

T.C.  
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

ENDOMETRİOSİS  
PATO FİZYOLOJİSİNDE APOPTOZ  
VE ANJİOGENEZİN YERİ VE  
ENDOMETRİOSİS OLGULARINDA  
PERİTONEAL SIVIDA VE SERUMDA  
SİTOKİNLERİN VE İMMÜN HÜCRE  
DAĞILIMLARININ  
DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr.Seda Deniz KIRILMAZ

Kadın Hastalıkları ve Doğum  
Anabilim Dalı  
TIPTA UZMANLIK TEZİ

ESKİŞEHİR  
2007

T.C.  
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

ENDOMETRİOSİS  
PATO FİZYOLOJİSİNDE APOPTOZ  
VE ANJİOGENEZİN YERİ VE  
ENDOMETRİOSİS OLGULARINDA  
PERİTONEAL SIVIDA VE SERUMDA  
SİTOKİNLERİN VE İMMÜN HÜCRE  
DAĞILIMLARININ  
DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr.Seda Deniz KIRILMAZ

Kadın Hastalıkları ve Doğum  
Anabilim Dalı  
TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI  
Prof.Dr.Hikmet HASSA

ESKİŞEHİR  
2007

## TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C.  
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Dr.Seda Deniz KIRILMAZ'a ait "Endometriosis patofizyolojisinde apoptozis ve anjiogenezin yeri ve endometriosis olgularında peritoneal sıvıda ve serumda sitokinlerin ve immün hücre dağılımlarının değerlendirilmesi " adlı çalışma jürimiz tarafından Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih: 06/07/2007

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Hikmet HASSA İmza  
Kadın Hast. ve Doğum Anabilim Dalı

Üye

Prof.Dr. Turgay ŞENER İmza  
Kadın Hast. ve Doğum Anabilim Dalı

Üye

Prof.Dr. Başar TEKİN İmza  
Kadın Hast. ve Doğum Anabilim Dalı

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Yönetim Kurulu'nun / / Tarih ve / Sayılı Kararıyla onaylanmıştır.

Prof.Dr.Özcan BÖR  
Dekan

## TEŞEKKÜR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'nda yapmış olduğum uzmanlık eğitimi süresince bana yakın ilgi ve desteklerini esirgemeyen ve bana yol gösteren kıymetli hocalarım Prof. Dr. Hikmet HASSA'ya, Prof. Dr. Sinan ÖZALP'e, Prof. Dr. Atilla YILDIRIM'a, Prof. Dr. Turgay ŞENER'e, Prof. Dr. Başar TEKİN'e, Prof. Dr. Ömer YALÇIN'a ve Doç. Dr. H. Mete TANIR'a teşekkürlerimi sunarım.

Araştırma sürecinde kendilerine ayırmaları gereken değerli zamanı benimle paylaşan ve değerli fikirleri ile araştırmanın her safhasında karşılıksız yardım ve desteklerini gördüğüm Prof. Dr. Hikmet HASSA ve Doç. Dr. H. Mete TANIR'a ayrıca teşekkürlerimi sunarım.

Araştırmamın gerçekleşmesi için bana gerekli ortamı sağlayan ve tüm imkanları seferber eden Prof. Dr. Sevilhan ARTAN'a, Prof. Dr. Zafer GÜLBAŞ'a ve Doç. Dr. Emine DÜNDAR'a, tez istatistiklerimin hazırlanmasında yardımcı olan Yard. Doç. Dr. Fezan ŞAHİN MUTLU'ya;

Laboratuvar safhasında yardımlarını esirgemeyen ve hatta geç saatlere kadar görev alan Hematoloji, Genetik ve Patoloji bölümü çalışanlarına;

Birlikte çalıştığım asistan arkadaşlarıma içten teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

**Kırılmaz, SD. Endometriosis patofizyolojisinde apoptozisin ve anjiogenezin yeri ve endometriosis olgularında peritoneal sıvıda ve serumda sitokinlerin ve immün hücre dağılımlarının değerlendirilmesi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2007.** Endometriosis reproduktif dönemdeki kadınların %5-15'inde görülmektedir. Kadın sağlığı açısından önemi infertilite, dismenore, dispareni ve abdominal ağrı ile ilişkili olmasıdır. Hastalığın kesin patofizyolojisi tam olarak açıklanamamıştır. Çalışmamızda hastalığın patofizyolojisinde apoptozis ve anjiogenezin yerini ve olgularda hem peritoneal sıvıda hem de serumda sitokin ve immün hücre seviyelerini araştırdık. Mevcut çalışma, kontrol grubu ve endometriosis olgularından oluşan iki alt grup içermektedir. İlk çalışmada, pelvik periton, adezyon, ötopik ve ektopik endometrium ve endometriotik kist cidarında TUNEL, M-30, Bax ve Bcl-2 değerlendirildi. İkinci çalışmada, peritoneal sıvıda ve serumda IL-2, IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$  ve VEGF seviyeleri ve immün hücreler değerlendirildi. Endometriosis olguları ve kontrol grubu arasında sitokinler ve hücre dağılımı açısından fark saptanmadı. TUNEL ve M-30 pozitifliği, endometriotik kist cidarında endometriotik odak ile kıyaslandığında anlamlı olarak artmış saptandı. Ovaryan ve peritoneal endometriosis farklı patogenetik mekanizmalar neden olabilir. Endometriosisin gelişimi ve devamlılığı halen bir merak konusudur. Bu hastalığın kesin mekanizmasını açıklamak için, halen geniş araştırmalara gerek duyulmaktadır.

Anahtar kelimeler: Endometriosis, apoptoz, anjiogenez, sitokin, immün

hücre

## ABSTRACT

**Kırlmaz, SD. Apoptosis and angiogenesis in pathophysiology of endometriosis and cytokines and distribution of immune cells in peritoneal fluid and serum in endometriotic women, Eskisehir Osmangazi University Faculty of Medicine, Medical Speciality Thesis in Department of Gynecology and Obstetrics, Eskişehir, 2007.**

Endometriosis is seen in %5-15 of women of reproductive years. The importance lies in the fact that it may be with infertility, dysmenorrhea, dyspareunia and abdominal pain. The exact pathophysiology of endometriosis is not totally elucidated. In our study we sought the role of apoptosis and angiogenesis in pathophysiology of disease and evaluated the levels of cytokines and immune cells in both peritoneal fluid and serum. The present investigation contained two experiments including both endometriotic and non-endometriotic control women. In the first experiment, TUNEL, M-30, Bax and Bcl-2 were assessed in pelvic peritoneum, adhesion, eutopic/ectopic endometria and in endometriotic cyst. In the second experiment, we evaluated the levels of IL-2, IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$  and VEGF and immune cells in peritoneal fluid and serum. There was no difference for cytokines and immune cells between endometriotic and non-endometriotic women. TUNEL and M-30 were increased in endometriotic cyst wall, compared to those of endometriotic foci. Therefore, different pathogenetic mechanisms may lead to ovarian and peritoneal endometriosis. Development and progression of endometriosis is still a subject of debate. There is still room for large studies, to elucidate the exact mechanism of the disease.

Keywords: Endometriosis, apoptosis, angiogenesis, cytokine, immune

cellc.

## İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLOLAR DİZİNİ	xi
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Endometriosis Patogenezi	3
2.1.1. Transplantasyon Teorisi	3
2.1.2. Çöломik Metaplazi Teorisi	4
2.1.3. Vasküler Yayılım	4
2.1.4. Heredite ve İmmün Sistem	5
2.2. Apoptoz	6
2.2.1. Apoptoz Analizleri	9
2.3. Endometrium ve Apoptoz	11
2.3.1. Normal Endometriumda Apoptoz	12
2.3.2. Normal Endometriumda Bcl-2	12
2.3.3. Endometriosisli Olgularda Apoptoz	14
2.3.4. Endometriosisli Olgularda Bcl-2	15
2.3.5. Endometriosis Fizyopatolojisinde Apoptoz	15
2.4. Anjiogenez ve İmmün Sistem	18
2.4.1. Anjiogenez	18
2.4.2. İmmün Sistem	21
2.5. Endometriosisde Anjiogenez Ve İmmün Sistemin Rolü	22
2.5.1. Endometriosisde Anjiogenez	22
2.5.2. Endometriosis Gelişiminde İmmünitenin Rolü	25

3. GEREÇ VE YÖNTEM	30
4. BULGULAR	41
5. TARTIŞMA	60
6. SONUÇ	72
7. KAYNAKLAR	73



## SİMGELER VE KISALTMALAR

EE	Erken evre
ELISA	Enzym-Linked Immune Absorbent Assay
Fas L	Fas Ligand
GE	Geç evre
ICAM-1	Inter Cellüler Adhesion Molecule-1
IFN	İnterferon
IL	İnterlökin
LAK hücr	Lenfosit aktive killer hücre
L/S	Laparoskopi
L/T	Laparotomi
MMP	Matriks MetalloProteinaz
NK	Natürel Killer
PBS	Phosphate Buffer Saline
PS	Peritoneal sıvı
RANTES	Regulated Upon Activation Normal T-cell Expressed and Secreted
r-AFS	Revizyone American Fertility Society
sd	Serbestlik derecesi
TIMP	Tissue Inhibitory of Metalloproteinase
Th	T helper
Ts	T sitotoksik
TNF	Tümör Nekroz Faktörü
TUNEL	Terminal deoksittransferaz mediated d-UTP biotine nick end labeling
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

## ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 2.1: Apoptotik cisimlerin hücrelerce fagosite edilmesi	6
Şekil 2.2: Nekroz sonucu hücre parçalanması	7
Şekil 3.1: Apoptotik kaskad	9
Şekil 3.2: Endometriosis gelişiminde immün sistem	26
Şekil 4.1: Normal peritoneal dokuda M-30 ve TUNEL pozitifliği	42
Şekil 4.2: Adezyon dokuda M-30 ve TUNEL pozitifliği	44
Şekil 4.3: Ötopik endometriumda M-30 ve TUNEL dağılımı	46
Şekil 4.4: Endometriotik kist cidarında M-30 dağılımı	47
Şekil 4.5: Endometriotik kist cidarında TUNEL dağılımı	48
Şekil 4.6: Sağlam peritonda bax protein boyanma oranı dağılımı	50
Şekil 4.7: Sağlam peritonda bcl-2 protein boyanma oranı dağılımı	50
Şekil 4.8: Ötopik endometriumda glandüler bax protein boyanma oranı dağılımı	51
Şekil 4.9: Ötopik endometriumda stromal bax protein boyanma oranı dağılımı	51
Şekil 4.10: Ötopik endometriumda glandüler bcl-2 protein boyanma oranı dağılımı	52
Şekil 4.11: Ötopik endometriumda stromal bcl-2 protein boyanma oranı dağılımı	52
Şekil 4.12: Ektopik endometriumda bax protein boyanma oranı dağılımı	53
Şekil 4.13: Ektopik endometriumda bcl-2 protein boyanma oranı dağılımı	53

## TABLOLAR

	Sayfa
Tablo 3.1: IL-2, IL-4, IL-10, VEGF ve IFN- $\gamma$ ölçümü duyarlılık (sensitivite) ve çalışma içi ve çalışmalar arası değişkenlik oranları	40
Tablo 4.1: Endometriosis olgularının başvuru şikayetleri	41
Tablo 4.2: Endometriosis olgularında evrelere göre ortalama skorlar	41
Tablo 4.3: EE, GE Kontrol grubu M30 ve TUNEL pozitifliği	42
Tablo 4.4: Peritoneal dokuda M 30 ve TUNEL pozitiflik karşılaştırılması	43
Tablo 4.5: EE, GE Kontrol grubu M30 ve TUNEL pozitifliği	45
Tablo 4.6: Ötopik endometrial dokuda TUNEL pozitifliği dağılımı	46
Tablo 4.7: Ötopik endometrial dokuda M-30 pozitifliği dağılımı	47
Tablo 4.8: Endometriosisli olgularda endometriotik odak ve endometriotik kist cidarında M-30 ve TUNEL pozitiflik dağılımı	48
Tablo 4.9: Endometriosisli olgularda ötopik ve ektopik endometriumda TUNEL ve M-30 pozitifliklerinin dağılımı	49
Tablo 4.10: Endometrisisli olgularda ötopik ve ektopik endometrial glandüler bax proteini boyanma oranı dağılımı	54
Tablo 4.11: Endometrisisli olgularda ötopik ve ektopik endometrial stromal bax proteini boyanma oranı dağılımı	55
Tablo 4.12: Endometrisisli olgularda ötopik ve ektopik endometrial glandüler bcl-2 proteini boyanma oranı dağılımı	55
Tablo 4.13: Endometrisisli olgularda ötopik ve ektopik endometrial stromal bcl-2 proteini boyanma oranı dağılımı	56
Tablo 4.14: Serum ve peritoneal mayide VEGF için mean rank değerleri	56
Tablo 4.15: Erken evre, Geç evre ve Kontrol grubu olgularında serumda sitokinlerin seviyelerinin mean rank değerleri.	57
Tablo 4.16: Erken evre, Geç evre ve Kontrol grubu olgularda peritoneal mayide sitokin seviyelerinin mean rank değerleri.	57
Tablo 4.17: Kontrol grubu, erken evre ve geç evre olgularda serumda T hücre alt grupları ve NK hücrelerin mean rank değerleri.	58
Tablo 4.18: Kontrol grubu, erken evre ve geç evre olgularda peritoneal	

mayide T hücre alt grupları ve NK hücrelerin mean rank değerleri.

## **1. GİRİŞ**

Endometriosis, ilk kez 1860 yılında Von Rokitansky tarafından tanımlanan, endometrial bez ve stromanın uterin kavite dışında fonksiyon gördüğü, klinik ve patolojik bir olaydır. Bununla beraber, hastalık 1921 yılında kendisi tarafından

“çikolata kisti” olarak tanımlanan bir seri perfore hemorajik ovaryan kist ve over üzerindeki lezyonları endometriosis olarak isimlendiren John Sampson ile gündeme gelmiştir (1). Sampson’un “endometrial dokunun pelvik kaviteye menstrüel dağılımı” konusundaki klasik görüşü ise 1927’de yayınlanmıştır (2).

Endometriosis görülme sıklığı infertilite veya pelvik ağrı gibi hastalıkların parçası gibi kaydedildiği ve tanı koymak için cerrahi gerektiği için halen belirsizliğini korumaktadır. Günümüzde üreme çağında kadınların %3-10’da, infertil olguların %25-35’de bulunduğu tahmin edilmektedir. Üreme çağında %35’den fazla kadında pelvik ağrı ve infertilite sebebidir (3).

Günümüzde hastalığı peritoneal, ovaryan ve rektovajinal endometriosis olarak 3 ayrı hastalık şeklinde kabul etmeyi öneren yayınlar bulunmaktadır. Ayrıca minimal ve hafif tipte, orta ve ileri derece hastalığın ayrılması, endometriosis’e bağlı pelvik ağrı ve endometriotik infertilitenin de farklı yorumlanması tavsiye edilmektedir (4).

Laparoskopinin kullanım alanının genişlemesi ile, endometriosis patogenezi ve infertilite ile ilişkisi konusunda çalışmalar peritoneal ortam üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu konudaki ilk çalışmalar, değişen siklus dönemine ait periton sıvısı ve periton sıvısındaki protein miktarı, steroid ve hormonlar ile ilgilidir (5,6). Daha sonraları, peritoneal mayi içindeki sellüler ve biyokimyasal içeriğin endometriosis oluşumundaki rolü araştırılmış ve bu konuda kaynaklarda pek çok çalışma yayınlanmıştır. Peritoneal mayi ortamında bulunan bazı büyüme faktörlerinin ve peritoneal mayideki makrofaj/monosit hücre sisteminden salınan sitokinlerin ( IL, VEGF gibi) endometriosisin oluşması ve devamında rol oynadığı son zamanlarda yapılan çalışmalarda ortaya konmaktadır (7-9,24). Yine hem serumda hem peritoneal sıvıda IGF, endometriosis varlığı ve ciddiyeti ile ilişkilendirilmektedir (10).

Yine son zamanlarda yapılan çalışmalar, endometriosisli kadınlardaki ötopik endometrial hücrelerin apoptoza karşı dirençli olabileceği yönünde sonuçlar içermektedir. Bcl/Bax protein ailesi ve fas-fas-ligand ekspresyon sistemi, her ikisi de apoptozu düzenleyen ve birbirine bağlı olan sistemlerdir. Apoptoza direnç kaviteye dökülen hücrelerin yaşamasını uygun hale getirebilir. Aynı zamanda, makrofaj aracılı immün yanıtı ektopik endometriumun direncini açıklamaya yardım edebilir.

Bu çalışmanın amacı, endometriosis ile anjiogenez ve apoptoz arasındaki ilişkiyi araştırmaktır. Bu amaçla immunolojik cevapta önemli hücre grupları ve sitokinlerin serum ve peritoneal mayide, erken ve geç evre lezyonlarda dağılımı, kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır. Bu şekilde endometriosis ile anjiogenez ve immünoloji arasındaki ilişkinin araştırılması hedeflenmektedir. Eş zamanlı olarak, erken evre endometriosisli, geç evre endometriosisli olgularda ve kontrol grubunda ötopik/ektopik endometrial hücrelerde, pelvik peritonda, apoptotik süreç genetik ve immunhistokimyasal yöntemlerle değerlendirilerek patogeneizde apoptozun yerinin belirlenmesi de hedeflenmektedir.

## **2.GENEL BİLGİLER**

### **2.1 Endometriosis patogenezi**

#### **2.1.1 Transplantasyon Teorisi**

Tek bir mekanizma tüm endometriosis olgularını açıklayamamasına rağmen, çok sayıda kanıt retrograd menstrüasyon ve viable endometrial dokunun implantasyonunu olarak bilinen Sampson'un teorisini endometriosis patogeneğinde primer mekanizma olduğunu desteklemektedir (2,14). Bu kanıtlar;

- Menses sürecinde L/S yapıldığında, patent fallop tüpleri olan kadınların %75-90'ında peritoneal sıvıda kan saptanabilmiştir (15,16).
- Menses sürecinde peritoneal sıvıdan elde edilen viable endometrial hücreler hücre kültüründe yaşayabilmektedir (17,18). Aynı zamanda peritonun mezotelyal yüzeyine yapışmakta ve penetre olabilmektedir (19,20).
- Endometriosis prevalansı, obstruktif müllerin anomalisi olan kadınlarda menstrüel akımı engellemeyen malformasyonu olan kadınlardan daha fazladır (21).
- Erken menarş, kısa menstrüel siklus ve menorajisi olan kadınlarda endometriosis insidansı artmıştır (22).
- Endometriosis, en sık overlerde takiben ön ve arka cul-de-sac, uterosakral ligamentler, uterus arkası ve arka round ligamentte olmak üzere sıklıkla pelvisin askı kısımlarında gözlenmektedir (23,24).
- İnsan dışındaki primatlarda cerrahi olarak indüklenmiş peritoneal endometriosis veya retroperitoneal menstrüel endometrium enjeksiyonu ile deneysel endometriosis oluşturulmuştur (16,26).

### **2.1.2 Çölomik Metaplazi Teorisi**

Çölomik metaplazi teorisine göre, endometriosis çölomik epitelden kaynaklanan (periton ve plevrada lokalize) mezotelyal hücrelerde spontan metaplazi sonucu oluşmaktadır (14). İndüksiyon teorisi ise, menstrüel akım sonucu peritonda

açığa çıkan maddelerin veya diğer stimulusların indüklediği çöломik metaplaziyi içeren varyant bir teoridir. Sampson orijinal yazısında peritoneal endometriosisin “kist içindeki bazı spesifik iritanların peritoneal endotelde hem yapısal hem de fonksiyonel olarak tipik endometrial dokuya gelişime yol açan metaplaziye neden olması” sonucu gelişebileceği belirtilmektedir (1). Bu teoriyi destekleyen görüşler;

- Endometriosis premenarşial bir kızda ve hiç menstrüasyon kanaması olmayan kadınlarda da görülmüştür (27,28).

- Ekstremitelerde gibi alışılmadık periferik alanlarda görülen endometriosisi açıklayabilecek tek teori integre olmayan çöломik epiteldeki metaplazidir.

- Yüksek doz östrojen ile tedavi edilen erkeklerde de nadiren mesane, karın duvarında endometriosis görülmüştür (31).

- Ovaryan yüzey epiteli ve stroma hücreleri, yüksek doz östrojen ile birlikte üç boyutlu kollajen kafeste kültüre edildiğinde endometrial gland ve stromaya dönüşmüştür (32).

Yakın zamanda ortaya atılan kombinasyon teorisine göre ise peritoneal endometriosis retrograd implantasyondan, over endometriosisi çöломik metaplaziden ve rektovajinal endometriosis Müller kanalı kalıntılarında gelişmektedir (3, 4).

### **2.1.3 Vasküler Yayılım**

Çöломik metaplazi, pelvik, torasik, üriner ve umbilikal endometriosisi açıklayabilmekle beraber, kanıtlar göstermektedir ki endometrial hücreler vasküler veya lenfatik transport yoluyla da endometriosisine neden olabilmektedir (33). Akciğer ve perikardda meydana gelen endometriosis vasküler yayılımla açıklanmaktadır (34).

### **2.1.4 Heredite ve İmmün Sistem**

Endometriosis, etkilenmiş olan kadınların birinci derece akrabalarında genel popülasyona göre 6-7 kez daha fazla görülmektedir (35,36). Endometriosis gelişimine predispozisyon sağlayan genler, dökülen endometrial hücrelerin yaşaması,



peritoneal yüzeye yapışması ve invazyonunu, proliferasyonunu, neovaskülarizasyonunu ve inflamatuvar yanıtı kontrol eden direk moleküler olayları kontrol etmektedir (75). Gerçekten de endometriosisli kadınların ötopik endometriumunda hastalığın patogeneziyle bağlantılı bazı gen ürünlerinin anormal ekspresyonu buna kanıttır.

Endometriosisli kadınlardaki ötopik endometrial hücreler apoptosise dirençlidir, normal fakat kompleks gen-aracılı programlanmış hücre ölümü fizyolojik prosesi, siklusun geç sekretuar ve menstrüel fazında endometrial dökülme ve hücre döngüsüne katkıda bulunmaktadır (11,12). Ektopik endometrium apoptoza daha direçli gibi görünmektedir (13). Apoptoza direnç kaviteye dökülen hücrelerin yaşamasını uygun hale getirebilir ve aynı zamanda makrofaj aracılı immün yanıtta ektopik endometriumun direncini açıklamaya yardım edebilir.

Endometriosisli kadınlarda peritoneal sıvı artmış inflamasyon, artmış peritoneal sıvı miktarı, artmış beyaz küre ve makrofaj konsantrasyonu ve bu makrofajların artmış aktivasyonu ile açısından belirgin olarak farklıdır (37). Bu aktive mononükleer hücrelerin biyolojik aktiviteye sahip değişik sitokinler salgıladığı belirtilmektedir.

Hastalığın gelişimine neden olabilecek şekilde, retrograd yolla peritona ulaşan endometrial artığın etkin şekilde ortadan kaldırılmasını engelleyen başarısız bir immün sistem yanıtının sözkonusu olduğu düşünülmektedir. Ancak bu immunolojik anormalliklerin endometriosisine neden olduğu mu, yoksa endometriosisin sonucu mu olduğu, net değildir.

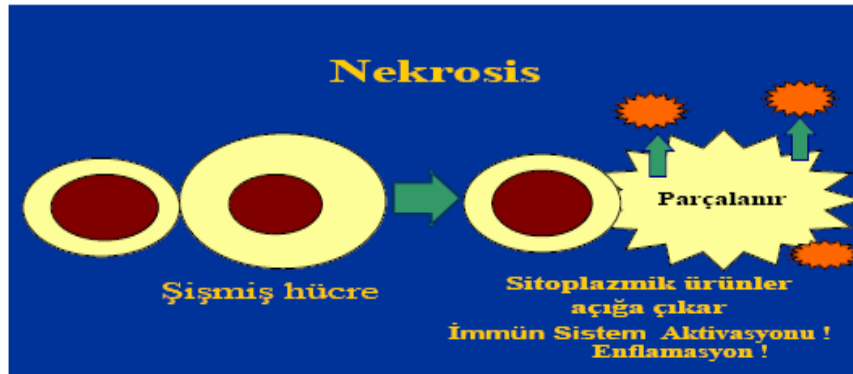
## **2.2. Apoptoz**

“Apoptoz” ya da “programlanmış hücre ölümü” (Apo-, sonlanma , -ptosis, düşme; yaprak dökümü), bir hücrenin tek başına, çevre doku ve hücrelerin hasarlanmasından etkilenmeden yaşamına son vermesidir (38).

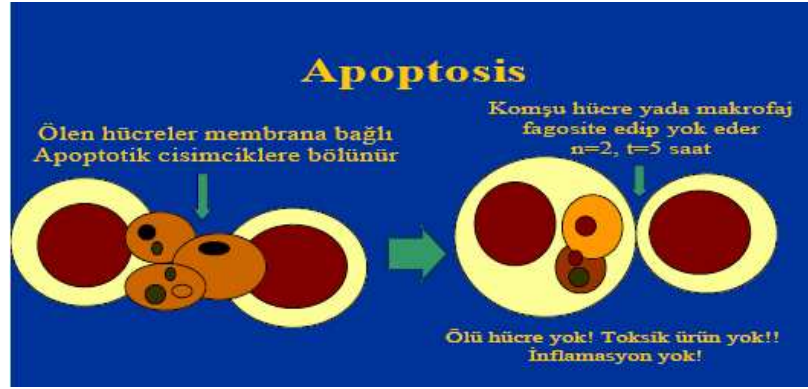
Hücre ölümü ya “apoptoz” ya da “nekroz” ile olur. Nekroz dışardan gelen bir uyarı ile plazma membranında oluşan değişiklikler sonucu olur. Nekrotik hücre; şişme ve plazma membranının yıkılması sonucunda sitoplazmik içeriğini dışarıdaki doku aralığına salar. Hücrenin nekrotik artıkları inflamatuvar hücreleri dokuya çekerek bu dokunun parçalanmasına yol açar ve bu inflamasyon olarak bildiğimiz histolojiye neden olur (39).

Apoptozda biyokimyasal ve morfolojik yapı nekrozda görüldenden farklıdır. Apoptotik olay morfolojik olarak ;

- Hücre büzülmesi
- Kromatin yoğunlaşması
- Sitoplazmik tomurcuklanma ve apoptotik cisimcik oluşması
- Apoptotik hücre veya cisimciklerin fagositozu ile karakterizedir (40).



**Şekil 1.1:** Yüzeylerinde yeni sinyal yapıları ortaya çıkan apoptotik cisimlerin, bu sinyal uyarısıyla yandaki hücre tarafından fagosite edilmesi.



**Şekil 1.2:** Hücrenin fiziksel ya da kimyasal harabiyeti sonucu gelişen hücre nekrozu sonucunda hücrenin parçalanması.

Apoptoz yaşamın ayrılmaz bir parçası olup, hem fizyolojik hem de patolojik olaylarda görülmektedir. Fizyolojik koşullarda apoptoz; embriyogenez esnasında programlı hücre harabiyeti, erişkinlerde hormona bağlı involüsyon (menstrüel siklus gibi), intestinal kript epiteli gibi proliferen hücre popülasyonunun azaltılması, timus gelişimi sırasında immün hücrelerin ölümü gibi olaylarda izlenir (41).

