



**DENEYSEL ENDOMETRİOZİS MODELİNE D3 VİTAMİNİ ETKİSİNİN
GNRH ANALOĞU BUSERELİN ASETAT İLE KARŞILAŞTIRILMALI
OLARAK İNCELENMESİ**

Ayşe KÖYLÜ

**DOKTORA TEZİ
HİSTOLOĞİ VE EMBRİYOLOĞİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Mart 2021

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Ayşe KÖYLÜ

19/03/2021

DENEYSEL ENDOMETRİOZİS MODELİNE D3 VİTAMİNİ ETKİSİNİN GNRH
ANALOĞU BUSERELİN ASETAT İLE KARŞILAŞTIRILMALI OLARAK
İNCELENMESİ

Doktora Tezi

Ayşe KÖYLÜ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Mart 2021

ÖZET

Endometriozis, endometriyal dokunun uterus dışı yerleşimi sonucunda gelişen ve kronik inflamasyonla seyreden bir durumdur. Buserelin asetat klinik uygulamalarda endometriozis tedavisinde kullanılan bir GnRH analogudur. Bu çalışmada, Buserelin asetat ile anjiyogenezisi baskıladığı ve apoptozisi uyardığı bilinen D vitamininin endometriozis üzerine etkileri karşılaştırıldı. Bunun için 10 haftalık Sprague Dawley türü 28 adet dişi sıçanda cerrahi endometriozis oluşturuldu. İlk operasyondan 28 gün sonra sıçanların abdomenleri açılarak peritoneal bölgede yer alan endometriyotik alanların boyutları ölçüldü, adezyon skorları hesaplandı ve sonra sıçanlar rastgele 4 gruba ayrıldı. Birinci gruptaki sıçanlara 28 gün boyunca intramüsküler NaCl solüsyonu uygulandı. İkinci grup sıçanlarına dimetil sülfoksit içerisinde çözündürülen D3 vitamini 28 gün boyunca intramüsküler yoldan uygulanırken, üçüncü gruptaki hayvanlara ise 28 gün boyunca sadece intramüsküler dimetil sülfoksit solüsyonu verildi. Dördüncü gruptaki hayvanlara distile su içerisinde çözündürülmüş buserelin asetat 3 hafta boyunca haftada 1 kez subkutan yoldan uygulandı. Deneyleerin tamamlanması sonrasında sakrifiye edilen sıçanların endometriyotik implantları, boyutları ve adezyon skorları değerlendirildikten sonra karın duvarıyla birlikte eksize edilerek çıkarıldı. Histomorfolojik değerlendirmeler için doku kesitleri hematoksilin eozin ve Masson trikrom ile boyanarak incelendi. Bcl-2 ve Bax antikorları ve TUNEL yöntemi kullanılarak dokudaki proapoptotik ve antiapoptotik süreçler immünohistokimyasal olarak değerlendirildi. Ayrıca, sıçanların peritoneal sıvı örneklerinde enflamasyon belirteçlerinden TNF- α ve anjiyogenezis sürecini değerlendirmeye yönelik VEGF düzeyleri ölçüldü. Veriler birlikte değerlendirildiğinde, D vitamini grubuna ait bulguların buserelin asetat grubuna yakın sonuçlar gösterdiği tespit edildi. Sonuç olarak, D vitamini fibrotik alanların gerilemesi ve apoptotik sürecin uyarılmasıyla endometriyal implant alanlarının gerilemesine aracılık etmiş olabilir.

Bilim Kodu : 1033
Anahtar Kelimeler : Apoptozis, buserelin asetat, D3 vitamini, endometriozis
Sayfa Adedi : 105
Danışman : Prof. Dr. Suna ÖMEROĞLU

A COMPARATIVE INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF VITAMIN D3 AND
BUSERELIN ACETATE ON EXPERIMENTALLY INDUCED ENDOMETRIOSIS

Ph. D. Thesis

Ayşe KÖYLÜ

GAZI UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

March 2021

ABSTRACT

Endometriosis is a condition that develops as a result of extrauterine presence of endometrial tissue causing chronic inflammation. Buserelin acetate is a GnRH analogue used in the treatment of endometriosis in clinical practice. In this study we compared the effects of buserelin acetate and vitamin D, which is known to suppress angiogenesis and stimulate apoptosis. For this purpose, endometriosis was induced surgically in 10 weeks old, 28 female Sprague Dawley rats. 28 days after the first surgery, abdomen of the rats were opened and size of the endometriotic implants in the peritoneum were measured and adhesion scores were calculated. Then the rats were randomly assigned into 4 groups. Rats in the first group were administered intramuscular NaCl solution for 28 days. Vitamin D3 dissolved in dimethyl sulfoxide was administered intramuscularly to the rats in second group for 28 days, whereas the animals in the third group were given only intramuscular solution of dimethyl sulfoxide for 28 days. And in the fourth group, the animals were subcutaneously administered buserelin acetate dissolved in distilled water once a week for 3 weeks. At the end of the experiments, the endometriotic implants of the sacrificed rats were excised with surrounding abdominal wall, after their size and adhesion scores were evaluated. For histomorphological evaluations, tissue sections were stained with hematoxylin eosin and Masson trichrome techniques. Proapoptotic and antiapoptotic processes in the tissue sections were evaluated immunohistochemically using Bcl-2 and Bax antibodies and TUNEL method. In addition, levels of TNF- α as inflammation marker and levels of VEGF to evaluate the angiogenesis process, were measured in peritoneal fluid samples of rats. When evaluated together findings and results in vitamin D treated group were similar to those in the buserelin acetate treated group. Therefore, vitamin D may have a role in improvement of endometrial implants by means of regression in fibrotic areas and stimulation of the apoptotic process.

Science Code : 1033
Key Words : Apoptosis, buserelin acetate, endometriosis, vitamin D3
Page Number : 105
Supervisor : Prof. Dr. Suna ÖMEROĞLU

TEŞEKKÜR

Bilimsel yönden gelişmemde emeği olan, desteğini esirgemeyen, hoşgörü ve sabrı ile pandemi gibi zor bir dönemde bana yardımcı olan danışmanım, Anabilim Dalı Başkanımız sayın Prof. Dr. Suna ÖMEROĞLU hocama; doktora eğitimim boyunca bilimsel birikimleri için sayın Prof. Dr. Çiğdem ELMAS'a, sayın Prof. Dr. Gülnur TAKE KAPLANOĞLU'na, ve sayın Prof. Dr. Onur KARABACAK'a; projedeki önemli katkılarından dolayı sayın Prof. Dr. Tuncay Veysel PEKER'e, sayın Doç. Dr. Mürşide Ayşe DEMİREL'e, sayın Dr. Öğr. Üyesi Zeynep YIĞMAN'a, ve Arş. Gör. Dr. Saadet Özen AKARCA DİZAKAR'a,

Doktora süreci boyunca karşılaştığımız zorlukları birlikte aştığımız ve eğitim sürecini birlikte geçirdiğimiz başta sevgili hocam güzel insan Prof. Dr. İnci KAHYAOĞLU'na ve tüm arkadaşlarıma,

Hayatımın her aşamasında yanımda olan ve bana güç veren, her şeyden çok değerli olan aileme; babam Prof. Dr. Mustafa KÖYLÜ'ye, annem Pakize KÖYLÜ'ye, kardeşlerim Furkan KÖYLÜ'ye ve Emre KÖYLÜ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu proje Gazi Üniversitesi, “Bilimsel Araştırma Projeleri” (Proje kodu: 01/2019-53) tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xi
RESİMLERİN LİSTESİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Uterus Embriyolojisi	5
2.2. Uterus Anatomisi	6
2.3. Uterus Histolojisi	7
2.4. Endometriozis	11
2.4.1. Retrograd menstruasyon teorisi	12
2.4.2. Metaplazi teorisi	14
2.4.3. Hormonlar.....	15
2.4.4. Oksidatif stres ve inflamasyon	19
2.4.5. Apoptozis.....	20
2.4.6. Genetik	26
2.5. D Vitamini.....	28
2.5.1. D vitamini ve endometriozis	29
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	31
3.1. Deneysel Endometriozis Modeli	31
3.2. Makroskobik Analizler.....	33

Sayfa

3.2.1. Endometriyotik volümlerin hesaplanması	33
3.2.2. Adezyon skorlarının hesaplanması	34
3.3. Grupların Dağılımı ve Özellikleri	35
3.4. Işık Mikroskopi Analizleri	37
3.4.1. Hematoksilen eozin boyama	37
3.4.2. Masson Trichrome boyama	38
3.4.3. TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) yöntemi	40
3.4.4. İmmünohistokimya	42
3.5. ELISA	44
3.6. Üç Boyutlu Modelleme	46
3.7. İstatistiksel Analizler	47
4. BULGULAR	49
4.1. Makroskobik Bulgular	49
4.1.1. Endometriyal implant volümleri	49
4.1.2. Adezyon skorları	50
4.2. Histolojik Bulgular	51
4.2.1. Endometriyal bez ve stromal yapı	51
4.2.2. Kollagen lif yoğunluğu	52
4.2.3. Gruplar arası apoptotik hücre sayımları	53
4.3. İmmünohistokimyasal Bulgular	55
4.3.1. Bcl-2 ve Bax immün reaktiviteleri	55
4.4. ELISA	55
4.4.1. Peritoneal VEGF bulguları	55
4.4.2. Peritoneal TNF- α bulguları	56
4.5. Üç Boyutlu Modelleme Bulguları	58

	Sayfa
5. TARTIŞMA	81
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	89
KAYNAKLAR	91
EKLER.....	101
EK-1. Etik Kurul Onayı	102
Ek-2. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası	104
ÖZGEÇMİŞ	105



ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Endometriozis patogenezinde rol alan mekanizmalar	11
Çizelge 3.1. Blauer (1988)'e göre karın içi adezyon alanlarının varlığı ve puanlaması.....	34
Çizelge 3.2. Otomatik doku takibi cihazının basamakları ve süreleri	36
Çizelge 3.3. Hematoksilen eozin boyama prosedürü.....	38
Çizelge 4.1. Gruplara ait adezyon skorların ortalama \pm SEM değerleri	51
Çizelge 4.2. Gruplara ait peritoneal VEGF değerlerinin ortalama \pm SEM değerleri	56
Çizelge 4.3. Gruplara ait peritoneal TNF- α değerlerinin ortalama \pm SEM değerleri	57

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Uterusun şematik çizimi.	7
Şekil 2.2. İntrinsik yolak. Hücresel stres ile aktive olan bir yolak tasvir edildi.	23
Şekil 2.3. Ekstrinsik yolak. Ölüm sinyallerinin hücre membranındaki ölüm reseptörlerini aktive etmesi ile başlayan bir süreç tasvir edildi.	24
Şekil 2.4. 1,25-dihidroksivitamin D3'ün (1,25 (OH)2D3) etkileri.....	29
Şekil 3.1. Deneysel sürecin özeti	36
Şekil 4.1. Endometriyal implant volümlerin normallik testi sonuçları	49
Şekil 4.2. Endometriyal implant volümlerin ortalama \pm SEM değerleri	50
Şekil 4.3. Kollagen lif yoğunluklarının normallik testi sonuçları.....	52
Şekil 4.4. Kollagen lif yoğunluklarının ortalama \pm SEM değerleri	53
Şekil 4.5. TUNEL pozitif boyanan apoptotik hücre sayımların normallik testi sonuçları ..	54
Şekil 4.6. TUNEL pozitif boyanan apoptotik hücre sayıların ortalama \pm SEM değerleri...	54
Şekil 4.7. Peritoneal VEGF değerlerinin ortalama \pm SEM değerleri.....	56
Şekil 4.8. Peritoneal TNF- α değerlerinin ortalama \pm SEM değerleri	58

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. Peritoneal kavitede kornu uterinin açığa çıkarılması.....	32
Resim 3.2. Peritonun vaskülarizasyonu yüksek olan bölgesinin açığa çıkarılması.....	33
Resim 3.3. Bir endometriyal implant ile endometriozis modeli örneği.....	34
Resim 3.4. Mikrometre aracı ile endometriyal implantın boyutlarının ölçümü	34
Resim 3.5. Karın içi adezyon alanlarının görüntülenmesi.....	35
Resim 4.1. Endometriozis grubuna ait II. aşamadaki endometriyal implant sonuçlarının farklı iki sıçandaki makroskobik görüntüleri.....	59
Resim 4.2. DMSO grubuna ait aynı sıçanın II. aşama ile III. aşamadaki endometriyotik implant sonuçlarının makroskobik görüntüleri.....	59
Resim 4.3. D vitamini grubuna ait aynı sıçanın II. aşama ile III. aşamadaki endometriyotik implant sonuçlarının makroskobik görüntüleri.....	60
Resim 4.4. Buserelin asetat grubuna ait aynı sıçanın II. aşama ile III. aşamadaki endometriyotik implant sonuçlarının makroskobik görüntüleri	60
Resim 4.5. DMSO grubuna ait 6, 5 ve 1. sıçanlara ait III. aşamalarındaki endometriyotik implantların makroskobik görüntüleri	61
Resim 4.5. D vitamini grubuna ait 7, 6 ve 2. sıçanlara ait III. aşamalarındaki endometriyotik implantların makroskobik görüntüleri.....	61
Resim 4.7. Buserelin asetat ait 7, 2 ve 1. sıçanlara ait III. aşamalarındaki endometriyotik implantların makroskobik görüntüleri	61
Resim 4.8. Sıçan uterusuna ait bir genel görüntü	62
Resim 4.9. Endometriozis grubuna ait endometriyal implant dokusunun H&E ile boyanmış histolojik görünümü	63
Resim 4.10. Endometriozis grubuna ait endometriyal implant dokusunun H&E ile boyanmış histolojik görünümü.....	63
Resim 4.11. Endometriozis grubuna ait endometriyal implant dokusunun H&E ile boyanmış histolojik görünümü.....	64
Resim 4.12. Endometriozis grubuna ait endometriyal implant dokusunun H&E ile boyanmış histolojik görünümü.....	64

Resim	Sayfa
Resim 4.13. Endometriozis grubuna ait endometriyal implant dokusunun H&E ile boyanmış histolojik görünümü.....	65
Resim 4.14. Endometriozis grubuna ait endometriyal implant dokusunun H&E ile boyanmış histolojik görünümü.....	65
Resim 4.15. Endometriozis grubuna ait endometriyal implant dokusunun H&E ile boyanmış histolojik görünümü.....	66
Resim 4.16. DMSO grubuna ait endometriyal implant dokusunun H&E ile boyanmış histolojik görünümü	66
Resim 4.17. DMSO grubuna ait endometriyal implant dokusunun H&E ile boyanmış histolojik görünümü	67
Resim 4.18. D vitamini grubuna grubuna ait endometriyal implant dokusunun H&E ile boyanmış histolojik görünümü.....	67
Resim 4.19. D vitamini grubuna grubuna ait endometriyal implant dokusunun H&E ile boyanmış histolojik görünümü.....	68
Resim 4.20. Buserelin asetat grubuna grubuna ait endometriyal implant dokusunun H&E ile boyanmış histolojik görünümü.....	68
Resim 4.21. Buserelin asetat grubuna grubuna ait endometriyal implant dokusunun H&E ile boyanmış histolojik görünümü.....	69
Resim 4.22. Deneysel endometriozis oluşturulan grupta, endometriyal implant dokusunun Masson Trichrome ile boyanmış histolojik görünümü	69
Resim 4.23. Deneysel endometriozis oluşturulan grupta, endometriyal implant dokusunun Masson Trichrome ile boyanmış histolojik görünümü	70
Resim 4.24. DMSO grubuna ait endometriyal implant dokusunun Masson Trichrome ile boyanmış histolojik görünümü.....	70
Resim 4.25. D vitamini grubuna ait endometriyal implant dokusunun Masson Trichrome ile boyanmış histolojik görünümü.....	71
Resim 4.26. Buserelin asetat grubuna ait endometriyal implant dokusunun Masson Trichrome ile boyanmış histolojik görünümü.....	71
Resim 4.27. Endometriozis grubuna ait endometriyal implant dokusunun, TUNEL metodu ile boyanmış histolojik görünümü.....	72
Resim 4.28. DMSO grubuna ait endometriyal implant dokusunun, TUNEL metodu ile boyanmış histolojik görünümü.....	72
Resim 4.29. D vitamini grubuna ait endometriyal implant dokusunun, TUNEL metodu ile boyanmış histolojik görünümü.....	73

Resim	Sayfa
Resim 4.30. D vitamini grubuna ait endometriyal implant dokusunun, TUNEL metodu ile boyanmış histolojik görünümü.....	73
Resim 4.31. Buserelin asetat grubuna ait endometriyal implant dokusunun, TUNEL metodu ile boyanmış histolojik görünümü.....	74
Resim 4.32. Buserelin asetat grubuna ait endometriyal implant dokusunun, TUNEL metodu ile boyanmış histolojik görünümü.....	74
Resim 4.33. Endometriozis grubuna ait endometriyal implant dokusunun, Bcl-2 ve Bax ile immünreaktivitesi.....	75
Resim 4.34. DMSO grubuna ait endometriyal implant dokusunun, Bcl-2 ve Bax ile immünreaktivitesi.....	76
Resim 4.35. D vitamini grubuna ait endometriyal implant dokusunun, Bcl-2 ve Bax ile immünreaktivitesi.....	77
Resim 4.36. Buserelin asetat grubuna ait endometriyal implant dokusunun, Bcl-2 ve Bax ile immünreaktivitesi.....	78
Resim 4.37. Endometriyal implant dokusuna ait bulgularının üç boyutlu görüntüsü	79

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılan bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
%	Yüzde
®	Registered sembolü
°C	Santigrat derece
μ	Mikro
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μm	Mikrometre
cm	Santimetre
g	Gram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
nm	Nanometre
pH	Power of hydrogen
ip	İntraperitoneal
a.	Arter
v.	Ven
α	Alfa
β	Beta
π	Pi

Kısaltmalar Açıklama

ANOVA	Analysis of variance
APAF-1	Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1
BAX	Bcl-2-ilişkili X protein
BCL-2	B-cell lenfoma 2
BID	BH3-only protein
BUSE	Buserelin asetat
CAS	Kaspaz

Kısaltmalar	Açıklama
COC	Combined oral contraception
CYP19A1	Cytochrome P450 Fam.19 SubA Member 1
DAB	Diaminobenzidine
DIABLO	Düşük PI'lı direkt IAP-bağlayıcı protein
DISC	Ölüm-uyarımlı sinyal kompleks
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DVİT	D vitamini
E1	Östron
E2	Östrodiol
E2S	Östradiol sülfat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ENDO	Endometriozis
ERα	Estrogen receptor alpha
ERβ	Estrogen receptor beta
H&E	Hematoksilen ve eozin
HRP	Horseradish peroxidase
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
MCP	Monosit kemoatraktan protein
MDA	Malondialdehit
OH\cdot	Hidroksil
PBS	Phosphate buffered saline
ROS	Reactive oxygen species
SEM	Standard error of the mean
SERM	Selective estrogen receptor modulators
TBİD	Tip 2 hücrelerdeki BH3-only protein çeşidi
TNF	Tümör nekroz faktörü
UV	Ultraviyole
VDR	Vitamin D reseptörü
VEGF	Vasküler endotelial büyüme faktörü
X	Objektif büyütme

1. GİRİŞ

Endometriozis, hormonal bakımdan aktif olan fonksiyonel endometriyal dokunun uterus dışında bulunması olarak tanımlanır. Çoğunlukla ovaryum ile uterusun serozal yüzeyine yerleşen bu fonksiyonel endometriyal doku parçaları, peritoneal yüzeye sahip abdomende, pelvik ve abdominal organların yüzeyinde de görülebilir. Bazı olgularda endometriozisin abdomen ve pelvisten daha uzak bölgelerde örneğin akciğer ve sinir sisteminde de ortaya çıktığı bilinmektedir [1].

Dünyada yaklaşık 200 milyon kadını etkilediği bilinen bu hastalık üreme çağına ulaşmış her 10 kadından 1'inde görülmektedir. Riski ise her geçen yıl, kadındaki menstruasyon döngüsünün sayısı ile orantılı olarak artmaktadır. Endometriozisin görülme sıklığından ziyade prevalansını tartışmak daha önemlidir; nedeni ise tanı konulmadan kişi yıllarca bu şekilde hayatını devam ettirir. Hastalığın altında yatan sebepler menarştan önce oluşup, yıllar içerisinde gelişmektedir [2].

Endometriozisin orijini hakkında birçok hipotez ortaya atılmıştır. Sampson'a göre endometriozis, menstrual endometriyuma ait parçaların uterin tüplerden geriye doğru ilerleyişi sonucunda peritoneal yüzeye implante olması ve orada varlığını sürdürmesi sonucunda meydana gelir. Bu mekanizma primat modellerde ve doğal olarak insanda tanımlanmış ve sadece menstrual döngüye sahip canlılarda gerçekleştiği kabul edilmiştir. Coelomic-metaplazi hipotezine göre endometriozis, peritoneal kavitede mezotelyal dokuların farklılaşarak endometriyum-benzeri dokuya dönüşmesi ile endometriyal lezyonların oluştuğu yönündedir. Üçüncü bir hipoteze göre endometriozis, endometriyal kavitede bulunan menstrual dokunun lenfatik veya kan dolaşımı ile venlerden vücudun başka bölgelerine dağılması sonucunda gerçekleşir. Sampson'un implantasyon hipotezi birçok endometriyotik lezyon oluşumlarının açıklanmasında yeterli görülmeyle beraber endometriozisin neden sadece bazı kadınlarda olduğunu açıklayamamaktadır. Çünkü üreme çağına gelen neredeyse her kadında peritoneal kaviteye doğru yani geriye doğru bir menstrual akım gerçekleşmektedir. Buna rağmen endometriozisin popülasyondaki görülme sıklığı %5 ile %10 arasında değişir [3].

Retrograd menstruasyon ve endometriyotik implantların varlığı sonucu ortaya çıkan immün yanıtlar endometriozisin araştırılmasında birer kilit noktadır. Endometriozisin patogenezinde lokal pelvik inflamatuvar süreç ve peritoneal kavitede bulunan immün sistem

ile ilişkili hücrelerin birlikte rol aldığı varsayılmaktadır. İmmün sistem kaynaklı bazı yetersizlikler endometriyal hücrelerin apoptozis ve fagositoza karşı direnç kazanmasına neden olur. İmmünolojik faktörlerin endometriozisteki payı büyüktür, bu nedenle tedavide immün sistemin terapötik manipülasyonundan faydalanılabilir. İmmün düzenleyici ajanlar arasından interferon- α 2b, interlökin-12 ve tümör nekroz faktör- α inhibitörleri endometriozis kaynaklı ağrı ve infertiliteye çare olabilecek ajanlar arasında gösterilmektedir. Ancak, bu ajanların halen klinik düzeyde kullanılabilirliği kanıtlanmamıştır [2].

Endometrioziste tedavi yöntemleri medikal ve cerrahi olarak sınıflandırılabilir. Uygulanacak prosedür(ler), hastanın semptomlarına ve tedavi hedeflerine göre belirlenmektedir. Örneğin, endometriozis ile ilişkili ağrının tedavisinde çoğu zaman fertilité çıkarları ile uyumsuzluklar ortaya çıkabilir bu nedenle hastanın tedavi önceliklerinin belirlenmesi gerekir. Tedavi yaklaşımları hem mevcut lezyonların giderilmesini hem de nüksün önlenmesini içermekte; mevcut stratejiler menstrüasyonun azaltılmasına veya ortadan kaldırılmasına dayanmaktadır. Kombine oral kontraseptifler, gonadotropin salgılayan hormon (GnRH) agonistleri, uzun etkili progestinler, Danazol ve aromataz inhibitörleri endometriozis ile ilişkili ağrı yönetimi için en yaygın kullanılan tıbbi tedaviler arasındadır [4].

İnsanlarda derideki aktif olmayan D vitamini formu (kolekalsiferol) derinin ultraviyole B'ye maruz kalmasından sonra önce karaciğerde 25-hidroksilasyona (25-hidroksikolekalsiferol) ardından böbreklerde ikinci bir hidroksilasyona uğrayarak aktif forma (1,25-dihidroksi kolekalsiferol; kalsitriol) dönüştürülür. D vitamini sentezinde görevli enzimler ve D vitamini reseptörleri immün sistem ile ilişkili olan antijen-sunan hücrelerde, T hücrelerinde, B hücrelerinde ve monositlerde bulunur [5]. D vitamini vücutta kalsiyum-fosfat dengesinin sürdürülmesinde ve ayrıca güçlü bir immün düzenleyicisi olarak görev yaptığı bilinmektedir. D vitamini, T hücre ve makrofaj kaynaklı sitokin üretimini azaltarak anti-inflamatuar bir etki oluşturur [6]. D vitamininin apoptotik süreç ile ilişkili olan pro-apoptotik (Bax) proteinleri uyardığı ve anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-2XL) proteinleri ise baskıladığı bilinmektedir [7]. Hem sağlıklı hem de endometriozisli kadınlarda D vitamini reseptörleri ile D vitamininin sentezlenmesinde görevli enzimlerin endometriyum ve ovaryumlarda bulunması D vitamininin bu bölgede otokrin/parakrin etkilerinin olduğunu göstermektedir [8].

D vitamininin önemi günümüzde popüleritesini sürdürmektedir. Kovid-19 teşhisi ile hastanede tedavi gören 235 hasta üzerinde yapılan klinik bir araştırma, serum 25-hidroksivitamin D seviyeleri ile immün reaktiviteleri arasındaki bağlantıyı ortaya çıkarmıştır. Buna göre,

yüksek serum 25-hidroksivitamin seviyelerine sahip hastaların virüs enfeksiyon kaynaklı sitokin fırtınası riskinden daha fazla korunmaktaydı [9]. Bir başka araştırma, Kovid-19 tedavisi gören hastaların D vitamininin immün düzenleyici özelliğinden ötürü, birlikte hazırlanacak olan fosfat ve magnezyum karışımı bir kokteyl ile tedavi sürecinin daha etkili olabileceğini iddia etmektedir [10]. Kişilerde D vitamini eksiliğinde, enfeksiyonlara ve otoimmün hastalıklara olan yatkınlığın artacağını iddia eden çalışmalar literatürde mevcuttur [11].

Amacımız, endometriyal hücrelerde apoptotik faaliyeti uyardığı bilinen ve günümüzde endometriozisin tedavisinde kullanılan GnRH analogu buserelin asetata [12] alternatif olarak 1,25-dihidroksi vitamin D₃'ün etkilerini histopatolojik ve immünohistokimyasal verilerin analizleriyle karşılaştırmaktır. Hipotezimiz, anjiyogenezisi baskıladığı ve apoptozisi uyardığı [7] bilinen 1,25(OH)₂D₃'ün endometriozis modeline terapötik bir etkinliği ve buserelin asetata alternatif olacağı yönündedir.



2. GENEL BİLGİLER

Kadın genital organları iç genital (*genitalia feminina interna*) ve dış genital (*genitalia feminina externa*) olmak üzere iki gruba ayrılır. İç genital organlar ovaryum, tuba uterina, uterus ve vajina; dış genital organlar mons pubis, labium majus pudendi, labium minus pudendi, klitoris, vestibulum vaginae, bulbus vestibuli, glandula vestibularis major ve glandulae vestibularis minores olarak adlandırılır [13].

2.1. Uterus Embriyolojisi

Embriyonik dönem, gelişimin 3-8. haftaları arasında 3 germ yaprağın, ektoderm, mezoderm ve endodermin farklanması sonucu doku ve organların geliştiği döneme denir. Ektodermal germ tabakasından gelişen yapılara merkezi ve periferik sinir sistemi elemanları, epidermis, duyu organların epiteli gibi yapılar örnek olarak verilebilir. Mezodermal germ tabakasından vasküler sistem ve ürogenital sistem organları örneğin böbrekler ve gonadlar gelişir. Endodermal germ tabakasından gelişen yapılara ise gastrointestinal sistem, solunum sistemi ve mesane epiteli örnek olarak verilebilir [14].

Embriyonun cinsiyeti her ne kadar genetik açıdan fertilizasyon esnasında belli olsa da gonadların erkek veya dişiye ait morfolojik karakterleri gelişimin 7. haftasına kadar belirgin değildir. Genital veya gonadal sırt olarak ortaya çıkan gonadların içinde 6. haftaya kadar germ hücreleri bulunmaz. Gonadal gelişimin ilk safhaları 5. haftada mezotelyal bir kalınlaşma olan primitif böbrek gelişimi ile ortaya çıkar. Genital veya gonadal kabartı, epitel ve altındaki mezenkim tabakasının çoğalması sonucunda oluşur. Parmak şeklinde bir yapıya bürünen gonadal kordonlar mezenkim içine doğru büyürler. Farklanmamış gonad, yapısal olarak dışta bir korteks, içte ise medulladan oluşmaktadır. Embriyonun genetiğinde XX kromozomu varsa farklanmamış gonadtaki korteks overe differansiye olur ve medullası geriler. Embriyo XY kromozomuna sahip ise medulla testise differansiye olur ve korteksi geriler [15].

Epiblasttan köken alan ve primitif çizgi boyunca göç eden primordiyal germ hücreleri 3. haftada yolk kesesinin allontoise yakın bir bölgesinde endoderm hücrelerinin olduğu bölgeye konumlanır. Sonbağırsağın mezenterinin dorsali boyunca hareket ederek 5. haftanın başında primitif gonadlara ulaşır; genital sırtlara gelişi ise 6. haftayı bulur [14].

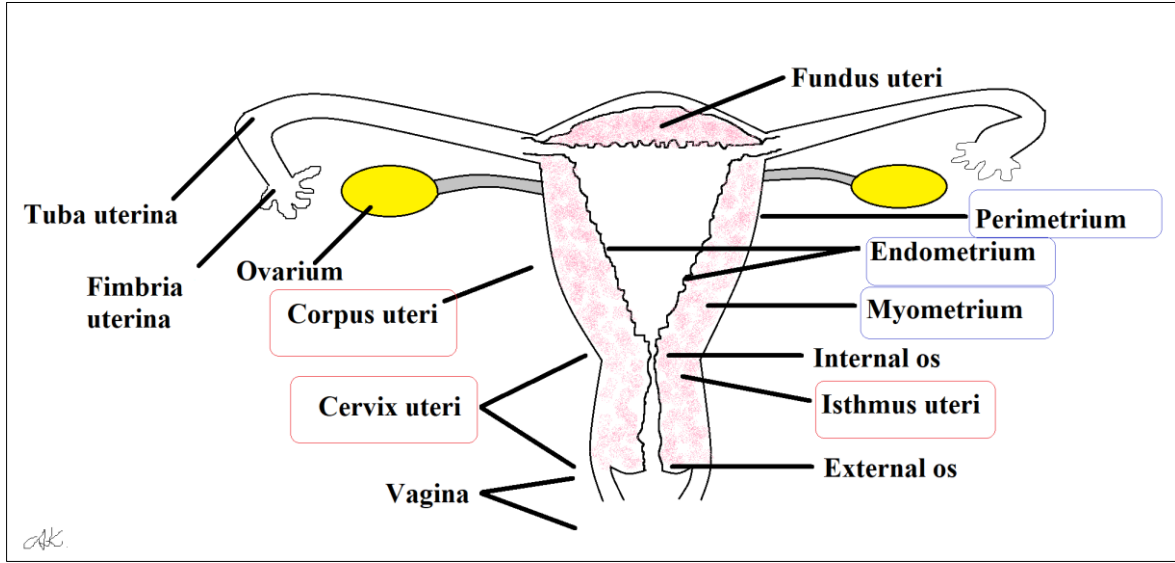
Farklanmamış evrede embriyonun mezonefrik (Wollfian) ve paramesonefrik (Müllerian) olmak üzere 2 çift genital kanalları vardır. Paramesonefrik kanal karın boşluğuna kranial ucundan açılır. Kaudal yönde ilerlerken mezonefrik kanalı önden çaprazlar sonrasında kaudomediyal yönde büyümeye devam eder. Orta hatta gelince karşı tarafın paramesonefrik kanalı ile temas eder. Öncesinde birbirleriyle bir septum ile ayrılmış olan bu iki kanal sonrasında birleşir ve uterus kanalını oluştururlar. Kaynaşan paramesonefrik kanalların lateralinden uterusun broad ligamenti meydana gelir. Broad ligamentin üst sınırında uterus tüpleri, arka taraf yüzeyinde ise overler yer almaktadır. Paramesonefrik kanalların kaynaşmasından ayrıca uterusun korpusu ve serviksi de oluşmaktadır. Mezenşim tabakası uterusun miyometriyum ile perimetriyum tabakalarını meydana getirir. Cinsiyet farklanmasında östrojen hormonunun etkisiyle paramesonefrik kanallardan tuba uterinalar, uterus, serviks ve vajenin üst kısmı gelişir. Aynı zamanda dış genital organları olan labium majus, labium minus, klitoris ve vajenin alt kısımları da gelişmektedir [14, 16].

2.2. Uterus Anatomisi

İnsanda uterus, pelvis boşluğunda mesane ile rektum arasında bulunan içi boş (cavitas uteri), kalın düz kas tabakasına sahip bir organdır. Komşulukları aşağıda vajina, yan-üstte tuba uterina'lar ile bağlantılıdır. Uzunluğu yaklaşık 7,5 cm, genişliği 5 cm (en geniş yeri), kalınlığı 2,5 cm; ağırlığı 30 ila 40 gr arasında değişir [13].

Uterus anatomik olarak corpus uteri, isthmus uteri ve cervix uteri olmak üzere 3 kısımda incelenir (Şekil 2.1). Fundus uteri, corpus uteri'nin yukarısında tuba uterina'ların giriş yerleri transvers bir çizgi ile birleştirildiğinde üstte kalan kısmına denir. Üzeri periton ile örtülü olan fundus uteri, uterusun en geniş kısmı olup ince bağırsak kıvrımları ve colon sigmoideum ile komşuluk yapar [13].

Uterusun vesica urinaria, rektum ve pelvis duvarları arasında ligamentleri bulunur. Bu ligamentlerin bir kısmı desteklik sağlayan periton plikaları (plica uterovesicalis, plica rectovaginalis) diğerleri ise düz kas lifleri ile fibröz doku içeren asıl bağlardır. Oksijence zengin kan uterusu a. iliaca interna'nın bir dalı olan a. uterina'lar ile gelir; venleri ise arterler ile birlikte seyreder ve v. iliaca interna'ya drene olur. Arteria uterina diğer damarlardan farklı olarak gebelik esnasında hipertrofiye uğrar ve uterus genişledikçe de kıvrıntılı olan yapısı düzleşir. Venlerde de gebelik esnasında belirgin genişlemeler görülür [13].



Şekil 2.1. Uterusun şematik çizimi. Anatomik olarak uterus corpus uteri, cervix uteri ve isthmus uteri olmak üzere 3 kısma ayrılır. Yapısal olarak dıştan içe doğru perimetrium, myometriyum ve endometriyum olarak adlandırılır

2.3. Uterus Histolojisi

Uterus, pelvisin orta hattında yer alan, güçlü kalın bir kas tabakasından oluşan, armut görünümünde bir üreme organıdır. Üç kısımdan oluşur. Bunlar; I. Gövde: oviduktların açıldığı geniş kısım, II. Fundus: oviduktların giriş portlarından daha yukarıda, uterusun yuvarlak tabanı, III. Serviks: uterusun dar sirküler kısmı, vajinaya açılan kısmı. Uterusun fundus ve gövdesinin kas duvar yapısı endometriyum, miyometriyum ve en dışta perimetrium [17], bazı kaynaklarda da adventisya/seroza olarak adlandırılır [18, 19], olmak üzere 3 tabakadan oluşur (Resim 4.8).

Perimetrium: Bu tabaka uterusu en dıştan saran seröz veya visseral yapıdaki tabakadır. Mezotelyum ve ince gevşek bağ dokusundan oluşur. Mezotelyumun altında elastik doku tabakası bulunur. Perimetrium uterusun arka yüzünün tamamını kaplar ve $\frac{1}{4}$ alt kısmı ile periton arasında gevşek bağ dokusu ile venler bulunur. Ön yüzünün ise tamamını kaplamaz. Ön yüzün bir kısmı bağ dokusu veya adventisya tabakası ile örtülüdür. Perimetrium pelvik ve abdominal periton ile devam eder [20].

Miyometriyum: Uterus duvarının büyük bir kısmını içte sirküler dışta longitudinal düz kas tabakasından meydana gelen kalın bir miyometriyum tabakası oluşturur. Rutin histolojik kesitlerde rastgele dizilmiş kas demetleri şeklinde görülen bu kas tabakası tuba uterina ve vajinanın kas tabakası ile devamlılık gösterir. Gebelik esnasında miyometriyumda kas

hipertrofisi, ekstrasellüler matriks değişimi, lenfatik ve kan damarları sayısında bir artış meydana gelir. Gebelikte uterus, miyometriyal düz kas hücrelerinde meydana gelen steroid hormon kaynaklı hiperplazi ve hipertrofi mekanizmaları ve fetüsün büyümesi sonrası uterusun mekanik olarak gerilmesi neticesinde hacmini 500-1000 kat artırabilir. Doğumda hacmi artan uterus, doğumdan sonra küçülür fakat hiç doğum yapmamış birine göre boyutu daha büyük kalır [13, 21].

Endometriyum: Uterusun lümenine bakan kısmında, en içte uterusun mukozası olan endometriyum tabakası bulunur. Morfolojik olarak 2/3'lük üst kısım, stratum fonksiyonale ve 1/3'lük alt kısım stratum bazale olmak üzere 2 tabakaya ayrılır. Organın beslenmesini sağlayan uterin arterden çıkan arkuat arterin dalları olan radial arterler bazalis tabakasına doğru ilerler. Bazalis tabakasında bu arterler spiral arter halinde devam eder ve arteriyoller halinde bir araya gelerek anastomozlaşır. Anastomozlaşan damar ağı kapillerleri destekler. Kapiller yatak ince duvarlı dilate segmentler olan lakünaları içerir. Fonksiyonel tabakanın görevi blastosistin implantasyonu için uygun ortamı sağlamaktır ve bunun gerçekleşmesi adına proliferasyon, sekresyon ve dejenerasyon olayları burada gerçekleşmektedir. Bazalis tabakasının görevi ise fonksiyonel tabakanın rejenerasyonu için kaynak oluşturmaktadır. Endometriyum tabakasındaki majör bileşenler dokunun iskeleti olan stromal hücreler, endometriyal kavitenin lümeni ile stromanın invajinasyonunu çevreleyen tek katlı prizmatik epitel tabaka, kan damarları ve immün hücrelerdir [22, 23]. Endometriyumun tek katlı prizmatik epiteli, salgı yapan hücreler ile silyumlu hücreleri içerir. Yüzey epitelinin uterus bezlerini oluşturmak amacıyla stromaya doğru yaptığı girintiler sonucu oluşan basit tübüler bezler endometriyumun derin kısımlarına doğru dallanır [23].

Menstrual Döngü: Üreme çağına ulaşmış sağlıklı bir kadında uterus her ay kendisini embriyonun implantasyonu ve ardından meydana gelecek olaylar için hazırlar. Menstrual döngü, uterusun endometriyum tabakasında meydana gelen gelişimsel basamakların art arda gerçekleşmesini tanımlayan bir terimdir. Bu döngü gonadotropinler tarafından kontrol edilir ve sağlıklı bir kadında 28 ± 2 günde bir tekrar eder. Menstrual döngü 3 ardışık evreden oluşur; proliferasyon evresi, sekretuar evresi ve menstrual evre [23]. Bazı kaynaklarda 1-14 gün arası proliferasyon/foliküler evre; 14-28 gün arası lüteal/sekresyon evre olarak da sınıflandırılabilir [24].

Proliferasyon evresi menstruasyondan hemen sonra başlar ve ovulasyondan 1 veya 2 gün sonra sona erer. Östrojen hormonu etkisi altında olan bu evrede Graffian folikülün gelişimi

gerçekleşmektedir. Endometriyumda hızla bir rejenerasyon gerçekleşir. Uterin bezlerin bazalında yer alan epitel hücre tabakasında mitoz bölünmeler gerçekleşir ve bu tabaka büyüdükçe mukozal yüzeyi kaplamaya başlar. Bezlerdeki prizmatik epitel hücrelerinde sayısız mitoz bölünmeler, stromada ise bağ dokusundaki hücrelerde yenilenme ve lamina proprianın yeniden yapımı gerçekleşir. Uterus bezleri uzar ve birbirine sıkıca paketlenmiş halde görünür. Bu fazda uterus bezleri bazaldan mukozal yüzeye doğru düz ve direkt uzanır. Spiral arterler de ayrıca stratum bazaleden yenilenen doku bölgelerine doğru büyür. Geç proliferasyon evrede hem bezlerde hem de stromada dikkat çekici büyümeler ve değişiklikler gözlenir. Bezler kıvrımlı hale gelir ve tirbuşon kıvrımlar göstermeye başlar. Stromal hücreler birbirinden ödemli sıvıyla ayrılır, mitoz bölünmeler sıklaşır ve epitel hücreleri daha yüksek ve daha prizmatik bir hal alıp, çekirdekleri rastgele yerleşir. Ayrıca, stromal hücreler kollagen ve ara madde salgılar ya da fonksiyonel tabakaya desteklik görevi görürler. Endometriyumun dökülen fonksiyonel tabakasına bazal tabakadan sayıları hızla artan epitel hücreleri göç eder. Böylece, proliferasyon evresi boyunca endometriyumun kalınlığı 0,5 mm'den 2-3 mm'ye kadar artar [17, 25].

