



T.C.  
ANKARA EĞİTİM ve ARAŞTIRMA HASTANESİ  
KADIN HASTALIKLARI ve DOĞUM KLİNİĞİ

**Klinik Şefi: Prof. Dr. A. Sertaç BATIOĞLU**  
**Başhekim: Prof. Dr. A . Pekcan DEMİRÖZ**

**RATLARDA OLUŞTURULAN DENEYSEL ENDOMETRİOZİS  
MODELİNDE ANTI-VEGF BEVACİZUMAB'IN PROFİLAKTİK VE  
TEDAVİ EDİCİETKİSİNİN HİSTOPATOLOJİK VE  
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL OLARAK GÖSTERİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Hatice IŞIK**

ANKARA  
2010



T.C.  
ANKARA EĞİTİM ve ARAŞTIRMA HASTANESİ  
KADIN HASTALIKLARI ve DOĞUM KLİNİĞİ

Klinik Şefi: Prof. Dr. A. Sertaç BATIOĞLU  
Başhekim: Prof. Dr. A. Pekcan DEMİRÖZ

**RATLARDA OLUŞTURULAN DENEYSEL ENDOMETRİOZİS  
MODELİNDE ANTI-VEGF BEVACİZUMAB'IN PROFİLAKTİK VE  
TEDAVİ EDİCİETKİSİNİN HİSTOPATOLOJİK VE  
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL OLARAK GÖSTERİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Hatice IŞIK**

TEZ DANIŞMANI

ANKARA  
2010

## TEŞEKKÜR

Mesleki eğitimimiz süresince maddi-manevi desteklerini bizden esirgemeyen, bizlere iyi çalışma ortamları sunan Başhekim Prof. Dr. Ali Pekcan Demiröz'e

Gerek tezimin hazırlanması gerek asistanlık eğitimim boyunca bilgi, birikim ve deneyimlerinden faydalandığım tez danışmanım, klinik şefimiz, hocam Prof. Dr. Sertaç Batioğlu' na,

Uzmanlık eğitimim süresince benim bu sanatı ve ilmi öğrenmemde her zaman bilgi ve tecrübeleri ile yol gösteren, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen klinik şef yardımcılarım Op. Dr. Yusuf Ergün, Op. Dr. Deniz Karçaaltıncaba, emekli klinik şef yardımcım OpDr. İsmet İnan ve tüm uzmanlarıma,

Tez çalışmam döneminde ve değerlendirilmesinde emeklerini ve yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım Op. Dr. Özlem Moraloğlu'na,

Tez çalışmamın histopatolojik ve immünohistokimyasal değerlendirme aşamasında bütün bilgi ve birikimini bize sunan ve emeklerini bizle paylaşan Sayın Dr. Muzaffer Çaydere'ye,

Tez çalışmamın değerlendirilmesinde emeklerini ve yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Sevtap Kılıç'a,

5 yıllık asistanlık süresini birlikte geçirdiğim başta ailemden daha çok birlikte olduğum ve birlikte çok güzel günler geçirdiğim asistan arkadaşlarım olmak üzere hemşire arkadaşlara ve diğer bütün sağlık personeline,

Hayatım boyunca verdikleri emek, sevgi ve şefkat ile beni bu günlere getiren ve fedakarlıklarını hiçbir zaman esirgemeyen başta annem ve babam olmak üzere bütün aileme, her zaman en büyük desteği sağlayan ve sevgisi ile bana güç veren sevgili eşim Metin Işık'a, hayat pınarlarım minik kızım Mehlika Azra Işık ve onun 'kuzum Ahmet' dediği oğlum Ahmet Emin Işık'a TEŞEKKÜRLERİMİ SUNARIM.

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER .....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	iv
ŞEKİLLER .....	v
TABLolar .....	vi
RESİMLER.....	vii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1 Endometriozis .....	4
2.1.1 Tarihçe .....	4
2.1.2 Epidemiyoloji .....	4
2.1.3 Etiyoloji ve Patogenez.....	5
2.1.4. Semptomlar.....	21
2.1.5. Tanı.....	25
2.1.6. Sınıflandırma.....	29
2.1.7. Tedavi .....	31
2.2 Endometriozis gelişiminde VEGF'ün rolü .....	38
2.3 VEGF düzeyinin ölçümü.....	41
2.4 Endometriosiste anti-VEGF tedaviler .....	41
2.5 Bevacizumab .....	41
2.6 Dişi Ratların Reprodüktif Sistemi .....	42
3. MATERYAL METOD.....	45
A. Histopatolojik İnceleme .....	47
B. Trikrom boyama ile değerlendirme .....	48
C. İmmünohistokimyasal İnceleme .....	49
D. İstatistiksel Analiz.....	50

4. BULGULAR.....	51
5. TARTIŞMA.....	70
6. ÖZET .....	76
7. ABSTRACT.....	78
8. KAYNAKLAR .....	80

## SİMGELER VE KISALTMALAR

FGF-a, FGF-b	: asidik ve bazik fibroblast büyüme faktörü
PDECGF	: plateletten elde edilmiş endotelial hücre büyüme faktörü
TGF-a, TGF- b	: transforme edici büyüme faktörü -a ve -b
TNF-a	: tümör nekroze edici faktör-a
VEGF	: vasküler endotelial büyüme faktörü
MCP- 1	: Monosit kemotaktik protein- 1
RANTES	: Regulated on Activation, normal T- cell expressed and secreted
LUF	: Luteinized unruptured follicle
ASRM	: American Society for Reproductive Medicine
<i>GnRH</i>	: <i>Gonadotropin Saliverici Hormon</i>
SERM	: selektif östrojen reseptör modülatörlerini

## ŞEKİLLER

<b>Şekil 1:</b>	İmmün değişiklik ve endometriozis .....	16
<b>Şekil 2:</b>	Endometriozisin Etyopatogenezi-Güncel Yaklaşım .....	21
<b>Şekil 3:</b>	Endometriozisin Sınıflandırılması .....	30
<b>Şekil 4:</b>	Endometriosis gelişiminde immün sistemin ve VEGF'ün rolü.....	40
<b>Şekil 5:</b>	Tedavi ve kontrol gruplarında trikrom boyama skor değerleri.....	55
<b>Şekil 6:</b>	Tedavi ve kontrol gruplarında VEGF skor değerleri.....	57
<b>Şekil 7:</b>	Tedavi ve kontrol gruplarında KI-67 skor değerleri .....	57

## TABLolar

<b>Tablo 1:</b> Endometriozis ile otoimmün hastalıklar arasındaki benzer özellikler .....	11
<b>Tablo2:</b> Endometrioziste infertilite nedenleri .....	24
<b>Tablo 3:</b> Kontrol ve Tedavi (Bevacizumab) Gruplarında Ratların Ağırlıkları(ort± SD) ve ağırlıkların istatistiksel analizi.....	51
<b>Tablo 4.</b> Kontrol ve tedavi gruplarında (Bevacizumab) endometriozis lezyon hacim değerleri(mm <sup>3</sup> ) ve istatistiksel analizleri .....	52
<b>Tablo-5:</b> Kontrol ve Tedavi Gruplarında Histolojik Skor Düzeyleri .....	53
<b>Tablo-6:</b> Kontrol ve Tedavi Gruplarında Trikrom Skor Düzeyleri .....	54
<b>Tablo-7:</b> Kontrol ve Tedavi Gruplarında VEGF ile Boyanma Skor Düzeyleri .....	56
<b>Tablo-8:</b> Kontrol ve Tedavi Gruplarında KI-67 ile Boyanma Skor Düzeyleri .....	58

## RESİMLER

<b>Resim 1.</b>	Dişi rattan vajinal smear örneği alma yöntemi.....	59
<b>Resim 2.</b>	Papanicolaou boyama sonrası smear görüntüsü .....	59
<b>Resim 3.</b>	Preoperatif hazırlığı tamamlanmış dişi ratın pre-op görünümü .....	60
<b>Resim 4.</b>	Anterior midline abdominal kesi ile batına girilmesi.....	60
<b>Resim 5.</b>	Uterin boynuzların tanımlanması.....	61
<b>Resim 6.</b>	Sağ pelvik yan duvara yerleştirilen implantın görünümü .....	61
<b>Resim 7.</b>	Periton, fasya ve cildin kapatılması. ....	62
<b>Resim 8.</b>	4. Haftada 2. Laparotomi sırasında endometriozis odağının görünümü. Kistik, damarlanma artışı görülen lezyon.....	62
<b>Resim 9.</b>	2. Laparotomi sırasında gözlenen implantın boyutunun ölçülmesi .....	63
<b>Resim 10.</b>	A grubu profilaktik tedavi alan grupta implant görünümü. ....	64
<b>Resim 11.</b>	B grubu tedavi sonrası lezyon ölçümü. ....	64
<b>Resim 12.</b>	Kontrol grubundaki implantın histopatolojik görünümü.....	65
<b>Resim 13.</b>	Tedavi alan B grubundaki implantın histopatolojik görünümü. ....	65
<b>Resim 14.</b>	Tedavi alan grup B'de over ve tubaların görünümü.....	66
<b>Resim15.</b>	Tedavi grubunda Masson's Trichrome boyma ile endometriozis çevresinde minimal fibröz doku artışı .....	66
<b>Resim 16.</b>	Kontrol grubunda Masson's Trichrome boyma ile endometriozis çevresinde yoğun fibröz doku artışı .....	67

<b>Resim 17.</b> Tedavi grubunda VEGFR için immünohistokimyasal olarak zayıf pozitif boyanma gösteren implantın görünümü.....	67
<b>Resim 18.</b> Kontrol grubunda VEGFR için immünohistokimyasal olarak güçlü pozitif boyanma gösteren implantın görünümü.....	68
<b>Resim 19.</b> Tedavi grubunda Ki-67 için immünohistokimyasal olarak negatif boyanma gösteren implantın görünümü .....	68
<b>Resim 20.</b> Kontrol grubunda Ki-67 için immünohistokimyasal olarak pozitif boyanma gösteren implantın görünümü.....	69

# 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Endometriozis, hormonlara duyarlı endometrial dokunun, uterin kavite dışında lokalize olmasıyla karakterize kronik bir hastalıktır. Kökeni ve histolojisi benign olan bu hastalık davranış olarak malign olabilir. En sık implantasyon yeri pelvik organlar ve periton olmakla birlikte, farklı doku ve organlarda da gözlenebilir. Reprodüktif dönemdeki kadınların yaklaşık 3-10%'ünde, primer infertilitesi olan kadınların 25-35%'inde görülür. Hastalık geniş spektrumlu klinik durumlar gösterip ilerleme ve tekrar etme eğilimindedir. İnfertilite, dismenore ve kronik pelvik ağrıyı da içerebilen çeşitli semptomlarla karşımıza çıkabilir.

Retrograd menstruasyon ile endometrial dokunun pelvik peritona transplantasyonu en sık kabul gören teori olmasına rağmen, hastalığın gelişiminden sorumlu hücresel ve moleküler mekanizmalar halen tam olarak anlaşılamamıştır. Bununla birlikte, hastalığın etiyojisi multifaktöryel olup çevresel, immünolojik, endokrin ve genetik faktörlerin rol oynadığı düşünülmektedir.

Endometriozis tedavisinde çeşitli yaklaşımlar mevcuttur. Ovaryan supresyon tedavisi, cerrahi tedavi ya da bunların kombinasyonu sıklıkla kullanılmaktadır. Şu andaki medikal tedaviler normal siklusun ve ovaryan hormon üretiminin bozulması üzerine kurulmuştur ve bir takım yan etkilere sahiptir. Bu bozulma gebe kalmayı önlemek gibi istenmeyen etkilere sahiptir. Ayrıca bu ilaçlar hastalığı sadece süprese etmekte, tedavi etmemektedir. Bu ilaçların yarattığı hipoöstrojenik durum ilaç bırakıldığında ortadan kalkmakta ve hastalık tekrar aktive olmaktadır. Ovaryen fonksiyonları süprese etmeyecek, yan etkisi az yeni tedavilere ihtiyaç vardır.

Transplantasyon teorisine göre endometrium dokusu peritona ulaştığında buraya yapışmakta olup bu esnada endometriozisin oluşabilmesi için kendisine yeni kan akımını sağlaması hayati önem arz etmektedir. Bu kan

akımının sağlanması ve yeni damarların oluşabilmesi için temel faktör anjiogenez olup, foliküler olgunlaşma, seleksiyon ve korpus luteumun normal çalışması, endometriyumun büyüme ve şekillendirilmesinde yani normal üreme fonksiyonlarının sağlanmasında yine kilit rol anjiogeneze aittir (1).

Kanser dışı hastalıklarda da kontrolsüz anjiogenez tablosu oluşabilmektedir. Bu durumlar; diyabete bağlı körlük ve romatoid artritir. Son dönemde çok miktarda anjiogenez faktörü belirlenmiş olup bunlar; asidik ve bazik fibroblast büyüme faktörü (FGF-a, FGF-b), plateletten elde edilmiş endotelial hücre büyüme faktörü (PDEC GF), transforme edici büyüme faktörü -a ve -b (TGF-a, TGF- b), tümör nekroze edici faktör-a (TNF-a) ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) olarak sıralanabilir (1).

Vasküler endotelial büyüme faktörü aynı zamanda vasküler permeabilite faktörü olarak da bilinir, heparin bağlayan glikoprotein yapısında olup güçlü anjiogenik özellik, endotel hücrelerine spesifik mitojenik ve vasküler permeabilite üzerinde işlev ve görevleri vardır. Birçok fizyolojik ve patolojik durumda önemli bir anjiogenez faktörü olduğu gibi overyan hiperstimulasyon sendromunda da kapiller kaçak patogenezinin sorumludur. VEGF ayrıca insan endometriyumunda da tesbit edilmiş olup buradaki fizyolojik ve patolojik anjiogeneze rol alır. Yapılan çalışmalarda ağır-orta endometriozisi olan bayanlarda normal bireylere göre VEGF düzeyinin arttığı saptanmıştır (2, 3). Ancak bu konudaki bilgiler yeni ve yetersizdir. Yapılan çalışmalarda VEGF ekspresyonunun endometriyum dokusunda sınırlı olduğu ve stroma dışında yayılmış makrofajlara özgün olduğunu göstermiştir. Başka çalışmalarda ise VEGF aktivitesi hem normal hem de ektopik endometriyum dokusunda saptanmıştır (4). Sonuç olarak endometrioziste VEGF'ün yadsınamaz bir rolü olduğu bilinmektedir.

Bevcizumab, insan vasküler endotelial büyüme faktörüne (VEGF) spesifik olarak bağlanan ve biyolojik aktivitesini nötralize eden bir rekombinant hümanize monoklonal antikordur. Bevcizumab, hümanize mürin antikorunun komplementer-determinant bölgeleri VEGF'e bağlanan, insan

antikoru temel bölgelerini içermektedir. Bevacizumab, gentamisin antibiyotiği içeren besi ortamındaki Chinese Hamsterinin over memeli hücresi ekspresyon sisteminde rekombinant DNA teknolojisi ile oluşturulur ve spesifik viral inaktivasyon ve çıkarılma aşamalarından oluşan bir süreç ile saflaştırılır. VEGF'nin, endotelial hücreleri yüzeyindeki Flt-1 ve KDR reseptörlerine bağlanmasını inhibe eder. VEGF'nin biyolojik aktivitesini nötralize ederek tümörlerin damarlanmalarını ve dolayısı ile tümörlerin büyümelerini yavaşlatır. Bevacizumab veya bevacizumabın parenteral mürin antikolarının immün sistemi baskılanmış fare ksenotransplant kanser modellerine uygulanması, kolon, meme, pankreas ve prostat kanserleri dahil olmak üzere insan kanserlerinde yaygın bir anti-tümör aktiviteyi meydana getirmiştir. Metastatik hastalığın ilerlemesi inhibe edilmiş ve mikrovasküler geçirgenlik azaltılmıştır. Ancak endometriozis tedavisinde kullanımı hakkında bilgi yoktur.

Bu çalışmanın amacı ratlarda eksperimental olarak endometriozis oluşturmak ve oluşturulan endometriozis implantı üzerine bevacizumabın (VEGF inhibitörü) profilaktik ve tedavi edici etkisini histopatolojik ve immün histokimyasal olarak araştırmaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 ENDOMETRİOZİS

#### 2.1.1 Tarihçe

Bugün için endometriozis olarak tanımladığımız peritoneal lezyonlar, tıp literatüründe ilk olarak 1860 yılında Rokitansky tarafından tanımlandı. Klinik ve histolojik inceleme, ilk olarak John Sampson tarafından kaleme alınmıştır. Endometriozisin “endometrial dokunun peritoneal kaviteye menstrüel yayılımı sonucu oluştuğu”nu ifade eden klasik makalesi 1927 yılında yayınlanmıştır (5).

#### 2.1.2. Epidemiyoloji

Endometriozis prevalansı semptomların varlığına bağlı olarak populasyon grupları arasında değişir. Tanı cerrahi olarak konulduğu için gerçek prevalans bilinmemekle beraber, laparoskopik tüp ligasyonu yapılan asemptomatik kadınların 1- 7% 'sinde hastalık teşhis edilmiştir; bu aralık genel populasyondaki prevalansı tahmin ettirebilir. Pelvik ağrısı olan kadınların 5- 21%'inde ve ağır dismenoresi olan kadınların 40- 52%'sinde endometriozis teşhis edilmiştir. Cramer ve arkadaşlarının yaptığı çok merkezli bir çalışmada primer infertilitesi olan kadınların 17%'sinde, diğer çalışmalarda primer infertilitesi olan kadınların 9- 50%'sinde endometriozis teşhis edilmiştir (6). İnfertil kadınlar fertil olan akranlarına göre 7- 10 kat daha fazla endometriozise sahiptir. Poligenik, multifaktöriyel kalıtım olduğu düşünülmektedir. Simpson ve arkadaşları kontrol grubu olarak kan bağı olmayan kadınlarda 1% hastalık olma hızına karşılık, birinci derece akrabalarda hastalık olma hızını 6,9% olarak rapor etmiştir (7).

Ortalama tanı yaşı 25-30'dur, ancak kronik pelvik ağrısı olan 20 yaş altı adölesanlarda ve östrojen kullanan postmenopozal kadınlarda da görülebilmektedir.

### **2.1.3 Etiyoloji ve Patogenez**

Endometriozis etiyojisinde birden fazla teori vardır ve bunların birbirlerini tamamladıkları kabul edilebilir. Bir bütün olarak ele alındıklarında, endometriozisin farklı teorilerini açıklamak daha kolay olmaktadır.

#### **2.1.3.1 Retrograd Akım Teorisi**

Tüm endometriozis vakalarını açıklayabilecek tek bir mekanizma olmamasına karşılık, birçok kanıt Sampson'un ilk kez 1927'de tanımladığı canlı endometrial dokunun retrograd menstruasyon ve implantasyonu teorisinin, endometriozis patogenezinde primer mekanizma olabileceğini desteklemektedir. Menstrüel dönemde laparoskopi uygulandığı takdirde, açık fallop tüpü olan kadınların %75-90'ında peritoneal sıvıda kan tespit edilebilir (8-11). Menstrüel dönemde peritoneal sıvıdan elde edilen canlı endometrial hücreler, hücre kültüründe üretilebilir (10-12) ve peritonun mezotelyal yüzeyine tutunabilir ve penetre olabilirler (13-14). Obstrüktif tipte mülleryan anomalisi olan kadınlarda, menstrüel kan akımının engellenmediği malformasyonlara göre endometriozisle daha sık karşılaşılır (15). Erken menarş, kısa menstrüel siklus ya da menorajili kadınlarda endometriozis insidansı daha yüksektir (5, 16, 17) Endometriozis, sıklıkla pelvisle bağlantılı olan bölümlerde, en sık overler olmak üzere anterior ve posterior cul-de-sak, uterosakral ligamentler, uterus posterioru ve posterior broad ligamentlerde gözlenir (18-20). İnsan dışı primatlarda, cerrahi olarak indüklenmiş peritoneal menstrüasyon, ya da menstrüel endometriyumun retroperitoneal enjeksiyonu

sonrası ve kendi menstrüel dokuları peritona enjekte edilen kadınlarda deneysel endometriozis oluşturulabilir (8, 21).

### **2.1.3.2 Çöломik Metaplazi Teorisi**

Çöломik epitelin multipotansiyel hücreleri endometrial hücreye dönüşmek üzere stimule olabilirler. Bu teori şu durumları açıklayabilir:

Endometriozis prepubertal kızlarda rapor edilmiştir (22).

Endometriozis hiç menstrüasyon olmayan kadınlarda da görülmüştür (23).

Endometriozis, başparmak, uyluk, dizde ise mezenkimal ekstremite tomurcuklarından erken embriyogenez sırasında çöломik epitele yakın kısımlardan gelişmiş olabilir (24).

İmplantasyon teorisi bu yerlerdeki endometriozisi açıklayamayacağı için, çöломik metaplazi sonucu endometriozis oluşması mantıklı görülmektedir. Endometriozis yüksek doz östrojen tedavisi ile bağlantılı olduğundan erkeklerde de oluşabilir (25).

### **2.1.3.3 İndüksiyon Teorisi**

İndüksiyon teorisi temelde çöломik metaplazi teorisinin bir uzantısıdır. Çöломik metaplazinin menstrüel debri ya da diğer stimuluslar sonucu indüklendiği fikrini öngörür. Henüz belirlenememiş endojen biyokimyasal bir faktörün, diferansiye olmamış peritoneal hücreleri, endometrial dokuya dönüşmeleri yönünde indükleyebileceği düşünülmektedir. Bazı gözlemler, en azından bazı vakalarda, endometriozisin spontan ya da indüklenmiş çöломik metaplazi sonucunda oluştuğunu savunmaktadır (24).

Endometriozis, menarş öncesi kız çocuklarında, hiç menstrüasyon olmamış kadınlarda ve rölatif olarak az menstrüel siklusları olan kızlarda gözlenmiştir (22, 23, 26).

Anatomik bir defekt olmadığı sürece sağlam endometrial hücreler toraksa giremeyecekleri için, implantasyon teorisi plevral veya pulmoner endometriozis vakalarını açıklayamaz (27). Steroid hormonlar ya da dejenere olmuş endometrial hücrelerden peritoneal sıvıya salınan kimyasal stimulus (torasik kavite ile sağ hemidiafragma aracılığıyla iletişim sağlar) tarafından indüklenmiş plevral metaplazi bu durumu açıklayabilecek makul bir mekanizmadır.

Ekstremitte (baş parmak, kalça, diz) (28-30) gibi endometriozisin nadir bulunduğu lokalizasyonları açıklayabilecek tek mekanizma, yanlış entegre olmuş çöломik (erken embriyogenez süresince mezenkimal ekstremitte tomurcuklarına yakın) (31) metaplazidir.

Yüksek doz östrojenle tedavi edilen erkeklerde nadir de olsa endometriozis (mesane, abdominal duvar) gözlenmiştir (32, 33).

Over yüzey epiteli ve stromal hücrelerin üç boyutlu kollojen jel ortamda östrodiolle kültüre edilmesi sonucunda endometrial bez ve stroma oluşumu gerçekleşir (34).

Ötopik (uterus içinde) ve ektopik (uterus dışında) endometrium, endometriotik implantların normal endometrial dokunun ototransplantasyonu olduğu şeklindeki görüşle uyuşmayacak şekilde, hem morfolojik hem de fonksiyonel açıdan farklıdır.

#### **2.1.3.4 Vasküler Diseminasyon Teorisi**

Çöломik metaplazi pelvis, toraks boşluğu (27), üriner sistem ve sindirim sistemi, inguinal kanal ve umbilikusta endometriozisi

açıklayabilmesine karşılık, endometrial hücrelerin vasküler ya da lenfatik transportunun da eşlik edebileceği gösterilmiştir (35-37).

Endometrial dokunun sezaryen, pelvik cerrahi ya da epizyotomi onarımı sırasında istenmeden direkt transplantasyonu cerrahi skarlar (38) ve perinede (39) rastlanan endometriozisin en muhtemel açıklaması gibi gözükmektedir.

### **2.1.3.5 İmmün Sistem Teorisi**

Retrograd menstrüasyon tüm kadınlarda belli derecelerde görülebilmesine karşın (40, 41) bu kadınların sadece bir kısmında endometriozis görülmektedir. Birçok araştırmada endometriozis ile değişmiş immün sistem hakkında ilişki bulunmuştur (42).

#### **2.1.3.5.1. Hücresel immünite ve endometriozis**

Hücresel immünitede değişiklikler rapor edilmesine karşın veriler çelişkilidir. Endometrioziste endometrial hücrelerin ve antijenlerin fark edilmesine cevaben perifer lenfositlerin proliferasyonunda azalma tesbit edilmiştir (43, 44). Endometrioziste otolog endometrial hücrelere karşı azalmış periferal lenfosit sitotoksitesi olduğundan dolayı endometrial hücre yıkımında azalma izlenmiştir. Badaway ve arkadaşları endometriozisli hastaların periferal kanında T-helper/T-süpresör oranının arttığını bildirmişlerdir (45). Buna karşın bazı çalışmalarda periferal lenfosit profilinde belirgin değişiklik saptanmamıştır (46).

Ek olarak T-helper/T-süpresör oranında artış periton sıvısında ve ötopik endometriuma nazaran endometriotik dokuda artmıştır (47, 48, 49). Buna rağmen farklı bir çalışmada endometriozisi olan ve olmayan kadınların ötopik endometriumunda bu oranda belirgin bir değişiklik bulunmamıştır.

Anlaşılabacağı üzere T hücresindeki değişiklikler ve hastalığıdaki rolü üzerinde çelişkiler mevcuttur (50). Bu çelişkilerin çoğu T hücre değerlendirmesinde kullanılan metodoloji farkından ve hasta popülasyon çeşitliliğinden kaynaklanabilir.

CD4 T hücreler tip1 (Th1) ve tip 2 (Th2) olmak üzere ikiye ayrılır. Th1 hücreler interferon  $\gamma$ , IL- 2 salgılamakta Th2 hücreler IL- 4, IL- 10 salgılamakta. T hücre sitotoksitesi bu salgılanan sitokinlerin oranına göre aktive ya da süprese olur. Normal koşullarda bu 2 hücre grubu arasında sıkı bir denge vardır. Örneğin Th1 IL- 12 salgılayarak Natürel Killer (NK) sitotoksik aktiviteyi artırırken, Th2 hücreler IL- 10 salgılayarak NK aktivitesini azaltırlar. Endometriozisli kadınlarda bu oran Th2 yönüne kaymıştır, yani hücresel sitotoksite azalmıştır.

NK hücrelerdeki değişim konusundaki kaynaklar daha tutarlıdır. Endometriozisli hastalardaki periferik ve peritoneal NK hücreler kontrol grubuna göre otolog ve heterolog endometrium hücrelerine karşı azalmış sitotoksite göstermiştir (51). NK hücre sitotoksitesi hastalığın şiddetiyle zıt şekilde korelasyon göstermiştir (52). Retrograd olarak dökülen endometrial dokuya karşı azalmış NK killer sitotoksitenin peritoneal kavitedeki dokunun yerleşmesini sağlayabileceği varsayılmıştır.

NK hücre sitotoksitesinde azalma olduğuna dair fikir birliği olmasına karşın bu hücrelerin sayısı hakkında farklı veriler vardır. Bazı çalışmalarda NK hücre sayısının azaldığı, arttığı ya da değişmediği gösterilmiştir (42, 53, 47). Endometriozisli hastaların peritoneal sıvısının NK hücre aktivitesini azalttığı gösterilmiştir (54, 55). Bu süpresyondan sorumlu sıvıların içinde bulunan bileşenlerin, monosit ve makrofajların ürünü olduğu öne sürülmektedir. Monosit ve makrofaj ürünleri immün ve nonimmün hücrelerin modulatörü olarak bilinirler. Bu hücreler ve hücre ürünleri endometriozis patofizyolojisinde yoğun araştırma alanı oluşturmaktadır.

