



**T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ENDOMETRİOZİS' Lİ HASTALARDA ASİMETRİK
DİMETİLARJİNİN, MALONDİALDEHİT VE M30 DÜZEYLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

DİLARA ÜLGER

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

2016

SİVAS

**T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ENDOMETRİOZİS' Lİ HASTALARDA ASİMETRİK
DİMETİLARJİNİN, MALONDİALDEHİT VE M30 DÜZEYLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

DİLARA ÜLGER

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Prof.Dr. SEVTAP BAKIR**

SİVAS-2016

‘Endometriozis’ li Hastalarda, Asimetrik Dimetilarjinin, Malondialdehit ve M30 Düzeylerinin Araştırılması’ adlı **Yüksek Lisans** Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzuna uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Biyokimya** Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan	Prof. Dr. Sevtap BAKIR	_____
Üye	Yrd. Doç. Dr. Savaş KARAKUŞ	_____
Üye	Yrd. Doç. Dr. Müjgan ERCAN	_____
Üye (danışman)	Prof. Dr. Sevtap BAKIR	_____

ONAY

Bu tez çalışması tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Zahid Tefik AĞAOĞLU
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MÜDÜRÜ

Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu' nun 18.02.2015 tarihli ve 4/4 sayılı kararı ile kabul edilen Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzuna göre hazırlanmıştır. Bu tez çalışması Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir.

[Proje No. T-606]

ÖZET
ENDOMETRİOZİS' Lİ HASTALARDA, ASİMETRİK DİMETİLARJİNİN
MALONDİALDEHİT VE M30 DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Dilara ÜLGER

Yüksek Lisans Tezi- Biyokimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof.Dr. Sevtap BAKIR

2016, 67 sayfa

Endometriozis, üreme çağındaki bayan nüfusunun % 10' unu etkileyen, östrojen bağımlı bir hastalıktır. Bu hastalık endometrial dokunun uterus dışında gelişimiyle karakterize iyi huylu, kısırlık ve ağrı semptomlarıyla ilişkilendirilen jinekolojik bir durumdur. Etyolojisi, patofizyolojisi, insidansı ve optimal tedavisi net olarak aydınlatılmamıştır. Bu çalışmada hasta ve kontrol grubuna ait serum ADMA, M30 ve MDA düzeylerinin ölçülerek, apoptozis ve oksidatif stresin hastalığın patogenezi ile olan ilişkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca bu hastalarda CA-125 seviyeleri ile hormonlar ve bazı rutin kan parametre düzeyleri de belirlenmiştir.

Endometriozis tanısı konan 31 hasta ve 31 sağlıklı kadın çalışma grubunu oluşturmuştur. Yapılan analizler sonucunda ADMA ($p= 0,001$), M30 ($p=0,002$) CA125 ($p=0,001$) düzeyleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında iki grup arasındaki farklılık önemli bulunurken ($p<0,005$), MDA ($p=0,924$) yönünden gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır ($p>0,005$).

Sonuç olarak, çalışmamızda endometriozisli hastalarda serum ADMA ve M30 düzeylerinin anlamlı olarak arttığı tespit edildiğinden bu parametrelerin endometriozis patogenezi ve prognozunda bir öneme sahip olmasının muhtemel olacağını düşünmekteyiz. Fakat bu parametrelerin hastalığıdaki rolünün daha kapsamlı çalışmalarla açığa kavuşturulması gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: Endometriozis, Asimetrikdimetilarjinin, Malondialdehit, CK18-M30, Apoptoz, Oksidatif stres, CA-125

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE, ADMA, MDA AND M30 LEVELS IN PATIENTS WITH ENDOMETRIOSIS

Dilara ÜLGER

Master's Thesis – Department of Biochemistry

Supervisor: Prof.Dr. Sevtap BAKIR

2016, 67 page

Endometriosis is a benign estrogen-dependent gynecological disease, characterized by the presence and growth of endometrial tissue outside the uterus; it affects 10% of women of reproductive age and is associated with infertility and pain. Etiology, pathophysiology incidence and optimal treatment haven't clearly clarified. In this study patients and control group's serum ADMA, MDA and M30 levels were measured and apoptosis, oxidative stress markers and inhibitor's roles and correlation with each other were aimed in the pathogenesis of endometriosis. Also in this patients CA-125, hormones and some kind of blood marker's levels were measured.

In our study, 31 endometriosis patients were chosen as a patient group, likewise 31 healthy individual female chosen as a control group. According to our analysis results ADMA ($p=0,001$), M30 ($p=0,002$), CA-125 ($p=0,001$) level's compared statistically and there was a significant importance between two groups ($p<0,005$), on the other hand there was no significant importance in terms of MDA ($p=0,924$) levels when compared between two groups ($p>0,005$).

As a result, in our study endometriosis patient's serum ADMA, M30 and CA125 levels were meaningful higher than control groups. We think it would be possible to markers can be beneficial on the pathogenesis and prognosis of endometriosis. But it needs to be more exhaustive and supportive studies for role of these parameters in this disease.

Key Words: Endometriosis, Asymmetric Dimethylarginine, Malondialdehyde, CK18-M30, Apoptosis, Oxidative stress, CA-125

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca değerli bilgi ve tecrübeleriyle çalışmalarımın her aşamasında bana yol gösteren danışman hocam sayın Prof. Dr. Sevtap BAKIR' a, destek, sabır ve anlayışından dolayı teşekkür ederim.

Yüksek Lisan eğitimim süresince bilgi birikimlerinden yararlandığım, Biyokimya Anabilim Dalı' nın tüm öğretim üyelerine, sekreterimiz ve çalışanlarına, özellikle yardım ve desteklerini esirgemeyen kıymetli hocamız Dr. İsmail SARI' ya ve Dr. Serpil ERŞAN' a, her türlü fedakârlığı yaparak, hasta grubumun oluşturulmasında çok kıymetli emeklerini esirgemeyen değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Savaş KARAKUŞ' a en içten teşekkürlerimi iletirim. Ayrıca istatistiksel analizlerin değerlendirilmesi sırasında yol gösteren kıymetli hocam Yrd. Doç. Dr. Ziyet ÇINAR' a, yürek dolusu teşekkür ederim.

Hayatım ve eğitimim boyunca hiçbir maddi ve manevi destekten kaçınmayan ve her türlü zorlukta yanımda olan sevgili annem Şerife ÜLGER, babam Fikret ÜLGER ve kardeşim Kaan' a sonsuz teşekkür ve minnetlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK.....	i
ONAY.....	ii
YÖNERGE.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ.....	xi
KISALTMALAR DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Endometriozis.....	2
2.1.1. Tanım.....	2
2.1.2. Tarihçe.....	2
2.1.3. Patoloji.....	2
2.1.3.A Retrograd Menstürasyon Teorisi.....	2
2.1.3.B Çölamik Metaplazi ve İndüksiyon Teorisi.....	3
2.1.3.C Vasküler Disseminasyon.....	3
2.1.3.D İmmün Sistem Teorisi.....	3
2.1.3.E Genetik Faktörler.....	4
2.1.3.F Hormonal Faktörler.....	5
2.1.3.G Çevresel Faktörler.....	5
2.1.4. Prevalans.....	5
2.1.5. Semptomlar.....	5
2.1.6. Teşhis.....	6
2.1.7. Klinik İnceleme.....	7
2.1.8. Sınıflama.....	8
2.1.9. Tedavi.....	10
2.1.10. Endometriozis ve CA-125 ilişkisi.....	10
2.2. Apoptozis.....	11
2.2.1. Morfolojik ve Biyokimyasal özellikleri.....	11
2.2.2. Mekanizması.....	12
2.2.2.1. Apoptozisin Başlatılması (Uyarılma-Sinyal Fazı).....	12
2.2.2.2. Hücre İçi Proteazların Aktivasyonu (İşlem Fazı).....	14
2.2.2.3. Fagositoz (Ortadan Kaldırma Fazı).....	14

2.2.3. Apoptozisi Belirleme Yöntemleri.....	15
2.2.3.1. ELISA ve M30.....	15
2.2.4. Apoptozis ve Sitokeratinler.....	16
2.2.4.1. Sitokeratinler.....	16
2.2.4.2. Sitokeratin 18.....	17
2.2.5. Apoptozis ve Endometriozis İlişkisi.....	18
2.2.5.1. Normal Endometriumda Apoptozis.....	19
2.2.5.2. Endometriozisli Hastalarda Apoptozis.....	19
2.2.5.3. Endometriozisli Hastaların P. Makrofajlarında Apoptozis.....	20
2.2.5.4. Endometriozis Fizyopatolojisinde Apoptozis.....	20
2.3. Serbest Radikaller Ve Oksidatif Stres.....	21
2.3.1. Serbest Radikallerin Hücre ve Doku Düzeyindeki Etkileri.....	22
A- Protein Oksidasyonu.....	22
B- DNA, RNA ve Gen Ekspresyonu.....	22
C- Karbonhidrat Oksidasyonu.....	22
D- Lipid Peroksidasyonu.....	23
2.3.2. Malondialdehit (MDA).....	24
2.3.3. Asimetrik Dimetilarjinin (ADMA).....	25
2.3.4. Endometriozis ve Oksidatif Stres.....	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	29
3.1. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler.....	29
3.2. Kimyasal Madde ve Kitler.....	30
3.3. Hasta ve Kontrol Grubunun Oluşturulması.....	30
3.3.1. Hastalar.....	30
3.3.2. Kontroller.....	30
3.4. Kan Örneklerinin Toplanması.....	30
3.5. Asimetrik Dimetilarjinin Tayini.....	31
3.5.1. Kullanılan Çözeltiler.....	31
3.5.2. Deneyin Yapılışı.....	31
3.5.3. ADMA Derişiminin Hesaplanması.....	32
3.6. M30 Tayini.....	33
3.6.1. Kullanılan Çözeltiler.....	33
3.6.2. Deneyin Yapılışı.....	33
3.6.3. M30 Derişiminin Hesaplanması.....	34

3.7. Malondialdehit Tayini.....	35
3.7.1. Kullanılan Çözeltiler.....	35
3.7.2. Deneyin Yapılışı.....	35
3.7.3. MDA Derişiminin Hesaplanması.....	34
4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	37
5. BULGULAR.....	38
6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	42
7. KAYNAKLAR.....	52
8. ÖZGEÇMİŞ.....	64
EK-1: 30.04.2014 tarihli ve 2014-04/40 sayılı karar ile onay alınmış etik kurul.....	65
EK-2: Hasta bilgilendirilmiş olur formu.....	67



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil-1: Endometriozis lezyonları.....	8
Şekil-2: Hücre nekroz ve apoptozis morfolojisi.....	12
Şekil-3: Tip I ve Tip II sitokeratin filamentleri	17
Şekil-4: Kırılmış sitokeratin 18.....	18
Şekil-5: Lipid Peroksidasyonu ve MDA oluşumu.....	24
Şekil-6: MDA ile tiyobarbütirik asit reaksiyonu.....	25
Şekil-7: ADMA'nın NOS inhibisyonu ve sitrülün oluşumu.....	26
Şekil-8: ADMA standart eğrisi.....	32
Şekil-9: M30 standart eğrisi.....	34
Şekil-10: MDA standart eğrisi.....	36

TABLolar DİZİNİ

Tablo-1: Endometriozis tanısında kullanılan belirteçler.....	7
Tablo-2: Endometriozisin (ASRM)'e göre sınıflandırılması.....	9
Tablo-3: Bazı ROS ve RNS ile serbest radikal olan ve olmayanların sınıflaması.....	22
Tablo-4: MDA Deneyin yapılış yöntemi.....	35
Tablo-5: Grupların sigara ve alkol kullanımı yönünden analizi.....	38
Tablo-6: Hasta ve Kontrol grubunun dismenore yönünden analizi.....	38
Tablo-7: Hasta ve Kontrol grubunun disparoni yönünden analizi.....	39
Tablo-8: Hasta ve Kontrol grubunun pelvik ağrı yönünden analizi.....	39
Tablo-9: Grupların hemogram parametrelerinin analizi.....	39
Tablo-10: Grupların biyokimya ve hormon parametrelerinin analizi...	40
Tablo-11: Hasta ve Kontrol Grubuna ait ADMA, M30 ve MDA düzeylerinin istatistiksel değerlendirilmesi	41

KISALTMALAR DİZİNİ

- ADMA:** Asimetrik Dimetilarjinin
Apaf 1: Apoptozis proteaz aktive edici faktör 1
ASRM: American Society for Reproductive Medicine
CA 125: Cancer Antijen 125
CA 19-9: Cancer Antijen 19-9
CAD: Kaspazla aktive olan DNAaz (caspase-activated DNAase)
CK-18 (M30): Sitokeratin 18
C19 steroid: Androjenler, steroid hormon
CTL: Sitotoksik T lenfositler
DDAH: Dimetil Arjinin Dimetil Aminohidrolaz
DNA: Deoksiribonükleik Asit
EDTA: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EGR-1: Early Growth Response 1 Geni
ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
E2: Östrodiol
FADD: Fas adapter protein with a death domain
GnRH: Ganadotropin Releasing Hormon
HPLC: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IL-6: İnterlökin-6
IVF: In vitro Fertilizasyon
NK: Natural Killer hücreler
MDA: Malondialdehit
MMP: Matriks Metallo Proteinaz
NO: Nitrik Oksit
NOS: Nitrik Oksit Sentaz
PRMT: Protein Arjinin Metil Transferaz
Ppm: Parts per million
PUFA: Çoklu doymamış yağ asiti
PP-14: Serum Plasental Protein-A= Glikodelin
ROS: Reaktif oksijen türleri
RNS: Reaktif nitrojen türleri
sICAM-1: Solubl form intercellüler adezyon molekül-1
TCA: Trikloro Asetik asit
TNF: Tümör Nekrozis Faktör
TNFR: Tümör Nekrozis Faktör Reseptör
TNF-alfa: Tümör Nekroz Faktör-alfa
TRADD: TNFR adapter protein with a death domain
TVUSG: Transvaginal Ultrasonografi

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Endometriozis, üreme çağındaki bayan nüfusunun % 10' unu etkileyen östrojen bağımlı yaygın, jinekolojik bir hastalıktır. Endometriyal dokunun, uterin kavite dışında bulunması ve gelişmesiyle karakterize edilir. Pelvik ağrı, dismenore, disparoni ve infertilite belirtileri en çok seyreden şikâyetlerdendir [1]. Endometriozis, sadece ektopik implantlarla sınırlı olmayıp, tüm üreme sistemini etkileyen karmaşık bir patolojiyi içermektedir [2]. En sık pelvik periton olmak üzere overler ve rektovajinal septumda görülür.

Endometriozis, insidansı oldukça yüksektir. Genel kadın popülasyonunda görülme sıklığı % 3-10 iken, infertil kadınlarda % 35' e kadar çıkmaktadır [3].

Patofizyolojisi henüz net olarak açıklanamayan endometriozisin patogenezi ile ilgili son yıllarda yapılan araştırmalarda, apoptozis ve oksidatif stresin önemli bir yere sahip olduğu ileri sürülmektedir.

Apoptozis programlı hücre ölümüdür ve normal dokuların homeostazı açısından önemlidir. Howard ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, kusurlu apoptozisin endometriozise neden olduğu ve sağlıklı kontrollerin ektopik endometriumları ile endometriozisli hastaların ektopik endometriumları karşılaştırıldığında, apoptozisin önemli derecede azaldığı ilk kez gösterilmiştir [4]. Yine bir çalışmada da sağlıklı kadınlarda menstüral siklusun geç sekretuar ve menstüral fazlarında uterin endometriumun fonksiyonel tabakasındaki yaşlanan hücrelerin ortadan kaldırılmasında apoptozisin etkin bir mekanizma olduğu ortaya konulmuştur [5]. Bunlara ek olarak, endometriozisli olgularda antioksidan savunma sistemleri ve endometriyal dokunun oksidatif durumunu inceleyen çalışmalarda anlamlı sonuçlar elde edilmiştir [6].

Çalışmamızda, apoptozisde önemli rol oynayan ve apoptozisin bir belirteci olan M30 antijeni (CK-18 sitokeratin), apoptozisi ve oksidatif stresi indükleyen ADMA ve lipid peroksidasyonunun önemli bir bozunma ürünü olan MDA düzeyleri, endometriozisli hastalar ve sağlıklı kontrol grubunda belirlenmiştir.

Bu çalışmada incelenen parametreler, patogenezi net olarak aydınlatılmamış bu hastalığın, prognoz yönünden değerlendirilmesi, apoptozis ve oksidatif stres belirteçlerinin hastalıkla ilişkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Endometriozis

2.1.1. Tanım

Endometriozis, endometrial bezlerin ve stromanın endometrium dışında yerleşimi olarak tanımlanmaktadır [7]. Düz kasların düzensiz proliferasyonu da endometriozis lezyonlarının tipik bir bileşenini oluşturmaktadır [8]. Endometriozis, sadece ektopik implantlarla sınırlı olmayıp tüm üreme sistemini etkileyen karmaşık bir patolojiye sahiptir [2].

Endometriozis en sık yumurtalıklar, karın boşluğu, rahim yüzeyi, rahim arkası boşluk, rahimi destekleyen bağlar ve tüplerde görülür. Daha az sıklıkta, bağırsaklarda, anal kanalda, idrar kesesinde, vajinada, dış üreme organları çevresinde ve karın ameliyatlarının yara izlerinde görülebilir [9].

2.1.2. Tarihçe

Günümüzde endometriozis olarak tanımladığımız peritoneal lezyonlar, ilk kez 1800' lü yıllarda tanımlanmış ve 1860 yılında Von Rokitansky tarafından adenomyom olarak sınıflandırılmıştır [10]. John Sampson tarafından ilk kez 1921 yılında, perfore olmuş bir dizi hemorajik over kisti 'çikolata kisti' olarak tanımlanmış ve daha sonra lezyonlar endometriozis olarak adlandırılmıştır. Sampson' un 'endometrial dokunun pelvik kaviteye menstüral dağılımı' konulu klasik makalesi 1927' de yayınlanmıştır [11].

2.1.3. Patoloji

Endometriozisin patogenezi henüz bilinmemekle birlikte birçok teori öne sürülmektedir. Bunlar; Retrograd Menstürasyon (Transplantasyon, Geri Akım) Teorisi, Çölomik Metaplazi ve İndüksiyon Teorisi, Vasküler Disseminasyon Teorisi, İmmün Sistem Teorisi, Genetik Faktörler, Hormonal Faktörler ve Çevresel Faktörlerdir.

2.1.3.A. Retrograd Menstürasyon-Transplantasyon Teorisi

Retrograd (geri akım) Menstürasyon Teorisi 1920' li yıllarda Sampson tarafından ortaya atılmış ve hala en yaygın kabul edilen teorilerdendir. Sampson'un bu teorisi, menstürasyon sırasında dökülen endometrial dokuların, fallop tüpler aracılığıyla periton kavitesine ulaştığı ve burada pelvik organlar üzerine yerleştiğini savunur [11]. Bu teoriyi destekleyecek nitelikteki birçok çalışma aşağıda sıralanmıştır.

1. Liu ve Hitchcock menstürasyon gören kadınlara yapılan laparoskopi sırasında tüplerin fimbrial uçlarında kan akışı görmüşlerdir [12].

2. Endometriozis en sık pelvisle bağlantılı olan kısımlarda görülür. Sıklıkla overler, anterior ve posterior cul de sac, uterosakral ligamentler, daha sonra posterior uterus ve posterior broad ligamentlerde görülür [13, 14].

3. 1951 yılında Keettel ve Stein menstüral akımdaki endometrial kalıntıların canlılığını doku kültürlerinden üretmiştir. Benzer şekilde uterin lavaj sonrası peritoneal kaviteden toplanan endometrial hücreler de kültürde üretilmiştir [15].

4. Maymun serviksleri transpoze edilerek, menstürasyon peritoneal kavitede oluşturulunca, endometriozis geliştiği gösterilmiştir [16].

5. Erken menarşi, menorajisi veya kısa menstüral siklusu olan kadınlarda endometriozis insidansı daha yüksektir [17].

6. Menstüral akım obstrüksiyonu olan kadınlarda endometriozis insidansının daha yüksek olduğu saptanmıştır [18].

2.1.3.B. Çölomik Metaplazi ve İndüksiyon Teorisi

Çölomik Metaplazi Teorisi Mayer tarafından 1919 yılında tanımlanmıştır. Çölomik kavite, farklılaşmamış hücreler veya endometriyal dokuya dönüşme potansiyeli olan hücreler içermektedir. Bu teori, çöлом epitelinin metaplaziye uğraması sonucunda endometriozisin geliştiğini, embriyolojik çalışma sonuçlarına dayanarak savunmaktadır [19].

İndüksiyon Teorisi ise çölomik metaplazi teorisinin genişletilmiş halidir. Endojen biyokimyasal ya da immünolojik uyarıcıların etkisiyle, farklılaşmamış hücrelerin endometrial hücrelere farklılaştıklarını savunur. Dişi tavşanlarla yapılan bir çalışmada bu desteklenirken kadınlar ve primatlarda henüz gösterilememiştir [20].

2.1.3.C. Vasküler Disseminasyon Teorisi

1925 yılında Halban, endometriozis odaklarının, endometrial hücrelerin lenfatik veya hematojen yolla yayılması sonucu oluştuğunu öne sürmüştür. Beyin, akciğer, lenf düğümleri ve abdominal duvar gibi uzak organlarda görülen endometriozis olgularını açıklayabilmektedir. Ayrıca endometrial adenokarsinomun lenf yoluyla yayılma eğilimi endometriyumun da bu yolla kolayca taşınabildiğini göstermektedir [21].

2.1.3.D. İmmün Sistem Teorisi

İmmün sistem, endometriozis patogeneğinde önemli yer kaplamaktadır [22]. Endometriozisli kadınlarda immün sistem değişiklikleri mümkündür ve hastalık pelvik kaviteden kaynaklanan canlı endometrial hücrelerin azalmış immünolojik klirensi

sonucu gelişebilir [23, 24]. Endometriozisin doğal immün fonksiyondaki bozukluğa bağlı oluşan otoimmün bir patolojide olduğu öngörülmektedir [25].

Normalde reflü olan endometrial hücreler, hücre dışı sıvıya yapışmazlar. Bu hücreler kendi adezyon reseptörlerinden farklı uyarı alarak apoptoze uğrarlar. Endometriozisli kadınlarda bu hücreler çoğalma, peritonun mezotelial hücrelerine yapışma ve neoanjiyogenezis oluşturma eğilimine sahiptir. Bu da endometriozis gelişimi ile bağdaştırılmaktadır [26].

Endometriozisli olgularda periton sıvısında makrofajlar, T lenfositler, NK hücrelerinin miktarlarında artış saptanmıştır. Makrofaj salgılarındaki büyüme faktörlerinde ve inflamasyon öncesi sitokinlerde artış mevcuttur [27].

Apoptosis ile hücre artışı arasındaki dengenin bozulmasının endometriozise sebep olduğu düşünülmektedir [28]. Ektopik endometrium hücrelerinin çoğalma hızı, apoptozis belirteçleri, steroid hormon seviyeleri normal endometriuma göre farklılık göstermektedir. Ektopik dokunun apoptoze olan hassasiyetinin azalması, yayılmasını ve yerleşmesini (implante) kolaylaştırabilir [29].

Endometriozis anjiyogenez ile ilerlemektedir. Endometriozisle implante olan endometrial doku kendi damarlarını geliştirmektedir. Bu sebeple endometriozis kanserde görülen metastazların implantasyonuna benzer bir davranış göstermektedir [30].

2.1.3.E. Genetik Faktörler

Endometriozise yatkınlıkta genetik faktörlerin tek başına etkili olabileceği düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda genetik polimorfizimin endometriozis ile ilişkisi tanımlanmıştır [31, 32]. Simpson, endometriozisi olan bir kadının varsa birinci derece akrabasında da endometriozis gelişme olasılığının % 7 olduğunu gösteren bir çalışma yapmıştır [33].

