T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

NORMAL İNSAN ENDOMETRİYUMU VE ENDOMETRİYOTİK DOKULARDA MONOSİT KEMOTAKTİK PROTEİN-2 VE TÜMÖR NEKROZ FAKTÖR ALFA DAĞILIMININ İMMÜNOHİSTOKİMYASAL OLARAK GÖSTERİLMESİ

TİİNÇE AKSAK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI
Prof. Dr. Sait POLAT

ADANA-2011

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

NORMAL İNSAN ENDOMETRİYUMU VE ENDOMETRİYOTİK DOKULARDA MONOSİT KEMOTAKTİK PROTEİN-2 VE TÜMÖR NEKROZ FAKTÖR ALFA DAĞILIMININ İMMÜNOHİSTOKİMYASAL OLARAK GÖSTERİLMESİ

TİİNÇE AKSAK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI
Prof. Dr. Sait POLAT

Bu tez Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TF2009YL22'nolu proje olarak desteklenmiştir.

ADANA-2011

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca her aşamada beni destekleyen, yol gösteren, tez konumun seçilmesi ve yazılması sırasında yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Sait Polat'a sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım. Tez çalışmalarım sırasında dokuların elde edilmesinde yardımlarını esirgemeyen, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Öğretim üyeleri, Sayın Prof. Dr.Turan Çetin'e ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Levent Toksöz'e, Işık mikroskopik ve immünohistokimyasal verilerimin değerlendirilmesine katkılarından dolayı, Patoloji Anabilim Dalı Öğretim üyesi, Sayın Doç. Dr. Derya Gümürdülü'ye, Işık mikroskopik fotograflarımın elde edilmesine destek olan Diş Hekimliği Fakültesi Öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Mehmet Kürkçü'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca Yüksek lisans eğitimin sırasında bana destek olan ve yardımlarını esirgemeyen Anabilim Dalımızın bütün Öğretim üyelerine, akademik ve idari personeline teşekkürlerimi sunarım.

Yaşamım boyunca her zaman yanımda olan, beni daima destekleyen ve bugünlere gelmemi sağlayan, canım annem, babam Perihan ve Yaşar Aksak'a sonsuz teşekkür ederim.

Tiinçe AKSAK

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY
TEŞEKKÜR iii
İÇİNDEKİLER iv
ŞEKİLLER ve TABLO DİZİNİ vi
SİMGELER VE KISALTMALAR vii
ÖZET ix
ABSTRACT xi
1.GİRİŞ 1
2.GENEL BİLGİLER 4
2.1.Endometriyum Histolojisi 4
2.2.Endometriyumun İnce Yapısı 8
2.2.1.Erken proliferatif faz 8
2.2.2.Orta proliferatif faz 9
2.2.3.Sekresyon fazı 9
2.2.3.1.Mikrovilluslu hücreler 9
2.2.3.2.Pinopodlu hücreler 10
2.2.3.3.Veziküllü hücreler 10
2.2.3.4.Silyalı hücreler 11
2.3.Endometriyozis 12
2.3.1.Endometriyozisin tanımı 12
2.3.2.Endometriyozis epidemiyolojisi 12
2.3.2.1.Prevalans 12
2.3.2.2.Risk faktörleri 13
2.3.3.Endometriyozis patogenezi 13
2.3.4.Endometriyozisin oluşum teorileri 14
2.3.4.1.İmplantasyon teorisi 14
2.3.4.2.İn-situ oluşum teorisi 15
2.3.4.3.İndüksiyon teorisi 15
2.3.4.4.Kombinasyon teorisi 15
2.3.5.Endometriyozisin evreleri 15
2.3.5.1.Mikroskobik endometriyozis 15
2.3.5.2.Erken aktif endometriyozis 15
2.3.5.3.İleri aktif endometriyozis 16
2.3.5.4.İyileşmiş endometriyozis 16
2.3.6.Ovaryan implantların morfolojisi 16
2.3.7.Ovaryan endometriyoma histolojisi 16
2.3.8.Endometriyotik dokuların ince yapı özellikleri 16
2.3.9.Endometriyozis ve infertilite ilişkisi 17
2.4.Sitokinler 17
2.4.1.Tümör Nekroz Faktör Alfa (TNF-α) 18
2.5.Kemokinler 20
2.5.1.Monosit Kemotaktik Protein 21
2.5.1.1.Monosit Kemotaktik Protein 2 (MCP-2) 21
2.6.İmmün Sistem ve Endometriyozis Arasındaki İlişki 21
2.7.Cluster of Differentiation 68 (CD68) 23

3.GEREÇ VE YÖNTEM 24
3.1.Hasta seçimi 24
3.2.Elektron mikroskobi yöntemleri 24
3.3.Işık mikroskobi yöntemleri 26
3.4.İmmünohistokimyasal yöntemler 26
4.BULGULAR 28
4.1.Histolojik bulgular 28
4.1.1.Kontrol endometriyum 28
4.1.2.Ötopik endometriyum 29
4.1.3.Ektopik endometriyum 29
4.2.İmmünohistokimyasal bulgular 30
4.2.1.Kontrol endometriyum 30
4.2.1.1.TNF-α 30
4.2.1.2.MCP-2 32
4.2.1.3.CD68 33
4.2.2.Ötopik endometriyum 33
4.2.2.1.TNF- α 33
4.2.2.2.MCP-2 34
4.2.2.3.CD68 36
4.2.3.Ektopik endometriyum 36
4.2.3.1.TNF-α 36
4.2.3.2.MCP-2 38
4.2.3.3.CD68 39
4.2.4.Negatif kontrol 40
4.2.5.Pozitif kontrol 41
4.2.5.1.TNF- α 41
4.2.5.2.MCP-2 42
4.2.5.3.CD68 43
4.3.Elektron mikroskobik bulgular 44
4.3.1.Kontrol endometriyum 44
4.3.2.Ötopik endometriyum 49
4.3.3.Ektopik endometriyum 53
5.TARTIŞMA 59
6.SONUÇLAR 66
7.KAYNAKLAR 68
8.ÖZGEÇMİŞ 72

ŞEKİLLER ve TABLO DİZİNİ

ŞEKİL 1: Kontrol endometriyumun ışık mikroskobik görünümü.
ŞEKİL 2: Ötopik endometriyumun ışık mikroskobik görünümü.
ŞEKİL 3: Ektopik endometriyumun ışık mikroskobik görünümü.
ŞEKİL 4: Kontrol endometriyumunda TNF-α immünreaktivitesi.
ŞEKİL 5: Kontrol endometriyumunda MCP-2 immünreaktivitesi.
ŞEKİL 6: Kontrol endometriyumunda CD68 immünreaktivitesi.
ŞEKİL 7: Ötopik endometriyumda TNF-α immünreaktivitesi.
ŞEKİL 8: Ötopik endometriyumda MCP-2 immünreaktivitesi.
ŞEKİL 9: Ötopik endometriyumda CD68 immünreaktivitesi.
ŞEKİL 10: Ektopik enddometriyumda TNF-α immünreaktivitesi.
ŞEKİL 11: Ektopik endometriyumda MCP-2 immünreaktivitesi.
ŞEKİL 12: Ektopik endometriyumda CD68 immünreaktivitesi.
ŞEKİL 13: TNF- α, MCP-2 ve CD68 için negatif kontrollerin görünümü.
ŞEKİL 14: TNF- α'nın pozitif kontrol görünümü.
ŞEKİL 15: MCP-2'nin pozitif kontrol görünümü.
ŞEKİL 16: CD68'in pozitif kontrol görünümü.
ŞEKİL 17: Kontrol endometriyumun elektron mikroskobik görünümü.
ŞEKİL 18: Kontrol endometriyumunun elektron mikroskobik görünümü.
ŞEKİL 19: Kontrol endometriyumunun elektron mikroskobik görünümü.
ŞEKİL 20: Ötopik endometriyumun elektron mikroskobik görünümü.
ŞEKİL 21: Ötopik endometriyumun elektron mikroskobik görünümü.
ŞEKİL 22: Ötopik endometriyumun elektron mikroskobik görünümü.
ŞEKİL 23: Ektopik endometriyumun elektron mikroskobik görünümü.
ŞEKİL 24: Ektopik endometriyumun elektron mikroskobik görünümü.
ŞEKİL 25: Ektopik endometriyumun elektron mikroskobik görünümü.
ŞEKİL 26: Ektopik endometriyumun elektron mikroskobik görünümü.
TABLO 1: Endometriyumda gruplar arasında TNF-α, MCP-2 ve CD68 İmmünreaktivitesi.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

TNF-α	Tümör Nekroz Faktör Alfa
TNF-β	Tümör Nekroz Faktör Beta
MCP-2	Monosit Kemotaktik Protein 2
CD68	Cluster of Differentiation
FSH	Follikül Stimüle Edici Hormon
hCG	İnsan Koryonik Gonadotropik Hormon
GER	Granüler Endoplazmik Retikülüm
SER	Düz Endoplazmik Retikülüm
ER	Endoplazmik Retikülüm
IL-3	İnterlökin-3
IL-5	İnterlökin-5
IL-6	İnterlökin-6
IL-7	İnterlökin-7
IL-8	İnterlökin-8
GM-SF	Granülosit-Monosit Stimüle Edici Faktör
TNFR1	Tümör Nekroz Faktör Reseptörü 1
TNFR2	Tümör Nekroz Faktör Reseptörü 2
sTNF	Çözünebilir TNF
LAMP	Lisosomal-Endosomal Associated Membrane Protein
NK	Natural Killer (Doğal öldürücü) Hücre
PBS	Fosfat Buffer Solüsyonu
IFN	Interferon
AEC	Aminoetilkarbozol