Endometriozisde hem periferik monositlerde hem de peritoneal makrofajlarda değişiklikler olur (56, 57, 58, 59, 60). Monositlerin sayısında

değişiklik olmamasına rağmen aktivasyonel durumlarında artış olmaktadır. Peritoneal makrofajların ise hem sayı hem de aktivasyonel durumlarında artış gösterilmiştir (61). Periton sıvısında endometrioziste en çok bulunan hücre makrofajdır ve endometriozisin patogenezinde ve semptomlarında önemli rol oynar. Makrofajların aktivasyonel durumlarında artış büyüme faktörleri ve sitokinler gibi ürünlerinin salgılanmasındaki artış ile ilişkilidir. Bu makrofaj ürünlerinin endometrial hücre proliferasyonu stimülasyonunda ve endometrial hücre implantasyonunda, matrix metalloproteinaz regülasyonu ile artmış doku remodülasyonunda ve ektopik endometrial dokunun artmış anjiyogenezinde rol aldığı varsayılmaktadır (62, 63, 64, 65, 66).

#### **2.1.3.5.2. Humoral immünite ve endometriozis**

Endometrioziste B lenfosit aktivitesinde ve otoantikör insidansında artış saptanmıştır (67). Weed ve arquembourg endometriozisli hastalarda total serum kompleman seviyesinde azalma bulmuşlardır (68). Endometrial ve ovaryan dokuya karşı immünglobülin A ve G endometriozisli kadınların serum, vajen ve servikal sekresyonunda bulunmuştur (69). Fakat yeni çalışmalar otoantikörlerin varlığını sorgulamaktadır (70, 71).

Otoantikörlerde artış varsa endometriozisin otoimmün hastalık olmasından şüphe edilebilir. Bu teori ilk kez Gleicher ve arkadaşları tarafından ortaya atılmıştır (72). Endometriozis otoimmün hastalığın birçok klasifikasyon kriterini taşımaktadır (Tablo1).

**Tablo 1:** Endometriozis ile otoimmün hastalıklar arasındaki benzer özellikler

Doku kaybı
Poliklonal B lenfosit aktivasyonu
T-lenfosit immunolojik anormallikleri
B- lenfosit immunolojik anormallikleri
İlişkili otoimmün hastalıklar
Multiorgan tutulumu
Ailesel olması
Olası çevresel faktörler
Olası genetik geçiş
Değişmiş apoptoz
<i>Nothnick. Endometriosis and autoimmunity. Fertil Steril 2001.</i>

Tablo 1' deki özelliklerin yanı sıra endometriozis infertilite ve rekürren gebelik kaybı ile ilişkilidir, bu da otoimmün hastalığın varlığı ile açıklanabilir (73). Fakat bir hastalığa tamamen otoimmün diyebilmek için hastalıklı bireyin serumundan veya dokusundan alınan immünglobulinlerin normal hayvanlara aktarılması ile hastalığın açıkça gösterilmesi gerekir (74). Şu ana kadar böyle bir çalışma yapılmamıştır. Endometriozisin otoimmün hastalık olma konusunda kesinlik bulunmasa da romatoid artrit, chron hastalığı, psöryazis gibi yaygın otoimmün hastalıklarla benzerlik gösterir.

Endometriozisde peritoneal sitokinlerin artmasıyla kanıtlanmış artmış peritoneal inflamasyon belirlenmiştir (75). Artmış sitokinlerin hastalığın nedeni ya da sonucu olduğu tam olarak bilinmemekle beraber hastalığın kurulumunda ve progresyonunda derin etkileri olabileceği açıktır. Örneğin, in-vitro sitokinler endometrial hücrelerin peritoneal mezotelyal hücrelerine adezyonunu stimule edebilir (64). Adezyon moleküllerinin endometriozisin erken gelişim evresindeki rolü büyüktür (76, 77). Endometrial hücre birkez periton yüzeyine tutunduktan sonra endometriozisin

gelişiminde/progresyonunda diğer basamak altta yatan dokunun invazyonunu içermektedir. İn-vitro ve in- vivo yapılan çalışmalar endometriozisin invaziv bir hastalık olduğunu belirtmektedir (78, 79, 80).

Endometriozisin invazyonundan dolayısıyla etiyoloji ve patofizyolojisinden matris metalloproteinazların(MMPs) önemli rolü olduğu kabul edilmektedir. MMPs endometriotik doku tarafından oluşturulur (81, 82). Brunner ve arkadaşları insan endometrial dokusunu fareye enjekte etmişlerdir. İnsan endometrial dokusundaki MMP ekspresyonu ektopik lezyonun oluşma kapasitesi ile paralellik göstermiştir (83).

Endometriozisin otoimmün hastalıklarla diğer benzer yanı apoptoz mekanizmasındaki değişikliktir (84, 85, 86). Bu mekanizmada retrograd olarak dökülen endometrial dokular hücre ölümünden kaçarak ve ektopik lezyon oluşturmaya daha meyilli olurlar.

Otoimmün hastalıkların patofizyolojisinde son zamanlarda dikkatleri üzerine toplayan sitokin tümör nekroze edici faktör-  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ )'dır. TNF-  $\alpha$  aktive makrofajların majör ürünüdür. TNF-  $\alpha$  enflamatuar lökositleri aktive etmesinin yanı sıra diğer proenflamatuar sitokinleri, interlekin- 1(IL- 1), IL- 6, TNF-  $\alpha$  oluşturur (87). TNF-  $\alpha$  endometriozis patofizyolojisinde önemli rol oynamaktadır ve peritoneal sıvıda artmıştır. TNF-  $\alpha$  hastalığın başlangıçtaki gelişimi için gerekli olan endometrial hücre adezyonunu ve MMP ekspresyonunu stimüle eder.

#### **2.1.3.5.3 Sitokinler ve büyüme faktörleri:**

Sitokinler ve büyüme faktörleri, lökosit ve diğer hücreler tarafından ekstrasellüler çevreye salınarak immün sistem içinde ve dışında kemotaksis, mitoz, anjiyogenez ve farklılaşma regulasyonunda mesajcı olarak görev yapmak üzere aynı hücre üzerinde (otokrin) ya da komşu hücre üzerinde (parakrin) etki gösteren geniş bir protein ve glikoprotein ailesidir (88).

Bozulmuş hücrel immünite periton kavite içindeki endometrial hücrelerin yetersiz temizlenmesine neden olurken, sitokinler ve büyüme faktörleri peritoneal yüzeye adezyonu kolaylaştırıp, proliferasyon ve anjiyogenezi stimule ederek ektopik endometriumun implantasyon ve gelişimine katkıda bulunur.

### **İnterlökin- 1 (IL- 1)**

İnflamasyon ve immün sistemde önemli rol oynayan IL- 1, aktive monosit, makrofaj, T ve B lenfositlerden, NK hücrelerden salgılanır. Endometriozisli kadınların periton sıvılarında gösterilmiştir (89, 90). İki farklı genden köken alan iki ayrı moleküler formu vardır: IL- 1 $\alpha$  ve IL- 1 $\beta$ . IL- 1  $\beta$  endometriotik lezyonlarda anjiyogenik faktörleri (vasküler endotelyal growth faktör ve IL- 6) indükleyerek anjiyogeneizde rol oynar (91).

IL-1  $\beta$  endometrial hücrelerden intrasellüler hücre adezyon molekülü (sICAM- 1) dökülmesini artırır, bu da peritoneal immün denetime engel olabilir (92).

### **İnterlökin- 6 (IL- 6)**

IL- 6 başta T lenfositler olmak üzere makrofaj, fibroblast ve endotelyal hücrelerden salgılanır. B hücre stimulator etkisi vardır. T hücre farklılaşmasını sağlar, diğer sitokinlerin sekresyonunu modüle eder. İnsan endometrial stromal hücrelerin proliferasyonunu inhibe eder (93). Endometriotik dokudaki stromal hücreler IL-6'nın inhibitör etkilerine rezistandır (94). Estrojen konsantrasyonunun yüksek olduğu proliferatif fazda IL- 6 düzeyi düşük, estrojen düzeyinin düşük olduğu sekresyon fazında IL- 6 düzeyi yüksektir (95). Periton sıvısındaki IL- 6 düzeyi hastalığın şiddeti ile orantılı yükselir, buna IL- 6 reseptör düzeyinde azalma eşlik eder (96).

### **İnterlökin- 8 (IL- 8)**

Nötrofillerin kemotaksisinden sorumlu bir kemokin ve potent anjiyogenik bir sitokindir. Mezotelyal hücreler, makrofaj ve endometrial

hücrelerde üretilir (97,98).IL-8 endometriotik ve endometrial stromal hücre proliferasyonunu stimüle eder (99, 100). TNF- $\alpha$  endometrial stromal hücre proliferasyonunu IL- 8 gen ve protein ekspresyonunu indükleyerek yapar (101). IL- 8 düzeyi ile hastalığın şiddeti arasında korelasyon vardır (102). IL- 8 endometrial hücrelerin fibronektine bağlanmasını indükler (103). Bu bağlanma daha çok IL- 8 salınmasına neden olarak kısır bir döngü oluşturur (104).

### **Monosit kemotaktik protein- 1 (MCP- 1)**

Monosit, T hücreler, fibroblastlar, endotelyal hücreler tarafından salgılanır monosit aktivite faktörüdür. İnterferon- $\gamma$  salınımını stimüle eder, IL- 13 salınımını inhibe eder. Endometriozisli hastaların periton sıvısında konsantrasyonu artar ve hastalığın şiddetiyle korelasyon gösterir (105, 106).

### **RANTES (Regulated on Activation, normal T- cell expressed and secreted)**

Monosit ve memory T hücreleri için kemoatraktan sitokindir. T hücreler ve mezenkimal hücreler tarafından salgılanır. Endometriozisli hastaların periton sıvısında konsantrasyonu artar ve hastalığın şiddetiyle korelasyon gösterir.

### **TNF- $\alpha$ (Tümör nekroze edici faktör- $\alpha$ )**

Nötrofiller, lenfositler, makrofajlar ve NK hücreler tarafından salgılanır. TNF-  $\alpha$  stromal hücrelerin mezotelyal hücrelere adezyonunu artırır (64).

Endometriozisli hastaların periton sıvısında konsantrasyonu artar ve hastalığın şiddetiyle korelasyon gösterir (107).

### **VEGF (Vasküler endotelyal growth faktör)**

Endotelyal hücreler için potent mitojendir ve monositler için kemoatraktan olarak görev yapar. En potent anjiyojenik faktörlerden biridir.

Monosit, makrofaj ve düz kas hücreleri tarafından oluşturulur. Primer olarak endometrial bezlerde VEGF proteini bulunur (108, 109). IL- 1, estradiol salınımını artırır. Endometriotik lezyondaki VEGF ekspresyonu neovaskülarizasyon mekanizmasını sağlar (110). Şiddetli endometrioziste peritoneal sıvıdaki VEGF konsantrasyonu hafif endometriozise göre daha fazladır (111).

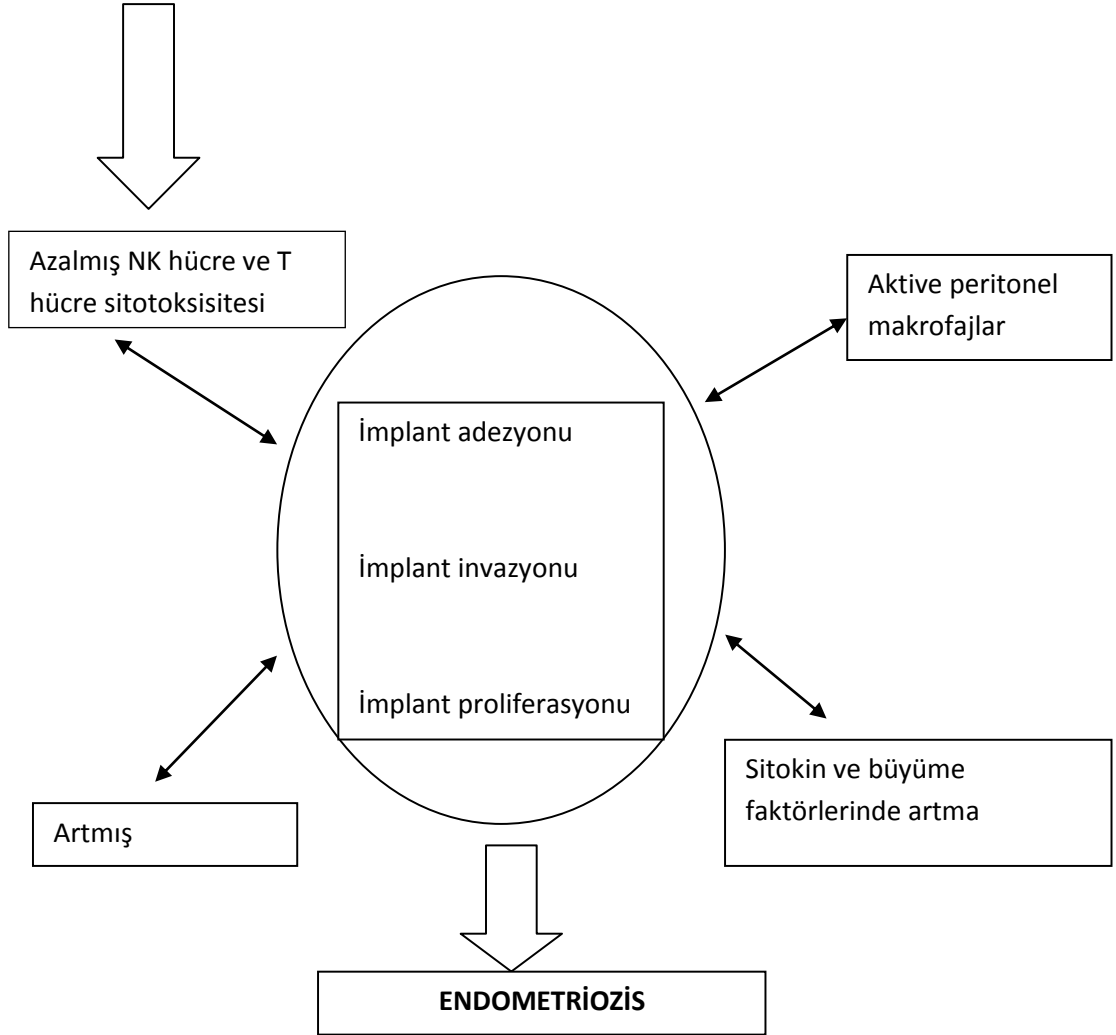
İmmün hücreler endometrioziste peritoneal kaviteye giren endometrial hücreleri uzaklaştırmak için çalışacaklarına, aksine ektopik endometriyumun tutunma ve proliferasyonunu ve anjiyogenezi stimule eden sitokin ve büyüme faktörleri salgılayarak hastalığın ilerlemesine neden olurlar. Bu immunolojik anormallikler hastalığın sebebi mi yoksa sonucu mu henüz bilinmemekle beraber endometriozis patogenezinde önemli rol oynar.

#### **2.1.3.6. Hormonal faktörler**

Endometriotik lezyonlar aromataz ve 17  $\beta$  hidroksisteroid dehidrogenaz tip 1 enzimlerine sahiptir, bu enzimler andrestendionu östrona ve östronu östrojene çevirir. Lezyonlar estrojeni inaktivite eden 17  $\beta$  hidroksisteroid dehidrogenaz tip 2 enzimine sahip değildir (112). Menstrual siklusun sekresyon fazında progesteron normal endometriyumda östrojen etkisini antogonize eder. Endometriozis ise progesteron rezistan bir durum sergiler (113). Prostaglandin E2 endometrial stromal hücrelerde aromataz aktivitesinin en potent indükleyicisidir. Oluşan östrojen siklooksijenaz 2 enzimini stimule ederek prostaglandin E2 sentezini artırır. Böylece kısır döngü oluşarak endometriozis proliferasyonu üzerindeki östrojen etkisi artar (114). Endometriozis östrojen bağımlı bir hastalıktır.

Sonuç olarak endometriozis endokrin, immunolojik, genetik ve çevresel elemanların birbiriyle etkileşimi sonucu ortaya çıkmaktadır. Etiyopatogenezi tek bir nedene bağlayarak açıklamak olanaksızdır (Şekil 1).

Retrograd menstruasyon



**Şekil 1:** İmmün değişiklik ve endometriozis

### **2.1.3.7. Anjiojenik faktörler ve neovaskülarizasyon**

Endometriosisli kadınlarda peritoneal sıvı; inflamasyon artımı, peritoneal sıvı miktarı artımı, beyaz küre ve makrofaj konsantrasyonu ve bu makrofajların artmış aktivasyonu açısından belirgin olarak farklıdır. Bu aktive esnasında makrofajlardan normalin üzerinde VEGF üretildiği, bu yolla buraya ulaşan endometriyum dokusunun vaskülarizasyonunu yani beslenmesini sağlayacak yeni kan damarı oluşumunu kolayca sağladığı bilinmektedir.

### **2.1.3.8 Çevresel Faktörler Ve Endometriozis**

Endometriozisin çevresel faktörlerle ve özellikle of 2,3,7,8-Tetraklorodibenzo-p-dioksin (dioksin) ile ilişkisi hastalığın etiopatogenezi konusunda yeni bir bakış açısı oluşturmuştur. Güçlü bir kimyasal zehir olan dioksinin rhesus maymunlarında endometriozise yol açtığı gözlenmiştir (115). Dioksine maruz kalma sonrası endometriosis gelişiminde genetik bazı mekanizmalar rol oynayabilir. Dioksinin hedef genleri sitokrom p450, plazminojen aktivatör inhibitör-2 ve interlökin 1-beta gibi inflamasyon ve farklılaşma ile ilgili düzenleyici genlerdir (116, 117). Bu genler ektopik endometrial dokunun peritoneal kavitede artmış reseptivitesinden sorumlu tutulmaktadır (117). Aday genler olarak ortaya sürülen Glutatyon S-transferaz ailesine ait enzimler dioksinin detoksifikasyonunda rol almaktadır (118). Metabolik detoksifikasyon enzim genlerindeki polimorfizm dioksin gibi çevresel toksinlere artmış sensitivite ve artmış endometriosis riski ile ilişkili olabilir. Bu özellik çevresel faktörler ve genetik arasında dolaylı bir bağ olarak karsımıza çıkmaktadır. Dioksine maruziyet ile periferel kan monositlerinden TNF-alfa üretiminin arttığı gösterilmiştir (115). Ayrıca dioksin progesteronun matrix metalloproteinazlar üzerindeki baskılayıcı etkisini ortadan kaldırarak ektopik endometrial dokunun gelişiminde rol oynayabilir (117).

### 2.1.3.9 Genetik Faktörler

Endometriosis, etkilenmiş olan kadınların birinci derece akrabalarında genel populasyona göre 6-7 kez daha fazla görülmektedir (119). Tüm bu gözlemler göstermiştir ki, endometriozisin genetik bir zemini vardır ve hastalığa predispozisyon kompleks genetik taşıyıcılık şeklinde kalıtılır ve fenotip etkilenen genlerin allelik varyantları ile çevresel faktörler arasındaki etkileşimi yansıtır.

Endometriosis gelişimine predispozisyon sağlayan genler, dökülen endometrial hücrelerin yaşaması, peritoneal yüzeye yapışması ve invazyonunu, proliferasyonunu, neovaskülarizasyonunu ve inflamatuvar yanıtı kontrol eden direk moleküler olayları kontrol etmektedir (120). Bu genlere ait polimorfizm ve mutasyonların endometriozise yol açabileceği üzerinde durulmuştur. Bunlar arasında galaktoz metabolizması ile ilgili galaktoz-1 fosfat üridil transferaz, faz 1 detoksifikasyon genleri (Ah Reseptör, CYP1A1, N-asetil transferaz-1), faz-2 detoksifikasyon genleri (glutatyon-S transferaz, N-asetil transferaz-2), steroid ilişkili genler (östrojen reseptör, aromataz), hücre içi adezyon genleri (ICAM-1), matriks metalloproteinazları, anjiogenik faktörler, sitokinler ve kemokinler bulunmaktadır.

Endometriozis gelişen kadınların ötopik endometrial hücreleri, apoptozise dirençlidir. Apoptozis, siklusun geç sekretuar ve menstrüel fazlarında endometriumun dökülmesi ve tekrar oluşmasına katkıda bulunan, normal fakat kompleks gen aracılığıyla regüle edilen fizyolojik bir programlı hücre ölümü işlemidir. Ektopik endometrium apoptozise daha dirençli gibi gözükmektedir: apoptozisi regüle eden Bcl-2/bax protein ailesi ve fas-fas ligand ekspresyon sistemi bu dirençle ilişkilendirilmiştir (121). Apoptozise direnç peritoneal kaviteye giren endometrial hücrelerin hayatta kalmasını artırabilir ve aynı zamanda ektopik endometriumun neden makrofaj aracılı immün denetim ve klirens karşı dirençli olduğunu açıklamaya yardım eder.

Endometriozisli kadınların ötopik endometriumundaki hücre adezyon moleküllerinin ekspresyon paterninde anormallikler tanımlanmıştır (122) ve

ektopik endometriumun peritoneal implantasyonu da arasında bağlantı kurulmuştur, ancak böyle bir mekanizma için henüz direkt bir kanıt mevcut değildir.

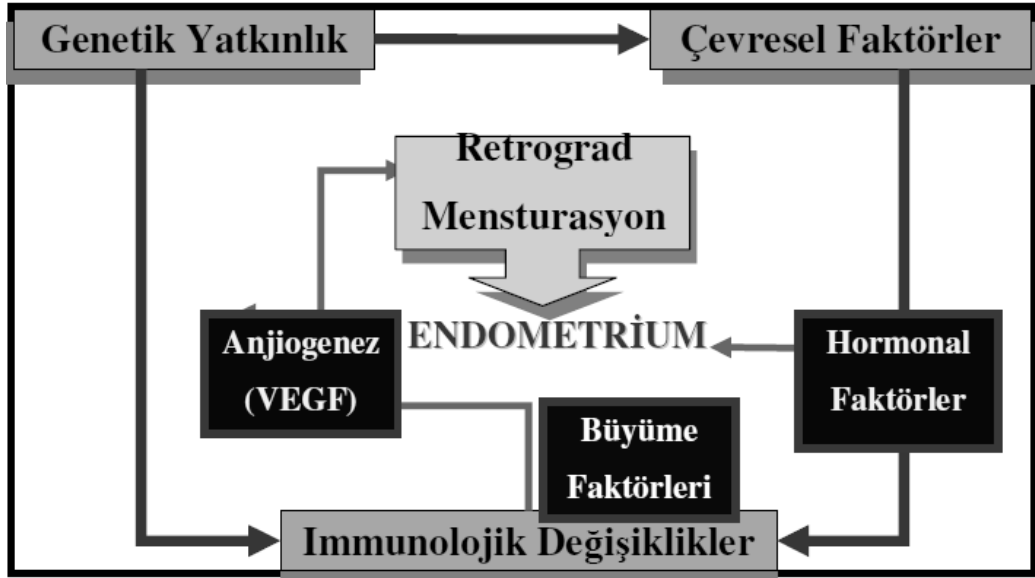
Matriks metalloproteinazlar, ekstrasellüler matriksi yıkan ve normal endometrial yıkım ve östrojenin stimüle ettiği yeniden büyümenin düzenlenmesine yardımcı olan enzimlerdir. Matriks metalloproteinaz ekspresyonu siklusun erken döneminde artar ve sıklıkla sekretuar fazda progesteron etkisiyle suprese olur (123). Matriks metalloproteinazların anormal ekspresyonu invazif ve yıkıcı hastalıklarla ilişkilidir. Endometriozisli kadınlarda, sekretuar endometrial matriks metalloproteinaz ekspresyonu beklenmedik şekilde progesteron supresyonuna dirençlidir (124). Dökülen endometrial hücrelerde devam eden matriks metalloproteinaz ekspresyonu, peritoneal yüzeye invazyonu ve takiben hücresel proliferasyonu kolaylaştıracak şekilde reflü olan endometriuma invaze olabilme potansiyeli sağlar (124, 125).

Endometriozis gelişim ve büyümesi östrojen bağımlıdır ve bugün için hem östrojen üretiminin hem de metabolizmasının, endometrioziste hastalığı ilerletecek şekilde değişikliğe uğradığına dair güçlü kanıtlar vardır (126). Orta ve ağır endometriozisli kadınların ötopik endometriumunda androjenlerin östrojenlere dönüşümünü sağlayan aromataz enzimi, anormal olarak eksprese edilir; hastalık bulunmayan kadınlarda genellikle endometrial aromataz aktivitesi saptanamamıştır (127). Böylelikle endometriozisli kadınlar lokal endometrial östrojen üretimini destekleyen genetik anormalliğe sahip olabilirler. Daha da önemlisi, endometriomalar ve peritoneal endometriotik implantlar son derece yüksek aromataz aktivitesi sergilerler (128). Normal ötopik endometriumla karşılaştırıldığında, aromatazı stimüle eden transkripsiyon faktörleri (esasen steroidojenik faktör-1, SF-1) endometriotik dokuda aşırı eksprese edilirken, enzimi inhibe edenler az eksprese edilirler ve sonuçta anormal aromataz aktivitesi ve östrojen sentezine neden olurlar (128,129). Östrojen aynı zamanda endometriozis kaynaklı stromal hücrelerde aromatazın potent bir stimülatörü olan prostoglandin (PG) E2'nin oluşumunu

sağlayan lokal siklooksijenaz tip-2 (COX-2) aktivitesini stimüle eder ve böylece devamlı lokal östrojen üretimi için ileriye dönük üretim artırımı (feedforward) döngüsü ya da geriye dönük üretim artırımı (pozitif feedback) döngüsü oluşturur (126,130,131).

Östron ve östradiolün birbirine dönüşümü iki formu bulunan 17 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaz (17 $\beta$ HSD) aracılığı ile sağlanır: tip 1 östronu östradiole dönüştürür ve tip 2 (ayrı bir gen tarafından kodlanır) ters reaksiyonu katalizler. Normal ötopik endometriumda, progesteron glandular epiteldeki 17 $\beta$ HSD tip 2 aktivitesini indükler; enzim sekretuar endometrial glandlarda fazla oranda eksprese edilir. Endometriotik dokuda, 17 $\beta$ HSD tip 1 normal olarak eksprese edilir ancak, 17 $\beta$ HSD tip 2 ekspresyonu gözlenmez. Progesteron endometriotik implantlarda 17 $\beta$ HSD tip 2 aktivitesini indüklemeyi, çünkü aynı zamanda progesteron reseptör (PR) ekspresyonu da anormaldir. PR-A ve PR-B olmak üzere 2 farklı PR izoformu belirlenmiştir. Hedef genler üzerindeki progesteron etkisi primer olarak PR-B aracılığıyla sağlanır; PR-A, PR-B fonksiyonunun baskılayıcısı olarak görev yapar. Normal ötopik endometriumda hem PR-A hem PR-B eksprese edilir. Endometriotik dokuda, PR-A eksprese edilir ancak PR-B eksprese edilmez (132-135).

Endometriotik dokular, östrojen üretim ve metabolizmasıyla ilişkili bir seri moleküler anormallikler sergilerler. Lokal östrojenin indüklediği PG E2 üretimi sonrasında stimüle edilen anormal aromataz aktivitesi, normal 17 $\beta$ HSD tip 1 ekspresyonu, PR-B'nin eksprese edilmemesine bağlı 17 $\beta$ HSD tip 2 aktivite yokluğu kombine olarak lokal östrojen konsantrasyonu artışına yol açarak hastalık oluşumu ve ilerlemesini sağlayabilir.



**Şekil 2:** Endometriozisin Etyopatogenezi-Güncel Yaklaşım

Endometriozis endokrin, immunolojik, genetik ve çevresel elemanların birbirleriyle etkileşimleri sonucunda ortaya çıkmaktadır (Şekil 2). Bu açıdan bakıldığında hastalığın etiyopatogenezini tek bir nedene dayandırarak açıklamak olanaksızdır.

#### 2.1.4. Semptomlar

Endometriozis hastalığının semptomu ve şiddeti hastalığın yaygınlığına, bulunduğu organa ve menstrüasyon gününe göre değişir. Endometriozisli kadınların en sık şikayeti pelvik ağrıdır, bu menstrüasyondan hemen önce artar ve adet sonunda azalır. Diğer semptomlar ise dismenore, disparoni, anormal uterin kanama ve infertilitedir.