Apoptozun ayrıca birçok hastalıkta rol oynadığı gösterilmiştir. Alzheimer hastalığında nöronların ölmesinde apoptozun önemli bir faktör olduğu bilinmektedir. Bunun yanı sıra; graft versus host hastalığında sitotoksik T hücreleri tarafından hücrelerin ölümü, bazı viral hastalıklarda hücre hasarı (Councilman cisimciği) ile ısı, radyasyon, hipoksi, kemoterapötik ilaçlar ile oluşan hücre ölümleri de patolojik koşullarda oluşan apoptoza örneklerdir (41,42).

Apoptoz; hücreye etraftan gelen yaşam uyarıları ve internal reseptörler arasındaki denge sayesinde hücrenin ölüme uğrayıp uğramamasına karar veren en önemli mekanizmalardan biridir. Eğer hücre, etraftaki hücrelerle ilişkisini kaybederse veya içerisinde onarım yapamayacağı bir hasara uğrarsa apoptoz başlatır (43).

Apoptoz çeşitli yollarla aktive olabilir.

- Fas-Fas ligand
- TNF
- Sitotoksik T lenfosit uyarısı sonucu
- Büyüme faktöründe azalma sonrası
- DNA hasarı sonucu oluşmaktadır (41).

Apoptoz mekanizmasında üç temel grup rol alır. Bunlar: ölüm reseptörleri, adaptör proteinler, proteolitik enzimlerdir.

Ölüm reseptörleri, TNF reseptör gen süper ailesine aittir. Bu reseptör polipeptidlerin sitoplazmik bölümleri, ölüm alanı (death domain) adı verilen bir aminoasit dizisi içerir ve adaptör proteinlere bağlanırlar. Adaptör proteinler, reseptörlerle gelen sinyal sonucunda caspase'lara bağlanıp onları aktive ederler. Caspase'la aktive olan DNAase (caspase-activated DNAase;CAD) aracılığıyla DNA yıkımı olur. Caspase aktivasyonu , uyarana ve hücreye göre değişebilir ve bu nedenle bir çok apoptoz yolunun var olabileceği söylenebilir (38).

Apoptozisin sağlanması için çeşitli yöntemler kullanılır. Bunlar:

- Hücresinin morfolojik incelenmesi
- Membranın geçirgenliği ile ilgili olan testler
- Fosfolipid eksternalizasyonu (Anneksin V boyası)
- Hücreyi geçemeyen boyalar (Hoechst)
- Sitoplazmik membrandan geçip DNA'yı boyayan testler (7-amino-actinomycine D, Propidium iodide)
- Kromatin çekirdeğinin segmentasyona uğraması
- DNA kırılmasının gen analizi
- DNA kırılmasının in situ olarak teşhis (in situ transkripsiyon, TUNEL, tek zincirli DNA'yı boyayan antikorlar, çift zincirli DNA'yı boyayan antikorlar)
- Hücresinin dissolüsyonu (SubG0-G1 analizi)
- Sitoplazmik biyokimyasal aktivasyonu tespit eden testler (caspase yıkım ürünleri, (M30), caspase aktivitesi, PARP aktivitesi, ölüm antijenleri)
- Mitokondrial fonksiyon ve yapının bozukluğunu tespit eden tetkikler (mitokondrial antijenlerin boyanması, metabolik aktivasyon ve sitokrom c açığa çıkmasını ölçen testler) (43).

Henüz apoptoz hakkında bilgilerimiz çok yeterli değilse de, mevcut veriler birçok hastalığın patogenezinin açıklanmasına katkıda bulunmaktadır.

## 2.2.1 Apoptoz Analizleri

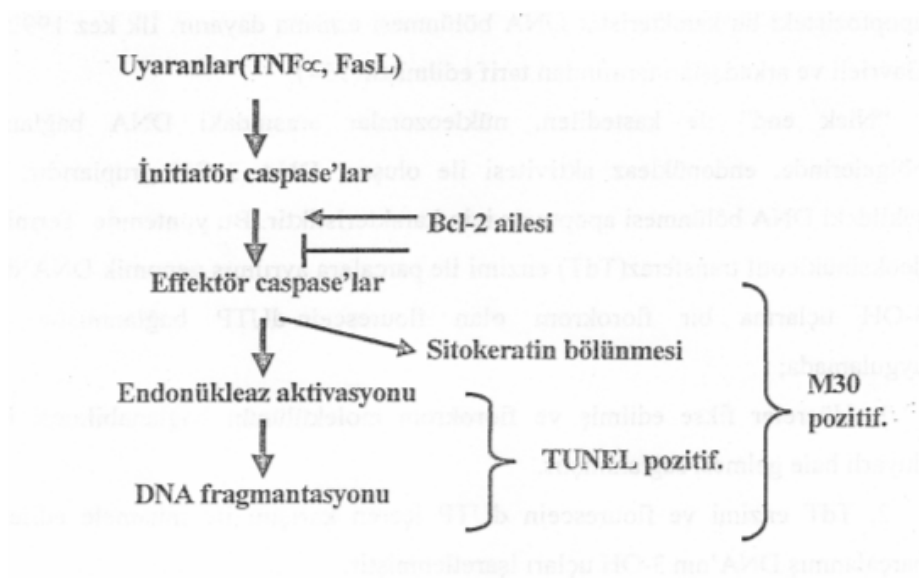
### TUNEL Yöntemi

Programlı hücre ölümü endojen endonükleaz aktivitesi ile beraberdir. En önemli biyokimyasal özelliği kromatin bölünmesidir. Agaroz jelde nükleozomal DNA parçaları merdiven basamağı şeklinde dizilir. TUNEL yöntemi apoptozdaki bu karakteristik DNA bölünmesi esasına dayanır. İlk kez 1992’de Gavrieli ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (44).

“Nick end” ile kastedilen, nükleozomlar arasındaki DNA bağlanma bölgelerinde, endonükleaz aktivitesi ile oluşan, DNA 3-OH gruplarıdır. Bu şekildeki DNA bölünmesi apoptosis için karakteristiktir. Bu yöntemde Terminal deoksiniükleotidil transferaz (TdT) enzimi ile parçalara ayrılmış genomik DNA’daki 3-OH uçlarına bir florokrom olan flourescein- dUTP bağlanmıştır

### M 30 Yöntemi

Sitokeratin 18 (CK18), epitelyal hücrelerde yaygın olarak bulunan intermedier filamentlerdendir. Apoptoza uğrayan epitelyal hücrelerde caspaz aktivasyonu ile CK 18’in bir epitopu ortaya çıkar. Bir monoklonal antikor olan M30 bu epitopu tanır. M30 ile muamele sonrası apoptotik hücrelerdeki sitoplazmik sitokeratin filamentleri agregasyona uğrar, canlı-viable- hücreler ve nekrotik hücrelerde ise bu agregasyon görülmez(45). M30 neo-epitopu oluşumu apoptozun erken dönemlerinde, TUNEL pozitifliğinden önce görülmektedir (45). Şekil 3’de TUNEL ve M 30’un apoptotik kaskaddaki yeri izlenmektedir.



**Şekil 2.1:** Apoptotik kaskadın şematik gösterimi

### **Bcl-2 ve Bax Proteinleri**

Bcl-2 proteini programlanmış hücre ölümünün fizyolojik inhibitörü, apoptozu direkt olarak düzenleyen “genel hücre ölümü süpresör geni” olarak düşünülebilir.

Apoptotik sinyaller mitokondrial membran geçirgenliğinde artışa neden olur. İç mitokondrial membranın porlarının formasyonu, membran potansiyelinin azalmasına ve mitokondriumun şişmesine neden olur. Bu sinyal ile dış mitokondrial membranların permeabilitesinde artış oluşturarak, sitokrom-c mitokondriadan sitoplazma içine boşalır. Sitokrom-c iç ve dış membranlar arasında bulunur. Sitokrom-c salınımı apoptozun morfolojik değişiminde kritik basamak olarak görünmektedir.

Sitokrom-c'nin salınması ile proteolitik enzim caspas aktivasyonuna yardımcı olur. Stratejik olarak mitokondrial dış membrana yerleşen bcl-2 ve diğer üyelerin (bad, bcl-Xl, bax gibi) mitokondriden sitoplazmaya sitokrom-c çıkışını regüle ettiği kabul edilir. Bu geçişin net regülasyonu açık değildir, fakat pro-apoptotik bir üye olan bax'ın sitokrom-c çıkışına izin verecek şekilde kanal oluşturduğu düşünülmektedir. Bcl-2 ise bax'ın kanal oluşturucu etkisini bloke eder (46).

### 2.3 Endometrium ve Apoptoz

Tarihsel olarak menstruasyon, spiral arterlerin kontraksiyonu ile gerçekleşen, endometriumun fonksiyonel tabakasının iskemik nekrozu olarak tanımlanır ve bu süreç seks hormon konsantrasyonuna bağlıdır. Uterus dışında bulunan, endometriuma benzeyen bez dokusu ve stroma olarak ifade edilen endometriosis, genel kadın popülasyonunun % 5-15'ini ve infertilite yönünden araştırılan kadınların % 40'ını oluşturan çok yaygın bir hastalıktır (47). Endometriosisin etyolojisi ve fizyopatolojisi hakkındaki bilgiler oldukça azdır. Metaplazi gelişmesi, müllerian artıklardan gelişmesi, retrograd menstrual akım sonrası implantasyon ve endometriumun büyümesi dahil çok sayıda teori önceki bölümde anlatılmıştır.

Üreme çağındaki kadınların hemen hepsinde endometrial artıklar bir dereceye kadar reflü olmaktadır (48). Retrograd olarak peritoneal kaviteye dökülen menstrual akıntının, canlı endometrial hücre bulundurduğu görülmüştür (49). Retrograd menstrual akım hemen hemen tüm kadınlarda gözlemlendiği halde, neden sadece bazı kadınlarda endometriosis geliştiği konusunda sayısız araştırmalar yapılmış ve birkaç teori ileri sürülmüştür (50). Bu teorilerden birincisi, endometriumun normal peritoneal temizleme yollarına olan direncine dayanmaktadır. İkinci teori, peritoneal mezotelyumun aşırı reseptör bulundurması, makrofajların hiperaktivasyonu ve NK hücrelerinin abnormalitelerini tetikleyen anormal hücrel ve humoral immüniteye sekonder hastalığın ortaya çıktığını öne sürmektedir. Öyle görünüyor ki, genetik olarak uygun bir endometriumun peritoneal ortam tarafından değiştirilmesi, onu invazyona yatkın hale getirmektedir. Retrograd akım gösteren endometrium dokusu ya da değiştirilmiş endometrium, pro-enflamatuar yada hormonal bir ortam yaratarak, hastalığın gelişmesine sebep olabilir (50).

Endometriosisli kadınların ötopik endometriumu, ektopik dokudaki değişiklikleri paylaşmaktadır ve bu değişiklikler hasta olmayan kadınların ötopik endometriumunda bulunmamaktadır. Bu da endometriosisteki primer defektin ötopik endometriumda olabileceğini düşündürmektedir (51). Bu şekilde değişmiş ötopik endometriumdan kaynaklanan ve peritoneal kaviteye dökülen hücre ve doku elemanlarının, peritoneal yüzeylerde implantasyon, büyüme ve endometriosis gelişmesine yol açmaktadır. Ancak bazı araştırmacılar endometriosisli kadınlardaki

ötopik ve ektopik doku arasında izlenen bir çok farklılıkların, peritoneal sıvı farklılıklarından kaynaklandığını söylemektedir (52).

Endometriosisli kadınların ötopik ve ektopik endometriumundaki endometrial değişikliklerden bir tanesi de apoptozun regülasyonundaki değişikliklerdir. Elektron mikroskopik çalışmalar, endometrial epitelial hücrelerin içinde, geç sekretuar fazda, apoptotik cisimciklerin varlığını kanıtlamıştır (53-55).

### **2.3.1 Normal Endometriumda Apoptoz**

Düzenli mens gören kadınların endometrial siklusu üç özgün faz içermektedir. Proliferatif, sekretuar ve menstrual faz. Yapılan çalışmalar apoptozun, siklusun menstrüel ve geç sekretuar fazında, uterin endometriumunun fonksiyonel tabakasından, yaşlanmış hücreleri temizleyerek, hücresel homeostazından korunmasına yardımcı olduğunu öne sürmektedir. Apoptoz, geç sekretuar ve menstrual endometriumun salgı epitelinde saptanmıştır. Proliferatif faz ve sekretuar fazın başlangıcında ise saptanan miktar çok azdır (56,57). Proliferatif fazdaki endometrial hücrelerin proliferasyonu östrojenlerin etkisine bağlıdır. Progesteronun, hücreleri diferansiasyona yönelttiği ve büyümenin sonlanmasına sebep olduğu düşünülmektedir. Normal endometriumdaki apoptozun siklik doğasını düşündüğümüzde, muhtemelen östrojen ve progesteronun bu dokuda apoptoza yol açan sinyalleri düzenlediklerini söyleyebiliriz (56). Vashiwo ve ark. (58) proliferatif fazdaki östradiol konsantrasyonlarının apoptozis paterni ile negatif bağlantı içerdiğini ortaya çıkarmıştır.

### **2.3.2 Normal Endometriumda Bcl-2**

Mitokondriler apoptotik mekanizmada önemli yer tutmaktadır ve regülatuar moleküllerin araya girmesi için etkin bir pozisyon teşkil etmektedir. Bcl-2 ailesi apoptotik süreci hem artırıp, hem de engellemek açısından önemlidir.

Kromozom 18 üzerinde lokalize bcl-2 (B cell lymphoma/leukemia-2) geni, bir hücrenin apoptoza geri dönüşümsüz olarak şartlanmış olup olmadığını ayarlamaktadır (59). Bcl-2 proteini apoptozla ilişkili moleküllerin belki de en iyi karakterize edilmiş olanıdır ve veriler bcl-2 proteininin kesin olarak hücre ölüm supressörü olarak rol oynadığını desteklemektedir. Bugüne dek proliferatif faz



sırasında bcl2'nin insan endometriumunda apoptozu inhibe ettiği düşünülse de, insan endometriumundaki apoptozun kesin mekanizması halen tam olarak bilinmemektedir (54,60).

Endometrial bez ve stromal hücrelerde siklik olarak gözlenen bcl-2, geç proliferatif fazda doruğa çıkmakta ve geç sekretuar ve menstrüel fazda azalmaktadır. Myometrial kas hücreleri ise menstrüel siklus boyunca yeterli bir bcl-2 immunoreaktivitesi sergilemektedir. Bundan dolayı bcl-2 hem endometrial bez hücreleri hem de myometrial çizgisiz kas hücrelerinin yaşaması için önemli bir gen ürünü olabilir (61). Bir çalışmada, bcl-2'nin siklik şekilde ortaya çıkışının levonorgestrel kullanımından sonra gerçekleşmediği gösterilmiştir (61). Bu da steroid hormonların sabit şekilde uygulanmasının, bcl-2'nin ifade edilmesini etkilediğini göstermektedir.

İmmünohistokimyasal boyama yöntemi kullanılarak normal endometriumun bazal tabakasına göre, fonksiyonel tabakasında bcl-2, Fas ve kaspas-3'ün farklı düzeylerde gözlemlenmiştir (62). Antiapoptotik protein olan bcl-2'nin bazal tabakada daha fazla ifade edildiği, buna karşın ölüm reseptörü olan Fas ve kaspas-3'ün endometriumun fonksiyonel tabakasında daha yüksek düzeyde bulunduğu aynı çalışmalarda görülmüştür. Bu sonuçlar endometriumun fonksiyonel biyolojisi ile çok iyi uyum sağlamaktadır. Menstrual siklus boyunca, bazal tabaka daha sabit olduğu için apoptozis bu tabakada daha az bulunmakta, buna karşın siklik büyüme, farklılaşma ve dökülme yaşayan fonksiyonel tabakada apoptoz daha yüksek oranda görülmektedir.

Bu güne kadar bcl-2 ailesinin 15 geni tarif edilmiştir. Bcl-2 gen ailesinin diğer üyeleri, bcl-2'den bağımsız olarak ya da bcl-2'nin görevlerinin tamamlayıcısı olarak, apoptoz mekanizmalarını kontrol etmede rol almaktadırlar. Bcl-2 ailesinin üyeleri, homodimerik ve heterodimerik bağlantılarla haberleşmektedirler. Böylece bir hücrenin potansiyel bir apoptotik stimulusa duyarlılığı, o hücrede o andaki proapoptotik ve antiapoptotik bcl-2 aile üyeleri ile saptanabilir (61).

Bax, bcl-2 aile üyesidir ve hücrenin ölüm hassasiyetini arttırmaktadır. Bunu da muhtemelen heterodimer etkileşim aracılığı ile bcl-2'nin hücrenel yaşam üzerindeki etkisine karşı gelmekle gerçekleştirmektedir (63). Tao ve ark. (64), Bax

proteini seviyelerinin, proliferatif endometriumda çok az sayıda olduğunu ve apoptozun en fazla olduğu sekretuar fazda arttığını bildirmiştir.

Bcl-2 insan endometriumunda önemli antiapoptotik faktördür. Sekretuar fazda endometrial hücre turnoveri sırasında indüklenen Bax ise mens ile ilişkilidir (63). Bax, bcl-2 ailesinin bir başka proapoptotik üyesidir ve kısmen bcl-2 ile etkileşerek, memeli hücrelerinde apoptozu hızlandırmaktadır (65).

Ovaryan steroidler bcl-2 ve bax aktivitesinin up ve down regülasyonu aracılığı ile endometrial apoptozu kontrol ederler. Endometrial bez hücrelerindeki bcl-2'nin siklik bir şekilde aktive edilmesi, siklus sırasında östrojen ve progesteron reseptör paternindeki değişikliklerle ilişkilidir. Bu konuda yapılan çalışmalarda, antiprogestin ile tedavi edilmiş hastaların endometrial bez ve yüzey epitelinde, bcl-2 proteininde artış gözlenmiştir. Yine bu çalışmalar, bcl-2 protein aktivitesinin östrojen ile arttığı, progesteron ile baskılandığını göstermektedir (54,66,67).

### **2.3.3 Endometriosisli Olgularda Apoptoz**

Endometriosisli kadınların ötopik endometriumu ile normal kadınların endometriumu karşılaştırılınca bazı temel farklılıklar gözlenir. Bunlar; yapısal anomaliler, proliferasyon, immun komponentler, adhezyon molekülleri, proteolitik enzimler ve onların inhibitörleri, steroid ve sitokin üretimi, cevap verme, gen ekspresyonu ve protein üretimi ile ilgili anomali gibi çok çeşitli anormallikler şeklinde kendini gösterebilmektedir (51). Bu farklılıklar, peritoneal kaviteye retrograd yol ile ulaşan endometrial hücrelerin yaşamasını sağlayarak, endometriosis'e neden olmaktadır. Hassa ve ark. (68) sıçanlarda uterus parçalarını implante ederek, %62 oranında endometriosis oluşturmuşlardır. Etyopatogenezdeki mekanizmalardan ilgi toplayan bir tanesi de, endometriosisli hastaların ötopik ve ektopik endometrial hücrelerinde olan apoptotik süreçtir.

Endometriosisli kadınlarda peritoneal kaviteye reflü olan endometrial hücrelerde apoptoz yüzdesinin çok azaldığı görülmektedir (69). Yine endometriosisli kadınların glandüler epitelindeki apoptoz indeksi, kontrol gurubuna göre, daha düşüktür. Endometriosisli hastalarda apoptozdaki siklik variabilite kaybolmuştur.

Apoptotik indeks düşüklüğü, endometrial hücrelerin ektopik yaşamasını ve implantasyonunu kolaylaştırırsa, apoptozis seviyesi ve hastalığın ciddiyeti arasında

ters bağlantı olabilir düşüncesi ile, Dmowski ve arkadaşları 2001 de bir çalışma yaparak endometriosisli hastaları hastalığın evresine göre apoptotik indeks yönünden analiz etmişlerdir. Bu çalışma sonunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmamasına karşın artan evre ile apoptozun azalma eğilimi olduğu dikkati çekmiştir (70).

#### **2.3.4 Endometriosisli Olgularda Bcl-2**

Endometriosisli olguların ötopik endometrial bez hücrelerinde bcl-2 siklik bir pattern ile eksprese olur, bu siklik değişiklikler peritoneal ve ovarian endometriotik dokularda görülmez (71). Peritoneal endometriotik dokudaki stromal hücrelerde apoptoz gözlenmez. Bunun nedeni ektopik dokulardaki stromal hücrelerde bcl-2 'nin fazlaca ekspresyonudur. Bu aşırı ekspresyon, ektopik stroma tarafından üretilen artmış sayıdaki östrojen reseptörleri ile direkt bir ilişki içindedir (72,73).

Endometriosisli kadınların proliferatif ötopik endometriumunda sağlıklı kadınların proliferatif endometriumuna göre daha fazla bcl-2 protein ekspresyonu vardır. Aynı fazda bax ekspresyonu görülmez. Sekretuar fazda ise her iki taraftan Bax ekspresyonu artmış oranda görülür. Endometriosisli ötopik endometriumda bcl-2'nin değişen ekspresyonu, apoptotik hücre sayısının düşmesine neden olur ve sonuç olarak ektopik lokalizasyonlarda bu hücrelerin yaşama kapasitesi artar (74).

#### **2.3.5 Endometriosis Fizyopatolojisinde Apoptoz**

Mevcut veriler, endometriosisli kadınlar ve normal kadınlardan elde edilen endometrial hücreler arasında temel farklılıkların olduğunu göstermektedir. Endometriosisli kadınların endometrial hücreleri, ektopik yerlerde implante olarak yaşayabilme ve artmış proliferasyon yeteneğine sahiptir. Endometrial dokunun spontan apoptoza hassasiyetinin bozulması, anormal implantasyon ve endometriumun ektopik yerlerde büyümesine zemin hazırlar.

Endometrial hücrelerin bir ölüm sinyali içermemesi ya da hücre ölümüne karşı gelebilmeleri, bu hücrelerin, antiapoptotik faktörleri (ör:bcl-2) arttırması, apoptoz öncül faktörleri örneğin bax protein azaltması ile ilişkilidir (75). Endometriosisli hastaların ötopik endometriumundaki anormal apoptozun primer olarak yada pelvik endometrial yayılıma sekonder olarak geliştiği tam olarak açık

değildir. Klinik prezentasyon ve teşhis sırasında bu kadınlarda hastalık zaten mevcut olduğu için erken gelişimsel dönemleri incelemek zordur.

Menstrüasyon sırasında endometrial fragmanların peritoneal kaviteye retrograd yolla yayılması siktir. Normal durumlarda, hücre dışı matrikse yapışmayan hücreler, kendi adhezyon reseptörlerinden farklı uyarı aldıklarında apoptoza uğrarlar. Endometriosisli kadınlarda bu hücreler peritonun mezotelyal hücrelerine yapışma, prolifer olma ve neoangiogenez oluşturma kapasitesine sahiptirler ve bu da aktif endometriosis gelişmesi ile sonuçlanır. MMP'nin apoptotik faktörler üzerindeki etkisi ve steroid hormonlarla regülasyonu, endometrial hücre döngüsü ve endometriosis gelişimi için gerekli olan invazif süreç arasında bir bağlantı sağlamış olur (76).

Ötopik endometrium ve endometriotik dokularda değişen apoptozis, endometriosisin fizyopatolojisini aydınlatılabilen bir gerçektir. Ancak bu değişikliklerin, hastalığın gelişimi sürecinde bir sonuç olarak mı geliştiği, yoksa hastalığın sebebi mi olduğu tam açık değildir. Endometriosisin gelişimi ve devamına yol açan, altta yatan mekanizmalar hala merak edilen bir konudur.

Son çalışmalar, bireyin endometriosisse duyarlılığının, genetik faktörler tarafından etkilendiğini öne sürmektedir. Somatik kromozomlardaki genetik alterasyonlar ve tümör süpressör genlerini inaktive eden DNA delesyonları, endometriosisin başlangıcı, devamı ve ilerlemesinde katkıda bulunabilir denilmektedir (77). Bu çalışmalar, ovarian endometrioma ve ovarian kanser arasında ortak bir bağ olduğuna kanıt olarak gösterilmektedir (78). Endometriosisli hastaların değişmiş gen ekspresyon profili için yapılan CDNA mikroassay analizi ilginç bir bakış açısı sağlar. Bu metot kullanılarak 2003 te yapılan bir çalışmada, endometriosisli kadınlarda 97 upregüle edilmiş ve 337 down regüle edilmiş genler bulunmuştur. Apoptozla ilgili genler (GADD34, GADD45A, GADD45B, PIG11) ve tümör süpressör geni p53'ün endometriotik dokularda down regüle olduğu görülmüştür (79).

Bu bulgular endometriosisde apoptotik mekanizmayı düzenleyen gen ürünlerini bulmak, endometriosisin tedavisi ve teşhisini koymak için moleküler hedef açısından önemli bilgiler sağlayabilir. Endometriosisli kadınların apoptozla ilişkili gen ekspresyonundaki değişiklikler, bu hastalığa olan bireysel hassasiyeti

açıklamakta ve endometriosisin neden sadece bazı kadınlarda geliştiği sorusuna cevap olmaktadır.

## 2.4. Anjiogenez ve İmmun Sistem

### 2.4.1 Anjiogenez

Mevcut kan damarlarından yeni kan damarlarının gelişmesi demek olan anjiyogenez, vücutta doğal olarak ortaya çıkan bir süreç olup, bazı durumlarda patolojik de olabilir. Fizyolojik anjiyogenez; embriyogenez, yara iyileşmesi ve kadın üreme sisteminde gözlenir (80).

Proanjiogenik ve anti anjiogenik faktörler arasındaki denge bozulduğunda anjiogenez kontrol edilemez. İnflamatuvar hastalıklarda (artrit, kronik inflamasyon, inflamatuvar bağırsak hastalıkları, psöriazis), çeşitli kanserlerde (meme, mesane, kolon, akciğer, nöroblastom, melanom, böbrek, pankreas, uterus, serviks, glioblastom) ve göz hastalıklarında (yaşla ilişkili maküler dejenerasyon, proliferatif retinopati) anjiyogenez patolojik olarak ortaya çıkmaktadır Periferik arter hastalıklarında ve gecikmiş yara iyileşmesinde ise anjiyogenezin yetersizliği söz konusu olmaktadır (81-83).

Primordial damarsal sistemin gelişimi vaskülogenez olarak tanımlanır ve ilkel damarsal ağı oluşturmak üzere endotelial progenitor hücrelerin embriyonik ve embriyo dışı mezoderm içerisinde farklılaşmasını kapsar. Damarsal ağlarının uzanması ve değişimi için yeni kapillerlerin oluşması, tomurcuklanma ve önceden oluşan damar ağının yeniden düzenlenerek küçük ve büyük damarları oluşturması gereklidir (84).

Gelişen damarsal yapıların birbiri ardı sıra olgunlaşmaları ise perivasküler hücrelerin yeniden yapılanmasına ve bazal membran üzerinde yapılaşmasını sağlayan faktörlerin varlığına bağlıdır. Embriyonik damarsal sistemin gelişmesi esnasında meydana gelen olaylar ve embriyonun oksijen ve besin ihtiyacı, aynen erişkin bir organizmada anjiogenez oluşumunda, özellikle hipoksinin aktive ettiği metabolik cevaplarla benzerlik gösterir (85,86).

Anjiogenez oldukça karmaşık bir mekanizma ile gerçekleşir. Hücre dışı matriks ve matriksi çevreleyen hücrelerden salınan pekçok büyüme faktörü, sitokinler ve bunların reseptörleri anjiogenezde temel rol oynar (86-88).

Yeni damar oluşumu aşağıda belirtilen olayları kapsayan çok basamaklı bir süreçtir: i. Bazal membranın proteolitik enzimler tarafından yıkılması, ii. Endotel

hücre aktivasyonu, proliferasyonu ve göçü, iii. Tubul oluşumu ve olgunlaşma, damar stabilizasyonu ve ekstrasellüler matriksin yeniden şekillenmesini içermektedir.