Sekretuar evre ovülasyondan hemen sonra başlar ve menstrual siklusun 26-27'nci günlerinde sona erer. Ovülasyondan 2-3 gün sonra progesteron hormonunun indüklemesi ile bez epitel hücrelerinde ve mukozal yüzeyde sekresyon aktiviteleri gözlenir. Yüzeysel tabakalardaki ödem kaybolduğunda endometriyum hafifçe küçülür. Başlarda, epitel hücrelerinin yuvarlak çekirdekleri merkezde konumlanmaktadır. Glikojen, hücrelerin bazal bölgelerinde birikir ve mitoz bölünmeler bir önceki proliferatif fazdan daha az görülmektedir. Yirmibir-25 günler arası, aktif sekresyon başlar ve glikojen daha çok epitel hücrelerin apikalinde gözlenir. Uterin bezlerdeki hipertrofiye eşlik eden ödem sonucunda endometriyal kalınlık 4 mm'ye kadar çıkar. Uterin bezleri belirgin şekilde pürüzlü bir hal alır. Yuvarlak çekirdekleri bu dönemde bazal pozisyonda yer almaktadır. Yoğun ve mukoid olan glikojen ve glikoprotein içeriği yüksek sekresyonlar bez lümenine boşalır ve epitel hücrelerinin lümen sınırlarında kabarcıklar oluşturur. Stromadaki hücreler büyür ve dilate olmuş şekilde gözlenirler. Spiral arterler neredeyse endometriyumun yüzeyine ulaşmış durumdadır. Eğer gebelik gerçekleşirse, stromal hücreler lipid ve glikojen depolayan desidual hücrelere dönüşürler [25].

Desidualizasyon: Endometriyal stromadaki desidualizasyon, endometriyal stromal fibroblastların farklılaşması sonucu epitel-benzeri salgı hücrelerine dönüşmesine denir. Bu olay, östrojen ve progesteron hormonları, cAMP (siklik adenozin monofosfat) ve lokal

parakrin faktörlerin etkisi altında gerçekleşmektedir. Amaç, olası embriyo implantasyonu için uterus duvarını hazır hale getirmek ve embriyo implantasyonunun devamlılığını sağlamaktır [19].

Menstrual evre östrojen ve progesteron hormon seviyelerinin düşmesi sonucunda meydana gelen değişimleri içerir. Hormon düzeylerinin ani düşüşü ile fonksiyonel tabakaya kan desteği azalır. Spiral arter duvarında meydana gelen kasılmalar neticesinde fonksiyonel tabakada iskemi gerçekleşir. Epitel yüzeyinde bozulmalar ve kan damarlarında rüptür meydana gelir. Spiral arterdeki kan fonksiyonel tabakaya değil de bazal tabakaya döner ve sonuçta içeriği kan, uterin sıvı ve epitelyal hücre olan kanama oluşur. Arteriyal kan akımı sınırlandırılır fakat venlerin açık uçlarından devamlı kan sızar. Menstrual kanama yaklaşık 5 ± 2 gün sürer ve ortalama 35 - 50 ml kan kaybedilir. Uterus myometriyumundaki kasılmalar bu kanamanın gerçekleşmesine yardımcı olur. Endometriyumun fonksiyonel tabakası 48 saatin sonunda yok olur [23, 26].

Menstrual döngü boyunca endometriyumdaki değişiklikler ultrasonografi ile görüntülenebilir. Literatürde "*histologic dating of endometrium*" yani "endometriyumun histolojik takvimi" olarak geçen bu çizelgede beklenen menstruasyon gününe 2-3 gün kala yapılan endometriyal biyopsilerden sonuçlar güvenilir çıkmaktadır. Proliferasyon evresi ayırt edilmesi en zor olan evredir. Bu evredeki bezler dar, tübüler yapıda olup mitotik aktivitesi belirgindir. Endometriyumun kalınlığı 0,5 mm - 5 mm arasındadır. Ovulasyonun 14. gün gerçekleşeceği kabul edilirse 16. günde bu evredeki bezler daha belirgin halde yalancı çok katlı epitel şeklinde görülür. Glandüler epitelyumun bazalında glikojen birikimi ve hücre merkezinde çekirdek yapısı gözlenir. Sekresyon evresinde progesteron hormon konsantrasyonunun artması ile östradiolün biyolojik etkisi azalır ve sonuçta östradiol reseptör sayılarında azalma, östradioli östrona dönüştüren enzim (17 β -hidroksisteroid dehidrogenaz 2 geni) faaliyetlerinde de artma gerçekleşir. Döngünün 17. gününde endometriyal bezler daha kıvrımlı ve dilate olmuştur. 18. günde epitelyumdaki vaküoller azalır ve çekirdeklere daha yakın konumlanırlar. Glikojen artık epitelyum hücrelerinin apeksinde de görülmektedir. 19. günde yalancı çok katlı epitel ve vakülasyon neredeyse görülmez ve intralüminal sekresyonlar ortaya çıkar. 21 veya 22. günde endometriyal stroma ödemli bir yapıya dönüşür. 23.günde spiral arterleri çevreleyen pre-desidual hücreler belirir ve stromal mitoz daha belirgin hale gelir. 25. günde yüzey epitelinin altındaki pre-desidual hücreler değişikliğe uğramaya başlar. 27. günde belirgin lenfosit infiltrasyonu ile gelişmiş bir desidua benzeri hücre sırası gözlenir. 28. günde menstruasyon başlar [27].

2.4. Endometriozis

Endometriozis, endometriyal dokunun uterin kavite dışında ektopik alanlarda tipik olarak da uterusun pelvik peritoneal yüzeyi ve ligamentlerinde, ovaryum üzerinde ve rekto-vajinal septumda görülen kronik, iyi huylu, östrojen-bağımlı inflamatuvar bir hastalık olarak tanımlanır [28, 29]. Endometriozisin oluşma mekanizması ile ilgili çeşitli görüşler bulunmakla birlikte birden fazla etkenin hastalığın patogenezinde rol alması sebebiyle multifaktöriyel bir hastalık olarak tanımlanır (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Endometriozis patogenezinde rol alan mekanizmalar

Teori/Faktör	Mekanizma
Retrograd menstruasyon	Endometriyal içeriğin pelvise doğru hareketi ve endometriyal lezyonların implantasyonu
Metaplazi	Hormonal veya immünojenik faktörlerden dolayı peritoneal dokunun veya hücrelerin endometriyal dokuya transformasyonu
Hormonlar	Progesteron-aracılı kontrole karşı direnç neticesinde östrojen-odaklı endometriyal lezyonların çoğalması
Oksidatif stres ve inflamasyon	Endometriyal büyümeyi teşvik eden immün hücre ve onların ürünü olan sitokinlerin artması
İmmün yetmezlik	Menstrual debrislere ortadan kaldırılmasında yetersizlik ve endometriyal lezyonların implantasyonu ve büyümesinin teşviki
Apoptozisin baskılanması	Apoptotik yolların engellenmesi ve endometriyal hücrelerin hayatta kalmasının teşviki
Genetik	Endometriyal hücrelerin tutunma özelliklerini değiştirmek ve immün sistemden kaçışını teşvik etmek
Kök hücre	Doğal olarak rejenerasyon yeteneğine sahip farklılaşmamış hücreler tarafından endometriyotik depozitlerin oluşmaya başlaması

Not: Sourial S, Tempest N, Hapangama DK. Theories on the pathogenesis of endometriosis. International Journal of Reproductive Medicine 2014; 2014 kaynağından uyarlanmıştır.

Üreme çağındaki kadınların yaklaşık %5-10'unu, bu sayı dünya genelinde 176 milyon kadına tekabül etmektedir, etkileyen pelvik ağrılı ve infertiliteye sebep olan bu hastalığın kesin bir tedavisi bulunmamaktadır. Güncel tedavi yöntemleri daha çok hastanın ağrısını azaltmaya yönelik olup, aralarında sınırlı cerrahi girişimler ve birçok yan etkiye neden olan

hormonal tedavi yöntemleri bulunmaktadır. Bu nedenle, klinik tablo araştırmacıları bu hastalığın patogenezi ve alt tiplerini tanımlamaya yönelik ve özellikle hormonal olmayan tedavi seçeneklerini araştırmaya sevk etmektedir [29, 30].

Uterus transplantasyonu ile ilgili ilk denemeler, 1874 yılında endometriyum transplantasyon çalışmaları sayesinde Goldzeiher'ı bu alanda öncü yapar. 20.yy'a gelindiğinde H. Stilling tarafından "Die Entwicklung transplantiertes Gewebsteilein" adlı bir makale yayınlanır. Yayınlanan bu makaleye ait bir alıntı; "İmmatür tavşanlardan elde edilen uterin parçaları ve vajinal dokular aynı hayvanın dalağına transplante edildiğinde dokular büyümeye devam eder. Dalağına implante edilen vajina parçalarından, uterustan ve endometriyumdan çeşitli boyutlarda kistler oluşmaya devam eder. Bu yapılar silli silindirik epitel ile bir sınır hattı oluşturur. Kistlerin içerisinde salgı ürünleri vardır ve epitelyumda yığılı halde papiller bulunmaktadır. Kist, ondan bir parça alınmasının ardından yine kendisini yenileyebilmektedir" şeklinde özetlenebilir [31].

İlk başarılı ovaryum allografisi 1863 yılında Paul Bert tarafından deneysel tavşan modeli üzerinde gerçekleştirilmiştir. Kadın hasta üzerinde yapılan ilk başarılı ovaryum allografi girişimi ise 1895 yılında Robert Morris tarafından gerçekleştirilmiştir. 1918 yılında Hesselberg, Kerwin ve Loeb *Guinea pig* üzerinde çeşitli organların transplantasyonunu gerçekleştirmiştir. Bazı uterus parçalarını kulak ceplerine; subkutan olarak da kulağına ve abdominal duvara transplante etmişlerdir. Hesselberg'e göre çalışma endometriozisi başarılı bir şekilde temsil ettiği yönündedir. Özellikle otograftlarındaki beklenen kistik yapıların, epitelyal sınırların, bezlerin ve bağ dokusu varlığının tespiti onu haklı çıkartmaktadır [31].

2.4.1. Retrograd menstruasyon teorisi

Retrograd menstruasyon teorisi endometriozisin etiyolojisini açıklayan en eski teoridir. Buna göre, menstruasyon esnasında dökülen endometriyal hücre/debris içeriğı tuba uterina boyunca pelvik boşluğına akar, peritoneal yüzeylere tutunur ve birkaç aşamadan sonra olgun endometriyotik lezyonlar meydana gelir. Ancak, retrograd menstruasyonu olan her kadında endometriozis gözlenmez [29]. Ayrıca ergenlik öncesi kızlarda, yeni doğanlarda ve erkeklerde de görülebilen endometriozisi açıklayamadığı için tartışmalıdır [32].

John Sampson 1916 yılında ele aldığı bir myoma uteri vakasında uterusu çıkarırken uterusa enjekte ettiği bir takım kimyasalların uterin ve ovaryan venlerden sızdığını gözlemlemiştir.

Operasyon süreci boyunca kimyasal içeriğin uterus duvarının venöz sinüslerinden sızdığını ve uterin ile ovaryum venlerine gittiğini gözlemlemiştir. Uterusun kan akışı, damarlara bizmut subkarbonat içeren eritilmiş jelatin injekte edilerek çalışılmıştır. Her bir uterustan çıkan uterin arterlerden biri anterior diğeri posterior uterus duvarını penetre eder. Arkuat arter olarak adlandırılan damarlar uterin duvarını dar/dış/periferal zon ve geniş/iç/radyal zon olarak ayırır. Damarlar myometriyumdan endometriyuma doğru ilerler. Arterlerin büyük kısmı uterusun direkt mukozasını besler. Venöz kan arkuat venler ile içeriği uterin pleksusa döker. Bu, broad ligamentlerin arasındaki tabakada yer alır. Arkuat venler kanı hem periferal hem de radyal uterus zonlarından alır. Mukozanın venöz kapilleri ki bazıları dilate olmuş sinüs formundadır, kanı miyometriyumun radyal zondaki venöz sinüslere boşaltır daha sonra arkuat venlere dönüşür. Endometriyum tabakasındaki kanın büyük bir kısmını bu büyük venler alır ve sinüslere boşaltır. Bu büyük venlere Sampson alıcı sinüs (*receiving sinuses*) adını vermiştir ve ona göre yabancı maddelerin sızıntısı endometriyumdan çıkan bu dilate olmuş büyük alıcı sinüslerden daha derindeki uterin duvara doğrudur. Uterin duvarında bulunan sinüs veya venlerde valve yani kapakçıkların olmaması venlerde meydana gelecek olan herhangi bir basınç değişikliğinde kanın uterus duvarına dağılmasına izin verecektir. Menstruasyon sırasında mukozadaki bazı kapillerler rüptür olabilmekte böylelikle kan sızıntısı/kaçağı meydana gelebilmektedir. Kanla birlikte küçük mukoza parçacıkları da aralardan sızıp rüptür olmuş kapillerlerin arasındaki lümene veya sinüslere sızar ve uterus duvarındaki daha derin venlere doğru ilerler [33].

Sampson 1927 yılında yayınlamış olduğu makalesinde endometriozisde endometriyal dokunun kökenini 4 olası yol ile tanımlamıştır. Bunlar;

1. Direkt veya birincil uterin endometriozis; Uterus duvarının kendi mukozası veya tubal mukozanın işgali ile,
2. İndirekt veya ikincil uterin endometriozis; Endometriyal dokunun pelvis bölgesinde bulunan ektopik endometriyal odaktan uterus duvarının yüzeyel alanına yayılması ile,
3. İmplantasyon veya peritoneal uterin endometriozis; Uterusa implantasyon yolu ile veya peritoneal yüzeyinde gelişmiş endometriyal dokudan,
4. Embolik veya metastatik uterin endometriozis; Menstrual deseminasyon ile uterusun venöz sirkülasyonuna ya uterin kaviteyi çevreleyen mukozadan ya da miyometriyumdaki endometriyal dokudan yayılması [33].

Histolojik çalışmalar göstermiştir ki, menstrual dönemdeki uterus mukozasında venöz kapiller ve büyük venöz sinüslerin sayesinde kan, mukozal damarlardan çevre dokulara geçmekte ve beraberinde getirdiği mukoza parçacıkları da onu izleyerek damar dışına çıkmaktadır. Menstrual kan, uterusun venöz dolaşımına rüptüre olmuş mukozal sinüslerden içerisinde endometriyal dokuya ait parçacıklar taşıyarak kaçar. Ayrıca bu kanallar aracılığıyla uterus mukozasına ait uterin parçacıkları da venlere sirkülasyonla doğru kaçak yapar. Endometriyal dokuya ait bu parçacıklar, çevre ven veya venöz sinüslerin yüzeyine implante olabilme ve yaşamını devam ettirebilme özelliğine sahiptir. Elde edilen histolojik verilerden ektopik endometriyal dokuda uterus mukozasındaki venöz kapillerlere benzer kapillere rastlanmıştır [33].

2.4.2. Metaplazi teorisi

Çöломik metaplazi teorisine göre endometriozis, visseral ve abdominal peritonun mezotelyal hattında bulunan özelleşmiş hücrelerin değişimi sonucunda meydana gelir. Endometriozisin nedeni çöломik epitelden kaynaklanan metaplazidir. Bu teorinin mantıklı olması, periton ve endometriumun her ikisinin de ortak embriyolojik kaynaktan yani çöломik duvardan köken alıyor olmasıdır Ancak bu görüşü bilimsel dayanaklarla kanıtlamak oldukça güçtür [32]. Normal peritoneal hücrelerin endometriyum benzeri hücrelere dönüşmesinde hormonal veya immünolojik faktörlerin rol oynadığı düşünülür. Hücrelerin yapısal değişimini tetikleyen olayın endokrin sistemi etkileyen, örneğin östrojen, olduğu söylenmektedir. Bu teori prepubertal dönemde görülen endometriozisi açıklayabilir ancak prepubertal dönemde endometriozisi ateşleyebilecek kadar östrojen miktarı yoktur ve bu nedenle üreme çağındaki kadınlarda görülen endometriozisten farklı bir açıklaması olmalıdır [29, 34].

Matsuura, Ohtake, Katabuchi ve Okamura (1999) insan ovaryum yüzey epiteli hücrelerini kullanarak yaptıkları *in vitro* hücre kültürü deneyinde endometriyal lezyonların ovaryum yüzey epitelinden metaplazi yolu ile köken aldığını kanıtlamıştır. Oluşturdukları modelde, hem ovaryum yüzey epiteli hem de ovaryum stromal hücrelerini 17 β - estradiol'ün de ortama katılması sonucunda kültüre ettiklerinde, ovaryan yüzey epitel hücrelerinden epitelyal mezenkimal yapılı endometriyal stromal hücre ile çevrili bir lümen oluşturmayı başarmışlardır. Elektron mikroskobu görüntülerinden bu hücrelerin yüzeylerinde sıkı

bağlantıların olduğu ve glandüler hücrelerde sitokeratin ile mikrovilli yapılarının da olduğu gözlenmiştir [35].

2.4.3. Hormonlar

Steroid hormonlar, hücresel metabolizmada, gelişimsel süreçlerde ve üreme sistemindeki fizyolojik olaylarda önemli ve düzenleyici etkinliği olan bileşiklerdir. Steroid hormonlar 5 ana başlık altında toplanabilir; mineralokortikoidler, glukokortikoidler, androjenler, östrojen ve progestinler [36]. Bu gruba D vitamini de katılabilir. D vitamini bir çeşit steroid olan sekostreoid yapıda olup, farkı normal steroid'teki C9 - C10 bağında bulunan B halkasının kopuk olmasıdır [37]. Mineralokortikoidler böbrekte zona glomerulozada, glukokortikoidler ise zona fasikulatada sentezlenir. Erkeklerdeki majör androjen olan testosteron sekonder cinsiyet karakterlerin oluşumunda görev alır fakat kadınlarda androjenin görev alanı dardır. Androjenler adrenal bez ve gonadlarda sentezlenir [36]. Farklı organlarda sentezlenmesine karşın steroid hormonların temeli aynı bileşiktir; kolesterolden sentezlenirler. Onları farklı kılan kimyasal bağları ve yan zincirlerindeki modifikasyonlarıdır [38]. Steroidogenez için gerekli olan kolesterolün ana kaynağı LDL-kolesteroldür. Yirmiyedi karbonlu bir bileşik olan kolesterol (3-hidroksi-5,6-kolesten) birkaç enzimatik basamaktan geçerek sırasıyla 21-19 ve 18 karbonlu steroid hormonlara dönüşür [39].

Östrojen 18 karbonlu bir bileşiktir ve özellikle kadınlardaki sekonder cinsiyet karakterlerin oluşumunda görevlidir [36, 39]. Dolaşımdaki asıl östrojenler, östradiol (E2), östron (E1) ve östriol'dür. Östriol gebelerdeki majör östrojendir ve idrarda tespit edilebilir. Östradiol, biyolojik olarak en aktif östrojendir. İnsan vücudunda 3 bölgede sentezlenir. Birincisi ovaryumdaki teka hücrelerine yakın konumlanmış granüloza hücrelerinden FSH'ın stimülasyonu ile kolesterolden sentezlenir. İkincisi periferde yer alan yağ hücrelerinde, deride ve iskelet kasında androstenedionun önce östrona ve ardından östradiole 17 β -hidroksisteroid dehidrogenaz enzimi ile dönüşümü sonucunda sentezlenir. Üçüncü olarak endometriyal dokularda kolesterolden sentezlenir. Menapoz öncesi kadınlarda ovaryumlarda sentezlenen en önemli östrojen, östradioldür [39, 40]. Bilinen ilk östrojen reseptör alt türü 1966 yılında sıçan uterusunda keşfedilen ER α 'dır. Bunu, 1996 yılında sıçan prostat ve ovaryumunda keşfedilen ER β takip eder. Bu reseptörlerin keşfi sayesinde E2'nin insan hücre ve dokularındaki fizyolojik ve patolojik rolleri daha iyi anlaşılmıştır. Dişi cinsiyet karakterlerinin gelişiminde E2'nin temel işlevleri vardır; ER α bu işlevlerden sorumlu olan

ana reseptördür. ER β 'nın ise endometriyumun üreme fonksiyonlarında önemli işlevlerinin olduğu düşünülmektedir [41].

Östrojen, endometriyal hücrelerde 2 ana yolak ile sentezlenir. Birincisi, CYP19A1 geni tarafından kodlanan bir aromataz proteini olan aromataz enzim kompleksinin aktivasyonu sayesinde androstenedion'un E1'e ve testosteronun E2'ye dönüşümü sonucu; ikincisi ise steroid sülfatazın aktivasyonu ile östradiol sülfat (E2S)'in biyoaktif metaboliti olan E2'ye veya östron sülfat (E1S)'in biyoaktif metaboliti olan E1'e dönüşümü ile gerçekleşmektedir [42].

Progesteron, 1900'lü yılların başında gebeliğin oluşum ve devamı için gerekli bir hormon olarak tanımlanıp ilk defa 1929 yılında Corner ve Allen tarafından corpus luteumdan izole edilmiştir [43]. Progesteron gebe olmayan kadınlarda ovaryum ve adrenal bezden; gebelerde ise korpus luteum ve plasentadan sentezlenir [44]. Menstrual döngünün düzenlenmesi, annenin gebeliğe hazırlanması ve gebeliğin sürdürülmesi gibi önemli görevleri vardır [36].

Endometriyal dokudaki esas düzenleyiciler östradiol ve progesteron hormonlarıdır. Menstrual döngüde bu hormonlar yüzlerce genin ekspresyonunu düzenler. Ayrıca bu dokularda hem östrojen hem de progesteron için immünreaktif reseptörler de yer almaktadır [40]. Sağlıklı bir endometriyumda östrojen ve progesteron sinyalizasyonu koordineli bir şekilde yürür ve sonuçta normal bir menstrual döngü ile embriyo kabulü için gerekli olan koşulların sağlanması adına bir ortam oluşturulur. Bu iki hormon kendilerine ait olan reseptörler üzerinden etki göstermektedir. Endometrioziste ise, uterin kavite dışında büyüyen endometriyal doku progesteron ve östrojen sinyalizasyonunun bozulmasına yol açar ve ortaya progesteron-dirençli ve östrojen-baskın bir ortam çıkar. Hormonal dengenin bozulması sonucunda inflamatuvar bir süreç ve beraberinde pelvik ağrı; embriyo implantasyonunu reddeden bir ortam meydana gelir [45].

Endometriozis, östrojen bağımlı bir hastalıktır. Klinik araştırmalar endometriozisin gelişiminde östrojenlerin temel kaynak olduğunu göstermektedir. Endometriyal dokularda fazlaca aromataz ekspresyonu ve lokal östrojen üretimi vardır [46]. Östrojen ve androjenlerin endometriyum hücreleri üzerinde intrakrin etkileri bulunmaktadır. Bu intrakrin etkilerin endometriyal fonksiyonlar üzerindeki etkileri hem endometriyal döngüde hem de endometriyal patolojilerde ana düzenleyici olarak görev alır. Araştırmalarda, endometriyal dokudaki işlevsel değişikliklerin bezlerdeki yapısal değişiklikler ve stromal

hücrelerin farklılaşması (desidualizasyon) olarak karakterize edilmektedir. Bu olaylara uterusun implantasyona hazırlığı ile menstruasyonda endometriyal doku onarımı sırasındaki immün hücre popülasyon ve sayısındaki değişiklikler de eşlik eder. Bazı araştırmacılara göre menstruasyon immünolojik bir olay olarak vurgulanmaktadır. İntrakrin etki sonucu ortamda prostaglandin konsantrasyonunda artış meydana gelir ve lokal enzim ekspresyonunu tetikler. Bu enzim ekspresyonları sonucunda pro-inflamatuar sitokin, kemokin ve matriks metalloproteinaz sentezlerinde artış meydana gelir [42].

Endometriozis, kısmen de olsa progesteron sinyalinin kaybedilmesi sonucu ötopik ve ektopik endometriyal dokuda görülmektedir. Birçok endometriozis çalışmasında ektopik endometriyumda 17 β -hidroksisteroid dehidrogenaz 2 geni (17 β HSD2) ekspresyonunda bir azalma olduğu gözlenmiştir. Bu enzim, biyolojik olarak aktif olan östradiolün daha az etkili olan östrona dönüştürülmesinde rol oynadığı için kritik bir öneme sahiptir. Endometriyal lezyonlarda azalan 17 β HSD2 ekspresyonunun bir sonucu olarak östradiol etkinliği progestin tedavisine rağmen artmaktadır. Bu nedenle aktif olmayan progesteron etiyojisinin aydınlatılması, semptom yönetimi ve önlenmesine yönelik etkili tedavilerin keşfedilmesine olanak sağlayacaktır [43].

Normal endometriyum ile endometriyal lezyonlar karşılaştırıldığında, endometriyal lezyonlarda artmış östradiol biyosentezi ve azalmış östradiol dönüşümü görülmektedir. Bu lezyonlarda steroidojenik genlerin aşırı ekspresyonları sonucunda artan seviyelerde lokal E2 sentezi gerçekleşir. Hastalığın ilerlemesi ve kalıcı olmasında yüksek seviyedeki lokal E2 kritik rol oynar [47]. E2'nin bilinen en iyi özelliklerinden biri iyi huylu anjiojenik süreçlerde ER α üzerinden direkt veya indirekt etki ile endometriyal epitelyal ve stromal hücrelerin anjiojenik büyüme faktörü salgılamasına etki etmesidir. E2'nin endometriyumdaki damarlar üzerine direkt etkisinin kanıtı endometriyal damarların hücrelerinde ER β reseptörlerinin yer almasıdır. ER β ayrıca glandüler epitelyum ile stromal hücrelerde de eksprese olmaktadır. Endometriozis hastalığında endometriyal dokulardaki ER β seviyeleri normalden 100 kat daha fazladır [41].

Endometriozis neden progesteron dirençli bir hastalıktır? Bunun cevabı ilgili genlerdeki mutasyonda olabilir. Wieser ve diğerleri (2002) klinik bir vaka araştırmasında endometriozis ile "Progesteron Reseptörüne Ait İntron G'de 306 Baz Çifti Ekleme Polimorfizimi" yani kısaca PROGINS arasındaki korelasyonu incelemiştir. Progesteron geni üzerindeki polimorfizm yani ilgili gendeki mutasyon özellikle hormona duyarlı organlarda

gerçekleşmekteydi. Bu çalışma, hepsi klinik ve histolojik açıdan değerlendirilen ve endometriozis tanısı konulan 95 hasta ile endometriozisi olmayan kontrol grubunu (n = 107) karşılaştırmıştır. PROGINS için progesteron reseptörüne ait allel ve genotip frekansları incelendiğinde iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) bir fark tespit edilmiştir. Çalışmaya göre, endometriozisli kadınlardaki polimorfizm oranı daha yüksek çıkmıştır. PROGINS mutasyonu tarafından yapısı değişen reseptörler hormonun bağlanma noktalarını da etkilemekte bu da östrojen reseptör kontrolünün zayıf kalmasına ve ortamdaki östrojen kaynaklı proliferasyonun artmasına neden olmaktadır. Mutasyonlu progesteron reseptör yapısı endometriozisde meydana gelen östrojenin aşırı aktivasyonu teorisini de böylelikle desteklemektedir. Sonuç olarak PROGINS ile endometriozis arasında bir ilişki vardır [48].

Progesteron ve östrojen etkilerini hücre içi reseptörleri üzerinden gerçekleştirirler. Östrojen proliferatif fazda endometriyal kalınlığın artması için epitel proliferasyonunu uyarır, progesteron sekresyon fazında östrojen kaynaklı proliferasyonu inhibe ederek stromal hücrelerin desidualizasyon sürecini uyarır. Progesteron ile östrojen arasındaki denge bozulup progesteron direnci ile östrojen baskınlığı baş gösterdiğinde endometriozise zemin hazırlanır. Progesteronun baskılanmasıyla epitelde P450 aromataz enzimi üzerinden östrojen sentezi gerçekleşir ve östrojen hücre içerisindeki reseptörlerine bağlanır. ERK/MAPK (ERK: Dış sinyal düzenleyici kinaz; MAPK: Mitojenle-etkinleşen protein kinaz) sinyalizasyonu ve stromadan gelen FGF (Fibroblast büyüme faktörü) ile epitelde proliferasyon gerçekleşir, desidualizasyonda ise yetersizlik yaşanır. Özetlenen bu biyolojik süreç endometriozis ile infertilizasyon arasındaki ilişkiyi de aydınlatmaktadır [45].

Tedavi amacı ile verilen ajanlardan GnRH agonistleri sayesinde negatif geri besleme ile östrojen sentezini azaltması hedeflenmiştir. GnRH antagonistleri ise aynı reseptöre yarışmalı bağlanma prensibi ile çalışarak yine östrojen sentezini azaltmayı hedeflemiştir. Aromataz inhibitörleri ve seçici östrojen reseptör modülatörleri (*Selective estrogen receptor modulators*, SERM) de aynı amaca hizmet ederler. SERM'in dışındakiler endometrioziste görülen ağrıyı gidermede kullanılırken SERM endometriyal lezyonların azaltılmasında kullanılmaktadır. Kombine oral kontraseptifler (*Combined oral contraception*, COC) ovaryum kaynaklı steroid üretimini baskılar ve progesteron takviyesini sağlar. COC ve progestin endometriyal kaynaklı ağrıyı gidermede kullanılır. COC'ler, lezyonların cerrahi olarak çıkarılmasından sonra endometrioziste nüksü önleme amacıyla doktorlar tarafından hastalara verilmektedir [45].

2.4.4. Oksidatif stres ve inflamasyon

Oksidatif stres, vücuttaki serbest radikal üretimi ile antioksidan sistem arasındaki dengenin bozulması, homeostazinin sekteye uğraması sonucu ortaya çıkar [49]. Hücreler aerobik koşullar altında reaktif oksijen türleri (ROS)'ine karşı bir savunma geliştirirler. Sağlıklı bir hücre ortamında artan ROS ile onların ortamdaki kaldırılmasında görevli olan antioksidanlar arasında bir denge vardır. Antioksidanlar 2 ana grup altında incelenebilir. Enzimatik antioksidanlar grubunun üyeleri: süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz katalaz ve glutatyon redüktazdır. Hidrojen peroksiti su ve alkole indirirler. Enzimatik olmayan antioksidanlar grubu üyeleri sentetik antioksidan veya gıda takviyesi olarak da bilinirler: C vitamini, E vitamini, β -karoten, selenyum, çinko, taurin ve glutatyonur. Oksidatif stres antioksidanların yetersiz kalması veya savunma sistemindeki zayıflıklar sonucu hücrede DNA hasarları, lipid peroksidaz ve protein hasarları ile kendisini gösterir. Kadın üreme sistemine de olumsuz etkileri vardır. Embriyonun rezorbisyonu, tekrarlayan gebelik kayıpları, preeklampsi, intrauterin büyüme geriliği ve fetal ölümler bunlara örnek verilebilir [50].

Endometrioziste, retrograd menstruasyon ile peritoneal kaviteye göç eden makrofajlar, eritrositler ve apoptotik endometriyal dokular burada oksidatif strese yol açan aşırı ROS üretimine neden olabilirler [51]. Endometriozisli hastaların peritoneal sıvılarında yüksek konsantrasyonlarda malondialdehit (MDA), pro-inflamatuar sitokinler (İnterlökin-6, Tümör nekroz faktörü alfa: TNF- α , İnterlökin-1 β), anjiyogenik faktörler (İnterlökin -8, Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü: VEGF), monosit kemoatraktan protein 1 (MCP-1) ve oksidize LDL (ox-LDL) bulunur. ROS'un açığa çıkmasında büyük bir paya sahip olan pro-inflamatuar ve kemotatik sitokinler, fagositik hücrelerin görevlendirilmesinde ve aktivasyonunda rol alırlar [50].

Mier-Cabrera ve diğerleri (2009) endometriozisli kadınlardaki antioksidandan zengin diyet ile beslenme sonucu plazma sıvılarındaki oksidatif stres seviyelerini karşılaştıran bir çalışma düzenlemişlerdir. Amaçları, endometriozisli kadınların antioksidandan zengin içerikli besinlerdeki vitaminleri absorbe etme kalitelerini ölçmek ve ayrıca besin içerikleri ile hastalığın seyrinin değiştirilebileceği yönünde bir hipotezleri vardır. Buna göre, endometriozisli hastalara yüksek oranda antioksidan yani vitamin A (günlük 1050 μ g retinola eşdeğer) vitamin C (günlük 500 mg) ve vitamin E (20 mg) içeren bir diyet programı verilmiş ve deneyin sonunda plazmadaki oksidatif stres belirteçlerinin ölçümü yapılmıştır.

Sonuç olarak, A, C ve E vitamini açısından zengin beslenme sonucu 4'ncü ayın sonunda endometriozisli hastaların oksidatif stres düzeylerinin azaldığı tespit edilmiştir [52]. Başka bir araştırmaya göre, beslenme çeşidinin endometriozis hastalığının gidişatına yön verebileceği yönündedir. Buna göre, yanlış beslenme alışkanlığı neticesinde örneğin lipid peroksidasyonuna neden olabilecek mekanizmanın açığa çıkması ile oksidatif stres ve epigenetik anormalliklerin ortaya çıkacağı düşünülmektedir. Omega-3'den zengin besinlerin anti-inflamatuar etkileri ve bu besinlere ek olarak N-asetilsistein ve D vitamininden zengin içerikli besinler ile hastalıklara karşı bir koruma, hastalığın oluşmasına karşı bir önlem alınabileceği öngörülmektedir. Kalsiyum, çinko, selenyum, C vitamini, E vitamini ve gıdalardaki fitokimyasallar, karotenoidler, flavonoidler, indoller ve izotiyosiyanatlar gibi biyoaktif bileşikler endometriozisteki patofizyolojik süreçler ile bağlantılıdır. Hormon dengesi, hücre sinyalizasyonu, hücre büyümesinin kontrolü, apoptozis ile de yakından ilişkilidir. Araştırmacılara göre, diyetlerin zengin içerikler ile yeniden programlanması ile endometriozis hastalığının önlenmesi olasıdır [53].

2.4.5. Apoptozis

Apoptozis veya programlı hücre ölümü, dokudaki belli hücrelerin ortadan kaldırılması amacıyla kontrol altında yürütülen fizyolojik doğal bir süreçtir. Apoptotik sürece giren hücrede belli başlı morfolojik değişiklikler gözlenir. Bu değişiklikler apoptozis için karakteristik olan özelliklerdir. Örneğin, hücre sitoplazmasında ve çekirdeğinde yoğunlaşmalar, DNA'nın parçalanması, hücre organellerinde ayrılma ve hücre plazma membran bütünlüğünün bozulmaya başlaması gibi özellikler sıralanabilir [54]. Morfolojik değişikliklere ek olarak hücrede belli başlı biyokimyasal değişiklikler de meydana gelir. Bir membran fosfolipid çeşidi olan fosfatidilserin'in hücre plazma membranının karşı tarafına geçmesi, bir çeşit sitosolik protein olan ve plazma membranındaki integrinlere bağlanabilen kalretikulin ile membran yüzeyine bağlanabilen Anneksin I'in hücre yüzeyinde gösterilmesi ve sitokrom c miktarının hücre sitoplazmasındaki artışı bu biyokimyasal değişikliklere örnek olarak verilebilir. Sonuçta apoptotik hücreler, komşu hücreler ve makrofajlar tarafından fagosite edilirler [54].

Apoptoziste meydana gelen morfolojik değişiklikler

Işık ve elektron mikroskobunun kullanımı sayesinde hücredeki apoptotik faaliyetlerde meydana gelen değişiklikler kolayca gözlenebilir. Apoptozisin erken evresinde hücrede büzüşme ve çekirdekteki kromatinlerin yoğunlaşması sonucu meydana gelen piknozis, hücrelerin üzerlerinde oluşan cepçikler (*blebs*), hücre sitoplazmasında vaküoller ve sitoplazma dışına taşan büyük vaküoller (*blisters*) ışık mikroskobu ile kolaylıkla ayırt edilebilir. Hücre büzüştükçe boyutu küçülmeye, laminin ve aktin filamentlerin parçalanması sonucu sitoplazma yoğunlaşmaya ve küçülmeye başlar. Çekirdek de tıpkı hücre gibi büzüşebilir ve hatta membranla kaplı birkaç parçaya ayrılabilir. Organeller birbirine yakın sıkıca paketlenmiş gibi yoğun alanlar oluşturur. Çekirdek kromatini at nalı şeklinde gözüktür [55, 56].

Rutin histolojik işlemlerin ardından hematoksilin ve eozin (H&E) boyası ile boyanan kesitlerde ışık mikroskobu altında apoptotik hücreler tek tek küçük hücreler veya küçük hücre toplulukları şeklinde tanımlanabilir. Apoptotik hücreler, histolojik olarak koyu eozinofilik sitoplazma ve yoğun mor renkli nükleer kromatin parçacıklar içeren yuvarlak veya oval koyu renkli kümeler şeklinde gözüktür. Elektron mikroskobunda ise nükleer membran altında periferde elektron yoğun nükleer materyalin çökmesi sonucu karakteristik olarak gözlenebilir. Apoptozisin tomurcuklanma evresinde, karyokinez yani çekirdek parçalanması ve apoptotik hücrelerden kopan parçacıklardan sonra plazma membran yapısında bozulma meydana gelir. Bu değişimler apoptozisin sonlarına doğru gerçekleşir. Apoptotik tomurcuklar (*apoptotic bodies*) nükleer parçacık içeren veya içermeyen sıkıca paketlenmiş ve organel içerikli sitoplazma bulundururlar. Organel bütünlüğü halen korunmaktadır ve tüm içerik sağlam bir plazma membranı ile çevrilidir. Apoptotik tomurcuklar makrofaj, parankimal hücre veya neoplastik hücrelerce fagosite olur ve fagolizozomlara indirgenirler. Apoptotik hücrelerin etrafını saran ve onları sindirebilen makrofajlara “*tingible body macrophages*” yani boyanabilen/boya tutabilen parçacık makrofaj denir. Bu makrofajlar sıklıkla lenfoid foliküllerin germinal merkezlerinde veya bazen de timik kortekste bulunur. Boyanabilen parçacıklar apoptotik hücrelerden gelen nükleer debris parçacıklarıdır. Apoptotik süreçte veya apoptotik parçacıkların temizlenmesi esnasında herhangi bir inflamatuvar reaksiyon gelişmez çünkü apoptotik hücreler çevresel dokulara hücre sel içeriklerini boşaltmazlar; kısa bir sürede fagosite olurlar böylece ortamda anti-inflamatuvar sitokin üretimi gerçekleşmez [55]. Apoptotik hücrelerin saptanması ışık mikroskobu altında histolojide rutin olarak kullanılan H&E boyası veya Giemsa boyası gibi

boyanan preparatların incelenmesiyle mümkündür. Ayrıca özel kitlerin yardımıyla Anneksin V boyası, TUNEL yöntemi veya kaspaz-3 yöntemini kullanarak immünohistokimyasal yöntemlerle de tespiti mümkündür [57].

Kaspaz (Cysteine Aspartate Specific ProteASEs-CASPASE), sistein aspartat-spesifik proteaz ailesine üye bir enzimdir. Proteini yani substratını aspartat aminoasidinden sonra keser ve aktif merkezinde sistein aminoasidi bulundurur. Hücrenin kaderini belirleyen embriyonik dönemdeki farklılaşmalarda ve nöronal yapının yeniden şekillenmesinde görev alır [58, 59]. Kaspaz (cas) ailesi özellikle apoptozis, piroptozis¹, nekroptozis² ve inflamasyon olaylarında önemli görevler üstlenir [60].

Kaspazlar, hücre içerisinde inaktif öncü veya pro-kaspaz olarak sentezlenir ve genelde diğer kaspazlar tarafından fiziksel bir bölünme/ayrışma ile aktif bir forma dönüşürler. Pro-apoptotik protein özelliğinde olan kaspazlar bir kez aktive olduklarında diğer kaspazları da aktive ederek hücre içerisinde bir kaskad oluştururlar [54, 59]. Genel olarak kaspaz proteaz ailesi 2 farklı yolak ile aktive olur; bunlardan biri ölüm sinyal-uyarılı veya başka bir ifade ile ölüm reseptör-aracılı yolak diğeri ise stres-uyarılı veya başka bir ifade ile mitokondrion-aracılı yolaktır [61]. Kaspazlar kendi içinde 3 gruba ayrılır. Apoptotik efektör kaspazlar: kaspaz-3, kaspaz -6 ve kaspaz -7; Apoptotik başlatıcı kaspazlar: kaspaz -2, kaspaz -8, kaspaz -9 ve kaspaz -10; İnflamatuar sitokin işleminde görevli olan kaspazlar: kaspaz -1, kaspaz -4, kaspaz -5 ve kaspaz -11'dir [60].