##### 2.1.4.1. Ağrı

Endometriozis, kronik pelvik ağrısı olan hastaların üçte birinde görülür. Ağrı kramp tarzında, künt veya keskin olarak tarif edilir ve menstrüasyon

döneminde artar. Ağrı tek yada iki taraflı olabilir ve birçok hasta rektal basınç hissi veya bel ağrısından yakınır. Endometriomanın rüptürü sonucu oluşan kanamadan dolayı akut karın ağrısı oluşabilir. Dismenore disparoniye oranla daha siktir. Hastalığın yaygınlığı ile ağrı arasında ilişki vardır. Endometriotik implantın morfolojik görünüşü ile ağrı birbirinden bağımsızdır. Kuldesak, uterosakral ligaman, rektovajinal septum ve vajende invazif endometriotik nodülleri olan hastalarda disparoni siktir. Şiddetli pelvik ağrı, derin infiltrate endometriozis ile uyumludur (136, 137).

Endometriozisle ilişkili ağrı 3 primer mekanizmayla açıklanmıştır (8).

1. İnflamatuar sitokinlerin peritoneal kavitedeki etkileri
2. Endometriotik implantlardan kaynaklanan fokal kanamanın direkt ya da indirekt etkisi
3. Pelvik tabandaki sinirlerin irritasyonu ya da direkt infiltrasyon

İleri endometriozisli birçok kadında az ya da hiç ağrı olmamasının veya hafif hastalığı olanlarda şiddetli ağrı olmasının sebebi, ciddi hastalığın genellikle kronik olduğu ve metabolik olarak daha az aktif olmasıyla ilgili olabilir. Endometriozisli bazı kadınlarda endometriotik dokulardan kaynaklanan devamlı nöral imputun noziseptif sistemin (ağrılı stimulusu alan nöronlar) santral olarak duyarlılaşmasına neden olması sonucunda somatik hiperaljezi (ağrıya artmış duyarlılık) ve tarif edilebilen ağrılı alanlar şeklinde olabileceğini düşündüren kanıtlar da mevcuttur (134).

Endometriozise eşlik eden ağrıda rol alabilecek diğer bir mekanizma, hormonal çevrenin ağrı algılanmasını etkileyebileceğidir. 16 çalışmayı içeren meta-analizde somatik duyuşal ağrı eşiğı ve ağrıya toleransın menses hemen öncesinde ya da menses boyunca en düşük değerde olduğu sonucuna varılmıştır (135).

#### 2.1.4.2.İnfertilite

İnfertil kadınların 20% ile 40%'ında endometriozis mevcuttur. Endometriozis ilişkili infertilite 3 primer mekanizma ile açıklanmıştır (8 ).

→ Ovulasyon sonrası ovum yakalanmasını inhibe eden ya da engelleyen bozulmuş adneksiyel anatomi

→ Oosit gelişimi ya da erken embriyogenezin engellenmesi

→ Azalmış endometrial reseptivite

Endometriozis, fertilitiyi hastalığın ciddiyeti ile yaklaşık olarak korele şekilde azaltır.

Minimal ya da hafif endometriozisli kadınlar, cerrahi tedavi sonrası gebe kalmaya tedavi edilmeyen kadınlara göre daha yatkındırlar (138). Endometriozis olan ve olmayan kadınlarda in vitro fertilizasyon (IVF) sonrası elde edilen ve üreme işleminin parçalarını tek tek değerlendirmek üzere ortalama değerler sunan gözlem sonuçları, hastalığın oosit kalitesi, embriyogenez ve endometrial reseptivite gibi çeşitli basamaklarda fertilitiyi olumsuz olarak etkilediğini düşündürmektedir (8). Mio ve arkadaşları LUF(Luteinized unruptured follicle) sendromunun endometriozisli hastalarda daha sık olduğunu göstermiştir.(139) Genel olarak IVF başarı oranları esasen endometriozisli kadınlarda tubal hastalığı olanlardan daha düşüktür ve prognoz ağır hastalıktan hafif hastalıktan daha kötüdür. Ciddi endometriozisli kadınlar, hafif hastalığı olanlara göre daha düşük pik östrojen seviyesi, oosit sayısı, gebelik ve implantasyon oranlarına sahiptir. Aksine, ciddi hastalığı olanlarda fertilizasyon oranları, bu hastaların muhtemelen metabolik olarak daha az aktif olan kronik hastalığa sahip olmaları nedeniyle hafif hastalığı olanlara göre daha yüksek olarak tespit edilmiştir (140). Endometriozisli kadınlarda IVF sonrası gözlenen düşük implantasyon ve gebelik oranları ya kötü oosit kalitesini takiben kötü embriyogenezisi ya da azalmış endometrial reseptiviteyi yansıtabilir. Bazı retrospektif çalışmalarda (141,142)

endometriozisin spontan abortus oranını artırdığı gösterilmişse de son yapılan yayınlarda spontan abortus oranında endometriozisli hastalarla normal kadınlar arasında bir fark olmadığı ortaya konmuştur. Bu nedenle endometriozis ve spontan abortus ilişkisini yeterince ortaya koymak güçtür (143,144,145).

Özet olarak endometriozis nedenli infertilite aşağıdaki sebeplerle açıklanabilir (Tablo 2).

**Tablo 2:** Endometrioziste infertilite nedenleri (146):

<i>1- Anatomik distorsiyon ve tubal tıkanıklık</i>
<i>2- Ovaryan ve tubal fonksiyon bozukluğu</i>
Ovulatuvar yetmezlik
Folikül gelişim bozukluğu
Hiperprolaktinemi
Luteal faz defekti
<i>3- İmmunolojik defekt</i>
Otoimmünite
Antiendometrial antikolarlar
<i>4- Peritoneal sıvı değişiklikleri</i>
Aktive makrofajlar
Sitokinler
Spermilerin artmış fagositozu
Artmış prostaglandinler
<i>5- Fertilizasyon ve implantasyon başarısızlığı</i>
<i>6- Erken spontan abortus</i>

### **2.1.4.3. Diğer semptomlar**

Rektovajinal tutulum olan hastalarda ağrılı defekasyon, mesane tutulumu olanlarda dizüri, periyodik hematüri, üreter çevresi tutulursa üreteral obstrüksiyon, gastrointestinal tutulumda rektal kanama gözlenebilir.

Endometriozisin geleneksel tanısı ektopik endometrial gland ve stromanın histolojik olarak gösterilmesini gerektirir ancak; bugün artık tanımlanabilen farklı endometriotik lezyonların görünüşleri ve doğal progresyonlarına yönelik güncel yaklaşımlar nedeniyle bu tarz bir yaklaşımın gereksiz yere çok katı olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, endometriozis patogeneziindeki gelişmeler henüz hastalığın tanısı için laparoskopiyeye alternatif olabilecek güvenilir non-invazif bir yöntem sunamamıştır.

### **2.1.5.Tanı**

#### **2.1.5.1 Klinik Tanı**

Semptomatik hastalarda en sık başvuru şikayetlerinden biri kronik pelvik ağrıdır. Semptomlar dismenore, intermenstrüel ağrı ve dismenoreyi içerir. Endometriozise eşlik eden dismenore sıklıkla menstrüel kanamanın başlamasından önce gerçekleşir ve genellikle menses boyunca ve bazen sonrasında devam eder. Pelvis dışı endometriozis ( abdominal skar, gastrointestinal ve üriner traktus, diafragma, plevra, periferal sinirler) tutulan organları yansıtan siklik semptomlarla birliktelik gösterebilir (8).

Endometriozisde çok çeşitli semptomlar görülmekle beraber, bunların hiçbiri endometriozis için spesifik değildir. Birçok hastada belirgin bulgu olmasa da

- Kuldesak veya uterosakral ligamanda lokalize hassasiyet

- Kuldesak veya uterosakral ligamanda veya rektovajinal septumda palpe edilen hassas nodüller
- Uterusun hareketi ile ağrı oluşması
- Hassas, büyümüş adneksiyel kitle
- Uterus veya adneksin fiksasyonu endometriosisi düşündürmelidir.

En sık görülen bulgu ise posterior fornikte palpasyon ile hassasiyettir. Uterosakral nodüller en iyi rektovajinal muayene ile tespit edilir. Muayenede endometriozise bağlı nodüller, endometriomaya bağlı büyümüş overler, veya uterusun kuldesaka yapışıklığı tespit edilebilir(147) Endometriozisin altın standart cerrahi tanısıyla karşılaştırıldığında fizik muayene rölatif olarak daha zayıf sensitivite, spesifite ve pozitif prediktif değere sahiptir.

#### **2.1.5.2 Labaratuar yöntemler**

Ca- 125 endometriumu da kapsayan çöломik epitel derivelerinin hücre yüzeyinde bulunan bir antijendir. Non-müsinöz epitelyal over kanserinin izlenmesinde yararlıdır. Endometriozis tanısı için elde bir kan testi mevcut değildir. Ancak Ca- 125 düzeyi özellikle orta ve ciddi endometriozisli hastalarda yüksektir. Bununla birlikte, normal menstrüasyon sırasında, akut pelvik inflamatuvar hastalıkta ya da leiomyoma gibi durumlarda da artmış olarak tespit edilebilir. Serum Ca- 125 tayininin endometriozis tanısında tarama testi olabileceği savunulmuştur ancak, cerrahi olarak tanı konmuş hastalığı altın standart olarak kabul eden 23 farklı çalışmayı içeren meta-analizde, bu belirtecin nispeten zayıf etkili olduğu sonucuna varılmıştır (148). Sonuçta Ca- 125 testinin endometriozis tanısında etkin bir tarama testi olarak kullanılması için sensitivitesi oldukça düşüktür. Tarama testi olarak sensitivitesi düşük olmakla birlikte tedaviye yanıt ve rekürrens için iyi bir belirteç olabilir (149). Yüksek değerler medikal tedavi ile azaltılabilse de tedavinin kesilmesi ile beraber hemen tedavi öncesi değerlerine ulaşır; bu durum da klinik kullanımı sınırlar.

Ca- 125 düzeyinin orta ve şiddetli endometrioziste artış sebebi açık değildir. Endometriozis lezyonlarının normal endometriuma göre fazla miktarda Ca- 125 içerdiği ve beraberindeki inflamasyonun Ca- 125'in dökülmesinde artışa yol açtığı hipotezi ortaya konmuştur. Ayrıca normalde peritoneal kaviteden dolaşıma sınırlı miktarda antijen difüzyonu sağlayan bir bariyer olan peritonun, endometriotik implant bölgelerinde hasarlanmış olması da dolaşıma daha fazla Ca- 125 salınmasına neden olmaktadır.

Bir diğer labaratuvar yöntem kanda indirek immunofloresans ve pasif hemaglutinasyon yöntemleriyle antiendometrial antikor bakılmasıdır. Bunun yanında serum plasental protein- 14 önceleri yüksek sensitiviteye sahip olarak gösterilmişse de diğer çalışmalar bunu desteklememiştir. Bu ve diğer birçok labaratuvar testleri bugün kullanılmamaktadır.

### **2.1.5.3 Görüntüleme Yöntemleri**

#### ***Transvajinal Ultrasonografi***

Transvajinal ultrasonografi, özellikle over kaynaklı endometriomaların belirlenmesinde faydalı olabilir, ancak pelvik adezyonları veya hastalığın yüzeysel peritoneal odaklarını görüntüleyemez. Endometriomalarda farklı ultrasonografik görüntüler elde edilebilmekle beraber, tipik olarak ekojenik kapsülle çevrili, diffüz düşük internal ekoda kistik yapılar izlenir. Bazılarında internal septasyonlar ya da kalınlaşmış nodüler cidarlar izlenebilir. Karakteristik özellikler mevcut olduğu takdirde, endometriomanın belirlenmesinde transvajinal ultrasonografi % 90 veya daha fazla sensitiviteye ve neredeyse % 100 spesifiteye sahiptir.

#### ***Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRI)***

Peritoneal implantların tanınmasında, MRI transvajinal ultrasonografiye üstündür ancak halen ameliyat esnasında gözlenen lezyonların sadece % 30-40'ını tanımlayabilir. Histopatolojik dökümente

edilmiş hastalığın belirlenmesinde MRI'nin sensitivitesi %70, spesifitesi %75'tir (150).

#### **2.1.5.4 Cerrahi Tanı**

Endometriozis tanısında altın standart laparoskopiyile birlikte eksize edilen lezyonun histolojik incelenmesidir. Laparoskopideki karakteristik bulgular peritonun serozal yüzeyinde tipik barut yanığı (sızan kandan kaynaklanan hemosiderin depozitleri içerir) şeklindeki lezyonlardır. Bunlar siyah, koyu kahverengi veya mavimsi nodüller ya da değişken derecede fibrozis ile çevrili eski hemoraji içeren küçük kistlerdir. Endometriozis kırmızı implantlar (peteşial, veziküler, polipoid, hemorajik, alev benzeri), seröz veya berrak veziküller, beyaz plaklar veya skarlaşma, sarı kahverengi peritoneal diskolorasyon ve subovarian adezyonlardan oluşan lezyonlar şeklinde ortaya çıkabilir. Kırmızı lezyonlar ileri derecede vasküler, proliferatif ve erken dönem hastalığı gösterirler. Pigmente lezyonlar daha yerleşik ya da ileri hastalığı temsil eder. Her ikisi de metabolik olarak aktiftir ve semptomlarla daha sık ilişkilidir. Beyaz lezyonlar daha az vaskülerite ve aktiviteye sahiptir ve nadiren semptomatiktir. Kesin histolojik kriterler endometriozisin cerrahi olarak konulan tanısını hastaların sadece yarısında konfirme ederler. Asemptomatik infertil kadınlarda hastalık olsun veya olmasın normal görünümlü peritonda endometriozisin mikroskopik kanıtı sıklıktır. Ancak bunun klinik önemi kesin değildir, çünkü birçok kadında görülebilmesine karşılık sadece bazılarında ilerleme gösterir (8).

Endometriomalar genellikle tipik olarak adezyonlarla ilişkilidir ve yoğun kahverengi çikolata benzeri sıvı içeren düzgün koyu kistler şeklinde görülürler. Daha büyük endometriomalar sıklıkla multiloküledir. Endometriomaların belirlenmesinde overlerin dikkatli inspeksiyonu oldukça güvenilirdir, ancak hastalık bariz olarak gözlenemiyorsa, overe uygulanacak ponksiyon ve aspirasyon aracılığıyla dikkatle yapılacak eksplorasyon yardımcı olabilir. Over kaynaklı endometriomalar sıklıkla diğer görünür

peritoneal lezyonlarla birliktelik gösterir. Tersine, derin infiltrate endometriozis sıklıkla retroperitonealdır, görünmez ve çoğunlukla izoledir.

Dikkatli klinik değerlendirme ile endometriozisi olabilecek kadınlar tanımlanabilir ancak tanı konulamaz. Serum Ca- 125 konsantrasyonu hastalıkla ilgili destekleyici delil sunmasına rağmen testin sensitivitesi etkin bir tarama amacı yapmak için oldukça düşüktür. Over kaynaklı endometriomaların belirlenmesinde transvajinal ultrasonografi ve MRI yüksek oranda sensitivite ve spesifiteye sahiptir, ancak hastalığa ait peritoneal implantları güvenilir olarak görüntüleyemez. Ampirik medikal tedaviye klinik cevap endometriozis tanısını doğrulamaz. Birçok kadında endometriozis tanısı dikkatli ve sistematik laparoskopik değerlendirmeye ihtiyaç duyar. Eksize edilen lezyonların histolojik değerlendirilmesi cerrahi bulguları doğrulayabilir ve tercih edilir ancak tanıyı kesin olarak ortaya koymak için gerekli değildir (8).

#### **2.1.6. Sınıflandırma**

ASRM (American Society for Reproductive Medicine) tarafından malign hastalıkların derecelendirilmesinde kullanılan sistem örnek alınarak, laparoskopi ya da laparotomideki cerrahi bulgulara dayalı bir klasifikasyon sistemi geliştirilmiştir (Şekil 3). Sistemin bugünkü versiyonu en geniş kabul görmüş sınıflandırma aracıdır (151)

		Endometriozis	<1cm	1-3 cm	>3 cm
PERİTON		Yüzeyel	1	2	4
		Derin	2	4	6
OVER	Sağ	Yüzeyel	1	2	4
		Derin	4	16	20
	Sol	Yüzeyel	1	2	4
		Derin	4	16	20
Posterior cul-de-sak obliterasyonu		Parsiyel		Komplet	
		4		40	
		Adezyonlar	<1/3	1/3-2/3	>2/3
OVER	Sağ	Filmi	1	2	4
		Dens	4	8	16
	Sol	Filmi	1	2	4
		Dens	4	8	16
TÜP	Sağ	Filmi	1	2	4
		Dens	4*	8*	16
	Sol	Filmi	1	2	4
		Dens	4*	8*	16

### Şekil 3: Endometriozisin Sınıflandırılması

\*Eğer fallop tüpünün fimbrial ucu adezyonlar nedeniyle tam olarak kapanmışsa, puanı 16 olarak değiştiriniz.

**Evre I (minimal): 1–5**

**Evre II (mild): 6–15**

**Evre III (moderate): 16–40**

**Evre IV (severe): > 40**

### **2.1.7. Tedavi**

Endometriozis tedavisinde hedef semptomaya yönelik ağrının giderilmesi, fertilitenin sağlanması, korunması ve endometriotik odaklardaki tekrarlama ya da ilerlemenin geciktirilmesi veya önlenmesidir.

Genel olarak endometriozisin medikal, konservatif cerrahi tedavilerine rağmen hastalığın yıllık rekürrensi % 5-10 olup olguların yaklaşık % 50'sinde sorun tekrar karşımıza çıkabilmektedir. Tedavinin hastalığın gerçek aktivitesini ne ölçüde etkilediği tartışmalıdır. Diğer yandan endometriozis implantları ile normal endometrium arasında mikroskopi, reseptörler, endokrin cevap açısından ancak % 50- 60 benzerliğin olduğu ve tedavi ile implantlardaki gelişim suprese olsa bile her zaman atrofinin sağlanamayacağı bilinmektedir. Endometriotik odağın davranış şeklindeki farklılıklar da olguların tedaviye yanıtlarını değerlendirmede yanlışlıklara neden olabilmektedir.

#### **2.1.7.1. Medikal Tedavi**

Medikal tedavinin amacı siklik menstrüasyonu azaltarak ya da ortadan kaldırarak peritoneal ekilmeyi ve gelişebilecek olası yeni implantları azaltmak ve endometrium gelişim ve aktivitesini baskılamaktır.

#### ***Danazol***

17 $\alpha$ -etiniltestosteronun isoksazol türevidir. Steroidojenik bazı enzimleri inhibe eder ve serbest testosteron seviyelerini artırır. Yüksek androjenik ve endometriozis oluşumunu önleyen düşük östrojenik ortam sağlanmış olur. Endometriozis tedavisinde, danazol'un önerilen dozunun (600-800 mg/gün) ilacın klinik yararlılığını sınırlayan androjenik ve hipoöstrojenik yan etkileri görülür. Bunlar arasında en sık olanları kilo artışı, sıvı retansiyonu, halsizlik, meme hacminde azalma, akne, ciltte yağlanma, hirsutismus, atrofik vajinit,

sıcak basması, kas krampları, emosyonel labilite ve lipit profilindeki istenmeyen etkilerdir (LDL seviyelerinin artıp, HDL seviyelerinin düşmesi). İrreversibl olarak seste kalınlaşma gelişebilir.

### ***Progestasyonel İlaçlar (Progestinler)***

Bu ilaçların endometriozis tedavisinde kabul edilen etki mekanizması, progesteron tarafından indüklenen ve endometriumda incelmeye yol açan desidualizasyondur. Endometrial matriks metalloproteinazların ekspresyonlarında progesteronların baskılayıcı etkisi diğer bir faydalı özellik olabilir. Endometriozisli kadınların ötopik endometriumundaki matriks metalloproteinaz aktivitesi beklenmedik şekilde progesteronun baskılayıcı etkisine dirençli olmasına rağmen, hastalığın tedavisinde kullanılan yüksek dozlar bu etkiyi yenmede yeterli olabilirler.

Tedavide medroksiprogesteron asetat (20-100 mg/gün oral ya da her 3 ayda 150 mg intramusküler), noretindron asetat (5-20 mg/gün) ve megestrol asetat (40 mg/gün) kullanılabilir. Yan etkiler, kilo artışı, sıvı retansiyonu, göğüslerde duyarlılık, epizodik kırılma kanaması ve depresyonu içermektedir. Yüksek dozlarda hipotalamo-hipofizer-over aksını baskılayıcı etkileri nedeniyle uzun süreli kullanımda hipogonadal durum oluşmasına ve kemik mineral dansitesinde azalmaya yol açabilirler. Tedavinin bırakılmasının ardından geri dönüş hızlı bir şekilde sağlanır ve kırık riski üzerine etkileri yoktur. Danazolde olduğu gibi fertilitte üzerine olumsuz etkileri gebelik isteyen infertil kadınlarda kullanımını kısıtlamaktadır.

### ***Oral Kontraseptifler***

Hastalık için en sık reçete edilen tedavi şeklidir. Devamlı kombine östrojen-progestin tedavisi amenoreyi ve desidualizasyonu indükler. Oral kontraseptifler aynı zamanda endometriozisli kadınlarda ötopik endometrial dokunun apoptozisini artırır. Kullanılan doz 6-12 ay süre ile günde 1 tablet devamlı tedavidir. Siklik yerine devamlı kullanım tedavide daha etkili olmaktadır.

## ***GnRH (Gonadotropin Saliverici Hormon) Agonistleri***

GnRH agonistleri, kısa yarı ömrü olan doğal GnRH'nin aksine, hipofizer gonadotropik hücrelerde geniş oranda bulunan GnRH reseptörlerine bağlanan modifiye GnRH formlarıdır. Hipofizden gonadotropin salınımı olması için GnRH'nin hipotalamustan pulsatil olarak salınması gerekir. Bunun tersine GnRH'nin sürekli olarak verilmesi, hipofizdeki GnRH reseptörlerinin sayısını azaltır. Bu etkiye "Down Regülasyon" adı verilir. Böylece overler yeterli gonadotropin uyarısı almaz; hem folikül stimüle edici hormon (FSH) hem de luteinizan hormon (LH) seviyeleri çok düşüktür. GnRH agonistlerinin endometriozis tedavisindeki etki mekanizmaları, mevcut hastalığı östrojen desteğinden yoksun bırakmak ve amenore ile yeni peritoneal hücre dökülme olasılığını ortadan kaldıran indüklenmiş hipogonadotropik durumu içermektedir. Leuprolid asetat depot, nafarelin asetat, goserelin, buserelin içinden en sık kullanılanlar buserelin ve leuprolid'dir. Tedaviye önce subkutan enjeksiyonlarla başlayıp daha sonra intranazal olarak kullanılması önerilmektedir. Siklusun ilk günlerinde başlanırsa, başlangıçtaki agonist etki nedeniyle istenmeden ovulasyon indüksiyonu yapılmış olabilir. Bu nedenle tedavinin ilk ayında mutlaka kontrasepsiyon uygulanmalıdır. İlaçların yan etkileri hipogonadizm belirtileridir ve sıcak basması, vajinal kuruluk, azalmış libido, depresyon, irritabilite, yorgunluk, baş ağrısı, cilt yapısında değişiklikler ve azalmış kemik mineral yoğunluğunu içermektedir. Danazol ya da yüksek doz progestin tedavisinde karşılaşılan serum lipit ve lipoprotein konsantrasyonları üzerindeki olumsuz etkiler GnRH agonist tedavisinde gözlenmez. Standart GnRH agonist tedavi rejimiyle (6 aylık) karşılaşılan kemik mineral yoğunluğundaki azalma anlamlıdır; kemik kaybı hem lomber vertebralarda (trabeküler kemik) hem de femur boynunda (kortikal kemik) izlenir ve ayda % 1'e ulaşabilir ve hatta aşabilir. Tedavinin sonlandırılmasından itibaren kemik kaybı yavaşça düzelir, ancak tüm kadınlarda düzelme tam olarak sağlanamaz. Trabeküler kemik kaybı kemik yapıda tam geri dönüştürülemeyen hasara neden olabilir (152,153,154). GnRH agonist tedavisine eşlik eden kemik mineral yoğunluğundaki azalmayı önlemeye yönelik çalışmalar sonucunda "ilave (add back)" tedavi stratejileri

geliştirilmiştir. Kombine östrojen-progestin ilaveli tedavi rejimleri kemiği korur ve sıcak basması ve genitoüriner atrofi gelişimini önlemede ek avantaj sağlar. Sadece progestin içeren tedavi rejimleri daha az faydalıdır. Tibolon, bifosfonatlar ve selektif östrojen reseptör modölatörlerini (SERM) içeren çok sayıda ilave rejimler tarif edilmiştir (155,156).

### ***Gestrinon***

Androjenik, antiprogestojenik ve antiöstrojenik etkileri olan 19-nor testosteron türevi olan bir steroiddir. Klinik yan etkiler danazolde görülenlere benzerdir.

Medikal tedavilerin endometriozis şiddeti üzerindeki etkileri benzerdir, ancak medikal tedaviler overdeki endometriomaların en küçükleri haricinde (1 cm'den küçük) hiç birinde etkili değildir. Medikal tedavinin bırakılmasından kısa bir süre sonra daha hafif ya da eşit yoğunlukta ağrı tekrar edebilir. Geleneksel medikal tedavilerin endometriozisli infertil kadınlarda fertilitiyi iyileştireceğine dair bir kanıt yoktur.

#### **2.1.7.2. Alternatif tedavi yaklaşımları**

**Aromataz inhibitörleri:** Aromataz, sitokrom p 450 sisteminde yer alır ve androjenlerin östrojenlere dönüşümünde hız kısıtlayıcı basamakta görev yapar. Endometriotik implantlarda ve endometriomalarda yüksek düzeyde aromataz messenger RNA sı tespit edilmiştir (157). Bunlar patolojik dokuda östrojenin lokal kaynağını oluştururlar (134,157). Bu tedavi ile endometrial odakların ürettiği lokal östrojen bloke olmuş olur.

**Raloksifen:** Non steroid selektif östrojen reseptör modölatörüdür. Bazı dokularda (kemik gibi) östrojen agonisti gibi davranırken; bazılarında (reprodüktif dokular gibi) östrojen antagonisti gibi davranır. Bu özelliğinden dolayı östrojen bağımlı hastalıklarda faydalı olabilir. Raloksifen reprodüktif yaş grubunda ovulasyonu engellemez, östrojen seviyelerinde artışa yol

açmasına rağmen, gonadotropin seviyelerini etkilemez ve endometrium üzerine minimal etkiye sahiptir (157). Hayvan deneylerinde raloksifenin endometriotik odaklarda anlamlı derecede azalma yaptığı saptanmıştır (158,159).

**Hücrel immüneyi artıran ajanlar:** **IL-12**, T lenfosit ve NK hücreleri aktive eder, antianjiogenik bir ajandır. **Interferon alfa-2b** ise NK hücreleri aktive eder, sitotoksik T lenfositlerini stimüle eder. Ayrıca hücre proliferasyonunu inhibe eder (157,160). **IL-2** hücrel immüneye anahtar rol oynayan bir sitokindir. T hücre ve NK hücre aktivitesini artırır (161). **Laxorubine** ise NK ve B hücre proliferasyonunu artırır. Makrofaj aracılı sitotoksitede rol oynar. **Levamisol** antihelmintik bir ilaçtır. T hücreler tarafından yürütölen hücrel immüneye üzerine katkıda bulunur (157).

**Genistein:** Üzerinde hayvan deneyi yapılan bir diğeri ajandır. Fitoöstrojendir, protein tirozin kinaz ve topoizomeraz-2 inhibisyonu yapar. Anjiogenezis inhibitörüdür, ayrıca aromataz ve 5-alfa redüktaz gibi enzimlerin inhibitörüdür. Etki mekanizması raloksifene benzer. Genistein tedavisinin rat deneyinde endometriosiste istatistiksel olarak anlamlı bir azalma sağladığı saptanmıştır (162).

**RU 486 (Mifepriston) ve selektif progesteron reseptör modölatörleri (SPRMs):** Progesteron antagonistleri ve agonist-antagonistlerinin, progesteron etkisine benzer şekilde endometrial atrofi yaptığı hayvan deneylerinde gösterilmiştir. Progesteron antagonisti Mifepriston endometrial spiral arterlerde periarteriolar dejenerasyon yaparak etki gösterirken; parsiyel agonist olan SPRMs spiral arterlerin sayı ve boyutlarını azaltarak etki gösterir. Vasköler desteğinin kalkması endometrial atrofi ile sonuçlanır. Mifepristonun günlük dozu 50-100 mg'dır ve etkisini 6 aydan sonra gösterir (163).

