semptomlar	42.sf
Tablo 3.1	Parafin doku takibi	43.sf
Tablo 3.2	Hematoksilen-Eozin boyaması	44.sf
Tablo 3.3	Anti-Brd-U boyaması	45.sf
Tablo 3.4	İndirekt immünohistokimya boyaması	46.sf
Tablo 1.	Grupların PCNA boyamalarından yapılan morfometrik analiz	49.sf
Tablo 2.	Grupların Ki67 boyamalarından yapılan morfometrik analiz	51.sf
Tablo 3.	Grupların BrDU boyamalarından yapılan morfometrik analiz	53.sf
Tablo 4.	Grupların TUNEL boyamalarından yapılan morfometrik analiz	55.sf
Tablo 5.	Grupların UK boyamalarından yapılan morfometrik analiz	57.sf
Tablo 6.	Grupların UKR boyamalarından yapılan morfometrik analiz	59.sf
Tablo 7.	Grupların tüm immunohistokimya boyamalarından yapılan morfometrik analiz	59.sf
Resim 1.	Biyopsi örneklerinde grupların HE boyalı histolojik incelemesi	47.sf
Resim 2.	Biyopsi örneklerinde grupların PCNA immunohistokimyasal analizi	48.sf
Resim 3.	Biyopsi örneklerinde grupların Ki67 immunohistokimyasal analizi	50.sf
Resim 4.	Biyopsi örneklerinde grupların BrDU immunohistokimyasal analizi	52.sf
Resim 5.	Biyopsi örneklerinde grupların TUNEL immunohistokimyasal analizi	54.sf
Resim 6.	Biyopsi örneklerinde grupların UK immunohistokimyasal analizi	56.sf
Resim 7.	Biyopsi örneklerinde grupların UKR immunohistokimyasal analizi	58.sf

TEŞEKKÜR

Öncelikle eğitimimde emeği geçen başta Kadın Hastalıkları ve Doğum AD Başkanımız Prof. Dr. Faik Mümtaz KOYUNCU olmak üzere tüm hocalarıma, çalışmamı yönlendiren ve destekleyen danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Aslı GÖKER TAMAY’a, çalışmanın laboratuvar aşamasında yardımlarını esirgemeyen Doç Dr. İbrahim TUĞLU’ya, hepsi birbirinden değerli olan çalışma arkadaşlarıma, bu süreçte ve tüm yaşamım boyunca hiçbir fedakarlıktan kaçınmaksızın beni hep destekleyen ve cesaretlendiren aileme ve hiçbir menfaat beklemeden hep yanımda olan kader arkadaşım, dostum Orhan’a içtenlikle teşekkür ederim.

LEİOMYOMDA ÜROKORTİN'İN ROLÜ

ÖZET

Amaç: Ürokotin açısından leiomyom ile normal myometrium dokusu arasında fark olup olmadığı saptanarak ürokortinin leiomyom etiolojisindeki olası rolü araştırıldı.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya Celal Bayar Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum bölümüne başvuran ve histerektomi kararı verilmiş olan leiomyom endikasyonlu 20 hasta, uterin prolapsus endikasyonlu 15 hasta alınmıştır. Operasyon sonrasında hastaların histerektomi materyallerinden; myom dokusu (myom endikasyonlulardan), normal myometrium dokusu (bütün hastalardan) ve over dokusu (salpingooferektomi de yapılmış olanlardan) örnekleri alındı. Bloklanan bütün örneklerle UK ve UKR açısından immünohistokimyasal boyama uygulanarak immunoreaktiviteler negatif (1), zayıf (2), orta (3) ve şiddetli (+++) pozitif olarak değerlendirildi.

Bulgular: Biyopsi örneklerinin UK açısından yapılan immünohistokimya boyamasında normal (PL+OVER) ile karşılaştırıldığında myomlu (LM+OVER) over dokusunda benzer miktarda boyanma görüldü. Boyanmanın heterojen olduğu, damar duvarlarında belirgin bulunduğu ve stromayı da tuttuğu saptandı. Kontrol örneklerinde (LM-MM ve PL+MM) bazal bir boyanmanın olduğu ve boyanmanın overe benzer şekilde damar duvarlarında lokalize olduğu anlaşıldı. LM+MM grubunda ise boyanmanın daha belirginleştiği ve daha yoğun olduğu saptandı. Yapılan morfometrik analizde de özellikle LM+MM grubunda anlamlı ($p<0,05$) bir fark bulundu.

Sonuç: Leiomyomlarda bu proteinlerin artış göstermesi hem tümör oluşumu ile ilgili olabileceği hem de damar duvarındaki lokalizasyonlarının tümör anjiogenezinde önemli olabileceğine işaret etmektedir. Çoğalma markırları ile ilişkilendirilebilmesi için leiomyosarkom gibi daha agresif tümör örnekleri ile leiomyom olgularının karşılaştırılması ve UK ve UK reseptörlerinin buradaki rollerinin ortaya konması için yeni çalışmaların yapılması gereklidir.

Anahtar Kelimeler: Leiomyom, Ürokotin, Ürokotin reseptörü

THE ROLE OF UROCORTIN IN LEIOMYOMA

ABSTRACT

Aim: To investigate the role of urocortin in the ethiopathogenesis of leiomyomas by comparing leiomyomas and normal myometrial tissue.

Materials and Methods: Twenty patients with leiomyoma and 15 patients with uterine prolapsus indication for hysterectomy who applied to Celal Bayar University Hospital Obstetrics and Gynecology Department were enrolled in the study. Leiomyoma tissue (leiomyoma indication group), normal myometrium tissue (all patients) and ovarian tissue (patients with salphingooferectomy) were stained immunohistochemically for UK and UKR. Immunoreactivity was scored as negative, weak, mild and strong positive.

Results: When compared to normal (PL+OVARY) similar staining was observed in the leiomyoma group (LM+OVARY). Staining was heterogeneous, obvious in vascular walls and also present in stroma. There was a basal staining in the control group (LM-MM and PL+MM) and localised in the vessel walls. Staining was dense and distinct in the LM+MM group. Morphometric analysis also showed significant difference in the LM+MM group ($p<0,05$).

Conclusion: The increase of these proteins in leiomyomas indicate that they may be related to tumorigenesis and the localisation in the vessel walls points out the possibility of a role in tumor angiogenesis. Further studies comparing aggressive tumors like leiomyosarcomas and leiomyomas are needed to establish an association between growth factors and urocortins and their receptors.

Key words: leiomyoma, urocortin, urocortin receptor

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Leiomyom, düz kas hücrelerinden oluşan benign karakterli bir tümördür. Uterin leiomyom, kadın pelvisinin ve uterusun en sık görülen, başlıca kas hücrelerinden oluşan ama değişik miktarlarda fibröz bağ dokusu da içeren bir tümördür. Düz kas liflerinden oluştuğu için sıklıkla myom veya leiomyom olarak adlandırılmaktadır ancak düz kas lifleri yanı sıra bu lifler arasında fibröz bağ dokusu da içerdiği için, fibromyom, myofibrom, leiomyofibrom, fibroleiomyom, fibrom ve fibroid gibi bir çok alternatif isim de kullanılmıştır. Bu isimlendirmelerden, leiomyom terimi en uygun olanıdır ve bu tümörün orjininin düz kas hücreleri olduğunu ve düz kas hücrelerinin baskın olduğunu vurgular (1).

Leiomyom, reproduktif yaş grubundaki kadınların %20-30' unda görülmektedir. Bütün premenapozal kadınların %20-77 kadarında oluşur (2). Postmortem incelemelerde kadınların % 50'sinde saptandığı bildirilmiştir (1). Bunlarla birlikte, uterin leiomyomların gerçek sıklığı kesin olarak bilinmemektedir.

Değişik boyut, sayı ve lokalizasyonda olabilen uterin leiomyomlar, çeşitli klinik durumlarla karşımıza çıkarlar. Anormal uterin kanamalar leiomyomların en önemli klinik bulgusudur ve hastaların yaklaşık %30'unda bulunmaktadır. Aşırı ve düzensiz kanama en sık sebep oldukları semptomdur (3,4,5). Nekroze olan leiomyomlar ağrıya sebep olabilirken büyüyen leiomyomlar mesaneye bası suretiyle ani idrara sıkışma hissi ve sık idrara çıkmaya, rektuma bası yaparak ağrılı defekasyona ve/veya konstipasyona, hatta üreterlere bası yaparak hidronefroza neden olabilirler. Özellikle zayıf kişilerde, büyüyen bir leiomyom karında şişlik olarak ortaya çıkabilir. Yerleşim yerinin özelliğine göre infertilite etiyolojisinde de az bir oranda da olsa rol oynayabilen leiomyomların gebelikte büyüyebildiği de bilinmektedir. Gebelik üzerindeki olumsuz etkileri arasında spontan abortus, ablasyo plasenta, intrauterin gelişme geriliği ve erken doğumlar görülebilir(1,135).

Kadın pelvisinin ve uterusun en sık rastlanan tümörü olmasına rağmen, leiomyoma uterinin kesin nedeni tam olarak bilinmemektedir. Normal myometrial dokunun myoma

dönüşüm mekanizması ve myom hücrelerinin anormal gelişimini yöneten faktörler net olarak anlaşılamamıştır (6). Ancak günümüzde myometriumun leiomyoma dönüşümünün normal myometriumun somatik mutasyonları ve lokal büyüme faktörleri ile seks steroidlerinin karmaşık ilişkileri sonucunda geliştiği düşünülmektedir (7). Etiyopatogenezi tam olarak aydınlatılmamış olan leiomyomların oluşum mekanizmaları için kromozomal anormallikler, steroid hormonlar, epidermal büyüme faktörü, insülin benzeri büyüme faktörü, vasküler endotelial büyüme faktörü gibi faktörler araştırılmıştır.

Leiomyom fizyopatolojisinde özellikle steroidlerin üzerinde durulmuştur. Östrojen reseptörünün myomlu dokuda myometriuma göre fazla olduğu, Progesteron A reseptörünün de myomlarda daha yoğun olduğu gösterilmiştir. Epidermal büyüme faktörü (EGF), İnsülin benzeri büyüme faktörleri (IGF-I,II), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi büyüme faktörleri leiomyom dokularında yoğun olarak gösterilmiştir. Tümörögenезisin önemli bir basamağı olan apoptozis duraklaması da leiomyomlarda incelenmiş ve tümör nekrozis faktör (TNF), Bcl-2 gibi belirteçler de leiomyomlarda çalışılmıştır (8,9,10,11,12,13).

İnsanda normal uterus endometriumu nöroendokrin bir organ olarak kabul edilmektedir. Overlerden salgılanan hormonlara yanıt vererek menstrüel döngüyü sağladığı gibi kendisi de çeşitli peptidler salgılamaktadır. Son yıllarda, myometrium kontraktilitesini etkilediği gösterilen ürokortin üzerinde çalışmalar yaygınlaşmıştır. Kortikotropin serbestleştirici hormon ailesine ait, 40 amino asitli bir peptit olan ürokortin; over, plasenta, fetal membranlar, fetal kan, gebe uterusu, endometrium epitelial ve stromal hücreleri, myometrium, vasküler düz kas hücreleri ve endometrial karsinomda gösterilmiştir (14,15,16,17,18,19). Renal hücreli karsinoma ile ilişkili olabileceği, tümör oluşumunu hücre proliferasyonunu azaltarak engellediği, endometrial karsinomlarda daha az eksprese edildiği gösterilmiştir (19,20). Ürokortinin potansiyel bir vazodilatatör olduğu da pek çok çalışmada ortaya konmuştur. Gebelikte desidüadan salgılandığına dair çalışmalar mevcuttur. Gebelik boyunca maternal plazmada da ölçülebilecek düzeylerde olduğu ve erken doğumlarda yükseldiği görülmüştür (21). Myometrial kontraktiliteyi etkilediği, iskemik kalp hastalıklarında reperfüzyon açısından önemli olduğu, spontan abortuslarda yüksek oranda bulunduğu da gösterilmiştir.

Kadınların yaklaşık %25’de bulunan, uterusun benign tümörü leiomyomlarda, ürokortin ile ilgili bir çalışma şimdiye kadar yapılmamıştır. Her yıl dünyada yüzbinlerce kadın leiomyom tanısıyla histerektomi olmaktadır. Leiomyom gelişiminde rolü olduğu

tahmin edilen pek çok faktör belirlenmiştir. Ürokortin de bu faktörlerden biri olabilir hipoteziyle bu çalışma planlanmıştır. Kadın genital organlarında gösterilen ve çeşitli klinik durumlarla ilişkisi belirlenen ürokortin'in leiomyomlarla ilişkisi de aydınlatılmaya değer görülmektedir. Leiomyomların etiyopatogenezi üzerinde pek çok çalışma yapılmaktadır ancak kesin bir sonuca ulaşamamıştır. Normal myometrium dokusu ile leiomyom dokusu arasındaki moleküler farkların anlaşılması, etiyopatogenezi aydınlatmada ve buna göre tedavilerin düzenlenmesinde yol gösterici olacaktır.

Biz bu çalışmada; ürokortin açısından leiomyom ile normal myometrium dokusu arasında fark olup olmadığını araştırdık. Böylece; ürokortinin leiomyom etiyolojisindeki olası rolünü ortaya koyarak, ileride uygulanabilecek cerrahi dışı tedaviler ve leiomyom gelişimini önleme konusundaki çalışmalara yol gösterici olmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.LEİOMYOM

Leiomyom, düz kas hücrelerinden oluşan benign karakterli bir tümördür. Uterin leiomyom, kadın pelvisinin ve uterusunun en sık görülen, başlıca kas hücrelerinden oluşan ama değişik miktarlarda fibröz bağ dokusu da içeren bir tümördür. Düz kas liflerinden oluştuğu için sıklıkla myom veya leiomyoma olarak adlandırılmaktadır ancak düz kas lifleri yanı sıra bu lifler arasında fibröz bağ dokusu da içerdiği için, fibromyom, myofibrom, leiomyofibrom, fibroleiomyom, fibrom ve fibroid gibi bir çok isim de bu tümör için kullanılmıştır. Bu isimlendirmelerden, leiomyom terimi en uygun olanıdır ve bu tümörün orjininin düz kas hücreleri olduğunu ve düz kas hücrelerinin baskın olduğunu vurgular (1).

Uterin leiomyomlar, 30 yaş öncesi kadınlarda nadir olarak görülmektedir. Reprodüktif yaş grubundaki kadınların %20-30' unda görülür. Bütün premenapozal kadınların %20-77 kadarında oluşur (2). Uterin leiomyomlu hastaların genellikle ailelerinde de leiomyom hikayesi vardır. Postmortem incelemelerde kadınların % 50'sinde saptandığı bildirilmiştir (1). Bunlarla birlikte, uterin leiomyomların gerçek sıklığı kesin olarak bilinmemektedir. Ancak leiomyom insidansı, histerektomi spesimenlerinde çalışılmıştır. Cramer ve Patel seri kesitlerde leiomyom oranını premenapozal kadınlarda %74, postmenapozal kadınlarda %84 olarak vermişlerdir (22). Uterin leiomyomalar histerektomi endikasyonları arasında en sık olanıdır (23). Amerika Birleşik Devletleri'nde Tüm histerektomilerin %30'unun nedeni leiomyoma uteri olarak bildirilmektedir (2). Bunlarla birlikte leiomyomların gerçek insidansının tam olarak saptanması oldukça zordur.

Uterin leiomyomlar boyut ve sayısı değişik olabilen, benign nitelikli, nodüler tümörlerdir. Büyüklükleri, mikroskopik boyutlardan kilogramlarca büyüklüğe kadar

değişebilir. Uterin duvarda herhangi bir yerde tek olarak veya uterusun farklı yerlerinde, odaklar halinde, çok sayıda bulunabilirler. Uterin leiomyomlar; lokalizasyon, sayı ve büyüklüklerine bağlı olarak uterusu simetrik olarak büyütebilir veya uterin yapıyı belirgin olarak bozabilirler. Gerçek bir kapsülleri yoktur, ancak tümörün büyümesi ile birlikte, çevredeki myometrial dokunun sıkışmasına bağlı olarak, bağ dokusundan meydana gelen pseudokapsül oluşmaktadır. Bu pseudokapsül ayrıca cerrahi olarak kolay enükleasyona olanak sağlamaktadır.

Uterin leiomyom oluşumunda nulliparite, anovulasyona bağlı karşılanamayan östradiol üretimi, obezite, ırk gibi bir çok risk faktörü tanımlanmış olup ideal vücut ağırlığının üstündeki her 10 kilogram için risk %21 oranında artmaktadır (24). Ayrıca 1970'lerde oral kontraseptif kullanımının leiomyom gelişimine neden olduğu yolunda bir çok yayın yapılmışsa da, geniş epidemiyolojik araştırmalar 10 yıl süreyle oral kontraseptif kullanımının uterin leiomyom gelişme riskini %30'dan fazla oranda azalttığını göstermiştir (24,25). Leiomyom, beyaz kadınlara göre zencilerde 3-9 kat daha sık görülmektedir (26,27).

Etiyopatogenezi

Kadın pelvisinin ve uterusun en sık rastlanan tümörü olmasına rağmen, leiomyoma uterinin kesin nedeni tam olarak bilinmemektedir. Normal myometrial dokunun myoma dönüşüm mekanizması ve myom hücrelerinin anormal gelişimini yöneten faktörler net olarak anlaşılamamıştır (6). Günümüzde leiomyom oluşumundan; normal myometriumun somatik mutasyonları ve lokal büyüme faktörleri ile seks steroidlerinin karmaşık ilişkileri sorumlu tutulmaktadır (7).

Birçok sitogenetik ve moleküler çalışma leiomyom oluşumunda genetik faktörlerin etkili olduğuna işaret etmektedir. Leiomyomların %40-50'sinde tümör spesifik kromozomal anormallikler saptanmıştır. Tanımlanmış bu kromozomal anormallikler arasında; t(12;14) (q15;q23-24), del(7) (q22q32), 6p21, 10q, trizomi 12 ve 3q'nun delesyonları bulunmaktadır. Prevalans ve insidansda ırksal farklılıkların olması, monozigotik ikizlerin histerektomisinde görülen yüksek korelasyon ve leiomyoma uterili hastalardaki artmış aile hikayesi etiopatogenezi genetik faktörlerin rolüne işaret eden bulgulardır (1).

Leiomyomların etiopatogenezi sorumlu tutulan faktörlerden biri de seks

steroidleridir. Leiomyomadaki büyüme ile östrojen ve progesteron arasındaki ilişkiyi destekleyen çok sayıda kanıt vardır. Leiomyomlar nadiren puberteden önce görülürler. Bu tümörler, ovaryan aktivitenin en çok olduğu reproduktif çağda belirgin olarak büyürler. Nullipar kadınlarda leiomyoma gelişme riski multipar kadınlarla karşılaştırıldığında daha fazladır. Gebelik esnasında leiomyomlarda belirgin olarak büyüme görülmesi, leiomyomlarla hormonal faktörler (östrojen, progesteron) arasındaki ilişkiye işaret eden bir diğer klinik bulgudur. Gebelik sırasında ayrıca, uterusun total olarak büyümesi ve kan akımının daha iyi düzeyde olması nedeni ile bu tümörlerin büyüklükleri artmaktadır. Menapoz sonrası ovaryan östrojen sekresyonunun azalması ile birlikte leiomyomun büyümesi sıklıkla durur ve hatta tümör boyutunda küçülme görülebilir. Leiomyomlar; anovulasyon, endometrial polip ve endometrial hiperplazi gibi hiperöstrojenik durumlarla sıklıkla birliktelik gösterirler. Hormonal faktörlerle ilişkili olarak; nulliparite, erken menarş, özellikle yüksek doz östrojen içeren oral kontraseptiflerin küçük yaşta kullanılması ve obezite, leiomyom gelişimi için risk faktörleri arasında bulunmaktadır. Vücut kitle indeksi fazla olan kadınlarda, az olanlara oranla leiomyom gelişme riski daha yüksek bulunmuştur. Bu durum muhtemelen yağ aromatazı aracılığı ile androjenlerin östrojenlere dönüştürülmesi ile ilgili gibi gözükmemektedir (1). Bütün bu klinik ve epidemiyolojik kanıtlar neticesinde, leiomyoma ve östrojen-progesteron arasındaki ilişki üzerinde özellikle durulmuştur. Östrojen, hedef hücreler üzerindeki fizyolojik etkilerini, spesifik nükleer reseptörlerine bağlanarak gerçekleştirmektedir. Bu reseptörler estrojen reseptör alfa (ER-Alfa) ve östrojen reseptör beta (ER-Beta) olarak bilinmektedir (28). Bir çok çalışmada, her iki östrojen reseptör mRNA'sının, hem myometrium hem de leiomyomada eksprese edildiği gösterilmiştir (29,30,31,32). Uterin leiomyomu olan ve olmayan hastalarda plazma östradiol seviyeleri benzer olarak bulunmuştur (33). Ancak leiomyom dokusundaki östrojen reseptör miktarının, normal myometrium dokusundaki östrojen reseptör düzeylerinden anlamlı derecede yüksek olduğu gösterilmiştir (8). Östrojenler ya direkt reseptör ya da growth faktör üretimini uyatarak indirekt yolla etki ederler. Leiomyomalarda, bir östrojen sentetaz olan aromataz P450'nin over-ekspresyonu gösterilmiştir ve bu enzim androjenlerin östrojenlere dönüşümünü katalize etmektedir. Leiomyomadaki bu insitu östrojen sentezi, bu tümörün gelişiminde bir otokrin/parakrin mekanizmada rol oynuyor olabilir. Buna bağlı olarak da, GnRH agonist tedavisinin, leiomyom hücrelerinde aromataz P450 ekspresyonunu inhibe ettiği, böylece, leiomyomlarda regresyona sebep olduğu düşünülmektedir (34, 35, 36).

Günümüzde uterin leiomyom gelişiminde hem östrojenin hem de progesteronun rolü olduğu düşünülmektedir. Bir çok klinik ve biyokimyasal kanıt, leiomyoma patogeneğinde progesteronun kritik bir rolünün olduğuna işaret etmektedir (37,38). Progesteron leiomyomda mitotik aktivite ve proliferasyonu stimüle etmektedir (39). Kawaguchi ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada menstrüel siklusun sekretuar fazında leiomyomda mitotik aktivitenin yüksek olduğu gösterilmiş ve progesteronun bu tümörün büyümesinde rolünün olabileceği düşünülmüştür. Sekretuar fazda, leiomyomda mitotik aktivitenin yüksek olması bu tümörün büyümesinin progesteron düzeylerinden etkilendiğini akla getirmektedir (40). Progesteron reseptörünün iki formu bulunmaktadır. Bunlar, progesteron reseptör-A (PR-A) ve progesteron reseptör-B (PR-B)'dir. Her iki progesteron reseptör formu da (PR-A ve PR-B), leiomyomda ve myometriümda eksprese edilmektedir ve bu dokularda PR-A konsantrasyonu, PR-B konsantrasyonundan daha yüksektir. Bununla birlikte; leiomyomda PR-A ve PR-B içeriklerinin, bitişikteki myometriümdakinden daha yüksek olduğu gösterilmiştir (9). Bir başka çalışmada leiomyomda PR-A düzeylerinin, myometriüm ile karşılaştırıldığında yükselmiş olduğu bildirilmiştir (41). Leiomyomda artmış olan progesteron reseptörünün sebebi leiomyomdaki östrojen ve östrojen reseptörlerindeki değişiklik olabilir. Çünkü bazı çalışmalarda progesteron reseptör ekspresyonunun östrojen tarafından kontrol edildiği gösterilmiştir (42,43). Güçlü bir antiprogesterin olan RU-486 (Mifepriston)' nın klinik olarak kullanımı ile leiomyomalarda belirgin bir regresyon saptanmaktadır (44,45,46). Yine bu durum da progesteronunun leiomyom gelişiminde ve büyümesinde rol oynadığını desteklemektedir. Ayrıca GnRH agonistleri tarafından oluşturulan leiomyom regresyonu progesterinler tarafından inhibe edilebilir (47, 48).

Tümör gelişiminin, proliferasyon ve apoptozis arasındaki dengeden etkileneceği göz önünde bulundurulduğunda apoptoziste meydana gelebilecek olan bir değişimin, leiomyom gelişiminde rol oynayabileceği düşünülebilir. Dolayısı ile apoptozis ile ilişkili olan bazı faktörler de leiomyom gelişim mekanizmasında etkili olabilir. Apoptozisin temel mekanizmasını, farklı pro-apoptotik ve anti-apoptotik moleküllerin kompleks karşılıklı etkileşimi oluşturmaktadır. Apoptozis, ilk olarak hücre büzüşmesi, kromatin yoğunlaşması ve hücre parçalanmasının son noktaya ulaşması ile karakterize hücre ölümünün morfolojik bir paterni olarak tanımlanmıştır (49). Bcl-2, apoptotik hücre ölümünü engelleyebilen bir proto-onkogendir. Transgenik modellerde, bcl-2 over-ekspresyonu, normal hücrelerin ölüm mekanizmalarından kaçmalarından dolayı

hücrelerin birikmesi ile sonuçlanmaktadır (50). İmmünohistokimyasal analizler, leiomyoma ve myometriumda Bcl-2 proteininin bulunduğunu göstermiştir (51,52). Myometrial hücreler ile karşılaştırıldığında leiomyom hücrelerinde, immünoreaktif Bcl-2 proteini, bol miktarda eksprese edilmektedir (13,53,54). Leiomyom hücrelerindeki Bcl-2 protein ekspresyonu, seks steroid hormonlar ile düzenlenir. Bir anti-apoptotik protein olan Bcl-2, yakın myometrium ile ilişkili leiomyoma dokusunda overeksprese edilmektedir. Leiomyom hücre kültürlerine progesteron eklenmesi, Bcl-2 düzeyini arttırmaktadır. Oysa ki leiomyoma hücre kültürlerine östradiol eklenmesi, daha düşük Bcl-2 düzeyleri ile sonuçlanmaktadır (55). Leiomyom gelişiminin regülasyonunda, progesteron etkisinin moleküler temeli tam olarak açık değildir, fakat muhtemeldir ki leiomyoma hücrelerinde, progesteron uyarısı, Bcl-2 protein indüksiyonunu etkiliyor olabilir (39).