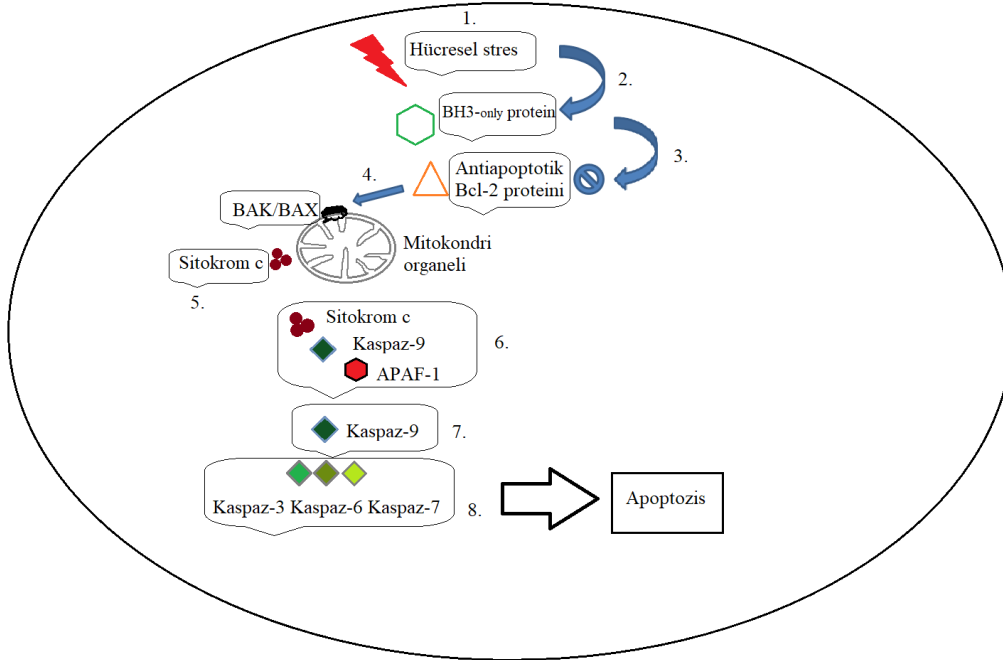
Apoptotik yollar

Apoptozis, intrinsik ve ekstrinsik yollar tarafından düzenlenmektedir. İntrinsik yolak hücre yüzeyindeki reseptörlere gereksinim duymadan hücre içi sinyallerin varlığında aktive olan apoptotik yolaktır. Bu sinyaller/uyarımlar negatif ve pozitif sinyaller/uyarımlar olarak sınıflandırılabilir. Negatif sinyaller, yokluğu ile apoptotik süreci başlatabilen sitokin, hormon veya büyüme faktörleri için kullanılan bir terimdir. Pozitif sinyaller ise varlığı ile apoptotik süreci başlatabilen ultraviyole, radyasyon, hipoksi, hipertermi, toksinler, viral enfeksiyon ve serbest radikaller için kullanılan bir terimdir. Tüm bu hücre içi kaynaklı uyarımlara tepki olarak iç mitokondriyal membran yapısı geçirgenliğini artırarak sitozole sitokrom c, SMAC/DIABLO ve serin proteaz HtrA2/Omi salınmasına neden olur. Bu

¹ Yüksek derecede inflamatuvarlı programlanmış hücre ölüm şekli.

² Bir çeşit programlanmış nekroz.

proteinler kaspaz-bağımlı mitokondriyal yolağı aktive ederler. Sitokrom c'nin kendisi pro-kaspaz-9 ve APAF-1 ile bir kompleks oluşturur ve sonuçta hücrede apoptozom denilen bir yapı meydana gelir (Şekil 2.2) [55, 62].



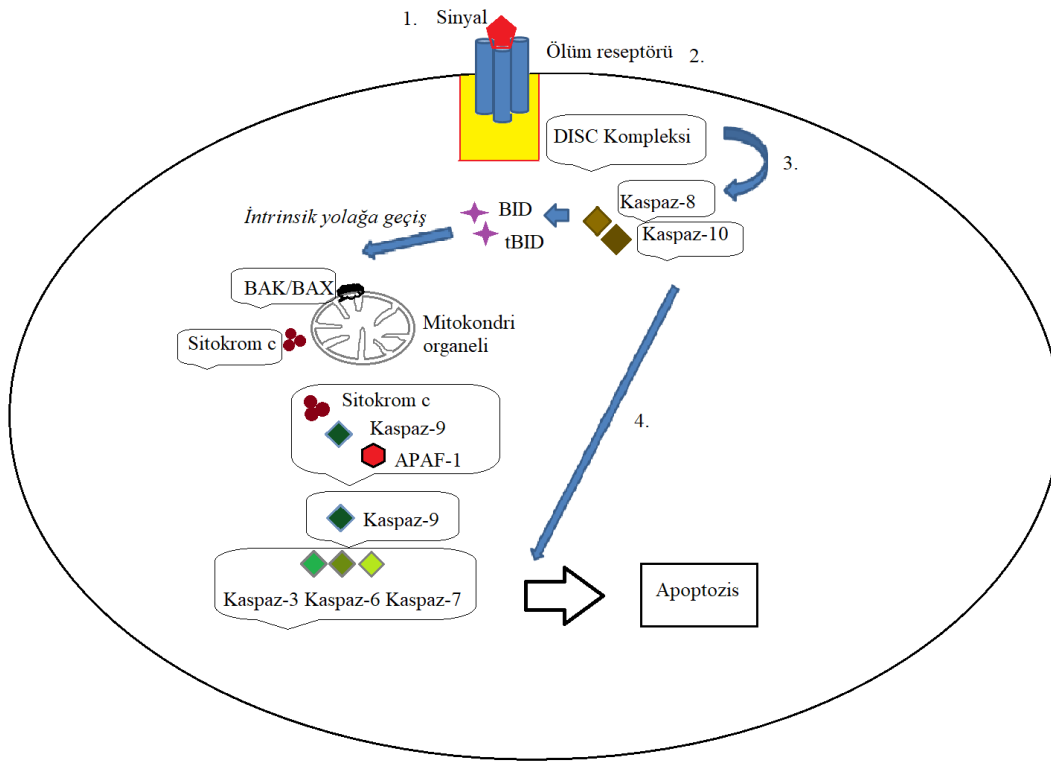
Şekil 2.2. İntrinsik yolak. Hüresel stres ile aktive olan bir yolak tasvir edildi. Hücre içi aktivasyonu ile BH-3 proteini anti-apoptotik Bcl-2 proteinini inhibe eder. BH3-only proteini BAK/BAX oligomerasyonunu başlatır ve mitokondrinin geçirgenliğini artırır. Geçirgenliğin artması ile sitozole sitokrom c ve SMAC/DIABLO salınımı gerçekleşir. Sitokrom c, kaspaz-9 ve APAF-1 ile bir kompleks oluşturur. Bu kompleks kaspaz-9'un aktivasyonunu sağlar. Kaspaz-9 aktive olunca kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7 de aktive olur. Tüm bu kaskad hücre ölümünü uymaktadır. SMAC: kaspazın ikincil mitokondri-türevli aktivatörü; DIABLO: düşük PI'lı direkt IAP-bağlayıcı protein; APAF-1: apoptotik proteaz aktive edici faktör 1 [62]

Apoptotik mitokondriyal olayların kontrol ve düzenlenmesi Bcl-2 (B hücre lenfoma/lösemi tip 2) protein ailesine aittir. Bcl-2 protein ailesi mitokondriyon membran geçirgenliğini kontrol altında tutar. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyeleri bulunur. Anti-apoptotik üyeleri: Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w, BAG; pro-apoptotik üyeleri: Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik ve Blk'dir. Anti-apoptotik ve pro-apoptotik proteinler birlikte çalışarak hücrenin geleceğine karar verirler. Pro-apoptotik proteinlerin sayısı daha fazla ise hücre apoptozise daha fazla meyilli olur, anti-apoptotik proteinlerin sayısı daha fazla ise hücre apoptozise daha az meyilli olur [54, 55].

İnsan endometriyumunda proliferatif fazda Bcl-2 apoptozisi inhibe etmektedir. Bcl-2 endometriyal glandüler ve stromal hücrelerde eksprese olur. Geç proliferatif fazda pik yapar,

geç sekretuar ve menstruasyon fazlarda düşüşe geçer. Buna karşın miyometriyal düz kas hücrelerinde menstrual döngü boyunca tutarlı Bcl-2 immünoreaktivite vardır [63]. Daikoku, Ito ve Otsuki (1998) yaptıkları bir çalışmada transgenik fare kullanarak Bcl-2 geni için homozigot ($Bcl-2^{-/-}$), heterozigot ($Bcl-2^{+/-}$) ve doğal fenotip ($Bcl-2^{+/+}$) olan deneklerde Bcl-2 proteininin işlevini araştırmışlardır. Bcl-2 geni eksik olan farelerde birçok apoptotik hücre ve parçacık sıklıkla bezlerde ve miyometriyumda gözlenmiştir. Araştırmacılara göre endometriyal glandüler hücrelerin ve miyometriyal düz kas hücrelerin hayatta kalması için Bcl-2 geni temel kaynak teşkil etmektedir [63, 64].

Apoptotik yollardan ikincisi olan ekstrinsik yolak, immün sistemi aktive eden bir enfeksiyon tarafından veya sitotoksik T hücre gibi hücre dışı kaynaklı uyarımlar ile reseptör-aracılı yolak üzerinden aktive olur. Burada da ölüm kazpazları aktive edilir ve bir kaskad oluşur (Şekil 2.3) [62].



Şekil 2.3. Ekstrinsik yolak. Ölüm sinyallerinin hücre membranındaki ölüm reseptörlerini aktive etmesi ile başlayan bir süreç tasvir edildi. Süreç bir kompleks olan DISC tarafından aktive edilmektedir. Kompleks kaspaz-8 ve kaspaz-10'a bir sinyal gönderir. Aktive olan kaspaz-8 ve kaspaz-10, kaspaz-3'ün aktivasyonunu sağlar. Bazı hücrelerde ekstrinsik yolak kaspaz-8 üzerinden çapraz yaparak intrinsik yolağa müdahil olur ve mitokondriyal yolak üzerinden apoptozisi uyarabilir. DISC: ölüm-uyarımlı sinyal kompleksi; BID: BH3-only protein çeşidi; tBID: Tip 2 hücrelerdeki BH3-only protein çeşidi [62]

Ekstrinsik apoptotik yolak, ölüm reseptör-bağımlı (*death receptor-dependent*) bir yoldur ve hücre dışı sinyallerin hücre membranındaki ölüm reseptörlerini aktive etmesi ile başlar. Ölüm reseptörleri, TNF ailesine mensup olup 20'den fazla protein içerir. Hücre ölüm ve yaşamının ayarlanması, hücre farklılaşması ve immün reaksiyonlarda bulunma gibi önemli biyolojik görevleri vardır [65]. Hücre membranında bulunan reseptörler ile etkileşime giren sinyallere sitokinler, sitotoksik ilaçlar, hormonlar, patojenler ve besinlerle alınan bazı doğal bileşikler (vitamin E) örnek olarak verilebilir [66]. Reseptör ve sinyal bileşimi hücrede bulunan ölüm-uyarımlı sinyal kompleks'in (DISC) bir araya gelmesine neden olur. DISC apoptotik faaliyetlerde önemli olan kaspaz-8 ile kaspaz-10'un öncü kuvvetlerini aktive eder. Aktive olan kaspaz-8 ve kaspaz-10; kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7'nin aktive olmasını sağlar. Bazı hücre tiplerinde ekstrinsik yolak sitozolde bulunan proteinlerin (tBID, BID) yardımıyla intrinsik yolağa kaydırılabilir [62, 67].

İnsan endometriyumunda proliferasyon ve menstrual evrelerin sorunsuz işlemesi adına bu dokudaki apoptozis aktiviteleri çok önemlidir. Bu süreçte apoptozis ile bağdaşan nükleer DNA fragmantasyonu çok açık bir şekilde görülmektedir. Apoptozisin varsayılan rolü normal endometriyumda yaşlanan veya fonksiyonunu kaybeden hücreleri ortadan kaldırmak ve her bir menstrual fazda gerçekleşen doku onarımının önünü açmaktır. Apoptotik hücreler, glandüler hücrelerde fazlaca bulunmakla beraber stromadaki yoğunluğu daha azdır. Normal bir endometriyumun fonksiyonel tabakasında apoptotik hücre sayısı geç sekretuar fazda artar, menstruasyon fazında en yüksek düzeye ulaşır. Fonksiyonel tabakadaki hücresel azalmayı bir sonraki menstrüel döngünün ilk fazı olan proliferasyon fazına gelindiğinde bazal tabakadan göç eden yeni hücre göçü tamamlayacaktır [68].

Endometriozisin belki de en ilgi çekici patolojik olayı apoptotik işleyiş ve organizasyonun sekteye uğratılmasıdır. Endometriozisli kadınlarda, endometriyal hücreler peritoneal kaviteye hücum ettiğinde orada bulunan ve apoptotik aktivitelerin meydana gelmesi için var olan mekanizmaları bloke ederler. Hücreler, apoptotik kaskada girmeyecekleri için ortadan kaldırılmaktan kurtulur, peritonu ele geçirecek kadar hayatta kalır ve neticede peritonu istila ederler. Neovaskülarizasyon indüklenir, endometriyal lezyonlar oluşur. Bu anormal hayatta kalma süreci anti-apoptotik faktörlerin aşırı ekspresyonuyla beraber pro-apoptotik faktörlerin de düşük miktarlarda eksprese edilmesi nedeniyle yaşanmaktadır. Apoptotik aktivitelerdeki bu aksaklıkların temelinde genetik varyasyonlar da olabilir; örneğin, Bcl-2 proteinini kodlayan genin anormal ekspresyonu [55].

Bcl-2 ve Bax proteinleri peritoneal ve ovaryan endometriozis olgularında, glandular ve stroma tabakalarında, proliferasyon ve sekretuar fazlarda belirlenebilir. Bcl-2 ve Bcl-X_L proteinleri apoptozisi önler ve hücrenin hayatta kalmasını sağlar iken Bax ve Bcl-X_s proteinleri apoptozisi uyarır. Östrojen ve progesteron hormonlarının hücrelerde apoptotik işleyiş üzerinde olumlu/olumsuz etkileri vardır. Örneğin, östrojen hormonu endometriyal epitelyal ve stromal hücrelerde anti-apoptotik etkilere neden olur. Lokal östradiol, hücredeki kemokin, kinaz ve Bcl-2 aracılı inflamatuvar süreçlerin yaşanmasını ve hücre canlılığının devamını sağlar. Öte yandan, hem ötopik hem de ektopik endometriyumda progesteronun baskın etkisi ile İnterlökin-8 ve diğer kemokinler inhibe edilmektedir. Ayrıca, progesteronlar endometriyal epitelyal hücrelerde Bcl-2'nin inhibisyonu ve beraberinde Bax ile ERK yolakların stimülasyonu ile apoptozisi başlatabilir [68].

2.4.6. Genetik

Endometriozis gelişiminin patogenomisi

Endometriyal lezyonların oluşum ve gelişimini aydınlatmak üzere genetik, endokrin, çevresel, immün ve epigenetik faktörler birçok araştırmaya konu olmuş ve sayısız çalışmalarda hastalığın nedenleri büyük çapta araştırılmıştır. İntrauterin hayatta embriyonun gelişimi esnasında kritik dönem adı verilen ve embriyonun organlarının gelişimini etkileyen iç veya dış etmenlere karşı son derece hassas olduğu dönemler vardır [69, 70].

Kök hücrelerin endometriozisin patogeneğinde rol aldığı iddia edilmektedir. Kök hücreler farklılaşmamış, kendini yenileyebilme özelliğinde olan ve farklılaşma yeteneği bulunan özel hücrelerdir. Uterus endometriyumunda bulunan Müllarian embriyogenezis aracılı genlerin yetişkinlikteki endometriozis hastalığı ile ilgili olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, uterus dışında örneğin akciğerlerde de görülebilen endometriyal lezyonların oluşumunun kök hücrelerinin faaliyetleri sonucunda olduğu varsayılmaktadır. Bu varsayım kök hücrelerin lenfovasküler aralıklar boyunca göçünü savunan teoriyi de desteklemektedir. Değişik tiplerde endometriyal kök hücreler tanımlanmıştır. Bunlara; peritoneal ve pelvik kavitedeki endometriyal kök hücreleri, Müllarian kanaldan köken alan embriyonik hücreleri, menstrual debridadaki kök hücreleri, metaplaziden sonraki çöломik epitelyal hücreleri, peritonun inflamatuvar bölgesindeki mezenkimal kemik iliği kök hücreleri örnek verilebilir. Endometriozise neden olan kök hücrelerin nerelerden kaynaklandığı net olmamakla birlikte 2 temel hipotez hâkimdir. Birincisi, dişi üreme sisteminin embriyogenezisi sırasında pelvik

boşluğu kaplayan periton boyunca yayılan kök hücrelerin (endometriozisin uterin dışı orijin kaynağı); ikincisi, endometriyal tabakadan gelen kök hücrelerin (endometriozisin uterus içi orijin kaynağı) hastalığa neden olduğu iddia edilmektedir. İkinci hipotez Sampson'un (1927) pelvik kaviteye saçılan endometriyal kökenli menstrual hücrelerin neden olduğu endometriozis varsayımı ile bağdaşmaktadır [69].

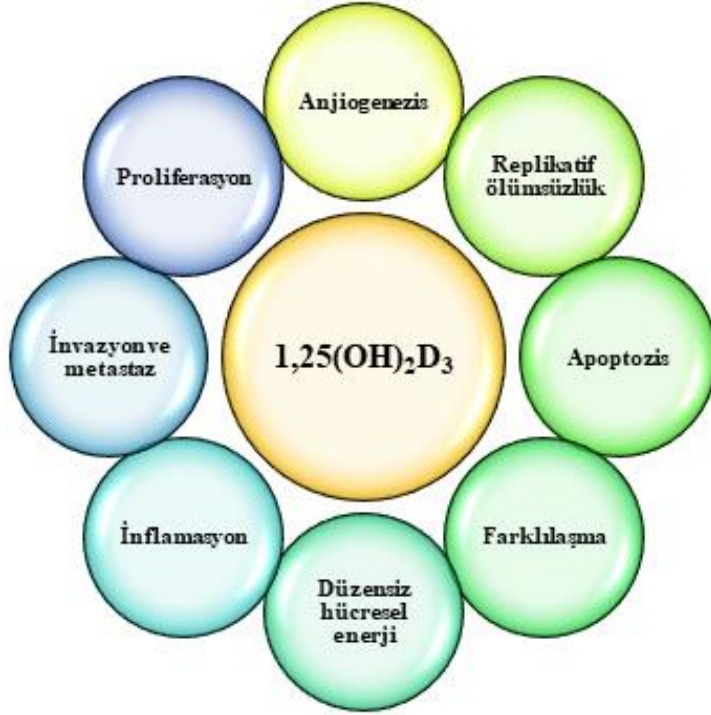
Dişide intrauterin hayatta iki çift genital kanal bulunur. Bunlar mezonefrik (*Wolffian*) ve paramezonefrik (*Müllerian*) kanaldır. Embriyonun her iki dorsal tarafında bulunan Müllerian kanalları önce kaudal sonra kaudo-medial yönde büyümeye devam eder. Sonrasında orta hatta birleşen bu iki kanal uterus kanalını meydana getirecektir [70]. Fetusda meydana gelen primitif endometriyal dokudaki bozulmalar gestasyonun 5-8 haftaları arasındaki kritik dönemde başlar, erken postnatal hayata kadar devam eder. HOX ailesinden HOXA10 geni temel düzenleyici olarak mezodermin segmentasyonu ve embriyo hattının uzamasından sorumludur. Ötopik ve ektopik endometriyal kök hücrelerin farklılaşmasına, adhezyonuna, çoğalmasına ve hayatta kalmasına zemin hazırlayan etmenler WNT ile HOX ailesine ait genlerin istenmeyen kombinasyonları ve bunlara ek oksidatif stres, pestisitler, endokrin bozucuların da dâhil olmasıdır. Ek olarak, postnatal hayatta suskun halde olan ve sonrasında tetiklenen olaylar dizisi sonucunda da endometriozis vuku bulabilmektedir. Periyodun neden duraksadığı bilinmemekle beraber endometriyotik hücre öncüllerinin yıllarca uykuda kaldığı ve tetiklenmeleri sonucunda metaplazi ile endometriyotik kök hücrelere dönüşebildiği bilinmektedir. Bu olayda da birçok genetik ve epigenetik faktörler rol oynamaktadır. Örnek olarak, Müllerian embriyogenezis ile ilgili genlerdeki ekspresyon fonksiyonel bozulmalar, geçici hipoksi, kronik inflamasyon (HIF-1A genini uyarır) ve mekanik transdüksiyon (TWIST1 genini regüle eder) verilebilir. Postnatal hayatta özellikle yetişkinlik döneminde endometriyotik kök hücreleri adhezyon, çoğalma, invazyon, angiogenezis sonucunda endometriyotik lezyonlara dönüşebilir. Angiogenezis ile ilgili VEGFA geni, immün-inflamatuar faktörler ile ilgili COX2 geni, matriks metaloproteinaz-3 geni, integrinler protein ürünleri ile birlikte endometriyotik lezyonların oluşmasında, kalıcı hale gelmesinde ve gelişmesinde kritik rol oynarlar. Epigenetik mekanizmalar, ötopik veya ektopik endometriozis ile karakterize olmuş immünolojik, immünohistokimyasal ve histolojik boyutunu gözlememize olanak sağlar, fakat hangi olayı ne veya nelerin tetiklediği net olarak ortaya çıkarılmadığı gibi, tek bir etiopatogenetik model bütün hastalığı açıklamada yetersiz kalacaktır [69, 71].

2.5. D Vitamini

İnsanda D vitamini ihtiyacı esas olarak Güneş'ten gelen ultraviyole B (UVB) ışığına maruz kaldıktan sonra ciltte sentezlenmeye başlaması ile karşılanırken öte yandan diyetle alınan D vitamini miktarı oldukça azdır. D vitamini bakımından zengin içerikli besinlere örnek olarak morina karaciğeri yağı (210 - 250 µg/100 g), pasifik somonu (13 - 24 µg/100 g), Baltık ringa balığı (5 -15 µg/100 g), *Cantharellus tubaeformis* türü mantar (13- 29 µg/100 g) verilebilir. Güneşten alınan verimle doğru orantılı olarak insanlarda D vitamini sentezi kışın en düşük seviyelerde iken yaz sonu maksimum seviyelere ulaşır [72, 73]. D vitamininin inaktif ve aktif formları farklı organlarda birçok enzimin yardımıyla sentezlenmektedir. Deride, 7-dehidrokolesterol UVB ışını sayesinde kolekalsiferole sentezlenir. Kolekalsiferol biyolojik olarak inaktif formda olup hemen vitamin D bağlayıcı proteine veya albümine bağlanır. Bu şekilde dolaşıma katıldıktan sonra karaciğerde hidrosilasyona uğrar ve CYP2R1 ve CYP27A1 enzimleri tarafından katalize edilir. Sonuçta, 25-hidroksivitamin D, 25(OH)D sentezlenir. Böbreklerde 25(OH)D, biyolojik olarak aktif formu olan kalsitriole yani 1,25(OH)₂D'e dönüştürülür. Vücutta kalsitriol seviyeleri renal-negatif-geribildirim sistemi ile özellikle renal CYP27B1 aktivasyonu ile dengede tutulmaktadır [5].

D vitamininin biyolojik olarak aktif olması onun reseptörüne bağlanması ile gerçekleşir. D vitamini reseptörleri (VDR) nükleer reseptör ailesine mensuptur. Ayrıca kalsiyum, fosfat dengesinin sağlanması, hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması ve immün yanıtlarda da rol almaktadır. VDR iskelette, immün sisteme ait hücrelerde (monosit, T ve B lenfosit), paratiroid bezlerde ve üreme sistemine ait organlarda da eksprese edilmektedir [74, 75].

Vücuttaki kalsiyum dengesinin sağlanması ve kemik gelişimine etkilerinin yanı sıra D vitamini birçok sinyal yollarında düzenleyici olarak da görev almaktadır. Normal hücrelerde farklılaşmayı indüklerken, tümör hücrelerindeki çoğalmayı inhibe eder. Anjiogenezisi inhibe eder, apoptozisi aktive eder ve metastaz olaylarını baskılar. D vitamininin ayrıca anti-mikrobiyal ve anti-inflamatuar etkileri de bulunmaktadır. Anti-kanser özelliği nedeniyle birçok kanser tipinde araştırma konusu olan D vitamininin en iyi kolorektal, göğüs ve prostat kanserlerinde etkili olduğu gözlenmiştir (Şekil 2.4) [76].



Şekil 2.4. 1,25-dihidroksivitamin D3'ün (1,25 (OH)2D3) etkileri. Feldman, D., Pike, J.W. and Bouillon, R. (2018). Vitamin D. (Fourth edition). London, United Kingdom: Academic Press. 545-562 kaynağından uyarlanmıştır

2.5.1. D vitamini ve endometriozis

Endometriozis tanısı konulan hastalarda, peritoneal sıvı ve serumdaki pro-inflamatuar sitokin artışları nedeniyle hem lokal hem de sistematik inflamasyon bilinen bir olaydır. Deneysel endometriozis hayvan modeli çalışmalarında immün sistemi uyaran ilaçların endometriozisi önlediği ve tedavi ettiği gösterilmiştir. D vitamini takviyesinin henüz klinik düzeyde endometriozis tedavisinde kullanılabilirliğine ait veriler olmasa da deneysel çalışmalar umut vericidir. Örneğin, fare modeli bir endometriozis deneyinde, D₃ reseptör agonisti olan elocalcitol hastalığın oluşturulmasından 1 hafta önce ve hastalığın oluşturulmasından 2 hafta sonra farelere günlük 100 µg/kg doz verildiğinde peritondaki makrofaj alınımının inhibe olduğu ve toplam lezyon ağırlığınının % 70'e kadar azaldığı gözlenmiştir [77]. Öte yandan Akyol ve diğerleri, denek olarak sıçan kullandıkları deneysel endometriozis araştırmalarında D vitamininin tedavi öncesi ve sonrası endometriyal bez hacimleri üzerindeki etkisinin az olduğunu gözlemlemişler. Omega 3 ile karşılaştırmalı olarak düzenledikleri çalışmada, omega 3'ün hem sitokin düzeylerinde hem de endometriyal bezin hacimsel değişimlerinde daha başarılı olduğunu savunmaktadırlar [8].

Endometriozisli kadınların endometriyumu da farklılık gösterebilmektedir. Örneğin, endometriyumlarında yapısal ve fonksiyonel düzeyde proliferasyon yeteneği, immün sistem bileşenlerin varlığı, adezyon, moleküler ekspresyon, steroid ve sitokin üretimlerini etkileyen anormallikler tespit edilmiştir [74].

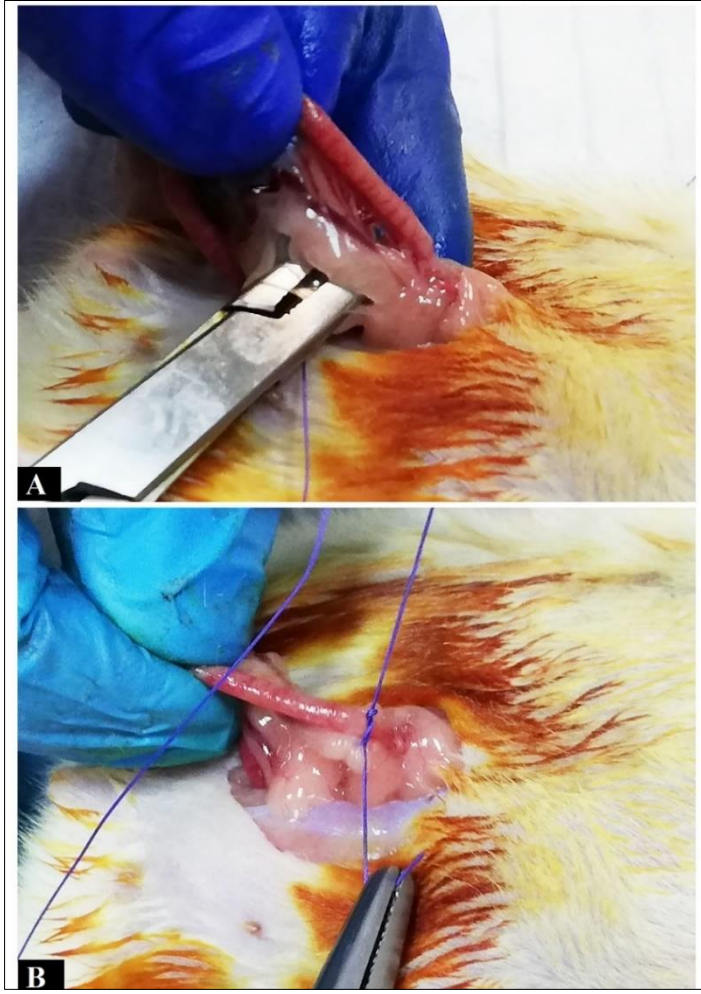
D vitamini analogları endometriozis tedavisinde uzun süredir kullanılmaktadır. Ancak, D vitamini daha çok endometriozis ile ilişkili immünolojik değişikliklerde ve özellikle endometriyumda büyük role sahiptir. D₃'ün aktif formunun endometrioziste görülen hücresel büyüme ve farklılaşma mekanizmaları üzerinde düzenleyici etkileri vardır. Endometriozisli hastalarda D vitamini bağlayıcı proteininde varyasyonlar olduğu tespit edilmiştir. Bu durum vücuttaki inflamatuvar araçlarını etkileyebilir. Ayrıca, D vitamini yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) kolesterol seviyeleri ile de etkileşim halindedir [78].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

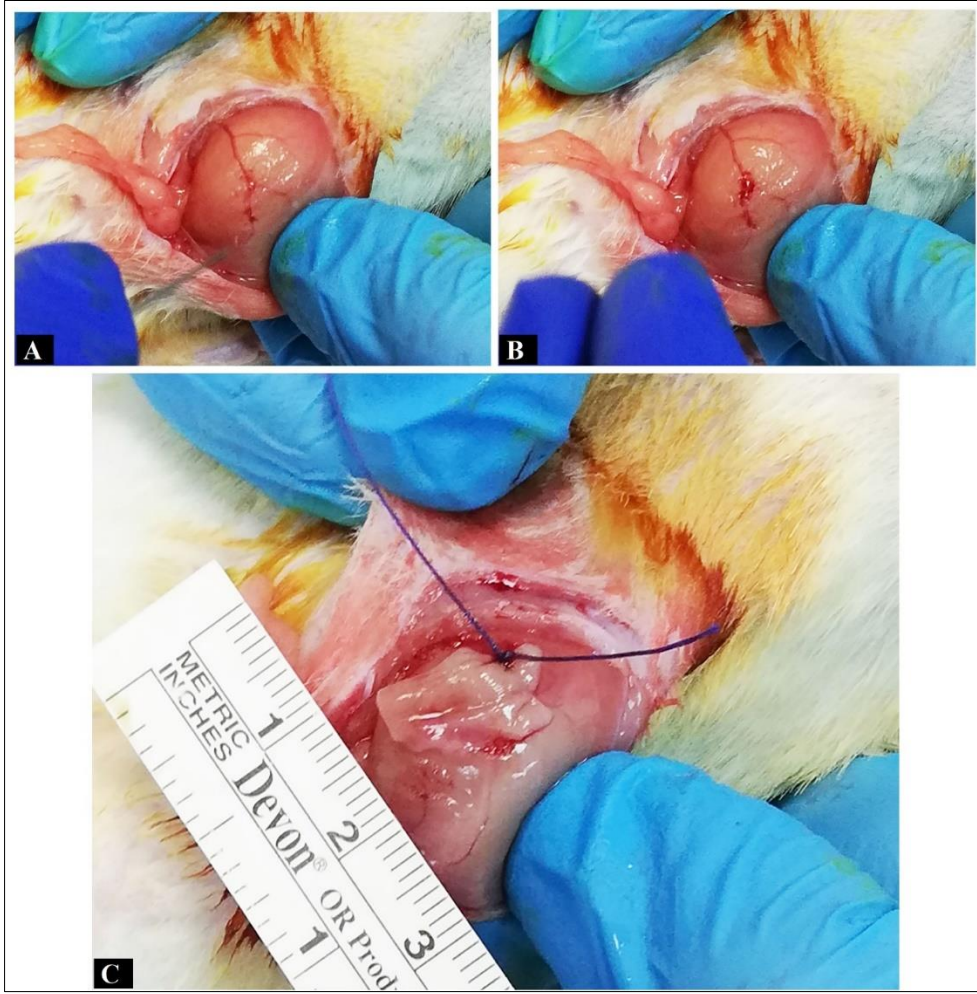
Çalışmanın başından sonuna kadar deney hayvanlarına Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu karar ve yönergesine uygun kurallar doğrultusunda muamelede bulunuldu (Etik Kurul Onay Numarası G.Ü.ET-19.015). Çalışmamızda, 200-250 g ağırlığında, 10 haftalık düzenli östrus siklus gösteren *Sprague Dawley* türü 28 adet dişi sıçan deney hayvanı olarak kullanıldı. Deney hayvanları Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nden temin edildi. Sıçanlar ortak kafesten rastgele seçildi ve bir kafeste iki veya üç denek olacak şekilde ayrı ayrı kafeslere alındı. Total sayıdaki 28 adet dişi sıçan her grupta 7 hayvan olacak şekilde rastgele 4 gruba ayrıldı. Sıçanlar, 12 saat gece/gündüz periyodunda, 21 - 24 °C hayvan barınma yerinde standart sıçan yemi ve musluk suyuyla beslendi. Sıçanlarda endometriozis modelini oluşturmak amacıyla uygulanan cerrahi işlemler ve deneklerin izlenmesi Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Deney Hayvanları Bakım ve Araştırma Ünitesinde gerçekleştirildi. Sıçanlardan elde edilen organların rutin histolojik takipleri, boyamaları ve immünohistokimyasal analizleri ile mikroskopik görüntülerin elde edilmesi Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi.

3.1. Deneysel Endometriozis Modeli

Deney prosedürüne dâhil edilen sıçanlara Jones (1984)'un yöntemine göre cerrahi indüksiyon ile endometriozis modeli uygulandı [79]. Her bir sıçanın beden ağırlığı ölçüldü ve ardından cerrahi işlem öncesi ksilazin (5 - 8 mg/kg/i.p.) ve ketamin (75 - 90 mg/kg/i.p.) ile genel anesteziye alındı. Genel anesteziye alınan sıçanlar sırt üstü pozisyonda yatırılarak abdomen kılları tıraş edildikten sonra bölge batikon ile dezenfekte edildi. Linea alba üzerinden deri, derialtı ve kas tabakaları ayrılarak peritoneal kaviteye ulaşıldı ve sağ kornu uteri açığa çıkarıldı. Uterusun sağ kornusu her iki uçtan 3/0 emilebilir sutür materyali (Vicryl®) ile ligatüre edilerek çıkarıldı (Resim 3.1). Asıcı ligamentlerinden ayrılan kornu uteri %0,9'luk NaCl solüsyonu içerisinde etrafındaki yağ dokusundan bir bistüri yardımıyla arındırıldı, 1,5 cm kesilerek periton duvarına dikildi (Resim 3.2). İşlem tamamlandıktan sonra açılan abdomen kasları ve deri usulüne uygun bir şekilde dikilerek kapatıldı. Sıçanlar reanimasyon sürecinden sonra tekrar kafeslerine alınarak endometriozis modelinin oluşum süreci olan 28 gün kafeslerinde aynı koşullar altında bakıldı.



Resim 3.1. Peritoneal kavitede kornu uterinin açığa çıkarılması (A). Sağ kornu uterinin 3/0 sutür materyali ile ligatüre edilmesi (B)



Resim 3.2. Peritonun vaskülarizasyonu yüksek olan bölgesi açığa çıkarılmakta (A). İnsülin enjektörü ile hafifçe bölgenin kanatılması (B). Bir uterin parçasının periton duvarına myometrium tabakası periton ile temas edecek şekilde sutüre edilmesi gösterilmekte (C)

3.2. Makroskobik Analizler

Deneysel endometriozis modelinde, sıçanların endometriyal implantlarına ait volüm değerleri ve adezyon skorları kayıt altına alındı.

3.2.1. Endometriyotik volümlerin hesaplanması

Endometriozis modelinin başarılı bir şekilde oluştuğunun kontrolü amacıyla (Resim 3.3) ilk operasyondan 28 gün sonra sıçanlar genel anesteziye alındı ve steril şartlar altında abdomenleri açılarak peritoneal bölgede yer alan endometriyotik alanların uzunluk, genişlik ve yükseklikleri mikrometre aracılığı ile ölçüldü (Resim 3.4). Endometriyotik volümler $\pi/6 \times \text{uzunluk} \times \text{genişlik} \times \text{yükseklik}$ formülü ile hesaplandı [80].



Resim 3.3. Bir endometriyal implant ile endometriozis modeli örneği



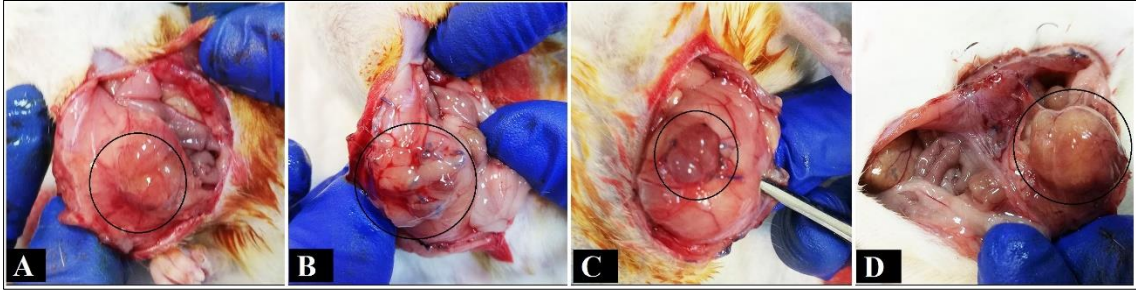
Resim 3.4. Mikrometre aracı ile endometriyal implantın boyutlarının ölçümü

3.2.2. Adezyon skorlarının hesaplanması

Operasyon esnasında karın içi adezyon alanlarının değerlendirilmesi Blauer'in skora göre yapıldı [81] (Çizelge 3.1) (Resim 3.5). Herhangi bir regresyon şekillenmemiş ve vezikül haline gelmişse endometriozis modeli oluşmuş kabul edildi.

Çizelge 3.1. Blauer (1988)'e göre karın içi adezyon alanlarının varlığı ve puanlaması

Puan	Adezyon Varlığı
0	Adezyon yok
1	Zayıf adezyon alanı
2	Bir bölgede yoğun adezyon alanı
3	Yaygın ve yoğun adezyon alanı
4	İç organların abdomen duvarına adezyonu



Resim 3.5. Karın içi adezyon alanlarının görüntülenmesi Zayıf adezyon alanı (A), bir bölgede yoğun adezyon alanı (B), yaygın ve yoğun adezyon alanı (C), iç organların abdomen duvarına adezyonu (D)

Sıçanların abdomenleri ilk operasyonda olduğu gibi tekrar kapatıldı ve süreç sonlandırıldı. Bütün sıçanlarda deneysel endometriozis modeli oluşturulduktan sonra sıçanlar rastgele 4 gruba ayrıldı.

3.3. Grupların Dağılımı ve Özellikleri

Çalışmaya dâhil edilen 28 adet sıçanın her birinde endometriozis modeli oluşturulduktan sonra gruplara dağılımları aşağıdaki gibi gerçekleştirildi (Şekil 3.6).

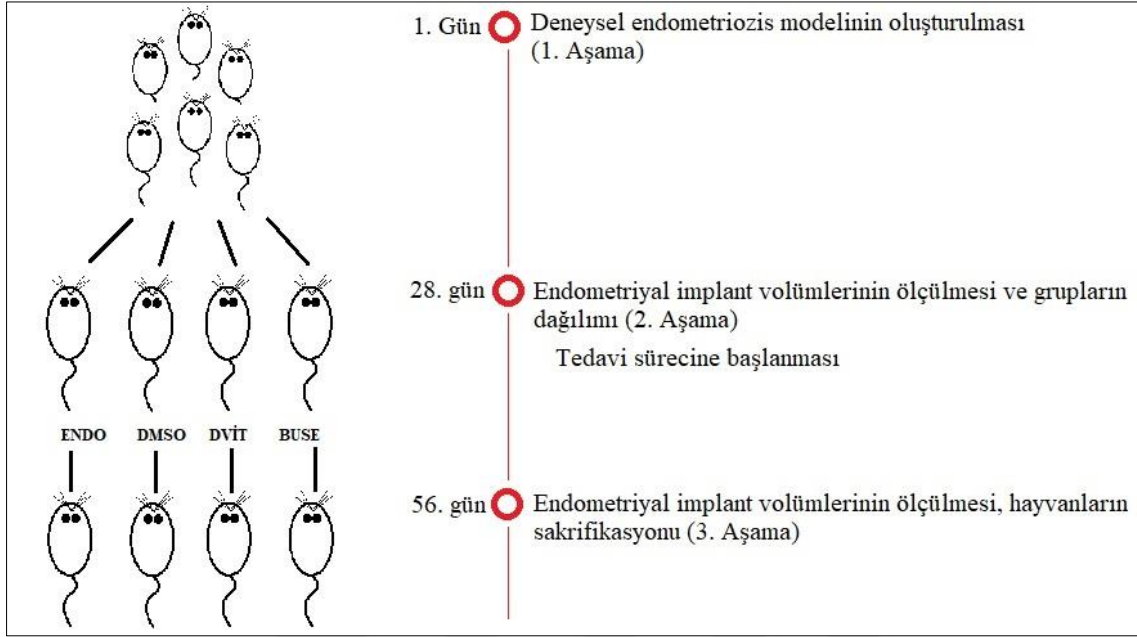
Endometriozis (ENDO) Grubu: Bu grupta yer alan sıçanlara %0,9 NaCl solüsyonu her bir hayvana 0,2 mL olacak şekilde 28 gün boyunca intramüsküler yoldan verildi. 28 günün ardından sıçanlar derin ksilazin-ketamin genel anestezisi altında sakrifiye edildi.

D Vitamini (DVİT) Grubu: Bu grupta yer alan sıçanlara Calcitriol (Katolog No: 1880-50, BioVision, USA) dimetil sülfoksit (Sigma, USA) içerisinde (çözünme oranı 50 mg/ml) çözdürüldükten sonra verildi. Her bir hayvana 0,2 mL karışımdaki doz miktarı 0,05 µg/kg olacak şekilde 28 gün boyunca intramüsküler yoldan verildi [82]. Tedavi süresi olan 28 günün sonunda sıçanlar derin ksilazin-ketamin ile genel anestezi altında sakrifiye edildi.