*i. Bazal Membranın Proteolitik Enzimler Tarafından Yıkılması*

Anjiyogenez süreci damar endotelini döşeyen kollajen, laminin gibi glikoproteinlerden ve heparan sülfat gibi proteoglikanlardan oluşan bazal membranın proteolitik yıkımı ile başlar (89).

Endotel hücreleri göç etmek ve çoğalmak üzere uyarıldığında membran ve hücreler arasında bir bölünme meydana gelir. Normalde, endotel hücreleri yayılma etkisi göstermeyen tek bir tabaka oluştururlar. Ancak anjiyogenez sırasında çoğalıp yayılma gösterirler. Normal, hastalıklı ya da hasarlı dokularda üretilip salgılanan anjiogenik büyüme faktörleri komşu dokulara difüzyon yolu ile geçer. Anjiogenik büyüme faktörleri yakınındaki önceden var olan kan damarlarının endotel hücrelerinde bulunan özgün reseptörlere bağlanırlar. Büyüme faktörleri tarafından aktive edilen proteolitik enzimler bazal membranın ve endotel hücrelerini döşeyen ekstrasellüler matriks (ECM) bileşenlerinin yıkımına neden olur. ECM'nin enzimatik yıkımını, endotel hücrelerinin uyarılması ve kapiller filizlenme izler (90).

*ii. Endotel Hücrelerde Göç ve Çoğalma*

Anjiogenik uyarı, proteolitik yıkım ile kısa bir süre sonra endotel hücreleri aktive eder. Endotel hücreleri hücre dışı matrikse göç eder ve çoğalır. Bu süreçte etkili anjiogenik faktör vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF)'dir (91).

*iii. Kapiller Oluşumu ve Damar Olgunlaşması*

Endotel hücre çoğalmasından sonra ECM bileşenlerinin depolanması ve bir araya getirilmesi için ekstrasellüler proteoliz mutlaka lokal olarak inhibe edilmelidir. Kapiller filizlenme oluştuktan sonra yine bu filizlenmenin ucunda yeni oluşmuş ECM'de yıkılma ortaya çıkar ve bu sayede daha ileri yayılımı mümkün olur. Bazal membranın yıkılması endotel hücre göçüne ve filiz oluşumuna izin verir. Endotelin yol alması ve uzaması sırasında hücre içi ve hücreler arası boşlukta, sonunda kendilerinden damarların oluştuğu lümenler gelişir. Böylece, ekstrasellüler matriks proteolizinin birbirini sırayla izleyen aktivasyon ve inhibisyonları sonucunda

kapillerler oluşur. Proteolitik yıkılma ve endotel hücresi göçünden sonra yeni oluşan kapillerler, yeni bazal membranı oluştururlar.

Bu nedenle, endotel hücrelerinin yeni kapiller yapılar oluşturabilmeleri için birbirlerine ve ECM'e tutunma gereksinimi vardır. Damar olgunlaştıktan ve uygun anjiyogenez ortaya çıktıktan sonra anjiyogenik faktörlerde azalma görülürken, anjiyogenez inhibitörlerinde artış gözlenir. Böylece endotel hücreleri anjiogenetik süreçten uzaklaşır ve oluşturulmuş damarlar kan akımını başlatmaya hazır hale gelmiş olur (92).

### 2.4.2 İmmün Sistem

İmmün sistemin primer amacı vücudu antijenlere karşı korumaktır. İmmünite hızlı, non-spesifik yanıt veren doğuştan veya bir antijen tarafından uyarılan spesifik yanıtla sonuçlanırsa kazanılmış şekilde olabilir (93). Doğuştan olan immünite bir hafıza yanıtına sahip değildir ve makrofaj, nötrofil, NK ve eozinofil hücrelerle ilişkili lizozimler, komplemanlar ve akut faz reaktanları aracılığı ile olur. Kazanılmış immünite, doğuştan olan immünite ile nötralize edilemeyen veya yok edilemeyen bir immünojen tarafından oluşturulur. Kazanılmış immünite T ve B hücreler ve onların salgıladığı Ig ve sitokinler aracılığı ile olur ve hızlı bir hafıza söz konusudur.

Antijen sunucu hücre olarak bilinen, ağırlıklı olarak makrofajları içeren dendritik hücre, fibroblast ve endotel hücreleri antijenleri içine alır, parçalayıp işlemiden geçirdikten sonra hücre yüzeylerinde immünolojik kompleksler olarak sunarlar (94). Bu immün kompleksler hem T helper, hem de NK hücreler ile ilişki kurabilirler. T hücreler sadece küçük antijenik peptidleri tanırlar ve MHC determinantlarına bağlanmaları gerekmektedir. NK hücrelerin ise MHC moleküllerine bağlanmaları gerekmez. Antijenleri tanıyabilir veya direk kendi salgıladıkları sitokinler ile hücre lizisi ya da T hücre aracılı immüniteyi aktive ederek yanıt oluşturur.

T hücre aktivasyonunu takiben Th1 ve Th2 hücrelerden olmak üzere iki farklı grup sitokin salgılanır. IL-2, IL-12, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  ve IFN- $\gamma$ 'yı içeren Th1 kaynaklı sitokinler genelde hücrel immün yanıtta rol alırken, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 ve IL-13 gibi Th2 sitokinleri B hücreleri aktive eder ve antikör salgılayan plazma hücrelerine



farklılaşmalarını sağlar. En iyi immün yanıt göstergesi IL-4'ün IFN- $\gamma$ 'ya oranıdır (95). Bununla beraber bazı antijenler T hücreler olmaksızın direk B hücreleri etkileyebilir. Bu durumda sadece IgM salgılanır. Bazı antijenler, major görevi spesifik immün yanıtı azaltmak olan lenfosit popülasyonlarını etkileyebilir. Bu süpresör hücreler antijeni tanıyarak ve B hücreleri inhibe eden IFN- $\gamma$  veya T ve B hücreleri inhibe eden TGF- $\beta$  salgılamak gibi değişik mekanizmalarla fonksiyon gösterir.

## 2.5. Endometriosisde Anjiogenez ve İmmün Sistemin Rolü

### 2.5.1 Endometriosisde Anjiogenez

Anjiogenez yeni kan damarları oluşmasıdır ve insanda menstrüel siklus için esas olan bir yapılanmadır. Uterin endometrium gelişme ve dökülmelerin düzenli siklusuyla giden dinamik bir dokudur ve rutin, fizyolojik olarak anjiogenezin görüldüğünün tanımlandığı birkaç erişkin dokusudan biridir (96). Anormal anjiogenez endometrial kanser, endometriosis, menoraji ve kırılma kanaması gibi endometriumla ilgili birkaç hastalık ile birlikte görülebilir. Pek çok anjiogenik mekanizma ve düzenleyici faktörün tanımlanması, endometriumun anjiogenez çalışma modeli olarak değerlendirilmesini gündeme getirmiştir (97).

#### *Endometriosisde Vasküler Gelişim*

Endometriosisin yüksek prevalansına rağmen, hastalıkla ilgili altta yatan genetik ve patofizyolojik mekanizmalarla ilgili nispeten az bilgi mevcuttur. Laparoskopi süresince aktif endometriotik lezyonlar damarlanma fazlalığı nedeniyle kolayca tanınabilmektedir. Endometriotik hücreler hem lokal, hem de uzak mesafeye metastaz yapabilmekte, diğer dokulara yapışmakta, invaze etmekte ve hasar vermektedirler. Anjiogenez endometriotik odakların oluşması için gerekli maddeleri sağlayan vital bir yapılanmadır (98).

Anjiogenez sadece implantasyon için temel bir durum olmayıp aynı zamanda endometriosisin klinik aktivitesi için de bir parametredir. Pigmente ve non-pigmente endometriotik lezyonların klinik aktivitelerinin ve anjiogenik potansiyellerinin farklı olduğu gösterilmiştir. Ektopik endometriumun anjiogenik aktivitesinin endometriosis patogenezi için bir tetikleyici olduğu varsayılmakta ancak bunun pek çok faktör tarafından düzenlendiği iddia edilmektedir (99).

Patolojik ve fizyolojik anjiogenez karşılaştırıldığında öncelikle başlangıç uyarıları farklılık göstermektedir. Hipoksi, asidoz, lokal inflamasyon ve endotelial hücre hasarı gibi değişik faktörler patolojik süreçlerde yeni anjiogenezi ortaya çıkarabilmektedir (98). Endometriosisdeki anjiogenezin tüm bu özellikleri paylaştığı henüz netlik kazanmış değildir.

Endometriosis pek çok bioaktif molekülün kontrolü altındadır ve yeni damarlanmayı kolaylaştıran 10-20 farklı faktör bilinmektedir (97-99). Endometriotik lezyon mikroçevresindeki hipoksi ve asidoz VEGF ve PIGF gibi büyüme faktörlerini uyarmaktadır.

#### *Peritonda Anjiogenez İndüksiyonu*

Dökülmüş endometrial dokunun abdominal kaviteye ulaşması lokal bir steril peritoneal sıvı inflamatuvar sürecini indüklemektedir. Bu peritoneal mayi çoğu polimorf nüveli lökositlerden ve aktive makrofajlardan salınan çok sayıda büyüme faktörü ve sitokini içermektedir (100). İnflamatuvar reaksiyonun fizyolojik rolü ektopik hücre ve dokuyu abdomenden temizlemektir. Bu sistem, mikroskopik endometriosis aralıklı olarak tüm patent fallop tüpü olan ve menstrüel siklusu olan kadınlarda bulunduğundan çok etkin bir sistem gibi görünmemektedir (101). Bu hücrelerin varlığı artmış bir oksidatif stress ve inflamatuvar sitokin, kemoatraktan ve vazoaktif maddelerin konsantrasyon artışı ile sonuçlanmaktadır. Bu maddeler dökülmüş endometrial doku ve peritoneal yüzey üzerine kaçınılmaz etkiye sahiptir. En önemli vazoaktif madde vasküler endotelial büyüme faktörü/vasküler permeabilite (VEGF/VPF) faktördür. Damar permeabilitesini artırır ve endometrial hücreleri aktive eder. VEGF menstrüel faz süresince hipoksik endometrial hücreler tarafından büyük miktarlarda üretilmektedir (102). VEGF aynı zamanda menstrüel akım içinde makrofajlar ve T-hücreler tarafından ve mezotelyal hücreler tarafından aktive edilmektedir (103,104).

VEGF'nin peritoneal yüzeyde vasküler değişiklikleri indüklediği yapılan gözlemlerle gösterilmiştir. Ayrıca peritoneal mayide varolan çözünmüş maddelerin anjiogenezini indüklediği gösterilmiştir (105). Buna göre, bazılarında VEGF tarafından aracılık edilen erken vasküler cevaplar, endometrial dokunun hızlı vaskülarizasyonu için peritoneal yüzeyi hazırlıyor olabilir.

Peritoneal mayi içindeki faktörlerin sistemik etkisi olmadığı tartışılmaktadır. Birtakım bulgular peritoneal mayide yeterli konsantrasyonda bulunan küçük faktörlerin dolaşıma geçtiğini ve sistemik bir yolla endometriotik lezyonlardaki aktivasyon-inhibisyon değişikliklerini sağladıklarını desteklemektedir (106).

VEGF'nin endometrial anjiogenezdeki rolü üzerinde çalışılan konulardan biridir (102-106). Endometriumun büyüme ve farklılaşması ve damarlanması östrojen ve progesteron hormonlarının kontrolü altında olmasına rağmen bu steroidlerin etkilerini büyük oranda değişik büyüme faktörlerine etki ederek indirek yoldan yaptığı düşünülmektedir. Anjiogenez olayında, en önemli faktörlerden biri, kuvvetli bir endotel hücre mitojeni olan aynı zamanda permeabilite artışı sağlayan ve inflamasyon ve diğer patolojilerde rol oynayan VEGF'dir (107). Ovaryan steroidlerin in vivo ve in vitro endometrial VEGF mRNA ve proteinlerinde dalgalanmalar yaptığına rağmen toplam endometrial VEGF üretiminin endometrial anjiogenez ile bağıntılı olmasına gerek olmadığı açıktır (108).

VEGF ve endotel hücre proliferasyonu üzerine östrojenin hızlı etkisine zıt olarak progesteronun etkisiyle yavaş ve daha düşük düzeyde etkisi vardır (109).

Epitelyal, stromal veya total VEGF mRNA ve protein düzeyleri ile menstrüel siklus ve endotel hücre proliferasyonları arasında ilişki olduğuna dair görüş birliği olmamasına rağmen, insan endometriumunda şiddetli immun yanıt veren odak gözlenmiştir (110,111). Bu odakların çoğu damarlar içindedir. İmmunhistokimyasal yöntemler kullanılarak tam kat endometrial kesitlerde, endotel hücre proliferasyonu ile ilişkili VEGF bulunmuştur (112). Sekretuar fazla karşılaştırıldığında proliferatif fazda VEGF sekrete eden mikrodamarlar sayısında belirgin fazlalık mevcuttur. Fokal VEGF lokal olarak marjine olmuş ve yapışmış nötrofiller içeren mikrodamarlar ile ilişkilidir. Lökositlerin endometrial endotel hücre proliferasyonu uyaran VEGF'nin bir kaynağını sağladığı hipotez edilmektedir (113).

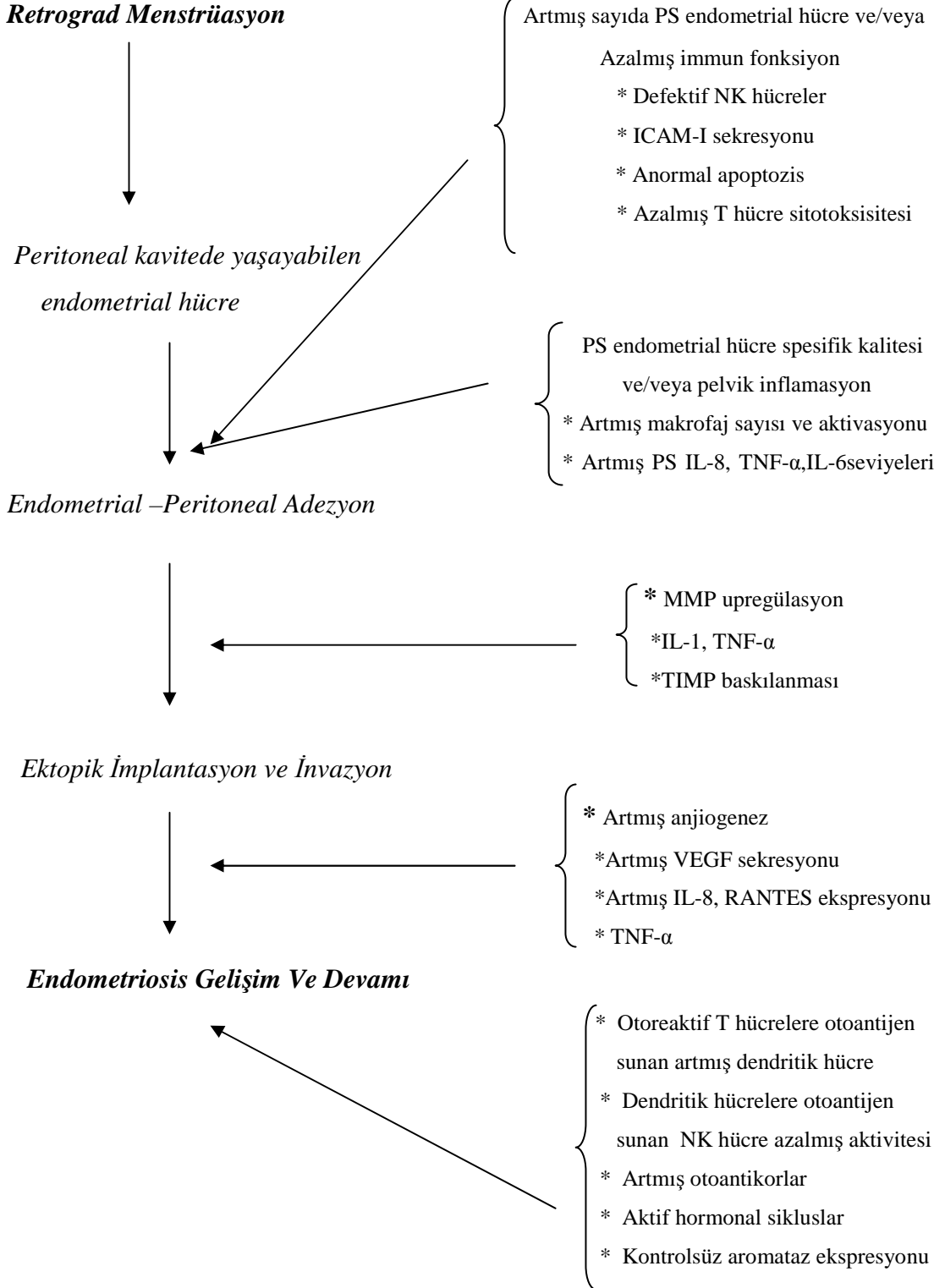
Nötrofil kaynaklı VEGF'nin endometriuma nötrofil göçünü modüle edebileceği ve VEGF ile indüklenen anjiogenez ve inflamasyonda bu otokrin mekanizmanın rol oynayabileceği hipotezlerden biridir (114). Nötrofillerin seviyesinin arttığı sekretuar fazda değil de, östrojenin yürüttüğü proliferatif faz boyunca endometrial anjiogenezde bir rolü olduğunun düşünülmesi de ilginç gelişmelerden biridir (114). Endometrial anjiogenezde nötrofillerin rolünün anlaşılması için daha fazla araştırmaya gerek duyulmaktadır.

### 2.5.2 Endometriosis Gelişiminde İmmüntenin Rolü

Endometriosisli kadınlarda peritoneal sıvı artmış inflamasyon, artmış peritoneal sıvı miktarı, artmış beyaz küre ve makrofaj konsantrasyonu ve bu makrofajların artmış aktivasyonu açısından belirgin olarak farklıdır (115). Bu aktive mononükleer hücrelerin biyolojik aktiviteye sahip değişik sitokinler salgıladığı hipotez edilmektedir. Sitokinler peritoneal makrofajlar, lenfositler, ektopik endometrial implantlar ve peritonun mezotelyal hücreleri tarafından sentezlenen düşük molekül ağırlıklı proteinler veya glikoproteinlerdir (116). Endometriosisli kadınlarda peritoneal sıvıda aktive makrofaj tarafından IL-1, IL-6, IL-8 ve TNF- $\alpha$  gibi birkaç sitokinin ekspresyonu kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, endometrial hücrelerin implantasyonu ve endometriosis gelişimini kolaylaştıran bir peritoneal mikroçevreye katkıda bulunabildiği öne sürülmektedir (117). Aslında, IL-8 ve TNF- $\alpha$  gibi sitokinlerin endometrial hücre proliferasyonu, endometrial adezyon ve anjiogeneze öncülük ettiği bilinmektedir. Endometriosisi olan kadınlarda sadece peritoneal makrofaj değil, aynı zamanda periton kaynaklı mezotelyal hücreler ve endometriotik lezyonlar da IL-1 ve TNF- $\alpha$  gibi sitokinler salgılamaktadır. Bu sitokinler IL-8 gibi diğer sitokinleri ve normal T hücre ekspresyonu ve sekresyonlarını da stimüle etmektedir. T hücre ekspresyonu ve sekresyonu, makrofajlar, T lenfositler ve eosinofiller için kuvvetli bir uyarıcı ve aktivatörken, IL-8 ise anjiogenez için kuvvetli bir uyarıcı ve aktivatördür (118,119). CD4 Th hücreler IL-2, IL-12 ve IFN- $\gamma$  salgılayan Th1 ve IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 ve IL-13 salgılayan Th2 hücreler olmak üzere ikiye ayrılır (52). Hücre aracılı immünite, özellikle T hücre aracılı olan Th1 ve Th2 tarafından üretilen sitokinlerin sitotoksikiteyi aktive veya suprese etmesiyle olur. Örneğin, Th1 tarafından sitotoksik NK'yı aktive eden IL-12 salınırken, Th2 IL-10 üreterek NK hücre aktivitesini azaltabilmektedir (52).

Endometriosisli olgularda peritoneal sıvı ve periferel kan hücre içerikleriyle de ilişkili farklılıklardan söz edilebilir. Sayılarının artmış olmasıyla beraber, peritoneal makrofajlar endometriosisde daha aktiftir (120). Makrofajlar aktive olduktan sonra, peritoneal kavitedeki olayları düzenleyen sitokinler, kompleman sistemi veya hidrolitik enzimler gibi ürünleri salgılayabilir. Endometriosis, endometrial hücrelerin peritondan uzaklaştırıldığı sistem aşırı retrograd

menstrüasyon tarafından sekteye uğratıldığında veya yetersiz bir uzaklaştırma sistemi, endometrial parçaların implantasyon ve büyümesine izin verdiğinde gelişebilir (121).



**Şekil 2.2:** Endometriosis gelişiminde immün sistemin rolü

Şekil 4’de endometriosis gelişiminde immün sistem dahilindeki hücre ve sitokinlerin peritoneal çevredeki rolü özetlenmiştir.

Daha önce yapılmış olan yayınlar GnRH gibi sistemik medikasyonların da, endometriotik lezyonların progresyonu üzerine etkileri olabileceğini göstermiştir (68). Bu durum, endometriosis devamlılığında etkisi olduğu düşünülen immün sistemi etkileyebilmektedir. Peritoneal kavitede sayıca artmış ve aktive olmuş makrofajlar, makrofaj kaynaklı sitokinlerin de artışına neden oluyor gibi görünmektedir. Bu sitokinlerin bazıları T hücrelerin proliferasyon ve farklılaşmasını stimüle edebilir ve takiben T hücre kaynaklı faktörler B hücrelerin aktivasyonunda kritik bir rol oynayabilir (121). Daha da ötesi, bu sitokinlerin peritoneal kavitede bulunan ektopik endometrium hücreleri gibi diğer hücreleri de etkilemesi mümkündür.

Bazı bulgular peritoneal sıvıdaki makrofaj ürünlerinin endometriosis başlangıcı, beslenmesi ve ilerlemesi üzerinde aktif rolü olduğunu söylemektedir (122). NK hücreler peritoneal sıvıda özellikle de sitotoksik güçleriyle yabancı cisimler üzerine etki ederek purifikasyon sağlamak amaçlı bulunmaktadır (123). Endometriosisli olgularda hem serum hem de peritoneal mayide NK hücrelerin sitotoksitesisi inhibe edilmiştir (124). Aktive peritoneal makrofajların salgıladığı TGF- $\alpha$  VE IL-10 ektopik endometriumdan salgılanan ve NK hücreleri inhibe eden maddeler sözkonusudur (123,125). Endometriosisli olguların ötopik endometriumunda kontrol grubu olgulara göre NK hücreleri inhibe edecek daha fazla madde salgılanmakta ve peritoneal ortam NK hücreler için uygunsuz hale gelmektedir (126,127).

NK hücre aktivitesi endometriosisli olgularda peritoneal sıvıda olduğu gibi periferik kanda da azalmıştır (128). Bununla beraber halen NK hücre aktivitesindeki değişikliğin hastalığın etkisi de olabileceği tartışılmaktadır (129). Anormal NK aktivitesi ektopik endometrium gibi kronik antijenik uyarıya yanıt olarak veya endometriosisle ilişkisiz otoimmün bir olayın sonucu olabilir.

Peritoneal sıvıdaki hücrelerin yaklaşık %30-50’si lenfositlerdir ve total sayıları endometriosisli olgularda daha yüksektir (124).

T hücre aracılı immün sistem homolog transplant reddinde yer aldığından, T hücre fonksiyonunda değişiklik endometriosisli olgularda düşünülmektedir.

Endometriosisli olgularda hücre aracılı immünitede değişiklikler kanıtlanmıştır (100). Endometriosisli olgularda peritoneal sıvı örneklerinde T supresörlere oranla artmış T helper toplulukları, artmış CD4:CD8 oranı bildirilmiş, bu kadınlarda artmış bir hücresele immün aktivite gösterilmiştir.

T hücrelerin menstrüasyon süresince yayılan otolog endometrial hücrelere karşı sitotoksik olması bilmecedir. Ektopik endometrial hücre peritoneal kaviteye implante olduğunda, aktive makrofajlar tarafından işleme alınır ve T hücrelere sunulur. Endometriosisli olgularda değişmiş makrofajlar yer değiştirmiş ve muhtemelen değişmiş olan endometrial hücrelerin implantasyonu ve proliferasyonunu stimüle ederler (130). Makrofajlarca salınan sitokinlerin etkisiyle, farklı T hücre alt grupları (Th1 ve Th2) aktif fonksiyonel hücreler oluşturmak üzere proliferere olur ve farklılaşırlar. T hücre aktivasyonu sonrası iki farklı grup sitokin, Th1 ve Th2 sitokinleri salgılanır. Th1 sitokinleri IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  ve TNF- $\alpha$  gibi hücresele immünite ile ilişkiliyken, Th2 sitokinleri IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 ve IL-13 olup B hücreleri aktive ederek farklılaşmaları ve antikor salgılayan plazma hücrelerine farklılaşmalarıyla ilişkilidir.

Endometriosis patogeneğinde immün mekanizmalar yanında sitokinler ve büyüme faktörleri de ilgi çekmektedir. Tanir HM (131), serum ve peritoneal sıvıda IGF konusunda yaptığı tez araştırmasında, IGF sisteminin endometriosis patogeneğinde önemli olduğunu, IGF-II ve IGFBP-3 serum ve PS seviyelerinin düşüklüğünün, endometriosis şiddetiyle doğru orantılı olduğunu saptamıştır.

Sitokin aktiviteleri ise çok çeşitlidir ve immün hücrelerin proliferasyon ve farklılaşmaları, hormon, enzim ve akut faz proteinlerinin salınımının indüklenmesi; çeşitli sitotoksik aktivitelerin artırılması, immünglobulin salgılanması ve kemotaksis buna dahildir. Genel olarak, sitokinler çeşitli hücreler üzerine biyolojik etki gösterir. Ek olarak diğer sitokinlerin üretiminin indüklenmesi veya azaltılmasını da sağlayabilirler.

VEGF hem fizyolojik hem patolojik anjiogeneşte rol oynayan kuvvetli bir anjiogenik faktördür. VEGF kaynakları ötopik endometrium, ektopik endometrial doku ve peritoneal sıvı makrofajlarıdır. VEGF'nin peritoneal endometriosisin etyolojisi ve devamında rolüne dair giderek artan kanıtlar sunulmaktadır (132). Endometriosisli olguların GnRH agonisti ile tedavisinin peritoneal sıvıda VEGF'yi



azaltması, endometriosis oluşumu ve devamında VEGF'nin rolü olduğunu göstermektedir.