Endometriozis ve diğer otoimmün hastalıklar arasında, endometriozis ve lökosit antijenleri arasında olduğu gibi bir ilişki gösterilmiştir [34, 35]. Tümör süpresör genlerini inaktif eden DNA delesyonlarının (silinme), endometriozisin başlama veya ilerlemesine katkıda bulunduğu [36] ve somatik kromozomlarda genetik değişikliklerin olduğu öne sürülmektedir [37]. Östrojen reseptörü B ve steroidojenik faktör-1 (SF-1) overekspresyonu ve hipometilasyonunu içeren bu epigenetik olayların endometriozis patogenezinde kritik rol oynayabileceği düşünülmektedir [38].

2.1.3.F. Hormonal Faktörler

Endometriozisin, üreme çağındaki kadınlarda sık görülmesi, hastalık bulgularının menopoz ile gerilemesi, menopoz sonrası östrojen takviyesi alan kadınlarda bulguların yeniden ortaya çıkması, endometriozisin östrojen bağımlı bir hastalık olduğunu göstermektedir. Ek olarak endometriozisli kadınlarda ötopik ve ektopik endometrial dokuda progesterona karşı azalmış endometrial sensivite gösterilmiştir [39]. Progesteronun endometriumda güçlü bir antiinflamatuvar etkinliği mevcuttur [40].

2.1.3.G. Çevresel Faktörler

Endometriozis çok sayıda gen ve çevresel faktörlerin etkileşimde bulunduğu bir hastalıktır. İmmün sistem değişiklikleri hastalığın nedeni veya sonucu olabilirken, bu değişiklikler genetik nedenlerden de kaynaklanabilir. Yapılan bir çalışmada, insan dışı primat modeli, endometriozis gelişiminde çevresel faktörler ve onların potansiyel etkileri hakkında önemli bilgiler sağlamıştır. Örneğin tüm vücuda X ışınları verilen rhesus maymunlarında kontrol grubundan daha yüksek oranda endometriozis gelişmiştir [41].

2.1.4. Prevalans

Endometriozis sık karşılaşılan jinekolojik hastalıklardan birisidir. Kesin tanısı cerrahi işlemlerle konulduğundan prevalansı tam bilinmese de, üreme çağındaki kadınların % 5-15' inde ve infertil kadınların % 25-35' inde olduğu tahmin edilmektedir. Sterilizasyon veya sterilizasyondan geri dönüş operasyonu uygulanan kadınların % 1-2' sinde, histerektomi uygulananların % 10' unda, laparoskopi uygulananların % 16-31' inde, pelvik ağrı nedeniyle cerrahi geçirenlerin % 53' ünde saptanmaktadır [38].

15-64 yaş arasındaki 1000 kadının 4' ü her yıl endometriozis sebebiyle hastaneye yatırılmaktadır. Endometriozis 30 yaş üstünde daha sık görülürken, siyahi kadınlarda daha az görülmektedir [42]. Sosyoekonomi ve eğitim durumunun endometriozise olan etkisi ise hala tartışmalıdır.

2.1.5. Semptomlar

Endometriozis hastalığının semptomu, hastalığın şiddetine, yaygınlığına, bulunduğu organa ve menstürasyon gününe göre değişim göstermektedir. Klinik deneyimler ve hastalar esas alındığında, ağır dismenore, şiddetli disparoni, kronik pelvik ağrı, ovulasyon ağrısı, anormal kanama veya menstürasyon öncesi semptomlar, infertilite, kronik yorgunluk, idrar semptomları, bel ağrısı, şişlik ve konstipasyon, gibi bulgular

endometriozis kökenli olabilir. Ancak bu semptomların birinin ya da birkaçının endometriozis tanısı koymadaki güvenilirliği belirsizdir. Çünkü bu semptomlar başka hastalıklardan dolayı da kaynaklanıyor olabilir. Buna rağmen endometriozisli kadınların birçoğu da asemptomatiktir [43].

Endometriozisli hastalarda ağrıya sebebiyet veren mekanizma, peritoneal inflamasyon, doku hasarı ile gelişen derin infiltrasyon, fibrotik kalınlaşma, ektopik alanlara tutunma, endometriotik implantlarda menstüral kanın birikimi ve dokuların fizyolojik hareketine bağlı ağrı olduğu düşünülmektedir [44, 45].

İnfertilite endometriozisli kadınların çoğunda görülen bir semptom olsa da endometriozisteki infertilitenin mekanizması günümüzde tam olarak aydınlatılamamıştır. Yapılan araştırmalarda infertilite ile endometriozisin evresi arasındaki ilişkinin bulunmasına rağmen normal anatomiye bozan pelvik adezyonlar ve bozulmuş yumurta kanalı fonksiyonu da sebep gösterilmektedir. Ayrıca bazı bulgular, orta şiddetteki endometriozisin de oosit gelişimini bozduğunu, embriyogenez ve implantasyonu olumsuz etkilediğini göstermektedir [46, 47].

2.1.6. Teşhis

Endometriozis teşhisinde altın standart laparoskopi ile lezyonun görülmesidir. Laparoskopi endometriozisin hem tanı hem de tedavisinde önemli yer kaplamaktadır. Cerrahi sırasında hastalığın tüm morfolojik şekilleri gözlenebilmektedir.

TVUSG (Transvaginal Ultrasonografi) periton yüzeyindeki ve over yüzey epitelindeki endometriozis implantlarını ayırt etmekte faydalı olmamaktadır [48].

Endometrioziste CA-125, CA-19-9 düzeylerinin yükseldiği belirlenmiş, ancak teşhiste güvenilirliği kısıtlıdır. CA-125 kullanımı konusunda tartışmalar olsa da noninvaziv tanısal testler arasında en çok çalışılanıdır [49].

Endometriozis belirteci olarak endometriumda C19 steroidlerinin (androstenedion ve testosteron) esterona dönüşümünde rol alan aromataz P450 enziminin ifadesi endometriozisli kadınların ötopik endometriumunda izlenirken, kontrol grubunda görülmemektedir [50]. Ayrıca, yapılan bir çalışmada da endometriumda aromataz P450 enziminin sadece endometrioziste değil, myoma uteri, adenomyozis gibi uterusun hormon bağımlı çoğalmasında da izlendiği, dolayısıyla endometriozis için özel bir belirteç olmadığını ortaya koymuşlardır [51].

Endometriozis klinik bulgularındaki heterojenite, hastalığın asemptomatik de olabilmesi, kesin tanı için cerrahi gerekmesi, tanı koydurucu ve hastalığın evresini

gösterici bir laboratuvar testi bulunmasına yönelik çabaları artmıştır. Bu bulgulardan yola çıkarak, endometriozis şüphesi taşıyan hastalarda tanıya yardımcı olmak amacıyla çok sayıda laboratuvar testi çalışılmıştır (Tablo-1).

Tablo-1: Endometriozis tanısında kullanılan belirteçler

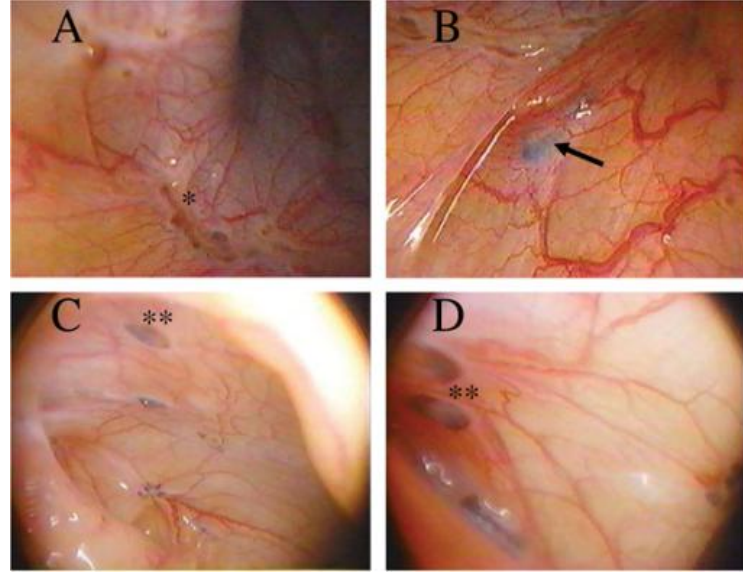
Tümör belirteçleri ve polipeptidler	CA-125, CA-19-9 sICAM Glycodelin- A (PP-14)
İmmünolojik belirteçler	Sitokinler: IL-6, TNF- α Otoantikolar: Antiendometrial antikor Oksidatif stres gösteren otoantikolar
Genetik belirteçler	(EGR)-1 Geni P450 Aromataz PP 14
Doku belirteçleri	Aromataz P450 Sitokinler Hormon Reseptörleri

2.1.7. Klinik İnceleme

Endometriozisli kadınların çoğunda klinik inceleme esnasında herhangi bir anormallik saptanmaz. Dış üreme organlarının muayenesi genellikle normaldir. Görsel tanı (laparoskopi), histopatolojik inceleme ve cerrahi girişim sağlayan, hastayı gereksiz laparotomilerden koruyan önemli bir tanı aracıdır [52].

Laparoskopide endometriozise özgü bulgular, periton seröz yüzeyinde tipik barut yanığı şeklindeki lezyonlardır. Bunlar siyah, koyu kahverengi, mavimsi düğümcükler veya değişken derecede fibrozis ile çevrili hemoraji içeren küçük kistlerdir (Şekil-1) [53]. Bu implantların büyüklüğü birkaç mm ile birkaç cm arasında değişebilmektedir. Hemosiderin birikimi de implantlarda sarı, kahverengi, siyah renk değişimine sebep olabilir [54].

Endometrioziste renksiz lezyonlar görmek de mümkündür. Periton üzerinde saydam olmayan beyaz lezyonlar, şeffaf sıvı kabarcıkları ve pembe polipler şeklinde görülebilir [55]. Menstrüasyon kanaması kistin koyu kırmızı veya mavimsi hemorajik renk değişikliğine sebep olur. Kan pigmentinin zamanla azalması sonucu kalın katran kıvamlı içerik oluşur ve bu nedenle çikolata kisti de denir [56].



Şekil-1: A: barut yanığı B: Mavi düğümcük C-D: çikolata kisti

Endometriotik implantlar dört ana bileşenden oluşur, endometrial bez, endometrial stroma, fibrozis ve hemoraji [55].

Makroskopik olarak normal görünen pelvis peritonunda ki endometrial bezler ve stromanın varlığı, mikroskopik endometriozis olarak tanımlanır. Endometriozis histogenezinde ve tedavi sonrası tekrarlama bu durum önem arz etmektedir [57].

2.1.8. Sınıflama

Endometriozis hastalığında, anatomik yerleşim ve hastalığın şiddeti temel alınarak birçok sınıflandırma sistemi geliştirilmiştir. İlki 1917 yılında Lockyer tarafından yapılan adenomyozis sınıflamasıdır [58]. 1949 yılında ise Wicks ve Larson histolojik sınıflamayı geliştirerek, kist duvarında fagositik hücreler ve kan debrislerinin bulunması Derece 1, lezyonlarda endometrial doku ve stromanın bulunmasını Derece 4 olarak bildirilmiştir [59]. 1951 yılında Huffman tarafından ilk cerrahi evreleme verilmiştir [60]. Ayrıca birçok araştırmacı tarafından da hastalığın sınıflaması yapılmış, ancak günümüzde geçerli ve en yaygın olarak kullanılan sınıflandırma sistemi, 1979’da yayınlanan ve 1996’da düzenlenen Amerikan Üreme Sağlığı Birliğinin (ASEM) sınıflamasıdır. Lezyonların görüntüsü, boyutu ile peritoneal, yumurtalık ve tüplerdeki lezyonların derinliği, adezyonların varlığı, yaygınlığı ve tipi ile cul-de-sac (rahim arkası boşluk çıkmazı) tıkanmasına göre puanlama yapılmaktadır [61]. Bu sistem ağrı ve infertilite göz önüne alınmadan, endometriozis hastalığını yansıtır.

Ayrıca bu sınıflandırmada gözlemciden kaynaklanan ve gözlemciler arası farklılıkların sebebiyet verdiği değerlendirmeler de söz konusu olabilir.

Bu sınıflama sisteminde lezyonlar puanlanarak toplam sonuç hesaplanır ve hastalığın evresi belirlenir. Tipik olarak endometriozis minimal, hafif, orta derece ve şiddetli olarak sınıflandırılır. Hafif hastalık, peritonun 5cm²'sinden küçük alanda, over üzerinde çok küçük implant bulunmasıdır. Adezyon çok az veya hiç yoktur. Orta formda yüzeysel veya derin yayılım gösteren birçok implant vardır. Şiddetli formda ise ovaryan endometriomalarını içeren, yüzeysel ve derin implantlar vardır. İnce veya yoğun adezyonlar genellikle mevcuttur [62] (Tablo-2).

Tablo 2: Endometriozisin (ASRM)'e göre sınıflandırılması

Endometriozis	1 cm'den küçük	1-3 cm	3 cm'den büyük
Periton			
Superfisial	1	2	4
Derin	2	4	6
Over			
Sağ Superfisial	1	2	4
Sağ derin	4	16	20
Sol Superfisial	1	2	4
Sol derin	4	16	20
Posterior cul-de-sac obliterasyonu	Parsiyel 4		Komplet 40
Adezyonlar	1/3'den az	1/3-2/3	2/3'den fazla
Over			
Sağda ince	1	2	4
Sağda yoğun	4	8	16
Solda ince	1	2	4
Solda yoğun	4	8	16
Tuba			
Sağda ince	1	2	4
Sağda yoğun	4*	8*	16
Solda ince	1	2	4
Solda yoğun	4*	8*	16

*Fallop tüpünün fimbrial ucu tamamen örtülü ise 16 puan verilmelidir (Te Linde Obstetri ve Jinekoloji kitabından alınmıştır).

Evre I (Minimal Endometriozis): 1-5 puan

Evre II (Hafif Endometriozis): 6-15 puan

Evre III (Orta Dereceli): 16-40 puan

Evre IV (Şiddetli Endometriozis): 40 puan üstü

2.1.9. Tedavi

Endometriozis tedavisinde hedef, şikâyete yönelik ağrının giderilmesi, fertilitenin sağlanması, korunması ve endometriotik hedeflerde tekrarlama ya da ilerlemenin geciktirilmesi ve önlenmesidir. Genel olarak endometriozisin medikal ve koruyucu tedavilerine rağmen hastalığın yıllık tekrarlama oranı % 5-10 olup, olguların yaklaşık % 50' sinde bu sorunla tekrar karşılaşılmaktadır [63]. Tedavinin hastalığın gerçek aktivitesini ne ölçüde etkilediği tartışmalıdır.

Endometriozis östrojen bağımlı bir hastalık olduğundan, östrojenin azalması şikâyetlerin azalmasına sebep olmaktadır. Bu nedenle östrojen üretimini azaltan medikal tedaviler geliştirilmiştir. Medikal tedavinin yanı sıra, cerrahi tedavi de koruyucu ve radikal cerrahi olarak, hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır [22].

2.1.10. Endometriozis ve CA-125 İlişkisi

Endometriozisin non-invaziv tanı ve takibinde en çok kullanılan serum belirteci CA-125' dir. Serum CA-125, 200.000 D ağırlığında bir glikoproteindir. İç organları örten epitellerde (endometrium, endoserviks, tüpler, periton, akciğer zarı, kalp zarı) bulunan ve en sıklıkla mukus salgılamayan epitelyal kötü huylu tümörlerde bulunan bir belirteçtir. CA-125 düzeyleri orta ve şiddetli endometriozisi olan kadınlarda çok yüksek, minimal ve hafif endometriozisi olanlarda ise normal düzeylerde bulunmuştur [64]. Endometriozis evresi 1-2 olan hastalarda CA-125 seviyesi ortalama 73 U/mL iken evre 3-4 hastalarında 248 U/mL civarındadır [65]. Menstürasyon esnasında da, endometriozisi olan ve olmayan kadınlarda da CA-125 düzeylerinde artış saptanmıştır [66].

Endometriozis tanısı koymayı amaçlayan çok sayıda çalışmada, CA-125 taraması yapılmıştır [67]. İleri evre endometriozisli çoğu hastada ve bazı minimal evre hastalarında, over kanserli hastalarda ki gibi CA-125 seviyeleri yüksek bulunmuştur. Bu çalışmalarda hassasiyet ve özgüllüğü etkileyen asıl etmenin, hastalığın evresi olduğu bildirilmiştir [68, 69].

Yapılan bir meta analiz çalışmasında, CA-125' in düşük duyarlılık seviyesinin (birçok çalışmada % 20-50), bu testin endometriozis tanısı için klinik kullanımında sınırlamalara sahip olduğunu göstermiştir [70]. Yine bir çalışmada, seri CA-125 ölçümünün, tedaviden sonraki dönemde endometriozisin tekrarlama ihtimalini takipte de kullanılabilmesi gösterilmiştir [71]. Sonuç olarak CA-125 endometriozis olgularında önemli tanı belirteci olarak karşımıza çıkmaktadır.

2.2. Apoptozis

Apoptozis (Apo-,sonlanma, -ptozis, düşme, yaprak dökümü) fonksiyonlarını kaybetmiş, fazla üretilmiş, yaşlanmış, düzensiz gelişmiş veya DNA' sında hasar olan hücrelerin, güvenli bir şekilde yok edilmelerini sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür. Hücreler doğar, belli bir müddet yaşar ve sonra ölürler. Hücrenin bu son aşamasına apoptozis denir. Apoptozis, fizyolojik hücre ölümü, hücre intiharı olarak da adlandırılmaktadır [72].

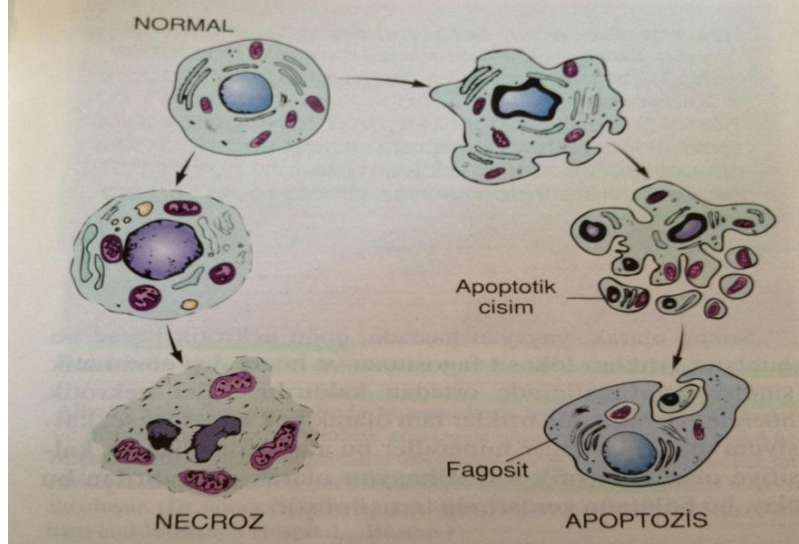
Apoptozis ilk defa 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie isimli patologlar tarafından tarif edilmiştir. Kerr ve arkadaşları hücre ölümünü morfolojik olarak takip ederken, ölen hücrelerin parçalandığını, parçaların bir zarla kaplanarak daha küçük küreciklere dönüştüğünü, bunlarında makrofajlar aracılığıyla fagosite edildiğini ifade etmişlerdir [73].

Apoptozis, doku homeostazında önemli bir parça olup, hem fizyolojik hem de patolojik durumlarda görülmektedir. Fizyolojik koşullarda apoptozis, embriyogenez sırasında programlı hücre yıkımı, menstüral siklusta endometrial dokunun dökülmesi, bağırsak epiteli gibi yenilenebilir hücrelerin azaltılması, timüs gelişimi sırasında immün hücrelerin ölüm süreçlerinde önemli yere sahiptir [74]. Patolojik koşullarda oluşan apoptozise de, alzheimer hastalığında nöronların ölmesi, immünolojik hastalıklarda sitotoksik T hücreleri tarafından hücrelerin ölümü, bazı viral hastalıklarda hücre harabiyeti ile ısı, radyasyon, hipoksi, kemoterapötik ilaçlar ile oluşan hücre ölümleri örnek olarak verilebilir [74, 75].

Hücre ölümü ya 'apoptozis' ya da 'nekroz' ile olur. Dışardan gelen bir uyarının plazma membranında oluşturduğu değişiklikler sonucu meydana gelen hücre ölüm şekline nekroz denir. Nekrotik hücre, şişerek plazma membranını yıkar, sitoplazmik içeriği dışardaki doku aralığına salar ve nekrotik atıkları ile inflamatuvar hücreleri dokuya alarak, bu dokunun parçalanmasına yol açar. Bu da inflamasyon olarak bildiğimiz histolojiye sebep olur [76].

2.2.1. Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

Apoptozisde ki biyokimyasal ve morfolojik değişiklikler, nekrozda görülenden farklıdır. Apoptozis morfolojisi, hücre büzüşmesi, kromatin yoğunlaşması, sitoplazmik tomurcuklanma ve apoptotik cisimcik oluşması ve son olarak apoptotik hücre veya cisimciklerin fagosite edilmesi ile karakterize edilen aşamaları içermektedir [77].



Şekil-2: Hücre nekroz ve apoptozis morfolojisi

Bunlara ek olarak bir dizi biyokimyasal olayda meydana gelmektedir. Örneğin, kaspazların proteinleri hidroliz etmesi, aktivitesi artan transglutaminazın apoptotik hücrenin diğer hücrelerle bağlantı yeteneğini bozması. Ayrıca glukokortikoidlerin hücre içi Ca^{+2} seviyesini artırması, Ca^{+2} bağımlı endonükleazların oligonükleotidleri parçalayarak DNA kırıkları oluşturması. Normalde plazma membranının iç yüzünde bulunan fosfotidilserinin erken evrede membranın dış yüzüne doğru yer değiştirmesi, bu değişim ile apoptotik hücrenin komşu hücre ve makrofajlar tarafından tanınmasını sağlamaktadır. Tüm bunlar apoptozis sürecinde meydana gelen biyokimyasal olaylara birkaç örnektir [78].

2.2.2. Mekanizması

Apoptozis, hücre dışı ve hücre içi reseptörlerden gelen sinyaller ile yaşam ve ölüm arasında dengenin sağlanmasına karar veren önemli bir mekanizmadır. Eğer hücre, etrafındaki hücrelerle iletişimini kaybederse yâda içerisinde onarımı mümkün olmayan bir hasara uğrarsa apoptozis devreye girer [79]. Apoptozis, başlatılma (uyarılma-sinyal fazı), hücre içi proteazların (kaspazlar) aktivasyonu (işlem fazı), fagositoz (ortadan kaldırma fazı) olmak üzere üç aşamadan meydana gelmektedir.

2.2.2.1. Apoptozisin Başlatılması (Uyarılma-Sinyal Fazı)

Hücrede apoptozisin başlatılması için ilk olarak, hücre içi veya dışından bir sinyal olarak ilgili genetik mekanizmayı harekete geçirmesi gerekmektedir [80].

Hücre Dışından Kaynaklanan Sinyaller

1-Çevresel Yaşam Sinyalleri ve Büyüme Faktörlerinin Yetersizliği: Hücreler çevre hücrelerden ve hücre dışı sıvıdan gelen büyüme faktörlerine, yaşam sinyallerine ihtiyaç duyarlar. Eğer sinyaller yeterli değil ve düzensizse hücre apoptozise gider [80].