RANTES	Regulated Activation Normal T cell Expressed and Secreted
PGE, PGF	Prostoglandinler
HE	Hematoksilen-Eozin
µm	Mikrometre
ml	Mililitre

ÖZET

Normal insan endometriyumu ve endometriyotik dokularda monosit kemotaksik protein 2 ve tümör nekroz faktör alfa dağılımının immünohistokimyasal olarak gösterilmesi

Endometriyozis, endometriyal bezlerin ve stromanın uterus kavitesi dışında vücudun diğer doku ve organlarında yerleşmesiyle karakterize jinekolojik bir hastalıktır. Yaklaşık olarak üreme çağındaki kadınların %6-10'unu etkileyen bu hastalığın pelvik ağrı, dismenore ve infertilite gibi önemli sorunlara neden olduğu bilinmektedir. Endometriyozis günümüze kadar, üzerinde en çok araştırma yapılan hastalıklardan birisi olmasına rağmen patogenezi hala tam olarak aydınlatılmış değildir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, endometiyozis oluşumu ve enflamatuvar cevaplar ile olan ilişkisi üzerinde yoğunlaşmıştır. Endometriyozisli hastaların vücut sıvılarında immün sistem hücrelerinin sayılarında ve bu hücrelerin sekresyonları olan sitokin ve kemokinlerin miktarında önemli artışların meydana geldiği rapor edilmiştir. Sitokinler, hormon benzeri mediyatörler olup genellikle parakrin tarzda etki gösteren, immün yanıtın düzenlenmesinden sorumlu, kemotaksis, hücre çoğalması, hücre aktivasyonu, motilite, adezyon ve morfogenezde rol alan, protein veya glikoprotein yapısındaki maddelerdir. Tümör nekroz faktör alfa (TNF-α), makrofaj, monosit, nötrofil lökosit, T hücreleri ve natural killer hücreleri tarafından salgılanan proenflamatuvar bir sitokin olup ortamda kemokin miktarının artmasına neden olmaktadır. Monosit kemotaksik protein 2 (MCP-2), monositlerin enflamasyon alanında birikmelerini sağlayan bir kemokindir.

Bu çalışmada, insanda normal endometriyum ve endometriyotik dokuların ince yapı özellikleri ile TNF-α ve MCP-2'nin hücresel ekspresyonlarının immünohistokimyasal olarak araştırılması amaçlanmıştır.

Yaşları 20-41 arasında değişen, 21 kadından endometriyum ve endometriyotik doku örnekleri alındı. Ayrıca infertilite tedavisi amacıyla başvuru yapan, endometriyozise sahip olmayan, 5 kadından elde edilen endometriyum biyopsileri de kontrol amacıyla kullanıldı. Dokular uygun yöntemlerle

hazırlanarak ışık ve elektron mikroskopta incelendi. Endometriyotik dokularda TNF-α ve MCP-2 immünreaktivitesinin epitel hücrelerinde belirgin olarak artış gösterdiği bulundu. Ötopik endometriyumda da yüzey ve bez epitelinde TNF-α ve MCP-2 ekspresyonunun kontrol grubuna göre belirgin olarak arttığı tespit edildi. Bunların yanında, endometriyotik dokularda, makrofajların stromadaki sayılarının anlamlı olarak yükseldiği gösterildi. Ultrastrüktürel olarak proliferatif evrede yüzey ve bez epitelinde yalnızca mikrovilluslu ve silyalı hücrelerin bulunduğu gösterildi.

Sonuç olarak TNF-α ve MCP-2'nin normal endometriyum biyolojisi yanında, endometriyozis gelişimi ve patogenezinde rol alabilecekleri kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler; TNF-α, MCP-2, endometriozis, immünohistokimya, ultrastrüktür.

ABSTRACT

Expression of monocyte chemotactic protein 2 and tumor necrosis factor alpha in human normal endometrium and endometriotic tissues

Endometriosis is a gynocological disease characterized by the presence of the endometrial glands and stroma outside the uterine cavity. This disease affects %6-10 of women with reproductive age and it causes serious problems such as pelvic pain, dysmenorrhea and infertility. Although endometriosis is one of the most investigated disease of gynecology, its pathogenesis is not clear completely. In recent years, many studies revealed the inflammatory nature of endometriosis. Many of the immune cells and their secretory products cytokines and chemokines has been detected in body fluids of women with endometriosis. Cytokines are protein or glycoprotein in structures and hormon-like molecules that act generally in a paracrine fashion to regulate immun responses. They involved in chemotaxis, cell proliferation, cell activation, motility, adhesion and morphogenesis. Tumor necrosis factor alpha (TNF-α) is a proenflammatory cytokine secreted by the macrophages, monocytes, neutrophiles, T cells and natural killer cells. It stimulates increase in the level of the chemokines in body fluids. Monocyte chemotactic protein 2 (MCP-2) is a chemokine act to recruit and activate monocytes into sites of inflammation area. The aim of this study to investigate the ultrastructural properties and whether the expression and localization of TNF-α and MCP-2 in the eutopic and ectopic endometrium of women with endometriosis.

Eutopic endometrial and endometriotic tissue samples were obtained from the women with endometriosis range 20-41 years and normal endometrial tissues were collected from 5 women without endometriosis as a control group. Tissues were processed for light and electron microscopy and examined. The epithelial cells of endometriotic tissues were revealed strongly cytoplasmic TNF-α and MCP-2 immunreactivities. Eutopic endometrial tissues were also stained prominently for both TNF-α and MCP-2. Furthermore, a significant increase in stromal macrophages cells were observed in endometriotic tissues. Moreover,

the ultrastructural observations on the normal and ectopic endometrial tissues were exhibited microvilli-rich cells and ciliated cells.

These findings suggest that TNF-α and MCP-2 may be involved in normal endometrial biology and in the pathogenesis of endometriosis.

Keywords; TNF-α,MCP-2,endometriosis, immunohistochemistry, ultrastructure.

1. GİRİŞ

Endometriyum, üreme periyodu boyunca yapısal ve fonksiyonel değişim gösteren, insan vücudunun eşsiz bir parçasıdır. Endometriyumun hücresel kompozisyonu oldukça dinamiktir. Yapısı normal üreme siklusu sırasında hormonal değişime bağlı olarak farklılıklar göstermektedir. Endometriyum, yapısını oluşturan endometrial epitel, stromal hücreler ve kan damarlarının yanı sıra mononüklear çok sayıda infiltratif hücreler içermektedir. Bu hücrelerin sayıları ve dağılımları menstrüal siklus fazlarında değişiklik göstermektedir[1]. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda endometriyumun yapısal ve fonksiyonel özellikleri ayrıntılı olarak dökümante edilmiştir. Histolojik özellikleri yanında, endometriyumun ultrastrüktürel özellikleri de endometriyal siklus boyunca geniş olarak araştırılmıştır. Bütün bu gelişmelere parelel olarak endometriyumun gelişimi, yüzey epiteli ve bez epitelinin hücresel özellikleri, stroma oluşumu ve hücresel farklılaşma dinamiği geniş olarak çalışılmış, halen de temel ve klinik araştırmalara konu edilmektedir. Endometriyumun yapısal dinamiği ve hipotalamo-hipofiziyal-ovarian hormonlarla olan ilişkisi hala tam olarak aydınlatılmış değildir[2].

Endometriyozis, endometriyal bezlerin ve stromanın uterus kavitesi dışında vücudun diğer doku ve organlarında yerleşmesiyle karakterize jinekolojik bir hastalıktır[3,4]. Yaklaşık olarak üreme çağındaki kadınların %6-10'unu etkileyen bu hastalığın pelvik ağrı, dismenore ve infertilite gibi önemli sonunlara neden olduğu bilinmektedir[3-5].

Endometriyozis günümüze kadar, üzerinde en çok araştırma yapılan hastalıklardan birisi olmasına rağmen patogenezi hala tam olarak aydınlatılmış değildir. Endometriyozis oluşumunu açıklamak üzere birçok teori öne sürülmüşse de Sampson'ın önerdiği retrograd menstrüasyon teorisi en yaygın kabul edilen teori olarak güncelliğini korumaktadır. Hastalığın patogenezinde genetik, hormonal, immünolojik ve çevresel faktörlerin kombinasyonunun etkili olabileceği düşünülmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, endometiyozis oluşumu ve enflamatuvar cevaplar ile olan ilişkisi üzerinde yoğunlaşmıştır.

Gerçektende endometriyozisli kadınların vücut sıvılarında immün sistem hücrelerinin sayılarında ve bu hücrelerin sekresyonları olan bazı sitokin ve kemokinlerin miktarında önemli artışların meydana geldiği rapor edilmiştir. Bu nedenle peritoneal sıvıdaki bazı mediyatörlerin endometriyotik dokuların implantasyonu ve ilerlemesinden sorumlu olabilecekleri ileri sürülmektedir[3].

Sitokinler, hormon benzeri mediyatörler olup genellikle parakrin tarzda etki gösteren, immün yanıtın düzenlenmesinden sorumlu, kemotaksis, hücre çoğalması, hücre aktivasyonu, motilite, adezyon ve morfogenezde rol alan, protein veya glikoprotein yapısındaki maddelerdir. İmmün ve enflamatuvar olaylarda görev alan hücrelerin etkinliklerinin arttırılmasında sitokinlerin rolü önemlidir. Bu mediyatörler; makrofaj, aktif lenfositler ve diğer hücreler tarafından salgılanmaktadır. Sitokinlerin etkilerinin genellikle enfeksiyon başlangıcında daha da belirgin olduğu açığa çıkarılmıştır[6].

