

MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı

DENEYSEL ENDOMETRİOZİS MODELİNDE KETOTİFEN, DİENOGESE VE
DANAZOL'UN TEDAVİ EDİCİ ETKİLERİNİN HİSTOLOJİK
PARAMETRELERLE İNCELENMESİ

UZMANLIK TEZİ
DR. YASEMİN VAROL GEM

Tez Danışmanı
PROF. DR. SEMRA ORUÇ KOLTAN

Manisa, 2019

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasının hazırlanmasının her aşamasında yardımlarını esirgemeyen ve büyük katkıları olan tez danışmanım, değerli hocam Prof.Dr. Semra ORUÇ KOLTAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık eğitimim süresince engin bilgi, beceri ve tecrübelerini benimle paylaşan, sabır ve hoşgörü ile emeklerini esirgemeyen, birlikte çalışmaktan her zaman gurur ve onur duyduğum değerli hocalarım Prof.Dr. Faik Mümtaz KOYUNCU, Prof.Dr. Tevfik GÜVENAL, Prof.Dr. Naci Kemal KUŞÇU, Doç.Dr. Yıldız UYAR, Doç.Dr. Aslı GÖKER, Doç.Dr. Burcu ARTUNÇ ÜLKÜMEN ve Doç.Dr. Pınar Solmaz HASDEMİR'e şükranlarımı sunarım.

Uzmanlık eğitimim boyunca her konuda yardım ve destekleriyle yanımda olan birlikte çalışmaktan gurur duyduğum, iyi-kötü günleri beraber geçirdiğimiz tüm değerli asistan arkadaşlarıma, klinik hemşirelerimize, sekreterlerimize ve personel arkadaşlarımıza teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde büyük fedakarlıkları ve katkıları olan, sevgilerini ve desteklerini hep yanımda hissettiğim sevgili annem ve babam Süheyla VAROL ve Reşat VAROL'a, sevgili kardeşlerim Özlem VAROL ve Adnan VAROL'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımda olduğu andan itibaren bana desteğini esirgemeyen, sevgi ve özveriyle her zaman yanımda olan çok sevgili eşim Dr. Kadir GEM'e ve hayatımıza girdiği andan itibaren anlam katan sevgili, küçük kızım Beren GEM'e teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TABLolar VE ŞEKİLLER LİSTESİ	III
I.GİRİŞ.....	1
II.GENEL BİLGİLER.....	3
1.Tanım.....	3
2.Sıklık.....	3
3.Etiyoloji.....	3
4.Endometriozisin Sınıflaması ve Lokalizasyonu.....	8
5.Klinik Semptomlar.....	11
6.Tanı.....	13
7. Tedavi.....	16
8. Ketotifen.....	22
III.MATERYAL VE METOD.....	24
IV. BULGULAR.....	33
1.Endometriotik implant bulguları.....	33
2.Histokimyasal bulgular.....	34
3.İmmünohistokimyasal Bulgular.....	37
V.TARTIŞMA.....	43
VI.SONUÇ.....	47
VII.ÖZET	48
VIII.İNGİLİZCE ÖZET.....	50
IX.KAYNAKLAR.....	52

ŞEKİLLER VE TABLOLAR LİSTESİ

ŞEKİL1: Batın ve pelviste endometriotik implantların olası yerleşimleri.....	9
ŞEKİL2: Amerikan Üreme Tıbbı Derneği yenilenmiş endometriozis klasifikasyonu (ASRM 1997).....	10
ŞEKİL3: Amerikan Üreme Tıbbı Derneği yenilenmiş endometriozis klasifikasyonu (ASRM 1997).....	11
TABLO 1. Parafin doku takip protokolü.....	26
TABLO 2. Hematoksilen-Eozin boyama protokolü.....	27
TABLO 3. İndirekt immunohistokimya protokolü.....	29
TABLO 4. Toluidin mavisi boyama protokolü.....	30
TABLO 5. ELISA Protokolü.....	32
TABLO 6. Endometriotik implant boyutlarının preop ve postop hacim karşılaştırması.....	33
TABLO 7. Ki-67, triptaz ve TNF α ait immunoreaktivitelerin gruplar bazında epitelial ve stromal yoğunlukları.....	41
RESİM 1: Omental yapışıklık oluşturmuş endometriotik implant görünümü.....	25
RESİM 2: Eksize edilen endometriotik implantların görünümü.....	33
RESİM 3: Endometriod implant örneklerinin histokimyasal boyaması.....	35
RESİM 4: Endometriod implant örneklerinin toluidin mavisi ile boyaması.....	37
RESİM 5: Endometriod implant örneklerinde Ki-67 dağılımı.....	38
RESİM 6: Endometriod implant örneklerinde triptaz dağılımı.....	39
RESİM 7: Endometriod implant örneklerinde TNF α dağılımı.....	40
GRAFİK 1: Deneysel endometriozis modeli batın sıvısındaki TNF α seviyeleri.....	43

GİRİŞ

Endometriozis, endometrial gland ve stromanın ekstrauterin bulunması olarak tanımlanan, benign, kronik ve yaygın görülen bir jinekolojik hastalıktır(1). Geniş spektrumlu kliniğe sahip olmakla beraber tamamen asemptomatik olabileceği gibi kronik pelvik ağrı, dismenore ve infertiliteyle de seyredebilir(2-3).

Endometriozisin inflamatuvar bir hastalık olduğu ve patofizyolojisinde endokrin, genetik ve çevresel faktörler kadar immün sistem değişikliklerinin de önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (4-5). Endometriozis kronik inflamasyonla ilişkili olduğundan, yeni tedavi stratejileri immün modüle edici ilaçlara odaklanmaktadır. Ancak, immün hücre alt-gruplarının, lokal olarak üretilen sitokinler, kemokinler ve ektopik endometriyal implantların büyümesini ve bunlarla ilişkili enflamasyonu modüle eden diğer mitojenik faktörlerin ağına nasıl ve ne ölçüde katkıda bulunduğu hakkında pek az şey bilinmektedir. Mast hücreleri (MH), özellikle alerjik reaksiyonlar sırasında bağışıklık sisteminin temel oyuncularını olarak bilinmektedirler. Fakat, son yıllarda MH'lerin çok daha geniş bir işlev yelpazesi sergiledikleri , ev sahibi savunma ve yara iyileşme yanıtlarına da dahil oldukları tespit edilmiştir(6).

Ketotifen, anti-alerjik aktiviteye sahip bir sikloheptatien türevidir. Ketotifen, histamin (H1) reseptörlerini seçici olarak bloke ederek histamin salınımının neden olduğu semptomları önlemektedir. Bu madde ayrıca, hipersensitivite reaksiyonlarında rol oynayan mast hücrelerinden enflamatuar mediatörlerin salınmasına engel olarak kemotaksiyi ve eozinofillerin aktivasyonunu azaltmaktadır(7).

Endometriotik lezyonlar boyunca mast hücrelerinin yaygın bir infiltrasyonu gözlenirken, bu hücrelerin ektopik endometriyum implantlarının büyümesini modüle eden ve endometrioz ile ilişkili inflamasyonu aktive eden moleküller ağı üzerine nasıl katkıda bulunduğu hakkında çok az şey bilinmektedir.(8)

Dienogest 17a-hidroksiprogesteronun özelliklerine sahip olan, oral formda aktif bir yarı sentetik progestojendir. 19-nortestosteronun bir türevidir ve antiandrojenik özelliklere sahiptir. Ağrılı semptomları hafifletmek ve endometriotik lezyonları azaltmak için endometriozisde onaylanmış bir tedavi seçeneğidir (9).

Danazol, 17 – α -etinin testosteronunun izoksazol türevi olan sentetik bir ajandır. Ana etki mekanizması , midsiklustaki LH pikini baskılamak ve kronik bir anovulasyon durumu yaratmaktır (10). Bu etkileri dolaşımdaki steroid transport proteinlerine ve hedef dokulardaki spesifik reseptörlere bağlanarak oluşmaktadır. Danazol, gonadotropinleri inhibe ederek, gametogenezi ve steroidogenezi baskılamaktadır. Ayrıca gonadal ve adrenal steroidogenesis, danazolün spesifik enzim sistemleri üzerindeki etkisi ile daha da bastırılmaktadır. Danazol ayrıca in vivo ve in vitro olarak immünoregülatör etkiler gösterir. Bu etki mekanizmaları sayesinde endometriyal atrofi ile sonuçlanan amenore ve hipoestrojenik bir duruma neden olarak klinik iyileşme sağlamaktadır (11). Fakat günümüzde danazol'un akne ,sıcak basması, hirsutizm ,kötü lipid profili ve irreversibl bir etki olan ses kalınlaşması ve karaciğer enzim yüksekliği gibi yan etkileri sebebiyle medikal tedavide daha az tercih edilmektedir.

Bu deneysel çalışmada, endometriozis patofizyolojisinde rolü olduğu düşünülen mast hücrelerini stabilize eden ketotifen'in endometriozis tedavisinde etkinliği olup olmadığı ve varsa bu etkinliğin endometriozis tedavisinde etkinliği kanıtlanmış olan dienogest ve danazol ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

1. TANIM

Endometriozis, endometrial gland ve stromasının uterus dışında bulunması olarak tanımlanan, benign, hormon bağımlı, kronik, inflamatuvar ve yaygın görülen bir jinekolojik hastalıktır (1). Sıklıkla reproduktif kadınlarda görülmektedir.

Endometriotik implantlar ,en sık periton üzerinde yerleşmekte , ayrıca overler, rektovajinal septum ,üreter ve daha nadir olarak mesane perikard ve plevrada bulunabilmektedir. (12-13).

2. SIKLIK

Endometriozisli kadınların çoğu asemptomatik olduğundan ve görüntüleme yöntemlerinin tanıda güvenliği düşük olduğundan endometriozisin toplumdaki görülme sıklığı bilinmemektedir. Endometriozis tanısında altın standart hispatolojik tanı ile birlikte olan laparoskopi veya laparatomidir (14-15). Cerrahinin endometriozis tanısında tek güvenilir yöntem olmasından ve genellikle güçlü bir şekilde hastalığa isaret eden belirti ya da klinik bulguları olmayan hastalara cerrahi uygulanmaması nedeniyle sıklığını belirlemek oldukça zordur. Asemptomatik kadınlarda endometriozis prevelansı araştırılan popülasyona göre %2 ile %22 arasında değişmektedir (16-17). Asemptomatik endometriozis sıklığı elektif sterilizasyon yapılanlarda ise %1-7, reproduktif dönemde pelvik ağrısı olanlarda %12-32, infertil kadınlarda %9-50 dir (17-18).

3. ETİYOLOJİ

Endometriozisin patofizyolojisi net olarak aydınlatılamamıştır , ancak destekleyici kanıtları olan çeşitli teoriler öne sürülmüştür.

3.1. Retrograd Menstruasyon ve İmplantasyon Teorisi

Endometrial dokunun fallop tüplerinden peritoneal boşluğa geçişini tanımlayan retrograd menstrüasyon teorisi, ilk ve en çok kabul gören teoridir (19). Tubalardan batin boşluğuna geçen endometrial dokular peritoneal mezotelyuma yapışarak invaze ettikten sonra canlılıklarını sürdürmek ve büyümek için kan damarlarını geliştirmektedir (13).

Menstrüel akışı engelleyen mülleryan anomalileri olan kadınlarda endometriozis yaygınlığı akışı engellemeyen anomalileri olan kadınlara kıyasla endometriozis görülme sıklığı daha fazla olmaktadır (21).

Menstrüasyon esnasında peritoneal maiden elde edilen canlı endometrial hücreler hücre kültüründe yetiştirilebilmekte ve peritonun mezotelyal yüzeyine tutunup penetre olabilmektedir(22).

Bu kanıtlar implantasyon teorisinin endometriozis patogenezinde ana mekanizma olduğunu desteklemektedir. Her ne kadar endometriozis için çok sayıda etioloji önerilmiş olsa da, retrograd menstrüasyon ve hücre aracılı lenfositotoksitenin her birinin hastalığın gelişiminde önemli bir rol oynadığı açıktır. Menstrüasyon esnasında yapılan laparoskopilerde fallop tüpleri açık olan kadınların %75- 90'ında periton boşluğunda kan gözlenebilmektedir(20). Fakat kadınlarda retrograd menstruasyon yüksek oranda görülebilmesine rağmen endometriozis sıklığı bu oran ile korele gözlenmemektedir (23,24,25). Ayrıca teori pelvise lokalize endometriotik implantları açıklayabilmekle beraber uzak alan tutulumlarını açıklayamamaktadır (21,26,27).

3.2. Çölemik Metaplazi Teorisi

Pariyetal peritonun pleuripotent bir doku olduğunu ve histolojik olarak normal endometriumdan ayırt edilemeyecek kadar metaplastik değişime uğradığını öne süren teoridir. Over ve endometrium öncül hücreleri , müllerian kanal çölemik epitelden farklılaştıklarından dolayı bu teori ovaryan endometriozisi açıklayabilmektedir (28). Yanlış entegre olmuş çölemik

epitelde (erken embriyogenez esnasında mezenşimal ekstremite tomurcukları ile yakın komşuluktadır.) oluşan metaplazi, ekstremiteler (baş parmak, uyluk, diz) gibi alışılmamış bölgelerdeki endometriozisi açıklayabilmektedir (30).

Endometriozis menarş öncesi dönemdeki kızlarda ve primer amenoreik kadınlarda da gözlenebilmektedir. Ayrıca göreceli olarak az sayıda menstrüel siklusu olan adölesanlarda gözlenen endometriozisde de çölomik metaplazi etkisi olduğu düşünülmektedir (29). Bu hasta örnekleri bu teoriyi desteklemekle birlikte çölomik metaplazi teorisi kuvvetli klinik ve deneysel verilerle desteklenmemiştir (31).

3.3. Lenfatik ve Vasküler Disseminasyon Teorisi

Endometrial dokunun anormal lenfatik ve vasküler yayılım yoluyla ekstrauterin dokulara yayıldığını öne süren bir teoridir. Endometriozisin perine, inguinal bölge gibi alışılmadık yerleşimleri, bu teoriyi desteklemektedir (32).

İzole retroperitoneal endometriotik implant saptanan hastalarda bu yayılımın lenfatik yolla olduğu düşünülmektedir. Bunun sebebi retroperitoneal bölgenin lenfatik açıdan zengin olması ile ilişkilendirilmektedir. Yinede bu teori için az miktarda deneysel çalışma bulunmaktadır (33).

3.4. İndüksiyon Teorisi

Çölomik metaplazi teorisinin bir varyantı olarak sunulmuştur. Bu teoride çeşitli hormonal ve biyolojik faktörlerin, farklılaşmamış hücrelerin endometrium dokusuna farklılaşmasına sebep olduğu düşünülmektedir. Bu faktörlerin eksojen veya endometriumdan salınan faktörler olduğu ileri sürülmektedir (34).

3.5. Hormonal Bağımlılık

Östrojen ,endometriozis gelişiminde kesin olarak rol oynadığı gösterilen esas faktördür (35). Kadındaki östrojenin çoğu direkt overlerden üretilse de , çeşitli periferik dokularında over ve adrenal kaynaklı androjenlerin aromatzasyonu ile östrojen ürettikleri bilinmektedir. Endometriotik lezyonların aromataz ve 17β-hidroksisteroid dehidrogenaz tip-1 ekspereze ettiğı gösterilmiştir. Fakat , implantlarda östrojeni inaktive eden 17β-hidroksisteroid dehidrogenaz tip-2 bulunmamaktadır. (36). Bu sayede, implantların östrojenik ortamda kalması sağlanmış olmaktadır.

Normal endometrium dokusunda ise aromataz ekspereze edilmekte ve progesterona cevap olarak 17β-hidroksisteroid dehidrogenaz tip-2 salgılanmaktadır (37). Sonuç olarak menstrüel siklusun luteal fazında progesteron östrojenin endometrium üzerindeki etkilerini antagonize etmektedir.

3.6. İmmünolojik Faktörler

Retrograd menstrüasyon kadınlarda sık görülen bir olaydır, ancak retrograd menstrüasyon olan her kadında endometriozis gelişmemektedir. Endometriozisli kadınlarda immün sistemde bir takım değışiklikler olabileceğı ve hastalığın endometrial kaviteden kaynaklanan canlı endometrial hücrelerin azalmış immünolojik klirensi sonucu gelişebileceğı düşünölmektedir (38, 39). Yapılan çalışmalarda endometritik implantlarda bozulmuş hücresel ve humoral immünite ile değışmiş büyüme faktörü ve sitokin sinyallerinin olduğu saptanmıştır. Peritoneal maideki endometrial hücrelerin klirensinin, azalmış makrofaj aktivitesi ve azalmış naturel killer (NK) hücre aktivitesi sebebiyle azalması sonucu endometriozis gelişebileceğı öne sürölmektedir (40).

Endometriozisli kadınlarda hücresel immünitenin bozuk olduğu ve T lenfositlerinde bu kapsamda yer aldığı düşünölmektedir. Hastalıktan etkilenmemiş kadınlarla endometriozisli kadınlar karşılaştırıldığında ,toplam lenfosit sayısı veya T helper / supersör alt grup oranının, periferik kanda farklı olmadığı bildirilmiştir. Ancak endometriozisli kadınlarda periton sıvısında

lenfosit sayısı arttığı ve yine bununda hastalarda ,T lenfositlerin otolog endometriuma karşı sitotoksik aktivitesinin bozulduğu görülmektedir (41,42).

Birçok kanıt endometriozisin subklinik bir peritoneal inflamasyon olduğu ve bu inflamasyona artmış peritoneal sıvı volümü ,artmış peritoneal sıvı lenfosit konsantrasyonu, artmış inflamatuvar sitokinler, büyüme faktörleri ve angiogenez uyarıcı faktörlerin sebep olduğunu göstermektedir . Örneğin endometriozislilerin peritoneal sıvılarında interlökin-1 β (IL-1 β) ,IL-6 ve tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) seviyeleri artmıştır (43,44). Aynı şekilde IL-8 'in peritoneal sıvı seviyeleri artmıştır ve endometrial stromal hücrelerin artışı uyarmaktadır (45).

Monosit kemoatraktant protein -1 (MCP-1) ve RANTES (aktivasyon ile düzenlenir, T hücresi ekspresyon eder ve salgılar) monositler için bir kemoatraktanttır. Yapılan çalışmalarda bu sitokinlerin peritoneal sıvı seviyelerinin yükseldiği ve bu yüksekliğin hastalığın şiddeti ile doğru orantılı olduğu gözlemlenmiştir (46,47).

Endometriotik implantlar boyunca mast hücrelerinin yaygın bir infiltrasyonu gözlenirken, bu hücrelerin ektopik endometriyum implantların büyümesini modüle eden ve endometriozis ile ilişkili inflamasyonu aktive eden moleküller ağ üzerine ne şekilde katkıda bulunduğu hakkında çok az şey bilinmektedir. Çevresel toksinlere ve endojen bileşiklerine yanıt olarak bilinen bir transkripsiyon faktörü olan aril hidrokarbon reseptörü (AhR) mast hücrelerinde bulunmaktadır. Mariuzzi ve ark. tarafından yapılan çalışmada endometrial stromal hücre büyümesinin, Ahr aktivasyonu üzerinden mast hücreleri tarafından salınan çözünabilir faktörlerinin varlığında geliştiği gösterilmiştir. Bu sonuçlar, endometriozis patogenezinde mast hücrelerin yeni bir mekanik rolü olduğunu düşündürmektedir (48).

Bu faktörlerin kesin rolleri net olarak bilinmese de, ekspresyon ve aktivitelerindeki karışıklık, endometriozis patogenezinde immünolojik rollerini desteklemektedir.

3.7. Genetik Faktörler

Endometriozisin poligenik / multifaktöryel olarak kalıtıldığı yapılan epidemiyolojik çalışmalarla gösterilmiştir. Hastalık 1. derece akrabalarda %5-%7 insidans ile kalıtsal yatkınlık göstermektedir (49).

Günümüze kadar yapılmış olan en büyük çalışmada, 1000 in üzerinde etkilenmiş kız kardeş çiftleri araştırılmış, 10q26 kromozomunda anlamlı ilişki olduğu öne sürülmüştür (50). Ayrıca çalışmada 20p13 kromozomunda küçük bir bağlantı olduğu da gösterilmiştir. Bu lokusun içinde veya yakınında bulunan iki aday gen tanımlanmıştır. Biri, üreme sisteminin gelişimi için gerekli olan transkripsiyon faktörü EMX2 (51), diğeri ise ovaryan endometriozisin malign transformasyonuna sebep olan tümör süpresör gen PTEN' dir (52).