2-Ölüm Reseptörlerinin Aktivasyonu (Reseptör-Ligand Etkileşmesi): Bazı sitokinler hücre zarındaki alıcılara bağlanarak, apoptozisi aktifleştirecek sinyaller üretebilir [80]. Apoptoziste etkin rol alan hücre zarı alıcıları içinde en önemli grup ‘Tümör Nekrozis Faktör Reseptör’ (TNFR) ailesidir. TNFR içinde de apoptozisi sebep olan reseptörlerden en önemlileri Fas ve TNFR1’ dir. Uyarı alan bu reseptörler, hücre sitoplazmasında bulunan adaptör proteinlere bağlanarak, adaptör proteinlerin ölüm efektör parçaları sayesinde de apoptozis için başlatıcı olan kaspazlara (örn: prokaspaz 8) bağlanırlar [81].

a) Fas-Fas Ligand Aracılı Apoptozis: Bu apoptozis türü hücre yüzey alıcısı olan Fas aracılığı ile oluşur. Fas ligand Fas reseptörüne bağlanarak, Fas reseptörünün hücre içinde bulunan parçası, FADD’ la birleşerek hücre ölümünü başlatan sinyali oluşturur. Bu da öncül kaspaz 8’ in aktifleşmesini sağlar [82].

b) Tümör Nekrozis Faktör (TNF) Aracılı Apoptozis: Bir sitokin olan TNF, reseptörlerinden biriyle birleşir (örn: TNFR1) ve reseptörün hücre içinde bulunan parçası, TRADD ile birleşerek etkileşim gösterir. Adaptör protein daha sonra öncül kaspaz 8’ i aktive ederek apoptozise neden olur [80].

c) Sitotoksik T Lenfosit Aracılı Apoptozis: Sitotoksik T lenfositler (CTL) infekte olmuş konakçı hücrelerin yüzeyinde bulunan yabancı antijenleri tanırlar. CTL’ lerin ana görevi kötü huylu ve virüs ile infekte olmuş olan hücrelerin öldürülmesidir [80, 83]. Yabancı antijenleri tespit ettiklerinde, yüzeylerinde Fas ligand oluşturarak hedef hücrelerin Fas reseptörlerine bağlanırlar. CTL’ ler sitoplazmalarında apoptozise sebep olan granzim B (serin proteaz) ve perforin adı verilen proteinler içeren taneciklere sahiptirler [83]. Perforin, hücre zarından geçebilen bir proteindir. CTL’ ler hedef hücre zarında perforin ile delikler oluşturarak, sitoplazmalarına granzim B salgırlar. Salgılanan Granzim B’ de hedef hücreye girerek kaspazları aktifleştirir [84].

d) Hücrelerin Maruz Kaldığı Dış Etkenler: Hipoksi, radyasyon, antimetabolit etkili ilaçlar, gamma ve ultraviyole ışınları, ısı gibi dış etkenler çeşitli yollar ile DNA hasarı oluşturarak apoptozise neden olurlar [84].

Hücre İçinden Kaynaklanan Sinyaller

Hücre içi Ca^{+2} düzeylerindeki artış, hücre içi pH'da azalma, metabolik ve hücre döngüsü bozuklukları gibi DNA hasarı sonucu oluşan değişiklikler, hücrede apoptozise sebep olan ölüm sinyallerini aktive edebilmektedir [85].

2.2.2.2. Hücre İçi Proteazların Aktivasyonu (İşlem Fazı)

İç ve dış sinyaller ile hücre içindeki proteazların bir kısmı aktive olur. Bu proteazlara kaspaz denmektedir. Dışardan gelen sinyaller, ölüm reseptörlerini aktive eden adaptör proteinleri, iç ortamdan gelen sinyaller ise mitokondrideki başlatıcı kaspazları aktive ederler [80].

Dışardan gelen sinyaller mitokondri zarındaki geçirgenliğin artmasına sebep olur. Mitokondri dış zarının geçirgenliğini antiapoptotik bir protein olan Bcl-2 ayarlamaktadır. Bu protein mitokondri dış zarında bulunan apoptozis proteaz aktive edici faktör 1 (Apaf 1)' e tutunur. Hücre içinden gelen apoptotik sinyaller Apaf 1' in mitokondriden ayrılmasına neden olarak, dış mitokondrial zarın geçirgenliğini artırır. Geçirgenliğin artması ile mitokondrinin iç ve dış zarı arasında bulunan sitokrom C'nin sitoplazmaya salınması sağlanır. Sitokrom C' de sitoplazmada Apaf 1, kaspaz 9 ve ATP ile birleşerek apoptozom cisimciğini oluşturur. Sonlandırıcı kaspaz olan kaspaz 3 apoptozom ile aktifleşerek apoptozisi başlatır [85].

Herhangi bir sebeple, hücre kromozomlarında DNA hasarı olduğunda, aktive olan bazı genler, apoptozise neden olabilir. Bu genlerin en önemlisi p53 genidir. İnsan tümörlerinin yarısından fazlasında p53 geninin mutasyona uğrayarak, kanser oluşumunda kritik rol oynadığı belirtilmiştir [82, 86]. DNA hasarı olduğunda aktif hale gelen p53 geni, p21 genini harekete geçirir ve hücrenin G1 fazında kalarak S fazına geçmesini engeller. Böylece hücre döngüsü durdurularak, DNA' sı hasarlı hücrenin çoğalması engellenir. p53 geni, DNA tamiri yapan proteinlerin transkripsiyonunu sağlar. Eğer bu proteinler DNA hasarını düzeltebilirse, hücre döngüsündeki engel kalkar. Hücre hasar düzeltilemezse, p53 geni Bax proteinini (Bcl-2 grubu proteini, preapoptotik) aktive edip mitokondri aracılığıyla hücrenin apoptozise gitmesini sağlar. Böylece DNA' sı hasarlı hücre ortadan kaldırılmış olur [80, 87].

2.2.2.3. Fagositoz (Ortadan Kaldırma Fazı)

Apoptozis sonunda oluşan apoptotik cisimler, ortamdaki parenkim hücreleri ve fagositler tarafından ortadan kaldırılarak, dokudan temizlenirler [84].

2.2.3. Apoptozisi Belirleme Yöntemleri

Apoptozisi belirlemek için çok çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Apoptozis terimi ilk kez hücrenin morfolojik görünümü esas alınarak kullanılmıştır. Ancak, günümüzde morfolojik görüntülemeye ek olarak apoptozise özgü bazı belirteçlerin moleküler düzeyde belirlenmesiyle de saptanabilmektedir. Son yıllarda, sadece apoptotik epitelyal hücrelerde olmak üzere, kaspazlarca kırılan bir protein olan sitokeratin 18' in kırıldıktan sonraki özgün formunu tanıyan antikolar kullanılarak, apoptozise özgül olduğu düşünülen bir yöntem saptanmıştır [88].

Apoptozis tayininde kullanılan başlıca yöntemler şöyle sınıflandırılmıştır:

- A. Morfolojik Görüntüleme Yöntemleri (Işık, Floresan, Elektron, Faz Kontrast Mikr.)
- B. Biyokimyasal Yöntemler (A. Jel Elektrofrezisi, Western Blotting, Flow Sitometri)
- C. İmmünohistokimyasal Yöntemler (Anneksin V, TUNEL, Kaspaz-3, M30)
- D. İmmünolojik Yöntemler (Fluorometrik, ELISA)
- E. Moleküler Biyoloji Yöntemi

2.2.3.1. ELISA ve M30

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) yöntemi, viral, bakteriyel ve paraziter enfeksiyonları ile apoptozisin belirlenmesinde kullanılan, serolojik bir tanı yöntemidir. ELISA yönteminin prensibi, antijen-antikor ilişkisinde, antikora bağlanmış bir enzim ilavesi ve ardından substratın eklenmesini seyreden, ardından antikor ve antijen varsa oluşan rengin belli bir dalga boyunda okunması esasına dayanmaktadır [89]. Duyarlı, özgül ve çabuk sonuç veren kantitatif bir yöntemdir.

Monoklonal bir antikor olan M30, apoptotik epitel hücrelerden sitokeratin 18 (CK-18)' in kaspazlarla kırılması sonucu serum veya plazmaya salınan antijenik bir kesittir [90]. M30 sadece kaspazların aktivasyonu ile kırılan CK-18 kesitlerini belirleyerek, apoptotik hücre ölümüne özgü bir belirteç olarak kabul edilmektedir. Nekrotik hücrelerde bu kesitlere rastlanmaz [91]. M30 immünoreaktivitesi apoptotik epitel hücrelerinin sitoplazması ile sınırlıdır ve erken apoptozis sırasında ifade edilir [92].

2.2.4. Apoptozis ve Sitokeratinler

Son yıllarda epitelyal kaynaklı çeşitli hastalıkların prognozunun belirlenmesinde, apoptozise özgü serum belirteçlerinin kullanımının yararlı olabileceği belirtilmiştir. Bu belirteçlerden biri M30 antijen olarak da adlandırılan, kaspazla kırılmış sitokeratin 18'dir [93].

Kaspazlar, aktif merkezlerinde sistein aminoasidi bulundurduğundan sistein proteazlar olarak da adlandırılan, zimojen (inaktif prekürsör) olarak sitoplazmada bulunan bir grup enzimdir. Şu ana kadar tanımlanmış 14 farklı kaspaz vardır ve birçoğu apoptozisde rol oynamaktadır. Apoptozisin işlem fazında hücreyi parçalayarak, apoptotik cisimlerin oluşumunu sağlayan etkenler (efektör) olarak bilinirler. Hücre iskeletinde yer alan CK-18 ise kaspazların en önemli substratlarından biridir. CK-18 apoptozisle ölen hücrelerde yeni bir antijenik bölge oluşumuna neden olacak şekilde, apoptozise özel bir pozisyonda kırılır. Oluşan yeni antijen kaspazla-kırılmış CK-18 ya da M30 antijeni olarak adlandırılır. Apoptotik hücrelerden salınarak seruma çıkabilen M30 antijeninin, ELISA yöntemiyle düzeyleri kolayca ölçülebilir.

Böylece, M30 antijen serumda ölçülebildiği için klinikte rutin kullanıma uygun bir belirteç olarak özellikle epitelyal kaynaklı birçok hastalık ve kanserin prognozunda ümit vaat edici bir rol üstlendiği görülmektedir [94, 95].

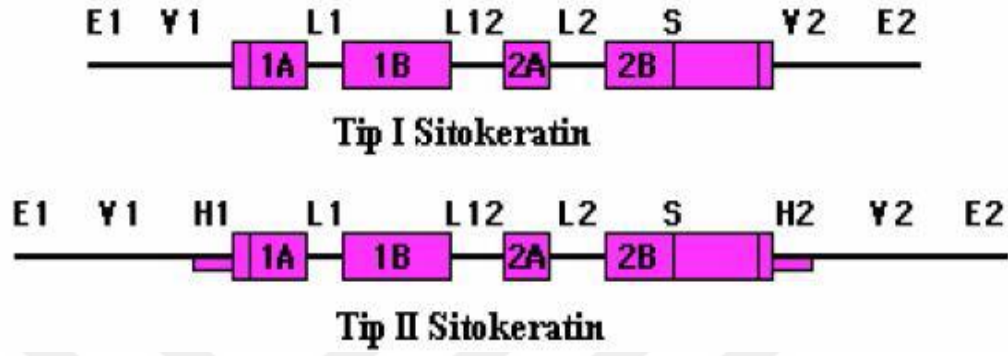
2.2.4.1. Sitokeratinler

Epitelyal hücrelerin iskeletini oluşturan sitokeratin (CK), ara filament protein ailesindedir [96]. Epitelyal dokularda hücrelerin şekil ve bütünlüğünün desteklenmesine katkı sağlarlar. Yapılan son çalışmalarda CK'lerin sinyal iletiminde rol aldığı ve hücrelerin göçünde, şekil ve hareketlerine katkıda bulunduğu ileri sürülmüştür [97].

Her sitokeratin molekülü, kendine özgü yapısal ve işlevsel özelliklere sahip olan epitel ile ilişkilidir [98]. CK'ler çoğunlukla basit ve keratinleşmemiş çok katlı epitelden ve epitelyal dokulardan salgılanır. Sağlıklı bireylerde, squamoz epitelden CK 1-6 ve 9-17 eksprese olurken, CK 7,8, 18-20 basit epitelden eksprese olur. Kötü huylu hücrelerde ise sadece CK 8, 18, 19 çok miktarda eksprese olur [99].

Şimdiye kadar 20'den fazla sitokeratinin varlığından söz edilmiştir ve bunlar iki gruba ayrılmaktadır. Tip I sitokeratinler asidik proteinlerden oluşup, CK 9-23 arasındaki sitokeratinleri içerirler. Tip II sitokeratinler bazik proteinlerden oluşup, CK 1-8 arasındaki sitokeratinleri içerirler [100].

Tüm sitokeratinler, 1A, 1B, 2A, 2B gibi dört sarmallı bölümden meydana gelen benzer molekülleri içerirler. Ayrıca, ligand parçaları adı verilen L1, L2 ve L12 gibi kısa düz parçalarla ayrılırlar. Temel CK' larda sarmal ve değişken bölümler arasında H1 ve H2 gibi var olan parçalar bulunurken uzantılarda, V1 ve V2 gibi değişken parçalar bulunmaktadır (Şekil-3) [100-102].



Şekil-3: Tip I ve Tip II sitokeratin filamentleri. Boyalı alanlar molekülün L bölümü ile bağlanan sarmal parçalarını, E- ve V- bölümleri değişken bölgeleri, H-bölümü homolog bölgeleri gösteriyor. “Stutter” bölgesi 2B’ nin oranını S ile belirler.

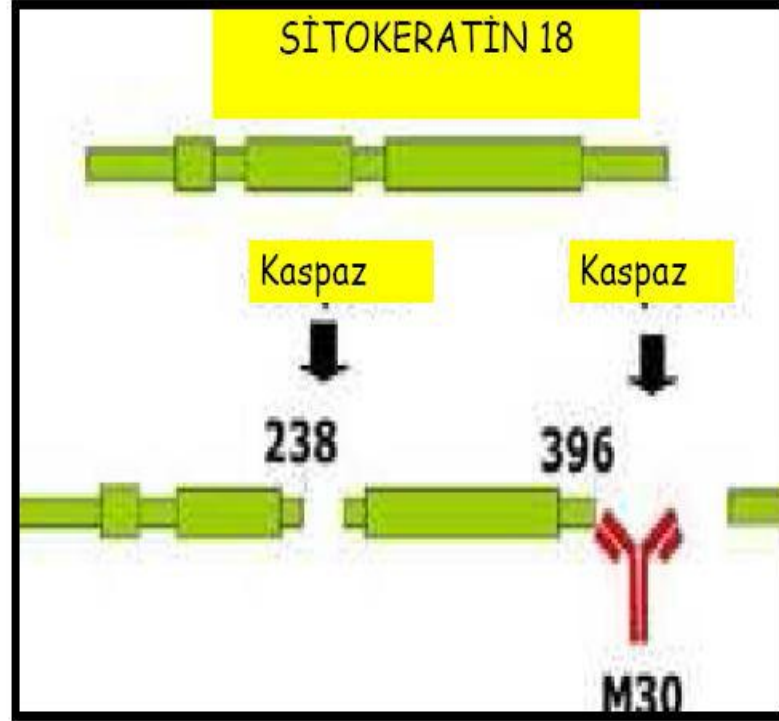
2.2.4.2. Sitokeratin 18 (CK-18)

CK-18, embriyogenez esnasında oluşan ilk sitokeratindir. Yetişkinlerde mesane epiteli, ince bağırsak ve kolon mukozası, hepatositler, ekrin ter bezleri, fallop tüpleri, pankreas asiner hücresi, rahim ağzı ve endometriumdan salgılanır [103]. Hızlı büyüyen tümörlerin epitel hücrelerinden CK-18 aşırı derecede salgılanırken, artan düzeyleri hücre çoğalması ve hücre döngüsü ile ilişkilidir [104].

Total CK-18, hızla çoğalan hücrelerde bol miktarda üretilir ve nekroz esnasında zar bütünlüğü bozulunca dolaşıma salınır. CK-18 sadece apoptozisle ölen hücrelerde, total CK-18’ in kaspazlarla kırılması sonucunda oluşur. Apoptozisle oluşan apoptotik cisimcikler, fagosite edilir. Kanser gibi hücre ölümünün ve hücre döngüsünün çok fazla olduğu durumlarda apoptozise giden hücrelerin bir kısmı sekonder nekroza uğrayarak, hücre içindeki kırılmış CK-18 dolaşıma salınır [105]. İn-vitro çalışmalarda kaspazlarca kırılmış CK-18’ in apoptozis esnasında hücre dışı alana salındığı gösterilmiştir [106].

Apoptozis esnasında CK-18, kaspazlarla aspartat 238 ve aspartat 396 noktasından kırılarak, CK-18Asp396 neo-epitopunun (M30 antijeni) çıkmasına sebep olur.

Buna özel geliştirilen M30 monoklonal antikoru, özellikle CK-18' in aspartat 396' da kırılan kısmını (M30 antijen) tanır (Şekil-4) [106]. Böylece monoklonal M30 apoptotik belirteç olarak kullanılabilir.



Şekil-4: Kırılmış sitokeratin 18

2.2.5. Apoptozis ve Endometriozis İlişkisi

Üreme çağındaki kadınların çoğunda, endometrial dokular bir noktaya kadar reflü olmaktadır [107]. Geri akım olarak peritoneal kaviteye kaçan menstürel içeriğin, canlı endometrial hücre bulundurduğu görülmüştür [108]. Retrograd menstürel akımın neredeyse tüm kadınlarda görülüyor olmasına rağmen, sadece bazı kadınlarda endometriozis geliştiğine neden olan sebeplere yönelik çok sayıda araştırma yapılmış, bunlarla ilgili önemli iki tane teori öne sürülmüştür [109]. Teorilerden ilki, endometriumun normal peritoneal arınma sistemlerine direnç göstermesi, ikincisi ise, peritoneal mezotelyumun çokça reseptör bulundurarak, artan makrofaj aktivitesi ve natural killer (NK) hücrelerinin normal işleyişini etkileyen, anormal hücrel ve salgısal bağışıklığa ikincil bir hastalığın sebep olduğu öne sürülmektedir. Böylece de, peritoneal ortam aracılığıyla değiştirilebilen endometrium, yayılmaya yatkın bir hal almaktadır. Geri akım gösteren yâda değiştirilmiş endometrium, inflamatuvarı tetikleyen veya hormonal bir ortam oluşturarak hastalığın gelişmesine sebep olabilir [109].

2.2.5.1. Normal Endometriumda Apoptozis

Menstrasyonu düzenli olan kadınların endometrial döngüsü üç temel evreden oluşmaktadır. Bunlar, proliferatif, sekretuar ve menstrüal evredir. Yapılan çalışmalarda apoptozisin, döngünün menstrüal ve geç sekretuar evrelerinde, uterin endometriumunun işlevsel kısmından, yaşlanmış hücrelerin temizlenerek, hücrenin ölüm ve yaşam arasında ki dengesini sağlamaya yardım ettiği öne sürülmektedir. Apoptozise, geç sekretuar ve menstrüal evrede endometriumun salgı epitelinde rastlanmıştır. Proliferatif ve sekretuar evrelerin başlangıcında ise çok az miktarda apoptozis saptanmıştır [5]. Proliferatif evrede endometrial hücrelerin çoğalması östrojene bağlıdır. Progesteronun hücreleri farklılaşmaya yönelterek, büyümenin durmasına neden olduğu düşünülmektedir. Normal endometriumdaki apoptozisin döngüsel ilerlemesi göz önüne alındığında, muhtemel olarak östrojen ve progesteronun bu dokuda apoptozise sebep olan sinyalleri düzenlediği söylenebilir [5]. Yapılan bir çalışmada da, proliferatif evredeki östrojen düzeylerinin apoptozisle ters orantılı ilişkisi gösterilmiştir [110].

2.2.5.2. Endometriozisli Hastalarda Apoptozis

Normal kadınların endometriumu ile endometriozisli kadınların ötopik endometriumu karşılaştırılınca birçok farklılık görülmektedir. Bunlar yapısal, çoğalma, bağışıklık sistemi bileşenleri, adezyon molekülleri, sindirim enzimleri ve inhibitörleri, steroid ve sitokin üretimi, cevap verme, protein üretimi ile ilgili sapmalar ve gen ekspresyonu gibi çok çeşitli farklılıklar görülmektedir. Bu farklılıklar endometriozisteki ilk hasarın, ötopik endometriumda olduğunu ve peritoneal kaviteye dökülen endometrial hücrelerin yaşamasına izin vererek endometriozise sebep olduğunu göstermektedir [111].

Farklılaşan ötopik endometriumun ve peritoneal kaviteye dökülen hücrelerin, peritoneal yüzeylere yerleşerek orda büyümesinin endometriozis geliştirmeye sebep olduğu düşünülmektedir. Başka bir açıdan ise endometriozisli bir hastanın ektopik dokusu ve ötopik endometriumu arasında izlenen birçok farklılığın peritoneal sıvı farklılıklarından oluştuğu düşünülmektedir [41, 112].

Endometriozisli kadınlarda peritoneal kaviteye dökülen endometrial hücrelerinde apoptozis yüzdesinin çok azaldığı görülmüştür [4]. Ayrıca endometriozisli hastalarda apoptozisdeki döngüsel değişiklik kaybolmuştur. Yine bir çalışmada, endometriozisli kadınların salgı epitelinde hastalığın evresine göre apoptozis yüzdesi analiz edilmiş ve kontrol grubuna göre daha düşük apoptozis tespit edilmiştir.

Bu araştırma sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşmamış ancak artan evre ile apoptozisin azalma eğiliminde olduğu gösterilmiştir [113].

2.2.5.3. Endometriozisli Hastaların Peritoneal Makrofajlarında Apoptozis

Endometriozis en sık temeli makrofaj hücresi olan, bir sıvı içeren peritoneal kavitede gelişmektedir [14, 114]. Endometrioziste bu hücrelerin sayısı ve sekretuar evre aktiviteleri artarken sitotoksik güçleri azalır. Yapılan son çalışmalara göre, bu hücreler endometriozis gelişimi ve ilerlemesinde önemli rol oynamaktadır [115, 116].

Endometriozis hastalarının peritoneal sıvısındaki Bcl-2 pozitif makrofajların artmış oranı, aktivasyon sürecini atlayan hücre sayısını artırarak apoptozisin azalmasına neden olmaktadır [117]. Normal ve endometriozisli kadınların ötopik endometrial dokusunda anlamlı oranda artan Bcl-2 üretimi geç sekretuar evrede daha da artar. Bcl-2'ce pozitif hücrelerin büyük kısmını lökositler oluşturur. Ektopik doku ötopik dokuya göre önemli miktarda yüksek Bcl-2 pozitif hücre içermektedir, bunların ise bazıları lökositlerdir [118].

2.2.5.4. Endometriozis Fizyopatolojisinde Apoptozis

Endometriozisli kadınların endometrial hücreleri, ektopik dokulara yerleşerek orada yaşayabilme ve artan çoğalma yeteneğine sahiptir. Endometrial dokunun normal apoptozis yeteneğinin bozulması endometrial hücrelerin ektopik alanlara oldukça fazla yerleşmesine ve orada büyümesine zemin hazırlar. Endometrial hücrelerin ölüm sinyali iletememesi ya da hücre ölümüne direnmeleri, bu hücrelerin antiapoptotik faktörleri (Bcl-2) arttırması, preapoptotik faktörleri (Bax) azaltması ile ilişkilidir [119].

Endometriozisin fizyopatolojisine katkı sağladığı düşünülen önemli etkenlerden biri, ötopik endometrium ve endometriotik dokularda değişen apoptozistir. Fakat bu değişikliğin, hastalığın sebebi mi yoksa hastalığın gelişme sürecinde ki bir sonuç mu olduğu net olarak aydınlatılamamıştır.

Son yapılan çalışmalarda, endometriozis gelişen bireylerin genetik faktörlerden etkilendiği öne sürülmektedir. Somatik kromozomlardaki genetik değişiklikler ve tümör baskılayıcı genlerin aktivitesini bozan DNA mutasyonlarının, endometriozisin oluşması, ilerlemesi ve büyümesine katkıda bulunabileceği gösterilmiştir [37]. Yine bir çalışmada 97 tane artmış ve 337 tane azalmış gen tespit edilmiştir [120]. Apoptozisle ilgili ve tümör baskılama genlerinin endometriotik dokularda azaldığı görülmüştür [121].

Bu bulgular endometrioziste apoptozisi düzenleyen genlerin önemini belirlemek, hastalığın teşhis ve tedavisine katkı sağlamak adına önemli bilgiler sağlayabilir. Endometriozisli hastaların apoptozisle ilişkili gen ifadesindeki değişiklikler bu hastalığa olan bireysel hassasiyeti açıklamakta ve endometriozisin neden yalnızca bazı kadınlarda geliştiği sorusuna cevap olmaktadır.

2.3. Serbest Radikaller Ve Oksidatif Stres

Oksijen, canlıların yaşamlarını devam ettirmeleri için ihtiyaç duydukları en temel elementlerden birisidir. Normalde suya dönüşen oksijenin % 1-3' lük bir diliminden serbest radikaller oluşmaktadır. Son yörüngesinde çiftleşmemiş bir adet elektron bulunduran atom veya moleküllere radikal denir. Oksijenli solunum yapan organizmalarda bu radikaller, değişik metabolik olaylar sonucunda, genellikle serbest oksijen radikalleri olarak açığa çıkarlar [122].