Kemokinler, son yıllarda üzerinde araştırmalar yapılan, yeni bir sitokin ailesi olup, 50 veya daha fazla üyesi bulunmaktadır. Bu maddeler, normal biyolojik ve patolojik süreçte düzenleyici olarak görev yapan mediyatörlerdir. Kemotaktik sitokinler olarak ta bilinen kemokinler oldukça küçük moleküllerdir. Bu maddelerin enflamasyonda ve enfeksiyonlara karşı cevapta lökositlerin dokulara yerleşimini kontrol ettikleri düşünülmektedir[7-10].

Tümör nekroz faktör alfa (TNF-α), TNF super ailesine ait bir sitokin olup, kaşeksin olarak da bilinenmektedir[11]. TNF-α'nın genellikle birden fazla etkisi olduğu yaygın olarak kabul edilmektedir[12]. TNF-α, aktif makrofajlar ile epitelyal hücreler, polimorfonüklear lökositler ve granüloza hücreleri gibi diğer birçok hücreden de salındığı rapor edilmiştir[13-15]. TNF-α'nın üreme siklusu sürecinde, overlerde, tuba uterinada, preimplante embriyoda ve endometriyumda varlığı çeşitli araştırmalarda gösterilmiştir[12,13,16-19].

Monosit kemotaktik protein (MCP), aktif monositlerin enflamasyon alanında toplanmasını sağlayan, önemli bir kemokindir[1]. Bu kemokinin, CCL1, CCL 2, CCL 7, CCL 8, CCL 11 ve CCL 13 gibi, genleri insan 17. kromozomunda bulunan, CCL24 ve CCL 26 gibi genleri insan 7. kromozomunda yer alan alt grupları vardır. Ayrıca insanda bulunmayan CCL12

tipine farede rastlanmaktadır[7]. Monosit kemotaktik protein 2 (MCP-2), monositlerin enflamasyon alanında birikmelerini ve aktivasyonlarını sağlamakta ve eozinofil lökositleri stimüle etmektedir. MCP-2, aynı zamanda bazofil lökositleri, mast hücrelerini ve natural killer (NK) hücrelerini de aktive etmektedir[20]. MCP-2'nin normal endometriyumda varlığı daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir[1]. Bununla birlikte MCP-2 ve endometriyozis ilişkisini immünohistokimyasal olark gösteren bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Kemokinlerin ortama salınması için ortamda TNF-α, gibi sitokinlerin varlığı gerekmektedir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda TNF-α ve MCP-2'nin endometriyum dokusundaki varlığı çeşitli yöntemlerle gösterilmiş olmakla birlikte, endometriyotik dokuda ve normal endometriyum dokusundaki varlıklarını ve hücre tiplerindeki dağılımlarını gösteren karşılaştırmalı, immünohistokimyasal bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ayrıca insanlarda bu dokuların karşılaştırmalı ince yapı özelliklerini içeren çok az sayıda çalışma bulunmaktadır.

Bu çalışmada, insanda normal endometriyum ve endometriyotik dokuların ince yapı özellikleri ile TNF-α ve MCP-2'nin hücresel ekspresyonlarının immünohistokimyasal olarak araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Endometriyum Histolojisi

Embriyolojik ve fötal gelişimin tamamlandığı dişi üreme sisteminin kalın duvarlı bölümü olan uterus üç tabakalı bir yapı sergilemektedir. Uterus; en dışta organı saran tipik seroza yapısında perimetriyum, ortada bandlar şeklinde düzenlenmiş düz kas liflerini içeren miyometriyum ve en içte mukoza tabakası olan endometriyum tabakalarından meydana gelmiştir. Endometriyum, organ lümenini döşeyen yüzey epiteli ve altında endometriyal stroma olarak da adlandırılan kalın bir lamina propriadan oluşmuştur. Endometriyumun üst 2/3'lük kısmı fonksiyonel tabaka, alt 1/3'lük kısmı ise bazal tabaka olarak adlandırılmaktadır[21].

Endometriyumun yüzey epiteli tek katlı prizmatik tipte olup, silyalı ve sekretuvar hücrelerden meydana gelmiştir. Endometriyal stroma; yıldız şekilli stromal hücreler ve liflerden zengin bağ dokusundan oluşmuştur. Stroma içerisinde miyometriyuma kadar uzanan tübüler tipte endometriyal bezler yer almaktadır. Bezler endometriyumun bazal tabakasında dallanmalar göstermektedir. Bez epiteli, yüzey epiteline benzemekle birlikte, epitelde silyalı hücrelerin sayıları azalmıştır. Endometriyal bezler, birbirlerinden endometriyal stroma ile ayrılmaktadır. Endometriyal stroma, hücresel yönden oldukça zengin olup, kollajen ve retiküler liflerin yanında, bol miktarda şekilsiz hücreler arası madde içermektedir. Stromal hücreler, uzun sitoplazmik uzantılar içeren, ovoid bir çekirdek ve belirgin bir çekirdekçiğe sahiptirler. Endometriyal stroma içerisinde, makrofajlar, granüler lökositler ve lenfositlere de rastlanmaktadır. Stroma içerisinde, endometriyal bezler ve kan damarları yerleşmektedir. Endometriyal stroma, bezlerin boyun kısımlarının yer aldığı 2/3 üst kısımda hücresel yönden daha zengindir. Bununla birlikte, bezlerin dallanmış son kısımlarının bulunduğu alt 1/3 kısımda stroma fibröz bağ dokudan oluşmuştur. Bazal tabaka, edometriyumun menstrüasyon sırasında dökülmeyen bazal kısmıdır ve endometriyum bazalis olarak da adlandırılmaktadır[21,22].

Endometriyumun üst 2/3 tabakası olan ve endometriyum fonksiyonalis olarak adlandırılan tabakası ise menstrüasyon sırasında dökülür. Menstrüal siklus boyunca endometriyumun fonksiyonel tabakasında birtakım siklik değişiklikler meydana gelmektedir.

Uterin arter, uterusun kas tabakası olan miyometriyumda sayıları 6-10 arasında değişen ve arkuat arterler olarak adlandırılan dallara ayrılır. Arkuat arterler, miyometriyumun stratum vaskülare tabakasında sirkümferensiyel olarak yerleşirler ve iki grup dala ayrılırlar. Bu dallardan bir kısmı miyometriyumun üst tabakasını beslerken, bir kısmı da, endometriyuma doğru uzanmaktadır. Endometriyuma uzanan ve radyal arter olarak adlandırılan arterler, endometriyum-miyometriyum kavşağında düz ve kıvrıntılı olmak üzere, iki segmente ayrılırlar. Düz segmentler, endometriyumun bazal tabakasını, spiral arterler olarak da bilinen kıvrıntılı arterler ise fonksiyonel tabakayı beslemektedirler. Spiral arterler, fonksiyonel tabakada arteriyollere dallanırlar. Daha sonra bu arteriyoller, yüzey epitelinin altında yerleşen çok sayıdaki kapiller damarları beslerler. Menstrüal siklus boyunca, düz arterler ve spiral arterlerin proksimal kısımlarında herhangi bir yapısal değişim gözlenmez. Buna karşın, spiral arterlerin distal kısımları östrojen ve progesteron hormonlarının etkisiyle dejenerasyona ve rejenerasyona uğrarlar. Yüzey epitelinin altında yer alan kapiller yataklarda, laküna adı verilen, ince duvarlı genişlemiş segmentler yer almaktadır. Benzer yapılar venöz sistemde de bulunur. Endometriyal venler, miyometriyumdaki geniş venlere drene olurlar. Endometriyumun yüzeyel tabakası hariç, uterusun tüm tabakalarında yaygın lenf damarları da bulunmaktadır. Bunların yanında, endometriyumda miyelinli ve miyelinsiz sinir liflerinden zengin bir sinir beslenmesi vardır. Miyelinli sinir lifleri mukoza tabakasına kadar uzanırlar ve yüzey epitelinin altında sinir pleksüsleri oluştururlar. Miyelinsiz sinir lifleri, kan damarları duvarlarında ve miyometriyumda bulunan düz kas liflerini inerve etmektedir[21].

Endometriyum, ovaryumun salgı aktivitesine bağlı olarak yapısal ve fonksiyonel değişiklikler göstermektedir. Hipofiz bezinden salgılanan hipofiziyal hormonların etkisiyle ovaryan siklus başlamaktadır. Siklus sırasında ovaryumda folliküller gelişmektedir. Follikül hücreleri tarafından üretilen ovaryan

hormonların etkisi ile endometriyumda siklik değişiklikler meydana gelmektedir. Endometriyumda meydana gelen bu yapısal ve fonksiyonel değişikliklerin tümü, menstrüal siklus veya endometriyal siklus olarak adlandırılmaktadır[22].