Tümör nekrozis faktör-alfa (TNF-alfa), sadece aktive makrofajlar tarafından değil, ayrıca kadın reproduktif organlarındaki çoğu hücre tipi tarafından da üretilen, çok yönlü bir sitokindir (56,57). Pek çok çalışma, TNF-alfa'nın çeşitli hücre tiplerinde, apoptozisi indüklemeye yeteneğini bildirmiştir (56,58,59). TNF-alfa'nın leiomyoma gelişimindeki rolü ve seks steroid hormonların, leiomyom hücrelerinde TNF-alfa ekspresyonu üzerindeki etkilerine ilişkin az bilgi bulunmaktadır. Leiomyom hücreleri, immünoreaktif TNF-alfa proteini içermektedir. Kurachi ve arkadaşları (2001) leiomyoma hücrelerinde immünoreaktif TNF-alfa ekspresyonunun myometrial hücrelerdekinden daha fazla olduğunu göstermişlerdir. Leiomyoma hücrelerinde immünoreaktif TNF-alfa, menstrüel siklusun proliferatif fazında sekretuar fazda olduğundan daha bol miktarda bulunmaktadır. Leiomyoma hücre kültürlerine progesteron eklenmesi, kontrol kültürler ile karşılaştırıldığında immünoreaktif TNF-alfa düzeylerinde dikkat çekecek derecede bir azalmayla sonuçlanmaktadır. Leiomyoma hücre kültürlerinde östradiol ile tedavi, TNF-alfa ekspresyonunu etkilememektedir. Oysaki leiomyoma hücrelerinde östradiol ve progesteron ile eş zamanlı tedavi, TNF-alfa ekspresyonunu, yalnız östradiol ile tedaviye göre hafifçe azaltmaktadır (12). Böylece, leiomyoma hücrelerinde TNF-alfa ekspresyonu, progesteron aracılığı ile düzenleniyor olabilir gibi gözükmemektedir (39).

Son yıllarda, polipeptid büyüme faktörlerinin leiomyom büyümesindeki uyarıcı etkilerine odaklanmış olan çalışmalar mevcuttur. Bu büyüme faktörleri; insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), epidermal growth faktör (EGF), trombosit kaynaklı growth faktör (PDGF), transforming growth faktör-beta (TGF-beta) ve anjiyogenik faktörlerdir. Bu

anjiogenik faktörler arasında ise vasküler endotelial growth faktör (VEGF), temel fibroblast growth faktör (bFGF), endotelin ve adrenomedüllin yer almaktadır.

İnsülin-like growth faktör (IGF), bir çok dokuda hücre büyüme, çoğalma ve farklılaşmasında etkili olan polipeptid yapıda bir ajandır. IGF'nin biyolojik etkilerini göstermesine IGF-IR ve IGF-IIR olmak üzere iki adet reseptör aracılık etmektedir. IGF-I ve IGF-II yapısal olarak proinsülin ile ilişkili polipeptid büyüme faktörleridir. IGF-I, bir çok hücrede büyüme ve farklılaşmadan sorumlu olmakla birlikte Growth hormonun (GH) biyolojik etkilerine aracılık etmektedir (60). IGF-I ve IGF-II, IGF-I reseptörüne benzer afinite ile bağlanabilmektedir. Bununla birlikte IGF-II reseptörü, öncelikli olarak IGF-II'ye bağlanmaktadır (61). IGF-I reseptörü, hem IGF-I hem de IGF-II'nin çoğu biyolojik etkisine aracılık etmektedir. Vücuttaki pek çok dokuda IGF üretimi olmaktadır. Endokrin, otokrin ve parakrin mekanizmalar aracılığı ile etki etme potansiyeline sahip olan IGF, dolaşımda bol miktarda bulunmaktadır (62). Hem myometriumda hem de leiomyomda IGF-I ve IGF-II mRNA'sının ve bunların reseptörlerinin bulunduğunu saptayan birçok çalışma mevcuttur. IGF-I, 70 aminoasit içeren bir polipeptiddir. IGF-I'in leiomyoma hücre kültürlerinde mitojenik etkide olduğu gösterilmiştir (63). IGF-I mRNA seviyelerinin leiomyomalarda myometriumdan daha yüksek seviyelerde bulunduğunu bildirilmiştir (10,64). Pek çok çalışmada myometrium ile karşılaştırıldığında leiomyomda artmış IGF-I reseptör seviyeleri bildirilmiştir (61,65,66,67). IGF-I'in, hayvan uterusunda estrogen etkilerine aracılık ettiği gösterilmiştir. Rhesus maymun uterusunda IGF-I, seks steroidlerinin büyüme-gelişme etkilerini düzenlemektedir (68). Giudice ve arkadaşları (1993), insanlarda leiomyomada IGF-I mRNA'nın, menstrüel siklus geç proliferatif fazda en bol miktarda bulunduğunu, fakat IGF-II mRNA ekspresyonunun menstrüel siklusa bağımlı olmadığını bildirmişlerdir (69). Seks steroid hormonlar, leiomyoma hücre kültürlerinde IGF-I mRNA düzeylerini etkilemektedir ancak IGF-I reseptör mRNA seviyelerini etkilemezler. Sadece progesteron veya östradiol-progesteron kombinasyonu ile tedavi; leiomyoma hücre kültürlerinde, tedavi verilmeyen hücre kültürleri ile karşılaştırıldığında IGF-I mRNA ekspresyonunu anlamlı derecede azaltmaktadır. Bununla birlikte östradiol veya progesterondan herhangi biri ile tedavi verilen hücre kültürleri ile tedavi verilmeyen kültürler arasında IGF-I reseptör mRNA ekspresyonu açısından anlamlı fark kaydedilmemiştir (70). IGF-I, Bcl-2 aracılığı ile apoptozu inhibe etmektedir (71). Hücrelerdeki IGF-I reseptör overekspresyonu, hücrelerin tümörjenik potansiyelini arttırmakta ve hücreleri apoptozisten korumaktadır (72,73). Yapılmış olan

bir çok çalışma neticesinde IGF-I'in uterin leiomyoma gelişmesi ve büyümesinde rol oynuyor olabileceği görülmektedir.

Epidermal growth faktör (EGF), 6 kDa ağırlığında, polipeptid yapıda bir moleküldür ve daha büyük prekürsör bir molekülün proteolitik işlemi ile oluşturulmaktadır. Bu prekürsör molekül 133 kDa ağırlığında olan prepro-EGF'dir (74,75). EGF'nin, leiomyom gelişiminde bir lokal büyüme faktörü olarak çok önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (76, 77,78,79,80). EGF reseptör mRNA'sı, hem myometrial hem de leiomyoma hücrelerinde bulunmaktadır. EGF mRNA ve EGF reseptör (EGF-R) mRNA'sının myometrial ve leiomyoma hücrelerinde ekspresyonu, EGF'nin bu dokuların gelişiminin otokrin/parakrin regülasyonu ile ilgili olabileceğini düşündürmektedir (79). EGF, doku kültürlerinde hem myometrium hemde leiomyoma hücreleri için mitojeniktir (81). Folliküler faz süresince leiomyomadaki EGF mRNA konsantrasyonu, myometriumunki ile benzerdir fakat luteal faz süresince leiomyomada anlamlı yükseklik saptanmıştır. Bununla birlikte myometriumdaki konsantrasyonun, esasen değişmeden kaldığı bildirilmiştir (11). EGF reseptör düzeyi ise leiomyomalarda myometriumdan anlamlı olacak derecede yüksek değildir ve menstrüel siklus boyunca dalgalanma olmuyor gibi gözükmemektedir. Cerrahi öncesinde GnRH agonistleri ile tedavi edilen kadınlarda leiomyomada, EGF reseptör seviyelerinde belirgin bir azalma görülmüştür (76,82,83). Daha da önemlisi EGF reseptör seviyelerindeki azalma, GnRH-agonist ile tedavi sonucunda leiomyomadaki küçülme ile korelasyon göstermektedir. Tüm bunlar, seks steroidlerinin leiomyoma gelişimindeki etkilerine EGF'nin aracılık ettiğini akla getirmektedir (84). Menstrüel siklusun luteal fazı süresince leiomyomalardaki mitojenik aktivite maksimaldir. Bu bulgular EGF üretiminin, progesteronun leiomyomalardaki mitotik aktiviteyi stimüle etme mekanizmalarından birisi olabileceğini düşündürmektedir (85).

Trombosit kaynaklı growth faktör (PDGF), heparin bağlayıcı büyüme faktörleri arasında yer almaktadır (86). PDGF, düz kas hücreleri ve fibroblastlar için güçlü bir mitojendir (87). PDGF'ün, biyolojik etkilerini göstermesine aracılık eden bir spesifik hücre yüzey reseptörü mevcuttur (PDGF-R). Leiomyomda, PDGF ve PDGF-R ekspresyonu bulunmuştur. Bu durum, leiomyom gelişiminde PDGF'ün rolünün olabileceğini akla getirmektedir. Leiomyomdaki PDGF mRNA düzeyleri, myometriumda bulunan düzeyler ile benzerdir. Bununla birlikte, leiomyom hücre kültürlerinde, myometrial hücrelerden daha fazla PDGF-R alanları bulunmaktadır, fakat PDGF-R

affinitesi, leiomyomda myometriumdakinden daha azdır (10,81,88). Leiomyom hücrelerinde PDGF'ün, mitojenik aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. PDGF, leiomyom hücrelerinde DNA sentezini ve hücre çoğalmasını stimüle etmektedir (81,89). GnRH agonistleri, leiomyomada immünoreaktif PDGF düzeylerinin düşmesini indüklemektedir ve azalmış PDGF ekspresyonu, uterin volümdeki küçülme ile ilişkili bulunmuştur (90).

Transforming growth faktör-Beta (TGF-Beta) ailesinin üyeleri, dokularda morfogenezis ve gelişimde rolü olan sitokinlerdir. TGF-Beta, fibronektin ve kollajen gibi ekstrasellüler matriks proteinlerini artırır ve bu proteinleri matriksin içine katmaktadır. TGF-Beta1, TGF-Beta2 ve TGF-Beta3 memeli reproduktif dokularında bol miktarda bulunmaktadır (91,92,93). Myometriumda, TGF-Beta1, TGF-Beta2 ve TGF-Beta3 mRNA ve TGF-Beta tip I-II-III reseptör mRNA ekspresyonu bildirilmiştir (94,95,96). Leiomyomlarda, myometrium ile karşılaştırıldığında yükselmiş TGF-Beta3 mRNA seviyeleri görülmektedir. Leiomyomada, TGF-Beta3 mRNA en yüksek düzeyinin midsekretuar fazda gözlendiği bulunmuştur ve bu da TGF-Beta3 ekspresyonunun düzenlenmesinde progesteronun rolünü akla getirmektedir (89,97, 98).

Leiomyomda, TGF-Beta ve TGF-Beta reseptörleri, myometriumdan daha yüksek düzeyde eksprese edilmektedir. TGF-Beta leiomyom hücrelerinde, hücre proliferasyonunun indüksiyonunda ve ekstrasellüler matriks sentezinde rol oynayabilir (39). TGF-beta3 resptörü, leiomyomlarda 5-8 kat daha fazla eksprese olmaktadır.

Anjiogenezisin, leiomyom gelişiminin düzenlenmesinde önemli bir rolünün olduğu düşünülmektedir. Leiomyom gelişimi ile ilgili olarak VEGF, bFGF, adrenomedüllin ve endotelin gibi anjiogenik faktörler üzerinde çalışılmıştır.

VEGF, vasküler endotelial hücreler için güçlü bir mitojendir ve anjiogenezde rol oynayan faktörlerden biridir. Kapiller permeabilityyi artıran güçlü bir ajandır. VEGF'ün 5 izoformu tanımlanmıştır. Bunlar VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D ve VEGF-E'dir. VEGF; bFGF ve PDGF gibi heparin bağlayan büyüme faktörleri arasında yer almaktadır. VEGF'deki heparin bağlama bölgeleri, ekstrasellüler matrikse bağlanmasına aracılık etmektedir. Böylece, diğer heparin bağlayan büyüme faktörleri ile birlikte, ekstrasellüler matrikste bir büyüme faktör rezervi oluşturmaktadırlar. Hem myometrium hem de leiomyoma düz kas hücrelerinde, VEGF protein ekspresyonu tanımlanmıştır. Leiomyomadaki VEGF mRNA düzeyleri ile myometriumdaki düzeyler arasında göze çarpan anlamlı derecede bir fark yoktur. Yine leiomyomadaki VEGF mRNA düzeyleri,

menstrüel siklusun proliferatif ve sekretuar fazları arasında fark göstermemektedir. Ayrıca GnRH agonistleri, leiomyomdaki VEGF mRNA düzeylerini etkilemez. VEGF, fibroblast growth faktör (FGF) ile sinerjistik etki gösterir (99,100,101,102,103).

Fibroblast ve düz kas hücreleri gibi çeşitli hücrelerde bFGF, mitogenezis ve farklılaşmayı uyarmakta ve leiomyom ve myometrial hücreler gibi düz kas hücrelerinde, proliferasyona yol açmakta ayrıca anjiogenezisi ilerletmektedir. Bununla birlikte bir çalışmada, bFGF ekspresyonu açısından leiomyoma ve myometrium arasında fark olmadığı gösterilmiştir. bFGF'ün hem myometrial hem de leiomyoma hücreleri için mitojenik etkide olduğu gösterilmiştir fakat leiomyoma hücrelerinin, bFGF'ün mitojenik etkisine daha az yanıt verdiği bulunmuştur. Tüm bunlar, bFGF'ün leiomyom gelişiminde çok önemli bir rolünün olmayabileceğini düşündürmektedir (39,104, 105, 106, 107).

Endotelin, bir vazokonstriktör peptid olup üç farklı izoformu bulunmaktadır, bunlar endotelin-1, endotelin-2 ve endotelin-3'tür. Endotelin, fibroblastlarda DNA sentezini ve hipertrofiyi uyarabilir. Pekonen ve arkadaşları, endotelin A reseptör mRNA'nın, leiomyomda myometriumdan daha bol olduğunu göstermişlerdir. Endotelin-1 ayrıca, bFGF, EGF, IGF-I ve IGF-II'nin leiomyoma gelişimi etkilerini güçlendirebilir (108,109,110).

Adrenomedüllin, leiomyomda yaygın biçimde eksprese edilmektedir. Leiomyomlarda en yaygın eksprese olan anjiogenik faktörler VEGF ve adrenomedüllindir. Bununla birlikte adrenomedüllin ekspresyonu, leiomyomadaki vasküler dansite ve endotelial hücre proliferasyonu ile bağlantılı gibi gözükmektedir (111).

Çok sayıda araştırmaya rağmen normal myometriumun leiomyoma dönüşüm mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Leiomyom gelişiminden, tek bir faktörün değil çok sayıdaki faktörün karmaşık ilişkilerinin sorumlu olduğu düşünülmektedir. Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz çalışmaları, her bir leiomyomun, esasen unisellüler olduğunu yani tek bir düz kas hücre klonunun (monoklonal) proliferasyonu olduğunu düşündürmektedir (112).

Leiomyomlar, makroskopik olarak birbirine benzemektedir ve leiomyomların gross morfolojisi hem patologlar hem de klinisyenler tarafından iyi bilinmektedir. Leiomyomlar, tek olarak bulunabildikleri gibi çoğunlukla multiplerdir. Genellikle küresel veya lobüle görünümde, iyi sınırlı, myometriumdan daha açık renkte, beyaz sert

lezyonlar şeklinde olup myometrial kesi yüzeyinden çıkıntılıdır. Açık gri veya inci beyazlığındaki görünümü ile myometriumdan ayırt edilirler. Kesit yüzeyleri, genellikle halka dizilişli, iç içe geçmiş düz kas liflerinden ibarettir. Yine çevredeki normal dokudan psödokapsülleri vasıtasıyla kolay bir şekilde ayrılabilirler (4).

Leiomyomların mikroskopik görünümünde; iğ şekilli düz kas hücreleri, demetler halinde birbirleri ile dik açı oluşturacak şekilde dizilmişlerdir. Bu kas demetleri, girdap oluşturacak şekilde uzanmaktadır. Sıklıkla uzunlamasına, künt uçlu nükleus içerirler ve nükleus, hücrenin merkezinde lokalizedir. İğ şeklindeki bu hücreler, eozinofilik sitoplazmaya sahiptirler. Düz kas lifleri arasında bağ dokusu bulunmaktadır. Tümörün fibröz doku hücreleri daha farklıdır. Sitoplazmaları fibrilsizdir. Nükleusları uzun, iğ şeklinde ve nokta uçlu olup genellikle hücrenin periferine yakındır. Leiomyomlar, etraflarındaki normal kas dokusundan, areolar doku ve baskıya uğramış myometriumun oluşturduğu psödokapsül vasıtası ile kolay bir şekilde ayrılabilirler. Leiomyomların arteriyel yoğunluğu, myometrium dokusundan azdır. Kan damarları genel olarak düzensiz dağılım gösterirler ve çoğunlukla kalın duvarlıdır (4, 113).

Mikroskopik olarak Cellular leiomyom, pleomorfik atipik Bizarre leiomyom ve lipoleiomyomlar gibi çok sayıda değişik şekilleri vardır. Cellular leiomyom komşu dokulardan, önemli oranda daha fazla miktarda hücre ihtiva ederler. Ancak mitotik aktivitede artış, nekroz ve hücre atipi yoktur. Bizarre leiomyoma gross olarak tipik leiomyoma benzer. Ancak mikroskopik olarak fokal, geniş sitoplazmalı, büyük nükleuslu, oldukça acaip şekilli dev hücreleri mevcuttur. Lipoleiomyomlar tipik leiomyoma benzer. Ancak düz kas hücreleri arasında yağ hücreleri vardır (113). Leiomyomlardan anormal miktarlarda salınabilen çeşitli growth faktörler, mezenşimal kökenli patolojik durumlarda da anormal olarak salınabilmektedir. Büyüme faktörleri hem hücre proliferasyonu hem de ekstrasellüler matrix yapımında artış ile ilişkilidir. Genellikle de tümör oluşumu; hücre proliferasyonu ile apoptozis arasındaki dengenin bozulmasına bağlanabilmektedir. PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) ve Ki-67, dokudaki proliferasyonu gösteren belirteçlerdir. PCNA, hücre siklusu ilişkili bir nonhiston nükleer proteindir. Artmış PCNA düzeyleri hücre siklusunun geç G1 fazında gözükmekte ve proliferasyonun S fazı süresince maksimum düzeyde olmaktadır. Fakat istirahat halindeki hücrelerde saptanamaz. Yani PCNA hücre siklusunun S fazındaki hücreleri değerlendirir. Ki-67 ise hücre siklusunun geç G1'den S, G2 ve M fazlarına kadar hücre siklusunun tüm aktif fazlarında eksprese olan bir nükleer proteindir. G0 fazında yoktur. Dolayısı ile mitotik fazdaki hücrelerden çok sıklık

hücrelerin oranını göstermektedir. Sekretuar fazda, proliferatif faza oranla daha fazla olmakla birlikte menstrüel siklusun tüm fazlarında myom dokusundaki Ki-67 düzeyinin myometriyuma oranla daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Ayrıca bir çalışmada immünohistokimyasal yöntemlerle Ki-67'nin leiomyosarkomda leiomyoma göre daha çok sayıda hücrede ve daha yoğun olarak gözleendiği de bildirilmiştir (114, 115, 116, 117, 118).

Leiomyomların ekstrasellüler matriksi çoğunlukla kollajenden oluşur ama proteoglikan ve fibronektin de içerirler. Leiomyomların normal myometriuma göre %50 daha fazla kollajen içerdiği ve tip-I kollajenin tip-III kollajene oranının leiomyomda artmış olduğu bildirilmiştir. Proteoglikanlar, leiomyom hücreleri ve ekstrasellüler matriks arasında bağ sağlayan glikoproteinlerdir (1).

Büyükliklerine göre değerlendirildiğinde leiomyomlar mikroskopik veya çok büyük boyutlarda (kilogramlarca ağırlığa erişebilirler) olabilmektedir. Çoğunlukla 15 cm'den küçüktürler, ancak nadir de olsa dev boyutlara ulaşabildikleri görülmektedir. Literatürde 65 kilogramdan daha ağır olarak rapor edilmiş tümör mevcuttur (119). Leiomyomlar, simetrik olarak uterusu büyütebilir veya uterin yapıyı belirgin olarak bozabilirler. Bir leiomyom, kıvam olarak sert ve taş (kalsifikasyon) kıvamında olabileceği gibi yumuşak da (kistik dejenerasyon) olabilmektedir. Genellikle kıvamı, sert veya lastiksi olarak tanımlanmaktadır. Her ne kadar gerçek bir kapsülleri yoksa da; tümör kenarları künttür ve infiltre olmayan, itici tabiatla, genellikle myometriumdan cerrahi olarak enükleasyona izin veren ve bağ dokusundan meydana gelen pseudokapsülü bulunmaktadır. Her tümörün genellikle tek bir majör kan damarı bulunmaktadır. Kanlanma tümörün periferinden olur, tümörün merkezi rölatif olarak avaskülerdir. Bu yüzden tümörün merkezinde nekroz ve dejenerasyon görülebilir.

Leiomyomlar, anatomik olarak bulundukları yere göre sınıflandırılırlar. Uterusta bulunan leiomyomlar, en sık olarak korpus uteride (%91,2), daha nadir olarak da istmik bölgede ve servikte yerleşirler. Leiomyomların daha nadir görüldüğü diğer yerler arasında intraligamenter yerleşim ve paratubal yerleşim gelmektedir (120). Korpus uteride yerleşmiş olan leiomyomlar, uterus duvarının çeşitli tabakalarına yerleşebilirler ve yerleştikleri bu tabakalara göre sınıflandırılabilirler (intramural, subserozal, submukozal). Bütün leiomyomlar aslında myometriumdan oluştuklarından başlangıçta hepsi intramural veya interstisyeldir. Tümör, büyüdükçe intramural olarak kalabilir veya bu büyüme dışarı doğru gelişerek subserozal, endometriuma doğru gelişerek de submukozal leiomyomları oluşturabilir. Leiomyomlar bazen ince, vasküler bir sapla

uterusa bağı olabirler. Bu durumda “pediküllü” leiomyom olarak isimlendirilirler. Lateral yerleşimli subseröz leiomyomlar, ligamentum latum’un iki peritoneal yaprağı arasında yerleşirse, intraligamenter leiomyomlar olarak isimlendirilirler. Leiomyomların yerleşim yerleri, klinik açıdan da son derece önemlidir. İntraligamenter ve servikal leiomyomların cerrahisi zor olabilir. Ayrıca, subseröz pedinküllü tümörler ve intraligamenter tümörler, tanıda problem yaratabilirler çünkü adnekslerden kaynaklanan tümörlerden ayırım zor olabilir (1, 120).

Servikal leiomyomlar, nadir görülen tümörlerdir (%2,6). Hem parametrium hem de vajene doğru gelişim gösterme özellikleri vardır. Mesane boynuna bası yaparak dizüri pollaküri ve inkontinansa, parametriuma doğru büyüme göstererek pelvik dolaşımda staza, üreterlere bası yaparak hidroüreter ve takiben hidronefroza, gebelikte de distosilere neden olabirler.

İntramural veya interstisyel leiomyomlar, yerleşim yerlerine göre en sık görülen myom tipidir (myomların %50-60’ı). Myometriumun içinde bulunan fakat endometrium veya serozada distorsiyon oluşturmayan tümörlerdir. Genellikle myometrium içerisinde multiple nodüller olarak yerleşirler. Küçük boyutlarda olduklarında uterusun şeklinde herhangi bir değişikliğe sebep olmazlar fakat büyüdükleri zaman uterin kavitede ve uterusun dış yüzünde düzensizliklere yol açabirler. Uterusun simetrik olarak büyümesine sebep olan intramural leiomyomlara “kugel myomu” denilmektedir. Tümörler uterusun simetrik büyümesine yol açarlarsa, bimanuel muayenede gebe uterusu ile karışabilecekleri bilinmelidir (1).

Subserozal veya subperitoneal leiomyomlar, tüm myomların yaklaşık %25-30’unu oluşturmaktadır. Bu tümörler peritonun visseral tabakasının hemen altında yer alıp myometrium yüzeyinden dışarıya doğru çıkıntı oluşturlar. Subseröz tümörler, pediküllü (saplı) olma eğilimindedirler fakat bazen sapsız, uterus yüzeyine geniş bir tabanla oturur vaziyette bulunabirler. Asemptomatik ve pediküllü olarak peritoneal kaviteye doğru, çok büyük boyutlarda büyüme eğilimi gösterirler. Bazen pedinküllü subseröz leiomyomlar, pedinkülün nekrozu neticesinde uterustan ayrılır ve diğer intraabdominal organlardan beslenmeye başlarlar. Bu tip leiomyomlara, “parazitik myom” adı verilmektedir. Parazitik myomlarda beslenme çoğunlukla omentumdan olmaktadır. Parazitik myomlar barsaklara yapışarak gastrointestinal sistem kanamasına sebep olabirler. Parazitik myomlar yaygın olduğunda “intraperitoneal leiomyomatosis (Leiomyomatosis Peritonealis Disseminata)” olarak isimlendirilmektedir. Subseröz

leiomyomlar, lateralde ligamentum latum'un iki yaprağı arasında gelişirse intraligamenter leiomyom olarak isimlendirilirler (121).

Submukozal leiomyomlar ise tüm myomların yaklaşık %5-10'unu oluşturmaktadır.

Submüköz leiomyomlar, endometriumun hemen altında yerleşmişlerdir ve uterusun lümenine doğru büyürken endometriuma bası yapma eğilimindedirler. Uterusun şeklini bozabilecek büyüklüklere ulaşabilirler. Bir sap ile endometrial kaviteye bağlı, pediküllü submüköz leiomyom tipleri olabileceği gibi, sapsız (sesil), geniş tabanlı submüköz leiomyom tipleri de bulunabilmektedir. Submüköz leiomyomlar, en fazla semptomatik olanlardır. Bazen çok büyük boyutlarda olmasalar bile, endometriuma yaptıkları bası nedeni ile semptomatik olabilmektedirler. Pediküllü olanları, endometrial kavite içinde bulunabilir veya nadiren servikal kanalı dilate ederek serviksten prolabe olabilirler. Hatta bazen prolabe olan submüköz leiomyom endometrial kavitenin tepesine bağlı ise ve uterin fundusu aşağı doğru çekerse, kronik uterin inversiyona sebep olabilirler. Bazen submüköz tümörler, uterin kaviteye doğru saplı şekilde büyüyerek, uterus kontraksiyonlarının etkisi ile servikal ostan vajene çıkıp, vagene doğmuş myom şeklini alabilirler. Bu tip tümörlere, “myoma in status nascendi” denilmektedir. Vajene doğmuş leiomyomlar gerçekleştiğinde, leiomyomlar torsiyone veya enfekte olabilirler.

Genel olarak subseröz leiomyomlar, submüköz leiomyomlara göre daha çok fibröz doku içerirken, submüköz leiomyomlar da subseröz olanlara göre daha çok düz kas dokusu içermektedir. Bununla birlikte sarkomatöz değişiklikler, submüköz tümörlerde daha sık olarak görülmektedir (1).