Serbest radikaller genellikle çok reaktif, kararsız ve biyolojik moleküllere karşı zararlıdır. Başka moleküller ile kolayca elektron alışverişi yapan bu moleküllere 'oksidan moleküller' ya da 'reaktif oksijen türleri' de denilmektedir [123]. Oksidanlar, reaktif oksijen türleri (ROS), reaktif nitrojen türleri (RNS), sülfür merkezli radikaller gibi moleküllerden oluşurlar. ROS ve RNS fizyolojik ve patolojik koşullarda metabolizma tarafından üretilirler. Oksidanları oluşturan çeşitli yolları şöyle sıralayabiliriz;

1. İyonize radyasyon
2. Kimyasal reaksiyonlar
3. Enzimatik tepkimeler
4. Serbest geçişli metal iyonlarının veya enzimlere bağlı metal iyonlarının neden olduğu redoks tepkimeleri [124].

ROS ve RNS başlıca serbest radikaller ve serbest radikal olmayanlar olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Tablo-3' de bunların sınıflandırılması gösterilmiştir [125].

Tablo-3: Bazı ROS ve RNS ile bunların serbest radikal olan ve serbest radikal olmayanlarının ayrı ayrı gruplandırılması

	Serbest Radikaller	Serbest Radikal Olmayanlar
ROS	Hidrojen Radikali (H•) Süperoksit Radikali (O ₂ • ⁻) Hidroksil Radikali (OH•) Hidroperoksil Radikali (HO ₂ •) Alkoksil Radikali (RO•) Peroksil Radikali (RO ₂ •)	Ozon (O ₃) Singlet Oksijen (¹ O ₂) Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) Hipokloroz Asit (HOCl) Lipid Hidroperoksit (LO ₂ H)
RNS	Nitrik Oksit (NO •) Nitrojen Dioksit (NO ₂ •)	Nitrozil Katyon (NO +) Nitrozil Anyon (NO-) Peroksinitrit (ONOO-) Nitröz Asit (HNO ₂) Alkil Peroksinitrit (ROONO)

2.3.1. Serbest Radikallerin Hücre ve Doku Düzeyindeki Etkileri

Serbest radikaller, hücrelerin lipid, protein, karbonhidrat, DNA ve enzim gibi yapısal bileşenlerini olumsuz yönde etkilemektedir. Kılcal geçirgenliği ve oksijenli solunumu bozar, hücrenin potasyum kaybetmesini ve trombositlerin kümeleşmesini artırmasının yanı sıra bazı savunma sistemlerini de inhibe ederler [126].

A- Protein Oksidasyonu: Proteinlerin yapısındaki aminoasitlere RNS ve ROS' ların saldırısı çeşitli sayıda ürün ortaya çıkmasına sebep olur. H₂O₂ ve O₂•⁻ fizyolojik düzeylerde proteinlere direkt etkisi çok azdır veya hiç yoktur (-SH grubu olmadıkça) [127].

B- DNA, RNA ve Gen Ekspresyonu: ROS yeterli düzeyleri, insan patofizyolojisinde enzimlerin ve redoksa duyarlı transkripsiyon faktörleri ile genlerin değişiminde rol oynayabilir. Bu hücre sinyali, hücre zarı ile ROS' un tepkimesinden kaynaklanan ve diğer biyoaktif moleküllerin katıldığı bir yolla meydana gelir [128].

C- Karbonhidrat Oksidasyonu: Serbest radikallerin karbonhidratlar üzerinde de önemli etkileri vardır. Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler ve oksialdehitler meydana gelir. Bu oksialdehitler ise birçok kronik hastalığın patogenezinde rol oynar [126].

D- Lipid Peroksidasyonu: Serbest radikaller, zar yapısındaki çoklu doymamış yağ asiti zincirinin, alfa metilen grubundan bir hidrojen atomu çıkararak lipid peroksidasyonunu başlatırlar. Hücre zarının yapısı lipid ve proteinden oluşmaktadır. Lipid peroksidasyonu lipidlere hasar vermekle kalmaz, zar proteinlerine de zarar verir [127]. Lipid peroksidasyonu sonucu, peroksitler, alkoller, malondialdehit, etan ve pentan gibi moleküller oluşur. Peroksidasyon sonuca açığa çıkan bu ürünler hücre zarının işlevini bozabilir, zara bağlı reseptör ve enzimleri inaktif edebilir, hücre zarı akışkanlığına zarar vererek, geçirgenliğini artırabilir buda hücre ve organel içeriklerinin ayrılmasına neden olan kopma ve kırılmalara yol açar. Lipid peroksidasyonu ile oluşan hücre zarı hasarı geri dönüşümsüzdür [129].

Hücrenin işlevleri açısından, hücre zarı bütünlüğü ve akışkanlığı önem arz etmektedir. Ökaryot hücrelerde bu akışkanlık zar lipidleri içine giren çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) aracılığıyla sağlanmaktadır. Serbest radikal etkisi ile PUFA' ların alfa metilen grubundan bir hidrojen atomunun ayrılmasıyla lipid peroksidasyonu başlar [130].

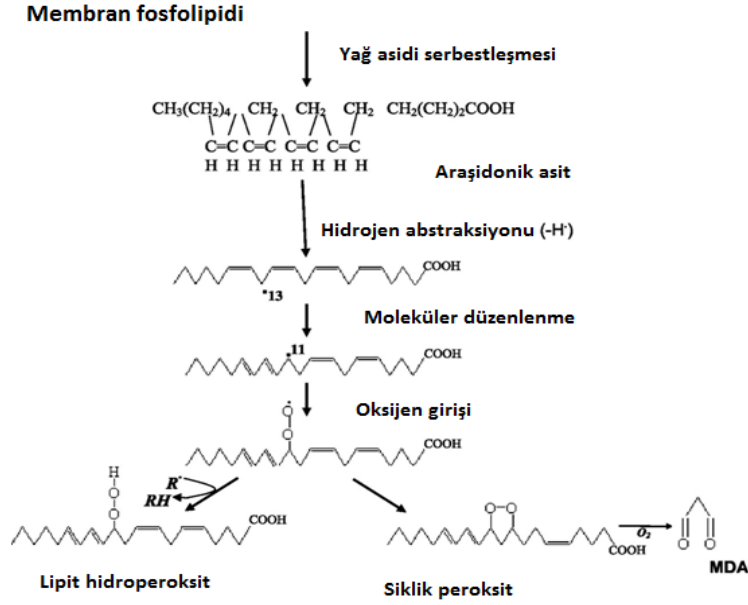
Lipid peroksidasyonu üç aşamada gerçekleşmektedir (Şekil-5).

a) *Başlama Evresi:* Serbest radikal etkisiyle PUFA' dan bir hidrojen atomunun ayrılması sonucu zincir radikal (L·) özelliği kazanır.

b) *İlerleme Evresi:* Oluşan radikal, moleküler düzenlemeyle, oksijen ile tepkimeye girerek peroksil radikalini (LOO⁻) oluşturur.

c) *Sonlanma Evresi:* Radikal olmayan ürünün oluşma aşamasıdır. Çift bağların yeniden düzenlenmesinden sonra moleküler oksijen eklenerek lipid hidroperoksit (LOOH) yâda endoperoksit oluşur.

Başlangıçtaki yağ asidinde en az üç çift bağ varsa son ürün olarak malondialdehit (MDA) oluşur. Üç karbonlu bir ketoaldehid olan MDA, normalde asetat veya malonata kadar yıkıldıktan sonra krebs döngüsü ile CO₂' e indirgenerek atılır. Fakat lipid peroksidasyonu gereğinden fazla olursa, ortamda artan MDA düzeyleri dokulara hasar vermeye başlar. Böylece tek bir başlatıcı etkisiyle yüzlerce yağ asidi zincirinin lipid hidroperoksitlere dönüşümü söz konusudur [131].



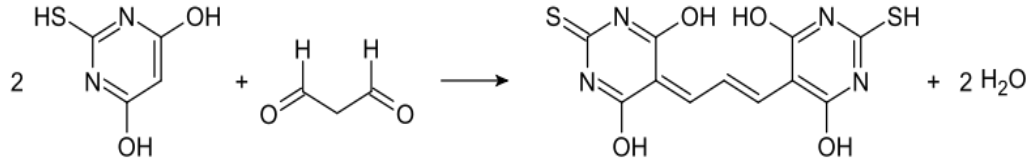
Şekil-5: Lipid Peroksidasyonu ve MDA oluşumu

2.3.2. Malondialdehit (MDA)

Malondialdehit (MDA), non-enzimatik lipid peroksidasyonu sonunda oluşan, zararlı etkileri olan son ürünlerden en önemlisidir. Uzun ömürlü ve yüksek reaktiviteye sahip bir üründür. Bu özelliğinden dolayı dokulardaki düzeyleri lipid peroksidasyonunun şiddetini belirlemek adına kolaylık sağlamaktadır. MDA, fosfolipidlerin amin gruplarıyla ve proteinlerin lizin kalıntılarıyla reaksiyona girer. Oluştuğu alandan uzağa gidebilen MDA, DNA bazlarıyla da etkileşime girebilir. Bu özelliğinden dolayı mutajenik ve kanserojendir. Bu yüzden lipid peroksidasyonu ve ürünleri, lipidlere oksidatif hasarın boyutlarının izlenmesinde önem arz eder [132, 133, 134, 135].

MDA, özellikle lizin kalıntıları olmak üzere birçok kalıntıda değişimlere, molekül içi ve moleküller arası çapraz bağların oluşmasına, DNA yapısında kırılmalara ve baz değişimlerine, hücre zarını etkileyerek hücre içinde aşırı Ca²⁺ birikimine yol açar. Hücre membranının işlevinin bozulması da, hücrenin şişmesi ve hücre ölümü ile sonuçlanır [136, 137, 138].

MDA, tiyobarbitürik asit (TBA) ile belirlenebilen bir lipid peroksidasyon ürünüdür. MDA iki molekül TBA ile reaksiyona girerek, oluşturduğu pembe renkli kompleksin UV spektrofotometrede 532 nm’ de absorbansı ölçülür (Şekil-6).



Şekil-6: MDA ile tiyobarbütürik asit reaksiyonu

Serbest radikallerin oluşumuyla canlı sistemlerde çeşitli hasarlar meydana gelmektedir. Ateroskleroz, kardiyovasküler hastalıklar, beyin dokusu hasarları, enfeksiyonlar, kanser, osteoporoz, preeklampsi, infertilite, endometriozis ve yaşlanma sürecindeki çoğu hastalıkta da lipid peroksidasyonu önemli rol oynamaktadır [139]. Son yıllarda endometriozisli hastalarda MDA düzeyleri ölçülerek oksidatif stres ve lipid peroksidasyonunun ölçütünü inceleyen çalışmalar yapılmıştır. Bir çalışmada endometriozisli olgularda hem ötopik hem ektopik endometriumda MDA düzeyleri ölçülmüş ve anlamlı derecede artış gözlenmiştir [140].

2.3.3. Asimetrik Dimetilarjinin (ADMA)

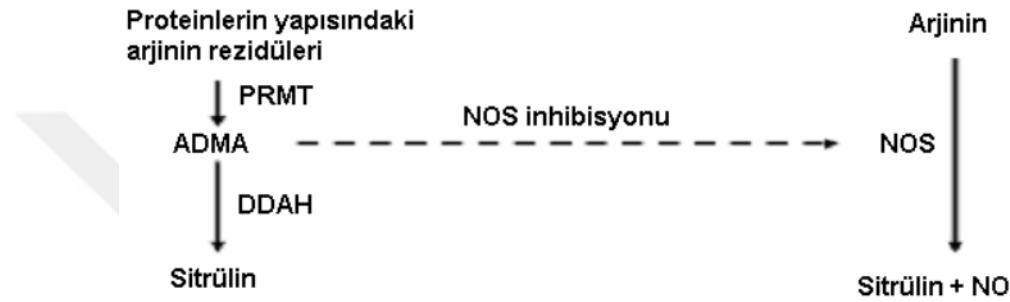
Asimetrik Dimetilarjinin (ADMA), arjinin amino asitinin translasyondan sonra değişikliğe uğramış bir formudur [141]. ADMA' nın önemli bir molekül olma sebebi, nitrik oksit sentaz (NOS) enzimini yarışmalı olarak inhibe etmesidir. Nitrik oksit (NO) sadece endotel bağımlı damar genişlemesini düzenlemekle kalmayıp, aynı zamanda damar duvarındaki düz kas hücrelerinin çoğalmasını, platelet adezyonu ile kümeleşmesini ve monosit adezyon inhibisyonunu da düzenleyen işlevlere sahiptir. Ayrıca vasküler dengenin sağlanmasında ve organlara kan iletilmesini devam ettirmede rol alan önemli bir moleküldür [142, 143]. ADMA ise böyle önemli görevleri olan NO molekülünün sentezini seçici olarak inhibe eder. Böylece, vasküler sistemin, NO' in olumlu etkilerinden yararlanmasını engelleyerek patolojik etki yaratır [144, 145].

ADMA ilk olarak 1970' li yıllarda bulunan bir molekülken, 1992 yılında NOS enzimini inhibe eden özelliğinin keşfedilmesiyle önem kazanmıştır ve üzerinde çok sayıda çalışma yapılmaya başlanmıştır [146].

Serbest ADMA' nın oluşması için gerçekleşmesi gereken iki karmaşık olay vardır. İlk olayda, proteinlerdeki arjinin kalıntılarının metillenmesi gerekirken, ikincisinde de, metillenmiş proteinlerin serbest aminoasitlere proteoliz edilmesi gerekir. Serbest ADMA bu yolla oluşmaktadır [147]. Proteinlerdeki arjinin kalıntılarının metillenmesi görevini, protein arjinin metil transferaz (PRMT) enzimleri üstlenmektedir [148].

Bu enzimin başlıca iki formu vardır. Bunlar PRMT 1 ve PRMT 2' dir. PRMT 1 enzimi histon ve histon dışı nükleer proteinler başta olmak üzere metilleme yaparken, PRMT 2 ise yalnız miyelin alkali proteinleri metillemektedir [149].

ADMA' nın % 10' u hücreden kan dolaşımına taşınır, dolaşımdaki ADMA böbrekler aracılığıyla uzaklaştırılır. Geriye kalan % 90' lık kısım ise dimetil arjinin dimetil aminohidrolaz (DDAH) enzimi tarafından yıkılır [150]. DDAH enziminin de iki türü bulunmaktadır. DDAH 1, böbrek ve beyinde daha aktifken, DDAH 2 ise kalpte, plasentada ve böbrekte daha aktif şekilde bulunur. ADMA' nın DDAH tarafından yıkılması sonucu sitrülün ve dimetilamin oluşmaktadır [151] (Şekil-7).



Şekil-7: ADMA' nın NOS inhibisyonu ve sitrülün oluşumu

Oksidatif stresin artış gösterdiği durumlarda, ADMA düzeylerinde de artış meydana gelir. ADMA düzeyinde ki bu artış, DDAH enziminin azalan aktivitesine bağlı olarak gelişebilir. DDAH aktivitesinin azalmasında, enzimin aktif bölgesinde bulunan sisteinin yükseltgenmesi önem arz etmektedir. Yükseltgenme ise NO tarafından sağlanıp, enzimin aktivitesi de geri dönüşümlü olarak azaltılabilmektedir [152]. Oksidatif stres, ADMA sentezinde görevli enzim aktivitesini değiştirerek ADMA düzeylerinde değişime yol açmaktadır. PRMT aktivitesi ROS ile artırılır ve ADMA düzeyleri artar [153].

Plazma ADMA düzeyleri, çeşitli avantaj ve dezavantaj bulundurmamak ile birlikte, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), kütle spektrometresi ve ELISA ile belirlenebilmektedir. Plazmadaki ADMA' nın biyolojik olarak aktif olup olmadığı kesin olarak bilinmemektedir. Ancak literatürde birçok hastalıkta plazma ADMA konsantrasyonlarında artış olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Örneğin, Böbrek yetmezliğinde ADMA düzeylerinde artış gözlenmektedir. Hemodiyaliz hastalarında ADMA düzeyleri artıp, hemodiyalizden sonra azalmaktadır [154]. Kardiyovasküler hastalıkların patogeneğinde aktif olan risk faktörleri (hiperkolesterolemi, hiperhomosisteinemi, hipertansiyon, hipertrigliseridemi) bulunan kişilerde ADMA

düzeyleri yüksek bulunmuştur [155]. İnsülin direnci ve Tip 2 Diyabette ADMA düzeyleri artmaktadır [156]. Ayrıca karaciğer hastalıkları [157], preeklampsi [158] ve gebelik durumlarında da seviyeleri değişkenlik göstermektedir [159]. Yapılan bir çalışmada şizofreni hastalarında ADMA seviyeleri yüksek bulunmuştur [160]. Yine deneysel endometriozis oluşturulmuş ratlarda, kontrol grubuna göre daha yüksek plazma ADMA düzeyleri elde edilmiştir [161].

2.3.4. Endometriozis ve Oksidatif Stres

Normal şartlarda serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma sistemi denge halindedir. Serbest radikal artışı dengeyi bozarak, lipid peroksidasyonuna yol açmaktadır. Hücre zarı ve organellerin yapısındaki lipid ve proteinler bozunmaya uğrar, enzimlerin aktivitesi bozular, DNA hasar görür, mitokondrilerde aerobik solunum bozular, parçalayıcı enzimler aktive olur, hücreden K⁺ kaybı artar, damar geçirgenliği bozular, hücre dışı sıvıdaki kollajen doku bileşenleri yıkılır, dokulara fagositlerin göçü ve trombosit kümeleşmesi artar. Organizmadaki tüm bu fonksiyonel ve yapısal değişikliklere oksidatif stres denir [162].

Sağlıklı kadınlarla kıyaslandığında endometriozisli kadınlarda oksidatif stresin daha yüksek olduğu görülmüştür [163]. Bu durum ektopik endometriyal doku oluşumuna karşılık gelişen yerel makrofaj ve nötrofil aktivasyonunun sonucudur. Mononükleer hücrelerin aktifliği ROS üretimine neden olmaktadır. Bu da üreme hücresinin yaşaya bilirliliğini, spermin hareketliliğini, yumurtanın verimini, implante yumurta gelişimini direkt olarak etkilemektedir. Bu yönden değerlendirildiğinde, antioksidan kaynağı gıdaların alımının oksidatif stres belirteci düzeylerini azalttığı gösterilmiştir. Antioksidan kaynağı gıdaları daha az tüketen kadınların endometriozis riskini daha çok taşıdığı ve artmış oksidatif stresin gözlemlendiği açıktır [164]. Antioksidan kaynağı maddeler ve oksidatif stres arasındaki ilişki değerlendirilirken çoğunlukla lipid peroksidasyonu mekanizmaları göz önünde bulundurulmaktadır. Endometriozisli kadınların sağlıklı kadınlara göre vitamin A, C, E ile çinko ve bakır düzeylerinin daha düşük olduğu belirtilmiştir [165].

Retrograd menstürasyonun kadınların bazısında endometriozise neden olurken, bazısında endometriozise neden olmaması, peritoneal sıvıda ROS ve antioksidanlar arasındaki dengenin bozulmasından kaynaklandığı, bunda oksidatif stres ve endometriozisle sonuçlanabileceği düşünülmektedir [163].

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

- Santrifüj (Hettich EBA 3S)
- Otomatik pipet uçları (mavi, sarı, beyaz)
- ELISA okuyucusu (GF-M3000 MICROPLATE READER)
- Spektrofotometre (Çift ışınlı Labmed. İnc)
- Elektronik hassas terazi (Sartorius 000032)
- Manyetik karıştırıcı (TM 14S)
- Etüv (Lab Companion 37°C)
- Vortex (ISO LAB)
- PH Metre (Adva)
- Falcon Tüp (ISO LAB tubes/sterile)
- Eldiven (Beybi Latex M)
- Ependorf tüp (1500 µL)
- Derin Dondurucu (-80)
- Mikropipetler (1000 µL, 500 µL, 100 µL)
- Balon joje (100 ml, 250 ml)
- Su Banyosu
- Buz banyosu
- Damıtık su
- Tüplük
- Parafilm
- Balık
- Huni
- Mezür
- Peçete
- Küvet

3.2. Kimyasal Maddeler ve Kitler

- Human Asimetrik Dimetilarjinin (ADMA) Elisa Kit
- Human CK 18-M30-Apoptosense Elisa Kit
- Tiyobarbütirik asit (C₄H₄O₂N₂S)
- DisodyumHidrojenFosfat (Na₂HPO₄.2H₂O)
- SodyumDihidrojenFosfat (NaH₂PO₄.2H₂O)
- TrikloroAsetikasit (CCl₃COOH)
- EtilenDiaminTetraAsetikasit (C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈.2H₂O)
- Sodyum Hidroksit (NaOH)
- Distile su

3.3. Hasta ve Kontrol Grubunun oluşturulması

3.3.1. Hastalar

Bu çalışmada hasta grubu, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum kliniğinde endometriozis ön tanısı konulan 31 kadın hastadan oluşturuldu. Hastalar yaş bakımından ayırım gözetmeksizin rastgele seçildi. Çalışma öncesi Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Başkanlığı'ndan 30.04.2014 tarihli ve 2014-04/40 sayılı karar ile onay alınmıştır [Ek-1].

3.3.2. Kontroller

Herhangi bir sistemik rahatsızlığı bulunmayan, yaş bakımından hasta grubuyla benzer dağılım gösteren, sağlıklı 31 kadın birey kontrol grubu olarak belirlendi. Kontrol grubundaki tüm bireyler çalışmaya gönüllü olarak dâhil edildi. Çalışmaya dâhil edilen tüm hasta ve kontrol grupları için bilgi formu karşılıklı soru-cevap şeklinde dolduruldu [Ek-2].

3.4. Kan Örneklerinin Toplanması

Endometriozis tanısı konmuş 31 kadının ve herhangi bir sistemik rahatsızlığı bulunmayan 31 sağlıklı kadının sağ veya sol ön kolundan yaklaşık 5' er ml venöz kan kuru tüplere alındı. Kan örnekleri 3000 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi, serumları ependorf tüplere alınarak, çalışma gününe kadar -80° C' de muhafaza edildi.

3.5. Asimetrik Dimetilarjinin Tayini

Hasta ve Kontrol grubuna ait bireylerin serumlarında, YH Biosearch Laboratory Human ADMA ELISA kiti kullanılarak, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Bölümünde ELISA yöntemi ile yapılmıştır. Deneyin her aşamasında kit prospektüsüne uyulmuştur.

Prensip: Serum örnekleri Human ADMA ya karşı yüksek oranda saf monoklonal antikorla kaplanmış kuyucuklara eklenir. Bu antikorlara bağlanan serumdaki Human ADMA üzerine biotinlenmiş ADMA antikoruna ilave edilir. Oluşan bu komplekse HRP-konjuge straptavidin eklenir. Daha sonra komplekse sırayla Kromojen A ve B solüsyonları eklenerek mavi renk oluşumu gözlenir. Oluşan rengin şiddeti serum ADMA düzeyini yansıtır.

3.5.1. Kullanılan Çözeltiler

-Human ADMA Standart: (64000 ng/L) 0.5 mL orijinal standart çözeltiden, standart seyreltici solüsyon ile 5 farklı derişimde ½ oranında standartlar hazırlandı.

-Standart Seyreltici: 3 mL

-HRP-konjuge straptavidin: 6 mL

-Biotin ADMA antikoruna: 1 mL

-Yıkama Çözeltisi: 20 mL yıkama çözeltisi (x30) alınarak 580 mL distile su ile seyreltilmiştir.