Hipofiz bezininden salgılanan follikül sitümüle edici hormon (FSH) gelişmekte olan folliküler hücrelerden östrojen hormonunun üretilmesini sağlar. Östrojen hormonu, endometriyumun proliferatif faza girmesine neden olur. Böylece uterusa doğru olan kan akımı artar. Endometriyum ödemli bir hal alır, hücrelerde hipertrofi gözlenir ve prolifere olurlar. Ayrıca hücrelerin metabolik aktivitelerinde anlamlı bir artış gözlenir. Proliferatif fazın sonlarına doğru hipofiz bezinde lüteinizan hormonun üretiminin artmasıyla ovulasyon gerçekleşir. Ovulasyondan hemen sonra oluşan korpus luteumdan östrojenin yanı sıra progesteron hormonu da salgılanmaya başlar. Progesteron endometriyumun sekretuvar faza girmesine neden olur[22].

Endometrial siklus 4 fazda incelenmektedir;

1.Menstrüal evre; Menstrüasyonun ilk günü menstrüal siklusun başlangıcı olarak kabul edilir. Yaklaşık 4-5 gün kadar süren bu kanama evresinde, endometriyumun fonksiyonel tabakası dökülmekte ve 35-40 gr kadar kan kaybı meydana gelmektedir.

2.Proliferatif evre; Menstrüal evreyi takiben başlayan bu evre yaklaşık 9 gün devam eder. Dolayısıyla proliferatif faz ovulasyondan 1 gün sonraya kadar sürmektedir. Ovaryumda folliküllerin olgunlaşmasıyla eş zamanlı gerçekleşen bu evrede, ovaryum folliküllerinde üretilen östrojenin etkisiyle endometriyum kalınlığı artmaktadır. Endometriyumda, epitel hücrelerinde ve stromal hücrelerde yüksek mitoz aktivitesi gözlenir. Bu fazda endometriyumun dökülmeyen bazal tabakasından fonksiyonel tabaka tekrar şekillenmeye başlar. Bazal tabakada bulunan bez epiteli hızla prolifere olur, bezlerin boyun kısımları ve yüzey epiteli yeniden şekillenir. Bu fazın sonunda, endometriyum yaklaşık 3 mm kalınlığa ulaşır. Bezler nispeten düz olup, dar bir lümene sahiptirler ve hafif dalgalı bir görünüm kazanırlar. Epitel hücrelerinin bazal kısımlarında glikojen birikimleri gözlenir.

3.Sekretuvar evre; Ovulasyondan yaklaşık 2-3 gün sonra, ovaryumda korpus luteumun oluşmasına paralel olarak endometriyumda da sekretuvar faz başlar. Bu evrede özellikle fonksiyonel tabakada belirgin değişiklikler oluşur. Endometriyum, ödemli bir görünüm alır ve kalınlığı 5-6 mm'ye kadar ulaşır. Korpus luteumdan salgılanan progesteronun etkisiyle, endometriyal bezler kıvrıntılı bir hal alır ve salgı yapmaya başlarlar. Epitel hücrelerinde çok miktarda glikojen depolanır. Bezlerin lümenleri keseler şeklinde olup içleri salgıyla doludur. Bez epitelinin mukoid salgısı glikojenden zengin besleyici maddeler içerir. Bu evrede epitel hücrelerinde mitoz oldukça sınırlıdır. Epitel hücrelerinde hipertrofi, ödem ve damarlanmanın artışı, endometriyal kalınlaşmadan sorumludur. Spiral arterler oldukça uzar ve kıvrıntılı bir görünüm alır ve yüzeye kadar ulaşırlar. Stromada ödem meydana gelir. Stromal hücreler genişler ve sitoplazmalarında glikojen ve lipid damlacıkları birikir. Östrojen ve progesteronun etkileri sonucunda, bu hücreler desidual hücrelere dönüşürler. Oldukça genişlemiş, soluk renkteki hücreler, glikojen yönünden zengindir. Stromal hücrelerdeki bu değişimin nedeni tam bilinmese de, implante olan embriyonun beslenmesine yönelik olduğu düşünülmektedir. Bu evrede endometriyum üç tabakalı bir yapı gösterir. Kompakt tabaka; bezlerin düz boyun kısımlarını içeren bu tabakada stromada az miktarda ödem görülür. Spongioz (süngerimsi) tabaka; bezlerin kıvrıntılı segmentlerinin bulunduğu bu tabakada stromada ödem oldukça belirgindir. Bazal tabaka; endometriyumun dökülmeyen son 1/3'lük tabakasıdır.

4.İskemik evre; Ovulasyondan yaklaşık 13-14 gün sonra gerçekleşen bu evre korpus luteumun gerilemesi sonucu oluşur. Bu evrede vasküler değişiklikler oldukça karakteristiktir. Anemi ve anoksi sonucu endometriyumdaki damarlar atrofiye uğrar, fonksiyonel tabakanın kan beslenmesi bozulur ve buna bağlı olarak soluk bir renk alır. Endometriyumun fonksiyonel tabakası dökülmeye hazır haldedir ve 1 gün sonra da menstrüasyon gerçekleşir.

Fertilizasyon gerçekleşirse, sekretuvar faz gerilemez ve korpus luteum gebelik korpus luteumuna dönüşür. Korpus luteumdan salgılanmaya devam eden progesteron hormonunun etkisiyle, endometriyum gebelik boyunca gerilemez. İmplante olan embriyoda trofoblastlardan salgılanan hCG (İnsan

koryonik gonadotropin), korpus luteumun gerilemesini inhibe eder ve progesteron salgılanmasını stimüle eder. Endometriyum ileri derecede gelişir ve gebelik süresince de gerilemez. Bu dönemde endometriyum gebelik fazındadır. Stromal hücrelerde glikojen ve lipid depolanır, hücreler desidual hücrelere dönüşürler[21].

Menstrüal siklus boyunca endometriyumda, proliferatif fazda alkalin fosfataz, beta glukorunidaz ve trifosfopiridin nukleotid ile sekretuvar fazda asit fosfataz ve difosfopiridin gibi, hücre metabolizmasına özel enzimler sentezlenir. Ovulasyonun gerçekleşmediği durumlarda, endometriyum proliferatif fazdan sekretuvar faza geçemez. Dolayısıyla endometriyumda sekretuvar faz gelişmez, proliferatif evre menstrüasyon aşamasına kadar devam eder[23].

Endometriyumun hücresel kompozisyonu, üreme siklusu boyunca hormonal değişikliklere bağlı olarak dinamik bir yapı sergiler. Endometriyumda sabit hücre populasyonunu oluşturan epitel hücreleri, stromal hücreler ve kan damarlarının yanı sıra, siklus sırasında bölgeye çok sayıda hücre infiltrasyonu gerçekleşmektedir. Bu hücrelerin sayıları ve dağılımları menstrüal siklus evrelerinde oldukça fazla değişiklik göstermektedir. En yoğun oldukları faz, pre-menstrüal ve menstrüal fazlardır. Siklus sırasında endometriyuma infiltre olan hücrelerden en belirgin olanı makrofajlardır[1].

2.2. Endometriyumun ince yapısı

2.2.1. Erken proliferatif faz (4-7. Gün)

Erken proliferatif faz boyunca endometriyumun yüzey ve bez epiteli basit prizmatik tiptedir. Epitelde silyalı ve mikrovilluslu olmak üzere iki tip hücre ayırt edilmektedir. Mikrovilluslu hücreler, apikal yüzeylerinde çok sayıda mikrovillusa sahip olup, belirgin bir glikokaliks tabakası ile örtülüdürler. Hücrelerin çekirdekleri merkezi yerleşimlidir ve ovoid ya da uzamış şekilde görülmektedir. Çekirdek içerisindeki kromatin homojen olarak dağılmıştır ve çekirdekte bir kaç adet çekirdekçik de bulunabilir. Hücreler birbirlerine sıkı bağlantılar ile bağlanmışlardır. Bazal ve supranüklear sitoplazmada çok sayıda poliribozom yer almaktadır. Ayrıca sitoplazma içerisinde, granüler endoplazmik retikülüm

sisternaları, çok sayıda küçük mitokondriyonlar ve bazı alanlarda annulate lamella benzeri yapılar gözlenmektedir. Golgi kompleksi genellikle zayıf gelişmiştir. Sitoplazma içerisinde ayrıca dens cisimcikler ve bir kaç lipid damlacığına da rastlanmaktadır. Yüzey epiteli ve bez epiteli içerisinde daha az sayıda bulunan silyalı hücreler, lümene bakan yüzde silyumlar içermektedir. Bu evrede, silyalı hücreler diğer yapısal özellikleri yönünden, mikrovilluslu hücrelere benzerlik göstermektedir. Endometriyal stroma, stromal hücreler, makrofajlar, bağ dokusu lifleri ve kan damarlarından oluşmaktadır[2].

2.2.2. Orta ve geç proliferatif faz (8-13. Gün)

Orta proliferatif faz boyunca yüzey ve bez epiteli hücrelerinde bazale yakın yerleşimli düzensiz sınırlara sahip, ökromatik bir çekirdek bulunur. Bu faz boyunca epitelde mitotik figürlere sıklıkla rastlanmaktadır. Epitel hücrelerinin sitoplazmalarında küçük, ince ve uzun mitokondriyonlar ile Golgi kompleksi ve endoplazmik retikülüm sisternaları görülmektedir. Bu dönemde, hücrelerin lateral yüzeylerinde membranlar genellikle düzdür. Bazal sitoplazmada yerleşen küçük glikojen partiküllerine rastlanmaktadır. Bazen hücrelerin sitoplazmalarında sekresyon granülleri ve heterofagozomlar da görülmektedir.