IL-2 immun yanıtta modölatör aktivitede en iyi çalışılmış sitokindir. Hem T hücre hem B hücre proliferasyon ve farklılaşmasını, NK ve LAK'ı da içeren non-spesifik sitolitik etkili hücrelerin aktivasyon ve proliferasyonu ve monosit ve makrofajların aktivasyonunu stimüle eder (133). Endometriosisli olgularda peritoneal lökositleri mobilize ve aktive eden sitokinler terapötik yönüyle de değerlendirilmektedir.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmaya Ocak 2003 – Haziran 2005 tarihleri arasında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Bölümü'nde L/S veya L/T uygulanan 97 olgu dahil edildi. Çalışma prospektif olarak yürütüldü. Çalışma grubu histopatolojik olarak endometriosis saptanan 60 olgudan oluşturuldu. Kontrol grubu ise yine aynı süre içinde L/S veya L/T uygulanan ve endometriosisi olmayan olgulardan oluşturuldu. Kontrol grubu olguları; operasyonda myoma uteri, tubaovaryan abse veya ektopik gebelik saptanmayan, adezyon dışında patolojik bulgu saptanmayan ve endometriosisle ilişkili semptomları olmayan, oral kontraseptif, GnRH agonisti, danazol gibi ilaçlar kullanmayan olgulardan seçildi. Fonksiyonel over kisti olan olgular kontrol grubuna dahil edildi. Kontrol grubunda toplam 37 olgu mevcuttu.

Çalışma, Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulunda değerlendirildi ve 19.08.2002 gün ve 17 sayılı etik kurul kararı ile onay aldı. Olgulardan yazılı onam alınmadı. Ancak tüm olgulara operasyondan önce sözel bilgi verilerek, izin alındıktan sonra materyaller alındı.

#### 3.1 Olgu Kabulü

Çalışmaya dahil edilen tüm olguların operasyonu genel anestezi altında gerçekleştirildi. L/S operasyonlarının tümü dorsolitotomi pozisyonunda ve iki kişiden oluşan aynı endoskopik cerrahi grubu tarafından uygulandı. Endometriosis için tanı kriteri olarak L/S veya L/T'de implant ve lezyonların direk gözlemi ve alınan biyopsilerde endometrial gland ve stromanın her ikisinin birden bulunması kabul edildi. Endometriosis olguları r-AFS (134) klasifikasyonuna göre değerlendirilerek; 1-5 puan arası olgular Evre I (hafif), 6-15 puan arası Evre II (orta), 16-30 puan arası Evre III (ciddi) ve 31-54 puan arası Evre IV (yaygın) endometriosis olarak tanımlandı. Evre I ve II (hafif ve orta derece) endometriosis olguları erken evre olarak kabul edilirken, Evre III ve IV (ciddi ve yaygın) endometriosis olguları geç evre olarak kabul edildi.

### 3.2 Materyalin Toplanması

Çalışmada olguların serum, peritoneal sıvı, normal görünen periton doku, adezyon doku, ötopik endometrium, peritoneal endometriotik odak ve endometrioma cidar materyalleri değerlendirildi.

Çalışma için kabul edilen olgulardan serumda bakılacak parametreler için L/S veya L/T uygulandığı gün operasyondan yaklaşık ½ -1 saat önce periferik kan alındı. Klinik endoskopi ekibi tarafından uygulanan L/S veya klinikteki cerrahlardan biri tarafından uygulanan L/T esnasında öncelikle batına 50 cc SF verildi ve kanla kontamine olmadan 20 cc steril enjektöre peritoneal mayi alındı ve takiben 150 cc SF verildi ve kanla kontamine olmadan 100 cc steril enjektöre peritoneal mayi alındı. Batın içerisinde vizüalize edilen endometriotik implant ve lezyon, adezyon, normal görünen peritoneal doku ve endometrioma cidarı çalışma materyali olmak üzere eksizyon yoluyla alındı. Aynı zamanda uygun olan hastalardan vajinal yolla endometriumdan novak kürele örnekleme yapıldı. Alınan materyaller %10luk formol içine konularak Patoloji bölümüne ve Genetik Bilim Dalı'ndan temin edilen transport mediumları (100 ml RPMI-1640 besiyeri içine 1 ml Penisilin Streptomisin ve 1 ml heparin konularak ve tercihan 0,1 ml Gentamisin eklenerek hazırlanmış) içine konularak da inceleme için genetik bölümüne gönderildi. Mayi ve periferik kan aynı gün 3000 rpm'de 10 dakika Eppendorf-Centrifuge 5810 R aletinde santrifüj edildi ve elde edilen supernatant derin dondurucuda -70 °C'de saklandı.

### 3.3 Apoptoz Analizleri

Alınan örnekler transport medium içerisinde Tıbbi Genetik Bilim Dalı'na ulaştırıldıktan sonra tüm materyaller aynı gün en geç 2 saat içinde çalışmaya alındı. Laboratuvar çalışmalarında doku örneklerinde apoptoz değerlendirilmesi TUNEL (terminal deoksinukleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP) nick end labeling) tekniği ile incelenmiş olup ayrıca M30 belirteci değerlendirilerek apoptoz indeksleri saptandı.

### **Apoptoz Analiz Yöntemleri**

İlk aşama dokuların mekanik olarak parçalanmasıdır. Mekanik parçalama sonrası kullanılan kit prosedürüne (Boehringer Mannheim) göre işlemler gerçekleştirilmiştir. Parçalanmış dokular proteinaz K (Roche) solüsyonunda 37°C'de 30-45 dakika muamele edilerek hücre süspansiyonları elde edildi.

#### **3.3.1 TUNEL Yöntemi**

Çalışmamızda TUNEL yöntemi In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein kullanılarak gerçekleştirildi. İlgili prosedür aşağıda maddeler halinde verildi.

1. Örnekler 3 kez PBS ile yıkayıp  $2 \times 10^7$  hücre/ml'ye seyreltildi.
2. Ependorf tüplerine aktarıldı.
3. Hücre süspansiyonlarına 100 µl/tüp olacak şekilde fiksasyon solüsyonu (40 µl formaldehit+100 µl 10xPBS+860 µl distile su ) koyuldu.
4. Vortekslenen örnekler 60 dakika 15-25°C'de inkübe edildi.
5. İnkübasyon sonunda tüpler 10 dakika 3000 rpm'de santrifüj edilerek süpernatant atıldı.
6. Hücre süspansiyonları 200µl PBS'de yıkayıp santrifüj edilerek süpernatant atıldı.
7. Süspansiyon haline getirilen örnekler üzerine 100'er µl permeabilisation solüsyonu (0,1 gr sodyum sitrat + 100 µl Tween-20 + 100ml distile su) koyularak 2 dakika +4°C'de bekletildi.
8. İki kez 200'er µl'lik PBS ile yıkandı.
9. Süspansiyon 50 µl/tüp olacak şekilde porsiyonlandı ve üzerine TUNEL Reaksiyon Karışımı (1:10 Enzim TDT:Label solüsyonu) konuldu.
10. Hazırlanan örnekler 60 dakika distile su ile nemlendirilmiş ortamda 37 °C'deki etüvde bekletildi.
11. İnkübasyon sonrası PBS ile yıkanan örnekler karanlık ortamda önceden hazırlanmış temiz lam üzerine yayılıp üzerine yüzey boyası (DABCO) damlatılarak floresan mikroskopta incelendi.
12. Mikroskopta nükleer fragmentasyonun gözlemlendiği yüksek intensitede floresan veren hücreler apoptotik hücreler olarak değerlendirildi.

Apoptotik hücre indeksi rastgele seçilen 10 farklı alandaki en az 200 hücre sayılarak belirlenmiştir. 200 hücreden 9 veya üzerinde TUNEL pozitif hücre olması apoptosis için anlamlı olarak kabul edilmiştir. Mikroskopik değerlendirme iki farklı kişi tarafından gerçekleştirilmiştir.

### **3.3.2 M30 Analizi**

#### **M-30 Yöntemi**

1. Yine aynı şekilde dokulardan elde edilmiş solüsyon PBS'de yıkayıp konsantrasyonu 100'er µl olacak şekilde tüplere aktarıldı.
2. Örneklerin fiksasyonu soğuk alkolde 30 dakika süreyle derin dondurucuda gerçekleştirildi. Süre sonunda örnekler 2'şer kez yıkama tamponu (100µl PBS + 0,1µl Tween-20 ) ile yıkandı.
3. Son yıkama tamponu atıldıktan sonra üzerlerine hazırlanan M30 CytoDEATH Antibody [ 1:20 M-30 CytoDEATH (Roche 2140322)] solüsyonu konularak oda ısısında ve karanlıkta 60 dakika bekletildi.
4. Süre sonunda yıkama tamponu ile yıkanan örnekler Antimouse Ig-Flourescein °(%2'lik Anti-FITC) antikoru ile 30 dakika oda ısısında muamele edildi.
5. Örnekler PBS ile yıkanarak önceden hazırlanan lam üzerine yayıldı ve kurumaya bırakıldı.
6. Preparatlar yüzey boyası (DABCO) ile boyanarak floresan mikroskopta incelendi, nükleer fragmentasyonun gözlemlendiği yüksek intensitede floresan veren hücreler apoptotik hücreler olarak değerlendirildi.

Her örnekte rastgele seçilen 10 objektif alanında an az 200 hücre içerisinde M30 pozitif hücre sayısı belirlenmiştir. TUNEL analizinde olduğu gibi 9 ve üzerinde pozitif hücre apoptosis için anlamlı kabul edilmiştir. Mikroskopik değerlendirme iki farklı kişi tarafından gerçekleştirilmiştir.

### 3.4 İmmunohistokimyasal Yöntem

Bcl-2 ve Bax protein ekspresyonunun saptanması için cerrahi operasyon sırasında histopatolojik inceleme için alınan ve Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda formalinde fikse edilmiş, parafin bloklar içerisindeki spesimenler kullanıldı.

#### Preparatların Hazırlanması

1. Seçilen parafin bloklardan Poly-L-Lysinli özel lama 4µ'luk birer kesit alındı.
2. Etüv içerisinde 60 °C'de 60 dakika bekletildikten sonra 3x5 dakika ksilolde bırakılarak deparafinize edildi ve absöü alkolde 3x1 dakika bekletildi.
3. Distile su ile 3 kez yıkanıp 5 dakika bekletildi.

#### Boyama Tekniğı

1. Preparatlara EDTA buffer (NeoMarkers, USA) ilavesinden sonra düdüklü tencere içerisinde 5 dakika basınç uygulanarak antijenitesi ortaya çıkarıldı.
2. %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'de (Hydregen peroksidase aqueous) 10 dakika bekletildikten sonra tekrar buffer ile 2x3 dakika yıkandı.
3. Daha sonra Protein block solüsyonu (Ultra V block) ile 5 dakika inkübe edildi.
4. Takiben bcl-2 ve bax proteinine karşı monoklonal fare antikoru (MS-123-R7 bcl Ab 100/D5 ve MS-711-R7 baxAb 2D2) ile 60 dakika inkübe edilip, buffer ile 2x3 dakika yıkandı.
5. Preparatlar 10'ar dakika süreyle Biotinylated Goat Anti-Mouse solüsyonu (Labvision, USA) ile 10 dakika inkübe edildi ve 2x3 dakika PBS (Phosphate Buffer Saline, Ph: 7,4) ile yıkandı.
6. Takiben preparatlar streptavidin peroksidaz ile 10 dakika inkübe edildi ve 2x3 dakika PBS (Phosphate Buffer Saline, Ph: 7,4) ile yıkandı.
7. Takiben AEC kromojen solüsyonunda 5 dakika ve distile su ile 5 dakika yıkandı.

8. Hematoxyline boyasında 20 saniye tutulup tekrar distile su ile 5 dakika yıkandı ve havada kurutuldu.
9. Preparatlar üzerine aqueous mounting medium damlatılıp, 22x22 mm lamel ile kapatıldı.

### **Değerlendirme**

Boyama mikroskopik olarak değerlendirildi ve %10'dan az hücre boyanmış ise 0 (negatif), %10-50 arasında ise 1 (pozitif) ve %50'nin üzerinde boyanmış ise 2 (kuvvetli pozitif) olarak değerlendirildi. Değerlendirme aynı patolog tarafından yapıldı.

### **3.4 Anjiogenez ve İmmünite Analizleri**

Serumda ve peritoneal mayide lenfosit alt gruplarını belirlemek amacıyla yapıldı. Her tüpe 10 µl'lik antikor dağıtıldı. Bu antikorlar;

1. IgG1 FITC/IgG2 PE
2. CD 3 FITC/CD 19 PE
3. CD 3FITC/CD 4 PE
4. CD 3 FITC/CD 8 PE
5. CD 3 FITC/CD 56 PE
6. A-HLA-DR FITC/CD 69 PE
7. CD 25 FITC olarak belirlendi.

Serum örneği için K3 EDTA'lı tüplere kan alındı ve aynı gün çalışıldı. Peritoneal sıvı için ise yine aynı gün alınan 150 ml'lik örnek naylon meshden filtre edildi ve 1800 rpm'de santrifüj edildi. 2 kez PBS (Phosphate Buffer Saline) ile yıkandı. Dipte kalan pellet 1 cc PBS ile resüspanse edildi. Aynı işlemler serum ve peritoneal mayi için uygulandı.

1. İçerisine antikor dağıtılmış tüplerin üzerine 100 µl örnek eklendi. 20 dakika karanlıkta oda ısısında bekletildi.
2. Her tüpe 2 ml dilüe lysing solusyon eklendi ve 10 dakika karanlıkta oda ısısında bekletildi.

3. 1800 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
4. Her tüpe 2 ml PBS eklenerek 1800 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
5. Her tüpe tekrar 2 ml PBS eklenerek 1800 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
6. Dipte kalan pellet 0,5 ml PBS eklendi ve resüspanse edildi.
7. Becton Dickinsen Facscalibur cihazında software rellquest programında 5000 hücre sayılıp, lenfosit kapısı alınarak analiz yapıldı.

Sonuçlar incelenmesinde CD3 antikoru ile beraber CD4 antikoru da eksprese ettiği belirlenen T hücreler Th, CD3 antikoru ile beraber CD8 antikoru eksprese ettiği belirlenenler Ts olarak kabul edildi ve benzer şekilde CD3 antikoru ile eş zamanlı CD56 antikoru eksprese ettiği belirlenen T hücreler NK (LGL) olarak kabul edildi. CD19 eksprese eden lenfositler B lenfosit olarak kabul edilirken, CD 69 ekspresyonu olan lenfositler aktif lenfosit olarak kabul edildi. Elde edilen lenfosit kapısında belirlenen oranlar kullanılarak değerlendirme yapıldı.

Anjiogenez ve immünite kolundaki diğer çalışma sitokinler ile yapıldı. Serumda ve peritoneal mayide sitokinlerin (IL-2, IL-4, IL-10, VEGF ve IFN- $\gamma$ ) düzeyleri ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) yöntemi ile çalışılmıştır. ELISA yönteminde sandviç tipinde iki immunolojik basamak oluşumu sözkonusudur. Birinci basamakta IL-4, IL-10, VEGF ve IFN- $\gamma$  için; ölçülecek madde (sitokin) katı bir yüzeye (cam tüp duvarına) bağlı bir monoklonal antikor tarafından yakalanmıştır. İkinci basamakta cam tübün içine streptavidin-peroksidaz konjugatı ile beraber biotinile monokloonal antikor ilave edilmektedir. Biotinile antikor, (solid faz) antijen antikor kompleksi ile bağlanmakta ve dolayısıyla reaksiyon oluşmaktadır. IL-2 için ise birinci basamakta sitokin katı bir yüzeye (cam tüp duvarına) bağlı bir monoklonal antikor tarafından yakalanmış ve biotinile ikinci monoklonal antikora (solid faz) yapışmıştır. İkinci basamakta streptavidin peroksidaz biotinile antikora yapışmaktadır. İnkübasyondan sonra, oluşan reaksiyon ise ortama bir kromojenik substrat eklenmesiyle ölçülmektedir. Kısaca, sitokin iki antikor arasında sandviç tarzında sıkışmaktadır.



IL-2 aktivitesi, ELISA IM 3583/3585 (Immunotech SAS, Beckman Coulter, USA), IL-4 aktivitesi ELISA IM 1981/1982(Cellular Communication Investigations, Beckman Coulter, USA), IL-10 aktivitesi ELISA IM 1987/1988(Cellular Communication Investigations, Beckman Coulter, USA), VEGF aktivitesi KHG0112/KH0111 (Biosource International, USA) ve IFN- $\gamma$  aktivitesi ELISA IM 1743/1862 (Cellular Communication Investigations, Beckman Coulter, USA) ile saptanmıştır. Tüm sonuçlar 450 nm absorbandsda aynı cihazda (GRIFOLDS Model= Triturus, SPAIN) okunmuştur.

Bu çalışmalar (sitokinler) daha önce materyal toplanması konusunda anlatıldığı şekilde tüm materyaller toplandıktan sonra ( 20 ml'lik örnekten) derin dondurucudaki örnekler kullanılarak toplu olarak yapılmıştır.

#### **IL-2 işlem basamakları;**

1. Kalibratör etiketindeki kadar sulandırılarak 2,5 ng/ml IL-2 solusyonu hazırlandı.
2. 50  $\mu$ l kalibratör veya 50 $\mu$ l hasta örneği kullanıldı ve 50 $\mu$ l biotinile antikor ile karşılaştırıldı.
3. 18-25°C'de 600 °G 120 dakika inkübe edildi.
4. 50 ml konsantre ve 950 ml distile su ile hazırlanmış wash buffer ile 3 kez yıkandı.
5. 100  $\mu$ l streptavidin-HRP konjugat eklendi.
6. 18-25°C'de 600 °G 30 dakika inkübe edildi.
7. Wash buffer ile 3 kez yıkandı.
8. 100  $\mu$ l kromojenik substrat eklendi.
9. 18-25°C'de 600 °G 20 dakika inkübe edildi.
10. 50  $\mu$ l stop solüsyonu eklendi.
11. 450 nm absorbansta okundu. (GRIFOLDS Model= Triturus)

**IL-4 işlem basamakları;**

1. Standart etiketindeki kadar sulandırılarak 10 ng/ml IL-4 solusyonu hazırlandı.
2. 100 µl standart veya 100µl hasta örneği alındı ve 18-25°C'de 600 °G 120 dakika inkübe edildi.
3. 50 ml konsantre ve 950 ml distile su ile hazırlanmış wash buffer ile 3 kez yıkandı.
4. 50 µl biotinile antikor ve takiben 100 µl HRP konjugat eklendi
5. 18-25°C'de 600 G 30 dakika inkübe edildi.
6. Wash buffer ile 3 kez yıkandı.
7. 100 µl kromojenik substrat eklendi.
8. 18-25°C'de 600 °G 20 dakika inkübe edildi.
9. 50 µl stop solüsyonu eklendi.
10. 450 nm absorbansta okundu. (GRIFOLDS Model= Triturus)

**IL-10 işlem basamakları;**

1. Standart etiketindeki kadar sulandırılarak 20 ng/ml IL-10 solusyonu hazırlandı.
2. 50 µl standart veya 50µl hasta örneği alındı ve 18-25°C'de 600 °G 120 dakika inkübe edildi.
3. 50 ml konsantre ve 950 ml distile su ile hazırlanmış wash buffer ile 3 kez yıkandı.
4. 50 µl biotinile antikor ve takiben 100 µl HRP konjugat eklendi
5. 18-25°C'de 600 °G 30 dakika inkübe edildi.
6. Wash buffer ile 3 kez yıkandı.
7. 100 µl kromojenik substrat eklendi.
8. 18-25°C'de 600 °G 15 dakika inkübe edildi.
9. 50 µl stop solüsyonu eklendi.
10. 450 nm absorbansta okundu. (GRIFOLDS Model= Triturus)

**IFN- $\gamma$  işlem basamakları;**

1. Standart etiketindeki kadar sulandırılarak 250 IU IFN- $\gamma$  solusyonu hazırlandı.
2. 50  $\mu$ l standart veya 50 $\mu$ l hasta örneği alındı ve 18-25°C'de 600 °G 120 dakika inkübe edildi.
3. 50 ml konsantre ve 950 ml distile su ile hazırlanmış wash buffer ile 3 kez yıkandı.
4. 50  $\mu$ l biotinile antikor ve takiben 100  $\mu$ l HRP konjugat eklendi
5. 18-25°C'de 600°G 30 dakika inkübe edildi.
6. Wash buffer ile 3 kez yıkandı.
7. 100  $\mu$ l kromojenik substrat eklendi.
8. 18-25°C'de 600 °G 20 dakika inkübe edildi.
9. 50  $\mu$ l stop solüsyonu eklendi.
10. 450 nm absorbansta okundu. (GRIFOLDS Model= Triturus)

**VEGF işlem basamakları;**

1. Standart etiketindeki kadar sulandırılarak 2000 pg/ml VEGF solusyonu hazırlandı.
2. 100  $\mu$ l standart veya 100 $\mu$ l hasta örneği alındı ve 18-25°C'de 120 dakika inkübe edildi.
3. 50 ml konsantre ve 950 ml distile su ile hazırlanmış wash buffer ile 4 kez yıkandı.
4. 100  $\mu$ l biotinile antikor eklendi
5. 18-25°C'de 60 dakika inkübe edildi.
6. Wash buffer ile 4 kez yıkandı.
7. 100  $\mu$ l kromojenik substrat eklendi.
8. 18-25°C'de 30 dakika inkübe edildi.
9. 100  $\mu$ l stop solüsyonu eklendi. Sonrasında 30 dakika 18-25°C'de karanlıkta inkübe edildi.
10. 450 nm absorbansta okundu. (GRIFOLDS Model= Triturus)

Sonuçlar Biotech USA tarafından kullanıcının ELİSA sonuçlarını standartlara göre doğru değerlendirebilmesi için geliştirilmiş olan KC programı ile hesaplanmış

ve her sitokin için hazırlanmış standart eğriler ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar ng/ml cinsinden elde edilmiştir. Standart bir eğri ile karşılaştırmanın amacı ise, testlerin ne kadar doğru ve hassas şekilde yapıldığını saptamaktır. Dört sitokin için kullanılan testlerin, önceden belirlenen , çalışma içi ve çalışmalar arası değişkenlik (intra-assay ve inter-assay variability) yüzdesi ve testin duyarlılığı (sensitivite) Tablo 1’de özetlenmiştir.

**Tablo 3.1:** IL-2, IL-4, IL-10, VEGF ve IFN- $\gamma$  ölçümünün duyarlılık (sensitivite) ve çalışma içi ve çalışmalar arası değişkenlik oranları.

	Sensitivite	Çalışma içi değişkenlik %	Çalışmalar arası değişkenlik %
IL-2	5 pg/ml	3.3-7.2	6.2-8.2
IL-4	5 pg/ml	2.1-5.6	4,8-14.7
IL-10	5 pg/ml	3.3-4	5.6-8.6
IFN- $\gamma$	0.08 IU/ml	2.2-12.6	6.2-12.2
VEGF	5 pg/ml	3.7-5.5	6.5-9.3

Tüm veriler, SPSS 13 (Statistical Packages for Social Sciences: SPSS Inc. Chicago, Illinois, ABD) programıyla bilgisayar ortamında değerlendirildi. Veriler aritmetik ortalama  $\pm$  standart sapma (2SD) şeklinde verildi. Non-parametrik veriler % olarak verildi. Non-parametrik verilerin bir kısmı, puanların ortalamasını ifade eden mean rank değerleri şeklinde verildi. İstatistik yapılırken Pearson  $\chi^2$  testi, Fisher’s exact testi, Exact  $\chi^2$  testi, Spearman korelasyon testi ve Kruskal-Wallis testleri kullanıldı. p değerinin 0.05 altında olması anlamlı olarak kabul edildi.

#### 4. BULGULAR

1 Ocak 2003 – 24 Haziran 2005 tarihleri arasında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Bölümü'nde L/S veya L/T uygulanan 97 olgu bu çalışmaya dahil edilmiştir. Olguların yaş dağılımları kontrol grubunda  $30.1 \pm 6.7$  yıl, erken evre olgularda  $30.9 \pm 5.6$  yıl ve geç evre olgularda ise  $29.9 \pm 6.7$  olarak bulunmuştur. Gruplar arasında yaş ortalaması açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ( $p > 0.05$ ).

Erken ve geç endometriosis olgularının başvuru şikayetleri ise Tablo 4.1de gösterilmiştir.

**Tablo 4.1:** Endometriosis olgularının başvuru şikayetleri.

Şikayet	EE(n)	GE(n)
Çocuk sahibi olamama	12	4
Kasık ağrısı	19	8
Adet düzensizliği	6	2
Adet sancısı	2	1
Endometriosis kontrol	-	1
Karın ağrısı	-	2
Rutin kontrol	3	-
Toplam	42	18

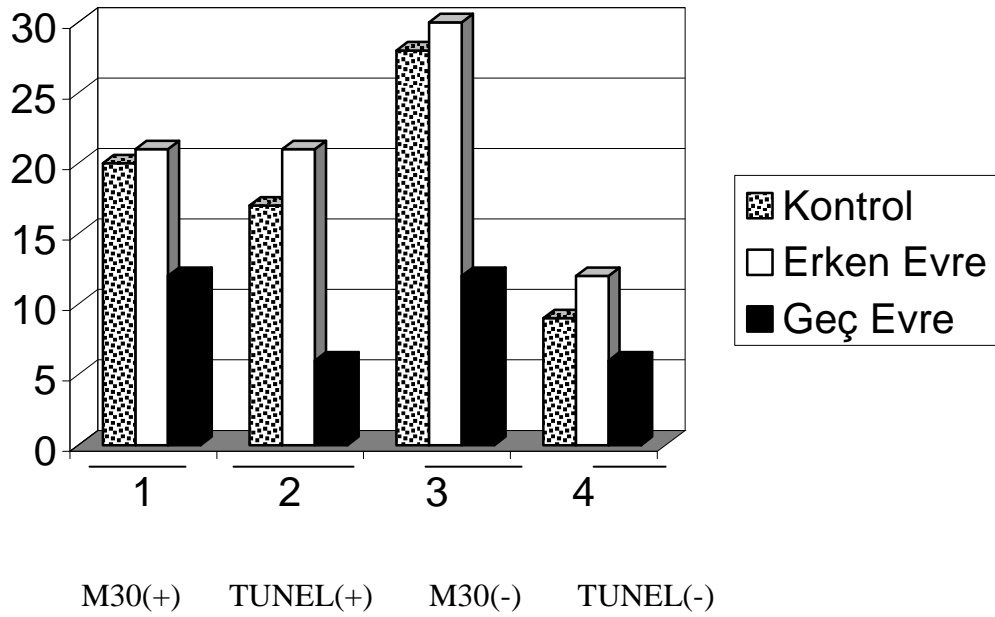
r-AFS (revised American Fertility Society) (134) sınıflandırmasına göre, değişik evre endometriosis lezyonlarının ortalama skorları ( $\pm$ standart sapma) Tablo 4.2'de özetlenmiştir.