-Kromojen A: 6 mL

-Kromojen B: 6 mL

-Stop Çözeltisi: 6 mL

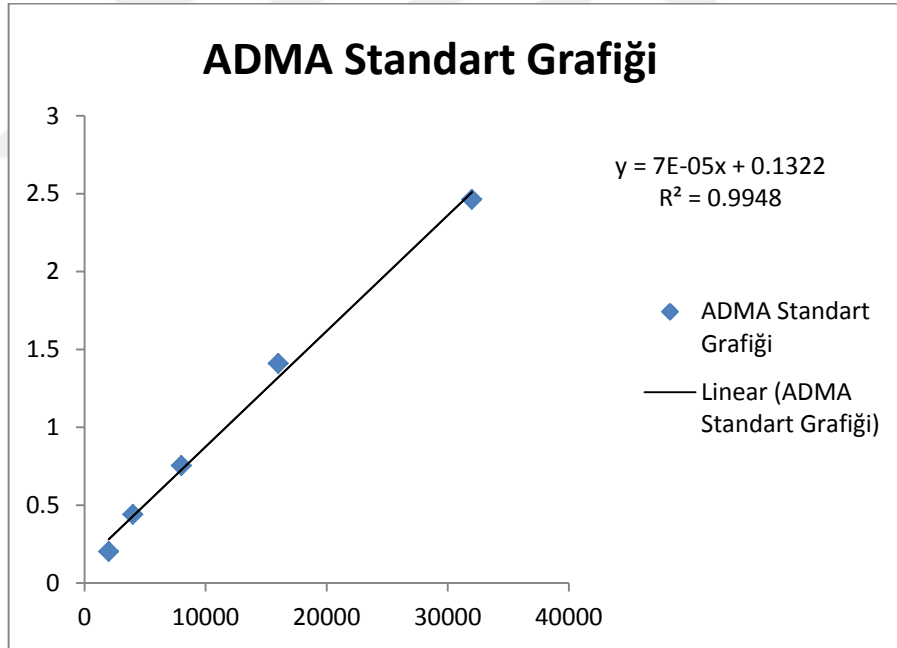
3.5.2. Deneyin Yapılışı:

1. Deneye başlamadan önce tüm numune ve reaktifler oda sıcaklığına getirildi.
2. Human ADMA standardı, standart sulandırıcı yardımıyla 32000 ng/L, 16000 ng/L, 8000 ng/L, 4000 ng/L, 2000 ng/L olacak şekilde seyreltildi ve 5 adet ADMA standardı elde edildi.
3. Blank olarak seçilen kuyucuğa hiç bir şey eklenmedi.
4. 50 µL standart ve 40 µL numune örnekleri kuyucuklara eklendi.
5. 10 µL ADMA antikoruna numune kuyucuklarına eklendi.

6. Son olarak 50 µL HRP blank hariç tüm kuyucuklara eklenerek, plağın üzeri kapatılıp 37°C' de 1 saat çalkalanarak inkübe edildi.
7. İnkübasyondan sonra kuyucuklar 350 µL yıkama çözeltisiyle 5 kez yıkandı.
8. Daha sonra sırasıyla 50' şer µL Kromojen A ve B solüsyonları eklenerek 10 dk. çalkalanıp 37°C' de ışıktan uzak inkübe edildi. Bu solüsyonların eklenmesiyle mavi renk oluşumu gözlemlendi.
9. Bu aşamadan sonra her bir kuyucuğa 50 µL stop solüsyonu eklenerek 15 sn. çalkalandı, oluşan sarı renkli kompleksin absorbansı 450 nm dalga boyunda okundu.

3.5.3. ADMA Derişiminin Hesaplanması

5 farklı derişimde hazırlanan ADMA standartlarının 450 nm dalga boyunda absorbansları ölçüldü. Standart absorbanslarından kör absorbansı çıkarılarak derişime karşı absorbans grafiğı çizildi ve standart eğri denklemi oluşturuldu. Bu grafik ve denklemden faydalanarak numunedeki ADMA derişimi hesaplandı ve ng/L olarak ifade edildi.



Şekil-8: ADMA standart eğrisi

3.6. M30 Tayini

Hasta ve Kontrol grubuna ait bireylerin serumlarında, YH Biosearch Laboratory Human M30-Apoptosense ELİSA kiti kullanılarak, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Bölümünde ELISA yöntemi ile yapılmıştır. Deneyin her aşamasında kit prospektüsüne uyulmuştur.

Prensip: Serum örnekleri Human M30-Apoptosense karşı yüksek oranda saf monoklonal antikorla kaplanmış kuyucuklara eklenir. Bu antikorlara bağlanan serumdaki Human M30-Apoptosense üzerine biotinlenmiş M30-Apoptosense antikoruna ilave edilir. Oluşan bu komplekse HRP-konjuge straptividin eklenir. Daha sonra komplekse sırayla Kromojen A ve B solüsyonları eklenerek mavi renk oluşumu gözlenir. Oluşan rengin şiddeti serum M30 düzeyini yansıtır.

3.6.1. Kullanılan Çözeltiler

-Human M30-Apoptosense Standart: (800 IU/L) 0.5 mL orijinal standart çözeltiden, standart seyreltici solüsyon ile 5 farklı derişimde ½ oranında standartlar hazırlandı.

-Standart Seyreltici: 3 mL

-HRP-konjuge straptividin: 6 mL

-Biotin (CK 18-M30) antikoruna: 1 mL

-Yıkama Çözeltisi: 20 mL yıkama çözeltisi (x30) alınarak 580 mL distile su ile seyreltilmiştir.

-Kromojen A: 6 mL

-Kromojen B: 6 mL

-Stop Çözeltisi: 6 mL

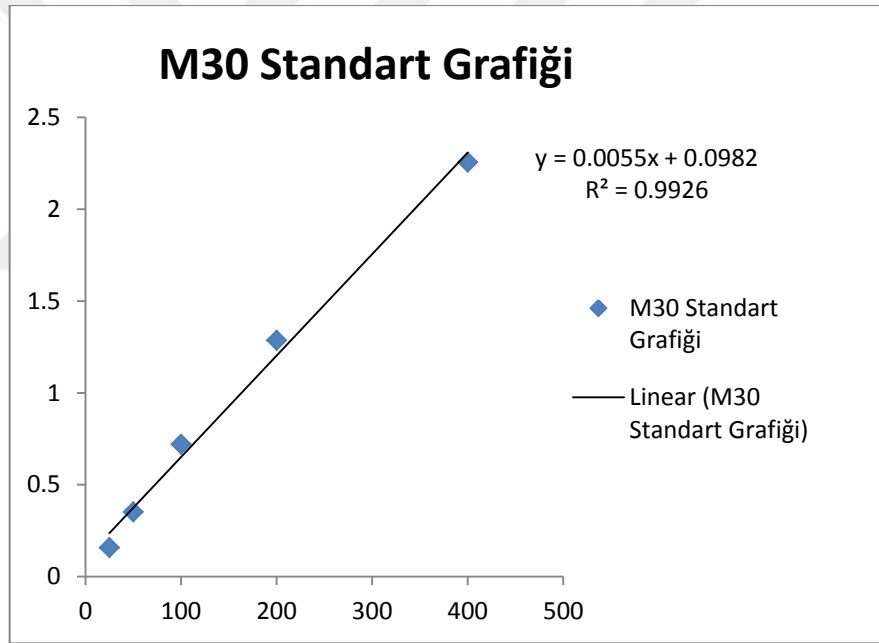
3.6.2. Deneyin Yapılışı:

1. Deneye başlamadan önce tüm numune ve reaktifler oda sıcaklığına getirildi.
2. Human M30-Apoptosense standardı standart sulandırıcı yardımıyla, 400 IU/L, 200 IU/L, 100 IU/L, 50 IU/L, 25 IU/L şeklinde seyreltildi ve 5 adet M30-Apoptosense standardı elde edildi.
3. Blank olarak seçilen kuyucuğa hiç bir şey eklenmedi.
4. 50 µL standart ve 40 µL numune örnekleri kuyucuklara eklendi.
5. 10 µL M30-Apoptosense antikoruna numune kuyucuklarına eklendi.
6. Son olarak 50 µL HRP blank hariç tüm kuyucuklara eklenerek, plağın üzeri kapatılıp 37°C' de 1 saat çalkalanarak inkübe edildi.

7. İnkübasyondan sonra kuyucuklar 350µL yıkama çözeltisiyle 5 kez yıkandı.
8. Daha sonra sırasıyla 50' şer µL Kromojen A ve B solüsyonları eklenerek 10 dk. çalkalanıp 37°C de ışıktan uzak inkübe edildi. Bu solüsyonların eklenmesiyle mavi renk oluşumu gözlemlendi.
9. Bu aşamadan sonra her bir kuyucuğa 50 µL stop solüsyonu eklenerek 15 sn. çalkalandı, oluşan sarı renkli kompleksin absorbanansı 450 nm dalga boyunda okundu.

3.6.3. M30 Derişiminin Hesaplanması

5 farklı derişimde hazırlanan M30 standartlarının 450 nm dalga boyunda absorbanansları ölçüldü. Standart absorbananslarından kör absorbanansı çıkarılarak derişime karşı absorbanans grafiğı çizildi ve standart eğri denklemi oluşturuldu. Bu grafik ve denklemden faydalanarak numunedeki M30 derişimi hesaplandı ve IU/L olarak ifade edildi.



Şekil-9: M30 standart eğrisi

3.7. Malondialdehit (MDA) Tayini

MDA düzeyi tiyobarbütirik asit ile muamele edilerek oluşturulan renkli kompleksin 532 nm dalga boyundaki max absorbansı Jain SK.1998 yöntemine göre Tıp Fakültesi Biyokimya ABD’de ölçülmüştür.

3.7.1. Kullanılan Çözeltiler

- ✓ % 1’ lik Tiyobarbütirik asit çözeltisi (0,05 N NaOH çözeltisiyle hazırlanmış)
- ✓ 0,2 M Sodyum Fosfat Tamponu (pH=7.4)
- ✓ % 30’ luk TCA çözeltisi
- ✓ 0,1 M EDTA çözeltisi
- ✓ 6.072 M MDA stok çözeltisi

3.7.2. Deneyin Yapılışı

1. Deneye başlamadan önce numune ve çözeltiler oda sıcaklığına getirildi.
2. Deney tüpleri her biri için tablodaki gibi hazırlandı.

Tablo-4: MDA deneyinin yapılış yöntemi

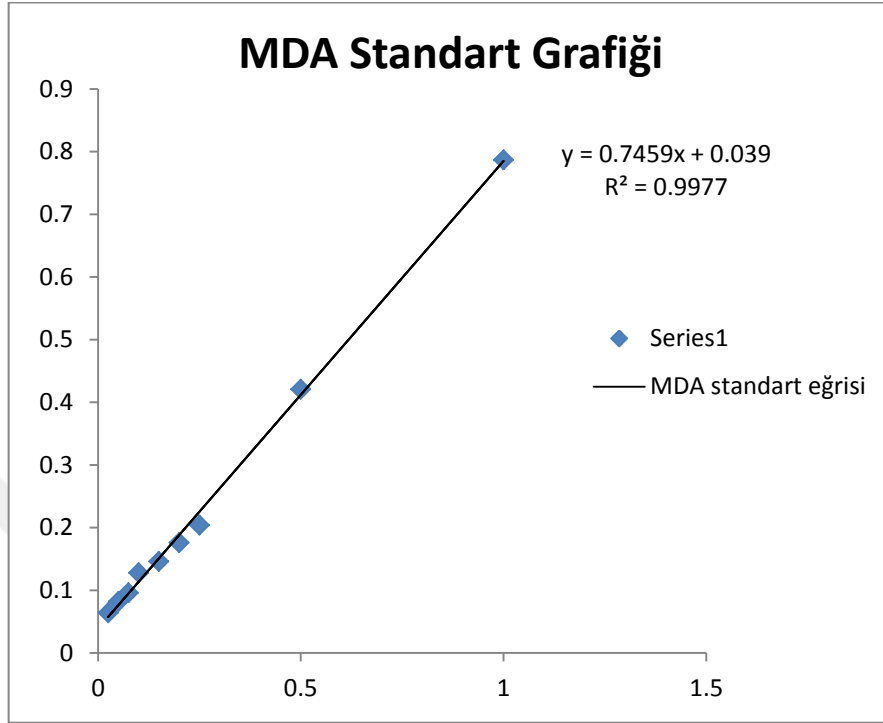
	Kör	Standart	Örnek
Standart		0,6 mL	
Serum			0,6 mL
Distile su	0,6 mL		
Fosfat tamponu	2,4 mL	2,4 mL	2,4 mL
TCA	1,5 mL	1,5 mL	1,5 mL

3. Hazırlanan tüpler 2 saat buz banyosunda bekletildi.
4. Sonra 2000 rpm de 5 dk. santrifüj edildi.
5. 3 mL süpernatant alınıp üzerine 0.225 mL EDTA, 0.75 mL TBA eklendi.
6. 15 dk. su banyosunda kaynatıldı.
7. Tüpler oda sıcaklığına gelince 532 nm dalga boyunda absorbansları okundu.
8. 6.072 M MDA stok çözeltiden farklı derişimler de hazırlanarak, aynı işlemler uygulandı ve standart eğrimizi çizmemize yardımcı oldu.

3.7.3. MDA Derişiminin Hesaplanması

6,072 M stok MDA çözeltisinden, 1- 0.5- 0.25- 0.2- 0.15- 0.1- 0.075- 0.05- 0.025 mMol 9 farklı standart çözelti hazırlandı, Tablo-4’ de ki işlemler uygulanıp 532 nm dalga boyunda absorbansları ölçüldü. Standart absorbanslarından körün absorbansı çıkarıldı,

derişime karşılık absorbans grafiği çizildi ve standart eğri denklemleri oluşturuldu. Bu grafik ve denklemlerden faydalanarak numunedeki MDA derişimi hesaplandı ve mMol olarak ifade edildi.



Şekil-10: MDA standart eğrisi

4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Çalışmamızda hasta ve kontrol grubundan elde edilen çeşitli verileri istatistiksel olarak değerlendirmek amacıyla '*Statistical Package for the Social Sciences*' (SPSS) programı (Versiyon 16.0) kullanılarak yapıldı.

Parametrik test varsayımları yerine getirildiğinde iki ortalama arasındaki farkın önemlilik testi (Kolmogorof-Simirnov), parametrik test varsayımları yerine getirilemediğinde Man Whitney U testi kullanılmıştır. 2x2 düzenlerde Khi-Kare testi ve Fisher Exact Khi-Kare testi kullanılmıştır. Çok gözlü düzenlerde ise Khi-Kare testi varsayımları yerine getirilmediğinden Khi-Kare Excat testlerden Monte Carlo modeli uygulanarak Khi-Kare değeri hesaplanmış ve yanılma düzeyi 0,05 olarak alınmıştır.

5. BULGULAR

Bu araştırmada 31' i hasta, 31' i kontrol grubu olmak üzere toplam 62 kadın çalışma grubunu oluşturmuştur. Bireylerin yaş dağılımları kontrol grubunda $30,29 \pm 7,41$ iken hasta grubunda yaşları $34,26 \pm 8,59$ olarak bulunmuştur. Yaş yönünden gruplar arası farklılık önemsizdir ($p=0,056$ $p>0,05$). Gruplar ayrıca **dismenore, disparoni, pelvik ağrı, alkol ve sigara** kullanımını aısından karşılaştırıldı, ilgili sonuçlar aşağıda gösterildi.

Tablo-5: Grupların sigara ve alkol kullanımı yönünden analizi

		Hasta	Kontrol	p	Toplam
		N=31	N=31	Değeri	
Sigara kullanımı	İen	7 (21,9)	3 (9,7)	0,164	10 (15,9)
	İmeyen	25 (78,1)	28 (90,3)		53 (84,1)
Alkol kullanımı	İen	3 (9,4)	0 (0)	0,164	3 (4,8)
	İmeyen	29 (90,6)	31 (100)		60 (100,0)

Tablo-5' e göre hasta ve kontrol grubundaki bireyler sigara ve alkol kullanımı yönünden istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, iki grup arasındaki fark anlamsız bulunmuştur ($p>0,05$).

Tablo-6: Hasta ve Kontrol grubunun dismenore yönünden analizi

		Hasta	Kontrol	p	X²
		N=31	N=31	Değeri	
Dismenore	Yok	9 (29,0)	15 (48,4)	0,118	2,44
	Var	22 (71,0)	16 (51,6)		

Tablo-6' ya göre her iki gruptaki bireyler dismenore şikâyeti yönünden karşılaştırıldığında, gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ($p>0,05$).

Tablo-7: Hasta ve Kontrol grubunun disparoni yönünden analizi

		Hasta N=31	Kontrol N=31	p Değeri	X²
Disparoni	Yok	16 (57,1)	27 (87,1)	0,010	6,67
	Var	12 (42,9)	4 (12,9)		

Gruplar disparoni şikâyeti yönünden karşılaştırıldığında, iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$). Hasta grubundaki bireylerde disparoni görülme sıklığı % 42' dir.

Tablo-8: Hasta ve Kontrol grubunun pelvik ağrı yönünden analizi

		Hasta N=31	Kontrol N=31	p Değeri	X²
Pelvik Ağrı	Yok	9 (29,0)	19 (61,3)	0,011	6,11
	Var	22 (71,0)	12 (38,7)		

Gruplar pelvik ağrı yönünden karşılaştırıldığında iki grup arası fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$). Hasta grubunda pelvik ağrının görülme sıklığı % 71' dir.

Tablo-9: Grupların hemogram parametrelerinin analizi

Parametreler	Kontrol	Hasta	Sonuç
WBC	7,79 ± 3,31	7,69 ± 3,36	p=0,899
Hb	13,11 ± 1,19	13,52 ± 4,95	p=0,696
Hct	39,66 ± 3,10	39,89 ± 9,98	p=0,922
Nöt.	4,78 ± 2,05	5,32 ± 3,48	p=0,505
Lenf.	2,35 ± 0,70	1,86 ± 0,49	p=0,005 *
Eos.	0,14 ± 0,12	0,11 ± 0,12	p=0,235
Baso.	0,03 ± 0,02	0,04 ± 0,09	p=0,743
Pt	12,16 ± 1,13	12,90 ± 0,99	p=0,038 *
Aptt	29,59 ± 4,62	30,57 ± 2,84	p=0,416

Her iki gruptaki bireylerin hemogram parametreleri karşılaştırıldığında Lenfosit ve Pt (*) yönünden farklılık önemli bulunurken ($p<0,05$), diğer parametreler önemsizdir ($p>0,05$).

Tablo-10: Grupların biyokimya ve hormon parametrelerini analizi

Ölçümler	Kontrol	Hasta	Sonuç
Ca	9,29 ± 0,37	9,33 ± 0,73	p=0,836
Na	138,20 ± 2,05	138,34 ± 2,37	p=0,823
K	4,26 ± 0,28	4,28 ± 0,29	p=0,863
Fsh	6,23 ± 5,54	8,04 ± 12,01	p=0,907
E2	70,86 ± 73,30	76,52 ± 53,01	p=0,148
Prolaktin	27,15 ± 37,75	28,78 ± 27,40	p=0,164
LH	6,27 ± 7,50	4,78 ± 3,20	p=0,796
Progesteron	0,86 ± 2,04	1,23 ± 1,70	p=0,321
AST	18,87 ± 4,04	16,68 ± 3,41	p=0,038 *
ALT	17,33 ± 8,41	13,67 ± 4,64	p=0,054
ALP	78,40 ± 20,06	52,57 ± 17,21	p=0,038 *

Bireylerin (her iki grup) biyokimya ve hormon değerleri karşılaştırıldığında, AST ve ALP (*) yönünden farklılık istatistiksel olarak önemli bulunurken ($p<0,05$), diğer parametreler yönünden ise istatistiksel fark önemsiz bulunmuştur ($p>0,05$).

Tablo-11: Hasta ve Kontrol Grubuna ait ADMA, M30 ve MDA düzeylerinin istatistiksel değerlendirilmesi

Parametreler	Kontrol $\bar{X} \pm S$	Hasta $\bar{X} \pm S$	Sonuç
ADMA	12,65 \pm 5,44	19,26 \pm 7,84	p=0,001*
<i>Min</i>	4	10,7	t=3,852
<i>Max</i>	25,2	34,8	
M30	371,30 \pm 134,60	871,48 \pm 99,9	p=0,002*
<i>Min</i>	150,3	147,4	t=3,315
<i>Max</i>	590,3	502,0	
MDA	0,24 \pm 0,04	0,25 \pm 0,05	p=0,924
<i>Min</i>	0,15	0,15	t= -0,421
<i>Max</i>	0,29	0,33	
CA-125	19,69 \pm 15,34	62,19 \pm 59,42	p=0,001*
<i>Min</i>	2,70	7,60	t=-3,796
<i>Max</i>	13,30	246,00	

*İstatistiksel olarak farklılıkların önemli olduğu parametreler

Hasta ve kontrol grubundaki bireyleri, serum ADMA, M30, MDA ve CA-125 düzeyleri incelenerek ortalama, standart sapma değerleri istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmada ADMA, M30 ve CA-125 yönünden gruplar arasındaki farklılıklar anlamlı bulunurken ($p < 0,05$), MDA yönünden gruplar arası farklılıklar anlamsız bulunmuştur ($p > 0,05$).

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Endometrium, epitel stroma, inflamatuvar hücre, damarlı yapı ve kan hücrelerinin eşlik ettiği farklı hücre bileşiminden oluşan karmaşık bir dokudur. Endometriozis ise endometrial dokuların uterin kavite dışında hormon bağımlı yerleşmesi ile karakterize, kronik ve yaygın bir kadın hastalığıdır. Histolojik olarak endometriozis iyi huyludur. Fakat büyüme, invazyon ve çoğalmak için çevre dokulara ihtiyaç duyması açısından malignite gibi davranmaktadır [166]. Hastalık çoğunlukla tüm etnik ve sosyal gruplarda üreme çağındaki kadınlarda görülmektedir. Üreme çağındaki kadınların % 6-10' unu, pelvik ağrılı genç kızlar ve kadınların % 50-60' ını, infertilite şikâyetiyle gelenleri % 50 ve üzerini etkilemektedir [3]. Çoğu kadında hiçbir belirti olmazken, endometriozisin cerrahi tanısı tesadüf olabilir. Semptomlar, fiziksel, zihinsel ve sosyal yönden olumsuz etki yapabilir. Endometriozis gelişiminde en çok etkilenen bölgeler, pelvik organlar, peritonyum ve overlerdir. Endometriozisin karakteristik belirtileri, şiddetli dismenore, derin disparoni, kronik pelvik ağrı ve menstürasyon sancısıdır. Pelvik ağrı menstürasyondan bağımsız oluşabilmektedir. Ağrı tek veya iki taraflı olabilir, bel ve bacadan aşağıya yayılabilir. Ayrıca, infertilite, kronik yorgunluk ve kabızlık sorunu da klinik endometriozis tablosuna aittir. Hastaların % 17-29' nun kendiliğinden iyileştiği, % 24-64' ünde hastalığın ilerlediği ve % 9-59' unda ise bir yıl süreyle sabit kaldığı gösterilmiştir [167].

Biz de çalışmamızda hastaları, dismenore, disparoni, pelvik ağrı, konstipasyon, infertilite şikâyetlerini göz önünde bulundurarak değerlendirdik. Hastaların % 71' inde dismenore şikâyeti görülürken, kontrollerin % 51.6' sında bu şikâyetin varlığı belirlenerek, iki grup arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p<0.05$). Dismenore şikâyeti sadece endometriozisle ilgili olmayıp, leiomyoma, servikal darlık, adenomyozis, over kisti, pelvik yapışıklıklar, RİA kullanımı, pelvik enfeksiyonlar gibi altta yatan organik bir nedenden de kaynaklanıyor olabilir. Dolayısıyla her ne kadar hasta grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek sıklıkta dismenore şikâyeti olsa da anlamlı fark görülmemesinin nedeni bu faktörlerdir.

Disparoni ve pelvik ağrı yönünden gruplar değerlendirildiğinde istatistiksel olarak fark önemli ($p<0.05$) bulunmuştur. Endometriozisli kadınların % 42.9' unda dismenore şikâyeti görülürken sağlıklı bireylerin % 12.9' unde bu şikâyete rastlanmaktadır. Pelvik ağrılı hasta sayısı % 71.0 iken sağlıklı kontrollerde bu sayı % 38.7' dir. Bu şikâyetler doğrultusunda bulgularımız literatürle uyumludur.