Geç proliferatif fazda hücrelerin çekirdeklerinde yer yer heterokromatik alanlar ortaya çıkmaktadır. Bu dönemde Golgi kompleksi gelişimine devam ederken, sitoplazmada çok sayıda küçük mitokondriyonlara da rastlanmaktadır. Granüler endoplazmik retikülüm ve serbest ribozomlar iyi gelişmiştir. Hücreler arası boşluklar genişlemeye başlamıştır. Menstrual siklusun 14. günü ile birlikte, çekirdeğin bazalinde yerleşen glikojen partiküllerinin sayısı belirgin olarak artmaktadır. Ayrıca bazı hücrelerde hala mitoza da rastlanmaktadır[4].

2.2.3. Sekresyon fazı (14-28. Gün)

Endometriyumun sekresyon fazında, yüzey epitelinde 4 farklı tipte hücre ayırt edilmektedir.

2.2.3.1. Mikrovilluslu hücreler: Yüzey epiteli içerisinde en sık gözlenen hücre tipidir. Orta derecede elektron dens bir sitoplazmaya sahip bu hücrelerde apikal yüzde çok sayıda mikrovillus ve sterosilya bulunur. Hücre çekirdekleri ovoid, hafifçe uzamış ve düzensiz bir sınıra sahiptir ve çoğunlukla apikal

pozisyonda yerleşir. Bazı hücrelerde çekirdekçik, çekirdek kılıfı invaginasyonları ile ilişkili olarak gözlenir ve bazen de gelişimin erken dönemindeki nüklear kanal sistemleriyle ilişkili olarak izlenir. Sitoplazmada çok sayıda uzun mitokondriyonlar, GER sisternaları, az sayıda, dev mitokondriyonlar, çok sayıda düz endoplazmik retikülüm sisternaları ve glikojen partikülleri gözlenir. Ayrıca supranüklear pozisyonda Golgi kompleksi yer alır. Lipid damlacıkları ve glikojen partikülleri genellikle bazal bölgededir. Elektron dens veziküller ve sekonder lizozomlar, daha çok apikal bölgede ve bazolateral membranlara yakın şekilde izlenir. Apikal yüzde, komşu hücreler arasında sıkı bağlantılar bulunur. Bunun yanında, lateral yüzeylerde de desmozomlara rastlanır. Sonuçta bu tip hücrelerde apikal yüzeyde mikrovilluslar, sterosilya, az sayıda apikal sitoplazmik çıkıntılar, orta düzeyde sekretuvar organeller ve gelişmekte olan nüklear kanal sistemi gözlenir[2,4,24].

2.2.3.2. Pinopodlu hücreler: Bu hücrelerin apikal yüzünde, pinopod olarak adlandırılan, geniş sitoplazmik uzantılar bulunur. Bu uzantılar düzenli bir yüzeye sahiptir ve mikrovillus içermezler. Pinopodların sitoplazmasında az sayıda organel, çok miktarda mikrofilaman, glikojen partikülleri, örtülü veziküller ve bazen de endoplazmik retikülüm sisternalarıyla, dens veziküller ve küçük mitokondiyonlar bulunur. Çekirdek ovoid olup düzenli bir sınıra sahiptir ve orta hatta yerleşmiştir. Ayrıca, iyi gelişmiş nüklear kanal sistemleri bulunur. Sitoplazmaları orta dereceli elektron densiteye sahiptir. Mitokondiyonları fazla olan bu hücrelerde, endoplazmik retikülüm sisternaları da izlenmektedir. Dev mitokondiyonlar bulunmaz, SER ve Golgi kompleksi de az gelişmiştir. Bununla birlikte, dens veziküller, sekonder lizozomlar, glikojen ve lipid damlacıkları belirgindir. Hücreler arasında az sayıda bağlantı kompleksleri de bulunur[4,24].

2.2.3.3. Veziküllü hücreler: Apikal sitoplazmalarında büyük çaplı sekretuvar veziküller ve elektron lusent sitoplazmaları ile karakterize hücrelerdir. Veziküller, Golgi kompleksi ve ER ile yakından ilişkilidir. Apikal yüzeyde az sayıda mikrovillus ve sterosilya bulunur. Sitoplazma içerisinde özellikle subnüklear pozisyonda, birkaç lipid damlacığı ve glikojen partikülüne rastlanır. Ayrıca supranüklear olarak dens veziküller, küçük mitokondriyonlar ve GER sisternaları da yer almaktadır. Bu hücrelerde, dev mitokondriyonlar

bulunmamaktadır. Çekirdek oval ve düzenli bir sınıra sahiptir, genellikle hücrenin ortasında yerleşir. Nüklear kanal sistemleri bulunmakla birlikte, belirgin değildir. Hücreler arasında dezmozomlara rastlanmaktadır. Veziküllü hücreler, epitel içerisinde az sayıda dağınık olarak yer alabildiği gibi, ikili veya üçlü gruplar halinde de bulunabilirler. Gerileme fazında, bu hücreler sıklıkla hücresel ölüm özellikleri göstermektedir. Hücrelerde sitoplazmik kayıp, organel genişlemeleri ve otofagozomlara sıklıkla rastlanmaktadır. Hücrelerin çoğunda, çekirdekte ökromatik bir görünüm izlenirken, bazı hücrelerde kromatin kümeleşmesi dikkati çekmektedir. Apikal kısımlarda, tipik holokrin sekresyonu simgeleyen, geniş vakuoller ile karakterize dejeneratif hücreler lümene doğru atılmaktadır[2,4,24].

2.2.3.4. Silyalı hücreler: Yüzey epitel hücreleri arasında en az sıklıkta gözlenen hücre tipidir. Sitoplazmaları oldukça elektron denstir. Apikal yüzleri düz olan bu hücrelerde, çok sayıda silyum yer almaktadır. Silyumların yanında, hücrelerde az sayıda mikrovillus ve sterosilyumlar da bulunmaktadır. Çekirdekleri bazale yakın olup, düzensiz sınırlara sahiptir. Hücrelerde nüklear kanal sistemleri bulunmamaktadır. Apikal sitoplazmada çok sayıda küçük mitokondiryonlar yer alır, fakat dev mitokondriyonlara sahip değildirler. Endoplazmik retikülüm ve Golgi sisternaları iyi gelişmemiştir. Hücre sitoplazmalarında ayrıca, az sayıda glikojen partikülü, dens veziküller, lizozomlar ve lipid damlacıkları da bulunmaktadır. Hücrelerin bazalinde, glikojen kümeleri ve mitokondriyonlarla ilişkili multilamellar cisimcikler de gözlenmektedir.

Endometriyumun sekresyon fazında, bez epitelinde de, yüzey epitelinde olduğu gibi, mikrovillustan zengin hücreler, pinopodlu hücreler, veziküllü hücreler ve silyalı hücreler olmak üzere 4 farklı tipte hücre ayırt edilmektedir[24].

2.3. Endometriyozis

2.3.1. Endometriyozisin tanımı

Endometriyozis, endometriyal bezlerin ve stromanın, uterus kavitesinin dışında, vücudun başka bir yerinde yerleşim göstermesiyle karakterize jinekolojik bir hastalıktır. Endometriyal dokunun, endometriyum dışındaki yerleşimi ektopik endometriyum adını almaktadır[3,25-33]. Bu hastalık üreme çağındaki kadınların yaklaşık %6-10'unu etkilemekte olup, bu oran infertilite ile birlikte %50'ye kadar çıkabilmektedir[11]. Endometriyozis, toplum sağlığını ilgilendiren önemli bir sorun olup hala üzerinde araştırma yapılan bir konu olarak güncelliğini sürdürmektedir. Bununla birlikte hastalığın nedeni henüz tam olarak aydınlatılamamıştır[3]. Endometriyotik dokunun yapısı histolojik olarak endometriyuma benzerlik göstermektedir. Endometriyal implantların dört ana komponenti; endometriyal bez, endometriyal stroma, fibrozis ve hemorajidir[33]. Ektopik implantlarda bulunan endometriyotik bezlerin yapısı düzensizdir. Bununla birlikte, bezlerde, mitotik figürler içeren siklik değişiklikler gözlenebilmektedir. Östrojen hormonunun etkisi ile epitel pseudostratifiye bir görünüm kazanırken, progesteron hormonunun etkisinde, sitoplazmik vakuolizasyon ve intraluminal sekresyon uyarılmaktadır. Ötopik ve ektopik endometriyal stroma dokusu yapısal olarak birbirine benzemektedir. Ektopik endometriyumda, normal endometriyumun spiral arteriyollerine benzeyen küçük arterioller de yer almaktadır. Ayrıca stromada hemoraji ile birlikte makrofajlara da sıklıkla rastlanır.

2.3.2. Endometriyozisin epidemiyolojisi

2.3.2.1. Prevalans

Endometriyozisin dünyada görülme sıklığı tam olarak bilinmemekle beraber, jinekolojik operasyon yapılan hastaların %1'inde, pelvik ağrı nedeniyle laparoskopi yapılan hastaların %2-32'sinde, sterilizasyon uygulanan hastaların %6-43'ünde, infertilite nedeniyle operasyon yapılan hastaların %21- 48'inde, kronik pelvik ağrı ve dismenore nedeniyle laparoskopi yapılan genç kızların %50'sinde hastalık tespit edilmiştir[34]. Houston ve arkadaşları, endometriyozisin

15-49 yaşları arasındaki kadınlarda bulunma oranını, 160/100000 kadın/yıl olarak açıklamışlardır. Bu hastalığın tanısı için yapılan jinekolojik ameliyatlar, son 30 yılda artış göstermiştir[35].