Evre 2 endometriozisli olguların incelendiği başka bir çalışmada mikrosatellit DNA analizi ile p16, GALT, p53 ve APOA2 lokuslarında allelik imbalansı (heterozigosite kaybı) görülmüştür (54). Bir diğer çalışmada ise endometriotik implantların %28'inde bir veya daha fazla bölgede heterozigosite kaybı görülmüştür. Bu bölgeler: kromozom 9q(%18) ,11q(%18) ve 22q(%15) (53). Yukardaki çalışmaların bulguları ışında endometrizosin kısmen genetik faktörlerin rol oynadığı bir olay olduğuna dair kanıtlar gittikçe artmaktadır.

3.8. Çevresel Faktörler

Çevresel toksinlere maruziyetin, endometriozisin gelişimine sebep olduğuna dair çeşitli kanıtlar bulunmaktadır. Özellikle dioksinin endometriozisin patogeneğinde ki rolleri üzerinde durulmaktadır. Dioksin hücreye bağlandıktan sonra aril hidrokarbon reseptörünü aktive ederek etkisini göstermektedir. (55). Normal endometriuma kıyasla endomeriozis dokularında daha yüksek oranda (9 kat fazla) dioksinle uyarılan bir gen olan CYP1 A1 geni transkripsiyonuna rastlanılmıştır. Aril hirokarbon reseptörü ve dioksin ilişkili genlerin semikantitatif revers tarnskriptaz polimeraz zincir reaksiyonu ile endometriotik implantlarda daha yüksek oranda ekspresyonu da tespit edilmiştir (56). Yapılan bir başka çalışmada ise bu çalışmanın

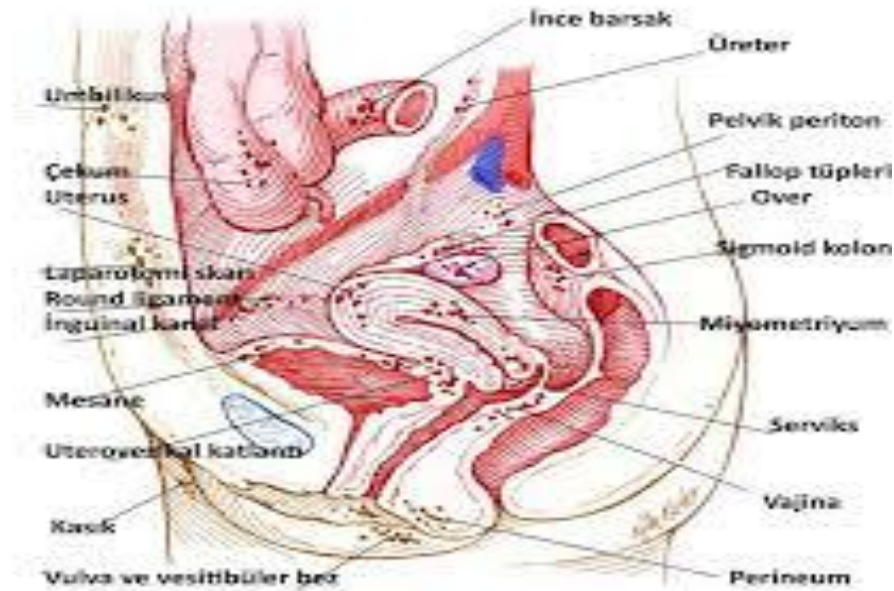
aksine endometriozis prevalansı veya şiddeti ile aril hidrokarbon reseptörü ve aril hidrokarbon nükleer transkriptörü veya CYP 1 A1 geni polimorfizmleri arasında bağlantı saptanmamıştır (57). Bu bulgular neticesinde endometriozis ile dioksine maruz kalma arasında bağlantı olduğunu gösteren yeterli kanıt henüz gösterilememiştir.

Bir çok farklı teori tanımlanmış olsa da , bu duruma bazı kadınların eğilimi olup bazılarının olmaması, bu hastalığın hala tanımlanmamış etiyolojileri olduğunu göstermektedir.

4. ENDOMETRİOZİSİN SINIFLAMASI VE LOKALİZASYONU

4.1. Anatmik Yerleşimler

Endometriozis pelvis içinde ve diğer pelvis dışı periton yüzeylerinin herhangi bir yerinde görülebilmektedir. Pelvik organlar arasında en sık overlerde izlenirken azalarak pelvik periton, anterior ve posterior kul-de-sak, posterior broad ligament, uterosakral ligament, uterus, fallop tüpleri, sigmoid kolon, appendiks ve round ligamentler üzerinde izlenebilmektedir. Ayrıca ,rektovajinal septum ,üerter nadir olarak mesane ,perikard, cerrahi skarlar ve plevra tutulabilir. (28).



Şekil1: Batın ve pelviste endometriotik implantların olası yerleşimleri

4.2. Sınıflama Sistemi

Endometriozis sınıflamasında birçok klasifikasyon sistemi önerilmekle beraber bunlardan sadece 1997'de ASRM (Amerikan Üreme Tıbbı Derneği) tarafından oluşturulan sınıflama sistemi kabul edilmiştir. Bu sistem implantların görünümü , boyutu, peritoneal- ovaryan implantların görünümü , büyüklüğü, derinliği , adneksiyel lezyonların varlığı, yaygınlığı ve cul-de sac obliterasyonuna dayanarak yapılmaktadır (58,59). Peritoneal ve ovaryan lezyonların morfolojisi kırmızı (kırmızı,kırmızı-pembe ve renksiz lezyonlar) , beyaz (beyaz , sarı- kahverengi ve peritoneal hasarlar) ,ve siyah (siyah ve mavi lezyonlar) olarak sınıflanmaktadır.

ASRM sınıflandırma sistemi yaygın olarak bilinmekte ve uzun süreden beri klinik pratikte ve araştırmada kullanılmaktadır. Fakat ASRM'nin kendisi tarafından kabul edildiği gibi tedavi sonrası gebe kalma oranları ve ağrı semptomları ile zayıf bir korelasyonu bulunmaktadır (60).



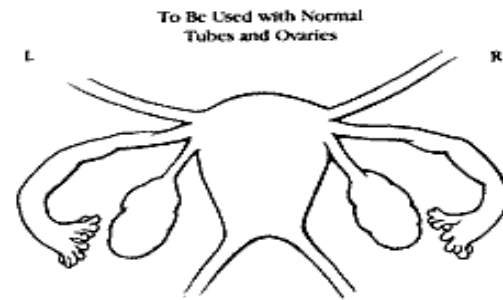
THE AMERICAN FERTILITY SOCIETY REVISED CLASSIFICATION OF ENDOMETRIOSIS

Patient's Name _____ Date _____
 Stage I (Minimal) - 1-5
 Stage II (Mild) - 6-15
 Stage III (Moderate) - 16-40
 Stage IV (Severe) - >40
 Total _____
 Laparoscopy _____ Laparotomy _____ Photography _____
 Recommended Treatment _____
 Prognosis _____

PERITONEUM	ENDOMETRIOSIS	< 1cm	1-3cm	> 3cm
	Superficial	1	2	4
	Deep	2	4	6
OVARY	R Superficial	1	2	4
	Deep	4	16	20
	L Superficial	1	2	4
	Deep	4	16	20
POSTERIOR CULDESAC OBLITERATION	Partial		Complete	
	4		40	
OVARY	ADHESIONS	< 1/3 Enclosure	1/3-2/3 Enclosure	> 2/3 Enclosure
	R Filmy	1	2	4
	Dense	4	8	16
	L Filmy	1	2	4
TUBE	Dense	4	8	16
	R Filmy	1	2	4
	Dense	4*	8*	16
	L Filmy	1	2	4
TUBE	Dense	4*	8*	16

*If the fimbriated end of the fallopian tube is completely enclosed, change the point assignment to 16.

Additional Endometriosis: _____ Associated Pathology: _____



**Şekil 2: Amerikan Üreme Tıbbı Derneği yenilenmiş endometriozis
klasifikasyonu (ASRM 1997)**

EXAMPLES & GUIDELINES

STAGE I (MINIMAL)

PERITONEUM			
Superficial Endo	-	1-3cm	- 2
R. OVARY			
Superficial Endo	-	< 1cm	- 1
Filmy Adhesions	-	< 1/3	- 1
TOTAL POINTS			- 4

STAGE II (MILD)

PERITONEUM			
Deep Endo	-	> 3cm	- 6
R. OVARY			
Superficial Endo	-	< 1cm	- 1
Filmy Adhesions	-	< 1/3	- 1
L. OVARY			
Superficial Endo	-	< 1cm	- 1
TOTAL POINTS			- 9

STAGE III (MODERATE)

PERITONEUM			
Deep Endo	-	> 3cm	- 6
CULDESAC			
Partial Obliteration			- 4
L. OVARY			
Deep Endo	-	1-3cm	- 16
TOTAL POINTS			26

STAGE III (MODERATE)

PERITONEUM			
Superficial Endo	-	> 3cm	- 3
R. TUBE			
Filmy Adhesions	-	< 1/3	- 1
R. OVARY			
Filmy Adhesions	-	< 1/3	- 1
L. TUBE			
Dense Adhesions	-	< 1/3	- 16*
L. OVARY			
Deep Endo	-	< 1 cm	- 4
Dense Adhesions	-	< 1/3	- 4
TOTAL POINTS			- 29

STAGE IV (SEVERE)

PERITONEUM			
Superficial Endo	-	> 3cm	- 3
L. OVARY			
Deep Endo	-	1-3cm	- 32**
Dense Adhesions	-	< 1/3	- 8**
L. TUBE			
Dense Adhesions	-	< 1/3	- 8**
TOTAL POINTS			51

STAGE IV (SEVERE)

PERITONEUM			
Deep Endo	-	> 3cm	- 6
CULDESAC			
Complete Obliteration			- 40
R. OVARY			
Deep Endo	-	1-3cm	- 16
Dense Adhesions	-	< 1/3	- 4
L. TUBE			
Dense Adhesions	-	> 2/3	- 16
L. OVARY			
Deep Endo	-	1-3cm	- 16
Dense Adhesions	-	> 2/3	- 16
TOTAL POINTS			114

*Point assignment changed to 16

**Point assignment doubled

Şekil 3: Amerikan Üreme Tıbbı Derneği yenilenmiş endometriozis klasifikasyonu (ASRM 1997)

5. KLİNİK SEMPTOMLAR

Endometriozisli kadınlar daha az sıklıkla asemptomatik olarak karşımıza çıksalarda , sıklıkla iki temel semptom olan yakınırırlar: pelvik ağrı (dismenore, disparanue) ve/veya infertiliteden yakınmaktadırlar. Bu iki ana semptom dışında endometriotik implanlatların yerleştiği dokuya özgü semptomlarda ortaya çıkabilmektedir. Gastrointestinal sistemde yer alırlarsa ;

ağrı, konstipasyon,gaz veya distansiyon ,barsak alışkanlıklarında değişiklikler, Üriner sistemde yer alırlarsa ; hematüri, yan ağrısı, pulmoner sistemde yer alırlarsa (Ekstra periton-plevra); hemoptizi, pnömotoraks gibi semptomlarla hekimlere başvurabilmektedirler.

5.1. Ağrı

Endometriozisin sık görülen bir semptomu olarak karşımıza çıkan ağrı endometriozisli kadınlarda değişiklik gösterip siklik ve kronik ağrı şeklinde olabilmektedir. Ağrının yayılımı değişken olmakla birlikte çoğu zaman bilateral ağrı şeklinde gözlemlenmektedir. Lokal ağrılar ise rektal, üreteral ve mesane gibi tutulan sistemden kaynaklanan ağrılar şeklinde olabilmektedir. Bazen sırtın alt bölgelerinde ve belde de ağrı oluşabilmektedir (61).

Ağrının patofizyolojisi net şekilde açıklanamamaktadır. Fakat patofizyolojide endometriotik lezyonlardan periton sıvısına proinflamtuar sitokin ve prostaglandin salınımı (13) , pelvik tabandaki sinirlerin irritasyonu ya da doğrudan infiltrasyonu (62) ve endometriotik implantlarda menstrüel kanın koleksiyonu (63) sorumlu olduğu düşünülmektedir.

Endometriozisde hastalığın şiddeti ile ağrı arasında korelasyon bulunmamaktadır (17,64). Bir çalışmada ,endometriozis evresi ve dismenore şiddeti ve nonmestrüel ağrı arasında belirgin ancak zayıf korelasyon varken, arka kuldesak lezyonları ve disparoni arasında güçlü bir bağlantı olduğu bildirilmiştir (65).

5.1. Subfertilite

Sağlıklı kadınlarda aylık fekundite oranı (MFR) ayda yaklaşık% 15-20 dir. (yaş ile azalır.) Endometriozisli kadınlarda ise bu oran % 2-10'dır (60). Ayrıca yapılan çalışmalarda infertil hastalarda kontrol grubundaki fertil kadınlara göre daha fazla endometriozis olduğu saptanmıştır (%13-33'e karşı %4-8) (68).

Endometriozis ve infertilite arasında nedensel bir ilişkiyi destekleyen patofizyolojik çeşitli faktörler bulunmaktadır : oosit kalitesini, folikülojenezi ve luteal fonksiyonu etkileyen periton sıvısındaki kronik inflamatuvar değişiklikler,

makrofajların ve fagositik disfonksiyonun proliferasyonu, proinflamatuvar ve anjiyojenik faktörlerin salınımı ,sperm-oosit etkileşimini etkileyen periton sıvısında değişiklikler , tubo-over temasını engelleyen fallop tüplerinin normal anatomisinin distorsiyonu, kronik inflamatuvar değişikliklere bağlı olarak değişmiş endometriyal reseptivite, değiştirilmiş uterotubal transporta neden olan miyometriyumun disperiztalizmi öne sürülen ve araştırılan faktörler arasında yer almaktadırlar (66-67).

Mathias ve ark. çalışmalarında orta derecede veya şiddetli endometriozis varlığında, overleri içine almış ise ve oluşan yapışıklıklar tuba-ovaryan motiliteyi ve ovum pick up 'ını bloke ediyorsa subfertilite ile endometriozis ilişkili olduğunu saptamışlardır (69). Ancak endometriozis ve infertilite arasındaki bağlantıyı destekleyen çok sayıda mekanizma ortaya konulsada , fertilite ve minimal veya hafif endometriozis ile ilişkisi hala tartışmalıdır (70).

6. TANI

6.1. Fizik muayene

Endometriozisli kadınlarda genellikle klinik muayene sırasında hiçbir anormal bulgu saptanmamaktadır. Vulva ,vagen ve servikste endometriozis nadir görülmesine rağmen muayene sırasında mutlaka endometriozis herhangi bir bulgusu yönünden bu bölgeler dikkatlice incelenmelidir. Spekulum incelemesinde genellikle herhangi bir bulgu saptanmamaktadır. Fakat bu muayene sırasında saptanan bazı bulgular endometriozisi düşündürmektedir. Bu bulgular; iğne ucu serviks izlenmesi ve arka fornikte yer alan, mavi renkli tipik implantlar ya da temas edilince kanayan kırmızı proliferatif lezyonlar olarak karşımıza çıkmaktadır (72). Diğer olası endometriozis bulguları ise, culde sac ve uterosakral ligamentteki nodüleritenin palpasyonu, uterosakral skarlaşma nedeni ile serviksin laterale yer değiştirmesi, rektovajinal septumda ağrılı şişme ve unilateral ve ya bilateral ovaryan endometriomalara bağlı palpasyonda adneksiyel kitle saptanmaktadır (73). Klinik muayene tanıya yardımcı olabilse de pelvik organ hassasiyetin duyarlılığı %36-90, özgüllüğü ise %32-92 olarak görülmektedir (74).

6.2. Laboratuvar Testleri

Endometriozis tanısını koyan kesin bir laboratuvar testi olmadığından laboratuvar testleri, pelvik ağrının diğer nedenlerini ekarte etmek için kullanılmaktadır.

CA 125, çölemik epitel derivelerinden (endometrium, fallop tüpü epiteli, endoserviks ve plevra gibi) eksprese edilen glikoprotein yapıda bir hücre yüzey antijenidir. CA-125 düzeyleri orta ve ciddi endometriozisi olanlarda genellikle belirgin olarak yüksek saptanırken minimal ve hafif endometriozisi olanlarda ise normal olarak bulunmuştur (75,76). Endometritotik lezyonların peritoneal irritasyon yaparak inflamasyona yol açtığı ve ca125 ekspresyonuna sebep olduğu varsayılmaktadır (75).

Serum CA-125 değerleri menstrüel siklus süresince değişkenlik gösterebilmektedir ve sıklıkla menstruasyonda en yüksek seviyelerde iken, foliküler fazın ortasında ve ovulasyonda en düşük seviyelerine inmektedir (77,78).

Endometriozis için riskli olduğu bilinen infertil veya pelvik ağrısı olan seçilmiş kadınlarda CA 125 'in spesifitesinin %80 'in üzerinde olduğu bildirilmiştir. Fakat CA 125'in düşük sensitivite seviyeleri (bir çok çalışmada %20-50) endometriozis tanısı için klinik kullanımında kısıtlamalara yol açmaktadır. Menstrüel period boyunca CA 125 düzeylerindeki artışın endometriozisli kadınlarda daha belirgin olduğu saptandığından menstrüel siklus süresince sensitivitenin yükselebileceği öne sürülmüştür. (77,79).

CA 125 seri ölçümleri tedavi sonrası endometriozisin rekürensini tahmin etmede kullanılabilmektedir (80,81). Kombine medikal ve cerrahi tedavi sonrası veya danazol, gonadotropin releasing hormon (GnRH) analogları ve ya gestrinon tedavileri sonrasında CA 125 seviyeleri düşmekte ancak bu düşüş medroksiprogesteron asetat(MPA) veya plaseboda gözlenmemektedir (82). Yapılan başka çalışmalar ise tedavi sonrası CA 125 seviyeleri ile hastalığın rekürrensi arasında korelasyon olmadığını ortaya koymaktadır (83,84).

Endometriozis tanısında kullanılmak üzere araştırılan diğer serum belirteçleri CA19-9, serum plasental protein 14 (PP14; glikodelin A), interlekin-6 (IL-6), tümör nekrozis faktör- α (TNF- α) dır. Ancak bu belirteçler, endometriozis tanısında yetersiz sensitivite ve spesifiteleri olmasıyla sebebiyle klinik olarak kullanılmamaktadır (85).

6.3. Tanısal Görüntüleme

6.3. 1. Ultrasonografi (USG)

Endometriozis tanısında özellikle ovaryan endometrioma tanısında transvajinal sonografi (TVS) yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak peritoneal endometriozis ve adezyonların görüntülenmesinde yetersiz kalmaktadır.(86)

Endometriomalar ultrasonografide tipik olarak hipoekoik ve ince duvarlı olarak izlenmektedir, fakat nadiren de olsa kalın septalı, kalın cidarlı ve hiperekoikte izlenebilmektedirler. Doppler ile bakıldığında kistin çevresinde akım kodlanır iken kistin içerisinde akım saptanmaz. TVS nin tanıdaki duyarlılığı %64-90 ve özgüllüğü %22-100 arasında değişmektedir (87).

Derin infiltratif endometriozisin mesane, sakrouterin ligamanlar veya rektovajinal septum tutulumunun gösterilmesinde, transvajinal veya transrektal ultrasonografi faydalı olabilmektedir (88,89).

6.3. 2. Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG)

Manyetik rezonans görüntüleme (MRG) yöntemleri gibi diğer bazı metodlar saptanan bulguları konfirme etmek amacıyla kullanılabilir ancak primer tanı yöntemi olarak kullanılmaları uygun değildir (90). MRG ovaryen endometriomaların saptanması ve diğer kistik yapılardan ayırt edilmesinde yardımcı olabilmektedir, fakat küçük peritoneal implantları görüntülemeye yetersiz kalmaktadır. Histopatolojik olarak tanı almış endometriozisli kadınlarda ,MRG yaklaşık %70 duyarlılık ve %75 özgüllüğe sahiptir (91).

Endometrioma T1 ağırlıklı kesitlerde hiperintens kitle olarak , T2 ağırlıklı kesitlerde ise hipointense olarak izlenmektedir (92).

6.3.3. Tanısal Laparoskopi

Endometriozis tanısında kullanılan ana yöntem laparoskopidir. Diagnostik laparoskopi esnasında pelvik ve abdominal kavite endometriozis varlığı açısından sistematik olarak gözlemlenmelidir . Barsak, mesane, uterus, tubalar, overler, cul-de-sac ve broad ligamentin inspeksiyonu yapılmalı ve künt bir proba derin infiltratif endometriozisin işareti olabilecek nodularitenin palpasyonu yapılmalıdır (93).