Endometriozis teşhisinde en güvenilir yöntem laparoskopiyeye dayanan, cerrahi operasyonla lezyonun görüntülenmesidir. Görsel inceleme endometriozis teşhisinde genellikle yeterli olmaktadır ancak en azından bir lezyonun histolojik olarak doğrulanması da idealdir. Eğer belirtiler endometriozise uyarsa, ilk olarak şikâyetlerin tedavisine hormonal kontraseptifler, non-steroid anti inflamatuvar ilaçlar önerilir. Eğer bu önlemler yeterli olmazsa, Avrupa İnsan Üremesi ve Embriyoloji Topluluğu (ESHRE) tarafından verilen yönergelerle göre, tanısız bir laparoskopi teşhisi doğrulamak adına yapılmalıdır [43]. Minimal invaziv teşhis olarak laparoskopi, hasta lezyonlarında net bir fikir verebilir. Ayrıca Ultrason ve MRI da endometriozis teşhisinde yardımcı olabilir. Non-invaziv teşhis yöntemlerinin eksikliği, endometriozisin kesin teşhisini geciktirmektedir [168].

Endometriozis yönünden şüphelenilen kadınların, değerlendirilmesinde non-invaziv ve basit teşhis yöntemlerinin bulunması, her zaman ciddi bir endişe konusu olmuştur. Endometriozis tanı ve takibinde laparoskopiyeye yardımcı olarak non-invaziv CA-125 testi kullanılmaktadır. CA-125 çoğu endometriozis vakasında yüksek çıkan bir çeşit hücre yüzey antijenidir ve bu hastalık için bir tarama yöntemi olarak önerilmiştir. Endometriozis tanısında CA-125 kullanımı konusunda tartışmalar olsa da cerrahi olmayan tanısız testler arasında en çok çalışılanıdır [49]. Ancak, 22 çalışmada yapılan bir meta analiz de, bu testin teşhis değerinin çok düşük olduğu rapor edilmiştir [169, 170]. CA-125 birçok jinekolojik hastalığın tanı ve takibinde yaygın olarak kullanılan epitelyal, glikoprotein yapılı bir kanser antijenidir. Bu antijenin, endometrium, periton, endoserviks gibi çoğu normal dokuda salgılandığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir [171]. Endometriozis olsun veya olmasın, menstrüasyon sırasında CA-125 seviyelerinin arttığı bu sebeple menstrüasyon sırasında bu antijen düzeylerinin göz ardı edilmesi gerektiği Pittaway ve ark. tarafından gösterilmiştir [171].

CA-125' in en önemli kullanım alanlarından birisi de over kanser teşhisi ve sonrasında tedavi takibinin yapılmasıdır. Endometriozis hastalarıyla yapılan bir çalışmada, normal cerrahi operasyon ve laparoskopik yöntem karşılaştırılarak, hastaların CA-125 seviyelerinde değişiklikler takip edilmiş ve birbiri ile olan ilişkileri kıyaslanmıştır. Operasyonlar öncesi yüksek miktardaki CA-125 seviyeleri, operasyonlar sonrası 6-12-24. saatlerde kemilüminesans yöntemiyle ölçülerek anlamlı derecede düşüşler gözlenmiştir. Laparoskopi ile normal cerrahide kıyaslandığında, daha düşük CA-125 seviyeleri dikkat çekmektedir [172].

Endometriozis evresi ile CA-125' in seviyesi arasındaki ilişkinin aydınlatılması adına da çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Serum CA-125' deki artışın ileri evre hastalarda daha yüksek olduğu gösterilirken [173], bir başka çalışmada ise endometriozis hastalığındaki tüm evrelerde anlamlı derece yüksek bulunmuştur [174]. Hastalığın tüm evreleri göz önüne alındığında testin sensitivite ve spesivite açısından kötü bir tanısal performans sergilediği bildirilmiştir [170].

Çalışmamızda da endometriozis grubunda serum CA-125 düzeylerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) derecede daha yüksek olduğu tespit edildi. Endometriozis hastalarında CA-125 ortalama 62.19 U/mL iken kontrol grubunda ortalama 19.69 U/mL olarak belirlendi. Bu sonuç literatürdeki çalışmalarla uyumludur [174, 175].

Her ne kadar özgün ve hassas bir belirteç olmasa da, CA-125' in seri ölçümleri tedavi sonrası hasta takibine yardımcı olabilir [174]. Tedavi sırasında düşüş gösterip, nüks halinde artan CA-125 seviyesinin sensitivitesi düşük olmakla birlikte, tedavi ve takipte önemli bir parametre olabileceği göz önünde bulundurulabilir. Teşhis de kesin olarak kullanmak için farklı parametreler ve çalışmalarla korelasyonu desteklenmelidir.

Endometriozis tıp literatüründe ilk defa 1800' lü yıllarda tanımlanmasına rağmen, günümüzde etyolojisi ve fizyopatolojisi hala aydınlatılmamış ancak birçok teori öne sürülmüştür. Bu hastalık, peritoneal yüzeylere yerleşen ve inflamatuvarı indükleyen endometrial hücrelerin, retrograd menstürasyonundan kaynaklanmaktadır [167]. Endometriozisi olan ve olmayan bayanların ötopik endometrial hücreleri karşılaştırıldığında bazı temel farklılıklar ortaya konmuştur. Endometriozisli bayanların endometrial hücreleri ektopik yerleşim gösterme ve bu yerlerde çoğalma yeteneğine sahiptir. Ektopik yerleşimlerin sebebi ise; neoanjyogenezis, fibrozis, adezyon oluşumu, immün fonksiyon bozukluğu, nöronal sızma ve apoptozisten kaçınma gibi çok değişik patolojik süreçlere dayanmaktadır [175]. Son yıllarda üzerine yoğunlaşılacak patofizyolojik mekanizmalardan biri de endometriozisli hastaların ötopik ve ektopik endometriumlarında apoptozisin düzenlenmesindeki değişiktir [109-111]. Endometrial dokuda apoptozisin normal düzenlenmesindeki bozulma, anormal implantasyona ve endometrial dokunun ektopik alanlarda büyümesine yol açar.

Apoptozis veya programlı hücre ölümü, çok hücreli organizmalarda hücre dengesinin devamından sorumlu, temel fizyolojik ve patolojik bir süreçtir.

Doku dengesinin devam ettirilmesinde ve normal işlevinde, ayrıca fazlalık olan fonksiyonu bozulmuş hücrelerin ortadan kaldırılmasında kritik rol oynar [176].

Endometriozis hastalarında son zamanlarda, apoptozisin önemini belirlemek amacıyla çok sayıda araştırma yapılmıştır. Mevcut veriler ve Harada ile ark. yaptığı bir meta analiz başta olmak üzere, endometriozis hastalarında apoptozisin azaldığı belirtilmiştir [116]. Yapılan bir çalışmada da endometriozisli kadınlarda peritoneal kaviteye reflü olan endometrial hücrelerde apoptozis yüzdesinin çok azaldığı gösterilmiştir. Aynı şekilde endometriozisli bayanların salgı epitelindeki apoptozis yüzdesi, kontrol grubuna göre daha düşüktür [4]. Endometriozisli hastalarda döngüsel değişiklik kaybolmuştur. Dmowski ve ark. hastalığın evresine göre apoptozis indeksini belirlemek için bir çalışma yapmışlardır. Çalışma sonucunda istatistiksel bir fark belirlenemezken, artan evre ile apoptozisin azalma eğiliminde olduğu gösterilmiştir [113].

Endometrial hücrenin bir ölüm sinyali iletilmesi ya da programlı hücre ölümüne karşı gelebilmesi için, bu hücrede antiapoptotik faktörlerin (Bcl-2) artması ya da apoptotik Bax proteinlerini azaltması gerekmektedir [119]. Meresman ve ark. TUNEL yöntemi ile ötopik endometrial dokuda apoptotik hücreleri belirleyerek, immunohistokimyasal yöntemle Bcl-2 ve Bax proteinleri değerlendirilmiştir. Sonuç olarak endometriozisli bayanlarda apoptotik hücre pozitifliğinin kontrol grubuna göre önemli oranda azaldığı saptanmıştır. Yine aynı çalışmada hastalarda proliferatif faz ile sekretuar fazdaki Bcl-2 ekspresyonu incelenmiş proliferatif fazda artmış Bcl-2 protein ekspresyon ifadesi tespit edilmiştir [119].

Apoptozis mekanizmasında rol alan üç temel faktör vardır, ölüm reseptörleri, adaptör proteinler ve proteolitik enzim olan kaspazlar. Bu üç faktör koordine olarak, bir proteaz aktivasyon şelalesi oluşturarak sitoplazmik protein yıkımında görev alırlar. Sitokrom C' nin sitoplazmaya salınması ile apoptozisin son aşamasından sorumlu kaspaz enzimleri aktive olur. Çok çeşitli görevleri olan kaspaz türleri vardır. Hücre ölümünü gerçekleştiren ise efektör kaspazlardır. Apoptozis mekanizmasının ana bileşeni kaspazlardır. Kaspaz aktivasyonu hücreye özeldir, kaspaz inhibitörlerinin (IAP) efektör kaspazları inhibe edip apoptozisi önlediği Büyükgebiz ve ark. yaptığı bir çalışmada gösterilmiştir. Ayrıca bu inhibitörlerin malign hücrelerde çok sayıda bulunduğu da gösterilmiştir [177].

Yapılan bir çalışmada, endometriozis hastalarının hem salgı hem stromal epitellerinde kaspaz-3 düzeylerine bakılmış ve bu hastalarda kaspaz-3 düzeylerinin anlamlı olarak daha düşük olduğu belirlenmiştir [178].

Apoptozis sürecindeki değişimleri belirlemek amacıyla çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bunlar, morfolojik görüntüleme, biyokimyasal, immünolojik, immunohistokimyasal ve moleküler biyolojik yöntemlerdir. Apoptozis sürecini belirlemek adına en uygun immünolojik yöntem ELISA yöntemidir. Çalışmamızda da apoptozis durumu ELISA yöntemiyle değerlendirilmiştir.

Apoptozisle ölen hücrelerde, apoptozise özgü kaspaz enzimlerinin etkisi sonucu oluşan kırılmış sitokeratin 18 (CK-18), tümör hücrelerinden salınan ve epitel kaynaklı malign hastalık süreçlerini değerlendirmek amacıyla kullanılan önemli bir apoptozis belirteçidir. Apoptozis esnasında oluşan apoptotik cisimler, komşu hücre ve makrofajlar tarafından fagosite edilir. Kanser gibi hücre ölümünün ve hücre döngüsünün çok yüksek olduğu durumlar da ise apoptozise giden hücrelerin bir kısmı sekonder nekroza uğrar, böylece hücre içindeki kırılmış CK-18 (M30 antijeni) dolaşıma salınır [105].

Apoptozis sırasında CK-18, kaspazlarla aspartat 238 ve aspartat 396 noktasında kırılır. M30 monoklonal antikor, özellikle CK-18' in aspartat 396' da kırılan parçasını (M30 antijen) tanır [106]. Böylece sitokeratinler apoptotik belirteç olarak kullanılabilir.

Endometriozisli hastalarda apoptozis sürecini değerlendirmek amacıyla çok sayıda çalışma mevcuttur [113, 116, 119, 176-178]. Ancak yaptığımız kaynak taraması ışığında M30 antijeni kullanarak endometriozis hastalarındaki apoptozisi değerlendiren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Fakat bazı kanser türlerinde yapılan çalışmalarda serum CK-18 düzeylerinin kemoterapi uygulamasına paralel olarak yükseldiği görülmüştür [95, 179]. Serum M30 seviyesi daha önceki çalışmalarda, tedaviye yanıt belirteci olarak incelenmiştir. Kemoterapi sırasındaki serum M30 düzeyindeki değişimler sayesinde bu belirtecin, kemoterapiye yanıtın erken göstergeleri olarak kullanılabilir olacağı bildirilmiştir [94]. Ayrıca, gastroentestinal kanser hastalarının kemoterapi sırasında yükselen M30 seviyeleri, artan apoptozis sonucu terapiye yanıtla ilişkilendirilmiştir [180].

Endometriozis ve kanser, hücre implantasyonu, kontrolsüz çoğalma, neoanjiogenez ve apoptozise uğrayan hücre sayısında azalma yönlerinden benzerdir. Kanser hücrelerinin kontrolsüz çoğalmasındaki artışın, apoptozisde azalmaya bağlı olarak geliştiği bilinmektedir. Apoptozis inhibe olunca, fonksiyonu bozulan hücreler

birikir ve dokuda hasara sebep olur. Kemoterapi ile tedavi sonucunda hücrelerde tekrar apoptozis artışı gözlemlenir [181]. Yukarda bahsetmiş olduğumuz çalışmalarda kemoterapi etkisiyle artmış apoptozis ve buna bağlı olarak apoptozis varlığını gösteren M30 düzeylerinde de artış olduğu görülmüştür.

İyi ve kötü huylu endometrial epitelde, proliferatif ve sekretuar fazda Bcl-2 ve M30 arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. İyi huylu doku örneklerinde proliferatif fazda büyük bir kısmı Bcl-2-pozitif olan hücrelere, çok az miktarda M30-pozitif hücrelerin eşlik ettiği görülmüştür. Sekretuar fazda bu değişerek az sayıda Bcl-2-pozitif hücre ve çok sayıda M30-pozitif hücre saptanmıştır. Kötü huylu tümörle hiperplazik endometrium kıyaslandığında Bcl-2-pozitif hücrelerin ortalama değerinin daha düşük olduğu ve 3. derece kanser hastalarında bu değer çok daha fazla düştüğü görülmüştür. Kanser ve hiperplazinin ortalama M30 değeri karşılaştırıldığında aksi yönde bir durum söz konusu olmuştur. Yani M30 ekspresyonu kanserli dokularda önemli derecede daha yüksek bulunmuştur ve aksine Bcl-2 seviyesi daha düşük olarak tespit edilmiştir [182].

Çalışmamızda da endometriozisli hastalarla kontrol grubunun serumlarında M30 seviyeleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmiştir. Hastalarda ortalama değer 271.48 IU/L iken kontrol grubunda ortalama değer 371.30 IU/L olarak hesaplanmıştır. Görüldüğü üzere kontrol grubunda M30 düzeyleri hasta grubuna göre daha yüksektir. Yukarda belirtmiş olduğumuz endometriozis hastalarında azalan apoptozis yüzdesine ışık tutar niteliktedir.

Bilgilerimize göre şüana kadar bir çalışma dışında endometriozis hastalarında M30 seviyelerini inceleyen herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Dolayısıyla çalışmamız bu anlamda ilk verileri oluşturmaktadır. Düşük çıkan hasta serum M30 seviyelerinin baskılanmış apoptozis sürecinin bir sonucu olarak yorumlayabiliriz. Bu bilgiler ışığında çalışmanın güvenilirliği ve patofizyolojisine katkıda bulunmak adına destekleyici çalışmalar yapılmalıdır.

Farklı hastalıkların evresinde çok sayıda yapılan çalışmalara karşın, endometriozis gelişimi ve ilerlemesinde hangi mekanizmaların nasıl rol aldığına dair elde açık bilgiler bulunmamaktadır. Agarwal ve ark. serbest radikallerin ve antioksidan mekanizmaların kadın üreme sistemi üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmada tekrarlayan gebelik kaybı, preeklampsi, spontan abortus, endometriozis, polikistikover sendromu ve açıklanamayan infertilite gibi üreme sağlığını etkileyen hastalıkların patogeneğinde oksidatif stresin arttığını göstermişlerdir. Endometriozisli kadınların

peritoneal sıvıda antioksidan koruyucu türlerin daha az aktif olduğu, maruz kaldıkları yüksek oksidatif stres sebebiyle doğal yolla gebe kalmalarının güçleştiği ve alternatif üreme tekniklerinin de başarı oranının düşük olduğu görülmüştür [183].

Retrograd menstürasyonun endometriozisle ilişkisi hakkında çok sayıda kanıt bulunsa da, retrograd menstürasyonu olan bayanların sadece bazılarında endometriozis geliştiğinin sebebi açığa kavuşturulamamıştır. Açıklanamayan bu durumun, bazı bayanların peritoneal sıvısında serbest radikaller ve antioksidanlar arasındaki dengeyi bozarak oksidatif strese ve endometriozise neden olan makrofajlar, demir iyonları ve çevresel atıkların sebep olduğu düşünülmektedir [163].

Birçok veri, endometriozisli bayanların periferik kan ve peritoneal sıvısında lipid peroksidasyon belirteçlerinin yüksek konsantrasyonlarına işaret etmektedir. Bu durum endometrial hücrelerin peritoneal kaviteye adezyonunu ve orda büyümesini arttırabilir [32]. Endometriozisli bayanlarda yüksek lipid peroksidasyon belirteçlerinin görülmesi proinflamatuvar çevre ile ilişkilendirilmiştir. Bu da apoptotik ve sindirilmemiş endometrial ektopik hücreler ile kırmızı kan hücrelerinin varlığından dolayı peritoneal makrofajların aktivasyonunun bir sonucu olarak düşünülmektedir [31]. Bu aktivasyon sonucu, peritoneal makrofajlar ayrıca serbest radikaller olarak da bilinen reaktif oksijen ve nitrojen türlerini (RONS) salarlar. Endometriozis olmayan ve olan kadınlarda makrofajların aktivasyonu ve konsantrasyonu karşılaştırıldığında endometrioziste makrofajların yoğun olarak aktive olduğu görülmüştür [23].

Serbest radikaller hücrede artış gösterdiğinde hücre lipid, protein ve nükleik asit yapılarında hasara neden olan ajanlar olarak işlev yaparlar. Malondialdehit (MDA) oluşumu lipid peroksidasyonu sonucu oluşan oksidatif hasar göstergesidir [184]. Endometriozis de MDA düzeyini inceleyen sınırlı sayıda çalışma vardır ve sonuçlar da tutarlılık göstermeyip, oldukça farklıdır. Örneğin, infertil hastaların endometriozis ve kontrol grubunun peritoneal sıvıda ve serumda MDA değerleri karşılaştırılmış ve iki grup arası fark anlamsız olarak tespit edilmiştir [164,185]. Bir başka çalışmada da endometriozisli hastaların periton sıvısında kontrol grubuna göre MDA seviyelerinde anlamlı bir fark tespit edilmemiştir [186].

Bir diğer araştırmada endometriozisi olan ve olmayan infertil bayanların kan serumunda oksidatif stres belirteçleri ve hastalık şiddetiyle olan ilişkileri karşılaştırılmıştır. Diğer belirteçler anlam ifade ederken, iki grup arasında MDA

seviyeleri farkı önemsiz bulunmuştur. Lipid peroksidasyonunun endometriozis ve infertilite arası nedensel ilişki içinde bir rol oynamadığı düşünülmüştür [187].

Hayvanlarla yapılan bir çalışmada, deneysel endometriozis oluşturulan sıçanlarda Etanercept' in (TNF-inhibitörü) endometriozisi tedavi edebilme yeteneğinin serum lipid peroksidasyonuna olan etkisini değerlendirmişler. Tedavi öncesi hastalarda serum MDA konsantrasyonu kontrol grubuna göre yüksek olmasına rağmen istatistiksel açıdan bir öneme sahip olmadığı belirlenmiştir. Tedavi sonrasında ise Etanercept' in serum MDA konsantrasyonlarını düşürdüğü gözlemlenmiştir [188].

Turgut ve ark. endometriozisli hastalar üzerine Cu, seruloplazmin ve oksidatif stres belirteçlerinin hastalığın patogenezinde ki önemini göstermek amacıyla kan serumunda incelemeler yapmışlar. İki grup TOS (total oksidatif stres) düzeyleri yönünden karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı ve endometrioziste daha yüksek olduğu belirlenirken, serum MDA düzeyi farkının iki grup arasında anlamlı olmadığı saptanmıştır. Aynı çalışmada peritoneal sıvıda MDA seviyesi artarken, serum düzeylerinde herhangi bir değişiklik olmadığı rapor edilmiştir [189].

Biz de çalışmamızda, endometriozisli hastaların kan serumunda MDA düzeylerini ölçtük. Hasta grubunun ortalama MDA düzeyi (0.26 mM) kontrol grubu ile (0.24 mM) karşılaştırıldığında, hasta grubunda bu değer daha yüksek olduğu gözlemlense de istatistiksel olarak gruplar arasındaki farkın önemsiz olduğu tespit edilmiştir ($p>0.05$).

Ayrıca literatürde MDA konsantrasyonlarının endometriozisli hastaların serumunda anlamlı olarak yüksek bulan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Dolayısıyla bu verimiz literatür ile uyumludur.

Her ne kadar oksidatif stresin endometriozisin patogenezinde rol aldığı bildirilse de, çalışmamızda MDA düzeyleri yönünden fark anlamsızdır. Bunun nedeni, serumda bu düzeyin incelenmesi, çalışma grubunun sınırlı sayısı ve oksidatif stresin sadece bu parametre yönünden incelenmesi olarak düşünülebilir.

MDA, oksidatif stres ve inflamasyon durumlarında artması beklenen lipid peroksidasyon ürünüdür. Bunun aksine, MDA seviyeleri endometrioziste bilinmeyen mekanizmalar ya da nispeten lokal inflamatuvar varlığından dolayı peritoneal sıvıda artmasına rağmen serumda değişmeden kalabilmektedir. Bu karmaşık mekanizmalar büyük ölçekli daha fazla araştırma yapmayı gerektirmektedir.

Nitrik Oksit (NO) çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçte bayan üreme sistemini de içeren farklı organlarda açığa çıkan serbest radikallerden bir diğeridir [190]. Endotelden türeyen NO anjiyogenik faktörlerin faaliyetlerinde önemli bir rol oynar. Damarlar üzerinde vazodilatasyon, damar direncinde düşme ve kan akımında artış gibi etkilere sahiptir. Bir takım anjiyogenik faktörler endotelial NOS ifadesi ve endotel kaynaklı NO salınımını stimüle ederek düzenler. VEGF, insan göbek venöz endotel hücrelerinden salınan NO ve NOS sentezini stimüle ederek düzenlediği görülmüştür [191, 192]. Son zamanlarda NOS' a yarışmacı bir endojen tarif edilmiştir. Bir arjinin analogu olan ADMA, L-Arjinin ile NOS için yarışır [144].

Vücutta oksidatif stresin arttığı durumlarda, ADMA düzeylerinde artış meydana gelir [152]. ADMA oluşumu için iki kompleks olayın gerçekleşmesi gerekir. Birincisi, proteinlerdeki arjinin kalıntısının metillenmesi, ikincisi bu metillenmiş proteinlerin proteoliz yoluyla serbest aminoasitlere kadar yıkılmasıdır. Serbest ADMA, bu yıkım ile oluşmaktadır. ADMA NOS' u inhibe etmektedir [147].

Bugüne kadar yapılan birçok çalışmada yüksek ADMA düzeylerinin kardiyovasküler hastalıkla ilişkisi gösterilmiştir [155]. Bu çalışmada ayrıca endometriozisli hastaların serumunda bugüne kadar araştırılmamış olan ADMA düzeyleride belirlendi. Çalışmamızda ADMA düzeyleri, iki grup arasında karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak farkın önemli olduğu belirlendi ($p<0.05$). Hasta grubunda ortalama değer 19.26 ng/L iken kontrol grubunda 12.65 ng/L dir. Yani serum ADMA değerlerinin hastalarda kontrollere göre önemli oranda daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır.

Yapılan çalışmalarda endometriozis hastalarında ADMA seviyeleri çoğunlukla plazmada [144], peritoneal sıvıda [193] ya da ilaç tedavisi sonrası plazma seviyelerine bakılarak analiz edilmiştir [161]. Çalışmamızla benzer olarak yapılan bir araştırmada periton sıvısı ve serumda ADMA düzeyleri ölçülmüş, periton sıvısına göre serum ADMA seviyelerinin daha anlamlı olduğu görülmüştür. Fakat hasta ve kontrol grubu arasında ADMA düzeyleri karşılaştırıldığında farkın istatistiksel olarak anlamsız olduğu sonucuna varılmıştır [193].