Dimetil sülfoksit (DMSO) Grubu: Bu grupta yer alan sıçanlara %0,6 konsantrasyonunda hazırlanan DMSO (Sigma, USA) her bir hayvana 0,2 mL olacak şekilde 28 gün boyunca intramüsküler yoldan verildi. 28 günün ardından sıçanlar derin ksilazin-ketamin ile genel anestezi altında sakrifiye edildi.

Buserelin asetat (BUSE) Grubu: Bu grupta yer alan sıçanlara buserelin asetat (Katolog No: B3303-1MG Sigma, USA) çözücüsü olan distile su içerisinde çözdürüldükten sonra her bir hayvana 0,2 mL karışımdaki doz miktarı 20 µg olacak şekilde haftada 1 kez 3 hafta boyunca

subkutan yoldan verildi [83]. Sonrasında sıçanlar derin ksilazin-ketamin ile genel anestezi altında sakrifiye edildi.



Şekil 3.1. Deneysel sürecin özeti

Tüm sıçanların endometriyotik dokuların implante edildiği periton duvarları eksize edildikten sonra %10'luk formaldehit (pH: 7,4) çözeltilerine alındı ve sonrasında rutin histolojik işlemlere tabi tutuldu (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Otomatik doku takibi cihazının basamakları ve süreleri

Kullanılan kimyasal	Süre
Distile su	1 saat
%70'lik alkol	1 saat
%80'lik alkol	1 saat
%96'lık alkol	1 saat
%96'lık alkol	1 saat
%96'lık alkol	1 saat
%96'lık alkol	1 saat
Ksilen	1 saat
Ksilen	1 saat
Ksilen	1 saat
Parafin	1 saat
Parafin	1 saat

Takip cihazından çıkarılan dokular parafin bloklara gömüldükten sonra mikrotomda (Leica RM2245) kesit almaya hazır hale getirildi.

H&E boyamalar için başlangıçta her bir bloktan $\frac{1}{2}$ örneklem aralığında 5 μ m kalınlığında seri kesitler alındı ve mikroskop altında incelendi. İncelemelerin ardından örneklem aralığı 1/20 olarak değiştirilip bloklardan tekrar kesitler alındı ve boyandı.

Masson trichrome ve immünohistokimyasal boyamalar için kesit kalınlığı 5 μ m olarak ayarlandı. Masson trichrome için örneklem aralığı 1/30; immünohistokimyasal boyamalar için örneklem aralığı 1/18 olarak belirlendi. Kesitler H&E, Masson Trichrome ve immünohistokimyasal boyamalar için ayrı preparat kutularında gruplandırılarak saklandı.

3.4. Işık Mikroskopi Analizleri

Rutin histolojik takip aşamalarından sonra mikrotom cihazında alınan kesitlerde çeşitli boyamalar ve immünohistokimyasal analizler yapıldı.

3.4.1. Hematoksilen eozin boyama

Rutin doku takibi basamaklarından sonra tüm deneklere ait endometriyotik implant doku örneklerinden 5 μ m kalınlığında, $\frac{1}{2}$ örneklem aralığında seri kesitler alındı. Kesitler deparafinizasyon işlemi için bir gece boyunca sıcaklığı 60°C derece olan etüv içerisinde tutuldu. Ardından, kesitler oda sıcaklığına getirildi ve laboratuvarımıza ait prosedüre uygun olarak Harris hematoksilen (Katolog No: 05-06004/L, BioOptica) ve eozin Y plus (Katolog No: 05-11007/L) ile boyandı (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Hematoksilen eozin boyama prosedürü

Kullanılan kimyasal	Süre
Ksilen	15 dakika
Ksilen	15 dakika
%96'lık alkol	10 dakika
%96'lık alkol	10 dakika
%80'lik alkol	10 dakika
%70'lik alkol	10 dakika
Havada kurutma	2 dakika
Akarsu	10 dakika
Harris Hematoksilen	9 dakika
Akarsu	10 dakika
Glasiyel asetik asit+alkol çözeltisi	2 kez daldır-çıkart
Akarsu	10 dakika
Eozin	9 dakika
Akarsu	2 dakika
%70'lik alkol	Daldır-çıkart
%80'lik alkol	Daldır-çıkart
%96'lık alkol	Daldır-çıkart
%96'lık alkol	2 dakika
Ksilen	30 dakika
Ksilen	30 dakika

Boyanan kesitler Leica DM 4000B (Germany) bilgisayar destekli ışık mikroskopunda, Leica Q Vin 3 programı kullanılarak görüntülendi.

H&E ile boyanan preparatlarda glandüler bez ve stromal yapıların yanı sıra diğer yapısal özelliklerin analizleri için Strehl ve diğerleri (2014) referans alındı. Ayrıca, hemosiderin yüklü makrafaj varlığı ve granüloma yapılarının gözlenmesi halinde de notlar alındı [84].

3.4.2. Masson Trichrome boyama

Rutin doku takibi basamaklarından sonra tüm deneklere ait endometriyotik implant doku örneklerinden 5 µm kalınlığında, 1/30 örneklem aralığında seri kesitler alındı. Kesitler deparafinizasyon işlemi için bir gece boyunca sıcaklığı 60 °C derece olan etüv içerisinde tutuldu. Deparafinizasyon işleminin ardından kesitler “Masson Trichrome with Aniline blue” (Katolog No: 04-010802, Bio Optica) kiti kullanılarak kit prosedürüne uygun bir şekilde boyandı.

Masson Trichrome boyama kiti prosedürü

1. Kesitler distile su ile yıkandı.
2. Bir tüpün içerisine 6 damla Weigert demir hematoksilen- A solüsyonu ile 6 damla Weigert demir hematoksilen- B solüsyonunu karıştırıldı. Sonrasında bu karışım dokuların üzerine damlatıldı ve 10 dakika boyunca aktivasyonu için beklendi.
3. Yıkama yapmadan kesitlerin üzerindeki solüsyonlar döküldü ve üzerlerine alkolik pikrik asit solüsyonu damlatıldı; 4 dakika boyunca aktivasyonu için beklendi.
4. Kesitler distile suda hızlıca yıkandı (3-4 saniye) ve üzerlerine ponceau asit damlatıldı; 4 dakika boyunca aktivasyonu için beklendi.
5. Kesitler distile suda yıkandı ve üzerlerine fosfomolibdik asit damlatıldı; 10 dakika boyunca aktivasyonu için beklendi.
6. Yıkama yapmadan kesitlerin üzerindeki solüsyonlar döküldü ve üzerlerine Masson aniline blue damlatıldı; 5 dakika boyunca aktivasyonu için beklendi.
7. Kesitler distile suda yıkandı, sırasıyla %70'lik, %80'lik ve %96'lık alkollerden hızlıca geçirildi. Son alkolde 1 dakika boyunca bekletildi. Kesimde saydamlaştırıldı ve entellan ile kapama yapıldı.

Masson Trichrome boyama kiti içerisinde yer alan Weigert demir hematoksilen çekirdekleri siyaha, pikrik asit eritrositleri sarıya, fosfomolibdik asit sitoplazmayı kırmızıya ve aniline blue bağ dokusunu mavi renge boyadı.

Masson Trichrome ile boyanan preparatlarda endometriyotik implant dokularında bulunan fibrozis yüzdeleri, kollagen lif yoğunluğunun analizleri için Zhang ve diğerleri, (2017) referans olarak alındı [85].

Leica DM 4000B (Germany) bilgisayar destekli ışık mikroskopunda, Leica Q Vin 3 programı kullanılarak her bir grup için preparatların x40'lık büyütmelerinde glandüler bez çevresinde yoğunlaşan kollagen lif alanlarından rastgele 5 fotoğraf çekildi ve ardından Image J programı ile lif yoğunlukları yüzde üzerinden hesaplandı. Buna göre; ektopik endometriyumun tüm alanıyla orantılı olarak maviyle boyanan kollagen lif tabakasının alanı hesaplandı.

3.4.3. TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) yöntemi

Rutin doku takibi basamaklarından sonra tüm deneklere ait endometriyotik implant doku örneklerinden 5 µm kalınlığında, implantın başından, ortasından ve sonundan kesitler alındı. Kesitler deparafinizasyon işlemi için bir gece boyunca sıcaklığı 60 °C derece olan etüv içerisinde tutuldu. Deparafinizasyon işleminin ardından kesitler TUNEL Chromogenic Apoptosis Detection Kit (Katolog No: A049, ABP Biosciences, USA) kullanılarak boyandı.

TUNEL Chromogenic Apoptosis Detection Kit prosedürü

1. Deparafinizasyon: Etüvden çıkarılan kesitler oda sıcaklığına geldiğinde dik şaleye yerleştirilir ve sırasıyla şu işlemlerden geçirildi.

- Ksilen (5 dakika)
- Ksilen (5 dakika)
- %100 alkol (5 dakika)
- %100 alkol (5 dakika)
- %95 alkol (5 dakika)
- %85 alkol (5 dakika)
- %75 alkol (5 dakika)
- 1X PBS (5 dakika)
- 1X PBS (5 dakika)

2. Dokuların etrafı pap pen (Katolog No: 3 NAN 0002, Nandai) ile çizilir ve kesitler immün boyama setine dizildi.

3. Enzim Uygulaması: Kesitlerin üzerine proteinaz K (Katolog No: P-480-100, Goldbio) damlatıldı ve 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi.

4. Kesitler 5 dakika (2 kez) PBS ile yıkandı.

5. Endojen Peroksidaz İnhibisyonu: Kesitler %2'lik hidrojen peroksidaz (Katolog No: TA-125-H202Q Thermo, UK) ile oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.

6. Kesitler 5 dakika (2 kez) PBS (Katolog No: PBS-10XA, Capricorn) ile yıkandı.

7. Kesitlerin üzerlerine TdT reaction buffer (Component A) damlatıldı ve 10 dakika bekletildi.

8. İşaretleme: Kesitlerin üzerlerine TdT solüsyonu damlatıldı ve kesitler 37°C derece sıcaklığındaki etüv içerisinde 60 dakika inkübe edildi.

- TdT solüsyonunun hazırlanışı,
- 10 örnek için,

TdT reaction buffer (Component A)	470 µL
TdT enzyme (Component B)	20 µL
Biotin-11-dUTP (Component C)	10 µL
Toplam hacim	500 µL

- Kesitlerin üzerindeki solüsyonun daha iyi yayılması için solüsyon damlatıldıktan sonra üzerleri parafilm ile kapatıldı.

9. TdT reaksiyonu, dokuların 10 dakika (2 kez) 2X SSC ile inkübasyonu sonucu durduruldu.

10. Kesitler 10 dakika (2 kez) %3 BSA (PBS içerisinde) ile yıkandı.

11. Antikor Reaksiyonu: Kesitler 30 dakika HRP-Streptavidin (Katolog No: TS-060-HR, Thermo, UK) boya solüsyonu ile karanlık bir ortamda, oda sıcaklığında inkübe edildi.

- HRP-Streptavidin boya solüsyonunun hazırlanışı,
- 10 örnek için,

HRP-Streptavidin (Component D)	10 µL
Staining buffer	990 µL
Toplam hacim	1000 µL

- Staining buffer: 0,6 M NaCl, 60 mM sodyum sitrat, %0,1 Triton X-100, %1BSA, pH 7.4

12. Kesitler 5 dakika (2 kez) %3 BSA (PBS içerisinde) ile yıkandı.

13. Renk Oluşturma: Kesitlerin üzerlerine diaminobenzidine (DAB) (Katolog No: TA-060-HSX Thermo, UK) damlatıldı ve kesitler 60 dakika, karanlık bir ortamda, oda sıcaklığında bekletildi. Reaksiyon PBS ile durduruldu.

- DAB solüsyonunun hazırlanışı,
- 10 örnek için,

DAB stok solution (Component E)	30 μ L
DAB diluent (Component F)	970 μ L
Toplam hacim	1000 μ L

14. Zıt Boyama: Kesitler hematoksilin ile 10 saniye boyandı ve ardından musluk suyu dolu bir kapta daldır-çıkart yapılarak fazla boyadan arındırıldı.

15. Kapatma: Kesitler artan alkol serilerinden geçirildikten sonra ksilene alındı ve ksilende 15 dakika bekletildi. Entellan ile kapama yapıldı.

DNA'nın internükleozomal bölünmesi apoptozis için ayırt edici bir özelliktir. Doku kesitlerinde, apoptotik hücrelerdeki DNA bölünmesi, TUNEL yöntemi kullanılarak yerinde tespit edilebilir. Bu yöntem DNA'da meydana gelen kırılmalar sonucu serbest kalan 3'-OH uçlarının modifiye edilmiş nükleotidler (dUTP) ile enzimatik (TdT) olarak etiketlenmesi sayesinde DNA fragmentasyonunun belirlenmesini sağlar. TUNEL, apoptotik hücrelerin tespiti için oldukça seçicidir; nekrotik hücrelerde meydana gelen veya ilaç kaynaklı DNA hasarlarını tespit etmez [86].

Apoptotik hücre sayısının belirlenmesi

Tüm gruplara ait işaretlenmiş apoptotik hücre sayımı Leica DM 4000B (Germany) bilgisayar destekli ışık mikroskobunda, Leica Q Vin 3 programı kullanılarak yapıldı. Sayım işlemi kesitler üzerinde x40'luk büyütmelemlerde 10 farklı birim alan içine düşen apoptotik hücrelerin sayılması ile gerçekleştirildi. Böylece toplam 10 kesitteki hücre sayısı her bir sıçan için kaydedildi [87].

3.4.4. İmmünohistokimya

Rutin doku takibi basamaklarından sonra tüm deneklere ait endometriyotik implant doku örneklerinden 5 μ m kalınlığında, 1/15 örneklem aralığında kesitler alındı. Kesitler

deparafinizasyon işlemi için bir gece boyunca sıcaklığı 60 °C derece olan etüv içerisinde tutuldu. Deparafinizasyon işleminin ardından kesitler Bcl-2 ve Bax antikolarıyla immünohistokimyasal boyama yapılarak immün reaktivite açısından değerlendirildi.

Bcl-2 ve Bax immünohistokimyasal kit prosedürleri

1. Etüvden çıkarılan kesitler oda sıcaklığına getirildikten sonra ksilende 1 gece bekletildi.
2. Kesitler dik şaleye yerleştirildi ve sırasıyla %100, %96, %80 ve %75'lik alkol serilerinden geçirildi.
3. Distile su ile yıkandı.
4. Antijen Retrieval: Kesitler, mikrodalga fırın içerisine yerleştirilen içi citrate buffer (Katolog No: 005000, Life Tech) (pH = 6,0) dolu bir kaptaki 30 dakika boyunca işleme tabi tutuldu.
5. Kesitler oda sıcaklığına getirildi.
6. Dokuların etrafı pap-pen ile çizildi ve kesitler immün boyama setine dizildi.
7. PBS ile 3 kez yıkandı.
8. Endojen Peroksidaz İnhibisyonu: Kesitler hidrojen peroksidaz ile oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.
9. PBS ile 3 kez yıkandı.
10. Ultra V Block (Katolog No: TA-060-UB, Thermo, UK) solüsyonu ile oda sıcaklığında 30 dakika işlem gördü.
11. Kesitler, Bcl-2 polyclonal antibody³ (Katolog No: bs-4563R, 1:300, Bioss, USA) ve Bax polyclonal antibody⁴ (Katolog No: bs-0127R, 1:300, Bioss, USA) ile +4°C derecede 1 gece inkübe edildi.

³Bcl-2 antikoru mitokondriyal hücre geçirgenliğini kontrol ederek hücre ölümünü düzenler. Kaspaz ile geri bildirim şeklinde çalışır. Kaspas aktivasyonunu, mitokondrilerden sitokrom c'nin salınımını inhibe ederek ve/veya APAF-1'e bağlanarak engeller.

⁴Bax antikoru stres koşulları altında mitokondri membranında konformasyon değişikliklere yol açar. Sonuçta, mitokondri membran translokasyonu ile sitokrom c salınımı gerçekleşir; hücrede apoptotik süreç tetiklenir.

12. PBS ile 3 kez yıkandı.

13. Biotinylated Goat Anti-Polyvalent (Katolog No: TP-060-BN, Thermo, UK) ile oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi.

14. PBS ile 3 kez yıkandı.

15. Streptavidin Peroxidase (Katolog No: TS-060-HR, Thermo, UK) ile oda sıcaklığında 30 dakika konjuge edildi.

16. PBS ile 3 kez yıkandı.

17. Renk Oluşturma: Kesitlerin üzerlerine DAB damlatıldı ve kesitler 60 dakika, karanlık bir ortamda, oda sıcaklığında bekletildi. Reaksiyon PBS ile durduruldu.

18. PBS ile 3 kez yıkandı.

19. Zıt Boyama: Hematoksilen damlatıldı ve hemen musluk suyu ile yıkandı.

20. %75, %80, %96 ve %100'lük alkol serilerinden geçirildi; %100 alkolde 1 dakika bekletildi.

21. Ksilende 15 dakika bekletildi.

22. Kapama: Entellan ile kapama yapıldı.

Bcl-2 apoptozisi bloke ederek hücrenin hayatta kalmasını sağlar ve bu nedenle apoptotik süreçte önemli bir elemandır. Bir hücre apoptotik sürece girdiğinde yapısında birtakım değişiklikler gözlenir. Bunlar; çekirdek fragmentasyonu, membranda içi organel dolu apoptotik cisimciklerin varlığı ve hücre büzüşmesidir [88].

Çalışmamızda, streptavidin-biotin peroksidaz immünohistokimyasal tekniği ile endometriyal implantlardaki stromal ve glandüler epitelyumdaki Bcl-2 ve Bax ekspresyonları gösterildi. Negatif kontrol olarak ardışık alınan her kesit çiftinin bir tanesine primer antikor yerine PBS damlatıldı.

3.5. ELISA

Peritoneal sıvıdaki VEGF ve TNF- α değerleri enzim bağlı immünosorbent kiti (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay; ELISA) kullanılarak ölçüldü. Bunun için sıçanların pelvis bölgesinden peritoneal sıvı örnekleri alındı ve steril kontrufaj tüplerin içine konulduktan sonra 4 °C derecede 10 dakika boyunca 3000 rpm’de santrifüj edildi [89]. Supernatant ve sedimentler santrifüj tüplerine alındı ve -80 °C derecede saklandı.

Rat Tumor Necrosis Factor Alpha ve Vascular Endothelial Cell Growth Factor ELISA Kitleri Prosedürü

ELISA prosedürü hem TNF- α (Katolog No: E0764Ra, bt-laboratory, Shanghai, China) hem de VEGF (Katolog No: E0659Ra, bt-laboratory, Shanghai, China) antikorları için aynı işlem basamaklarını içermektedir. Bütün reaktifler, standart solüsyonlar ve örnekler tanımlandığı gibi hazırlandı.

1. Tüm reaktifler kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirildi. Bu test oda sıcaklığında yapılmaktadır.
2. Test için gerekli olan şeritler hesaplandı.
3. Şeritler çerçevede kullanılmak için yerleştirildi. Kullanılmayacak olan şeritler 2 ile 8°C derece arasında saklanmalıdır.
4. Standart kuyulara 50 μ l standart eklendi. Not: Standart kuyulara antikor (antibody) eklenmez çünkü standart solüsyon biyotinli antikor içermektedir.
5. Örnek kuyulara 40 μ l örnek eklendi ve sonrasında yine örnek kuyulara 10 μ l anti-TNF-A antikor (veya VEGF antikor) eklendi, devamında örnek kuyulara ve standart kuyulara 50 μ l “Streptavidin-HRP” eklendi (boş kontrol kuyulara değil). İyice karıştırıldı.
6. Plakaların üzeri bir kaplama ile kapatıldı. 37°C derecede 60 dakika boyunca inkübe edildi.
7. Plakaların üzeri açıldı ve plakalar 5 kez “Wash” tamponu ile yıkandı.
8. Bütün kuyularda geçerli olmak üzere her bir kuyu 30 - 60 saniye arası en az 0,35 ml “Wash” tamponu ile iyice ıslatıldı.

9. Otomatik yıkama için, tüm kuyular aspire edildi ve 5 kez “Wash” tamponu ile yıkama yapıldı, kuyular ağzına kadar dolacak şekilde “Wash” tamponu ile doldurulup yıkama yapıldı.

10. Plakalar kurutma kâğıdı üzerinde kurutuldu.

11. Her bir kuyuya 50 µl “Substrat Solüsyon A” ve 50 µl “Substrat Solüsyon B” eklendi.

12. Plaka yeni bir kaplama kullanılarak kapatıldı ve karanlıkta 37°C derecede 10 dakika boyunca inkübe edildi.

13. Her bir kuyuya 50 µl “Stop” solüsyonu eklendi, mavi renk hemen sarı renge dönüştü.

14. “Stop” solüsyonu ekledikten sonra 10 dakika içerisinde 450 nm’de “Microplate Reader”da acilen okutuldu.

Kit içerisinde olmayan fakat deney esnasında gerekli olan malzemeler şunlardır; 37°C ± 0,5 °C inkübatör, absorbant kâğıt, pipet, tüp, distile su, “Microplate Reader” 450 ± 10 nm dalga boyunda filtre.

ELISA, Engvall ve Perlmann tarafından 1971 yılında peptit, protein, antikor ve hormon gibi çözülebilen substratların tespit edilmesini ve ölçülebilmesini mümkün hale getirmek için geliştirdikleri bir testtir. ELISA’da bir antijen (hedef makro molekül) yüzeyde (mikroplate) hareketsiz hale getirildikten sonra enzime bağlı bir antikor ile etkileşime girmesi sağlanır. Antikora bağlanan enzimin aktivitesini ölçme temeline dayanan kantitatif bir ölçüm yöntemidir [90].

3.6. Üç Boyutlu Modelleme

Deney gruplarına ait endometriyal bez ve stroma örneklerinin histolojik değerlendirilmesi sonucu elde edilen bulgular Cinema 4D Release 23 (Maxon computer GmbH, Friedrichsdorf Germany) adlı modelleme ve animasyon programı kullanılarak 3 boyutlu hale getirildi. Elde edilen görüntülerden HDRI ve global illumination ile 1280 x 720 dpi şeklinde tiff formatında render’lar alınarak, elde edilen histolojik görüntüler üç boyutlu olarak görselleştirildi.

3.7. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler için GraphPad Prism (Version 8.0.0 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA) programı kullanıldı. Tüm verilerin ortalama değerlerinin gruplar arasında karşılaştırmalı olarak incelenmesinden önce Shapiro-Wilk ile normallik testi yapıldı ($p > 0,05$). Normal dağılım göstermeyen veriler için ise Mann-Whitney-U testi kullanıldı. Tüm verilerin gruplar arası istatistiksel değerlendirmeleri için One Way ANOVA testi kullanıldı. İkili karşılaştırmalarda ise Unpaired t testi kullanıldı. İstatistiksel olarak anlamlılık $p < 0,05$ değeri olarak kabul edildi.





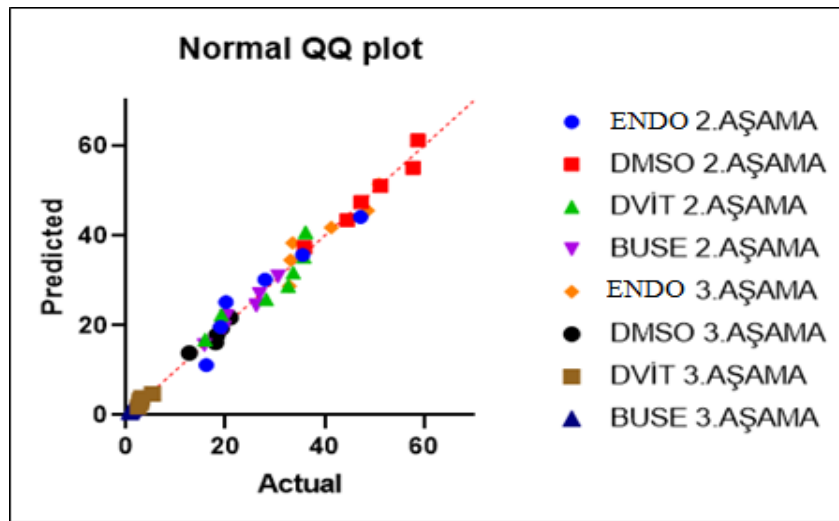
4. BULGULAR

4.1. Makroskobik Bulgular

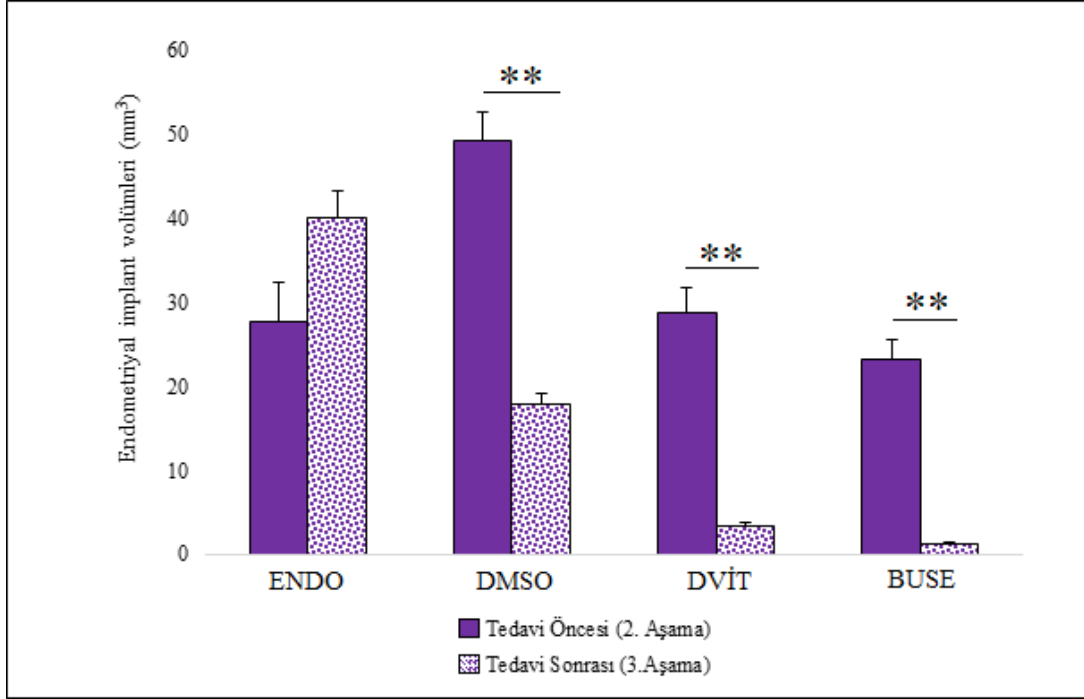
Endometriyal implantların volüm hesaplamaları ve adezyon skorlarının bulguları elde edildi ve değerlendirildi.

4.1.1. Endometriyal implant volümleri

Tedavi öncesi (2. aşama) veriler tüm gruplarda normal dağılıma sahip iken tedavi sonrası (3. aşama) D vitamini grubuna ait veriler normal dağılıma sahip değildi (Şekil 4.1). Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p < 0,05$). İkili karşılaştırmalarda endometriozis grubunda tedavi öncesi (2. aşama) ile tedavi sonrası (3. aşama) endometriyal implant volümleri açısından anlamlı bir fark bulunmadı ($p = 0,093$). DMSO grubunda tedavi öncesi (2. aşama) ile tedavi sonrası (3. aşama) endometriyal implant volümleri açısından anlamlı bir fark bulundu ($p = 0,004$). D vitamini grubunda tedavi öncesi (2. aşama) ile tedavi sonrası (3. aşama) endometriyal implant volümleri açısından anlamlı bir fark bulundu ($p = 0,002$). Buserelin asetat grubunda tedavi öncesi (2. aşama) ile tedavi sonrası (3. aşama) endometriyal implant volümleri açısından anlamlı bir fark bulundu ($p = 0,004$). Buna göre, endometriyal implant volümlerinde endometriozis grubu hariç diğer gruplarda küçülme gerçekleşti (Şekil 4.2) (Resim 4.1- Resim 4.7).



Şekil 4.1. Endometriyal implant volümlerinin normallik testi sonuçları (p değerleri sırasıyla; ENDO 2.aşama = 0,392; DMSO 2.aşama = 0,731; DVİT 2.aşama = 0,115; BUSE 2.aşama = 0,733; ENDO 3.aşama = 0,104; DMSO 3.aşama = 0,277; DVİT 3.aşama = 0,035; BUSE 3.aşama = 0,413)



Şekil 4.2. Endometriyal implant volümlerin ortalama \pm SEM değerleri (**: $p < 0,05$)

4.1.2. Adezyon skorları

Blauer (1988)'in karın içi adezyon alanlarının varlığı ve puanlaması sistemine göre bir değerlendirme yapıldı. Buna göre, tedavi öncesi sonuçlarına göre sıçanların hepsinde en az 1 puana karşılık gelen adezyon alanları tespit edildi. Tedavi sonrasında ise her grupta en az 1 tane ölçülemeyecek kadar küçük adezyon alanları vardı; adezyon skorları 1 ile 4 arasında değişmekteydi. Endometriozis grubunda tedavi öncesi (2. aşama) ile tedavi sonrası (3. aşama) adezyon skorları açısından anlamlı bir fark bulunmadı ($p = 0,246$). DMSO grubunda tedavi öncesi (2. aşama) ile tedavi sonrası (3. aşama) adezyon skorları açısından anlamlı bir fark bulunmadı ($p = 0,622$). D vitamini grubunda tedavi öncesi (2. aşama) ile tedavi sonrası (3. aşama) adezyon skorları açısından anlamlı bir fark bulundu ($p = 0,010$). Buserelin asetat grubunda tedavi öncesi (2. aşama) ile tedavi sonrası (3. aşama) adezyon skorları açısından anlamlı bir fark bulunmadı ($p = 0,070$) (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Gruplara ait adezyon skorların ortalama \pm SEM değerleri (*: $p < 0,05$)

Gruplar	Tedavi Öncesi (2. Aşama)	Tedavi Sonrası (3. Aşama)
ENDO	2,28 \pm 0,47	3,00 \pm 0,30
DMSO	3,33 \pm 0,33	3,16 \pm 0,65
DVİT	2,87 \pm 0,29	0,71 \pm 0,56*
BUSE	3,00 \pm 0,32	1,50 \pm 0,59

4.2. Histolojik Bulgular

Endometriyal bezler ve stromal yapılar H&E boyaması, kollagen lif yoğunlukları ise Masson Trichrome kiti kullanılarak değerlendirildi.

4.2.1. Endometriyal bez ve stromal yapı

Hematoksilen ve eozin bulgularında, deneysel endometriozis modeli oluşturulan grupta, epitel dokusunda yer yer dökülme ve kayıplar görüldü. Epitel hücrelerinde vakuolizasyon ve volüm artışı saptandı. Endometriyal stromada vaskülarizasyonun artmasına bağlı olarak çok sayıda kan damarları, ekstrasvaze eritrositler, hemosiderin pigment granülleri dikkati çekti (Resim 4.9- Resim 4.15).

Dimetil sülfoksit grubuna ait endometriyal implant dokusunda, vakuolizasyonun görüldüğü bez epitel hücreleri, endometriyal bez lümeni içinde yoğun hücre infiltrasyonu, bezleri çevreleyen stromal hücrelerde yoğunluk ve hücre infiltrasyonları dikkati çekti (Resim 4.16- Resim 4.17).

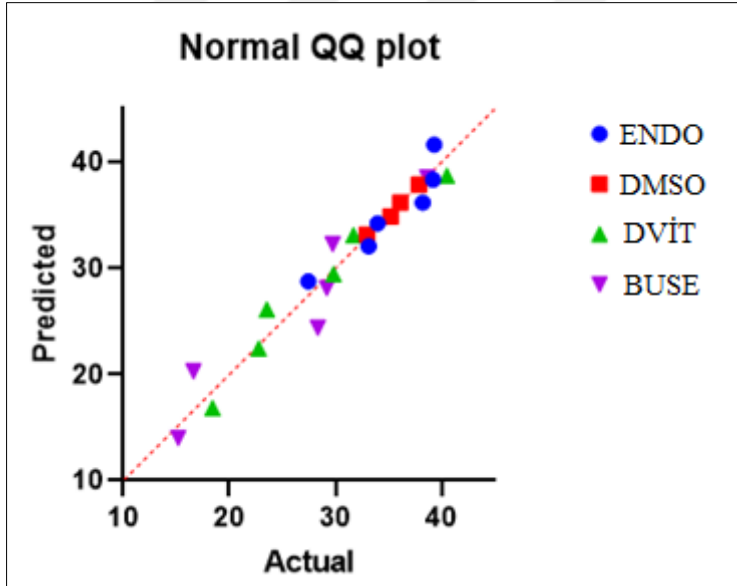
D vitamini grubuna ait endometriyal implant dokusunda, endometriyal bezlerde epitel hücrelerinde vakuolizasyon, epitel hücre kaybı, bez epitel hücrelerinde yer yer lümen içine dökülmeler olduğu gözlemlendi. Stromada, endometriozis grubuna göre vaskülarizasyonun, stromal yoğunluğun, hücre infiltrasyonunun azaldığı dikkati çekti. Endometriozis grubunda stromada görülen hemosiderin pigment granüllerinin olmayışı dikkati çekti (Resim 4.18- Resim 4.19).

Buserelin asetat grubuna ait endometriyal implant dokusunda endometriyal bezlerde atrofi, stromal hücre yoğunluğunda azalma, vaskülarizasyon ve hücre infiltrasyonunda azalmanın yanı sıra hemosiderin pigment granüllerinin olmaması dikkati çekti (Resim 20- Resim 21).

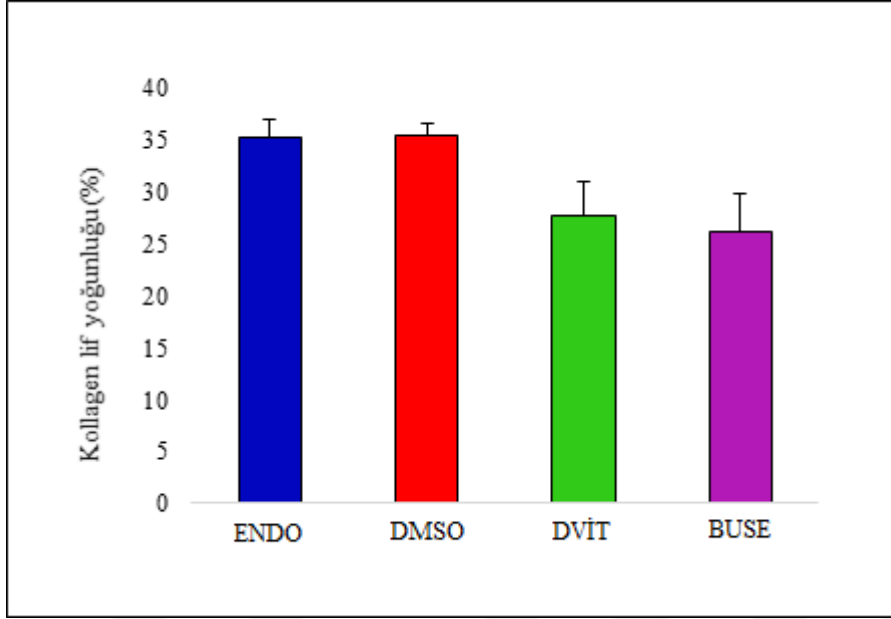
4.2.2. Kollagen lif yoğunluğu

Gruplara ait ektopik endometriyumun tüm alanıyla orantılı olarak aniline blue ile boyanan kollagen lif tabakası alan yüzdeleri Image J Programı kullanılarak ölçüldü ve istatistiksel olarak değerlendirildi.

Kollagen lif yoğunluğu sonuçları normal dağılım göstermektedir (Şekil 4.3). Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p = 0,070$). Gruplar ikili olarak birbirleriyle karşılaştırıldığında endometriozis ve DMSO grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p = 0,897$). Endometriozis ve D vitamini grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p = 0,075$). Endometriozis ve buserelin asetat grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p = 0,054$). Kollagen lif yoğunluklarının D vitamini ve buserelin asetat gruplarında az olduğu belirlendi (Şekil 4.4).



Şekil 4.3. Kollagen lif yoğunlukların normallik testi sonuçları (p değerleri sırasıyla; ENDO=0,872; DMSO = 0,993; DVİT = 0,993; BUSE = 0,900)



Şekil 4.4. Kollagen lif yoğunluklarının ortalama \pm SEM değerleri

Deneysel endometriozis oluşturulan grupta, endometriyal stromada vaskülarizasyonun arttığını gösteren çok sayıda kan damarı, ekstravaze kan hücreleri dikkati çekti. Stromal hücre yoğunluğu ve kalın demetler yapmış kollagen liflerin varlığı fibrotik değişiklikleri göstermekteydi (Resim 4.22- Resim 4.23).

DMSO grubunda deneysel endometriozis grubu ile benzer şekilde fibrotik değişiklikler, yoğun stromal hücreler, kalın kollagen lif demetleri saptandı (Resim 4.24).

D vitamini grubunda stromada atrofiye giden bez toplulukları gözlenirken, kollagen lif yoğunluğu ve stromal hücre yoğunluğunun deneysel endometriozis grubuna göre belirgin olarak azaldığı dikkati çekti (Resim 4.25).

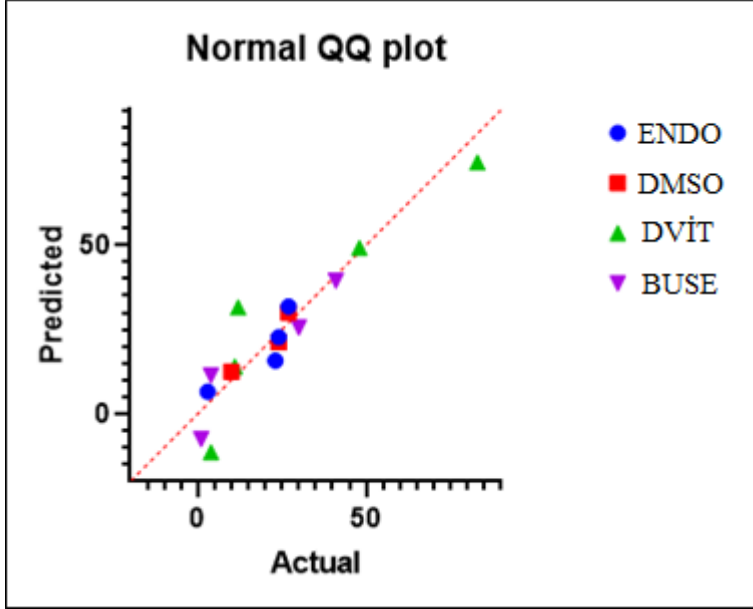
Buserelin asetat grubunda vasküler yoğunluğun ve fibrotik değişikliklerin endometriyozis grubuna göre azaldığı gözlemlendi (Resim 4.26).

4.2.3. Gruplar arası apoptotik hücre sayımları

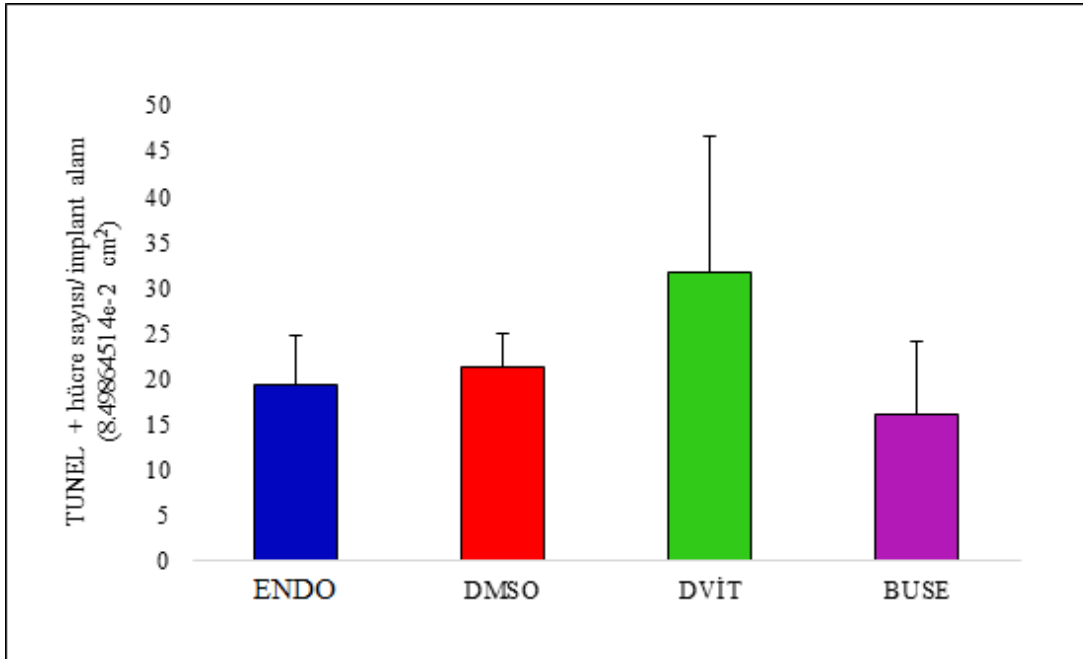
TUNEL pozitif boyanan apoptotik hücreler Image J Programı kullanılarak sayıldı ve istatistiksel olarak değerlendirildi.