Sekonder Değişiklikler (Dejeneratif Değişiklikler):

Leiomyomalarda yaygın olarak dejeneratif değişiklikler gözlenebilmektedir. Leiomyomalar içerisinde hyalinizasyon, likefaksiyon (kistik dejenerasyon), kalsifikasyon, kanama, yağ veya inflamasyon olanlar olabilir. Bu sekonder değişikliklere bağlı histolojik paternler, gözle görülebilir ya da mikroskopik görünümle değerlendirilebilirler. Bu değişimlerin sebebi; kan akımındaki değişiklikler, hızlı büyüme, gebelik ve mekanik hasarlardır. Sekonder değişiklikler benign ya da malign yönde olabilirler (4,122).

Leiomyomlardaki en sık sekonder değişiklik, hyalin dejenerasyondur. Çok küçük olanlarda nadir olmakla birlikte nerdeyse tüm leiomyomlarda var olan çok genel bir

dejenerasyon tipidir (vakaların %60'ından fazlasında). Bu tip dejenerasyonda hyalinize alandaki kesi yüzeyi, düzgün ve homojen görünümlü olup sarmal benzeri paternini kaybetmiştir. Sarı renkli, yumuşak, jelatin benzeri hyalinize alanlar içerirler ve genellikle asemptomatiklerdir (1,4,122).

Kistik dejenerasyon ise genellikle nekroz veya hyalin dejenerasyonu takiben meydana gelmektedir. Leiomyomların %4 kadarında görülmektedir. Likefaksiyon sonrasında, çok sayıda sünger görünümlü küçük boşluklar, genellikle çıplak gözle görülebilmektedir. Bazen kistik değişiklik o kadar büyüktür ki, leiomyom gerçek kistik tümöre dönüşebilir (1, 4).

Bir diğer değişiklik tipi ise kalsifik (kalkeröz) dejenerasyondur. Kalsifik leiomyomlar; yaşlılarda, siyah kadınlarda ve pediküllü subseröz tümörlerde daha sık görülmektedir. Devam eden kan akımının azalması ve dokunun iskemik nekrozu sonrasında, leiomyom içinde kalsiyumkarbonat ve kalsiyumfosfat birikmesi sonucunda oluşmaktadır. Kalsifiye kisti andırabilecek şekilde kalsiyum, tümörün periferinde birikebilir. İleri düzeyde bir kalsifik dejenerasyon mevcut ise leiomyom, sert, solid, kalsifiye bir hal alabilir ve bu durumda “rahim taşı” olarak isimlendirilirler. Kalsifik dejenerasyon gösteren leiomyomlar, radyografik olarak kolayca tanınabilirler (1,4,122).

Kırmızı (karneöz) dejenerasyon, en sık gebelik esnasında görülmektedir. Leiomyomlardaki fizyolojik değişiklikler, myometriumdakinden farklıdır ve bu durum, leiomyomada kan akımının bozulmasına, aseptik dejenerasyon ve infarkt oluşumuna neden olmaktadır. Genellikle ağrı da eşlik edebilir. Kırmızı dejenerasyonun ve kırmızı renk oluşumunun nedeni, venöz tromboz ve interstisyel kanamayla oluşan konjesyondur. Gebelerin %0,1-3,9 kadarında leiomyom görülebilir ve hastaların %10 kadarında kırmızı dejenerasyon görülür (123).

Dolaşımsal yetmezlik, tümörün merkezinde önce santral nekroz oluşmasına ve ardından enfeksiyon gelişmesine neden olabilir. Bu durum, septik dejenerasyon olarak isimlendirilir. Bu durum ateş, pelvik hassasiyet ve akut ağrıya sebep olabilir. Submüköz leiomyomlar, en sık enfekte olanlardır. Bu tümörler özellikle vajen içine uzanırlarsa enfekte olurlar ve apse formasyonu da oluşabilmektedir. Bu enfeksiyonlarda etken genellikle streptokoklar olmakla birlikte bakteroides fragilis enfeksiyonları da görülebilmektedir. Enfeksiyon tablosu, parametrit, peritonit veya sepsis ile sonuçlanabilir (1,4,123).

Menapoz veya gebeliği takiben oluşan atrofik dejenerasyonda, tümör büyüklüğü azalırken, belirti ve bulgular kaybolmaktadır.

Nadir olarak görülen yağlı (miksomatöz) dejenerasyon, hyalin ve kistik dejenerasyonu takiben oluşur ve asemptomatiktirler. Kesit yüzeyi sarımsı renkte olabilir (4).

Leiomyomlardaki en önemli fakat nadir görülebilen değişiklik ise, sarkomatöz dejenerasyondur. Leiomyomdaki sarkom insidansı hakkında çeşitli farklı yayınlar mevcuttur. Novak tarafından bildirilen insidans %0,7 olmakla birlikte, Montague ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir araştırmada insidans %0,29 olarak bulunmuştur. Leiomyom içinde gelişen gerçek sarkom insidansını, %0,04 gibi daha düşük oranlarda bildiren çalışmalar da mevcuttur. Uterin leiomyomlu çoğu kadına cerrahi uygulanmadığı göz önünde bulundurulduğunda, leiomyomadaki gerçek sarkom insidansının düşük olduğu düşünülebilir. Ancak, gerçek sıklığı tam olarak saptamak zordur. Sarkom daha çok büyük leiomyomda ve tümörün kan akımının en zayıf olduğu merkezinde olmaktadır. Menapozdaki kadınlarda görülen leiomyomlarda hızlı bir şekilde büyüme sözü konusu olduğunda sarkomatöz dejenerasyondan şüphelenilmelidir. Histolojik olarak gerçek leiomyosarkomu tanımlamak zordur. Bu konuda bazı patoloğlar, mitotik sayıya güvenirlir. Onluk büyütmede mitotik figürü, beşten az olan tümörlerin tümü benign olarak değerlendirilirken, onluk büyütmede mitotik figürü, ondan fazla olan tümörler malign olarak değerlendirilmektedir. Bazı patoloğlar ise mitotik sayının önemli olması ile birlikte tanı için nükleer hiperkromazi, nükleer pleomorfizm ve dev hücre gibi hücre formlarının varlığına güvenirlir (1,124,125).

Leiomyomlar benign tümör olmalarına rağmen değişik derecelerde meydana gelebilen iskemik nekrozlardan dolayı malign tümörlere benzer görünüm kazanabilirler. Artık günümüzde malign benign ayrımında sıklıkla mitotik indeks, sitolojik atipi derecesi, tümör hücresi nekrozu (koagülasyon nekrozu) kullanılmaktadır. Mitotik indeksi 5-15 arasında olan tümörlerin bazıları agresif davranış gösterebilirler ve bu yüzden bunlar “smooth muscle tumor of uncertain potential” olarak isimlendirilmektedirler. Ayrıca bazı tümörlerde belirgin hücresel atipi görülse de malign davranış görülmez, bunlar ise “symplastik leiomyom” olarak adlandırılırlar (126).

Sellüler leiomyomlar, ilk bakışta sarkomu andırabilirler. Bu tip tümörler, komşu dokulardan, önemli oranda daha fazla miktarda hücre ihtiva ederler. Ancak mitotik aktivitede artış, nekroz ve hücresel atipi görülmez. Gross olarak, tipik leiomyomlardan

hafifçe daha yumuşak olabilirler ve sıklıkla oral kontraseptif kullanan veya genç gebe kadınlarda görülmektedirler (113).

Klinik:

Uterin leiomyom prevalansı yüksek olduğu için leiomyom ile birlikte olan semptomların insidansının da oldukça yüksek olması beklenebilir. Ancak leiomyomu olan olguların hepsi semptomatik değildir. Genellikle asemptomatiktirler. Olguların sadece %20-50'sinde doğrudan leiomyom veya leiomyomlara atfedilen semptomlar bulunmaktadır (4,127,128). Büyük leiomyomlar bile bazen hiç semptom vermeyebilirler. Bu nedenle pek çoğunun tanısı rutin muayene ve ultrasonografi ile konulur. Leiomyomların semptomları tümörün lokalizasyonuna, boyutlarına ve leiomyomların sayısına bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir. Tek bir semptom bulunabileceği gibi birden fazla semptom bir arada bulunabilir. Uterin leiomyomalı hastalarda görülebilecek semptomlar tablo 1.1'de gösterilmiştir.

Anormal uterin kanama:

Anormal uterin kanamalar leiomyomların en önemli klinik bulgusudur ve hastaların yaklaşık %30'unda bulunmaktadır. Leiomyomlu kadınlarda anormal kanama paterni menoraji, hipermenore, metroraji ve premenstrüel spotting gibi çeşitli şekillerde görülebilmektedir. Leiomyomların karakteristik kanama paterni menoraji ve hipermenore olup en sık görülen şekli menorajidir. Menstrüasyon süreci dışındaki zamanlarda kanama leiomyomlar için karakteristik değildir (3,4,5). Anormal kanama paternine demir eksikliği anemisinin eşlik etmesi sık rastlanan bir durumdur. Menstrüel kan kaybının fazla olduğu ilk aylarda hemoglobin ve hematokrit değerleri normal olabilir. Ancak, ilerleyen zamanlarda demir depolarının tükenmesiyle birlikte anemi de belirginleşmektedir.

Anormal kanamada leiomyomun büyüklüğünden çok lokalizasyonu önemli gibi gözükmemektedir. Anormal kanama submüköz, intramural ve subseröz leiomyomlarla birlikte olabilmektedir. Ancak anormal kanama görülme sıklığı submüköz leiomyomlarda daha yüksektir. Submüköz leiomyomlarda, tümör üzerindeki endometriumun konjesyonu, ülserasyonu ve nekrozu nedeniyle menstrüasyon aralarında da kanama görülebilmektedir. İntramural leiomyomaların endometrial kaviteye bası

yapması da menorajiye sebep olabilmektedir. Bununla birlikte menapoz öncesi intramural yerleşimli ve asemptomatik olan leiomyomlar, menapoz sonrası submüköz hale gelerek semptomatik olabilirler ve genellikle kendilerini postmenapozal kanama ile göstermektedirler. Bu durum, menapoz sonrası oluşan myometrial atrofi ve uterin duvarın incilmesi ile oluşmaktadır. Postmenapozal dönemde leiomyom da bir miktar büzüşür ancak bu büzüşme genellikle onu çevreleyen myometrium kadar olmamaktadır. Böylece menapozdan önce intramural olan bir leiomyom postmenapozal dönemde submüköz pozisyona gelebilir ve bunun neticesinde de ülser olarak kanayabilir. Ancak yine de postmenapozal kanama durumunda, leiomyom saptansa bile, hasta servikal veya endometrial anormallikler gibi diğer postmenapozal kanama sebepleri açısından da mutlaka değerlendirilmelidir. Postmenapozal kanama ile birlikte uterin leiomyomadaki büyüme malign değişikliğe işaret edebilir (1). Anormal uterin kanaması olan herhangi bir kadında leiomyom saptandığında, bu kanamanın sebebinin her zaman leiomyom olmadığı akılda tutulmalıdır. Bu nedenle diğer anormal kanama nedenleri ekarte edilmelidir.

Uterin leiomyomaların anormal kanamaya yol açması çeşitli mekanizmalar ile açıklanmaktadır. Bunlar; uterusun büyümesiyle endometrial yüzeyde artış, uterusun damarlanma ve kan akımında artış, intramural leiomyomlarda uterusun kontraksiyon yeteneğinin azalması ve hemostaz yapmakta gecikmesi, submüköz leiomyomlarda çevredeki damarların, kısmen venlerin distorsiyon ve konjesyonu veya üstteki endometriumun ülserasyonudur. Leiomyoma varlığında endometrial kavitenin yüzey alanı belirgin olarak genişleyebilmektedir. Sehgal ve Haskins endometrial yüzey alanı ile kanama şiddeti arasında bir korelasyon olduğunu göstermişlerdir (1, 128).

Bası etkisi:

Leiomyomlar, komşu organlar üzerine bası etkisi yaratarak semptomlara sebep olabilirler. Bu semptomlar; pelvik ağrı, dispareni, dolgunluk hissi, üriner sistem şikayetleri ve gastrointestinal şikayetler gibi çeşitli şekillerde olabilmektedir. Böyle bir basıdan en çok mesane etkilenmektedir. Bası ile ilişkili olarak ani idrara sıkışma hissi, sık idrara çıkma ve bazen de üriner inkontinans görülebilmektedir. Büyük anterior leiomyomlar mesaneye bası yaparak mesane kapasitesinde azalmaya yol açabilirler. Bazen leiomyom akut idrar retansiyonuna yol açabilmektedir. Bu durum, leiomyomun hızlı büyüyerek kemiğe karşı üretra ve mesane boynuna bası yapması ile oluşabilir.

Nadiren posterior yerleşimli fundal bir leiomyom, uterusu aşırı retrofleks bir pozisyona getirebilir ve mesane tabanına bası yaparak üriner retansiyona neden olabilir. Büyük leiomyomu olan kadınlarda, levator kas hiatusunun genişlemesi ve zayıf ürogenital diyafram boyunca mesane tabanının ve üretra posteriorunun dışarıya çıkıntı yapması görülebilir. Bu hastalarda stres üriner inkontinans ta görülebilmektedir. Sık olmamakla birlikte, multiple büyük leiomyomlara bağlı uterusun büyümesi ile bası sonucu sessiz üreteral obstrüksiyon gelişebilir. Simetrik olarak belirgin büyümüş olan uterus, tüm pelvisi doldurarak üreterlere bası yapabilmektedir. Tümörün lokalizasyonuna bağlı olarak obstrüksiyon üreterlerin herhangi birisinde olabilir. Üreterlerin obstrüksiyonu, zamanla hidroüreter ve hidronefroza yol açacak ve renal fonksiyonlarda da bozulmaya sebep olabilecektir. Uterin leiomyomaya bağlı olarak oluşan kronik mesane boynu obstrüksiyonu bazen, mesanenin büyümesine yol açabilecek kadar şiddetli olur. İhmal edilmiş olan olgularda mesanedeki bu büyüme, tüm alt abdomeni dolduracak kadar fazla olabilir.

Barsaklar, mesaneye göre daha az bası semptomları göstermektedir ancak rektuma olan bası nedeniyle tenesmus ve kabızlık gibi şikayetler olabilir. Parazitik leiomyomlar intestinal obstrüksiyona neden olabilirler. Büyük tümörler, pelvik venöz konjesyona bağlı olarak alt ekstremitelerde ödeme sebep olabilmektedir. Ayrıca, çok büyük bir leiomyom yalnızca abdominal ve pelvik organlara bası yapmakla kalmayıp aynı zamanda solunum fonksiyonlarını da bozabilir (1, 4, 128, 129).

Ağrı:

Abdominal ve pelvik ağrı veya rahatsızlık, pelviste ağırlık hissi ve disparoni semptomatik uterin leiomyomalı hastaların yaklaşık üçte birinde görülmektedir. Leiomyoma ile birlikte olan ağrı çeşitli sebeplere bağlı olabilir. Leiomyomun bizzat kendisine bağlı ağrı genellikle olmaz. Ağrı, ya leiomyomun bası etkisine ya da leiomyomdaki sekonder değişikliklere bağlı olarak ortaya çıkabilir. Ağrı, dolaşımın tıkanması veya enfeksiyon sonrası tümör içerisindeki dejenerasyon nedeni ile, pediküllü tümörlerin torsiyonu veya submüköz leiomyomların uterin kaviteden atılması için oluşan myometrial kontraksiyonlar sonucu olabilmektedir. Nadiren, pedinküle subseröz leiomyomlar kendi etrafında dönerek akut batın kliniğine yol açabilir. Bu pedinküle tümörlerdeki torsiyon, daha çok gebelikte veya menapoz sonrasında görülmektedir. Akut karneöz veya kırmızı dejenerasyon hayatın herhangi bir döneminde görülebilir ancak bu

tip dejenerasyonun ağrıya sebep olması daha çok gebelikte görülmektedir. Büyük tümörler, kemik pelvise çakılı hale gelebilir ve sinirler üzerine bası yaparak bele ya da alt ekstremitelere yayılan ağrıya yol açabilirler. Broad ligament içindeki bir tümör, tek taraflı alt abdominal ağrıya ya da siyatik sinire baskı yaparak ağrıya neden olabilir. Nadir olarak leiomyomanın enfeksiyonu, ani başlayan ateş, lökositoz ve şiddetli karın ağrısına yol açabilir. Leiomyoma ile ilişkili çeşitli sebeplere bağlı olarak ağrı oluşabilmekte ise de leiomyomanın, ağrıya neden olan diğer pelvik patolojilerle birlikte olabileceği unutulmamalıdır. Bu nedenle, pelvik inflamatuvar hastalık, endometrit, over tümörleri, gastrointestinal ve üriner sistemi ilgilendiren patolojiler gibi diğer durumların ekarte edilmesi gerekmektedir (1,4,128,130,131).

Spontan abortus ve gebelikle ilişkili diğer problemler:

Leiomyoma sekonder spontan abortus insidansı tam olarak bilinmese de, uterin leiomyom, spontan abortus riskini anlamlı olarak artırmaktadır. Leiomyomu olan gebelerdeki insidans, normal gebelerdekinden yaklaşık 2-3 kat daha fazladır. Myomektomi sonrasında tekrarlayan spontan abortus oranları azalmaktadır. Buttram ve Reiter'in yapmış oldukları bir çalışmada; uterin leiomyomalı hastalarda spontan abortus oranı %41 iken, myomektomi sonrasında bu oran %19'a düşmüştür (127, 132). Uterin leiomyomadan kaynaklanan spontan abortus sebeplerini açıklamaya yönelik çeşitli mekanizmalar ileri sürülmüştür. Bu mekanizmalar; Uterin kan akımının bozulması, endometriumdaki kan akım değişiklikleri, uterin irritabilite, gebelikte leiomyomun dejenerasyonu veya hızlı büyümesi, gebelikte büyüyen uterin kavitenin büyümesindeki zorluk ve endometrial gelişmedeki azalma veya leiomyomun lokalizasyonu nedeniyle uygun implantasyonun ve plasenta büyümesindeki bozulmadır. Submüköz leiomyom üzerindeki ince ve beslenme bozukluğu olan endometrium, başarılı implantasyon oranını azaltmaktadır, çünkü böyle bir ortam, embriyo ve plasentanın normal bir şekilde büyüme ve gelişmesi için uygun değildir (1). Ayrıca, malforme embriyo sıklığının, leiomyomalı olgularda iki kat artmış olduğu bildirilmiştir (133). Eğer plasental alana yakın yerleşimli leiomyom mevcut ise böyle olgularda gebelikte ilişkili komplikasyonların artmış olduğu bulunmuştur. Bunlar; kanama, ağrı, erken doğum ve postpartum kanama gibi komplikasyonlardır (134). Yine başka bir araştırmada, leiomyomu bulunan olgularda abortus imminens, erken doğum tehdidi, ablasyo plasenta ve pelvik ağrı oranlarının anlamlı olarak artmış olduğu bildirilmiştir (135). Leiomyom ayrıca, distosi ve operatif

doğum riskini de artırmaktadır. Gebelikte, leiomyomun kırmızı veya karneöz dejenerasyonu ile ağrı, hafif ateş ve lökositöz olabilmektedir. Gebelikte, subseröz pediküllü leiomyomların torsiyonu, gebe olmayanlara göre daha sıktır (1).

İnfertilite:

Leiomyomlar, nadir de olsa infertilitenin primer sebebi olabilmektedirler. Gebe kalamama bazen ilk şikayet olabilir ancak tek başına leiomyomlar, hastaların %2-10'unda infertilite nedenidir (136). Leiomyoma sonucu infertilite, anormal uterin kan akımı, sperm transportunun bozulması, uterin veya tubal motilitedeki anormallik ve aralıklı anovulasyon gibi bir çok faktöre bağlı olabilir (137). Yapılan çeşitli çalışmalara bakıldığında, myomektomi sonrasında gebelik hızının arttığı görülmektedir (127). Li ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada, myomektomi sonrasında hem gebelik hızının arttığı hem de spontan gebelik kaybı insidansının azaldığı saptanmıştır (132). Ancak yaş da, myomektomiyi takiben gebelik hızında etkili olan önemli bir faktördür. 35 yaşın altında olan kadınlarda gebelik hızı daha yüksek iken (%62-83), 35 yaşın üzerinde olanlarda bu hız oldukça düşüktür (%0-33) (130). İntramural veya submüköz leiomyomlar, anlamlı büyüklükte ise infertilite sebebi olabilirken, genellikle, küçük subseröz leiomyomlar infertilite sebebi olarak düşünülmezler (1).

2.2.ÜROKORTİN

Kortikotropin releasing faktör (CRF) ailesi, çeşitli nöropeptidlerden oluşmaktadır ve bunlardan biri olan ürokortin, bu ailenin yeni tanımlanan bir üyesidir. 40 aminoasitli bir peptid olan ürokortin, ilk olarak, sıçan orta beyinde tanımlanmıştır ve ürotensin ve CRF ile yüksek sekans homolojisi göstermektedir. Ürotensin ile %63, CRF ile %45 sekans benzerliği bulunmaktadır. İsmi ilk kısmı (üro), onun ürotensin ile ilişkisini ve isminin son kısmı (kortin), CRF ile ilişkisini yansıtmaktadır (138,139). Sıçan ürokortini ile %95 benzerlik gösteren insan ürokortini, bir genomik kütüphane kullanılarak kromozom 2'ye lokalize olmuş ve klonlanmıştır. Ürokortin, CRF reseptörlerine (CRF-R) etki etmektedir. Sentetik insan ürokortini, değişik CRF reseptör subtiplerine (CRF-R1 ve CRF-R2) bağlanır ve sıçan anterior hipofiz hücrelerinden adrenokortikotropik hormon (ACTH) salınımını artırır. Bu etkisi, CRF-binding protein (CRF-BP) ile önlenir.

Bununla birlikte başka bir çalışmada; ürokortin in vitro ortamda güçlü ACTH salınımı aktivitesine sahip olduğu halde, endojen ürokortinin, in vivo ortamda pitüiter ACTH sekresyonu üzerine etki etmediği bildirilmiştir. CRF-R2, ürokortini CRF'den 40 kat daha yüksek bir affinite ile bağlarken; CRF-R1, CRF ve ürokortini benzer bir affinite ile bağlamaktadır (140,141,142,143,144). İnsan plasentası, CRF ve CRF-BP'in önemli bir kaynağıdır. Bir çok çalışma, CRF'ün, multiple lokal, hormonogenezis veya vasküler tonus regülasyonu etkilerine sahip olduğunu göstermiştir. Gerçekten de CRF, plasental hücre kültürlerinden ACTH veya prostaglandin salınımı artırmaktadır ve perfüze lobüllerde fetoplasental sirkülasyonun vazodilatasyonunu uyarmaktadır (145,146,147,148,149). Bununla birlikte ürokortin, CRF reseptörlerine etki eden vazodilatör bir peptiddir (142,150). Ürokortinin; ACTH ve prostaglandin sekresyonunu stimüle etmesi ile ve plasental damar direncini düzenlemesi ile insan plasentasında major bir rolünün olduğu bildirilmiştir (16,151).

Hem ürokortin hem de CRF, reseptörlere bağlanıp, G-protein aracılı sinyal transdüksiyonu ve cAMP üretimini aktive ederek etki göstermektedirler (143,152). Ayrıca CRF-R1 ve CRF-R2; insan koryon trofoblast kültürlerinde, 15-hidroksi-prostaglandin dehidrogenaz ekspresyonu üzerindeki etkilere aracılık etmektedir. Bu durum, gebelik boyunca koryondan myometriuma kadar, prostaglandin düzeylerinin regülasyonunda önemlidir (153). Ürokortinin bir diğer etki mekanizması ise kalsiyum kanalları üzerindeki rolüdür. Vasküler düz kas hücrelerinde, kalsiyum kanallarını inhibe ederek intrasellüler kalsiyum miktarını azaltabilir (154).

Ürokortinin tür farklılıkları, CRF'ünkilerden daha geniş gibi gözükmektedir. Örneğin, hamster ve sıçan ürokortinleri iki aminoaside göre farklılık gösterirler ancak, CRF sekansları tam bir homoloji göstermektedir (155). Dolayısıyla, dağılımları ve belki de fonksiyonları bile türler arasında farklılık gösterebilir.

Ürokortin, ilk olarak sıçan beyinde tanımlanmıştır ancak, aynı zamanda insan fetusu, plasenta, deri ve prostat gibi çeşitli dokularda da eksprese edilmektedir (14,156,157,158). Ayrıca sıçanlarda ürokortin mRNA, adrenallerde, kalpte, iskelet kasında, karaciğerde, böbrekte, dalakta ve testiste bulunmaktadır (159).

Ürokortin; paraventriküler, supraoptik ve arkuat nükleus dahil hipotalamusta, nöroendokrin aktivite ve stresle ilişkili davranışların güçlü bir modülatörüdür (160).

Ürokortinin, iştahı baskıladığı gösterilmiştir. Gıda alımının güçlü bir şekilde

baskılanması, ürokortin'in meydana getirdiği en göze çarpan biyolojik etkilerden biridir. Koob ve arkadaşları, yaptıkları bir çalışmada; 10 ng gibi düşük dozlarda ürokortinin intraserebroventriküler enjeksiyonunun, serbestçe beslenenlerin yanısıra yiyecekten yoksun sıçanlarda gıda alımını azalttığını tespit ettiler (161). Yine başka bir araştırmada, küçük ürokortin dozlarının (0.003-3nmol/fare) periferik yolla enjekte edilmesinin, doza bağlı olarak, yiyecek alımı üzerinde CRF'den daha yüksek ve uzun süreli inhibitör etkiler meydana getirdiği bildirilmiştir (162).

Yüksek seviyelerdeki ürokortin mRNA, insanların ve kemirgenlerin kalplerinde görülmüştür (138,163,164,165,). Ürokortinin kardiyovasküler sistem üzerinde olumlu etkilere sahip olduğu düşünülmektedir. Periferik uygulanımı vazodilatasyona ve kardiyak kontraktilitede artışa neden olmaktadır. Ayrıca koroner kan akımını ve kalp hızını artırır. Rademaker ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada; ürokortinin, kalp yetmezlikli koyunlar üzerindeki olumlu hemodinamik etkileri gösterilmiştir (166).