**Tablo 4.2:** Endometriosis olgularında evrelere göre ortalama skorlar.

<u>Evreler</u>	<u>n</u>	<u>Skor (<math>\pm</math>SD)</u>
Evre I	9	$1.7 \pm 0.9$
Evre II	33	$9.5 \pm 2.9$
Evre III	16	$19.8 \pm 3.9$
Evre IV	2	$38 \pm 1.4$

Erken evre (Evre I ve II) olguları için ortalama r-AFS skoru  $7.8 \pm 4.1$  ve Geç evre (Evre III ve IV) olgular için ise r-AFS skoru  $21.83 \pm 6.9$  olarak hesaplanmıştır. İlk olarak, Erken evre ve geç evre ve kontrol grubu olgularda normal görünen peritoneal dokuda M30 ve TUNEL testlerinin pozitiflik oranları belirlenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.1’de gösterilmiştir.

n



**Şekil 4.1:** Normal peritoneal dokuda M30 ve TUNEL pozitif ve negatiflik dağılımı.

Tablo 4.3’de ise, bu dağılımın gruplar arası istatistiksel olarak farklılığı gösterilmiştir. Buna göre normal peritoneal dokuda erken evre ve geç evre ve kontrol grubu olguları arasında M30 ve TUNEL pozitifliğinde istatistiksel olarak (Pearson  $\chi^2$  testi) anlamlı bir farklılık görülmemektedir. (M-30 için  $p=0.59$ ,  $\chi^2=1.1$  ve  $sd=2$ , TUNEL için  $p=1.0$ ,  $\chi^2=0.1$  ve  $sd=2$ )

**Tablo 4.3:** EE, GE Kontrol grubu M30 ve TUNEL pozitifliği

<b>Normal Periton Dokusu</b>			
	<b><u>M30 Pozitif (n)</u></b>	<b><u>M30 Negatif (n)</u></b>	<b><u>p</u></b>
Kontrol Grubu	20	17	0.59
Erken Evre	21	21	
Geç Evre	12	6	
	<b><u>TUNEL Pozitif (n)</u></b>	<b><u>TUNEL Negatif (n)</u></b>	<b><u>p</u></b>
Kontrol Grubu	28	9	1.0
Erken Evre	30	12	
Geç Evre	12	6	

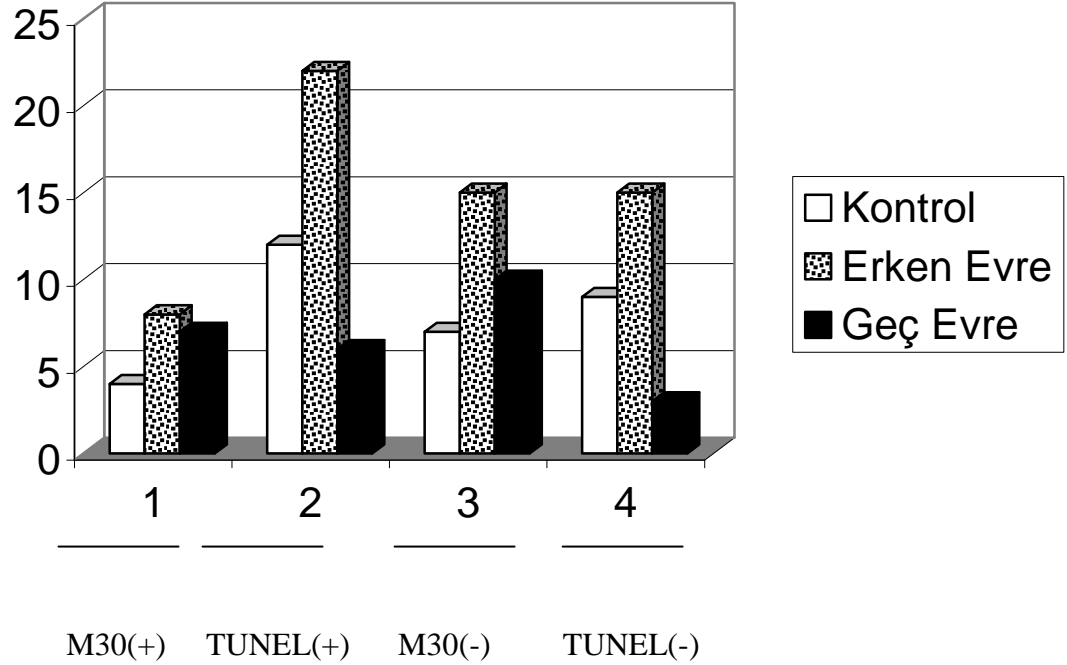
Tablo 4.4’de iki apoptotik indeksin (M 30 ve TUNEL) kontrol grubu, erken evre ve geç evre olgularda dağılımı karşılaştırılmaktadır. M 30 ve TUNEL pozitiflik dağılımlarının gruplar arasındaki korelasyon analizi, Spearman’s rs testi uygulanarak değerlendirilmiştir ve aralarında pozitif bağıntı saptanmıştır. (rs=0,316 ve p=0.041)

**Tablo 4.4:** Peritoneal dokuda M 30 ve TUNEL pozitiflik karşılaştırılması.

<b>Sağlam Periton</b>	<b>M30 pozitif n (%)</b>	<b>TUNEL pozitif n (%)</b>
Kontrol n (%)	20 (54.1)	28 (75.6)
Erken evre n (%)	21 (50)	30 (71.4)
Geç evre n (%)	12 (66.6)	12 (66.6)
<b>Toplam</b>	<b>53</b>	<b>60</b>

Kontrol grubu, erken evre ve geç evre endometriosisli olgularda adezyon dokuda M30 ve TUNEL pozitiflik dağılımı ise Şekil 4.2’de izlenmektedir.

n



**Şekil 4.2:** Adezyon dokusunda M30 ve TUNEL pozitiflik dağılımı.

Adezyon dokuda her üç grup arasında M30 ve TUNEL pozitiflik dağılımı açısından istatistiksel olarak (Pearson  $\chi^2$  testi) anlamlı farklılık saptanmamıştır. (M-30 için  $\chi^2=3.6$ ,  $sd=2$ ,  $p=0.19$  ve TUNEL için  $\chi^2=4.6$ ,  $sd=2$ ,  $p=0.29$ )

EE, GE ve kontrol grubu olgularda adezyon dokuda M-30 ve TUNEL pozitiflik dağılım oranları Tablo 4.5’de verilmiştir.



**Tablo 4.5:** EE, GE Kontrol grubu M30 ve TUNEL pozitifliği

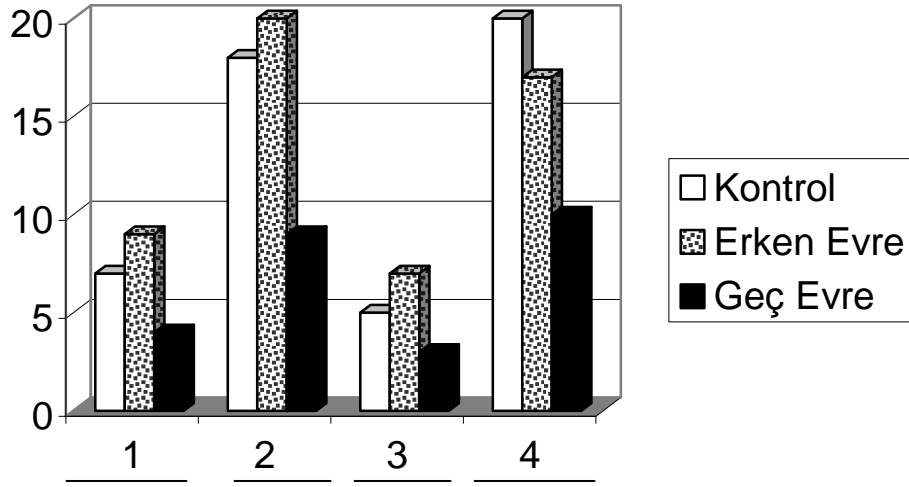
<b>Adezyon Dokusu</b>			
	<b><u>M30 Pozitif</u></b>	<b><u>M30 Negatif</u></b>	<b><u>p</u></b>
Kontrol Grubu	4	8	
Erken Evre	8	22	0.1
Geç Evre	7	6	
	<b><u>TUNEL Pozitif</u></b>	<b><u>TUNEL Negatif</u></b>	<b><u>p</u></b>
Kontrol Grubu	7	9	
Erken Evre	15	15	0.09
Geç Evre	3	10	

Olguların adezyon dokudaki M-30 ve TUNEL pozitiflik dağılımlarının bağıntısı da Spearman korelasyon testi ile değerlendirildi. Buna göre gruplar arasında pozitif bağıntı mevcuttu. ( $r_s=0.6$ ,  $sd=2$  ve  $p<0.001$ )

Toplam 60 endometriosisli olgunun 33'ünden analiz için endometrial odak (ektopik endometrium) alındı. Erken evre olgularda 33 odaktan sadece 1 olguda M-30 pozitifliği ve 3 olguda TUNEL pozitifliği mevcuttu. 12 geç evre endometriosisli olgudan ise M 30 ve TUNEL pozitifliği 1'er olguda pozitif olarak değerlendirildi. Pearson  $\chi^2$  istatistik analizine göre, erken evre ve geç evre olgularda endometriotik odakta apoptotik indeksler arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır. ( $\chi^2=1.1$ ,  $sd=2$  ve  $p=0.6$ .)

Her üç grupta da ötopik endometrium dokuda değerlendirilen M-30 ve TUNEL pozitiflik dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Pearson  $\chi^2$  testi kullanılarak elde edilen sonuçlar M-30 için  $\chi^2=0.24$  ve  $p=0.91$  iken TUNEL için  $\chi^2=0.317$  ve  $p=0.87$  idi. Şekil 4.3'de EE, GE ve kontrol grubundaki ötopik endometrium dokusunda M-30 ve TUNEL pozitiflik dağılımı verilmiştir.

n



TUNEL (+) TUNEL(-) M30(+) M30(-)

**Şekil 4.3:** Ötopik endometrial dokuda M30 ve TUNEL pozitiflik dağılımı.

Tablo 4.6’da olguların ötopik endometrium dokusunda TUNEL pozitiflik verileri ve Tablo 4.7’de ise M-30 pozitiflik verileri izlenmektedir.

**Tablo 4.6:** Ötopik endometrial dokuda TUNEL pozitifliği dağılımı

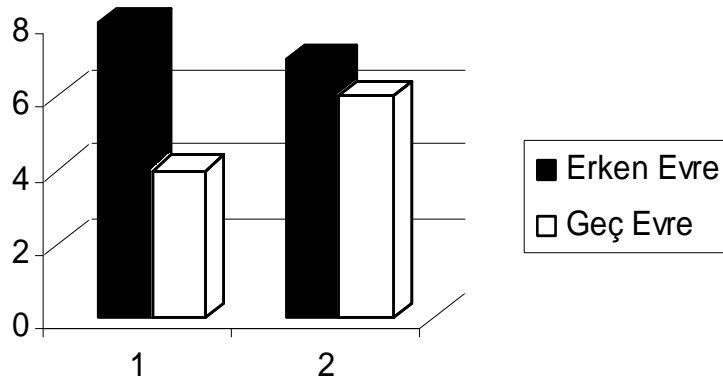
	TUNEL pozitif n (%)	TUNEL negatif n (%)	Toplam n
Kontrol n (%)	7 (28)	18 (72)	25
Erken Evre n (%)	9 (31,1)	20 (68,9)	29
Geç Evre n (%)	4 (30,7)	9(69,3)	13

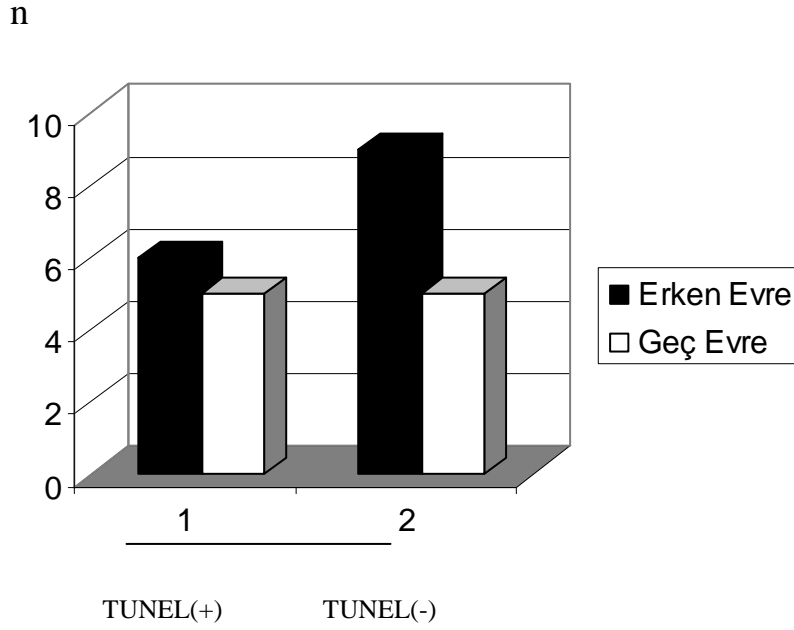
**Tablo 4.7:** Ötopik endometrial dokuda M-30 pozitifliği dağılımı.

	M-30 pozitif n(%)	M-30 negatif n(%)	Toplam n
Kontrol n (%)	4 (16)	19 (84)	25
Erken Evre n (%)	8 (28)	20 (72)	29
Geç Evre n (%)	3 (23)	9(77)	13

Şekil 4.4'de endometriotik kist cidarında M30 pozitif ve negatif olarak değerlendirilen endometriosisli olgular ve Şekil 4.5'da ise TUNEL pozitif ve negatif olarak değerlendirilen endometriosisli olgular verilmiştir. Bu olguların istatistiksel dağılımı ise Tablo 4.5'de verilmiştir. Endometriotik kisti olan 15 EE olgudan 8'inde M-30 pozitifliği, 5'inde TUNEL pozitifliği saptanmış ve 10 GE olgudan 4'ünde M-30 pozitifliği ve 5'inde TUNEL pozitifliği saptandı. M-30 için  $\chi^2=0.15$ ,  $sd=1$  ve  $p=0.73$  iken TUNEL için  $\chi^2=0.38$ ,  $sd=1$  ve  $p=0.71$  olarak saptandı. (Pearson  $\chi^2$ ) Buna göre endometriotik kist cidarında M30 ve TUNEL pozitiflik dağılımı açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık izlenmemiştir.

n

**Şekil 4.4:** EE ve GE olgularda endometriotik kist cidarında M-30 pozitiflik dağılımı.



**Şekil 4.5:** EE ve GE olgularda endometriotik kist cidarında TUNEL pozitiflik dağılımı.

Endometriosis olgularında ektopik (peritoneal) endometrial dokuda ve endometriotik kist cidarında EE olgularda M-30 pozitifliği arasında Fisher's Exact testi sonucu anlamlı farklılık saptadık. Diğer istatistik değerlerimiz ise istatistiksel anlama ulaşmamakla beraber anlama ulaşmaya oldukça yakın değerlerdeydi. EE TUNEL için  $\chi^2=p=0.08$  ve M-30 için  $\chi^2=p<0.001$ , GE TUNEL için  $\chi^2=p=0.056$  ve M-30 için  $\chi^2=p=0.1$ ) Olguların endometriotik kist cidarı ve peritoneal endometriotik odakta pozitiflik dağılımları Tablo 4.8'de verilmiştir.

**Tablo 4.8:** Endometriosisli olgularda endometriotik odak ve endometriotik kist cidarında M-30 ve TUNEL pozitiflik dağılımı.

	Erken Evre M-30 (+) n(%)	Geç Evre M-30 (+) n(%)	Erken Evre TUNEL (+) n(%)	Geç Evre TUNEL (+) n(%)
End. Odak n(%)	1 (3)	1 (8)	3 (9)	1 (8)
End. kist n(%)	8 (53)	4 (40)	5 (40)	5 (50)

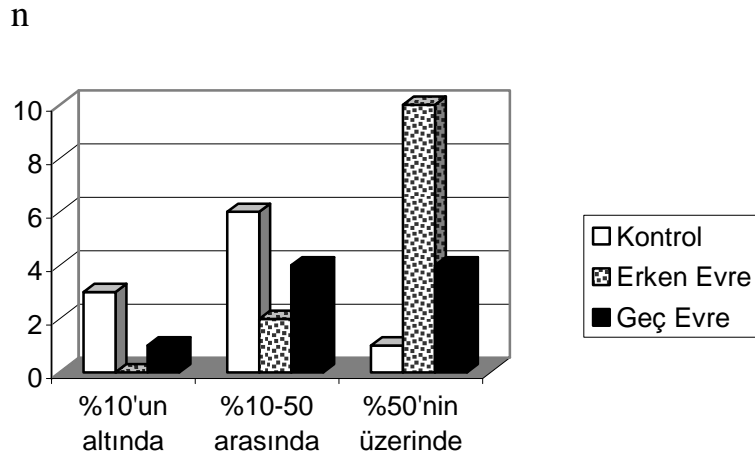
Tablo 4.9’da endometriotik olgularda ötopik ve ektopik endometrial dokudaki apoptosis değerlendirilmiştir. Tablodaki veriler hasta sayısını belirtmektedir ve bu oranlar ektopik endometrial dokuda apoptozun azalmış olduğunu göstermektedir. Ancak ektopik dokudaki pozitif olgu sayılarının yetersiz olması istatistiksel olarak anlamlı değere ulaşılmasını engellemiştir.

**Tablo 4.9:** Endometriosisli olgularda ötopik ve ektopik endometriumda TUNEL ve M-30 pozitifliklerinin dağılımı.

	TUNEL pozitiflik		M-30 pozitiflik	
	Ötopik end	Ektopik end	Ötopik end	Ektopik end
Erken Evre n(%)	7 (28)	3 (9)	4 (16)	1 (3)
Geç evre n(%)	4 (30)	1 (8)	3 (8)	1 (8)

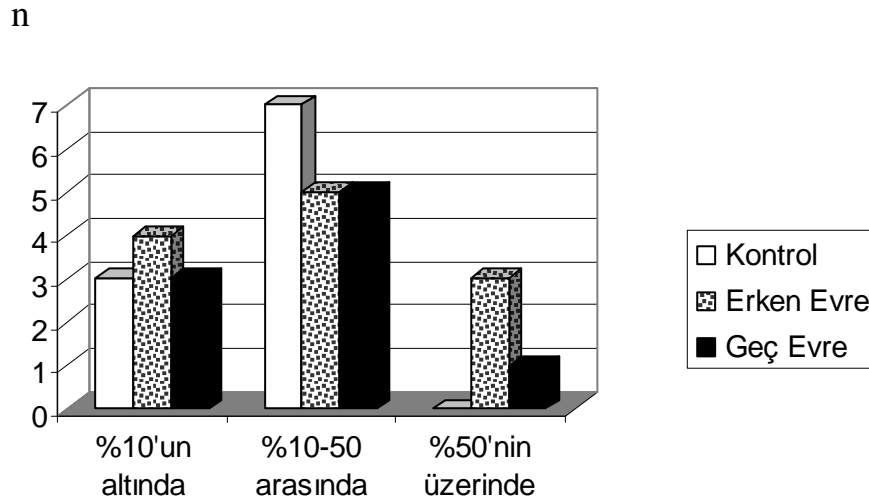
Çalışmada ayrıca 30 olguda, normal görünen peritoneal doku, ötopik endometrium ve ektopik endometrial dokuda Bax ve Bcl-2 protein boyanma oranları değerlendirildi ve bu şekilde apoptoz varlığı saptanmaya çalışıldı. Otuz olgu içindeki dağılım 10 kontrol grubu, 12 erken evre ve 9 geç endometriosis olarak belirlendi.

Buna göre gruplar arasında bax proteini boyanma oranları dağılımı arasında anlamlı istatistiksel fark mevcuttur. (Pearson  $\chi^2$  testi;  $\chi^2=12.9$ ,  $sd=4$ ,  $p=0.038$ ) Endometriosisli olgularda, endometriosis olmayan olgulara göre sağlam peritoneal dokuda apoptozla ilişkili olduğu düşünülen Bax proteini boyanma oranı anlamlı derecede yüksektir. Erken evre ve geç evre endometriosis olgularına bakıldığında ise erken evre olgularda Bax proteini boyanma oranı daha yüksektir. Yani, endometriosisli hastalarda evre arttıkça boyanma oranı azalmıştır. Şekil 4.6’da EE, GE ve kontrol grubu olgular arasında Bax proteini boyanma dağılımı izlenmektedir.



**Şekil 4.6:** Olgularda sağlam peritoneal dokuda Bax protein boyanma oranları dağılımı.

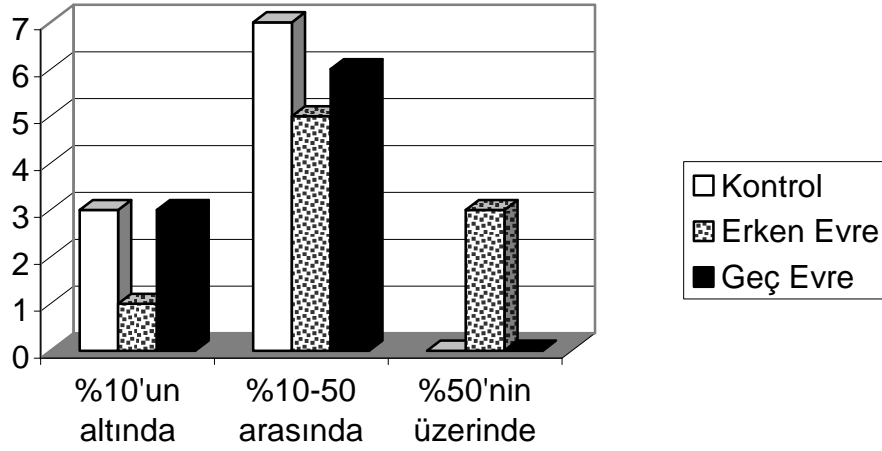
Tüm gruplardaki Bcl-2 protein boyanma dağılımı ise Şekil 4.7'de verilmiştir. Bu dağılıma göre istatistiksel olarak gruplar arasında Bcl-2 protein boyanma oranları dağılımı arasında anlamlı farklılık yoktur (Pearson  $\chi^2$  testi  $\chi^2=3.5$ ,  $sd=4$ ,  $p=0.55$ ).



**Şekil 4.7:** Olgularda sağlam peritoneal dokuda Bcl-2 protein boyanma oranları dağılımı.

Ötopik endometriyumda glandüler bax protein boyanma oranları tüm gruplarda değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmeye göre glandüler bax protein boyanma oranları dağılımı arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktur. (Pearson  $\chi^2$  testi  $\chi^2=7.5$ ,  $sd=4$  ve  $p=0.1$ ) Ötopik endometriyumda glandüler bax protein boyanma oranı dağılımı Şekil 4.8'de izlenmektedir.

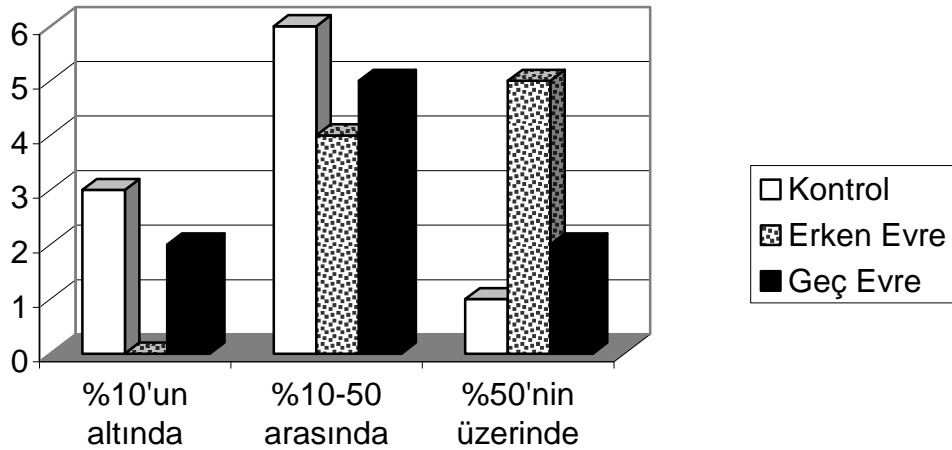
n



**Şekil 4.8:** Ötopik endometiumda glandüler bax protein boyanma oranları dağılımı.

Ötopik endometriumda stromal bax protein boyanma oranları dağılımı da tüm gruplarda değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmeye göre stromal bax protein boyanma oranları dağılımı arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktur. (Pearson  $\chi^2$  testi;  $\chi^2=6.4$ ,  $sd=4$  ve  $p=0.2$ ) Ötopik endometriumda stromal bax protein boyanma oranı dağılımı Şekil 4.9'da izlenmektedir.

n

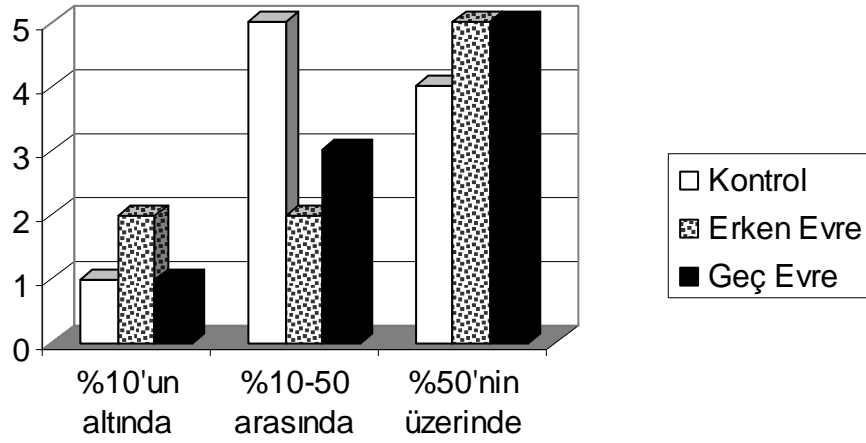


**Şekil 4.9:** Ötopik endometriumda stromal Bax protein boyanma oranları dağılımı.

Ötopik endometriumda glandüler ve stromal bcl-2 protein boyanma oranı dağılımı her üç grup için değerlendirildi. Buna göre glandüler bcl-2 boyanma oranı dağılımı ve stromal bcl-2 boyanma oranı dağılımı gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemekteydi (Glandüler bcl-2 için  $\chi^2=1.9$ ,  $sd=4$ ,  $p=0.78$  ve stromal bcl-2 için  $\chi^2=7.2$ ,  $sd=6$ ,  $p=0.29$ ).