Apoptotik hücre sayım sonuçları normal dağılım göstermekteydi (Şekil 4.5). Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p = 0,692$). Gruplar ikili olarak karşılaştırıldığında endometriozis ve DMSO grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadı

($p=0,774$). Endometriozis ve D vitamini grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p = 0,506$). Endometriozis ve buserelin asetat grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p = 0,764$). Endometriyal implant alanına oranlandığında D vitamini grubuna ait TUNEL pozitif hücre yoğunluğu daha fazla bulundu (Şekil 4.6) (Resim 4.27- Resim 4.32).



Şekil 4.5. TUNEL pozitif boyanan apoptotik hücre sayımlarının normallik testi sonuçları (p değerleri sırasıyla; ENDO = 0,257; DMSO = 0,072; DVİT = 0,171; BUSE = 0,096)



Şekil 4.6. TUNEL pozitif boyanan apoptotik hücre sayılarının ortalama \pm SEM değerleri

4.3. İmmünohistokimyasal Bulgular

İmmünohistokimyasal değerlendirmelerde apoptotik sürecin belirteçleri olan Bcl-2 ve Bax immün reaktiviteleri gözlemlendi.

4.3.1. Bcl-2 ve Bax immün reaktiviteleri

Gruplar Bcl-2 immün reaktiviteleri bakımından değerlendirildiğinde yoğun antikor tutunumunun endometriozis ve DMSO gruplarında olduğu gözlemlendi (Resim 4.33, Resim 4.34). D vitamini ve buserelin asetat gruplarındaki hücrelerin immün reaktivite yoğunlukları birbirine benzerdi (Resim 4.35, Resim 4.36). Gruplar Bax immün reaktiviteleri bakımından değerlendirildiğinde yoğun tutunumunun D vitamini ve buserelin asetat gruplarında olduğu gözlemlendi (Resim 4.35, Resim 4.36).

4.4. ELISA

Gruplara ait peritoneal sıvılardaki VEGF ve TNF- α değerleri tedavi öncesi (2. aşama) ve sonrası (3. aşama) karşılaştırma yapmak üzere değerlendirildi.

4.4.1. Peritoneal VEGF bulguları

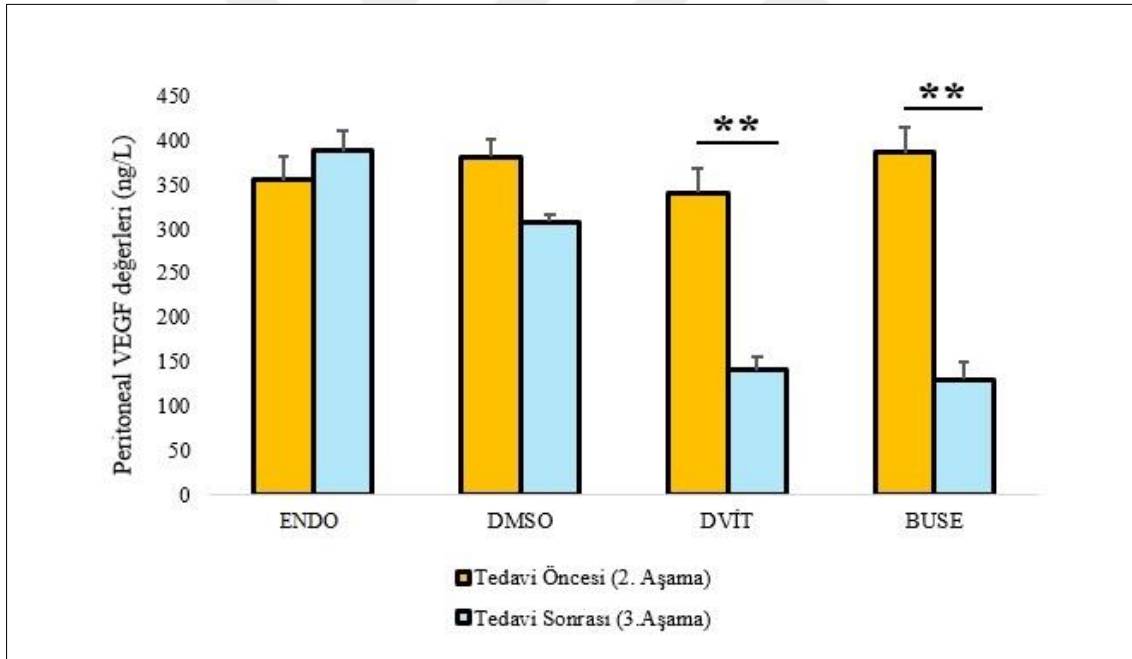
Sıçanlarından tedavi öncesinde (2. aşama) alınan peritoneal sıvı örneklerinden yapılan VEGF değerleri için ELISA testinden çıkan sonuçlar normal dağılım göstermektedir. Gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadığı tespit edildi ($p = 0,906$). İkili karşılaştırmalarda, endometriozis ile DMSO grubu arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p = 0,648$). Endometriozis ile D vitamini grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p = 0,809$). Endometriozis ile buserelin asetat grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p = 0,801$).

Sıçanlarından tedavi sonrasında (3. aşama) alınan peritoneal sıvı örneklerinden yapılan VEGF değerleri için ELISA testinden çıkan sonuçlar normal dağılım göstermektedir. Gruplar arasında anlamlı farklar olduğu tespit edildi ($p < 0,05$). İkili karşılaştırmalarda DMSO ile buserelin asetat grupları arasında anlamlı bir fark olduğu ($p < 0,05$); D vitamini ile buserelin asetat grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadığı tespit edildi ($p = 0,265$). DMSO ile D vitamini grupları arasında anlamlı bir fark olduğu tespit edildi ($p < 0,05$).

Çizelge 4.2. Gruplara ait peritoneal VEGF değerlerinin ortalama \pm SEM değerleri (*: $p < 0,05$)

Gruplar	Tedavi öncesi (2. aşama)	Tedavi sonrası (3. aşama)
ENDO	355,341 \pm 25,522 ng/L	387,783 \pm 22,381 ng/L
DMSO	380,856 \pm 20,983 ng/L	308,004 \pm 8,495 ng/L
DVİT	340,937 \pm 26,724 ng/L	140,461 \pm 14,165 ng/L*
BUSE	386,092 \pm 28,860 ng/L	129,465 \pm 20,863 ng/L *

Gruplar peritoneal VEGF değerleri için 2. ve 3. aşama sonuçları bakımından karşılaştırıldığında Endometriyozis ve DMSO gruplarının 2. aşama ile 3. aşama sonuçları arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0,05$); D vitamini ve buserelin asetat gruplarının 2. aşama ile 3. aşama sonuçları arasında anlamlı bir fark bulundu ($p < 0,05$) (Çizelge 4.2) (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Peritoneal VEGF değerlerinin ortalama \pm SEM değerleri (**: $p < 0,05$)

4.4.2. Peritoneal TNF- α bulguları

Sıçanlarından tedavi öncesinde (2. aşama) alınan peritoneal sıvı örneklerinden yapılan TNF- α değerleri için ELISA testinden çıkan sonuçlar normal dağılım göstermektedir. Gruplar arasında anlamlı fark bulundu ($p = 0,009$). İkili karşılaştırmalarda, endometriyozis ile DMSO grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p = 0,372$). Endometriyozis ile D vitamini

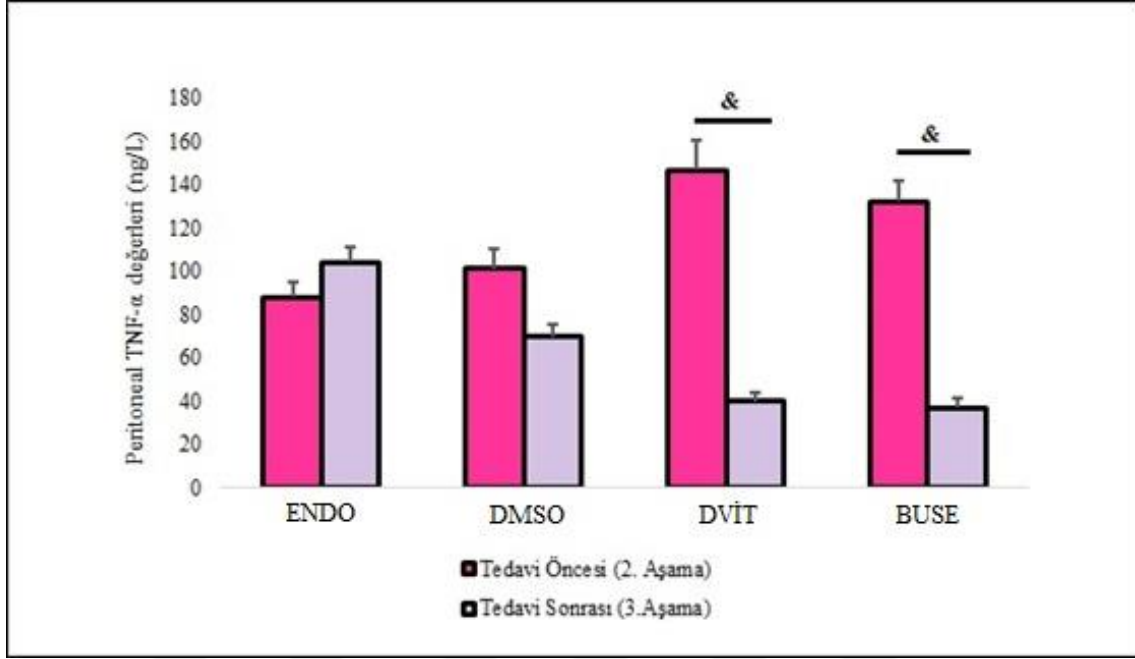
grupları arasında anlamlı bir fark bulundu ($p = 0,010$). Endometriozis ile buserelin asetat grupları arasında anlamlı bir fark bulundu ($p = 0,008$).

Sıçanlarından tedavi sonrasında (3. aşama) alınan peritoneal sıvı örneklerinden yapılan TNF- α değerleri için ELISA testinden çıkan sonuçlar normal dağılım göstermektedir. Gruplar arasında anlamlı fark olduğu tespit edildi ($p < 0,05$). İkili karşılaştırmalarda, endometriozis ile DMSO grupları arasında anlamlı bir fark bulundu ($p = 0,013$). Endometriozis ile D vitamini grubu; endometriozis ile buserelin asetat grubu arasında da anlamlı bir fark bulundu ($p < 0,05$).

Çizelge 4.3. Gruplara ait peritoneal TNF- α değerlerinin ortalama \pm SEM değerleri (*: $p < 0,05$)

Gruplar	Tedavi öncesi (2. aşama)	Tedavi sonrası (3. aşama)
ENDO	87,961 \pm 6,744 ng/L	104, 086 \pm 7,129 ng/L
DMSO	101,234 \pm 8,970 ng/L	69,775 \pm 5,625 ng/L
DVİT	146,754 \pm 14,204 ng/L	39,916 \pm 4,097 ng/L*
BUSE	132, 465 \pm 9,171 ng/L	37,007 \pm 4,520 ng/L*

Gruplar peritoneal TNF- α değerleri için 2. ve 3. aşama sonuçları bakımından karşılaştırıldığında DMSO ve endometriozis gruplarının 2. aşama ile 3. aşama sonuçları arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p = 0,054$ ve $p = 0,179$ sırasıyla). D vitamini ve buserelin asetat gruplarının 2. aşama ile 3. aşama sonuçları arasında anlamlı bir fark bulundu ($p < 0,05$) (Çizelge 4.3) (Şekil 4.8).



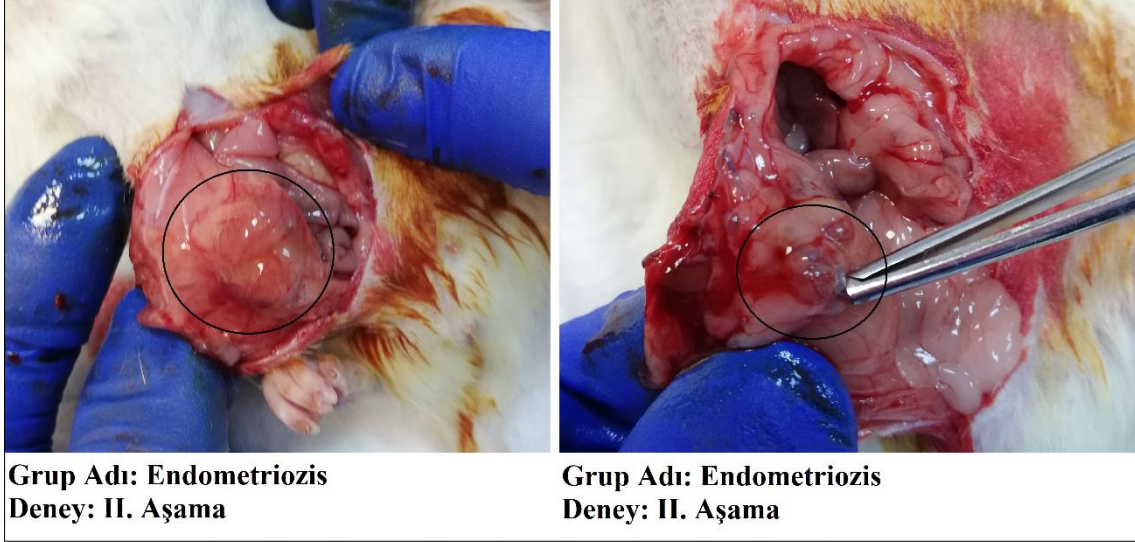
Şekil 4.8. Peritoneal TNF- α değerlerinin ortalama \pm SEM değerleri (& : $p < 0,05$)

4.5. Üç Boyutlu Modelleme Bulguları

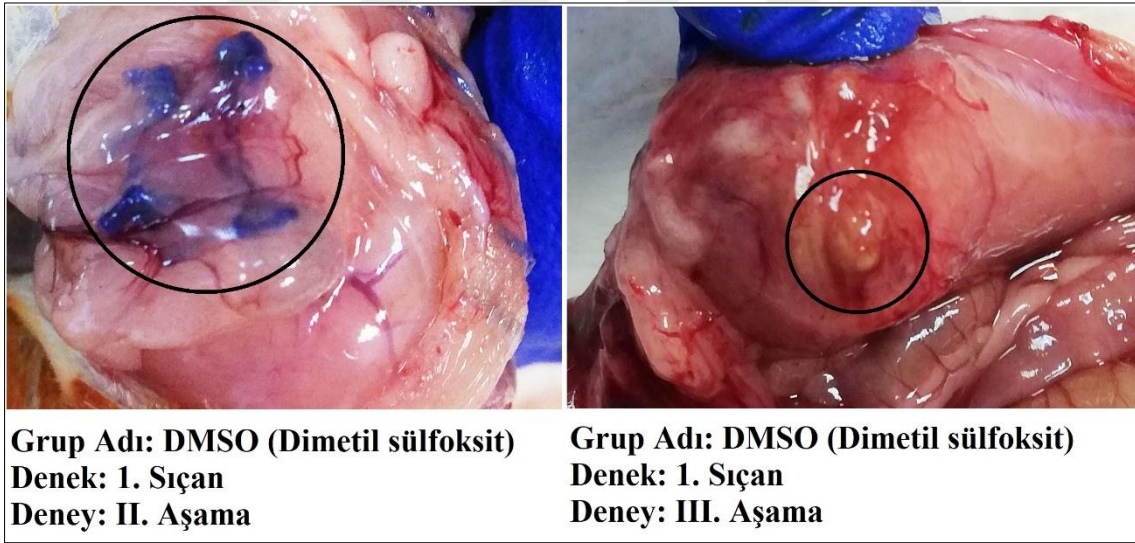
Endometriozise ait patolojik yapıların ve tedavi grubunun görsel olarak daha iyi anlaşılması açısından, ışık mikroskopik görüntülerden elde edilen bulgular üç boyutlu hale getirilerek uzaysal anlamda bir derinlik kazandırıldı (Resim 4.37).

Resimler

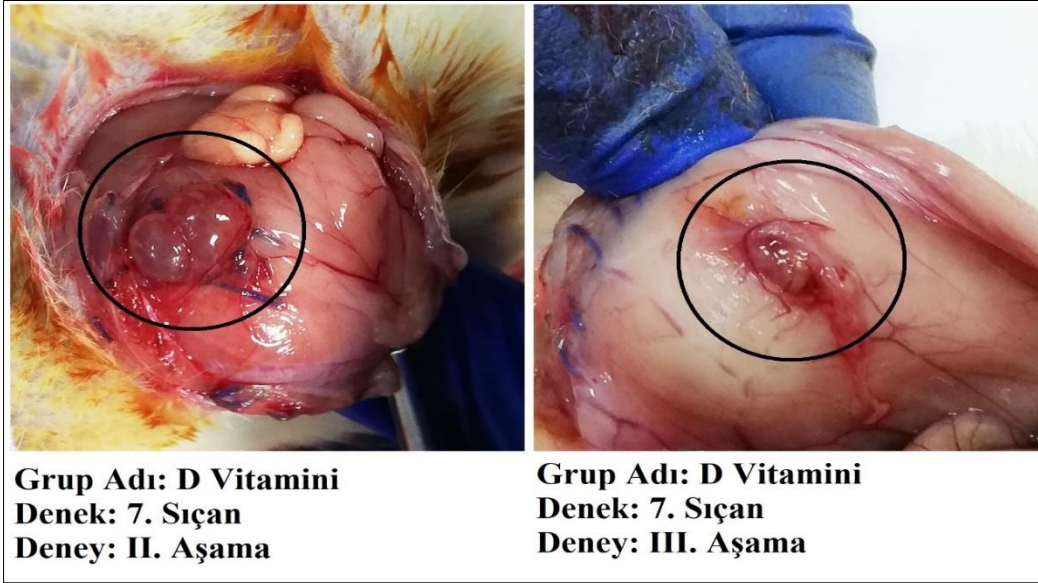
Deney gruplarındaki endometriyal implantların makroskopik görüntüleri



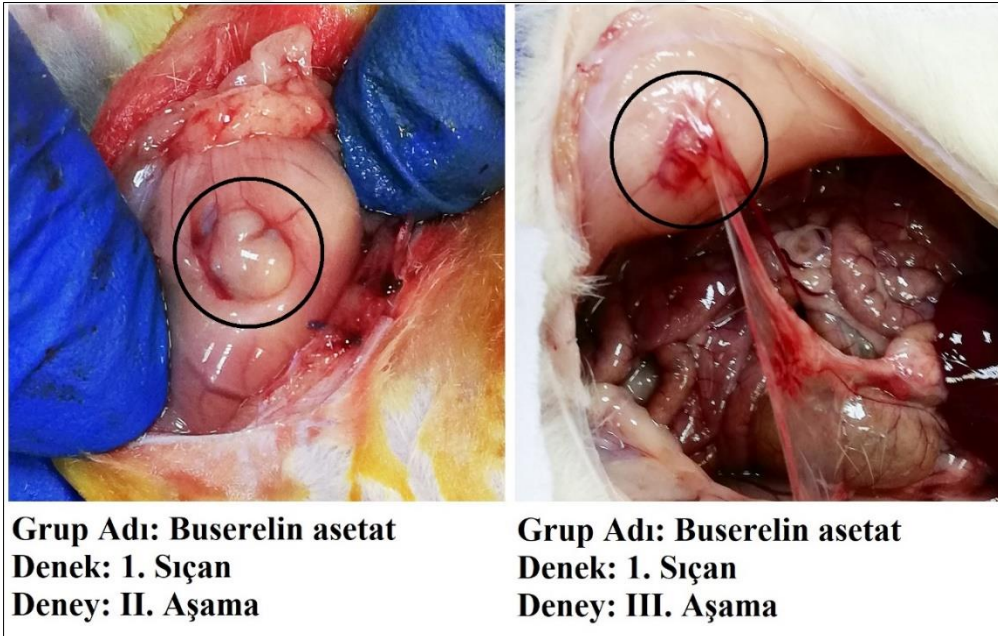
Resim 4.1. Endometriozis grubuna ait II. aşamadaki endometriyal implant (yuvarlak içinde) sonuçlarının farklı iki sıçandaki makroskopik görüntüleri



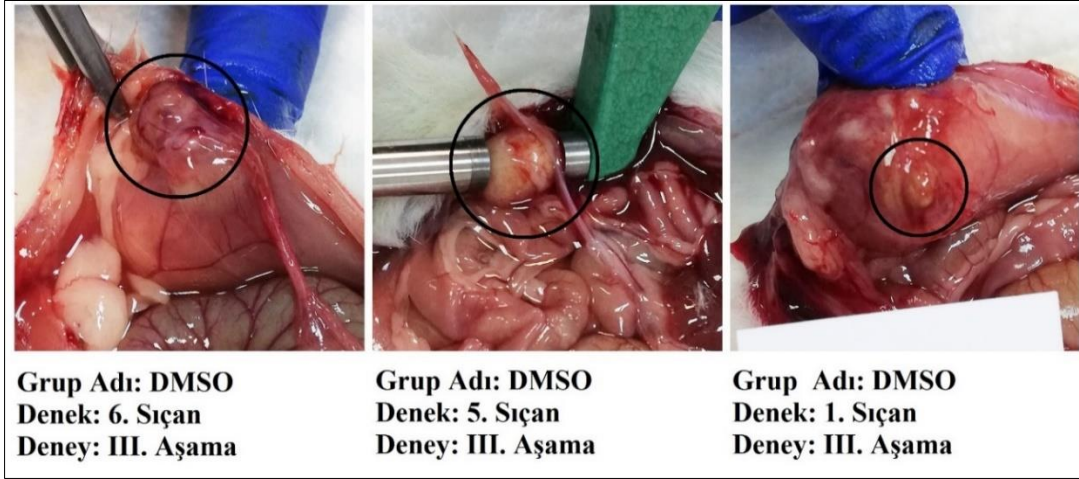
Resim 4.2. DMSO (Dimetil sülfoksit) grubuna ait aynı sıçanın II. aşama ile III. aşamadaki endometriyotik implant (yuvarlak içinde) sonuçlarının makroskopik görüntüsü



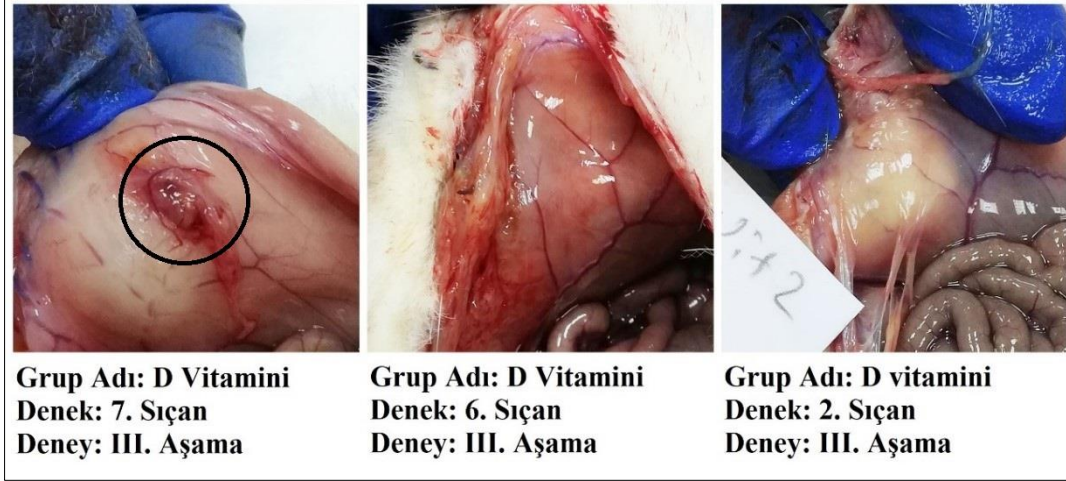
Resim 4.3. D vitamini grubuna ait aynı sıçanın II. aşama ile III. aşamadaki endometriyotik implant (yuvarlak içinde) sonuçlarının makroskobik görüntüsü



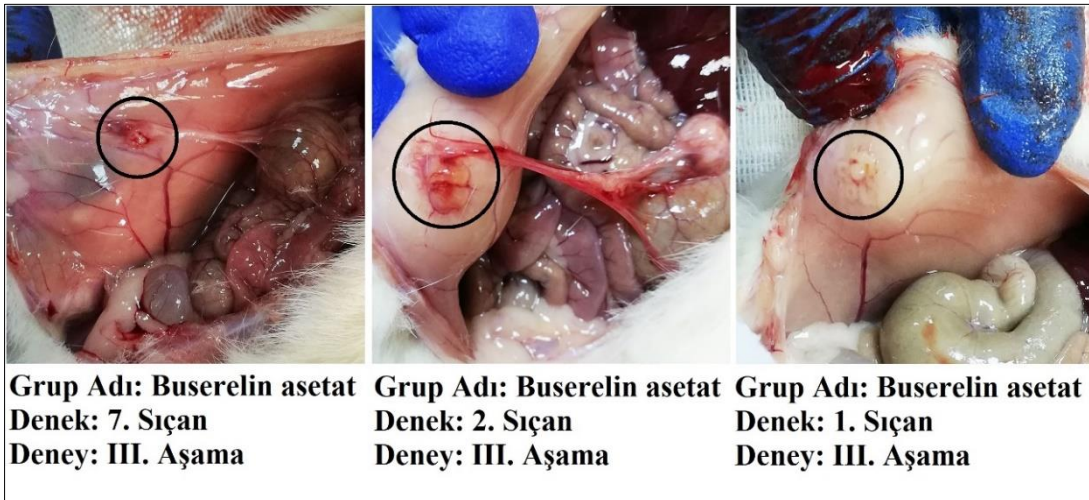
Resim 4.4. Buserelin asetat grubuna ait aynı sıçanın II. aşama ile III. aşamadaki endometriyotik implant (yuvarlak içinde) sonuçlarının makroskobik görüntüsü



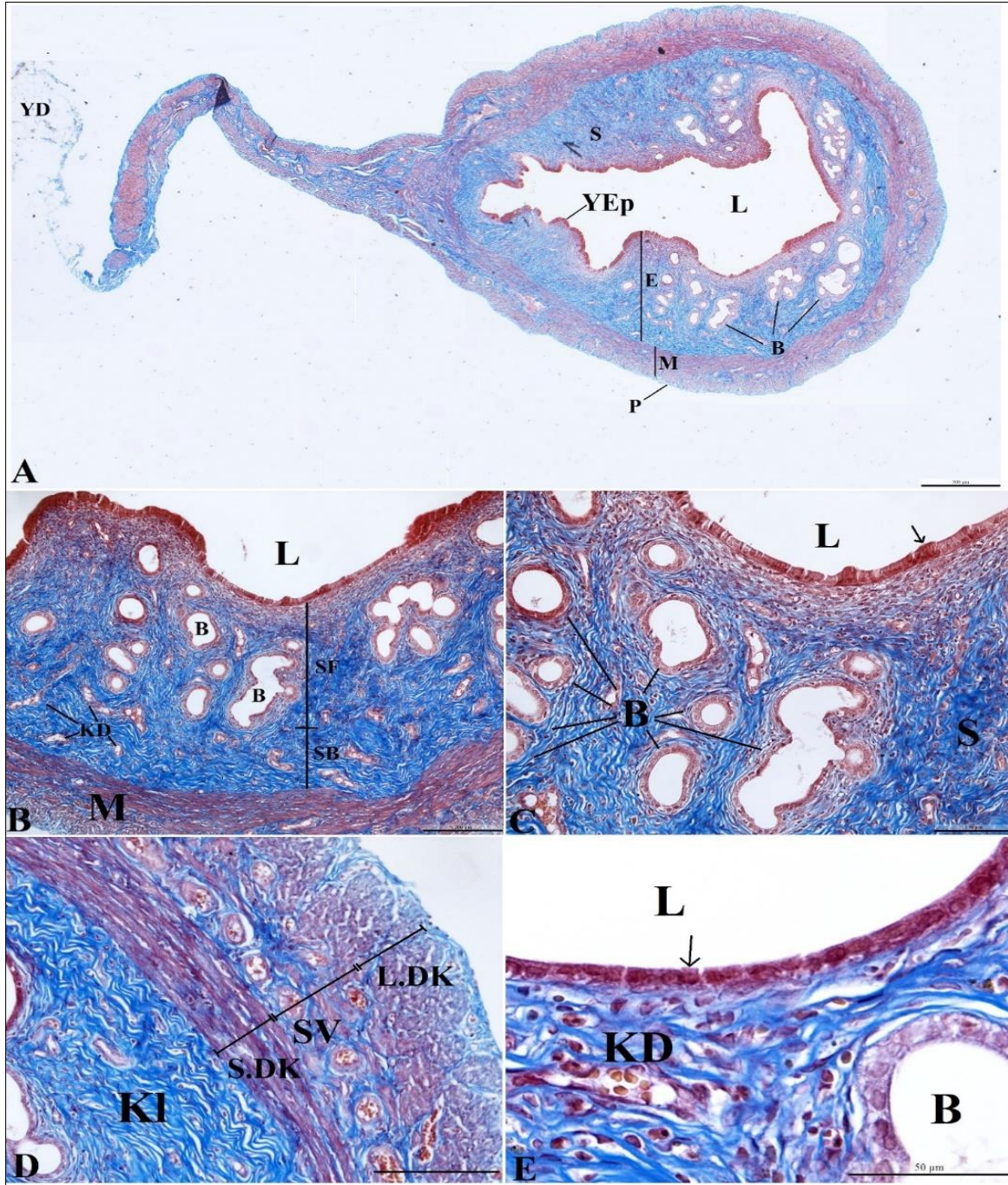
Resim 4.5. DMSO grubuna ait 6, 5 ve 1. sıçanlara ait III. aşamalarındaki endometriyotik implantların (yuvarlak içinde) makroskobik görüntüleri



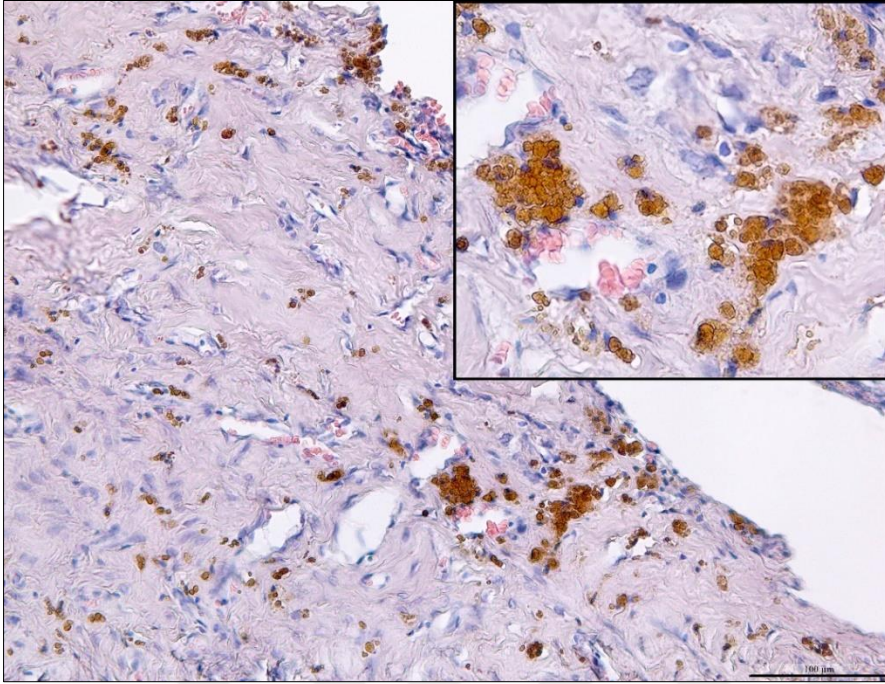
Resim 4.6. D vitamini grubuna ait 7, 6 ve 2. sıçanlara ait III. aşamalarındaki endometriyotik implantların (yuvarlak içinde) makroskobik görüntüleri



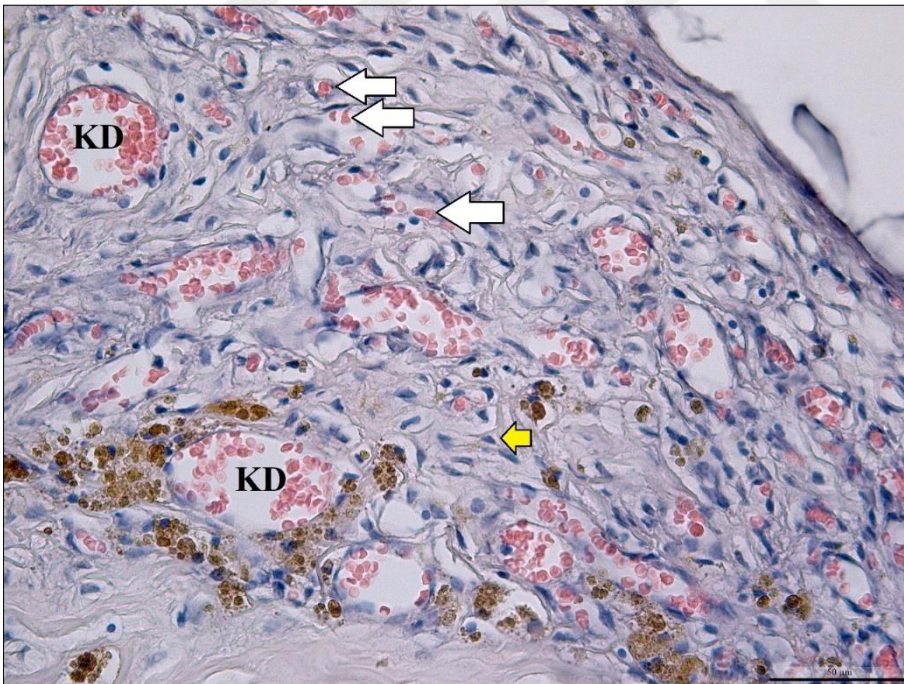
Resim 4.7. Buserelin asetat ait 7, 2 ve 1. sıçanlara ait III. aşamalarındaki endometriyotik implantların (yuvarlak içinde) makroskobik görüntüleri



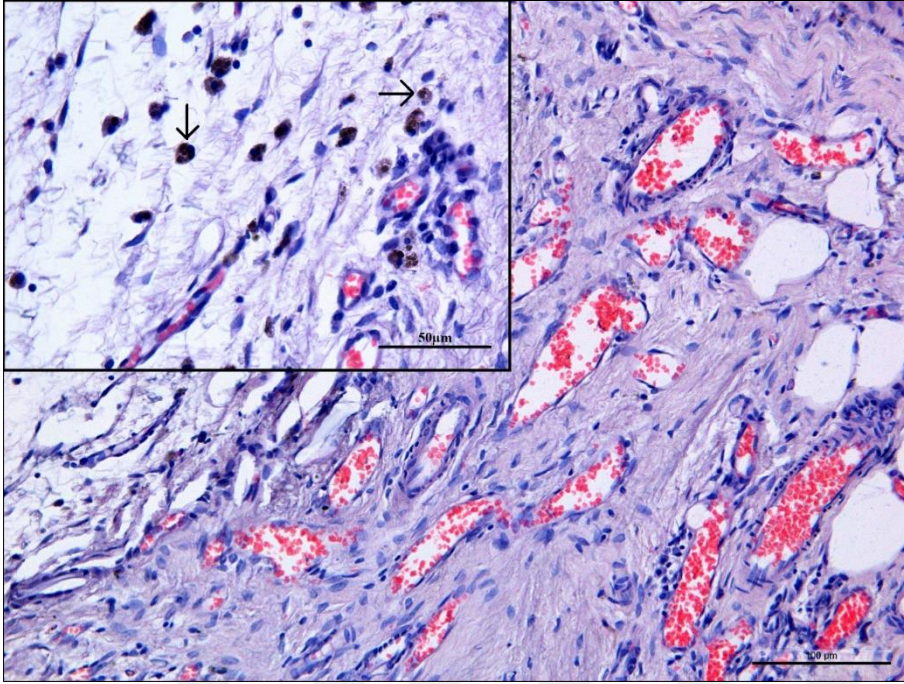
Resim 4.8. Sıçan uterusuna ait bir genel görüntü A. Uterusun duvarı, lümeden (L) dış doğru endometriyum (E), miyometriyum (M) ve perimetriyum (P) olmak üzere 3 tabakadan oluşur. Endometriyumda endometriyal bezler (B) ve bezleri çevreleyen bir stromal (S) yapı bulunur. Organı en dıştan çevreleyen bir yağ dokusu (YD) bulunur. B'de endometriyuma ait stratum fonksiyonale (SF) ve stratum bazale (SB) olmak üzere 2 tabakası ve çok sayıda kan damarı (KD) ile bezler görülmektedir. C ve E'de endometriyal yüzeyi çevreleyen tek katlı prizmatik epitel (ok) görülmektedir. D'de miyometriyumun dışta longitudinal (L.DK) ve içte sirküler düz kas (S.DK) tabakaları ve çok sayıda büyük kan damarı içeren stratum vaskulere (SV) görülmektedir. Hem endometriyum hem de miyometriyum tabakalarında yoğun miktarda kollagen lif (Kl) demetleri bulunur (Skala bar A: 500 µm, B: 200 µm, C: 100 µm, D: 200 µm, E: 50 µm; Masson Trichrome)



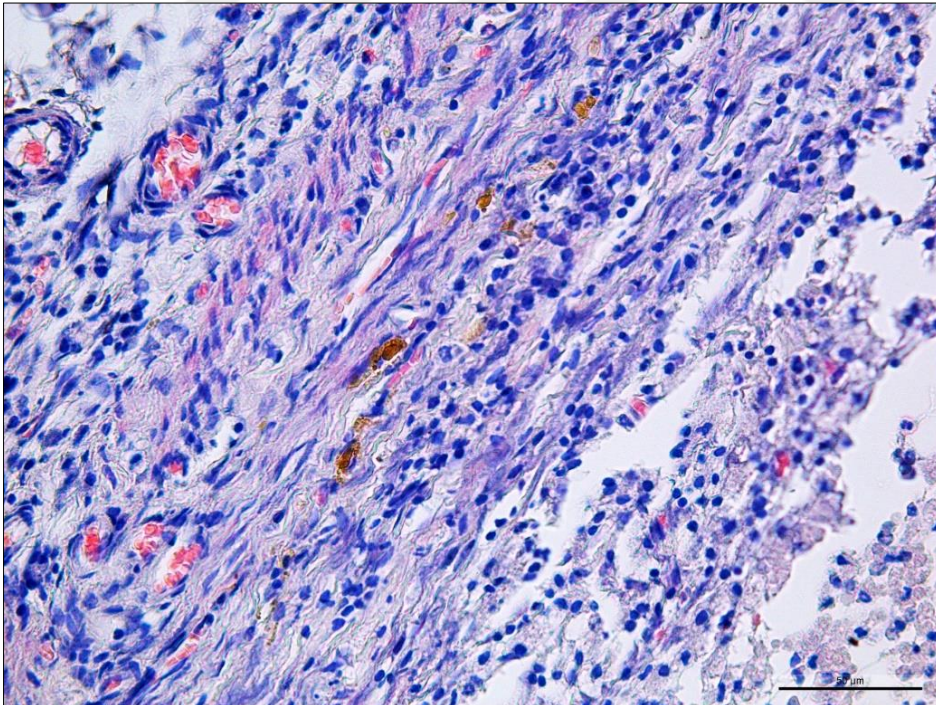
Resim 4.9. Endometriozis grubuna ait endometriyal implant dokusunda, epitelde döküntü ve kayıp görülmekte. Hemosiderin pigmentleri (kahverengi hücreler) gözlenmekte (H&E, x200)



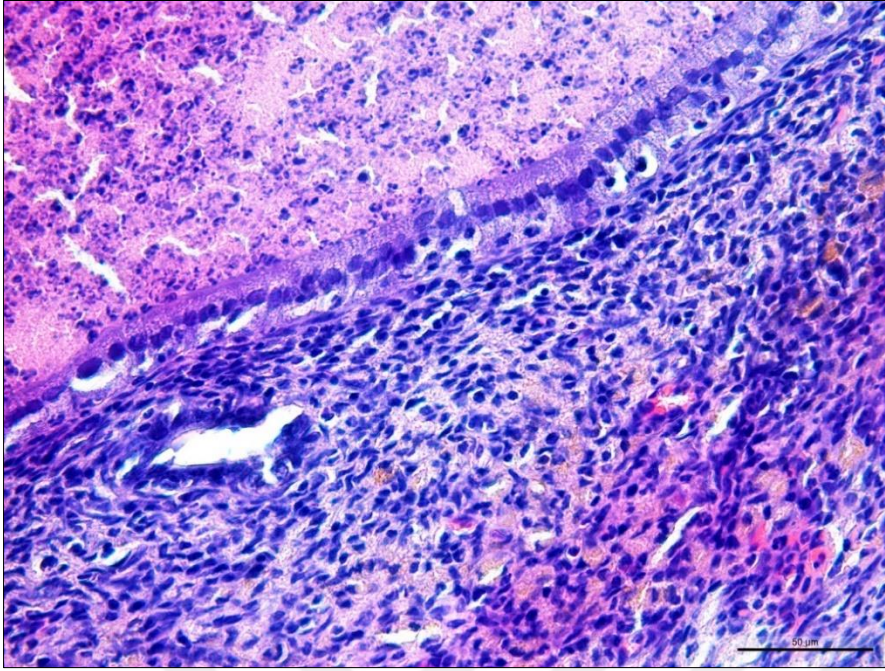
Resim 4.10. Endometriozis grubuna ait endometriyal implant dokusunda, çok sayıda kan damarı (KD), stromal hücreler (↘), hemosiderin pigmentleri (kahverengi hücre), ekstrasvaze hücreler (↔) görülmekte (H&E, x400)