Laparoskopide peritonun serozal yüzeyinde karakteristik bulgular (barut yanığı) saptanabilir. Bu bulgular siyah, koyu kahverengi veya mavimsi nodüller şeklinde veya değişken derecede fibrozis ile çevrili eski hemoraji içeren küçük kistler şeklinde izlenebilir. Derin infiltratif endometrioziste laparoskopik bulgular minimal hastalık görüntüsüne sahip olabilir.bu nedenle nodülerite palpasyonu önem taşımaktadır (94).

Laparoskopik bulgulara dayanarak tanı konulması sıklıkla fazladan tanıya sebep olmaktadır. Bu nedenle laparoskopi sırasında şüpheli lezyonlardan mutlaka biyopsi yapılarak histopatolojik tanı ile değerlendirilmelidir. Laparoskopik ve histolojik bulgular arasındaki uyumsuzluk genellikle skar oluşmuş lezyonlardan kaynaklanmaktadır. Histolojik tanı uterin kavite dışında hem endometrial bezlerin hem de stromanın varlığının gösterilmesi ile koyulmaktadır (95,96).

7. TEDAVİ

Tedavi, hastalığın etkisi ve tedavinin hayat kalitesi üzerine etkisini kapsayacak şekilde klinik bütünlük içinde kişiselleştirilmelidir. Endometriozisli kadınların çoğunda reproduktif dönemde olmaları nedeni ile fertilitenin korunması amaçlanmaktadır. Birçok hasta ağrı ve subfertiliteye sahiptir ve ağrının tedavisinden sonra çocuk istemleri bulunmaktadır. Ağrı tedavi seçimini komplike hale getiren bir semptomdur. Semptomatik endometriozisli

kadınların analjezik, hormon, cerrahi ve yardımcı üreme teknikleri veya bunların kombinasyonu ile tedavisi mümkün olmaktadır (97).

7.1. Ağrının Medikal Tedavisi

7.1.1. Nonsteroid Anti-İnflamatuvar İlaçlar

Siklooksijenaz izoenzim 1 ve 2 yi (COX-1 VE COX-2) non selektif olarak inhibe ederek etki gösterirler ve bu gruptaki selektif COX-2 inhibitörleri spesifik olarak COX-2 izoenzimini baskırlar. Endometriozisin kronik inflamatuvar bir hastalık olduğu düşünülünce, anti-inflamatuvar ilaçlar ağrı tedavisinde etkili gibi görünmektedir.

Endometriozisin laparoskopi ile tanı almasından önce primer dismenore veya pelvik ağrısı olan kadınlarda bilinen endometriozise bağlı minimal veya hafif ağrı tedavisi için ilk seçilecek ilaçlar NSAİD'dir. Endometriozis ile ilişkili ağrıda NSAİD 'lerin analjezik etkisi ayrıntılı olarak araştırılmamıştır. Allen C. ve ark. tarafından yapılan çalışmada ,endometriozis ile ilişkili ağrının tamamen yada tatmin edici derecede giderilmesinde , naproksen ile %83 , plasebo ile %41 başarı elde edildiği gösterilmiştir. Naproksen alan grup , plasebo alanlarla kıyaslandığında daha az destekleyici analjezik alma ihtiyacı olduğu gösterilmiştir (98).

Endometriozisle ilişkili ağrının azaltılmasında NSAİD'lerin etkinitesi anti inflamtuvar etkisinin yanında lokal antinosiseptif etki ve santral sensitizasyonun azaltılması ile açıklanabilir. Ancak ağrıda oldukça etkili olan NSAİD'lerin gastrik ülser , olası ovulasyon inhibisyonu gibi çeşitli yan etkileri bulunmaktadır. Ovulasyon sırasında prostaglandinler folikül rüptür mekanizmasında rol oynadıklarından NSAİD'ler ovulasyon inhibisyonuna yol açabilecekleri unutulmamalıdır. Bu sebeple gebe kalmak isteyen kadınlara ovulasyon esnasında NSAİD önerilmemektedir (99).

7.1.2. Kombine Oral Kontraseptifler

KOK'lar ,gonadotropin salınımını, menstrüel kan akımını azaltarak ve implantları desidualize ederek endometriozisde etki göstermektedir. Aynı

zamanda, KOK'lar endometriotik implantlardaki nöronal uyarılmayı ve nöronal büyüme faktörü ekspresyonunu azaltarak da etki etmektedir (100). Her ne kadar oral kontraseptifler desidulize endometriumu indükleselerde ilaçların östrojenik bileşeni tedavinin ilk haftasında endometrial gelişimi stimule ettiğinden proliferatif dönemde pelvik ağrıyı arttırmaktadır.

OKS'yi siklik olarak kullanmak endometrioizis gelişimi ve rekürrensi açısından profilaksi sağlayabilmektedir. Siklik olarak kullanılabildikleri gibi ara vermeden, menstrüel kanamadan bağımsız olarak sürekli kullanılabilmektedir. Düşük doz monofazik kombine kontraseptifler (6-12 ay boyunca günde 1 hap) endometrioizis tedavisinde , amenore ve endometrial desidüalizasyonla sonuçlanan 'pseudogebelik ' durumunu oluşturmak için kullanılabilmektedir (101). Oral kontraseptiflerle indüklenen amenore , potansiyel olarak retrograd menstrüasyonu önleyip ayrıca odaklar içine kanamayı önleyip hastalığın ilerlemesini yavaşlatmaktadır. Ancak oral kontraseptiflerle yapılan medikal tedavinin kesin bir tedavi olduğunu gösteren tatmin edici kanıtlar bulunmamaktadır. Birçok hastada tedavinin sonlanmasını takiben indüklenen atrofide olmuş endometrial implantlar reaktivasyon göstermektedir (103).

Monofazik KOK'lar endometrioizis tedavisinde kullanılmaktadır. Ancak multifazik KOK'lara klinik üstünlüğünü gösteren yeterli kanıt bulunmamaktadır. Ayrıca düşük doz KOK' ların (20 µg etinil östradiol içeren) endometrioizis tedavisinde geleneksel dozlardaki KOK' lara üstünlüğü kanıtlanamamıştır ve daha yüksek oranda anormal kanamaya neden olmaktadır (102).

7.1.3. Progestinler

Progestinler gösterdikleri antiendometriotik etki ile endometrial dokuda ilk olarak desidüalizasyona, sonuçta da endometrial atrofiye neden olmaktadır. Ayrıca nöral sinir duyarlılığını azaltmakta ve endometriotik lezyonun nöral büyüme faktörü ekspresyonunu azaltmaktadır. (104).

Progestinler , danazol ve GnRH analogları kadar etkili oldukları halde bu ilaçlardan daha az yan etkiye neden olmalarından dolayı çoğunlukla

endometriozis tedavisinde ilk seçenek ilaçlar olarak tercih edilmektedir (105). Oral progestinler , depo medroksiprogesteron asetat (DMPA) , levonorgestrel salgılayan rahim içi araçlar (RİA), ve yeni selektif progesteron reseptör modölatörleri (SPRM) olmak üzere çeşitli şekillerde uygulanabilmektedir.

Depo medroksiprogesteron asetat (DMPA); her 3 ayda bir 150 mg uygulanan medroksiprogesteron asetat endometriozisle ilişkili ağrı tedavisinde oldukça etkili olmaktadır. Ancak amenore ve anovulasyonu indüklenmesinden dolayı infertil kadınlarda kullanılması önerilmemektedir (105).

Dienogest; progestojenik ve anti-androjenik etkinliği olan bir 19-nortestosteron türevidir (106). Endometriyal lezyonların büyümesi santral ve lokal etkiler olmak üzere çeşitli mekanizmalar yoluyla inhibe edilmektedir. Dienogest santral etkileri; gonadotropin sekresyonunun inhibisyonu, hipoestrojenik, hipergestrojenik endokrin çevrenin endometriyal dokuda desidualizasyona yol açması ve takiben lezyonların atrofiye olması şeklindedir. Lokal etkiler ise; progesteron reseptörü yoluyla oluşan progestasyonel etkilerden bağımsız bir şekilde, endometriyuma benzer dokunun proliferasyonu üzerinde direkt inhibitör etki, endometriyozisle ilişkili enflamasyon üzerinde etki göstermesi ile oluşmaktadır. Dienogest parakrin seviyede endometriyuma benzer dokunun estrojene karşı yanıtını düzenleyen metalloproteinazların modülasyonunu yaparak etki göstermektedir (107,108,109). Strowitzki ve ark. tarafından yapılan çalışmada 12 haftalık 2 mg dienogest kullanımı plasebo ile karşılaştırılmış ve Dienogest endometriyozis ile ilişkili pelvik ağrının giderilmesinde plasebodan anlamlı derecede üstün olduğu saptanmıştır. Yan etki profili açısından plaseboya kıyasla daha az kemik kaybı , sıcak basması ve daha çok irregüler kanama olduğu bildirilmiştir (110).

Levonorgestrel salgılayan rahim içi araçlar (RİA); endometrial glandüler atrofi ve stromal desidual transformasyonu indükleyerek etki etmekte ve aynı zamanda endometrial hücre proliferasyonunu azaltıp ve apoptotik aktiviteyi arttırmaktadır. Peritoneal veya rektovajinal endometriozisi olan kadınlarda ağrı tedavisinde günlük 20 µg levonorgestrel salgılayan rahim içi araçlar

kullanıldığında ağrı ve konservatif cerrahi sonrasında dismenore rekürrensini azaldığı görülmüştür (111).

7.1.4. Progesteron Antagonistleri ve Selektif Progesteron Reseptör Modölatörleri

Endometrium üzerinde antiproliferatif etkiler yaparak endometriozisi süprese etmektedir, ancak GnRH tedavisinde izlenen hipoöstrojenizm ve kemik kaybı bu tedavide görülmemektedir.

Mifepriston (RU 486) bir progesteron antagonistidir ve endometriozisli kadınlar üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda, oral olarak 6 ay boyunca 50 mg/gün dozuna kullanılması önerilmektedir. Bu kullanım şekli ile pelvik ağrıyı ve endometriozisin yaygınlığını azalttığı bulunmuştur (112).

7.1.5. Danazol

17- α etinil testosteronun izoksazol türevi olan sentetik bir ajandır. Danazol GnRH ve gonadotropin sekresyonunun baskılanması , steroidogenezin direk inhibisyonu , östrodiol ve progesteronun metabolik klirensinde artış , endometrial androjen ve progesteron reseptörleri ile direkt antagonist ve agonistik etkileşim oluşturarak etki yapmaktadır. Bu mekanizmalar sayesinde yüksek androjenik , düşük östrojenik bir ortam oluşmaktadır (113). Ayrıca danazolün immünolojik etkileri ise; serum c3 'de azalma , serum c4 seviyesinde yükselme , çeşitli fosfolipid antijenlere karşı azalmış serum otoantikör seviyeleri ve tedavi esnasında CA 125 seviyelerinde azalma olarak karşımıza çıkmaktadır. T hücre mitojenleri ile aktive edilen kültürlerde , periferik kan lenfosit proliferasyonunu önlemektedir. Fakat çeşitli çalışmalarda makrofaj bağımlı B lenfositlerinin T lenfosit aktivasyonunu etkilemediği görülmüştür. (115,116,117,118).

Telimaa ve ark. tarafından yapılan çalışmada günde 3 kez 6 ay süre 200 mg oral kullanılan danazolün pelvik ağrıyı plasebo grubuna göre daha yüksek azalttığı görülmüştür (114). Fakat kullanılan bu dozlarda, sıvı retansiyonu, akne, hirsutizm sıcak basması , seste kalınlaşma, kötü lipid profili ,karaciğer

enzim yüksekliği veya duygu durum değişikliklerini içeren yan etkilerin ortaya çıktığı saptanmıştır. Özellikle oluşan ses kalınlaşmasının irreversibl olması rutinde endometriozisde etkili olmasına rağmen ilacın kullanımını engellemektedir (119).

7.1.6. Gonadotropin Serbestleştirici Hormon Analogları

Endojen pulsatil salınan GnRH, n hipofizden pulsatil gonadotropin salınımına sebep olurken , pulsatil olmayan GnRH salınımı , hipofizde desensitizasyona ve overlerde steroidogenezin durmasına sebep olmaktadır (120). Endometriozis tedavisinde oldukça etkili olan GnRH analoglarının rutinde kullanımı ciddi yan etkileri ve maliyetinin yüksek olması nedeni ile kısıtlı olmaktadır. Saptanan yan etkileri arasında vazomotor semptomlar, uykusuzluk, ürogenital atrofi, kemik mineral yoğunluğuunda azalma yer almaktadır (121). Kemik kaybı en önemli yan etkilerden biridir ve 6 aylık tedavide trabeküler kemikte %6- 8 kayıp izlenmektedir. 6 aydan uzun süreli tedavi gerektiği durumlarda ise kemik kaybının reversibilitesi tartışmalı olduğuundan bu konuda önlem alınması gerekmektedir. GnRH analogları tarafından oluşturulan hipostrojenik duruma sekonder oluşan vazomotor semptomlar ve kemik mineral yoğunluğuunda azalma “add-back” östrojen tedavisi ile engellenebilmektedir (122,123).

7.1.7. Aromataz İnhibitörleri

Aromataz, androjenden östrojen oluşumunda rol alan bir enzimdir. Bu enzimin inhibisyonu ile endometriotik implantlarda regresyon olduğuunu gösteren çeşitli çalışmalar mevcuttur. Yapılan bir çalışmada aromataz inhibitörleri GnRH analogları, OKS ve progestin ile kombine edilmiş ve bu kombine tedavi ile endometriozisli hastaların ortalama ağrı skorlarında ve lezyon boyutlarında azalma olduğu saptanmıştır. Aromataz inhibitörleri endometriotik lezyon boyutunda azalma ve ağrının azaltılmasında etkin görülmektedir, ancak diğer hormonal tedaviler ile kombinasyonu gerekmektedir (124,125).

7.2. Ağrının Cerrahi Tedavisi

Endometriozis ile ilişkili ağrı için çeşitli cerrahi tedavi modaliteleri bulunmaktadır. Bu çeşitli cerrahi yaklaşımlar; lezyonların çıkartılması ve adezyolizis, endometrioma ekstirpasyonu, presakral nörektomi ve laparoskopik uterin sinir ablasyonundan oluşmaktadır. Bu cerrahi modaliteler laparotomi veya laparoskopik olarak uygulanabilmektedir (126). Cerrahi tedavinin belirgin plasebo etkisi bulunmaktadır. Tanısal laparoskopide endometriotik implantlar tam olarak çıkarılmayıp koterize edildiğinde bile ağrı kaybolması %50 civarında olmaktadır (127,128,129).

7.3. Fertilite için Cerrahi Tedavi

Endometriozis ile ilişkili infertilite tedavisinde hastanın yaşı, infertilite süresi ,endometriozis evresi, tüp-over ilişkisinin bozulması, önceki tedaviler, ilişkili ağrı semptomu ve hastanın hastalığa karşı bakış-davranış şekli ve tedavi fiyatı beklentilere göre çeşitlilik göstermektedir. Minimal-orta düzey endometriozis için cerrahi modalite oldukça karışıktır. Bir metaanalize göre minimal-orta düzey endometriozisli kadınlarda endometriotik doku ablasyonu ve adezyolizis ,diagnostik laparoskopi yapılanlara göre fertiliteyi artırmaktadır (130,131,132).

Orta-ağır düzey endometriozisli hastaların , anatomi ve tubal fonksiyonu düzeltmek için cerrahi ile tedavi edilmeleri gerekmektedir. Ancak cerrahi sonrası gebelik oranlarının arttığına dair sonuç çıkarmış hiçbir randomize çalışma ve metaanaliz bulunmamaktadır (133). Çalışmalarada Orta- ağır endometriozisli kadınlarda cerrahi sonrası 9-12 aylık sürede gebelik oranlarının %24-30 arasında değişebildiği saptanmıştır. (133,134).

Overyan endometrioma boyutu 4 cm üzerinde olan kadınlarda laparoskopik kistektominin drenaj ve koagülasyona üstün olduğu ve gebelik oranlarını arttırdığı görülmüştür. (135,136).

7.4. Fertilite için Medikal Tedavi

Hormonal tedavi endometriozisi tedavi etmemekte yalnızca endometriotik implantları baskılamaktadır. Bütün tıbbi tedaviler (analjezikler hariç) ovaryan aktiviteyi engelleyerek kontraseptif bir etkiye sahip olduğu için, gebe kalma arzusu olan kadınlar için uygun olmamaktadır. Randomize çalışmalarda fertilite arzusu olan kadınlarda postoperatif medikal tedavinin etkinliği olmaması nedeniyle endike olmadığı belirtilmektedir. Konservatif cerrahi sonrası 6-12 aylık dönemde en yüksek spontan gebelik oranları olduğu bildirilmektedir (60).

Gebelik isteyen endometriozisli kadınlarda yardımcı üreme teknikleri (ART) – kontrollü ovaryan hiperstimülasyon, intrauterin inseminasyon, IVF ve gamet intrafallopian transfer (GIFT) – cerrahi rekonstrüksiyon sonrası ek tedavi seçeneği olarak uygulanabilmektedir. Minimal / hafif endometriozisi olan kadınlarda tuba-ovaryan ilişki bozulmamışsa IUI iyi bir tedavi seçeneği olabilmekte ve ovulasyon indüksiyonu ile IUI önerilmektedir (137). Tedavi edilmemiş orta / şiddetli endometriozisli kadınlarda ise intrauterin inseminasyonun gebelik oranlarını arttırdığına dair yeterli veri bulunmamaktadır (60).

8. KETOTİFEN

Ketotifen; mast hücre stabilizatörü ve histamin (h1) reseptör antagonistidir. Histamin ve lökotrienler gibi allerjik mediyatörlerin salınımını inhibe ederek ve İnsan rekombinan sitokinleri tarafından eozinofillerin olgunlaşmasını inhibe ederek ve böylece enflamatuvar odağa eozinofil akışını baskılanmakta ayrıca PAF (Trombosit aktive edici faktör) tarafından trombosit aktivasyonu yaparak etki göstermektedir.

Endometriotik implantlar boyunca mast hücrelerinin yaygın bir infiltrasyonu gözlenirken, bu hücrelerin ektopik endometriyum implantların büyümesini modüle eden ve endometrioz ile ilişkili inflamasyonu aktive eden moleküller ağ üzerine nasıl katkıda bulunduğu hakkında çok az şey

bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada çevresel toksinlere ve endojen bileşiklere yanıt verdiği bilinen bir transkripsiyon faktörü olan Aril Hidrokarbon Reseptörünün MC'lerinde bulunduğu ve reseptörün uyarılması ile MH'lerinden IL-17 ve reaktif oksijen radikalleri salınarak inflamatuvar sürecin başladığı saptanmıştır. Bu çalışmaların ışığında endometriozis patogeneğinde MH'lerin yeni bir mekanik rolü olduğu düşünülmektedir (138).

9. Ki-67 PROLİFERASYON İNDEKSİ

Ki-67, G0 hariç hücre siklusunun G1, S, G2 ve M fazlarında bulunan nükleer bir proteindir (144). Ki-67 normal ve neoplastik dokularda hücre proliferasyonunu ölçmede yaygın olarak kullanılmaktadır (145). Yapılan bir çalışmada endometriumda Ki-67 ekspresyonu proliferasyon fazında, sekresyon ve menstrüasyon fazına göre daha yüksek olduğu saptanmıştır (146). Bu bilgiler ışığında çalışmamızda endometriotik dokularda ki-67 proliferasyon indeksi incelenmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

1.Deneysel Modelin ve Grupların Oluşturulması

Çalışma için 40 adet 220-280 gr aralığında dişi Wistar Albino cinsi sıçanlara 40mg/ kg ketamin hidrokloride, 2mg/kg kslazin hidroklorid karışımı ile anestezi yapıldı. Batına üretral açıklığın üstünden başlayan 3 cm lik vertikal kesiyle girilerek uterin hornlar iki taraftan sütüre edilerek 1 cm lik alan çıkarıldı. Çıkarılan endometrial fragman longitudinal ikiye ayrılarak endometrium tespit edilen peritona 4.0 poliprolenle iki taraflı sütüre edilerek transplante edildi. Steril şartlarda cilt-cilt altı kapatıldı ve denekler rastgele her bir grupta 6 denek olacak şekilde 5 gruba ayrıldı.