Gastrointestinal trakt ve onun bağlantılı makrofajları, periferde önemli bir ürokortin üretim kaynağı oluşturmaktadır. Ürokortin mRNA; sıçan duodenumunda, ince bağırsakta ve kolonda bulunmuştur ve in situ hibridizasyon, hem submukozal hem de myenterik plexus'ta ürokortin içeren hücreler göstermiştir (167). Hem mRNA hem de ürokortin peptid, 3 ay kadar erken yaştaki insan kolonunun lamina propriasındaki makrofajlarda tespit edilmiştir ve bir immün uyarı anlamına gelmektedir (168). Ürokortin mRNA ekspresyonu, ülseratif kolitli hastalarda inflamasyonun şiddeti ile korelasyon göstermektedir (169). Ürokortinin gastrointestinal makrofajlar ve plazma hücrelerindeki lokalizasyonu uyumlu olarak insan lenfositleri, CRF değil ama ürokortin üretirler (170). Aynı zamanda ürokortin ekspresyonu timus ve dalakta da meydana gelmektedir (163,171). Ayrıca ürokortinin; gastrointestinal yolun inflamatuvar hastalıkları (Örn: gastrit, irritabl barsak sendromu), romatoid artrit, major depresyon ve atopik hastalıklarla da (astım, ürtiker ve dermatit gibi) ilişkili olduğu bildirilmiştir (150,172).

Growth faktörlerin anjiogenezi stimüle etmesi ayrıntılı olarak araştırılmış olduğu halde, anjiogenezisin endojen inhibitörleri daha az anlaşılmıştır. Vasküler CRF-R2'nin ürokortin ile aktivasyonu, vasküler endotelial growth faktörün (VEGF) azaltılması aracılığıyla, vaskülarizasyonu etkili bir şekilde baskılayabilir (173). Patolojik hücre proliferasyonu ve neoanjiogenezi, tümörigenezis ve tümör progresyonu için bir ön şart olduğu için, ürokortin/CRF-R sistemi ile insan malignansileri arasında bir bağ olduğu gösterilmiştir (19,158,174). Özellikle proliferasyonun inhibisyonu ve anjiogenezi

kontrolünün, çoğunlukla CRF-R2 aracılığıyla ayarlandığına inanılmaktadır (175, 176).

Ürokortin ile insan tümörleri arasındaki ilişkiyi araştıran çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Tezval ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada; böbrek tümöründe ürokortin/CRF-R2'nin olası ilişkisini ortaya çıkarmak amacıyla normal ve tümöral böbrek örneklerinde, ürokortin ve CRF-R2 ekspresyonu incelenmiştir. Bu çalışmada, örneklerin normal veya tümöral dokulardan olup olmamasına bağlı olarak ürokortinin, farklı subsellüler kompartmanlarda bulunduğunu gözlemlemişlerdir. Berrak hücreli renal cell karsinoma örneklerinde, diffüz bir nükleer immünboyanma bulunmuşken; normal doku örneklerinde, proksimal tübüllerde çoğunlukla ürokortinin sitoplazmik ekspresyonu gözlemlenmiştir (20). Yine başka bir çalışmada; ürokortin immünboyamanın karşılaştırmalı analizi uygulandığı zaman benign prostat hiperplazisi ile prostatik adenokarsinoma dokuları arasında fark olmadığı gözlemlenmiştir. Aynı çalışmada, ürokortin immünboyanma ile tümör grade'i arasında korelasyonun olmadığı da bildirilmiştir (158).

İnsan endometriumu, nöroendokrin peptidlerin bir sentez ve etki yeridir (177). Desidualizasyonda ve insan endometrial hücre proliferasyonunda önemli roller oynayan bir peptid olduğu için özellikle endometrial CRF ekspresyonu ve fonksiyonları kapsamlı olarak değerlendirilmiştir (178,179,180). CRF mRNA ve peptid, insan endometrium epitelial hücrelerinde saptanabilir ve CRF mRNA, insan endometrial stromal hücreler tarafından menstrüel siklusun başından sonuna kadar eksprese edilmektedir. İnsan endometriumunun ayrıca, hem CRF-R1 hem de CRF-R2 eksprese ettiği de bildirilmiştir. (181, 182, 183). Florio ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada; ürokortin mRNA, insanda hem stromal hem de epitelial endometrial hücrelerde bulunmuştur. Bununla birlikte ürokortin myometriumdaki da tanımlanmıştır (18). Bir başka çalışmada; ürokortin ekspresyonunun, insan endometrial karsinomunda down-regüle olduğu bildirilmiştir (19).

Ürokortin; sinsityotrofoblastta, desiduada, overde ve fetal membranlarda da üretilmektedir. Overyan ürokortin/CRF sisteminin; steroidogenezisin bir otokrin ve parakrin düzenleyicisi olarak etki gösterebileceği ileri sürülmüştür. Çeşitli çalışmalar, amnion ve korionda, ürokortin mRNA ekspresyonunun bulunduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, Florio ve arkadaşları ise, doğum süresince bir ürokortin kaynağı olarak fetusun önemli rolü üzerinde durmuştur (14,15,16,17).

Ürokortinin overyan steroidogenezisteki olası rolü açıklanmaya çalışılmaktadır. Yapılan bir çalışmada ürokortin ve reseptörlerinin insan overlerinde tanımlandıkları

saptanmıştır. Ürokortin; immünohistokimyasal metodlar kullanılarak, atretik folliküllerde olduğu gibi dominant ve nondominant folliküllerin hem granüloza hem de teka interna hücrelerinde saptanmıştır. Ürokortin ayrıca, orta ve geç luteal faz korpus luteumdaki lüteinize granüloza ve tekal hücrelerde saptanmıştır. Bunlarla birlikte gebe korpus luteumunda da ürokortinin saptandığı bildirilmiştir. Regrese olmuş korpus luteumdaki ürokortin mRNA düzeylerinin, midluteal faz ve gebe korpus luteumundakinden anlamlı derecede daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar, ürokortinin insan korpus luteumunda lokal olarak üretildiğini ve ürokortin ekspresyon düzeylerinin regrese korpus luteumda göreceli olarak yüksek olduğunu akla getirmektedir. Bunlarla birlikte ayrıca, regrese korpus luteumdaki CRF, CRF-R1 ve CRF-R2 α için olan mRNA'ların düzeylerinin de, midluteal faz ve gebe korpus luteumundakinden anlamlı derecede yüksek olduğu gösterilmiştir. Bütün bu sonuçlar; ürokortin ve CRF'nin, overyan korpus luteumda, büyük olasılıkla da overyan steroidogenezisi inhibe ederek, bir otokrin ve/veya parakrin düzenleyici olarak etki edebileceğini düşündürmektedir (17).

Ürokortinin, doğumun başlaması ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Önceden yapılmış olan bazı çalışmalar, ürokortinin, CRF-R2 aracılığıyla ve bir otokrin/parakrin yolla myometrial kontraktiletiyi arttırabileceğini bildirmiştir. Myometrial hücreleri direkt olarak veya prostaglandin, östradiol veya ACTH sekresyonu aracılığıyla indirekt olarak etkileyebilirler (14,151,184,185,186,187,188,189). Ayrıca ürokortinin, matriks disorganizasyonu ve membranların rüptürü ile sonuçlanan matriks metalloproteinaz-9 (MMP-9) seviyelerini yükselttiği bildirilmiştir (185). Bir başka çalışmada, term veya preterm vaginal doğumda, maternal ve fetal plazma ürokortin düzeylerinin, elektif sezaryen sonrası değerler ile karşılaştırıldığında yükseldiği gösterilmiştir. Bununla birlikte; ürokortin sabit kalırken, maternal plazma CRF düzeylerinin gebeliğin başından sonuna kadar arttığı bilinmektedir. Bundan dolayı çoğu araştırmacı ürokortinin, insan doğumunda ve doğumun başlangıcında önemli bir rol oynayabileceğini ileri sürmüşlerdir (190,191,192,193).

Bazı çalışmalar, erken doğum tehdidi olan kadınlarda preterm doğumu önceden belirlemek amacıyla 28 ve 34 gebelik haftaları arasında maternal plazma ürokortin'i kullanmışlardır. Bu çalışmalarda; plazma ürokortininin, preterm doğum yapan kadınlarda, term doğum yapanlara göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu bulunmuştur (21). C.Iavazzo ve arkadaşları (2009), erken ikinci trimester amniotik sıvıdaki ürokortin konsantrasyonunun, preterm doğumu önceden bildirmeye yardımcı olup olamayacağını

değerlendirmek amacıyla bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada da; preterm doğum yapan kadınlarda amniotik sıvı ürokortin düzeylerinin, term doğum yapanlardan anlamlı derecede yüksek olmadığı bulunmuştur. Bu bulgular, amniotik sıvı ürokortin konsantrasyonunun, erken doğumu önceden belirleyici olmadığını göstermektedir (194).

Madhappan ve arkadaşları, gebelik implantasyonunda ürokortinin karakteristik bir rolünün olduğunu ve ürokortinin spontan abortuslarla ilişkili olabileceğini ileri sürmüşlerdir (195).

Sonuç olarak; kadın genital organlarının en yaygın patolojilerinden biri olan leiomyom, uterusun en sık görülen tümörüdür ve uterin leiomyomlar histerektomi endikasyonları arasında en sık olanıdır (23). Amerika Birleşik Devletleri'nde Tüm histerektomilerin %30'unun nedeni leiomyoma uteri olarak bildirilmektedir (2). Bu kadar sık görülmesine ve histerektomi endikasyonları arasında birinci sırada olmasına rağmen myoma uterinin kesin nedeni tam olarak bilinmemektedir. Leiomyomun etiyolojisini açıklamak amacıyla; genetik faktörler, lokal büyüme faktörleri ve seks steroidleri gibi çeşitli faktörler üzerinde durulmuştur. Yapılan çalışmalar neticesinde leiomyomun etiyolojisinin daha net bir şekilde ortaya konmasıyla birlikte kadın genital sistemi için çok önemli olan bu hastalığın tedavisi konusunda ve belki de bu patolojinin ortaya çıkmasının önlenmesi konusunda son derece önemli adımlar atılmış olacaktır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırma kapsamına alınmış olan hastaların tamamı, Celal Bayar Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum bölümüne başvuran ve kriterlere uygun olan hastalar arasından seçilmiştir. Seçilmiş olan hastalar 27.05.2009-25.01.2010 tarihleri arasında opere olmuştur. Araştırma yerel etik kurul tarafından onaylanmıştır.

Araştırmaya çalışma grubu olarak leiomyoma uteri tanısı almış ve bu nedenle histerektomi veya histerektomi + salpingooferektomi önerilmiş ve bu operasyonu kabul etmiş olan 20 hasta ile kontrol grubu olarak da leiomyomu olmayan, uterin prolapsus nedeniyle histerektomi veya histerektomi + salpingooferektomi önerilmiş ve bu operasyonu kabul etmiş olan 15 hasta alınmıştır. Leiomyomlar için histerektomi endikasyonları olarak anormal kanama, pelvik ağrı, pelvik bası ve anormal uterus büyümesi kabul edilirken, kontrol grubu olarak seçilmiş olan uterin prolapsus endikasyonlu hastaların leiomyomsuz olması şartı aranmıştır. Hastalarda ek olarak bulunabilecek tanı konulmuş olan hipertansiyon, diabetes mellitus, endometrium kanseri, over kanseri, endometrial hiperplazi gibi hastalıklar araştırmadan dışlanma kriterleri olarak kabul edilmiştir. Ayrıca çalışma kapsamına alınacak olan hastaların son 6 ay içerisinde herhangi bir hormonal tedavi almamış olmalarına dikkat edilmiştir. Hastalardan rutin operasyon öncesi onam formları dışında bu çalışmaya ait, operasyonda çıkarılan uterusun ve overlerin histolojik inceleme amacıyla 1 cm.lik örneklerinin alınması için de aydınlatılmış onam alınmıştır. Çalışmaya kabul edilmiş olan hastaların örnekleri, operasyondan hemen sonra operasyon salonunda alınmış ve %10'luk formalin solüsyonuna konulmuştur. Leiomyom endikasyonu ile opere olmuş olan hastaların histerektomi materyallerinde leiomyom dokusundan ve myom dışı normal myometrium dokusundan örnek alınırken prolapsus nedeni ile opere olan hastaların normal myometrium dokusundan örnek alınmıştır. Ayrıca salpingooferektomi de yapılmış olan hastalardan bunlara ek olarak

over dokusundan da örnek alınmıştır. Operasyon sonrası alınmış olan örnekler formalin solüsyonuna konulmuş ve Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalına ulaştırılmıştır.

Işık Mikroskopik İnceleme: Alınan biyopsi örnekleri % 10' luk formalin solüsyonu içerisinde 24- 48 saat süre ile tespit edildikten sonra rutin parafin takip işlemine tabi tutuldu ve dokular bloklanarak rotary mikrotom (RM 2135, Leica) ile 5 µm' lik kesitler alındı. Dokunun morfolojisini incelemek amacıyla hematoksilin-eozin (H-E) boyamaları yapıldı. İmmunohistokimyasal analiz için aşağıdaki antikolar (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) çalışıldı ve dağılımları indirekt immunohistokimya yöntemi ile incelendi.

Parafin Doku Takibi: Tespit edilen örnekler, tespit solüsyonunun uzaklaştırılması amacıyla bir gece akar su altında yıkandıktan sonra, dehidratasyon amacıyla 30' ar dakika % 60'dan % 80'e artan etil alkol serilerinden geçirildi. % 95 alkol içerisinde birer saat iki değişim sağlanarak tutulan örnekler 30 dakika 1:1 oranında ksilen-alkol karışımına ve şeffaflaştırma amacıyla birer saat iki değişim ksilene tabi tutuldu. 1:1 ksilen: parafin içerisinde 30 dakika 60°C'lik etüvde tutulan örnekler birer saat 2 değişim parafin ile immersiyonu sağlandıktan sonra blok kaplarına alınarak parafin içerisinde gömüldü (Tablo 3.1). Alınan 5 µm'lik kesitlere histokimyasal inceleme için hematoksilin-eozin boyaması, immunohistokimyasal inceleme için indirek immunoperaksidaz ve anti-Brd-U boyaması yapıldı.

Hematoksilen-Eozin Boyaması: Rotary mikrotom (RM 2135, Leica) aracılığı ile alınan 5 µm' lik parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60° C'lik etüvde bırakıldıktan sonra, 30'ar dakika iki değişim ksilene tabi tutuldu. Ardından rehidratasyon işlemi için % 95'den % 60'a azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler 5 dakika akar su altında yıkandı. Hematoksilin (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile 30 dk. boyandıktan sonra, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 5 dakika akar suda yıkandı. Diferansiyasyon için asit alkole batırılıp çıkarılan kesitler 5 dakika akar su altında yıkandı. Daha sonra kesitler 2 dakika eozin (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) boyası ile boyandı. Aynı şekilde 5 dakika akar su altında yıkama yapıldıktan sonra sırasıyla % 80 ve % 95'lik alkol serilerinden geçirilip havada kurutulan kesitler şeffaflaştırma amacıyla 30 dakika iki değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (Tablo

3.2).

BrdU boyaması: Örneklerden alınan parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C etüvde bırakıldıktan sonra, 30 dakika iki değişim ksilene tabi tutuldu. Ardından rehidratasyon işlemi için % 95 ile % 60 aralığında azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler distile suda 10 dakika bekletildi. Dakopen (IM3580, Immunotech, Marseille, France) ile sınırlandırılan % 0,5 tripsin (EK001-10K, Biogenex, San Ramon, USA) solüsyonu içinde oda sıcaklığında 10 dakika tutulan kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dakika % 3 H₂O₂ uygulandı. 3 defa 5 dakika PBS ile yıkanan kesitlere DNA denatürasyonu için 2.5 N HCL 37° C de 15 dakika uygulandı. Tekrar 3 defa 5 dakika PBS ile yıkanan kesitler 37° C 30 dakika bloklama solüsyonu (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) ile muamele edildi. Bloklama solüsyonu dokudan uzaklaştırıldıktan sonra monoklonal anti-Brd-U antikoru (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) 1/100 dilüsyonda 37° C 2 saat uygulandı. PBS ile 3 defa yıkanan kesitler, anti-mouse biotin-streptavidin hidrojen peroksidaz ikincil antikoru (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) ile 30 dakika boyandı. Yine 3 defa 5 dakika PBS ile yıkanan kesitler, oluşturulan immunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla diaminobenzidine (DAB, K007, DBS, California, USA) ile 2 dakika boyandı. Mayer's hematoksilen (02274390059, J.T.Barker, Deventer, Holland) ile artalan boyaması sağlandıktan sonra distile su ile 15 dk. yıkanan kesitler % 80 ve % 95 alkol serilerinden geçirilip havada kurutulduktan sonra şeffaflaştırma amacıyla 30 dakika iki değişim ksilende tutuldu ve entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (Tablo 3.3).

İndirekt İmmünoperoxidaz Yöntemi: Alınan örnekler immunohistokimyasal boyama için bir gece 60 C etüvde tutulduktan sonra, 30 dakika iki değişim ksilen ile şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Ardından % 95 ile % 60 aralığında azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile suda 10 dakika bekletildi. Dakopen (IM3580, Immunotech, Marseille, France) ile sınırlandırılan % 0,5 tripsin (EK001-10K, Biogenex, San Ramon, USA) solüsyonu içinde oda sıcaklığında 15 dakika tutulan kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dakika % 3 H₂O₂ uygulandı. 3 defa 5 dakika PBS ile yıkanan kesitler 10 dakika bloklama solüsyonu (85-6543, Histostain plus kit, Zymed, San Francisco, USA) ile muamele edildi. Bloklama solüsyonu dokudan uzaklaştırıldıktan sonra primer antikorlar (Liste 1) ile bir gece inkübe

edildi. Ertesi gün PBS ile 3 defa yıkanan kesitler, anti-mouse biotin-streptavidin hidrojen peroksidaz ikincil antikoru (85-6543, Histostain plus kit, Zymed, San Francisco, USA) ile 30 dakika boyandı. Yine üç defa 5 dakika PBS ile yıkanan kesitler, oluşturulan immunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC, 85-6543, Histostain plus kit, Zymed, San Francisco, USA) ile 5 dk. boyandı. Mayer's hematoksilen (02274390059, J.T.Barker, Deventer, Holland) ile artalan boyaması sağlandıktan sonra distile su ile 10 dakika yıkanan kesitler kapatma medyumunu (K002, DBS, California, USA) ile kapatıldı (Tablo 3.4)

Morfometrik ve İstatiksel analiz: İndirekt immunohistokimya işleminden sonra örnekler kör uygulama ile örnekleri bilmeyen iki histolog tarafından farklı zamanlarda değerlendirilerek, immunoreaktiviteler negatif (1), zayıf (2), orta (3) ve şiddetli (+++) pozitif olarak değerlendirildi. Sonuçların istatistiksel değerlendirilmesinde Graphpad 3.0 (Sanfrancisco, USA) yazılımı kullanıldı ve tek yönlü ANOVA ile değerlendirildi. Sonuçlar için $p<0.05$ az anlamlı, $p<0.01$ anlamlı ve $p<0.001$ çok anlamlı olarak kabul edildi.

4.BULGULAR

Araştırmamızda Celal Bayar Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum bölümünde leiomyoma uteri nedeniyle opere olan 20 hasta ve uterin prolapsus nedeniyle opere olan 15 hasta yer almaktadır.

Biyopsi örneklerinin HE boyamalarında normal (PL+OVER) ile karşılaştırıldığında myomlu (LM+OVER) over dokusunda benzer histolojik görünüm saptandı. Kontrol olan leiomyomlu myometriumun normal kısmından alınan LM-MM ve prolapsuslu normal myometrium PL+MM örneklerinde benzer şekilde düz kas hücrelerinden oluşan myometriyum histolojisi görüldü. (Resim 1). Leiomyomlu örneklerde histopatolojik görüntü iğ şekilli düz kas hücreleri demetler halinde birbirleri ile dik açı olacak şekilde dizilmiş olarak bulundu. Bu kas demetleri büyük kitleler halinde girdap oluşturacak şekilde ve uzun mesafeler boyunca uzandı. İğ şeklindeki ve uzun olan bu hücrelerin sitoplazması HE boyamasında küçük pembe lifli olarak görüldü (Resim 1). Hücre yoğunluğu için yapılan morfometrik analizde sadece LM+MM grubunda oldukça anlamlı ($p<0,001$) bir artış saptandı.

Biyopsi örneklerinde normal (PL+OVER) ile karşılaştırıldığında myomlu (LM+OVER) over dokusunda PCNA immunohistokimyası açısından benzer histolojik görünüm saptanarak çoğalan hücre sayısı anlamsızdı ($p>0,05$). Kontrol örnekleri LM-MM ve PL+MM ile farklılık saptanmazken sadece LM+MM grubunda anlamlı ($p<0,05$) bir artış saptandı (Resim 2). Hücre çoğalması markırı olan PCNA için yapılan morfometrik analizde sadece LM+MM grubunda oldukça anlamlı ($p<0,001$) bir artış saptandı (Tablo 1).

Biyopsi örneklerinde normal (PL+OVER) ile karşılaştırıldığında myomlu (LM+OVER) over dokusunda Ki-67 immunohistokimyası açısından benzer histolojik görünüm saptanarak anlamlı olarak çoğalan hücre bulunmadı. Kontrol LM-MM ve PL+MM örneklerinde farklılık saptanmazken sadece LM+MM grubunda anlamlı ($p<0,05$) bir artış saptandı (Resim 3). Hücre çoğalması için PCNA ile karşılaştırıldığında daha özgün

bir markır olan Ki-67 için yapılan morfometrik analizde sadece LM+MM grubunda anlamlı ($p<0,05$) bir artış saptandı (Tablo 2).

Biyopsi örneklerinde normal (PL+OVER) ile karşılaştırıldığında myomlu (LM+OVER) over dokusunda PCNA ve Ki67 ile karşılaştırıldığında çok daha özgün olan BrDU markırı için immunohistokimyasal incelemede benzer histolojik görünüm saptanarak anlamlı olarak çoğalan hücre bulunmadı. Kontrol LM-MM ve PL+MM örneklerinde farklılık saptanmazken LM+MM grubunda da anlamlı bir artış saptanmadı (Resim 4). Hücre çoğalması markırı için PCNA ve Ki67 karşılaştırıldığında daha özgün bir markır olan ayrıca kısa süre öncesinde çoğalan hücreleri gösteren BrDU boyaması için yapılan morfometrik analizde gruplar arasında fark saptanmadı. LM+MM grubunda da anlamlı bir artış saptanmadı (Tablo 3).

Biyopsi örneklerinin hücre intiharı açısından apoptotik analizi için yapılan TUNEL boyamasında normal (PL+OVER) ile karşılaştırıldığında myomlu (LM+OVER) over dokusunda TUNEL immunohistokimyası açısından benzer histolojik görünüm saptandı ve anlamlı olarak intihar eden hücre bulunmadı. Kontrol LM-MM ve PL+MM örneklerinde farklılık saptanmazken sadece LM+MM grubunda boyanma daha yoğun olarak saptandı (Resim 5). Hücre intihar veya programlı ölüm markırı olan TUNEL boyamasında yapılan morfometrik analizde sadece LM+MM grubunda oldukça anlamlı ($p<0,05$) bir artış saptandı (Tablo 4).

Biyopsi örneklerinin UK açısından yapılan immunohistokimya boyamasında normal (PL+OVER) ile karşılaştırıldığında myomlu (LM+OVER) over dokusunda benzer miktarda boyama görüldü. Boyanmanın heterojen olduğu, damar duvarlarında belirgin bulunduğu ve stromayı da tuttuğu saptandı. Kontrol örneklerinde LM-MM ve PL+MM bazal bir boyanmanın olduğu, overe benzer şekilde damar duvarlarında lokalize olduğu anlaşıldı. LM+MM grubunda boyanmanın daha belirginleştiği ve daha yoğun olduğu saptandı (Resim 6). Yapılan morfometrik analizde de özellikle LM+MM grubunda anlamlı ($p<0,05$) bir fark bulundu (Tablo 5).

5.TARTIŞMA

Bu çalışmada leiomyom dokusunda çoğalmanın var olduğu ancak aktif olmadığı, bu aktif olmayan çoğalma ile birlikte UK boyanmasının varlığı, bunun hem kontrol overlerinde hem kontrol myometriyumlarında bazal düzeyde var olduğu görüldü. UK reseptörlerinin UK boyamasına benzer şekilde tüm örneklerde saptandığı ayrıca leiomyomlarda boyanmanın daha da arttığı saptandı.

Düz kas tümörleri uterusun en sık görülen tümörleridir. Leiomyomlar, reproduktif yaş grubundaki kadınların %20-30' unda görülür ve bütün premenapozal kadınların %20-77 kadarında oluşurken (2), leiomyosarkomlar uterin düz kas tümörlerinin küçük bir yüzdesini oluşturmaktadır. Çoğu leiomyom ve leiomyosarkom olgusuna histopatolojik kriterlerle kolaylıkla tanı konulabilmektedir. Uterin düz kas tümörlerinde malignensi özellikleri şiddetli nükleer atipi, yüksek mitotik aktivite, koagülatif tümör nekrozu varlığı ve infiltratif tümör sınıridir. Az sayıda uterin düz kas proliferasyonu ise çeşitli nedenlerle tanısız güçlüğüne yol açabilmektedir. Leiomyomun az görülen varyantları olan atipik leiomyom (Symplastic leiomyoma), mitotik aktif leiomyom ve sellüler leiomyomların sahip oldukları nükleer atipi, yüksek mitotik indeks ve yüksek sellülarite gibi bazı özellikler nedeniyle leiomyosarkomlardan ayrımında, en azından bazı olgularda, büyük güçlükler yaşanabilmektedir. Ayrıca bazı düz kas tümörleri, histopatolojik kriterlerin kombine edilmesine rağmen, benign veya malign olarak kategorize edilememekte olup, bu olgular malignite potansiyeli belirsiz düz kas tümörleri (STUMP) olarak adlandırılmaktadır. Sonuçta uterin düz kas tümörlerinin benign veya malign olarak güvenilir bir şekilde kategorize edilebilmesi, prognostik ve terapötik açıdan büyük öneme sahiptir (1,113,126).