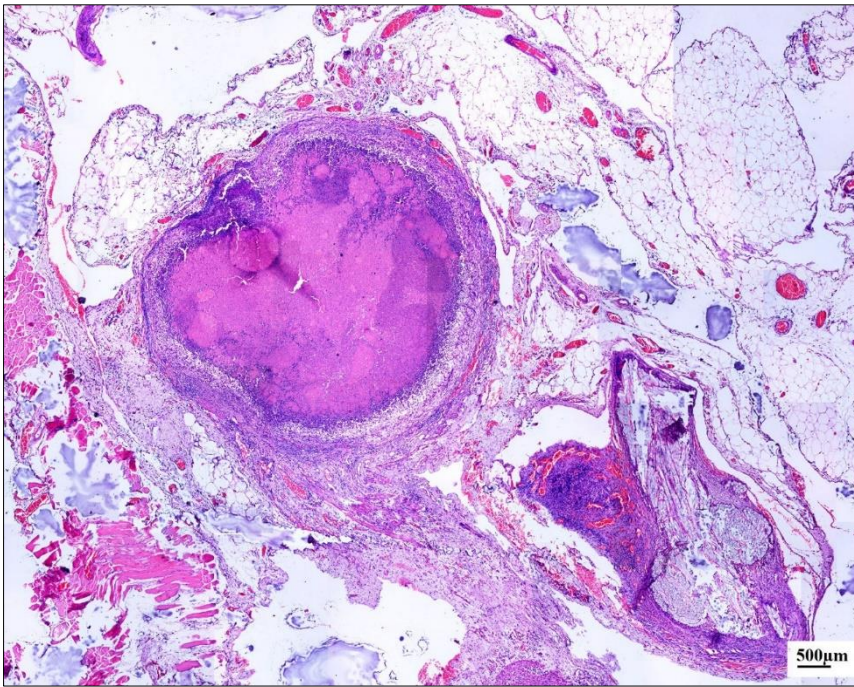
Resim 4.11. Endometriozis grubuna ait endometriyal implant dokusunda, vaskülarizasyonda, bağ dokusunda artış, hemosiderin yüklü makrofajlar görülmekte (H&E, x200). Sol üst köşede, hemosiderin yüklü makrofajların (←) büyük görüntüsü görülmekte (H&E, x400)



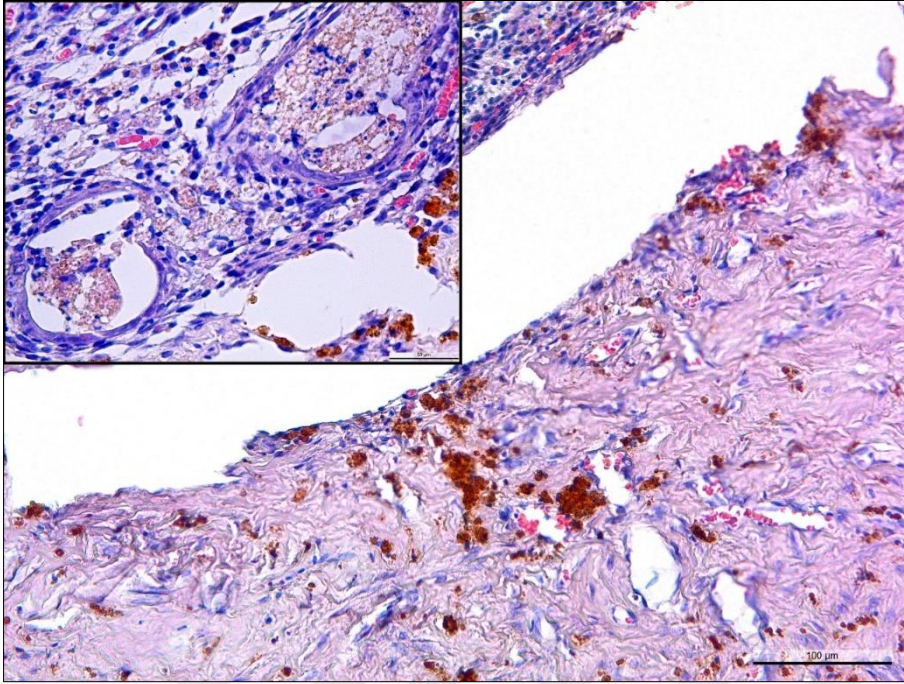
Resim 4.12. Endometriozis grubuna ait endometriyal implant dokusunda, kist duvarında yaygın iltihabi hücre infiltrasyonu görünmekte, özellikle kist boşluğuna yakın kısımda infiltrasyon artmakta ve boşluğa dökülen hücre (kan hücreleri ve dökülen epitel hücreleri) debrisleri görünmekte. Düz kas tabakasıyla stromal sınır arasında hücre infiltrasyonu yanı sıra hemosiderin yüklü makrofajlar izlenmekte. Ayrıca duvar boyunca kan damarları izlenmekte (H&E, x400)



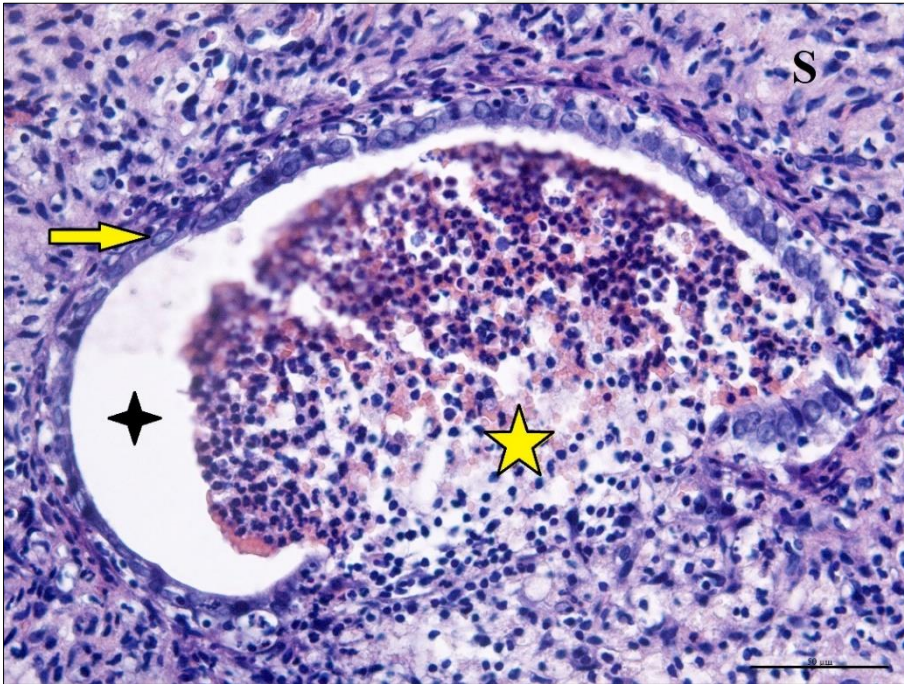
Resim 4.13. Endometriozis grubuna ait endometriyal implant dokusunda, sol üst köşede kist boşluğunu dolduran kan hücreleri ve dökülen epitel hücre debrisleri fibrin içerisinde yoğun bir şekilde izlenmekte. Kist lümeni prizmatik şekilli sitoplazmaları çoğunlukla vakuolize olmuş hücreler ile çevrilidir. Epitel altında bağ dokusunda endometriyal bez yapısı, özellikle sağ alt tarafta yoğun eritrosit ekstrasvasyonu ve hücre infiltrasyonu izlenmekte (H&E, x400)



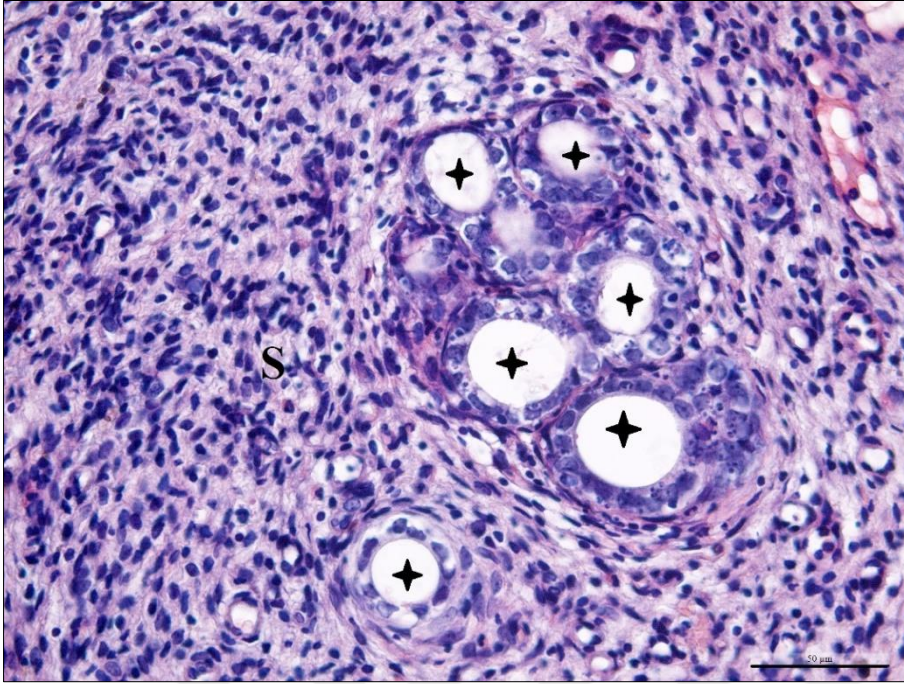
Resim 4.14. Endometriozis grubuna ait endometriyal implant dokusunda, küçük büyütme mikrografta sol tarafta karın duvarına ait çizgili kas kesitleri, sağ altta sütür materyaline ait bir kesit ve ikisinin arasında içi eozinofilik sekresyon içeren dilate olmuş kistik görünümlü bez yapısı (endometrioma) görülmekte (H&E, x40)



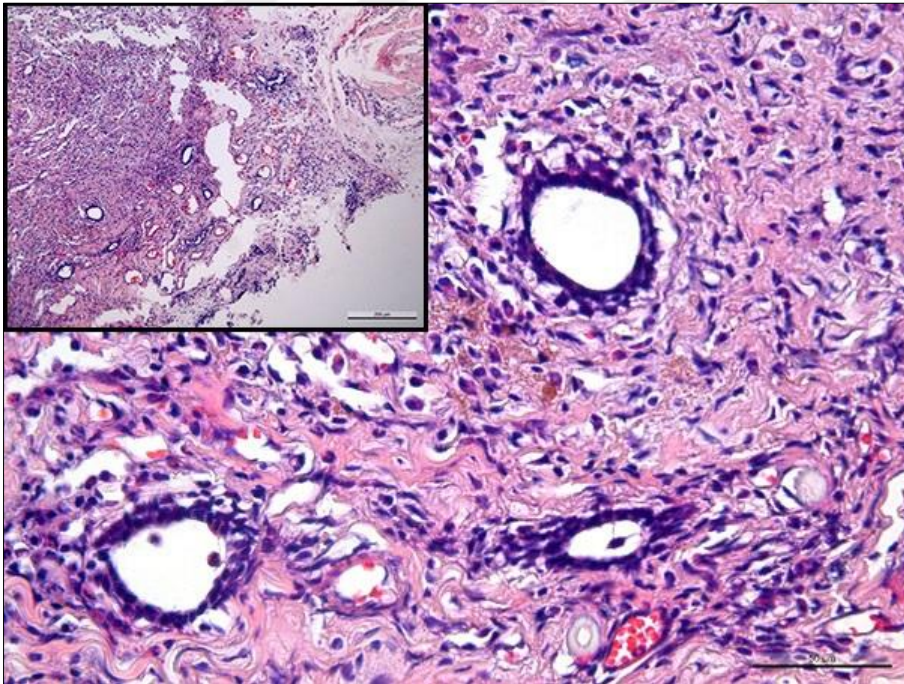
Resim 4.15. Endometriozis grubuna ait endometriyal implant dokusunda, yüzey epitel bütünlüğü bozulmuş (H&E, x200); sol üst köşede, stromada lümenleri infiltrasyonlu iki adet bez yapı görülmekte (H&E, x400)



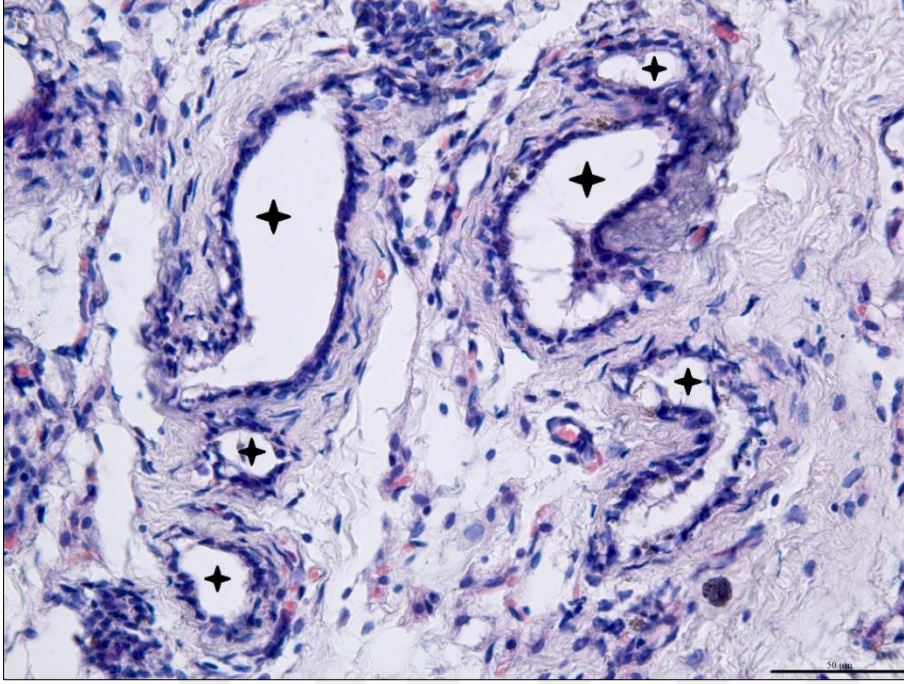
Resim 4.16. DMSO grubuna ait endometriyal implant dokusunda, endometriyal bez lümeni (★) içinde yoğun hücre infiltrasyonu (★) görülmekte. Endometriyal stroma (S) tarafından kuşatılan endometriyal bez epitel tek katlı kübik epitel (→) tipinde bez lümenini çevrelemekte (H&E, x400)



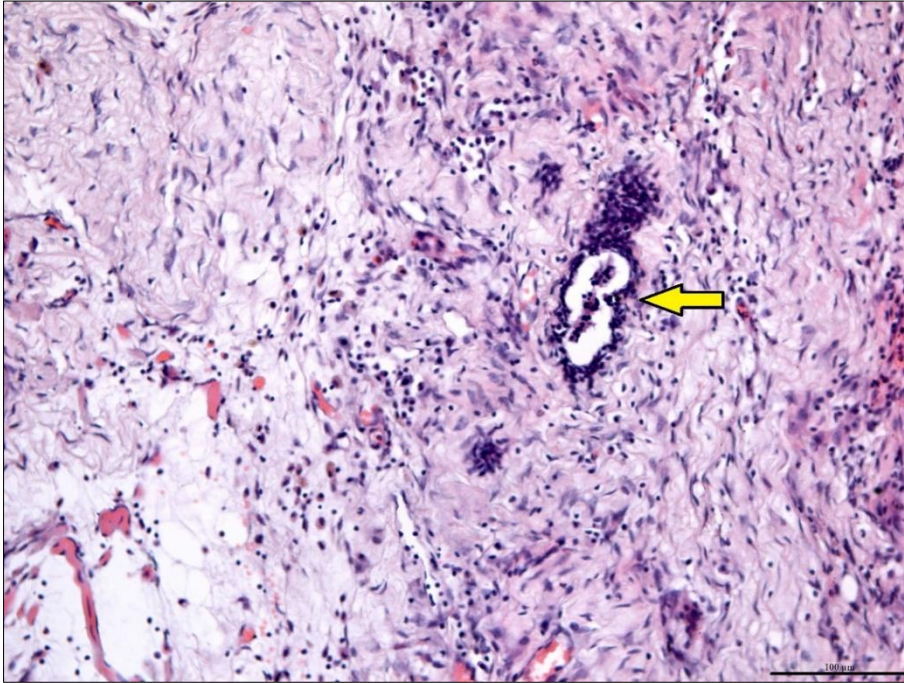
Resim 4.17. DMSO grubuna ait endometriyal implant dokusunda, tek katlı kübik epitele sahip endometriyal bezlerin lümenleri (✦) ve onları çevreleyen stromada hücre infiltrasyonu gösteren yoğun stromal doku (S) görülmekte (H&E, x400)



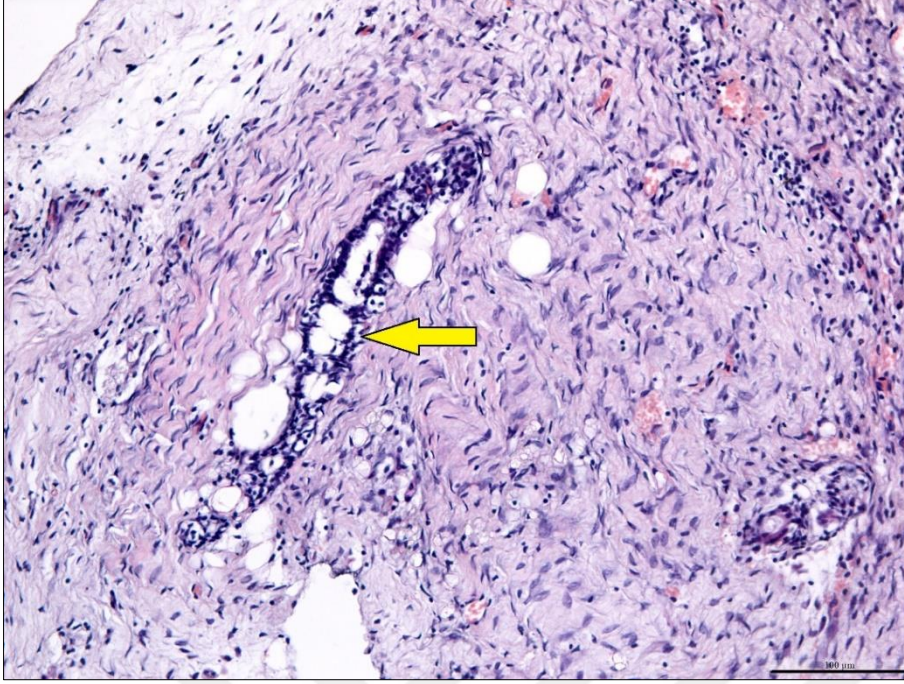
Resim 4.18. D vitamini grubuna ait endometriyal implant dokusunda, endometriozis grubuna göre azalmış vaskülarizasyon, inflamasyon; stromal hücre yoğunluğu ile bezlerin atrofiye olması dikkati çekmekte (H&E, x400)



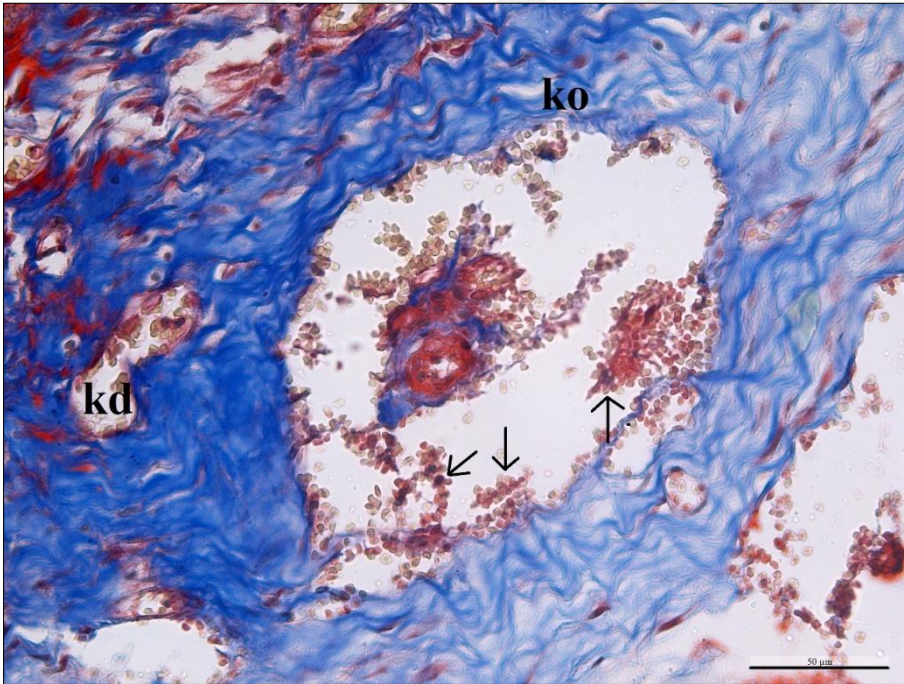
Resim 4.19. D vitamini grubuna ait endometriyal implant dokusunda, vaskülarizasyonun, stromal yoğunluğun, hücre infiltrasyonunun azalması, hemosiderin pigmentlerinin olmayışı dikkati çekmekte. Endometriyal bez lümen (*) içi epitel dökülmeleri görülmekte (H&E, x400)



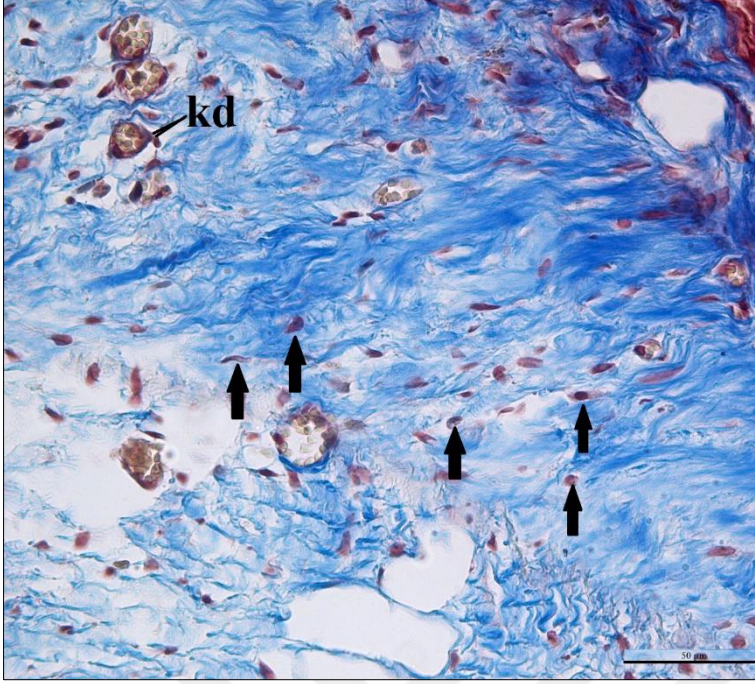
Resim 4.20. Buserelin asetat grubuna ait endometriyal implant dokusunda, vaskülarizasyonun, stromal yoğunluğun, hücre infiltrasyonunun azaldığı ve endometriyal bezlerin (→) atrofiye olduğu dikkati çekmekte. Hemosiderin pigmentlerin olmayışı dikkati çekmekte (H&E, x200)



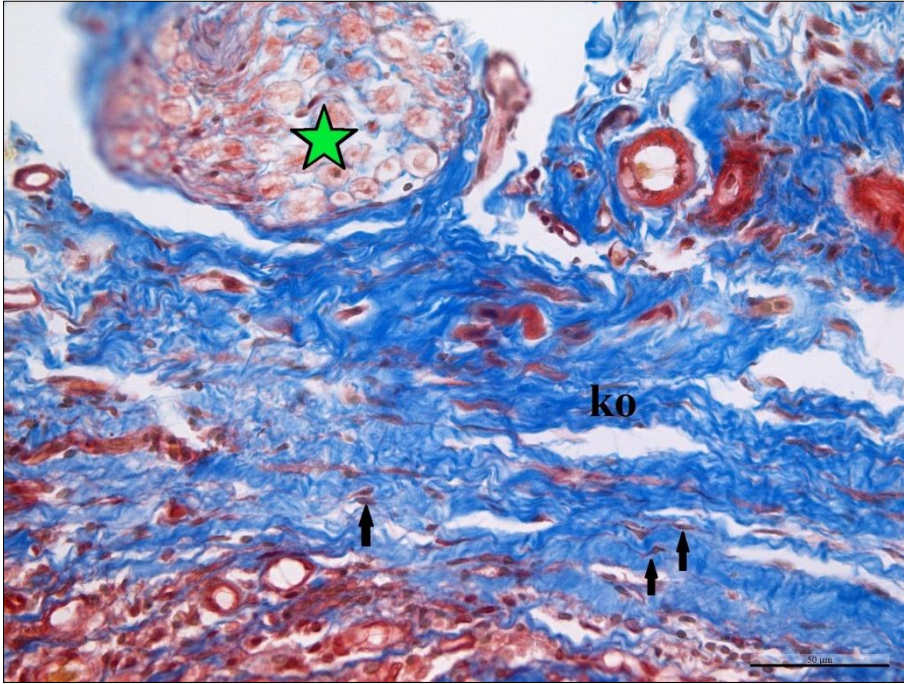
Resim 4.21. Buserelin asetat grubuna ait endometriyal implant dokusunda, atrofiye giden bezler (←) ve azalmış stromal yoğunluk; hemosiderin pigmentlerin, vaskülarizasyonun ve makrofajların olmayışı dikkati çekmekte (H&E, x200)



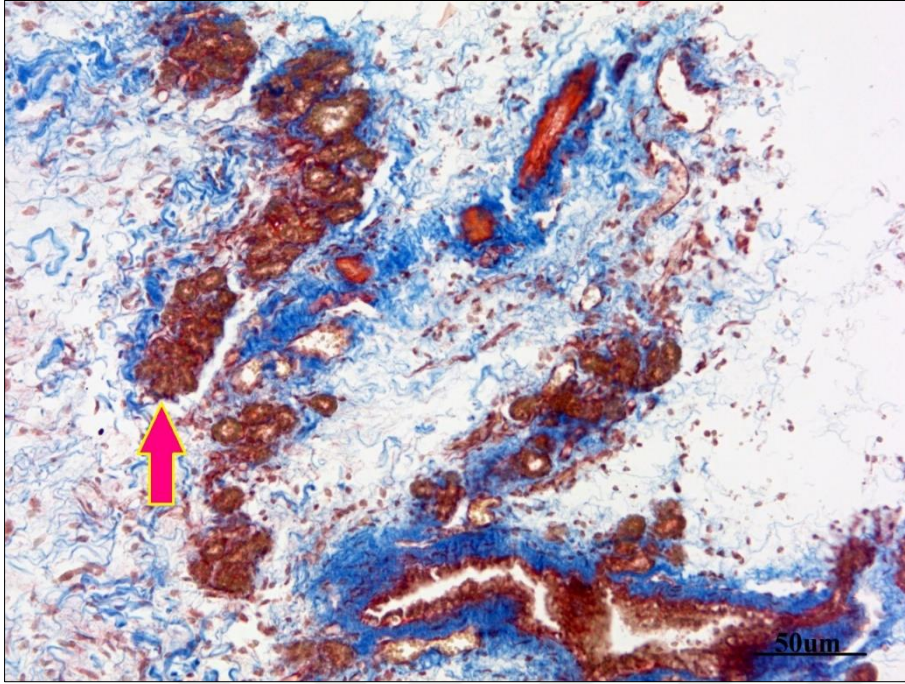
Resim 4.22. Deneysel endometriozis oluşturulan grupta, endometriyal stromada, özellikle vasküler oluşumlar çevresinde kalın demetler yapmış şekilde kollagen lifler (ko), çok sayıda kan damarı (kd), ekstrasvaze kan hücreleri görülmekte (←) (Masson Trichrome, x400)



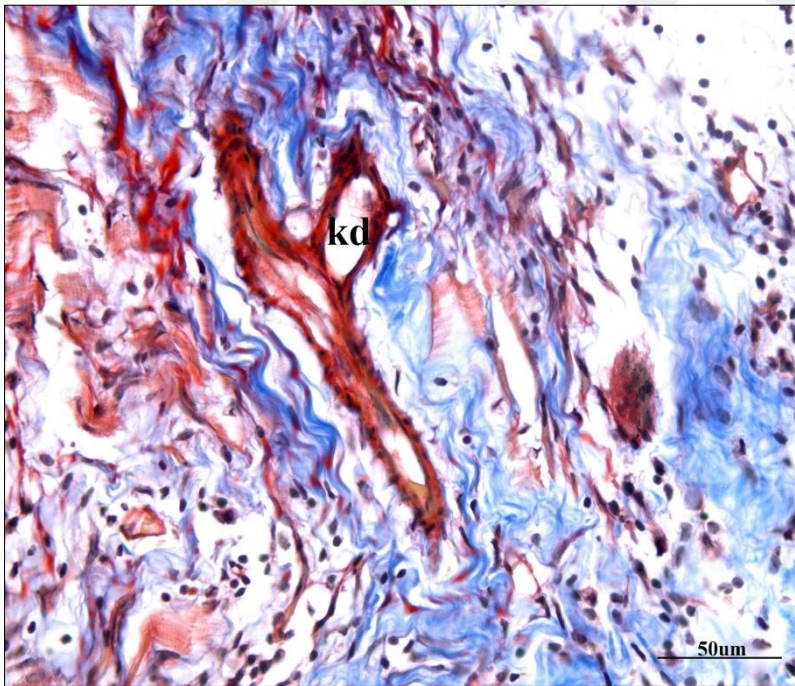
Resim 4.23. Deneysel endometriozis oluşturulan grupta, endometriyal stromada yoğunluk gösteren stromal hücreler (↖), çok sayıda kan damarı (kd), yoğun demetler oluşturan kollagen lifler dikkati çekmekte (Masson Trichrome, x400)



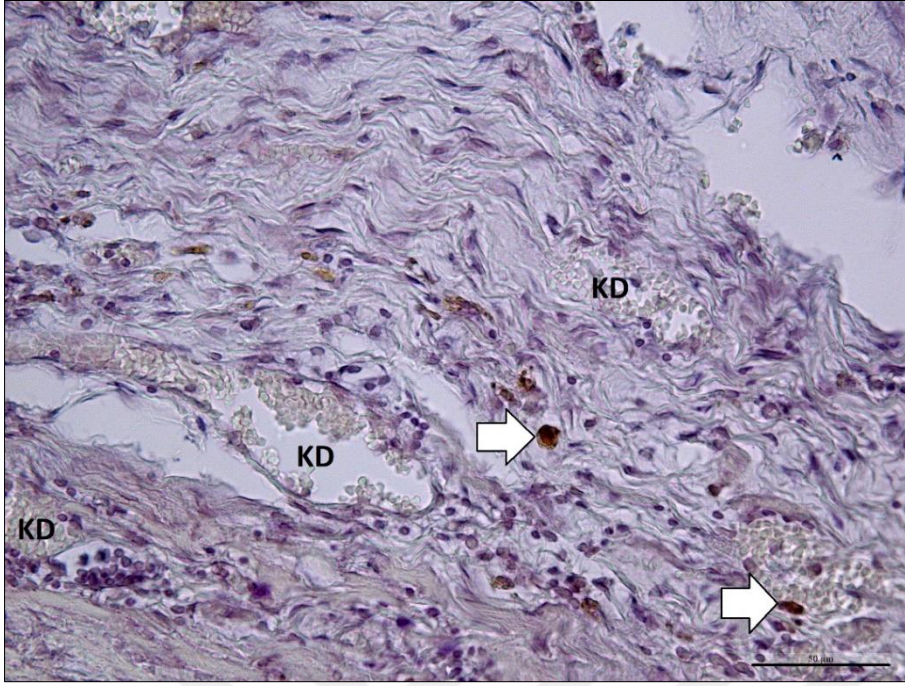
Resim 4.24. DMSO grubuna ait endometriyal stromada yoğun demetler oluşturan kollagen lifler (ko), stromal hücreler (↖) ve sinir kesiti (★) görülmekte (Masson Trichrome, x400)



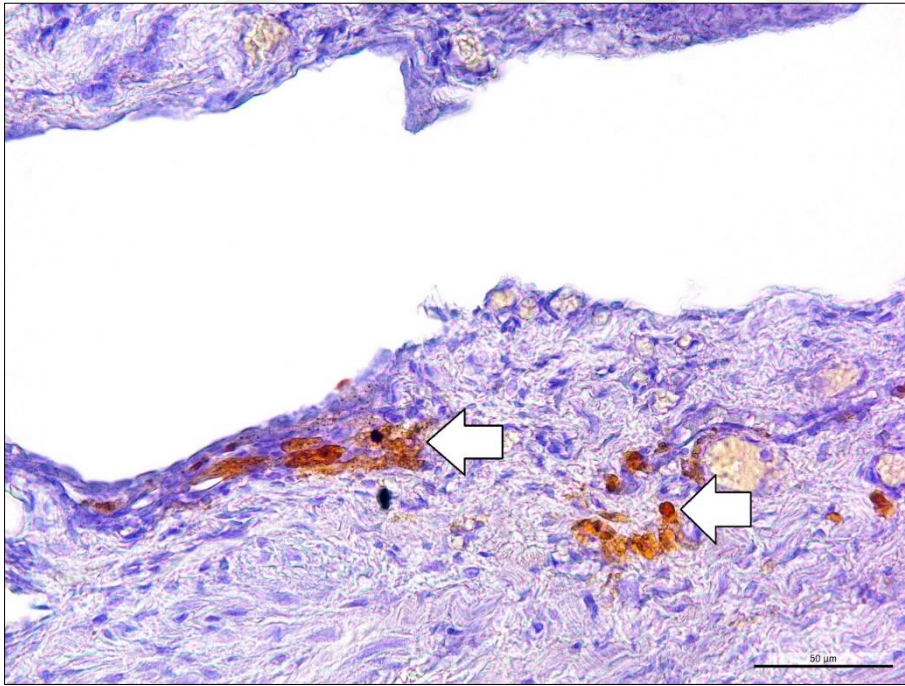
Resim 4.25. D vitamini verilen gruba ait endometriyal stromada atrofiye giden bez yapıları (↖), stromal hücrelerde ve kollagen lif yoğunluğunda endometriozis grubuna göre gerileme dikkati çekmekte (Masson Trichrome, x400)



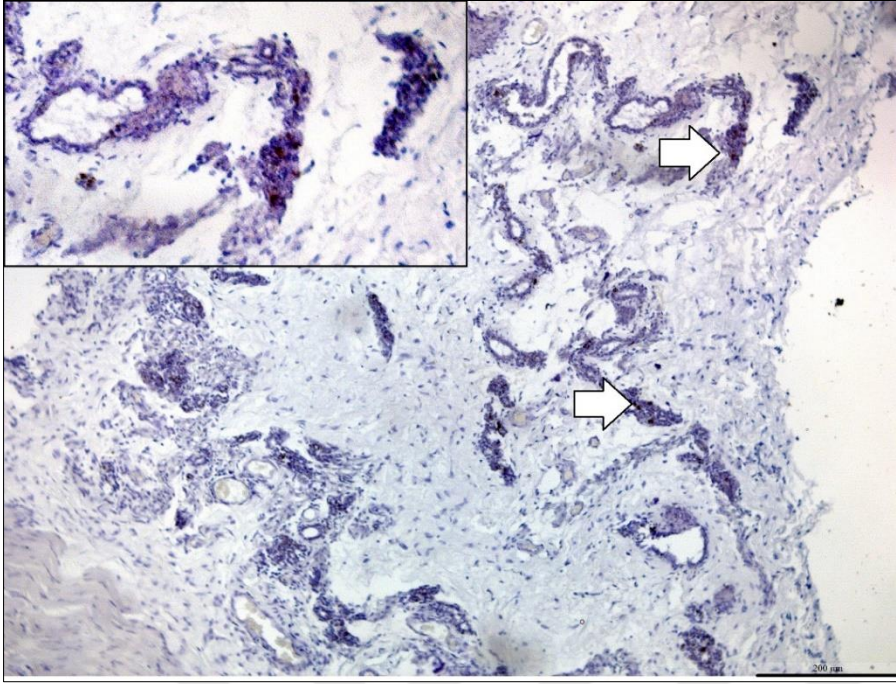
Resim 4.26. Buserelin asetat grubuna ait endometriyal stromada kan damarları (kd), endometriozis grubuna göre yoğunluğu azalmış kollagen lifler görülmekte (Masson Trichrome, x400)



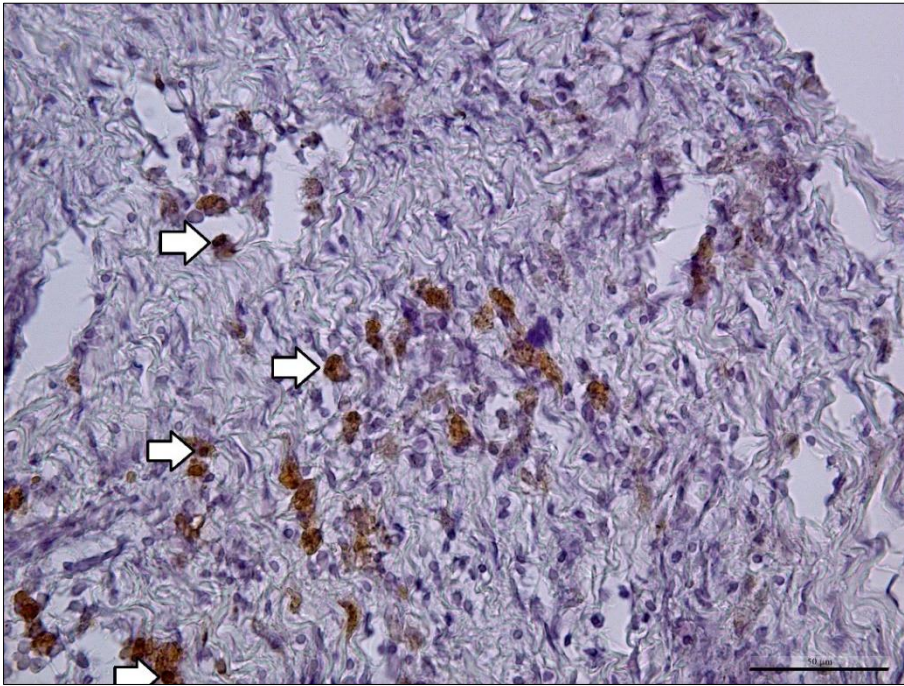
Resim 4.27. Endometriozis grubuna ait endometriyal implant dokusunda, TUNEL metodu ile stromada apoptotik hücreler (⇨) dikkati çekmekte (DAB+Hematoksilen, x400) (KD: kan damarı)



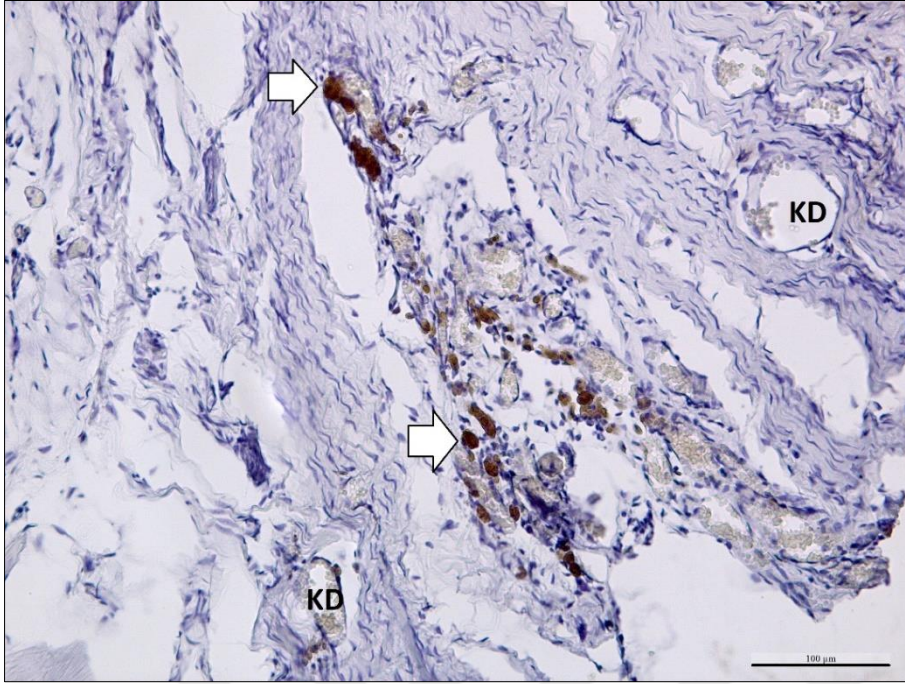
Resim 4.28. DMSO grubuna ait endometriyal implant dokusunda, TUNEL metodu ile stromada küçük apoptotik hücre (⇨) grupları görülmekte (DAB+Hematoksilen, x400)