2.3.2.2. Risk faktörleri

Endometriyozisin oluşumunda ırk, herediter ve hormonal faktörler, yaş ve sosyoekonomik durum gibi etkenlerin rol oynadığı düşünülmektedir. Ayrıca menstrüasyon ve üreme geçmişi, sigara, kafein ve alkol kullanımı, boy, kilo ve vücut yapısı, doğum kontrol hapları da endometriyozis oluşumunda dikkat çeken risk faktörleri arasında yer almaktadır[35,36].

2.3.3. Endometriyozisin patogenezi

Vücutta, endometriyozise en sık rastlanan bölge pelvis olmakla birlikte, diğer doku ve organlar da endometriyal odaklar görülebilir. Ektopik endometriyotik dokulara, ovaryumlar, tuba uterina, ligamentler, vajen, serviks, rektovajinal septum, ince ve kalın barsaklar, appendiks ve anüs gibi bölgelerde rastlanmaktadır. Bunların yanında, ender olarak, inguinal kanal, abdominal ve perineal skarlar, üreterler, mesane, karaciğer, diyafram, omurga ve ekstremiteler, böbrekler, akciğer, plevra ve beyinde de endometriyal implantlar bulunabilmektedir[3,35-38]. Ovaryumda endometriyotik doku, fibröz kapsül ile sarılı halde, içerisinde koyu kahverengi sıvı bulunan, kistik yapılar şeklinde bulunmaktadır. Ovaryumda bulunan bu kistik oluşumlara ovaryan endometriyoma adı verilmektedir[39]. Endometriyozisi olan hastaların yaklaşık %17-44'ünde ovaryan endometriyomaya rastlanmaktadır. Genellikle adet dönemlerine, pelvik ağrılara neden olarak yaşam kalitesini düşüren bu rahatsızlık, infertilite, subferilite, dismenore ve disperoni gibi sorunlara da neden olmaktadır[40]. Bütün bunların yanında, ovaryan endometriyoma, siklik olmayan ağrı ve pelvik kanser riskinin artması gibi sonuçlar da doğurabilmektedir[38].

2.3.4. Endometriyozisin oluşum teorileri

Endometriyozis histogenezisini tanımlamak amacıyla çeşitli teoriler geliştirilmiştir. Bu teorilerden bugün için en fazla kabul görenler; implantasyon teorisi, in-situ gelişim teorisi, indüksiyon ve kombinasyon teorileridir. İmplantasyon teorisi de kendi içerisinde; retrograd menstrüasyon, lenfatik yayılım, vasküler yayılım, direkt invazyon ve uterotubal oluşum olmak üzere sınıflandırılmaktadır. In-situ gelişim teorisi de; kölomik metaplazi teorisi, Mülleriyan duktus kalıntı ve Wolffian duktus kalıntı teorisi olmak üzere gruplandırılmaktadır[35].

2.3.4.1. İmplantasyon teorisi: Endometriyal dokunun menstrüasyon sonrasında tuba uterinadan geçerek batına dökülmesi ve yerleşmesi fikrine dayanmaktadır. Endometriyozisin gelişimi, peritona ulaşan doku miktarına ve endometriyal hücrelerin peritona yapışmasını sağlayan faktörlere bağlıdır. Ektopik implantasyon, menstrüal kanın endometriyal hücre içermesi ve bu hücrelerin de peritona yapışmaları halinde gerçekleşmektedir.

Retrograd menstrüasyon teorisi**,** 1920 yılında, Sampson tarafından ileri sürülmüştür. Bu teori menstrüel dokunun tuba uterinadan ilerleyerek pelvik organlara ulaşması, bu bölgelerde yerleşmesi ve büyümesini açıklamaktadır. Genital yollarda meydana gelen herhangi bir tıkanma, menstrüel kanın dışarı atılmasını engelleyecek ve endometriyozis oluşum oranını arttıracaktır. Adet dönemlerinde laparotomi ve laparoskopi yapılan kadınların yaklaşık %70-90'ında retrograd menstrüasyon gerçekleştiği gösterilmiştir. Buna rağmen retrograd menstrüasyon gerçekleşen kadınların büyük bir kısmında endometriyozisin gelişmemesi bu teorinin endometriyozisin oluşumunu açıklamada tek başına yeterli olmadığını da göstermektedir. Keza retrograd menstrüasyon teorisi, periton kavitesi dışında gelişen endometriyozis odaklarının gelişimini de açıklayamamaktadır[41]. Direkt invazyon teorisi, sezaryen alanında ve diğer cerrahi skarlarda endometriyozis oluşumunu açıklarken, pelvik kavite dışındaki dokularda endometriyozis gelişimini lenfatik ve vasküler yayılım teorileri açıklayabilmektedir.

2.3.4.2. In-situ oluşum teorisi

Endometriyozis, retrograd menstrüasyon yoluyla oluşmamış ise, hastalığın gelişiminin in-situ oluşum teorisine göre meydana gelebileceği kabul edilmektedir. Bu teori kapsamında yer alan kölomik metaplazi teorisi, endometriyozisin, vücudun tüm bölgelerine yayılmasını açıklamaktadır. Mülleriyan ve Wolffian duktus kalıntısı teorilerine göre, Mülleriyan ve Wolffian sistemin rudimenter yapıları, endometriyotik lezyonlar oluşturabilmektedir[35].

2.3.4.3. İndüksiyon teorisi

1955 yılında Levander ve Normann tarafından öne sürülen bu teoriye göre peritoneal kaviteye ulaşmış dejenere endometriyumdan salgılanan bazı faktörler, mezenşimal hücreleri indükleyerek endometriozis oluşumuna neden olmaktadır[35].

2.3.4.4. Kombinasyon teorisi

Kombinasyon teorisine göre; peritoneal endometriyozis retrograd menstrüasyon sonucu, ovaryan endometriyozis kölomik metaplazi sonucu oluşmakta, rektovajinal endometriyozis ise Mülleriyan duktus kalıntılarından köken almaktadır[35].

2.3.5. Endometriyozisin evreleri

Hastalığın gelişimi boyunca 4 farklı evre ayırt edilmektedir[35].

2.3.5.1. Mikroskobik endometriyozis; Periton makroskopik olarak normal görünüme sahip olmasına rağmen intraperitoneal lezyon varlığı mikroskop ile ayırt edilebilmektedir. Endometriyotik lezyonda silyalı prizmatik epitel mezotelin yerini almıştır. Epitel altında endometriyal bezler ve stroma görülebilmektedir.

2.3.5.2. Erken aktif endometriyozis; Polipler, veziküller, kabarıntılar en erken lezyon tipini belirler. Sıvı içerikli olarak ta ortaya çıkabilir. Bunlar yüksek oranda damarlı ve non-fibrotik lezyonlardır. Bezler genellikle proliferatif ve sekretuvar fazdadır.

2.3.5.3. İleri aktif endometriyozis; Tipik pigmentli hemorajik ve fibrotik endometriyotik alanlardır.

2.3.5.4. İyileşmiş endometriyozis; Beyaz yara izi şeklinde implantlar halinde görülmekte olup, aktif bezler fibrotik lezyonlar ile birlikte de bulunabilir[35].

2.3.6. Ovaryan implantların makroskopisi

Ovaryan endometriyotik implantlar, genel olarak kırmızı, beyaz ve siyah lezyonlar şeklinde sınıflandırılmaktadır[35]. Endometriyotik kistleri kan ve diğer sıvıları içermekte olup, genellikle birkaç milimetreden 10 cm'ye kadar değişebilen boyutlarda olabilmektedir[33].

2.3.7. Ovaryan endometriyoma histolojisi

Endometriyoma duvarı, ince ve nisbeten yassılaşmış basit epitele sahiptir. Epitelin altında ince bir stroma tabakası yer almaktadır. Stromada, stromal hücreler, hemosiderin yüklü makrofajlar bulunmaktadır. Endometriyoma dokusu alttan fibröz bir doku tarafından çevrelenmiştir[39].

2.3.8. Endometriyotik dokuların ince yapı özellikleri

Proliferatif fazda endometriyotik dokunun yüzey epiteli ve bez epiteline sahip olduğu, epitelin prizmatik tipte, silyalı ve mikrovilluslu hücrelerden oluştuğu rapor edilmiştir. Hücrelerin apikal kısımlarında çok sayıda mikrovillus bulunmaktadır. Hücreler arasında, genellikle apikal bölgeye yakın olmak üzere sıkı bağlantılar ile lateral yüzeylerde dezmozom benzeri bağlantılar görülmektedir. Epitel hücrelerinin çekirdekleri oval görünümde olup, genellikle merkezi yerleşimlidir. Çekirdek kılıfı çekirdek içerisine doğru invajinasyonlar gösterebilmektedir. Hücrelerde supranüklear bölgede birçok küçük mitokondriyonlara rastlanmaktadır. Ayrıca endoplazmik retikülüm sisternaları, Golgi kompleksi ve serbest ribozomlar da hücre içerisinde gözlenen organellerdir. Apikal bölgede birkaç ozmofilik veziküller de izelenebilmektedir.

Proliferatif fazın ileri dönemlerinde hücrelerin yüzeyleri daha düzensizdir ve bez epitelyum hücreleri lümene doğru sitoplazmik uzantılar gönderirler. Ayrıca bu dönemde stroma tipik kollajen lifler içermektedir. Bu liflerin bazıları bandlar şeklinde düzenlenmiştir. Stromada bulunan fibroblastlarda az sayıda organel bulunur[42].