Makroskopik özellikler açısından histolojik olarak farklı subtipteki leiomyomların hepsinin makroskopik görünümü benzerdir. Leiomyomlar makroskopik olarak, yuvarlak, keskin kenarlı, sert, gri-beyaz kitleler olup, kesit yüzeyleri karakteristik olarak girdap benzeri çizgilenmeler gösterir. Yine çevredeki normal dokudan psödokapsülleri

vasıtasıyla kolay bir şekilde ayrılabilirler. Leiomyomlar tek olabilirler, fakat çoğu kez uterus içinde multiple yerleşimli tümör seklindedirler (4). Büyüklükleri mikroskopik boyutlardan kilogramlarca büyük boyutlara kadar değişebilmektedir (119). Bazı leiomyomlar çeşitli tipteki dejenerasyonlar nedeniyle bu makroskopik görünümünden sapma gösterebilirler. Çoğu dejenerasyon formları kan, hyalin, kollajen, kalsiyum, mukopolisakkarid ya da bunların kombinasyonlarının kas liflerinin yerini alması ile olur. Bu dejenerasyonlar sonucu leiomyomların kesit yüzeylerinde sarı renk değişikliği, mukoid görünüm, kistik değişiklik ve kanama ortaya çıkabilir (1,4,122). Leiomyomlar myometriumun herhangi bir yerine lokalize olabilirler. Yerleşim yerlerine göre intramural, submüköz ve subseröz olabilirler. Subserozal lezyonlar nadiren çevre organlara yapışıp kan akımını o bölgelerden sağlayabilirler ve böylece uterustan bağımsız parazitik leiomyomları oluşturlar (120,121). Submukozal leiomyomlar sıklıkla ülser ve hemorajik olurlar. Gebelikte leiomyomlar belirgin olarak büyüyebilirler. Leiomyomlarda görülebilen kırmızı dejenerasyon genellikle gebelikte görülmektedir. Gebelerin %0,1-3,9 kadarında leiomyom görülebilir ve hastaların %10 kadarında kırmızı dejenerasyon görülür (123). Leiomyomlarda kalsifikasyon da görülebilir. İleri düzeyde bir kalsifik dejenerasyon mevcut ise leiomyom, sert, solid, kalsifiye bir hal alabilir ve bu durumda “rahim taşı” olarak isimlendirilirler. Kalsifik dejenerasyon gösteren leiomyomlar, radyografik olarak kolayca tanınabilirler (1).

Mikroskopik özellikler açısından leiomyomlar iğsi, üniform görünümdeki düz kas hücre demetlerinden oluşur. İğsi hücreler belirsiz sınırları olan, yoğun fibriller eozinofilik sitoplazmalı hücrelerdir. Nükleusları elonge olup, uçları künt olarak sonlanır. Hücreler ince kromatin ağına ve küçük nükleoluslara sahiptir. Çoğu leiomyomlar etraf myometriumdan daha sellülerdir. Mitotik figürler genellikle seyrek (113). Dejeneratif değişiklikler leiomyomlarda sık olarak görülür. Leiomyomlardaki en sık sekonder değişiklik, hyalin dejenerasyondur. Vakaların %60’ından fazlasında görülebilmektedir. Leiomyomların %4 kadarında ise kistik dejenerasyon görülmektedir. Kanama, ödem, mikroid dejenerasyon, hipersellüler odaklar ve sellüler hipertrofi gebelikte ya da progestinlerin alınımında görülebilir. Progestasyonel ajanlar mitotik aktivitede hafif artışa neden olabilir, fakat bu sayı hiçbir zaman leiomyosarkom seviyelerine ulaşmaz. Submüköz leiomyomlar, özellikle de endometrial kaviteye uzandıklarında, sıklıkla akut inflamatuvar hücrelerle birlikte yaygın nekroza neden olabilirler. Ayrıca, nekroza komşu alanlarda mitotik aktivitede artış görülebilir (1,4,122). Leiomyomlar mikroskopik olarak

sınırlı lezyonlardır, ancak bazı olgularda çevre myometriuma uzanımlar olabilir. İmmünohistokimyasal özellikler açısından leiomyomlarda tümör hücreleri kas-spesifik aktin, alfa-düz kas aktini, desmin, vimentin ve kaldesmon ile boyanma gösterirler. Bu çalışmada örneklerin over dokusu incelemelerinde, hem leiomyomlu hem de prolapsuslu hastalarda mikroskobik düzeyde benzerlik bulundu ve patolojik hücreler saptanmadı. Leiomyomlu olgularda normal myometriyum dokusundan alınan örneklerle prolapsuslu olgulardan alınan örnekler benzer histolojik görünüme sahipti. Leiomyomlu olgularda histopatolojik bulgular önceki literatür çalışmaları ile uyumlu bulundu.

Düz kas kökenli olduğu düşünülen uterin mezenkimal tümörlerde, tümörün benign mi malign mi olduğunun değerlendirilmesinden önce, tümör hücrelerinin gerçekten düz kas diferansiyasyonu gösterip göstermediği anlaşılmaya çalışılmalıdır. Çoğu düz kas tümöründe, tümör hücreleri normal myometrial hücrelere benzediği için, genellikle düz kas diferansiyasyonunun olduğunun anlaşılmasında önemli bir sorunla karşılaşılır. Ancak, bazen düz kas hücreleri epitelyal hücrelere benzeyebilmekte ve epitelioid düz kas tümörlerini oluşturmaktadırlar. Tümörün düz kas kökenli olduğu konusunda önemli bir ipucu, epitelioid düz kas hücrelerinin aşık düz kas diferansiyasyonu gösteren hücrelerle birlikte olmasıdır. Epitelyal membran antijen (EMA), keratin, aktin ve desmin gibi immunohistokimyasal belirleyiciler de bu konuda yardımcı olabilirler. Fakat bunlar dikkatle kullanılmalıdırlar çünkü düz kas hücreleri, keratin pozitif olabilirler ve EMA'ye karşı antikolar ile tanımlanan bir antijen eksprese edebilirler. Bununla birlikte epitelyal hücreler desmin pozitif değildirler. Ayrıca düz kas hücreleri, karakteristik eozinofilik, bazen fibriller olan sitoplazmalarının çoğunu kaybederek ve yuvarlak nüveli hale gelerek endometrial stromal hücrelere benzerlik gösterebilirler. Hem düz kas hücreleri hem de stromal hücrelerin düz kas aktini ve desmin eksprese ettikleri bildirilmektedir. Bununla birlikte stromal hücrelerde desmin ekspresyonu sıklıkla fokal olarak izlenmekte iken düz kas hücrelerinde diffüz ve kuvvetlidir. Bu nedenle, desmin-pozitif hücrelerden oluşan tümörlerin düz kas tümörü olarak değerlendirilmesi yönünde artmış bir eğilim olduğu görülmektedir. Tümörde düz kas diferansiyasyonu olduğu belirlendikten sonra, tümörün göstereceği klinik davranışı belirlemek amacıyla makroskopik ve mikroskopik özelliklerin değerlendirilmesi önemlidir. Uterin düz kas tümörlerinin tanısı ve prognozunu belirleyebilmek amacıyla çeşitli parametreler kullanılmıştır (196,197). Düz kas tümörlerinin benign-malign ayrımında, Taylor ve Norris tarafından önerilen tek değişkenli bir sınıflamada; 10 büyük büyütme alanında (BBA) 10 veya daha fazla mitoz içeren tümörlerin agresif davrandığı ve leiomyosarkom olarak tanımlanması gerektiği, buna

karşın düşük mitotik indekse sahip olan tümörlerin ise benign olduğu düşünülmüştür (198). Bundan başka bir çok araştırmacı leiomyosarkom tanısında sitolojik atipinin önemli olduğunu savunmuşlardır. Bir çalışmada, çeşitli morfolojik özellikler arasında koagülatif tümör hücre nekrozunun en önemli faktör olduğu bildirilmiştir (199). Daha sonraları bu konuda yapılan çeşitli çalışmalar neticesinde; uterin düz kas tümörlerinin tanısında mitotik indeks, sitolojik atipi ve derecesi, nekroz varlığı ve tipi gibi çeşitli mikroskopik özelliklerin birlikte değerlendirilmesinin en güvenilir ve uygun yaklaşım olacağı düşünülmüştür (1). Bu anlamda bizim çalışmamızda mitotik aktivitenin yüksek olmadığı yapılan markır boyamaları ile ortaya kondu. PCNA boyamalarında artmış yoğunluk saptanırken, daha azalan şekli ile Ki67 boyaması ve oldukça az BrDU boyaması saptandı. Önceki çalışmalarla uyumlu olarak artmış mitotik indeksin leiomyosarkom olgularına özgün olması gerektiğini düşündürdü. Bu boyamalar ile örneklerin mitotik aktivitesi yüksek olmayan leiomyomlar olduğu düşüncesine varıldı.

Düz kas hücreleri normal myometrial hücrelere benzerler. Leiomyomların mikroskopik görünümünde; iğ şekilli düz kas hücreleri, demetler halinde birbirleri ile dik açı oluşturacak şekilde dizilmişlerdir. Bu kas demetleri, girdap oluşturacak şekilde uzanmaktadırlar. Sıklıkla uzunlamasına, künt uçlu nükleus içerirler ve nükleus, hücrenin merkezinde lokalizedir. İğ şeklindeki bu hücreler, eozinofilik sitoplazmaya sahiptirler. Olağan uterin düz kas hücreleri de elonge, eozinofilik, bazen fibriler sitoplazmalı ve belirgin hücre membranına sahip hücrelerdir ve fasiküler düzenlenim gösterme eğilimindedirler (113). Yüksek mitotik indeks ve ileri derecede atipik ve anaplastik sitolojik özelliklerin kötü prognozla birlikteliği çok sıklıkla bildirilmiştir (1). Sitolojik atipinin, belli özelliklere dikkat edilerek tekrarlanabilir bir şekilde tanımlanması önemlidir. Bell ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada 213 problemli düz kas tümöründe birçok farklı histopatolojik özellik değerlendirilmiştir. Bu çalışmada sitolojik atipi; “önemsiz atipi (atipi yok veya minimal)” ve “önemli atipi (orta ve siddetli derecede atipi)” olmak üzere 2 grupta incelenmiş ve bu gruptamanın araştırmacılar arasındaki uyumu artırdığı ve tekrarlanabilirliği sağladığı belirtilmiştir. Yine aynı çalışmada atipi derecesi belirlenirken nükleer pleomorfizm, nükleer boyut, nükleer membran düzensizlikleri, kromatin dansitesi ve dağılımı, nükleoler boyut, belirginlik ve konfigürasyonu dikkate alınmıştır (200). Mitotik indeks 10 BBA’ndaki toplam mitoz sayısını göstermektedir. Mitotik indeks belirlenirken sadece gerçek mitotik fügürler sayılmalıdır. Bizim çalışmamızda alınan örneklerin leiomyom dışında başka tanıyı düşündürecek bulgulara sahip olmadığı çoğalma markırları ile doğrulanarak mitotik indeksin düşük olduğuna karar verildi.

Nekrozun varlığı veya yokluğu ve tipi, uterin düz kas tümörlü hastaların klinik sonuçlarını öngörmek açısından güçlü bir belirleyicidir. Koagülatif tümör hücre nekrozunda nekrotik ve korunmuş hücreler arasında ani bir geçiş bulunmaktadır. Bu tip nekrozda sıklıkla nekrotik hücrelerin nükleusları hematoksisifilik boyanma özelliklerini korumaktadır. Koagülatif tümör hücre nekrozu sıklıkla klinik olarak malign düz kas tümörlerinde bulunur ve asla gözardı edilmemelidir. Buna karşılık hyalinize nekrozda ise nekrotik ve korunmuş hücreler arasına hyalinize kollajenden oluşmuş bir zon girmektedir. Granülasyon dokusu ile organize olmuş bir infarkt alanına benzer bir paterndir. Eğer hyalinizasyon alanında ölü nükleus seçilebilirse, bunların üniform oldukları ve sıklıkla kromatinin soluk olduğu görülür. Hyalinize nekroz, leiomyomalarda sıktır ve bir düz kas tümörünün malign potansiyelini öngörmek açısından yardımcı değildir. Submüköz leiomyomlardaki ülserasyona sekonder olarak gelişen nekroz ise akut inflamatuvar hücreler ve periferik reparatif bir süreç içermektedir (197,200). Bizim çalışmamızda, leiomyomun karakteristiklerini göstermek açısından önemli olan nekroz bulgusuna aldığımız örneklerde rastlanılmadı.

Bu çalışmada alınan tüm örneklerde UK ve UKR boyamalarında immunopozitif boyama saptandı ve over ile myometriumda bazal bir tanımlamanın varlığı gösterildi. Yapılan bir çalışmada postmenopozal endometriyumda UK mRNA tanımlanması gösterilmiş ve endometrial luminal ve glandular epitelial hücrelerde ayrıca endotelial hücrelerde lokalize olduğu saptanmıştır. Orta derecede bir immunoreaktivite varlığının proliferatif ve sekretuar fazlarda stromal hücrelerde de bulunduğu bildirilmiştir (18). Ayrıca over steroid hormonlarının bu UK tanımlamalarına etki edebileceği düşünülmüştür (14,16,18). UK tanımlamasının endometrial kanserlerde azalmış olduğunu gösteren bir başka önceki çalışma da (19) UK'in kanserdeki etkisini sorgulamaya açmış ve fizyolojik rolünün araştırılmasını düşündürmüştür. UKR çalışmaları (143,152,180) bu fizyolojik rolün cAMP üzerinden gerçekleştirildiğini göstermiştir. UK ile endometrial tümör hücrelerinin çoğalmaları arasında bir ilişki olduğu düşüncesi ortaya konmasına (201) rağmen melanoma hücrelerinde tam tersi bir etki bulunmuştur (202). Bu anlamda bizim çalışmada da sonuçlar artmış çoğalma markırları ile artmış UK ve UKR ilişkisini düşündürmektedir. Bu ilişkinin gösterilmesi için çift boyamalı immunohistokimya yapılarak aynı hücrenin hem çoğaldığı hem de UK ve UKR tanımladığı saptanmalıdır. UK ve UKR önceki çalışmalarda söz edildiği üzere

(203,204) özellikle damar duvarlarında daha fazla ve yoğun boyandı. Bu çalışmada ortaya konan UKR damar duvarındaki tanımlamasının anjiogenez ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür (173,175,176). UK için UKR-1 ve UKR-2 tanımlamaları yapılmış ve UK'in bu reseptörlerine farklı duyarlılıklarının olduğu saptanmıştır (16,142,143). Bizim çalışmamızda gösterilen UK ve UKR immunohistokimyasal tanımlamaları ve diğer çalışmalarda insan ovaryumunda erken dejenere olan korpus luteumunda, luteinize granuloza ve teka hücrelerinde gösterilmiş olması bazal bir tanımlamanın insan over ve myometriumunda varlığını desteklemektedir. Ancak insan overi oositinde UK gösterilememiştir. Buna karşılık hamilelikle artan bir UK ve UKR tanımlaması da bildirilmiştir. UK ve UKR varlığının over steroid salgısını baskıladığı da bilinmektedir (17,194,205,206). Önceki çalışmalarda maternal ve fetal membranlarda UK tanımlamaları gösterilmiş, plasenta ve ilgili dokularda varlığı anlaşılmıştır. Ayrıca UK tanımlamasının endometrial epiteliyal ve stromal hücrelerde, myometriumda ve damar düz kaslarında varlığı PCR ile saptanmıştır (14,15,18).

Bu çalışmanın sonuçları UK ve UKR varlığının over ve myometriumda bazal seviyede olduğunu göstermektedir. Leiomyomlarda artış gösteren bu proteinlerin hem tümör oluşumu ile ilgili olabileceği hem de damar duvarındaki lokalizasyonlarının tümör anjiogenezinde önemli olabileceğine işaret etmektedir. Çoğalma markırları ile ilişkilendirilebilmesi için daha agresif tümör örnekleri ile leiomyom olgularının karşılaştırılması ve UK ve UK reseptörlerinin buradaki rollerinin ortaya konması ileride tedavi protokollerinde yer almalarını sağlayacak önemli gelişmeler olabilecektir.

6. SONUÇLAR

Kadın pelvisinin ve uterusun en sık rastlanan tümörü olmasına rağmen, leiomyoma uterinin kesin nedeni tam olarak bilinmemektedir. Normal myometrial dokunun myoma dönüşüm mekanizması ve myom hücrelerinin anormal gelişimini yöneten faktörler net olarak anlaşılamamıştır. Günümüzde leiomyom oluşumundan; normal myometriumun somatik mutasyonları ve lokal büyüme faktörleri ile seks steroidlerinin karmaşık ilişkileri sorumlu tutulmaktadır. Bizim çalışmamızda; UK ve UKR overde, myom dokusunda, myomlu uterustaki normal myometrium dokusunda ve myomsuz uterustaki normal myometrium dokusunda saptandı. Overde ve myometrium dokularında saptanan UK ve UKR varlığının bazal düzeyde olduğu görüldü. Ancak, UK ve UKR açısından yapılan boyamada LM+MM grubunda boyanmanın daha belirginleştiği ve daha yoğun olduğu saptandı. Bu durum, UK'in leiomyom oluşumu ile ilgili olabileceğini akla getirmektedir. Bundan başka bu proteinin damar duvarındaki lokalizasyonu da anjiogeneizde önemli olabileceğine işaret etmektedir. Bu çalışmada leiomyom dokusunda çoğalmanın var olduğu ancak aktif olmadığı saptandı. Bundan dolayı çoğalma markırları ile ilişkilendirilebilmesi için leiomyosarkom gibi daha agresif tümör örnekleri ile leiomyom olgularının karşılaştırılması gereklidir. Böylece UK ve UK reseptörlerinin buradaki rollerinin ortaya konması ileride gelişecek olan önleme ve yeni tedavi protokolleri açısından önemli gelişmeler sağlayacaktır.

7.TABLO VE RESİMLER

Tablo 1.1 Leiomyomada görülebilecek semptomlar

Anormal uterin kanama (menoraji, hipermenore, metroraji, intermenstrüel kanama vb.)
Pelvik ağrı, dismenore, disparoni
Pelvik dolgunluk hissi
Sık idrara çıkma, üriner inkontinans
Kabızlık
Tekrarlayan gebelik kayıpları
İnfertilite
Abdominal distansiyon
Alt ekstremitelerde ödem

Tablo 3.1 Parafin Doku Takibi

İşlem	Madde	Süre
Tespit	% 10 formalin	24- 48 saat
	Akar su	1 gece
Dehidratasyon	% 60 etil alkol	30 dakika
	% 70 etil alkol	30 dakika
	% 80 etil alkol	30 dakika
	% 95 etil alkol	1 saat
	% 95 etil alkol	1 saat
Şeffaflaştırma	Ksilen-Alkol	30 dakika
	Ksilen	1 saat
	Ksilen	1 saat
Emdime 60° C etüvde	Ksilen-Parafin	30 dakika
	Parafin	1 saat
	Parafin	1 saat
Gömme	Parafin	

Tablo 3.2 Hematoksilin-Eozin Boyaması

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60° C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen	30 dakika
	Ksilen	30 dakika
Rehidratasyon	% 95 alkol	2 dakika
	% 80 alkol	2 dakika
	% 70 alkol	2 dakika
	% 60 alkol	2 dakika
Yıkama	Akar su	5 dakika
Boyama	Hematoksilen	30 dakika
Yıkama	Akar su	5 dakika
Diferansiyasyon	Asit alkol	2-3 saniye
Boyama	Eosin	2 dakika
Yıkama	Akar su	5 dakika
Dehidratasyon	% 80 alkol	1 dakika
Dehidratasyon	% 95 alkol	1 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen	1 saat
Kapama	Entellan	

Tablo 3. 3 Anti-Brd-U Boyaması

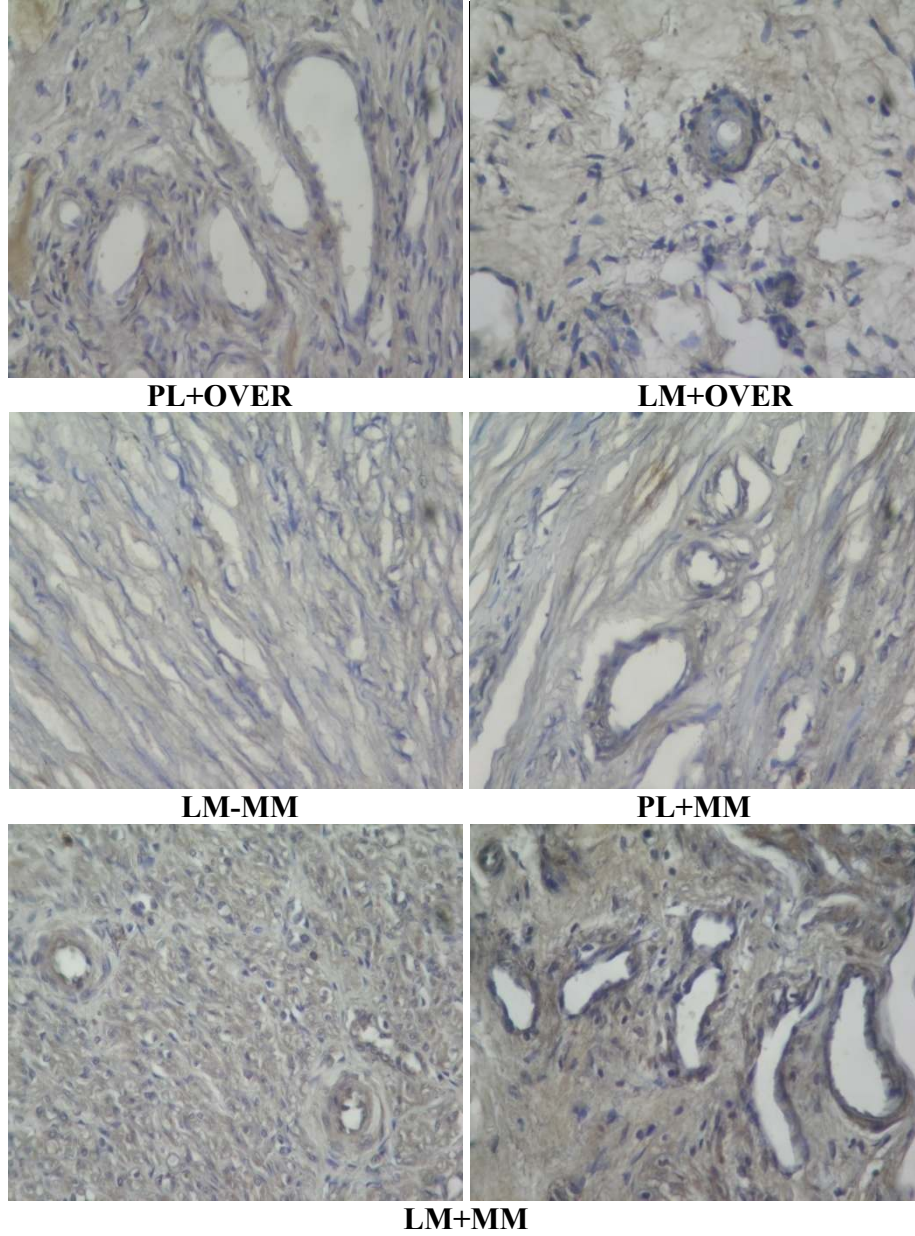
İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60° C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen	30 dakika
	Ksilen	30 dakika
Rehidratasyon	% 95 alkol	2 dakika
	% 80 alkol	2 dakika
	% 70 alkol	2 dakika
	% 60 alkol	2 dakika
Yıkama	Distile su	10 dakika
Dokuların etrafını çizme	Dakopen	
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	Tripsin	10 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	%3' lük hidrojen peroksit	5 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	2.5 N HCl	15 dakika, 37°C de
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Bloklama	Blok solüsyonu	30 dakika, 37°C de
Antikor ile inkübasyon	Anti-Brd-U	2 saat, 37°C de
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	İkinci antikor	30 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	Avidin-biotin kompleksi	30 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika

Boyama	DAB	2 dk.
Yıkama	Distile su	3x5 dakika
Zit Boyama	Mayer' s hematoksilen	15 dakika
Yıkama	Distile su	3x5 dakika
Dehidratasyon	% 80 alkol	1 dakika
Dehidratasyon	% 95 alkol	1 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen	1 saat
Kapama	Entellan	

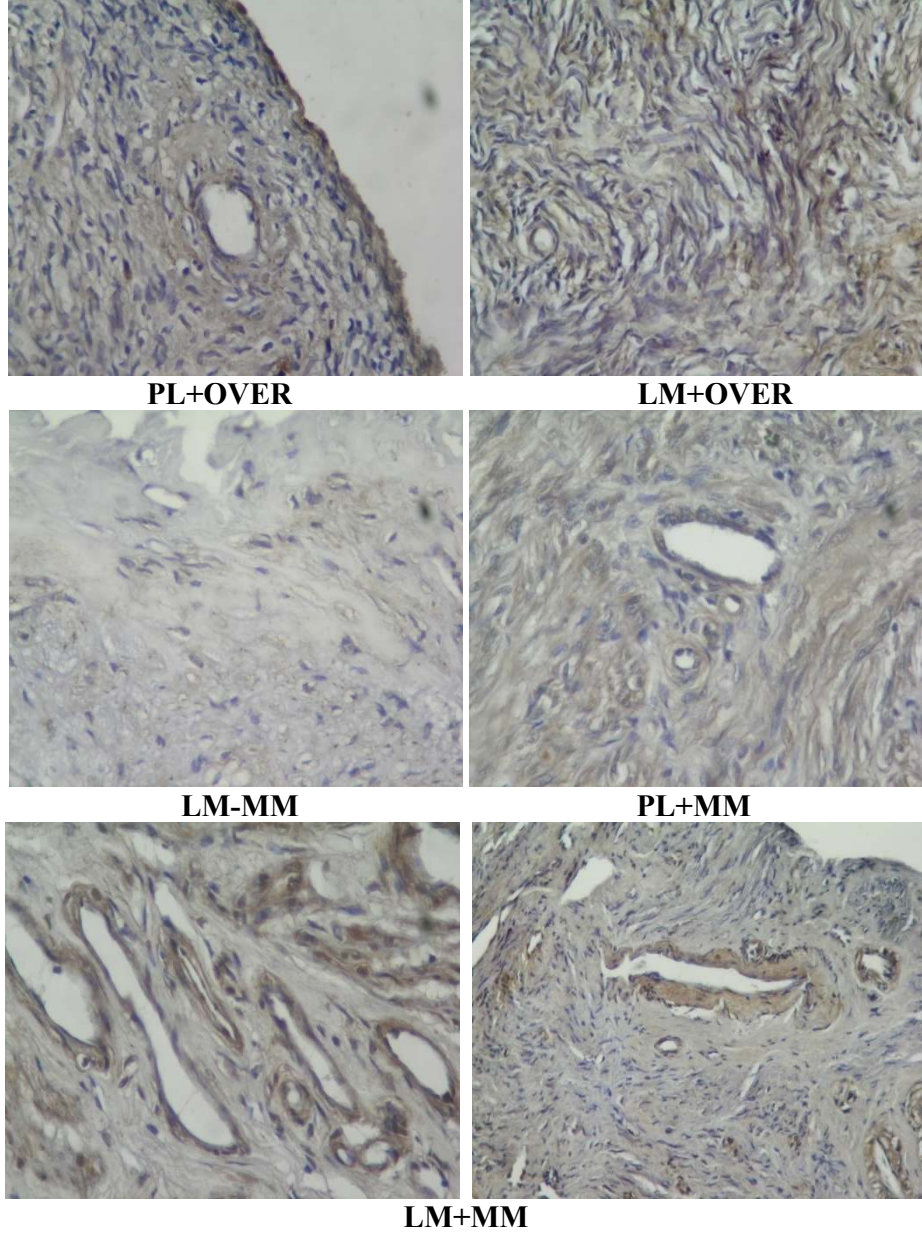
Tablo 3. 4 Indirek Immunohistokiya Boyaması