Grup 1: Ketotifen grubu (1mg/kg/gün, Oral)

Grup 2: Dienogst grubu (0.3mg/kg/gün, Oral)

Grup 3: Danazol grubu (100mg/kg/gün, Oral)

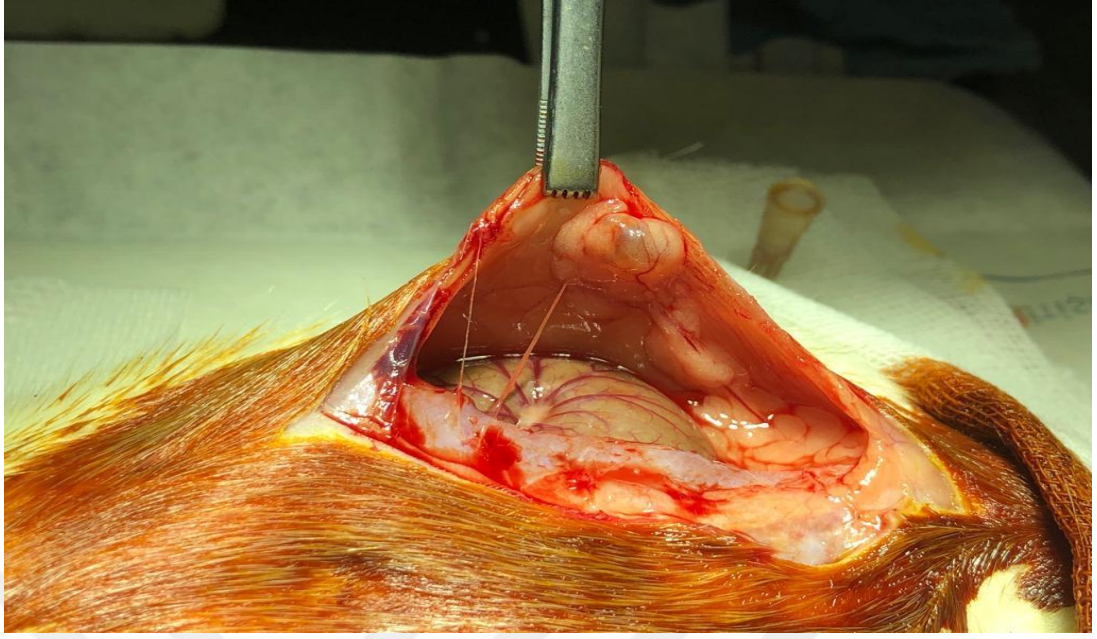
Grup 4: İsolYTE S grubu (1cc/gün, Oral)

Grup 5: Kontrol grubu (Ketotifen, Dienogest, Danazol ve Isolyte S verilmedi.)

Tüm gruptaki denekler 4 hafta boyunca takip edildi. Her 3 günde bir pansuman yapıldı.

2.İmplantların Değerlendirilmesi

Endometriozis modeli uygulamasından 4 hafta sonra relaparotomi yapılarak endometriotik implantların boyutu, hacmi ve çalışmaya uygunluğu değerlendirildi. Her gruptaki tedavi öncesi implant hacimleri, boyutları ölçülerek hesaplandı. Hacim hesaplamaları için elipsoid hacim formülü (uzunluk X genişlik X yükseklik X 0.52 mm³) kullanılmıştır .



Resim 1: omental yapışıklık oluşturmuş endometriotik implant görünümü.

3.Dokuların Alınması ve Parafin Doku Takibi

Her bir grup denekten endometriotik implantlar alındıktan sonra ışık mikroskobu ile değerlendirilmek üzere %10 formalin solüsyonunda 48 saat süreyle fiksasyon amacıyla bekletildi. Doku örneklerinin formalinden arınması için 1 gece boyunca akar su altında yıkandı ve dehidratasyon amacıyla sırasıyla %60, %70, %80, %95 'lik alkollerde (Alkomed, BUL) 30 dakika, %100 alkolde 1 saat olacak şekilde tutuldu. Şeffaflaştırma için örnekler etanol-ksilen (1:1) karışımında 30 dakika, daha sonra iki defa ksilen içerisinde (Surgipath, USA) 60 dakika tutuldu. Şeffaflaştırma işleminin ardından önce 60 °C'lik etüv içerisinde bulunan ksilen-parafin (1:1) karışımında 30 dakika ve 60 'ar dakika iki değişim parafin içerisinde bekletildi. Örnekler daha sonra parafin içerisine gömülerek bloklar oluşturuldu. Uygulanan doku takip protokolü Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 4. Parafin doku takip protokolü

İŞLEM		SÜRE
Fiksasyon	%10 Formalin	48 Saat
	AKAR SU	16 Saat
Dehidratasyon	%60 Alkol	30 Dakika
	%70 Alkol	30 Dakika
	%80 Alkol	30 Dakika
	%95 Alkol	30 Dakika
	%100 Absolut Alkol	1 Saat
	%100 Absolut Alkol	1 Saat
Şeffaflaştırma	Etanol:Ksilen(1:1)	30 Dakika
	Ksilen I	1 Saat
	Ksilen II	1 Saat
İnfiltrasyon	Ksilen -Parafin (1:1)	30 Dakika
	Parafin I	1 Saat
	Parafin II	1 Saat
Gömme	Parafin	

4.Dokularının Histokimyasal Boyaması

Histokimyasal analiz için parafine gömülen bloklardan mikrotom (Leica RM2245, GER) cihazı ile 5 µm'lik kesitler alındı. Kesitler 60°C'de bir gece etüvde bekletildikten sonra parafinin uzaklaştırılması için 30 dakika iki değişim ksilen içerisinde bekletildi. Kesitler dokuların rehidratasyonu için sırası ile %96, %80, %70, %60'lık azalan alkol serilerinde 2'şer dakika bekletildi ve akar su altında 5 dakika yıkandı. Çekirdeklerin boyanması için 8 dakika hematoxilen (RRSP67, Atom Scientific, UK) ile boyandı ve fazla hematoxilenin uzaklaştırılması için kesitler tekrar akar su altında 5 dakika yıkandı. Asit-alkol içerisinde birkaç saniye tutulan kesitler tekrar akar su altında 5 dakika yıkandı ve sitoplazmanın boyanması için 2 dakika eozin

(RRSP35, Atom Scientific, UK) ile boyandı. Kesitler akar su altında 5 dakika tekrar yıkandıktan sonra %80 ve %96'lık alkol serilerinden geçirildikten sonra birkaç dakika oda sıcaklığında kurutuldu ve 1 saat ksilende tutulduktan sonra entellan (107961; Merck, GER) ile üzerine lamel yerleştirilerek kapatıldı (Tablo 2). Tüm örnekler ışık mikroskobu (Olympus BX-43, JP) ile incelendi ve fotoğrafları çekildi.

Tablo 5. Hematoksilen-Eozin boyama protokolü

İŞLEM		SÜRE
Deparafinizasyon	60°C'lik Etüvde	Gece Boyunca
Deparafinizasyon	Ksilen I	30 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilen II	30 Dakika
Rehidratasyon	%96 Etil Alkol	2 Dakika
	%80 Etil Alkol	2 Dakika
	%70 Etil Alkol	2 Dakika
	%60 Etil Alkol	2 Dakika
Yıkama	Akar Su	5 Dakika
Boyama	Hematoksilen	8 Dakika
Yıkama	Akar Su	5 Dakika
Diferansiyasyon	Asit- Alkol	1-2 Saniye
Yıkama	Akar Su	5 Dakika
Boyama	Eozin	2 Dakika
Yıkama	Akar Su	5 Dakika
	%80 Etil Alkol	1 Dakika
	%95 Etil Alkol	1 Dakika
Kurutma	Oda Sıcaklığı	
	Ksilen	1 Saat
Kapatma	Entellan	

5.Dokuların İmmunohistokimyasal Boyaması

İmmunohistokimyasal analiz için kesitler 1 gece boyunca 60 °C'lik etüvde bekletildikten sonra ksilen içerisinde 1 saat bekletilerek deparafinize edildi. Preparatlar daha sonra sırası ile %96'lık, %80'lik, %70'lik, %60'lık alkol serilerinde 2'şer dakika tutuldu ve distile su ile 2 kez 5'er dakika yıkandı. İmmunohistokimya kalemi (Pap-Pen, Invitrogen, UK) ile etrafında hidrofobik alan oluşturulan kesitler 3 kez 5 dakika fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile yıkandı. Daha sonra dokulardaki proteinleri çapraz bağları yıkmak için 37 °C'de 15 dakika tripsin (TSS155, ScyTek Laboratories, USA) uygulandı. Kesitler 3 kez 5'er dakika PBS ile yıkandıktan sonra endojen peroksidaz aktivitesini inhibe etmek için %3'lük H₂O₂ (K-40391897, Merck, GER) oda sıcaklığında 10 dakika uygulandı. Daha sonra kesitler tekrar 3 kez 5 dakika PBS ile yıkandı ve 1 saat bloklama solüsyonu (hrp-S-030, Zytomed Systems, GER) ile inkübe edildi. Kesitlerden solüsyon uzaklaştırıldı ve anti-Ki67 (PRM-325AA, Biocare Medical. USA), anti-Triptaz (SC-377427, Santa Cruz, USA), anti-Tnf α (SC-52746, Santa Cruz, USA) primer antikörleri kullanılarak +4°C'de bütün gece inkübe edildi. Inkübasyon sonunda PBS ile 3 defa 5'er dakika yıkanan kesitler 30 dakika primer antikör ile uyumlu biotinlenmiş sekonder antikör (HRP-S-030, Zytomed Systems, GER) ile inkübe edildi. Kesitlerin 3 defa 5'er dakika PBS ile yıkanmasının ardından 30 dakika streptavidin-HRP (HRP-S-030, Zytomed Systems, GER) uygulandı ve tekrar PBS ile 3 defa 5'er dakika yıkandı. İmmunoreaktivitenin görünür hale gelmesi için Diaminobenzidin (DAB) kromojeni (TA-125-HD, Thermo Scientific, USA) ile 5-10 dakika boyanan kesitler artalan boyaması için Mayer's Hematoksilen (TA-125-MH, Thermo Scientific, USA) ile 1 dakika artalan boyaması için tutuldu. Tüm kesitler distile su ile yıkanmanın ardından (boya fazlası uzaklaşınca kadar) %80 ve %96'lık alkollerden geçirildikten sonra ksilende 1 saat tutuldu ve entellan (107961; Merck, GER) ile üzerine lamel yerleştirilerek kapatıldı (Tablo 3). Negatif kontrol kesitlerine primer antikörler uygulanmadı ve diğer tüm basamaklar aynı şekilde gerçekleştirildi. Hazırlanan preraratlar ışık mikroskobu altında incelendi (Olympus BX-43, JP) ve fotoğrafları çekildi.

Tablo 6. İndirekt immunohistokimya protokolü

İŞLEM		SÜRE
Deparafinizasyon	60°C'lik Etüvde	Gece Boyunca
Deparafinizasyon	Ksilen I	30 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilen II	30 Dakika
Rehidratasyon	%96 Etil Alkol	2 Dakika
	%80 Etil Alkol	2 Dakika
	%70 Etil Alkol	2 Dakika
	%60 Etil Alkol	2 Dakika
Yıkama	Distile Su	10 Dakika
	Pbs	3x5 Dakika
	Pap Pen	
	Tripsin 37°C'de Etüvde	10 Dakika
	Pbs	3x5 Dakika
Peroksidaz Bloklama	%3'lük Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂)	5 Dakika
Yıkama	PBS	3x5 Dakika
Bloking	Bloking Solüsyonu	1 Saat
Primer Antikor	Primer Antikor	18 Saat (+4°C'de)
Yıkama	PBS	3x5 Dakika
Sekonder Antikor	Biotinlenmiş Sekonder Antikor	30 Dakika
Yıkama	PBS	3x5 Dakika
	Streptavidin	30 Dakika
Yıkama	PBS	3x5 Dakika
	DAB (Diamino Benzidin)	5-10 Dakika
Yıkama	Distile Su	3x5 Dakika
Artalan Boyaması	Mayer's Hematoksilen	1 Dakika
Yıkama	Distile Su	10 Dakika
	%80 Etil Alkol	1 Dakika

	%96 Etil Alkol	1 Dakika
	Ksilen	1 Saat
Kapatma	Entellan	

6.İmmunohistokimya Boyamanın Değerlendirilmesi

Tüm kesitlerdeki immunoreaktivite şiddeti negatif (0), zayıf (1), orta (2) ve şiddetli (3) olmak üzere iki farklı gözlemci tarafından farklı zamanlarda değerlendirildi. Tüm grup örneklerin her bir denekte gözlenen boyanma şiddetleri değerlendirme sonrasında ortalama ve standart sapmaları elde edildi.

7.Dokuların Toluidin Mavisi ile Boyaması

Kesitler 60°C'de bir gece etüvde bekletildikten sonra parafinin uzaklaştırılması için 30 dakika iki değişim ksilen içerisinde bekletildi. Kesitler dokuların rehidratasyonu için sırası ile %96, %80, %70, %60'lık azalan alkol serilerinde 2'şer dakika bekletildi ve akar su altında 5 dakika yıkandı. Boyama solüsyonu elde etmek amacı için % 0.1 toluidin mavisi olacak şekilde toluidin mavisi (R1727, Agar Scientific, UK) distile suda içerisinde çözdürüldü. Kesitler 10 dakika boya solüsyonu içerisinde tutulduktan sonra distile su ile 2 dakika yıkandı. Kesitler daha sonra % 80 ve % 96'lık alkol serilerinden geçirildi ve havada kurutuldu. Örnekler 20 dakika ksilende içerisinde tutulduktan sonra entellan (107961; Merck, GER) ile kapatıldı (Tablo 4) ve ışık mikroskobu (Olympus BX-43, JP) ile incelenerek fotoğrafları çekildi.

Tablo 4. Toluidin mavisi boyama protokolü

İŞLEM		SÜRE
Deparafinizasyon	60°C'lik Etüvde	Gece Boyunca
Deparafinizasyon	Ksilen I	2 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilen II	2 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilen III	2 Dakika

Rehidratasyon	%96 Etil Alkol	2 Dakika
	%96 Etil Alkol	2 Dakika
	%80 Etil Alkol	2 Dakika
	%70 Etil Alkol	2 Dakika
Yıkama	Akar Su	2 Dakika
Boyama	Toluidin Mavisi	10 Dakika
Yıkama	Distile Su	2 Dakika
	%80 Etil Alkol	1 Dakika
	%96 Etil Alkol	1 Dakika
Kurutma	Havada	
Şeffaflaştırma	Ksilen	20 Dakika
Kapatma	Entellan	

8.ELISA Analizi ile TNF α Varlığının Belirlenmesi

TNF α ELISA kiti (BMS622, Invitrogen, UK) içindeki tüm malzemeler ve mevcut deney örnekleri oda ısısına (22⁰C - 24⁰C) getirildi. Yıkama tamponu, biotin-konjugat solüsyonu, streptavidin-HRP solüsyonu ve sıçan TNF α standart solüsyonu kit içeriğinde belirtilen oranlara göre hazırlandı. Her kuyucuk 2 kez 400 μ l yıkama tamponu ile yıkandı ve sıçan TNF α standart solüsyonundan ilk 7 kuyucuğa 100 μ l eklendi. Diğer kuyucuklara mevcut ELISA kiti içerisinde bulunan örnek dilüentten 50 μ l eklendi. Çalışma grup deneklerden alınan batın içi sıvı örneklerinden her bir kuyucuğa 50 μ l eklendi. Ardından tüm kuyucuklara 50 μ l biotin-konjugat solüsyonundan eklenip kuyucukların üzeri adheziv bantla kapatılarak oda ısısında 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda adheziv bant kaldırılarak tüm kuyucuklar 4 kez 400 μ l yıkama tamponu eklenerek yıkama yapıldı. Yıkama yapıldıktan sonra her kuyucuğa hazırlanan streptavidin-HRP solüsyonundan 100 μ l eklenip kuyucukların üzeri adheziv bantla kapatılarak oda ısısında 1 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından adheziv bant kaldırılarak tüm

kuyucuklara tekrar 4 kez 400 µl yıkama tamponu eklenerek yıkama yapıldı ve direkt ışıktan kaçınılarak 100 µl TMB substrat solüsyonundan eklenip oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda her kuyucuğa tampon solüsyonundan 100 µl eklenerek spektrofotometre cihazında (ELX800UV, BioTek Instruments Inc, USA) 450 nm dalga boyunda ölçüm gerçekleştirildi.

İstatistiksel hesaplama için Graphpad Prism 7 kullanıldı. Öncelikle veri dağılımının normal olup olmadığının belirlenmesi için Shapiro Wilk normallik testi uygulandı. Veri dağılımının normal olduğu görüldü. Buna göre parametrik bir test olan One-way ANOVA kullanılarak veriler değerlendirildi. Sonuçlar ortalama±standart sapma şeklinde verildi. $p<0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

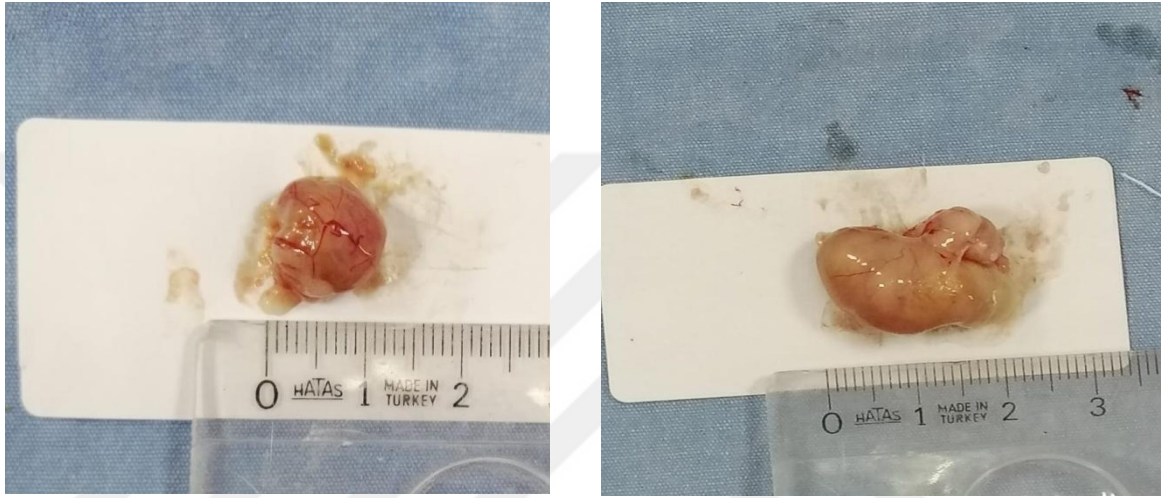
Tablo 5. ELISA Protokolü

İŞLEM		SÜRE
Yıkama Tamponu	2x400 µL	30 Saniye
Standart Solüsyon	100 µL	
Örnek Dilüent	50 µL	
Deney Grubu Örnekleri	50 µL	
Biotin-Konjugat	50 µL	
İnkübasyon		2 Saat
Yıkama Tamponu	4x400 µL	1 Dakika
Streptavidin-Hrp	100 µL	
İnkübasyon		1 Saat
Yıkama Tamponu	4x400 µL	1 Dakika
TmbSubstrat Solüsyonu	100 µL	10 Dakika
Durdurma Solüsyonu	100 µL	
Ölçüm		

BULGULAR

Endometrial İmplant Bulguları

Endometriotik implantlar eksize edildikten sonra her gruptaki implant hacimleri, elipsoid hacim formülü (uzunluk X genişlik X yükseklik X 0.52 mm³) kullanılarak tekrar hesaplandı.