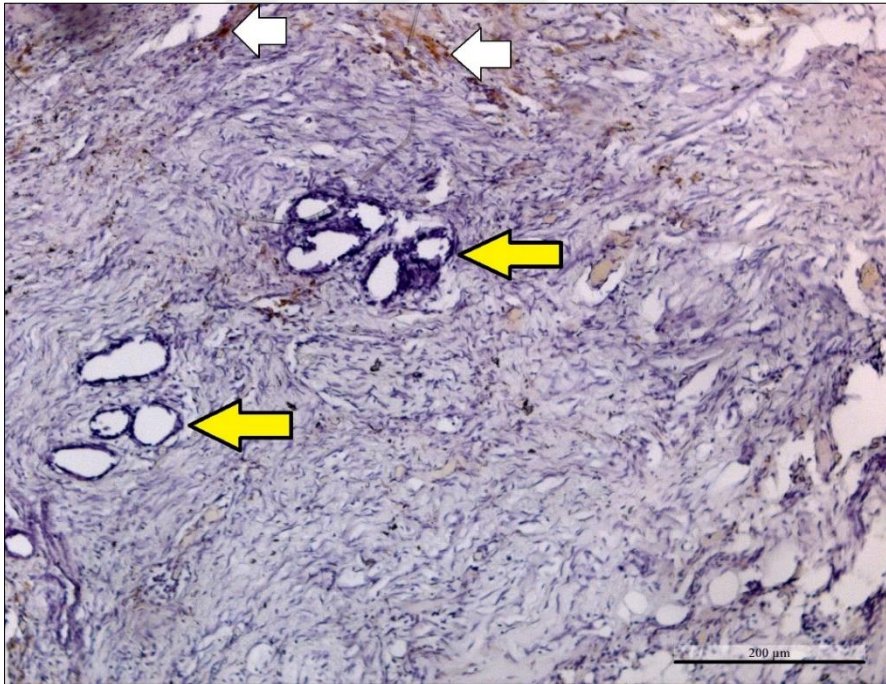
Resim 4.29. D vitamini grubuna ait endometriyal implant dokusunda, TUNEL metodu ile stromada apoptotik hücre (⇨) grupları görülmekte (DAB+Hematoksilen, x100)



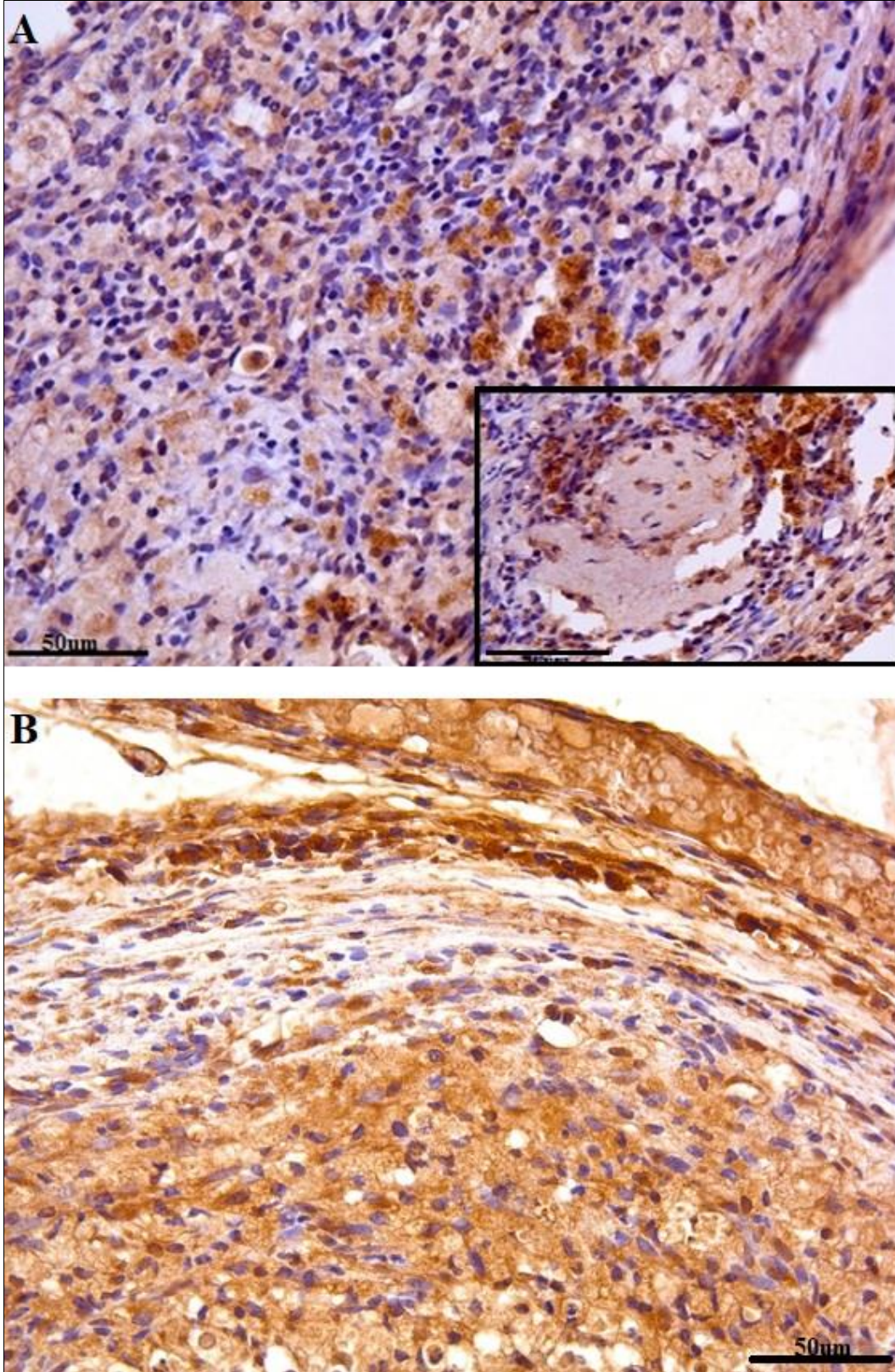
Resim 4.30. D vitamini grubuna ait endometriyal implant dokusunda, TUNEL metodu ile stromada yoğun miktarda apoptotik hücre toplulukları (⇨) görülmekte (DAB+Hematoksilen, x400)



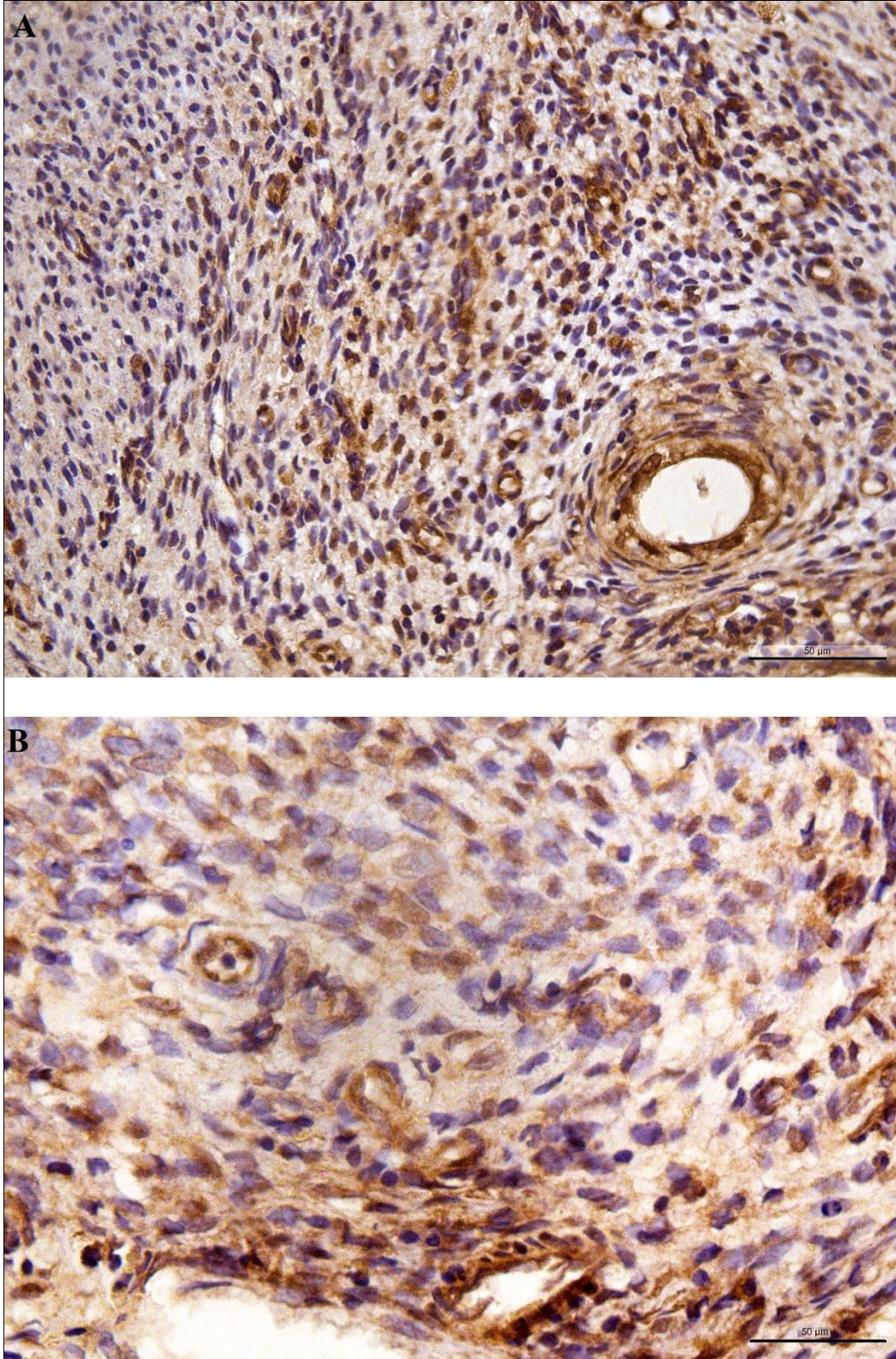
Resim 4.31. Buserelin grubuna ait endometriyal implant dokusunda, TUNEL metodu ile stromada apoptotik hücre (⇨) odakları görülmekte (DAB+Hematoksilen, x100) (KD: kan damarı)



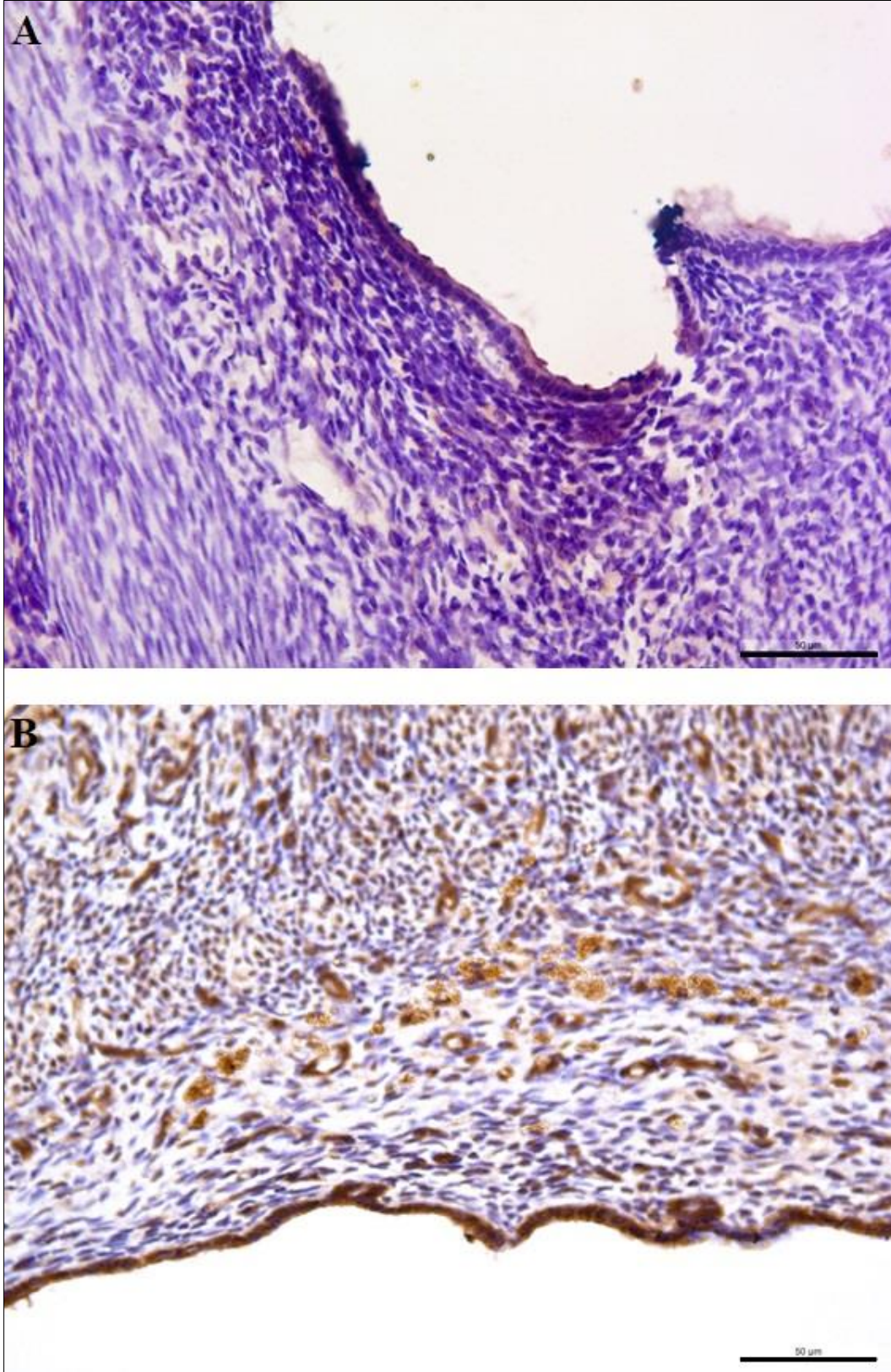
Resim 4.32. Buserelin grubuna ait endometriyal implant dokusunda, TUNEL metodu ile stromada apoptotik hücre (⇨) odakları ve endometriyal bez (⇩) yapıları görülmekte (DAB+Hematoksilen, x100)



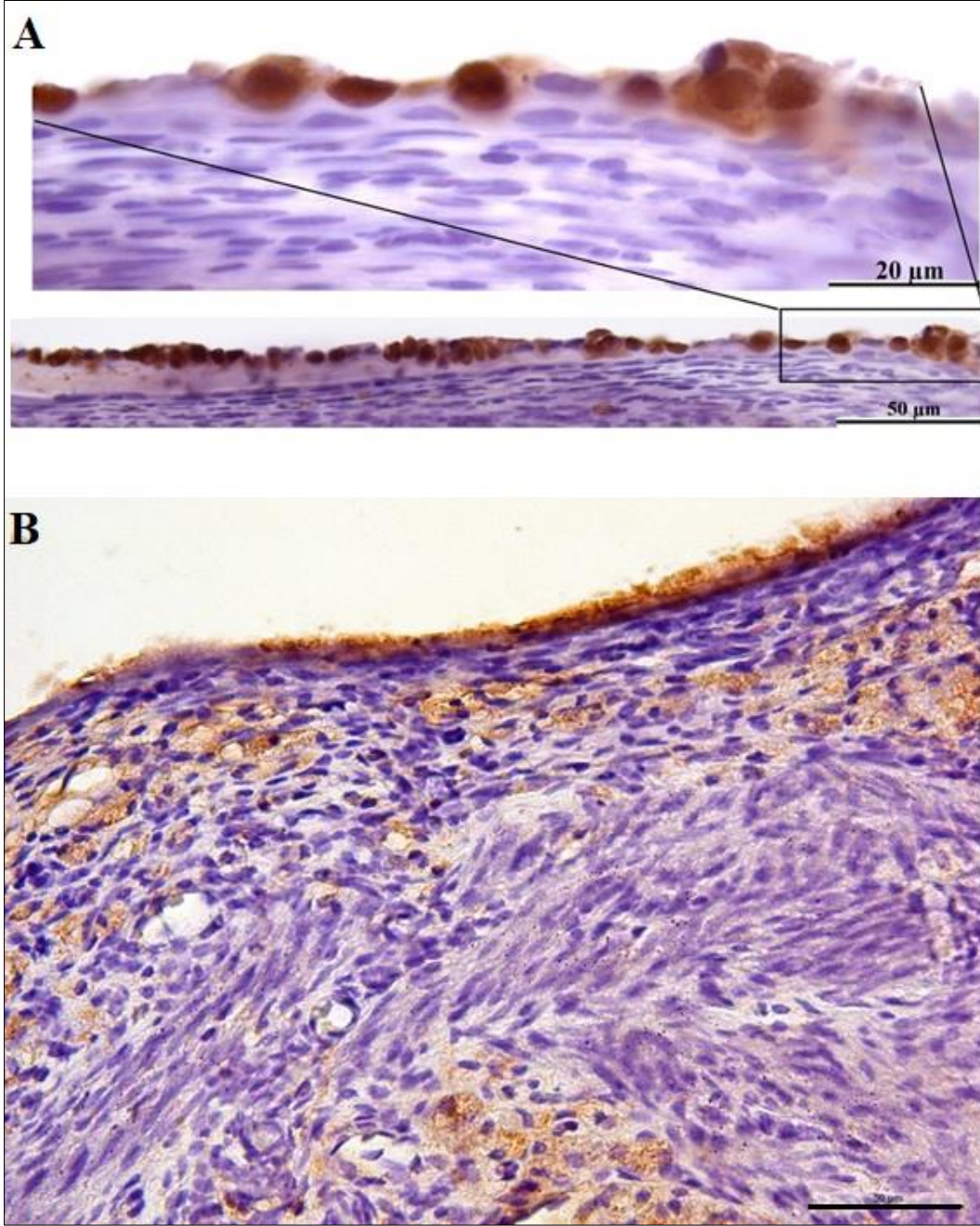
Resim 4.33. (A) Endometriozis grubuna ait endometriyal implant dokusunda, stromada, Bcl-2 immünreaktivitesi görülmekte. İnsette, kistik oluşumu çevreleyen hücrelerde Bcl-2 immün aktivitesi izlenmekte (DAB+Hematoksilen, x400); (B) Endometriozis grubuna ait endometriyal implant dokusunda, stromada, Bax antikoru immünreaktivitesi görülmekte (DAB+Hematoksilen, x400)



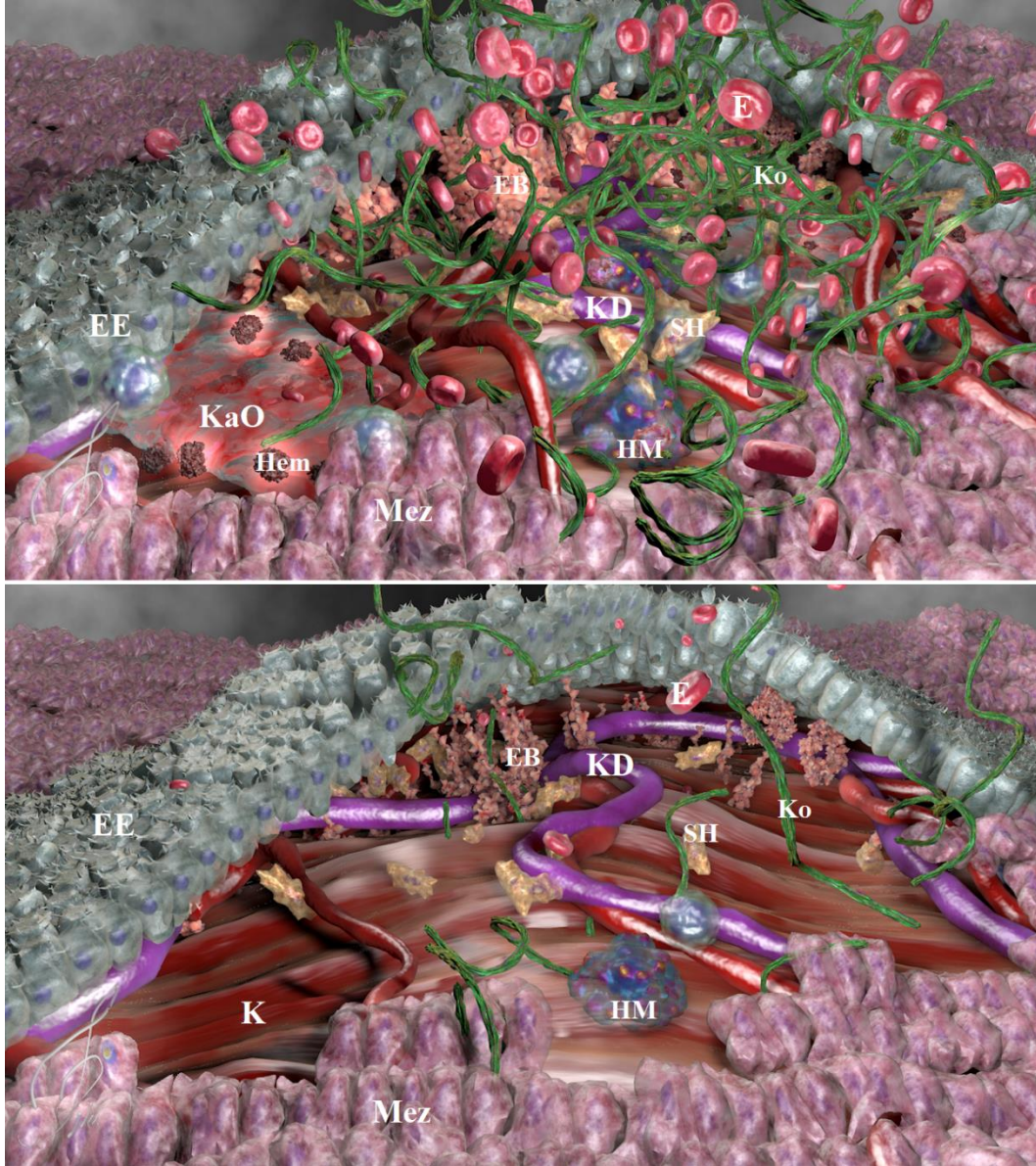
Resim 4.34. (A) DMSO grubuna ait endometriyal implant dokusunda, Bcl-2 ile stromal hücrelerde, bez epitel hücrelerinde immünreaktivite görülmekte (DAB+Hematoksilen, x400); (B) DMSO grubuna ait endometriyal implant dokusunda, stromada Bax antikoruna ile zayıf immünreaktivitesi görülmekte (DAB+Hematoksilen, x400)



Resim 4.35. (A) D vitamini grubuna ait endometriyal implant dokusunda, Bcl-2 ile epitel hücrelerinde ve stromal hücrelerde zayıf immünreaktivite görülmekte (DAB+Hematoksilen, x400); (B) D vitamini grubuna ait endometriyal implant dokusunda, Bax ile yüzey epitel hücrelerinde, stromal hücrelerde immünreaktivite artışı gözlenmekte (DAB+Hematoksilen, x400)



Resim 4.36. (A) Buserelin asetat grubuna ait endometriyal implant dokusunda, Bcl-2 antikoru ile immünohistokimyasal boyanan endometriyal beze ait epitel hücrelerinde immünreaktivite görülmekte (DAB+Hematoksilen, x400); (B) Buserelin asetat grubuna ait endometriyal implant dokusunda, Bax antikoru ile stromada, epitel hücrelerinde immünreaktivite izlenmekte (DAB+Hematoksilen, x400)



Resim 4.37. Endometriyal implant dokusuna ait H&E bulgularının üç boyutlu görüntüsü. Ekstravaze olmuş eritrositler (E), kollagen lifler (Ko), kas dokusu (K), hemosiderin pigmenti (Hem), endometriyal yüzey epiteli (EE), peritoneal mezotel hücresi (Mez), hemosiderin yüklü makrofaj (HM), endometriyal bez (EB), kan damarları (KD), stromal hücre (SH), kanama odağı (KaO). (Üst resim: Endometriozis grubu; alt resim: D vitamini grubu) (Üç boyutlu modellemeler Prof. Dr. Tuncay Veysel PEKER tarafından yapılmıştır)



5. TARTIŞMA

Endometriozis, endometriyum-benzeri dokunun uterus dışı ortamda var olması nedeniyle vücutta kronik inflamatuvar reaksiyonların meydana geldiği bir patolojidir. Bazı kadınlarda semptomlar ağırlı geçip infertiliteye neden olabilirken bazılarında ise hiç semptom görülmez. Prevalans tam olarak bilinmese de yaygınlığı genel popülasyonda %2 ile %10 arasında değişmekte olup, infertil kadınlar içerisinde %50 civarındadır. Endometriozis tanısı hastanın öyküsü ve semptomlarına göre belirlenirken, fizik muayene ve görüntüleme tekniklerinin yardımıyla koordineli bir şekilde ilerlemekte; laparoskopi esnasında alınan bir doku parçasından histolojik analiz ile kesinleştirilmektedir [91]. Üreme çağına karakteristik [92] olan bu hastalığın riskleri arasında yaş faktörü (risk 25-29 yaş aralığında artmakta olup, 44 yaşından sonra giderek azalmaktadır) [93], genetik yatkınlık ve ayrıca tek nükleotidli polimorfizimler [94] sayılabilir. Diğer risk faktörleri ise uzun süre endojen östrojene maruz kalma; özellikle erken menarş ve geç menopoz dönemlerinde, endokrin-bozucu kimyasallara maruz kalma, kısa menstrual döngüler, aşırı trans yağ ve kırmızı et tüketimi olarak verilebilir [95].

Klinikte endometriozis, ektopik implantların bulunması/bulunmaması, adezyonların varlığı, derecesi ve çeşidi gibi özellikleri içeren kriterlere göre puanlanmaktadır. “American Society for Reproductive Medicine” kriterlerine göre periton ile overlerde endometriyotik lezyonların varlığına, posterior cul de sac endometriozisine, ovaryum ve tuba uterinalardaki adezyonlara puan verilir, toplam puan hesaplanarak hastalık minimal, hafif, orta ve şiddetli olmak üzere değerlendirilir [96].

Endometriozisin histopatolojisinde mutlaka endometriyal bezler ve onları çevreleyen endometriyal stromanın görülmesi gerekir. Hemoraji ve hemosiderin pigment yapıları sıkça görülmekle birlikte her zaman olmayabilir. Küçük mikroskopik büyültmelerde epitelin yapısı ince, koyu keskin sınırlara sahiptir ve epitelin altında soluk bir stroma görülmektedir. Epitelin lümenine bakan yüzeyi pürüzlü ve düzensiz olabilir. Büyük mikroskopik büyültmelerde ise epiteli oluşturan hücreler uzun ve prizmatik olup, çekirdekleri düzenli dikey yönelim gösteren uzun purolar şeklinde sıralanmıştır. Sitoplazmaları eozinofilik ve silyaları ayırt edilebilmektedir. Stroma, endometriyumdaki normal stromaya benzer olup küçük iğ şeklindeki hücrelere sahiptir. Stromal yapıda fibroblastlara ve fibrotik alanlara rastlanmaktadır. Fibroblastları ve hücre dışı matriksi içeren fibrotik yapılar genellikle

endometriyal implantların çevresinde bulunurlar. Kanamanın kanıtı olarak stromada veya bitişikteki endometriyal dokuda hemoraj görülebilir. Dokudaki kan odaklıkları dejenere olup hemosiderin pigmentlerini oluştururlar ve daha sonrasında bu hemosiderin pigmentleri ya dokuda hapsolür ya da makrofajlar tarafından fagosite edilirler. Hemosiderin yüklü makrofajlar endometriozis kaynaklı kanamalar sonucunda dokuda tespit edilebilir [97, 98]. Dodds ve diğeri (2017), cerrahi olarak indüklenen endometriozisin fare modeli çalışmalarında makroskopik olarak lezyonları incelediklerinde yoğun, kistik ve nekrotik olmak üzere 3 tip lezyon tanımlamışlardır. Yoğun tip lezyonların opak veya pembe-kırmızıya doğru giden bir renk skalası içerdiği ve yüzeyinin pürüzsüz olduğunu tespit etmişlerdir. Mikroskopik düzeyde ise bu yoğun tip lezyonların hem endometriyal bez içeriklerine hem de stromaya sahip olduğunu göstermişlerdir. Bu lezyonların bir bağ dokusu kapsül yapısı ile sınırlandırıldığını, küçük kan damarları ile vaskülarizasyonunun sağlandığını ve genellikle inflamatuvar hücreler (makrofaj ve lenfositler) tarafından infiltrasyon alanlarının olduğunu gözlemlemişlerdir. Kistik tipteki lezyonların endometriyal bez ve stromal yapılarına ilaveten içleri sıvı ile dolu kistik yapıların olduğunu gözlemlemişlerdir. Lezyonlar genellikle bağ dokusu kapsülü ile çevrili, stromal yapıya inflamatuvar hücre infiltrasyonu gözlenmiştir. Kistin içerisinde makrofaj, lenfosit ve kan hücrelerine rastlanmıştır. Kistik tipteki lezyonların boyutlarının yoğun tipteki lezyon boyutlarından daha büyük olduğu belirlenmiştir. Nekrotik lezyonlarda ise farkedilebilir hücre veya dokuların olmadığı, nekrotik alanların olduğu tespit edilmiştir. Araştırmacılar, birçok nekrotik lezyon örneklerinde endometriyal bez ve stromal yapıya rastlamamışlardır [99]. Strehl ve diğeri (2014), yaş aralığı 19 - 52 olan ve operasyon gününe en az 6 ay kala eksojen hormonu almayan pre-menopoz 47 endometriozisli hastayı içeren bir klinik çalışmayı yürütmüştür. Hastaların pelvik ve abdominal peritonlarını laparoskopik olarak inceledikten sonra lezyonları fotoğraflamışlar, kırmızı⁵, siyah⁶, beyaz ve kahverengi⁷ olarak sınıflandırmışlardır. Ayrıca lokasyonları ve şekilleri de değerlendirmişlerdir. Toplamda 30 siyah, 17 beyaz, 11 kahverengi ve 7 kırmızı endometriozis lezyon bölgesi eksize edilmiş ve fiksasyon işlemlerinin ardından parafin bloklara gömülmüştür. Üç µm kalınlığında aldıkları kesitlerden H&E ile boyalı preparatlar elde etmişlerdir. Analizlerinde endometriyal bez yolaklarının ve endometriyal bez içeriklerinin derecelendirilmesinin yanı sıra inflamatuvar infiltrasyon alanlarının ve sinir yapılarının varlığı/yokluğu da not edilmiştir. Araştırma

⁵ Peritoneal endometriozisin ilk basamağı; en aktif ve vasküle olmuş lezyon tipi

⁶ Peritoneal endometriozisin en ileri seviye tipi. Lümen içi debrizler görülür

⁷ Peritoneal endometriozisin latent seviye tipleri. Kollagen kalıntılarının olduğu inaktif bölgeler bulunur

sonuçlarına göre tüm renklerdeki lezyonlarda büyük ve orta büyüklükte endometriyal bezlere daha sık rastlanmıştır. Bez içeriklerinin kanlı veya boş olmasının ise gruplar arası değişkenlik gösterdiği ve en fazla siyah lezyona ait endometriyal bez içeriklerinin kanlı olduğu bulunmuştur [84, 100]. Çalışmamızda, bütün gruplara ait H&E ile boyanan preparatlarda endometriyal bez ve stroma yapılarına rastladık. Tüm gruplarda yoğun hücre infiltrasyon alanları ve yoğun damarlanmalar gözlemlendi. Gruplar arasında endometriyal bezlerin boyutları, içerikleri, dağılımları ve şiddetleri birbirlerinden farklılık gösterdi. Endometriyal stroma yapısı, fibrotik alanlar ve hemosiderin pigmentlerin yoğunluğu tüm gruplarda farklılık gösterdi. Kistik yapılara daha çok endometriozis grubunda rastlandı. D vitamini ve buserelin asetat grubuna ait endometriyal bezlerin boyutları diğer iki grup ile kıyaslandığında daha küçük gözlemlendi. Bu iki gruba ait endometriyal bez içerikleri genelde temiz, lümeni çevreleyen tek katlı kübik epitel hücrelerinin varlığı korunuyordu. Birkaç preparatta yer yer endometriyal bez lümeni içi epitel döküntülerine rastlandı. Aynı zamanda endometriyal bez lümeni içi lökosit infiltrasyonları da gözlemlendi.

Jones (1984)'un yöntemine göre uygulanan cerrahi indüksiyon ile endometriozis modeli yapımı geçerliliğini korumakta ve birçok deneysel endometriozis çalışmasında da tercih edilmektedir. Araştırmacılar, Jones (1984)'un yöntemine göre indükledikleri endometriozis modelinde sıçanların endometriyal implant boyutlarının tedavi öncesinde farklılık gösterdiğini belirtmişlerdir [101, 102]. Çalışmamızda endometriyal implant volümü bakımından tedavi öncesine göre artış gösteren tek grup endometriozis grubu oldu; bu sonuç literatürdeki benzer araştırmalarla tutarlılık göstermektedir [102, 103]. DMSO, D vitamini ve buserelin asetat gruplarında hacimsel azalış gözlemlendi; son volüm ile ilk volüm arasındaki en büyük fark D vitamini grubuna ait oldu. Fakat, en düşük endometriyal implant volümlerine buserelin asetat grubunda rastlandı. Sonuç olarak, D vitamini ile buserelin asetat uygulaması sonucu deneysel endometriozis modelinde implant boyutlarında bir gerileme gözlemlendi.

Mert ve diğerleri (2016), sıçanlarda uyguladıkları deneysel endometriozis modelinde *Hypericum perforatum L.* (sarı kantaron) ve *Hippophae rhamnoides L.* (yalancı iğde) karışımının etkilerini araştırdıkları çalışmalarında referans grup olarak buserelin asetatı seçmişlerdir. Tedavi öncesi ile tedavi sonrası ölçülen endometriyal implant volümlerinin endometriozis grubunda yüksek olduğu, buserelin asetat uygulanan grupta ise azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca adezyon skorları için, kontrol grubunda yüksek değerler varken, buserelin asetat grubunda ise bir azalış olduğu bildirilmektedir. Biz de çalışmamızda, adezyon

skorlarını değerlendirdiğimizde endometriozis grubunda artış, buserelin asetat grubunda azalış olduğunu tespit ettik. Fakat, D vitamini verdiğimiz gruptaki ortalama adezyon skoru Buserelin asetat grubu ile kıyaslandığında daha başarılı çıktı; D vitamini, buseralin asetata göre adezyonun bertaraf edilmesinde daha başarılı bulundu. Benzer olarak, Yılmaz ve diğerleri (2013) yaptıkları bir çalışmada D vitamininin postoperatif adezyonları önlemede başarılı olduğunu göstermişlerdir [104]. D vitamininin adezyonu önlemede veya etkisini azaltmada kilit faktörlerden biri olan hücre içi adezyon molekül 1 (*Intercellular adhesion molecule 1, ICAM-1*) ile olan etkileşimi düşünülebilir [105]. Hücre membran glikoproteini olan ICAM-1, hücre içi adezyonu artıran immünoglobulin süper ailesine mensup bir proteindir [106]. ICAM-1 ile endometriozis olguları arasında bir bağlantı olduğu varsayılmakta; ektopik endometriyal hücrelerin ICAM-1 için kaynak teşkil ettiği ve ICAM-1 proteinlerin ektopik endometriyal stromada aşırı eksprese edildiği iddia edilmektedir. Buna ek olarak, endometriozis olgularında serum ICAM-1 seviyeleri yüksek bulunmuştur [105, 107].

Endometriyotik lezyon bölgelerinde meydana gelen fibrotik yapılanmanın ardında kompleks bir mekanizma yer almaktadır. Fibrozis endometriozisin bütün tiplerinde karşımıza çıkmakta, endometriozis ile ilişkili ağrı ve infertiliteye yol açmaktadır. Biyolojik süreçte miyofibril ve düz kas hücrelerinin aktivasyonu ile fazla miktarlarda üretilen “dönüştürücü büyüme faktörü- β ” (*transforming growth factor, TGF- β*), “epitel-mezenkimal değişim” (*epithelial-to-mesenchymal transition, EMT*) ve kollagen depozitleri görev almaktadır. Farelerde ve insanlarda, aktive olan trombositlerin fibrozisin gelişiminde görev aldığı yapılan araştırmalarla keşfedilmiştir. Endometriyotik lezyonlar esasen tekrarlanan doku hasarı ve ardından bir yenilenme sürecini geçiren olaylar dizisinin meydana geldiği bölgelerdir. Lezyon bölgelerine kan damarlarından trombositlerin ekstrasvazasyonu ve agregasyonu, dönüştürücü büyüme faktörü- β salınımı ve ilişkili yolların indüklenmesi sonucunda fibrozis tetiklenir. Makrofajlar, pro-fibrotik fenomenler (VEGF, TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8) için bazı aracı faktörleri üretebilirler. Peritoneal lezyonlar kırmızıdan siyah lezyona doğru fibrotik bileşenlerden ötürü evrilme eğilimindedirler. Endometriozisin latent evrelerinde fibrotik alanlar opakdan sarı-kahverengi lezyon bölgelerinin oluşumuna aracılık eder. Normal şartlar altında fibroblastların çoğalması tipik olarak tip I kollagen ile düzenlenmektedir. Endometrioziste, derin endometriyotik stromal hücrelerin büyümesi onları çevreleyen fibrotik alandan etkilenmez. Bu kontrol dışı stromal hücre çoğalmaları, “serin/treonin protein kinaz” (AKT) ve ERK yollarının anormal aktivasyonları ile ilişkili görünmektedir [108]. Matsuzaki ve Darcha (2015), stromal hücrelerin fibrotik alanlarda

nasıl direnç göstererek çoğalabildiklerini araştırmak için insan kaynaklı endometriyal parçaları önce hücre kültürü ortamında izole ettikten sonra farelere enjekte etmişlerdir. *In vitro* ortamda gerçekleştirdikleri deneylerde AKT ve ERK yollarının derin endometriyotik lezyonların büyümesine yardımcı olduğunu bunu fibrotik alanlardaki stromal hücre proliferasyonlarını destekleyerek yaptığını düşünmektedirler. Bu nedenle, AKT ve ERK yollarının inhibisyonu ile hücre proliferasyonunun azaltılması ve apoptozisin uyarılmasını temel alan etkili bir terapötik stratejinin geliştirilebileceğini düşünmektedirler [109]. Nahari ve Razi (2018), sıçanlardaki ektopik endometriyal dokudaki apoptotik faaliyetleri teşvik etmek amacıyla, ERK ve Bcl-2'yi de kapsayan yollarla birlikte ele aldıklarında Silymarin ile olası bir tedavi seçeneğini önermişlerdir. Silymarinin (devedikeni bitkisinden elde edilen tohum) antioksidan, anti-kanser, anti-inflamatuar ve immünsupresif etkilerinin olduğu bilinmektedir [110]. Güncel bir araştırmada, D vitamininin bağ dokusu büyüme faktörü (*connective tissue growth factor, CTGF*) ve CD34/VEGF yolağı üzerinden etki göstererek peritondaki kollagen birikimi sonucu meydana gelen fibrotik dokuyu ve anjiogenezisi geriletmiş gösterilmiştir [111]. Çalışmamızda D vitamini uygulanan grupta kollagen lif yoğunluğu yüzdesi endometriozis ve DMSO gruplarından düşüktü fakat istatistiksel düzeyde fark bulunmadı. Benzer sonuç buserelin asetat grubu için de geçerliydi; kollagen lif yoğunluklarının yüzdesi D vitamini grubu ile benzer fakat endometriozis ve DMSO grupları ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.

Dokuda meydana gelen apoptotik aktivitelerin niceliksel olarak değerlendirilmesine fırsat veren TUNEL yöntemi araştırmalarda sıkça kullanılmaktadır. Yöntem, apoptozis esnasında meydana gelen DNA fragmantasyonlarının kırık olan DNA ucunun 3' hidroksil grubuna bir belirteç bağlanarak mikroskop altında görünür hale getirilmesi prensibine göre çalışır [112]. Hastalardan elde edilen numunelerin parafin bloklara gömülüp ardından kit yardımıyla TUNEL yönteminin uygulandığı birçok çalışma mevcuttur [113-115]. Ayrıca yine deney hayvanlarından elde edilen numunelerin parafin bloklarında da TUNEL yöntemi uygulanabilir [101]. Ortak sonuç ise, endometriozis olgularında apoptozise karşı bir direnç gösterilmektedir. Hücreler bir şekilde apoptozisten kaçmakta veya apoptozis baskılanmaktadır. Hatta, apoptozisi inhibe eden proteinlerin örneğin Bcl-2 seviyelerinin de arttığı bildirilmektedir [116].

Apoptozisi başlatan veya önleyen proteinler yine hücre içerisinde bulunan kaspazlar ile birlikte çalışır. Ektopik endometroziste Bcl-2 gen ekspresyon seviyeleri yüksektir;

proliferatif fazda bez epitelinde, geç sekretuar fazda ise stromal hücrelerde pik yaptığını gösteren çalışmalar mevcuttur [117].

Bir ötopik endometriyum olgusunda, kontrol grubu (N = 16) ve hasta grubu (N = 14) olmak üzere 2 gruptan oluşan bir çalışmada TUNEL yöntemi, Bcl-2 ve Bax protein yoğunlukları değerlendirilmiştir. Apoptozis değerlerinin hastalığın şiddetinden (hafif, orta, şiddetli) etkilenmediği bildirilmiştir. Bcl-2 immünohistokimyasal boyamanın endometriyal bez hücrelerinde yoğun olarak gözlemlendiği, geç proliferatif fazda pik yaptığı, geç sekretuar fazda ise ortadan kaybolduğu belirtilmiştir. Kontrol grubunda ise Bcl-2 immünohistokimyasal boyamanın geç proliferatif fazda görüldüğü fakat geç sekretuar fazda kaybolduğu tespit edilmiştir. Bax ekspresyonunun endometriyal bez hücrelerinde hem hasta grubunda hem de kontrol grubunda geç proliferatif fazda olmadığı bildirilmiştir. Araştırmacılara göre, aşırı Bcl-2 ekspresyonu Bax homodimer yapılarının birikmesini engellemiş, bu durum da apoptozisin uyarılmasını önlemiştir. Birden fazla anti-apoptotik yolak bulunmaktadır. Endometriozisli hastalarda bu yollardan hangileri bir arada görev almakta veya kaçısı aktif olmakta, endometriyal hücrelerin apoptotik sürece girmelerini hangileri engellemekte soruları henüz yanıtlanabilmiş değildir [118-120].