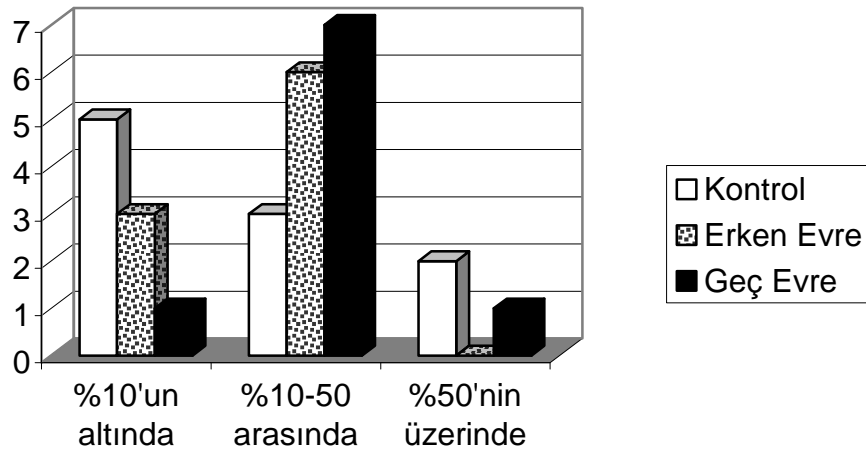
Ötopik endometrium dokuda glandüler bcl-2 protein boyanma oranları dağılımı Şekil 4.10'da ve stromal bcl-2 protein boyanma oranları dağılımı Şekil 4.11'de izlenmektedir.

n



**Şekil 4.10:** Ötopik endometriumda glandüler bcl-2 protein boyanma oranları dağılımı.

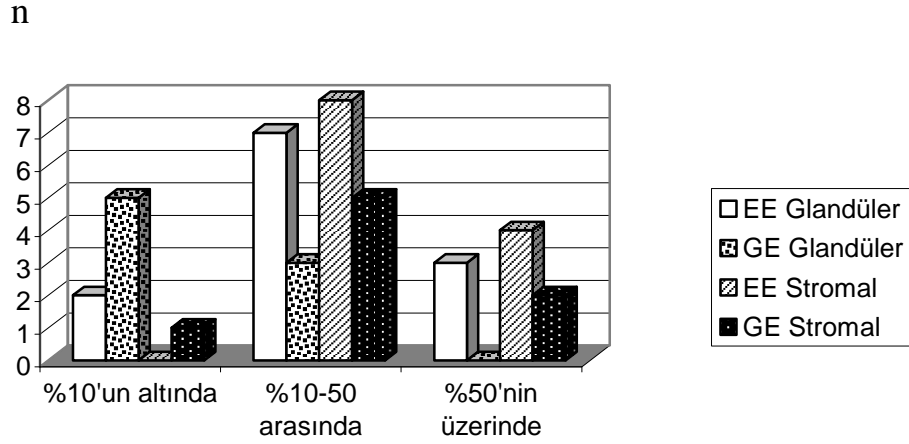
n



**Şekil 4.11:** Ötopik endometriumda stromal bcl-2 protein boyanma oranları dağılımı.

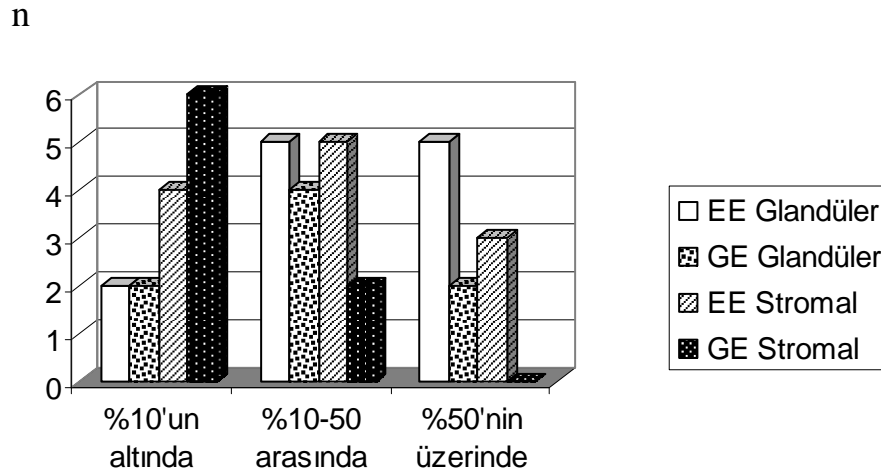


Ektopik endometriumda glandüler ve stromal Bax protein boyanma oranı dağılımı değerlendirilmiştir. Protein boyanma oranlarının dağılımı Şekil 4.12'de verilmiş olup ektopik endometriumda erken ve geç evre endometriosis olguları ayrı ayrı incelendiğinde Pearson  $\chi^2$  testi sonucu glandüler Bax protein ve stromal Bax protein dağılımları arasında anlamlı bir farklılık yoktu. (Glandüler bax için  $\chi^2=5.3$ ,  $sd=2$ ,  $p=0.93$  ve stromal bax için  $\chi^2=6.1$ ,  $sd=2$ ,  $p=0.07$ )



**Şekil 4.12:** Ektopik endometriumda Bax protein boyanma oranı dağılımı.

Ektopik endometriumda glandüler ve stromal bcl-2 protein boyanma oranı dağılımı değerlendirilmiştir. Protein boyanma oranlarının dağılımı Şekil 4.13'de verilmiş olup ektopik endometriumda erken ve geç evre endometriosis olguları ayrı ayrı incelendiğinde Pearson  $\chi^2$  testi sonucu glandüler bcl-2 protein ve stromal bcl-2 protein arasında anlamlı bir farklılık yoktu. (Glandüler bcl-2 için  $\chi^2=1.4$ ,  $sd=2$ ,  $p=0.6$  ve stromal bax için  $\chi^2=5.7$ ,  $sd=2$ ,  $p=0.1$ )



**Şekil 4.13:** Ektopik endometriumda Bcl-2 protein boyanma oranı dağılımı.

Erken evre ve geç evre endometriosisli olgularda ektojik ve ötopik endometriumda Bax ve Bcl-2 protein boyanma oranı dağılımı stromal ve glandüler dokuda ayrı ayrı değerlendirildi. Spearman korelasyon analizine göre glandüler Bax ve Bcl-2 protein boyanma oranı dağılımı arasında bir korelasyon varken (bax için  $r_s=0.524$  ve  $p=0.031$ , bcl-2 için  $r_s=0.514$  ve  $p=0.035$ ), bu proteinlerin stromal komponentlerdeki boyanma dağılımları arasında korelasyon yoktu (bax için  $r_s=0.2$  ve  $p=0.44$ , bcl-2 için  $r_s=0.76$  ve  $p=0.77$ ).

EE ve GE endometriosis olgularında ötopik ve ektojik endometrial glandüler dokuda bax protein boyanma oranları dağılımı karşılaştırıldı. Buna göre dokular arasında boyanma oranı dağılımı arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı. EE olgular için Exact  $\chi^2$  ve GE olgular için Fisher exact  $\chi^2$  testi uygulandı. (EE için  $\chi^2=0.4$ ,  $sd= 2$ ,  $p=1.000$  ve GE olgular için  $\chi^2=p=0.35$ ) Tablo 4.10'da endometriosisli olgularda ötopik ve ektojik glandüler endometrial dokuda bax protein boyanma oranları dağılımı izlenmektedir.

**Tablo 4.10:**Endometrisisli olgularda ötopik ve ektojik endometrial glandüler bax proteini boyanma oranı dağılımı.

<b>Bax protein</b>	EE % 10↓	EE % 10-50	EE % 50↑	GE % 10↓	GE % 10-50	GE % 50 ↑
Ötopik gland (n)	1	5	3	3	6	0
Ektojik gland (n)	2	7	3	5	3	0

Tablo 4.11'de endometriosisli olgularda ötopik ve ektojik stromal endometrial dokuda bax protein boyanma oranları dağılımı izlenmektedir. Buna göre dokular arasında boyanma oranları dağılımı arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı. İstatistiksel değerlendirme için EE olgularda Fisher Exact  $\chi^2$  ve GE olgular için exact  $\chi^2$  testi uygulandı. (EE için  $\chi^2=p=0.39$  ve GE olgular için  $\chi^2=0.27$ ,  $sd=2$ ,  $p=1.0$ )

**Tablo 4.11:**Endometrisisli olgularda ötopik ve ektopik endometrial stromal bax proteini boyanma oranı dağılımı.

<b>Bax protein</b>	EE %10↓	EE %10-50	EE %50 ↑	GE %10↓	GE %10-50	GE %50 ↑
Ötopik stroma	0	4	5	2	5	2
Ektopik stroma	0	8	4	1	5	2

EE ve GE endometriosis olgularında ötopik ve ektopik endometrial glandüler dokuda bcl-2 protein boyanma oranları dağılımı karşılaştırıldı. Buna göre dokular arasında boyanma oranları dağılımı arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı. Bu değerlendirme için exact  $\chi^2$  testi kullanıldı. (EE için  $\chi^2=0.87$ , sd= 2, p=0.73 ve GE olgular için  $\chi^2=1.71$ , sd=2, p=0.54) Tablo 4.12’de endometriosisli olgularda ötopik ve ektopik glandüler endometrial dokuda bcl-2 protein boyanma oranları dağılımı izlenmektedir.

**Tablo 4.12:**Endometrisisli olgularda ötopik ve ektopik endometrial glandüler bcl-2 proteini boyanma oranı dağılımı.

<b>Bcl-2 protein</b>	EE %10↓	EE %10-50	EE %50 ↑	GE %10↓	GE %10-50	GE %50 ↑
Ötopik gland	2	2	5	1	3	5
Ektopik gland	2	5	5	2	4	2

Tablo 4.13’de endometriosisli olgularda ötopik ve ektopik stromal endometrial dokuda bcl-2 protein boyanma oranları dağılımı izlenmektedir. Buna göre EE olgularda dokular arasında anlamlı fark yokken (exact  $\chi^2$  testi,  $\chi^2=2.86$ , sd=2, p=0.34), GE olgularda geç evre olgularda ektopik endometrial stromada bcl-2 protein boyanma oranı anlamlı olarak azalmıştır ( $\chi^2=7.32$ , sd=2, p=0.026).

**Tablo 4.13:** Endometrisisli olgularda ötopik ve ektopik endometrial stromal bcl-2 proteini boyanma oranı dağılımı.

Bcl-2 protein	EE %10↓	EE %10-50	EE %50 ↑	GE %10↓	GE %10-50	GE %50 ↑
Ötopik stroma (n)	3	6	0	1	7	1
Ektopik stroma	4	5	3	6	2	0

Serumda ve peritoneal sıvıda VEGF seviyeleri 14 erken evre endometriosis, 6 geç evre endometriosis ve 9 kontrol grubu olmak üzere toplam 29 olguda değerlendirilmiştir. Sonuçlar, Kruskal-Wallis testine göre değerlendirilmiş ve anlamlı farklılık saptanmamıştır. ( $\chi^2=1.43$ , sd= 2 ve p=0.49) Olguların serum ve peritoneal sıvıdaki VEGF bulguları Tablo 4.14’de verilmiştir.

**Tablo 4.14:** Serum ve peritoneal mayide VEGF için mean rank değerleri.

VEGF	Serum	Peritoneal mayi
	Kontrol (n:9)	17.56
Erken evre (n:14)	13.43	13.21
Geç evre(n:6)	14.83	16.58

Serumda ve peritoneal sıvıda bakılan IL-2, IL-4, IL-10 ve IFN- $\gamma$  erken evre, geç evre ve kontrol grubundaki mean rank değerleri karşılaştırıldığında Gruplar arasında sitokinler arasında istatistiksel anlamlı fark yoktu (Kruskal-Wallis testi).

Tablo 4.15’de EE, GE ve Kontrol grubu olgularında serumda sitokinlerin seviyelerinin mean rank değerleri izlenmektedir.

**Tablo 4.15:** Erken evre, Geç evre ve Kontrol grubu olgularında serumda sitokinlerin seviyelerinin mean rank değerleri.

	KONTROL	ERKEN EVRE	GEÇ EVRE	
IL-2	53.59	47.88	42.17	$\chi^2=3.68$ p=0.158
IL-4	50.77	47.76	48.25	$\chi^2=1.195$ p=0.55
IL-10	46.84	48.95	53.56	$\chi^2=3.43$ p=0.18
IFN- $\gamma$	49.31	47.98	50.75	$\chi^2=0.13$ p=0.93

Tablo 4.16'da EE, GE ve Kontrol grubu olgularında peritoneal sıvıda sitokinlerin seviyelerinin mean rank değerleri izlenmektedir

**Tablo 4.16:** Erken evre, Geç evre ve Kontrol grubu olgularda peritoneal sıvıda sitokin seviyelerinin mean rank değerleri.

	KONTROL	ERKEN EVRE	GEÇ EVRE	
IL-2	45.61	53.13	46.33	$\chi^2=1.85$ p=0.39
IL-4	47.05	51.35	47.53	$\chi^2=0.65$ p=0.72
IL-10	43.88	52.76	50.75	$\chi^2=3.19$ p=0.20
IFN- $\gamma$	44.18	53.70	47.94	$\chi^2=2.33$ p=0.312

Serumda ve peritoneal sıvıda bakılan T hücre alt grupları ve NK hücre dağılımının EE, GE ve kontrol grubundaki, Kruskal- Wallis testi sonucuna göre elde edilen mean rank değerleri (sıra puanları ortalaması) değerlendirilmiştir. Tablo 4.17’de serumda bu hücrelerin mean rank,  $\chi^2$  ve p değerleri verilmiştir. Bu değerlere göre gruplar arasında hücre dağılımları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

**Tablo 4.17:** Kontrol grubu, erken evre ve geç evre olgularda serumda T hücre alt grupları ve NK hücrelerin mean rank değerleri.

	KONTROL	ERKEN EVRE	GEÇ EVRE	
T h.	50.07	46.76	52.03	$\chi^2=0.52$ p=0.768
T sup.	49.46	51.04	43.31	$\chi^2=0.96$ p=0.62
Akt.T lenf.	45.98	41.36	40.47	$\chi^2=0.81$ p=0.67
NK	47.76	49.31	50.83	$\chi^2=0.154$ p=0.93

Tablo 4.18’de peritoneal sıvıda T hücre alt gruplarına ait bulgular izlenmektedir. Peritoneal sıvıda da hücresel dağılım açısından anlamlı farklılık saptanmamıştır.

**Tablo 4.18:** Kontrol grubu, erken evre ve geç evre olgularda peritoneal mayide T hücre alt grupları ve NK hücrelerin mean rank değerleri.

	KONTROL	ERKEN EVRE	GEÇ EVRE	
T h.	53.95	45.6	46.78	$\chi^2=1.87$ p=0.39
T supr.	52.04	42.72	54.39	$\chi^2=3.17$ p=0.21
Akt. T lenf	41.27	50.5	61.39	$\chi^2=5.05$ p=0.06
NK	51.5	42.95	57.97	$\chi^2=4.07$ p=0.13

## 5.TARTIŞMA

Apoptoz ya da programlı hücre ölümü, tam gelişmiş çok hücreli organizmalarda ve embriogenez sırasında çeşitli tip hücrelerin yok edildiği bir prosestir. Hem fizyolojik hem de patolojik durumlarda gerçekleşen apoptoz morfogenez, immünolojik tolerans, habis hücre büyümesi, otoimmünite, nörodejeneratif hastalıklar ve AIDS dahil çok eşitli durumlara sebep olmaktadır (135-137).

Mevcut veriler, endometriosisli kadınlar ve normal kadınlardan elde edilen endometrial hücreler arasında temel farklılıkların olduğunu göstermektedir. Endometriosisli kadınların endometrial hücreleri, ektopik yerlerde implante olarak yaşayabilme ve artmış proliferasyon yeteneğine sahiptir. Endometrial dokunun spontan apoptoza hassasiyetinin bozulması, anormal implantasyon ve endometriumun ektopik yerlerde büyümesine zemin hazırlar.

Endometrial hücrelerin bir ölüm sinyali transmit edememesi ya da hücre ölümüne karşı gelebilmeleri, bu hücrelerin, antiapoptotik faktörleri (ör:bcl-2) artırması, apoptoz öncül faktörleri örneğin bax proteininin azaltılması ile ilişkilidir (75). Endometriosisli hastaların ötopik endometriumundaki anormal apoptozun primer olarak yada pelvik endometrial yayılıma sekonder olarak geliştiği tam olarak açık değildir.

Endometriosis patogenezinde apoptozun yerini değerlendirmek için farklı çalışmalar yapılmıştır. Apoptotik hücreler ELİSA temelinde hücre ölüm tarama kitleri veya DNA parçalanmasına bağlı TUNEL yöntemi ile saptanmıştır (70). Hücre ölüm represör aktivitesini değerlendirmek için aynı zamanda bcl-2 de immünohistokimyasal olarak araştırılmaktadır (72).

Çalışmamızda TUNEL ve M-30 ile yapılan değerlendirmede 60 endometriosisli olgu ve 37 kontrol grubu karşılaştırıldı ki bu sayılar daha önceki çalışmaların çoğundan yüksekti (74, 142, 149, 172). Ancak bax ve bcl-2 protein değerlendirmeleri bu hastaların tümüne uygulanmadı.

Dökülen endometrial hücrelerin peritoneal hücrelerdeki morfolojik değişiklikleri indüklemesi, apoptosis veya nekroz veya hücre sel yeniden yapılanmadaki indüksiyonun sonucudur. Koks ve ark.(138) menstrüel doku tarafından salgılanan parakrin faktörlerin hücre şekli ve ekstrasellüler matriks yayılımında değişiklikleri indüklediğini göstermiştir.



Bir başka yayında Demir ve ark. (139) ise menstrüel akıntıdan dökülen hücrelerin mezotel üzerine zararlı etkileri olduğu üzerinde durmuştur.

Çalışmamızda normal görünen peritoneal dokuda erken evre, geç evre ve kontrol grubu olguları arasında TUNEL ve M-30 pozitiflikleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ( $p>0.05$ ). Benzer şekilde adezyon dokuda yapılan TUNEL ve M-30 pozitiflikleri de istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermedi ( $p=0.05$ ). Bu gruplarda bax protein boyanma oranına bakıldığında ise endometriosisli olgularda istatistiksel olarak anlamlı bir artış göze çarpmaktadır ( $p<0.05$ ). Endometriosisli olgular evrelerine göre değerlendirildiğinde evre ilerledikçe boyanma oranının azalmakta olduğu saptanmıştır.

Kaynaklarda endometriosisi olan ve olmayan olgularda sağlam peritoneal doku ve adezyon dokuda apoptosis değerlendirilmesi yapılmış çalışma mevcut değildir. Bu noktada mevcut çalışmamız öncül bir çalışma olarak kabul edilebilir. Yapılan TUNEL ve M-30 değerlendirme sonuçları ile olgu sayısı da göz önüne alındığında sağlam dokuda endometriosisi olan ve olmayan olgular arasında fark olmadığını söylemek mümkündür. Ancak apoptozla ilgili bax protein boyanma oranına bakıldığında evre ilerledikçe apoptozun arttığı anlaşılmaktadır. Bu bulgu endometriosisin etyopatogenezi düşünüldüğünde beklenmeyen bir bulgu olmakla beraber peritoneal doku ve adezyon için literatür bilgisi olmadığından yorum yapmak zordur. Endometriosisle ilişkisi olmayan sağlam hücrelerde kontrol grubu ve endometriosis olguları arasında parakrin faktörlerin neden olduğu farklılıklar olmayabilir. Endometriosisli olgulardaki bu sağlam periton hücreleri endometriosis bağlantılı faktörlerden etkilenmemiş ve kontrol grubu olgular ile aynı özelliklere sahip hücreler olabilir. Ancak sağlam peritoneal dokuda veya adezyon dokuda erken evre, geç evre endometriosis ve kontrol grubu arasında apoptosis değişiklikleri olmasa da bu durum tek başına endometriosis patogenezinde apoptozun yeri olmadığını açıklayamaz.

Çalışmamızda her üç grup arasında ötopik endometriumdaki TUNEL ve M-30 pozitiflikleri değerlendirildiğinde anlamlı istatistiksel farklılık yoktu ( $p>0.05$ ). Aynı şekilde ötopik endometrial dokuda hem glandüler hem de stromal bax ve bcl-2 protein boyanmaları arasında da istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ( $p>0.05$ ). Kaynaklarda bu konuda çelişkili sonuçlar mevcuttur.

İlk olarak Gebel ve ark. (11) endometriosisli olgularda ötopik endometriumda apoptosis paterninin sağlıklı kontrol grubuna göre daha düşük olduğunu bulmuştur. Daha

sonraki çalışmalarda yazarlar arasında apoptosis ekspresyonundaki farklılığa yönelik tam bir fikir birliği sağlanamamıştır (70,73,140).

Jones ve ark. (72) 30 endometriosis olan ve 15 endometriosis olmayan kontrol grubu olguda ötopik endometrium örneklerinde bcl-2 pozitif hücre oranlarını değerlendirdikleri çalışmalarında istatistiksel farklılık bulmamışlardır. Aynı şekilde her iki olgu grubundaki TUNEL pozitif hücreler oldukça nadir gözlenmiş ve arada fark saptanmamıştır.

Beliard ve ark. (141) 30 endometriosisli ve 15 kontrol grubu olguda ötopik endometriumda ve endometriotik dokuda apoptosis ve proliferasyonu p-53 ve bcl-2, östrojen ve progesteron reseptör üretimi ve TUNEL yöntemleri ile değerlendirmişlerdir. Endometriosis ve kontrol grubu arasında endometrial dokuda apoptotik ve proliferatif parametreler açısından anlamlı farklılık saptamamışlardır.

Meresman ve ark. (74) 14 endometriosisli ve 16 kontrol grubu olgusu ile yaptıkları çalışmada ötopik endometrial dokuda TUNEL yöntemi ile apoptotik hücreler belirlenmiş ve immünohistokimyasal yöntemle bcl-2 ve bax proteini değerlendirilmiştir. Buna göre, endometriosisli olgularda bir alandaki apoptotik hücre pozitifliği kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak azalmış olarak saptanmış. Bu değer endometriosis olguları için  $1,9 \pm 0,7$  iken kontrol grubu olgularda  $7,1 \pm 0,9$  olarak verilmiştir. Aynı çalışmada, endometriosisli olgularda proliferatif fazda bcl-2 protein ekspresyonunun endometriosisli olgularda artmış olduğunu, ancak sekretuar fazda böyle bir artışın sözkonusu olmadığı bildirilmiştir. Çalışmada bu farklılığın erken evre ve geç evre endometriosisli olgularda istatistiksel farklılığa ulaşmadığını, bunun hastalığın ciddiyeti ve ötopik endometrial hücrelerin spontan apoptoz kabiliyeti ile ilgili olmadığını düşündüğünü de bildirilmiştir. Szymanowski'nin (140) çalışmasında ise, ötopik endometriumda stromal ve glandüler komponentteki apoptotik hücreler değerlendirildiğinde endometriosisli olgularda düşük bulunmuş ve istatistiksel anlamlılığa da ulaşmıştır.

Mevcut çalışmaya benzer sonuçlar bulan diğer yayınlar (72, 141) göz önüne alınırsa; ötopik endometriumdaki apoptozun, peritoneal sitokinler ve büyüme faktörlerinden etkilenmediği ve ancak mikroçevre değiştiğinde farklı apoptoz oranları gösterdiği düşünülebilir. Ancak mevcut çalışma ektopik implantasyonun ötopik dokuda

proliferasyon artışından bağımsız olduğunu gösterse de bu konuda daha çok parametrenin birlikte değerlendirildiği çalışmalar yapılmasının uygun olacağı kanaatindeyiz.

Mevcut çalışmada, erken evre ve geç evre endometriotik olgularda ötopik ve ektopik endometrial doku karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı. Erken evrede 33 olgudan 1'inde M-30 pozitifliği ve 3'ünde TUNEL pozitifliği varken, geç evrede 12 olguda her iki parametre için de sadece 1 olguda pozitiflik saptandı. Erken evre ve geç evre endometriosis olgularında, ektopik endometrial dokuda hem stromal hem de glandüler dokuda yapılan bax ve bcl-2 protein boyanma oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ( $p>0.05$ ).

Beliard ve ark (141) endometriosisli olgularda ötopik endometrium ile karşılaştırıldığında, endometriotik lezyonda DNA parçalanmasının (TUNEL pozitifliği oranı) anlamlı olarak azaldığını ve ektopik alanda yaşamı devam etmesine öncülük edebilen bcl-2 ekspresyonunun anlamlı olarak arttığını saptamışlardır. Daha önce yapılmış olan bir çalışmanın sonuçları da ektopik endometrial dokuda apoptozun azaldığı yönündedir (72). Scotti ve ark. (142) endometriosisli olgularda ektopik endometriumda belirgin olarak azalmış proliferatif aktivite olduğunu göstermişlerdir.

Endometriosis olgularını hem ötopik hem de ektopik dokuda stromal ve glandüler bax ve bcl-2 protein boyanma oranları açısından karşılaştırdığımızda yalnızca geç evre olgularda ektopik endometrial stromal komponentte bcl-2 protein boyanma oranında ötopik endometriuma göre anlamlı azalma saptadık. Bu bulgu literatürdeki bilgilere ters düşmektedir, ancak diğer parametrelerde istatistiksel farklılık olmaması ve olgu sayısının azlığı yorum yapma konusunda dikkatli olmamız gerektirdiğini düşündürmektedir.

Endometriotik lezyonların persistansı ve büyümesi için proliferasyon gerekli görünmesine rağmen, çalışmamız patogeneizde apoptozun rolü olduğuna, hastalığın ilerlemesinde proliferasyonun bir mekanizma olduğunu düşündürecek sonuçlar vermemiştir. Apoptozun sadece bu çalışmada kullanılan yöntemlerle değil başka yöntemlerle ve daha geniş serilerde yapılması kaynaklardaki sonuçlara yeni bir bakış açısı sağlayabilir.

Mevcut çalışmada ektopik endometrial dokuda ve endometriotik kist cidarında EE olgularda M-30 pozitifliği arasında anlamlı farklılık saptadık. Diğer istatistik değerlerimiz ise istatistiksel anlama ulaşmamakla beraber anlama ulaşmaya oldukça yakın değerlerdeydi

(EE TUNEL için  $\chi^2=p=0.08$  ve M-30 için  $\chi^2=p<0.001$ , GE TUNEL için  $\chi^2=p=0.056$  ve M-30 için  $\chi^2=p=0.1$ ).

Arıcı ve ark. (143) laparoskopi uygulanan 75 endometriosisli olguda apoptozis ile endometriosis evresi ve menstrüel siklus fazı arasında ilişkiyi araştırdıkları çalışmada anlamlı fark saptamadıklarını bildirmişlerdir. Bu çalışmada TUNEL pozitifliği, bax ve bcl-2 protein ekspresyon pozitifliği ovarian endometriotik dokuda değerlendirilmiştir. Apoptotik hücreler (TUNEL) stromal hücrelerde glandüler hücrelerde anlamlı olarak artmış olarak bulunmuş ve bu değerler stromal hücrelerde %73,3 iken glandüler hücrede %48 olarak verilmiştir. Bunun aksine, hem bax hem de bcl-2 protein ekspresyonu stromal hücrelerde anlamlı olarak azalmış değerlerde saptanmıştır. Benzer şekilde bir başka yayında peritoneal endometriosisde evre ile apoptoz arasında TUNEL yöntemi kullanılarak anlamlı ilişki olmadığı saptanmıştır (70).

Bu bulgumuz kaynaklarda daha önce yapılmış olan çalışma sonuçlarıyla uyumludur. Tüm değerlendirmelerde istatistiksel olarak anlama ulaşılamamış olmakla beraber bu durum sayılarının yetersizliğine bağlanmıştır. Elde edilen değerler istatistik anlama ulaşmaya çok yakındır. Eğer programlanmış hücre ölümü endometrial hücrelerin ektopik büyümesini kolaylaştırıyorsa, apoptoz seviyesi ve endometriosisin ciddiyeti arasında ilişki olması beklenebilir. Bununla beraber, endometriotik lezyonların persistansı için apoptoz regülasyonun bozulması kritik bir nokta ise, hastalığın tüm seviyelerinde karşılaştırılabilir seviyelerde apoptoz beklenebilir. Apoptoz mekanizmasının endometriosis patogenezi ve persistansı üzerine kesin etkisini belirlemede daha ileri düzeyde çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Endometriotik olgularda peritoneal endometriotik lezyon ve ovarian endometriotik lezyon arasında apoptoz arasında bağıntının değerlendirildiği kaynaklarda, bu konudaki çelişkili sonuçlar yer almaktadır. Bcl-2'nin tüm ovarian endometriotik odak örneklerinde negatif olduğunu bildiren yayınların varlığı dışında, bcl-2'nin belirgin olarak arttığını bildiren yayınlar da mevcuttur (144-146). Bu farklı sonuçlar farklı patogenetik orjinler olabileceğini düşündürmüştür. Ovarian lezyonlar over epitelinin invajinasyonu ve metaplazisi sonucu oluştuğu ve peritoneal endometriosisin dökülen endometriumun implantasyonu sonucu oluştuğu düşünülmektedir (147).

Peritoneal, ovarian ve kolorektal endometriosisde apoptotik protein ekspresyonunu değerlendiren bir çalışmada bcl-2 ekspresyonu ovarian endometriotik

lezyonda peritoneal ve kolorektal endometriotik lezyona göre anlamlı olarak daha düşük, bax ekspresyonunu ise kolorektal endometriotik lezyonda ovaryan lezyona göre daha düşük bulunmuştur (148). Klemmt ve ark. (149) yaptıkları çalışmada yüzeysel peritoneal ve ovaryan endometriotik lezyonlardaki stromal hücrelerin ikiye katlanma zamanı arasında fark saptamamış ancak derin infiltre lezyonlarda ikiye katlanma zamanının anlamlı derecede kısa olduğunu saptamıştır. Kim ve ark. (150) 29 peritoneal endometriosis, 11 rektovajinal ve 22 ovaryan endometriosisli olguyu karşılaştırdıkları bir çalışmada peritoneal endometriosisin adezyon molekül ekspresyonunun ovaryan endometriosisden anlamlı olarak yüksek olduğu ve proliferatif aktivitenin ovaryan ve peritoneal endometriosisde rektovajinal endometriosisden anlamlı olarak yüksek olduğu saptanmıştır.

Bu çalışmada da ovaryan endometriosisli olgularda apoptotik hücre pozitiflik oranları ovaryan endometriosisde anlamlı olarak fazla saptanmıştır. Kaynaklarda TUNEL ve M-30 ile bu konuda yapılmış çalışma olmamakla beraber diğer parametrelerin değerlendirildiği yayınlar da mevcut çalışmaya benzer şekilde peritoneal ve ovaryan endometriosisde farklı apoptotik protein ekspresyonları bildirmiştir (144,145,146,150). Apoptoz ilişkili protein ekspresyonunun endometriosis lokalizasyonuna göre değişmesi farklı apoptotik yollar olduğunu, daha da ötesi apoptotik protein ekspresyon farklılıkları lokalizasyonuna göre endometriosisin farklı etyopatogenezlerle açıklanabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak, daha önceki çalışmalar ışığında apoptozun endometriosis patogenezinde yeri olduğu kabul edilebilir. Ancak bizim çalışmamız, apoptozun endometriosis patogenezinde yeri olduğunu göstermemiştir. Farklı çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilme sebepleri kullanılan yöntem ve dokuların farklı olmasından kaynaklanabilir. Ayrıca endometriosis halen etyopatogenezindeki gizliliği korumaktadır ve apoptoza eşlik eden ve olumlu veya olumsuz etkileyen pek çok kompleks mekanizmanın rolü olması muhtemeldir.

Dökülmüş endometrial dokunun abdominal kaviteye ulaşması lokal bir steril peritoneal sıvı inflamatuvar olayını indüklemektedir. Bu peritoneal mayi çoğu polimorf nüveli lökositlerden ve aktive makrofajlardan salınan çok sayıda büyüme faktörü ve sitokini içermektedir (100). İnflamatuvar reaksiyonun fizyolojik rolü ektopik hücre ve dokuyu peritoneal boşluktan temizlemektir. Bu sistem, mikroskopik endometriosis aralıklı

olarak tüm patent fallop tüpü olan ve menstrüel siklusu olan kadınlarda bulunduğundan çok etkin bir sistem gibi görünmemektedir (101).

Bu çalışmada serumda ve peritoneal mayide erken evre, geç evre ve kontrol grubu olgular arasında VEGF düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ( $p>0.05$ ).

VEGF endotelial hücre yaşamı, proliferasyonu ve anjiogenez için önemli bir düzenleyici olup endometriyumda anjiogenez düzenlenmesi içinde özel bir role sahip gibi görünmektedir (151). Kaynaklarda endometriosisi olan ve olmayan olguların serum VEGF seviyeleri ile ilgili pek çok yayın mevcuttur (152-155).

Bourley ve ark. (156) hem serumda hem de peritoneal sıvıda VEGF seviyelerinin endometriotik olgularda daha yüksek olduğunu ve anjiogenetik regülasyonda bozulmanın sözkonusu olabileceğini bildirmişlerdir. Daha önce yapılmış olan çalışmada peritoneal sıvı VEGF seviyeleri endometriosisli olgularda kontrol grubunda daha yüksek bulunmuştur. (157,158) Xavier ve ark. (159) ise endometriosisli olgularda serum VEGF seviyelerinde endometriosisli olgularda anlamlı bir artış olduğunu göstermişlerdir.

Gagne ve ark. (153) 131 endometriosis olgusu ve 146 kontrol grubu olgu arasında serum VEGF seviyelerini ELİSA yöntemi ile saptamışlar ve anlamlı farklılık saptamamışlardır. Bu çalışmada olguların tümü luteal fazda değerlendirilerek siklusun farklı fazlarında olabilecek değişiklikler ekarte edilmiştir. Pellicer ve ark. (155) 20 endometriosisli ve 18 kontrol grubu olguda folliküler fazda yaptıkları çalışmada, VEGF'nin endometriosisli olgularda serumda arttığını, ilginç olarak peritoneal sıvıda endometriosisli olgular ve kontrol grubu olgular arasında anlamlı fark olmadığını saptamışlardır.

Çalışma sonuçları kaynaklardaki VEGF ilişkili çelişkili yayınlara bir yenisi eklenmiştir. Tüm olgularımız teknik nedenli değerlendirilememiş olmasına rağmen VEGF çalışılan olgu sayısı yetersiz değildir. Çalışmamız endometriosisli olgularda serum ve peritoneal sıvıda VEGF seviyesi ile hastalığın varlığı, evresi ve skoru arasında bağıntı olmadığı olasılığını düşündürmektedir. Daha önce yapılmış olan çalışmalarda, endometrial hiperplazi, anormal uterin kanama veya over kisti gibi benign jinekolojik hastalıkların da VEGF ile ilişkili olabileceğini göstermiştir (152). Çalışmada myom, tubaovaryan abse veya bilinen hiperplazisi olan olgular kabul edilmemekle birlikte over kisti ve anormal uterin kanaması olan kontrol grubu olgular kabul edildi. VEGF endometriotik odakların

gelişiminde kritik bir role sahip olmakla beraber, dolaşımdaki VEGF düzeyi hastalıkla ilişkili olmayabilir.

Daha önce yapılmış çalışmalara göre, retrograd endometrium inokülasyonuna karşı yetersiz lokal immünite, sitokin üretiminde bir dengesizlik ve azalmış NK hücre sayısı lokal ektopik endometrial doku gelişimine neden olabilirler (160).

Endometriosisde NK hücre teorisine göre endometriotik hücreler NK hücrelerin doğal hedefidir ve NK hücrelerde ektopik endometriumu temizlemeye yönelik bir başarısızlık hastalığın gelişimiyle sonuçlanabilir. Bununla beraber halen NK hücre aktivitesindeki değişikliğin hastalığın etkisi de olabileceği tartışılmaktadır (161,162).

Mevcut çalışmadaki sonuçlar değerlendirildiğinde, serumda ve peritoneal sıvıda NK hücrelerinin sayısı arasında EE, GE endometriosis ve kontrol grubu olgular arasında anlamlı farklılık saptanmadı ( $p>0.05$ ). NK hücrelerin endometriosis patogenezindeki yerine yönelik çalışmalarda, NK aktivitesi farklı sonuçlanmış olmakla beraber, NK sayısının değerlendirildiği bir çalışmada, mevcut çalışmaya benzer olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır.

Somigliana ve ark. (126) yaptığı çalışma sonucuna göre ise, endometriosisli olgularda dolaşımdaki ve peritoneal sıvıdaki NK hücre sitotoksitesi azalmıştır, ancak hem dolaşımdaki hem de peritoneal sıvıdaki NK sayısında değişiklik yoktur. Benzer olarak mevcut çalışmada, NK hücre sayıları değerlendirilmiştir, ancak hücre sayıları fonksiyon konusunda net bilgi sağlamamaktadır.

Oosterlync ve ark. (163) otolog endometrial hücelere karşı endometriosisli kadınlarda NK hücre sitotoksitesinde azalma olduğunu ve bu azalmanın evreyle korele olduğunu bildirmişlerdir. Aynı grup daha sonra yaptığı bir çalışmada ise, endometriosisli olgularda peritoneal sıvıda anlamlı olarak artmış bir NK aktivitesi olduğunu bildirmiştir (124). Quaranta ve ark. (164) 10 endometriosisli ve 8 kontrol grubu olgu ile yaptıkları çalışmada, endometriosisli olgularda NK hücre aktivitesinde anlamlı azalma saptamışlardır. Bu çalışmada etkin kabul edilen hücreler hedef hücrelerle ilişkilendirilerek sitotoksiste değerlendirilmiştir. Prefuma ve ark. (165) sekretuar endometrial hücrelerde CD54 ekspresyonunda azalmanın, NK hücreler tarafından tanınma ve yok edilmelerinde azalmayla sonuçlandığını göstermiştir. D'Hooghe ve ark. (166) yaptıkları bir hayvan çalışmasında, endometriosisli olgular ve endometriosis olmayan olgular arasında NK hücre aktivitesi ve lenfosit aracılı sitotoksitenin karşılaştırılabilir olduğunu saptamıştır. Bu

çalışmada da yine NK hücre aktivitesini değerlendirmek için NK sensitif bir eritromyeloid lökemik hücre serisi kullanılmıştır .

Kaynaklarda NK hücrelerin endometriosis patogenezindeki yerine yönelik çalışmalarda NK aktivitesi farklı sonuçlanmış olmakla beraber, NK sayısının değerlendirildiği bir çalışmada, mevcut çalışmaya benzer olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır.

Çeşitli çalışmacılar endometriosisde immunolojik sistemin rolünü ortaya çıkarmak için çalışmalar yapmışlar ve bununla bağlantılı bazı anormallikler bulmuşlardır (167). Endometriosisli olgularda lenfosit subgrupları son 20 yıl içinde pek çok araştırmacı tarafından değerlendirilmiş ve peritoneal sıvı, periferal kan ve endometriotik dokularda farklı sonuçlar verilmiştir (168,169).

Hastalığın inflamatuvar doğası ve uzak hücre implantasyonunda immun sistem tarafından üretilen çeşitli sitokinlerin önemi göz önüne alınarak, bu çalışmada T hücrelerle ilişkili sitokin profili değerlendirildi (178,179).

Yaptığımız çalışmada hem serumda hem de peritoneal mayide IL-10 ve IFN- $\gamma$  seviyeleri arasında erken evre ve geç evre endometriosis ve kontrol grubu arasında anlamlı farklılık saptamadık ( $p>0.05$ ). Çalışmamızda sitokinlere ilişkin bir diğer sonuç pro-inflamatuvar kabul edilen IL-2 ve antiinflamatuvar kabul edilen IL-4 arasında da erken evre, geç evre endometriosis ve kontrol grubu olgular arasında fark saptanmamış olmasıydı ( $p>0.05$ ).

Kaynaklarda Th1 ve Th2 hücreler arasındaki kooperasyonun örnekleri gösterilmiş olup, endometriosisde hem antikor yanıtı oluşumu hem de her iki hücrenin birden rolü sözkonusu gibi görünmektedir. 2 hücre grubu arasında aracı olarak özellikle IL-4 göze çarpmaktadır (180).

Tabibzadeh (67) yaptığı çalışmada IL-10 seviyesini endometriosisli olgularda peritoneal sıvıda artmış saptadığını bildirmiştir. Yine bir başka çalışmada, IVF uygulanan açıklanamayan infertilitesi olan ve endometriosisi olan 101 olguda periferal kanda mononükleer hücre kültürlerinde IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$  seviyeleri ELISA yöntemi ile belirlenmiş IL-10 seviyelerinin endometriosisli olgularda kontrol grubundan daha düşük olduğu bulunmuştur (170).

Szylo ve ark. (169) endometriosisli olgularda CD4 T hepler hücrelerde artış ve CD8 T supresör hücrelerde azalma saptamış olmakla beraber, hücre alt grupları ile sitokin



üretimi ve hastalığın evresi arasında korelasyon saptamamıştır. Bir başka yayında ise aktive peritoneal T hücre azalmasının daha çok geç evre olguların ana özelliği olduğu ve CD4 T hücrelerin erken evre olgularla ilişkili olduğu, ancak CD4 T hücrelerin peritoneal lokal hücrel immüniteyi dalgalandıran mekanizmanın net olmadığı bildirilmiştir (171).

CD4 Th hücreler IL-2, IL-12 ve IFN- $\gamma$  salgılayan Th1 ve IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 ve IL-13 salgılayan Th2 hücreler olmak üzere ikiye ayrılır(52). Harada ve ark. (52) endometriosisli kadınlarda; peritoneal sıvıda Th2'nin IL-4 ve IL-10 salınımını artırarak hücre aracılı immüniteyi anormal olarak baskıladığı bildirilmiştir.

D'Hooghe ve ark. (172) yaptıkları çalışmada 7 derin endometriosisli ve 6 yüzeysel endometriosisli olguda peritoneal sıvı ve periferik kanda IL-6, IL-10 ve IFN- $\gamma$  seviyelerini değerlendirmişler ve sonuçta derin ve yüzeysel endometriosisli olgular arasında anlamlı farklılık saptamamışlardır. Ginsburg ve ark. (170) 101 endometriosisli ve kontrol grubu olgular arasında serumda IFN- $\gamma$  seviyeleri arasında anlamlı fark olmadığı bulmuştur. Khoram ve ark. (173) 12 ciddi endometriosis, 12 hafif endometriosis ve 12 kontrol grubu olgu arasında peritoneal sıvıda IFN- $\gamma$  seviyeleri arasında istatistiksel anlamlı farklılık olmadığı bulmuştur.

Hücre aracılı immünite, özellikle T hücre aracılı olan Th1 ve Th2 tarafından üretilen sitokinlerin sitotoksisiteyi aktive veya suprese etmesiyle olur. Örneğin, Th1 tarafından sitotoksik NK'yı aktive eden IL-12 salınırken, Th2 IL-10 üreterek NK hücre aktivitesini azaltabilmektedir (51,174). Szylo ve ark. (169) endometriosisli olgularda CD4 T hepler hücrelerde artış ve CD8 T supresör hücrelerde azalma saptamış olmakla beraber, hücre alt grupları ile sitokin üretimi ve hastalığın evresi arasında ilişki saptamamışlardır. Bir başka yayında ise aktive peritoneal T hücre azalmasının daha çok geç evre olguların ana özelliği olduğu ve CD4 T hücrelerin erken evre olgularla ilişkili olduğu, ancak CD4 T hücrelerin peritoneal lokal hücrel immüniteyi dalgalandıran mekanizmanın net olmadığı bildirilmiştir (175).

Podgaec ve ark. (176) yaptıkları çalışmada endometriosisli olan ve olmayan olgularda IL-2, IL-4, IL-10, TNF- $\alpha$  ve IFN- $\gamma$  seviyelerini serumda ve peritoneal sıvıda değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada olgu sayısı açısından değerlendirildiğinde kaynaklardaki geniş serilerden biri olup, 65 endometriosisli ve 33 endometriosis olmayan kontrol grubu içermektedir. Bu olgu sayıları bizim çalışmamıza da oldukça yakındır. Aynı çalışmada, endometriosisli olgularda periferik kanda IL-2, IL-4, IL-10 ve IFN- $\gamma$  arasında

istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptamamışlar, peritoneal sıvıda ise endometriosisli olgularda sadece IL-10 ve IFN- $\gamma$  seviyelerinde istatistiksel anlamlı yükseklik saptamışlar. Kontrol grubu ve endometriosisli olgular arasındaki sitokin seviyeleri örneklerin alındığı menstrüal siklus fazıyla da istatistiksel olarak anlamlı saptanmamışlar ve bu değişkenin bu sitokinler üzerine etkisi olmadığını savunmuşlardır. Podgaec ve ark. Th1 ve Th2 yanıtını sitokin seviyeleri ile değerlendirdikleri çalışmada endometriosisin evresi ile sitokin seviyeleri ve Th1 ve Th2 yanıtı arasında istatistiksel fark bulmamışlardır.

Antsiferova ve ark. (177) periferel kan ve endometriotik dokuda yaptıkları çalışmada PCR (polimeraz change reaction) yöntemi ile IL-2, IL-4 ve IL-10'un mrna ekspresyonunu, hücre içi sekresyonlarını ve akım sitometresi ile de lenfosit fenotip profilini değerlendirmişlerdir. Yirmi kontrol grubu ve 15 endometriosisli olgu grubunda değerlendirme bizim çalışmamızdan farklı olarak tüm olgular siklusun proliferatif fazındayken yapılmış. Endometriosisli olgularda periferel kan lenfositlerinde IL-4 ve IL-10 mrna seviyeleri anlamlı olarak yüksek saptanırken, IL-2 seviyeleri arasında anlamlı fark saptanmamıştır. Bu çalışma sonucuna göre, endometriosisli olgularda sistemik düzeyde Th2 farklılaşmasına eğilim vardır. Ötopik endometrial hücrelerde yapılan değerlendirmede ise endometriosisli olgularda IL-2 ve IL-4 için artmış mRNA seviyeleri sözkonusu iken IL-10 mRNA seviyeleri arasında anlamlı farklılık yoktur. Ektopik endometrial hücrelerde de IL-4 mRNA seviyeleri ve hücre içi IL-4 seviyeleri yüksek saptayan bu çalışmada endometriotik lezyonlarda da Th2 aktivasyonu desteklenmektedir.

Mevcut çalışmada değerlendirilmesi planlanan her sitokin için ayrı ayrı seviyeleri olmayıp, immün yanıtın düzenlenmesinde sitokinlerin ve elbette bu sitokinlerin kaynaklarının yeridir. Bu çalışma endometriosis patogenezinde inflamatuvar farklılıklar olduğu hipotezini değerlendirilen sitokinler ve hücreler doğrultusunda desteklememektedir. Ancak bu negatif bulgular ihtiyatla yorumlanmalıdır. İlk olarak yapılan çalışmaların bazılarında sitokinler farklı yöntemlerle ve farklı dokularda değerlendirilmesi bu çelişkili sonuçlara neden olmuş olabilir. İkincisi, yüzeysel peritoneal, ovaryan veya derin endometriosis olguları periferel kan ve peritoneal mayide değişken sitokin seviyelerine bağımlı olabilir ki bu ayırım çalışmamızda belirtilmemiştir. Üçüncü olarak, insan immün sistemi sadece burada değerlendirilen hücreler ve sitokinlerden ibaret değildir ve bir hücre varlığında bir yanıtın veya yokluğunda diğer bir yanıtın söz etmek olası değildir. Endometriosis farklı klinik şekilde karşımıza çıkabilen ve bu varyantlarla ilişkili daha fazla

alışmalara gerek duyulan klinik bir durumdur. Bu nedenle, periferik kan ve peritoneal mayi sitokin düzeyleri açısından net bilgiler ek çalışmalar gerektirmektedir.

## 6. SONUÇ

Endometriosis, doğurganlık çağındaki kadınlarda en sık görülen jinekolojik hastalıkların başında gelmektedir. Şu ana kadar kesin patofizyolojik süreç tanımlanmamakla birlikte, çeşitli teoriler ışığında, bu süreç açıklanmaya çalışılmaktadır.

Son zamanlarda, hücre düzeyinde olan çalışmalar ile, endometriosisde değişik bakış açıları oluşmaktadır. Bu çalışmalar çoğunlukla, lokal sitokin dağılımları, anjiogenetik süreç belirteçleri ve retrograd yolla dökülen ötopik endometrial hücrelerin intrinsik özellikleri üzerine yoğunlaşmaktadır.

Yapmış olduğumuz çalışmada, kontrol grubu olgular ile EE ve GE endometriosis olguları arasında apoptoz oranları açısından fark bulmadık. Bu sonuç, endometriosis patogenezinde apoptozun yeri olmadığını düşündürmektedir. Ancak peritoneal endometrial odak ve endometriotik kist cidarından alınan örneklerde apoptoz arasında anlamlı fark bulunmuştur. Bu farklılık, farklı lokalizasyonlardaki endometriosisin patofizyolojisinde farklı mekanizmaların rol oynayabileceğine dikkat çekmiştir.

Endometriosisde, lokal ve sistemik immünite değişiklikleri ve bununla bağlantılı olan sitokin değişiklikleri de bu çalışmada araştırılmış, ancak EE, GE endometriosis ve kontrol grubu olgular arasında istatistiksel farklılığa ulaşamamıştır. Bu doğrultuda, endometriosis patogenezinde immün sistemin rolü olmadığı sonucuna ulaştık. Bu konuda kaynaklarda da çelişkili sonuçlar veren yayınlar mevcuttur.

Çalışmamız, endometriosisde patofizyolojiyi açıklamaya yönelik pek çok parametreyi içermesine rağmen, endometriosisin bu çalışmadaki parametrelerin dışında da değişik faktörlerden etkileniyor olma olasılığını gözardı edemeyiz. Kaynaklardaki yayınlar doğrultusunda lokal ya da sistemik değişik teoriler üretilebilir. Bizim için bilmece olmaya devam eden bu hastalığın tam olarak çözülebilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu inancındayız.

## 7.KAYNAKLAR

1. Sampson JA. Perforating hemorrhagic cysts (chocolate cyst) of the ovary: their importance and especially their relation to pelvic adenomas of the endometrial type. *Arch Surg* 1921; 3: 245.
2. Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* 1927; 14: 22-69.
3. Donnez J, Chantaine F, Nisolle M. The efficiency of medical and surgical treatment of endometriosis associated infertility: arguments in favour of a medico-surgical approach. *Hum Reprod Update* 2002; 8: 89-94.
4. Nisolle M, Casana-Roux F, Donnez JA. Immunohistochemical analysis of proliferative activity and steroid receptor expression in peritoneal and ovarian endometriosis. *Fertil Steril* 1997; 68: 912-19.
5. Bouckaert PR, Evers JLH, Doesburg WH. Patterns of changes in proteins in the peritoneal fluid of women during periovulatory phase of the menstrual cycle. *J Reprod Fert* 1986; 77: 229-336.
6. Chew PCT, Peh KL, Loganath A, Gunasegaram R, Ratnam SS. Elevated peritoneal fluid luteinizing hormone and prolactin concentrations in infertile women with endometriosis. *Int J Gynecol Obstet* 1990; 33: 35-39.
7. Hsu CC, Yang BC, Huang KE. Enhanced IL-4 expression in patients with endometriosis. *Fertil Steril* 1997; 67: 1059-1064.
8. Li JX, Dai SZ, Liu H, Cao YM, Liu SQ. Study on the changes of T-lymphocyte subsets in the patients with endometriosis. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 2005; 40: 17-20.
9. Meresman GF, Bilotas MA, Lombardi E, Tesonom-Sueldo C, Bancau RI. Effect of GnRH analogues on apoptosis and release of IL-1 and vascular endothelial growth factor in endometrial cell cultures from patients with endometriosis. *Human Reprod* 2003; 18: 1767-1771.
10. Gurgan T, Bukulmaz O, Yaralı H, Tanir M, Akyildiz S. Serum and peritoneal fluid levels of IGF-1 and IGF-2 and insulinlike growth binding protein-3 in endometriosis. *J Reprod Med* 1999; 44:450-454.

11. Gebel HM, Braun DP, Tambur A, Frame D, Rana N, Dmowski WP. Spontaneous apoptosis of endometrial tissue is impaired in women with endometriosis, *Fertil Steril* 1998;69:1042-1047.
12. Dmowski WP, Ding J, Shen J, Rana N, Fernandez BB, Braun DP. Apoptosis in endometrial glandular and stromal cells in women with and without endometriosis, *Hum Reprod* 2001; 16: 1802-1808.
13. Garcia-Velasco JA, Arıcı A. Apoptosis and the pathogenesis of endometriosis, *Semin Reprod Med* 2003; 21: 165.
14. Speroff L, Fritz MA. *Klinik Jinekolojik Endokrinoloji ve İnfertilite*. Güneş Kitabevi. Ankara 2007 Endometriosis : 1103-1134.
15. Halme J, Becker W, Wing R, Accentuated cyclic activation of peritoneal macrophages in patients with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1984; 148: 85.
16. Blumenkrantz MJ, Gallagher N, Bashore RA, Tenckoff H. Retrograde menstruation in women undergoing chronic peritoneal dialysis. *Obstet Gynecol* 1981; 57: 667-70.
17. Liu DY, Hitchcock A. Endometriosis: its association with retrograde menstruation, dysmenorrhea and tubal pathology. *Br J Obstet Gynecol* 1986; 93: 859-862.
18. Kruitwagen RPFM, Poels LG, Willemsen WNP, Jap PHK, Thomas CMG, Rolland R. Endometrial epithelial cells in peritoneal fluid during the early follicular phase. *Fertil Steril* 1991; 55: 297-303.
19. Palmer JR, Driscoll SG, Rosenberg LIF, Berkowitz RS, Lurain JR, Soper J, Twiggs LB, Gershenson DM, Kohorn EI, Berman M, Shapiro S, Rao RS. Oral contraceptive use and risk of gestational trophoblastic tumors. *J Natl Cancer Ins* 1999; 91: 635-40.
20. Geraedts JP, Harper J, Braude P, Sermon K, Veiga A, Gianaroli LIF, Agan N, Munne S, Gitlin S, Blenow E, de Boer K, Hussey N, Traeger-Synodios J, Lee SH, Viville S, Krey L, Ray P, Emiliani S, Liu YH, Vermeulen S, Knavakis E. Preimplantation genetic diagnosis, a collaborative activity of clinical genetic departments and IVF centres. *Prenat Diag* 2001; 21: 1086-1092.
21. Olive DL, Henderson DY. Endometriosis and müllerian anomalies. *Obstet Gynecol* 1987; 69: 412-425.

22. Cramer DW, Missmer SA. The epidemiology of endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 955: 11-22.
23. Jenkins S, Olive DL, Haney AF. Endometriosis: pathogenetic implications of the anatomic distribution. *Obste Gynecol* 1986; 67: 335-338.
24. Grupos Italliano per lo Studio Dell'Endometriosi. Prevalance and anatomic distribution of endometriosis in women with selected gynecological conditions: results from a multicentric Italian study. *Hum Reprod* 1994; 9: 1158-1162.
25. Velasco I, Campos A, Acien P. Changes in cytokine levels of patients with ovarian endometriosis after treatment with gonadotropin-releasing hormone analogue, ultrasound-guided drainage, and intracystic recombinant IL-2. *Fertil Steril* 2005; 83: 873-877.
26. D'Hooghe TM, Bambra CS, Raeymakers BM, De Jonge I, Lauweryns JM, Konickx PR. Intrapelvic injection of menstrual endometrium causes endometriosis in baboons (*Papio cynocephalus* and *Papio anubis*). *Am J Obstet Gynecol* 1995; 173: 125-134.
27. Clark AH. Endometriosis in a young girl. *JAMA* 1948; 136: 690.
28. El-Mahgoub S, Yaseen S. A positive proof for the theory of coelomic metaplasia. *Am J Obstet Gynecol* 1980; 137: 137-140.
29. Gruenwald P. Origin of endometriosis from the mesenchyme of the coelomic walls. *Am J Obstet Gynecol* 1942; 44: 470.
30. Das Gupta S, Pal SK, Saha PK, Dawn CS. Endometriosis in the thumb. *J Indian Med Assoc* 1985; 83: 122.
31. Martin JD, Jr., Hauck AE. Endometriosis in the male. *Am Surg* 1985;51:426-430.
32. Matsuura K, Othake H, Katabuchi H, Okamura H. Coelomic metaplasia theory of endometriosis: evidence from in vivo studies and an in vitro experimental model. *Gynecol Obstet Invest* 1999; 47: 18-20.
33. Ueki M. Histologic study of endometriosis and examination of lymphatic drainage in and from the uterus. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165: 201-209.
34. Levander G, Normann P. The patogenesis of endometriosis: an experimental study. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1998; 34: 355-66.