Resim 2: eksize edilen endometriotik implantların görünümü

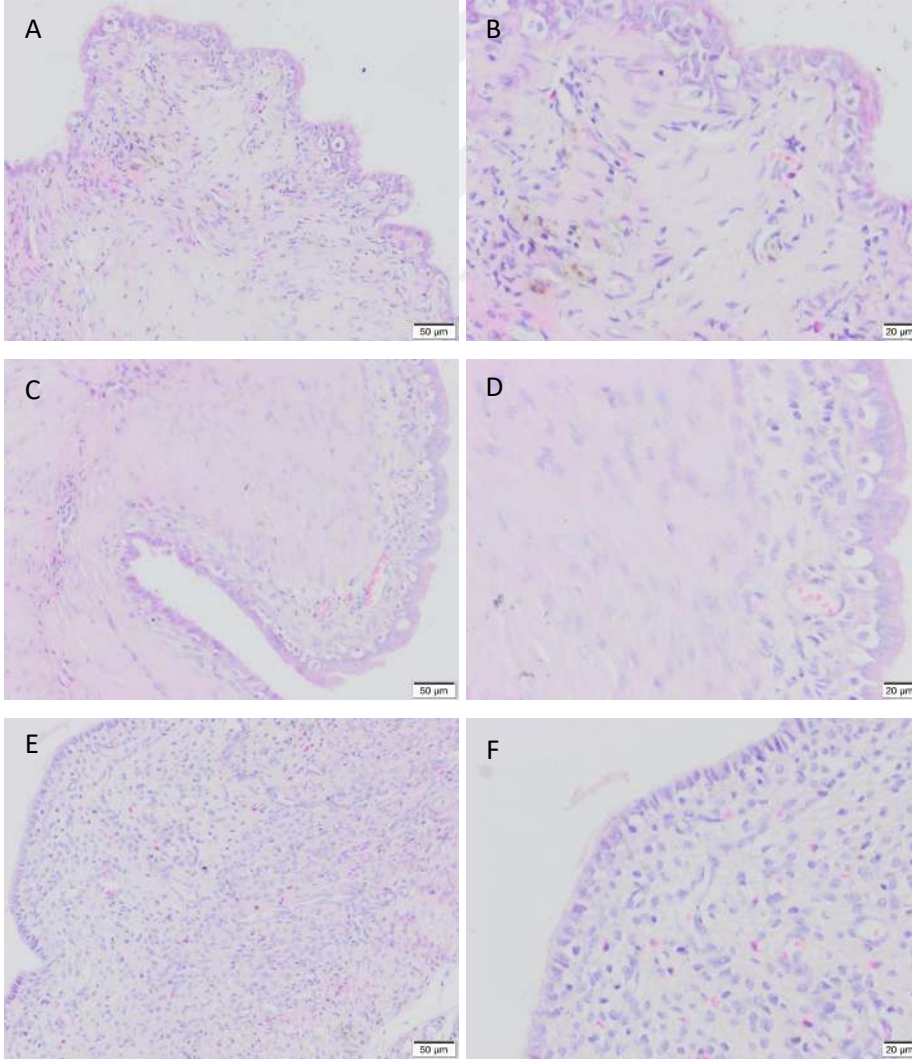
Tablo 6: endometriotik implant boyutlarının preop ve postop hacim karşılaştırması

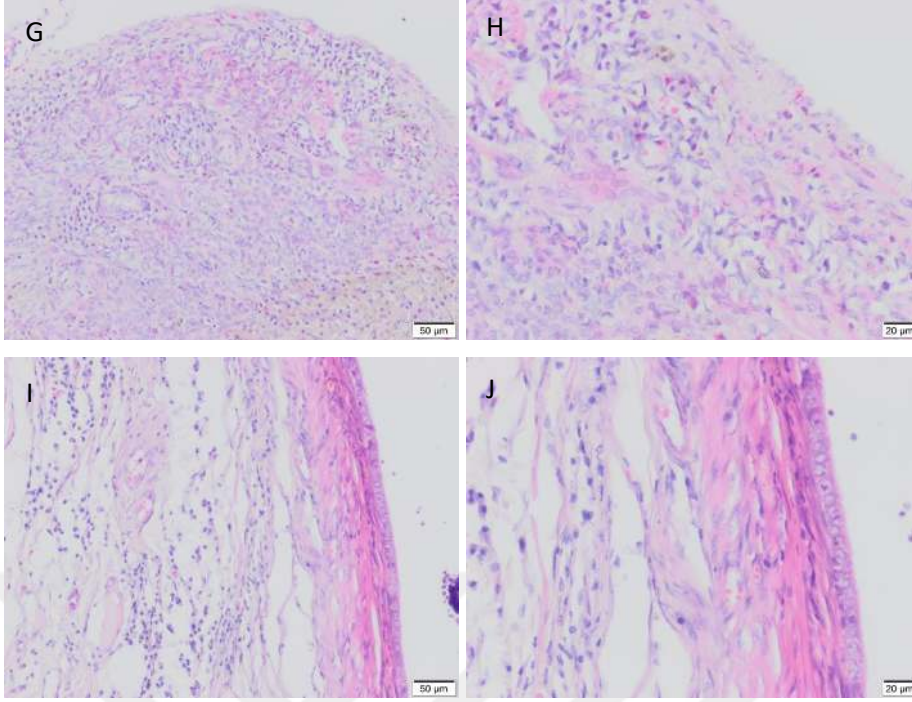
Ortalama implant volümü (mm ³)-	Grup 1 (ketotifen 1mg/kg) n=8	Grup 2 (dienogest 0.3mg/kg) n=8	Grup 3 (danazol 100mg/kg) n=8	Grup 4 (isolyte-s) n=8	Grup 5 (kontrol) n=8
öncesi	29,87 ± 3,73	30,76 ± 2,87	30,85 ± 2,97	30,50 ± 3,57	30,21 ± 2,41
sonrası	23 ± 2,62 P<0.017	22,51 ± 4,53 P<0.036	21,46 ± 6,40 P<0.012	57,55 ± 25,48	62,35 ± 23,04

Değerlendirme sonunda grup1 (ketotifen) , grup 2 (dienogest) ve grup 3 (danazol) gruplarında hacimsel boyutta küçülmenin anlamlı olduğu görüldü (p<0.05). Grup 4(isolyte–s) ve grup 5 (kontrol) gruplarında ise endometriotik implant hacimlerinde istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu izlendi (p<0.05).

Histokimyasal Bulgular

Histokimyasal analiz sonrasında Grup 1 ketotifen grubunda implant örneklerinde tek katlı kübik epitel ile döşeli altta gevşek bağ dokusu karakterinde yapıların olduğu gözlemlendi (Resim 2A,B). Grup 2 dienogest grubunda ise grup 1 ile benzer yapıların olduğu, fakat bağ dokusu içerisinde hücresel elemanların daha az olduğu saptandı (Resim 2C,D). Grup 3 danazol grubunda ise grup 1 ile benzer olduğu, bağ dokusunda PNL hücrelerin olduğu saptandı (Resim 2E,F). Grup 4 isolyte-S (resim 2G,H) ve grup 5 kontrol (Resim 2I,J) gruplarında yüzeyde tek katlı epitel kübik epitel altında bağ dokusunda kanlanmanın arttığı ve PNL hücrelerin sayıca fazla olduğu görüldü.

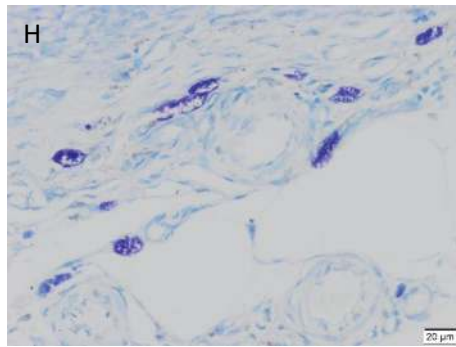
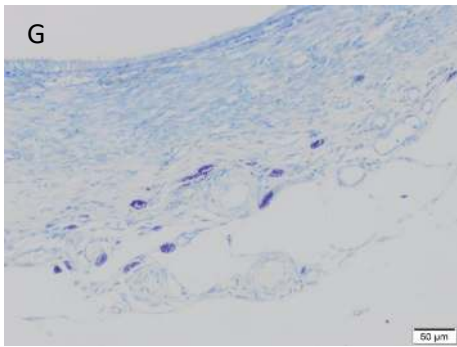
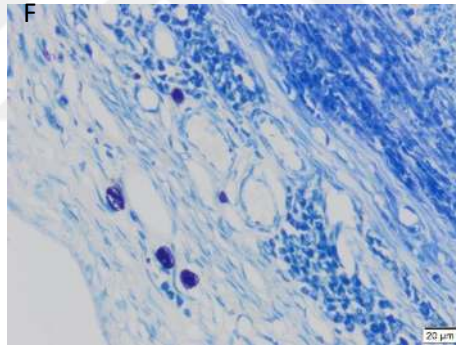
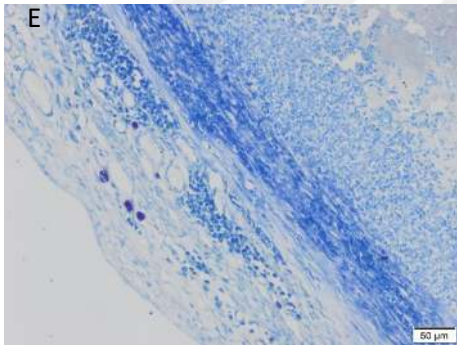
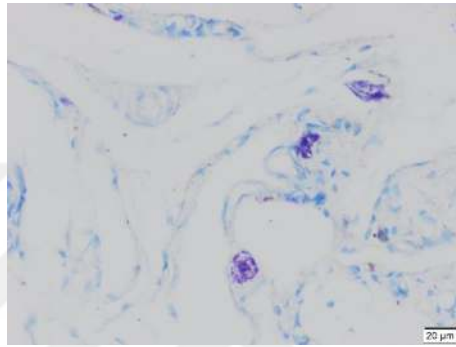
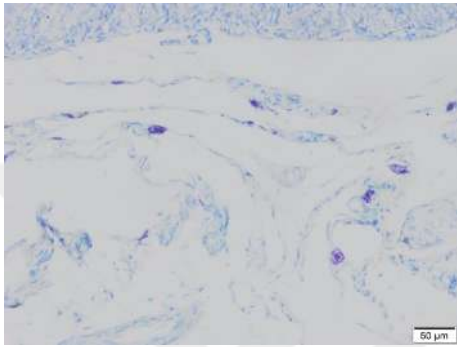
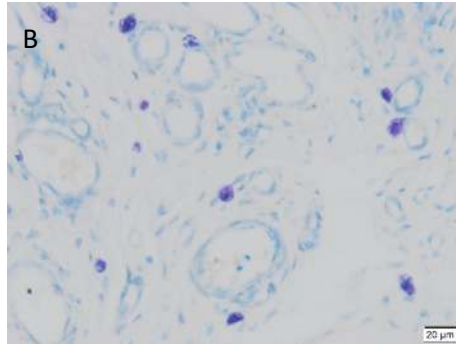
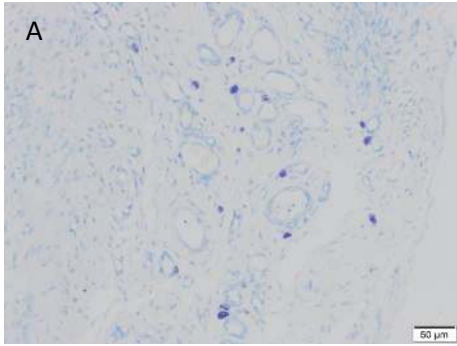


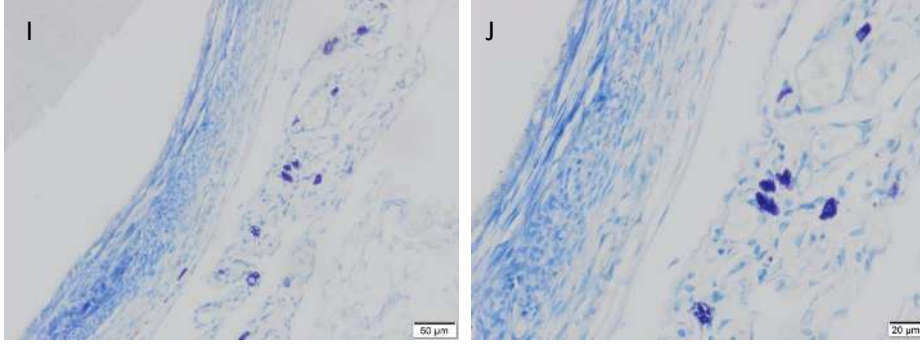


Resim 3: Grup 1 (A, B), Grup 2 (C, D), Grup 3 (E, F), Grup 4 (G, H) ve Grup 5 (I, J) ait endometriod implant örneklerinin histokimyasal boyaması. Ölçek: 50µM (A,C,E,G,I), 20µM (B, D, F, H, J).

Toluidin Boyaması Analizi

Mast hücrelerinin boyanması amacı için yapılan boyama sonrasında tüm grup örneklerinde bağ dokusu içerisinde mast hücrelerinin mor renkli olarak boyandığı gözlemlendi (Resim 4). Grup 1 ketotifen, grup 2 diogenest ve grup 3 danazol gruplarında mast hücre varlığının grup 4 isolyte-S ve grup 5 kontrol gruplarına göre daha az olduğu gözlemlendi (Resim 4). Tedavi gruplarından grup 2 diogenest (Resim 4C, D) ve grup 3 danazol (Resim 4E, F) gruplarında mast hücre varlığının grup 1 ketotifen grubuna (Resim 4A, B) oranla daha az olduğu saptandı.



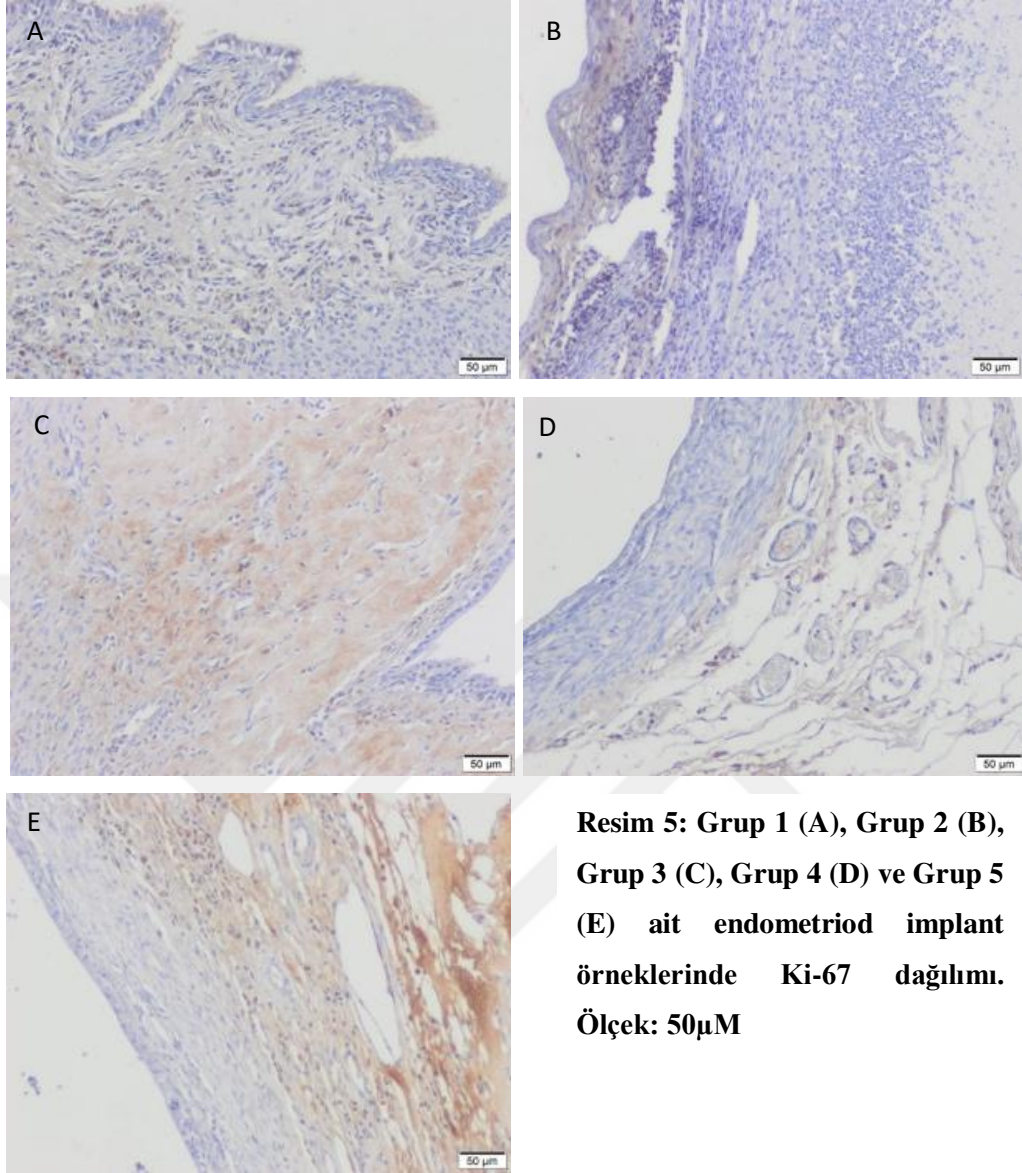


Resim 4: Grup 1 (A, B), Grup 2 (C, D), Grup 3 (E, F), Grup 4 (G, H) ve Grup 5 (I, J) ait endometriod implant örneklerinin toluidin mavisi ile boyaması. Ölçek: 50µM (A,C,E,G,I), 20µM (B, D, F, H, J).

İmmunohistokimyasal Bulgular

Ki-67 Dağılımı

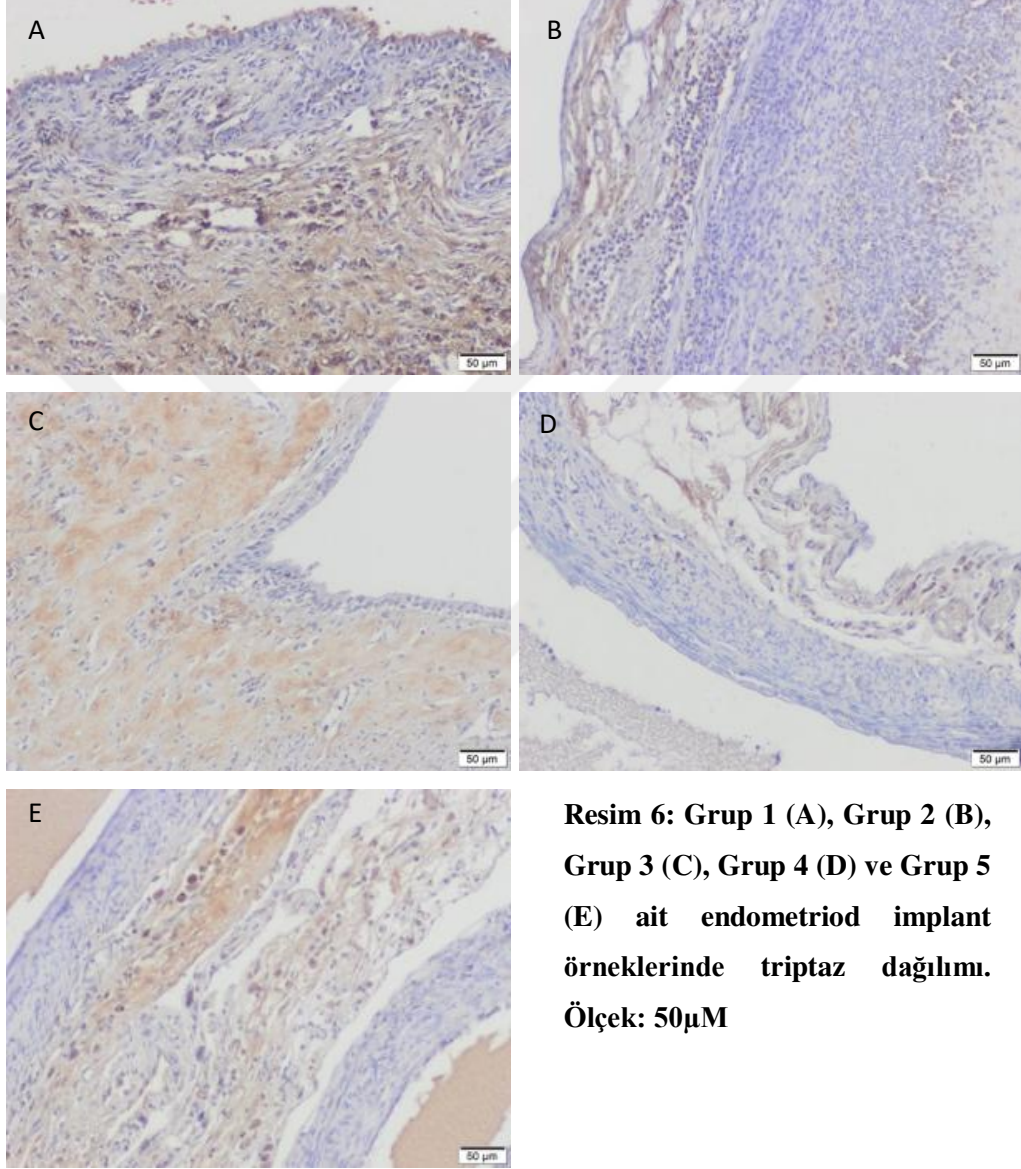
İmmunohistokimyasal analiz sonrasında Ki-67 immunoreaktivitesi grup 1 ketotifen grubunda epitelial ve stromal hücrelerde yer yer zayıf şiddette iken (Resim 3A) iken, grup 2 dianogest grubunda immunoreaktivitenin grup 1 e oranla daha az olduğu, stromal ve epitelial alanlarda nadiren zayıf şiddette olduğu gözlemlendi (Resim 3B). Grup 3 danazol grubunda ki-67 immunoreaktivitesinin stromada orta şiddette iken, epitelde zayıf şiddette olduğu saptandı (Resim 3C). Grup 4 isolyte-S grubunda ki-67 immunoreaktivitesinin stromada zayıf, epitelde yer yer çok az şiddette boyamanın olduğu saptandı (Resim 3D). Grup 5 kontrol grubunda ise Ki-67 immunoreaktivitesi stromada orta şiddette iken, epitelde negatif veya çok nadiren boyanma olduğu izlendi (Resim 3E).



Triptaz Dağılımı

İmmunohistokimyasal analiz sonrasında triptaz immunoreaktivitesi grup 1 ketotifen grubunda epitelial hücrelerinde zayıf ve yer yer orta şiddette iken, stromal hücrelerde şiddette olduğu görüldü (Resim 4A). Grup 2 dianogest grubunda triptaz immunoreaktivitesinin grup 1 e oranla daha az olduğu, stromal hücrelerde zayıf, epitelial hücrelerde zayıf nadiren orta şiddette olduğu gözlemlendi (Resim 4B). Grup 3 danazol (Resim 4C) ve Grup 4 isolyte-S (Resim 4D) gruplarında triptaz immunoreaktivitesi stromada orta ve epitelial

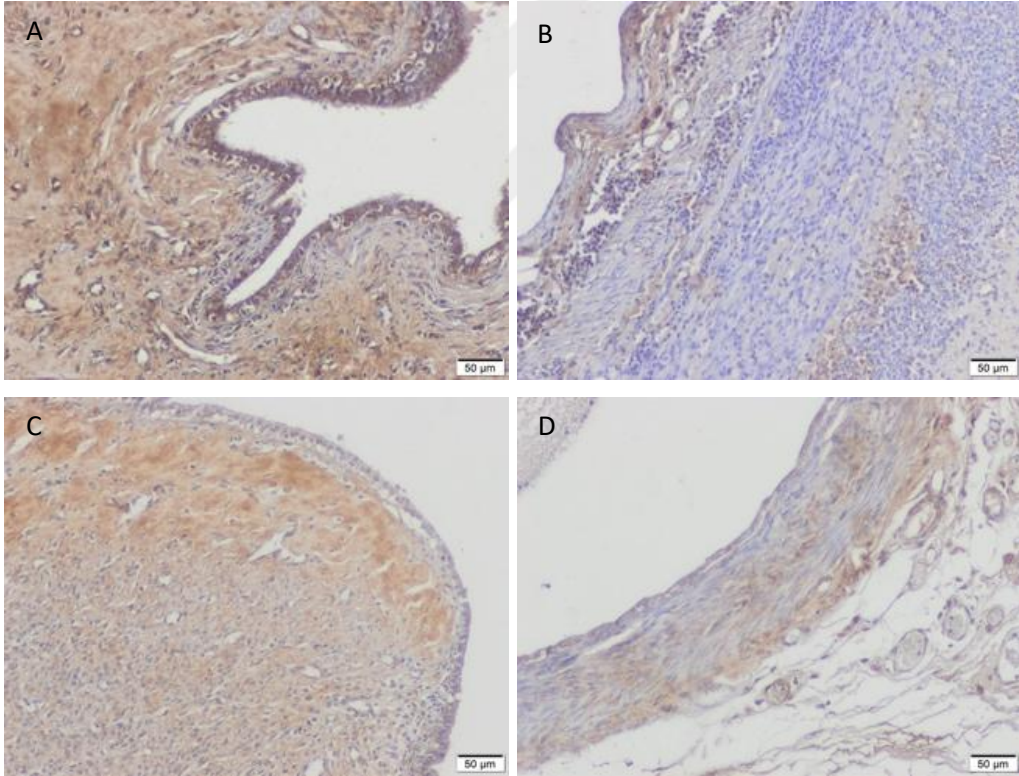
alanda zayıf şiddet olduğu izlendi Grup 5 kontrol grubunda ise triptaz immunoreaktivitesi stromada orta şiddette iken, epitelde negatif veya çok nadiren boyanma olduğu gözlemlendi (Resim 3E).

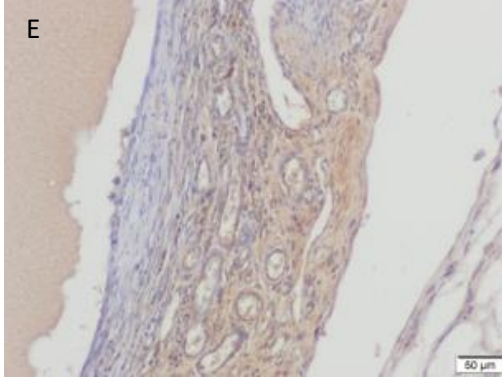


Resim 6: Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C), Grup 4 (D) ve Grup 5 (E) ait endometriod implant örneklerinde triptaz dağılımı. Ölçek: 50µM

TNF α Dağılımı

İmmünohistokimyasal analiz sonrasında TNF α immünoreaktivitesi grup 1 ketotifen grubunda stromada orta yer yer zayıf şiddete iken, epitelial alanda şiddetli pozitif olduğu görüldü (Resim 5A). Grup 2 dianogest grubunda TNF α immünoreaktivitesi stromal ve epitelial alanlarda orta şiddette olduğu gözlemlendi (Resim 5B). Grup 3 danazol grubunda TNF α immünoreaktivitesinin stromada şiddetli pozitif iken, epitelial alanlarda şiddetli pozitif fakat yer yer orta şiddette olduğu gözlemlendi (Resim 5C). Grup 4 isolyte-S (Resim 5D) ve Grup 5 kontrol (Resim 5E) gruplarında TNF α immünoreaktivitesinin stromada şiddetli, epitelde orta şiddette boyamanın olduğu saptandı (Resim 5D).





Resim 7: Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C), Grup 4 (D) ve Grup 5 (E) ait endometriod implant örneklerinde TNFα dağılımı. Ölçek: 50μM

Ki-67, triptaz ve TNFα ait immunoreaktivitelerin yoğunlukları tablo 5 de toplu olarak verilmiştir.

Tablo 4: Ki-67, triptaz ve TNFα ait immunoreaktivitelerin gruplar bazında epitelial ve stromal yoğunlukları (Ortalama±SD)

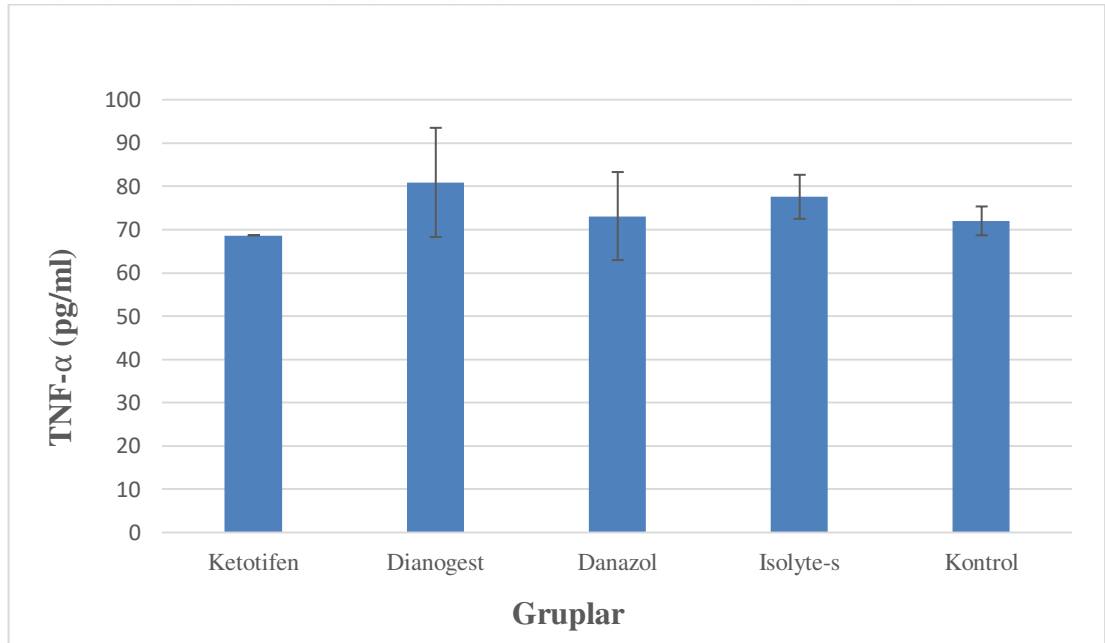
GRUPLAR	Ki-67	TRİPTAZ	TNFα
Grup 1 KETOTİFEN			
Stroma	1 ± 0	1.75 ± 0.5	1.5 ± 0.5
Epitel	1 ± 0	1.5 ± 0.57	2.5 ± 1
Grup 2 DİENOGET			
Stroma	0.5 ± 0.58	1.25 ± 0.5	2 ± 0
Epitel	0.5 ± 0.57	0.75 ± 0.5	1.25 ± 0.95
Grup 3 DANAZOL			
Stroma	1.75 ± 0.5	1.75 ± 0.5	3 ± 0
Epitel	0.5 ± 0.58	1 ± 0.82	2.5 ± 1
Grup 4 ISOLYTE-S			
Stroma	1.25 ± 0.5	1.75 ± 0.5	3 ± 0
Epitel	0.25 ± 0.5	0.5 ± 0.58	2 ± 0
Grup 5 KONTROL			
Stroma	1.5 ± 1	1.5 ± 1	3 ± 0
Epitel	0.25 ± 0.5	0.25 ± 0.5	2 ± 0

İmmunoreaktivite analizi sonrasında Ki-67, triptaz ve TNFα immunoreaktivite yoğunlukları istatistiki olarak karşılaştırıldığında, Ki-67 immunoreaktivitesinin tüm grup epitel ve stromalarında gözlenen immunoreaktivitelerin istatistiksel

olarak anlamlı olmadığı gözlemlendi. Grup 5 kontrol grubunda epitelde gözlenen zayıf triptaz immunoreaktesinin grup 3 danazol ve grup 4 isolyte-s gruplarına oranla istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($P<0.05$). $TNF\alpha$ immunoreaktivitesinin gruplar arası istatistiksel olarak değerlendirilmesi sonrasında grup 1 ketotifen grubundaki stromal $TNF\alpha$ immunoreaktivitesinin grup 2 diogenest, grup 3 danazol grup 4 isolyte-s ve grup 5 kontrol gruplarına oranla istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($P<0.05$).

$TNF\alpha$ Varlığının ELISA Yöntemi ile Analizi

ELISA analizi sonrasında $TNF\alpha$ seviyesi grup 1 ketotifen grubunda 68.67 ± 0.0 iken, grup 2 diogenest grubunda 80.89 ± 12.62 iken, grup 3 danazol grubunda 73.11 ± 10.18 , grup 4 isolyte-S grubunda 77.56 ± 5.09 , grup 5 kontrol grubunda ise 72.0 ± 3.33 olduğu saptandı (Grafik 1). Analiz sonucunda gruplar arasında $TNF\alpha$ seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.



Grafik 1: Grup 1 (A, B), Grup 2 (C, D), Grup 3 (E, F), Grup 4 (G, H) ve Grup 5 (I, J) ait deneysel endometriozis modeli batın sıvısındaki $TNF\alpha$ seviyeleri.

TARTIŞMA

Endometriozis uterus dışındaki ektopik endometriyal dokunun varlığı ile karakterize, inflamatuvar bir hastalıktır. Endometriozis patogenezi hala net olarak belirlenememiştir. Patogeneizde çeşitli teoriler öne sürülmüş olup bunlar arasında en çok kabul gören teori retrograd menstrüasyon teorisi. Ancak menstrüasyon sırasında yapılan laparoskopik çalışmalarda birçok kadında retrograd menstrüasyon saptanmasına rağmen bu kadınların az bir kısmında endometriozis geliştiği gösterilmiştir. Peritoneal kaviteye yayılan menstrüel doku ve içerdiği endometrium dokusu immün sistem tarafından temizlenmektedir. Bu nedenle retrograd menstrüasyon nedeniyle endometriozis gelişmesinde immün sistem bozukluğu sorumlu tutulmaktadır. Endometriotik lezyonlar boyunca mast hücrelerinin yaygın bir infiltrasyonu gözlenirken, bu hücrelerin ektopik endometrium implantların büyümesini modüle eden ve endometriozis ile ilişkili inflamasyonu teşvik eden moleküller ağı üzerine nasıl katkıda bulunduğu hakkında çok az şey bilinmektedir.

Çevresel toksinlere ve endojen bileşiklerine yanıt olarak bilinen bir transkripsiyon faktörü olan aril hidrokarbon reseptörü (AhR) MH'lerde bulunmaktadır. Aril hidrokarbon reseptörü aktivasyonuna yanıt olarak, MH'ler ILR-17 ve reaktif oksijen türlerini üreterek AhR ligandlarının MH'ler yoluyla inflamasyon üzerindeki potansiyel etkisini arttırmaktadır. Mariuzzi ve ark. yapmış olduğu çalışmada İnsan endometriotik doku örnekleri kullanılarak, AhR ile aktive edilmiş MH 'lerin olduğu kültür ortamındaki endometrial stromal hücrelerin büyümesini değerlendirmiştir. Bu çalışmada endometrial stromal hücre büyümesinin, MH'ler tarafından salgılanan çözünabilir faktörler varlığında Ahr aktivasyonu ile geliştiği saptanmıştır. Endometriozis patogenezi MH'lerin yeni bir mekanik rolü olduğu düşünülmektedir (138,139). Bizde çalışmamızda endometrioziste mast hücrelerinin rolünü araştırabilmek amacıyla deneysel endometriozis modeli üzerinde mast hücre stabilizatörü olan ketotifen 28 gün boyunca oral yoldan uyguladık. Ayrıca endometriozis tedavisinde rutinde kullanılan dienogest ve danazolunda etkilerini araştırmayı ve ketotifen ile karşılaştırmayı amaçladık. Bu üç grubu

Isolyte-S ve hiçbir tedavi almayan kontrol grupları ile mast hücre yoğunlukları açısından karşılaştırdık. Mast hücrelerinin boyanması amacıyla yapılan toluidin blue boyaması sonrasında grup 1 ketotifen, grup 2 dienogest ve grup 3 danazol gruplarında mast hücre varlığının grup 4 isolyte-S ve grup 5 kontrol gruplarına göre daha az olduğunu gözledik. Tedavi gruplarından grup 2 dienogest ve grup 3 danazol gruplarında mast hücre varlığının grup 1 ketotifen grubuna oranla daha az olduğunu saptadık. Bu verilerimiz Mariuzzi ve ark. yapmış olduğu çalışmayı destekler nitelikte görülmekte olup mast hücrelerinin patofizyolojide etkin rolleri olduğunu göstermektedir. Çalışmada kullandığımız endometriozis tedavi protokollerinden rutin tedavide kullanılan dienogest ve danazolun ayrıca rutin tedavide olmayan ketotifenin mast hücrelerini azalttığı ve bu sayede inflamasyonu baskıladığını düşünmekteyiz.

Çalışmamızın ayrı bir koluda endometriotik implant hacimleri ölçümüdür. Bu ölçümler tedavi öncesi ve sonrası yapılarak karşılaştırıldı. Tedavi öncesi tüm gruplarda endometriotik implant hacimleri benzer iken tedavi sonrası kontrol ve Isolyte-S gruplarına kıyasla grup 1 ketotifen, grup 2 dienogest ve grup 3 danazol gruplarında implant hacimlerinde anlamlı olarak azalma olduğunu saptadık. Fischer ve ark.'nın Dienogest 0.3 ve 1.0 mg / kg / gün, Danazol 100 mg / kg / gün dozlarında, 28 gün boyunca oral yoldan uyguladıkları çalışmalarında Dienogest 0.3 mg / kg / gün uygulanan grubun, toplam endometriyal lezyon alanını önemli ölçüde azalttığı ve bu etkinin, Danazol 100 mg / kg / gün grubuna eşdeğer bir etki gösterdiği saptanmıştır. İlk gruptaki 0,3 mg/kg/gün dienogest dozunun, endometriyal dokunun büyümesi üzerine kuvvetli inhibitör aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Çalışmacılar bu bulguların lezyonların azaltılmasında dienogestin etkinliği için destekleyici kanıt niteliğinde olduğunu öne sürmüşlerdir (140). Bizim çalışmamızda da dienogest ve danazol gruplarında implant hacimlerinde azalmada benzer etkinlik görülmüş olup bulgularımız literatürü destekler niteliktedir. Yine aynı şekilde ketotifen'in de implant hacimlerin de istatistiksel olarak azalma sağladığı ancak bu azalmanın danazol ve dienogest gruplarına oranla daha az olduğunu saptadık. Bu verinin sonucunda da

dienogest ve danazolun lezyon büyüklüğü açısından ketotifene oranla daha etkili olduğu sonucuna vardık.

Zhu LB ve ark. tarafından yapılan bir başka çalışmada mast hücre stabilizatörü olan sodyum kromoglikat'ın sıçanlarda deneysel endometriozis üzerine etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada mast hücrelerinin toplam sayısı ve degranülasyonu, serumdaki TNF- α konsantrasyonları, serumdaki östradiol konsantrasyonları, triptaz ve sinir büyüme faktörü (NGF) ekspresyonu ölçülmüştür. Sodyum kromoglikat'ın mast hücrelerinin degranülasyonunu engelleyerek ve TNF- α ve triptaz düzeylerini düşürerek endometriozisin klinik semptomlarını giderdiği sonucuna varmışlardır (141). Bizim çalışmamızda da deneysel endometriozis modelinde endometriotik implant stromalarında ki-67, triptaz ve TNF α immunoreaktivite yoğunlukları analiz edilmiştir. TNF α immunoreaktivitesinin gruplar arası istatistiksel olarak değerlendirilmesi sonrasında grup 1 ketotifen grubundaki stromal TNF α immunoreaktivitesinin grup 2 dienogest, grup 3 danazol grup 4 isolyte-s ve grup 5 kontrol gruplarına oranla istatistiksel olarak anlamlı olduğunu saptadık ($P<0.05$). Çalışmamızda ketotifen grubundaki bulgularımız Zhu LB ve ark. yapmış olduğu çalışma verileri ile uyumlu iken dienogest ve danazol gruplarındaki verilerimiz ise uyumlu değildir.

Bu çalışmada kullandığımız diğer belirteçler Ki-67 ve triptaz immunoreaktivite yoğunluklarını istatistiki olarak karşılaştırdığımızda, Ki-67 immunoreaktivitesinin tüm grup epitel ve stromalarında istatistiksel olarak anlamlı olmadığını gözledik. Grup 5 kontrol grubunda epitelde gözlenen zayıf triptaz immunoreaktivitesinin grup 3 danazol ve grup 4 Isolyte-S gruplarına oranla düşük olduğunu ve bulgunun da istatistiksel olarak anlamlı olduğunu saptadık ($P<0.05$). Bu veri bize triptaz aktivitesinin Zhu LB ve ark. tarafından yapılan çalışmanın aksine endometriozis patogenezinde rolü olmadığını düşündürmüştür.

ELISA analizi sonrasında TNF α seviyesi grup 1 ketotifen grubunda 68.67 ± 0.0 , grup 2 diogenest grubunda 80.89 ± 12.62 , grup 3 danazol grubunda 73.11 ± 10.18 , grup 4 isolyte-S grubunda 77.56 ± 5.09 ve grup 5 kontrol grubunda ise 72.0 ± 3.33 olarak bulduk. Analiz sonucunda gruplar arasında

TNF α seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptamadık. Elde edilen veriler sonucunda ketotifenin endometriotik implantların stromalarında TNF α ' yı azaltarak endometriozişte görülen inflamatuvar süreç üzerinde etkin olduğunu düşündük. Literatürde dienogest ve danazol moleküllerinin serum ve batın sıvısında TNF α seviyelerini azalttığını gösteren veriler mevcuttur. Fakat biz stromal dokularda TNF α seviyelerinde bu iki molekülün azalma sağlamadığını saptadık. KarşığoluT. Ve ark. yapmış olduğu çalışmada da mikronize progesteron ve kabergolin molekülleri çalışılmış olup periton histopatolojisi ve immünohistokimya boyamalarında , gruplar arasında IL-6 ve TNF-a boyaması açısından fark gösterilmemiştir (143). Bu çalışmada bizim bulgularımızla uyumluluk göstermektedir .