**Matriks metalloproteinaz inhibitörleri:** Matriks metalloproteinler endopeptidaz ailesindedir. Ekstrasellöler matriks proteinlerinin turnoverından sorumludur. Bunların aktiviteleri spesifik matriks

metalloproteinaz doku inhibitörleri tarafından kontrol edilir (TIMPs). Steroid hormonlardan östrojen endometrial MMPs aktivitesini artırırken; progesteron azaltır. Artmış MMPs aktivasyonu endometriosisde tanımlanmıştır ve endometriumun dokulara invazyon ve implantasyonundan sorumlu tutulmaktadır. Bu enzimlerin inhibisyonu endometriosisin gelişimini engelleyebilir. Bu moleküllerle ilgili 2001'de yapılan tek deneysel çalışmaya(164) ek olarak Bülent Yılmaz ve arkadaşları 2009'da metforminin TIMP-2 ve MMP-9 inhibisyonu yoluyla ratlarda oluşturulan endometriosis odaklarını geriletmediğini göstermiştir (165).

### **Anti-VEGF tedaviler**

Endometriosisin patofizyolojisinde VEGF çok önemli bir yere sahip olduğundan bu molekülün inhibe edilmesi endometriosis oluşum ve tedavisinde önemli olabilir. Bu amaçla kullanılabilecek bir ajanın, bevacizumabın, denenmesi mantıklı bir tercih kabul edilmelidir(163).

### **2.1.7.3. Cerrahi Tedavi**

Endometriosisin cerrahi tedavisi normal anatomik ilişkilerin sağlanması, görünür tüm hastalığın mümkün olan genişlikte çıkartılması ya da yok edilmesi ve hastalığın tekrarının önlenmesi ya da geciktirilmesini amaçlar. Üreme anatomisini bozan orta ya da ciddi endometriosisi olup fertilitelerini yeniden düzenlemeyi ya da korumayı umut eden kadınlar için, tedavi seçeneği cerrahidir, çünkü medikal tedavi cerrahi kadar başarılı olamaz. Hastalığın ciddiyeti daha az olduğunda, medikal tedavi hastaların büyük bir kısmında ağrıyı etkin bir şekilde kontrol edebilir, ancak fertilité üzerine hiç etkisi yoktur; cerrahi en azından ağrının giderilmesinde medikal tedavi kadar etkilidir ve aynı zamanda fertilitéyi de iyileştirir.

Endometriosis tedavisinde cerrahi laparoskopik ya da laparotomik olarak gerçekleştirilebilmesine karşılık, enstrümantasyon ve teknikteki

teknolojik gelişmeler genellikle geniş enterolizis ya da bağırsak rezeksiyonuna ihtiyaç duyulanlar hariç hepsinde endoskopik yaklaşıma izin verir. Laparoskopi daha iyi görüntü, daha az doku travması, daha küçük insizyon ve daha hızlı postoperatif iyileşme avantajlarını sunar. Postoperatif adezyonlar ve komplikasyonlar laparotomiye takiben oluşarlardan daha azdır. En önemlisi laparoskopiyle, laparotomi sonrası gözlenenlerle eşit ya da daha iyi sonuçlar elde edilir (166).

Endometriozisteki peritoneal implantların kabul edilen cerrahi tedavileri mümkün olduğu ölçüde tüm hastalığın ablasyon ya da eksizyonu şeklindedir; eksizyon tanının histopatolojik olarak doğrulanması için ek olarak doku spesmeni avantajı sağlar. Over kaynaklı endometriomalar en iyi şekilde, kistektomi ya da kistin delinmesini takiben internal kist duvarının ablasyonu ile tedavi edilebilirler. Derin rektovajinal endometriozis, geniş cerrahi tedaviye ihtiyaç gösterir. Hafif endometriozisle ilişkili ağrının kontrolünde cerrahi tedavinin etkinliği medikal tedavilerle karşılaştırılabilir düzeydedir, ancak cerrahi tedavi endometriomalı veya derin infiltrate hastalığı olan kadınlarda daha iyi uzun dönem sonuçlar sunar. Cerrahi tedavi orta ve ağır endometriozisli kadınlarda ve muhtemelen orta düzeyde yaygınlık gösteren minimal ve hafif hastalığı olan kadınlarda fertilitiyi artırır. Cerrahi sonrası gebelik oranları en yüksek ilk 6ay- 1 yılda gözlenmesi nedeniyle postoperatif medikal tedaviyle vakit kaybedilmemelidir (167). Cul-de-sak ve rektovajinal septumun tutulduğu derin hastalığı olan kadınların sonuçlarını olumlu yönde etkilemesi haricinde, preoperatif medikal tedavinin yeri kanıtlanmış değildir. Postoperatif medikal tedavi, hastalık ve semptomların rekürrensini geciktirir; yaygın ve rezidü hastalığı olan kadınlarda kullanılmalıdır, ancak infertil kadınlara çoğunlukla ek bir faydası olmaz. Cerrahi tedavi sonrası endometriozisin rekürrens oranı yılda yaklaşık %10-20'dir. Medikal tedavi yetersiz kaldığında ya da konservatif cerrahi tedavi gereksiz veya başarısız olduğunda, histerektomi ve bilateral salpingo-ooferektomi oldukça etkili olur. Kombine düşük doz östrojen-progestin tedavisi, radikal cerrahi tedavi sonrası tercih edilen postmenopozal hormon tedavi şeklidir (8).

## 2.2 ENDOMETRİOZİS GELİŞİMİNDE VEGF'ÜN ROLÜ

Retrograd menstruasyon kadınlarda sık görülen bir olay olsa da menstrüasyonu olan her kadında endometriosis gelişmez. Endometriosisli kadınlarda immün sistemde değişiklikler olabilir ve hastalık pelvik kaviteden kaynaklanan canlı endometrial hücrelerin azalmış immünolojik klirensi ve VEGF'e bağlı kolaylaşmış kanlanma sonucu gelişebilir (168).

Endometriosis tüm popülasyonda %10, infertil bayanlarda %40'a kadar saptanabilen bir patolojidir. Endometriosis benin bir hadise olmasına karşın progressif seyri nedeni ile istenmeyen sonuçlara neden olmaktadır. Bu progresif seyir nedeni ile yeni kan damarları yani kanlanmaya ihtiyaç ortaya çıkar, bu da endometriosis seyrinde kritik bir öneme sahiptir. Endometrial implantlar genelde peritona yerleşmiş olup peritoneal sıvıyı beslenme ve yayılım amacı ile kullanılırlar. Bu yayılım inflamatuvar bir reaksiyonun ortaya çıkmasına neden olur ve periton sıvısının karakteri ve hücre içeriği değişir. Endometriosisli bayanların periton sıvısı incelendiğinde in vitro şartlarda endometrium stromasının büyümesine yol açabildiği görülmüştür. Yine aynı sıvının tavuk embriyolarında koryo-allantoik membranda anjiogenez uyardığı da saptanmıştır (169, 170).

VEGF anjiogenezin güçlü ve spesifik bir uyarıcısı olup en az 4 izoformu bulunan bir peptittir. VEGF-189 ve VEGF-206 büyük izoformlar olup VEGF-121 ve VEGF-165 küçük izoformlardır. Büyük izoformlar hücre bağımlı olup küçük izoformlardan önce üretilir (171,172). VEGF endometrium, over, plasenta, ve makrofajlar gibi bir çok dokuda üretilebilir. Ancak reseptörleri en çok ve bol miktarda normal endotel hücrelerinde ve bazı kanser hücrelerinde bulunur (171, 172). Endotel hücre büyümesini uyarmanın yanında vasküler geçirgenlik, makrofaj trafiği ve glukoz transportunu da düzenler (173).

### **Özetle; VEGF (Vasküler Endotelyal Growth Faktör)**

İmplant olabilmek ve büyümek için endometriumun kan desteğini sağlaması şarttır.

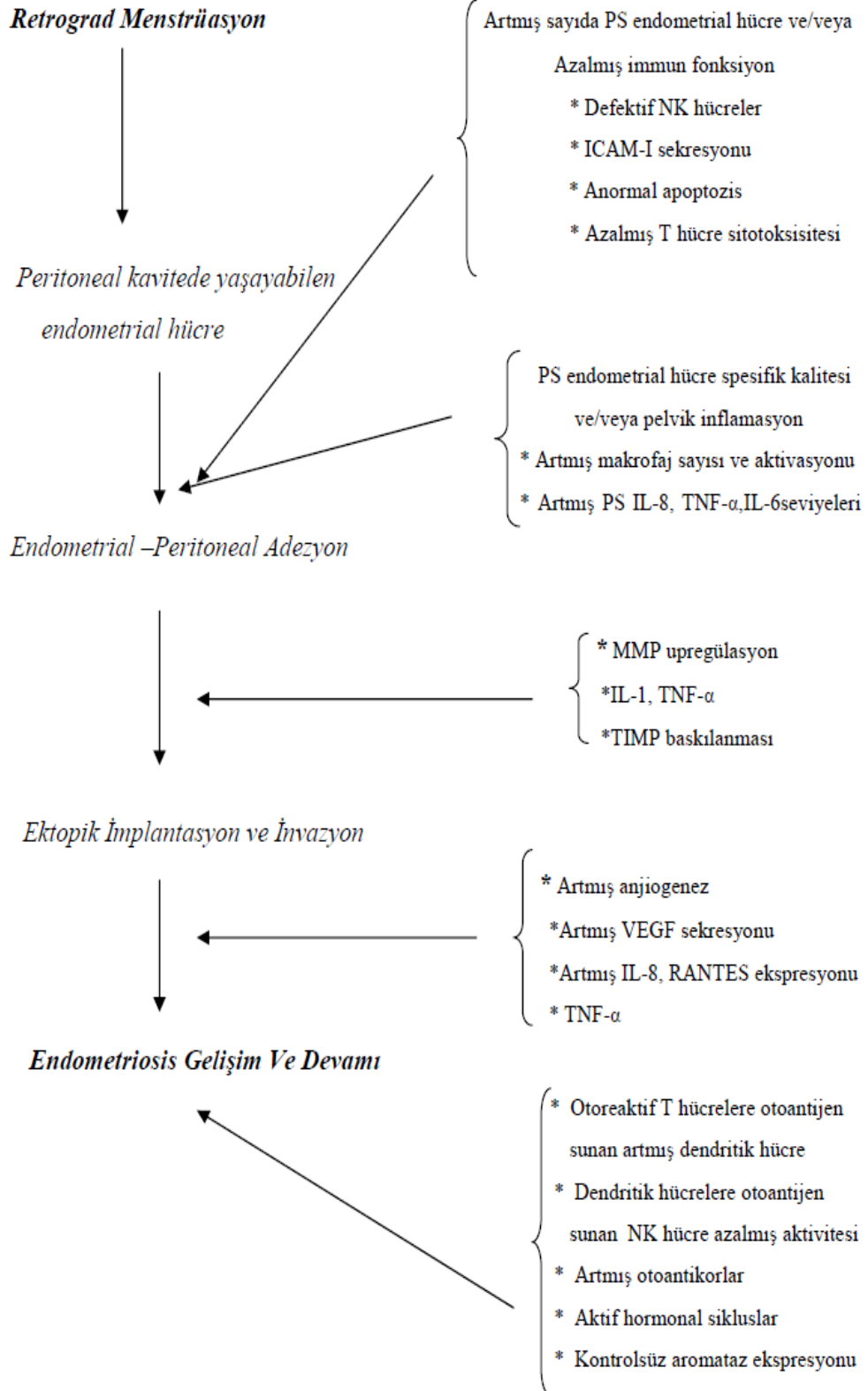
VEGF monosit ve makrofajlar tarafından üretilen lokal anjiogenezin önemli bir mediatörüdür. Epitelyum hücrelerde, mezankimal hücrelerde ve tümör hücrelerince de üretilmektedir.

VEGF endotelyal hücrelerin proliferasyonunu stimüle eder ve aynı zamanda monositler için kemoatraktandır.

Primer olarak endometrial glandlarda üretilir ve östrojen ve IL-1 dahil olmak üzere bir takım faktörler tarafından regülasyonu artırılır.

Endometriozisli kadınlarda peritoneal sıvıda VEGF konsantrasyonları artmıştır ve hastalığın ileri evrelerinde en yüksek düzeydedir.

Aktif kırmızı lezyonlarda, inaktif “barut-yanığı” implantlardan daha fazla olmak üzere endometriotik lezyonlarda da eksprese edilir (8).



**Şekil 4:** Endometriosis gelişiminde immün sistemin ve VEGF'ün rolü

### **2.3 VEGF DÜZEYİNİN ÖLÇÜMÜ**

VEGF düzeyinin ölçümü immünoassay yöntemi ile özel kitler (R&D Systems, Minneapolis, MN) kullanılarak yapılır. Kullanılan kitlerde bulunan antikolar anti-VEGF-165 olmasına karşın hem VEGF-165 hem de VEGF-121'i tanır ve ölçer. Saptama alt limiti sırasıyla 31.2 pg/mL ve 3.13pg/mL'dir. Ölçümler periton sıvısı kullanılarak da yapılabilir.

### **2.4 ENDOMETRİOSİSTE ANTI-VEGF TEDAVİLER**

VEGF homodimerik bir glikoprotein olup moleküler ağırlığı 45 kDa'dur. İyi bilinen 4 tane izoformu olmasına karşın izole edilmiş 12 izoformu mevcuttur (174). Bu 12 izoformun çoğunluğu reseptör uyarımı yapabilme kapasitesine sahiptir. VEGF inhibitörlerinin bu 12 izoform üzerindeki farklı etkinliklerinin kliniğe nasıl yansıdığı ve inhibitör etkisinin değişip değişmediği net olarak bilinmemektedir (175, 176).

Endometriosisin transplantasyon teorisine göre endometriosisin peritoneal kavitede tutunduktan sonra varlığını sürdürebilmesi için damarsal desteğinin sağlanması gerekir. Üzerinde en çok çalışılan ve en çok bilinen anjiogenetik faktör VEGF'dir. Bu molekül endometriosisli hastaların endometriotik lezyonları, endometriomaları ve peritoneal sıvılarında gösterilmiştir. Bu molekülün inhibisyonu endometriosisin gelişiminin engellenmesinde bir basamak olabilir. Bu amaçla endostatin, TNP-470, celecoxib, rosiglitazon gibi anjiogenezis inhibitörleri kullanılmış ve endometriotik lezyonların sayı ve boyutunda azalma saptanmıştır (163).

### **2.5 BEVACİZUMAB**

Bevacizumab, insan vasküler endotelyal büyüme faktörüne (VEGF) spesifik olarak bağlanan ve biyolojik aktivitesini nötralize eden bir

rekombinant insan monoklonal antikorudur. Bevacizumab, hümanize mürin antikorunun komplementer-determinant bölgeleri VEGF'ye bağlanan, insan antikoruna temel bölgelerini içermektedir. Bevacizumab, gentamisin antibiyotiği içeren besi ortamındaki Çin Hamsterinin over memeli hücreleri ekspresyon sisteminde rekombinant DNA teknolojisi ile oluşturulur ve spesifik viral inaktivasyon ve çıkarılma aşamalarından oluşan bir süreç ile saflaştırılır. Bevacizumab 214 amino asitten oluşmaktadır ve molekül ağırlığı yaklaşık 149.000 dalton olup VEGF'nin, endotelial hücreleri yüzeyindeki Flt-1 ve KDR reseptörlerine bağlanmasını inhibe eder. VEGF'nin biyolojik aktivitesini nötralize ederek tümörlerin damarlanmalarını ve dolayısı ile tümörlerin büyümelerini yavaşlatır. Bevacizumab veya bevacizumabın parenteral mürin antikorlarının immün sistemi baskılanmış fare ksenotransplant kanser modellerine uygulanması, kolon, meme, pankreas ve prostat kanserleri dahil olmak üzere insan kanserlerinde yaygın bir anti-tümör aktiviteyi meydana getirmiştir. Metastatik hastalığın ilerlemesi inhibe edilmiş ve mikrovasküler geçirgenlik azaltılmıştır. Bevacizumab intravenöz enfüzyon şeklinde uygulanır.

## **2.6 DIŞI RATLARIN REPRODÜKTİF SİSTEMİ**

Ratlarda böbreklerin kaudal ucuna yakın olarak konumlanmış olan ovaryumlar 3- 5 mm büyüklüğündedir. Uterus bikornual yapıda olup kornular 4- 6 cm uzunluktadır. Uterusun beslenmesi arteria uterina tarafından sağlanmaktadır. Serviks uteri 0. 3- 0. 5 cm, vajina ise 2.5 cm uzunluktadır. Klitoris vajinal girişin kranialinde küçük ve konik şekilde bir çıkıntı halindedir. Dişi ratlarda üretra klitorisin altında yer alır ve vajina ile bağlantısı yoktur.

Memeli dişi hayvanların seksüel aktiviteleri ve üreme sistemlerindeki değişiklikler döngüselidir. Dişiler çoğu zaman erkeklerden kaçınır ve seksüel girişimleri geri çevirirler. Periyodik olarak bu davranış modelinde ani bir değişiklik meydana gelir ve dişiler eşleşmek için atılımında bulunurlar. Bu kısa kızışma veya estrus dönemleri son derece karakteristiktir ve menstrüasyon

göstermeyen memeli cinslerinde bile görülür. Bu cinsel ritim küçük kemiricilerde 4- 5 gün olup estrus siklusu adını alır. Kemiricilerde estrus siklusunun kısa olmasının nedeni hipofizden LH'nın yetersiz salgılanması ve oluşumundan kısa bir süre sonra korpus luteumun dejenere olmasıdır. Estrus siklusu; diestrus, proestrus, estrus ve metestrus olmak üzere dört fazdan oluşmaktadır. Bu fazların deney hayvanlarında saptanması vajinal smear takibi ile yapılabilmektedir.

Dişi ratlarda siklusu oluşturan proestrus fazı 12 saat, estrus fazı 12 saat, erken metaestrus fazı 15 saat, geç metaestrus fazı 6 saat ve diestrus fazı 57 saat sürer. Proestrusta LH ve östrodiol 17- $\beta$  maksimum düzeye ulaşır. FSH'da ise yavaş bir artış görülür. Bu dönemin başlangıcında E2 değeri düşük seviyede seyrederken, proestrus döneminin ortalarına doğru en yüksek seviyeye ulaşır. Estrusa doğru ise hafif bir düşme gösterir.

Estrusun süresi 7- 21 saat olup daha çok gece saatlerinde belirlenir. Estrusta vulva ödemli, vajina duvarı kurudur. Davranışsal olarak estrustaki dişi ratlar aşırı hareketli olurlar, baş ya da sırtları okşandığında kulakları titrer, pelvis bölgesi uyarıldığında ise arka tarafını kaldırır. Estrus sonuna doğru dişi ratlarda spontan olarak ovule olan yaklaşık 10 adet oositin yaşam süresi 10-12 saat kadardır.

### ***Estrus Siklusunun Vajinal Smear ile Belirlenmesi ve Siklusun İnsan Siklusuna Uyarlanması:***

- Diestrus: (57 saat) İki çiftleşme periyodu arasındaki zaman aralığıdır. Smearda bol miktarda değişik epitel hücre tipleri vardır. Mukus ve lökosit mevcuttur. Epitel hücreleri daha çok oval şekillidir. Glandüler hiperplazi ile başlayan bu devrede korpus luteumun salgıladığı progesteron hormonunun etkisi vardır.

İnsanlarda, ovulasyondan sonra çatlayan folikülde lipitten zengin luteal hücrelerin oluştuğu ve korpus luteumun meydana geldiği luteal veya

sekretuvar faz diye adlandırılan evre sıçanların diestrus ve metestrus evrelerine paralellik göstermektedir.

- Proestrus: (12 saat) Bu fazda ovaryumda bir ya da birkaç folikül olgunlaşır ve folikül epitelleri teka intena hücrelerinden östrojen salgırlar. Vajinal epitel çoğalmıştır. Smeara, dış hatları oval olan epitel hücrelerinin merkezi nukleusları vardır, lökosit ve mukus nadirdir.

Proestrus fazı, insanlardaki menstrual siklusun 1.-14. gün arası, bir folikülün hızla büyümeye başladığı, kada estrojen hormonunun yükseldiği foliküler faz veya proliferatif faz olarak tanımlanan döneme karşılık gelmektedir.

- Estrus: (14 saat) Çiftleşme ve kızışma periyodu olup, estrus davranışının hayvanda belirgin hale gelmesinden 6-10 saat sonra ovulasyon gerçekleşmektedir. Smeara görülen vajen epitelinde kornifikasyon vardır, birçoğu çekirdeklerini kaybetmiştir. Çiftleşme halinde ise vajinal plak oluşur.

İnsanda siklusun yaklaşık 14. günü, LH hormonu salınımının aniden yükselmesi ile gerçekleşen ovulasyon dönemi ile özdeşdir.

- Metestrus: (21 saat) Overde korpus luteumun şekillenmeye başlaması ile karakterizedir. Smeara birkaç kornifiye hücre olup, lökosit ve mukus boldur. Dönem sonunda çekirdekli poligonal hücreler ortaya çıkar.

### ***Ratlarda Deneysel Endometriozis Çalışmaları***

Vernon ve Wilson, ratlarda endometriozis oluşturmak için 1985 yılında yaptıkları çalışmalarında çeşitli teknikler denemişlerdir. Peritoneal kaviteye 2x2 mm'lik uterus parçası implantasyonu, uterin lavaj instillasyonu ve endometrial kazıntı materyalinin ekimini uygulamışlardır. Sadece ototransplant yapılan grupta kistik endometriozis geliştiğini belirtmişlerdir. Bu elipsoidal kistik odakların hem endometrial stroma hem de glandları içerdiği saptanmıştır.

### 3. MATERYAL METOD

Araştırma için deney hayvanları, Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi'ne bağlı Deney Hayvanları Ünitesi'nden sağlandı ve araştırma aynı ünite de yürütüldü. Araştırma materyali olarak yetişkin, ağırlıkları 170-222 gram arasında değişen Wistar Albino türü toplam 36 adet dişi rat kullanıldı. Tüm işlemler için Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Eğitim Planlama ve Koordinasyon Kurulundan onay alındı.

Çalışma için seçilen ratlar, bireysel olarak kafeslendi. Kafeslerde altlık materyali olarak ince sarı saman kullanıldı ve bakım odasında ısı  $24 \pm 1 \text{ C}^{\circ}$ , nem oranı  $\% 55 \pm 5$  ve ışık/zaman ayarı 12/12 saat olarak belirlendi. Suluk olarak, sürekli kafeslerin üzerinde bulundurulmuş cam suluklar kullanıldı. Ratların beslenmesi için, Türk Standartları Enstitüsü (TSE) standartlarına uygun olarak yaptırılan pelet yem seçildi. Ratların bakımı Deney Hayvanları Ünitesi'nde Erkan Kaya tarafından yapıldı.

#### OPERASYON 1

Tüm ratlar homojenizasyon için operasyonlardan önce vajinal smear alınarak estrus fazında olan ratlar belirlendi. Smear alınırken rat sırtüstü yatar pozisyonunda, kafası aşağıya gelecek şekilde tutularak, kuyruk ve kuyruk kökünden tespit edildi. Vajen  $\%0.2$ 'lik SF ile yıkanarak hidrofili pamuklu çubukla smear alındı (**Resim 1**). Alınan smear örnekleri fiksasyon sonrası papanicolaou boyama yöntemiyle boyandı (**Resim 2**). Günlük alınan vajinal smear örnekleri ile belirlenen estrus fazındaki ratlar operasyona alındı. Çalışmaya 36 rat alınarak bütün ratlara Ketamin hidrokloride(i.m 40mg/kg  $\%10$  alfamin),Xylazine hidroklorid(i.m 2mg/kg  $\%2$  alfazin)karışımı ile anestezi verildi.Operasyon öncesi ratların batin cildi traşlandı ve  $\%10$ 'luk povidin iyot çözeltisi ile antisepsi sağlandı(**Resim 3**). Ratlara endometriosis cerrahi olarak Wernon ve arkadaşlarının önerdiği şekilde(177), Uygur ve arkadaşlarının modifikasyonları (178)dikkate alınarak otolog uterin dokunun abdominal

duvarın iç yüzüne transplante edilmesi yoluyla indüklendi. Batına üretral açıklığın üstünden başlayan 3 cm'lik vertikal kesiyle girildi(**Resim 4**) ve her iki uterin horn açığa çıkarıldı (**Resim 5**). Sağ uterin horn 1 cm'lik segment longitudinal olarak miromakas yardımıyla açılarak endometrial doku açığa çıkarıldı. Daha sonra sağ yandan ön peritona 1 cm'lik kesiyle girildi ve periton içine endometrial doku periton ile yüzleştirilerek 4.0 poliprolenle iki taraflı suture edilerek transplante edildi (**Resim 6**). Çalışmaya alınan ratlar rastgele üç gruba ayrıldı(A ,B ve C). A grubundaki 12 rata yapılan implantın çevresine olmak üzere bevacizumab(Altuzan®) 0.05 ml(1.25 mg) intraperitoneal verildi. Diğer B ve C grubundaki toplam 24 rata ilaç verilmedi. Abdominal duvar kapatılmadan önce kuruluğun önlenmesi ve adezyon oluşumunun minimal olması için 2 ml salin ile abdominal kavite yıkandı. Abdominal insizyon 4,0 poliglactin suture kullanılarak ilk kat periton-fasya, ikinci kat cilt olmak üzere iki tabaka halinde kapatıldı (**Resim 7**). Operasyon süresi ortamın dokuların kurumalarına etkisini minimize etmek amacıyla 15 dk ile sınırlandı ve tüm operasyonlar aynı iki çalışmacı tarafından yapıldı. Ratlar operasyondan sonra tek tek kafeslenip 4 haftalık iyileşme sürecine bırakıldı. Bu dönemde ratlar günlük tartıldı ve hiçbirine östrojen tedavisi verilmedi.

## OPERASYON 2

İlk operasyondan 4 hafta sonra ratlara estrus fazındaki ratlara ikincil bakış laparatomisi aynı çalışmacılar tarafından yapıldı. İlaç verilen gruptan(A) 2 ve ilaç verilmeyen B ve C grubundan 5 olmak üzere toplam 7 rat kaybı oldu. Kalan ratlara yapılan bu operasyonda implantın canlılığı, kistik oluşum varlığı literatürde olan daha önce yapılan iki çalışmadaki kriterelere uygun değerlendirildi (177, 178) (**Resim 8**). Ektopik uterin doku tanımlandı ve ektopik uterin dokunun büyüklüğü cetvel yardımıyla uzunluk, genişlik ve yükseklik olarak üç farklı boyutta ölçüldü (**Resim 9**). Her bir ektopik uterin dokunun küresel volümü elipsoid formül kullanılarak  $V(mm^3)=0.52$  uzunlukxgenişlikxyükseklik hesaplandı (178). Dokular dijital fotoğraf makinesiyle fotoğraflandı ve ölçümler kaydedildi. A ve C grubundaki ratlar

ketamin anesteziyle öldürüldü. A ve C grubundaki ratlardaki ektopik endometriotik odaklar eksize edildi, tartıldı ve %10 luk formalin solusyonuna koyularak patoloğa teslim edildi. İnceleme yapan patoloğa, inceleme sonuna kadar uygulanan tedavi konusunda bilgi verilmedi. Patolojiye gönderilen materyal %10'luk formalinle fikse edildikten sonra rutin takip işlemlerinden geçirilip histopatolojik ve immunohistokimyal inceleme için ikiye ayrılarak parafin bloklara gömüldü. B grubundaki 12 rata daha önce A grubuna verildiği gibi yapılan implantın çevresine olmak üzere bevacizumab(Altuzan®) 0.05 ml(1.25 mg) intraperitoneal verildi ve tekrar batın tarif edildiği şekilde iki kat olarak kapatıldı.

### **OPERASYON 3**

İkinci operasyondan 4 hafta sonra günlük vajinal smearlar alınarak estrus fazındaki ratlarda üçüncü operasyon yapıldı ve kalan 12 rat da ketamin anesteziyle öldürüldü. İmplantlar aynı çalışmacı tarafından aynı ölçüm metodları kullanılarak tekrar ölçüldü. Dijital fotoğraf makinesiyle dokuların fotoğrafı çekildi. Ektopik endometrial odaklar eksize edildi, tartıldı ve %10 luk formalin solusyonuna koyularak patoloğa teslim edildi. İnceleme yapan patoloğa, inceleme sonuna kadar uygulanan tedavi konusunda bilgi verilmedi. Patolojiye gönderilen materyal %10'luk formalinle fiske edildikten sonra rutin takip işlemlerinden geçirilip histopatolojik ve immunohistokimyal inceleme için ikiye ayrılarak parafin bloklara gömüldü.

### **A. HİSTOPATOLOJİK İNCELEME**

Örnekler Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji laboratuvarında kesitler hazırlanıp hematoksilin-eozin boyası uygulandı. Dehidrate edilip parafin bloklara gömüldükten sonra 4- 6 mikronluk kesitler hazırlanıp hematoksilin-eozin boyası uygulandı. Her blok için iki kesit hazırlandı ve seçilmiş vakalarda daha derin kesitler alındı. Preparatlar ışık mikroskopisi altında incelendi. Endometriozisin histolojik tanısı endometrial glandüler doku ve stromanın morfolojik olarak identifikasyonu esasına dayanır. Bu çalışmada önceki çalışmalardaki geliştirilmiş metot esas alınarak endometriozis

odaklarındaki epitelyal hücre persistansı semikantitatif olarak değerlendirildi: iyi korunmuş epitelyal tabaka= skor 3, lökosit infiltrasyonu ile birlikte orta derecede korunmuş epitelyal tabaka= skor 2, zayıf olarak korunmuş epitelyal tabaka (seyrek olarak sadece epitelyal hücreleri içeren)= skor 1, epitelin olmaması= skor 0 olarak değerlendirildi(179). Her bir rat için belirlenen skorlar gruplar arasında istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

## **B. TRİKROM BOYAMA İLE DEĞERLENDİRME**

Bu kit konnektif dokuyu göstermede özellikle de kollajen ve kas dokusunu birbirinden ayırt etmede kullanılır.

Protokol:

1.A ve B istenen eşit ölçülerde karıştırarak Weigert Hematoksisen hazırlanır.

2.Solusyon 4 derecede korunursa 30 gün aktif olabilir.

3.Kesitler suya götürülür.

4.Nucleuslar Weigerts Iron Hematoksisen ile 15-30 dakika boyandıktan sonra hızlıca yıkanır ve %0.5 alkol solusyonunda ayrıştırılır.

5.Suda durulanır.

6.5 dakika Ponceau Fuscine solusyonunda boyanır ve daha sonra hızlıca suda durulanır.

7.Fosfotungstik asitte 5 dakika ayrıştırılır.

8.Durulamadan Anilin Blue mason solusyonuna 5 dakika için transfer edilir.

9.Distile suda durulanır.

10.Slaytlar Fosfotungstik aside 5 dakika için aktarılır.

11.Asetik asit solusyonuna 5 dakika için aktarılır.

12.Suda durulanır.

13.Dehidrate edilir. Ksilen ile temizlenir ve cam üzerine yerleştirilir.

Trikrom boyama ile incelemede değerlendirme için Grade 0:hiç fibrozis yok; Grade 1:minimal fibroz doku artışı; Grade 2:düzensiz fibröz doku artışı; Grade 3:konsantrik fibrozis,hyalinizasyon kullanılmıştır(180)

### **C. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL İNCELEME**

1-Parafin bloklara gömülen dokulardan 5 mikronluk kesitler alınarak bir gece boyunca 37°C ve 1 saat 60°C de inkübe edildi.

2-Her olgu için negatif kontrol kullanıldı.Pozitif kontrol için primer antikor (1/300 dilüe edilmiş şekilde)preimmünsera ile birlikte kullanıldı.

3-Ki-67 (Cat # RM-9106-S /Labvision/NeoMarkers Corporation, Fremont CA, USA) ve Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (Cat # RB-222-P /Labvision/NeoMarkers Corporation, Fremont CA, USA) antikorları kullanım klavuzuna göre streptavidine – biotine peroxydase complex metodu kullanılarak uygulandı.

4-Ki-67 indeksi 100 hücrede boyanan hücre sayısının yüzde olarak belirtilmesi şeklinde hesaplandı.

5-Tüm olgular Leica DMI 4000 B ışık mikroskobu(Leica, Wetzlar, Germany) ile değerlendirildi. Her spesimen 40X büyütmede bakıldı.

6-Her spesimde KI-67 pozitif nukleuslar sayıldı. Her bir endometiosis odağında 100 hücre sayıldı ve bunlardan KI-67 pozitif nukleusu olan hücrelerden ,0-5 arası negatif;5-25 arası pozitif olarak değerlendirildi.

7-Rölatif immunoreaktif boyama yoğunluğu kuantitatif olarak daha önce McCarty ve arkadaşları tarafından belirlenen şekilde değerlendirildi(181)

8-Pozitif VEGF boyan epitelyum hücrelerini VEGF boyama yoğunluğuyla çarpımının yüzdelerinin toplamından HSCORE(histolojik skor)elde edilmiştir.HSCORE= $\sum P_i(I+1)$ . Burada, I boyama yoğunluğunu gösteriyor(0= ekspresyon yok, 1=hafif, 2=orta, and 3=yoğun) ve P<sub>i</sub> her yoğunluk için boyanan hücre yüzdesidir(182)

9-Tüm dokular örneklerin nereden alındığı hakkında bilgisi olmayan tek bir patolog(Muzaffer Çaydere) tarafından değerlendirildi.

#### **D. İSTATİSTİKSEL ANALİZ**

Verilerin istatistiksel değerlendirmesi SPSS for Windows release 15.0 paket programında yapılmıştır. Değerlendirmelerde sürekli veriler için normal dağılıma sahip olanlarda üç grup arasındaki karşılaştırmalar tek yönlü varyans analizi ve bonferroni testi ile , normal dağılıma sahip olmayanlarda Kruskal-Wallis varyans analizi ile değerlendirilmiştir. Ayrıca kategorik verilerin değerlendirmesinde Khi-Kare testi uygulanmıştır.

Tanımlayıcı değerler olarak normal dağılan sürekli veriler için aritmetik ortalama±standart sapma, normal dağılmayan verilerde medyan, minimum ve maksimum değerler verilmiştir. Kategorik veriler sayı ve yüzde şeklinde ifade edilmiştir. İstatistiksel anlamlılık sınırı 0.05 olarak alınmıştır.

## 4. BULGULAR

Araştırma materyali olarak yetişkin, ağırlıkları 170-222 gram arasında değişen Wistar Albino türü toplam 36 adet dişi rat kullanıldı. Başlangıçta ratların ağırlığı 170- 222 gram arasında değişmekteydi. Araştırma dönemi süresince kontrol grubundan 5 rat, profilaktik tedavi verilen gruptan(A grubu) 2 rat anesteziye bağlı komplikasyonlar nedeniyle öldü. Kalan tüm ratlar cerrahi prosedürleri iyi tolere etti. Tüm laparotomi insizyonları intaktı ve ratlardan hiçbirinde insizyonel herni görülmedi. Vaginal smearlar yoluyla estrous siklusundaki yan etkiler elimine edildi. Çalışma süresince ratların ağırlık değişimi takip edildi. Ratların genel görünümü, idrar rengi, iştah durumu gibi özellikleri gözlemlendi. Tedaviye bağlı olarak ratların genel durumunda herhangi bir olumsuz etki gözlenmedi. Tedavi grubunda tedaviden dolayı kayıp olmadı.

İkinci laparatomiden sonra gruplar arasında ratların ağırlığı yönünden fark saptanmadı (**Tablo-3**).

**Tablo 3:** Kontrol veTedavi (Bevacizumab) Gruplarında Ratların Ağırlıkları (ort± SD) ve ağırlıkların istatistiksel analizi

Kilo,mg (ort±SD)	Gruplar			İstatistiksel analiz*		
	Grup A ( n=10 )	Grup B ( n=12 )	Grup C ( n=7 )	GrupA vs GrupB	Grup A vs GrupC	Grup B vs GrupC
Ağırlık 1	198,30±3,97	195,25±10,71	195,14±7,12	0,405	0,259	0,982
Ağırlık 2	200,70±4,19	202,75±4,19	198,86±7,62	0,616	0,530	0,45

♦ Grup A:profilaktik bevacizumab alan grup, GrupB:Lezyon oluştuktan sonra bevacizumab alan grup, Grup C:kontrol grubu , ort±SD: ortalama± standart deviasyon, Ağırlık 1: Tedavi öncesi ağırlık(mg), Ağırlık 2: Tedavi sonrası ağırlık(mg)

\*ANOVA testine göre grupların ağırlıkları arasında anlamlı fark saptanmadı(p>0.05)

İkinci laparatomiden sonra yapılan gözlemede profilaktik tedavi verilen grupta 7 ratta(%70) endometriozis odağı oluşmadı (**Resim 10**) fakat buna karşılık diğer gruplardaki ratların tümünde odak oluştu ve Pearson Chi-square testine göre anlamlı farklılık saptandı ( $p=0,000$ ). Uterin hornlarda A grubunda hiç hidrosalpenks oluşumu gözlenmezken, B grubunun tamamında C grubundaki 7 rattan 4'ünde hidrosalpenks mevcuttu ve yine aynı teste göre istatistiksel olarak profilaktik tedavi alan grup ile diğer iki grup arasında anlamlı fark mevcuttu ( $p=0.000$ ). Damarlanma artışı B ve C grubunda tüm ratlarda oluşan endometriozis odağında mevcuttu, buna rağmen A grubunda endometriozis odağı oluşan sadece%30 ratta damarlanma artışı mevcuttu ve bu açıdan A grubu ve diğer gruplar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlıydı( $p=0.000$ ) .

*Lezyon Hacim Değerlendirilmesi:*

**Tablo 4.** Kontrol ve tedavi gruplarında (Bevacizumab) endometriozis lezyon hacim değerleri( $\text{mm}^3$ ) ve istatistiksel analizleri

Lezyon hacmi( $\text{mm}^3$ ) (median/IQR)	Gruplar			İstatistiksel analiz*		
	Grup A ( n=10 )	Grup B ( n=12 )	Grup C ( n=7 )	GrupA vs GrupB	Grup A vs GrupC	Grup B vs GrupC
Volüm 1	0/1,8	103/109	162/220	0,001	0,001	0,384
Volüm 2	0/1,8	0/14	220/220	0,346	0,001	0,001

Volüm 1: tedavi öncesi hacim değeri( $\text{mm}^3$ ), Volüm 2:tedavi sonrası hacim değeri ( $\text{mm}^3$ ),

Kruskal-Wallis testine göre ikinci laparatomiden sonra profilaktik tedavi alan grupta endometriozis lezyon hacmi profilaktik tedavi almayan gruplara göre belirgin olarak düşüktü ( $p=0,001$ ). Endometriozis lezyonu oluştuktan sonrasında Grup B 'ye verilen lokal Bevacizumab tedavisi lezyon hacimlerini belirgin olarak düşürdü. Tedavi öncesi B grubu lezyon hacim median değeri  $103 \text{ mm}^3$  iken tedavi sonrası median değer  $0 \text{ mm}^3$  oldu. Wilcoxon Signed Ranks testine göre B grubundaki lezyon hacminin tedavi sonucu düşüşü

istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p=0,002$ ) Tedavi öncesi B grubu ratlar ile A grubu ratların lezyon hacmi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark varken ( $p<0,05$ ) tedavi sonrası iki grup arasında fark görülmedi ( $p>0,05$ ). Yine tedavi öncesi B grubu ratlar ile kontrol grubu lezyon hacimleri arasında istatistiksel fark yokken tedavi sonrası iki grup arasında belirgin fark görüldü ( $p=0.001$ ) **(Tablo-4)**.

B grubu bevacizumab(1.25 mg) tedavi öncesi ve sonrası kendi içinde karşılaştırıldığında tedavi öncesi bütün ratlarda hidrosalpenks varken tedavi sonrası %83,3 azalmıştır.Yine B grubunda tedavi öncesi tüm ratlardaki endometiozis odağında damarlanma artışı mevcuttu fakat tedavi sonrası hiçbir rattaki odakta damarlanma artışı izlenmedi **(Resim 11)**.

*Histopatolojik Bulgular :*

**Tablo 5:** Kontrol ve Tedavi Gruplarında Histolojik Skor Düzeyleri

	Gruplar			İstatistiksel analiz			
	Grup A (n=10)	Grup B (n=12)	Grup C (n=7)	GrupA vs GrupB	Grup A vs GrupC	Grup B vs GrupC	Group A vs Grup B vs Grup C
Histolojik Skor(median/IQR)	1/ 1	1/0.75	2/ 2	0.348*	0.003*	0.005*	0.003♦

\*Mann-Whitney Test, ♦ Kruskal Wallis Test

Tablo 5'e göre, tedavi sonrasında, kontrol ve tedavi gruplarından elde edilen histolojik skorlar karşılaştırıldığında, Kruskal Wallis testine göre bu değerler arasında anlamlı fark olduğu ( $p=0,003$ ) saptanmıştır. Histolojik skor değerlerine bakıldığında tedavi sonrasında kontrol grubu ortalaması 2 iken profilaktik tedavi alan grup(A) ile odak ouştuktan sonra tedavi alan grupta (B) ortalamasının 1 olduğu saptanmıştır. Mann Whitney testine göre A grubu ile kontrol grubu arasında ve B grubu ile kontrol grubu arasında histolojik skor

açısından anlamlı fark görülmüşken ( $p < 0.005$ ) ;A ve B grupları arasında istatistiksel fark saptanmamıştır( $p > 0.005$ ) .

Diğer bir deyişle, çalışma gruplarına lokal verilen bevacizumab etken maddeli ilacın skor değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı düşüşe neden olduğu, ve bu düşüşde tedavinin verilme zamanının etkin olmadığı saptanmıştır.

Işık mikroskop ile yapılan histopatolojik incelemede kontrol grubunda iyi korunmuş endometrium gland ve stromasından oluşan adacıklar ve arada siderofajlar mevcutken(Resim 12) tedavi gruplarında seyrek olarak endometrial gland ve stromadan oluşan tabaka izlenmekteydi(Resim 13).Tedavi lokal olarak verildiği için tedavi alan hiçbir ratta tedaviye bağlı overlerde etkilenme saptanmadı (Resim 14).

#### *Trikrom boyama ile inceleme:*

Histopatolojik inceleme için hazırlanan preparatlar ayrıca endometriozis etrafındaki fibrozis odağını daha iyi gösterebilmek için trikrom boya ile boyandı. Işık mikroskop altında yapılan incelemede tedavi gruplarında minimal fibroz doku artışı görülürken(Resim 15) kontrol grubunda endometriozis odağı etrafında konsantrik fibrozis ve hyalinizasyon saptandı (Resim 16).

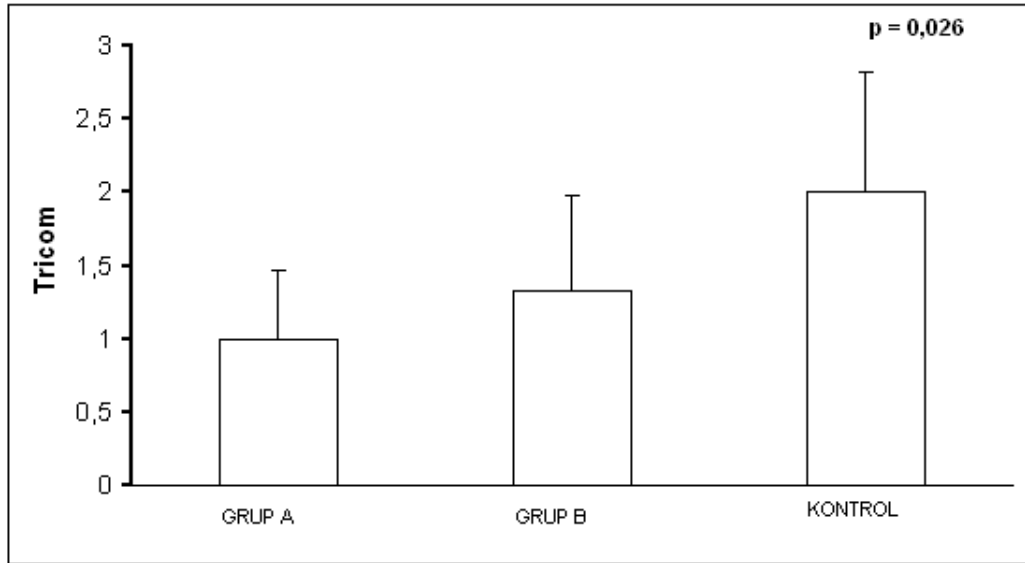
**Tablo 6:** Kontrol ve Tedavi Gruplarında Trikrom Skor Düzeyleri

	Gruplar			İstatistiksel analiz			
	Grup A (n=10)	Grup B (n=12)	Grup C (n=7)	GrupA vs GrupB	Grup A vs GrupC	Grup B vs GrupC	Grup A vs Grup B vs Grup C
Trikrom Skor (medyan/IQR)	1/0	1/1	2/2	0.163*	0.010*	0.09*	0.026♦

\*Mann-Whitney Test, ♦ Kruskal Wallis Test

Tablo 6'ya göre, tedavi sonrasında, kontrol ve tedavi gruplarından elde edilen trikrom inceleme skorlar karşılaştırıldığında, Kruskal Wallis testine göre bu değerler arasında anlamlı fark olduğu ( $p=0,026$ ) saptanmıştır. Trikrom skor değerlerine bakıldığında tedavi sonrasında kontrol grubu ortalaması 2 iken profilaktik tedavi alan grup (A) ile odak ouştuktan sonra tedavi alan grupta(B) ortalamasının 1 olduğu saptanmıştır. Mann Whitney testine göre A grubu ile kontrol grubu arasında trikrom skor değerleri açısından anlamlı fark görülmüşken ( $p<0.005$ ); A ve B grupları arasında istatistiksel fark saptanmamıştır( $p>0.005$ ) .B grubunda trikrom skor değerleri kontrol grubuna göre düşük olmasına rağmen istatistiksel olarak fark saptanmamıştır ( $p>0.05$ )

Diğer bir deyişle, çalışma gruplarına lokal verilen bevacizumab etken maddeli ilacın trikrom skor değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı düşüşe neden olduğu, ve bu düşüşde tedavinin özellikle profilaktik verilmesinin istatistiksel olarak anlamlı fark oluşturduğu saptanmıştır. Yani tedavinin profilaktik verilmesi endometriozis odağı çevresinde fibrozis oluşumunu önlemektedir.



**Şekil 5.** Tedavi ve kontrol gruplarında trikrom boyama skor değerleri, değerler medyan olarak verilmiştir. Tedavi ile kontrol grupları arasında istatistiksel fark mevcuttur ( $p=0,026$ ).

### VEGF boyama ile inceleme:

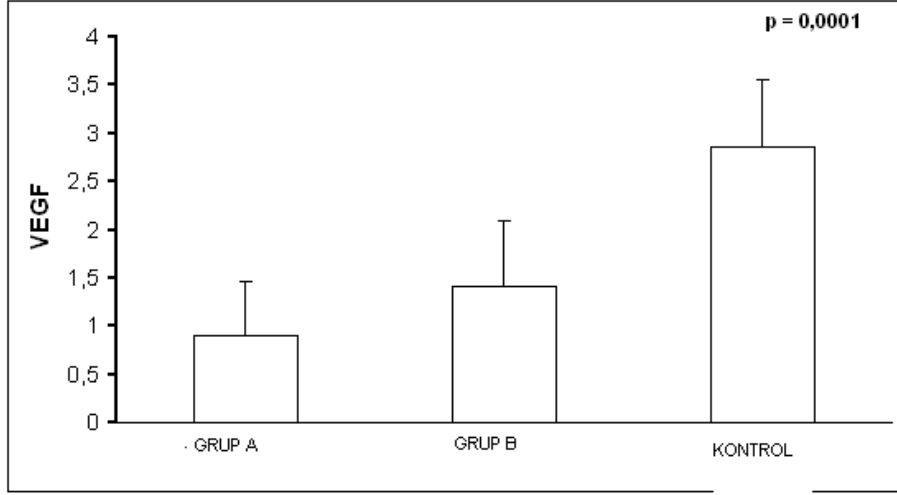
Kruskal Wallis testine göre kontrol ve tedavi gruplarından elde edilen VEGF ile boyanma skorları karşılaştırıldığında, tedavi gruplarında VEGF ile boyanma kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşüktür ( $p=0,0001$ ). Kontrol grubu VEGF ile boyanma skoru ortalama 3 iken profilaktik tedavi alan grup(A) ile odak ouştuktan sonra tedavi alan grupta(B) ortalamasının 1 olduğu saptanmıştır. Mann Whitney testine göre A grubu ile kontrol grubu arasında ve B grubu ile kontrol grubu arasında VEGF skorları açısından anlamlı fark görülmüşken ( $p<0.005$ ); A ve B grupları arasında istatistiksel fark saptanmamıştır ( $p>0.005$ ) (Şekil-6).

Diğer bir deyişle, çalışma gruplarına verilen tedavinin VEGF ile boyanma skorlarında istatistiksel olarak anlamlı düşüşe neden olduğu ve bu düşüşte tedavinin verilme zamanının etkin olmadığı saptanmıştır.

**Tablo 7:** Kontrol ve Tedavi Gruplarında VEGF ile Boyanma Skor Düzeyleri

	Gruplar			İstatiksel analiz			
	Grup A (n=10)	Grup B (n=12)	Grup C (n=7)	GrupA vs GrupB	Grup A vs GrupC	Grup B vs GrupC	Group A vs Grup B vs Grup C
VEGF ile boyanma Skor (median/IQR)	1/ 0,25	1/1	3/1	0.071*	0.001*	0.002*	0.0001♦

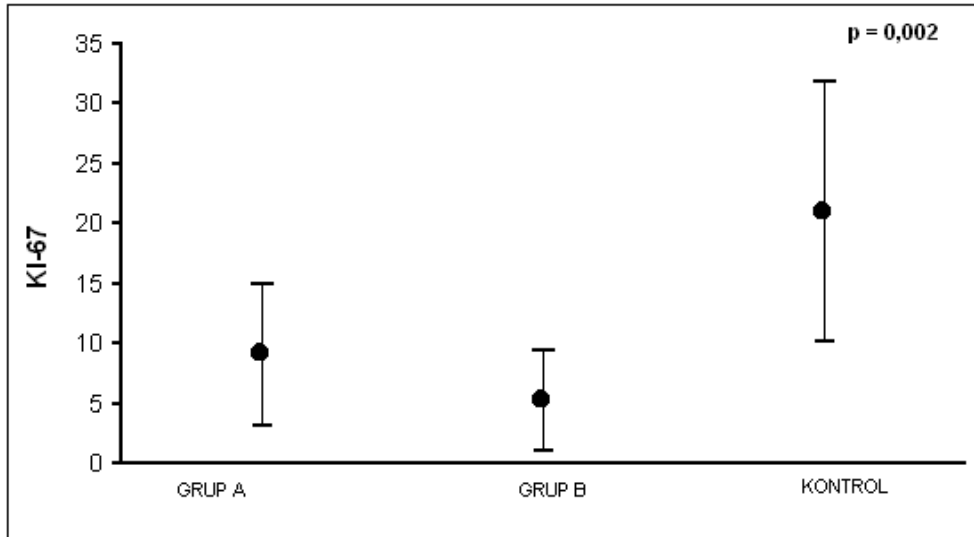
\*Mann-Whitney Test, ♦ Kruskal Wallis Test



**Şekil 6.** Tedavi ve kontrol gruplarında VEGF skor değerleri. Değerler medyan olarak verilmiştir. Tedavi ile kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark mevcuttur ( $p=0,0001$ ).

Işık mikroskobu altında tedavi grubunda zayıf boyanma görülmüşken (Resim 17), kontrol grubunda güçlü boyanma gözlenmiştir (Resim 18).

*Kİ-67 boyama ile inceleme:*



**Şekil 7.** Tedavi ve kontrol gruplarında Kİ-67 skor değerleri. Değerler medyan olarak verilmiştir. Tedavi ile kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark mevcuttur ( $p=0,0001$ ).

Kruskal Wallis testine göre kontrol ve tedavi gruplarından elde edilen Ki-67 ile boyanma skorları karşılaştırıldığında, kontrol grubunda Ki-67 ile boyanan hücre (medyan 20 işaretli nucleus/hücre, min-max:7- 35) profilaktik tedavi alan A grubu(medyan 7.5 işaretli nucleus/ hücre, min-max: 3-20) ile sonradan tedavi alan B grubu(medyan 3 işaretli nucleus/hücre, min-max:2-15) değerlerinden anlamlı olarak büyüktü( $p=0.002$ )(Tablo-8).Mann Whitney testine göre A grubu ile kontrol grubu arasında ve B grubu ile kontrol grubu arasında Ki-67 boyanma skorları açısından anlamlı fark görülmüşken ( $p<0.005$ ); A ve B grupları arasında istatistiksel fark saptanmamıştır ( $p=0.059$ ) (Şekil-7).

**Tablo 8.** Kontrol ve Tedavi Gruplarında Ki-67 ile Boyanma Skor Düzeyleri

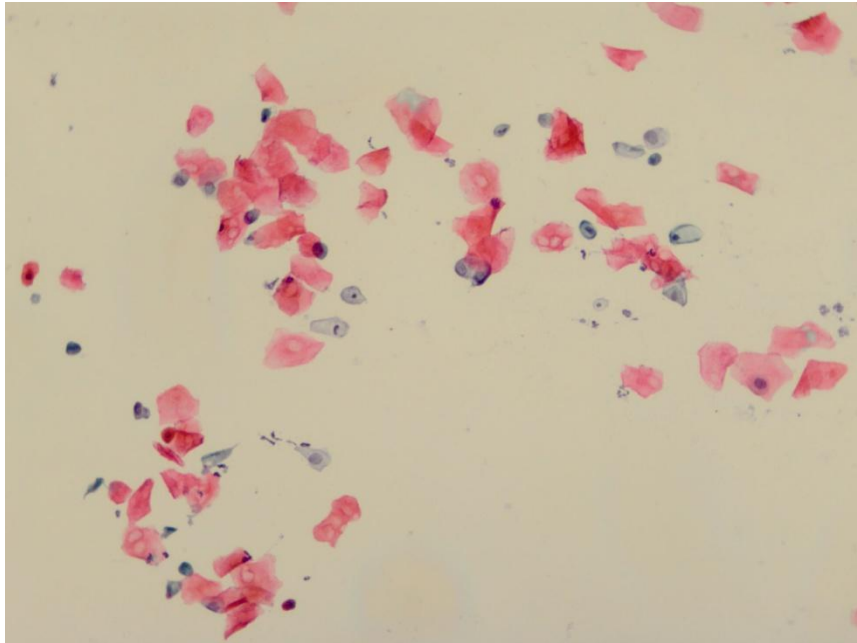
	Gruplar			İstatiksel analiz			
	Grup A ( n=10 )	Grup B ( n=12 )	Grup C ( n=7 )	GrupA vs GrupB	Grup A vs GrupC	Grup B vs GrupC	Group A vs Grup B vs Grup C
Ki-67 ile boyanma Skor (median/IQR)	7.5/10.5	3/6.5	20/ 25	0.059*	0.015*	0.002*	0.002♦

\*Mann-Whitney Test, ♦ Kruskal Wallis Test

Işık mikroskobu altında preparatlar incelendiğinde tedavi grubunda negatif Ki-67 boyanma görülmüşken (Resim 19), kontrol grubunda güçlü boyanma gözlenmiştir (Resim 20).



**Resim 1.** Dişi rattan vajinal smear örneği alma yöntemi.



**Resim 2.** Papanicolaou boyama sonrası smear görüntüsü.



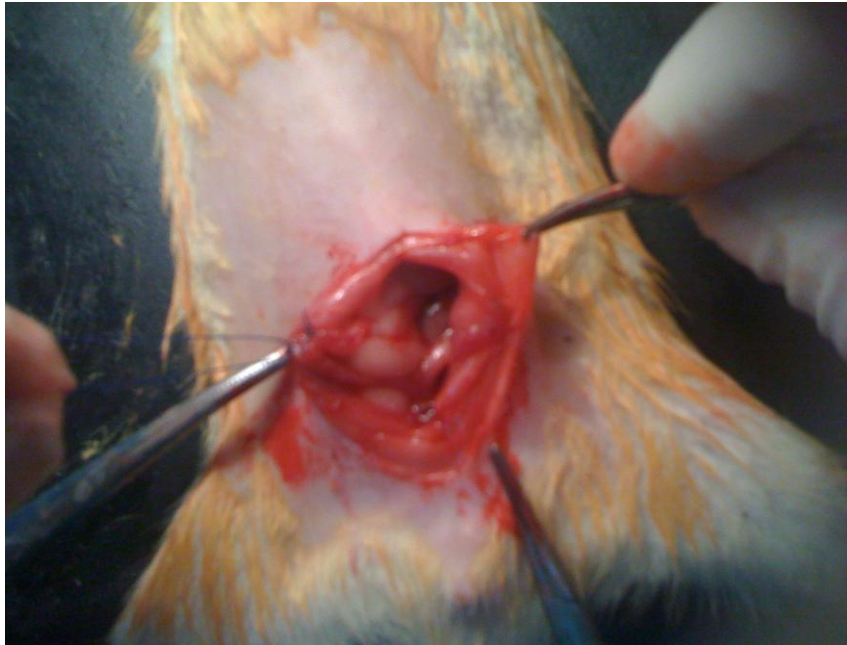
**Resim 3.** Preoperatif hazırlığı tamamlanmış dişi ratın operasyon öncesi görünümü.



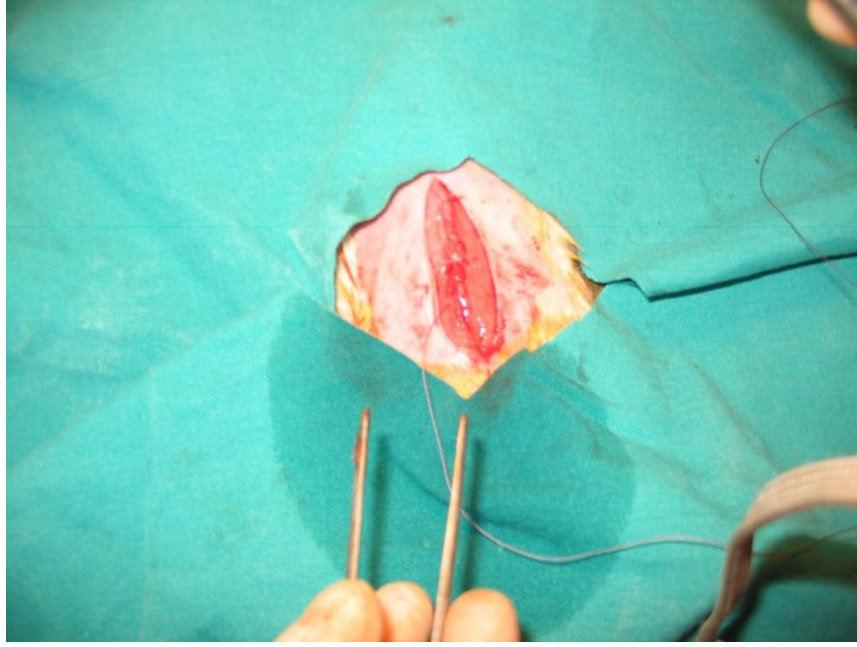
**Resim 4.** Anterior midline abdominal kesi ile batına girilmesi.



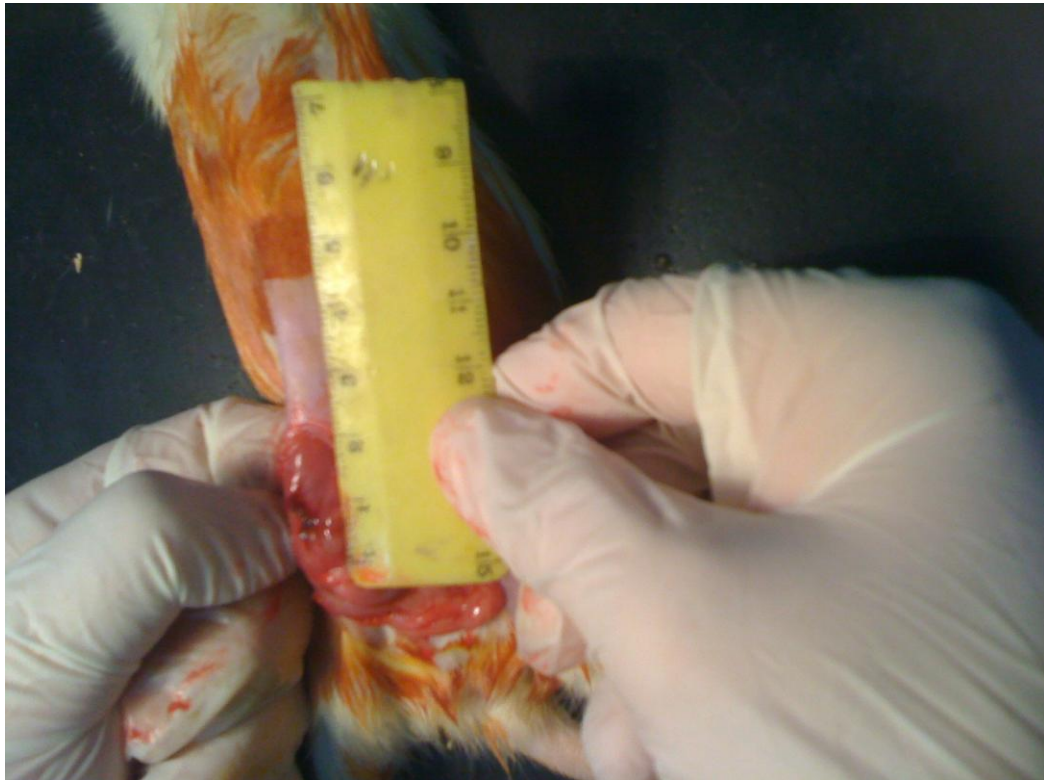
**Resim 5.** Uterin boynuzların tanımlanması.



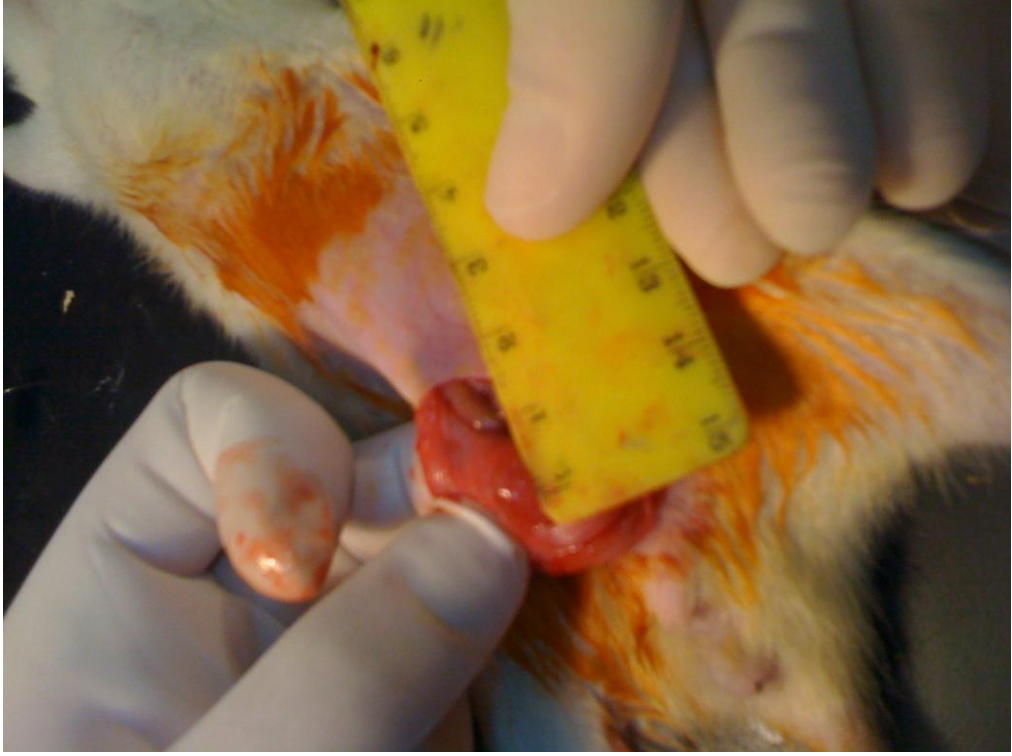
**Resim 6.** Sağ pelvik yan duvara yerleştirilen implantın görünümü



**Resim 7.** Periton, fasya ve cildin kapatılması.



**Resim 8. 4.** Haftada 2. Laparotomi sırasında endometriozis odağının görünümü. Kistik, damarlanma artışı görülen lezyon.



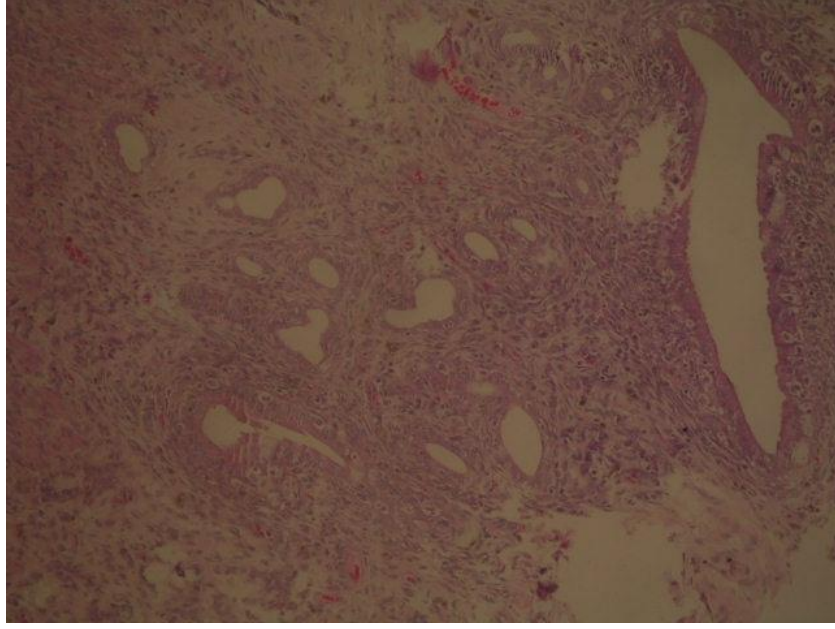
**Resim 9. 2.** Laparotomi sırasında gözlenen implantın boyutunun ölçülmesi



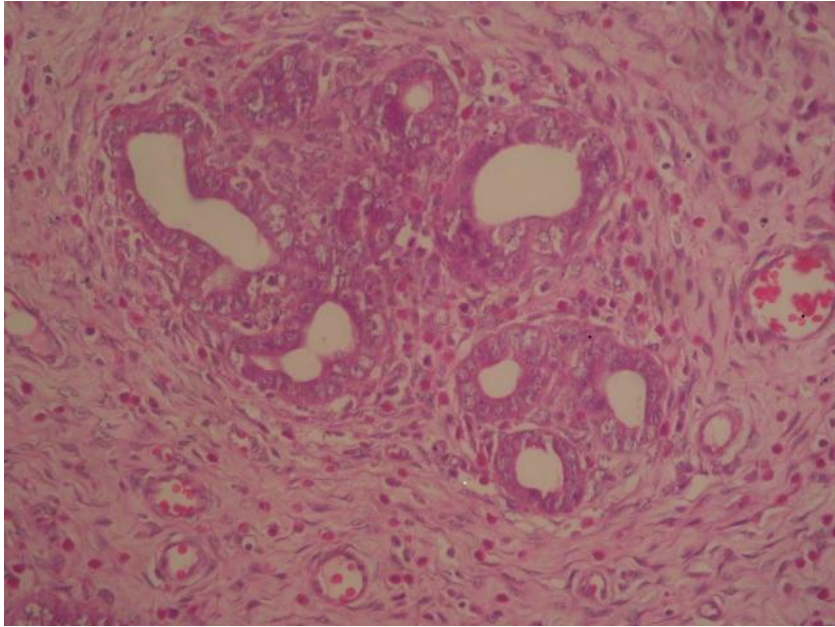
**Resim 10.** A grubu profilaktik tedavi alan grupta implant görünümü. Kontrol ve B grubunun tedavi öncesine göre belirgin küçük, damarlanması azalmış lezyon.



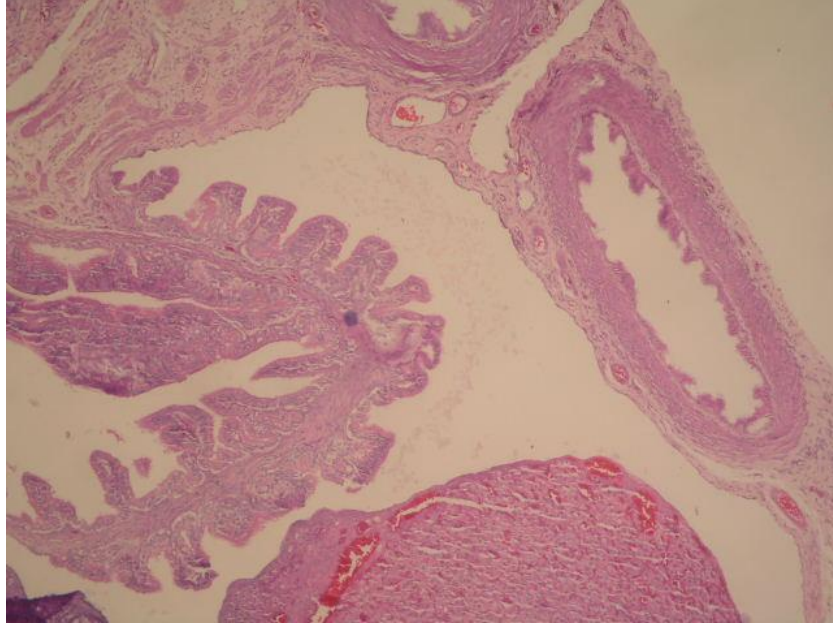
**Resim 11.** B grubu tedavi sonrası lezyon ölçümü. Tedavi öncesine göre lezyon boyutunda belirgin azalma ve lezyonun damarlanmasında azalma gözlenmiştir.



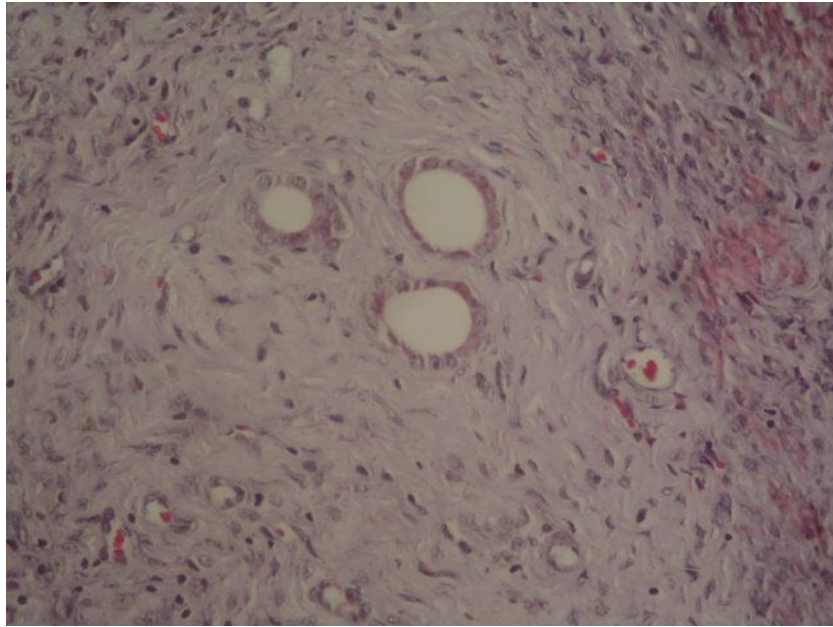
**Resim 12.** Kontrol grubundaki implantın histopatolojik görünümü. 40X, Hematoksilen & Eozin(HE). Endometrium gland ve stromasında oluşan adacıklar ve arada siderofajlar.



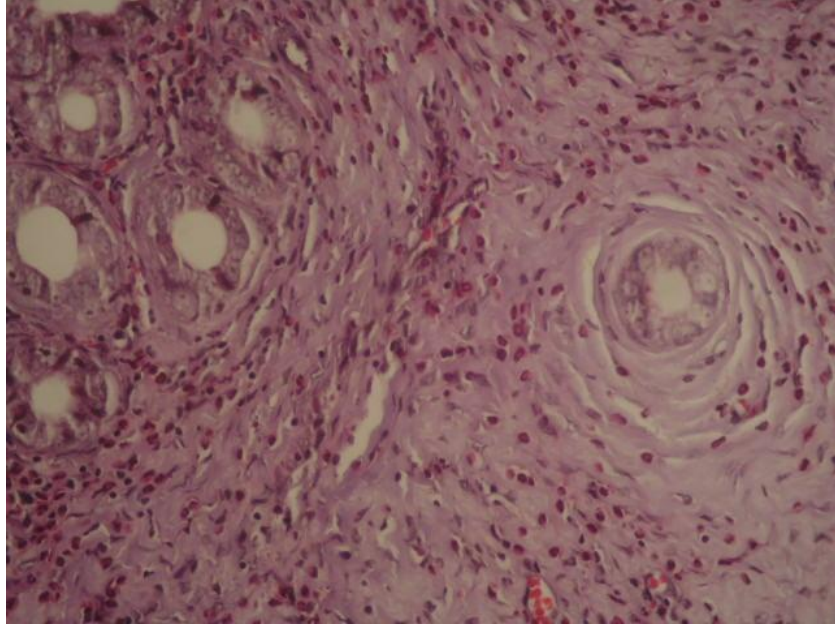
**Resim 13.** Tedavi alan B grubundaki implantın histopatolojik görünümü. 40X, HE. Endometrial gland ve çevresindeki dezmozplastik reaksiyon.



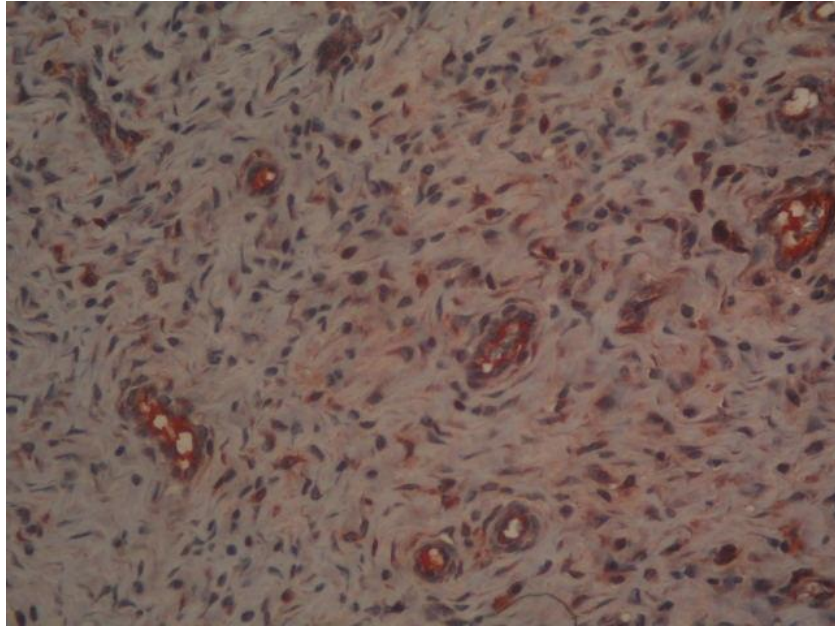
**Resim 14.** Tedavi alan grup B'de over ve tubaların görünümü. 40X HE.  
Tuba ve overlerde ilaca bağılı değişiklik gözlenmedi.



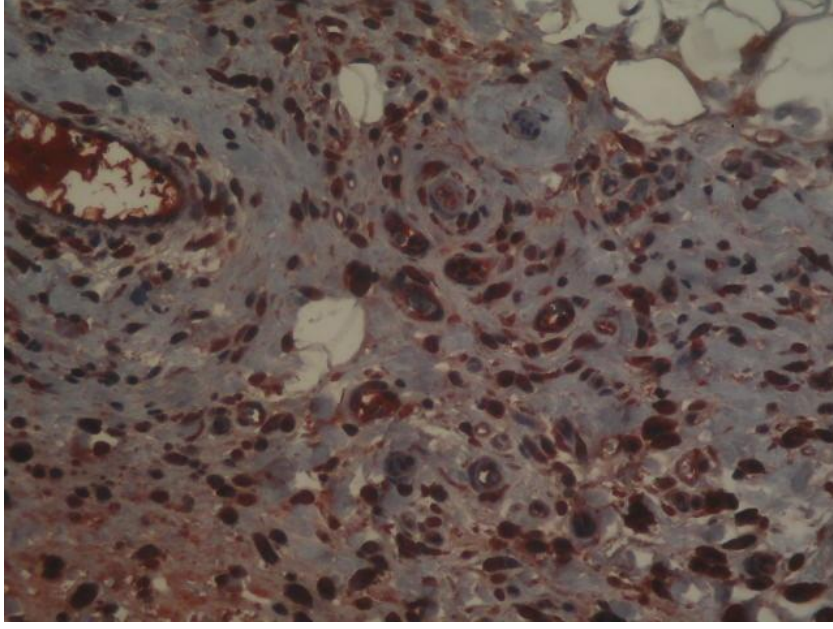
**Resim15.** Tedavi grubunda Masson's Trichrome boyma ile endometriozis çevresinde minimal fibröz doku artışı



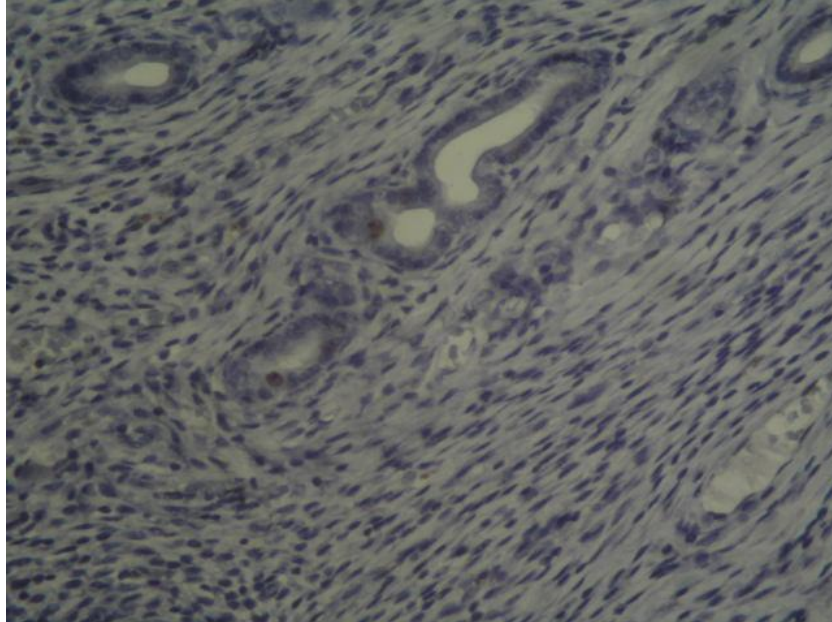
**Resim 16.** Kontrol grubunda Masson's Trichrome boyama ile endometriozis çevresinde yoğun fibröz doku artışı



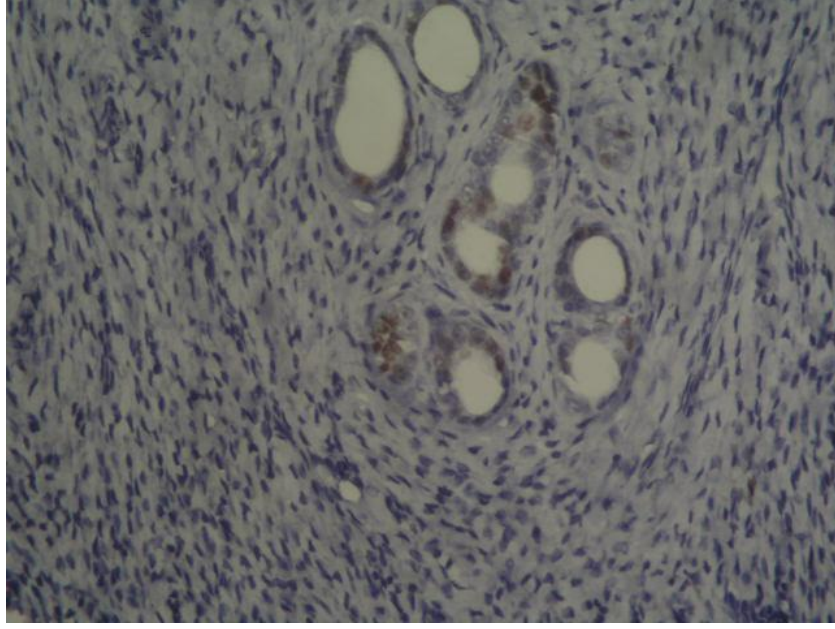
**Resim 17.** Tedavi grubunda VEGFR için immünohistokimyasal olarak zayıf pozitif boyanma gösteren implantın görünümü.



**Resim 18.** Kontrol grubunda VEGFR için immünohistokimyasal olarak güçlü pozitif boyanma gösteren implantın görünümü.



**Resim 19.** Tedavi grubunda Ki-67 için immünohistokimyasal olarak negatif boyanma gösteren implantın görünümü



**Resim 20.** Kontrol grubunda Ki-67 için immünohistokimyasal olarak pozitif boyanma gösteren implantın görünümü

## 5. TARTIŞMA

Endometrioziste kullanılan medikal tedaviler endojen steroid üretimini azaltmaya yöneliktir. Bu tedaviler endometriotik odağı küçültmekle birlikte endometriozisin oluşturduğu ağrıya da etkilidir. Bu hormon tedavilerinin yan etkileri uzun süreli kullanımlarına olanak vermemektedir. Bunun yanında medikal tedaviler kesildikten sonra hastalığın tekrarlama oranı yüksektir ve tedavilerin endometriozis ilişkili infertilite üzerine hiçbir yararı yoktur (183). Endometrioziste geliştirilen yeni tedavi modellerinin yan etkilerinin az olması ve fertilité üzerine negatif etkilerinin olmaması gerekmektedir.

Yeni tedavi modalitelerinin test edilmesinde, endometriosis modeli oluşturulan deneysel çalışmalar çok yararlı birer araçtır. Çünkü etik nedenlerden dolayı bu çalışmaları insanlarda yapmak mümkün olmamaktadır. Bu çalışmada da endometriosis Vernon ve ark. (177) önerdiği şekilde, modifiye edilerek, olog endometrial dokunun peritoneal kaviteye sütüre edilmesi yoluyla indüklenmiştir.

Endometriosisle romatoid artrit, crohn hastalığı, psöriazis gibi otoimmün hastalıklar arasında benzerlikler vardır. Bu benzerlikler TNF- $\alpha$  gibi sitokin seviyelerinde artış, apopitozda bozulma, T ve B lenfositlerde anormallikler gibi durumları içerir. Antiinflamatuvar ve immün modülatör ilaçlar bu otoimmün hastalıklarda kullanım alanı bulmuştur. Bu hastalıklarla endometriosis arasındaki benzerlikler endometriosisde de bu tedavilerin yararlı olabileceğini düşündürmektedir (184).

Transplantasyon teorisine göre endometrium dokusu peritonea ulaştığında buraya yapışmakta olup bu esnada endometriozisin oluşabilmesi için kendisine yeni kan akımını sağlaması gerekir

Kanser dışı hastalıklarda da kontrolsüz anjiogenez tablosu oluşabilmektedir. Bu durumlar; diyabete bağlı körlük ve romatoid artrittir. Son

dönemde çok miktarda anjiogenez faktörü belirlenmiş olup bunlar; asidik ve bazik fibroblast büyüme faktörü (FGF-a, FGF-b), plateletten elde edilmiş endotelial hücre büyüme faktörü (PDEC GF), transforme edici büyüme faktörü -a ve -b (TGF-a, TGF- b), tümör nekroze edici faktör-a (TNF-a) ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) olarak sıralanabilir (1).

VEGF anjiogenezin güçlü ve spesifik bir uyarıcısı olup en az 4 izoformu bulunan bir peptittir. Vasküler endotelial büyüme faktörü , heparin bağlayan glikoprotein yapısında olup güçlü anjiogenik özellik, endotel hücrelerine spesifik mitojenik ve vasküler permeabilite üzerinde işlev ve görevleri vardır. VEGF ayrıca insan endometriyumunda da tesbit edilmiş olup buradaki fizyolojik ve patolojik anjiogenezde rol alır. Yapılan çalışmalarda ağır-orta endometriozisi olan bayanlarda normal bireylere göre VEGF düzeyinin arttığı saptanmıştır (2, 3). VEGF ekspresyonunun endometrium dokusunda sınırlı olduğu ve stroma dışında yayılmış makrofajlara özgün olduğu gösterilmiştir. Başka çalışmalarda ise VEGF aktivitesi hem normal hem de ektopik endometrium dokusunda saptanmıştır (4).

Sonuç olarak endometriozisde VEGF'ün yadsınamaz bir rolü olduğu bilinmektedir. Bu molekülün inhibisyonu endometriosisin gelişiminin engellenmesinde bir basamak olabilir. Bu amaçla endostatin, TNP-470, celecoxib, rosiglitazon gibi anjiogenezis inhibitörleri kullanılmış ve endometriotik lezyonların sayı ve boyutunda azalma saptanmıştır (163).

Daniel Escorsim Machado ve ark. siklooksijenaz-2 inhibitörü olan parecoxib'in antianjiogenik etkiyle rat modelinde endometrial dokuların gerilediğini göstermiştir(185).

Jiang HQ ve ark. ciddi immün yetmezliği olan farelere endometriosisli bayanlardan alınan endometrium dokusu implante edilmiştir ve iki hafta sonra çalışma grubuna rekombinan insan endostatini 2mg/kg/gün intraperitoneal verilmiş ,kontrol grubuna ise salin verilmiş. 14 günlük tedavi sonunda lezyon hacimleri ve VEGF ekspresyonuna bakılmış.Rekombinan

insan endostatini alan grupta lezyonların gerilediği ve VEGF ekspresyonunda azalma olduğu gözlenmiş (186).

H. XU ve ark. yeşil çayda bulunan katesin(askorbik aside dirençli skorbüt olgularında etkili madde) maddesinin farelerdeki endometriosis modelinde antianjiojenik etkisi çalışılmış ve katesin maddesi alanlarda kontrol grubuna göre endometriotik lezyonların istatistiksel olarak anlamlı az olduğu izlenmiştir(187).

Biz de bu çalışmamızda endometriozisi önleme ve tedavi etme amacıyla bir anti-VEGF olan bevacizumabı kullandık. Bevacizumab, insan vasküler endotelial büyüme faktörüne (VEGF) spesifik olarak bağlanan ve biyolojik aktivitesini nötralize eden bir rekombinant insan monoklonal antikordur. Bevacizumab VEGF'nin, endotelial hücreleri yüzeyindeki Flt-1 ve KDR reseptörlerine bağlanmasını inhibe eder. VEGF'nin biyolojik aktivitesini nötralize ederek tümörlerin damarlanmalarını ve dolayısı ile tümörlerin büyümelerini yavaşlatır. Bevacizumab veya bevacizumabın parenteral mürin antikorlarının immün sistemi baskılanmış fare ksenotransplant kanser modellerine uygulanması, kolon, meme, pankreas ve prostat kanserleri dahil olmak üzere insan kanserlerinde yaygın bir anti-tümör aktiviteyi meydana getirmiştir. Metastatik hastalığın ilerlemesi inhibe edilmiş ve mikrovasküler geçirgenlik azaltılmıştır.

Higgins B ve ark. farelerde oluşturulan meme adenokarsinom modelinde capecitabin ve bevacizumab etkinliğini çalışmışlar ve bu iki ilaç beraber kullanıldığında bevacizumabın(5mg/kg intraperitoneal) anti-VEGF etkinliğiyle capecitabinin tek kullanımına göre etkinliğini arttırdığı ve kombine tedavi alan grupta tümörün büyümesinin durdurulmasında ve yaşam süresini uzatmada tek tedaviye göre üstün olduğu bulunmuştur(188)

Huynh H ve ark. yine immün yetmezliği olan farelerde oluşturulan peritoneal over kanserinde bevacizumab ve rapamycinin beraber kullanıldığında anti-VEGF etkiyle tümör boyutunu ciddi boyutta küçülttüğünü

ve bu kombine tedavinin over kanseri ve metastazı önlemede yeni bir yaklaşım olacağını söylemiştir(189).

Ninomiya S ve ark. farelere insan mide kanser hücre dizisi MKN-45P'yi enjekte ederek peritoneal metastaz modeli oluşturduktan sonra intraperitoneal bevacizumab (0.1 mg/100µL) vermişler. Karın çevresi, asit hacmi ve peritoneal tümör sayı ve hacmi ölçülmüş ve bütün ölçümlerde tedavi alan grupta kontrole göre ciddi azalma görülmüş. Ayrıca immünohistokimyasal olarak periton metastazlarının CD-31 işaretli analizinde tedavi alan grupta daha az damarsal alan olduğu gözlenmiş (190).

Kanser tedavisi dışında bevacizumab gözde vaskülarizasyonu azaltmak için yaygın kullanılmaktadır. Kim TI ve ark. tavşan kornealarında epitelyal yara iyileşmesindeki etkileri karşılaştırmak amacıyla tavşan korneaları çizildikten sonra 0, 0.5,1.0, 1.25, 1.5,2.5, veya 5 mg /mL dozunda bevacizumab günde iki kez topikal verilmiştir.1.0 mg/mL veya daha yüksek dozda bevacizumab alan gruplardaki tavşan korneal epitelin anjiogenezin inhibisyonuna bağlı azaldığı görülmüştür(191).

Lee SY ve ark. Bevacizumabın retinoblastomada anjiogenez üzerinde Y-79 insan retinoblastoma hücre dizisi farelere transplante edilmiş ve daha sonra bevacizumab ile tedavi edilmiş. Tümoral dokudaki damar yoğunluğu CD34 immunohistokimyasal boyamayla bakılmış. Bevacizumab alan grupta kontrol grubuna göre damar yoğunluğunda %50 azalma saptanmış ve tedavi alan grupta böylece tümör ağırlığı ve yoğunluğunun azaldığı gösterilmiş ki bu da retinoblastoma tedavisinde anti-VEGF olan bevacizumabın etkili olduğu gösterilmiş (192).

Biz de çalışmamızda daha önce endometriozis tedavisinde kullanılmamış olan VEGF inhibitörü bevacizumabın (Altuzan®) etkinliğini göstermek amacıyla ratlara odak oluşmadan ve oluşuktan sonra 1.25 mg(0.05 ml) bevacizumab tedavisi verdik. Tedavi dozu için literatürdeki deneysel çalışmalarda daha önceden verilen lokal tedavi dozları alındı(188,191,193). Bu lokal tedavi dozu insanlarda gözde yapılan

çalışmalardaki dozla eşdir. Fakat rat yüzey alanı insanınkinden çok daha düşük olduğundan insanlarda endometriozis tedavisi için kullanılırsa bevacizumab dozu sulandırılarak verilmelidir. Bu tedavi dozu lokal tedavide güvenilir düşük doz etkin tedavi dozudur. Sakurai K ve ark.(194) maymun gözüne genelde kullanılan 1.25 mg dozunun 10 katı verdikleri halde patolojik değişiklik olmadığını savunsalar da bizim çalışmamızda 1.25 mg bevacizumab tedavisi endometriozis odakların gerilemesi için yeterli olmuştur.Daha önce yapılan göz çalışmalarında bevacizumab intravitreal ve kanser çalışmalarında intraperitoneal verilmiştir(193,188). Bevacizumabın daha önceden yapılan çalışmalarda adult hastalarda sistemik kullanımda; hipertansiyon, burun kanaması, proteinüri, nötropeni, diyare, tromboz, hayvan fetuslarında iskelet deformiteleri ve düşük fetal ağırlık gibi yan etkileri bilinmektedir(195,196).Fakat lokal bevacizumab kullanılan çalışmalarda bu yan etkiler izlenmemiştir(188,191). Bizim çalışmamızda da bevacizumab intraperitoneal olarak verilerek yan etkilerinden kaçınılmıştır.

Çalışmamızda tedavi gruplarında kontrol grubuna göre lezyon volümleri anlamlı derecede daha düşüktü. Özellikle odak oluşmadan önce profilaktik amaçlı tedavi verilen grupta bu fark daha belirgindi. Tedavi verilen gruplarda histolojik skor değerleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşüktü. Yine endometriotik odaklar etrafındaki fibrozisi göstermek amacıyla yapılan trikrom boyama sonucu skorları da kontrol grubuna göre tedavi gruplarında endometriozis odağı çevresindeki fibrozisin belirgin az olduğunu gösterdi.Özellikle tedavinin profilaktik verilmesi endometiozis çevresinde fibrosis oluşumu çok daha belirgin azalttı. Bu bulgumuz daha önce endometiroziste trikrom boyama ile ilgili çalışmaların sonuçlarıyla benzerdi(180). Kontrol ve tedavi gruplarında immünohistokimyasal yöntem kullanılarak ektopik dokuda VEGFR düzeyleri değerlendirildi. Boyanmanın derecesine göre skor verilerek gruplar karşılaştırıldı ve tedavi alan gruplarda VEGF skor değerleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşüktü. Ayrıca endometriotik odaklarda hücre proliferasyonu Ki-67 ile çalışıldı ve sonuçlar skorlandı. Yine tedavi alan gruplarda kontrole göre skorlar anlamlı

düşüktü. Bu da gösteriyor ki bevacizumab etken maddeli ilaç VEGFR blokajı yoluyla endometriozisin gelişimini etkin bir şekilde engellemektedir.

Sonuç olarak; son yıllarda immünolojik faktörler endometriozisin patogeneğinde üzerinde en çok durulan konulardandır. Endometriotik lezyondaki VEGF ekspresyonu neovaskülarizasyon mekanizmasını sağlar (110).Bu yüzden anti-VEGF tedaviler eksperimental olarak rat,tavşan ve maymunlarda çalışılmaktadır. Bizim çalışmamız ratlarda deneysel olarak oluşturulan endometriozis modelinde anti-VEGF olan bevacizumab (Avastin®)ın endometriozisteki hem profilaktik hem de tedavi edici etkisini morfolojik, histopatolojik, immünhistokimyasal olarak gösteren ilk çalışmadır. Bu çalışma başka deneysel çalışmalarla desteklendikten sonra insanlarda endometriozis tedavisinde kullanılabilir.

## 6. ÖZET

### Giriş ve Amaç

Bevacizumab, insan vasküler endotelyal büyüme faktörüne (VEGF) spesifik olarak bağlanan ve biyolojik aktivitesini nötralize eden bir rekombinant hümanize monoklonal antikordur. Bu çalışmanın amacı ratlarda eksperimental olarak endometriozis oluşturmak ve oluşturulan endometriozis implantı üzerine bevacizumabın (VEGF inhibitörü) profilaktik ve tedavi edici etkisini histopatolojik ve immün histokimyasal olarak araştırmaktır.

### Gereç ve Yöntem

Bu randomize, plasebo kontrollü, rat eksperimental araştırma Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Deney Hayvanları Labartuarında gerçekleştirilmiştir. Araştırma için 36 adet Wistar Albino türü dişi rat kullanılmıştır. Otolog endometrium dokunun sağ pelvik yan duvara implante edilmesiyle ratlarda endometriosis oluşturuldu. Ratlar random olarak üç gruba ayrıldı. A grubuna ilk operasyon sırasında 0.05ml(1.25 mg) bevasizumab (Altuzan®) intraperitoneal verildi.4 hafta iyileşme periodundan sonra endometriozis odakları ikinci laparotomiyle değerlendirildi.2 rat A grubundan 5 rat kontrol grubundan kayıp oldu. Bütün gruplarda endometriozis odaklarının hacimleri ölçüldü. A ve kontrol grubu endometriotik odaklar çevre dokuyla birlikte histolojik ve immünohistokimyasal inceleme için çıkarılarak patolojiye gönderildi. B grubu ratlara da yine 0.05 ml(1.25mg) bevasizumab intraperitoneal verilerek 4 hafta sonra değerlendirildi.B grubunda oluşan endometriozis odakların hacimleri ölçüldü,odaklar çıkarılarak patolojiye gönderildi. Histopatolojik skor epitelyal tabakanın korunması esasına göre değerlendirildi. Ayrıca endometriozis odakları çevresindeki fibrozis dokusu Masson's trikrom boyama ile değerlendirildi. Fibrozis derecesine göre skorlama yapıldı. Her üç grupta ektopik endometrial dokuda VEGFR(Vasküler Endothelial Growth Faktör) için ve KI-67 için

immünohistokimyasal inceleme yapıldı. Ektopik dokuda reseptör için immün boyanmanın derecesine göre skorlama yapıldı.

## **Bulgular**

Mann Whitney U testi ve Kruskal-Wallis testiyle veriler değerlendirildi. Profilaktik amaçlı tedavi alan grup ile kontrol grubu lezyon hacimleri karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre lezyon hacimlerinin profilaktik tedavi alan grupta anlamlı olarak düşük olduğu saptandı( $p<0.05$ ). Ayrıca endometriotik odak oluştuktan sonra tedavi alan B grubu lezyon hacimleri de tedavi öncesine göre belirgin azaldı( $p<0.05$ ).Bevacizumab endometrial lezyonların gerilemesine ve atrofisine neden oldu.Histolojik, trikrom ve immünohistokimyasal skorlarda gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark mevcuttu( $p<0.05$ ).Tedavi sonrası profilaktik tedavi alan A grubunda kontrol grubuna göre; sonradan tedavi alan B grubunda da tedavi öncesine ve kontrol grubuna göre skorlar belirgin olarak azalmıştı( $p<0.05$ ).

## **Sonuç**

Bevacizumab, endometriotik odakların hacmini küçültüyor, histopatolojik özellikleri geriletıyor. Endometriotik odakların gerileyip atrofiye uğramasına neden oluyor.Bu da endometriozis patogenezinde VEGF'in önemli rolünü ve anti-VEGF olan bevacizumab'ın endometriozis profilaksi ve tedavisinde yararlı olduğunu gösteriyor.

**Anahtar kelimeler:** Endometriozis, anti-VEGF, bevacizumab, rat model.

## 7. ABSTRACT

### Objective

Bevacizumab is a recombinant humanized monoclonal antibody which binds specifically to vascular endothelial growth factor (VEGF) and neutralizes its biological activity. The aim of this study is to investigate the efficacy of anti-VEGF therapy (bevacizumab, Altuzan®) on prophylactic and therapeutic treatment of endometriotic foci in the rat endometriosis model by using histopathologic and immunohistochemical assays.

### Study Design

This randomized, placebo-controlled, rat experimental study was executed in the Experimental Surgery Laboratory at Ankara Education and Research Hospital. The study was performed on 36 Wistar female rats. Experimental endometriosis was constituted with implantation of autologous endometrial tissue to the right side of the pelvic wall. Rats were divided randomly into 3 groups. 0.05ml (1.25 mg) bevacizumab (Altuzan®) by intraperitoneal route was given to Group A in the first operation. After four weeks, the implants were examined by second laparotomy, two rats from Group A and five rats from Group C were died. The volumes and properties of the implants of each group were evaluated. Rats in Group A and Group C were killed and the endometriotic foci with surrounding normal tissue were extracted for the histopathologic and immunohistochemical evaluation and sent pathology. 0.05ml (1.25 mg) bevacizumab (Altuzan®) by intraperitoneal route was given also to Group B and after 4 weeks third laparotomy was done to Group B. Again rats were killed and implants were examined, volumes are evaluated and endometriotic foci were extracted for histopathologic and immunohistochemical evaluation. A scoring system was used to evaluate preservation of epithelia. Also the fibrosis around the endometriotic foci was evaluated by Masson's Trichrome stain. A scoring

system was used to evaluate the degree of fibrosis. In addition, endometrial explants were evaluated immunohistochemically for VEGFR and Ki-67. A scoring system was used to evaluate expression grade of VEGFR and Ki-67 in endometriotic lesions.

## **Results**

Mann Whitney U test and Kruskal-Wallis tests were used for statistical evaluation of results. The volumes of lesions were smaller in prophylactic treated group than the ones in the control group and this was statistically significant ( $p < 0.05$ ). Also the volumes of endometriotic foci in Group B, in which rats were treated after the endometriotic foci exists, were smaller than the ones in the control group and this was statistically significant also ( $p < 0.05$ ). Bevacizumab causes regression and atrophy of the endometriotic lesions. There were significant differences among the groups in histopathological, trichrome and immunohistochemical parameters ( $p < 0.05$ ). After treatment, the scores in prophylactic treated Group A were less than the ones in control and also the scores in Group B were less than the ones in the same group before treatment and also the ones in control.

## **Conclusion**

Bevacizumab treatment was seen to have effect on the volumes and histopathological structure of endometriotic implants. Bevacizumab causes regression and atrophy of the endometriotic lesions. This also shows that vascular endothelial growth factor has an important role in the pathogenesis of endometriosis and anti-VEGF bevacizumab is beneficial in the prophylaxis and treatment of endometriosis.

**Key Words:** Endometriosis, anti-VEGF, bevacizumab, rat model.

## 8. KAYNAKLAR

- 1- Donnez J, Smoes D, Gillerot S, Casanas-Roux F, Nisolle M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis. *Human Repr.*1998;13:1686-90.
- 2- McLaren, J., Prentice, A., Charnock-Jones, D.S. *et al.* (1996a) Vascular endothelial growth factor is produced by peritoneal fluid macrophages in endometriosis and is regulated by ovarian steroids. *J. Clin. Invest.*, 98, 482–489.
- 3- Abramov, Y., Barak, V., Nisman, B. and Schenker, J.G. (1997) Vascular endothelial growth factor plasma levels correlate to the clinical picture in severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil. Steril.*, 67, 261–265.
- 4- Shifren, J.L., Tseng, J.F., Zaloudek, C.J. *et al.* (1996) Ovarian steroid regulation of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: implications for angiogenesis during the menstrual cycle and in the pathogenesis of endometriosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 81, 3112–3118.
- 5- Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* 1925; 14: 422.
- 6- Cramer DW, Missmer SA. The epidemiology of endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 955: 11-22.
- 7- Simpson JL, Elias S, Malinak LR, *et al.* Heritable aspects of endometriosis. 1. genetic studies. *Am J Obstet Gynecol* 1980; 137: 325.
- 8- Klinik Jinekolojik Endokrinoloji ve İnfertilite. 7. Baskı Leon Speroff ve Marc A. Fritz. Güneş Tıp Kitapevleri, Ankara, 2007.
- 9- Halme J, Becker W, Wing R. Accentuated cyclic activation of peritoneal macrophages in patients with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1984; 148: 85.

- 10- Liu DTY, Hitchcock A. Endometriosis: its association with retrograde menstruation, dysmenorrhea, and tubal pathology. *BrJ Obst Gynaecol* 1986; 93: 859.
- 11- Blumenkrantz MJ, Gallagher N, Bashore RA, Tenckhoff H. Retrograde menstruation in women undergoing chronic peritoneal dialysis. *Obstet Gynecol* 1981; 57: 667.
- 12- Kruitwagen RFPM, Poels LG, Willemsen WNP, Jap PHK, Thomas CMG, Rolland R. Endometrial epithelial cells in peritoneal fluid during the follicular phase. *Fertil Steril* 1991; 55: 297.
- 13- Palmer JR, Driscoll SG, Rosenberg L, Berkowitz RS, Lurain JR, Soper J, Twiggs LB, Gershenson DM, Kohorn EI, Berman M, Shapiro S, Rao RS. Oral contraceptive use and risk of gestational trophoblastic tumors. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 635.
- 14- Geraedts JP, Harper J, Braude P, Sermon K, Veiga A, Gianaroli L, Agan N, Munne S, Gitlin S, Blenow E, de Boer K, Hussey N, Traeger-Synodinos J, Lee SH, Viville S, Krey L, Ray P, Emilliani S, Liu YH, Vermeulen S, Kanavakis E. Preimplantation genetic diagnosis (PGD), a collaborative activity of clinical genetic departments and IVF centers. *Prenat Diagn* 2001; 21: 1086.
- 15- Olive DL, Henderson DY. Endometriosis and mullerian anomalies. *Obstet Gynecol* 1987; 69: 412.
- 16- Cramer DW, Wilson E, Stillman JR, Berger MJ, Belisle S, Schiff I, Albrecht B, Gibson M, Stadel BW, Schoenbaum SC. The relation of endometriosis to menstrual characteristics, smoking and exercise. *JAMA* 1986; 355: 1904.
- 17- Darrow SL, Vena JE, Batt RE, Zielezny MA, Michalek AM, Selman S. Menstrual cycle characteristics and the risk of endometriosis. *Epidemiology* 1993; 4: 135.
- 18- Jenkins S, Olive DL, Haney AF. Endometriosis, pathogenic implications of the anatomic distribution. *Obstet Gynecol* 1986; 67: 335.

- 19- Ishimura T, Masuzaki H. Peritoneal endometriosis: endometrial tissue implantation as its primary etiologic mechanism. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165: 210.
- 20- Gruppos Italiano per lo Studio Dell'Endometriosi. Prevalance anatomical distribution of endometriosis in women with selected gynaecological conditions: results from a multicenter Italian study. *Hum Reprod* 1994; 9: 1158.
- 21- D'Hooghe TM, Bambra CS, Raeymaekers BM, De Jonge I, Lauweryns JM, Koninckx PR. Intrapelvic injection of menstrual endometrium causes endometriosis in baboons. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 173: 125.
- 22- Clark AH. Endometriosis in a young girl. *JAMA* 1948; 136: 690.
- 23- El-Mahgoub S, Yaseen S. A positive proof for the theory of coelomic metaplasia. *Am J Obstet Gynecol* 1980; 137: 137.
- 24- Suginami H. A reappraisal of the coelomic metaplasia theory by reviewing endometriosis occurring in unusual sites and instances. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165: 214.
- 25- Olikier AJ, Harris AE. Endometriosis of the bladder in a male patient. *J Urol* 1971; 106: 858.
- 26- Schifrin BS, Erez S, Moore JG. Teen-age endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1973; 116: 973.
- 27- Foster DC, Stern JL, Buscema J, Rock JA, Woodruff JD. Pleural and parenchymal pulmonary endometriosis. *Obstet Gynecol* 1981; 58: 552.
- 28- Das Gupta S, Pal SK, Saha PK, Dawn CS. Endometriosis in the thumb. *J Indian Med Assoc* 1985; 83: 122.
- 29- Gitelis S, Petasnick JP, Turner DA, Ghiselli RW, Miller AW. Endometriosis simulating a soft tissue tumor of the thigh: CT and MR evaluation. *J Comput Assist Tomogr* 1985; 9 :573.

- 30- Patel VC, Samuels H, Abeles E, Hirjibehedin PF. Endometriosis at the knee. A case report. *Clin Orthop* 1982; 171: 140.
- 31- Fujii S. Secondary mullerian system and endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165: 219.
- 32- Schrodt GR, Ibanez J. Endometriosis of the male urinary system: a case report. *J Urol* 1980; 124: 722.
- 33- Martin JD, Hauck AE, Endometriosis in the male. *Am Surg* 1985; 51: 426.
- 34- Matsuura K, Ohtake H, Katabuchi H, Okamura H. Coelomic metaplasia theory of endometriosis: evidence from in vivo studies and an in vitro experimental model. *Gynecol Obstet Invest* 1999; 47(1): 18.
- 35- Ueki M. Histologic study of endometriosis and examination of lymphatic drainage in and from the uterus. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165: 201.
- 36- Ichimiya M, Hirota T, Muto M. Intralymphatic embolic cells with cutaneous endometriosis in the umbilicus. *J Dermatol* 1998; 25: 333.
- 37- Moore JG, Binstock MA, Growdon WA. The clinical implications of retroperitoneal endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 158: 1291.
- 38- Taff L, Jones S. Cesarean scar endometriosis. A report of two cases. *J Reprod Med* 2002; 47: 50.
- 39- Kanellos I, Kelpis T, Zaraboukas T, Betsis D. Perineal endometriosis in episiotomy scar with anal sphincter involvement. *Tech Coloproctol* 2001; 5: 107.
- 40- Liu DTY, Hitchcock A. Endometriosis: its association with retrograde menstruation, dysmenorrhea and tubal pathology. *Br J Obstet Gynaecol* 1986; 93: 859.
- 41- Halme J, Hammond MG, Hulka JF, Raj SG, Talbert L. Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstet Gynecol* 1984; 64: 151– 4.

- 42- Oosterlynck DJ, Cornillie FJ, Waer M, Vandeputte M, Koninckx PR. Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium. *Fertil Steril* 1991;56 :45– 51.
- 43- Dmowski WP, Steele RW, Gaker GF. Deficient cellular immunity in endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1981; 141: 377– 83.
- 44- Steele RW, Dmoswki WP, Marmer DJ. Immunologic aspects of human endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 1984; 6: 33– 6.
- 45- Badaway SZ, Cuenca V, Stitzel A, Tice D. Immune rosettes of T and B lymphocytes in infertile women with endometriosis. *J Reprod Med* 1987; 32: 194 – 7.
- 46- Gleicher N, Dmowski WP, Siegel I, Liu TL, Friberg J, Radwansea E, et al. Lymphocyte subsets in endometriosis. *Obstet Gynecol* 1984; 63: 463– 6.
- 47- Hill JA, Faris HM, Schiff I, Anderson DJ. Characterization of leukocyte subpopulations in the peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertil Steril* 1988; 50: 216 – 22.
- 48- Dmowski WP, Gebel HM, Braun DP. The role of cell-mediated immunity in pathogenesis of endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl* 1994; 159: 7– 14.
- 49- Witz CA, Montoya IA, Dey TD, Schenken RS. Characterization of lymphocyte subpopulations and T cell activation ind endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 1994; 32: 173– 9.
- 50- Mettler L, Volkov NI, Kulakov VI, Jurgenson A, Parwaresch MR. Lymphocyte subsets in the endometrium of patients with endometriosis throughout the menstrual cycle. *Am J Reprod Immunol* 1996; 36: 342– 9.
- 51- Wilson TJ, Hertzog PJ, Angus D, Munnery L, Wood EC, Kola I. Decreased natural killer cell activity in endometriosis patients: relationship to disease pathogenesis. *Fertil Steril* 1994; 62: 1086–8.

- 52- Ho HN, Chao KH, Chen HF, Wu MY, Yang YS, Lee TY. Peritoneal natural killer cytotoxicity and CD251CD31 lymphocyte subpopulation are decreased in women with stage III-IV endometriosis. *Hum Reprod* 1995; 10: 2671– 5.
- 53- Hsu C, Lin Y, Wang S, Huang K. Immunomodulation in women with endometriosis receiving GnRH agonist. *Obstet Gynecol* 1997; 89: 993– 8.
- 54- Kanzaki H, Sheng-Wang HS, Kariya M, Mori T. Suppression of natural killer cell activity by sera from patients with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 167: 257– 61.
- 55- Oosterlynck KD, Meuleman C, Waer M, Koninckx PR, Vandeputte M. Immunosuppressive activity of peritoneal fluid in women with endometriosis. *Obstet Gynecol* 1993; 82: 206 – 12.
- 56- Zeller JM, Henig I, Radwanska E, Dmowski WP. Enhancement of human monocyte and peritoneal macrophage chemiluminescence activities in women with endometriosis. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1987; 13: 78– 82.
- 57- Haney AF, Muscato JJ, Weinberg JB. Peritoneal fluid cell populations in infertility patients. *Fertil Steril* 1981; 35: 696– 8.
- 58- Halme J, Becker S, Hammond MG, Raj S. Pelvic macrophages in normal and infertile women: the role of patent tubes. *AmJ Obstet Gynecol* 1982; 142: 890-5.
- 59- Halme J, Becker S, Wing R. Accentuated cyclic activation of peritoneal macrophages in patients with endometriosis. *AmJ Obstet Gynecol* 1984; 148: 85-90.
- 60- Halme J, Becker S, Haskill S. Altered maturation and function of peritoneal macrophages: possible role in the pathogenesis of endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1987; 156: 783– 9.