Huniadi ve diğerleri (2013), sıçanlarda cerrahi olarak indükledikleri endometriozis modeli çalışmalarında parafin bloklardan elde ettikleri kesitlerde Bcl-2 ve Bax için immünohistokimyasal analizler yapmışlardır. Araştırmacılar, tedavi grubuna uyguladıkları pro-apoptotik etkisi olduğu bilinen ulipristalin Bax antikoru ile immün reaktivite bakımından pozitif boyanan hücre sayılarının yoğun olduğunu gözlemlemişlerdir. Bcl-2 antikoru ile immün reaktivite bakımından pozitif boyanan hücrelerinin ise az olduğunu gözlemlemişlerdir [121]. Bir fare modeli endometriozis çalışmasında, hücre proliferasyonunu inhibe edici özelliği olan metforminin endometriyal implant alanlarındaki Bcl-2/Bax oranını düşürdüğünü ve bu şekilde apoptotik faaliyetleri azalttığı bildirilmiştir [122]. Çalışmamızda, kanser tedavilerinde terapötik etkileri olduğu iddia edilen, apoptotik faaliyetleri indükleyen anti-proliferatif özelliğindeki D vitamini [123] verilen gruptaki Bcl-2 ile immün pozitif boyanan hücrelerin endometriyal bez ve stromada seyrek, Bax ile immün pozitif boyanan hücrelerin endometriyal bez ve stromada biraz daha yoğun boyandığını tespit ettik. Benzer sonuç buserelin asetat grubu için de söz konusudur. Kistik lezyonlarda Bcl-2 ve Bax immünreaktivite, kistik lezyondaki hücrelerin lokasyonlarına bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. Korkmaz ve diğerleri (2013), endometriyal kistik yapılara ait epitel hücrelerinde zayıf Bcl-2 ve yoğun Bax immünreaktivite gözlemlemişlerdir. Araştırmacılara

göre, kistik endometriyal stromal hücreler ile endometriyal stromal hücreler arasında Bcl-2 ekspresyonu bakımından önemli derecede bir fark bulunmaktadır [136]. Biz de çalışmamızda, endometriozis grubuna ait kistik yapılarda Bcl-2 ve Bax immüreaktivite tutunumları bakımından bir değişkenlik olduğunu gözlemledik.

Bir dokunun orijinal bölgesinden uzaklaşıp ektopik bir bölgede hayatta kalması için onun başarılı bir şekilde yeni konağına adhere olması, yeni çevresine uyum sağlaması, çoğalması ve beslenmesi için yeni kan kaynaklarını oluşturması gerekir. Bu süreçte apoptozis inhibe olur; hücre-hücre, hücre-substrat etkileşimleri gerçekleşir; kontrollü hücre çoğalması ve anjiogenezis meydana gelir [124]. Abbas ve diğerleri (2013), sıçanlarda cerrahi olarak indüklenen endometriozis modelinde bir protein-tirozin kinaz inhibitörü olan Sunitinib anti-kanser ajanı ile olası tedavi araştırmalarında TUNEL ile implant bölgelerindeki apoptotik faaliyetleri araştırmışlardır. Kist lümenini oluşturan epitellerin hücre çekirdeklerinin ve stromadaki birkaç çekirdeğin TUNEL pozitif boyandığını (koyu kahverengi) tespit etmişlerdir [125]. Çalışmamızda, TUNEL pozitif hücre sayısını implant alanına oranladığımızda en yüksek oranın D vitamini grubuna ait olduğunu bulduk. D vitamini, endometriyal implant alanındaki hücreleri apoptotik sürece teşvik ederek makroskopik düzeyde implant küçülmesine yol açmış olabilir.

Endometriozisli kadınlara ait periton sıvıları mitojenik, anjiyojenik, morfojenik ve kemoatraktan aktivitelere sahiptir. Sıvının içeriğinde büyüme faktörleri ve monosit/makrofajlardan salınan sitokinler bulunurken periton kavitede ayrıca endometriyal, ovaryan ve mezotelyal hücrelere de rastlanır. Bu sitokinler ve büyüme faktörleri hücrelerin hayatta kalmasını, çoğalmasını, farklılaşmasını, anjiogenezisi ve inflamatuvar yanıtları tetikleyebilir. Endometriozisli bireylerde monosit/makrofajlar tarafından ortama salınan pro-inflamatuvar sitokinlerden makrofaj koloni-uyarıcı faktör, IL-1, IL-6 ve TNF- α seviyeleri yüksektir. IL-1 ve TNF- α diğer sitokinler olan IL-8 ve monosit kemotaktik protein-1 (MCP-1)'in salınımını stimüle edebilirler. Bu sitokinler nötrofil, T lenfosit, monosit ve makrofajlara kemoatraktan ve pelvik ağrı ile infertiliteye katkıda buldukları iddia edilmektedir. Güçlü bir anjiyojenik faktör olan VEGF de periton sıvısında rastlanır ve hastalığın şiddeti VEGF seviyeleri ile pozitif korelasyon göstermektedir. VEGF'in periton sıvısında nereden kaynaklandığı tam olarak bilinmese de endometriyal, mezotelyal veya endotelyal hücrelerden ötürü olabileceği düşünülmektedir [126].

Yapılan çalışmalarda endometriozis modeli oluşturulan deneysel hayvan modellerinde VEGF seviyelerinin değerlendirilmesi parafin bloklarda immünohistokimyasal yöntemlerle olduğu gibi [127] periton veya plazma sıvılarından elde edilen numunelerde de yapılmaktadır [103]. Yeniel ve diğerleri (2014), sıçanlarda cerrahi olarak indüklenen endometriozis modelinde oksitosin etkisinin plazma ve periton sıvılarındaki MCP-1, VEGF ve TNF- α seviyelerine olan etkilerini araştırmıştır. Çalışmada VEGF ve TNF- α seviyelerinin tedavi uygulanmayan endometriozis ile indüklenen grupta yüksek olduğu, tedavi olarak oksitosin uygulanan endometriozis ile indüklenen grupta ise VEGF ve TNF- α seviyelerinin hem plazma hem de periton sıvılarında önemli derecede azaldığı gösterilmiştir [128]. Biz de çalışmamızda peritoneal VEGF örneklerini hem 2. aşamanın hem de 3. aşamanın sonunda derledik ve ELISA yöntemi ile değerlendirdik. Araştırmamıza göre, endometriozis grubunda tedavi sonrasında (3. aşama) bir artış gözlenirken DMSO, D vitamini ve Buserelin asetat gruplarında bir azalmanın olduğunu tespit ettik. Özellikle D vitamini ve Buserelin asetat gruplarında peritoneal VEGF değerleri bakımından önemli derecede bir düşüş olduğu gözlemlendi. Bu sonucu, D vitamininin patolojik anjiogenezisi baskılamasına dayandırabiliriz [129]. Ayrıca, peritoneal TNF- α örneklerini de hem 2. aşamanın hem de 3. aşamanın sonunda derledik ve ELISA yöntemi ile değerlendirdik. Endometriozis grubunun peritoneal TNF- α değerleri 3. aşamada yükselmiş bulundu; DMSO, D vitamini ve Buserelin asetat gruplarının peritoneal TNF- α değerleri ise azalmış bulundu. Özellikle D vitamini ve Buserelin asetat gruplarının tedavi öncesi ve sonrası peritoneal TNF- α değerleri bakımından istatistiksel olarak önemli bir fark olduğunu tespit ettik. Sonuçlarımız, deneysel endometriozis çalışmaları ve literatür ile paralellik göstermektedir [102, 130, 131].

Endometriyal implant bölgelerindeki sinir lif yoğunlukları ile endometriozis-ilişkili ağrı arasında pozitif bir korelasyon bulunmaktadır. Laparoskopik endometriozis tanısı konulan 44 kadınla yapılan bir araştırmada peritoneal endometrioziste sinir lif yoğunluğu ile ağrı arasında bir ilişki olduğu, ağrının menstrual faza bağlı olarak değişkenlik göstermediği belirtilmiştir [132]. Kemirgen ve sıçanlara uygulanan ektopik endometriyal implantlar sonucunda organizma kendi duyuşal ve sempatik sinir lif kaynaklarını o bölgede kendisi uyarmaktadır [133, 134]. Biz de çalışmamızda birçok H&E boyalı preparatlarımızdaki implant bölgelerinde sinir liflerine rastladık.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Endometriozis, ektopik endometriyal-benzeri dokuların uterus dışı göçü ve buna bağlı olarak yerleşimleri sonucunda gelişen kronik inflamasyonla seyreden jinekolojik bir patolojidir [91].

Hastalara laparoskopi yöntemi ile endometriozis tanısı konulduktan 1 yıl sonra lezyonların % 17 ile % 29'u kendiliğinden düzelir, % 24 ile % 64'ü ilerleme gösterir ve % 9 ile % 59'u stabil kalır. Laparoskopik lezyonların yok edilmesinden sonra 1-2 yıl içerisinde % 10 ile % 55 arasında bir rekürrens meydana gelir. Klinikte belli bir süreç boyunca kombine oral kontraseptifler, oral progestinler ve GnRH agonistleri gibi ilaçlar verilmekte; problem ise bu ilaçların bırakılması halinde endometriozis ve infertilite durumu geri dönmektedir [95, 135].

Amacımız, sıçanlarda deneysel endometriozis modeli oluşturarak klinikte kullanılan ve bir GnRH analogu olan buseralin asetat ile birçok faydası bulunan doğal bir koruyucu olan D vitamininin etkinliklerini karşılaştırmaktır. Çalışmamızda, histopatolojik bulguların yanı sıra immünohistokimyasal açıdan ve ELISA yöntemi ile peritoneal VEGF ve TNF- α düzeylerini değerlendirdik.

Sonuçta, D vitamini fibrotik alanların gerilemesine, apoptotik süreci uyararak ve anjiogenezisi baskılayarak implant boyutlarının küçülmesine neden olmuş olabilir. İmplant bölgesini yapılandıran ve o bölgeye yabancı olan hücrelerin temizlenmesiyle inflamatuvar sürecin gerilemesini sağlamış olabilir. Peritoneal VEGF seviyelerinin düşmesi ile patolojik anjiogenezisinin baskılanması sonucu endometriyal implant bölgesinin kanlanması sekteye uğratılmıştır. Beslenemeyen ve yeteri kadar oksijen alamayan hücreler apoptotik ve/veya nekrotik sürece girmiş olabilir.

Endometriyal implant bölgelerinde yeniden damarlanmaların tespiti için farklı immünohistokimyasal analizler kullanılabilir. VEGF ve TNF- α 'nın yanı sıra matris metalloproteinaz (MMP), D vitamini reseptörü (VDR) gibi yeni ajanların değerlendirilmesi yapılabilir. Endometriozis hastalığını bir otoimmün hastalık gibi değerlendirip inflamatuvar süreçte görev alan ajanların analizleri yapılabilir. Farklı veya kombine anti-inflamatuvar tedavi yöntemleriyle yeni deneysel hayvan modeli çalışmaları planlanabilir.



KAYNAKLAR

1. Fielding, J.R., A.S. Thurmond, and D. Brown. (2011). *Gynecologic Imaging (Expert Radiology Series)*. Elsevier Health Sciences, 147-160.
2. Strauss, J.F., Robert L. Barbieri and Antonio R. Gargiulo. (2019). *Yen And Jaffe's Reproductive Endocrinology : Physiology, Pathophysiology, And Clinical Management* (Eighth Edition). Elsevier, 206-247.
3. Williams, R. H., Melmed, S., Koenig, R., Rosen, C. J., Auchus, R., and Goldfine, A. (2020). *Williams textbook of endocrinology* (Fourteenth Edition). Elsevier. 825-866.
4. Smith, R. P., and Netter, F. H. (2018). *Endometriosis. In Netter's obstetrics and gynecology* (Third edition). Elsevier. 298-300.
5. Prietl, B., Treiber, G., Pieber, T. R., and Amrein, K. (2013). *Vitamin D and immune function. Nutrients*. 2502-2521.
6. Zughaier, S.M., E. Lubberts, and A. Bener. (2020). Editorial: Immune-Modulatory Effects of Vitamin D. *Frontiers in Immunology*, 11, 2385.
7. Pereira, F., M.J. Larriba, and A. Muoz (2012). Vitamin D and colon cancer. *Endocrine Related Cancer*, 19(3), R51.
8. Akyol, A., Şimşek, M., İlhan, R., Can, B., Baspınar, M., Akyol, H., Akın, M. (2016). Efficacies of vitamin D and omega-3 polyunsaturated fatty acids on experimental endometriosis. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 55(6), 835-839.
9. Maghbooli, Z., Sahraian, M. A., Ebrahimi, M., Pazoki, M., Kafan, S., Tabriz, H. M., Holick, M. F. (2020). Vitamin D sufficiency, a serum 25-hydroxyvitamin D at least 30 ng/mL reduced risk for adverse clinical outcomes in patients with COVID-19 infection. *PLoS One*, 15(9), e0239799. doi:10.1371/journal.pone.0239799.
10. Van Kempen, T.A. and E. Deixler. (2020). SARS-CoV-2: Influence of phosphate and magnesium, moderated by vitamin D, on energy (ATP)-metabolism and on severity of COVID-19. *The American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*. 320:1, E2-E6.
11. Ardeniz, Ö. (2008). Vitamin D ve immün sistem. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 28(2), 198-205.
12. Bilotas, M., Barañao, R. I., Buquet, R., Sueldo, C., Tesone, M., & Meresman, G. (2006). Effect of GnRH analogues on apoptosis and expression of Bcl-2, Bax, Fas and FasL proteins in endometrial epithelial cell cultures from patients with endometriosis and controls. *Human Reproduction*, 22(3), 644-653.
13. Sancak, B., Cumhuri, M., İlgi, S., Kural, E., Taner, E., Başar, R., Çelik, H. (2016). *Fonksiyonel anatomi: baş-boyun ve iç organlar* (10. Baskı). Ankara: ODTÜ Geliştirme Vakfı. 302-306.

14. Sadler, T. (2004). *Langman's Medical Embryology* (Ninth editin). New York: Lippincott Williams & Wilkins. 235-262.
15. Moore, K. L., Persaud, T.V.N., Torchia, M. G. (2020). *The developing human clinically oriented embryology*. Philadelphia: Elsevier (Eleventh Edition). 11- 46.e1.
16. İnternet. Moncada-Madrado M, Rodríguez Valero C. (2020). *Embryology, Uterus*. StatPearls Publishing LLC. [Updated 2020 Aug 11]. Web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547748/> adresinden 15 Ocak 2021'de alınmıştır.
17. Ross, M.H. and W. Pawlina. (2020). *Histology : A Text And Atlas : With Correlated Cell And Molecular Biology* (Eighth edition). Philadelphia : Wolters Kluwer Healt. 830-863.
18. Gartner, L. (2020). *Female Reproductive System, in Textbook of Histology* (Fifth edition) Philadelphia, PA : Elsevier. 487-518.
19. Abraham L. Kierszenbaum and Tres L.,L. (2020). *Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology* (Fifth edition). St. Louis, MO : Elsevier. 723-753.
20. Sancak, B., Cumhuri, M., İlgi, S., Kural, E., Taner, E., Başar, R., Çelik, H. (2016). *Fonksiyonel anatomi: baş-boyun ve iç organlar* (10. Baskı). Ankara: ODTÜ Geliştirme Vakfi. 298-306.
21. Buyru, F. (2001). Uterusta gebelik için oluşan değişimler, hormonal uyarılara yanıt. *Perinatoloji Dergisi*, 9, 224-229.
22. Bulun, S.E. (2016). *Williams Textbook of Endocrinology* (Thirteenth Edition), Philadelphia: Elsevier. 589-663.
23. Ross, M. ve Pawlina W (2014). *Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas*. (Altıncı baskı). (çev. Baykal B.) Ankara: Palme yayıncılık. 848-854.
24. İnternet. Thiyagarajan, D.K., H. Basit, and R. Jeanmonod. (2019). *Physiology, Menstrual Cycle*. StatPearls Publishing LLC. [Updated September 17, 2020]. Web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500020/> adresinden 15 Ocak 2021'de alınmıştır.
25. Ovalle W. K. and Nahirney P.C. (2020). *Netter's Essential Histology*. (Third Edition) Elsevier. 431-458.
26. Carroll, R.G. (2007). Elsevier's Integrated Physiology. Mosby: Philadelphia. 177-187.
27. İnternet. Reed, B.G. and Carr, B.R. (2018). *The normal menstrual cycle and the control of ovulation*. South Dartmouth. Web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279054/> adresinden 15 Ocak 2021'de alınmıştır.
28. Kumar, D. (2016). *Medical and Health Genomics*. London, UK : Academic Press 213-225.
29. Sourial, S., N. Tempest and D.K. Hapangama (2014). Theories on the pathogenesis of endometriosis. *International Journal of Reproductive Medicine*. 2014, 179515. doi:10.1155/2014/179515

30. Zondervan, K. T., Becker, C. M., Koga, K., Missmer, S. A., Taylor, R. N. and Viganò, P. (2018). Endometriosis. *Nature Reviews Disease Primers*. 4(1), 9. doi:10.1038/s41572-018-0008-5
31. Alborzi, S., A. Azimirad, and M. Azimirad (2018). Experimental Endometriosis: Review of the Literature Through a Century and the Iranian Experience. *Archives of Iranian Medicine*. 21(11), 536-543.
32. Taylor, R. and D.I. Lebovic (2014). *Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology* (Seventh edition). Saunders: Philadelphia. 565-585.
33. Sampson, J.A. (1927). Metastatic or Embolic Endometriosis, due to the Menstrual Dissemination of Endometrial Tissue into the Venous Circulation. *The American Journal of Pathology*. 3(2), 93–110.43.
34. Rolla, E. (2019). Endometriosis: advances and controversies in classification, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *F1000Research*. 8(F1000 Faculty Rev):529. 10.12688/f1000research.14817.1
35. Matsuura, K., Ohtake, H., Katabuchi, H. and Okamura, H. (1999). Coelomic metaplasia theory of endometriosis: evidence from in vivo studies and an in vitro experimental model. *Gynecologic and obstetric investigation*. 47(Suppl. 1), 18-22.
36. Holst, J. P., Soldin, O. P., Guo, T. and Soldin, S. J. (2004). Steroid hormones: relevance and measurement in the clinical laboratory. *Clinics in laboratory medicine*. 24(1), 105-118. doi:10.1016/j.cll.2004.01.004
37. Ohshima, Y. and Shinki, T. (2016). *Handbook of Hormones*. San Diego: Academic Press. 546-e597-542.
38. Norman, A.W. (2003). *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (Second Edition). Academic Press: Oxford. 3166-3174.
39. Samavat, H. and M.S. Kurzer (2015). Estrogen metabolism and breast cancer. *Cancer letters*. 356 (2 Pt A), 231-243.
40. Bulun, S. E., Monsavais, D., Pavone, M. E., Dyson, M., Xue, Q., Attar, E., Su, E. J. (2012). Role of estrogen receptor- β in endometriosis. *Seminars in Reproductive Medicine*. 30(1), 39-45. doi: 10.1055/s-0031-1299596.
41. Hapangama, D., A. Kamal, and J. Bulmer (2014). Estrogen receptor β : the guardian of the endometrium. *Human Reproduction Update*. 21(2), 174-193.
42. Gibson, D. A., Simitsidellis, I., Collins, F. and Saunders, P. T. (2018). Endometrial intracrinology: Oestrogens, androgens and endometrial disorders. *International Journal of Molecular Sciences*. 19(10), 3276.
43. Patel, B. G., Rudnicki, M., Yu, J., Shu, Y. and Taylor, R. N. (2017). Progesterone resistance in endometriosis: origins, consequences and interventions. *Acta Obstetricia Et Gynecologica Scandinavica*. 96(6), 623-632.

44. Furth, P. A., Afridi, S., Alothman, S. J., Azhar, R. I., Gusain, L. Y., Shreeves, S. M., Zomorodi, D. (2018). *Encyclopedia of Reproduction* (Second Edition) Oxford: Academic Press. 808-813.
45. Marquardt, R. M., Kim, T. H., Shin, J.-H. and Jeong, J.W. (2019). Progesterone and Estrogen Signaling in the Endometrium: What Goes Wrong in Endometriosis? *International Journal of Molecular Sciences*. 20(15), 3822. doi:10.3390/ijms20153822
46. Attar, E. and Bulun S.E. (2005). Aromatase and other steroidogenic genes in endometriosis: translational aspects. *Human Reproduction Update*. 12(1), 49-56.
47. Qi, Q. M., Guo S. W. and Liu, X. S. (2017). Estrogen Biosynthesis and Its Regulation in Endometriosis. *Reproductive and Developmental Medicine*. 1(1), 55.
48. Wieser, F., Schneeberger, C., Tong, D., Tempfer, C., Huber, J. C. and Wenzl, R. (2002). PROGINS receptor gene polymorphism is associated with endometriosis. *Fertility and Sterility*. 77(2), 309-312.
49. Casas-Grajales, S. and Muriel, P. (2017). *Liver Pathophysiology*. Boston: Academic Press. 583-604.
50. Lu, J., Wang, Z., Cao, J., Chen, Y. and Dong, Y. (2018). A novel and compact review on the role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 16(1), 80.
51. Scutiero, G., Iannone, P., Bernardi, G., Bonaccorsi, G., Spadaro, S., Volta, C. A., Nappi, L. (2017). Oxidative stress and endometriosis: a systematic review of the literature. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017(2017), 7265238. doi: 10.1155/2017/7265238.
52. Mier-Cabrera, J., Aburto-Soto, T., Burrola-Méndez, S., Jiménez-Zamudio, L., Tolentino, M. C., Casanueva, E., & Hernández-Guerrero, C. (2009). Women with endometriosis improved their peripheral antioxidant markers after the application of a high antioxidant diet. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 28(7), 54. doi:10.1186/1477-7827-7-54.
53. Halpern, G., Schor, E. and Kopelman, A. (2015). Nutritional aspects related to endometriosis. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 61(6), 519-523.
54. İnternet. Blanco, G. and Blanco A. (2017). *Medical Biochemistry*. Elsevier. 791-796 Web: <http://www.sciencedirect.com/science/book/9780128035504> adresinden 15 Ocak 2021'de alınmıştır.
55. Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*. 35(4), 495-516.
56. Güleş, Ö. ve Ülker E. (2008). Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 19(2), 73-78.
57. Coşkun, G. ve Özgür H. (2014). Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*. 20(3), 145-158.

58. Morgan, C. W., Julien, O., Unger, E. K., Shah, N. M. and Wells, J. A. (2014). *Methods in Enzymology*. Academic Press. 544, 179-213.
59. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell* (Fourth edition). Garland Science.
60. Fan, J., Ning, B., Lyon, C. J. and Hu, T. Y. (2017). *The Enzymes*. Academic Press. 42, 1-25.
61. Fan, T.J., Han, L.H., Cong, R.S. and Liang, J. (2005). Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 37(11), 719-727.
62. Zaman, S., R. Wang, and V. Gandhi (2014). Targeting the apoptosis pathway in hematologic malignancies. *Leukemia & lymphoma*. 55(9), 1980-1992.
63. Harada, T., Taniguchi, F., Izawa, M., Ohama, Y., Takenaka, Y., Tagashira, Y. and Terakawa, N. (2007). Apoptosis and endometriosis. *Frontiers in Bioscience*. 12(1), 3140-3151.
64. Daikoku, E., Ito, Y. and Otsuki, Y (1998). The induction of apoptosis in ovaries and uteri of bcl-2-deficient mice. *Medical Electron Microscopy*. 31(2), 68-76.
65. Fulda, S. and K.-M. Debatin (2006). Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*. 25(34), 4798- 4811.
66. Hongmei Z. (2012). Extrinsic and intrinsic apoptosis signal pathway review. *Apoptosis and Medicine*. London, United Kingdom: InTechOpen.
67. Pistrutto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A., and D'Orazi, G. (2016). Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging*. 8(4), 603-619. doi: 10.18632/aging.100934.
68. Reis, F.M., Petraglia, F. and Taylor, R.N. (2013). Endometriosis: hormone regulation and clinical consequences of chemotaxis and apoptosis. *Human Reproduction Update*. 19(4), 406-418.
69. Baranov, V., Malysheva O. and Yarmolinskaya, M. (2018). Pathogenomics of endometriosis development. *International Journal of Molecular Sciences*. 19(7), 1852-1863.
70. Sadler, T.W. (2011). *Langman's Medical Embryology*. Philadelphia: Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins. 235-262.
71. Laganà, A. S., Garzon, S., Götte, M., Viganò, P., Franchi, M., Ghezzi, F. and Martin, D. C. (2019). The Pathogenesis of Endometriosis: Molecular and Cell Biology Insights. *International Journal of Molecular Sciences*. 20(22), 5615- 5657.
72. Prietl, B., Treiber, G., Pieber, T. R. and Amrein, K. (2013). Vitamin D and immune function. *Nutrients*. 5(7), 2502-2521.
73. O'Mahony, L., Stepien, M., Gibney, M. J., Nugent, A. P. and Brennan, L. (2011). The potential role of vitamin D enhanced foods in improving vitamin D status. *Nutrients*. 3(12), 1023-1041.

74. Cermisoni, G. C., Alteri, A., Corti, L., Rabellotti, E., Papaleo, E., Viganò, P. and Sanchez, A. M. (2018). Vitamin D and endometrium: a systematic review of a neglected area of research. *International Journal of Molecular Sciences*. 19(8), 2320-2333.
75. Abbas, M. A., Taha, M. O., Disi, A. M. and Shomaf, M. (2013). Regression of endometrial implants treated with vitamin D3 in a rat model of endometriosis. *European Journal of Pharmacology*. 715(1-3), 72-75.
76. Feldman, D., Pike, J.W. and Bouillon, R. (2018). *Vitamin D*. (Fourth edition). London, United Kingdom : Academic Press. 545-562.
77. Feldman, D., Pike, J.W. and Bouillon, R. (2018). *Vitamin D*. (Fourth edition). London, United Kingdom : Academic Press. 783-795.
78. Wardle, J. (2019). *Clinical naturopathy* (Third edition). Chatswood, NSW: Elsevier. 452-465.
79. Jones, R.C. (1984). The effect of a luteinizing hormone releasing hormone (LRH) agonist (Wy-40,972), levonorgestrel, danazol and ovariectomy on experimental endometriosis in the rat. *European Journal of Endocrinology*. 106(2), 282-288.
80. Altintas, D., Kokcu, A., Tosun, M., Cetinkaya, M. B., and Kandemir, B. (2008). Comparison of the effects of cetrorelix, a GnRH antagonist, and leuprolide, a GnRH agonist, on experimental endometriosis. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. 34(6), 1014-1019.
81. Blauer, K.L. and Collins R.L. (1988). The effect of intraperitoneal progesterone on postoperative adhesion formation in rabbits. *Fertility and Sterility*. 49(1), 144-149.
82. Yildirim, B., Guler, T., Akbulut, M., Oztekin, O. and Sariiz, G. (2014). 1-Alpha, 25-Dihydroxyvitamin D3 Regresses Endometriotic Implants in Rats by Inhibiting Neovascularization and Altering Regulation of Matrix Metalloproteinase. *Postgraduate Medicine*. 126(1), 104-110.
83. Akkol, E. K., Demirel, M. A., Acikara, O. B., Süntar, I., Ergene, B., Ilhan, M., and Tekin, M. (2015). Phytochemical analyses and effects of *Alchemilla mollis* (Buser) Rothm. and *Alchemilla persica* Rothm. in rat endometriosis model. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. 292(3), 619-628.
84. Strehl, J. D., Hackl, J., Wachter, D. L., Klingsiek, P., Burghaus, S., Renner, S. P. and Beckmann, M. W. (2014). Correlation of histological and macroscopic findings in peritoneal endometriosis. *International Journal of Clinical And Experimental Pathology*. 7(1), 152-162.
85. Zhang, Q., Liu, X. and Guo, S. W. (2017). Progressive development of endometriosis and its hindrance by anti-platelet treatment in mice with induced endometriosis. *Reproductive Biomedicine Online*. 34(2), 124-136.
86. İnternet. ABPBiosciences, TUNEL Chromogenic Apoptosis Detection Kit Datasheet. (2020). Web: <https://www.abpbio.com/product/tunel-chromogenic-kit/> adresinden 15 Ocak 2021'de alınmıştır.

87. Kütük, T. (2017). *Radyasyona bağlı hipokampal nörojeniz inhibisyonunda tianeptinin etkisi*, Yayınlanmamış Uzmanlık Tezi, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara.
88. Jones, R.K., Searle, R.F. and J.N. Bulmer (1998). Apoptosis and bcl-2 expression in normal human endometrium, endometriosis and adenomyosis. *Human Reproduction*. 13(12), 3496-3502.
89. Wang, X., Ma, Z. and Song, N. (2018). Inflammatory cytokines IL-6, IL-10, IL-13, TNF- α and peritoneal fluid flora were associated with infertility in patients with endometriosis. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 22(9), 2513-2518.
90. Zhao, Q., Lu, D., Zhang, G., Zhang, D., and Shi, X. (2021). Recent improvements in enzyme-linked immunosorbent assays based on nanomaterials. *Talanta*. 223(Pt 1), 121722. doi:10.1016/j.talanta.2020.121722.
91. Dunselman, G. A., Vermeulen, N., Becker, C., Calhaz-Jorge, C., D'Hooghe, T., De Bie, B. and Nelen, W. (2014). ESHRE guideline: management of women with endometriosis. *Human Reproduction*. 29(3), 400-412. doi:10.1093/humrep/det457.
92. Nisenblat, V., Bossuyt, P. M., Farquhar, C., Johnson, N. and Hull, M. L. (2016). Imaging modalities for the non-invasive diagnosis of endometriosis. *Cochrane Library: Cochrane Reviews*. 2(2), Cd009591. doi:10.1002/14651858.CD009591.pub2.
93. Missmer, S. A., Hankinson, S. E., Spiegelman, D., Barbieri, R. L., Marshall, L. M. and Hunter, D. J. (2004). Incidence of laparoscopically confirmed endometriosis by demographic, anthropometric, and lifestyle factors. *American Journal of Epidemiology*. 160(8), 784-796. doi:10.1093/aje/kwh275.
94. Nyholt, D. R., Low, S. K., Anderson, C. A., Painter, J. N., Uno, S., Morris, A. P. and Montgomery, G. W. (2012). Genome-wide association meta-analysis identifies new endometriosis risk loci. *Nature Genetics*. 44(12), 1355-1359. doi:10.1038/ng.2445.
95. Giudice, L.C. (2010). Clinical practice. Endometriosis. *The New England Journal of Medicine*. 362(25), 2389-2398.
96. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. (1997). *Fertility and Sterility*. 67:817-821.
97. Mutter, G.L. and J. Prat (2014). *Pathology of the Female Reproductive Tract*. (Third edition). London : Elsevier. 487-508.
98. Strauss, J.F., Robert L. Barbieri and Antonio R. Gargiulo. (2019). *Yen And Jaffe's Reproductive Endocrinology : Physiology, Pathophysiology, And Clinical Management* (Eighth Edition). Elsevier. 609-642.e7.
99. Dodds, K. N., Beckett, E. A., Evans, S. F. and Hutchinson, M. R. (2017). Lesion development is modulated by the natural estrous cycle and mouse strain in a minimally invasive model of endometriosis. *Biology of Reproduction*. 97(6), 810-821.

100. Nisolle, M. and Donnez, J. (1997). Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertility and Sterility*. 68(4), 585-596.
101. Cao, Y., Ye, Q., Zhuang, M., Xie, S., Zhong, R., Cui, J. And Cao, L. (2017). Ginsenoside Rg3 inhibits angiogenesis in a rat model of endometriosis through the VEGFR-2-mediated PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *PLoS One*. 12(11), e0186520. doi:10.1371/journal.pone.0186520
102. Demirel, M. A., Sutar, I., Ilhan, M., Keles, H. and Akkol, E. K. (2014). Experimental endometriosis remission in rats treated with *Achillea biebersteinii* Afan.: histopathological evaluation and determination of cytokine levels. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*.175, 172-177.
103. Ilhan, M., Ali, Z., Khan, I. A., Taştan, H. and Küpeli Akkol, E. (2019). Promising activity of *Anthemis austriaca* Jacq. on the endometriosis rat model and isolation of its active constituents. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 27(6), 889-899.
104. Yilmaz, S. S., Hizli, D., Yilmaz, E., Eryilmaz, O. G., Hizli, F. and Haltaş, H. (2013). Effect of vitamin D on postoperative adhesion formation in a rat uterine horn adhesion model. *The Journal of Reproductive Medicine*. 58(11-12), 511-516.
105. Viganò, P., Gaffuri, B., Somigliana, E., Busacca, M., Di Blasio, A. and Vignali, M. (1998). Expression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 mRNA and protein is enhanced in endometriosis versus endometrial stromal cells in culture. *Molecular Human Reproduction*. 4(12), 1150-1156.
106. Capra, F., De Maria, E., Lunardi, C., Marchiori, L., Mezzelani, P., Beri, R. and Battista Gabrielli, G. (2000). Serum Level of Soluble Intercellular Adhesion Molecule 1 in Patients with Chronic Liver Disease Related to Hepatitis C Virus: A Prognostic Marker for Responses to Interferon Treatment. *The Journal of Infectious Diseases*. 181(2), 425-431.
107. Wu, M. H., Yang, B. C., Hsu, C. C., Lee, Y. C. and Huang, K. E. (1998). The expression of soluble intercellular adhesion molecule-1 in endometriosis. *Fertility and Sterility*. 70(6), 1139-1142.
108. Viganò, P., Ottolina, J., Bartiromo, L., Bonavina, G., Schimberni, M., Villanacci, R., and Candiani, M. (2020). Cellular Components Contributing to Fibrosis in Endometriosis: A Literature Review. *Journal of Minimally Invasive Gynecology*. 27(2), 287-295.
109. Matsuzaki, S. and Darcha C. (2015) Co-operation between the AKT and ERK signaling pathways may support growth of deep endometriosis in a fibrotic microenvironment in vitro. *Human Reproduction*. 30(7), 1606-1616.
110. Nahari, E. and Razi, M. (2018). Silymarin amplifies apoptosis in ectopic endometrial tissue in rats with endometriosis; implication on growth factor GDNF, ERK1/2 and Bcl-6b expression. *Acta Histochemica*. 120(8), 757-767.
111. Da, J., Yang, Y., Dong, R., Shen, Y. and Zha, Y. (2020). Therapeutic effect of 1,25(OH)₂-VitaminD₃ on fibrosis and angiogenesis of peritoneum induced by chlorhexidine. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. (129), 110431.

112. Gorczyca, W., Traganos, F., Jesionowska, H. and Darzynkiewicz, Z. (1993). Presence of DNA Strand Breaks and Increased Sensitivity of DNA in Situ to Denaturation in Abnormal Human Sperm Cells: Analogy to Apoptosis of Somatic Cells. *Experimental Cell Research*. 207(1), 202-205.
113. Johnson, M. C., Torres, M., Alves, A., Bacallao, K., Fuentes, A., Vega, M. and Boric, M. A. (2005). Augmented cell survival in eutopic endometrium from women with endometriosis: Expression of c-myc, TGF-beta1 and bax genes. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 3(1), 45-53.
114. Salmassi, A., Acar-Perk, B., Schmutzler, A. G., Koch, K., Püngel, F., Jonat, W. and Mettler, L. (2011). Apoptosis resistance in endometriosis. *BioImpacts*. 1(2), 129–134.
115. Khazaei, M. R., Rashidi, Z., Chobsaz, F. and Khazaei, M. (2016). Apoptosis induction of human endometriotic epithelial and stromal cells by noscapine. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 19(9), 940-945.
116. Béliard, A., Noël, A. and Foidart J. M. (2004). Reduction of apoptosis and proliferation in endometriosis. *Fertility and Sterility*. 82(1), 80-85.
117. Jones, R. K., Searle, R.F., and Bulmer J.N. (1998). Apoptosis and bcl-2 expression in normal human endometrium, endometriosis and adenomyosis. *Human Reproduction*. 13(12), 3496-3502.
118. Vinatier, D., Dufour, P., and Subtil, D. (1996). Apoptosis: a programmed cell death involved in ovarian and uterine physiology. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 67(2), 85-102.
119. Meresman, G. F., Vighi, S., Buquet, R. A., Contreras-Ortiz, O., Tesone, M. and Rumi, L. S. (2000). Apoptosis and expression of Bcl-2 and Bax in eutopic endometrium from women with endometriosis. *Fertility and Sterility*. 74(4), 760-766.
120. Oltvai, Z. N. and Korsmeyer, S.J. (1994). Checkpoints of dueling dimers foil death wishes. *Cell*. 79(2), 189-192.
121. Huniadi, C. A., Pop, O. L., Antal, T. A. and Stamatian, F. (2013). The effects of ulipristal on Bax/Bcl-2, cytochrome c, Ki-67 and cyclooxygenase-2 expression in a rat model with surgically induced endometriosis. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 169(2), 360-365.
122. Mulyantoro, I., Indrapraja, O., Widjiati, W. and Noerpramana, N. P. (2020). Effect of Metformin on Bcl-2/Bax Expression Ratio and Endometrial Implants: A Mouse Model in Endometriosis Study. *Journal of Biomedicine and Translational Research*. 6(2), 53-58.
123. Banerjee, P. and M. Chatterjee M. (2003). Antiproliferative role of vitamin D and its analogs--a brief overview. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 253(1-2), 247-254.
124. Giudice, L.C., Tazuke S.I., and Swiersz L. (1998). Status of current research on endometriosis. *The Journal of Reproductive Medicine*. 43(3 Suppl), 252-262.
125. Abbas, M. A., Disi, A. M. and Taha, M.O. (2013). Sunitinib as an anti-endometriotic agent. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 49(4), 732-736.

126. Jameson, J.L. and L.J. De Groot (2016). *Endocrinology : adult and pediatric* (Seventh edition). Philadelphia: Elsevier. 2242-2254.e5.
127. Zhang, S., Zhuang, L., Liu, Q., Yu, X., Min, Q., Chen, M. and Chen, Q. (2021). Rosiglitazone affects the progression of surgically-induced endometriosis in a rat model. *Molecular Medicine Reports*. 23(1), 35-43.
128. Yeniel, A. Ö., Erbas, O., Ergenoglu, A. M., Aktug, H., Taskiran, D., Yildirim, N., and Ulukus, M. (2014). Effect of oxytocin treatment on explant size, plasma and peritoneal levels of MCP-1, VEGF, TNF- α and histopathological parameters in a rat endometriosis model. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 175, 134-139.
129. Feldman, D., Pike, J.W. and Bouillon, R. (2018). *Vitamin D*. (Fourth edition). London, United Kingdom : Academic Press. 550-562.
130. Lebovic, D.I., Mueller M.D. and Taylor R.N. (2001). Immunobiology of endometriosis. *Fertility and Sterility*. 75(1), 1-10.
131. Wu, M. Y. and Ho, H. N. (2003). The Role of Cytokines in Endometriosis. *American Journal of Reproductive Immunology*. 49(5), 285-296.
132. Wang, G., Tokushige, N., and Fraser, I. S. (2011). Nerve fibers and menstrual cycle in peritoneal endometriosis. *Fertility and Sterility*. 95(8), 2772-2774.
133. Berkley, K. J., Dmitrieva, N., Curtis, K. S. and Papka, R. E. (2004). Innervation of ectopic endometrium in a rat model of endometriosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 101(30), 11094-11098.
134. Berkley, K. J., Rapkin, A. J. and Papka, R. E. (2005). The pains of endometriosis. *Science*. 308(5728), 1587-1589.
135. Johnson, N. P. and Hummelshoj, L. (2013). Consensus on current management of endometriosis. *Human Reproduction*. 28(6), 1552-1568.
136. Korkmaz, D., Bastu, E., Dural, O., Yasa, C., Yavuz, E. and Buyru, F. (2013). Apoptosis through regulation of Bcl-2, Bax and Mcl-1 expressions in endometriotic cyst lesions and the endometrium of women with moderate to severe endometriosis. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 33, 725-728.



EKLER

EK-1. Etik Kurul Onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 14/03/2019-E.34142



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı



Sayı : 66332047-604.01.02-
Konu : Değerlendirme ve Onay

Sayın Prof. Dr. Suna ÖMEROĞLU
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Suna ÖMEROĞLU, Ayşe KÖYLÜ, Tuncay Veysel PEKER, Mürşide Ayşe DEMİREL ve Saadet Özen AKARCA DİZAKAR'dan oluşan G.Ü.ET-19.015 kod numaralı ve "*Deneyisel Endometriyozis Modelinde D3 Vitamini Etkisinin GnRH Analogu Buserelin Asetat İle Karşılaştırılmalı Olarak İncelenmesi*" başlıklı araştırma önerinizin incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-19.015 and entitled "*Comparative Investigation of the Effects of Vitamin D3 and GnRH Analogue Buserelin Acetate on Experimental Endometriosis Model*" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Abdulkadir BEDİRLİ
Kurul Başkanı

Hayvan Türü : Sıçan Sprague Dawley
Hayvan Sayısı : 28

Ek: 1 Liste



Ankara
Tel:0 (312) 202 20 57 - 0 (312) 2... Faks:0 (312) 202 38 76
e-Posta :hadyek@gazi.edu.tr İnternet Adresi :http://hadyek.gazi.edu.tr/

Bilgi için :Burak Çitrak
Genel Evrak Sorumlusu
Telefon No:0312 229 78 00

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

ÖZGEÇMİŞ**Kişisel Bilgiler****Soyadı, adı** : KÖYLÜ, Ayşe**Uyruğu** : T.C.

Eğitim Derecesi	Okul/Program	Mezuniyet yılı
Doktora	Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Devam ediyor
Yüksek Lisans	Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	2017
Lisans	Ondokuz Mayıs Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği	2012
Lise	Samsun Milli Piyango Anadolu Lisesi	2005

Yabancı dil

İngilizce



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..