Bazı çalışmalarda vücutta oksidatif stresin arttığı durumlarda ADMA düzeylerinde artış olduğu bildirilmiştir [152, 194]. Örneğin, preeklampsi hastalarında yapılan bir araştırmada, bu hastalarda artan oksidatif strese bağlı olarak ADMA düzeylerinde artış görülmüştür [194]. Oksidatif stresin ADMA yapım ve yıkımında rol

alan bazı enzimlerin aktivitelerinde değişiklikler yaratarak ADMA düzeylerinde farklılıklara neden olduğu ileri sürülmektedir [152, 153, 194]. ADMA, dimetilarjinin dimetil aminohidrolaz (DDAH) tarafından sitriline metabolize edilirken [151], PRMT 1, arjinin kalıntılarına metil gruplarının eklenmesini sağlayarak ADMA oluşumunda rol alan bir enzim grubudur [153]. Artan reaktif oksijen türlerinin PRMT 1 aktivitesini artırdığı bunun da ADMA düzeylerinde artışa neden olduğu, ayrıca artan oksidatif stresin, DDAH enzim aktivitesini azalttığı da tespit edilmiştir [152, 153]. DDAH aktivitesindeki bu azalma ise ADMA yıkımında azalmaya neden olarak artan oksidatif stres durumlarında ADMA düzeylerindeki artışı tetiklediği ileri sürülmektedir [152, 153, 194]. Tüm bunlara ek olarak, artan plazma ADMA seviyeleri sistematik inflamasyon ile de ilişkilendirilmiştir [155].

Oksidatif stres [163, 164, 183] ve inflamasyonun [195] endometriozisin patogenezinde de önemli rol aldığı yapılan çalışmalarda ortaya konulmuştur. Çalışmamızda artan oksidatif strese bağlı olarak lipid peroksidasyonunun bir belirteci olan MDA düzeyleri yönünden hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı farkın olmadığı belirlenmiş olsa da endometriozisli hastalarda bu parametrenin arttığı görülmüştür. Dolayısıyla, endometriozisli kadınlarda artan oksidatif stres ve/veya inflamasyona bağlı olarak ADMA düzeylerinin yükseldiğini düşünmekteyiz.

Sonuç olarak, MDA, M30 ve ADMA düzeylerinin endometriozis patofizyolojisinde ki önemini belirlemek amacıyla yaptığımız bu çalışmada, ADMA ve M30 düzeyleri yönünden gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunurken, MDA düzeylerinin anlamsız olduğu tespit edilmiştir. Hasta grubunda M30 düzeylerinin daha düşük olmasının endometrioziste azalan apoptozisten kaynaklandığını düşünmekteyiz. Ayrıca, hasta grubumuzda ADMA düzeylerindeki anlamlı artış endometrioziste artan oksidatif stresle ilişkili olabilir. Çalışmamızda artan oksidatif stres sonucu lipid peroksidasyonunun bir belirteci olan MDA düzeylerinin hasta grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek olarak bulunması bu düşüncüyü desteklemektedir. Fakat MDA düzeylerindeki bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. Oksidatif stresin tek başına bu parametre ile değerlendirilmesi ve çalışma grubumuzun sınırlı sayısından dolayı, ADMA düzeylerinin ve oksidatif stres arasındaki korelasyonun birlikte değerlendirildiği daha geniş kapsamlı çalışmaların gerekliliğini ortaya koymaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Carlos P. Marisa T., Carolina G., Hugo S., M. Angelica B., Ariel F., M. Cecilia J., Nuclear factor kB pathway and interleukin-6 are affected in eutopic endometrium of women with endometriosis; *Reproduction* [2009] 137 727 737.
2. Brosens IA, Brosens JJ. Redefining endometriosis: is deep endometriosis a progressive disease? *Hum Reprod.* 2000; 15:1– 3.
3. Eskenazi B, Warner ML. Epidemiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 1997;24:235-238.
4. Howard M. Gebel, Donald P. Braun, Anat Tambur, David Frame, Nasir Rana, W. Paul Dmowski; Spontaneous apoptosis of endometrial tissue is impaired in women with endometriosis; Gebel et al. *Endometrial apoptosis in endometriosis* Vol. 69, No. 6, June 1998.
5. Shikone T, Yamoto M, Kokawa K, Yamashita K, Nishimori K and Nakano R. Apoptosis in human corpora lutea during cyclic luteal regression and early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 2376- 80.
6. Murphy AA, Palinski W, Rankin S, Morales JA, Parthasarathy S. Macrophage scavenger receptor [s] and oxidatively modified proteins in endometriosis. *Fertil Steril* 1998; 69: 1085-1091.
7. Boyer CM, Knapp RC, Bast RC Jr. Biology and immunology in: Betek JS, Hacker NF. *Practical Gynecologic Oncology*, 2.nd edn. Baltimore: Willams & Wilkins, 1994; 89 – 90.
8. Anaf V, Simon P, Fayt I, Noel J. Smooth muscles are frequent components of endometriotic lesions *Human Reprod.* 2000; 15: 767 – 771.
9. Konnicks PR, D’Hoodge TD, Oosterlynck D. Response to letter to the editor. *Fertil Steril* 1991; 56 – 590.
10. Speroff L, Glass RH, Kase N, Endometriosis, Erk A. *Klinik Jinekolojik Endokrinoloji ve İnfertilite*. Nobel Tıp Kitabevi 1996;5. Baskı:853-65.
11. Sampson J. Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of the endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* 1927;14:422-69.
12. Liu DTY, Hitchcock A. Endometriosis: its association with retrograde menstruation, dysmenorrhea and tubal pathology. *Br J Obstet Gynaecol.* 1986; 93: 859.
13. Ishimaru T, Masuzaki H. Peritoneal endometriosis; endometrial tissue implantation as its primary etiologic mechanism. *Am J Obstet Gynecol* 1991;165:210-4.
14. Jenkins S, Olive DL, Haney AF. Endometriosis. Pathogenetic implications of the anatomic distribution. *Obstet Gynecol* 1986;67:335- 8.
15. Kruitvagen RFP, Poels LG, Willemsen WNP et al. Endometrial epithelial cells in peritoneal fluid during the early follicular phase. *Fertil Steril.* 1991;55:297.
16. Scott RB, TeLinde RW, Wharton LR Jr. Further studies on experimental endometriosis. *Am J Obstet Gynecol.* 1953;66:1082.
17. Gramer DW, Wilson E, Stillman RJ et al. The relation of endometriosis to menstrual characteristics, smoking and exercise. *JAMA* 1986;355:1904-8.
18. Olive DL, Henderson DY. Endometriosis and mullerian anomalies. *Obstet Gynecol.* 1987;69:412.

19. Rock JA, Jones III HW. Endometriosis, Te Linde's Operative Gynecology 9th edition, 2005;25: 553-590.
20. Merrill JA. Endometrial induction of endometriosis across millipore filters. *Am J Obstet Gynecol* 1966; 94: 780 – 789.
21. Balasch J, Creus M, Fabregues F, et al. Visible and non-visible endometriosis at laparoscopy in fertile and infertile women and in patients with chronic pelvic pain: a prospective study. *Hum Reprod* 1996; 11: 387.
22. Bieber EJ, Sanfilippo JS, Horowitz IR. *Clinical Gynecology* 1th Ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, Elsevier nc. , 2006: 159 – 179.
23. D'Hooghe TM, Hill JA. immunobiology of endometriosis, in: Bronston R, Anderson DJ, eds. *immunology of reproduction*. Cambridge, MA: Blackwell Scientific 1996: 322 – 356.
24. Dmowski WP, Steele RN, Baker GF. Deficient cellular immunity in endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1981; 141: 377 – 383.
25. Nothnick WB. Treating endometriosis as an autoimmune disease. *Fertil Steril* 2001;76: 223–231.
26. Alpin AE, Howe A, Alahari SK and Juliano RL. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin cell adhesion molecules and selectins. *Pharmacol Rev* 1998; 50: 197-263.
27. Nisolle M, Donnez J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertil Steril* 1997; 68: 585 – 596.
28. Beliard A, Noel A, Foidart JM. Reduction of apoptosis and proliferation in endometriosis. *Fertil Steril* 2004; 82: 80 – 85.
29. Halme J, White C, Kauma S, Estes J, Hoskild S. Peritoneal macrophages from patients with endometriosis release growth factor activity in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;66: 1044 – 1049.
30. Healy DL, Roger PA, Hii L and Wingfield M. Angiogenesis: a new theory of endometriosis *Hum Reprod Update* 1998; 4: 736 – 740.
31. Hsieh YY, Chang CC, Tsai FJ, et al. Estrogen receptor alpha dinucleotide repeat and cytochrome P450c17alpha gene polymorphisms are associated with susceptibility to endometriosis. *Fertil Steril* 2005; 83;567.
32. Kennedy S. Genetics of endometriosis: a review of the positional cloning approaches. *Semin Reprod Med* 2003;21;111.
33. Simpson JL, Elias S, Malinak LR, Buttram VC. Heritable aspects of endometriosis. *Genetics studies*. *Am J Obstet Gynecol*. 1980;137:327-31.
34. Grimes DA, LeBolt SA, Grimes KR, Wingo PA. Systemic lupus erythematosus and reproductive function: a case control study. *Am J Obstet Gynecol*. 1985;153:179-86.
35. Simpson JL, Malinak LR, Elias S, Garson S, Radvany RA. HLA associations in endometriosis. *Am J Obstet Gynecol*. 1984;148:395-7.
36. Jiang X, Moriand SJ, Hitchcock A, Thomas EJ and Campbell IG. Allelotyping of endometriosis with adjacent ovarian carcinoma reveals evidence of a common lineage. *Cancer Res*. 1998;58:1707—1712.

37. Kosugi Y, Elias S, Malinak LR, 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.
38. Serdar E. Bulun. Endometriosis, Review article, *N Engl J Med* 2009;360:268-79.
39. Bruner-Tran KL, Carvalho-Macedo AC, Duleba AJ, Crispens MA, Osteen KG. Experimental endometriosis in immunocompromised mice after adoptive transfer of human leukocytes. *Fertility and Sterility* Vol 93. No. 8: 2010; 2519-2524.
40. Lea RG, Sandra O. Immunoendocrine aspects of endometrial function and implantation. *Reproduction* 2007; 134: 389-404.
41. Fanton JW, Golden JG. Radiation-induced endometriosis in *Maccaca mulatta*. *Radiat Res* 1991; 126: 141–46.
42. Sanfillippo JS. Endometriosis in adolescents, in Wilson EA editor. *Endometriosis*. Alan R. Liss Inc. New York. 161-172, 1987.
43. Kennedy S, Bergqvist A, Chapron C, D'Hooge T, Dunselman G, Greb R, Hummelshoj L, Prentice A, Saridoğan E. ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Human Reproduction* Vol. 20, No. 10. 2005; 2698-2704.
44. Cornillie FJ, Oosterlynck D, Lauweryns JM, Koninckx PR. Deeply infiltrating pelvic endometriosis: histology and clinical significance. *Fertil Steril.* 1990;53:978-83.
45. Barlow DH, Glynn CJ. Endometriosis and pelvic pain. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol.* 1993;7:775-90.
46. D'Hooghe TM, Debrock S, Hill JA and Meuleman C. [2003] Endometriosis and subfertility: is the relationship resolved? *Semin Reprod Med* 21,243–253.
47. Gianetto-Berrutti A and Feyles V. [2003] Endometriosis related to infertility. *Minerva Ginecol* 55,407–416.
48. Timmerman D, Bourne TH, Taylor A et al. A comparison of methods for preoperative discrimination between malignant and benign adnexial masses: the development of a new logistic regression model. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 181:57 – 65.
49. Brosens I, Puttemans P, Campo R, Gordts S, Brosens J: Non – invasive methods of diagnosis of endometriosis. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2003, 15: 519 – 522.
50. Kitawaki J, Kusuki I, Koshiba H, Tsukamoto K, Fushiki S, Honjo H. Detection of aromatase cytochrome P450 in endometrial biopsy specimen as a diagnostic test for endometriosis. *Fertil Steril* 1999; 72: 1100 – 1106.
51. Dheenadayaln K, Mak I, Cordts S et al. Aromatase P450 messenger RNA expression in the eutopic endometrium is not a specific marker for pelvic endometriosis. *Fertil Steril* 2002; 78: 825 – 829.
52. Howard FM. The role of laparoscopy as a diagnostic tool in CPP. *Bailliere's Clinical Obstet and Gynecol* 2000; 14 [3]: 467 – 494.
53. Martin DC, Hubert GD, Vander Zwaag R, Zeky FA. Laparoscopic appearances of peritoneal endometriosis *Fertil Steril* 1989; 51: 63 – 67.
54. Marcoux S, Mahoux R, Berube S. Laparoscopic surgery in infertile women with minimal or mild endometriosis. *Canadian collobarative groupe on endometriosis. N Engl J. Med,* 1997; 24: 217 – 222.

55. Connie E, Alford, Robert N, Taylor MD, Alan H, De Cherney MD. Endometriosis, 2010, Chapter 9.
56. Clements PB. Pathology of endometriosis. *Pathol Annu* 1990; 245 – 295.
57. Hayata T, Matsu T, Kawano Y, Matsui N, Miyikawa I. Scanning electron microscopy of endometrotic lesions in the pelvic peritoneum and the histogenesis of endometriosis. *nt J Gynecol Obstet* 1992; 39: 311 – 319.
58. Lockyer C: Fibroids and allied tumours [Myoma and Adenomyoma]. London, MacMillan and Co, 1918.
59. Wicks, M.J. and Larson, C.P. Histologic criteria for evaluating endometriosis. *Northwest Med.*1949, 48,611-6131.
60. Huffman JW. External endometriosis. *Am. J Obstet. Gynecol.* 1951;62,1243-1252.
61. The American Society for Reproductive Medicine, Revised American Society for Reproductive Medicine Classification of endometriosis, *Fertil Steril* 1997; 67: 819.
62. Gibbs, Ronald S, Karlan, Beth Y, Haney, Arthur F, Nygaard, ngrid E. Danforth's Obstetrics and Gynecology 9th Ed, Lipincott Willams & Wilkins. 2001: 230 – 245.
63. Clayton RD,Hawe JA,Love JC,Wilkin Son N,Garry R.Recurrent pain after hysterectomy and bilateral salpingoophorectomy for endometriosis.Evaluation of laparoscopic excision of residual endometriosis.*Br J Obstet Gynecol* 1999;106:740-744.
64. Barbieri RL, Niloff JM, Bast RC, Schaetzl E, Kistner RW, Knapp RC. Elevated serum concentration of CA-125 in patients with advanced endometriosis. *Fertil Steril* 1986;45:630-4.
65. Abrao MS, Podgaec S, Pinotti JA, de Oliveira RM. Tumor markers in endometriosis. *Int J Gynecol Obstet* 1999; 66: 19 – 22.
66. Masahashi T, Matsuzawa K, Ohsawa M, Narita O, Asai T, Ishihara M. Serum CA-125 levels in patients with endometriosis: changes in CA-125 levels during menstruation. *Obstet Gynecol* 1988;72:328-31.
67. Meden H, Fattahi-Meibodi A. CA 125 in benign gynecological conditions. *Int J Biol Markers.* 1998;13:231–7.
68. Malkasian Jr GD, Knapp RC, Lavin PT, Zurawski Jr VR, Podratz KC, Stanhope CR, et al. Preoperative evaluation of serum CA 125 levels in premenopausal and postmenopausal patients with pelvic masses: discrimination of benign from malignant disease. *Am J Obstet Gynecol.* 1988;159:341–6.
69. Barbati A, Cosmi EV, Spaziani R, Ventura R, Montanino G. Serum and peritoneal fluid CA-125 levels in patients with endometriosis. *Fertil Steril* 1994; 61: 438–42.
70. Mol BW, Bayram N, Lijmer JG, Wiegerinck MA, Bongers MY, van der Veen F, et al. The performance of CA-125 measurement in the detection of endometriosis: a metaanalysis. *Fertil Steril.* 1998;70:1101–8.
71. Oral E,Arici A.Pathogenesis of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1997; 24:219-33.
72. Thompson CB. Apoptozis. In: Paul WE [eds]. *Fundemental immunology.* Lippincott-Raven Publishers; 1999;107-38.
73. Wyllie AH. Duvall E.Cell death.In: McGee JO'D, Issacson PGR, Wright N [eds].*Oxford Texbook of Patology*, vol 1. USA: Oxford University pres; 1992, 142-7.

74. 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.
75. Geske FJ, PhD, Gerschenson LE, MD, PhD. The Biology of Apoptosis. Human Pathology 2001; 32: 1029-1038.
76. Geske FJ, PhD, Gerschenson LE, MD, PhD. The Biology of Apoptosis. Human Pathology 2001; 32: 1029-1038.
77. Nagata S. Apoptosis by death factor. Cell 1997; 88: 355-365.
78. Gibson RM. Does apoptosis have a role in neurodegeneration? BMJ, 2001; 322[7301]:1539-40.
79. Ergin M, Aklan S. Apoptozis. Arşiv 2002;11: 495.
80. Hirose Y, Yoshimi N, Suzui M, et al. Expression of bcl-2, bax, and bcl-XL proteins in azoxymethane-induced rat colonic adenocarcinomas. Mol Carcinog 1997;19: 25-30.
81. Sanders EJ, Torkkeli PH, French AS. Patterns of cell death during gastrulation in chick and mouse embryos. Anat Embryol. 1997; 195: 147-54.
82. Pole RJ, Qi BQ, Beasley SW. Patterns of apoptosis during degeneration of the pronephros and mesonephros. J Urol 2002;167:269-7.
83. Aral H. Apoptozis. Sendrom 1996; 33-7.
84. Thompson CB. Apoptozis in the pathogenesis and treatment of disease. Science 1995; 267: 1456-62.
85. Afford S, Randhawa S. Apoptozis. Mol Pathol 2000; 53:55-63.
86. Dhar P. Measuring tobacco smoke exposure: quantifying nicotine/cotinine concentration in biological samples by colorimetry, chromatography and immunoassay methods. J Pharm Biomed Anal. 2004; 35: 155-68.
87. Rodenburg RJT, Raats JMH, Puijn GJM, van Venrooij WJ. Cell death: a trigger of autoimmunity? Bioessays 2000; 22:627-36.35.
88. Verhagen AM, Coulson EJ, Vaux DL. Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs. Genome Biology. 2001; 2[7]: 3009.1-3009.10
89. Güleş Ö, Eren Ü. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi, 2008; 2: 73-8.
90. Kramer G, Erdal H, Mertens HJ, et al. Differentiation between cell death modes using measurements of different soluble forms of extracellular cytokeratin 18. Cancer Res 2004;64:1751-2.
91. Leers MP, Kolgen W, Bjorklund V, et al. Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. J Pathol 1999;187:567-72.
92. Schutte B, Henfling M, Kolgen W, et al. Keratin 8/18 breakdown and reorganization during apoptosis. Exp Cell Res 2004;297:11-26.
93. Hakan Ö, İrfan K, The relation between serum cytokeratin 18 and acute pancreatitis: Can it be a serological predictive marker? Turk J Gastroenterol 2012; 23 [6]: 759-763 doi: 10.4318 /tjg.2012.0257.

94. Demiray M, Ulukaya E, Arslan M et al. Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer Could be Predictable by Measuring a Novel Serum Apoptosis Product, Caspase Cleaved Cytokeratin 18: A Prospective Pilot Study. *Cancer Invest*, 2006; 24[7]:669-76.
95. Ulukaya E, Yilmaztepe A, Akgoz S, Linder S, Karadag M. The levels of caspasecleaved cytokeratin 18 are elevated in serum from patients with lung cancer and helpful to predict the survival. *Lung Cancer*, 2007; 56:399-404.
96. Langbein L, Rogers MA, Winter H et al. The catalog of human hair keratins I. Expression of the nine type I members in the hair follicle. *J Biol Chem*, 1999; 274: 19.874-84.
97. Miettinen E. Keratin immunohistochemistry: Update of applications and pitfalls. *Pathol Ann*, 1993; 28:113-43.
98. C. S. Ramaekers, A. Huysmans, G. Schaart, Tissue distribution of keratin 7 as monitored by a monoclonal antibody. *Exp Cell Res*, 1987; 170:235- 289.
99. R. Moll, T. Achtstaetter, 99-Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*, 1982; 31:11-24.
100. Coulombe PA, Omary MB. 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Curr Opin Cell Biol*, 2002; 14: 110-22.
101. Ishida-Yamamoto A, Takahashi H, Lizuka H. Lessons from disorders of Epidermal differentiation-associated keratins. *Histol Histopathol*, 2002; 17: 331-8.
102. Smith FJD. The molecular genetics of keratin disorders. *Am J Clin Dermatol*, 2003; 4: 347-364.
103. Quinlan RA, Schiller DL, Hatzfeld M, et al. Patterns of expression and organization of cytokeratin intermediate filaments. *Ann NY Acad Sci*, 1985; 455: 282-306.
104. Barak V., Goike H., Panaretakis W.K, Einarsson R., Clinical utility of cytokeratins as tumor markers. *Clin Biochem*, 2004; 37: 529-540.
105. G.Kramer, H.Erdal, HJ.Mertens, M.Nap, J.Maurmann, G.Steiner.et al. Differentiation between cell death modes using measurements of different soluble forms of extracellular cytokeratin 18, *Cancer Res*, 2004; 64: 1751-56.
106. Ku NO, Omary MB. Effect of mutation and phosphorylation of type I keratins on their caspase-mediated degradation. *J Biol Chem*, 2001; 276:26792-8.
107. Halme J, Hammond MG, Hulka JF, Raj S and Talbert LM [1984a] Increased activation of pelvic macrophages in infertile women with endometriosis. *Obstet Gynecol* 64,151-154.
108. Arumugam K and Lim JM [1997] Menstrual characteristics associated with endometriosis. *Br J Obstet Gynecol* 104,948-950.
109. Vinatier D, Orazi G, Cosson M and Dufour P [2001] Theories of endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 96,21-34.
110. 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.

111. Sharpe –Timms KL [2001]. Endometrial anomalies in women with endometriosis. *Ann NY Acad Sci* 943,131-147.
112. Noble LS, Takayama K, Zetium KM, Putman JM, Johns DA, Hinsshelwood MM, Agarwal VR, Zhao Y, Carr BR and Bulun SE [1997]. Prostaglandins E2 stimulates aromatase expression in endometriosis-derived stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 82,600-606.
113. 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.
114. Eischen A, Duclos B, Schmit-Goguel M, Rouyer N, Bergerat JP, Hummel M, Oskam R and Oberling F [1994] Human resident peritoneal macrophages: phenotype and histology. *Br J Haematol* 88,712-722.
115. Punnonen R, Klemi PJ, Nikkanen V. Postmenopausal endometriosis, *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 11:195,1980.
116. Harada T, Iwabe T and Terakawa N [2001] Role of cytokines in endometriosis. *Fertil Steril* 76,1-10.
117. McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS, Sharkey AM and Smith SA [1997] Immunocolonization of the apoptosis regulating proteins Bcl-2 and Bax in human endometrium and isolated peritoneal fluid macrophages in endometriosis. *Hum Reprod* 12,146-152.
118. Jones RK, Searle RF and Bulmer JN [1998] Apoptosis and bcl-2 expression in normal human endometrium, endometriosis and adenomyosis. *Hum Reprod* 13,3496-3502.
119. Meresman GF, Auge L, Baranao RI, Lombardi E, Tesone M and Sueldo C [2002] Oral contraceptives suppress cell proliferation and enhance apoptosis of eutopic endometrial tissue from patients with endometriosis. *Fertil Steril* 77,1141-1147.
120. Campbell IG and Thomas EJ. Endometriosis candidate genes. *Hum Reprod Update* 2001; 7: 15-20.
121. Arimoto T, Katagiri T, Oda K, Tsunoda T, Yasugi T, Osuga Y, Yoshicavva 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.
122. Açıkgöz S, Bingöl F, Aydın S: The effect of topical CCNU treatment on lipid peroxidation of glial tumours transplanted on rat brain. *Gen Pharmac.* 26 [2] : 437439,1995.
123. Halliwell B. Drug antioxidant effects. *Drugs* 1991; 42[4]: 569 - 605.
124. Abuja PM, Albertini R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clin Chim Acta.* 2001;306:1-17.
125. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition.* 2002;18:872-879.
126. Akkuş, İ. Serbest Radikaller ve Fizyoterapik Etkileri, [1995]. Mimoza Basım, Konya, 183.
127. Halliwell B, Gutteridge JM. *Free Radicals in Biology and Medicine*, third edition. Clarendon Pres, Oxford, 1999.