2.3.9. Endometriyozis ve infertilite ilişkisi

İnfertil hastalarda endometriyozise daha fazla oranda rastlanmakta olup kadınların yaklaşık %50'sinde endometriozis görüldüğü rapor edilmiştir. İleri derecedeki endometriozisin infertilite nedeni olabileceği yaygın olarak kabul edilmektedir. Orta dereceli ve ağır endometriyozisli hastalarda, mekanik faktörler, peritoneal sıvı anormallikleri, ovulasyon sorunları, pelvik ağrı ve immünolojik anormallikler infertilite nedeni olabilmektedir[35].

2.4. Sitokinler

Sitokinler, yaklaşık 8-30 kDa ağırlığa sahip, protein veya glikoprotein yapısındaki hormon benzeri yapılar olup, çeşitli hücre ve dokular tarafından üretilebilmektedirler[6]. Uyarılmış lenfositler, monositler, makrofajlar ve diğer bir çok hücre tarafından salgılanmaktadırlar. Sitokinler, diğer hücrelere parakrin yolla etki ederler, enfeksiyon, travma ve hastalıklarda görev alan önemli mediyatörlerdir. Sitokinlerin hastalıklardaki rolleri oldukça komplekstir. Bu mediyatörlerin endokrin rolleri, klasik endokrin hormonlara göre oldukça farklıdır. Sitokinler, immün yanıtın düzenlenmesinde, kemotaksis, hücre çoğalması, hücre aktivasyonu, motilite, adezyon ve morfogenezinde rol almaktadır. Bunların yanında, immün ve enflamatuvar olaylarda görev alan hücrelerin etkinliklerinin arttırılmasında da önemli fonksiyonlara sahiplerdir. Bu mediyatörler, indüklenebilir nitelikte maddeler olup, antijenler için spesifik değildirler. Sitokinler ayrıca implantasyon kontrolü ve endometriyal hücrelerin uterus dışında büyümesi ile de yakında ilişkilidirler. Endometriyozisli hastaların peritoneal sıvılarında büyüme faktörlerini ve sitokinleri sentezleyen makrofajların sayılarında belirgin bir artış olduğu kaydedilmiştir[43]. Sitokinlerin

yalnızca immün sistem hücrelerinden değil aynı zamanda endometriyotik implantlardan da salgılanabileceği rapor edilmiştir[44-46].

Sitokinler immün yanıtta rol oynayan ve diğer bazı tip hücrelerin çoğalmasını ve farklılaşmasını uyarırlar. Bu bağlamda, immün yanıtın düzenlenmesinde supressör veya stimülatör etkilere neden olurlar. Enflamasyona katılan hücreleri aktive ederek, reaksiyon alanına toplanmalarını sağlarlar. Sitokinler ayrıca hipofiz bezinden bazı hormonların salınmasına da neden olurlar. Bunların yanında, akut faz cevabı ve ateş oluşturma ve antiviral etkileri de rapor edilmiştir. Diğer taraftan, TNF-α gibi, bazı sitokinler kemik iliğine etki ederek, hematopoezisin düzenlenmesine de katılırlar[45].

İnsan vücudunda yer alan sitokinler subfamilyalarına göre gruplandırılmaktadırlar. İnterlökinler; IL-1α, IL-1β, IL1ra, IL-2-, IL-26 gibi, doğuştan var olan ve sonradan kazanılmış bağışıklığı düzenlerler. Kemokinler, IL-8 ve MCP gibi, lökosit kemotaksisinde ve aktivasyonunda görev almaktadır. TNF-α ve TNF-β, tümör sitotoksisitesi ile ilişkilidirler. İnterferonlar, IFN- α, β ve γ, anti-viral özellikte mediyatörler olup, immün sistem üzerinde düzenleyici etkilere sahiptirler. Koloni stimüle edici faktörler, GM-SF, IL-3, IL-5, IL-6 ve IL-7 gibi, miyelopoieziste rol oynamaktadırlar. Nötrotrofinler ve nöropoetinler, nötrotrofik faktör, sinir büyüme faktörü, IL-6 gibi, nöronal büyüme ve diferansiyasyonda görev almaktadır. Büyüme faktörleri, fibroblast büyüme faktörü ve endotelyal hücre büyüme faktörü gibi, hücre büyümesinde düzenleyici olarak rol alırlar[6].

2.4.1.Tümör Nekroz Faktör Alfa (TNF-α)

TNF-α, farklı hücre tipleri tarafından salgılanan ve enflamatuvar olaylarda önemli olan bir sitokindir. Kaşeksin veya kaşektin olarak ta bilininen TNF-α, ilk kez Carswell ve arkdaşları tarafından sarkom nekrozundan sorumlu sitotoksik bir faktör olarak tanımlanmıştır. İnsan TNF geni 1984 yılında klonlanmış ve haritalanmıştır. TNF-α, esas olarak monosit ve makrofajlardan salgılanmasına rağmen, TNF-β lenfoid hücreler tarafında üretilmektedir. Bununla birlikte, her iki sitokin de benzer biyolojik aktivitelere sahiptir ve aynı yüzey reseptörüne

bağlanmaktadır. TNF-α, biyolojik özelliklerini, TNF superailesine bağlı, membran reseptörleri olan TNFR1 ve TNFR2'ye bağlanarak göstermektedir. TNFR1, TNF sinyalinde anahtar bir mediyatör olup pek çok dokuda bulunmaktadır. Buna karşın,TNFR2, daha çok immün sistem hücrelerinde bulunmaktadır ve lenfoid sistemde önemli bir role sahiptir. Her iki reseptörün ekstraselüler domainleri membrandan ayrılmakta ve çözünebilir TNF (sTNF)'yi oluşturmaktadır. TNF-α, oldukça geniş spektrumlu biyoaktiviteye sahiptir ve bir çok hücre TNFα'ya duyarlıdır. Genel olarak bu sitokin dokuda rejenerasyon ve yıkım olayları olmak üzere ikili bir fonksiyona sahiptir. Fizyolojik koşullarda, TNF-α'nın immün sistem reaksiyonlarının kontrolünde ve vücut savunmasında önemli rolleri bulunmaktadır. Ayrıca nörolojik travmalarda hücre yaşamının kontrolü ve homeostazisinde, hücre proliferasyonu, hücre göçü ve diferansiyasyonunda da görev almaktadır. TNF-α'nın pro-enflamatuvar ve immün-stimülasyon aktivitelerinden dolayı birçok patolojik olayla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Bu sitokin, romatoid artrit ve enflamatuvar barsak hastalıkları gibi, birçok otoimmün hastalığın gelişimi ile yakından ilişkilidir. Bu nedenle bu hastalıkların tedavisinde sTNF reseptörleri ve TNF nötralize eden antikorlar kullanılmaktadır. Bu nedenle vücutta TNF-α konsantrasyonları ölçülerek bu sitokinin zararlı veya yararlı etkileri öngörülmektedir. Dolayısıyla, TNF-α konsantrasyonu, hücre-doku tipi, TNF reseptör dağılımı ve TNF-α stimülasyonunun süresi, fizyolojik ve patolojik reaksiyonların geleceğini belirlemektedir[11].

Öte yandan, TNF-α, endometriyal epitelin ve stromanın gelişmesi ve menstrüasyonun normal fizyolojisinde de görev almaktadır. Endometrial bezlerde erken proliferatif fazda TNF-α proteini negatif veya zayıf boyanmış olarak gözlenirken, proliferatif fazın ileri safhalarında boyanma giderek artmakta, geç proliferatif fazda ise maksimum düzeye ulaşmaktadır. Bu sekresyon, sekretuvar faz boyunca en üst seviyede kalmaktadır. Siklusun sonlarına doğru TNF mRNA seviyesi azalırken, protein miktarı, hücrelerde yüksek seviyelerde varlığını sürdürmektedir[13]. Yapılan çalışmalarda endometriozisli hastaların periton sıvılarında TNF-α konsantrasyonunun belirgin olarak arttığı, hastalığın evresi ile sitokin konsantrasyonu arasında yakın

ilişkinin olduğu rapor edilmiştir[47]. Dolayısıyla, TNF-α endometriozisin gelişiminde ve devamlılığında kilit role sahip bir sitokindir. Bunun dışında TNF'nin kadın infertilitesinde de önemli rolleri olabileceği ileri sürülmektedir[48]. Tsudo ve arkadaşları sitokinlerin immün hücrelerinin yanında, aynı zamanda endometriyotik implantlardan da salgılanabildiğini rapor etmişlerdir[49].

Normalde ve gebelik sırasında, endometrial hücreler tarafından endometriyum gelişiminde rol oynayan, belirgin bir TNF-α ekspresyonun varlığı daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Üreme fizyolojisi ve patolojisinde endometriyumdaki çeşitli hücre tipleri tarafından salgılanan sitokinler ve kemokinler arasındaki ilişki günümüzde hala tartışma konusudur. Araştırmacılar, TNF gibi sitokinlerin endometriyumda üretilen RANTES, MCP-1 ve IL-8 gibi mediyatörlerin, önemli düzenleyicileri olduğuna dikkati çekmektedir[11].