35. Coxhead D, Thomas EJ. Familial inheritance of endometriosis in a British population: a case control study. *J Obstet Gynecol* 1993; 13: 42-46.
36. Simpson JL, Elias J, Malinak LR, Buttram VC. Heritable aspects of endometriosis. I. Genetic studies. *Am J Obstet Gynecol* 1980; 137: 327-331.
37. D'Hooghe TM, Hill JA. Immunobiology of endometriosis. In: *Immunology of reproduction* Edited by: Bronston R, Anderson DJ. Cambridge, MA, USA. 1996: 322-356.
38. Büyükgebiz O, Caferler JS. Apoptosis. *Sendrom* 2001;1:102-106.
39. Granville DJ, Carthy CM, Hunt DWC . Apoptosis: Molecular aspect of cell death and disease. *Lab Invest* 1998; 78: 893-913.
40. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997; 88: 355-365.
41. Cotran RS, Kumar V, Collins T(eds). *Cellular Pathology: cell injury and cell death*. In: *Robbins Pathologic Basis of Disease*, 6. Edition, WB Saunders Company, 1999: 18-25.
42. Geske FJ, PhD, Gerschenson LE, MD, PhD. *The Biology of Apoptosis*. *Human Pathology* 2001; 32: 1029-1038.
43. Ergin M, Aklan S. Apotozis. *Arşiv* 2002;11: 495.
44. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via spesific labelling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992; 119: 493-501.
45. Leers MPG, Kölgen W, Björklund V, Bergman T, Tribbick G, Persson B, Björklund P, Ramaekers FCS, Björklund B, Nap M, Jörnvall H, Schutte B. Immunocytochemical Detection and Mapping of a Cytokeratin 18 Neo-epitope Exposed During Early Apoptosis. *J Pathol* 1999; 187: 567-572.
46. Reed JC. Cytochrome C: can't live with it-can't live without it. *Cell* 1997; 91:559.
47. Eskenazi B and Warner ML. Epidemiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1997; 24, 235-238.
48. Halme J, Hammond MG, Hulka JF, Raj S and Talbert LM. Increased activation of pelvic macrophages in infertile women with endometriosis. *Obstet Gynecol* 1984; 64: 151-154.



49. Arumugam K and Lim JM. Menstrual characteristics associated with endometriosis. *Br J Obstet Gynecol* 1997; 104: 948-950.
50. Vinatier D, Orazi G, Cosson M and Dufour P. Theories of endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001; 96: 21-34.
51. Sharpe-Timms KL Endometrial anomalies in women with endometriosis. *Ann NY Acad Sci* 2001; 943: 131-147.
52. Harada T, Iwabe T and Terakawa N Role of cytokines in endometriosis. *Fertil Steril* 2001 76; 1-10.
53. Hopwood D and Levison DA. Atrophy and apoptosis in the cyclical human endometrium. *J Pathol* 1976 ; 119:159-166.
54. Otsuki Y, Misaki O, Sugimoto O, Ito Y, Tsujimoto Y and Akao Y. Cyclic bcl-2 expression in human uterine endometriura during menstrual cycle. *Lancet* 1994;34: 28-29.
55. Kerr JFR, Wyllie AH and Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972 ;26: 239-257.
56. Kokawa K, Shikone T and Nakano R. Apoptosis in the human uterine endometrium during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 4144-47.
57. Shikone T, Yamoto M, Kokavva K, Yanaiashita K, Nishimori K and Nakano R. Apoptosis of human corpora lutea during cyclic luteal regression and early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 2376-80.
58. Vaskivuo TE, Stenback F, Karhumaa P, Risteli J, Dunkel L and Tapanainen JS. Apoptosis and apoptosis-related proteins in human endometrium. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 165: 75-83.
59. Diebold J, Barretton G, Felchner M, Meier W, Dopfer K, Schmidt M and Lohrs U. Bcl-2 expression, p53 accumulation and apoptosis in ovarian carcinoma cell lines. *Am J Clin Pathol* 1996; 105: 341-349.
60. Reed JC Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* 1997; 387: 773-776.
61. Otsuki Y. Apoptosis in human endometrium: apoptotic detection methods and signaling. *Med Electron Microsc* 2001; 34: 166-173.

62. Rogers PA, Lederman F, Plunkett D and Affandi B. Bcl-2, Fas, and caspase-3 expression in endometrium from levonorgestrel implant users with and without breakthrough bleeding. *Hum Reprod* 2000; 15: 152-161.
63. Oltvai ZN, Milliman CL and Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vitro with a conserved homolog, Bax, the accelerated programmed cell death. *Cell* 1993; 74: 609-619.
64. Tao X-J, Tilly Ki, Maravei DV, Shifren JL, Krajevski S, Reed JC, Tilly JT and Isaacson KB Differential expression of members of the bcl-2 gene family in proliferative and secretory human endometrium: glandular epithelial cell apoptosis is associated with increased expression of bax. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 2738-46.
65. Tao X-J, Sayegh RA, Tilly JT and Isaacson KB. Elevated expression of the proapoptotic BCL-2 family member, BAK, in the human endometrium coincident with apoptosis during the secretory phase of the cycle. *Fertil Steril* 1998; 70: 338-343.
66. Chittenden T, Harrington EA, O'Connor R, Flemington C, Lutz RJ, Evan GI and Guild BC Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak. *Nature* 1995; 374: 731-733.
67. Thabibzadeh S. Signals and molecular pathways involved in apoptosis with special emphasis on human endometrium. *Hum Reprod* 1995; 1: 303-323.
68. Hassa H, Yıldırım A, Tekin B, Özdemir F, Açıklın E, Özdamar K. Buserelinin sıçanlarda cerrahi yöntemle oluşturulmuş endometriosis'e etkisi. *Türk Fertilite Dergisi* 1993; 1: 5-11.
69. Gebel HM, Braun DP, Tambur A, Frame D, Rana N and Dmowski DP. Spontaneous apoptosis of endometrial tissue is impaired in women with endometriosis. *Fertil Steril* 1998; 9: 1042-1047.
70. Dmowski WP, Ding J, Shen J, Rana N, Fernandez BB and Braun DP. Apoptosis in endometrial glandular and stromal cells in women with and without endometriosis. *Hum Reprod* 2001; 16: 802-1808.
71. Watanabe H, Kanzaki H, Narukavva S, Inoue T, Katsuragavva H, Kaneko Y and Mori T. Bcl-2 and Fas expression in eutopic and ectopic human endometrium during

- the menstrual cycle in relation to endometrial cell apoptosis. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 176: 360-368.
72. Jones RK, Searle RF and Bulmer JN. Apoptosis and bcl-2 expression in normal human endometrium, endometriosis and adenomyosis. *Hum Reprod* 1998; 13: 3496-3502.
73. Fujishita A, Chavez RO, Nakane PK, Yamabe T, Koji T, Ishimau T and Masuzaki H. Expression of estrogen and progesterone receptors in endometrium and peritoneal endometriosis: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Fertil Steril* 1997; 67: 856-864.
74. Meresman GF, Vighi S, Buquet RA, Contreras-Ortiz O, Tesone M and Rumi LS. Apoptosis and expression of Bcl-2, Bax in eutopic endometrium from women with endometriosis. *Fertil Steril* 2000; 74: 760-766.
75. Meresman GF, Auge L, Baranao RI, Lombardi E, Tesone M and Sueldo C. Oral contraceptives suppress cell proliferation and enhance apoptosis of eutopic endometrial tissue from patients with endometriosis. *Fertil Steril* 2002; 77: 1141-47.
76. Aplin AE, Howe A, Alahari SK and Juliano RL. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-celladhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev* 1998; 50: 197-263.
77. Kosugi Y, Elias S, MalinakLR, Nagata J, Isaka K, Takayama M, Simpson JL and Bischoff FZ increased heterogeneity of chromosome 17 aneuploidy in endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 180: 792-797.
78. Campbell IG and Thomas EJ. Endometriosis candidate genes. *Hum Reprod Update* 2001; 7: 15-20.
79. Arimoto T, Katagiri T, Oda K, Tsunoda T, Yasugi T, Osuga Y, Yoshucavva H, Nishü O, Yano T, Taketani Y and Nakamura Y. Genome-wide cDNA microarray analysis of gene-expression profiles involved in ovarian endometriosis. *Int J Oncol* 2003; 22: 551-560.
80. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003; 9: 653- 660.
81. Slevin M, West D, Kumar P, Rooney P, Kumar S. Hyaluronan, angiogenesis and malignant disease. *Int J Cancer* 2004; 109: 793-794.

82. Luttun A, Dewerchin M, Collen D, Carmeliet P. The role of proteinases in angiogenesis, heart development, restenosis, atherosclerosis, myocardial ischemia, and stroke: insights from genetic studies. *Curr Atheroscler Rep* 2000; 2: 407-416.
83. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 401-410.
84. Folkman Y, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem*. 1992; 267: 10931–34.
85. Folkman J. Angiogenesis and angiogenesis inhibition: An overview. *EXS* 1997; 79: 1–8.
86. Intaglietta M, Johnson PC, Winslow RM. Microvascular and tissue oxygen distribution. *Cardiovasc Res* 1996; 32: 632–643.
87. Goodsell DS. The molecular perspective: VEGF and angiogenesis. *Stem Cells*. 2003; 21: 118–119.
88. Brooks PC. Role of integrins in angiogenesis. *Eur J Cancer* 1996; 32A: 2423–29 .
89. Mignatti P, Rifkin DB. Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Enzyme Protein* 1996; 49: 117- 137.
90. Ausprunk DH and Folkman J. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc Res* 1977; 14: 53–65.
91. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9: 669- 676.
92. Pepper MS, Montesano R, Mandriota SJ, Orci L, Vassalli JD. Angiogenesis: A paradigm for balanced extracellular proteolysis during cell migration and morphogenesis. *Enzyme Protein*. 1996; 49: 138–162.
93. Goodman JV. The immun response . *Basic and Clinical Immunology*. Appleton and Lange 1991;41-65.
94. Janeway JA. The immun system in health and disease. *Immunobiology* 1994 ;5: 43-47.
95. Chateleir R, Varkila K, Coffman RL. IL-4 induces a rseponse in leishmania-major infected mice. *J Immunol* 1992; 148: 1182-1187.
96. Gargett CE, Westaon G, Rogers PAW. Mechanism and regulation of endometrial angiogenesis. *Reprod Med Review* 2002; 10: 45-61.

97. Girling JA, Rogers PAW. Recent advances in endometrial angiogenesis research. *Angiogenesis* 2005; 8: 89-99.
98. Hayrabyan S, Kyurkchiev S, Kehayov I. FGF-1 nad S100A13 possibly contribute to angiogenesis in endometriosis. *J Reprod Immunol* 2005; 67: 87-101.
99. Gescher DM, Haensel A, Meyhofer-Malik, Malik E. The importance of angiogenesis for the pathogenesis of endometriosis. *Zentrale Gynakol* 2003; 125: 243-246.
100. Ho HN, Wu MY, Yang YS. Peritoneal cellular immunity and endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 1997; 38: 400-12.
101. Koninkx PR. Is mild endometriosis a condition occurring intermitandly in all women? *Hum Reprod* 1994; 9: 2202-5.
102. Sharkey AM, Day K, McPherson A, Malik S, Licence D, Smith SK, Charnock-Jones DS. Vascular endothelial grwth factor expression in human endometrium is regulated by hypoxia. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 402-9.
103. Harmey JH, Dimitriadis E, Kay E Redmond HP, Boucher-Hayes D. Regulation of macrophage production of vascular endothelial growth factor (VEGF) by hypooxia and transforming growth factorbeta-1. *Ann Surg Oncol* 1998; 5: 271-8.
104. Selgas R, del Peso G, Bajo MA, Castro MA, Molina S, Cirugeda A, Sanchez-Tomero JA, Castro JM, Alvarez V, Carbi A, Vara F. Spontaneous VEGF production by cultured peritoneal mesothelial cells from patients on peritoneal dialysis. *Perit Dial Int* 2000; 20: 798-801.
105. Maas JW, Challaz-Jorge C, ter Riet G, Dunselman GA Goeis AF, Struijker-Boduer HA. Tumor necrosis factor-alpha but not interleukin-1 beta or interleukin-8 concentrations correlate with angiogenic activity of peritoneal fluid from patients with minimal to mild endometriosis. *Fertil Steril* 2001; 75: 180-185.
106. Groothuis PG, Nap AW, Winterhager E, Grümmer R. Vascular development in endometriosis. *Angiogenesis* 2005; 8: 147-156.
107. Ferra N. Vascular endothelial growth factor: Basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004; 25: 581-611.
108. Albrecht ED, Aberdeen GW, Nikalous AL, Babischin JS, Suresch DL, Pepe GJ. Acute temporal regulation of vascular endothelial growth/permeability factor

expression and endothelial morphology in the baboon endometrium by ovarian steroids. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 2844-52.

109. Ma W, Tan J, Matsumoto B, Robert B, Abrahamson D, Das SK, Dey SK. Adult tissue angiogenesis: Evidence for negative regulation by estrogen in the uterus. *Mol Endocrinol* 2001; 15: 1983-92.

110. Graubert MD, Ortega MA, Kessel B, Mortola JF, Iruela-Arispe ML. Vascular repair after menstruation involves regulation of vascular endothelial growth factor-receptor phosphorylation by Sflt-1. *Am J Pathol* 2001; 158: 1399-410.

111. Wei P, Chen X-L, Song X-X et al. VEGF, Bfgf and their receptors in the endometrium of rhesus monkeys during menstrual cycle and early pregnancy. *Placenta* 2004; 25: 184-96.

112. Gargett CE, Lederman F, Heryanto B, Gambino LS, Rogers PA. Focal vascular endothelial growth factor correlates with angiogenesis in human endometrium. Role of intravascular neutrophils. *Hum Reprod* 2001; 16: 1065-75.

113. Gargett CE, Rogers PAW. Human endometrial angiogenesis. *Reproduction* 2001; 121: 181-6.

114. Ancelin M, Chollet-Martin S, Herve MA, Legrand C, El Benna J. Vascular endothelial growth factor VEGF 189 induces human neutrophil chemotaxis in extravascular tissue via an autocrine amplification mechanism. *Lab Invest* 2004; 84: 502-12.

115. D'Hooghe TM, Hill JA: Immunobiology of endometriosis. In: *Immunology of reproduction* Edited by: Bronston R, Anderson DJ. Cambridge, MA: 1996:322-356

116. Akourn A, Lernay A, Pardis I, Rheault N, Maheux R. Secretion of interleukin-6 by human endometriotic cells and regulation by proinflammatory cytokines and sex steroids. *Hum Reprod* 1996: 2269-75.

117. Pizzo A, Salmeri FM, Ardita FV, Sofo V, Tripepi M, Marsico S. Behaviour of cytokine levels in serum and peritoneal fluid of women with endometriosis. *Gynecol Obstet Invest* 2002; 54: 82-87.

118. Hornung D, Fujii E, Lim KH, Vigne JL, McMaster MT, Taylor RN. Histocompatibility leukocyte antigen-G is not expressed by endometriosis or endometrial tissue. *Fertil Steril* 2001; 75: 814-817.

119. Bullimore DW. Endometriosis is sustained by tumour necrosis factor-alpha. *Med Hypotheses* 2003; 60: 84-88.
120. Oral E, Olive DL, Arici A. The peritoneal environment in endometriosis. *Human Reprod* 1996; 2: 385-398.
121. Dmowski WP. Immunological aspects of endometriosis. *Int J Gynecol Obstet* 1995;50:3-10.
122. Sentürk LM, Arıcı A. Immunology of endometriosis. *J Reprod Immunol* 1999; 43: 67-73.
123. Ho HN, Cha KH, Chen HF, Wu my, Yang YS, Lee TY. Peritoneal natural killer cytotoxicity and CD25 +CD 3 lymphocyte subpopulation are decreased in women with stage III-IV endometriosis. *Hum Reprod* 1995; 10: 2671-5.
124. Oosterlync DJ, Meuleman C, Waer M, Konickx MJ. Immunosuppressive activity of peritoneal fluid in endometriosis. *Gynecol Obstet* 1993; 82: 206-12.
125. Mizumoto Y, Hirata J, Tokuato S. Effect of culture supernatant endometriotic lesions, uterin endometrium and peritoneum from rats with endometrial endometriosis on the natural killer activity of spleen cells. *Gynecol Obstet Invest* 1996; 41: 122-7.
126. Somigliana E, Vigano P, Gaffuri B, Candiani M, Busacca M, Di Blasio M, Vignali M. Modulation of NK cell lytic function by endometrial secretory factors: potential role in endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 1996; 35: 295-300.
127. Provinciali M, Di Stefano G, Muzzioli M, Garzetti GG, Ciavattini A, Fabris N. Relationship between 17- $\beta$ -estradiol and prolactin in regulation of natural killer cell activity during progression of endometriosis. *J Endocrine Invest* 1995; 18: 645-52.
128. Oosterlynnk DJ, Meuleman C, Waer M, Vandeputte M, Konickx PR. The natural killer activity of peritoneal fluid lymphocytes is decreased in women with endometriosis. *Fertil Steril* 1992; 58: 290-295.
129. Gazvani R, Templeton A. Peritoneal environment, cytokines and angiogenesis in the pathophysiology of endometriosis. *Reproduction* 2002; 123: 217-226.
130. Dmowski WP, Gebel HM, Braun DP. The role of cell-mediated immunity in pathogenesis of endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1994; 159: 7-14.
131. Tanır HM. IGF sisteminin endometriosis patofizyolojisinda yeri. *Uzmanlık Tezi, ANKARA*, 1996.

132. McLaren J. Vascular endothelial growth factor and endometriotic angiogenesis. *Hum Reprod* 2000; 12: 1307-1310.
133. Anderson TD, Hayes TJ, Powers GD, Gately MK, Tudor R, Rushton A. Comparative toxicity and pathology associated with administration of recombinant IL-2 to animals. *Int Rev Exp Pathol* 1993; 34: 57-77.
134. American Fertility Society ; Revised American Fertility Society classification of endometriosis. *Fertil Steril* 1985 ;43: 351.
135. Raff MC. Social controls on cell survival and cell death. *Nature*. 1992;356:397-400.
136. Ameisen JC, Estaquier J, Idziorek T, De Beis F. Programmed cell death and AIDS pathogenesis: significance and potential mechanisms. *Curr Top Microbiol Immunol* 1995; 200: 195-211.
137. Dragunow M, MacGibbon GA, Lawlor P. Apoptosis, neurotrophic factors and neurodegeneration. *Rev Neurosci* 1997; 8: 223-65.
138. Koks CAM, Demir Weusten AY, Groothuis PG. Menstruum induces changes in mesothelial cell morphology. *Obstet Gynecol Invest* 2000;50: 13-18.
139. Demir Weustwn AY, Groothuis PG, Dunselman GA, Goeij A, Arends JW, Evers J. Morphological changes in mesothelial cells induced by shed endometrium in vitro are not primarily due to apoptosis or necrosis. *Hum Reprod* 2000; 15: 1462-68.
140. Szymanowski K. Apoptosis pattern in human endometrium in women with pelvic endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol and Reprod Biol* 2007; 132:107-10.
141. Beliard A, Noel A, Foidart JM. Reduction of apoptosis and proliferation in endometriosis. *FertilSteril* 2004; 82: 80-85.
142. S Scotti, Regidor AE, Schindler and E Winterhager. Reduced proliferation and cell adhesion in endometriosis. *Mol Hum Reprod* 2000 :6; 610-617.
143. Arıcı A, Goumeneu AG, Matallitakis IM, Tzardi M, Fragouli YG, Mahutte N. Apoptosis and differential expression of apoptosis-related proteins in endometriotic glandular and stromal cells. *J Soc Gynecol Investig* 2004; 11: 318-322.
144. Suganuma N, Harada M, Furuhashi M, Nawa A, Kikkawa F. Apoptosis in human endometrial and endometriotic tissues. *Horm Res* 1997; 48: 42-47.



145. Harada M, Suganuma N, Furhashi M, Nagasaka T, Nakashima N, Kikkawa F. Detection of apoptosis in human endometriotic tissues. *Mol Hum Reprod* 1996; 2: 307-15.
146. Jones R, Searle R, Bulmer J. Apoptosis and bcl-2 expression in normal human endometrium, endometriosis and adenomyosis. *Hum Reprod* 1999; 13: 3496-502.
147. Nisolle M, Donnez J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertil Steril* 1997; 68: 585-96.
148. Dufournet C, Uzan C, Fauvet R, Cortez A, Siffroi JP, Darai E. Expression of apoptosis-related proteins in peritoneal, ovarian and colorectal endometriosis. *J Reprod Immunol* 2006; 70: 151-162.
149. Klemmt PA, Phil D, Carver JG, Kennedy SH, Kononckx PR, Mardon HJ. Stromal cells from endometriotic lesions and endometrium from women with endometriosis have reduced decidualization capacity. *Fertil Steril* 2006; 85: 564-572.
150. Kim HO K, Yag HM, Kang IS, Kong MK, Kim HS, Zhang X, Kim I. Expression of CD-44, vascular endothelial factor, matrix metalloproteinase-2 and KI 67 in peritoneal, rectovaginal and ovarian endometriosis. *J Reprod Med* 2007; 52: 207-213.
151. Print C, Valtola R, Evans A, Lessan K, Malik S, Smith S. Soluble factors from human endometrium promote angiogenesis and regulate the endothelial cell transcriptome. *Hum Reprod* 2004; 10: 2356-66.
152. Fasciani A, D'Ambrogio G, Boci G, Luisi S, Artini PG, Genazzani AR. Vascular endothelial growth factor and IL-8 in ovarian cystic pathology. *Fertil Steril* 2001; 75: 1218-1221.
153. Gagne D, Page M, Robitaille G, Hugo P, Gosselin D. Levels of vascular endothelial growth factor in serum of patients with endometriosis. *Hum Reprod* 2003; 18: 1674-1680.
154. Matalliotakis IM, Goumenou AG, Koumantakis GE, Neonaki MA, Koumantakis EE, Dionyssopoulou E. Serum concentrations of growth factors in women with and without endometriosis: the action of anti-endometriosis medicines. *Int Immunopharmacol* 2003; 3: 81-89.

155. Pellicer A, Albert C, Mercader A, Bonilia-Musoles F, Remohi J, Simon C. The follicular and endocrine environment in women with endometriosis: local and systemic cytokine production. *Fertil Steril* 1998; 70: 425-431.
156. Bourlov V, Volkov N, Pavlovic S, Letts N, Larsson A, Olovsson M. Relationship between microvessel density, proliferative activity and expression of vascular endothelial growth factor-A and its receptors in eutopic endometrium and endometriotic lesions. *Reproduction* 2006; 132: 501-9.
157. Fang XL, Xia XM, Lin QH. Expression of vascular endothelial growth factor in the peritoneal fluid and eutopic endometrium of patients with endometriosis. *Hunan Yi Ke Da Xue Bao* 2003; 28: 288-90.
158. Liu Y, Lv L. Mechanism of elevated vascular endothelial growth factor levels in peritoneal fluids from patients with endometriosis. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2004; 24: 470-2.
159. Xavier P, Belo L, Beires J, Rebelo I, Lunet N, Barros H. Serum levels of VEGF and TNF- $\alpha$  and their association with C-reactive protein in patients with endometriosis. *Arc Gynecol Obstet* 2006; 273: 227-231.
160. Hormung D, Klingel K, Kandolf R, Wallwiener D, Taylor RN. Regulated on activation normal T cell expressed and secreted mRNA expression in normal endometrium and endometriotic implants: assessment of autocrine/paracrine regulation by in situ hybridization. *Am J Pathol* 2001; 158: 1949-54.
161. Gazvani R, Templeton A. Peritoneal environment, cytokines and angiogenesis in the pathophysiology of endometriosis. *Reproduction* 2002; 123: 217-226.
162. Kikuchi Y, Ishikawa N, Hirata J, Imazumi E, Sasa H, Nagata I. Changes of peripheral blood lymphocyte subsets before and after operation of patients with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 169: 1545-49.
163. Oosterlynck DJ, Cornille FJ, Waer M, Vandeputte M, Koninckx PR. Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium. *Fertil Steril* 1991; 56: 45-51.
164. Quantara MG, Porpora MG, Mattioli B, Giordani L, Libri I, Ingelido AM, Cerenzia P, Felice A, Abballe A, Felip ED, Viora M. Impaired NK-cell-mediated cytotoxic activity and cytokine production in patients with endometriosis: a possible role for PCBs and DDE. *Life Science* 2006; 79: 491-498.

165. Prefumo F, Semino C, Melioli G, Venturini PL. A defective expression of ICAM-1 (CD-54) on secretory endometrial cells is associated with endometriosis. *Immunology Letters* 2002; 80: 49-53.
166. D'Hooghe TM, Scheerlinc PY, Konickx PR, Hill JA, Bambra CS. Anti-endometrial lymphocytotoxicity and natural akiller cell activity in baboons with endometriosis. *Hum Reprod* 1995; 10: 558-562.
167. Berkkanoglu M, Arıcı A. Immunology and endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 2003; 50: 48-59.
168. Gleicher N, Dmowski WP, Siegel I. Lymphocyte subsets in endometriosis. *Obstet Gynecol* 1984; 63: 463-66.
169. Szylo K, Tchorzewski H, Banasic M, Glowacka E, Lewkowicz P, Bartosinska A. The involvement of T lymphocytes in the pathogenesis of endometriotic tissues overgrowth in women with endometriosis. *Mediators of Inflamm* 2003; 12: 131-138.
170. Ginsburg ES, Xiao L, Gargiulo AR, Kung FT, Politch JA, Hill JA. T helper 2 and 3 type immunity to trophoblast in succesfull in vitro fertilization-embriyo transfer. *FertilSteril* 2005; 83: 1659-64.
171. Ho HN, Wu MY, Chao KH, Chen CD, Chen SV, Yang YS. Peritoneal IL-10 increases with decrease in activated CD4 T lymphocytes in women with endometriosis. *Hum Reprod* 1997; 12: 2528-33.
172. D'Hooghe TM, Xiao L, Hill JA. Cytokine profiles in autologous peritoneal fluid and peripheral blood of women with deep and superficial endometriosis. *Arch Gynecol Obstet* 2001; 265: 40-44.
173. Khoram O, Taylor RN, Ryan IP, Schall TJ, Landers DV. Peritoneal fluid concentrations of the cytokine RANTES correlate with the severity of endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 169: 1545-49.
174. Hsu CC, Yang BC, Wu MH, Huang KE. Enhanced interleukin-4 expression in patients with endometriosis. *Fertil Steril* 1997; 67: 1059-1064.
175. Ho HN, Wu MY, Chao KH, Chen CD, Chen SV, Yang YS. Peritoneal IL-10 increases with decrease in activated CD4 T lymphocytes in women with endometriosis. *Hum Reprod* 1997; 12: 2528-33.

176. S.Podgaec, Abrao MS, Dias JA, Rizzo LV, Olivera RM, Baracat EC. Endometriosis : an inflammatory disease with a Th2 immun response component. *Human Reprod* 2007; 22: 1373-79.
177. Antsiferova YS,Sotnikova NY, Posiseeva LV, Shor AL. Changes in the T-helper cytokine profile and in lymphocyte activation at the systemic and local levels in women with endometriosis. *Fertil Steril* 2005; 84: 1705-1711.
178. Agic A, Xu H, Finans D, Banz C, Diedrich K, Hornung D. Is endometriosis associated with systemic subclinical inflammation? *Gynecol Obstet Invest* 2006; 62: 139-147.
179. Donskov F, Von Der Maase. Impact of immune parameters on long-term survival in metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2006; 13: 1997-2005.
180. Rizzo LV, DeKruyff RH, Umetsu DT, Caspi RR. Regulation of the interaction between Th1 and Th2 cell clones to provide help for antibody production in vivo. *Eur J Immunol* 1995; 25: 143-147.