128. Poli G, Leonarduzzi G, Biasi F, Chiarotto E. Oxidative Stress and Cell Signalling. *Current Medicinal Chemistry*. 2004;11:1023-1042.
129. Kurutaş Belge E, İnanç Güler F, Kılınç M. Serbest Radikaller. *Arşiv*, 2004, 13:120-13.
130. Halliwell B, Gutteridge JMC. [1985]. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human disease. *Mol. Aspects. Med.* 8:89-193
131. Fuji T. [1991]. Site specific mechanisms of initiation by chelated iron and inhibition by alphatocopherol of lipid peroxide dependent lipid peroxidation in charged micelles. *Arch. Biochem. Biophys.* 28[1]:120-126.
132. Niki E.[1987]. Antioxidant in relation to lipid peroxidation. *Chem. Phy. Lipids.* 44: 227-253.
133. Placer CA, Cushman LL, Johnson BC. [1990]. Estimation of product of lipid peroxidation [Malondyaldehyde] in biochemical systems. *Anal. Biochem.* 16:259-264.
134. 146. Porter NA. [1984]. Chemistry of lipid peroxidation. *Meth. Enzymol.* 105: 273-283.
135. 147. Mark R, McCall, Balz F, Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Radic Biol And Med* 1999; 26: 1034-1053.
136. Ignarro, LJ., Buga, GM., Wood, KS., Byrns, RE., Chaudhuri, G.: Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci.* 84: 9265-9, USA, 1987.
137. Repine, JE., Bast, A., Lankhorst, I., and Oxidative Stress Study Group: Oxidative stress in COPD.. *Am J Respir Crit Care Med.* 156: 341-357, 1997.
138. Rio DD., Stewart, AJ., Pellegrini, N.: A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Met Cardiovasc Dis.* 15[4]:316-28.
139. Rifici V.A. Khachadrian A.K. The inhibition of low density lipoprotein oxidation by estradiol, *Metabolism* 1992;41:1110-1114.
140. Yıldız İ., Hikmet K., Figen G., Düzgün K., Faruk B., Indices of Oxidative Stress in Eutopic and Ectopic Endometrium of Women with Endometriosis. *Türk Klinik Biyokimya Derg* 2003; 1: [1-6].
141. Böger RH, Vallance P, Cooke JP. [2003] Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a key regulator of nitric oxide synthase. *Atherosclerosis Supplements* 4: 1–3.
142. Cooke J, Dzau V. [1997] Derangements of the nitric oxide synthase pathway, L-arginine, and cardiovascular disease. *Circulation* 96: 379–382.
143. Napoli C, Ignarro LJ. [2001] Nitric oxide and atherosclerosis. *Nitric Oxide* 5: 88–97.
144. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. [1992] Endogenous dimethylarginine as an inhibitor of nitric oxide synthesis. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 20[Suppl-12]:S60–62.
145. Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HF, Moncada S. [1990] Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br. J.Pharmacol.* 101:746–52.

146. Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K. [1989] Purification and properties of a new enzyme: NG, NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase from rat kidney. *J Biol Chem.*264:10205–10209.
147. Vallance P, Leiper J. Cardiovascular biology of the Asymmetric dimethylarginine: dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24:1023-30.
148. Clarke S. [1993] Protein methylation. *Curr Opin Cell Biol.* 5: 977–983.
149. Ghosh SK, Woon KP, Kim S. Purification and molecular identification of two protein methylases I from calf brain. Myelin basic protein and histon spesific enzymes. *J Biol Chem* 1988; 263:19024-33.
150. Tran CT, Leiper JM, Vallance P. The DDAH/ADMA/NOS pathway. *Atheroscler Suppl* 2003; 4:33-40.
151. Jacobi J, Tsao PS. Asymmetrical dimethylarginine in renal disease: limits of variation or variation of limits? *Am J Nephrol* 2008; 28:224-37.
152. Leiper J, Murray-Rust J, McDonald N, Vallance P. S-nitrosylation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates enzyme activity: further interactions between nitric oxide synthase and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:13527-32.
153. Sydow K, Münzel T. ADMA and oxidative stress. *Atheroscler Suppl* 2003; 4:41-51.
154. Zoccali C, Bode-Böger S, Mallamaci F, Benedetto F, Tripepi G, Malatino L, Cataliotti A, Bellanuova I, Fermo I, Frölich J, Böger R. Plasma concentration of Asymmetric dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. *Lancet.* 2001;358:2113-2117.
155. Böger RH, Ron ES. L-arginine improves vascular function by overcoming deleterious effects of ADMA, a novel cardiovascular risk factor. *Altern Med Rev.* 2005;10:14-23.
156. Krzyzanowska K, Mittermayer F, Shnawa N, Hofer M, Schnabler J, Etmüller Y, Kapiotis S, Wolzt M, Scherthaner G. Asymmetrical dimethylarginine is related to renal function, chronic inflammation and macroangiopathy in patients with Type 2 diabetes and albuminuria. *Diabet Med.* 2007;24:81-86.
157. Siroen MP, van der Sijp JR, Teerlink T, van Schaik C, Nijveldt RJ, van Leeuwen PA. The human liver clears both asymmetric and symmetric dimethyl arginine. *Hepatology* 2005; 41:559-65.
158. Fickling SA, Williams D, Vallance P, Nussey SS, Whitley GS. Plasma concentrations of endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in normal pregnancy and preeclampsia. *Lancet* 1993; 342:242-3.
159. Holden DP, Fickling SA, Whitley GS, Nussey SS. Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine, a natural inhibitor of nitric oxide synthase, in normal pregnancy and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 178:551-6.
160. Celik C, Cayci T, Ozdemir B, Akgul EO, Zincir S et al. [2011] Plasma asymmetric dimethylarginine (ADMA) concentrations in patients with first and multiple episode schizophrenia. *Psychiatry Res.* Aug 11.

161. Cayci T, Akgul EO, Gulcan Kurt Y, Ceyhan TS, Aydin I et al. [2011] The levels of nitric oxide and asymmetric dimethylarginine in the rat endometriosis model., *J Obstet Gynaecol Res.* [ISI], Apr 12, DOI: 10.1111/j.1447-0756. [2010].01482.x.
162. Jacob RA, Burr BJ. Oxidative damage and defence. *Am J Clin Nutr* 1996;63:985-90.
163. LW Jackson, EF Schisterman, R Dey-Rao, R Browne, D.Armstrong. Oxidative stress and endometriosis. *Human Reproduction.* Vol.20, No.7 pp. 2014–2020, 2005.
164. Mier-Cabrera J, Genera-Garcia M, De la Jara-Diaz J, Perichart-Perera O, Vadillo-Ortega F, Hernandez-Guerrero C. Effect of vitamins C and E supplementation on peripheral oxidative stress markers and pregnancy rate in women with endometriosis. *International Journal of Gynecology and Obstetrics* 2008; 100, 252-256.
165. Mier-Cabrera J, Aburto-Soto T, Burrola-Mendez S, Jimenez-Zamudio L, Tolentino MC, Casanueva E, Hernandez-Guerrero C. Women with endometriosis improved their peripheral antioxidant markers after the application of a high antioxidant diet. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2009; 7: 54 1-11.
166. Y.Z.Li, L.J. Wang, X. Li, S.L. Li, J.L. Wang, Z.H. Wu, L. Gong and X.D. Zhang. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms contribute to the risk of endometriosis: an updated systematic review and meta-analysis of 14 case-control studies, *Genetics and Molecular Research* 12 [2]: 1035-1044 [2013]; April 2, 2013.
167. L. C. Giudice, "Clinical Practice—Endometriosis," *The New England Journal of Medicine*, Vol. 362, No. 25, 2010, pp. 2389-2398.
168. Mihalyi A, Gevaert O, Kyama C, Simsa P, Pochet N, De Smet F, et al. Non-invasive diagnosis of endometriosis based on a combined analysis of six plasma biomarkers. *Human Reproduction* 2010;25[3]:654-64.
169. Speroff L, Fritz MA. *Clinical gynecologic endocrinology and infertility*: lippincott Williams & wilkins; 2005.
170. Novak E, Berek JS. *Berek & Novak's gynecology*: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
171. Pittaway DE, Fayeza JA. Serum CA-125 antigen levels increase during menses. *Am J Obstet Gynecol.* 1987;156:75–6.
172. Y.Q. Ruan, W.G. Liang, S.-H. Huang. Analysis of laparoscopy on endometriosis patients with high expression of CA125, *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*; 2015; 19: 1334-1337.
173. Somigliana E, Vignani P, Tirelli AS. Use of the concomitant serum dosage of CA125, CA 19-9 and L-6 to detect the presence of endometriosis. *Hum Reprod* 2004; 19 [8]: 1871-1876 .
174. Maryam K, Elaheh S, Mansoureh V, Maryam A, Yousef M, Narges S. A comparison between serum levels of interleukin-6 and CA125 in patients with endometriosis and normal women; *Med J Islam Repub Iran* 2015 [19 October]; Vol. 29:280.
175. Ana Luiza L. Rocha, Fernando M. Reis, Robert N. Taylor. *Angiogenesis and Endometriosis*, *Obstetrics and Gynecology International*; Volume 2013; Article ID 859619, 8 pages.

176. Leila R, Seddighe A, Abbas M, Armin Z, Alia GL, Alia F, Sara S, Jafar S, Study of ultrastructure and apoptosis in the endometrium of women with or without endometriosis, *Iran J Reprod Med* Vol. 11. No. 5. pp: 399-404, May 2013.
177. Büyükgebiz O, Caferler JS. Apoptoz. *Sendrom* 2001;13:102-7.
178. Eda D. [2009]. Endometriozis etyopatogenezinde apoptozis-kaspaz 3 ve MMP-2'nin değerlendirilmesi. Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kadın Doğum A.B.D, Uzmanlık tezi, Ankara.
179. Bilici A, Ustaalioglu BB, Ercan S, Orcun A, Seker M, Salepci T, Gumus M [2012] The prognostic significance of the increase in the serum M30 and M65 values after chemotherapy and relationship between these values and clinicopathological factors in patients with advanced gastric cancer. *Tumor Biology*; December 2012, Volume 33, Issue 6, pp 2201-2208.
180. Brandt D, Volkmann X, Anstatt M, Langer F, Manns MP, Schulze-Osthoff K, Bantel H [2010] Serum biomarkers of cell death for monitoring therapy response of gastrointestinal carcinomas. *Eur J Cancer* 46[8]:1464–1473. doi:10.1016/j.ejca.2010.01.037.
181. Meng XW, Lee SH, Kaufmann SH. Apoptosis In The Treatment Of Cancer: A Promise Kept? *Curr Opin Cell Biol* 2006;18: 668-76.
182. Hassan M, Morsi, Mathie P. G. Leers, Martin Radespiel-Tröger, Viveka Björklund, Hamdi El Kabarity, Marius Nap, and Wolfram Jager, Apoptosis, bcl-2 Expression, and Proliferation in Benign and Malignant Endometrial Epithelium: An Approach Using Multiparameter Flow Cytometry; *Gynecologic Oncology* 77, 11–17 [2000].
183. Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, Shaman A, Gupta S. The effects of oxidative stress on female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol.* 2012;49.
184. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J ve diğ. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 2006; 160:1-40.
185. Shanti A, Santanam N, Morales AJ, Parthasarathy S, Murphy AA. Autoantibodies to markers of oxidative stress are elevated in women with endometriosis. *Fertil Steril* 1999; 71: 1115-1118.
186. Do Amaral Vf, Bydlowski Sp, Peranovich Tc, Navarro Pa, Subbiah Mt, Ferriani Ra. Lipid peroxidation in the peritoneal fluid of infertile women with peritoneal endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005; 119: 72-75.
187. Andrade AZ1, Rodrigues JK, Dib LA, Romão GS, Ferriani RA, Jordão Junior AA, Navarro PA; Serum markers of oxidative stress in infertile women with endometriosis; *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2010 Jun;32[6]:279-85.
188. Fatma Ceyla E, Cihan Deniz K, Tuğba K, Birol V, Canan B; Etanercept tedavisinin deneysel endometriozisli sıçan modelinde serum malondialdehit düzeylerine etkisi; *Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi Eylül 2015, Cilt 1, Sayı 1, s. 26-29.*
189. A.Turgut, A.Özler, N.Y.Görük, S.Y Tunç, O.Evliyaoğlu, T. Gül; Copper, ceruloplasmin and oxidative stress in patients with advanced-stage endometriosis; *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*; 2013; 17: 1472-1478.
190. Rosselli M, Keller PJ, Dubey RK. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Hum Reprod Update.* 1998;4:3–24. [PubMed].

191. Hood JD, Meininger CJ, Ziche M, Granger HJ. VEGF upregulates eNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells. *Am J Physiol* 1998; 274 [3 Pt 2]: H1054–H1058.
192. Van der Zee R, Murohara T, Luo Z et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor augments nitric oxide release from quiescent rabbit and human vascular endothelium. *Circulation* 1997; 95: 1030–1037.
193. Maryam Kianpour, Mehdi Nematbakhsh, and Sayad Mehdi Ahmadi; Asymmetric dimethylarginine (ADMA), nitric oxide metabolite, and estradiol levels in serum and peritoneal fluid in women with endometriosis. *Iran J Nurs Midwifery Res.* 2015 Jul-Aug;20[4]:484-9. doi: 10.4103/1735-9066.160997.
194. Hasan Alaçam. [2008]. Preeklampside ADMA ve oksidan/antioksidan sistemin rolü, Hacettepe Üni. Tıp Fakültesi, Biyokimya AD, Uzmanlık Tezi, 56, Ankara.
195. Shoko Kinugasa, Koichi Shinohara, Akihiko Wakatsuki [2011]. Increased asymmetric dimethylarginine and enhanced inflammation are associated with impaired vascular reactivity in women with endometriosis, doi:10.1016/j.atherosclerosis;08;005.

8. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Ad-Soyad	Dilara ÜLGER
Doğum Yeri ve Tarihi	Sivas, 01.01.1989
Medeni Hali	Bekâr
Yabancı dil	İngilizce
e-posta:	dlr89@msn.com

Eğitim Bilgileri

Lise	Gazi Osman Paşa (YDA) Lisesi, TOKAT, 2007
Üniversite	Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, SİVAS, 2012
Yüksek Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Ad, SİVAS, 2016

İş Tecrübesi

Sivas Demir-Çelik İşletmeleri	Kalite-Kontrol Laboratuar Sorumlusu 2015-2016
-------------------------------	--

EK-1**KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU**

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Endometriozis'li hastalarda; Asimetrik Dimetiltarjinin, Malondialdehit ve M30 düzeylerinin araştırılması
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Cumhuriyet Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Cumhuriyet Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başhekimlik Girişi TR-58140 Merkez/Sivas
	TELEFON	0 346 258 00 25
	FAKS	0 346 258 00 24
	E-POSTA	cuetikkurul@gmail.com

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Sevtap Bakır / Dilara Ülger YL öğrencisi			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi			
	DESTEKLEYİCİ				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZI VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 4	<input type="checkbox"/>		
		Gözlemsel ilaç çalışması	<input type="checkbox"/>		
İlaç dışı klinik araştırma		<input checked="" type="checkbox"/>			
Diğer ise belirtiniz					
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Emin Yener Gültekin
İmza:

Not: Etik kurul başkanının her sayfada imzasının olması gerekmektedir.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Endometriozis'li hastalarda; Asimetrik Dimetilarjinin, Malondialdehit ve M30 düzeylerinin araştırılması
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili			
		ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama					
	SIGORTA	<input type="checkbox"/>					
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>					
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>					
	ILAN	<input type="checkbox"/>					
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>					
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>					
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>					
KARAR BELGELERİ	Karar No:2014-04/40	Tarih: 30.04.2014					
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekece, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerden gerekli izin alınarak gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.						
Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.							

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Emin Yener Gültekin

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişkisi		Katılım *		İmza
Prof. Dr. Emin Yener Gültekin	Öroloji	Cumhuriyet Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Kürşat Karadayı	Genel Cerrahi	Cumhuriyet Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Hülya Tokar	Periodontoloji	Cumhuriyet Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Ayşe Demirkazık Çançalar	Biyofizik	Cumhuriyet Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Aynur Engin	Enfeksiyon Hastalıkları	Cumhuriyet Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Özlem Kayım Yıldız	Noroloji	Cumhuriyet Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Fatih Kılıçlı	Endokrinoloji	Cumhuriyet Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

Etik Kurul Başkanının Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Emin Yener Gültekin
İmza:

Not: Etik kurul başkanının her sayfada imzasının olması gerekmektedir.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Endometriozis'li hastalarda; Asimetrik Dimetilarjinin, Malondialdehit ve M30 düzeylerinin araştırılması
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

Yrd. Doç. Dr. Ziyet Çınar	Biyostatistik	Cumhuriyet Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	İmza
Yrd. Doç. Dr. Galay Yıldırım	Tıp Tarihi ve Etik	Cumhuriyet Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Ahmet Altun	Tıbbi Farmakoloji	Cumhuriyet Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Uzm. Dr. Levent Sağlam	Aile Hekimi	Sivas Halk Sağlığı Müdürlüğü	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Uzm. Dr. Mutlu Doğan	Genel Cerrahi	Sivas Numune Hastanesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Ogr. Gör. Engin Daşlı	Avukat	Cumhuriyet Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Oğret. Şemsettin Ağtas,	Biyoloji Öğretmeni	Sivas Lisesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

*:Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Emin Yener Gültekin
İmza:

Not: Etik kurul başkanının her sayfada imzasının olması gerekmektedir.

EK-2

C. Ü. KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU BİLGİLENDİRİLMİŞ OLUR FORMU

Sayın ...

Bu katılacağınız çalışma bilimsel bir araştırma olup, araştırmanın adı 'Endometriozis'li (ağrılı adet görme, ağrılı cinsel birleşme ve kısırlığı seyreden şikâyetlerle birlikte, ultrasonografi ile yumurtalıkta yer alan kistlik kitlelerin teşhisi ile kesinlik gösteren kadın hastalığıdır) hastalarda Asimetrik Dimetilarjinin, Malondialdehit ve M30 (bir takım laboratuvar testleri) düzeylerinin araştırılması 'dır.

Bu araştırmanın amacı, Endometriozis tanısı almış olan hastaların, kan serumunda bazı laboratuvar analizleri yaparak, hastalığın seyri hakkında önemi olduğu düşünülen değişkenlerin araştırılıp hastalığın tedavisine katkıda bulunmaktır. Çalışmaya katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Kararınızdan önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Bu bilgileri okuyup anladıktan sonra araştırmaya katılmak isterseniz formu imzalayınız.

Bu araştırmada sizin sağ veya sol ön kolunuzdan kan örneği alınacak, alınan kanlar özel tüplerde -80°C de çalışma gününe kadar saklanacak ve bir takım biyokimyasal değişkenlerin analizi Biyokimya Laboratuvarımızda yapılacaktır. Bu araştırmada yer almanız için size endometriozis tanısı konduğu anda çalışmaya katılmak istemeniz ve 5-10 ml kan vermeniz yeterli olacaktır. Bu araştırma sizin gibi endometriozis tanısı konmuş 31 gönüllü bayandan ve çalışmanın güvenilirliğini karşılaştırmak için, 31 sağlıklı ve gönüllü, bayan kontrol grubundan oluşmaktadır. Kontrol grubuna alınan gönüllülerin de sadece 5-10 ml kan vermesi yeterli olup, kanlarında; hasta grubuyla aynı değişkenler analiz edilecek ve karşılaştırma yapılacaktır. Hasta ve kontrol grubu için beklenen riskler aynıdır. Çalışma 1 yıl sürecektir.

Bu araştırmada sizin için herhangi bir risk ve zarar söz konusu değildir. Bu araştırma esnasında size ilaç adı altında herhangi bir madde verilmeyecek veya herhangi bir cerrahi müdahalede bulunulmayacaktır. Sadece sizden tanı aldığınız tarihten bugüne kadar olan otomasyon sistemi üzerindeki bilgilerinizi (yaş, cinsiyet gibi sosyodemografik bilgileriniz ve kan testleri sonuçlarınız) incelemek ve az miktarda kan almak için izin istemekteyiz. Bu araştırma ile ilgili olarak sizden beklenen istenen tahlilleri yaptırmak, araştırmacının sorularına uygun ve doğru cevap vermek ve sonuçlarını zamanında araştırmacıya ulaştırmaktır.

Eğer araştırmaya katılmayı kabul ederseniz Yrd.Doç.Dr. Savaş KARAKUŞ veya onun görevlendireceği bir hekim tarafından muayene edileceksiniz ve bulgular kaydedilecektir. Muayene sonucunda doktorunuz uygun görürse bu çalışmaya alınacaksınız.

Kan alınması sırasında oluşabilecek riskler:

- 1-) İğne batmasına bağlı olarak az bir acı duyabilirsiniz. Az bir ihtimal de olsa iğne batması sonrasında kanamanın uzaması veya enfeksiyon riski vardır.
- 2.) Nadir de olsa kan alınan bölgede enfeksiyon ve sinir hasarı sebebiyle kolda ağrı, uyuşma görülebilir. Bunun dışında 5-10 ml kan kaybının bilinen bir yan etkisi yoktur

Araştırma sırasında sizi ilgilendirebilecek herhangi bir gelişme olduğunda, bu durum size veya yasal temsilcinize derhal bildirilecektir. Araştırma hakkında ek bilgiler almak için ya da çalışma ile ilgili herhangi bir sorun, istenmeyen etki ya da diğer rahatsızlıklarınız için 05542533347 numaralı telefondan proje yürütücüsü Prof.Dr. Sevtap Bakır'a başvurabilirsiniz.

Ayrıca bu araştırma kapsamındaki bütün muayene, tetkik, testler ve tıbbi bakım hizmetleri için sizden veya bağılı bulunduğunuz sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret istenmeyecektir. İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununuzun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahale sizden ücret talep edilmeden ve sosyal güvenceniz kullanılmadan sağlanacaktır desteklenmektedir.

Bu araştırmada yer almak tamamen sizin isteğinize bağılıdır. Araştırmada yer almayı reddedebilirsiniz ya da herhangi bir aşamada araştırmadan ayrılabilirsiniz. Bu durum herhangi bir cezaya ya da sizin yararlarınıza engel duruma yol açmayacaktır. Araştırmacı bilginiz dahilinde veya isteğiniz dışında, uygulanan tedavi şemasının gereklerini yerine getirmemeniz, çalışma programını aksatmanız veya tedavinin etkinliğini artırmak vb. nedenlerle sizi araştırmadan çıkarabilir. Araştırmanın sonuçları bilimsel amaçla kullanılacaktır, çalışmadan çekilmeniz ya da araştırmacı tarafından çıkarılmanız durumunda, sizle ilgili tıbbi veriler de gerekirse bilimsel amaçla kullanılabilir.

Size ait tüm tıbbi ve kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır ve araştırma yayınlansa bile kimlik bilgileriniz verilmeyecektir, ancak araştırmanın izleyicileri, yoklama yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar gerektiğinde tıbbi bilgilerinize ulaşabilir. Siz de istediğinizde kendinize ait tıbbi bilgilere ulaşabilirsiniz.

Çalışmaya Katılma Onayı:

Yukarıda yer alan ve araştırmaya başlanmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri okudum ve sözlü olarak dinledim. Aklıma gelen tüm soruları araştırmacıya sordum, yazılı ve sözlü olarak bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Çalışmaya katılmayı isteyip istemediğime karar vermem için bana yeterli zaman tanındı. Bu koşullar altında, bana ait tıbbi bilgilerin gözden geçirilmesi, transfer edilmesi ve işlenmesi konusunda araştırma yürütücüsüne yetki veriyor ve söz konusu araştırmaya ilişkin bana yapılan katılım davetini hiçbir zorlama ve baskı olmaksızın gönüllü olarak kabul ediyorum. Bu formun imzalı bir kopyası bana verilecektir.

Gönüllünün,

Adı-Soyadı:

Adresi:

Tel.-Faks:

Tarih ve İmza:

Açıklamaları yapan araştırmacının,

Adı-Soyadı:

Görevi:

Adresi:

Tel.-Faks:

Tarih ve İmza:

Olur alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin/görüşme tanığının,

Adı-Soyadı:

Görevi:

Adresi:

Tel.-Faks:

Tarih ve İmza: