

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
KADIN HASTALIKLARI VE  
DOĞUM  
ANABİLİM DALI

**BEVASİZUMAB SIÇAN  
ENDOMETRİYOZİS MODELİNDE  
APOPTOZİSİ İNDÜKLER**

**DR. DİDEM SOYSAL**

**UZMANLIK TEZİ**

**İZMİR-2012**

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
KADIN HASTALIKLARI VE  
DOĞUM  
ANABİLİM DALI

# BEVASİZUMAB SIÇAN ENDOMETRİYOZİS MODELİNDE APOPTOZİSİ İNDÜKLER

UZMANLIK TEZİ

DR. DİDEM SOYSAL

TEZ DANIŞMANLARI

PROF. DR. CEMAL POSACI

PROF. DR. ÖMER ERBİL DOĞAN

Bu araştırma DEÜ Araştırma Fon Saymanlığı Tarafından 2010.KB.SAG.042 sayı ile desteklenmiştir.

<b>TEŞEKKÜR.....</b>	<b>iii</b>
<b>TABLO LİSTESİ.....</b>	<b>iv</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ .....</b>	<b>v</b>
<b>KISALTMALAR.....</b>	<b>vi</b>
<b>ÖZET .....</b>	<b>1</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>3</b>
<b>1.GİRİŞ VE AMAÇ .....</b>	<b>5</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER .....</b>	<b>7</b>
2.1. ENDOMETRİYOZİS.....	7
2.1.1. Patogenez.....	7
2.1.2. Genetik .....	9
2.1.3. İmmünoloji .....	11
2.1.4. Epidemiyoloji ve Risk Faktörleri.....	12
2.1.5. Tanı .....	12
2.1.5.1. Klinik Tanı .....	13
2.1.5.2. CA 125 .....	13
2.1.5.3. Görüntüleme Yöntemleri .....	14
2.1.5.4. Terapötik Denemeler .....	14
2.1.5.5. Cerrahi Tanı .....	14
2.1.5.6. Klasifikasyon Sistemi .....	15
2.1.6. Tedavi.....	17
2.1.6.1. Bekleme Tedavisi .....	17
2.1.6.2. Medikal Tedavi.....	17
2.1.6.3. Cerrahi Tedavi.....	20
2.1.7. Apoptozis.....	21
2.1.7.1. Apoptozis ve Bcl-2 Ailesi.....	23
2.1.7.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Apoptotik Gen Ekspresyonlarının Saptanması .....	24
2.1.7.3. Endometriyozis ve Apoptozis .....	27
2.1.7.3.1. Normal Endometriyumda Apoptozis.....	27
2.1.7.3.2. Endometriyozisli Hastalarda Apoptozis .....	29

2.1.7.4. Endometriyozis Tedavi Modaliteleri ve Apoptozis.....	30
2.1.8. Anjiyogenez.....	31
2.1.8.1. Endometriyozis ve Anjiyogenez .....	32
2.1.8.2. Endometriyozis ve VEGF .....	34
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>36</b>
3. 1. Sıçan Cerrahi Endometriyozis Modeli .....	36
3. 2. Adezyonların İncelenmesi .....	39
3. 3. Endometriyotik Odakların Histopatolojik İncelemesi.....	39
3. 4. Endometriyotik Odakların Polimeraz Zincir Reaksiyonu İle Analizi .....	40
3. 5. İstatistiksel Analiz .....	41
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>42</b>
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>54</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>62</b>
<b>7. KAYNAKLAR.....</b>	<b>63</b>

## **TEŞEKKÜR**

*Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'ndaki asistanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, yetişmemde emeği bulunan tüm hocalarıma; Prof. Dr. Ata ÖNVURAL'a, Prof. Dr. Berrin ACAR'a, Prof. Dr. Namık DEMİR'e, Prof. Dr. Turhan USLU'ya, Prof. Dr. Bülent GÜLEKLİ'ye, Prof. Dr. Cemal POSACI'ya, Prof. Dr. Yakup ERATA'ya, Prof. Dr. Murat CELİLOĞLU'na, Prof. Dr. Uğur SAYGILI'ya, Prof. Dr. Sabahattin ALTUNYURT'a, Prof. Dr. Serkan GÜÇLÜ'ye, Doç. Dr. Erbil DOĞAN'a, Uzm. Dr. Bahadır SAATLI'ya, Uzm.Dr.R.Emre OKYAY'a ve beraber çalıştığım tüm asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.*

*Tezimin hazırlanmasındaki katkılarından dolayı sayın hocalarıma; Prof. Dr. Cemal POSACI'ya, Doç.Dr. Erbil Doğan'a, Uzm. Dr. Bahadır SAATLI'ya, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Sefa Kızıldağ'a, Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Meral Koyuncuoğlu'na, Halk Sağlığı Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Reyhan Uçku ve Dr. Sinem Doğanay'a teşekkürlerimi sunarım.*

*Uzmanlık eğitimim süresince ve tezimin hazırlanması esnasında desteğini ve varlığını yanımda hissettiğim sevgili anneme, babama, kardeşime, eşime ve küçük oğluma teşekkür ederim.*

Dr. Didem SOYSAL

<b>Tablo 1.</b> Amerikan Reprodüktif Tıp Cemiyeti'ne Göre Gözden Geçirilmiş Endometriyozis Sınıflandırılması .....	<b>16</b>
<b>Tablo 2.</b> İmplantların Gruplara Göre Yüzey Genişliği, Histopatolojik Skor ve Adezyon Skorları .....	<b>43</b>
<b>Tablo 3.</b> Kontrol Grubu ve Leuprolid Grubunun İmplant Yüzey Genişliği, Adezyon ve Histopatolojik Skorlarının Karşılaştırılması .....	<b>44</b>
<b>Tablo 4.</b> Kontrol Grubu ve Bevasizumab Grubunun İmplant Yüzey Genişliği, Adezyon ve Histopatolojik Skorlarının Karşılaştırılması.....	<b>45</b>
<b>Tablo 5.</b> Leuprolid Grubu ve Bevasizumab Grubunun İmplant Yüzey Genişliği, Adezyon ve Histopatolojik Skorlarının Karşılaştırılması.....	<b>46</b>
<b>Tablo 6.</b> Tedavi Gruplarında Pro-apoptotik ve Anti-apoptotik Gen Ekspresyonları.....	<b>49</b>
<b>Tablo 7.</b> Kontrol Grubu ve Leuprolid Grubu Pro-apoptotik ve Anti-apoptotik Gen Ekspresyonları .....	<b>50</b>
<b>Tablo 8.</b> Kontrol Grubu ve Bevasizumab Grubu Pro-apoptotik ve Anti-apoptotik Gen Ekspresyonları .....	<b>51</b>
<b>Tablo 9.</b> Leuprolid Grubu ve Bevasizumab Grubu Pro-apoptotik ve Anti-apoptotik Gen Ekspresyonları .....	<b>52</b>

<b>Şekil 1.</b> Retrograd Menstruasyon Teorisi .....	<b>8</b>
<b>Şekil 2.</b> Endometriyoziste Medikal Tedavi Modaliteleri ve Etki Mekanizmaları .....	<b>18</b>
<b>Şekil 3.</b> Apoptozis ve Nekrozda Karşılaşılan Hücrel Değişiklikler.....	<b>22</b>
<b>Şekil 4.</b> İntrinsik ve Ekstrinsik Apoptozis Yolakları.....	<b>23</b>
<b>Şekil 5.</b> mRNA Ekspresyonunun Tespitinde Polimeraz Zincir Reaksiyonu .....	<b>25</b>
<b>Şekil 6.</b> TaqMan Probu .....	<b>26</b>
<b>Şekil 7.</b> TaqMan probu ve primerin Hedef DNA'ya bağlanması .....	<b>26</b>
<b>Şekil 8.</b> Raportör florokromun serbest hale geçmesi ve sinyal oluşması .....	<b>27</b>
<b>Şekil 9.</b> Anjiyogenez Basamakları .....	<b>31</b>
<b>Şekil 10.</b> Sıçana laparotomi uygulaması.....	<b>36</b>
<b>Şekil 11.</b> Sol uterin horn eksizyonu.....	<b>36</b>
<b>Şekil 12.</b> Endometriyal dokunun hazırlanışı.....	<b>37</b>
<b>Şekil 13.</b> Endometriyal implantın batın sol yan duvarına fiksasyonu .....	<b>37</b>
<b>Şekil 14.</b> Abdomenin kapatılması .....	<b>37</b>
<b>Şekil 15.</b> Endometriyotik implantın ölçümü .....	<b>38</b>
<b>Şekil 16.</b> Endometriyotik İmplantların Histopatolojik Skorlaması.....	<b>40</b>
<b>Şekil 17.</b> Adezyon Şiddeti Grup İçi Dağılımı .....	<b>47</b>
<b>Şekil 18.</b> Adezyon Yaygınlığı Grup İçi Dağılımı .....	<b>47</b>
<b>Şekil 19.</b> İmplant Yüzey Genişliğinin Tedavi Sonrası Değişiminin Grup İçi Dağılımı.....	<b>48</b>
<b>Şekil 20.</b> Leuprolid ve Bevasizumab Grubunda Endometriyal Odakta Bcl-2 ve Bax Ekspresyonu.....	<b>53</b>

## **KISALTMALAR**

<b>VEGF</b>	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
<b>CA 125</b>	: Kanser Antijen 125
<b>USG</b>	: Ultrasonografi
<b>MRG</b>	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
<b>MMP</b>	: Matriks Metalloproteinaz
<b>mRNA</b>	: Messenger RNA
<b>COX-2</b>	: Siklooksijenaz tip 2
<b>PGE2</b>	: Prostaglandin E2
<b>NK</b>	: Natural Killer
<b>ICAM-1</b>	: İnterselüler Adezyon Molekülü-1
<b>Fas</b>	: Fas Antijeni
<b>Fas L</b>	: Fas Ligand
<b>PDGF</b>	: Platelet Derive Büyüme Faktör
<b>TGF-<math>\beta_1</math></b>	: Transforming Büyüme Faktör- $\beta_1$
<b>bFGF</b>	: Bazik Fibroblast Büyüme Faktör
<b>FGF</b>	: Fibroblast Büyüme Faktör
<b>GnRHa</b>	: Gonadotropin Salgılayıcı Hormon Agonisti
<b>LH</b>	: Luteinize Edici Hormon
<b>MPA</b>	: Medroksiprogesteron Asetat
<b>LNG</b>	: Levonorgestrel
<b>RIA</b>	: Rahim İçi Araç
<b>DMPA</b>	: Depo Medroksiprogesteron Asetat
<b>KOK</b>	: Kombine Oral Kontraseptif
<b>GnRHr</b>	: Gonadotropin Salgılayıcı Hormon Reseptörü
<b>FSH</b>	: Folikül Stimüle Edici Hormon
<b>SERM</b>	: Selektif Östrojen Reseptör Modülatörü
<b>SPRM</b>	: Selektif Progesteron Reseptör Modülatörü
<b>LUNA</b>	: Laparoskopik Uterin Sinir Ablasyonu
<b>Cyc-c</b>	: Sitokrom c
<b>Bcl-2</b>	: B Hücreli Lenfoma/Lösemi 2



<b>TNF</b>	: Tumor Nekrozis Faktör
<b>TNFR</b>	: Tumor Nekrozis Faktör Reseptörü
<b>PCR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>cDNA</b>	: Komplementer DNA
<b>VEGFR-2</b>	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü-2
<b>VEGFR</b>	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü
<b>MMLV</b>	: Moloney murine leukemia virus
<b>SPSS</b>	: Statistical Package for Social Sciences
<b>TUNEL</b>	: Terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling
<b>NAG-1</b>	: Nonsteroidal antiinflatuar ilaç aktive gen-1
<b>PCNA</b>	: Prolifere hücre nükleer antijeni

## ÖZET

### BEVASİZUMAB SIÇAN ENDOMETRİYOZİS MODELİNDE APOPTOZİSİ İNDÜKLER

**AMAÇ:** Anjiyogenetik bir hastalık olan endometriyozisde endometriyal dokunun ektopik bölgelerde gelişmesi ve hayatta kalabilmesi için neovaskülerizasyona ihtiyaç duyulur. Bu nedenle anjiyogenez inhibitörleri bu hastalığın tedavisinde yeni bir umut olarak görülmektedir. Bevasizumab bazı insan tümörlerinde kullanılan, insan vasküler endotelial büyüme faktörünü (VEGF) hedefleyen bir rekombine monoklonal antikordur. Bu çalışmanın amacı anti-VEGF antikoru olan Bevasizumabın sıçan endometriyozis modelinde endometriyal implantlarda apoptotik gen ekspresyonu üzerine etkisini araştırmaktır.

**YÖNTEM:** Çalışmaya 8 hafta yaşında, gebe olmayan, Wistar albino suşu toplam 29 adet sıçan dahil edilmiştir. Her bir sıçanda cerrahi endometriyozis modeli oluşturulmuştur. İlk operasyondan 3 hafta sonra ikinci laparotomiler yapılarak, endometriyotik odak boyutları ölçülüp yüzey alanları hesaplanmıştır. Sıçanlar üç gruba ayrılmıştır: Grup I (kontrol grubu) intraperitoneal tek doz %0.09 NaCl solusyonu (0.25 cc; n=10); Grup II (çalışma grubu) intraperitoneal tek doz bevasizumab (2.5 mg/kg; n=10); Grup III (pozitif kontrol grubu) subkütan tek doz leuprolid asetat (1 mg/kg; n=9) verilmiştir. İkinci operasyondan 3 hafta sonra sıçanlar sakrifiye edilip endometriyotik odakların boyutları tekrar ölçülüp, adezyonların şiddeti, yaygınlığı incelenip total adezyon skoru hesaplanmıştır. Endometriyotik odaklar RNA ekstraksiyonu, histopatolojik inceleme ve immünohistokimyasal inceleme için çıkarılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile Bax, Cyc-c, Bcl-2 ve Bcl-xl mRNA gen ekspresyonu seviyeleri belirlenmiştir. İmplantlarda epitelyal hücre varlığı CD10 immünohistokimyasal boyama ve semikantitatif inceleme ile değerlendirilmiştir.

**BULGULAR:** Bevasizumab grubu (%58.8) kontrol grubu (%6.2) ile karşılaştırıldığında implant yüzey alanlarını anlamlı olarak küçültmüştür ( $P<0.001$ ), ancak leuprolid asetat ile arasında fark yoktur (%61.9) ( $P=0.62$ ). Total adezyon skoru bevasizumab grubunda ( $1.4\pm 0.9$ ) kontrol grubundan ( $2.9\pm 0.9$ ) anlamlı olarak az saptanmıştır ( $P=0.003$ ), bevasizumab grubu ile leuprolid asetat grubu ( $2.2\pm 1.3$ ) arasında anlamlı bir fark yoktur ( $P=0.13$ ). Semikantitatif incelemede implantlarda endometriyal epitel hücre varlığı değerlendirilmiş leuprolid asetat grubunda ( $0.56\pm 1.0$ ) kontrol grubundan ( $1.78\pm 1.0$ ) anlamlı derecede düşük skor saptanmıştır ( $P=0.009$ ) ancak bevasizumab grubu ( $1.4\pm 1.4$ ) ile kontrol grubu arasında anlamlı fark yoktur ( $P=0.45$ ). Semikantitatif analizde leuprolid asetat ve bevasizumab grupları arasında anlamlı

fark yoktur ( $P=0.17$ ). Endometriyotik odak PCR çalışmasında anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-xl) ve apoptotik (Bax, Cyc-c) gen ekspresyonları çalışılmıştır. Bevasizumab Bax gen ekspresyonunu kontrole göre 3.1 kat, Cyc-c ekspresyonunu kontrole göre 1.3 kat arttırırken, Bcl-2 ekspresyonunu kontrole göre 0.4 kat, Bcl-xl ekspresyonunu kontrole göre 0.8 kat azaltmıştır ( $P<0.001$ ). Benzer bir şekilde leuprolid asetat da Bax gen ekspresyonunu kontrole göre 3.0 kat ( $P<0.001$ ), Cyc-c ekspresyonunu kontrole 1.3 kat ( $P<0.001$ ) arttırırken, Bcl-2 ekspresyonunu kontrole göre 0.4 kat ( $P<0.001$ ), Bcl-xl ekspresyonunu kontrole göre 0.8 kat azaltmıştır ( $P=0.002$ ). Ancak leuprolid asetat ve bevasizumab grupları arasında gen ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $P>0.05$ ).

**SONUÇ:** Bu bulgular ışığında yeni bir anjiyogenez inhibitörü olan bevasizumab endometriyotik odakları geriletmede leuprolid asetatla benzer etkinliğe sahiptir. Bu etkiyi açıklamada olası bir mekanizma apoptozis indüksiyonudur.

**Anahtar Kelimeler:** endometriyozis, apoptozis, bevasizumab, anjiyogenez

## SUMMARY

### BEVACIZUMAB INDUCES APOPTOSIS IN THE RAT ENDOMETRIOSIS MODEL

**INTRODUCTION:** Endometriosis is accepted to be one of the angiogenetic diseases and neovascularization is essential for the development and survival of the endometrial tissue at the ectopic sites. Therefore, angiogenesis inhibitors are novel therapeutic agents promising a new hope for this disease. Bevacizumab is a recombinant, monoclonal antibody targeting human VEGF and it is used in various human tumors. The aim of this study was to investigate the effects of anti-VEGF antibody Bevacizumab on endometrial explants and on apoptotic gene expression levels in the rat endometriosis model.

**MATERIAL & METHODS:** In this study surgical induction of endometriosis was performed in 29, nonpregnant, 8 weeks old Wistar Albino rats. After 3 weeks, second laparotomies were performed to measure dimensions of endometriotic foci and explant areas were calculated. The animals were divided in three groups: Group I (control group), single intraperitoneal injection of saline (0.25cc; n=10); Group II (study group), single intraperitoneal injection of bevacizumab (2.5 mg/kg; n=10); and Group III (positive control group), single subcutaneous injection of depot leuprolide acetate (1 mg/kg; n=9). Three weeks later, the rats were sacrificed and the endometriotic explant dimensions were measured, the severity and extent of the adhesions and total adhesion scores were calculated. Endometriotic foci were removed for apoptotic gene expressions, histopathologic and immunohistochemical examination. The level of Bax, Cyc-c, Bcl-2 and Bcl-xl mRNA gen expressions were detected by polymerase chain reaction PCR. The presence of epithelium in explants were examined by the semiquantitative evaluation and CD10 immunohistochemistry.

**RESULTS:** Bevacizumab treatment statistically significantly decreased the endometriotic implant size (58.8%) compared with control (6.2%) ( $P<0.001$ ), and this effect was comparable with the decrease in leuprolide acetate (61.9%) ( $P=0.62$ ). Bevacizumab-treated rats had lower total adhesion scores ( $1.4\pm 0.9$ ) when compared with control group ( $2.9\pm 0.9$ ) ( $P=0.003$ ), but bevacizumab-treated rats had similar scores with leuprolide group ( $2.2\pm 1.3$ ) ( $P=0.13$ ). Semiquantitative evaluation of the persistence of endometrial epithelial cells in the explants showed a significantly lower score in leuprolide-treated rats ( $0.56\pm 1.0$ ) compared with control rats ( $1.78\pm 1.0$ ) ( $P=0.009$ ), but bevacizumab-treated rats ( $1.4\pm 1.4$ ) had similar scores with control group ( $P=0.45$ ). There was no statistically significant difference in

semiquantitative evaluation between bevacizumab and leuprolide group ( $P=0.17$ ). In PCR study of endometriotic foci apoptotic genes (Bax, Cyc-c) and anti-apoptotic genes (Bcl-2, Bcl-xl) were evaluated. Bevacizumab statistically significantly increased expression of Bax gene 3.1 fold, Cyc-c gene 1.3 fold and decreased expression of Bcl-2 gene 0.4 fold, Bcl-xl gene 0.8 fold compared with control group ( $P<0.001$ ). Similarly, leuprolide acetate statistically significantly increased expression of Bax gene 3.0 fold ( $P<0.001$ ), Cyc-c gene 1.3 fold ( $P<0.001$ ) and decreased expression of Bcl-2 gene 0.4 fold ( $P<0.001$ ), Bcl-xl 0.8 fold ( $P=0.002$ ), compared with control group. The level of change in anti-apoptotic and apoptotic gene expressions did not show statistically significant difference between bevacizumab and leuprolide group ( $P>0.05$ ).

**CONCLUSIONS:** This study suggests that a novel angiogenesis inhibitor, anti-VEGF antibody bevacizumab is as effective as leuprolide acetate in the regression of the endometriotic lesions. One possible mechanism of this effect is the induction of apoptosis.

**Key Words:** endometriosis, apoptosis, bevacizumab, angiogenesis

# 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Endometriyozis, endometriyal glandüler ve stromal dokunun uterin kavite dışında bulunmasıyla karakterize kronik bir hastalıktır. Dismenore, disparoni, pelvik ağrı ve infertilite sık görülen şikayetlerdir. Üreme çağındaki kadınların yaklaşık %5-15'inde, infertilite problemi olan kadınların ise yaklaşık %20-40'da bulunmaktadır.(1-5). Endometriyozis en sık olarak sırasıyla overlerde, ön ve arka cul-de-sacta, uterosakral ligamanda, uterus ve broad ligamanların arka yüzünde görülmektedir (6-7).

Endometriyoziste kolay uygulanabilen bir tanı testi mevcut değildir. Klinik olarak şüphelenilen olgularda kanser antijen 125 (CA125) bakılması, ultrasonografi (USG) ve abdominal manyetik rezonans görüntüleme (MRG) gibi görüntüleme yöntemlerinden faydalanılması tanıyı destekler. Ancak vakaların önemli bir kısmında tanı şüpheli cerrahi lezyonların histolojik incelemesi ile konulabilir.

Normal fizyoloji içinde endometriyal hücreler anjiyogenez ve enflamasyonu indükleyen hormonal faktörlere yanıt olarak proliferer olur. Endometriyoziste ise anjiyogenez ve hücre proliferasyonu artarken apoptoziste azalma mevcuttur (8-14). Yeni damar oluşumunda ilk basamak anjiyogenetik faktörler tarafından uyarılan matür kan damarlarından mural hücrelerin ayrılması ve ekstraselüler matriksin yıkımı ile damarın destabilizasyonudur. Ektopik endometriyumda PCR çalışmaları artmış matriks metalloproteinaz-9 (MMP-9) ve azalmış doku metalloproteinaz-3 inhibitörü messenger RNA (mRNA) ekspresyonunu işaret etmektedir (15). Bu durum endometriyozisli hastalarda endotel hücrelerin migrasyonunu ve yeni damar oluşumunu açıklamada önemlidir. Anjiyogenez mekanizmasında önemli bir mediyatör olan VEGF endometriyozis patogeneğinde de önemli bir yere sahiptir (16-18). Endotel hücreleri üzerinde mitojenik etkisi vardır ve vasküler permeabilityi artırır (19). Bu etkileri endotel üzerinde bulunan tirozin kinaz reseptörleri sayesinde sağlar (20). VEGF'nin tek fonksiyonu artmış anjiyogenez değildir, endotel hücrelerinde ve over granuloza hücrelerinde azalmış apoptoza da neden olmaktadır (21-22). Yapılan sıçan modellerinde de endometritik lezyonlarda artmış VEGF, VEGF-2 reseptörü ve MMP-9 ekspresyonları ve artmış anjiyogenez mevcuttur (23).

Endometriyozis tedavisinde kullanılan geleneksel medikal ilaçlar Sampson'un retrograd menstrüasyon teorisine ve ektopik endometriyumun ötopik endometriyum gibi tedaviye yanıt vereceği esasına dayanır. Östrojene bağımlı bir hastalık olan endometriyoziste,

tedavinin amacı siklik menstrüasyonu önleyerek retrograd yayılımın, yeni implant oluşumunun ve oluşmuş implantların gelişiminin engellenmesidir. Tedavide sıklıkla gonadotropin serbestleştirici hormon ( GnRH ) agonistleri ve steroidojenik ajanlar kullanılır. Hipoöstrojenik çevre oluşumu geleneksel tedavinin temellerini oluşturur. Ancak hipoöstrojenik çevrenin olumsuz yan etkilerinden korunmak için yeni tedavi modalitelerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Bevasizumab VEGF'ye bağlanan ve onun biyolojik aktivitesini yok eden rekombinant humanize IgG1 antikorudur. Dokuda etkinliğini anjiyogenezi inhibe ederek gösterir. Meme, akciğer ve kolorektal kanserlerde kemoterapi protokollerine eklenmesi kemoterapi etkinliğini arttırmıştır. Bu bilgiler ışığında bevasizumab endometriyozis de etkin bir tedavi modalitesi olabileceği fikri oluşmuştur. Leuprolid asetat ise endometriyozis tedavisinde etkisini hem hipoöstrojenik çevre oluşturarak hem de dokuda apoptozisi arttırarak gösteren bir GnRH analogudur. Bu çalışmada bevasizumabın deneysel endometriyozis modelinde etkinliği klinik olarak kabul görmüş bir tedavi şekli olan leuprolid asetat ile karşılaştırılarak araştırılması amaçlanmıştır.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. ENDOMETRİYOZİS**

Endometriyozis, endometriyal glandüler ve stromal dokunun uterin kavite dışında bulunmasıyla karakterize kronik jinekolojik bir hastalıktır. İlk olarak 1927 yılında Sampson tarafından tanımlanmıştır (24). Dismenore, disparoni, pelvik ağrı ve subfertilite sık görülen şikayetlerdir. Üreme çağındaki kadınların yaklaşık %5-15'unda, infertilite problemi olan kadınların ise yaklaşık %20-40'da bulunmaktadır (1-5). Olguların % 2-4'ünde postmenopozal dönemde gözlenir (25).

Nullipar, kısa ve yoğun menstrüel siklusları olan kadınlar endometriyozis açısından risk altındadırlar (3,26-27). Neredeyse tüm kadınlarda peritoneal kaviteye menstrual debrisler taşınmasına rağmen hastalığın %5-15 kadında görülmesi patogeneizde genetik ve immünojenik yatkınlığa işaret etmektedir. Endometriyozis beyaz ırkta siyah ırka göre daha sık görülmektedir, en sık olarak ise Asyalılarda görüldüğü tespit edilmiştir (28).

Hastalığın seyrinde progresyon ve rekürrensler sıktır. Bu nedenle klinik yönetimi zordur. Tanı ve evreleme cerrahi olarak yapılır. Hastalık en sık olarak pelvik bölgede görülmektedir. Evre çoğu zaman semptomların şiddeti ile ilgili değil, cerrahide görülen hastalık miktarıyla ilişkilidir. Evreleme Amerikan reproduktif tıp cemiyetine göre gözden geçirilmiş endometriyozis sınıflamasına göre yapılır. Evre 1 minimal hastalığı tanımlar iken, Evre 4 de şiddetli hastalık mevcuttur (29).

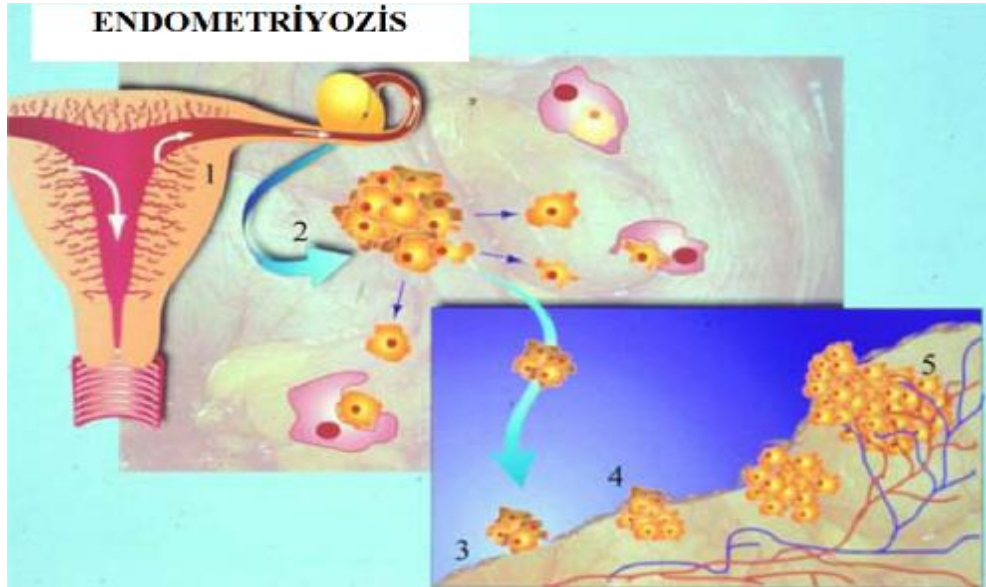
Endometriyozis günlük aktiviteleri etkileyerek kişinin yaşam kalitesini bozan bir hastalık olmakla beraber, disparoniye ve infertiliteye neden olduğunda sadece kadının değil çiftin problemi olarak görülmelidir.

#### **2.1.1. PATOGENEZ**

Hastalık kliniğe peritoneal endometriyozis, overyan endometriyozis veya derin invazif endometriyozis olarak yansıyabilir (30). Endometriyozis en sık olarak pelvik bölgede görülmekle beraber nadir olarak vücudun diğer bölgelerinde endometriyal adacıklar halinde görülebilir. Sırasıyla en sık olarak overlerde, ön ve arka cul-de-sacta, uterosakral ligamanda, uterus ve broad ligamanların arka yüzünde görülmektedir (6-7). Lezyonların farklı yerleşim yerlerine sahip olması oluşumlarında da farklı mekanizmaların yer alabileceğini



düşündürmüştür: mezotelyal metaplazi (ovaryen endometriyoma), rektovaginal septumda müllerian kalıntılardan gelişme (derin invazif lezyonlar) ve retrograd menstrüasyon (peritoneal implantlar). Sampson'nun retrograd menstrüasyon teorisi endometriyozis patogenezinde birincil mekanizma olarak kabul edilmektedir. Şekil 1 menstrüasyon sırasında transtubal regürjitasyona uğrayan endometriyal hücrelerin pelvik yapılara implantasyonunu göstermektedir. Mens döneminde yapılan laparoskopilerde patent fallopian tüpleri olan kadınların yaklaşık %75-90'ında peritoneal sıvıda kan tespit edilmektedir (31-33). Mens sırasında peritoneal sıvıdan elde edilen canlı endometriyal hücreler peritonun mezotelyal yüzeyine implante olabilmektedir (34-35). Aynı zamanda menstrüel akımı bozan obstrüktif müllerian anomalisi olan kadınlarda endometriyozis daha yaygın görülmektedir (36). Tüm bu teoriyi destekleyen bulgulara rağmen bu teori atipik yerleşimli endometriyozis olgularını açıklamada yetersiz kalmaktadır.



**Şekil 1.** Retrograd Menstrüasyon Teorisi (37)

1: Fallop tüplerinden retrograd menstrüasyon 2: Abdomene ulaşma 3:Peritoneal yüzeye yapışma 4: İnvazyon 5: Yeni damar oluşumu

Atipik yerleşimli endometriyozis olgularında endometriyal hücrelerin vasküler veya lenfatik yolla yayılım gösterebildiğine dair kanıtlar saptanmıştır (38-41). Cerrahi skarlarda izlenen endometriyozisin endometriyal dokuların direkt transplantasyonu ile oluştuğu düşünülmektedir (42-43). Ekstrapelvik endometriyozis, hemen hemen vücudun tüm organlarında oluşabilir (39). Üretra, bağırsak, akciğerler, plevral kavite, deri, lenf bezleri, sinirler ve beyin endometriyozisin tespit edildiği organlardır (44).

Söloomik metaplazi teorisine göre endometriyozis söloomik epitelden kaynaklanan mezotelyal hücrelerin spontan metaplazisi sonucunda oluşur. İndüksiyon teorisi ise söloomik metaplazi teorisinin daha genişletilmiş formudur. Burada metaplazi spontan gelişmez bilinmeyen bir biyokimyasal faktör, enfeksiyon, hormonal veya diğer tetikleyici faktörler buna neden olur. Atipik yerleşimli endometriyozis ve menstrüel siklusları seyrek olan veya hiç adet görmeyen premenarşal kızlarda görülen endometriyozis bu teoriyle açıklanabilir.

Cerrahi olarak tanımlanmasının ardından yıllar geçmesine rağmen hastalığın histopatogenezi henüz tam olarak ortaya konulamamıştır. Endometriyozisli kadınların genetik ve immün fonksiyonları üzerine yapılacak çalışmalar ve buna ektopik lezyonlardaki moleküler değişikliklerin incelenmesinin eklenmesi hastalığın histopatogenezine yeni bakış açıları sağlayabilecektir. Hastalığın patogenezini anlamaya yönelik atılacak her adım yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesini sağlayacaktır.

### **2.1.2. GENETİK**

Nerdeyse tüm kadınlarda peritoneal kaviteye menstrüel debrisler taşınır (45) ve birçok çalışmada peritoneal kavitede canlı endometriyal hücreler görülmüştür (46-50). Ancak her kadında endometriyozisin gelişmemesini Vinatier ve arkadaşları iki teori ile açıklamıştır (51). Birinci teoriye göre problem endometriyal dokudadır ve normal peritoneal temizlenmeye direnç gösterir. İkinci teoriye göre ise problem hücresele ve hümoral immünededir. Genetik olarak endometriyozise predispoze endometriyal dokunun reflüsünün peritoneal kavitede proinflatuar yanıtları bozarak hastalığı oluşturuyor olması da mümkündür.

Endometriyozisli hastaların birinci derece akrabalarında, hastalık riskinin yedi kat fazla olduğu gösterilmiştir (52-54). Hastalığın insanlarda ve insan dışı primatlarda bazı ailelerde görülme sıklığı artmıştır. Monozigotik ve dizigotik ikizlerde sıklıkla saptanır ve ikiz olmayan kız kardeşlerde hastalığın başlangıç yaşının benzer olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle hastalığın gelişiminde belirgin bir Mendelyen kalıtım paterni belirlenememiş, multifaktöryel kalıtım kabul edilmiştir (53). Endometriyozis gelişimine yol açabilecek genlerin dökülen endometriyal hücrelerin peritoneal yüzeylere invaze olmasını, proliferasyonunu ve neovaskularizasyonunu sağlarken inflammatuar yanıtı da kontrol ettiği ileri sürülmüştür.

Endometriyozisli hastaların ötopik endometriyal hücrelerinin geç sekretuar faz ve mens fazında hücre yıkımı ve hücre siklusunu kontrol eden programlı hücre ölümüne (apoptozis) dirençli olduğu saptanmıştır (9,12). Bu direnç peritoneal kaviteye ulaşan endometriyal hücrelerin sağ kalımını açıklayabilir.

Benzer şekilde ötopik endometriyumda hücre adezyon molekülü ekspresyonlarında da anormallikler görülmüştür (55). Matriks metalloproteinazları (MMP) ekstraselüler matriksi yıkan enzimlerdir (56-60). Normal endometriyumda ekspresyonları overyan hormonlara bağlıdır (58). MMP-1, MMP-3 ve MMP-7 seviyelerinin proliferatif fazda arttığı, sekretuar fazda ise azaldığı saptanmıştır (61). Aynı zamanda bu enzimler tümöral hastalıklarla (61) ve endometriyozisle ilişkilendirilmiştir (56-59,63). MMP aktivitesi progesteronun kontrolü altındadır. Ancak endometriyozisli hastalarda ekspresyonları progesteron supresyonuna dirençlidir (56). Endometriyozisli hastaların ötopik endometriyumunda artmış MMP-2 ve azalmış doku MMP inhibitörü seviyeleri saptanmıştır (64). Başka bir çalışmada ise ötopik endometriyal dokuda kontrol grubuna göre artmış VEGF, MMP-1, MMP-9, Angiopoietin 1-2 seviyeleri saptanmıştır (65). Bu bulgular sorunun kaynağında menstrüel reflünün de öncesinde implantasyon yeteneği olan anjiyogeneze yatkın endometriyal hücrelerin olduğunu düşündürülebilir.

Endometriyozis östrojen bağımlı bir hastalıktır. Östrojen üretimi ve metabolizmasındaki moleküler değişimler endometriyozisin gelişimine katkı sağlar. Östrojen lokal siklooksijenaz tip 2 (COX-2) enzimini aktivite ederek prostaglandin E2 (PGE2)'nin artmasına yol açar. Prostaglandin E2 ise androjenlerin östrojene dönüşümünü gerçekleştiren aromataz enzimi için önemli bir uyarıcıdır (66). 17 beta hidroksisteroid dehidrogenaz enzimi sayesinde östron ve östradiol birbirine çevrilebilmektedir. Enzimin 2 ayrı tipi vardır. Tip 1 17 beta hidroksisteroid dehidrogenaz enzimi östronu östradiole çevirirken, tip 2 tam tersi reaksiyonu katelize eder. Endometriyozisli hastalarda tip 1 17 beta hidroksisteroid dehidrogenaz enzim aktivitesinin normal olduğu, ancak östradiolü östrona çeviren tip 2 17 beta hidroksisteroid dehidrogenaz enzim aktivitesinin anormal derecede azaldığı izlenmiştir. Bu durumun da tip 2 17 beta hidroksisteroid dehidrogenaz enzim aktivitesini arttıran progesteron B tipi reseptörlerinin endometriyotik dokularda bulunmamasıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir (67).

### 2.1.3. İMMÜNOLOJİ

Vinatier ve arkadaşlarının ikinci teorisine göre problem hücrel ve hümoral immünitededir. Kadınlarda peritoneal kaviteden endometriyal hücrelerin temizlenmesinin mekanizması tam olarak anlaşılammıştır, ancak bu mekanizmada natural killer (NK) hücrelerin rol aldığı düşünölmektedir (68). NK hücreler tümör hücrelerini, virüsle enfekte konak hücrelerini ve transplante edilen yabancı hücreleri tanıyıp, yok ederler. Endometriyozisli kadınlarda otolog ve heterolog endometriyal hücrelere karşı azalmış peritoneal ve periferel NK hücre aktivitesi ve sitotoksite gözlenmiştir (69-70). Azalmış peritoneal NK hücre sitotoksitesi hastalığın evresi ile ilişkilendirilmiştir (71). Benzer şekilde endometriyozisli hastalarda periton sıvısında (69) ve serumda (72) fertil kontrol grup ile karşılaştırıldığında NK hücre aktivitesi daha fazla baskılanmış bulunmuştur. NK hücrelerde sitotoksitede azalma olduğu yönünde görüş birliği olsa da bu hücrelerin sayıları ve buldukları bölgede popölasyon içindeki yüzdeleri konusunda çelişkili sonuçlar vardır (73).

Endometriyozisli hastalarda periferel kan lenfositlerinin endometriyal antijen ve hücrelerle karşılaştığında düşük proliferasyon gösterdiği (74-75) ve daha az yıkım yaptığı gösterilmiştir (75). T hücrelerin endometriyozis patofizyolojisine etkisi konusunda çelişkili sonuçlar vardır (76).

Periferel (77) ve peritoneal (31,78-80) makrofajların endometriyozisli hastalarda aktive olduğu gözlenmiştir. Periferel makrofaj (77) sayılarının artmadığı ancak peritoneal makrofaj (31,78-81) sayılarının ve konsantrasyonlarının arttığı saptanmıştır. Bu artmış aktivite sonucu salınan büyüme faktörleri ve sitokinler endometriyotik lezyonların oluşumu ve progresyonuyla ilişkilendirilmeye çalışılmıştır.

Hücrel immünite ve endometriyozis arasında kurulan ilişki hümoral immüniteyle endometriyozis arasında kurulammıştır. B hücre aktivitesi ve otoantikör varlığı konusunda çalışmalarda çelişkili sonuçlar vardır (73).

İmmün tanımadan kaçma mekanizması, immünohit-endometriyal implant etkileşmesini engelleyen protein sekresyonu ile gerçekleşir. Bu faktörlerden birisi soluble adezyon molekülü olan interselüler adezyon molekülü-1 (ICAM-1) dir. ICAM-1 bir grup immün hücrede sentezlenen hücre yüzey integrin ligandı olan bir koreseptördür (68). Endometriyotik stromal hücreler ötopik endometriyal hücrelerle karşılaştırıldığında daha fazla solubl ICAM-1 salgılandığı gösterilmiştir. Ayrıca endometriyotik doku kültürleri

endometriyal stromal hücre kültürleri ile karşılaştırıldığında ICAM-1 mRNA ve protein sentezinin fazla olduğu gösterilmiştir (76).

Diğer bir hipotez ise Fas antijeni (Fas) -Fas ligand (Fas L) ekspresyon sistemidir. Fas L eksprese eden hücreler Fas bulunduran immün hücreler ile bağlandıktan sonra Fas reseptörü olan immün hücrelerin apoptozise uğramasına neden olur. Makrofajlardan salınan büyüme faktörlerine yönelik yapılan bir çalışmada platelet derive büyüme faktör (PDGF) ve transforming büyüme faktör-  $\beta_1$ 'in (TGF- $\beta_1$ ) Fas L ekspresyonunu arttırdığı ancak bazik fibroblast büyüme faktörün (bFGF) ekspresyonu etkilemediği saptanmıştır. Bu şekilde immün hücreler Fas L taşıyan endometriyal epitel hücreleri ile bağlandıktan sonra apoptozise uğrar ve endometriyal epitelyal hücreler immün yanıtta korunur (82).

#### **2.1.4. EPİDEMİYOLOJİ VE RİSK FAKTÖRLERİ**

Toplumda gerçek prevalansı tam olarak bilinmemekle birlikte üreme çağındaki kadınların yaklaşık %5-15'de tespit edilmiştir. Kronik pelvik ağrısı olan kadınlarda %5-20 oranında, infertilite sorunu yaşayan kadınların %20-40'da endometriyozis saptanmaktadır (2-7). Asemptomatik kadınlarda prevalansı yaklaşık %4'dür (83-84). Olguların % 2-4'ünde postmenopozal dönemde gözlenir (25).

Menarş öncesi ve menopoz döneminde görülme sıklığı azalırken, hastalık üreme çağında pik yapmaktadır. Hastalık sıklıkla sosyoekonomik seviyesi yüksek olan beyaz ırkta görülmektedir. Nulliparlarda daha sık görülse de sekonder infertilite nedeni de olabilmektedir. Aile öyküsü olanların risk altında olduğu saptanmıştır. Epidemiyolojik çalışmalarda alkol ve kafein kullanımının riski arttırdığı, sigaranın ise antiöstrojenik özelliğinden dolayı endometriyozis oluşumunu engellediği tespit edilmiştir (3).

#### **2.1.5. TANI**

Endometriyozis tanısı histolojik olarak ektopik endometriyal bezlerin ve stromanın varlığı ile konur. Ancak yapılan tüm çalışmalara rağmen yüksek sensitivite ve spesifisiteye sahip bir alternatif noninvazif test bulunamamıştır. Cerrahi halen altın standart yöntemdir. Öykü ve fizik muayene diğer kronik pelvik ağrı nedenlerinin ayırıcı tanısını yapmada faydalı olmaktadır. Transvajinal USG tipik endometriyoma vakalarını saptamada çoğu zaman

yeterlidir. CA-125 ölçümü ve abdominopelvik MRG endometriyomaların tanısında sıklıkla kullanılmaktadır.

### **2.1.5.1. KLİNİK TANI**

Kronik pelvik ağrı, endometriyoziste en sık karşılaşılan semptomdur. Dismenore, disparoni, intermenstrüel ağrı, sırt ağrısı, defekasyon esnasında ağrı diğer semptomlardır (85-86). Endometriyoziste ağrı genellikle mens öncesi başlar, mens süresince devam eder ve bazen de mensin bitiminin ardından da sürer. Ağrının şiddeti ile hastalığın şiddeti arasında bir ilişki saptanamamıştır (87-89). Endometriyozisli hastalarda ağrıya neden olan olası mekanizma, lokal peritoneal enflamasyon, doku hasarı ile birlikte olan derin infiltrasyon, adezyon formasyonu, fibrotik kalınlaşma ve endometriyotik implantlarda menstrüel kanın birikimidir (90-91). Ayrıca endometriyozis bozulmuş adneksiyal anatomi, oosit ve embriyo gelişimindeki bozukluklar ve azalmış endometriyal reseptivite nedeniyle infertiliteye neden olabilir.

Fizik muayenede eksternal genitalya tipik olarak normaldir. Spekulum muayenesinde mavi renkli implantlar ve dokunulduğunda kanayabilen kırmızı proliferatif lezyonlar gözlenebilir. Bimanuel muayenede arka vajinal fornikte sert nodüllerin palpe edilmesi, uterin hareketlerde hassasiyet olması, endometriyomalardan kaynaklanan sert adneksiyal kitlelerin bulunması endometriyozisi düşündürmektedir (92). Ancak şiddetli olarak tanıdan şüphe edildiğinde normal fizik muayene bulguları tanıyı ekarte ettirmez.

### **2.1.5.2. CA-125**

CA-125 çölemik epitelyum derivatifleri tarafından eksprese edilen hücre yüzey antijenidir. Sıklıkla epitelyal over kanserinde tanı veya monitörizasyon amaçlı kullanılır. İleri evre endometriyozisi olan olgularda seviyeleri artmıştır (93-95). Tanı koymada duyarlılığı düşüktür. Erken gebelik haftalarında, normal menstrüasyon döneminde, leyomyomu veya pelvik inflamatuvar hastalığı olan kadınlarda seviyeleri yükselebilmektedir (96).

CA-125'in özgüllüğünün, çoğu çalışmada %80'in üzerinde olduğu bildirilmiştir. Ancak düşük duyarlılık düzeyi (%20-50), bu testin endometriyozis tanısı için klinik kullanımında sınırlamalara sebep olmuştur. Seri CA-125 kontrolleri, tedavi sonrası endometriyozisin yeniden ortaya çıkışını tahmin etmede kullanılabilir (97).

### **2.1.5.3. GÖRÜNTÜLEME YÖNTEMLERİ**

Endometriyozisin görüntülenmesinde transvajinal USG, transrektal USG ve MRG gibi çeşitli görüntüleme yöntemleri denenmiştir. Görüntülemeye ilk başvurulması gereken yöntem transvajinal USG'dir. Transvajinal USG ve pelvik MRG endometriyomaların tanısında ve diğer over kistlerinden ayrımının yapılmasında faydalı yöntemlerdir. Pelvik MR diğer görüntüleme yöntemlerinden farklı olarak pelvik adezyonları veya yüzeysel peritoneal endometriyozis odaklarının tanısında transvajinal USG'ye üstündür. Ancak cerrahide saptanan adezyonların %30-40'ını saptar.

### **2.1.5.4. TERAPÖTİK DENEMELER**

Gonadotropin salgılayıcı hormon agonistlerinin (GnRHa) tanı koyma amaçlı ampirik uygulaması bir çalışmaya göre semptomlarda azalma sağlayarak cerrahi öncesi % 82 hastaya tanı konulmasını sağlamıştır (98). Ancak ampirik tedaviye yanıt güvenilir değildir (99).

### **2.1.5.5. CERRAHİ TANI**

Endometriyozis tanısında altın standart yöntem laparoskopik olarak ektopik endometriyal lezyonların görüntülenmesi ve bu lezyonların histopatolojik olarak incelenmesidir. Lezyonların çeşitliliği nedeniyle cerrahi sırasında dikkatli bir inspeksiyon gerekmektedir. Laparoskopide klasik peritoneal implantlar fibrozisin çevrelediği mavi-siyah "barut yanığı" lezyonlardır. Ancak lezyonlar atipik beyaz ve opak, kırmızı ve alev şeklinde veya veziküler şekilde izlenebilir. Pigmente lezyonlar metabolik olarak aktif, ileri evre bir hastalığı göstermektedir. Endometriyomaların içeriği yoğun kahverengi çikolata kıvamlıdır. Laparoskopide içeriğinin aspire edilmesiyle diğer over kistlerinden ayırt edilebilirler. Görülebilir bir hastalık mevcut değilse tanıdan şüphe edildiğinde overyan aspirasyon ve puncture denenebilir. Asemptomatik infertil hastalardan alınan peritoneal biopsilerde cerrahide her hangi bir odak saptanamasa da endometriyozis tanısı mikroskopik olarak konulabilmektedir ancak bu durum çok nadirdir (47, 100).

### **2.1.5.6. KLASİFİKASYON SİSTEMİ**

Endometriyozis için geçerli evreleme sistemi 1996 yılında kabul edilen Amerikan reproduktif tıp cemiyetine göre gözden geçirilmiş endometriyozis sınıflamasıdır (Tablo 1). İmplantların görünümü, boyutu, peritoneal ve overyan implantların derinliği, adneksiyal adezyonların varlığı, yaygınlığı ve tipi ile cul-de sac obliterasyonuna göre puanlama yapılmaktadır (101). Bu sistem endometriyozisin şiddetini yansıtır, fakat ağrı veya infertiliteyi öngörmeye kullanılamaz. Subjektif bir yöntem olduğu için gözlemcilerden kaynaklanan farklılıklar söz konusu olabilir.

Hastalığın şiddeti bulguların puanlaması sonucu elde edilen toplam skora göre verilir. Bu sisteme göre endometriyozis minimal, hafif, orta ve şiddetli olmak üzere dört evreye ayrılır. Endometriyomanın çapı 3 cm'nin üzerinde ise hastalık Evre III veya üzerindedir. Cul-de sac'ın tam obliterasyonu hastalığın Evre IV olduğunu gösterir.



**Tablo 1.** Amerikan Reprodüktif Tıp Cemiyeti'ne Göre Gözden Geçirilmiş Endometriyozis Sınıflandırılması

	Endometriyozis	<1 cm	1-3 cm	>3 cm
Periton	Yüzeysel	1	2	4
	Derin	2	4	6
Over	R Yüzeysel	1	2	4
	R Derin	4	16	20
	L Yüzeysel	1	2	4
	L Derin	4	16	20
	Posterior Cul-de-sac obliterasyonu	Kısmi 4		Tam 40
	Adezyonlar	<1/3 Tıkanıklık	1/3-2/3 Tıkanıklık	>2/3 Tıkanıklık
Over	R İnce	1	2	4
	R Yoğun	4	8	16
	L İnce	1	2	4
	L Yoğun	4	8	16
Tuba	R İnce	1	2	4
	R Yoğun	4	8	16
	L İnce	1	2	4
	L Yoğun	4	8	16

Evre I (minimal): 1-5

Evre II (hafif): 6-15

Evre III (orta): 16-40

Evre IV (ciddi): >40

## **2.1.6. TEDAVİ**

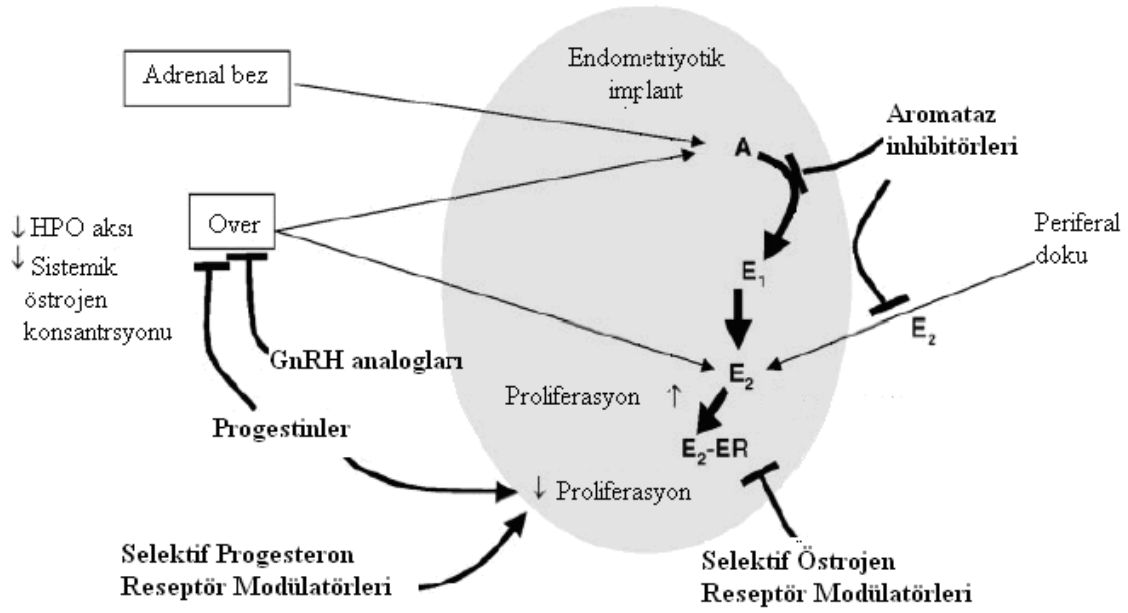
Endometriyozis tedavisinde hedef semptoma yönelik ağrının giderilmesi, fertilitenin sağlanması, korunması ve endometriyotik odaklardaki tekrarlama ya da ilerlemenin geciktirilmesi veya önlenmesidir (102). Bu hedeflere ulaşmak için patogeneizde en çok sorumlu tutulan retrograd menstrüasyon teorisine yönelik tedavi stratejileri geliştirilmiştir. Böylelikle sıklık menstrüasyon azaltılmış veya elimine edilmiş ve yeni implant oluşumu ve var olan implantların aktivitesi engellenmiştir. Tedavi alternatifleri; bekleme tedavisi, medikal tedavi, cerrahi tedavi veya bu seçeneklerin beraber uygulanmasıdır.

### **2.1.6.1. BEKLEME TEDAVİSİ**

Evre I ve II endometriyozis hastalarında bekleme ile %55-75 arasında konsepsiyon elde edildiği için bekleme tedavisi uygun bir seçenektir. Şiddetli hastalığı mevcut olan hastalar bu yöntemden fayda görmeyecektir (103).

### **2.1.6.2. MEDİKAL TEDAVİ**

Endometriyozis östrojene bağımlı bir hastalıktır. Tedavide kronik anovulasyon, yalancı gebelik (oral kontraseptifler ve progesterinler) veya yalancı menopo (Gonadotropin salgılayıcı hormon analogları) ortamları sağlanarak endometriyozisin semptomlarının azaltılması hedeflenmektedir (85). Tüm medikal tedavi seçenekleri semptomların azaltılması açısından benzer etkinliğe sahiptir (102). Ancak tedavi edici etkiden çok fazla söz edilemez. Özellikle infertilite şikayeti olan hastalarda geleneksel medikal tedavilerin faydası saptanamamıştır (104). Şekil 2'de endometriyoziste medikal tedavi modaliteleri ve etki mekanizmaları özetlenmiştir.



**Şekil 2.** Endometriyoziste Medikal Tedavi Modaliteleri ve Etki Mekanizmaları (102)

Danazol midsiklus luteinize edici hormon (LH) pikini inhibe edip kronik anovulasyonu sağlayan 17-alfa etinil testosteronun bir isoksazol türevidir. Seks hormon bağlayıcı globuline bağlanarak serbest testosteron seviyelerini artırır. Overlerde LH dalgası ve steroidogenezi baskılar, hipoöstrojenik çevre oluşturur. Önerilen doz oral yolla günlük 600-800 mg'dır. Birçok çalışmada etkinlikleri gösterilse de (102) androjenik yan etkileri nedeniyle artık tercih edilen bir tedavi modalitesi değildir. Tedavi sırasında karşılaşılan yan etkiler kilo alma, sıvı retansiyonu, yorgunluk, akne, yağlı cilt, hirsütizm, atrofik vajinit, sıcak basmaları, kas krampları, duygusal labilite ve lipid profilinde değişimlerdir.

Medroksiprogesteron asetat (MPA) ve 19-nortestosteron türevleri endometriyal dokuda desidualizasyona yol açarak endometriyal atrofi oluşturmaktadır. Yüksek dozlarda ovulatuvar fonksiyonu bozabilir. Medroksiprogesteron asetatın oral alımda günlük dozu 20-100 mg, 3 aylık intramusküler dozu 150 mg'dır. Norethindrone asetat 15-20mg/gün, megesterol asetat 40 mg/gün olarak önerilmektedir. Kırılma kanamaları, kilo alma, sıvı retansiyonu, memede hassasiyet ve depresyon karşılaşılabilecek yan etkilerdir. Endometriyal bezlerde atrofi, stromada yaygın desidualizasyon ve apoptotik aktivitede artış sağladığı için levonorgestrel (LNG) salınımlı rahim içi araç (RIA) adenomyozis, dismenore, menoraji, kronik pelvik ağrı ve semptomatik endometriyozis tedavisinde kullanılmaktadır (105).

Gestrinon antiprogestinek, antiöstrojenik ve androjenik etkilere sahip 19-nortestosteron türevidir. İki üç günde bir 2.5-10 mg olarak kullanılır. Yan etkileri danazol ile ilişkili yan etkilere benzemektedir.

DMPA-SC 104 depo medroksiprogesteron asetat'ın (DMPA) 104 mg/0.65 ml subkütan uygulanabilen özel bir formudur. Her üç ayda bir uygulanır. DMPA-SC 104'ü leuprolid asetat ile kıyaslayan iki uluslararası randomize çalışmada tedavi sonrası 12 ay takipte benzer etkinlik saptanmıştır (106-107). Ancak tedavi sonrası 6. ayda DMPA-SC 104 ve leuprolid asetat kullanan hastaların kemik mineral dansiteleri karşılaştırıldığında DMPA-SC 104 kullanan hastaların daha iyi skorlara sahip olduğu saptanmıştır. Ancak DMPA-SC 104 tedavisi daha fazla kanama ve lekelenme ile ilişkili bulunmuştur (106).

Kombine oral kontraseptifler (KOK) daha az metabolik etkiye sahip olmaları nedeniyle iyi tolere edilirler. Bu nedenle endometriyozis hastalarında en sık kullanılan medikal tedavi modalitesidir. Siklik veya devamlı kullanılabilirler. Endometriyal atrofi ve desidualizasyon yaparak yalancı gebelik ortamı oluştururlar. 6-12 aylık tedavide hastaların %75-90'ında ağrı palyasyonu sağlanmaktadır (108-109). Postoperatif kullanımlarının rekürens azaltmada her hangi bir etkinliği bulunmamıştır (110). Goserelin ile düşük doz KOK tedavisini disparoni ve pelvik ağrı palyasyonu açısından kıyaslayan bir çalışmada GnRH analogları disparoni tedavisinde daha etkiliyken pelvik ağrıda iki grubun bezer etkinliğe sahip oldukları bulunmuştur (111). Yan etki profili anormal kanamalar, kilo alma, sıvı retansiyonu, bulantı ve trombozu içermektedir. Progestajen ajanlar ve oral kontraseptif kullanımında oluşabilecek ara kanamaların üstesinden kısa dönem östrojen kullanımıyla gelinebilir.

GnRHa pitüiter bezde yerleşmiş gonadotropin üzerindeki gonadotropin salgılayıcı hormon reseptörlerine (GnRHr) bağlanan GnRH'nın modifiye formlarıdır. Doğal GnRH'ya oranla reseptörlere daha uzun bağlanabilirler ve hipofiz bezini devamlı uyarıya maruz bırakırlar. İlk başta sağladıkları saman alevi etki (flare etki) sonrası reseptör konsantrasyonlarında azalmaya yol açarlar. GnRH'nın pulsatile salınımının bozulması ile sirküle olan folikül stimüle edici hormon (FSH) ve LH seviyeleri düşmekte, medikal oofektomi ya da geçici menopoz ortamı oluşturulmaktadır. Nafarelin, buserelin, histrelin, goserelin, triptorelin ve leuprolid asetat tedavide kullanılmış GnRH analoglarıdır. GnRHa intranazal, intramusküler veya subkütanöz kullanılabilir. Bir veya üç ayda bir uygulanan depo formları dışında günlük kullanılabilen formları vardır. GnRH analogları ile tedavi sonrası rekürens 2.yıl %28 iken, 5.yıl %53'e ulaşmaktadır (112). Başlıca yan etkileri vajinal kanama,

sıcak basmaları, vajinal kuruluk, azalmış libido, meme hassasiyeti, uykusuzluk, osteoporoz ve depresyondur. Özellikle kemik mineral yapısına yönelik olumsuz etkileri azaltmak adına kombine östrojen-progestin, düşük doz östrojen, tibolon, bifosfonat veya selektif östrojen reseptör modülatörü (SERM) gibi geri ekleme tedavileri uygulanmaktadır. GnRHa'nın danazol ve yüksek doz progestin tedavilerinde görülen serum lipid profili ve lipoprotein konsantrasyonu üzerine olumsuz etkileri yoktur.

Mifepriston (RU-486), SERM, selektif progesteron reseptör modülatörleri (SPRM), GnRH antagonistleri, aromataz inhibitörleri, TNF-alfa inhibitörleri, MMP inhibitörleri, anjiyogenez inhibitörleri ve pentoksifilin gibi fosfodiesteraz inhibitörleri endometriyozis tedavisinde hala araştırılan tedavi seçenekleridir.

### **2.1.6.3. CERRAHİ TEDAVİ**

Endometriyozisin cerrahi tedavisinde amaç görülebilir tüm lezyonları olabildiğince eksize etmek ve normal anatomik yapıyı sağlamaktır. Fertilité üzerine etkisi bulunmayan medikal tedavinin aksine cerrahi tedavi hem ağrı palyasyonu, hem de fertilité üzerine olumlu etkiye sahiptir (113). Ancak cerrahi tedavi uygulanan hastalarda dahi rekürens hızları yüksektir. İkinci yıl rekürens hızı % 21.5, beşinci yıl % 40-45'dir (114). Hornstein ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmaya göre bir yılın sonunda pelvik ağrının rekürensi %51, Valle ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmaya göre üç yılın sonunda %7-30, beş yılın sonunda %40-50'dir (102). Bu sonuçlar medikal tedavinin rekürens hızıyla benzerdir.

Cerrahi tedavide laparoskopi cerrah açısından daha iyi vizüalizasyon sağlaması, hasta açısından ise daha küçük insizyon, kısa hospitalizasyon süresi ve hızlı iyileşme gibi avantajları nedeniyle laparotominin önüne geçmiştir. Postoperatif dönemde adezyon formasyonu ve komplikasyon oranlarının laparoskopi ile daha düşük olması diğer bir avantajdır (115).

Laparoskopik kistektomi endometriyotik kistlerin cerrahi tedavisinde ilk tercih olarak seçilmelidir. Kist drenajı hastalığın tekrar etme olasılığı nedeniyle tercih edilmemektedir (116). Kistektominin teknik olarak zor olduğu durumlarda, drenaj ve bipolar koagülasyonla kist duvarına hasar verilmesi düşünülebilir. Kistektominin aspirasyon ve koagülasyona üstünlüğü histopatolojik inceleme yapılabilmesidir. Postoperatif adezyon oluşma riski,

ortalama operasyon süresi, kan kaybı, hospitalizasyon süresi, komplikasyon ve laparotomiye geçme riski yöntemler arasında istatistiksel olarak farklı değildir (117).

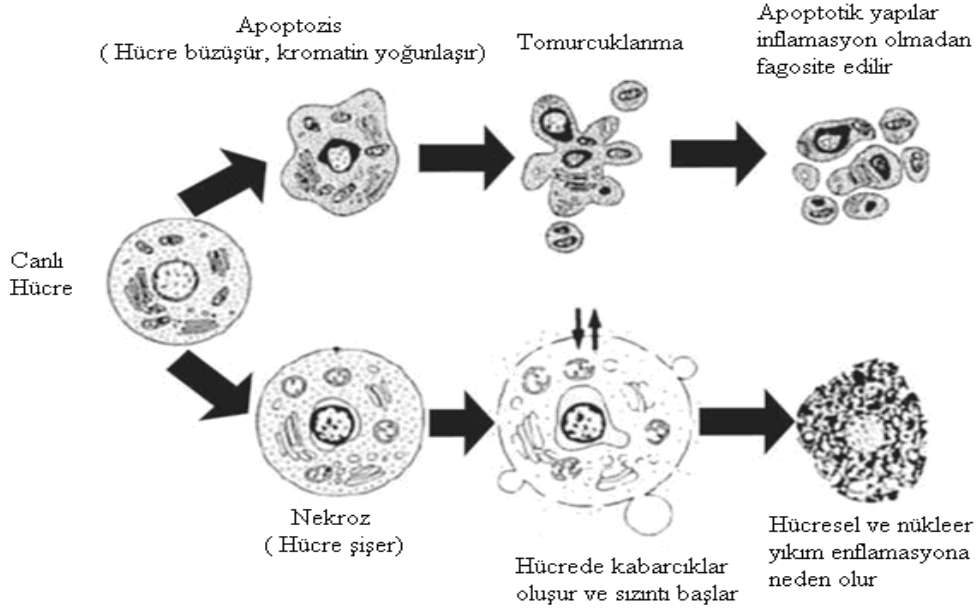
Presakral nörektomi ve laparoskopik uterin sinir ablasyonu (LUNA) dismenore ve pelvik ağrı yönetiminde diğer seçeneklerdir. LUNA ile uterustan çıkan uterosakral ligaman içindeki eferent duyu liflerine ve onların sekonder gangliyonlarına hasar verilmektedir. Presakral nörektomi ise, süperiyör hipogastrik pleksus seviyesinde uterus ve santral pelvisin sempatik innervasyonunun bozulmasıdır. Ancak yapılan kontrollü çalışmalarda konservatif tedaviye her hangi bir ek fayda sağlamadığı saptanmıştır. Bu işlemlerin başlıca komplikasyonları komşu venöz pleksuslardan kanama veya üreteral hasardır (118).

Fertilitesini tamamlamış ve konservatif tedaviden fayda görmeyen hastalarda uterus ve overlerin alınması düşünülebilir. Sadece histerektomi seçilmiş hasta gruplarına uygulanabilir. Overlerin korunduğu cerrahi müdahalelerde 6 kat artmış rekürrens ve reoperasyon riski mevcuttur (119).

Medikal tedavi cerrahi öncesinde veya sonrasında uygulanabilir. Preoperatif medikal tedavinin implant büyüklüğünü azaltarak rektovajinal endometriyosis haricinde rekürrensi azalttığı saptanmıştır (120). Ancak ağrı kontrolünde ve fertilitate açısından cerrahi tedaviye bir katkısının olduğu gösterilememiştir (113). Postoperatif medikal tedavinin kullanımı konusu çelişkilidir. Amaç ağrı palyasyonu ise cerrahi sonrası medikal tedavi önerilebilir ancak gebelik istemi mevcutsa özellikle ilk bir sene gebe kalma şansının yüksek olması nedeniyle cerrahi sonrası medikal tedavi önerilmemelidir.

### **2.1.7. APOPTOZİS**

Hücre ölümü iki farklı mekanizma ile gerçekleşir: nekroz ve apoptozis. Apoptozis veya programlı hücre ölümü istenmeyen hücrelerin enflamatuvar yanıt oluşturmaksızın fizyolojik olarak eradikasyonudur. İlk olarak 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie tarafından tanımlanmıştır. Kerr ve arkadaşları hücre ölümlerini morfolojik olarak takip ederken, ölen hücrelerin parçalandığını ve bu parçaların tekrar membranla kaplanarak daha küçük küreciklere dönüştüğünü ve bunların da makrofajlar tarafından fagosite edildiğini saptamıştır. Şekil 3'de apoptozis ve nekrozda karşılaşılan hücresel değişiklikler gösterilmektedir.

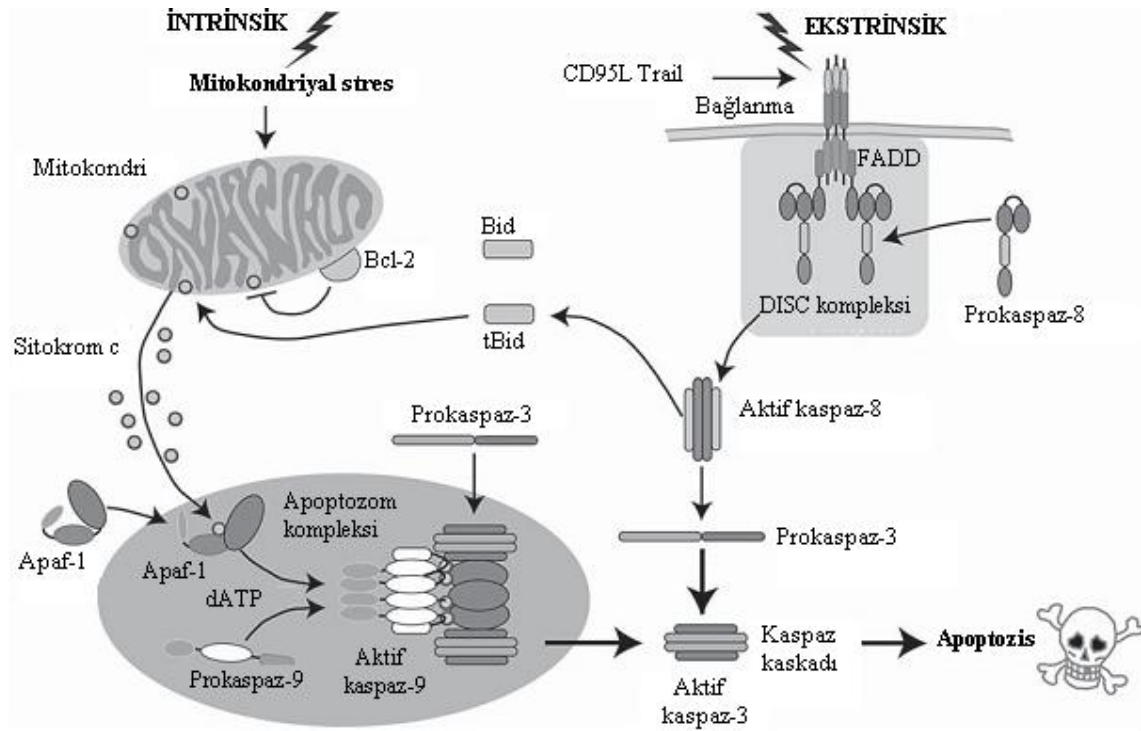


**Şekil 3.** Apoptozis ve Nekrozda Karşılaşılan Hüresel Değişiklikler (121)

Apoptozis süreci çok hücreli organizmalarda hemostazın sağlanmasında, embriyogenezde ve patojenlere karşı savunmada kritik bir role sahiptir (122). Hücre sayısının hemostatik kontrolü hücre proliferasyonu ve hücre ölümü arasındaki dinamik dengeye dayanır. Apoptozisin nekrotik hücre ölümünden en büyük farkı fragmente olmuş nükleusların ve parçalanmış hücreye ait tüm yapıların plazma membranı ile kaplanarak immün sistemi enflamasyon yönünde uarmamasıdır. Nekrotik ölüm ise çoğunlukla bir hücre hasarı ile ortaya çıkar. Hasarlanan hücre önce şişer ve sonra parçalanır. Hücrelerin parçalanması sonucu ortaya çıkan prostaglandinler, lökotrienler, serotonin ve histamin gibi vazoaaktif aminler hasara en yakın damar endotelini uyarır. Bu biyokimyasal olayların ardından iltihaplanma dediğimiz kızarıklık, ödem ve ağrı ile tanımlanan enflamatuar reaksiyonlar başlar. Apoptozis, nekrozun tam tersine tamamen kontrollü ve programlı bir hücre ölümüdür.

Apoptozisin 3 fazı mevcuttur. İlk faz indüksiyon fazıdır. Büyüme faktörlerinin eksikliği, iyonize radyasyon, kimyasallar, DNA hasarı gibi birçok etken indüksiyonu başlatabilir. Yürütme fazı intrinsik ve ekstrinsik yollarla başlatılabilir. Şekil 4’de intrinsik ve ekstrinsik apoptozis yolları şematize edilmiştir. Ekstrinsik yolak, hücre membranında bulunan Fas, TNF ya da TRAIL reseptörlerine uygun ligandların bağlanması ile aktive olur. Kaspaz 8’in aktivasyonu ile son bulur. İntrinsik yolak ise mitokondriyal membranın zarar

görmesi nedeniyle salınan mitokondriyal proteinler (örn. sitokrom c) sayesinde aktive olur (121). Sitokrom c (Cyc-c) salınımının önemli bir regülatörü Bcl-2 ailesi proteinleridir. Bunlar pro-apoptotik veya anti-apoptotik olabilirler. p53'ün mitokondriyal anti-apoptotik proteinlere bağlanması (örn. Bcl-xl) Bax ve Bak'ın supresyonunu inhibe ederek mitokondriyal por oluşumunu ve sitokrom c'nin salınımına neden olur. Biyokimyasal ve morfolojik değişiklikler fazında çift sarmallı DNA kalsiyum-magnezyuma bağlı endonükleazlar tarafından nükleozomal parçalara ayrılır. Morfolojik olarak mitokondriyal membranlarda por oluşumu, membranlarda kabarcıklanma, nükleer membranda kromatin agregasyonu, sitoplazmik büzüşme ve hücre fragmantasyonudur (122). Apoptozisin bir başka karakteristik bulgusu fosfatidilserinin plazma membranının dışına translokasyonudur ki bu da fagositik tanıma için önemlidir.



**Şekil 4.** İntrinsik ve Ekstrinsik Apoptozis Yolakları (121)

### 2.1.7.1. APOPTOZİS VE BCL-2 AİLESİ

Apoptozisi kontrol eden genler konusunda ilk ayrıntılı bilgiler, *C.elegans* adlı solucanın incelenmesi sonucu elde edilmiştir (123) *C.elegans* ile yapılan çalışmalar sonucunda görülmüştür ki, her hücre hayatta kalabilmek için ölümü engelleyici mesaj (Egl-1)



yollayabilirken, ölümü başlatıcı mesaj da yollayabilir (Ces-1 ve Ces-2). Apoptotik sinyal yandaki hücreden gelebileceği gibi hücrenin kendinden de gelebilir (124).

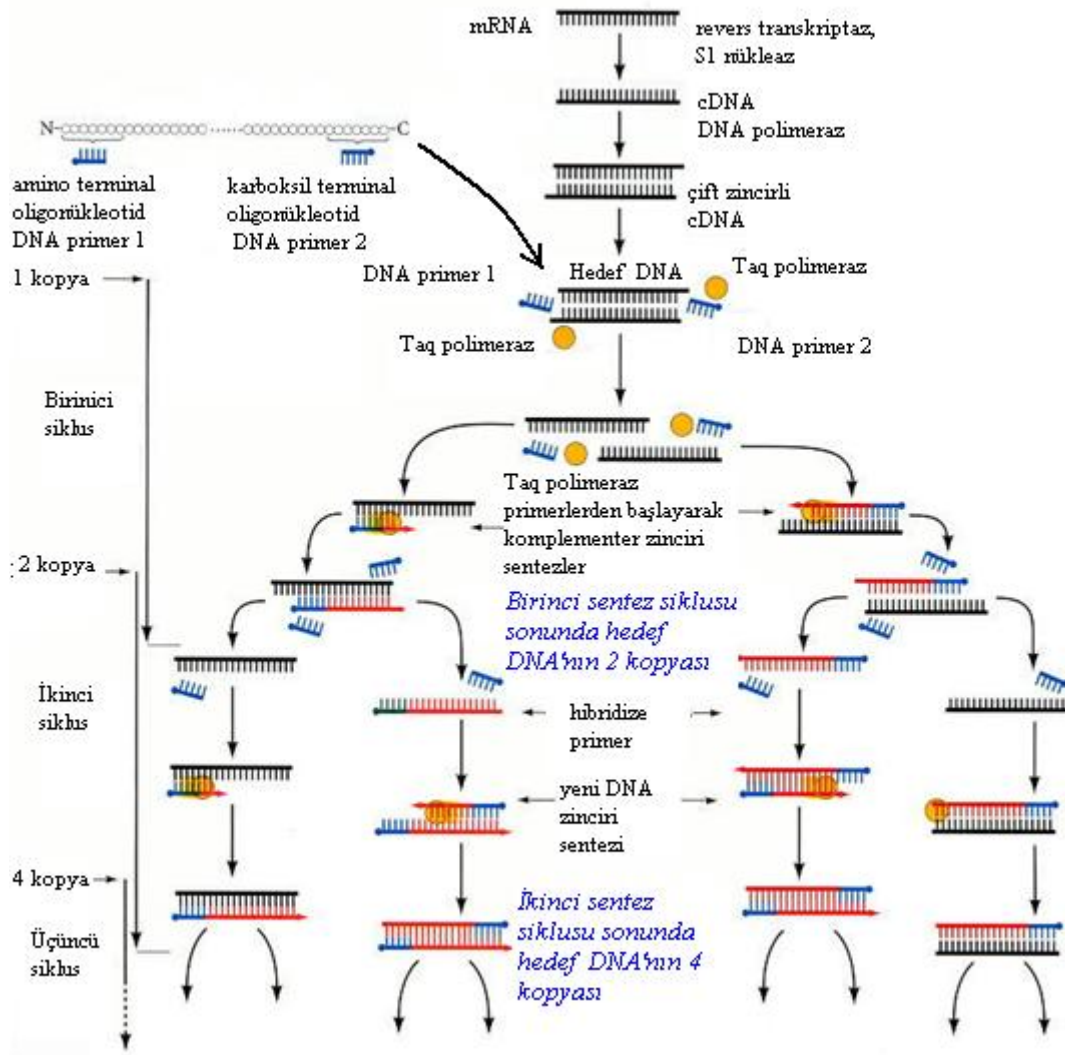
B Hücreli Lenfoma/Lösemi 2 (Bcl-2) geni ilk olarak folliküler B hücreli lenfoma hücrelerinden elde edilmiş bir proto-onkogendir. Günümüze kadar 19 tane Bcl-2 ailesine ait üye protein tanımlanmıştır. Bcl-2 ailesi üyesi proteinler apoptozu mitokondriyal seviyede kontrol eden ana proteinlerdir. Bu üyeler Bcl-2 homoloji ünitelerine (BH1-BH2-BH3-BH4) sahiptir. Bcl-2 üyeleri fonksiyonları ve yapılarına göre üçe ayrılabilirler (125).

- 1- Anti-apoptotik üyeler: Bu üyeler BH1 ve BH2 ünitelerini içerirler ve hücreyi apoptoza karşı korurlar. En önemlileri şunlardır; Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-w, Mcl-1
- 2- Pro-apoptotik üyeler: Bu üyeler apoptozda rol oynarlar ve BH4 dışındaki diğer üniteleri içerirler. En önemlileri şunlardır; Bax, Bak, Bok.
- 3- Sadece BH3 ünitesi içeren üyeler: Pro-apoptotik rolleri vardır. En önemlileri şunlardır; Bid, Bad, Bim, Bik

Bcl-2 geni Bcl-2 ailesinin bir üyesidir ve hücre proliferasyonuna neden olmadan hücre ölümünü engelleyen bir proto-onkogendir (126). Bcl-2'nin etkinliği kendisi gibi Bcl-2 ailesinin bir üyesi olan potansiyel antagonisti Bax geninin konsantrasyonuna bağlıdır. Bu nedenle Bcl-2/Bax oranı apoptozise duyarlılığı göstermede önemlidir (127). Bu ailenin diğer bir üyesi olan Bcl-x'in iki ayrı formu iki farklı etkinlik gösterir. Bcl-x<sub>long</sub> Bcl-2 benzeri anti-apoptotik etki gösterirken, Bcl-x<sub>short</sub> pro-apoptotik etki gösterir. Yapılan çalışmalar da Bcl-2 ailesi proteinleri dışında apoptozisi regüle eden birçok protein bulunmuştur. Bunlarda bir kısmı Fas, FasL, TNF (tümör nekrozis faktör), tümör nekrozis faktör reseptörü (TNFR), p53 ve Myc'dir.

#### **2.1.7.2. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU İLE APOPTOTİK GEN EKSPRESYONLARININ SAPTANMASI**

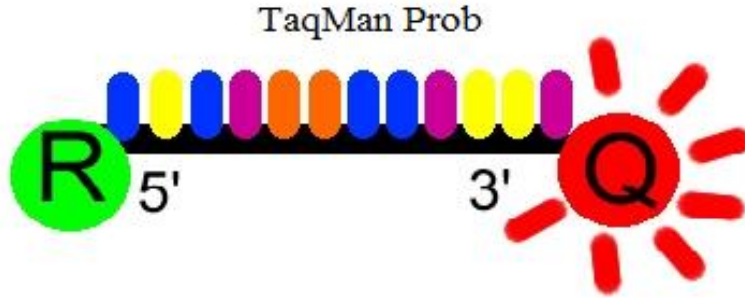
Polimeraz zincir reaksiyonu çok küçük miktarlardaki spesifik DNA fragmanlarından çok sayıda üretebilen in-vitro klonlama yöntemidir. Bu yöntem spesifik geni klonlamak ya da spesifik genin aktif olarak RNA'ya transkribe olup olmadığını saptamak amaçlı kullanılabilir. Bu teknik özellikle çok küçük miktarlarda nükleik asit varlığında yapılacak çalışmalarda faydalıdır. Şekil 5'de mRNA'nın saptanmasında PCR yönteminin kullanımı özetlenmiştir.



Şekil 5. mRNA Ekspresyonunun Tespitinde Polimeraz Zincir Reaksiyonu

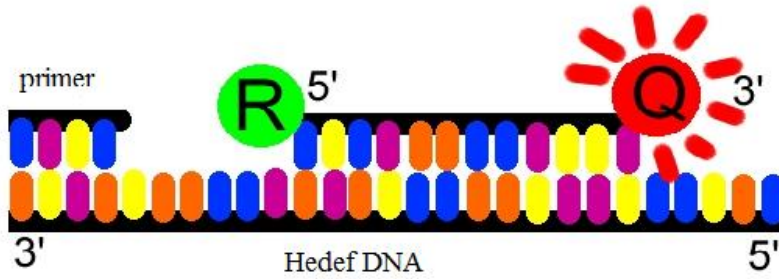
İlk olarak bir grup hücreden mRNA pürifiye edilip revers transkriptaz enzimi ile komplementer DNA (cDNA) sentezlenmiştir. Ardından DNA polimeraz ve S1 nükleaz ile tek zincirli cDNA çift zincirli hale getirilir. Ardından spesifik cDNA amplifikasyon için hedef seçilir. cDNA çift sarmalı ısıtılarak denatüre edilir. Denatüre cDNA'ya aranan mesajı komplementer iki küçük oligonükleotid primerleri ve prob eklenir. Oligonükleotidler yaklaşık 20 baz içeren kısa DNA parçalarıdır. Eğer oligonükleotid cDNA üzerindeki sekansı tanırsa orijinal DNA üzerinde aranan mRNA'nın bulunduğu anlamına gelir. Eğer bir gen veya sekansı bilinen protein için spesifik mRNA izole edilmeye çalışılıyorsa proteinin amino ve karboksil ucuna komplementer oligonükleotidleri sentezleyebiliriz. TaqMan prob sisteminde

5' ve 3' uçlarından florokrom maddelerle işaretli prob kullanılmaktadır. Probun 5' ucunda raportör florokrom, 3' ucunda ise baskılayıcı florokrom bulunmaktadır. Şekil 6'da TaqMan probunun şematize hali gösterilmektedir.



Şekil 6. TaqMan Prob

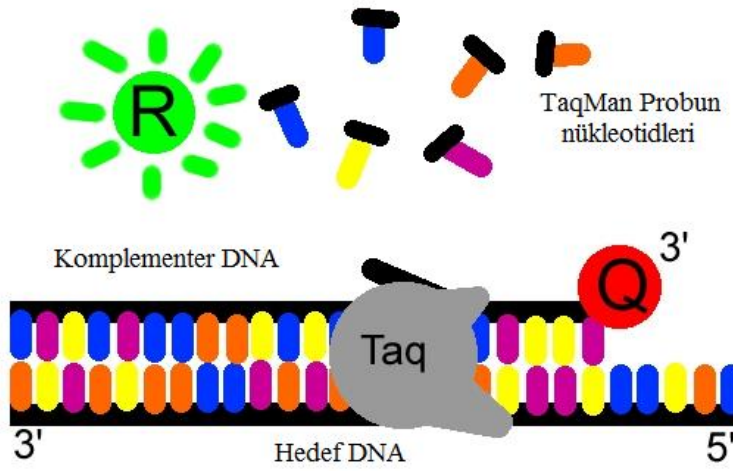
Prob, tek sarmal hale getirilen hedef molekül üzerinde, primerlerin bağlanma bölgesinin arasında kalan yere bağlanır. Prob-hedef molekül arasında ki hibridizasyon devam ettiği sürece raportör florokrom maddenin sinyal oluşturması, 3' ucundaki baskılayıcı florokrom tarafından engellenmektedir. Primer ve probun hedef DNA'ya bağlanmış hali Şekil 7'de gösterilmektedir.



Şekil 7. TaqMan probu ve primerin Hedef DNA'ya bağlanması

Primerlerin hedef nükleik asite bağlanmasını takiben başlatılan primer uzaması probun bağlandığı noktaya kadar geldiğinde, sentezin devam edebilmesi için Taq DNA polimeraz enzimi 5'→3' nükleaz aktivitesini kullanarak probu 5' uçtan yıkmaya başlar. Raportör florokromun serbest hale geçmesi ve sinyal oluşması şekil 8'de gösterilmektedir. Böylece

başlangıçta çok az miktarda var olan DNA fragmanı amplifiye olur ve her siklуста üretilen amplifikasyon ürünü miktarına paralel olarak sinyal şiddeti de artmaktadır.



Şekil 8. Raportör florokromun serbest hale geçmesi ve sinyal oluşması

### 2.1.7.3. ENDOMETRİYOZİS VE APOPTOZİS

#### 2.1.7.3.1 NORMAL ENDOMETRİYUMDA APOPTOZİS

Endometriyumda hücrel hemostaz, sekretuar ve menstrüel fazda endometriyumun fonksiyonel tabakasının yaşlanmış hücrelerinin apoptozis yoluyla elimine edilmesi ile sağlanır. Düzenli adet gören kadınlarda endometriyal siklus üç faza sahiptir; proliferatif, sekretuar ve menstrüel faz. Endometriyal faz apoptozis ilişkisini inceleyen birçok çalışmada apoptozis proliferatif ve erken sekretuar fazda çok az miktarda saptanırken, geç sekretuar ve menstrüel fazda yüksek seviyede bulunmuştur (128-130). Elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalarda özellikle geç sekretuar fazda normal endometriyal dokuda apoptozis süreci gözlenmiştir (131-132). Apoptozisin endometriyumda siklik değişiklikler göstermesi apoptozisin östrojen ve progesteron seviyelerindeki değişimlerden etkilendiğini düşündürür. Vaskivuo ve arkadaşlarının yaptığı çalışma proliferatif fazda serum östrojen seviyeleri ile apoptozis arasında negatif korelasyonu göstererek bu görüşü desteklemiştir (130).

Anti-apoptotik ve pro-apoptotik gen ekspresyonları incelendiğinde normal endometriyal dokuda Bax proteinin özellikle sekretuar fazda Bcl-2 proteininin ise proliferatif fazda artış gösterdiği saptanmıştır (129,133-134). Bcl-2 proteinindeki bu artışın endometriyumda proliferatif fazda apoptozisi baskıladığı gösterilmiştir (132). Bcl-2 immünoreaktivitesinin endometriyumun özellikle bazal tabakasında olduğu, ovülasyondan

sonra fonksiyonel tabakada ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (129). Endometriyumun bazal tabakasında sürekli olan ancak fonksiyonel tabakada siklus fazına göre değişiklik gösteren ekspresyon progenitör hücre popülasyonlarının devamlılığının sağlanması ile ilgili olabileceğini düşündürmüştür. Glandüler epitel hücrelerinde Bcl-2 ve Bax oranlarındaki değişikliklerin endometriyal hücre apoptozisi ile paralel seyretmesi bu proteinlerin menstrüel siklusta apoptozisi regüle ettiğinin en büyük kanıtıdır. Bcl-2'nin glandüler ve yüzey epitelinde immünohistokimyasal ekspresyonunun antiprogestin tedavilerle arttığının gösterilmesi (135) bu sürecin overyan steroid hormonlar tarafından etkilendiğinin bir diğer kanıtıdır (134,136-138). Buna dayanarak bu genin ekspresyonu progesteron tarafından baskılanıp östrojen tarafından artırılabilir sonucuna varılabilir.

Endometriyumun tersine myometriyal tabakada Bcl-2 ekspresyonları incelendiğinde menstrüasyondan etkilenmeyen stabil bir immünoaktivite gözlenir (139). Bcl-2'den yoksun fare çalışmalarında endometriyal bezlerde ve myometriyal tabakada birçok apoptotik cisim izlenmiştir (140). Bu nedenle Bcl-2 endometriyal bez dokusu hücreleri ve myometriyal hücrelerin sağ kalımı için gerekli olabilir.

Bcl-2 ve Bax dışında apoptozisi regüle eden diğer bir Bcl-2 ailesi üyesi olan Bcl-xl Bax proteini ile heterodimerizasyon yaparak ya da direk olarak proteinin fonksiyon görmesine engel olur (141). p53 immünoaktivitesi glandüler ve stromal endometriyumda gözlenmemiştir (139). TNFR ailesine ait olan Fas tip-1 membran proteinidir ve FasL ile bağlandığında çeşitli hücre tiplerinde apoptozisi indükler. FasL'nin iki formu vardır; membrana bağlı inaktif form ve solubl form. Membrana bağlı form matriks metalloproteinazlar tarafından aktif forma çevrilir (142). Geç proliferatif fazda Fas ve FasL hücrenin golgi aparatında veziküllerde bulunur, etkileşime giremedikleri için apoptozisi başlatamazlar (139,143). Sekretuar fazda ise hücre membranının bir parçası haline gelip aktifleşip etkileşime girebilir ve apoptozis sinyalini başlatabilirler (139,143). Bu nedenle endometriyal glandüler hücreler sekretuar fazda immünohistokimyasal olarak daha güçlü boyanırlar (133,144). Song ve arkadaşları endometriyal kültürlerden östrojen ve/veya progesteronun uzaklaştırılması sonucu apoptozisin ve Fas-FasL ekspresyonunun arttığını saptamıştır. Bu bilgi endometriyal siklusta Fas ilişkili apoptozisin önemini ortaya koymuştur. Bcl-2 ise Fas-FasL ilişkili apoptozisin kontrolünde önemli rol oynar (145).

### 2.1.7.3.2 ENDOMETRİYOZİSLİ HASTALARDA APOPTOZİS

Endometriyozisli kadınların ötopik endometriyumu ile normal kadınların endometriyumu karşılaştırıldığında bazı temel farklılıklar gözlenir. Bunlar; yapısal, immün ve proliferasyon anomalileri, adezyon molekülleri, proteolitik enzimler ve onların inhibitörleri, steroid ve sitokin üretimi, gen ekspresyonu ve protein üretimi ile ilgili problemler gibi çok çeşitli anormallikler şeklinde kendini göstermektedir (146). Bu farklılıkların peritoneal kaviteye retrograd yol ile ulaşan endometriyal hücrelerin yaşamasını sağlayarak, endometriyozise neden olduğu düşünülmektedir.

Endometriyozis etiopatogenezinde ilgi toplayan mekanizmalardan bir tanesi de apoptozistir. Endometriyozisli hastaların endometriyal dokuları endometriyozisi olmayan kadınların endometriyal dokularından apoptozis açısından belirgin farklılık gösterir. Bu farklılık mensle atılan endometriyal hücrelerde dahi kendini düşük apoptozis oranları ile göstermiştir (9). Ötopik endometriyumdan alınan örneklerde apoptotik indeksler endometriyozis hastalarında belirgin olarak düşük saptanmıştır (12). Watanabe ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Bcl-2 ekspresyonunun endometriyal glandüler dokuda siklik değişiklikler gösterdiği ancak ektopik dokuda bu siklik değişikliklerin belirgin olmadığı saptanmıştır (144). Jones ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise Bcl-2 geninin ekspresyonunun endometriyal dokuda endometriyozisli hastalarda kontrol gruplarından farklı olmadığı, ancak ektopik stromal hücrelerde Bcl-2'nin fazla eksprese olduğu saptanmıştır (147). Bir diğer çalışma da endometriyozisli hastalardan alınan endometriyal doku örneklerinde Bcl-2 ekspresyonunun kontrollere göre yüksek olduğu, Bax ekspresyonunun ise proliferasyon fazında saptanmayıp sekretuar fazda saptanmaya başladığı endometriyozisli hastalarda ve kontrollerde gözlenmiştir (148). Johnson ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise endometriyozisli hastaların ötopik endometriyumlarında azalmış c-myc, TNF- $\beta$  I ve Bax ekspresyonu saptanmış, endometriyal dokuların artmış sağ kalımları ve proliferasyon yetenekleri bu genlere bağlanmıştır (149). Farklı olarak bir çalışmada pro-apoptotik genlerin transkripsiyonunun endometriyotik hastaların ötopik endometriyumlarında kontrollere göre arttığı saptanmıştır. (150).

Somatik kromozomlarda genetik alterasyonlar (151) ve bazı tümör baskılayıcı genlerdeki DNA delesyonları da (PTEN) (152,153) endometriyozisin oluşumunda ve ilerlemesinde etkili olmaktadır. Endometriyozisli hastaların gen ekspresyon profilini ortaya koymak için yapılan bir cDNA mikroassay analizi ise ilginç sonuçlar vermiştir. Bu çalışmada

endometriyozisli kadınlarda 97 ekspresyonu artmış ve 337 ekspresyonu azalmış gen bulunmuştur. Apoptozisle ilgili genler (GADD34, GADD45A, GADD45B, PIG11) ve p53'ün endometriyotik dokularda ekspresyonunun azaldığı görülmüştür (154).

Peritoneal yüzeyler endometriyozisin en sık görüldüğü bölgedir. Peritoneal sıvının major hücresel komponenti ise makrofajlardır (155). Mc Laren ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada peritoneal sıvıda Bcl-2 pozitif makrofaj sayısı kontrol grubundan anlamlı derece fazla bulunmuştur (156). Bu durum endometriyozisli hastalarda makrofajların apoptozisten korunarak peritonda fazla sayıda bulunmasını açıklamıştır.

#### **2.1.7.4. ENDOMETRİYOZİS TEDAVİ MODALİTELERİ VE APOPTOZİS**

Endometriyozis östrojene bağımlı bir hastalıktır. Günümüzde kullanılan tedaviler östrojen seviyelerini postmenapozal seviyelere düşürmeyi hedefler. En sık kullanılan tedavi yöntemlerinden biri GnRH agonistleridir. GnRH agonistleri ile yapılan çalışmaları incelediğimizde endometriyozisli hastaların ötopik ve ektopik endometriyal hücrelerin de apoptozisi artırdığı birçok çalışma ile gösterilmiştir (157-161). Meresman ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada GnRHa'nın hücre kültürlerinde IL-1 $\beta$  ve VEGF üretimini direk olarak baskılayarak ötopik ve ektopik endometriyal hücrelerde artmış apoptotik hıza neden olduğu saptanmıştır (157). Bilotas ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada artmış apoptozise Bax ve Fas gibi apoptotik proteinlerin ekspresyonunun artmasının, Bcl-2 gibi anti-apoptotik proteinlerin ekspresyonunun azalmasının neden olduğu gösterilmiştir (158). Başka bir tedavi modalitesi olan kombine oral kontraseptiflerin endometriyal bez proliferasyonunu durdurarak endometriyal atrofiye neden olduğu (162) ve ötopik endometriyum da programlı hücre ölümünü arttırdığı gösterilmiştir (163). Progestajen ajanların da endometriyal doku proliferasyonunu apoptozisi arttırarak durdurduğu yönünde yayınlar mevcuttur (135).

Bu tedavi modaliteleri hipo-östrojenik yan etkileri nedeniyle endometriyozis için ideal bir tedavi yöntemi olamamıştır. Hipo-östrojenik yan etkilere sahip olmadan ektopik endometriyal odaklarda apoptozisi arttıran ve proliferasyonu engelleyen ilaçlar endometriyozis tedavisinde kilit rol oynayacaktır.

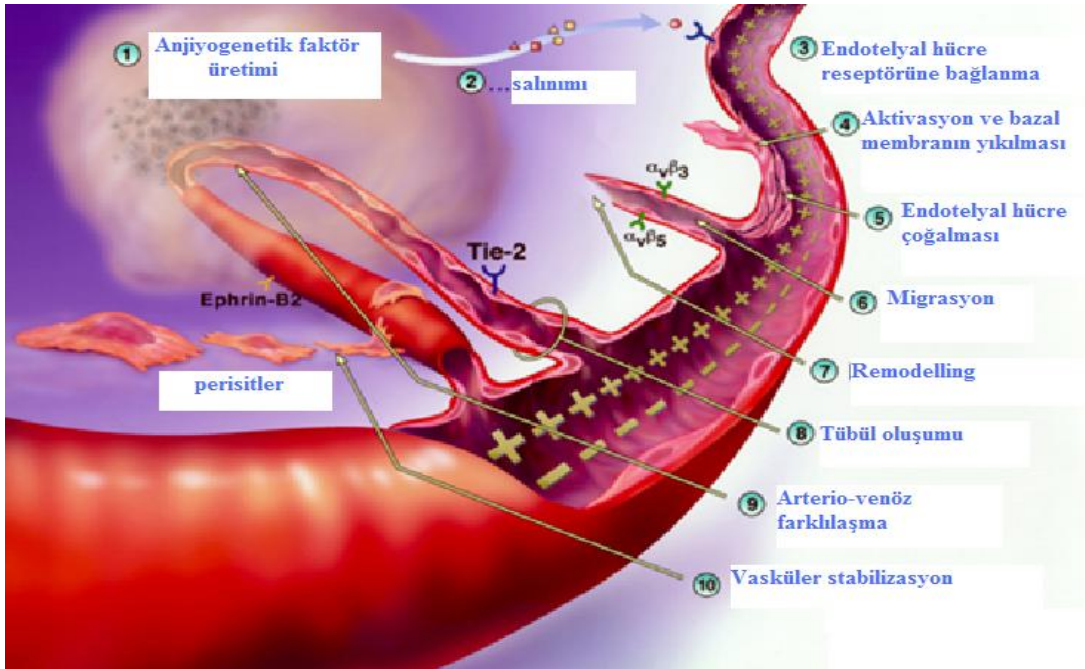
## 2.1.8. ANJİYOGENEZ

Anjiyogenez mevcut damarlardan yeni damar oluşumdur. Fizyolojik anjiyogenez embriyogenezde kritik rol oynamasına karşın erişkinlerde üreme organları ve yara iyileşmesi dışında gözlenmez. Kadınlarda anjiyogenez menstrüel sıklusta ve korpus luteum oluşumunda rol alır (164).

Normalde vücutta pro-anjiyogenik ve anti-anjiyogenik faktörler arasındaki denge vardır. Bu dengenin bozulması romatoid artrit, diyabetik retinopati, psöriasis ve çeşitli kanserlerin oluşumunda rol oynar.

Anjiyogenez mekanizması oldukça karmaşıktır. Hücre dışı matriks ve matriksi çevreleyen hücrelerden salınan pek çok büyüme faktörü, sitokinler ve bunların reseptörleri anjiyogenezde temel rol oynar (165-167). Yeni damar oluşumu aşağıda belirtilen olayları kapsayan çok basamaklı bir süreçtir (168) (Şekil 9):

- Bazal membranın proteolitik enzimler tarafından yıkılması
- Endotel hücre aktivasyonu, proliferasyonu ve göçü
- Tübül oluşumu ve olgunlaşma, damar stabilizasyonu ve ekstrasellüler matriksin yeniden şekillenmesi



Şekil 9. Anjiyogenez Basamakları



### 2.1.8.1 ENDOMETRİYOZİS VE ANJİYOGENEZ

Endometriyal implantların sağ kalımı ve sonrasında endometriyozisin gelişmesi için anjiyogenez kritik role sahiptir (37,169-170). Anjiyogenez yeni oluşmuş endometriyal implanta besin öğeleri ve büyüme faktörlerinin taşınmasını sağlar.

Endometriyozisin evresi ile ilişkili olarak peritoneal implantlarda damar matüritesi değişiklik gösterir. Erken endometriyotik lezyonlarda yüksek vasküler yoğunluk onlara pembe-kırmızı rengini vermektedir (17,171). Bu lezyonlar artmış mitotik indekse sahiptir. Ancak perisitlerle çevrili matür damarlar bu lezyonlarda izlenmez. Siyah lezyonlar ise hastalığın daha ileri evrelerinde görülür, matür damar yüzdesi bu lezyonlarda daha fazladır (172). Overyan endometriyotik lezyonlarda da perisitten fakir immatür damarlar bulunur (173). Sigmoid kolon ve rektovaginal septumu içine alan derin infiltrate endometriyozis lezyonlarında da vaskülarizasyon yoğun olarak izlenir (37). Bu bulgular göstermiştir ki anjiyogenez endometriyozisle yakından ilgilidir.

Endometriyotik lezyon oluşumunu aydınlatmak için in-vivo ve in-vitro birçok deneysel model oluşturulmuştur (174). Bu modellerde endometriyotik lezyonların vaskülarizasyonu incelendiğinde ektopik endometriyal dokunun sağ kalımı ve büyümesi için yeterli anjiyogenetik yanıtı ihtiyaç olduğu görülmüştür (37,175). Birçok hayvan modelinde ise anjiyogenez basamaklarının blokasyonunun endometriyotik implant oluşmasını engellediği saptanmıştır (173,176-179). Endometriyozisli hastalarda kronik inflamatuvar süreç ve endometriyumun kendine has anjiyogenetik özelliklerinin endometriyotik dokunun ihtiyaçlarını karşıladığı düşünülmektedir (37,174, 175). Endometriyozisli hastalardan alınan endometriyal dokuda artmış endotelyal hücre proliferasyonu (180), mikrodamar yoğunluğu (18) ve artmış pro-anjiyogenetik faktör ekspresyonları (37) izlenmiştir. Peritoneal sıvı incelemelerinde pro-anjiyogenetik ve anti-anjiyogenetik büyüme faktörleri arasındaki denge endometriyoziste pro-anjiyogenetik faktörler lehine bozulmuştur (174,181). Hücre bazında ise makrofaj ve dendritik hücrelerin endometriyozis gelişimine katkı sağladığı gösterilmiştir (182-184).

Birçok anjiyogenetik faktörün endometriyozisle ilişkisi gösterilmesine rağmen endometriyotik lezyonların vaskülarizasyon mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Endometriyoziste izlenen anjiyogenez ile tümör anjiyogenezi birçok ortak belirteçe sahiptir. Başlıcaları VEGFR-2, endoglin  $\alpha\beta 3$  integrin, ürokinaz-tip plazminojen aktivatörü, IL-8, MMP-2 ve -9 ve fibronektindir (185,186). Bu durum kanser ve endometriyozis tedavisinde

ortak noktaların olabileceği sonucunu doğurmuştur. Anjiyostatik tedavide hedef aktivasyon, proliferasyon, adezyon, migrasyon ve endotelial hücre matürasyonu gibi anjiyogenez basamaklarıdır. Bu basamakları hedef alan birçok ilaç hayvan modellerinde denenmiştir.

Dabrosin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada doğal bir anjiyogenez inhibitörü olan angiostatin geninin normalden fazla ekspresyonu sağlanmıştır. Artmış angiostatin gen ekspresyonu tedavi grubundaki tüm farelerde hastalığın eradikasyonunu, over dokusu bırakılan farelerde ise östrojen ve progesteron seviyelerinde azalma sağlamıştır (176).

Anti-anjiyogenetik faktörlerin endometriyozis tedavisinde etkinliğini değerlendiren bir diğer çalışmada anti-human-VEGF-A antikoru ve solubl flt-1 reseptörleri ile tedavi edilen atimik farelerde implant sayısında azalma saptanmıştır. Ayrıca endometriyotik odaklara kaynak sağlayan perisitten fakir damarların solubl flt-1 tedavisi ile yapılarının bozulduğu gözlenmiştir (173).

Anti-human VEGF, TDP-470, endostatin ve anginexin kullanıldığı bir çalışmada tüm tedavi gruplarında mikrodamar yoğunluğu ve endometriyotik lezyon sayısı azalmıştır. Mikrodamar yoğunluğunun azalmasında perisitten fakir damar miktarının tedavi gruplarında azalması etkili olmuştur (177). Endostatinle yapılan bir diğer çalışmada fare endometriyozis modeli oluşturulmuştur. Endostatin tedavisi ile endometriyotik lezyonların kontrol grubuna göre %47 azaldığı saptanmıştır. Endostatin alan farelerin kontrol grubuyla kıyaslandığında kontrol grubu kadar fertil olduğu, oluşan gebeliklerin normal olduğu ve aynı sayıda yavru doğurdıkları saptanmıştır. Oluşan yavrularda herhangi bir teratojenik bulguya rastlanmamıştır (178).

Sıçan endometriyozis modelinde rofecoxibin etkinliğini değerlendiren bir çalışmada rofecoxib endometriyotik odaklarda küçülme ve atrofi yaparken peritoneal sıvıda VEGF seviyelerini azaltmıştır. Rofecoxib'in bu etkinliği leuprolid asetatla karşılaştırıldığında tedavi grupları arasında fark bulunamamıştır (187). Çeşitli COX-2 inhibitörleri ile yapılan hayvan modellerinde de benzer sonuçlar bulunmuştur (188,189). Ancak bir çalışmada selektif COX-2 inhibitörü olan nimesulide ile implant sayısında ve yüzey alanlarında gerileme olmamıştır (190).

Pentoksifilin tedavisinin TNF- $\alpha$  üretimini baskıladığı bilinmektedir. Pentoksifilin tedavisinin etkinliğini sıçan endometriyozis modelinde değerlendiren bir çalışmada tedavi ile

endometriyotik implantların yüzey alanları ve mikrodamar dansitesinde azalma saptanmıştır. Bu etkinin sağlanması VEGF-C ve onun reseptörü olan flk-1'in ekspresyonlarında azalma sorumlu tutulmuştur (191).

VEGF reseptörü-2'nin (VEGFR-2) endositozuyla VEGF'nin VEGF reseptörüne (VEGFR) bağlanmasına engel olan, dopamin agonisti, kabergolinle yapılan bir endometriyozis modelinde tedavi alan grupta aktif endometriyotik hücre yüzdesinde, hücrel proliferasyon indeksinde ve neoanjiyogeneze azalma saptanmıştır. Tedavi alan grupta anjiyogenetik belirteçlerden VEGF ekspresyonu azalırken, anti-anjiyogenetik genler olan angiopoietin-1 ve Wnt-1 ekspresyonları artmıştır (192).

### **2.1.8.2. ENDOMETRİYOSİS VE VEGF**

VEGF endotelial hücre aktivasyonunu sağlayan ve vasküler geçirgenliği arttıran önemli bir vazoaaktif büyüme faktörüdür. Tümör büyümesinde olduğu gibi endometriyozisde de ektopik yerleşimin oluşabilmesi ve hayatta kalabilmesi için anjiyogeneze ihtiyaç duyulur (170).

VEGF 30-40 kDaltonluk heparin bağlayıcı anjiyogenetik bir büyüme faktörüdür. Başlıca etkileri vasküler geçirgenliğin artırılması ve yeni oluşmuş damarların hayatta kalmasının sağlanmasıdır (193). Bu güne kadar değişik sekresyon potansiyellerine dayanarak tanımlanmış 4 izoformu vardır, kısa formları direk salgılanırken (VEBF121 ve VEBF165), uzun formları intraselüler kalırlar (VEBF189 ve VEBF206) (194). Biyolojik etkilerini mikrovasküler endotelial hücre yüzeylerindeki 2 tane yüksek afiniteli tirozin kinaz reseptörleri aracılığı ile yapar, bunlar VEGFR-1 (flt-1) ve VEGFR-2 (flk-1/KDR) dir (195,196). VEGFR-2'ye bağlanma mezodermik hücrelerin endotelial hücrelere farklılaşmasına, VEGFR-1'e bağlanma tübüler kapiller yapı gelişimine neden olur (197).

VEGF mRNA ve protein ekspresyonu ötopik endometriyumda saptanmıştır ve menstrüel siklus esnasında damar oluşumunda önemli role sahiptir (13,169,198). Endometriyozisli hastaların ötopik endometriyumları normal bireylerin ki ile karşılaştırıldığında, hasta kadınlarda luteal fazda artmış VEGF mRNA ve protein ekspresyonu saptanmıştır (169,199). Endometriyozisli hastaların periton sıvısında da yüksek miktarda VEGF içerdiği gösterilmiştir (16). VEGF'yi salgılayan temel hücre ise peritoneal

makrofajlardır (200). VEGF mRNA ekspresyonu kırmızı (aktif) endometriyotik lezyonlarda siyah (sessiz) lezyonlara göre daha fazladır (169,199). Sıçan modellerinde de endometriyotik lezyonlarda artmış VEGF, VEGFR-2 ve MMP-9 ekspresyonu ve artmış anjiyogenez mevcuttur (23). Deneysel endometriyozis modellerinde VEGF ligand ve diğer anjiyogenez inhibitörlerinin kullanımı ile endometriyotik odaklarda gerileme, damar yoğunluğunda azalma saptanmıştır (173,176-179). VEGF'nin endotel hücrelerinde ve over granuloza hücrelerinde azalmış apoptozise neden olduğu da bilinmektedir (21,22). Bu çalışmalar VEGF'nin endometriyotik dokularda görülen artmış anjiyogenez ve azalmış apoptozis ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştür.

VEGF etkinliği başlıca üç mekanizma ile inhibe edilebilir. Bunlar VEGFR inhibisyonu, VEGFR tirozin kinaz inhibisyonu ve VEGF'ye yönelik monoklonal antikorlardır. Bevasizumab VEGF'ye bağlanan ve onun biyolojik aktivitesini yok eden rekombinant humanize IgG1 antikorudur. Dokuda etkinliğini anjiyogenezi inhibe ederek gösterir. Bevasizumab ile anti-VEGF terapisinin etkisi birçok insan kanserinde gösterilmiştir (201). Hayvan çalışmalarında ise anjiyogenez inhibisyonu apoptozise neden olarak tümör dokusunda küçülme sağlamıştır (202-204). Endometriyotik odakların gelişimi kanser gelişimi ile benzerlik gösterir. İnvazyon, implantasyon ve proliferasyon evreleri endometriyozis gelişiminde de görülür. Teorik olarak anjiyogenezin inhibisyonu kanser dokusu gibi davranan endometriyotik odaklarda hipoksiye bağlı gerilemeye neden olabilir. Moraloğlu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada sıçan uterin horn adezyon modelinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bevasizumab gruplarında adezyon oluşumunun daha az olduğu ve kontrol grubunda adezyon bölgelerinde VEGF'nin immünohistokimyasal olarak daha fazla boyandığı saptanmıştır (205). 2011 yılında Ricci ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise bevasizumabın endometriyal lezyon proliferasyonunu inhibe ettiği, vasküler dansiteyi azalttığı ve bunları yaparken apoptotik hücre yüzdesini arttırdığı saptanmıştır (206). Bu bilgiler ışığında bevasizumabın endometriyoziste etkin bir tedavi modalitesi olabileceği fikri doğmuştur. Bu çalışmayla bevasizumabın endometriyozis tedavisinde etkinliğini ve bu etkinliği oluştururken apoptotik gen ekspresyonlarındaki değişimleri saptamayı planladık.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

#### 3.1.SIÇAN CERRAHİ ENDOMETRİYOZİS MODELİ

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvar'ından cinsel yönden olgunluğa erişmiş, 200-250 gram ağırlıklarında, 8 haftalık olan Wistar albino suşu toplam 29 adet sıçan deneye dahil edilmiştir. Sıçanlara deney süresince 12 saat gece ve 12 saat gündüz fotoperiyotta standart yem ve su verilmiştir. Tüm sıçanlara Vernon ve Wilson'un ilk kez 1985'de tanımladığı cerrahi endometriyozis modeli uygulanmıştır (207). 40-80 mg/kg Ketamine ve 5-10 mg/kg Xylazine (intraperitoneal) ile uygulanan anesteziyi takiben steril şartlarda laparotomi yapılmıştır (şekil 10).



Şekil 10. Sıçana laparotomi uygulaması

Laparotomi sonrasında sol uterin horn uterotubal ve servikal ucundan bağlanıp eksize edilmiştir (şekil 11).



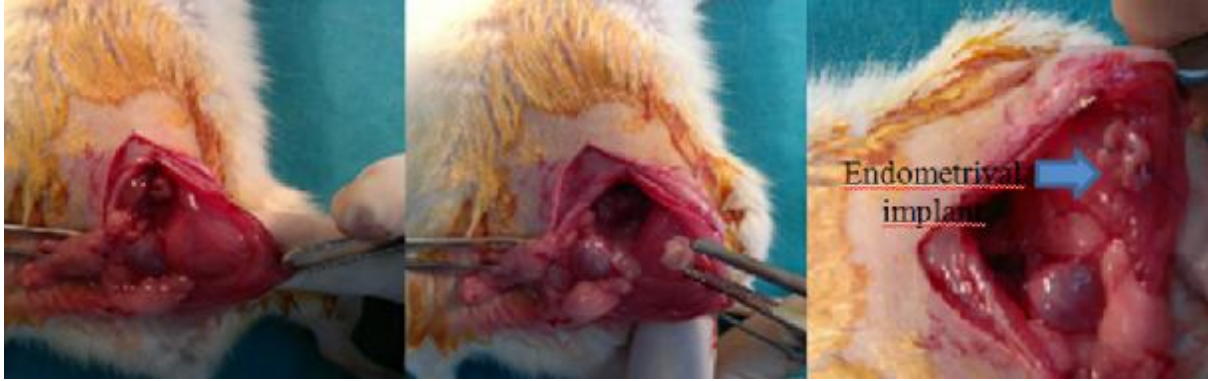
Şekil 11. Sol uterin horn eksizyonu

Steril salin solüsyonuna alınan horn antimezenterik akstan diseke edilip 5x5 mm'lik doku elde edilmiştir (şekil 12) .



**Şekil 12.** Endometriyal dokunun hazırlanışı

Elde edilen doku endometriyal yüzü abdominal kaviteye bakacak şekilde peritoneal yüze 5.0 polipropilen (5.0 Prolen Ethicon) ile suture edilmiştir (şekil 13).



**Şekil 13.** Endometriyal implantın batın sol yan duvarına fiksasyonu

Abdomen katları 3.0 polyglactin 910 (3.0 Vicryl Ethicon) ile anatomik olarak kapatılmıştır (şekil 14).



**Şekil 14.** Abdomenin kapatılması

Cerrahi olarak endometriyozisin oluşturulmasından 3 hafta sonra relaparotomi yapıp, endometriyotik odakların uzunluğu ve genişliği makroskopik olarak ölçülüp yüzey alanları hesaplanmıştır (şekil 15). Sıçanlar relaparotomi sonrasında üç gruba ayrılmıştır.



**Şekil 15.** Endometriyotik implantın ölçümü

İlk grup sıçanlara ikinci laparotomi sonrasında %0,9 luk NaCl solüsyonu intraperitoneal olarak verilmiştir (n=10). İkinci grup sıçanlara tek doz bevasizumab 2,5 mg/kg intraperitoneal olarak verilmiştir (n=10). Üçüncü grup sıçanlara ise GnRH analogu depo formu (leuprolid asetat) 1 mg/kg'dan subkütan uygulanmıştır (n=9). Tedavi sonrası 3.haftada tüm gruplara üçüncü laparotomi uygulanmış endometriyotik odakların boyutları tekrar ölçülüp, adezyonların şiddeti, yaygınlığı incelenip total adezyon skoru hesaplanmıştır. Sıçanlardan sağ over, sağ uterin horn ve endometriyotik odaklar RNA ekstraksiyonu için çıkarılmıştır. Çıkarılan endometriyotik odaklarda ayrıca histopatolojik inceleme ve immünohistokimyasal inceleme yapılmıştır. Deneye katılan tüm sıçanlara üçüncü laparotomi sonrasında dekapitasyon yapılarak deneye son verilmiştir.

Deneyde altı sıçanda endometriyozis odağı oluşturulamamıştır. Birinci ve ikinci laparotomi sonrası süreçte yedi sıçan ölmüştür. Kayıplar telafi edilerek deney 29 sıçanla tamamlanmıştır.

### **3.2. ADEZYONLARIN İNCELENMESİ**

Adezyonların şiddeti, yaygınlığı ve total adezyon skoru Linsky ve Ark.'nın 1987'de belirttiği skorlama sistemi ile hesaplanmıştır (208).

Adezyon yaygınlığı skorlaması:

0 puan: Adezyon yok

1 puan: Travmatize alanın %25'de adezyon var

2 puan: Travmatize alanın %50'de adezyon var

3 puan: Travmatize alanın tümünde adezyon var

Adezyonların şiddetinin skorlanması:

0 puan: Separasyona rezistans yok

0,5 puan: Separasyona kısmi rezistans var

1 puan: Keskin diseksiyon gerekli

Total adezyon skoru, adezyon şiddeti ve yaygınlığı skorlarının toplamıyla elde edilip sıfır ila dört arasındadır. Skorlama işlemi sonrasında implantlar çıkarılmıştır.

### **3.3. ENDOMETRİYOTİK ODAKLARIN HİSTOPATOLOJİK İNCELEMESİ**

Endometriyotik odaklar RNA ekstraksiyonu ve histopatolojik inceleme için ikiye ayrılmıştır. Histopatolojik inceleme için alınan doku %10 formalinde fiske edilmiştir. Formalinle fiske edilen endometriyotik fokus parafin bloklarına gömülüp 5mm kalınlığında kesitler alınmıştır. Preparatlar hematoksilin-eosinle ve CD10 immünohistokimyasal boya ile boyanıp ışık mikroskopunda değerlendirilmiştir. Ektopik endometriyal dokuda epitelyal hücre varlığı semikantitatif olarak önceki sıçan çalışmalarında belirtildiği gibi değerlendirilmiştir (209). Şekil 16'da histopatolojik skorlamaya ait örnekler sunulmuştur.



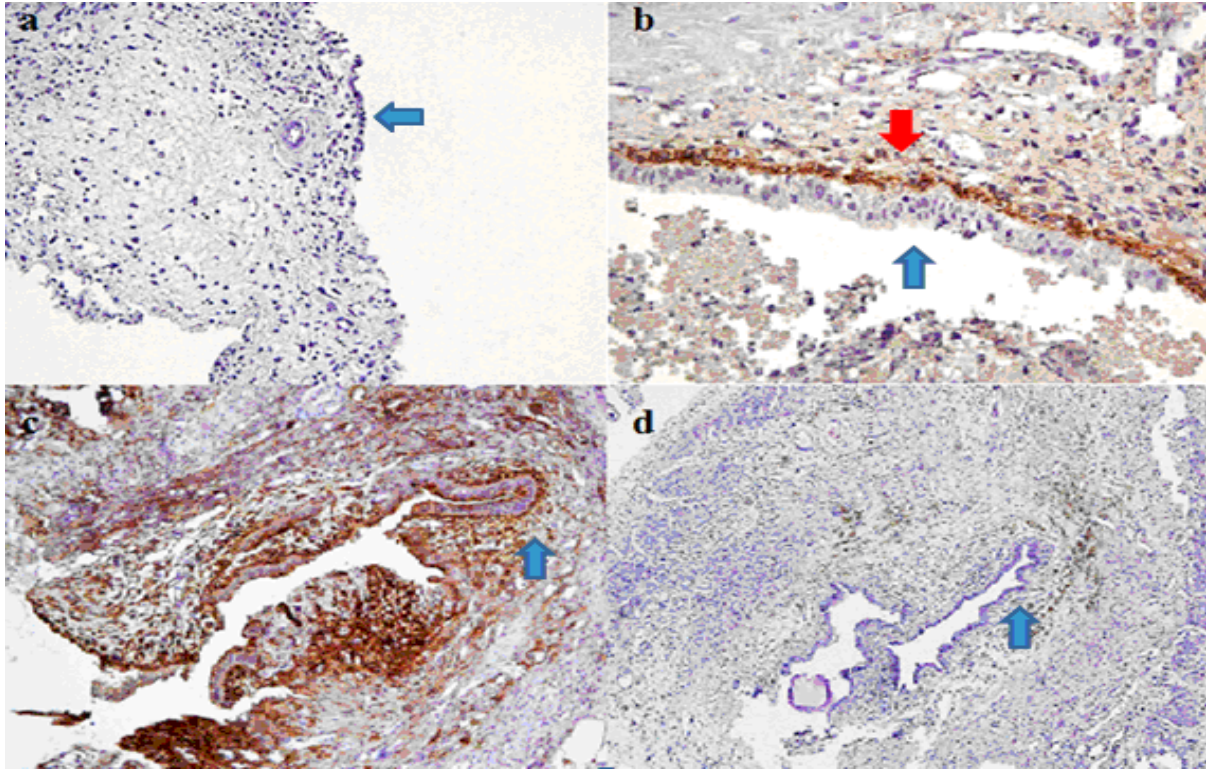
Histopatolojik skorlama:

3 puan: İyi korunmuş epitelyal doku

2 puan: Kısmi korunmuş epitelyal doku

1 puan: Kötü korunmuş epitelyal doku

0 puan: Epitel yok



**Şekil 16.** Endometriyotik İmplantların Histopatolojik Skorlaması. a.Skor 1: kötü korunmuş epitel (Hemotoksilen-Eosin [HE] boyanmış kesit X200) b. Skor 2: kısmi korunmuş epitel (CD10 immunhistokimya boyama X400) c. skor 3: iyi korunmuş epitel (CD10 immunhistokimya boyama X200) d. skor 3: iyi korunmuş epitel (HE boyalı kesit X100) Oklar; mavi: endometriyotik fokustaki epitelyal hücre, kırmızı: CD10 ile boyanmış stroma ve pigmente histiositler

### 3.3. ENDOMETRİYOTİK ODAKLARIN POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU İLE ANALİZİ

Total RNA izolasyonu için total RNA izolasyon kiti kullanılmıştır. Birçok total RNA izolasyon kiti, izole edilen total RNA'da genomik DNA bulaşı kalmadığını belirtse de deneyin sağlığı açısından izole edilen total RNA RNase-free DNase I ile işlenerek olası kalıntı genomik DNA uzaklaştırılmıştır. İzole edilen total RNA'nın miktar tayini yapıldıktan

sonra, cDNA sentezi için kalıp olarak kullanılmıştır. cDNA sentezi, MMLV (moloney murine leukemia virus) reverse transkriptaz enzimi içeren cDNA sentez kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. mRNA ekspresyon düzeylerinin saptanması için LightCycler 2.0 (Roche) cihazı kullanılmıştır. cDNA'lar kalıp olarak kullanılarak, rattus norvegicus Bcl2-associated X protein (Bax), rattus norvegicus B-cell CLL-lymphoma 2 (Bcl-2), rattus norvegicus Bcl2-like 1 (Bcl-xl) ve rattus norvegicus cytochrome c, somatic'e (Cyts) spesifik primerler ve TaqMan probu (PE Biosystem) kullanılmıştır. Apoptotik uyarı verilen hücrelerin mRNA ekspresyon düzeyleri uyarı verilmemiş hücrelere göre göreceli kantite edilmiştir. Relatif kantitasyon işlemi deney grubundaki hücrelerin hedef gen / referans gen ekspresyon oranının, kontrol grubundaki hücrelerin hedef gen / referans gen ekspresyon oranına orantılanması ile yapılmıştır. Bu işlem LightCycler Software version 4.0.0.23 (Roche Diagnostics) yazılımı ile otomatik olarak yapılmıştır.

### **3.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ**

Tüm istatistiksel analizler SPSS for Windows 16.0 (statistical package for the social sciences) programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ölçüm değişkenlerinin ve apoptoz belirteçlerinin karşılaştırılmasında nonparametrik koşullarda Kruskal-Wallis ve Mann-Whitney U-testi kullanılmıştır. Anlamlılık düzeyi  $P < 0.05$  olarak kabul edilmiştir.

#### 4. BULGULAR

Yapılan istatistiksel değerlendirmede deneye katılan 3 grubun endometriyotik implantlarının tedavi öncesi ve sonrası ortalama yüzey genişliği, tedavi öncesi ve sonrası yüzey alanı fark ortalaması, histopatolojik skoru, adezyon yaygınlığı, adezyon şiddeti ve toplam adezyon skoru karşılaştırılmıştır. Endometriyotik odakların tedavi öncesi ortalama yüzey genişlikleri kontrol grubunda  $48.4\pm 32.8$  mm, leuprolid grubunda  $44.8\pm 39.2$  mm ve bevasizumab grubunda  $61.3\pm 41.1$  mm olarak bulunmuştur, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ( $P=0.412$ ). Tedavi sonrası implantların ortalama yüzey genişliği karşılaştırıldığında kontrol grubunda  $45.9\pm 33.7$  mm, leuprolid grubunda  $16.3\pm 15.1$  mm, bevasizumab grubunda  $22.1\pm 16.1$  mm olarak saptanmıştır ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $P=0.030$ ). İmplantların tedavi öncesi ve tedavi sonrası yüzey alanları arası fark ortalaması incelendiğinde kontrol grubunda  $2.5\pm 1.3$  mm, leuprolid grubunda  $28.4\pm 3.0$  mm ve bevasizumab grubunda  $39.2\pm 3.5$  olarak saptanmıştır ve istatistiksel olarak anlamlıdır ( $P=0.001$ ). İmplantların histopatolojik skorları, kontrol grubunda  $1.78\pm 1.0$ , leuprolid grubunda  $0.56\pm 1.0$ , bevasizumab grubunda  $1.40\pm 1.4$  olarak saptanmıştır ( $P=0.052$ ). Adezyon yaygınlığı skoru açısından gruplar ele alındığında kontrol grubunda  $2.1\pm 0.7$ , leuprolid grubunda  $1.6\pm 0.9$  ve bevasizumab grubunda  $1.0\pm 0.7$  olarak bulunmuştur ve skor farkları istatistiksel olarak anlamlıdır ( $P=0.017$ ). Adezyon şiddetlerinin skorlandırılması sonucunda kontrol grubunda  $0.8\pm 0.3$ , leuprolid grubunda  $0.6\pm 0.4$  ve buvasizumab grubunda  $0.40\pm 0.3$  puan elde edilmiştir ve istatistiksel olarak anlamlıdır ( $P=0.030$ ). Toplam adezyon skorları ise kontrol grubunda  $2.9\pm 0.9$ , leuprolid grubunda  $2.2\pm 1.3$  ve bevasizumab grubunda  $1.4\pm 0.9$  olarak bulunmuştur ve gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $P=0.011$ ). Tablo 2 implantların gruplara göre yüzey genişliği, histopatolojik skor ve adezyon skorlarını göstermektedir.

**Tablo 2. İmplantların Gruplara Göre Yüzey Genişliği, Histopatolojik Skor ve Adezyon Skorları**

Gruplar	Kontrol n=10	Leuprolid n=9	Bevasizumab n=10	P*
İmplantların ortalama yüzey genişliği (mm)				
Tedavi öncesi	48.4±32.8	44.8±39.2	61.3±41.1	0.412
Tedavi sonrası	45.9±33.7	16.3±15.1	22.1±16.1	<b>0.030</b>
Tedavi öncesi ve sonrası yüzey alanları fark ortalaması	2.5±1.3	28.4±3.0	39.2±3.5	<b>0.001</b>
Histopatolojik skor	1.78±1.0	0.56±1.0	1.40±1.4	0.052
Adezyon yaygınlık Skoru	2.1±0.7	1.6±0.9	1.0±0.7	<b>0.017</b>
Adezyon şiddet skoru	0.8±0.3	0.6±0.4	0.4±0.3	<b>0.030</b>
Toplam adezyon skoru	2.9±0.9	2.2±1.3	1.4±0.9	<b>0.011</b>

Veriler; ortalama ± SD şeklinde verilmiştir. p\*: Kruskal-Wallis testi.

Tedavi gruplarından leuprolid grubuyla kontrol grubunun karşılaştırılmasında, implantların tedavi sonrası ortalama yüzey genişliği (P=0.015), tedavi öncesi ve sonrası yüzey alanları arası fark ortalaması (P=0.004) ve histopatolojik skorlar (P=0.009) açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır. Leuprolid grubunda tedavi ile yüzey alanı %61.9 küçülürken kontrol grubunda %6.2 küçülmüştür (P=0.001). Adezyon yaygınlık skoru, adezyon şiddet skoru ve toplam adezyon skorları açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. Tablo 3 kontrol grubu ve leuprolid grubunun implant yüzey genişliği, histopatolojik skor ve adezyon skor özelliklerini göstermektedir.

**Tablo 3. Kontrol Grubu ve Leuprolid Grubunun İmplant Yüzey Genişliği, Adezyon ve Histopatolojik Skorlarının Karşılaştırılması**

Gruplar	Kontrol n=10	Leuprolid n=9	P*
İmplantların ortalama yüzey genişliği (mm) Tedavi sonrası	45.9±33.7	16.3±15.1	<b>0.015</b>
Tedavi öncesi ve sonrası yüzey alanları fark ortalaması	2.5±1.3	28.4±3.0	<b>0.004</b>
Histopatolojik skor	1.78±1.0	0.56±1.0	<b>0.009</b>
Adezyon yaygınlık Skoru	2.1±0.7	1.6±0.9	0.174
Adezyon şiddet skoru	0.8±0.3	0.6±0.4	0.317
Toplam adezyon skoru	2.9±0.9	2.2±1.3	0.164

Veriler; ortalama ± SD şeklinde verilmiştir. p\*:Mann-Whitney U Testi

Kontrol grubu ve bevasizunab grubu karşılaştırıldığında tedavi sonrası implant yüzey genişliği ortalaması (P=0.082) arasında fark yoktur, tedavi öncesi ve sonrası yüzey genişliği farkı ortalaması (P=0.001), adezyon yaygınlık skoru (P=0.005), adezyon şiddet skoru (P=0.007) ve toplam adezyon skoru (P=0.003) açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır. Bevasizumab grubunda tedavi ile yüzey alanı %58.8 küçülürken kontrol grubunda %6.2'lik bir küçülme saptanmıştır (P=<0.001). Histopatolojik skorlar arasında ise anlamlı fark saptanmamıştır. Tablo 4 kontrol grubu ve bevasizumab grubunun implant yüzey genişliği, histopatolojik skor ve adezyon skor özelliklerini göstermektedir.

**Tablo 4. Kontrol Grubu ve Bevasizumab Grubunun İmplant Yüzey Genişliği, Adezyon ve Histopatolojik Skorlarının Karşılaştırılması**

Gruplar	Kontrol n=10	Bevasizumab n=10	P*
İmplantların ortalama yüzey genişliği (mm) Tedavi sonrası	45.9±33.7	22.1±16.1	0.082
Tedavi öncesi ve sonrası yüzey alanları fark ortalaması	2.5±1.3	39.2±3.5	<b>0.001</b>
Histopatolojik skor	1.78±1.0	1.40±1.4	0.445
Adezyon yaygınlık skoru	2.1±0.7	1.0±0.7	<b>0.005</b>
Adezyon şiddet skoru	0.8±0.3	0.4±0.3	<b>0.007</b>
Toplam adezyon skoru	2.9±0.9	1.4±0.9	<b>0.003</b>

Veriler; ortalama ± SD şeklinde verilmiştir. p\*: Mann-Whitney U Testi

Her iki tedavi grubunun karşılaştırılmasında elde edilen sonuçlara göre implantların tedavi sonrası yüzey genişliği ortalaması, tedavi öncesi ve sonrası yüzey genişlik farkı ortalaması, histopatolojik skor, adezyon şiddeti, adezyon yaygınlığı ve toplam adezyon skoru açısından bir birlerine istatistiksel olarak anlamlı üstünlükleri saptanamamıştır. Bevasizumab grubunda tedavi ile implant yüzey alanlarında %58.8 küçülme saptanırken leuprolid asetat grubunda tedavi ile %61.9 küçülme saptanmıştır (P=0.62). Tablo 5 leuprolid grubu ve bevasizumab grubunun implant yüzey genişliği, histopatolojik skor ve adezyon skor özelliklerini göstermektedir.

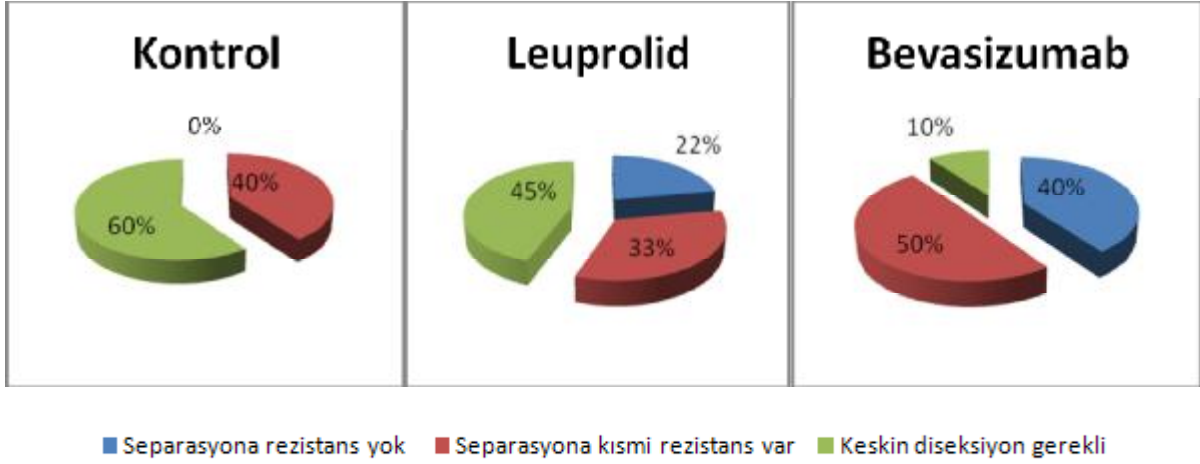
**Tablo 5. Leuprolid Grubu ve Bevasizumab Grubunun İmplant Yüzey Genişliği, Adezyon ve Histopatolojik Skorlarının Karşılaştırılması**

Gruplar	Leuprolid n=9	Bevasizumab n=10	P*
İmplantların ortalama yüzey genişliği (mm) Tedavi sonrası	16.3±15.1	22.1±16.1	0.214
Tedavi öncesi ve sonrası yüzey alanları fark ortalaması	28.4±3.0	39.2±3.5	0.287
Histopatolojik skor	0.56±1.0	1.40±1.4	0.168
Adezyon yaygınlık skoru	1.6±0.9	1.0±0.7	0.135
Adezyon şiddet skoru	0.6±0.4	0.40±0.3	0.151
Toplam adezyon skoru	2.2±1.3	1.4±0.9	0.132

Veriler; ortalama ± SD şeklinde verilmiştir. p\*: Mann-Whitney U Testi

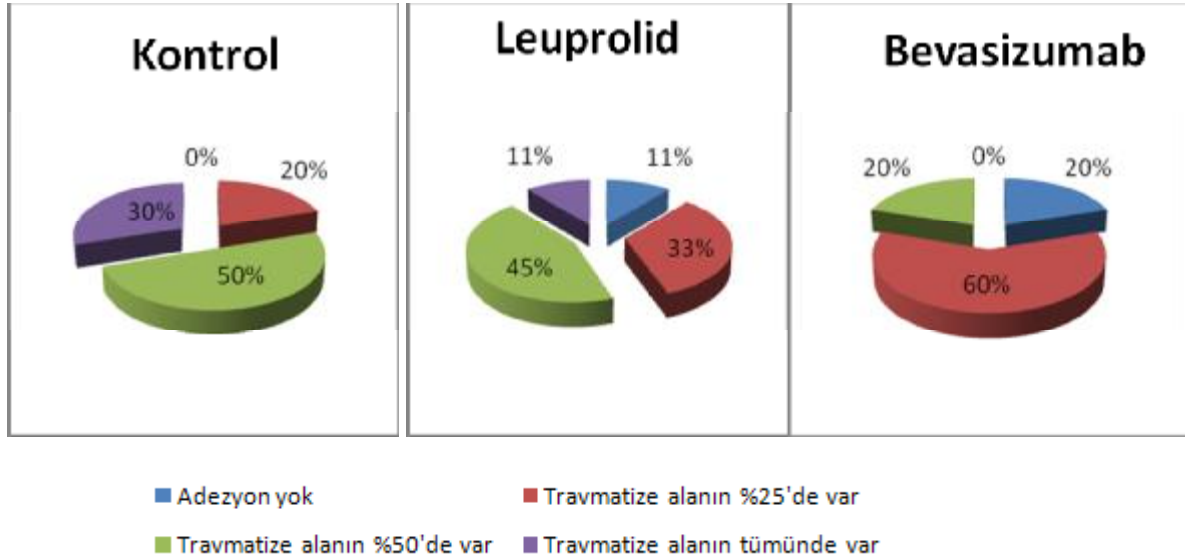
Adezyon şiddetinin grup içi dağılımı incelendiğinde keskin diseksiyon gerektiren adezyon kontrol grubunda %60, leuprolid grubunda %45, bevasizumab grubunda ise %10 olarak saptanmıştır. Şekil 17 adezyon şiddetinin grup içi dağılımını göstermektedir.

**Şekil 17. Adezyon Şiddeti Grup İçi Dağılımı**



Adezyon yaygınlığının grup içi dağılımı incelendiğinde travmatize alanın tümünde adezyon kontrol grubunda %30, leuprolid grubunda %11 oranında saptanmıştır. Bevasizumab grubunda ise travmatize alanın tümünde adezyona rastlanmamıştır. Şekil 18 adezyon yaygınlığının grup içi dağılımını göstermektedir.

**Şekil 18. Adezyon Yaygınlığı Grup İçi Dağılımı**

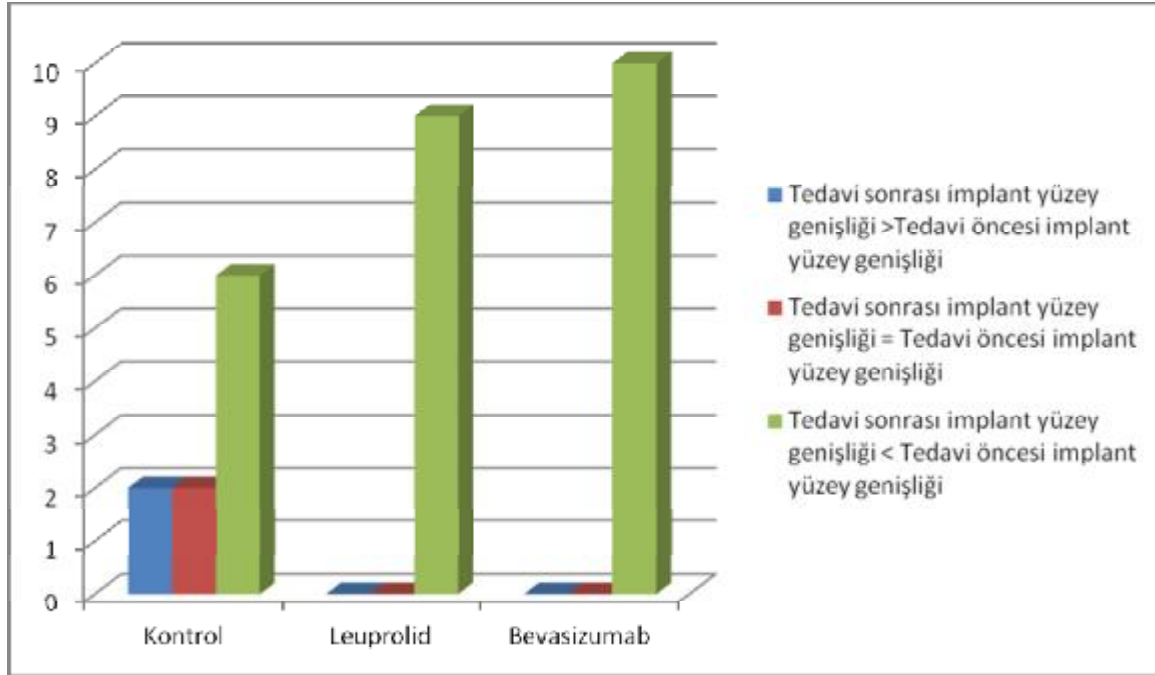


Tedavi öncesi ve tedavi sonrasında implant yüzey genişliği değişimi açısından gruplar değerlendirildiğinde kontrol grubunda %60 sıçanda gerileme, %20 sıçanda artma, %20



sıçanda ise değişiklik olmadığı bulunmuştur. Hem leuprolid hem de bevasizumab grubunda tüm sıçanlarda implant yüzey genişliklerinde tedavi sonrası gerileme saptanmıştır. Şekil 19 tedavi sonrasında implant yüzey genişliklerinin değişiminin grup içi dağılımını göstermektedir.

**Şekil 19. İmplant Yüzey Genişliğinin Tedavi Sonrası Değişiminin Grup İçi Dağılımı**



Tedavi gruplarında pro-apoptotik ve anti-apoptotik gen ekspresyonları endometriyum, endometriyotik odak ve overde incelendiğinde anti-apoptotik genler olan Bcl-2 ve Bcl-xl, pro-apoptotik gen olan Bax'ın ekspresyonları tüm dokularda istatistiksel olarak anlamlı farka sahiptir. Pro-apoptotik bir gen olan Cyc-c'nin ekspresyonu sadece endometriyal odakta istatistiksel olarak anlamlı farka sahiptir. Tablo 6 tedavi gruplarında pro-apoptotik ve anti-apoptotik gen ekspresyonlarını göstermektedir.

**Tablo 6. Tedavi Gruplarında Pro-apoptotik ve Anti-apoptotik Gen Ekspresyonları**

Gruplar	Kontrol n=10	Leuprolid n=9	Bevasizumab n=10	P*
Bax ekspresyonu				
Endometriyum	1.0±0.0	2.2±0.7	2.5±0.8	<0.001
Endometriyal odak	1.0±0.0	3.0±0.8	3.1±0.8	<0.001
Over	1.0±0.0	1.8±0.5	2.0±0.4	<0.001
Cyc-c ekspresyonu				
Endometriyum	1.0±0.0	1.0±0.2	1.1±0.2	0.141
Endometriyal odak	1.0±0.0	1.3±0.1	1.3±0.1	<0.001
Over	1.0±0.0	1.0±0.2	1.1±0.1	0.103
Bcl-2 ekspresyonu				
Endometriyum	1.0±0.0	0.6±0.2	0.5±0.1	<0.001
Endometriyal odak	1.0±0.0	0.4±0.2	0.4±0.1	<0.001
Over	1.0±0.0	0.6±0.1	0.7±0.2	<0.001
Bcl-xl ekspresyonu				
Endometriyum	1.0±0.0	0.5±0.2	0.7±0.1	<0.001
Endometriyal odak	1.0±0.0	0.8±0.2	0.8±0.1	<0.001
Over	1.0±0.0	0.5±0.2	0.5±0.1	<0.001

Veriler; ortalama ± SD şeklinde verilmiştir. p\*: Kruskal-Wallis testi

Bax gen ekspresyonu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında leuproid grubunda endometriyal dokuda 2.2 kat, endometriyal odakta 3.0 kat, over dokusunda 1.8 kat artmıştır (P<0.001). Cyc gen ekspresyonu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında endometriyal dokuda ve over dokusunda istatistiksel olarak anlamlı değişiklik göstermemiştir, ancak endometriyal odakta 1.3 kat artış saptanmıştır (P<0.001). Bcl-2 gen ekspresyonu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında leuprolid grubunda endometriyal dokuda 0.6 kat, endometriyal odakta 0.4 kat, over dokusunda 0.6 kat azalmıştır (P<0.001). Bcl-xl gen ekspresyonu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında endometriyal dokuda 0.5 kat (P<0.001), endometriyal odakta 0.8 kat (P=0.002), over dokusunda 0.5 kat azalmıştır (P<0.001). Tablo 7 kontrol grubu ve leuprolid grubu pro-apoptotik ve anti-apoptotik gen ekspresyonlarını göstermektedir.

**Tablo 7. Kontrol Grubu ve Leuprolid Grubu Pro-apoptotik ve Anti-apoptotik Gen Ekspresyonları**

Gruplar	Kontrol n=10	Leuprolid n=9	P*
Bax ekspresyonu			
Endometriyum	1.0±0.0	2.2±0.7	<0.001
Endometriyal odak	1.0±0.0	3.0±0.8	<0.001
Over	1.0±0.0	1.8±0.5	<0.001
Cyc-c ekspresyonu			
Endometriyum	1.0±0.0	1.0±0.2	0.659
Endometriyal odak	1.0±0.0	1.3±0.1	<0.001
Over	1.0±0.0	1.0±0.2	0.659
Bcl-2 ekspresyonu			
Endometriyum	1.0±0.0	0.6±0.2	<0.001
Endometriyal odak	1.0±0.0	0.4±0.2	<0.001
Over	1.0±0.0	0.6±0.1	<0.001
Bcl-xl ekspresyonu			
Endometriyum	1.0±0.0	0.5±0.2	<0.001
Endometriyal odak	1.0±0.0	0.8±0.2	0.002
Over	1.0±0.0	0.5±0.2	<0.001

Veriler; ortalama ± SD şeklinde verilmiştir. p\*: Mann-Whitney U Testi

Bax gen ekspresyonu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bevasizumab grubunda endometriyal dokuda 2.5 kat, endometriyal odakta 3.1 kat, over dokusunda 2.0 kat artmıştır (P<0.001). Cyc-c gen ekspresyonu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bevasizumab grubunda endometriyal dokuda 1.1 (P=0.015), endometriyal odakta 1.3 kat (P<0.001), over dokusunda 1.1 kat artmıştır (P=0.015). Bcl-2 gen ekspresyonu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bevasizumab grubunda endometriyal dokuda 0.5 kat, endometriyal odakta 0.4 kat, over dokusunda 0.7 kat azalmıştır (P<0.001). Bcl-xl gen ekspresyonu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bevasizumab grubunda endometriyal dokuda 0.7 kat, endometriyal odakta 0.8 kat, over dokusunda 0.5 kat azalmıştır (P<0.001). Tablo 8 kontrol grubu ve bevasizumab grubu pro-apoptotik ve anti-apoptotik gen ekspresyonlarını göstermektedir.

**Tablo 8. Kontrol Grubu ve Bevasizumab Grubu Pro-apoptotik ve Anti-apoptotik Gen Ekspresyonları**

Gruplar	Kontrol n=10	Bevasizumab n=10	P*
Bax ekspresyonu			
Endometriyum	1.0±0.0	2.5±0.8	<b>&lt;0.001</b>
Endometriyal odak	1.0±0.0	3.1±0.8	<b>&lt;0.001</b>
Over	1.0±0.0	2.0±0.4	<b>&lt;0.001</b>
Cyc-c ekspresyonu			
Endometriyum	1.0±0.0	1.1±0.2	<b>0.015</b>
Endometriyal odak	1.0±0.0	1.3±0.1	<b>&lt;0.001</b>
Over	1.0±0.0	1.1±0.1	<b>0.015</b>
Bcl-2 ekspresyonu			
Endometriyum	1.0±0.0	0.5±0.1	<b>&lt;0.001</b>
Endometriyal odak	1.0±0.0	0.4±0.1	<b>&lt;0.001</b>
Over	1.0±0.0	0.7±0.2	<b>&lt;0.001</b>
Bcl-xl ekspresyonu			
Endometriyum	1.0±0.0	0,7±0.1	<b>&lt;0.001</b>
Endometriyal odak	1.0±0.0	0.8±0.1	<b>&lt;0.001</b>
Over	1.0±0.0	0.5±0.1	<b>&lt;0.001</b>

Veriler; ortalama ± SD şeklinde verilmiştir. p\*: Mann-Whitney U Testi

Pro-apoptotik ve anti-apoptotik genlerin endometriyum, endometriyotik odak ve over dokusunda ekspresyonları leuprolid grubu ile bevasizumab grubu arasında karşılaştırıldığında tüm gen ekspresyonlarının istatistiksel olarak anlamlı farka sahip olmadığı saptanmıştır (P>0.05). Tablo 9 leuprolid grubu ve bevasizumab grubu pro-apoptotik ve anti-apoptotik gen ekspresyonlarını göstermektedir.

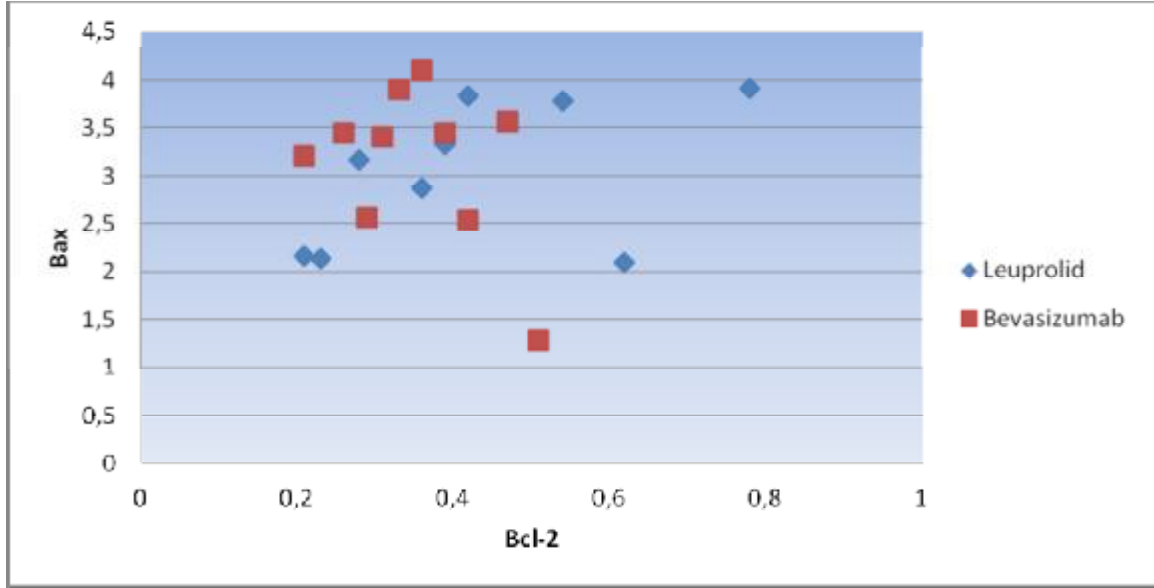
**Tablo 9. Leuprolid Grubu ve Bevasizumab Grubu Pro-apoptotik ve Anti-apoptotik Gen Ekspresyonları**

Gruplar	Leuprolid n=9	Bevasizumab n=10	P*
Bax ekspresyonu			
Endometriyum	2.2±0.7	2.5±0.8	0.327
Endometriyal odak	3.0±0.8	3.1±0.8	0.567
Over	1.8±0.5	2.0±0.4	0.391
Cyc-c ekspresyonu			
Endometriyum	1.0±0.2	1.1±0.2	0.487
Endometriyal odak	1.3±0.1	1.3±0.1	0.712
Over	1.0±0.2	1.1±0.1	0.205
Bcl-2 ekspresyonu			
Endometriyum	0.6±0.2	0.5±0.1	0.141
Endometriyal odak	0.4±0.2	0.4±0.1	0.513
Over	0.6±0.1	0.7±0.2	0.177
Bcl-xl ekspresyonu			
Endometriyum	0.5±0.2	0,7±0.1	0.060
Endometriyal odak	0.8±0.2	0.8±0.1	0.390
Over	0.5±0.2	0.5±0.1	0.621

Veriler; ortalama ± SD şeklinde verilmiştir. p\*: Mann-Whitney U Testi

Endometriyotik odakda Bcl-2 ve Bax geni ekspresyonlarının leuprolid ve bevasizumab gruplarında dağılımı karşılaştırıldığında her iki grupta Bcl-2 gen ekspresyonunun azaldığı, Bax gen ekspresyonunun ise arttığı görülmüştür. Şekil 20’de leuprolid ve bevasizumab grubundaki her bir sıçanın Bax ve Bcl-2 gen ekspresyonlarının kontrol grubuna göre kat olarak değişimini göstermektedir.

**Şekil 20. Leuprolid ve Bevasizumab Grubunda Endometriyal Odakta Bcl-2 ve Bax Ekspresyonu**



## 5. TARTIŞMA

Endometriyozis özellikle üreme çağındaki kadınları etkileyen rekürrens ve progresyona yatkın bir seyri olan kronik bir hastalıktır. Dismenore, disparoni, pelvik ağrı ve subfertilite hastalığın seyrinde sık görülen şikayetlerdir. Bu şikayetler nedeni ile hastaların günlük aktivite, kariyer planları ve fertilite beklentileri önemli ölçüde etkilenmektedir. Cerrahi olarak tanımlanmasının ardından yaklaşık bir yüzyıl geçmesine ve oluşumunu aydınlatmaya çalışan birçok çalışma olmasına rağmen hastalığın patogenezi henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Sampson'nun retrograd menstrüasyon teorisi ise endometriyozis patogenezinde birincil mekanizma olarak yerini korumaktadır.

Endometriyal hücreler anjiyogenezi ve enflamasyonu indükleyen hormonal faktörlere yanıt olarak proliferer olur. İnsan endometriyumunun kendine has anjiyogenetik potansiyeli ötopik endometriyumda patolojik değişikliklerin hastalığın temelini oluşturabileceğini düşündürmüştür. Endometriyotik hücrelerin endometriyal hücrelerle kıyaslandığında artmış proliferasyon ve sağ kalıma sahip olduğu görülmüştür.

Endometriyozis tedavisinde kullanılan geleneksel medikal ilaçlar hipoöstrojenik çevre oluşturma ilkesine dayanır. Ancak medikal tedavilerin hipoöstrojenik yan etkileri kullanımlarını sınırlar. Aynı zamanda medikal tedavilerle elde edilen sonuçlar kalıcı nitelikte değildir. Bu nedenle endometriyozis tedavisinde kalıcı sonuçlara ve daha az yan etkiye sahip tedavi modalitelerine ihtiyaç vardır.

GnRH agonistleri endometriyozis tedavisinde yerini almış etkin tedavi modaliteleridir. GnRH agonistleri ile ilgili çalışmaları incelediğimizde endometriyozisli hastalardan elde edilen ötopik ve ektopik endometriyal hücrelerde hormonal etkilerinin yanı sıra apoptozisi arttırdıkları gösterilmiştir. Bir çalışmada 16 tedavi almamış endometriyozisli kadın ve 14 kişiden oluşan kontrol grupları oluşturulmuştur. Bütün olgulardan ötopik endometriyum örnekleme yapılmıştır. Bu hücrelerden elde edilen kültürler leoprolid asetat eklenmiştir. Leoprolid asetatın her iki grupta da apoptotik indeksleri artırıp hücre proliferasyonunu azalttığı saptanmıştır (159). Benzer bir çalışma İmai ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada 13 endometriyozisli ve kontrol grubu olarak 8 leyomyomlu hastadan ektopik ve ötopik endometriyal hücre örnekleri alınmıştır. Spontan apoptozis endometriyozisli hastalarda daha düşük saptanırken, GnRH analogu eklenmesi durumunda endometriyozisli hastalarda apoptozis artarken kontrol grubunda bir değişiklik saptanmamıştır (160).

Meresman ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada endometriyozisli ve kontrol hastalarından elde edilen endometriyal hücre kültürlerine leuprolid asetat eklenmesinin apoptozisi arttırdığı ve VEGF salınımını azalttığı gösterilmiştir (157). Diğer bir çalışmada endometriyozisli ve endometriyozisi olmayan infertil kadınların endometriyum örneklerinde apoptozis ilişkili proteinler ve apoptotik hücre yüzdeleri incelenmiştir. Leuprolid asetat ve Antide (GnRH antagonisti) kullanıldığında hem endometriyozisli hem de endometriyozisi olmayan olgularda apoptotik hücre yüzdeleri artarken, Bax ve FasL ekspresyonu artmış, Bcl-2 ekspresyonu ise azalmıştır (158).

Reproduktif sistemi etkileyen hastalıklarda GnRH agonistlerinin rolünü inceleyen bir çalışmada ise leuprolid asetat endometriyoma, adenomyozis ve myoma uteriye sahip 55 hastaya verilirken, 81 hastada her hangi bir tedavi modalitesi kullanılmamıştır. Enflamasyon dokuda makrofaj infiltrasyonu, anjiyogenez mikrodamar yoğunluğu, apoptozis ise TUNEL testi (Terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling) ve aktive kaspaz-3'ün immün ekspresyonu ile değerlendirilmiştir. Enflamasyon ve anjiyogenez GnRHa tedavisi alan grupta hastaların endometriyumlarında anlamlı olarak azalırken, patolojik lezyonlarında ve myometriyumlarında da belirgin olarak azalmış bulunmuştur. Apoptotik indeks ve aktif kaspaz-3'ün kantitatif-histogram skorları tedavi alan grubun ötopik endometriyumunda, patolojik lezyonlarında ve myometriyumlarında anlamlı olarak artmış saptanmıştır. Doku düzeyinde gösterilen bu etkiler çeşitli reproduktif sistem hastalıklarının GnRHa tedavisi ile regresyonunu açıklamada faydalıdır (161).

Farklı olarak Borroni ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada GnRH reseptörleri 13 overyan endometriyoma olgusunda dokuda PCR çalışması ile saptanmıştır. Alınan endometriyoma hücreleri hücre kültürlerinde 9 gün çoğaltıldıktan sonra çeşitli dozlarda leuprolid asetata maruz bırakılmıştır. 5 vakada çeşitli dozlarda belirgin hücre proliferasyonunda azalma saptanırken 8 vakada GnRHR varlığına ve artan ilaç dozlarına rağmen hücre proliferasyonuna bir etki saptanmamıştır (210).

GnRH reseptörlerinin ekspresyonu ve GnRH agonistlerinin endometriyum ve reproduktif sistem lezyonlarında hücre proliferasyonuna etkisi bir diğer çalışmada daha sorgulanmıştır. Pelvik endometriyozisli 35, overyan endometriyomalı 45, adenomyozisli 35 ve myoma uterisi olan 56 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Hastalardan biopsiler laparoskopi ya da laparotomi ile alınmıştır. PCR çalışmasında endometriyum ve patolojik lezyonlarda



GnRHR I ve II'ye ait mRNA'ların eksprese olduğu saptanmıştır. GnRHR'nin menstrüel fazda en fazla eksprese olduğu, peritoneal kırmızı lezyonlarda ise immün reaktivitesinin diğer peritoneal lezyonlardan fazla olduğu saptanmıştır. Ekzojen GnRHa tedavisi ile endometriyumda ve lezyonlarda hücre proliferasyonunun da azalma olduğu saptanmıştır (211). Bu çalışmalar göstermiştir ki GnRHa hipo-östrojenik çevre oluşturmanın yanı sıra direk hücre proliferasyonunu azaltıcı ve apoptozisi arttırıcı etkisi ile endometriyotik lezyonların gerilemesini sağlamaktadır. Bizim çalışmamızda da leuprolid asetat endometriyotik implant yüzey alanlarını kontrole kıyasla anlamlı olarak küçültmüştür. PCR çalışmasında ise leuprolid asetattın apoptotik genlerin ekspresyonunu arttırdığı, anti-apoptotik genlerin ekspresyonlarını azalttığı görülmüştür.

Progestajen ajanların kullanımı endometriyozis tedavisinde yerini almıştır ancak sistemik yan etkileri nedeniyle lokal etkiye sahip levonorgestrel salımlı rahim içi araç kullanımı fikri ortaya çıkmıştır. GnRHa ve levonorgestrel salımlı rahim içi araç uygulamasının 22 endometriyozis hastasında hücre proliferasyonu, Fas ekspresyonu ve steroid reseptörleri üzerine etkisi bir çalışmada araştırılmıştır. 11 hastaya 6 ay boyunca GnRHa tedavisi, 11 hastaya levonorgestrel salımlı rahim içi araç uygulaması yapılmıştır. Hastaların tedavi öncesi ve sonrasında endometriyotik lezyonlarından ve endometriyumlarından biyopsi alınmıştır. Her iki tedavi protokolünün ötopik ve ektopik endometriyal doku hücre proliferasyonu indekslerinde anlamlı azalma sağladığı saptanmıştır. Sadece levonorgestrel salımlı rahim içi araç uygulanan hastaların ötopik ve ektopik endometriyumlarında Fas ekspresyonu artmış olarak bulunmuştur. Ötopik endometriyumda steroid reseptörlerinin ekspresyonunun her iki tedavi modalitesinde de azaldığı ancak ektopik endometriyum dokusunda sadece levonorgestrel salımlı rahim içi araç uygulanan hastalarda belirgin düşüş gösterdiği saptanmıştır (212).

Endometriyozis tedavisinde kullanılan medikal tedavi modaliteleri ve apoptozis ilişkisi birçok jinekolojik hastalıkta incelenmiştir. Menorajisi olan bir grup hastada levonorgestrel salımlı rahim içi araç uygulamasının endometriyal proliferasyon ve apoptozis üzerine etkisi araştırılmıştır. Levonorgestrel salımlı rahim içi araç uygulamasının endometriyal stroma ve bez dokusunda proliferasyonu azalttığı ve apoptozisi arttırdığı saptanmıştır. Uygulama sonrası apoptozisin artma mekanizması olarak artmış Fas antijen ekspresyonu ve azalmış Bcl-2 protein ekspresyonu gösterilmiştir (213).

Bir hücre kültürü çalışmasında progesteron, medroksiprogesteron asetat ve levonorgestrel'in endometriyal endotelyal hücrelerde apoptotik etkisi araştırılmıştır. Medroksiprogesteron asetatın tüm dozlarında TUNEL çalışmasında artmış apoptozis, immünohistokimyasal incelemede de artmış Bax ve azalmış Bcl-2 ekspresyonu saptanmıştır. Ancak levonorgestrel hücre kültürlerine yüksek dozda eklendiğinde bu etkileri oluşturabilmiştir (214).

Levonorgestrel'in leyomyom hücreleri üzerine etkilerini araştıran bir çalışmada ilacın artan konsantrasyonları ile proliferasyon hızının azaldığı, apoptozis hızının ise arttığı saptanmıştır. PCR ve Western Blot çalışmaları ile IGF-1, Bcl-2 ve survivin mRNA ekspresyonlarının azaldığı, p38 fosforilasyonundaki artış ise kaspaz-3'ün aktif olduğunu ortaya koymuştur (215).

Progesteron ajanların ektopik endometriyuma etkilerini fare modelinde araştıran bir çalışmada farelere 7 ila 28 gün progesteron, didrogesteron ya da dihidrodidrogesteron subkütan olarak verilmiştir. Tedavi sonrasında ektopik lezyonlar proliferasyon, apoptozis ve anjiyogenez açısından değerlendirilmiştir. Tüm progestin tedavilerinde apoptozisin arttığı (aktif kaspaz 3 boyanmasında artış) gösterilmiştir ancak değişik progestinler arasında anlamlı fark bulunamamıştır. MMP-2 ekspresyonu tüm progestinlerde azalmış olarak saptanmıştır. MMP-3 ekspresyonu ise sadece didrogesteron tedavisi sonrası azalmıştır. bFGF'ün transkripsiyonu progesteron ve dihidrodidrogesteron ile baskılanmıştır. VEGF ve sistin zengin anjiyogenez indükleyicisi transkripsiyonu dihidrodidrogesteron ve didrogesteron ile suprese olmuştur. Ayrıca mikrodamar yoğunluğu progestinlerle hafif olarak baskılanmıştır (216).

Medroksiprogesteron asetat, danazol ve leuprolid asetatın endometriyal stromal hücre proliferasyonu üzerine etkisini araştıran bir çalışmada hücre kültürlerinde medroksiprogesteron asetat ve danazol'ün hücre proliferasyonunu azalttığı ancak leuprolid asetatı böyle bir etkinin saptanmadığı sonucuna varılmıştır (217).

Danazol'ün etkinliğini in-vivo ve in-vitro ortamda araştıran bir çalışmada danazol'ün direk olarak endometriyal hücreler üzerine etki ederek ve indirekt olarak periferik kan monositleri aracılığı ile proliferasyonu engellediği saptanmıştır. Bu etki danazol'ün monosit derive büyüme faktörlerinin salınımını baskılamasına bağlanmıştır (218).

Danazol'ün ovulasyonu inhibe etmesi yanı sıra in-vitro ortamda sağladığı direk anti-proliferatif etkilere dayanarak planlanan bir çalışmada danazol vaginal halka formunda derin

infiltrate pelvik endometriyozis olgularına uygulanmıştır. Kontrol grubunu ise overyan endometriyomalı hastalar oluşturmuştur. Vaginal danazol uygulaması oral uygulamadan farklı olarak serumda ilaç konsantrasyonları saptanamadan derin infiltrate pelvik endometriyozis olgularında endometriyotik kitleleri küçülmüştür. Bu danazolün vaginal mukozadan emilerek endometriyotik dokuya ulaşmasına bağlanmıştır (219).

Olivares ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada celecoxib'in endometriyal epitel hücrelerinde VEGF salınımı, COX-2 ekspresyonu, apoptozis ve hücre proliferasyonu üzerine etkileri çalışılmıştır. Endometriyozisli hastalarda celecoxib yüksek dozlarda endometriyal epitel hücrelerinde COX-2 protein seviyesini arttırmıştır. Celecoxib'in tüm dozlarda prostoglandin E2 ve VEGF sentezinde azalma sağlaması COX-2 aktivitesinin azaldığını düşündürmüştür. Düşük dozlarda dahil olmak üzere tüm dozlarda hücre proliferasyonu azalırken apoptozisin arttığı saptanmıştır (220).

COX-2 inhibitörleri ile ilgili bir diğer çalışmada selektif bir COX-2 inhibitörü olan NS398 Suriye Golden hamsterlarında oluşturulan endometriyozis modelinde kullanılmıştır. COX-2'nin endometriyotik odakları anjiyogenezi inhibe ederek küçülttüğü bunla beraber anjiyogenetik bir büyüme faktörü olan VEGF seviyelerini azalttığı saptanmıştır. COX-2 inhibitörü bu etkilerinin yanı sıra endometriyotik hücrelerde kaspaz-3 ile aktive apoptoziste artış ve beraberinde hücre proliferasyonunda azalma göstermiştir (221).

NS398 ile yapılan fare endometriyozis modelinde ise implant büyüklüklerinde, mikrodamar dansitesinde, VEGF ve COX-2 indekslerinde azalma saptanırken proliferasyon ve apoptozis üzerine yararlı bir etki saptanmamıştır (222).

COX-2 inhibitörü olan rofecoxib ile yapılan bir sıçan endometriyozis modelinde ise rofecoxibin endometriyotik odakları geriletmede leuprolid asetat kadar etkili olduğu ve her iki ilacında VEGF seviyelerinde azalmaya neden olduğu saptanmıştır (187).

Enflamasyon, apoptozis ve tümörögenез gibi selüler süreçlerde yer alan nonsteroidal antiinflamatuvar ilaç aktive gen-1'in (NAG-1) endometriyumda ekspresyonunu ve selektif COX-2 inhibitörü olan celecoxible etkileşimini değerlendiren bir çalışmada NAG-1 mRNA seviyelerinin menstrüel siklus boyunca değiştiği, özellikle geç sekretuar ve menstrüel fazda arttığı saptanmıştır. Endometriyozisli hastalarda NAG-1 mRNA seviyelerinin düşük olduğu ancak hücre kültürlerine celecoxib eklenmesi ile NAG-1 mRNA ekspresyon seviyelerinin ve apoptozisin arttırdığı gözlenmiştir. Bu etkilerin doz ve konsantrasyon bağımlı olduğu

saptanmıştır (223). Bir diğer çalışmada adenomyozisten derive mezenkimal kök hücreler endometriyal mezenkimal kök hücrelerle karşılaştırılmış, adenomyozisten derive mezenkimal kök hücrelerde artmış COX-2 ekspresyonu saptanmıştır. Adenomyozisten derive mezenkimal kök hücreler COX-2 inhibitörleri ile tedavi edildiğinde migrasyon ve invazyon yeteneğinde azalma saptanırken, apoptoziste artma saptanmıştır. Ancak COX-2 inhibitörleri ile benzer etkinlik endometriyal mezenkimal kök hücrelerinde saptanmamıştır (224).

Rosiglitazone ve celecoxib'in etkinliğini fare endometriyozis modelinde değerlendiren bir çalışmada proliferatif hücre nükleer antijeni (PCNA) ile vaskülerizasyon, CD31 ve CD34 ile hücre proliferasyonu immünohistokimyasal olarak değerlendirilmiştir. TUNEL tekniği ise apoptozisi saptamada kullanılmıştır. Tüm çalışma gruplarında tedavi ile lezyonların anlamlı derece küçüldüğü, hücre proliferasyonunun azaldığı ve apoptozisin arttığı saptanmıştır. Kombine ve tek başına her iki ilaçta deneysel endometriyozis modelinde etkin bulunmuştur (225).

VEGF'nin anjiyogenez mekanizmasında önemi (16,21,166,169,179), tümör ve endotelial hücreleri apoptozisten koruması (22,226,227) ve endometriyozis etiolojisinde rol oynadığı yönündeki kanıtlar VEGF inhibisyonunun endometriyozis tedavisinde etkin şekilde kullanılabileceği fikrini ortaya atmıştır. Bu fikirden yola çıkarak Ricci ve arkadaşlarının yaptığı fare endometriyozis modelinde, VEGF inhibisyonunun endometriyotik implantların oluşması üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada bizim çalışmamızdan farklı olarak cerrahi olarak oluşturulan endometriyotik odakların oluşup oluşmadığı kontrol edilmeden tedaviye başlanmıştır. Ayrıca tedaviye operasyonlardan iki hafta sonra başlanmış ve iki hafta süresince 15, 18, 21, 24 ve 27. günlerde bevasizumab 5mg/kg dozunda verilmiştir. Tedavi sonrasında eksize edilen endometriyotik odaklarda hücre proliferasyonu (PCNA) ve vasküler yoğunluk (CD34) immünohistokimyasal boyama, apoptozis ise TUNEL testi ile değerlendirilmiştir. Bevasizumab ile tedavi edilen farelerde lezyon sayısının azalmadığı ancak lezyon toplam hacminin azaldığı saptanmıştır. Bizim çalışmamızda da benzer olarak bevasizumab ile tedavi edilen sıçanların kontrol grubuna göre lezyon boyutlarında küçülme saptanmıştır. Aynı çalışmada bevasizumab grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bevasizumab grubunda azalmış hücre proliferasyonu, azalmış vasküler yoğunluk ve artmış apoptozis izlenmiştir. Ancak bu çalışmada bevasizumab klinik olarak etkinliği kanıtlanmış herhangi bir tedavi modalitesi ile karşılaştırılmamıştır (206).

Bevasizumab tedavisinin adezyon oluşumu üzerindeki engelleyici etkisi ele alındığında, bu konu ile ilgili yapılmış farklı metodlara sahip birkaç çalışma vardır. Ignjatovic ve arkadaşları sıçan çekum ve peritonlarında abrazyon yaparak oluşturdukları modelde intraperitoneal bevasizumabın etkinliğini incelemiştir. Bevasizumab uygulanan grupta adezyonların daha az olduğu saptanmıştır. (228). Moraloğlu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise sıçanlarda uterin horn adezyon modeli oluşturulmuş ve farklı dozlarda iki gruba bevasizumab verilerek adezyonlar üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bevasizumab gruplarında adezyon oluşumunun daha az olduğu bulunmuştur. Yüksek doz ve düşük doz bevasizumab grupları karşılaştırıldığında yüksek doz bevasizumab verilen sıçanlarda daha az adezyon olduğu saptanmıştır (205). Bizim çalışmamızda asıl amaç bevasizumabın endometriyotik odaklar üzerine etkisini değerlendirmek olmasına rağmen bevasizumabın endometriyotik adezyonlar üzerindeki etkisi de incelenmiştir. Benzer şekilde bevasizumabın kontrol grubuna göre adezyon yaygınlığı ve şiddetini azalttığı bulunmuştur ( $P<0.05$ ).

Bevasizumab tedavisinin endometriyozis hayvan modellerinde apoptotik belirteçler üzerine etkisi daha önce çalışılmamıştır. Bu çalışmayla bevasizumab leuprolid asetat ile ilk kez karşılaştırılmıştır. Endometriyotik lezyonların yüzey alanlarını küçültmede, histopatolojik skorlamada, adezyon yaygınlık skoru, adezyon şiddet skoru, toplam adezyon skoru ve apoptotik gen ekspresyonları açısından bevasizumab ve leuprolid asetat grupları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Ancak leuprolid asetat kontrol grubuna kıyasla histopatolojik skorlamada anlamlı olarak düzelmeye sağlamıştır, benzer bir sonuç kontrol ve bevasizumab grupları arasında saptanamamıştır. Bu nedenle bevasizumab ile histopatolojik iyileşme gösterilememiş ancak lezyon yüzey alan büyüklüğünde ve apoptotik gen ekspresyonlarında düzelmeye gösterilmiştir. Bevasizumabın endometriyotik odaklarda endotele zarar vermeden implant yüzey alanını küçültmesi ötopik endometriyum üzerinde olumsuz etkiler oluşturmadan endometriyozisin tedavisini sağlayacağını düşündürebilir. Endometriyotik lezyonlardaki apoptozis direncinin üstesinden gelinmesinde bevasizumabın apoptotik etkisinden faydalanılabilir.

Endometriyozis patogenezinde etkin olması muhtemel olan diğer büyüme faktörlerinden fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve PDGF'ün VEGF ile birlikte inhibisyonları fikri ele alındığında Laschke ve arkadaşlarının çalışmasının sonuçları ilgi çekmektedir. Bu çalışmaya göre FGF, PDGF ve VEGF'nin kombine inhibisyonu (SU6668) tek başına VEGF

inhibisyonuna (SU5416) göre mikrodamar yoğunluğunu azaltmada daha etkili bulunmuştur (179). Bu nedenle bevasizumab ile diğer büyüme faktörlerinin inhibisyonunu kapsayan yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Bevasizumabın kanser hastalarında anjiyogenezi inhibe etme yeteneği dışında (229,230) bu çalışmayla endometriyozis tedavisinde etkinliği leuprolid asetat ile kıyaslanarak gösterilmiştir. Bevasizumabın intravenöz kullanımda proteinüri, hipertansiyon, kanama, tromboemboli, barsak perforasyonu, bozulmuş yara iyileşmesi, infüzyona bağlı hipersensitivite reaksiyonu ve reversibl lökoensefalopati sendromu gibi yan etkilere neden olabildiği bilinmektedir (231). İlaç yan etkisini minimal seviyeye indirip, lokal etkinliğinden faydalanma fikrinden yola çıkılarak ilacın intraperitoneal yolla verilmesi araştırılmıştır. Kısıtlı sayıda hastadan elde edilen verilere göre, ciddi asiti olan malign over kanseri olgularında intraperitoneal uygulama ile belirgin yan etki oluşturmaksızın asitin en az 2 ay süre ile geriletelebildiği saptanmıştır (232). Ancak verilerin kısıtlı olması intraperitoneal uygulamanın toksisitesi hakkında henüz yorum yapılmasını güçleştirmektedir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Endometriyozis tedavisinde sıklıkla kullanılan GnRH agonistleri ve steroidojenik ajanlar çoğunlukla küratif etkiden uzakta, supresif etki sağlamaktadır. Cerrahi tedavi ise endometriyozis tanısında olduğu kadar tedavisinde de etkili bir yöntemdir. Cerrahinin over rezervine olumsuz etkileri ve operasyonlar sonrası rekürrenslerin görülebilmesi bu uygulamaların kullanımlarını kısıtlar. Bu nedenle endometriyoma gelişimini ve nüksünü önleyen etkili terapötik modalitelerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışmayla endometriyozis tedavisinde anti-anjiyogeneik bir ilaç olan bevasizumab leuprolid asetat ile karşılaştırılmıştır. Bevasizumab ile leuprolid asetat grupları arasında endometriyotik odakta toplam adezyon skoru, histopatolojik skor ve tedavi sonrası yüzey alanlarında küçülme açısından fark saptanmamıştır. Benzer bir şekilde PCR çalışmasında endometriyotik odak, endometriyum dokusu ve over dokusu örneklerinde anti-apoptotik genlerden Bcl-2 ve Bcl-xl ekspresyonları bevasizumab ve leuprolid grubunda kontrol grubuna oranla düşük, apoptotik genlerden olan Bax ekspresyonları ise bevasizumab ve leuprolid grubunda kontrol grubuna oranla yüksek bulunmuştur. Ancak leuprolid asetat ve bevasizumab grupları arasında gen ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamamıştır. Bu bulgular ışığında bevasizumabın leuprolid asetat ile benzer etkinliğe sahip olduğu düşünülebilir. Endometriyozis tedavisinde etkinliğinin gösterilebilmesi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

## **7. KAYNAKLAR**

1. Eskenazi B, Warner ML. Epidemiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1997;24:235–58.
2. Thomas EJ, Prentice A. The aetiology and pathogenesis of endometriosis. *Reprod Med Rev* 1992;1:21–36.
3. Cramer DW, Missmer SA. The epidemiology of endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 2002;955:11-22.
4. D'Hooghe TM, Debrock S, Hill JA, Meuleman C. Endometriosis and subfertility: is the relationship resolved? *Semin Reprod Med* 2003;21(2):243-54.
5. Olive DL, Schwartz LB. Endometriosis. *N Engl J Med* 1993;328(24):1759-69.
6. Jenkins S, Olive DL, Haney AF. Endometriosis: pathogenetic implications of the anatomic distribution. *Obstet Gynecol* 1986;67(3):335-38.
7. Ishimura T, Masuzaki H. Peritoneal endometriosis: endometrial tissue implantation as its primary etiologic mechanism. *Am J Obstet Gynecol* 1991;165(1):210-14.
8. Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. *Lancet* 2004;364:1789-99.
9. 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;69:1042-47.
10. Donald PB, Jianchi D, Fehr S, James CW, Nasir R, Dmowski WP. Quantitative expression of apoptosis-regulating genes in endometrium from women with and without endometriosis. *Fertil Steril* 2007;87:263-68.
11. Aude Beliard, Agnes Noel, Jean-Michel Foidart. Reduction of apoptosis and proliferation in endometriosis. *Fertil Steril* 2004;82:80-85.



12. Dmowski WP, Ding J, Shen J, Rana N, Fernandez BB, Braun DP. Apoptosis in endometrial glandular stromal cells in women with and without endometriosis. *Hum Reprod* 2001;16:1802-08.
13. Shifren JL, Tseng JF, Zaloudek CJ, Ryan IP, Meng YG, Ferrara N, Jaffe RB, Taylor RN. 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(8):3112-18.
14. Healy DL, Rogers PA, Hii L, Wingfield M. Angiogenesis: a new theory for endometriosis. *Hum Reprod Update* 1998; 4(5):736-40.
15. Chung HW, Wen Y, Chun SH, Nezhat C, Woo BH, Lake Polan M. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 mRNA expression in ectopic and eutopic endometrium in women with endometriosis: a rationale for endometriotic invasiveness. *Fertil Steril* 2001;75(1):152-9.
16. McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS, Smith SK. Vascular endothelial growth factor (VEGF) concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Hum Reprod* 1996;11(1):220-3.
17. McLaren J. Vascular endothelial growth factor and endometriotic angiogenesis. *Hum Reproduction Update* 2000;6(1):45-55.
18. V Bourlev, N Volkov, S Pavlovitch, N Lets, A Larsson, M Olovsson. The relationship between microvessel density, proliferative activity and expression of vascular endothelial growth factor-A and its receptors in eutopic endometrium and endometriotic lesions. *Reproduction* 2006;132(3):501-9.
19. Pupo-Nogueira A, de Oliveira RM, Petta CA, Podgaec S, Dias JÁ, Abrão MS. Vascular Endothelial Growth Factor concentrations in the serum and peritoneal fluid of women with endometriosis. *Int J Gynecol Obstet* 2007;99(1):33-37.

20. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;280:1358-66.
21. Nor JE, Christensen J, Mooney DJ, Polverini PJ. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis is associated with enhanced endothelial cell survival and induction of Bcl-2 expression. *Am. J. Pathol.* 1999;154:375–84.
22. Kosaka N, Sudo N, Miyamoto A, Shimizu T. Vascular endothelial growth factor (VEGF) suppresses ovarian granulosa cell apoptosis in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;363(3):733-37.
23. Daniel E Machado, Plínio T Berardo, Celia Y Palmero, Luiz E Nasciutti. Higher expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 (Flk-1) and metalloproteinase-9 (MMP-9) in a rat model of peritoneal endometriosis is similar to cancer diseases. *J Exp Clin Cancer Res.* 2010;19:29:1-9.
24. Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* 1921; 14: 422–469.
25. Punnonen R, Klemi PJ, Nikkanen V. Postmenopausal endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1980;11:195–200.
26. Cramer DW, Wilson E, Stillman RJ, Berger MJ, Belisle S, Schiff I, Albrecht B, Gibson M, Stadel BV, Schoenbaum SC. The relation of endometriosis to menstrual characteristics, smoking, and exercise. *JAMA* 1986 11;255(14):1904-8.
27. Darrow SL, Vena JE, Batt RE, Zielesny MA, Michalek AM, Selman S. Menstrual cycle characteristics and the risk of endometriosis. *Epidemiology* 1993;4(2):135-42.
28. Arumugam K, Templeton AA. Endometriosis and race. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 1992;32(2):164-5.
29. Viganò P, Parazzini F, Somigliana E, Vercellini P. Endometriosis: epidemiology and aetiological factors. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2004;18(2):177-200.

30. Nisolle M, Donnez J. Peritoneal endometriosis ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertil Steril* 1997; 68(4): 585-96.
31. Halme J, Becker S, Wing R. Accentuated cyclic activation of peritoneal macrophages in patients with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1984;148(1):85-90.
32. Liu DT, Hitchcock A. Endometriosis: its association with retrograde menstruation, dysmenorrhoea and tubal pathology. *Br J Obstet Gynaecol* 1986;93(8):859-62.
33. Blumenkrantz MJ, Gallagher N, Bashore RA, Tenckhoff H. Retrograde menstruation in women undergoing chronic peritoneal dialysis. *Obstet Gynecol* 1981;57(5):667-70.
34. 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 7;91(7):635-40.
35. Geraedts JP, Harper J, Braude P, Sermon K, Veiga A, Gianaroli L, Agan N, Munné S, Gitlin S, Blenow E, de Boer K, Hussey N, Traeger-Synodinos J, Lee SH, Viville S, Krey L, Ray P, Emiliani S, Liu YH, Vermeulen S. Preimplantation genetic diagnosis (PGD), a collaborative activity of clinical genetic departments and IVF centres. *Prenat Diagn* 2001;21(12):1086-92.
36. Olive DL, Henderson DY. Endometriosis and mullerian anomalies. *Obstet Gynecol* 1987;69:412-5.
37. Groothuis PG, Nap AW, Winterhager E, Grümmer R. Vascular development in endometriosis. *Angiogenesis*. 2005;8(2):147-56.
38. Javert CT. Pathogenesis of endometriosis based on endometrial homeoplasia, direct extension, exfoliation and implantation, lymphatic and hematogenous metastasis, including five case reports of endometrial tissue in pelvic lymph nodes. *Cancer* 1949 ;2(3):399-410
39. Ueki M. Histologic study of endometriosis and examination of lymphatic drainage in and from the uterus. *Am J Obstet Gynecol* 1991;165(1):201-9.
40. Ichimiya M, Hirota T, Muto M. Intralymphatic embolic cells with cutaneous endometriosis in the umbilicus. *J Dermatol* 1998 ;25(5):333-6.
41. Moore JG, Binstock MA, Growdon WA. The clinical implications of retroperitoneal endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1988 ;158:1291-8.

42. Scholefield HJ, Sajjad Y, Morgan PR. Cutaneous endometriosis and its association with caesarean section and gynaecological procedures. *J Obstet Gynaecol* 2002;22(5):553-4.
43. Taff L, Jones S. Cesarean scar endometriosis. A report of two cases. *J Reprod Med* 2002 ;47(1):50-2.
44. Rock JA, Markham SM. Extra pelvic endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1989;16(1):193-219.
45. Halme J, Hammond MG, Hulka JF, Raj S, Talbert LM. Increased activation of pelvic macrophages in infertile women with endometriosis. *Obstet Gynecol* 1984; 64: 151–154.
46. Keettel WC, Stein RJ. The viability of the cast-off menstrual endometrium. *Am J Obstet Gynecol* 1951; 61: 440.
47. Nisolle M, Paindaveine B, Berliere M, Casanas- Roux F, Bourdon A, Donnez J. Histologic study of peritoneal endometriosis in infertile women. *Fertil Steril* 1990; 53: 984–88.
48. Kruitwagen RFPM, Poels LG, Willemsen WNP, de Ronde IJ, Jap PH, Rolland R. Endometrial epithelial cells in peritoneal fluid during the early follicular phase. *Fertil Steril* 1991; 55: 297–303.
49. Arumugam K, Lim JM. Menstrual characteristics associated with endometriosis. *Br J Obstet Gynecol* 1997; 104: 948–50.
50. Vercellini P, De Giurgo O, Aimi G, Panazza S, Uglietti A, Crosignani PG. Menstrual characteristics in women with and without endometriosis. *Obstet Gynecol* 1997; 90:264–68.
51. Vinatier D, Orazi G, Cosson M, Dufour P. Theories of endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001;96(1):21-34.
52. Kennedy S, Hadfield R, Westbrook C, Weeks DE, Barlow D, Golding S. Magnetic resonance imaging to assess familial risk in relatives of women with endometriosis. *Lancet* 1998;352(9138):1440-1.
53. Moen MH, Magnus P. The familial risk of endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1993;72(7):560-4.
54. Simpson JL, Elias S, Malinak LR, Buttram VC Jr. Heritable aspects of endometriosis. I. Genetic studies. *Am J Obstet Gynecol* 1980;137(3):327-31.

55. 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(2):643-9.
56. Osteen KG, Yeaman GR, Bruner-Tran KL. Matrix metalloproteinase and endometriosis. *Semin Reprod Med* 2003;21:155-64.
57. Ramon L, Gilabert-Estelles J, Castello R, Gilabert J, Espana F, Romeu A, ve ark. mRNA analysis of several components of the plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems in endometriosis using a real-time quantitative RT-PCR assay. *Hum Reprod* 2005;20:272-8.
58. Bruner-tran KL, Eisenberg E, Yeaman GR, Anderson TA, McBean J, Osteen KG. Steroid and Cytokine regulation of matrix mwetalloproteinase expression in endometriosis and the establishment of experimental endometriosis in nude mice. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:4782-91.
59. Mulayim N, Savlu A, Guzeloglu-Kayisli O, Kayisli UA, Arici A. Regulation of endometrial-stromal cell matrix metalloproteinase activity and invasiveness by interleukin-8. *Fertil Steril* 2004;81:904-11.
60. Wu MH, Shoji Y, Wu MC, Chuang PC, Lin CC, Huang MF ve ark. Suppression of Matrix Metalloproteinase-9 by Prostaglandin E2 in peritoneal macrophage is associated with severity of endometriosis. *Am J Pathol* 2005;167:1061-9.
61. Rodgers WH, Matrisian LM, Giudice LC, Dsupin B, Cannon P, Svitek C ve ark. Patterns of matrix metalloproteinase expression in cycling endometrium imply differential functions and regulation by steroid hormones. *J Clin Invest* 1994;94:946-53.
62. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001;17:463-516.
63. Collette T, Bellehumeur C, Kats R, Maheux R, Mailloux J, Villeneuve M. Evidence for an increased release of proteolytic activity by the eutopic endometrial tissue in women with endometriosis and for involvement of matrix metalloproteinase-9. *Hum Reprod* 2004;19:1257-64.
64. Chung HW, Lee JY, Moon HS, Hur SE, Park MH, Wen Y ve ark. Matrix metalloproteinase-2, membranous type 1 matrix metalloproteinase, and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression in ectopic and eutopic endometrium. *Fertil Steril* 2002;78:787-95.

65. Di Carlo C, Bonifacio M, Tommaselli GA, Bifulco G, Guerra G, Nappi C. Metalloproteinases, vascular endothelial growth factor, and angiopoietin 1 and 2 in eutopic and ectopic endometrium. *Fertil Steril*. 2009;91(6):2315-23.
66. Noble LS, Takayama K, Zeitoun KM, Putman JM ve ark. Prostaglandin E2 stimulates aromatase expression in endometriosis- derived stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(2): 600-6.
67. 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.
68. Lebovic DI, Mueller MD, Taylor RN. Immunobiology of endometriosis. *Fertil Steril* 2001;75(1):1-10.
69. 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.
70. 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;62:1086–88.
71. 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;10:2671–75.
72. Kanzaki H, 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.
73. Nothnick WB. Treating endometriosis as an autoimmune disease. *Fertil Steril* 2001;76(2):223-31.
74. Dmowski WP, Steele RW, Baker GF. Deficient cellular immunity in endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1981;141(4):377-83.

75. Steele RW, Dmowski WP, Marmer DJ. Immunologic aspects of human endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 1984;6(1):33-6
76. Mettler L, Volkov NI, Kulakov VI, Jürgensen A, Parwaresch MR. Lymphocyte subsets in the endometrium of patients with endometriosis throughout the menstrual cycle. *Am J Reprod Immunol* 1996;36(6):342-8.
77. 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(3):78-82.
78. Haney AF, Muscato JJ, Weinberg JB. Peritoneal fluid cell populations in infertility patients. *Fertil Steril* 1981;35(6):696-8.
79. Halme J, Becker S, Hammond MG, Raj S. Pelvic macrophages in normal and infertile women: the role of patent tubes. *Am J Obstet Gynecol* 1982;142(7):890-5.
80. Halme J, Becker S, Haskill S. Altered maturation and function of peritoneal macrophages: possible role in pathogenesis of endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1987;156(4):783-9.
81. Dunselman GA, Hendrix MG, Bouckaert PX, Evers JL. Functional aspects of peritoneal macrophages in endometriosis of women. *Reprod Fertil* 1988;82(2):707-10.
82. Garcia-Velasco JA, Arici A, Zreik T, Naftolin F, Mor G. Macrophage derived growth factors modulate Fas ligand expression in cultured endometrial stromal cells: a role in endometriosis. *Mol Hum Reprod* 1999;5(7):642-50.
83. Strathy JH, Molgaard CA, Coulam CB, Melton LJ 3rd. Endometriosis and infertility: a laparoscopic study of endometriosis among fertile and infertile women. *Fertil Steril* 1982;38(6):667-72.
84. Sangi-Haghpeykar H, Poindexter AN 3rd. Epidemiology of endometriosis among parous women. *Obstet Gynecol* 1995;85(6):983-92.
85. Child TJ, Tan SL. Endometriosis: aetiology, pathogenesis and treatment. *Drugs* 2001;61(12):1735-50.

86. Chwalisz K, Garg R, Brenner RM, Schubert G, Elger W. Selective progesterone receptor modulators (SPRMs): a novel therapeutic concept in endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 2002;955:373-88.
87. Gruppo Italiano per lo Studio dell'Endometriosi. Relationship between stage, site and morphological characteristics of pelvic endometriosis and pain. *Hum Reprod* 2001;16(12):2668-71.
88. Vercellini P, Trespidi L, De Giorgi O, Cortesi I, Parazzini F, Crosignani PG. Endometriosis and pelvic pain: relation to disease stage and localization. *Fertil Steril* 1996;65(2):299-304.
89. Fedele L, Bianchi S, Bocciolone L, Di Nola G, Parazzini F. Pain symptoms associated with endometriosis. *Obstet Gynecol* 1992;79:767-9.
90. Cornillie FJ, Oosterlynck D, Lauweryns JM, Koninckx PR. Deeply infiltrating pelvic endometriosis: histology and clinical significance. *Fertil Steril* 1990;53:978-83.
91. Barlow DH, Glynn CJ. Endometriosis and pelvic pain. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* 1993;7:775-90.
92. Mounsey AL, Wilgus A, Slawson DC. Diagnosis and Management of Endometriosis. *American Family Physician* 2006; 74(4): 594-602.
93. Barbieri RL, Niloff JM, Bast RC Jr, Scaetzel E, Kistner RW, Knapp RC. Elevated serum concentrations of CA-125 in patients with advanced endometriosis. *Fertil Steril* 1986;45(5):630-4.
94. Pittaway DE, Fayeze JA. The use of CA-125 in the diagnosis and management of endometriosis. *Fertil Steril* 1986;46(5):790-5.
95. Koninckx PR, Riittinen L, Seppala M, Cornillie FJ. CA-125 and placental protein 14 concentrations in plasma and peritoneal fluid of women with deeply infiltrating pelvic endometriosis. *Fertil Steril* 1992;57(3):523-30.
96. Mol BW, Bayram N, Lijmer JG, Wiegerinck MA ve ark. The performance Of CA-125 measurement in the detection of endometriosis: a meta analysis. *Fertil Steril* 1998; 70(6): 1101-8.



97. Shaw RW. Endometriosis. Blackwell Science Ltd. London, 1995.
98. Ling FW. Randomized controlled trial of depot leuprolide in patients with chronic pelvic pain and clinically suspected endometriosis. Pelvic Pain Study Group. *Obstet Gynecol* 1999;93(1):51-8.
99. Speroff L, Fritz MA. Endometriosis. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. Seventh edition 2005. p: 1103-1133.
100. Murphy AA, Green WR, Bobbie D, dela Cruz ZC, Rock JA. Unsuspected endometriosis documented by scanning electron microscopy in visually normal peritoneum. *Fertil Steril* 1986;46(3):522-4.
101. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis:1996. *Fertil Steril* 1997;67:817-21.
102. Crosignani P, Olive D, Bergqvist A, Luciano A. Advances in the management of endometriosis: an update for clinicians. *Hum Reprod Update* 2006;12(2):179-89.
103. Lu PY, JO Steven. Endometriosis: Current management. *Mayo Clin Proc* 1995; 70: 453-63.
104. Hughes E, Brown J, Collins JJ, Farquhar C, Fedorkow DM, Vandekerckhove P. Ovulation suppression for endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007 18;(3):CD000155.
105. Vercellini P, Viganò P, Somigliana E. The role of the levonorgestrel-releasing intrauterine device in the management of symptomatic endometriosis. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* 2005;17(4): 359–365.
106. Crosignani PG, Luciano A, Ray A, Bergqvist A. Subcutaneous depot medroxyprogesterone acetate versus leuprolide acetate in the treatment of endometriosis-associated pain. *Hum Reprod* 2006;21(1):248-56.

107. Schlaff WD, Carson SA, Luciano A, Ross D, Bergqvist A. Subcutaneous injection of depot medroxyprogesterone acetate compared with leuprolide acetate in the treatment of endometriosis-associated pain. *Fertil Steril* 2006;85(2):314-25.
108. Moore J, Kennedy S, Prentice A. Modern combined oral contraceptives for pain associated with endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007;(3):CD001019.
109. Olive DL. Medical therapy of endometriosis. *Semin Reprod Med* 2003;21(2):209-22.
110. Muzii L, Marana R, Caruana P, Catalano GF, Margutti F, Panici PB. Postoperative administration of monophasic combined oral contraceptives after laparoscopic treatment of ovarian endometriomas: a prospective, randomized trial. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183(3):588-92.
111. Vercellini P, Trespidi L, Colombo A, Vendola N, Marchini M, Crosignani PG. A gonadotropin-releasing hormone agonist versus a low-dose oral contraceptive for pelvic pain associated with endometriosis. *Fertil Steril* 1993;60(1):75-9.
112. Waller KG, Shaw RW. Gonadotropin-releasing hormone analogues for the treatment of endometriosis: long-term follow-up. *Fertil Steril* 1993;59(3):511-5.
113. Adamson D. Surgical management of endometriosis. *Semin Reprod Med* 2003; 21: 223-33.
114. Guo SW. Recurrence of endometriosis and its control. *Hum Reprod Update* 2009;15(4):441-461.
115. Bruhat MA, Mage G, Chapron C, Pouly JL, Canis M, Wattiez A. Present day endoscopic surgery in gynecology. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1991;41(1):4-13.
116. Saleh A, Tulndi T. Reoperation after laparoscopic treatment of ovarian endometriomas by excision and fenestration. *Fertil Steril* 1999; 72(2): 322-24.
117. Chapron C, Vercellini P, Barakat H, Vieira M et al. Management of ovarian endometriomas. *Hum Reprod Update* 2002; 8: 591-97.

118. The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine: Treatment of pelvic pain associated with endometriosis. *Fertil Steril* 2006; 86: 18-27.
119. Namnour AB, Hickman TN, Goodman SB, Gehlbach DL, Rock JA. Incidence of symptom recurrence after hysterectomy for endometriosis. *Fertil Steril* 1995;64(5):898-902.
120. Donnez J, Pirard C, Smets M, Jadoul P, Squifflet J. Pre- and post-surgical management of endometriosis. *Semin Reprod Med* 2003;21(2):235-42.
121. Tesone M, Bilotas M, Barañao RI, Meresman G. The role of GnRH analogues in endometriosis-associated apoptosis and angiogenesis. *Gynecol Obstet Invest* 2008;66:10-8.
122. Agic A, Djalali S, Diedrich K, Hornung D. Apoptosis in endometriosis. *Gynecol Obstet Invest* 2009;68(4):217-23.
123. Hengartner MO, Ellis RE, Horvitz HR. *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature* 1992; 356:494-9.
124. Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 1993;75(4):641-52.
125. Kim M, Tilly JL. Current concepts in Bcl-2 family member regulation of female germ cell development and survival. *Biochimica et Biophysica Acta* 2004; 1644: 205– 210.
126. Korsmeyer SJ. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood* 1992;80:879–86.
127. Chao DT, Korsmeyer SJ. Bcl-2 family: regulators of cell death. *Annu Immunol* 1998;16:395– 419.
128. Kokawa K, Shikone T, Nakano R. Apoptosis in the human uterine endometrium during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:4144-47.
129. Tao XJ, Tilly KI, Maravei DV, Shifren JL, Krajewski S, Reed JC, Tilly JT, Isaacson KB. Differential expression of members of the bcl-2 gene family in proliferative and secretory human endometrium: glandular epithelial cell apoptosis is associated with increased expression of bax. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:2738-46.

130. Vaskivuo TE, Stenback F, Karhumaa P, Risteli J, Dunkel L, Tapanainen JS. Apoptosis and apoptosis-related proteins in human endometrium. *Mol Cell Endocrinol* 2000;165:75-83.
131. Hopwood D, Levison DA. Atrophy and apoptosis in the cyclical human endometrium. *J Pathol* 1976; 119: 159–166.
132. Otsuki Y, Misaki O, Sugimoto O, Ito Y, Tsujimoto Y, Akao Y. Cyclic bcl-2 expression in human uterine endometrium during menstrual cycle. *Lancet* 1994; 344: 28–29.
133. Yamashita H, Otsuki Y, Matsumoto K, Ueki K, Ueki M. Fas ligand, Fas antigen and Bcl-2 expression in human endometrium during the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* 1999;5(4):358-64.
134. Tabibzadeh S, Zupi E, Babaknia A. Site and menstrual cycle dependent expression of proteins of the TNF receptor family and Bcl-2 oncoprotein and phase specific production of TNF $\alpha$  in human endometrium. *Hum Reprod* 1995;10:277– 86.
135. Critchley HOD, Tong S, Cameron ST, Drudy TA, Kelly RW, Baird DT. Regulation of Bcl-2 gene family members in human endometrium by antiprogestin administration in vivo. *J Reprod Fertil* 1999;115:389 –95.
136. Nawaz S, Lynch MP, Galand P, Gerschenson LE. Hormonal regulation of cell death in rabbit uterine epithelium. *Am J Pathol* 1987;127:51–9.
137. Rotello RJ, Hocker MB, Gerschenson LE. Biochemical evidence for programmed cell death in rabbit uterine epithelium. *Am J Pathol* 1989;134:491–5.
138. Harada M, Suganuma N, Furuhashi M, Nagasaka T, Nakashima N, Kikkawa F, ve ark. Detection of apoptosis in human endometriotic tissues. *Mol Hum Reprod* 1996;2:307–15.
139. Otsuki Y. Apoptosis in human endometrium: apoptotic detection methods and signaling. *Med Electron Microsc* 2001;34:166-73.

140. Daikoku E, Ito Y, Otsuki Y. The induction of apoptosis in ovaries and uteri of bcl-2 deficient mice. *Med Electron Microsc.*1998; 31,68-76.
141. Cheng EH, Levine B, Boise LH, Thompson CB, Hardwick JM. Bax-independent inhibition of apoptosis by Bcl-XL. *Nature* 1996;379(6565):554-6.
142. Harada T, Kaponis A, Iwabe T, Taniguchi F, Makrydimas G, Sofikitis N, Paschopoulos M, Paraskevaidis E, Terakawa N. Apoptosis in human endometrium and endometriosis. *Hum Reprod Update* 2004;10(1):29-38.
143. Song J, Rutherford T, Naftolin F, Brown S, Mor G. Hormonal regulation of apoptosis and the Fas and Fas ligand system in human endometrial cells. *Mol Hum Reprod* 2002;8:447-55.
144. Watanabe H, Kanzaki H, Narukawa S, Inoue T, Katsuragawa H, Kaneko Y, Mori T. Bcl-2 and Fas expression in eutopic and ectopic human endometrium during the menstrual cycle in relation to endometrial cell apoptosis. *Am J Obstet Gynecol* 1997;176: 360-68.
145. Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, Matsuda H, Tsujimoto Y. Bcl-2 expression prevents activation of the ICE protease cascade. *Oncogene* 1996;12:2251-57.
146. Sharpe-Timms KL. Endometrial anomalies in women with endometriosis. *Ann NY Acad Sci* 2001; 943: 131-147.
147. Jones RK, Searle RF, Bulmer JN. Apoptosis and bcl-2 expression in normal human endometrium, endometriosis and adenomyosis. *Hum Reprod* 1998;13(12):3496-502.
148. 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(4):760-6.

149. Johnson MC, Torres M, Alves A, Bacallao K, Fuentes A, Vega M, Boric MA. Augmented cell survival in eutopic endometrium from women with endometriosis: expression of c-myc, TGF-beta1 and bax genes. *Reprod Biol Endocrinol* 2005;3:45.
150. Zubor P, Hatok J, Galo S, Dokus K, Klobusiakova D, Danko J, Racay P. Anti-apoptotic and pro-apoptotic gene expression evaluated from eutopic endometrium in the proliferative phase of the menstrual cycle among women with endometriosis and healthy controls. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009;145(2):172-6.
151. Kosugi Y, Elias S, Malinak LR, Nagata J, Isaka K, Takayama M, Simpson JL, Bischoff FZ. Increased heterogeneity of chromosome 17 aneuploidy in endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 180:792-97.
152. Obata K, Morland SJ, Watson RH, Hitchcock A, Chenevix-Trench G, Thomas EJ, Campbell IG. Frequent PTEN/MMAC mutations in endometrioid, but not serous or mucinous epithelial ovarian tumors. *Cancer Res* 1998; 58:2095-97.
153. Jiang X, Morland SJ, Hitchcock A, Thomas EJ, Campbell IG. Allelotyping of endometriosis with adjacent ovarian carcinoma reveals evidence of a common lineage. *Cancer Res* 1998;58:1707-12.
154. Arimoto T, Katagiri T, Oda K, Tsunoda T, Yasugi T, Osuga Y, Yoshicavva H, Nishii O, Yano T, Taketani Y, Nakamura Y. Genome-wide cDNA microarray analysis of gene-expression profiles involved in ovarian endometriosis. *Int J Oncol* 2003; 22: 551-560.
155. Eischen A, Duclos B, Schmit-Goguel M, Rouyer N, Bergerat JP, Hummel M, Oskam R, Oberling F. Human resident peritoneal macrophages: phenotype and histology. *Br J Haematol* 1994; 88:712-22.
156. McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Smith SA. Immunocolonization of the apoptosis regulating proteins Bcl-2 and Bax in human endometrium and isolated peritoneal fluid macrophages in endometriosis. *Hum Reprod* 1997; 12:146-52

157. Meresman GF, Bilotas MA, Lombardi E, Tesone M, Sueldo C, Baranao R. Effect of GnRH analogues on apoptosis and release of interleukin-1b and vascular endothelial growth factor in endometrial cell cultures from patients with endometriosis. *Hum Reprod* 2003;18:1767-71.
158. Bilotas M, Barañao RI, Buquet R, Sueldo C, Tesone M, Meresman GF. Effect of GnRH analogues on apoptosis and expression of Bcl-2, Bax, Fas and FasL proteins in endometrial epithelial cell cultures from patients with endometriosis and controls. *Hum Reprod* 2007;22: 644–653.
159. Meresman GF, Bilotas M, Buquet RA, Barañao RI, Sueldo C, Tesone M. Gonadotropin-releasing hormone agonist induces apoptosis and reduces cell proliferation in eutopic endometrial cultures from women with endometriosis. *Fertil Steril* 2003;80:702-7.
160. Imai A, Takagi A, Tamaya T. Gonadotropin-releasing hormone analog repairs reduced endometrial cell apoptosis in endometriosis in vitro. *Am J Obstet Gynecol* 2000;182(5):1142-6.
161. Khan KN, Kitajima M, Hiraki K, Fujishita A, Sekine I, Ishimaru T, Masuzaki H. Changes in tissue inflammation, angiogenesis and apoptosis in endometriosis, adenomyosis and uterine myoma after GnRH agonist therapy. *Hum Reprod* 2010;25(3):642-53.
162. Koh EAT, Illingworth PJ, Duncan WC, Critchley HOD. Immunolocalization of Bcl-2 protein in human endometrium in the menstrual cycle and stimulated early pregnancy. *Hum Reprod* 1995;10:1557– 62.
163. Meresman GF, Auge L, Baranao RI, Lombardi E, Tesone M, Sueldo C. Oral contraceptives suppress cell proliferation and enhance apoptosis of eutopic endometrial tissue from patients with endometriosis. *Fertil Steril* 2002;77:1141-47.
164. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003; 9: 653- 660.

165. Intaglietta M, Johnson PC, Winslow RM. Microvascular and tissue oxygen distribution. *Cardiovasc Res* 1996; 32: 632–643.
166. Goodsell DS. The molecular perspective: VEGF and angiogenesis. *Stem Cells* 2003;21:118-119.
167. Brooks PC. Role of integrins in angiogenesis. *Eur J Cancer* 1996;32A:2423-29.
168. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992;267:10931–34.
169. Donnez J, Smoes P, Gillerot S, Casanas-Roux F, Nisolle M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis. *Hum Reprod* 1998;13:1686-90.
170. Taylor RN, Lebovic DI, Mueller MD. Angiogenic factors in endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 2002;955(26):89-100.
171. Nisolle M, Casanas-Roux F, Anaf V, Mine JM, Donnez J. Morphometric study of the stromal vascularization in peritoneal endometriosis. *Fertil Steril* 1993;59:681–84.
172. Matsuzaki S, Canis M, Murakami T, Dechelotte P, Bruhat MA, Okamura K. Immunohistochemical analysis of the role of angiogenic status in the vasculature of peritoneal endometriosis. *Fertil Steril* 2001;76:712–16.
173. Hull ML, Charnock-Jones DS, Chan CL, et al. Antiangiogenic agents are effective inhibitors of endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(6):2889-99.
174. Laschke MW, Menger MD. In vitro and in vivo approaches to study angiogenesis in the pathophysiology and therapy of endometriosis. *Hum Reprod Update* 2007;13:331–342.
175. Becker CM, D'Amato RJ. Angiogenesis and antiangiogenic therapy in endometriosis. *Microvasc Res* 2007;74:121–130.



176. Dabrosin C, Gyorffy S, Margetts P, Ross C, Gauldie J. Therapeutic effect of angiostatin gene transfer in a murine model of endometriosis. *Am J Pathol* 2002;161:909–18.
177. Nap AW, Griffioen AW, Dunselman GA, ve ark. Antiangiogenesis therapy for endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(3):1089-1095.
178. Becker CM, Sampson DA, Rupnick MA, Rohan RM, Efstathiou JA, Short SM, Taylor GA, Folkman J, D'Amato RJ. Endostatin inhibits the growth of endometriotic lesions but does not affect fertility. *Fertil Steril* 2005;84(Suppl 2):1144–1155.
179. Laschke MW, Elitzsch A, Vollmar B, Vajkoczy P, Menger MD. Combined inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor, but not inhibition of VEGF alone, effectively suppresses angiogenesis and vessel maturation in endometriotic lesions. *Hum Reprod* 2006;21(1):262-8.
180. Wingfield M, Macpherson A, Healy DL, Rogers PA. Cell proliferation is increased in the endometrium of women with endometriosis. *Fertil Steril* 1995;64:340–46.
181. Koninckx PR, Kennedy SH, Barlow DH. Endometriotic disease: the role of peritoneal fluid. *Hum Reprod Update* 1998;4:741–751.
182. Gazvani R, Templeton A. Peritoneal environment, cytokines and angiogenesis in the pathophysiology of endometriosis. *Reproduction* 2002;123:217–26.
183. Lin YJ, Lai MD, Lei HY, Wing LY. Neutrophils and macrophages promote angiogenesis in the early stage of endometriosis in a mouse model. *Endocrinology* 2006;147:1278–86.
184. Fainaru O, Adini A, Benny O, Adini I, Short S, Bazinet L, Nakai K, Pravda E, Hornstein MD, D'Amato RJ ve ark. Dendritic cells support angiogenesis and promote lesion growth in a murine model of endometriosis. *FASEB J* 2008;22:522–29.

185. McCarty MF, Liu W, Fan F, Parikh A, Reimuth N, Stoeltzing O, Ellis LM. Promises and pitfalls of anti-angiogenic therapy in clinical trials. *Trends Mol Med* 2003;9:53–58.
186. Brack SS, Dinkelborg LM, Neri D. Molecular targeting of angiogenesis form imaging and therapy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2004;31:1327–41.
187. Dogan E, Saygili U, Posaci C, Tuna B, Caliskan S, Altunyurt S, Saatli B. Regression of endometrial explants in rats treated with the cyclooxygenase-2 inhibitor rofecoxib. *Fertil Steril* 2004;82 Suppl 3:1115-20.
188. Matsuzaki S, Canis M, Darcha C, Dallel R, Okamura K, Mage G. Cyclooxygenase-2 selective inhibitor prevents implantation of eutopic endometrium to ectopic sites in rats. *Fertil Steril* 2004;82(6):1609-15.
189. Machado DE, Berardo PT, Landgraf RG, Fernandes PD, Palmero C, Alves LM, Abrao MS, Nasciutti LE. A selective cyclooxygenase-2 inhibitor suppresses the growth of endometriosis with an antiangiogenic effect in a rat model. *Fertil Steril* 2010;93(8):2674-9.
190. Hull ML, Prentice A, Wang DY, Butt RP, Phillips SC, Smith SK, Charnock-Jones DS. Nimesulide, a COX-2 inhibitor, does not reduce lesion size or number in a nude mouse model of endometriosis. *Hum Reprod* 2005;20(2):350-8.
191. Vlahos NF, Gregoriou O, Deliveliotou A, Perrea D, Vlachos A, Zhao Y, Lai J, Creatsas G. Effect of pentoxifylline on vascular endothelial growth factor C and flk-1 expression on endometrial implants in the rat endometriosis model. *Fertil Steril* 2010;93(4):1316-23.
192. Novella-Maestre E, Carda C, Noguera I, Ruiz-Saurí A, García-Velasco JA, Simón C, Pellicer A. Dopamine agonist administration causes a reduction in endometrial implants through modulation of angiogenesis in experimentally induced endometriosis. *Hum Reprod* 2009;24(5):1025-35.

193. Ceyhan ST, Onguru O, Baser I, Gunhan O. Expression of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in ovarian endometriotic cysts and their relationship with angiogenesis. *Fertil Steril* 2008;90(4):988-93.
194. Ferrara N, Davis-Smith T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997;18:4–25.
195. de Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 1992;255:989-91.
196. Millauer B, Wizigmann-Voos S, Schnurch H, Martinez R, Moller NP, Risau W, Ullrich A. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 1993;72:835–46.
197. Shibuya M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *J BiochemMol Biol* 2006;39:469–78.
198. Smith, S.K. Regulation of angiogenesis in the endometrium. *Trends Endocrinol Metab* 2001;12:147-51.
199. Tan XJ, Lang JH, Liu DY, Shen K, Leng JH, Zhu L. Expression of vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 mRNA in patients with endometriosis. *Fertil Steril* 2002;78:148-53.
200. McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS, ve ark. Vascular endothelial growth factor is produced by peritoneal fluid macrophages in endometriosis and is regulated by ovarian steroids. *J Clin Invest* 1996;98(2):482-89.
201. Grothey A, Ellis LM. Targeting angiogenesis driven by vascular endothelial growth factors using antibody-based therapies. *Cancer J* 2008;14(3):170-177.

202. Selvakumaran M, Yao KS, Feldman MD, O'Dwyer PJ. Antitumor effect of the angiogenesis inhibitor bevacizumab is dependent on susceptibility of tumors to hypoxia-induced apoptosis. *Biochem Pharmacol* 2008;75(3):627-38.
203. Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, Neeman M, Bono F, Abramovitch R, Maxwell P, Koch CJ, Ratcliffe P, Moons L, Jain RK, Collen D, Keshert E. Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 1998;394(6692):485-90.
204. Shaheen RM, Davis DW, Liu W, Zebrowski BK, Wilson MR, Bucana CD, McConkey DJ, McMahon G, Ellis LM. Antiangiogenic therapy targeting the tyrosine kinase receptor for vascular endothelial growth factor receptor inhibits the growth of colon cancer liver metastasis and induces tumor and endothelial cell apoptosis. *Cancer Res* 1999;59(21):5412-6.
205. Moraloğlu O, Işık H, Kiliç S, Sahin U, Caydere M, Ustün H, Batioglu S. Effect of bevacizumab on postoperative adhesion formation in a rat uterine horn adhesion model and the correlation with vascular endothelial growth factor and Ki-67 immunopositivity. *Fertil Steril* 2011;95(8):2638-41.
206. Ricci AG, Olivares CN, Bilotas MA, Meresman GF, Barañao RI. Effect of vascular endothelial growth factor inhibition on endometrial implant development in a murine model of endometriosis. *Reprod Sci* 2011;18(7):614-22.
207. Vernon MW, Wilson EA. Studies on the surgical induction of endometriosis in the rat. *Fertil Steril* 1985;44:684-94.
208. Linsky CB, Diamond MP, Cunningham T, Constantine B, De-Cherney AH, diZerega GS. Adhesion reduction in a rabbit uterine horn model using an absorbable barrier TC-7. *J Reprod Med* 1987;32:17-20.
209. Keenan JA, Williams-Boyce PK, Massey PJ, Chen TT, Caudle 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.

210. Borroni R, Di Blasio AM, Gaffuri B, Santorsola R, Busacca M, Vigano P, Vignali M. Expression of GnRH receptor gene in human ectopic endometrial cells and inhibition of their proliferation by leuprolide acetate. *Mol Cell Endocrinol* 2000;159:37–43.
211. Khan KN, Kitajima M, Hiraki K, Fujishita A, Nakashima M, Ishimaru T, Masuzaki H. Cell proliferation effect of GnRH agonist on pathological lesions of women with endometriosis, adenomyosis and uterine myoma. *Hum Reprod* 2010;25(11):2878-90.
212. Gomes MK, Rosa-e-Silva JC, Garcia SB, de Sá Rosa-e-Silva AC, Turatti A, Vieira CS, Ferriani RA. Effects of the levonorgestrel-releasing intrauterine system on cell proliferation, Fas expression and steroid receptors in endometriosis lesions and normal endometrium. *Hum Reprod* 2009;24(11):2736-45.
213. Maruo T, Laoag-Fernandez JB, Pakarinen P, Murakoshi H, Spitz IM, Johansson E. Effects of the levonorgestrel-releasing intrauterine system on proliferation and apoptosis in the endometrium. *Hum Reprod* 2001;16(10):2103-8.
214. Choksuchat C, Zhao S, Deutch TD, Kimble TD, Archer DF. Effects of progesterone, levonorgestrel and medroxyprogesterone acetate on apoptosis in human endometrial endothelial cells. *Contraception* 2009;79(2):139-45.
215. Xu Q, Qiu L, Zhu L, Luo L, Xu C. Levonorgestrel inhibits proliferation and induces apoptosis in uterine leiomyoma cells. *Contraception* 2010;82(3):301-8.
216. Mönckedieck V, Sannecke C, Husen B, Kumbartski M, Kimmig R, Tötsch M, Winterhager E, Grümmer R. Progestins inhibit expression of MMPs and of angiogenic factors in human ectopic endometrial lesions in a mouse model. *Mol Hum Reprod* 2009;15(10):633-43.
217. Surrey ES, Halme J. Direct effects of medroxyprogesterone acetate, danazol, and leuprolide acetate on endometrial stromal cell proliferation in vitro. *Fertil Steril* 1992;58, 273–78.

218. Braun DP, Gebel H, Dmowski WP. Effect of danazol in vitro and in vivo on monocyte-mediated enhancement of endometrial cell proliferation in women with endometriosis. *Fertil Steril* 1994; 62, 89–95.
219. Igarashi M, Iizuka M, Abe Y, Ibuki Y. Novel vaginal danazol ring therapy for pelvic endometriosis, in particular deeply infiltrating endometriosis. *Hum Reprod* 1998;13(7):1952-6.
220. Olivares C, Bilotas M, Buquet R, Borghi M, Sueldo C, Tesone M, Meresman G. Effects of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor on endometrial epithelial cells from patients with endometriosis. *Hum Reprod* 2008;23(12):2701-8.
221. Laschke MW, Elitzsch A, Scheuer C, Vollmar B, Menger MD. Selective cyclooxygenase-2 inhibition induces regression of autologous endometrial grafts by down-regulation of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis and stimulation of caspase-3-dependent apoptosis. *Fertil Steril* 2007;87(1):163-71.
222. Ozawa Y, Murakami T, Tamura M, Terada Y, Yaegashi N, Okamura K. A selective cyclooxygenase-2 inhibitor suppresses the growth of endometriosis xenografts via antiangiogenic activity in severe combined immunodeficiency mice. *Fertil Steril* 2006;86(4 Suppl):1146-51.
223. Seo SK, Nam A, Jeon YE, Cho S, Choi YS, Lee BS. Expression and possible role of non-steroidal anti-inflammatory drug-activated gene-1 (NAG-1) in the human endometrium and endometriosis. *Hum Reprod* 2010;25(12):3043-9.
224. Chen YJ, Li HY, Chang YL, Yuan CC, Tai LK, Lu KH, Chang CM, Chiou SH. Suppression of migratory/invasive ability and induction of apoptosis in adenomyosis-derived mesenchymal stem cells by cyclooxygenase-2 inhibitors. *Fertil Steril* 2010;94(6):1972-9.
225. Olivares C, Ricci A, Bilotas M, Barañao RI, Meresman G. The inhibitory effect of celecoxib and rosiglitazone on experimental endometriosis. *Fertil Steril* 2011;96(2):428-33.

226. Liu W, Ahmad SA, Reinmuth N, Shaheen RM, Jung YD, Fan F, Ellis LM. Endothelial cell survival and apoptosis in the tumor vasculature. *Apoptosis* 2000;5(4):323-8.
227. Harmey JH, Bouchier-Hayes D. Vascular endothelial growth factor (VEGF), a survival factor for tumour cells: implications for anti-angiogenic therapy. *Bioessays* 2002;24(3):280-3.
228. Ignjatovic D, Aasland K, Pettersen M, Sund S, Chen Y, Spasojevic M, Nesgaard JM. Intra-abdominal administration of bevacizumab diminishes intra-peritoneal adhesions. *Am J Surg* 2010;200(2):270-5.
229. Ferrara N, Hillan KJ, Novotny W. Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;333(2):328-35.
230. McCarthy M. Antiangiogenesis drug promising for metastatic colorectal cancer. *Lancet* 2003;361(9373):1959.
231. Shord SS, Bressler LR, Tierney LA, Cuellar S, George A. Understanding and managing the possible adverse effects associated with bevacizumab. *Am J Health Syst Pharm* 2009;66(11):999-1013.
232. Kobold S, Hegewisch-Becker S, Oechsle K, Jordan K, Bokemeyer C, Atanackovic D. Intraperitoneal VEGF inhibition using bevacizumab: a potential approach for the symptomatic treatment of malignant ascites? *Oncologist* 2009;14(12):1242-51.