Dienogest ve danazolun TNF α üzerine etkisi literatürde batın sıvısı ve serumdaki düzeyleri üzerinden araştırılmıştır (140). Bu çalışmalarda serumda ve batın sıvısında TNF α seviyelerinde azalma olduğu gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda ise literatürden farklı olarak batın sıvısındaki TNF α miktarının azalmış olduğu ancak bu bulgunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığını gözledik. Ayrıca çalışmamızda diğer çalışmalardan farklı olarak stromal dokulardaki TNF α miktarını da inceledik. Dienogest ve danazol gruplarında stromal TNF α seviyelerinde anlamlı azalma saptamadık. Ancak ketotifen grubunda literatürden farklı olarak batın sıvısındaki TNF α seviyelerinde anlamlı azalma sağlamazken stromal TNF α seviyelerinde anlamlı azalma sağladığını saptadık. Bu veriler ışığında endometriotik implant stromalarında ketotifenin TNF α seviyelerinde oluşturduğu azalmanın batın sıvısındaki TNF α düzeylerine göre endometrioziş üzerine etkisini daha spesifik olarak yorumladık. Çünkü stromal dokudaki TNF alfa miktarı endometriotik dokuya lokalize ve spesifik iken batın sıvısı ve serumdaki TNF alfa düzeylerinin endometriozişe spesifik olmayabileceğini düşünmekteyiz.

SONUÇ

Endometriozis, hormonlara duyarlı endometrial dokunun, uterin kavite dışında lokalize olmasıyla karakterize kronik ve inflamatuvar bir hastalıktır. Geniş spektrumlu kliniğe sahip olup, en sık görülen semptomları kronik pelvik ağrı ve infertilitedir.

Endometriozisdeki patofizyolojik temel hala net olarak açıklanamamakla beraber endometriozis patofizyolojisinde hücresel ve humoral immünitinin rolü olduğu düşünülmektedir. Günümüzde mast hücrelerinin hem doğal hem de edinsel bağışıklık yanıtlarının birçok basamağında efektör hücreler olarak görev aldıkları görülmüştür. Bizde çalışmamızda mast hücre stabilizatörü olan ketotifenin etkinliğini dienogest, danazol ve kontrol grupları ile karşılaştırdık. Ketotifenin endometriotik implant hacimlerinde azalmada dienogest ve danazol kadar etkin olduğunu gözledik. Mast hücre yoğunluklarında kontrol ve Isolyte-S gruplarına oranla anlamlı azalma olduğunu ancak dienogest ve danazol gruplarında mast hücre yoğunluklarındaki azalmanın daha fazla olduğunu saptadık. Yine ketotifen grubunda stromal TNF- α seviyelerinde kontrol grubuna oranla anlamlı azalma sağladığını bulduk. Mevcut bulgular sonucunda ketotifenin endometriotik implantlar üzerinde tedavi edici etkinliği olduğunu ve endometriozis tedavisinde rutin kullanıma girmesinin uygun olacağını düşünmekteyiz. Ancak ketotifenin mevcut tedavi protokolleri içerisinde yer alması ve patofizyolojiye etkisinin tam olarak aydınlatılması konusunda daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu görüşündeyiz.

ÖZET

Deneyisel endometriozis modelinde ketotifen,dienogest ve danazol'un tedavi edici etkilerinin histolojik parametrelerle incelenmesi

Amaç: Endometriozis, hormonlara duyarlı endometrial dokunun, uterin kavite dışında lokalize olmasıyla karakterize kronik bir hastalıktır. Endometriozisdeki patofizyolojik temel hala net olarak açıklanamamıştır ancak patofizyolojisinde hücrel ve humoral immünitenin büyük rolü olduğu düşünülmektedir.

Günümüzde mast hücrelerinin hem doğal hem de edinsel bağışıklık yanıtlarının birçok basamağında efektör hücreler olarak görev aldıkları görülmüştür. Çalışmamızda mast hücre stabiliztörü olan ketotifen'in tedavi etkinliği olup olmadığı ve endometriozis tedavisinde kullanılan dienogest ve danazol 'un etkinlikleri ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve metod: Sıçanlar üzerinde deneyisel endometriozis modeli oluşturuldu. Her grupta 8 sıçan olacak şekilde ketotifen, dienogest , danazol , isolyte-s ve kontrol grupları olmak üzere 5 gruba ayrıldı. Ketotifen 1mg/kg ,dienogest 0.3mg/kg ve danazol 100 mg/kg isolyte-s 1ml/kg 28 gün boyunca oral yoldan uygulandı. Medikasyon periyodu sonunda relaparotomi yapılarak endometriotik implantlar hacimleri ölçüldü, ardından eksize edildi ve batın sitolojisi alındı. Batın sıvısında TNF- α düzeyleri ölçüldü. Eksize edilen implantlarda Ki-67, triptaz , TNF- α düzeyleri ve mast hücre yoğunlukları incelendi.

Bulgular: medikasyon öncesi ortalama implant hacimleri grup arasında benzerdi. Medikasyon sonrası ketotifen grubunda $26,1 \pm 4,03$, dienogest grubunda $22,51 \pm 4,53$, danazol grubunda $21,46 \pm 6,40$ isolyte-s grubunda $57,55 \pm 25,48$ ve kontrol grubunda $62,35 \pm 23,04$ ölçüldü. Mast hücrelerinin boyanması amacı için yapılan boyama sonrasında grup 1 ketotifen, grup 2 dienogest ve grup 3 danazol gruplarında mast hücre varlığının grup 4 isolyte-

S ve grup 5 kontrol gruplarına göre daha az olduğu gözlemlendi. Tedavi gruplarından grup 2 dienogest ve grup 3 danazol gruplarında mast hücre varlığının grup 1 ketotifen grubuna oranla daha az olduğu saptandı. İmmunoreaktivite analizi sonrasında Ki-67 immunoreaktivitesinin tüm grup epitel ve stromalarında gözlenen immunoreaktivitelerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlemlendi. Grup 5 kontrol grubunda epitelde gözlenen zayıf triptaz immunoreaktivitesinin grup 3 danazol ve grup 4 isolyte-s gruplarına oranla istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı. TNF α immunoreaktivitesinin gruplar arası istatistiksel olarak değerlendirilmesi sonrasında grup 1 ketotifen grubundaki stromal TNF α immunoreaktivitesinin grup 2 dienogest, grup 3 danazol, grup 4 isolyte-s ve grup 5 kontrol gruplarına oranla istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü.

Sonuç: ketotifen grubunda endometriotik implant hacimlerinde azalmanın dienogest ve danazole benzer etkinlikte olduğu görüldü. Yine ketotifen grubunda mast hücre yoğunluklarında ve stromal TNF α seviyelerinde azalma olduğu görüldü. Mevcut bulgular ketotifenin endometriozis tedavisinde kullanılabilecek bir molekül olduğunu düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: endometriozis ,ketotifen, danazol, dienogest, mast hücresi

SUMMARY

Investigation of the therapeutic effects of ketotifen, dienogest and danazol in experimental endometriosis model with histological parameters

Aim: Endometriosis is a chronic disease characterized by the localization of hormone-sensitive endometrial tissue outside the uterine cavity. The pathophysiological basis in endometriosis is still unclear. However, cellular and humoral immunity is thought to play a major role in the pathophysiology. Today, mast cells have been shown to act as effector cells in many stages of both natural and acquired immune responses. In this study, we aimed to compare the efficacy of ketotifen, a mast cell stabilizer, and to compare the efficacy of dienogest and danazol used in the treatment of endometriosis.

Materials and methods: Experimental endometriosis model was created on rats. Ketotifen, dienogest, danazol, isolyte-s and control groups were divided into 5 groups with 8 rats in each group. Ketotifen 1 mg / kg, dienogest 0.3mg / kg and danazol 100 mg / kg isolyte-s 1ml were administered orally for 28 days. Endometriotic implants were measured by relaparotomy at the end of the medical period, then excised and abdominal cytology was obtained. TNF- α levels were measured in abdominal fluid. Ki-67, tryptase, TNF- α levels and mast cell densities were examined in the excised implants.

Findings: The mean implant volumes before medication were similar between the groups. 26.1 ± 4.03 in the ketotifen group, 22.51 ± 4.53 in the dienogest group, 21.46 ± 6.40 in the danazol group, 57.55 ± 25.48 in the isolyte-s group and 62.35 ± 23.04 in the control group were measured. After staining for the purpose of staining of mast cells, the presence of mast cells was lower in group 1 ketotifen, group 2 diogenest and group 3 danazol than in group 4 isolyte-S and group 5 control groups. The presence of mast cells in diogenest group 2 and danazol group 3 were found to be less than those

of group 1 ketotifen. . Immunoreactivity analysis revealed that Ki-67 immunoreactivity was not statistically significant in all group epithelium and stroma. In group 5 control group, weak tryptase immunoreactivity observed in epithelium was statistically significant compared to group 3 danazol and group 4 isolyte-s groups. After the TNF α immunoreactivity was evaluated statistically, the stromal TNF α immunoreactivity in group 1 ketotifen group was statistically significant compared to group 2 dienogest, group 3 danazol, group 4 isolyte-s and group 5 control groups.

Result: In the ketotifen group, the decrease in endometriotic implant volume was similar to dienogest and danazole. Again in the ketotifen group, mast cell densities and stromal TNF α levels were decreased. Current findings suggest that ketotifen is a molecule that can be used in the treatment of endometriosis.

Key Words: endometriosis, ketotifen, danazol, dienogest, mast cell

KAYNAKLAR

- 1 Milingos S, Protopapas A, Drakakis P, Liapi A, Loutradis D, Kallipolitis G, Milingos D, Michalas S. Laparoscopic management of patients with endometriosis and chronic pelvic pain. Ann N Y Acad Sci 2003; 997:269– 273
- 2 Zhu X, Hamilton KD, McNicol ED. Acupuncture for pain in endometriosis. Sao Paulo Med J. 2013;131(6):439
- 3 Hugo Maia Jr,Clarice Haddad, Julio Casoy, Combining oral contraceptives with a natural nuclear factor-kappa B inhibitor for the treatment of endometriosisrelated pain. Int J Womens Health. 2013 Dec 21;6:35-9
- 4 Houston DE, Noller K, Melton LJ and Selwyn BJ. The epidemiology of pelvic endometriosis. Clinical Obstetrics and Gynecology. 1988; 31(4): 787- 800.
- 5 Missmer SA and Cramer DW. The epidemiology of endometrioisis. Obstet Gynecol Clin North AM. 2003; 30(1): 1- 19.
- 6 Dennis Kirchhoff, Stefan Kaulfuss, Ulrike Fuhrmann, Marcus Maurer & Thomas M Zollner (2012) Mast cells in endometriosis: guilty or innocent bystanders?, Expert Opinion on Therapeutic Targets, 16:3, 237-241
- 7 <https://cameochemicals.noaa.gov/chemical/20556>
CAMEO Chemical Reactivity Classification
<https://cameochemicals.noaa.gov/browse/react>
- 8 Mariuzzi L, Domenis R, Orsaria M, Marzinotto S: Functional expression of aryl hydrocarbon receptor on mast cells populating human endometriotic tissues. Lab Invest. 2016 Sep;96(9):959-971.

- 9 Schindler AE: Dienogest in long-term treatment of endometriosis. *Int J Womens Health*. 2011;3:175-84.
- 10 Floyd WS Danazol: endocrine and endometrial effects. *Int J Fertil*. 1980;25(1):75-80.
- 11 Dmowski WP: Danazol. A synthetic steroid with diverse biologic effects. *J Reprod Med*. 1990 Jan;35(1 Suppl):69-74; discussion 74-5.
- 12 Comiter CV. Endometriosis of the urinary tract. *Urol Clin North Am*. 2002 Aug;29(3):625-35.
- 13 Giudice LC , Kao LC. Endometriosis. *Lancet*. 2004 Nov 13-19;364(9447):1789-99.
- 14 Kennedy S, Bergqvist A, Chapron C, D'Hooghe T, ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Hum Reprod*. 2005 Oct;20(10):2698-704.
- 15 Marchino GL, Gennarelli G, Enria R, Bongioanni F, Lipari G, Massobrio M. Diagnosis of pelvic endometriosis with use of macroscopic versus histologic findings. *Fertil Steril*. 2005 Jul;84(1):12-5.
- 16 Eskenazi B, Warner ML. Epidemiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 1997 Jun;24(2):235-58.
- 17 Mahmood TA, Templeton A. Prevalence and genesis of endometriosis. *Hum Reprod*. 1991 Apr;6(4):544-9.
- 18 Wheeler JM Epidemiology of endometriosis-associated infertility, *J Reprod Med* 34:41, 1989.

- 19 Simpson JL, Elias S, Malinak LR, et al. Heritable aspects of endometriosis. Genetics studies. Am J Obstet Gynecol 1980;137:327-331.
- 20 Liu DTY, Hitchcock A, Endometriosis: its association with retrograde menstruation, dysmenorrhea, and tubal pathology, Br J Obstet Gynaecol 93:859, 1986.
- 21 Olive DL, Henderson DY, Endometriosis and müllerian anomalies, Obstet Gynecol 69:412, 1987
- 22 Witz CA, Monotoya-Rodriguez IA, Schenken RS, Whole explants of peritoneum and endometrium: a novel model of the early endometriosis lesion, Fertil Steril 71:56, 1999
- 23 Treloar SA, O'Connor DT, O'Connor VM, et al. Genetic influences on endometriosis in an Australian twin sample. Fertil Steril 1999;71:701-710.
- 24 Hadfield RM, Mardon HJ, Barlow DH, et al. Endometriosis in monozygotic twins. Fertil Steril 1997;68:941-94
- 25 Simpson JL, Malinak LR, Elias S, et al. HLA associations in endometriosis. Am J Obstet Gynecol 1984; 148:395-397.
- 26 Pinsonneault O, Goldstein DP. Obstructing malformations of the uterus and vagina. Fertil Steril 1985;44:241-247.
- 27 D'Hooghe TM, Bambra CS, Suleman MA, et al. Development of a model of retrograde menstruation in baboons (Papio anubis). Fertil Steril 1994;62:635-638.

- 28 Suginami H, A reappraisal of the coelomic metaplasia theory by reviewing endometriosis occurring in unusual sites and instances, *Am J Obstet Gynecol* 165:214, 1991.
- 29 Schiffrin BS, Erez S, Moore JG, Teen-age endometriosis, *Am J Obstet Gynecol* 116:973, 1973.,
- 30 Gruenwald P, Origin of endometriosis from the mesenchyme of the coelomic walls, *Am J Obstet Gynecol* 44:470, 1942.
- 31 Berek J. S. ,Berek& Novak Jinekoloji, Nobel Tıp Kitabevleri 14.Baskı 2007, 29:1137-1183
- 32 Mitchell AO , Hoffman AP, Swartz SE, Ghosh BC. An unusual occurrence of endometriosis in the right groin: a case report and review of the literature. *Mil Med.* 1991 Nov;156(11):633-4.
- 33 Moore JG, Binstock MA, Growdon WA. The clinical implications of retroperitoneal endometriosis.*Am J Obstet Gynecol.* 1988 Jun;158 (6 Pt 1):1291-8.
- 34 Vinatier D, Orazi G, Cosson M, Dufour P. Theories of endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2001 May;96 (1):21-34
- 35 Gurates B, Bulun SE. Endometriosis: the ultimate hormonal disease. *Semin Reprod Med.* 2003 May;21(2):125-34.
- 36 Kitawaki J, Noguchi T, Amatsu T, Maeda K, Tsukamoto K, Yamamoto T, Fushiki S, Osawa Y, Honjo H. Expression of aromatase cytochrome P450 protein and messenger ribonucleic acid in human endometriotic and adenomyotic tissues but not in normal endometrium. *Biol Reprod.* 1997 Sep;57(3):514-9.

- 37 Satyaswaroop PG, Wartell DJ, Mortel R. Distribution of progesterone receptor, estradiol dehydrogenase, and 20 alpha-dihydroprogesterone dehydrogenase activities in human endometrial glands and stroma: progestin induction of steroid dehydrogenase activities in vitro is restricted to the glandular epithelium. *Endocrinology*. 1982 Sep;111(3):743-9.
- 38 D'Hooghe TM, Pudney J, Hill JA. Immunobiology of the reproductive tract in a female baboon. *Am J Primatol*. 2001 Jan;53(1):47-54.
- 39 Dmowski WP, Steele RW, Baker GF. Deficient cellular immunity in endometriosis. *Am J Obstet Gynecol*. 1981 Oct 15;141(4):377-83.
- 40 Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium. Oosterlynck DJ, Cornillie FJ, Waer M, Vandeputte M, Koninckx PR. *Fertil Steril*. 1991 Jul;56(1):45-51.
- 41 Steele RW, Dmowski WP, Marmer DJ. Immunologic aspects of human endometriosis. *Am J Reprod Immunol*. 1984 Jul-Aug;6(1):33-6.
- 42 Gleicher N, Dmowski WP, Siegel I, Liu TL, Friberg J, Radwanska E, Toder V. Lymphocyte subsets in endometriosis. *Obstet Gynecol*. 1984 Apr;63(4):463-6.
- 43 Tseng JF, Ryan IP, Milam TD, Murai JT, Schriock ED, Landers DV, Taylor RN. Interleukin-6 secretion in vitro is up-regulated in ectopic and eutopic endometrial stromal cells from women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996 Mar;81(3):1118-22.
- 44 Mori H, Sawairi M, Nakagawa M, Itoh N, Wada K, Tamaya T. Peritoneal fluid interleukin-1 beta and tumor necrosis factor in patients with benign gynecologic disease. *Am J Reprod Immunol*. 1991 Sep;26(2):62-7.

- 45 Arici A, Tazuke SI, Attar E, Kliman HJ, Olive DL. Interleukin-8 concentration in peritoneal fluid of patients with endometriosis and modulation of interleukin-8 expression in human mesothelial cells. *Mol Hum Reprod*. 1996 Jan;2(1):40-5.
- 46 Arici A, Oral E, Attar E, Tazuke SI, Olive DL. Monocyte chemotactic protein-1 concentration in peritoneal fluid of women with endometriosis and its modulation of expression in mesothelial cells. *Fertil Steril*. 1997 Jun;67(6):1065-72.
- 47 Khorram O, Taylor RN, Ryan IP, Schall TJ, Landers DV. Peritoneal fluid concentrations of the cytokine RANTES correlate with the severity of endometriosis. *Am J Obstet Gynecol*. 1993 Dec;169(6):1545-9
- 48 Mariuzzi L, Domenis R, Orsaria M, Marzinotto S, Londero AP, Bulfoni M, Candotti V, Zanello A, Ballico M, Mimmi MC, Calcagno A, Marchesoni D, Di Loreto C, Beltrami AP, Cesselli D, Gri G. Functional expression of aryl hydrocarbon receptor on mast cells populating human endometriotic tissues. *Lab Invest*. 2016 Sep;96(9):959-971.
- 49 Bischoff F, Simpson L. J. Genetics of endometriosis: heritability and candidate genes. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology* Vol. 18, No. 2, pp. 219–232, 2004
- 50 Treloar SA, Wicks J, Nyholt DR, Montgomery GW, Bahlo M, Smith V, Dawson G, Mackay IJ, Weeks DE, Bennett ST, Carey A, Ewen-White KR, Duffy DL, O'connor DT, Barlow DH, Martin NG, Kennedy SH. Genomewide linkage study in 1,176 affected sister pair families identifies a significant susceptibility locus for endometriosis on chromosome 10q26. *Am J Hum Genet*. 2005 Sep;77(3):365-76. Epub 2005 Jul 21.

- 51 Daftary GS, Taylor HS. EMX2 gene expression in the female reproductive tract and aberrant expression in the endometrium of patients with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 May;89(5):2390-6.
- 52 Bischoff F, Simpson JL. Genetics of endometriosis: heritability and candidate genes. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2004 Apr;18(2):219-32. Review.
- 53 Jiang X, Hitchcock A, Bryan EJ, Watson RH, Englefield P, Thomas EJ, Campbell IG. Microsatellite analysis of endometriosis reveals loss of heterozygosity at candidate ovarian tumor suppressor gene loci. *Cancer Res.* 1996 Aug 1;56(15):3534-9.
- 54 Goumenou AG, Arvanitis DA, Matalliotakis IM, Koumantakis EE, Spandidos DA. Microsatellite DNA assays reveal an allelic imbalance in p16(Ink4), GALT, p53, and APOA2 loci in patients with endometriosis. *Fertil Steril.* 2001 Jan;75(1):160-5.
- 55 Environmental dioxins and endometriosis. Rier S, Foster WG. *Semin Reprod Med.* 2003 May;21(2):145-54. Review.
- 56 Igarashi T, Osuga U, Tsutsumi O, Momoeda M, Ando K, Matsumi H, Takai Y, Okagaki R, Hiroi H, Fujiwara O, Yano T, Taketani Y. *Endocr J.* Expression of Ah receptor and dioxin-related genes in human uterine endometrium in women with or without endometriosis. 1999 Dec;46(6):765-72.
- 57 Endometriosis: pathogenesis, diagnosis, therapy and association with cancer (review). Baldi A, Campioni M, Signorile PG. *Oncol Rep.* 2008 Apr;19(4):843-6. Review.