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60° C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen	30 dakika
	Ksilen	30 dakika
Rehidratasyon	% 95 alkol	2 dakika
	% 80 alkol	2 dakika
	% 70 alkol	2 dakika
	% 60 alkol	2 dakika
Yıkama	Distile su	10 dakika
Dokuların etrafını çizme	Dakopen	
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	Tripsin	15 dakika

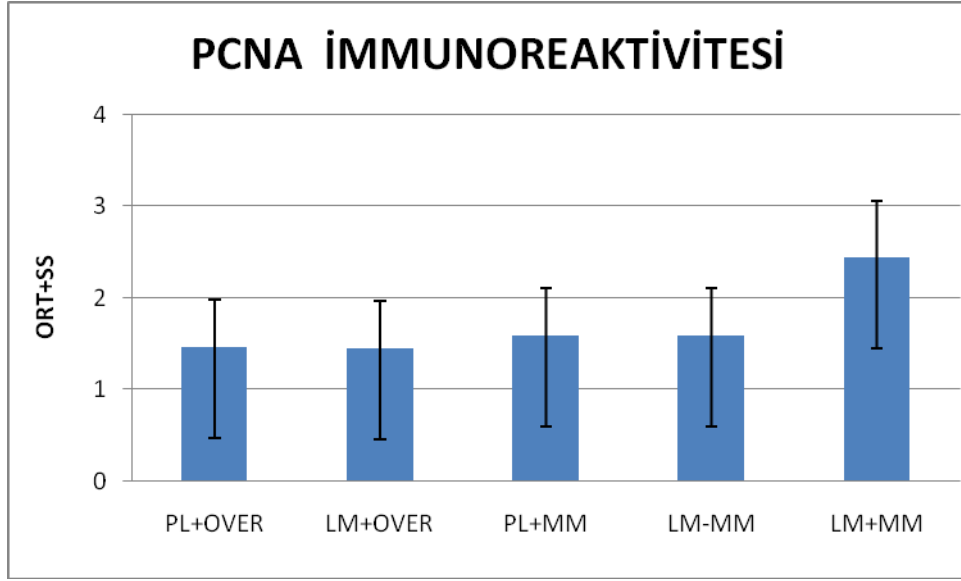
	%3' lük hidrojen peroksit	5 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Bloklama	Blok solüsyonu	10 dakika
Antikor ile inkübasyon	K-8, K-14, FGF-1, FGF-2, MCP-1, EGF, IL-8, Kollajen-1	1 gece, 4°C de
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	İkincil antikor	30 dakika
	Avidin-biotin kompleksi	30 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Boyama	AEC	5 dk.
Yıkama	Distile su	3x5 dakika
Zit Boyama	Mayer' s hematoksilen	15 dakika
Yıkama	Distile su	3x5 dakika
Kapama	Kapatma mediumu	



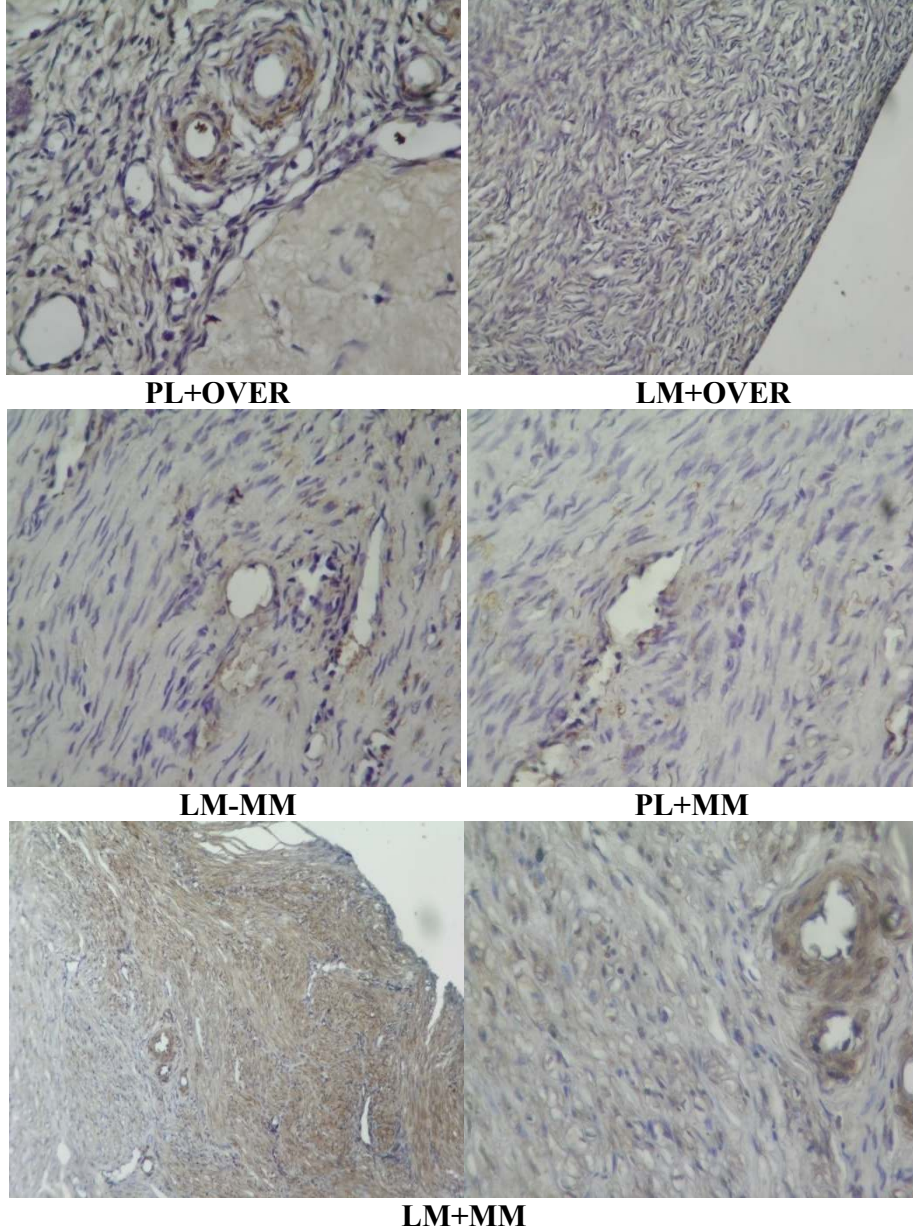
Resim 1. Biyopsi örneklerinde grupların HE boyamalı histolojik incelemede normal (PL+OVER, x400) ve leomyomlu (LM+OVER, x400) overde normal histoloji gözlenirken, kontrol olguları normal (LM-MM, x400 ve PL+MM, x400) myometriumlarda tipik histoloji izlendi. Leomyom örneklerinde (LM+MM, x200 ve x400) ise beklenildiği gibi histopatolojik görüntü leomyom için karakteristik özellikler içerdi.



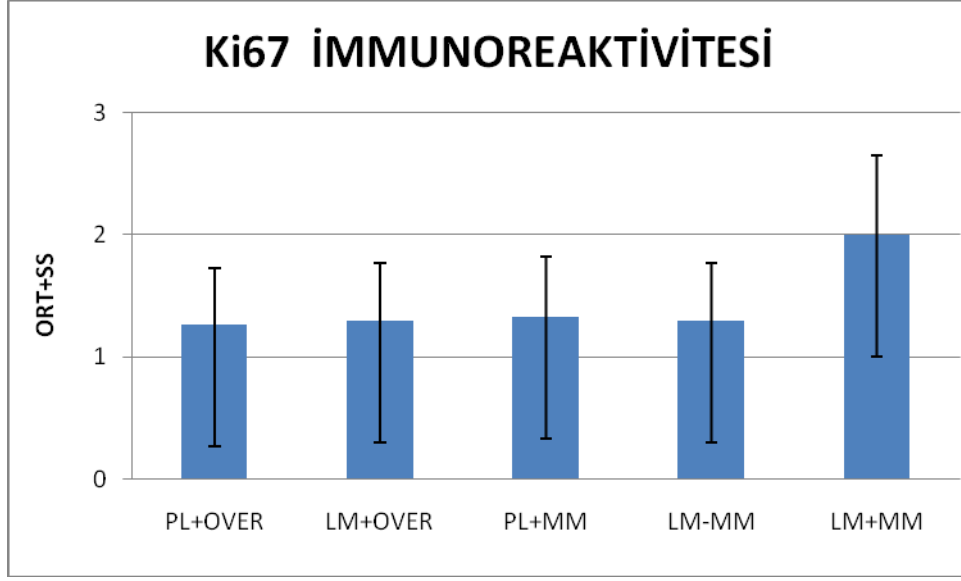
Resim 2. Biyopsi örneklerinde gruplarının **PCNA** immunohistokimyasal analizinde normal (PL+OVER, x400) ve leomyomlu (LM+OVER, x400) overde normal histoloji gözlenirken, kontrol olguları normal (LM-MM, x400 ve PL+MM, x400) myometriumlarda tipik histoloji izlendi. Bu örneklerde damar çevresinde daha belirgin olmak üzere bazal bir immun boyanmanın olduğu görüldü. Leomyom örneklerinde (LM+MM, x200 ve x400) ise beklenildiği gibi histopatolojik görüntü leomyom için karakteristik özellikler içerirken immun boyamanın daha da belirginleştiği saptandı.



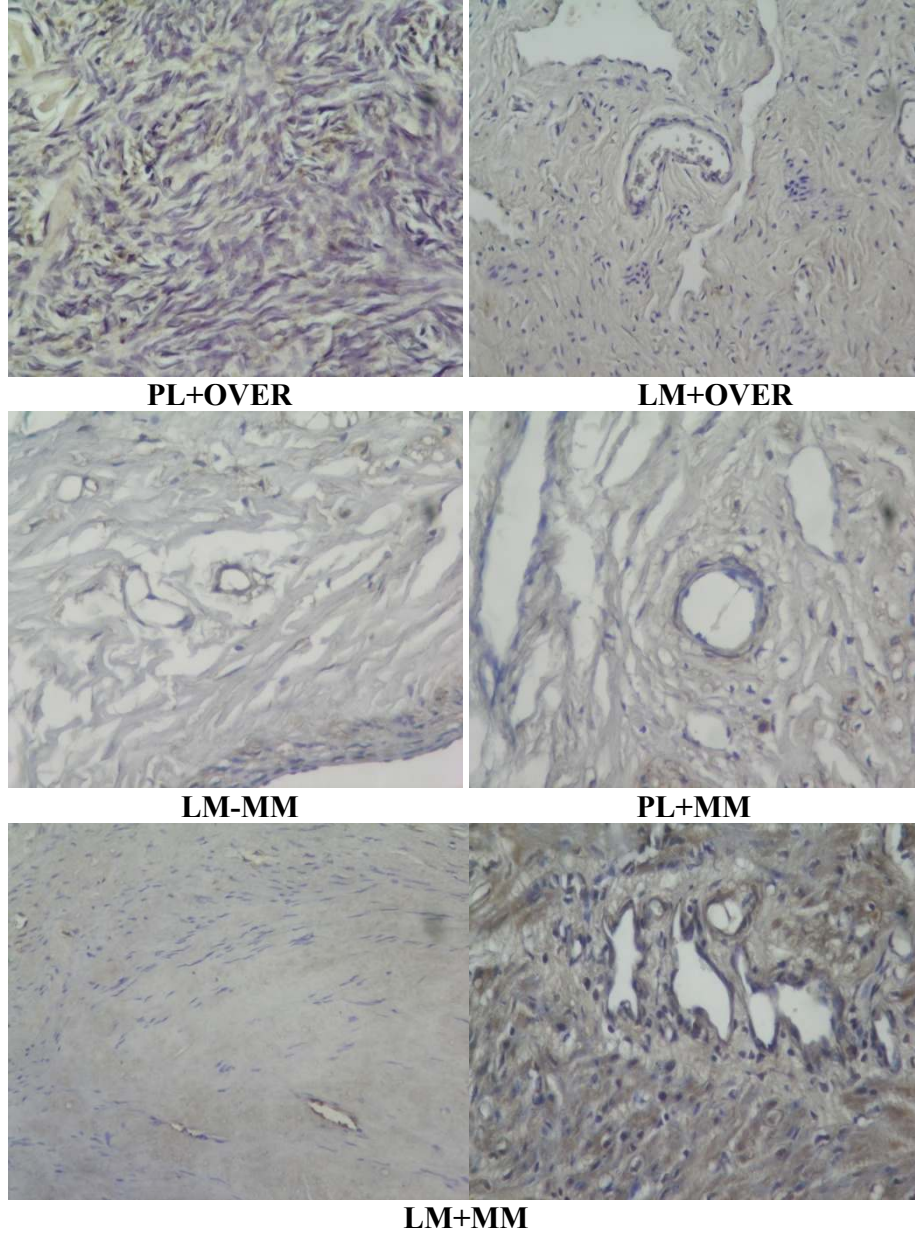
Tablo 1. Grupların PCNA boyamalarından yapılan morfometrik analizde kontrol gruplarına göre LM+MM grubunda anlamlı ($p<0,05$) bir artış saptandı.



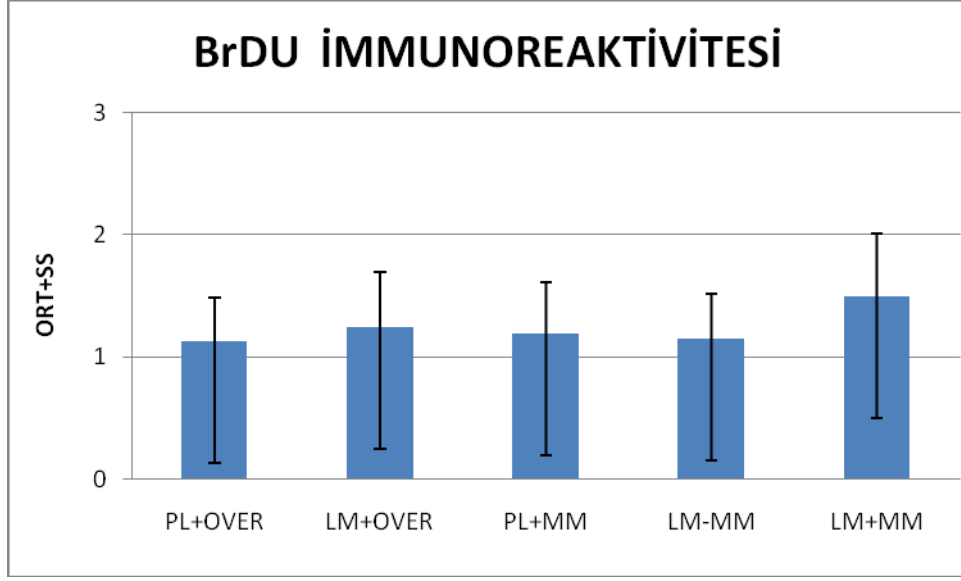
Resim 3. Biyopsi örneklerinde gruplarının **Ki67** immunohistokimyasal analizinde normal (PL+OVER, x400) ve leomyomlu (LM+OVER, x400) overde normal histoloji gözlenirken, kontrol olguları normal (LM-MM, x400 ve PL+MM, x400) myometriumlarda tipik histoloji izlendi. Bu örneklerde damar çevresinde daha belirgin olmak üzere bazal bir boyanmanın olduğu görüldü. Leomyomlu (LM+MM, x200 ve x400) myometriumlarda ise beklenildiği gibi histopatolojik görüntü leomyom için karakteristik özellikler içerirken immun boyamanın daha da belirginleştiği saptandı.



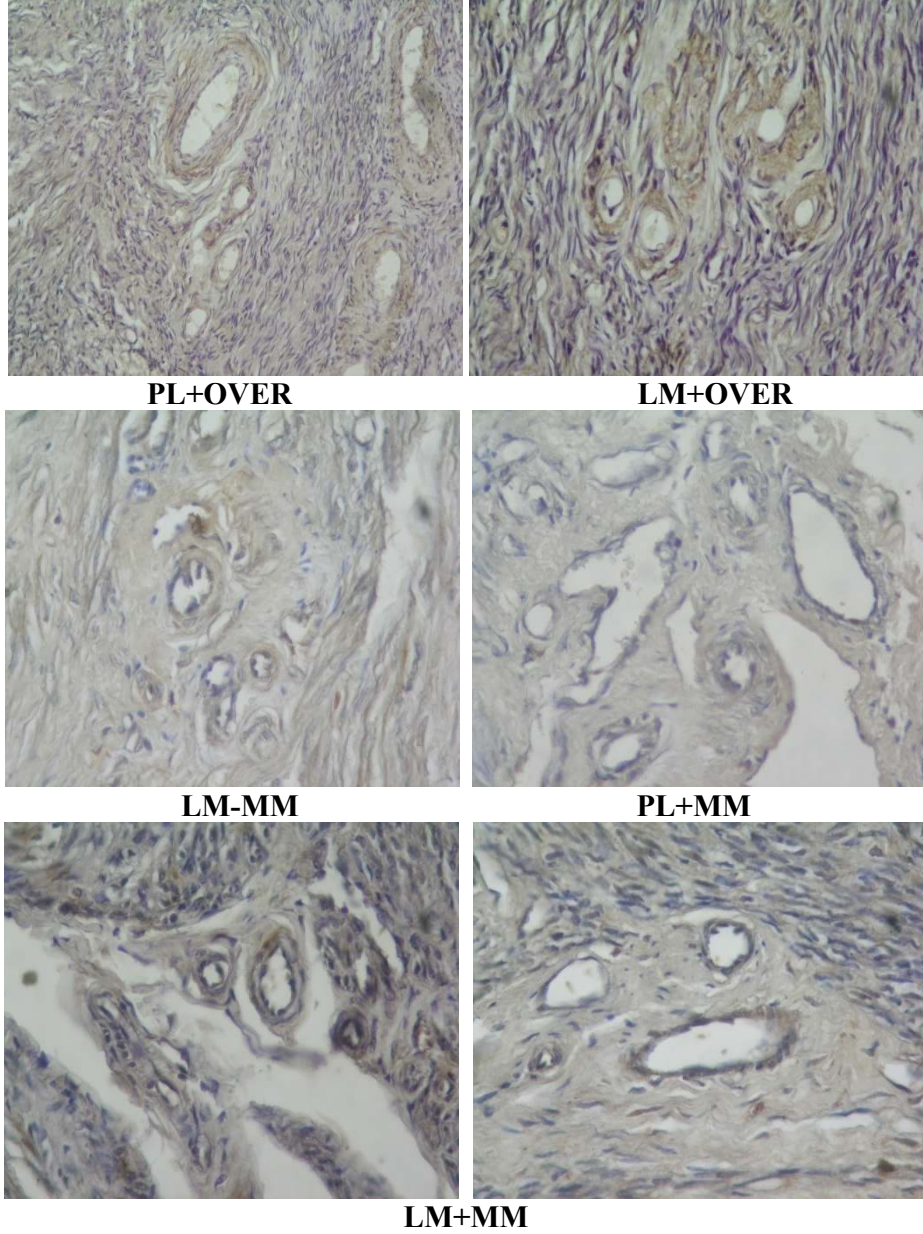
Tablo 2. Grupların Ki67 boyamalarından yapılan morfometrik analizde kontrol gruplarına göre LM+MM grubunda anlamlı ($p<0,05$) bir artış saptandı.



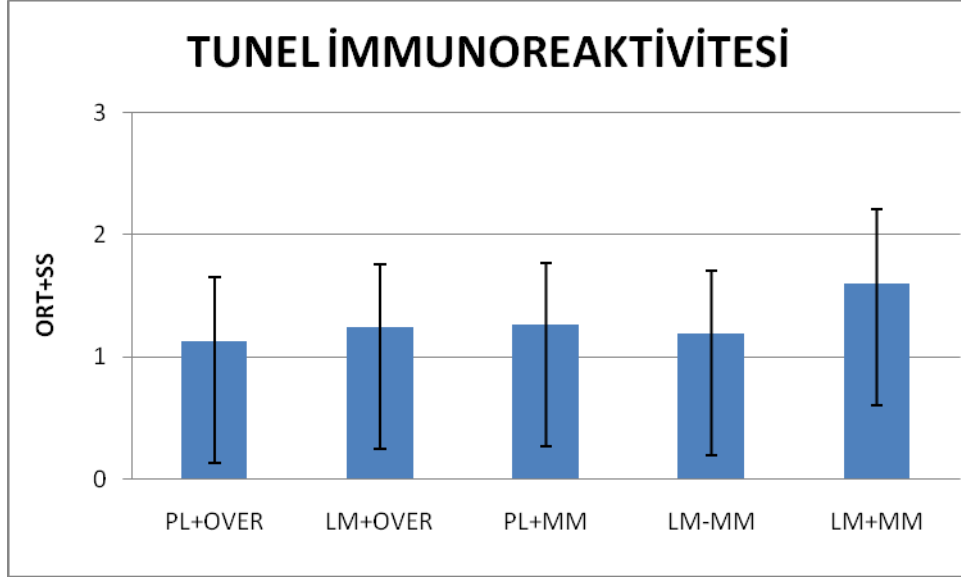
Resim 4. Biyopsi örneklerinde gruplarının **BrDU** immunohistokimyasal analizinde normal (PL+OVER, x400) ve leomyomlu (LM+OVER, x400) overde normal histoloji gözlenirken, kontrol olguları normal (LM-MM, x400 ve PL+MM, x400) myometriumlarda tipik histoloji izlendi. Bu örneklerde damar çevresinde daha belirgin olmak üzere ancak PCNA ve Ki67 ile karşılaştırıldığında çok daha az olmak üzere bazal bir boyanmanın olduğu görüldü. Leomyomlu (LM+MM, x200 ve x400) myometriumlarda ise beklenildiği gibi histopatolojik görüntü leomyom için karakteristik özellikler içerirken immun boyamanın diğer çoğalma markırları PCNA ve Ki67 ile karşılaştırıldığında çok daha az belirginleştiği saptandı.



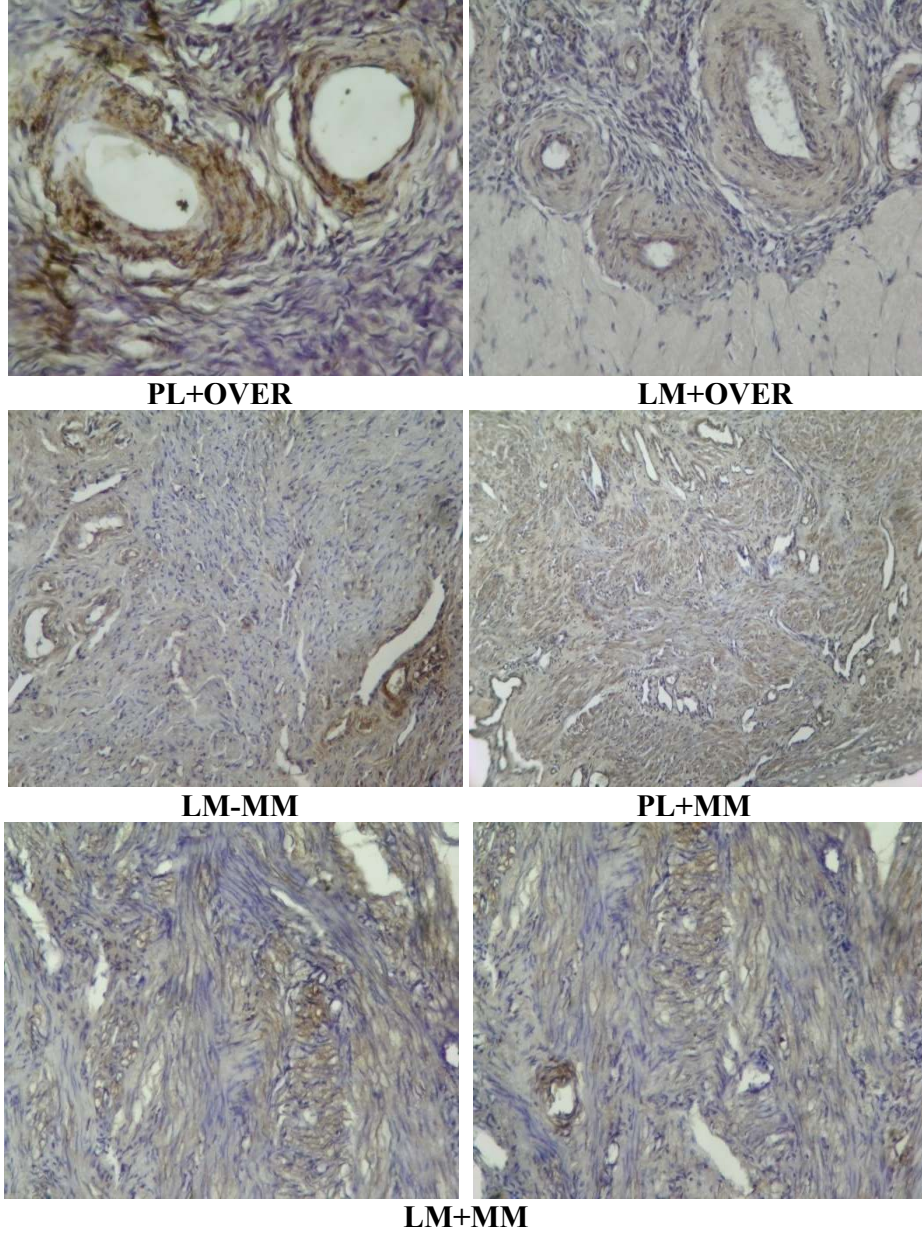
Tablo 3. Grupların BrDU boyamalarından yapılan morfometrik analizde kontrol gruplarına göre LM+MM grubunda anlamlı ($p>0,05$) bir artış saptanmadı.



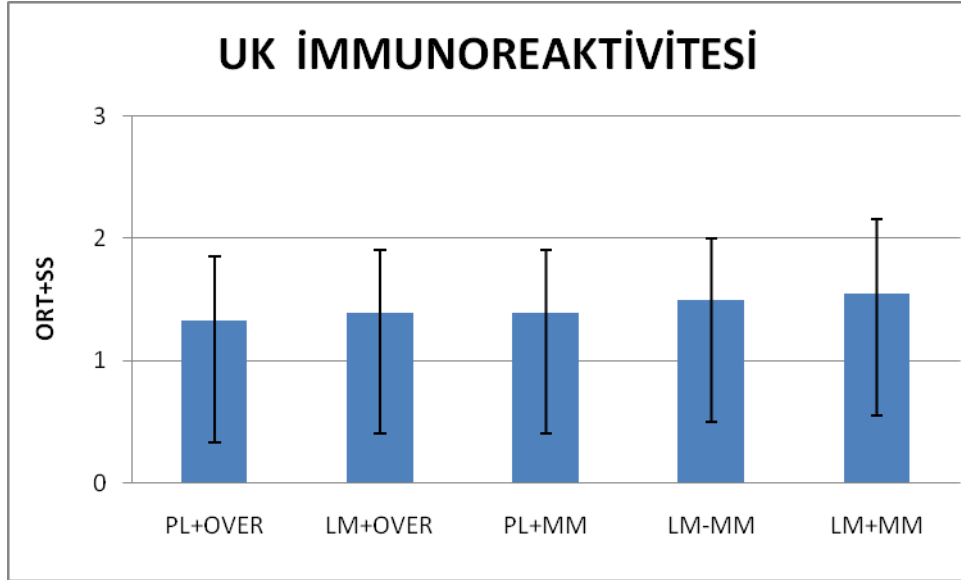
Resim 5. Biyopsi örneklerinde gruplarının **TUNEL** immunohistokimyasal analizinde normal (PL+OVER, x400) ve leomyomlu (LM+OVER, x400) overde normal histoloji gözlenirken, kontrol olguları normal (LM-MM, x400 ve PL+MM, x400) myometriumlarda tipik histoloji izlendi. Leomyomlu (LM+MM, x200 ve x400) myometriumlarda ise beklenildiği gibi histopatolojik görüntü leomyom için karakteristik özellikler içerirken immun boyamanın diğer kontrol gruplar ile karşılaştırıldığında daha belirgin olduğu saptandı.



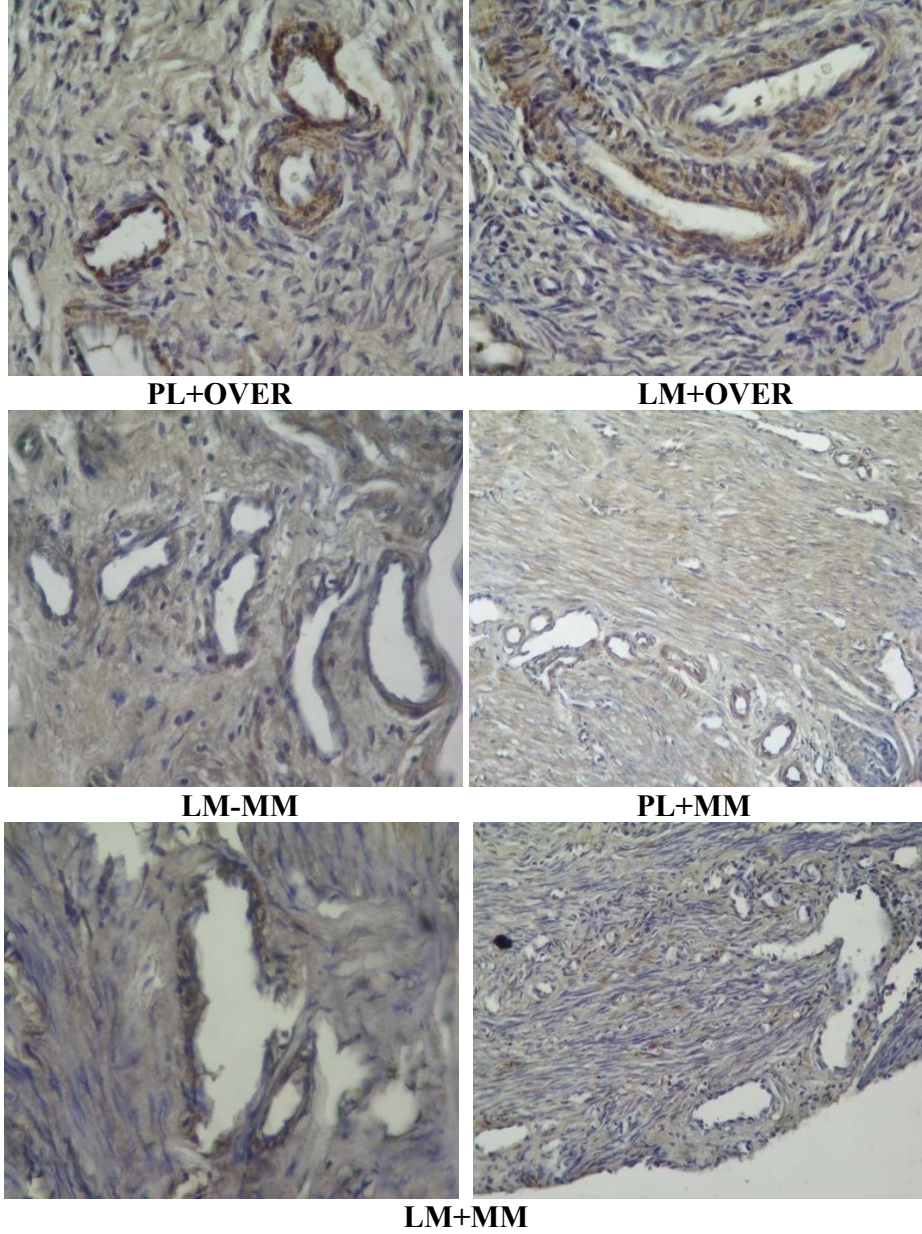
Tablo 4. Grupların TUNEL boyamalarından yapılan morfometrik analizde kontrol gruplarına göre LM+MM grubunda anlamlı ($p<0,05$) bir artış saptandı.



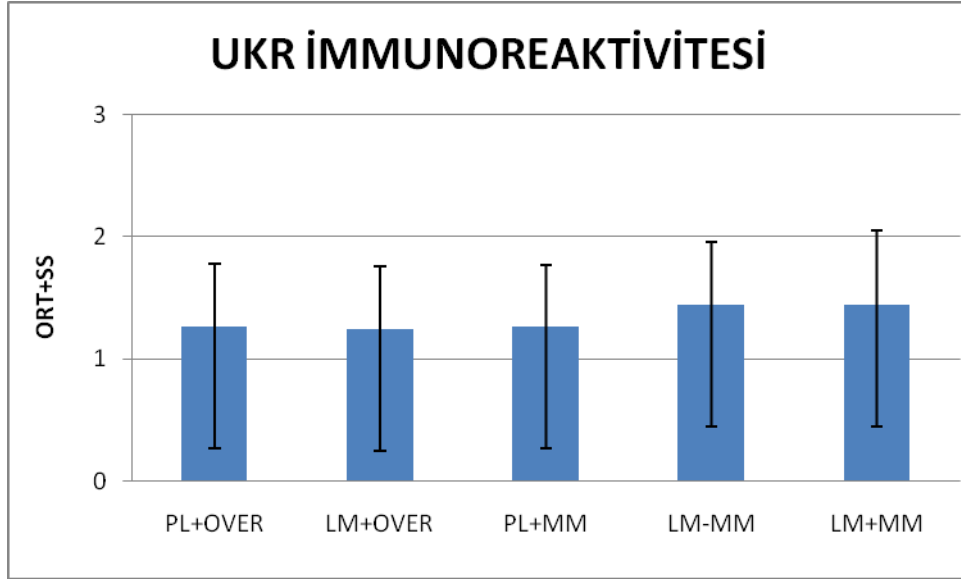
Resim 6. Biyopsi örneklerinde gruplarının **UK** immunohistokimyasal analizinde normal (PL+OVER, x400) ve leomyomlu (LM+OVER, x400) overde normal histoloji gözlenirken, kontrol olguları normal (LM-MM, x400 ve PL+MM, x400) myometriumlarda tipik histoloji izlendi. Bazal boyanmanın damar çevresinde daha belirgin olduğu görüldü. Leomyomlu (LM+MM, x200 ve x400) myometriumlarda ise beklenildiği gibi histopatolojik görüntü leomyom için karakteristik özellikler içerirken immun boyamanın diğer kontrol gruplar ile karşılaştırıldığında daha belirgin olduğu saptandı.



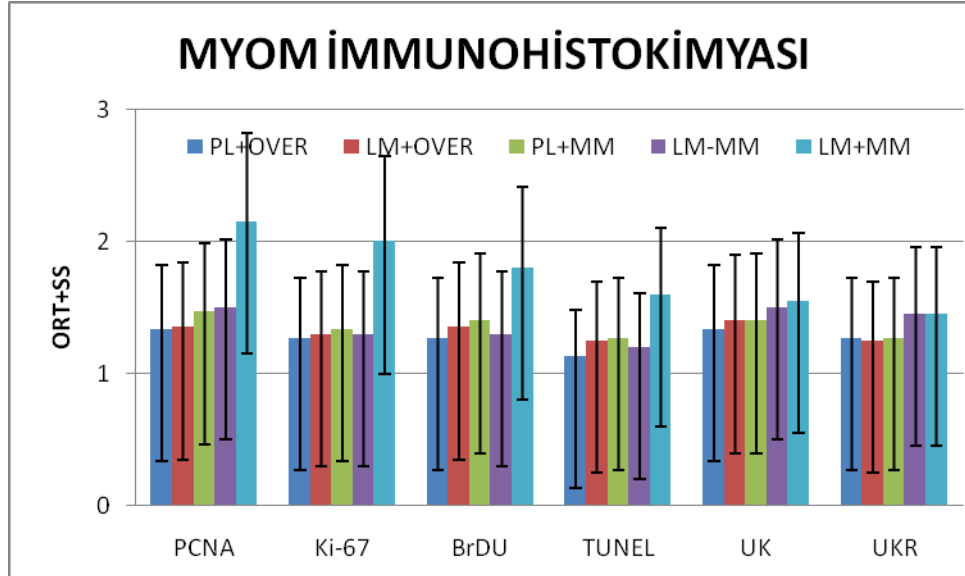
Tablo 5. Grupların UK boyamalarından yapılan morfometrik analizde kontrol gruplarına göre LM+MM grubunda anlamlı ($p<0,05$) bir artış saptandı.



Resim 7. Biyopsi örneklerinde gruplarının **UKR** immunohistokimyasal analizinde normal (PL+OVER, x400) ve leomyomlu (LM+OVER, x400) overde normal histoloji gözlenirken, kontrol olguları normal (LM-MM, x400 ve PL+MM, x400) myometriumlarda tipik histoloji izlendi. Bazal boyanmanın damar çevresinde daha belirgin olduğu görüldü. Leomyomlu (LM+MM, x200 ve x400) myometriumlarda ise beklenildiği gibi histopatolojik görüntü leomyom için karakteristik özellikler içerirken immun boyamanın diğer kontrol gruplar ile karşılaştırıldığında daha belirgin olduğu saptandı.



Tablo 6. Grupların UKR boyamalarından yapılan morfometrik analizde kontrol gruplarına göre LM+MM grubunda anlamlı ($p<0,05$) bir artış saptandı.



Tablo 7. Grupların tüm immunohistokimya boyamalarından yapılan morfometrik analizde kontrol gruplarına göre LM+MM grubunun hepsi için gösterilmesi.

8.KAYNAKLAR

1. Rock AJ, Jones WH (eds). Te Linde's Operative Gynecology 9th ed. Chap 30. Philadelphia: Wiliams & Wilkins Lippincott 2003; 753-98
2. Steven H. Eisinger, Sean Meldrum, Kevin Fiscella, et al Low-dose mifepristone for uterine leiomyomata. *Obstet. Gyncol.* 2003;101 (2):243-250.
3. Marshall LM, Spiegelmen D, Goldman MB, et al. A prospective study of reproductive factors and oral contraceptive use in relation to the risk of uterine leiomyomata. *Fertil Steril* 1998; 70:432-9
4. Lacey CG. Benign disorders of the uterine corpus. In: Pernoll ML (ed.) *Current Obstet. Gynecol. Diagnosis and Treatment* (7th ed). New Jersey, Appleton and Lange 1991;732-45.
5. Elizabeth A. Steward. Uterine fibroids. *Lancet* 2001;357:293-98.
6. Floridon C, Lund N, Thomsen SG. Alternative treatment for symptomatic fibroids. *Current Opinion in Obstet. Gynecol.* 2001;13:491-495.
7. Rein MS, Barbieri RL, Friedman AJ. Progesterone: a critical role in the pathogenesis of uterine myomas (Review) *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1995. Jan;172(1 Pt 1):14-8.
8. Wilson EA, Yang F, Rees ED. Estradiol and progesterone binding in uterine leiomyomata and in normal uterine tissues. *Obstet Gynecol* 1980;55:20.
9. Viville B, Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Wetzka B and Smith SK (1997) Distribution of the A and B forms of the progesterone receptor Messenger ribonucleic acid and protein in uterine leiomyomata and adjacent myometrium. *Hum Reprod* 12,815-822.
10. Boehm KD, Daimon M, Gorodeski IG, Sheean LA, Utian WH, Ilan J. 1990. Expression of the insulin-like and platelet-derived growth factor genes in human uterine tissues. *Mol Reprod Dev* 27:93–101.

11. Harrison-Woolrych ML, Charnock-Jones DS, Smith SK. 1994. Quantification of messenger ribonucleic acid for epidermal growth factor in human myometrium and leiomyomata using reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Endocrinol Metab* 78:1179–1184.
12. Kurachi O, Matsuo H, Samoto T and Maruo T (2001) Tumor necrosis factor- α expression in human uterine leiomyoma and its down-regulation by progesterone. *J Clin Endocrinol Metab* 86,2275-2280.
13. Matsuo H, Maruo T and Samoto T (1997) Increased expression of Bcl-2 protein in human uterine leiomyoma and its up-regulation by progesterone. *J Clin Endocrinol Metab* 82,293-299.
14. F. Petraglia, P. Florio, R. Gallo, et al., “Human placenta and fetal membranes express human urocortin mRNA and peptide,” *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 81, no. 10, pp. 3807–3810, 1996.
15. E. Zoumakis, K. C. Rice, P. W. Gold, and G. P. Chrousos, “Potential uses of corticotropin-releasing hormone antagonists,” *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1083, pp. 239–251, 2006.
16. P. Florio, W. Vale, and F. Petraglia, “Urocortins in human reproduction,” *Peptides*, vol. 25, no. 10, pp. 1751–1757, 2004.
17. Muramatsu Y, Sugino N, Suzuki T, Totsune K, et al. 2001 Urocortin and corticotropin-releasing factor receptor expression in normal cycling human ovaries. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 1362–1369.
18. Florio P, Arcuri F, Ciarmela P, Runci Y, Romagnoli R, Cintonio M et al (2002) Identification of urocortin mRNA and peptide in the human endometrium. *J Endocrinol* 173:9–14.
19. Florio P, De Falco G, Leucci E, Torricelli M, et al. (2006) Urocortin expression is downregulated in human endometrial carcinoma. *J Endocrinol* 190:99–105.
20. Tezval H, Jurk S, Atschekzei F et al. Urocortin and CRF-R2 in human renal cell carcinoma: disruption of an endogenous inhibitor of angiogenesis and proliferation. *World J Urol* 27:825-830, 2009.

21. P. Florio, E. A. Linton, M. Torricelli, et al., "Prediction of preterm delivery based on maternal plasma urocortin," *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 92, no. 12, pp. 4734–4737, 2007.
22. Cramer SF, Patel A. The frequency of uterine leiomyomas. *Am J Clin Pathol* 1990; 94:435-8.
23. Lepine LA, Hillis SD, Marchbanks PA, et al. Hysterectomy surveillance United States 1980-1997. *MMWR* 1997; 46 (4): 1-15.
24. Ross RK, Pike MC, Vessey MP, Yeates D, Casagrande JT. Risk factors for uterine fibroids: reduced risk associated with oral contraceptives. *Br.Med. J.* 1986;293:359-62
25. John AH, Martin R. Growth of leiomyomata with estrogen –progesterone therapy.*J. Reprod. Mod.* 1971;6:56-8
26. Torpin r, Pund E, Peeples WJ. The etiologic and pathologic factors in a series of 1741 fibromyomas of the uterus. *Am J Obstet Gynecol.* 1942;44:569-74.
27. Rubenstein AH, Seftel HC, Miller K, Berson I, Wright AD. Metabolic response to oral glucose in healthy South African White, Indian and African subjects. *Br. Med. J.* 1969;1:748-51.
28. Mosselman S, Polman J and Dijkema R (1996) ER β : identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 392,49- 53.
29. Pedeutour F, Quade BJ, Weremowicz S, Cin PD, Ali S and Morton CC (1998) Localization and expression of the human estrogen receptor beta gene in uterine leiomyomata. *Genes Chrom Cancer* 23,361-366.
30. Benassayag C, Leroy MJ, Rigourd V, Robert B et al. Estrogen receptors (ER α / ER β) in normal and pathological growth of the human myometrium: pregnancy and leiomyoma. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1999; 276,E1112-E1118.
31. Kovacs KA, Oszter A, Göcze PM, Környei JL and Szabo I (2001) Comparative analysis of cyclin D1 and oestrogen receptor (α and β) levels in human leiomyoma and adjacent myometrium. *Mol Hum Reprod* 7,1085-1091.
32. Sakaguchi H, Fujimoto J, Aoki I and Tamaya T (2003) Expression of estrogen receptor α and β in myometrium of premenopausal and postmenopausal women. *Steroids* 68,11-19.

33. Spellacy WN, LeMaire WJ, Buhi WC, et al. Plasma growth hormone and estradiol levels in women with uterine myomas. *Obstet Gynecol* 1972;40:829.
34. Bulun SE, Simpson ER and Word RA Expression of the CYP19 gene and its product aromatase cytochrome P450 in human uterine leiomyoma tissues and cells in culture. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78,736-743.
35. Shozu M, Sumitani H, Segawa T, Yang H-J, Murakami K and Inoue M (2001) Inhibition of in situ expression of aromatase P450 in leiomyoma of the uterus by leuporelin acetate. *J Clin Endocrinol Metab* 86,5405-5411.
36. Shozu M, Sumitani H, Segawa T, Yang H-J, Murakami K, Kasai T and Inoue M (2002) Overexpression of aromatase P450 in leiomyoma tissue is driven primarily through promoter I4 of the aromatase P450 gene (CYP19). *J Clin Endocrinol Metab* 87,2540-2548.
37. Maruo T, Matsuo H, Samoto T, Shimomura Y, Kurachi O, Gao Z, Wang Y, Spitz IM and Johansson E (2000) Effects of progesterone on uterine leiomyoma growth and apoptosis. *Steroids* 65,585-592.
38. Rein MS (2000) Advances in uterine leiomyoma research: the progesterone hypothesis. *Environ Health Perspect* 108(Suppl 5),791-793.
39. Maruo T, Ohara N, Wang J, Matsuo H. Sex steroidal regulation of uterine leiomyoma growth and apoptosis. *Hum Reprod* 2004; 10 (3): 207-220.
40. Kawaguchi, K, Fujii, S, Konishi, I, et al. (1989) Mitotic activity in uterine leiomyomas during the menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol* 160,637-641.
41. Brandon DD, Bethea CL, Strawn EY, Novy MJ, Burry KA, Harrington MS, Erickson TE, et al. Progesterone receptor mRNA and protein are overexpressed in human uterine leiomyomas. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 169,78-85.
42. Kastner P, Krust A, Turcotte B, et al. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J* 1990;9:1603.
43. Nardulli AM, Greene GL, O'Malley BW, et al. Regulation of progesterone receptor mRNA and protein levels in MCF-cells by estradiol: analysis of estrogen's effect on progesterone receptor synthesis and degradation. *Endocrinol.* 1988;122:935.

44. Murphy AA, Kettel LM, Morales AJ, Roberts VJ and Yen SS (1993) Regression of uterine leiomyomata in response to the antiprogestosterone RU486. *J Clin Endocrinol Metab* 76,513-517.
45. Murphy AA, Morales AJ, Kettel LM and Yen SS (1995) Regression of uterine leiomyomata to the antiprogestosterone RU486: dose-response effect. *Fertil Steril* 64,187-190.
46. Kettel LM, Murphy AA, Morales AJ and Yen SSC (1994) Clinical efficacy of the antiprogestosterone RU486 in the treatment of endometriosis and uterine fibroids. *Hum Reprod* 9,116-120.
47. Friedman AJ, Barbieri RL, Doubilet PM, Fine C, and Schiff I A randomized, double-blind trial of a GnRH agonist (leuprolide) with or without medroxyprogesterone acetate in the treatment of leiomyomata uteri. *Fertil Steril* 1988;49,404-409.
48. Carr BR, Marshburn PB, Weatherall PT, Bradshaw KD, et al. an evaluation of the effect of GnRH analogs and medroxyprogesterone acetate on uterine leiomyoma volume by magnetic resonance imaging: a prospective, randomized, double blind, placebo-controlled, crossover trial. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76,1217-1223.
49. Kerr JF, Wyllie AH and Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26,239-257.
50. McDonnell TJ, Deane N, Platt FM, Nunez G, Jaeger U, Mckearn JP and Korsmeyer SJ (1989) bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* 57,79-88.
51. Lu QL, Poulson R, Wong L and Hanby AM (1993) Bcl-2 expression in adult and embryonic non-haematopoietic tissues. *J Pathol* 169,431-437.
52. Soini Y and Paakko P (1996) Bcl-2 is preferentially expressed in tumours of muscle origin but is not related to p53 expression. *Histopathology* 28,141-145.
53. Khurana KK, Singh SB, Tatum AH, Schulz V and Badawy SZA (1999) Maintenance of increased Bcl-2 expression in uterine leiomyomas after GnRH agonist therapy. *J Reprod Med* 44,487-492.
54. Wu X, Blanck A, Olovsson M, Henriksen R and Lindblom B (2002b) Expression of Bcl-2, Bcl-x, Mcl-1, Bax and Bak in human uterine leiomyomas and

myometrium during the menstrual cycle and after menopause. J Steroid Biochem Mol Biol 80,77-83.

55. Maruo T, Ohara N, Wang J, et al. Sex steroidal regulation of uterine leiomyoma growth and apoptosis. Hum Reprod Update. 2004;10:207-220.

56. Danforth DN Jr and Sgagias MK TNF- α modulates estradiol responsiveness of MCF-7 breast cancer cells in vitro. J Endocrinol 1993;138,517-528.

57. Terranova PF, Hunter VJ, Roby KF and Hunt JS (1995) Tumor necrosis factor- α in the female reproductive tract. Proc Soc Exp Biol Med 209,325-342.

58. Pusztai L, Lewis CE and McGee JO (1993) Growth arrest of the breast cancer cell line, T47D, by TNF α ; cell cycle specificity and signal transduction. Br J Cancer 67,290-296.

59. Maruo T, Laoag-Fernandez JB, Takekida S, Peng X, Deguchi J, Samoto T, Kondo H and Matsuo H (1999) Regulation of granulosa cell proliferation and apoptosis during follicular development. Gynecol Endocrinol 13,410-419.

60. Duan C Specifying the cellular responses to IGF signals: roles of IGF-binding proteins. J Endocrinol 2002;175,41-54.

61. Van derVen LTM, Roholl PJM, Gloudemans T, Van Buul-Offers SC, Welters MJP, Bladergroen BA, Faber JAJ, Sussenbach JS and Den Otter W(1997) Expression of insulin-like growth factors (IGFs), their receptors and IGF binding protein-3 in normal, benign and malignant smooth muscle tissues. Br J Cancer 75,1631-1640.

62. Cohick WS, Clemmons DR. 1993. The insulin-like growth factors. Annu Rev Physiol 55:131–153.

63. Strawn EY, Jr., Novy MJ, Burry KA, Bethea CL. 1995. Insulin-like growth factor I promotes leiomyoma cell growth *in vitro*. Am J Obstet Gynecol 172:1837–1843; discussion 1843–1834.

64. Hoppener JW, Mosselman S, Roholl PJ, Lambrechts C, Slebos RJ, de Pagter-Holthuisen P, et al. 1988. Expression of insulin-like growth factor-I and -II genes in human smooth muscle tumours. Embo J 7:1379–1385.

65. Tammola P, Pekonen F and Rutanen EM (1989) Binding of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I in human myometrium and leiomyomata. *Obstet Gynecol* 74,658-662.
66. Chandrasekhar Y, Hainer J, Osuamkpe C and Nagamani M IGF-I and II binding in human myometrium and leiomyomas. *Am J Obstet Gynecol* 1992;166,64-69.
67. Dixon D, He H and Haseman JK Immunohistological localization of growth factors and their receptors in uterine leiomyomas and matched myometrium. *Environ Health perspect* 2000; 108(Suppl 5),795-802.
68. Adesanya OO, Zhou J and Bondy CA Sex steroid regulation of insulin-like growth factor system gene expression and proliferation in primate myometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81,1967-1974
69. Giudice LC, Irwin JC, Dsupin BA, Pannier EM et al. IGF, IGFBP and IGF receptor gene expression and IGFBP synthesis in human uterine leiomyomata. *Hum Reprod* 1993;8,1796-1806.
70. Yamada T, Nakago S, Kurachi O, Wang J, Takekida S, Matsuo H and Maruo T (2004) Progesterone down-regulates insulin-like growth factor-I expression in cultured human uterine leiomyoma cells. *Hum Reprod* 19,1-7.
71. Gao Z, Matsuo H, Wang Y, Nakago S and Maruo T Up-regulation by IGF-I of proliferating cell nuclear antigen and Bcl-2 protein Expression in human uterine leiomyoma cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86,5593-5599.
72. Resnicoff M, Abraham D, Yutanawiboonchai W, Rotman HL, Kajstura J, Rubin R, Zoltick P and Baserga R (1995) The insulin-like growth factor I receptor protects tumor cells from apoptosis in vitro. *Cancer Res* 55,2463-2469.
73. Parrizas M and LeRoith D (1997) Insulin-like growth factor-1 inhibition of apoptosis is associated with increased expression of the bcl-xL gene product. *Endocrinology* 138,1355-1358.
74. Gray A, Dull TJ and Ullrich A Nucleotide sequence of EGF cDNA predicts a 128,000-molecular weight protein precursor. *Nature* 1983;303,722-725.