- 61- Dunselman GAJ, Hendrix MGR, Bouckaert PXJ, Evers JLH. Functional aspects of peritoneal macrophages in endometriosis of women. *J Reprod Fertil* 1988; 82: 707– 10.
- 62- Hammond MG, Oh ST, Anners J, Surrey ES, Halme J. The effect of growth factors on the proliferation of human endometrial stromal cells in culture. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 168: 1131– 6.
- 63- Iwabe T, Harada T, Tsudo T, Nagano Y, Yoshida S, Tanikawa M, et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  promotes proliferation of endometriotic stromal cells by inducing interleukin- 8 gene and protein expression. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 824 – 9.
- 64- Zhang RJ, Wild RA, Ojago JM. Effect of TNF- $\alpha$  on adhesion of human endometrial stromal cells to peritoneal mesothelial cells: an in vitro system. *Fertil Steril* 1993; 59: 1196 –201.
- 65- Osteen KG, Keller NR, Feltus FA, Melner MH. Paracrine regulation of matrix metalloproteinase expression in the normal endometrium. *Gynecol Obstet Invest* 1999; 48(suppl 1): 2– 13.
- 66- Taylor RN, Ryan IP, Moore ES, Hornung D, Shifren JL, Tseng JF. Angiogenesis and macrophage activation in endometriosis. *Ann NY Acad Sci* 1997; 828: 194 – 207.
- 67- Startseva NV. Clinical immunological aspects of genital endometriosis. *Akush Ginekol (Mosk)* 1980; 3: 23– 6.
- 68- Weed JC, Arquembourg PC. Endometriosis: can it produce an autoimmune response resulting in infertility? *Clin Obstet Gynecol* 1980; 23: 885– 93.
- 69- Mathur S, Peress MR, Williamson HO, Youmans CD, Manye SA, Garvin AJ, et al. Autoimmunity to endometrium and ovary in endometriosis. *Clin Exp Immunol* 1982; 50: 259– 66.
- 70- Meek SC, Hodge DD, Musich JR. Autoimmunity in infertility patients with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 158: 1365– 73.

- 71- Switchenko AC, Kauffman RS, Becker M. Are there antiendometrial antibodies in sera of women with endometriosis? *Fertil Steril* 1991; 56: 235– 41.
- 72- Gleicher N, el-Roeiy A, Confino E, Friberg J. Is endometriosis an autoimmune disease? *Obstet Gynecol* 1987; 70: 115– 22.
- 73- Muse K. Endometriosis and infertility. In: Wilson E, ed. *Endometriosis*. New York: Alan R. Liss, Inc., 1987: 91– 110.,
- 74- Nothnick WB: Treating endometriosis as an autoimmune disease. *Fertil Steril* 2001; 76: 223– 231.
- 75- Oral E, Olive DL, Arici A. The peritoneal environment in endometriosis. *Hum Reprod Update* 1997; 2: 385– 98.
- 76- Witz CA, Montoya-Rodriguez IA, Schenken RS. Whole explants of peritoneum and endometrium: a novel model of the early endometriosis lesion. *Fertil Steril* 1999; 71: 56– 60.
- 77- Witz CA, Takahashi A, Montoya-Rodriguez IA, Cho S, Schenken RS. Expression of the  $\alpha 2\beta 1$  and  $\alpha 3\beta 1$  integrins at the surface of mesothelial cells: a potential attachment site of endometrial cells. *Fertil Steril* 2000; 74: 579– 84.
- 78- Gaetje R, Kotzian S, Herrmann G, Baumann R, Starzinski-Powitz A. Invasiveness of endometriotic cells in vitro. *Lancet* 1995; 346: 1463– 4.
- 79- Spuijbroek MDEH, Dunselman GAJ, Menheere PPCA, Evers JL. Early endometriosis invades the extracellular matrix. *Fertil Steril* 1992; 58: 929 – 33.
- 80- Cornillie FJ, Oosterlynck D, Lauweryns JM, Koninckx PR. Deeply infiltrating pelvic endometriosis: histology and clinical significance. *Fert Steril* 1990; 53: 978-83.
- 81- Saito T, Mizumoto H, Kuroki K, Fujii M, Moir S, Kudo R. Expression of MMP- 3 and TIMP-1 in endometriosis and the influence of danazol. *Acta Obstet Gynecol Jpn* 1995; 47: 495– 6.

- 82- Osteen KG, Bruner KL, Sharpe-Timms KL. Steroid and growth factor regulation of matrix metalloproteinase expression and endometriosis. *Semin Reprod Endocrinol* 1996; 14: 247– 55.
- 83- Bruner KL, Matrisian LM, Rodgers WH, Gorstein F, Osteen KG. Suppression of matrix metalloproteinases inhibits establishment of ectopic lesions by human tissue in nude mice. *J Clin Invest* 1997; 99: 2851– 7.
- 84- Imai A, Takagai A, Tamaya T. Gonadotropin-releasing hormone analog repairs reduced endometrial cell apoptosis in endometriosis in vitro. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 182: 1142– 6.
- 85- Gebel HM, Braun DP, Tambur A, Frame D, Rana N, Dmowski WP. Spontaneous apoptosis of endometrial tissue is impaired in women with endometriosis. *Fertil Steril* 1998; 69: 1042– 7.
- 86- Meresman GF, Vighi S, Buquet RA, Contreras-Ortiz O, Tesone M, Rumi LS. Apoptosis and expression of Bcl- 2 and Bax in eutopic endometrium from women with endometriosis. *Fertil Steril* 2000; 74: 760– 6.
- 87- Eisen HN. *General immunology* 2nd rev ed. Philadelphia: JB Lippincott Co, 1980.
- 88- Kayisli UA, Mahutte NG, Arici A: Uterine chemokines in reproductive hysiology and pathology. *Am J Reprod Immunol* 2002; 47: 213– 221.
- 89- Fakh H, Bagget B, Holtz G et al.: Interleukine-1: a possible role in the infertility associated with endometriosis. *Fertil Steril* 1987; 47: 213– 217.
- 90- Mori H, Sawairim M, Nakagawa M: Peritoneal fluid interleukin-1b and tumor necrosis factor in patients with benign gynecologic disease. *Am J Reprod Immunol* 1991; 26: 62– 67.
- 91- Lebovic DI, Bentzien F, Chao VA, Garrett EN, Meng YG, Taylor RN: Induction of an angiogenic phenotype in endometriotic stromal cell cultures by interleukine- 1b. *Mol Hum Reprod* 2000; 6: 269–275.

- 92- Vigano` P, Gaffuri B, Somigliana E, Busacca M, Di Blasio AM, Vignali M: Expression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 mRNA and protein is enhanced in endometriosis versus endometrial stromal cells in culture. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 1150– 1156.
- 93- Zarmakoupis PN, Rier SE, Maroulis GB, Becker JL: Inhibition of human endometrial stromal cell proliferation by interleukin 6. *Hum Reprod* 1995; 10: 2395– 2399.
- 94- Yoshioka H, Harada T, Iwabe T, Nagano Y, Taniguchi F, Tanikawa M, Terakawa N: Menstrual cycle-specific inhibition of the proliferation of endometrial stromal cells by interleukin 6 and its soluble receptor. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 180: 1088– 1094.
- 95- Tabibzadeh SS, Santhanam U, Sehgal PB, May LT: Cytokine-induced production of IFN-beta 2/IL-6 by freshly explanted human endometrial stromal cells: modulation by estradiol-17 beta. *J Immunol* 1989; 142: 3134– 3139.
- 96- Rier SE, Zarmakoupis PN, Hu X, Becker JL: Dysregulation of interleukin- 6 responses in ectopic endometrial stromal cells: correlation with decreased soluble receptor levels in peritoneal fluid of women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 1431– 37.
- 97- Arici A, Head J, MacDonald PC, Casey ML: Regulation of interleukin- 8 gene expression in human endometrial cells in culture. *Mol Cell Endocrinol* 1993; 94: 195– 204.
- 98- Arici A, Tazuke SI, Attar E et al. Interleukin- 8 concentration in peritoneal fluid of patients with endometriosis and modulation of interleukine- 8 expression in human mesothelial cells. *Mol Hum Reprod* 1996; 2: 40– 45.
- 99- Iwabe T, Harada T, Tsudo T, Tanikawa M, Onohara Y, Terakawa N: Pathogenetic significance of levels of interleukin- 8 in peritoneal fluid of patients with endometriosis. *Fertil Steril* 1998; 69: 924–929.

- 100- Arici A, Seli E, Zeyneloglu HB, Senturk LM, Oral E, Olive DL: Interleukin- 8 induces proliferation of endometrial stromal cells: a potential autocrine growth factor. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 1201– 1205.
- 101- Iwabe T, Harada T, Tsudo T, Nagano Y, Yoshida S, Tanikwa M, Terakawa N: Tumor necrosis factor- $\alpha$  promotes proliferation of endometriotic stromal cells by inducing interleukin- 8 gene and protein expression. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 824– 829.
- 102- Arici A, Tazuke SI, Attar E et al.: Interleukin-8 concentration in peritoneal fluid of patients with endometriosis and modulation of interleukine-8 expression in human mesothelial cells. *Mol Hum Reprod* 1996; 2: 40– 45.
- 103- Garcia-Velasco JA, Arici A: Interleukin- 8 stimulates the adhesion of endometrial stromal cells to fibronectin. *Fertil Steril* 1999; 72: 336– 340.
- 104- Garcia-Velasco JA, Arici A: Interleukin- 8 expression in endometrial stromal cells is regulated by integrin-dependent cell adhesion. *Mol Hum Reprod* 1999; 5: 1135– 1140.
- 105- Arici A, Oral E, Attar E, Tazuke S, Olive DL: Monocyte chemotactic protein- 1 concentration in peritoneal fluid in patients with endometriosis and its modulation in human mesothelial cells. *Fertil Steril* 1997; 67: 1065– 1072.
- 106- Taketani Y, Kuo TM, Mizuno M: Comparison of cytokine levels and embryo toxicity in peritoneal fluid in infertile women with untreated or treated endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 167: 265– 270.
- 107- Eisermann J, Gast MJ, Pineda J, Odem RR, Collins JL: Tumor necrosis factor in peritoneal fluid of women undergoing laparoscopic surgery. *Fertil Steril* 1988; 50: 573– 579.
- 108- Shifren JL, Tseng JF, Zaloudek CJ, Ryan IP, Meng YG, Ferrara N et al.: Ovarian steroid regulation of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: implications for angiogenesis during the

- menstrual cycle and in the pathogenesis of endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 3112– 3118.
- 109- Li XF, Gregory J, Ahmed A: Immunolocalization of vascular endothelial growth factor in human endometrium. *Growth Factors* 1994; 11: 277– 282.
- 110- Nisolle M, Casanas-Roux F, Anaf V, Mine J-M, Donnez J: Morphometric study of the stromal vascularization in peritoneal endometriosis. *Fertil Steril* 1993; 59: 681– 684.
- 111- McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS et al.: Vascular endothelial growth factor is produced by peritoneal fluid macrophages in endometriosis and is regulated by ovarian steroids. *J Clin Invest* 1996; 98: 482– 489.
- 112- Zeitoun K, Takayama K, Sasano H, et al deficient 17 $\beta$  hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in endometriosis: failure to metabolize 17 beta-estradiol. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 4474.
- 113- Attia GR, Zeitoun K, Edwards D, et al: progesterone receptor isoform A but not B is expressed in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 2897.
- 114- Bulun SE, Yang S, Fang Z et al: estrogen production and metabolism in endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 955: 75.
- 115- Rier, SE, Martin, DC, Bowman, RE, Dmowski, WP and Becker, JL. Endometriosis in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) following chronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo p-dioxin. *Fundam Appl Toxicol* 1993; 21: 433-41.
- 116- Whitlock, JP, Jr. Genetic and molecular aspects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-pdioxin action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1990 ; 30: 251-77.
- 117- Sutter, TR, Guzman, K, Dold, KM and Greenlee, WF. Targets for dioxin: genes for plasminogen activator inhibitor-2 and interleukin-1 beta. *Science* 1991; 254: 415-8

- 118- Hadfield, RM, Manek, S, Weeks, DE, Mardon, HJ, Barlow, DH and Kennedy, SH. Linkage and association studies of the relationship between endometriosis and genes encoding the detoxification enzymes GSTM1, GSTT1 and CYP1A1. *Mol Hum Reprod* 2001; 7: 1073-8.
- 119- Coxhead D, Thomas EJ. Familial inheritance of endometriosis in a British population: a case control study. *J Obstet Gynecol* 1993; 13: 42-46.
- 120- Meresman GF, Auge L, Baranao RI, Lombardi E, Tesone M and Sueldo C. Oral contraceptives suppress cell proliferation and enhance apoptosis of eutopic endometrial tissue from patients with endometriosis. *Fert Ster* 2002;77: 1141-47.
- 121- Garcia-Velasco JA, Arici A. Apoptosis and the pathogenesis of endometriosis. *Semin Reprod Med* 2003; 21: 165
- 122- Lessey BA, Castelbaum AJ, Sawin SW, Buck CA, Schinnar R, Bilker W, Strom BL. Aberrant integrin expression in the endometrium of women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79: 643.
- 123- Rodgers WH, Matrisian LM, Giudice LC, Dsupin B, Cannon P, Svitek C, Gorstein F, Osteen KG. Patterns of matrix metalloproteinase expression in cycling endometrium imply differential functions and regulation by steroid hormones. *J Clin Invest* 1994; 94: 946.
- 124- Osteen KG, Yeaman GR, Bruner-Tran KL. Matrix metalloproteinases and endometriosis. *Semin reprod Med* 2003; 21: 155.
- 125- Osteen KG, Igarashi TM, Bruner-Tran KL. Progesterone action in the human endometrium: induction of a unique tissue environment which limits matrix metalloproteinase expression. *Front Biosci* 2003; 8: 78-86.
- 126- Gurates B, Bulun SE. Endometriosis: the ultimate hormonal disease. *Semin Reprod Med*. 2003; 21(2): 125-34.
- 127- Noble LS, Simpson ER, Johns A, Bulun SE. Aromatase expression in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 174.

- 128- Kitawaki J, Noguchi T, Amatsu T, Maeda K, Tsukamoto K, Yamamoto T, Fushiki S, Osawa Y, Honjo H. Expression of aromatase cytochrome P450 protein and messenger ribonucleic acid in human endometriotic and adenomyotic tissues but not in normal endometrium. *Biol Reprod.* 1997; 57(3): 514-9.
- 129- Bulun SE, Mahendroo MS, Simpson ER. Polymerase chain reaction amplification fails to detect aromatase cytochrome P450 transcripts in normal human endometrium or decidua. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993; 76(6): 1458-63.
- 130- Zeitoun KM, Bulun SE. Aromatase: a key molecule in the pathophysiology of endometriosis and a therapeutic target. *Fertil Steril.* 1999; 72(6): 961-9.
- 131- Noble LS, Takayama K, Zeitoun KM, Putman JM, Johns DA, Hinshelwood MM, Agarwal VR, Zhao Y, Carr BR, Bulun SE. Prostaglandin E2 stimulates aromatase expression in endometriosis-derived stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82(2): 600-6.
- 132- Casey ML, MacDonald PC, Andersson S. 17 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 2: chromosomal assignment and progestin regulation of gene expression in human endometrium. *J Clin Invest.* 1994; 94(5): 2135-41
- 133- Zeitoun K, Takayama K, Sasano H, Suzuki T, Moghrabi N, Andersson S, Johns A, Meng L, Putman M, Carr B, Bulun SE. Deficient 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in endometriosis: failure to metabolize 17beta-estradiol. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83(12): 4474-80.
- 134- Vegeto E, Shahbaz MM, Wen DX, Goldman ME, O'Malley BW, McDonnell DP. Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol Endocrinol.* 1993; 7(10): 1244-55.

- 135- Attia GR, Zeitoun K, Edwards D, Johns A, Carr BR, Bulun SE. Progesterone receptor isoform A but not B is expressed in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85(8): 2897-902.
- 134- Bajaj P, Madsen H, Arendt-Nielsen L. Endometriosis is associated with central sensitization: a psychophysical controlled study. *J Pain* 2003; 4: 372.
- 135- Riley JL, Robinson ME, Wise EA, Price DD. A meta-analytic review of pain perception across the menstrual cycle. *Pain* 1999; 81: 225.
- 136- Koninckx PR, Meulaman C, Demeyere S, Lesaffre E, Cornillie FJ. Suggestive evidence that pelvic endometriosis is a progressive disease, whereas deeply infiltrating endometriosis is associated with pelvic pain. *Fertil Steril* 1991; 55: 759- 65.
- 137- Cornillie FJ, Oosterlynck D, Lauweryns JM, Koninckx PR. Deeply infiltrating pelvic endometriosis: histology and clinical significance. *Fertil Steril* 1990; 53: 978- 83.
- 138- Jacobson TZ, Barlow DH, Koninckx PR, Olive D, Farquhar C. Laparoscopic surgery for subfertility associated with endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2002; (4): CD001398.
- 139- Mio Y, Toda T, Harada T et al. Pathophysiology of infertility associated with endometriosis: Luteinized unruptured follicle in the early stages of endometriosis as a cause of unexplained infertility. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 167: 251.
- 140- Barnhart K, Dunsmoor-Su R, Coutifaris C. Effect of endometriosis on IVF. *Fertil Steril* 2002; 77: 1148.
- 141- Olive DL, Franklin RR, Gratkins LV. The association between endometriosis and spontaneous abortion. A retrospective clinical study. *J Reprod Med.* 1982; 27(6): 333-8.
- 142- Wheeler JM, Johnston BM, Malinak LR. The relationship of endometriosis to spontaneous abortion. *Fertil Steril.* 1983; 39(5): 656-60.

- 143- Matorras R, Rodríguez F, Gutierrez de Terán G, Pijoan JI, Ramón O, Rodríguez-Escudero FJ. Endometriosis and spontaneous abortion rate: a cohort study in infertile women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1998; 77(1): 101-5.
- 144- Matalliotakis I, Cakmak H, Dermitzaki D, Zervoudis S, Goumenou A, Fragouli Y. Increased rate of endometriosis and spontaneous abortion in an in vitro fertilization program: no correlation with epidemiological factors. *Gynecol Endocrinol.* 2008; 24(4): 194-8.
- 145- Vercammen EE, D'Hooghe TM. Endometriosis and recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med.* 2000; 18(4): 363-8.
- 146- Surrey ES, Hamle J. Endometriosis as a cause of infertility. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1989; 16: 7973-
- 147-Gibbs, Ronald S.; Karlan, Beth Y.; Haney, Arthur F.; Nygaard, Ingrid E. *Danforth's Obstetrics and Gynecology.* 9th Ed., Lippincott Williams & Wilkins. 2001: 230-245.
- 148- Mol BW, Bayram N, Lijmer JG, Wiegerinck MA, Bongers MY, van der Veen F, Bossuyt PM. The performance of Ca-125 measurement in the detection of endometriosis. *Fertil Steril* 1998; 70: 1101.
- 149- Ozakşit G, Çağlar T, Çiçek N, Kuşçu E, Batioğlu S, Gökmen O. Serum CA 125 levels before, during and after treatment for endometriosis. *Int J Gynaecol Obstet.* 1995 Sep;50(3): 269- 73. □
- 150- Stratton P, Winkel C, Premkumar A, Chow C, Wilson J, Hearn-Stokes R, Heo S, Merino M, Nieman LK. Diagnostic accuracy of laparoscopy, magnetic resonance imaging, and histopathologic examination for the detection of endometriosis. *Fertil Steril* 2003; 79: 1078.
- 151-Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril.* 1997; 67(5): 817- 21
- 152- Dawood MY, Ramos J, Khan-Dawood FS. Depot leuprolide acetate versus danazol for treatment of pelvic endometriosis: changes in

- vertebral bone mass and serum estradiol and calcitonin. *Fertil Steril* 1995; 63: 1177.
- 153- Revilla R, Revilla M, Hernandez ER, Villa LF, Varela L, Rico H. Evidence that the loss of bone mass induced by GnRH agonists is not totally recovered. *Maturitas* 1995; 22: 145.
- 154- Taga M, Minaguchi H. Reduction of bone mineral density by GnRH agonist, nafarelin, is not completely reversible at 6 months after the cessation of administration. *Acta Obstet Gynecol Scand*;1996; 75: 162.
- 155- Ripps BA, VanGilder K, Minhas B, Welford M, Mamish Z. Alendronate for the prevention of bone mineral loss during GnRH agonist therapy. *J Reprod Med* 2003; 48: 761.
- 156- Palomba S, Orio F, Morelli M, Russo T, Pellicano M, Zupi E, Lombardi G, Nappi C, Panici PL, Zullo F. Raloxifene administration in premenopausal woman with uterine leiomyomas: a pilot study. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 3603.
- 157- Vignali M, Infantino M, Matrone R, Chiodo I, Somigliana E, Busacca M, Viganò P. *Fertil Steril*. 2002 Oct; 78(4): 665-78. Review.
- 158- Swisher D, Tague RM, Seyler DE. Effect of the selective estrogen receptor modulator raloxifene on explanted uterine growth in rats. *Drug Dev Res* 1995; 36: 43–5.
- 159- Yao Z, Shen X, Capodanno I, Donnelly M, Fenyk-Melody J, Hausamann J, et al. Validation of rat endometriosis model by using raloxifene as a positive control for the evaluation of novel SERM compounds. *J Invest Surg* 2005; 18: 177–83.
- 160-Acien P, Quereda F, Campos A, Gomez-Torres MJ, Velasco I, GutierrezM. Use of intraperitoneal interferon alpha-2b therapy after conservative surgery for endometriosis and postoperative medical treatment with depot gonadotropin-releasing hormone analog: a Randomized clinical trial. *Fertil Steril* 2002; 78(4): 705–11.

- 161- Melioli G, Semino C, Semino A, Venturini PL, Ragni N. Recombinant interleukin-2 corrects in vitro the immunological defect of endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 1993; 30(4): 218–27.
- 162- Yavuz E, Oktem M, Esinler I, Toru SA, Zeyneloğlu HB. Genistein causes regression of endometriotic implants in the rat model. *Fertility and Sterility* 2002; 88(2): 1129-34.
- 163- Olive DL, Lindheim SR, Pritts EA. New medical treatments for endometriosis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2004 Apr; 18(2): 319-28. Review.
- 164- Mori T, Yamasaki S, Masui F, et al. Suppression of the development of experimentally induced uterine adenomyosis by a novel matrix metalloproteinase inhibitor, ONO-4817, in mice. *Experimental Biology and Medicine* 2001;226;429-433
- 165- Yılmaz B, Sucak A, Kilic S, et al. Metformin regress endometriotic implants in rats by improving implant levels of superoxide dismutase, vascular endothelial growth factor, tissue inhibitor of metalloproteinase-2, and matrix metalloproteinase-9. *Am J Obstet Gynecol* 2009; 201:x.ex-x.ex
- 166- Adamson GD, Pasta DJ. Surgical treatment of endometriosis-associated with infertility: meta-analysis compared with survival analysis. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 171: 1488.
- 167- D'Hoodge TM, Hill JA. Endometriosis. In Novak Gynecology 12th ed. Williams and Wilkins Baltimore 1996; 26: 887- 914.
- 168- Surrey ES, Halme J. Effects of peritoneal fluid from endometriosis patients on endometrial stromal cell proliferation in vitro. *Obstet Gynecol* 1990; 76: 792–7.
- 169- Oosterlynck DJ, Meuleman C, Sobis H, Vandeputte M, Koninckx PR. Angiogenic activity of peritoneal fluid from women with endometriosis. *Fertil Steril* 1993; 59: 778–82.

- 170- Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev* 1992;13:18 –32.
- 171- Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997;18:4 –25.
- 172- Connolly DT. Vascular permeability factor: a unique regulator of blood vessel function. *J Cell Biochem* 1991;47:219 –23.
- 173- Clauss M, Gerlach M, Gerlach H, Brett J, Wang F, Familletti PC, et al. Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J Exp Med* 1990;172:1535– 45.
- 174- Nowak DG, Woolard J, Amin EM, Konopatskaya O, Saleem MA, Churchill AJ, Ladomery MR, Harper SJ, Bates DO (2008) Expression of pro- and anti-angiogenic isoforms of VEGF is differentially regulated by splicing and growth factors. *J Cell Sci* 121: 3487–95.
- 175- Bates DO, Cui TG, Doughty JM, Winkler M, Sugiono M, Shields JD, Peat D, Gillatt D, Harper SJ (2002) VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 62: 4123–31.
- 176- Varey AH, Rennel ES, Qiu Y, Bevan HS, Perrin RM, Raffy S, Dixon AR, Paraskeva C, Zaccheo O, Hassan AB, Harper SJ, Bates DO (2008) VEGF 165 b, an antiangiogenic VEGF-A isoform, binds and inhibits bevacizumab treatment in experimental colorectal carcinoma: balance of pro- and antiangiogenic VEGF-A isoforms has implications for therapy. *Br J Cancer* 98: 1366–79.
- 177- Vernon MW, Wilson EA. Studies on the surgical induction of endometriosis in the rat. *Fertil Steril.* 1985 Nov; 44(5): 684-94.
- 178- Uygur D, Aytan H, Zergeroglu S, Batioglu S. Leflunomide-an immunomodulator induces regression of endometrial explants in a rat model of endometriosis. *J Soc Gynecol Investig* 2006; 13: 378–83.

- 179- Keenan JA, Williams-Boyce PK, Massey PJ, Chen TT, Caudleb MR, Bukovsky A. Regression of endometrial explants in a rat model of endometriosis treated with the immune modulators loxoribine and levamisole. *Fertil Steril* 1999; 72: 135–41.
- 180- Anaf V, Simom Ph, El Nakadi I. Relationship between Endometriotic foci and nerves in rectovaginal endometriotic nodules. *Human Reproduction*;15; 8; 1744-1750
- 181- McCarty KS Jr, Miller LS, Cox EB, et al. Estrogen receptor analyses. Correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal antireceptor antibodies. *Arch Pathol Lab Med* 1985;109: 716–21.
- 182- Jacques Donnez, Pierre Smoes, Stephane Gillerot, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis. *European Society for Human Reproduction and Embryology*. 1998;13,1686-90.
- 183- Aytan H, Caglar P, Uygur D, Zergeroglu S, Batioglu S. Effect of the immunomodulator leflunomide on the induction of endometriosis in an experimental rat model. *Fertil Steril*. 2007 Mar; 87(3): 698- 701.
- 184- Nothnick WB. Treating endometriosis as an autoimmune disease. *Fertil Steril* 2001; 75:1-10.
- 185- Machado DE, Berardo PT. A selective cyclooxygenase-2 inhibitor suppress the growth of endometriosis with an antiangiogenic effect in a rat model. *Fertil Steril*. 2010 ; 93 ; 2674-9
- 186- Jiang HQ, Li YL, Zou J. Effect of recombinant human endostatin on endometriosis in mice. *Chin Med J*. 2007;120;1241-6
- 187- H. XU, W.T. Lui, C.Y. Chu, P.S. Ng. Antiangiogenic effects of green tea catechin on an experimental endometriosis mouse model. *Human Reproduction*. 2009;24; 608-18
- 188- Higgins B, Kolinsky K, Linn M, Adames V. Antitumor activity of capecitabine and bevacizumab combination in a human estrogen

- receptor-negative breast adenocarcinoma xenograft model. *Anticancer Res.* 2007; 27; 2279-87
- 189- Huynh H, Teo CC, Soo KC. Bevacizumab and rapamycin inhibit tumor growth in peritoneal model of human ovarian cancer. *Mol Cancer Ther.* 2007; 6;2959-66
- 190- Ninomiya S, Inomata M, Tajima M. Effect of bevacizumab, a humanized monoclonal antibody to vascular endothelial growth factor, on peritoneal metastasis of MNK-45P human gastric cancer in mice. *J Surg Res.* 2009 ;154; 196-202.
- 191- Kim TI, Chung JL, Hong JP. Bevacizumab application delays epithelial healing in rabbit cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009; 50; 4653-9
- 192- Lee SY, Kim DK, Cho JH. Inhibitory effect of bevacizumab on the angiogenesis and growth of retinoblastoma. *Arch Ophthalmol.* 2008;126; 953-8
- 193- Nomoto H, Shiraga F, Kuno N. Pharmacokinetics of bevacizumab after topical, subconjunctival, and intravitreal administration in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009; 50; 4807-13
- 194- Sakurai K, Akiyama H, Yukitoshi S. Effect of intravitreal injection of high-dose bevacizumab in monkey eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009; 50; 4905-16.
- 195- Gordon MS, Margolin K, Talpaz M. Phase I safety and pharmacokinetic study of recombinant human anti-vascular endothelial growth factor in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol;* 2001; 19; 843-50.
- 196- Langmuir VK, Cobleigh MA, Herbst RS. Successful long term therapy with bevacizumab (Avastin) in solid tumors. *Proc Am Soc Clin Oncol;* 2002; 21; 9a. Abstract.