- 58 American fertility society classification of endometriosis . fertil steril 1979;32:633-634.
- 59 American society for reproductive medicine .revised american societyfor reproductive medicine classification of endometriosis.am soc reprod med 1997;5:817-821
- 60 Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology 51 (2018) 25e33 endometriois and infertility: insights into the casual link and magament strategies.carla tomasetti ,Thomas d'hooge.
- 61 Mathias SD, Kuppermann M, Liberman RF, Lipschutz RC, Steege JF.Chronic pelvic pain: prevalence, health-related quality of life, and economic correlates.Obstet Gynecol. 1996 Mar;87(3):321-7.
- 62 Anaf V, Simon P, El Nakadi I, Fayt I, Buxant F, Simonart T, PenyMO, Noel JC, Relationship between endometriotic foci and nerves in rectovaginal endometriotic nodules, Hum Reprod 15:1744, 2000.
- 63 Riley JL, 3rd, Robinson ME, Wise EA, Price DD, A meta-analytic review of pain perception across the menstrual cycle, Pain 81:225, 1999.
- 64 Endoemtriosis and pelvic pain : relation to disease stage and localization . vercellini p,cortesii et al. Fertil steril 1996;65: 299-304.
- 65 Vercellini P, fedele L , aimi G et all. Associtation between endometriosis stage ,lesion type ,patient characterics and severity of pelvic pain symptoms : a multivariate analysis of over 1000 patients . hum. Reprod 2007: 22:206-271.

- 66 Endometriosis- associated infertility: aspects of pathophysiological mechanisms and treatment options. Tambo T. Acta obstetri gynecol scand 2017;(96)6 :659-67.
- 67 De ziegler d. Borghese B. Cahpron C. Endometriosis and infetility: pathophysiology and management. Lancet 2010;376(9742):730-8.
- 68 D'hooghe TM, debrock s, hill JA , et al: endomteriosis and subfertility is the relationship resolved? Semin reprod med 21:243,2003 .
- 69 Benaglia L, Somigliana E, Vercellini P, Abbiati A, Ragni G, Fedele L Endometriotic ovarian cysts negatively affect the rate of spontaneous ovulation.Hum Reprod. 2009 Sep;24(9):2183-6. doi: 10.1093/humrep/dep202. Epub 2009 Jun 5.
- 70 Endometriosis-associated infertility.Haney AF. Baillieres Clin Obstet Gynaecol. 1993 Dec;7(4):791-812. Review.
- 71 Stenosis of the external cervical os: an association with endometriosis in women with chronic pelvic pain. Barbieri RL¹. Fertil Steril. 1998 Sep;70(3):571-3.
- 72 Fauconnier A, Chapron C, Dubuisson JB, Vieira M, Dousset B, Breart G, Relation between pain symptoms and the anatomic location of deep infi ltrating endometriosis, Fertil Steril 78:719, 2002.
- 73 Propst AM, Storti K, Barbieri RL. Lateral cervical displacement is associated with endometriosis. Fertil Steril. 1998 Sep;70(3):568-70.
- 74 Chapron C, Dubuisson JB, Pansini V, Vieira M, Fauconnier A, Barakat H, Dousset B. Routine clinical examination is not sufficient for diagnosing and locating deeply infiltrating endometriosis. J Am Assoc Gynecol Laparosc. 2002 May;9(2):115-9.

- 75 Barbieri RL, Niloff JM, Bast Jr RC, Schaetzel E, Kistner RW, Knapp RC, Elevated serum concentrations of CA-125 in patients with advanced endometriosis, *Fertil Steril* 45:630, 1986.
- 76 Bast RC Jr, Klug TL, St John E, Jenison E, Niloff JM, Lazarus H, Berkowitz RS, Leavitt T, Griffiths CT, Parker L, Zurawski VR Jr, Knapp RC. A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer . *N Engl J Med.* 1983 Oct 13;309(15):883-7.
- 77 Pittaway DE, Fayed JA, Serum CA-125 antigen levels increase during menses, *Am J Obstet Gynecol* 156:75, 1987.
- 78 Mol BW, Bayram N, Lijmer JG, Wiegerinck MA, Bongers MY, van der Veen F, Bossuyt PM, The performance of CA-125 measurement in the detection of endometriosis: a meta-analysis, *Fertil Steril* 70:1101, 1998.
- 79 Hornstein MD, Thomas PP, Gleason RE, Barbieri RL. Menstrual cyclicity of CA-125 in patients with endometriosis. *Fertil Steril.* 1992 Aug;58(2):279-83.
- 80 Pittaway DE, Fayed JA, The use of CA-125 in the diagnosis and management of endometriosis, *Fertil Steril* 46:790, 1986.
- 81 Pittaway DE. The use of serial CA 125 concentrations to monitor endometriosis in infertile women. *Am J Obstet Gynecol.* 1990 Sep;163(3):1032-5; discussion 1035-7.
- 82 Kauppila A, Telimaa S, Rönnerberg L, Vuori J. Placebo-controlled study on serum concentrations of CA-125 before and after treatment of

endometriosis with danazol or high-dose medroxyprogesterone acetate alone or after surgery. *Fertil Steril*. 1988 Jan;49(1):37-41.

- 83 Franssen AM, van der Heijden PF, Thomas CM, Doesburg WH, Willemsen WN, Rolland R. On the origin and significance of serum CA-125 concentrations in 97 patients with endometriosis before, during, and after buserelin acetate, nafarelin, or danazol. *Fertil Steril*. 1992 May;57(5):974-9.
- 84 Dawood MY, Khan-Dawood FS, Ramos J. Plasma and peritoneal fluid levels of CA 125 in women with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol*. 1988 Dec;159(6):1526-31.
- 85 Tseng JF, Ryan IP, Milam TD, Murai JT, Schriock ED, Landers DV, Taylor RN, Interleukin-6 secretion in vitro is up-regulated in ectopic and eutopic endometrial stromal cells from women with endometriosis, *J Clin Endocrinol Metab* 81:1118, 1996.
- 86 Moore J, Copley S, Morris J, Lindsell D, Golding S, Kennedy S. A systematic review of the accuracy of ultrasound in the diagnosis of endometriosis. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2002 Dec;20(6):630-4.
- 87 Vitale I, Malagó R, Zamboni G, Procacci C. Pelvic endometriosis: US and MRI features. Carbognin G¹, Guarise A, Minelli L, *Abdom Imaging*. 2004 Sep-Oct;29(5):609-18. Epub 2004 May 27.
- 88 Bazot M, Malzy P, Cortez A, Roseau G, Amouyal P, Darai E, Accuracy of transvaginal sonography and rectal endoscopic sonography in the diagnosis of deep infiltrating endometriosis, *Ultrasound Obstet Gynecol* 30:994, 2007.
- 89 Bazot M, Lafont C, Rouzier R, Roseau G, Thomassin-Naggara I, Darai E, Diagnostic accuracy of physical examination, transvaginal

sonography, rectal endoscopic sonography, and magnetic resonance imaging to diagnose deep infiltrating endometriosis, *Fertil Steril* 92:1825, 2009.

- 90 Kinkel K, Chapron C, Balleyguier C, Fritel X, Dubuisson JB, Moreau JF. Magnetic resonance imaging characteristics of deep endometriosis. *Hum Reprod.* 1999 Apr;14(4):1080-6.
- 91 Stratton P, Winkel C, Premkumar A, Chow C, Wilson J, Hearnstokes R, Heo S, Merino M, Nieman LK, Diagnostic accuracy of laparoscopy, magnetic resonance imaging, and histopathologic examination for the detection of endometriosis, *Fertil Steril* 79:1078, 2003.
- 92 Schorge J. ,Williams Jinekoloji, Nobel Tıp Kitabevleri 2015, 10:290-291
- 93 Berek and novak jinekoloji , Nobel Tıp Kitabevleri 2017,17:516-517.
- 94 Koninckx PR, Oosterlynck D, D'Hooghe T, Meuleman C. Deeply infiltrating endometriosis is a disease whereas mild endometriosis could be considered a non-disease. *Ann N Y Acad Sci.* 1994 Sep 30;734:333-41. Review.
- 95 Marchino GL, Gennarelli G, Enria R, Bongioanni F, Lipari G, Massobrio M. Diagnosis of pelvic endometriosis with use of macroscopic versus histologic findings. *Fertil Steril.* 2005 Jul;84(1):12-5.
- 96 Walter AJ, Hentz JG, Magtibay PM, Cornella JL, Magrina JF. Endometriosis: correlation between histologic and visual findings at laparoscopy. *Am J Obstet Gynecol.* 2001 Jun;184(7):1407-11; discussion 1411-3.

- 97 Kennedy S, Bergqvist A, Chapron C, et al. On behalf of the ESHRE special interest group for endometriosis and endometrium guideline development group . ESHRE guideline for diagnosis and treatment of endometriosis . hum reprod 2005 ;20:2698-2704.
- 98 Allen c , Hopewell s, Prentice a et al. Nonsteroidal antiinflammatory drugs for pain in women with endometriosis . cochrane database syst rev 2009;2
- 99 Prostaglandin biosynthesis inhibitors and endometriosis. Kauppila A, Puolakka J, Ylikorkala O. Prostaglandins. 1979 Oct;18(4):655-61.
- 100 Tokushige N, Markham R, Russell P, Fraser IS. Effect of progestogens and combined oral contraceptives on nerve fibers in peritoneal endometriosis. Fertil Steril. 2009 Oct;92(4):1234-9
- 101 Kistner RW . the treatment of endometriosis of by inducing pseudo-pregnancy with ovarian hormones : a report of fifty –eight cases. Fertil steril 1959 ;10:539-556.
- 102 Gallo MF, Nanda K, Grimes DA, Schulz KF. 20 mcg versus >20 mcg estrogen combined oral contraceptives for contraception. Cochrane Database Syst Rev. 2005 Apr 18;(2):CD003989. Review. Update in: Cochrane Database Syst Rev. 2008;(4):CD003989.
- 103 31. Berek J. S. ,Berek& Novak Jinekoloji, Nobel Tıp Kitabevleri nisan 2007, 17: 534-535.
- 104 Tokushige N, Markham R, Russell P, Fraser IS. Effect of progestogens and combined oral contraceptives on nerve fibers in peritoneal endometriosis. Fertil Steril. 2009 Oct;92(4):1234-9.

- 105 31. Berek J. S. ,Berek& Novak Jinekoloji, Nobel Tıp Kitabevleri nisan 2007, 17: 535-537
- 106 Sitruk-Ware R. New progestagens for contraceptive use.Hum Reprod Update. 2006 Mar-Apr;12(2):169-78. Epub 2005 Nov 16.
- 107 Shimizu Y, Takeuchi T, Mita S, Mizuguchi K, Kiyono T, Inoue M, Kyo S. Dienogest, a synthetic progestin, inhibits the proliferation of immortalized human endometrial epithelial cells with suppression of cyclin D1 gene expression. Mol Hum Reprod. 2009 Oct;15(10):693-701.
- 108 Vercellini P, Fedele L, Pietropaolo G, Frontino G, Somigliana E, Crosignani PG.Progestogens for endometriosis: forward to the past. Hum Reprod Update. 2003 Jul-Aug;9(4):387-96. Review.
- 109 Katsuki Y, Takano Y, Futamura Y, Shibutani Y, Aoki D, Udagawa Y, Nozawa S. Effects of dienogest, a synthetic steroid, on experimental endometriosis in rats. Eur J Endocrinol. 1998 Feb;138(2):216-26.
- 110 Strowitzki T, Faustmann T, Gerlinger C, Seitz C. Dienogest in the treatment of endometriosis-associated pelvic pain: a 12-week, randomized, double-blind, placebo-controlled study.Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2010 Aug;151(2):193-8.
- 111 Viganò P, Somigliana E, Vercellini P. Levonorgestrel-releasing intrauterine system for the treatment of endometriosis: biological and clinical evidence. Womens Health (Lond). 2007 Mar;3(2):207-14.

- 112 Kettel LM, Murphy AA, Morales AJ, Ulmann A, Baulieu EE, Yen SS. Treatment of endometriosis with the antiprogestosterone mifepristone (RU486) Fertil Steril. 1996 Jan;65(1):23-8.
- 113 Hill JA, Barbieri RL , Andersen DJ. Immunosuppressive effects of danazol in vitro. Fertil steril 1987 ;48:414-418.
- 114 Telimaa S. ,Puolakka J,Ronnberg L, et al: Placebo-controlled comparison of danazol and high dose ,medroxyprogesterone acetate in the treatment of endometriosis . Gynecol Endocrinol 1:13,1987.
- 115 Franssen AMHW, van der Heijden PFM, Thomas CMG, et al. On the origin and significance of serum CA 125 concentrations in 97 patients with endometriosis before ,during and after buserelin acetate ,nafarelin , or danazol . fertil steril 1992;57: 974 -979.
- 116 Bischof P., Galfetti MA , Seydoux J, et al. Perihelical CA 125 levels in patients with uterine fibroids . hum. Reprod 1992;7:35-38.
- 117 Ota H, Maki M, Shidara Y, et al. Effects of danazol at the immunologic level in patients with adenomyosis , with special reference to autoantibodies : a multicenter cooperative study .Am J Obstet Gynecol 1992; 167: 481-486.
- 118 Hill JA, Haimovici F, Politch JA , et al. Effects of soluble products of activated macrophages (lymphokines and monokines) on human sperm motion parameters. Fertil Steril. 1987;47: 460-465.
- 119 31. Berek J. S. ,Berek& Novak Jinekoloji, Nobel Tıp Kitabevleri nisan 2007, 17: 539.

- 120 Rabin D , McNeil LW : Pituitary and gonadal desensitization after continuous luteinizing hormone-releasing hormone infusion in normal females . J Clin Endocrinol Metab 51: 873,1980.
- 121 Sowers MR, Zheng H, Jannausch ML, McConnell D, Nan B, Harlow S, et al. Amount of bone loss in relation to time around the final menstrual period and follicle-stimulating hormone staging of the transmenopause. J Clin Endocrinol Metab 2010;95:2155–62.
- 122 Vercellini P, Crosignani PG, Fadini R, et al. A gonadotropin-releasing hormone agonist compared with expectant management after conservative surgery for symptomatic endometriosis. Br J Obstet Gynaecol 1999;106:672-677.
- 123 Franke HR, van de Weijere PHM, Pennings TMM, et al. Gonadotropin-releasing hormone agonist plus "add-back" hormone replacement therapy for treatment of endometriosis: a prospective randomized placebo-controlled double-blind trial. Fertil Steril 2000;74:535.
- 124 Yano S.Ikegami Y, Nakao K. Studies on the effect of the new non-steroidal aromatase inhibitor fadrazole hydroclorid in an endometriosis model in rats. Arzneimittelforschung 1996;46,192-195
- 125 Kudoh M, Susaki Y, Ideyama Y,et al; Inhibitory effects of a novel aromatase inhibitor, YM511, in rats with experimental endometriosis. J. Steroid Biochem Mol Biol 1997; 63:1-3
- 126 Schorge J. ,Williams Jinekoloji, Nobel Tıp Kitabevleri 2010, 10:225-243
- 127 Fedele L, Bianchi S, Bocciolone L, Di Nola G, Franchi D. Buserelin acetate in the treatment of pelvic pain associated with minimal and

mild endometriosis: a controlled study. *Fertil Steril*. 1993 Mar;59(3):516-21.

- 128 Candiani GB, Fedele L, Vercellini P, Bianchi S, Di Nola G. Presacral neurectomy for the treatment of pelvic pain associated with endometriosis: a controlled study. *Am J Obstet Gynecol*. 1992 Jul;167(1):100-3.
- 129 Sutton CJ, Ewen SP, Whitelaw N, Haines P. Prospective, randomized, double-blind, controlled trial of laser laparoscopy in the treatment of pelvic pain associated with minimal, mild, and moderate endometriosis. *Fertil Steril*. 1994 Oct;62(4):696-700.
- 130 Marcoux S, Maheux R, Bérubé S. Laparoscopic surgery in infertile women with minimal or mild endometriosis. Canadian Collaborative Group on Endometriosis. *N Engl J Med*. 1997 Jul 24;337(4):217-22.
- 131 Parazzini F. Ablation of lesions or no treatment in minimal-mild endometriosis in infertile women: a randomized trial. Gruppo Italiano per lo Studio dell'Endometriosi. *Hum Reprod*. 1999 May;14(5):1332-4.
- 132 Jacobson TZ, Duffy JM, Barlow D, Farquhar C, Koninckx PR, Olive D. Laparoscopic surgery for subfertility associated with endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010 Jan 20;(1):CD001398.
- 133 Kennedy S, Bergqvist A, Chapron C, D'Hooghe T, Dunselman G, Greb R, Hummelshoj L, Prentice A, Saridogan E; ESHRE Special Interest Group for Endometriosis and Endometrium Guideline Development Group. ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Hum Reprod*. 2005 Oct;20(10):2698-704. Epub 2005 Jun 24.

- 134 Chapron C, Fritel X, Dubuisson JB. Fertility after laparoscopic management of deep endometriosis infiltrating the uterosacral ligaments. *Hum Reprod*. 1999 Feb;14(2):329-32.
- 135 Beretta P, Franchi M, Ghezzi F, Busacca M, Zupi E, Bolis P. Randomized clinical trial of two laparoscopic treatments of endometriomas: cystectomy versus drainage and coagulation. *Fertil Steril*. 1998 Dec;70(6):1176-80.
- 136 Chapron C, Vercellini P, Barakat H, Vieira M, Dubuisson JB. Management of ovarian endometriomas. *Hum Reprod Update*. 2002 Nov-Dec;8(6):591-7. Review.
- 137 31. Berek J. S. ,Berek& Novak Jinekoloji, Nobel Tıp Kitabevleri nisan 2007, 17: 543
- 138 Mariuzzi L, Domenis R, Orsaria M, Marzinotto S, Londero AP, Bulfoni M, Candotti V, Zanello A, Ballico M, Mimmi MC, Calcagno A, Marchesoni D, Di Loreto C, Beltrami AP, Cesselli D, Gri G. Functional expression of aryl hydrocarbon receptor on mast cells populating human endometriotic tissues. *Lab Invest*. 2016 Sep;96(9):959-971. doi: 10.1038/labinvest.2016.74. Epub 2016 Jun 27.
- 139 D'Cruz OJ, Uckun FM. Targeting mast cells in endometriosis with janus kinase 3 inhibitor, JANEX-1. *Am J Reprod Immunol* 2007; 58:75–97.
- 140 Fischer OM, Kaufmann-Reiche U, Moeller C, Fuhrmann U. Effects of dienogest on surgically induced endometriosis in rats after repeated oral administration. *Gynecol Obstet Invest*. 2011;72(3):145-51.

- 141 Zhu LB, Lin KQ, Zhang XM, Lin J. Sodium cromoglycate attenuates experimental endometriosis in rats by regulating mast cells. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2015 May;44(3):278-84.
- 142 Zhu TH, Zou G, Ding SJ, Li TT, Zhu LB, Wang JZ, Yao YX, Zhang XM. Mast cell stabilizer ketotifen reduces hyperalgesia in a rodent model of surgically induced endometriosis. *J Pain Res*. 2019 Apr 29;12:1359-1369.
- 143 The Effects of Micronized Progesterone and Cabergoline On a Rat Autotransplantation Endometriosis Model: A Placebo Controlled Randomized Trial. Karslioglu T, Karasu AFG, Yildiz P. *J Invest Surg*. 2020 Jan 6:1-5.
- 144 Hayama M, Ota H, Toki T et al. Cell kinetic study of the endometrium by nonisotopic in situ hybridization for histone H3 messenger RNA and immunohistochemistry for Ki-67 and for estrogen and progesterone receptors. *The Anatomical Record* 2002; 266: 234-240
- 145 Matsumoto Y, Iwasaka T, Yamasaki F, Sugimori H. Apoptosis and Ki-67 expression in adenomyotic lesions and in the corresponding eutopic endometrium. *Obstet Gynecol* 1999; 94: 71-7
- 146 Ambros RA. Simple hyperplasia of the endometrium: an evaluation of proliferative activity by Ki-67 immunostaining. *Int J Gynecol Pathol* 2000; 19: 206-11.