75. Scott J, Urdea M, Quiroga M, Sanchez-Pescador R, Fong N, Selby M, Rutter WJ and Bell GI (1983) Structure of a mouse submaxillary Messenger RNA encoding epidermal growth factor and seven related proteins. *Science* 221,236-240.
76. Hofmann GE, Rao CV, Barrows GH, Schultz GS and Sanfilippo JS Binding sites for EGF in human uterine tissues and leiomyomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1984;158,880-884
77. Huet-Hudson YM, Chakraborty C, De SK, Suzaki Y, Andrews GK and Dey SK (1990) Estrogen regulates the synthesis of epidermal growth factor in mouse uterine epithelial cells. *Mol Endocrinol* 4,510-523.
78. Nelson KG, Takahashi T, Bossert NL, Walmer DK and McLachlan JA (1991) Epidermal growth factor replaces estrogen in the stimulation of female genital-tract growth and differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 88,21- 25.
79. Yeh J, Rein M and Nowak R (1991) Presence of messenger ribonucleic acid for epidermal growth factor (EGF) and EGF receptor demonstrable in monolayer cell cultures of myometria and leiomyoma. *Fertil Steril* 56,997-1000.
80. Rossi MJ, Chegini N and Masterson BJ (1992) Presence of epidermal growth factor, platelet-derived growth factor, and their receptors in human myometrial tissue and smooth muscle cells: their action in smooth muscle cells in vitro. *Endocrinology* 130,1716-1727.
81. Fayed YM, Tsibris JCM, Langenberg PW and Robertson AL Jr Human uterine leiomyoma cells: binding and growth responses to EGF, PDGF and insulin. *Lab Invest* 1989;60,30-37
82. Chegini N, Rao CV, Wakim N, Sanfilippo J. 1986. Binding of 125I-epidermal growth factor in human uterus. *Cell Tissue Res* 246:543–548.
83. Lumsden MA, West CP, Bramley T, Rungay L, Baird DT. 1988. The binding of epidermal growth factor to the human uterus and leiomyomata in women rendered hypo-oestrogenic by continuous administration of an LHRH agonist. *Br J Obstet Gynaecol* 95:1299–1304.
84. Rein MS, Nowak RA. 1992. Biology of uterine myomas and myometrium *in vitro*. *Semin Reprod Endocrinol* 10:310–319.

85. Flake G. P., Andersen J and Dixon D. Etiology and pathogenesis of uterine leiomyomas: A review. *Env. Health Persp.* 111(8): 1037-1054,2003.
86. Nowak RA. 1999. Fibroids: pathophysiology and current medical treatment. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 13:223–238.
87. Ross R, Raines EW and Bowen-Pope DF (1986) The biology of platelet-derived growth factor. *Cell* 46,155-169.
88. Palman C, Bowen-Pope DF and Brooks JJ (1992) Platelet-derived growth factor (β -subunit) immunoreactivity in soft tissue tumors. *Lab Invest* 66,108-115.
89. Arici A and Sozen I Expression, menstrual cycle-dependent activation, and bimodal mitogenic effect of transforming growth factor- β 1 in human myometrium and leiomyoma. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 188,76-83
90. Di Lieto A, De Rosa G, De Falco M, Iannotti F, Staibano S et al. Relationship between PDGF expression in leiomyomas and uterine volume changes after GnRH agonist treatment. *Hum Pathol* 2002;33,220-224.
91. Ingman WV and Robertson SA (2002) Defining the actions of transforming growth factor beta in reproduction. *Bioessays* 24,904-914.
92. Ignatz RA and Massague J (1986) Transforming growth factor-b stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem* 261,4337-4345.
93. Ignatz RA, Endo T and Massague J (1987) Regulation of fibronectin and type I collagen mRNA levels by transforming growth factor-b. *J Biol Chem* 262,6443-6446.
94. Dou Q, Zhao Y, Tarnuzzer RW, Rong H et al. Suppression of TGF- β and TGF- β receptor mRNA and protein expression in leiomyomata in women receiving GnRH agonist therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81,3222-3230.
95. Tang XM, Dou Q, Zhao Y, McLean F, Davis J and Chegini N (1997) The expression of transforming growth factor- β s and TGF- β receptor mRNA and protein and the effect of TGF β s on human myometrial smooth muscle cells in vitro. *Mol Hum Reprod* 3,233-240.

96. Chegini N, Zhao Y, Williams RS, Flanders KC. 1994. Human uterine tissue throughout the menstrual cycle expresses transforming growth factor-beta 1 (TGF beta 1), TGF beta 2, TGF beta 3, and TGF beta type II receptor Messenger ribonucleic acid and protein and contains [125I]TGF beta 1- binding sites. *Endocrinology* 135:439–449.
97. Lee BS and Nowak RA (2001) Human leiomyoma smooth muscle cells show increased expression of transforming growth factor- β 3 (TGF β 3) and altered responses to the antiproliferative effects of TGF β . *J Clin Endocrinol Metab* 86,913-920.
98. Arici A and Sozen I transforming growth factor- β 3 is expressed at high levels in leiomyoma where it stimulates fibronectin expression and cell proliferation. *Fertil Steril* 2000; 73,1006-1011
99. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. 1999. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 13:9-22.
100. Hyder SM, Huang JC, Nawaz Z, Boettger-Tong H, Makela S, Chiappetta C, et al. 2000. Regulation of vascular endothelial growth factor expression by estrogens and progestins. *Environ Health Perspect* 108(suppl 5):785–790.
101. Dixon D, He H, Haseman JK. 2000. Immunohistochemical localization of growth factors and their receptors in uterine leiomyomas and matched myometrium. *Environ Health Perspect* 108(suppl 5):795–802.
102. Harrison-Woolrych ML, Sharkey AM, Charnock-Jones DS and Smith SK Localization and quantification of VEGF mRNA in human myometrium and leiomyomata. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80,1853-1858.
103. Ferrara N, Houck K, Jakeman L and Leung DW Molecular and biological properties of the VEGF family of proteins. *Endocr Rev* 1992;13,18-32.
104. Stewart EA, Nowak RA. 1996. Leiomyoma-related bleeding: a classic hypothesis updated for the molecular era. *Hum Reprod Update* 2:295–306.
105. Klagsbrun M and Dluiz S (1993) Smooth muscle cell and endothelial cell growth factors. *Trends Cardiovasc Med* 3,213-217.
106. Wu X, Blanck A, Olovsson M, Moller B and Lindblom B (2001) Expression of basic fibroblast growth factor (bFGF), FGF receptor 1 and FGF receptor 2 in uterine leiomyomas and myometrium during the menstrual cycle, after menopause and GnRHa treatment. *Acta Obstet Gynecol Scand* 80,497-504.

107. Rauk PN, Surti U, Roberts JM and Michalopoulos G (1995) Mitogenic effect of basic fibroblast growth factor and estradiol on cultured human myometrial and leiomyoma cells. *Am J Obstet Gynecol* 173,571-577.
108. Battistini B, Chailler P, D'Orleans-juste P, Briere N and sirois P Growth regulatory properties of endothelins. *Peptides* 1993; 14,385-399
109. Pekonen F, Nyman T and Rutanen EM (1994) Differential expression of mRNAs for endothelin-related proteins in human endometrium, myometrium and leiomyoma. *Mol Cell Endocrinol* 103,165-170.
110. Eude I, Dallot E, Vacher-Lavenu MC, Chapron C et al. Potentiation response of cultured human uterine leiomyoma cells to various growth factors by endothelin-I: role of protein kinase C. *Eur J Endocrinol* 2001;144,543-548.
111. Hague S, Zhang L, Oehler MK, et al. Expression of the hypoxically regulated angiogenic factor adrenomedullin correlates with uterine leiomyoma vascular density. *Clin Cancer Res* 6:2808-2814,2000.
112. Fletcher JA, Morton CC, Pavelka K and Lage JM Chromosome aberrations in uterine smooth muscle tumors: potential diagnostic relevance of cytogenetic instability. *Cancer Res* 1990;50,4092-4097.
113. Benda JA. Pathology of smooth muscle tumors of the uterine corpus. *Clin Obstet Gynecol* 2001; 44:350-63.
114. Kurki P, Vanderlaan M, Dolbeare F, Gray J, Tan EM. 1986 Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin during the cell cycle. *Exp Cell Res*. 166:209 –219.
115. Layfield LJ, Liu K, Dodge R, Barsky SH. Uterine smooth muscle tumors: utility of classification by proliferation, ploidity, and prognostic markers versus traditional histopathology. *Arch Pathol Lab Med* 2004;124:221–7.
116. Mayerhofer K, Lozanov P, Bodner K, Bodner-Adler B, Obermair A, Kimberger O, etal. Ki 67 expression in patients with uterine leiomyomas, uterine smooth muscle tumors of uncertain malignant potential (STUMP) and uterine leiomyosarcomas (LMS). *Acta Obstet Gynecol Scand* 2004;83:1085–8.

117. Shimomura Y, Matsuo H, Samoto T and Maruo T. Up-regulation by progesterone of PCNA and EGF expression in human uterine leiomyoma J Clin. Endocrinol. Metab. 1998 Vol;83 No:6 P:2192-2198.
118. Sancı M, Dikiş C, İnan S, Türköz E ve ark. Immunolocalization of VEGF, VEGF-R, EGF-R and Ki-67 in leiomyoma, cellular leiomyoma and leiomyosarcoma. Acta histochemica 2009, P1-9
119. Hunt SH. Fibroid weighing one hundred and forty pounds. Am J Obstet 1888;21:62.
120. Carabias E, Lopez-Pino MA, Dhimes FP and Vargas J. Paratubal cystic leiomyoma: radiologic and pathologic analyses. Eur J Radiol 20:28-31,1995.
121. Rader JS, Binette SP, Brandt TD et al. Ileal hemorrhage caused by a parasitic uterine leiomyoma. Obstet Gynecol 76:531-534,1990.
122. Ha HK, Jee MK, Lee HJ et al. MR imaging analysis of heterogeneous leiomyomas of the uterus. Front Biosci 2: f4-f12,1997.
123. Hasan F, Arumugam K, and Sivanesaratnam V. Uterine leiomyomata in pregnancy. Int J Gynecol Obstet 34:45-48,1991.
124. Montague A, Swartz DP, Woodruff JD. Sarcoma arising in leiomyoma of uterus: factors influencing prognosis. Am J Obstet Gynecol 1965;92:421.
125. Corscaden JA, Singh RP. Leiomyosarcoma of the uterus Am J Obstet Gynecol 1958;75:149.
126. Hendrickson MR, and Kempson RL. A diagnostic approach to smooth muscle tumors of the uterus. Current Diagnostic Pathology 6:21-30,2000.
127. Buttram VC, Reiter RC. Uterine leiomyomata: Etiology, symptomatology and management. Fertil Steril 1981; 36:422-45.
128. Stovall DW. Clinical symptomatology of uterine leiomyomas. Clin Obstet Gynecol 2001; 44:364-71.
129. Mattingly RF. Large myomata uteri and stress urinary incontinence. In: Nichols DH, ed. Clinical problems, injuries and complications of gynecologic surgery. Baltimore: Williams and Wilkins,1983.

130. Guarnaccia MM, Rein MS. Traditional surgical approaches to uterine fibroids: Abdominal myomectomy and hysterectomy. *Clin Obstet Gynecol* 2001; 44:385-400
131. Jonas HS, Masterson BJ. Giant uterine tumors. Case report and review of the literature. *Obstet. Gynecol* . 1977;50(Suppl1):2.
132. Li TC, Mortimer R, Cooke ID. Myomectomy: a retrospective study to examine reproductive performance before and after surgery. *Hum Reprod*. 1999;14:1735-40.
133. Matsunaga E, Shiota K. Ectopic pregnancy and myoma uteri: teratogenic effects and maternal characteristics. *Teratology*. 1980;21:61.
134. Muram D, Gillieson MS, Walters JH. Myomas of the uterus in pregnancy: ultrasonographic follow-up. *Am J Obstet gynecol* 1980;138:16.
135. Exacoustos C, Rosati P. Ultrasound diagnosis of uterine myomas and complications in pregnancy. *Obstet Gynecol* 1993;82:97.
136. Wallah EE, Vu KK. Myoma uteri and infertility. *Obstet. Gynecol. Clin. N. Am.* 22:791-99.
137. Ubaldi F, Tournaye H, Camus M, Van Der Pas H, Gepts E, Devroey P. Fertility after hysteroscopic myomectomy. *Hum Reprod Update* 1995;1:81-90.
138. K. Takahashi, K. Totsune, O. Murakami, and S. Shibahara, "Urocortins as cardiovascular peptides," *Peptides*, vol. 25, pp. 1723–1731, 2004.
139. Vaughan J, Donaldson C, Bittencourt J et al. 1995 Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor. *Nature* 378: 287-292.
140. Donaldson CJ, Sutton SW, Perrin MH et al. 1996 Cloning and characterization of human urcortin *Endocrinology* 137: 2167-2170.
141. K. Lewis, C. Li, M. H. Perrin, et al., "Identification of urocortin III, an additional member of the corticotropin-releasing factor (CRF) family with high affinity for the CRF2 receptor," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 98, pp. 7570–7575, 2001.

142. S. Y. Hsu and A. J. W. Hsueh, "Human stresscopin and stresscopin-related peptide are selective ligands for the type 2 corticotropin-releasing hormone receptor," *Nature Medicine*, vol. 7, no. 5, pp. 605–611, 2001.
143. H. Tu, A. J. Kastin, and W. Pan, "Corticotropin-releasing hormone receptor (CRHR)1 and CRHR2 are both trafficking and signaling receptors for urocortin," *Molecular Endocrinology*, vol. 21, no. 3, pp. 700–711, 2007.
144. Oki Y, Sasano H (2004) Localization and physiological roles of urocortin. *Peptides* 25(10):1745–1749.
145. Petraglia F, Potter E, Cameron VA et al. 1993 Corticotropin-releasing factor-binding protein is produced by human placenta and intrauterine tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 77: 919 924.
146. Challis JRG, Matthews SG, Van Meier C, Ramirez MM. 1995 The placental corticotrophin-releasing hormone- adrenocorticotrophin axis. *Placenta* 16: 481-502.
147. Petraglia F, Sawchenko PE, Rivier J, Vale W. 1987 Evidence for local stimulation of ACTH secretion by corticotropin-releasing factor in human placenta. *Nature* 328: 717-719.
148. Jones SA, Challis JRG .1990 Effects of corticotrophin- releasing hormone and adrenocorticotrophin on prostaglandin output by human placenta and fetal membranes. *Gynecol Obstet Invest.* 29: 165-8.
149. Clifton VL, Read MA, Leitch IM, Boura ALA, Robinson PJ and Smith R 1994 Corticotropin-releasing hormone- induced vasodilatation in the human fetal placental circulation. *J Clin Endocrinol Metab* 76: 666-669.
150. Lewis K, Li C, Perrin MH, Blount A, et al (2001) Identification of urocortin III, an additional member of the corticotropin-releasing factor (CRF) family with high affinity for the CRF2 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:7570–7575.
151. F. Petraglia, P. Florio, C. Benedetto, et al., "Urocortin stimulates placental adrenocorticotropin and prostaglandin release and myometrial contractility in vitro," *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 84, no. 4, pp. 1420–1423, 1999.
152. Lovenberg TW, Liaw CW, Grigoriadis DE, et al (1995) Cloning and characterisation of a functionally distinct corticotrophin-releasing factor receptor subtype from rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:836–840.

153. Gao L, He P, Sha J, Liu C, Dai L, Hui N et al (2007) Corticotropin-releasing hormone receptor type 1 and type 2 mediate differential effects on 15-hydroxy prostaglandin dehydrogenase expression in cultured human chorion trophoblasts. *Endocrinology* 148(8):3645–3654.
154. Tao J, Li S (2005) Effects of urocortin via ion mechanisms or CRF-receptors? *Biochem Biophys Res Commun* 336(3):731–736.
155. Robinson, B.M., Tellam, D.J., Smart, D., et al. 1999. Cloning and characterization of corticotropin- releasing factor and urocortin in Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*). *Peptides* 20, 1177–1185.
156. Watanabe, F., Oki, Y., Ozawa, M., Masuzawa, M., et al. 1999. Urocortin in human placenta and maternal plasma. *Peptides* 20, 205–209.
157. Slominski, A., Roloff, B., Curry, J., Dahiya, M., Szczesniwski, A., Wortsman, J., 2000. The skin produces urocortin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 815–823.
158. Arcuri, F., Cintorino, M., Florio, P., Floccari, F. et al. 2002. Expression of urocortin mRNA and peptide in the human prostate and in prostatic adenocarcinoma. *Prostate* 52, 167–172.
159. Shi, M., Yan, X., Ryan, D., Harris, R., 2000. Identification of urocortin mRNA antisense transcripts in rat tissue. *Brain Res. Bull.* 53, 317–324.
160. Reyes TM, Lewis K, Perrin MH, et al (2001) Urocortin II: a member of the corticotropin-releasing factor (CRF) neuropeptide family that is selectively bound by type 2 CRF-receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(5):2843–2848.
161. Spina, M., Merlo-Pich, E., Chan, R.K.W. et al. 1996. Appetite-suppressing effects of urocortin, a CRF-related neuropeptide. *Science* 273, 1561–1564.
162. Asakawa, A., Inui, A., Ueno, N., Makino, S., Fujino, M.A., Kasuga, M., 1999. Urocortin reduces food intake and gastric emptying in lean and ob/ob obese mice. *Gastroenterology* 116, 1287–1292.
163. Baigent, S., Lowry, P., 2000. mRNA expression profiles for corticotropin-releasing factor (CRF), urocortin, CRF receptors and CRF-binding protein in peripheral rat tissues. *J. Mol. Endocrinol.* 25, 43–52.

164. Kimura, Y., Takahashi, K., Totsune, K., Muramatsu, Y., Kaneko, C., Darnel, A., Suzuki, T., Ebina, M., Nukiwa, T., Sasano, H., 2002. Expression of urocortin and corticotropin-releasing factor receptor subtypes in the human heart. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 340–346.
165. Hashimoto, K., Nishiyama, M., Tanaka, Y., Noguchi, T., Asaba, K., Hossein, P., Nishioka, T., Makino, S., 2004. Urocortins and corticotropin releasing factor type 2 receptors in the hypothalamus and the cardiovascular system. *Peptides* 25, 1711–1721.
166. Rademaker MT, Charles CJ, Espiner EA, et al. Beneficial Hemodynamic, Endocrine, and Renal Effects of Urocortin in Experimental Heart Failure: Comparison With Normal Sheep. *J Am Coll Cardiol* 2002;40:1495- 505.
167. Harada, S., Imaki, T., Naruse, M., Chikada, N., Nakajima, K., Demura, H., 1999. Urocortin mRNA is expressed in the enteric nervous system of the rat. *Neurosci. Lett.* 267, 125–128.
168. Muramatsu, Y., Fukushima, K., Iino, K., Totsune, K., Takahashi, K., Suzuki, T. et al. 2000. Urocortin and corticotropin-releasing factor receptor expression in the human colonic mucosa. *Peptides* 21, 1799– 1809.
169. Saruta, M., Takahashi, K., Suzuki, T., Torii, A., Kawakami, M., Sasano, H., 2004. Urocortin 1 in colonic mucosa in patients with ulcerative colitis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 5352–5361.
170. Bamberger, C.M., Wald, M., Bamberger, A.-M., Ergun, S., Beil, F.U., Schulte, H.M., 1998. Human lymphocytes produce urocortin, but not corticotropin-releasing hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83, 708–711.
171. Kageyama, K., Bradbury, M.J., Zhao, L., Blount, A., Vale, W., 1999. Urocortin messenger ribonucleic acid: tissue distribution in the rat and regulation in thymus by lipopolysaccharide and glucocorticoids. *Endocrinology* 140, 5651–5658.
172. Latchman D (2002) Molecules in focus urocortin. *Int J Biochem Cell Biol* 34:907–910.
173. Bale TL, Giordano FJ, Hickey RP, Huang Y, et al. (2002) Corticotropin-releasing factor receptor 2 is a tonic suppressor of vascularization. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:7734–7739.

174. Wang J, Li S (2007) Corticotropin-releasing factor family and its receptors: tumor therapeutic targets? *Biochem Biophys Res Commun* 362:785–788.
175. Hao Z, Huang Y, Cleman J, Jovin IS, Vale WW, Bale TL, Giordano FJ (2008) Urocortin2 inhibits tumor growth via effects on vascularization and cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:3939–3944.
176. Wang J, Xu Y, Xu Y, Zhu H, Zhang R, Zhang G, Li S (2008) Urocortin's inhibition of tumor growth and angiogenesis in hepatocellular carcinoma via corticotrophin-releasing factor receptor 2. *Cancer Invest* 26:359–368.
177. Zoumakis E, Margioris AN, Makrigiannakis A, Stournaras C & Gravanis A 1997 Human endometrium as a neuroendocrine tissue: expression, regulation and biological roles of endometrial corticotropin-releasing hormone (CRH) and opioid peptides. *Journal of Endocrinological Investigation* 20, 158–167.
178. Ferrari A, Petraglia F & Gurpide E 1995 Corticotropin releasing factor decidualizes human endometrial stromal cells in vitro. Interaction with progestin. *Journal Steroid Biochemistry Molecular Biology* 54, 251–255
179. Zoumakis E, Margioris AN, Stournaras C, et al. 2000 Corticotrophin-releasing hormone (CRH) interacts with inflammatory prostaglandins and interleukins and affects the decidualization of human endometrial stroma. *Molecular Human Reproduction* 6, 344–351.
180. Graziani G, Tentori L, Portarena I, et al. 2002 CRH inhibits cell growth of human endometrial adenocarcinoma cells via CRH-receptor 1-mediated activation of cAMP-PKA pathway. *Endocrinology* 143, 807–813.
181. Gravanis A, Makrigiannakis A, Zoumakis E & Margioris AN 2001 Endometrial and myometrial corticotropin-releasing hormone (CRH): its regulation and possible roles. *Peptides* 22, 785–793.
182. Di Blasio AM, Giraldi FP, Vigano P, Petraglia F, Vignali M & Cavagnini F 1997 Expression of corticotropin-releasing hormone and its R1 receptor in human endometrial stromal cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82,1594–1597.
183. Karteris E, Papadopoulou N, Grammatopoulos DK & Hillhouse EW 2004 Expression and signalling characteristics of the CRH receptors during the implantation phase in the human endometrium. *J Mol Endocrinol* 32, 21–32.

184. I. M. Leitch, A. L. A. Boura, C. Botti, M. A. Read, W. A. W. Walters, and R. Smith, "Vasodilator actions of urocortin and related peptides in the human perfused placenta in vitro," *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 83, no. 12, pp. 4510–4513, 1998.
185. W. Li and J. R. G. Challis, "Corticotropin-releasing hormone and urocortin induce secretion of matrix metalloproteinase- 9 (MMP-9) without change in tissue inhibitors of MMP-1 by cultured cells from human placenta and fetal membranes," *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 90, no. 12, pp. 6569–6574, 2005.
186. E. W. Hillhouse and D. K. Grammatopoulos, "Role of stress peptides during human pregnancy and labour," *Reproduction*, vol. 124, no. 3, pp. 323–329, 2002.
187. S. A. Jones and J. R. G. Challis, "Local stimulation of prostaglandin production by corticotropin-releasing hormone in human fetal membranes and placenta," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 159, no. 1, pp. 192–199, 1989.
188. E. Karteris, E. W. Hillhouse, and D. K. Grammatopoulos, "Urocortin II is expressed in human pregnant myometrial cells and regulates myosin light chain phosphorylation: potential role of the Type-2 corticotropin-releasing hormone receptor in the control of myometrial contractility," *Endocrinology*, vol. 145, no. 2, pp. 890–900, 2004.
189. D. K. Grammatopoulos and E. W. Hillhouse, "Role of corticotropin-releasing hormone in onset of labour," *The Lancet*, vol. 354, no. 9189, pp. 1546–1549, 1999.
190. P. Florio, M. Torricelli, L. Galleri, et al., "High fetal urocortin levels at term and preterm labor," *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 90, no. 9, pp. 5361–5365, 2005.
191. V. L. Clifton, G. Qing, V. E. Murphy, J. Schwartz, G. Madsen, and R. Smith, "Localization and characterization of urocortin during human pregnancy," *Placenta*, vol. 21, no. 8, pp. 782–788, 2000.
192. P. Florio, S. Rivest, F. M. Reis, et al., "Lack of gestation-related changes of urocortin gene expression in human placenta," *Prenatal and Neonatal Medicine*, vol. 4, no. 4, pp. 296–300, 1999.

193. B. Meczekalski, "Placental corticotrophin releasing hormone and urocortin—possible role in mechanism of preterm labor," *Polski Merkuriusz Lekarski*, vol. 21, no. 124, pp. 398–400, 2006.
194. Iavazzo C, Tassis K, Gourgiotis D et al. Urocortin in second trimester amniotic fluid: Its role as predictor of preterm labor. *Hind. Publish. Corpora. Mediators of Inflammation* 2009:1-7.
195. Madhappan B, Kempuraj D, Christodoulou S, Tsapikidis S, Boucher W, Karagiannis V et al (2003) High levels of intrauterine CRH, urocortin, tryptase, and interleukin- 8 in spontaneous abortions. *Endocrinology* 144:2285–2290.
196. Hendrickson MR, Longacre TA, Kempson RL. The Uterine Corpus. In: Sternberg SS, editor. *Diagnostic Surgical Pathology*. 3th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1999. p.2203-2306.
197. Richard L Kempson, Hendrickson MR. Smooth Muscle, Endometrial Stromal and Mixed Müllerian Tumors of the uterus. 2000. The United States and Canadian Academy of Pathology, vol.13, No.3, P.328-342.
198. Taylor HB, Norris HJ. Mesenchymal tumors of the uterus. IV. Diagnosis and prognosis of leiomyosarcoma. *Arch Pathol* 1966;82:40.
199. Burns B, Curry RH, Bell MEA. Morphologic features of prognostic significance in uterine smooth muscle tumors: a review of 84 cases. *Am J Obstet Gynecol*. 1979; 135:109-14.
200. Bell SW, Kempson RL, Hendrickson MR. Problematic uterine smooth muscle neoplasms. A clinicopathologic study of 213 cases. *Am J Surg. Pathol*. 1994;18:535-58.
201. Graziani G, Ferrandina G, Pozzoli G, Vergati M, Muzi A, Legge F, Tentori L, Scambia G & Navarra P 2006 Corticotropin-releasing hormone receptor-1 in human endometrial cancer. *Oncology Reports* 15 375–379.
202. Carlson KW, Nawy SS, Wei ET, Sadee W, Filov VA, Rezsova VV, Slominski A & Quillan MJ 2001 Inhibition of Mouse melanoma cell proliferation by corticotrophin-releasing hormone and its analogs. *Anticancer Research* 21 1173–1179.

203. Coste, S.C., Kesterson, R.A., Heldwein, K.A., et al. (2000). Abnormal adaptations to stress and impaired cardiovascular function in mice lacking corticotropin releasing hormone receptor-2. *Nat. Genet.*, 24, 403 ± 409.

204. Huang Y, Chan F. L., Lau CW et al. Urocortin-induced endothelium-dependent relaxation of rat coronary artery: role of nitric oxide and K⁺ channels. *British Journ. of Pharma.* (2002) 135,1467-1476

205. Mastorakos G, Scopa CD, Vryonidou A, et al. 1994 Presence of immunoreactive corticotropin-releasing hormone in normal and polycystic human ovaries. *J Clin Endocrinol Metab.* 79:1191–1197.

206. Jacobs RA, Oosterhuis J, Porter DG, Lobb DK, Yuzpe AA, Challis JRG. 1991 Immunoreactive adrenocorticotrophin is present in the ovary and in particular the oocyte of several mammalian species. *J Reprod Fertil.* 91:285–291.