2.5. Kemokinler

Kemokinler, sitokinlerin geniş, multifonksiyonel bir ailesi olup, enfeksiyon veya yaralanma alanlarına hücre göçünü uyaran mediyatörlerdir[7]. Kemotaktik aktiviteye sahip, yaklaşık 8-10 kDa ağırlığında oldukça küçük moleküllerdir[50]. Kemokinler, son yıllarda üzerinde en çok çalışılan sitokin grubu olup, 50'nin üzerinde farklı üyesi tanımlanmıştır. Kemokinler, normal biyolojik ve patolojik süreçte görev alan mediyatörlerdir[8,51]. Kemokinler 2 ana katagoriye ayrılır. Bir grubu homeostatik ürünler olup, lenfatik sistemde lenfosit trafiği ve immün sistemin devamından sorumludurlar. Diğer grup kemokinler ise yalnızca enfeksiyon veya proenflamatuvar bir uyarı sonucu üretilirler, lökositlerin enfekte veya yaralanma alanlarına göçünü uyarmaktadırlar. Bu enflamatuvar kemokinler, aynı zamanda immün cevabı arttırmak üzere hücreleri aktive ederler[7].

Kemokinler, yapılarında bulunan sisteinlerin düzenlenmesine göre; alfa (CXC), beta (CC), gama(C), delta (CX_3C) olmak üzere 4 alt familyaya ayrılır[7,8,52].

2.5.1. Monosit Kemotaktik Protein (MCP)

Alerjenik protein grubundan olan monosit kemotaktik protein (MCP), CC kemokin alt ailesinin bir üyesidir. Pleotropik aktiviteye sahip olan MCP, genellikle eozinofil veya bazofil lökosit atraktanı olarak da bilinmektedir[7]. Ayrıca monosit ve lenfositler için de kemotaktik aktiviteye sahiptir. MCP-1, ilk tanımlanan tip olup, MCP-2 ve 3 formları da MCP-1'e yapısal olarak %70 homoloji gösterir. Her üç molekülün biyolojik aktivasyonları birbirine benzemektedir[53].

2.5.1.1. Monosit Kemotaktik Protein-2 (MCP-2)

Eozinofilleri stimüle eden monosit kemotaktik protein-2 proteini, CCR1-2-3 reseptörlerine bağlanarak etkisini göstermektedir. MCP-2 normal endometriyumda epitel hücrelerinde eksprese edilirken bu kemokinin stromal hücreler ve damar lokalizasyonunun olmadığı gösterilmiştir[1]. Ayrıca makrofajlar için de güçlü kemoatraktan moleküllerdir. Asselin ve arkadaşları CCL2 ve CCL8 (MCP-2) ekspresyonunu koyun uterusunda çalışmışlar ve erken gebelik boyunca bu kemokinlerin seviyelerinin artığını rapor etmişlerdir. Bu bilgiler, kemokinlerin endometriyum fizyolojisinde, implantasyonda ve plasentasyonda önemli rollere sahip olabileceklerini düşündürmektedir[8].

2.6. İmmün sistem ve endometriyozis arasındaki ilişki

Endometriyozisin oluşumu, endometriyotik implantların yerleşimi ve tutunmaları immün sistem hücreleri ile yakından ilişkilidir. İmmün sistem hücreleri ektopik hücrelerin uzaklaştırılmasında veya fagositozunda önemli roller üstlenmektedir. Sağlıklı bir kadında ektopik bölgeye yayılan endometriyotik hücreler, çoğunlukla apopitoza gitmekte ve makrofajlar tarafından ortamdan uzaklaştırılmaktadır. Ektopik implantların bulunduğu alana immün sistem hücreleri infiltre olmakta, bunun sonucunda ortamda proenflamatvar sitokinler, büyüme faktörleri ve anjiyogenetik faktörler oldukça artmaktadır. Bunu takiben fibroblastların ve bağ doku miktarının proliferasyonu

gerçekleşmekte ve sonuçta yaralanma bölgesinde iyileşme meydana gelmektedir. Reaksiyonların derinliği, immün aktivasyonun derecesi ve karakterine göre oldukça değişmektedir. Bazı kadınlarda ektopik endometriyum çok az miktarda fibrotik doku ile çevrelenirken, diğerlerinde belirgin bir fibrozis dikkati çekmektedir. İmmün sistem hücrelerinin implantasyon alanına göçü ve burada immün cevap oluşturmaları genel olarak kabul edilmekle birlikte, immün cevabın primer ya da sekonder olup olmadığı tam açık değildir. Hücresel immün yanıtta meydana gelebilecek bir azalmada, peritoneal ortamdan menstrüal atıkların uzaklaştırılmasının engelleneceği, sonuçta da endometriyozisin gelişebileceği düşünülmektedir.

Periferal kan monositleri ve makrofajlar, immün sistemde anahtar role sahip hücrelerdir. Endometriyozisli hastalarda monosit ve makrofaj aktivasyonunun belirgin olarak arttığı rapor edilmiştir. Uyarılma durumlarında monosit ve makrofajlar, yüksek oranda TNF-α, IL-6 ve IL-8 sentezlemektedirler. Peritoneal sıvıdaki ve bağ dokudaki makrofajlar, ortamdaki eritrositler, bozulmuş hücre ve dokular, apopitotik hücreler ve muhtemelen de bu bölgeye ulaşmış olan endometriyal hücreleri fagosite etmektedirler. Endometriyotik sıvıda makrofajların sayı ve konsantrasyonları belirgin olarak artmaktadır. Oldukça büyük çaplı bu hücreler, uyarılma sonucunda normal sağlıklı kadınlara göre daha yüksek seviyelerde sitokin üretmektedirler. Ayrıca makrofajların, düz kas hücrelerinin kasılmasına neden olan, PGE2 ve PGF2α gibi, prostaglandinlerin sentezini de gerçekleştirdiği bilinmektedir. Endometriyotik peritoneal makrofajlar, aynı zamanda diğer sitokinler, büyüme faktörleri, adezyon molekülleri, komplement sistem elemanları, hidrolitik enzimler, reaktif oksijen radikalleri ve diğer maddeleri sentezlemektedirler. NK hücreleri, büyük lenfositler olup, endometriyozisli kadınlarda bu hücrelerin sayılarında belirgin bir azalmanın olduğu, bu nedenle de immün sistemde fonksiyonel bir yetersizliğin oluşabileceği ileri sürülmektedir. Endometriyoziste kemokin ve sitokinlerin yüksek seviyelerde bulunmaları, ektopik hücre veya doku parçalarının ortamdan uzaklaştırılmasıyla yakından ilişkili olabileceği üzerinde durulmaktadır. Ektopik hücrelerin ortamda uzun süre bulunmaları sonucunda, genellikle endometriyozis gelişmektedir[54].

2.7. Cluster of Differantiaton 68 (CD68)

CD68, monosit ve doku makrofajlarını da içeren, bütün mononüklear fagositer sistem üyeleri tarafından yüksek oranda eksprese edilen, 110 kD ağırlığında transmembran bir glikoproteinidir[55]. LAMP (lisosomal-endosomal associated membrane protein) ailesinin bir üyesi olan CD68'in primer olarak lokalize olduğu yapılar, lizozomlar ve endozomlardır. Normal insan dokularındaki monosit ve makrofajlarda monoklonal CD68 antikorları kullanılarak yüksek oranda boyanma gösterilebilmektedir[56].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hasta seçimi

Bu çalışmada Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalına, pelvik ağrı, adet düzensizliği ve özellikle dismenore ve infertilite sorunu nedeniyle başvuran, yaşları 20-41 arasında değişen, 21 kadından elde edilen 15 adet ötopik endometriyum ve 21 adet ovaryan endometriyotik doku örnekleri incelendi. Hastalardan 6'sı bekar olduğundan ötopik endometriyum biyopsisi yapılmadı. Araştırma projesi, Adana Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylandıktan sonra (19.10.2009 tarih ve AKAEK 3/1'nolu karar), doku biyopsileri hastalardan Bilgilendirilmiş Onam formu eşliğinde alındı. Olgularda, sistemik, otoimmün veya enflamatuvar bir hastalık tespit edilmedi. Ayrıca hastalar, son 1 yıl içerisinde gebelik de geçirmemişti. Hastalara menstrüal siklusun orta proliferatif fazında (8-10.günler) genel anestezi altında laparoskopi uygulandı. Laparoskopi sonucunda ovaryumunda endometriyoması bulunan hastalardan, ektopik ve ötopik endometriyum örnekleri alındı. Ayrıca infertilite tedavisi amacıyla başvuru yapan, endometriyozise sahip olmayan ve yaşları 32-39 arasında değişen 5 kadından elde edilen endometriyum biyopsileri de kontrol amacıyla kullanıldı. Elde edilen doku örnekleri, ışık mikroskobik, immünohistokimyasal ve elektron mikroskobik incelemeler için uygun yöntemlerle hazırlandı.

3.2. Elektron mikroskobi yöntemleri

Elektron mikroskobik incelemeler için alınan ötopik ve ektopik endometriyum dokuları ve kontrol amaçlı alınan normal endometriyum örnekleri Milloning fosfat tamponu (pH: 7,4) ile hazırlanmış %5'lik glutaraldehit içerisine alındı. 1 saat glutaraldehit içerisinde bekletilen dokular dişçi mumu dökülmüş petri kabı içerisine alınıp jilet yardımı ile 1mm^3 büyüklükte parçalara ayrılıp 3 saat daha %5'lik gluteraldehit içerisine alındı. Toplam 4 saat süreyle tespit edildikten sonra buffer solüsyonu olan Millonig fosfat[57] tamponunda 10 dakika bekletildi ve sonra tekrar Millonig fosfat tamponuna koyularak 1 gece bekletildi.

Ertesi gün %1'lik osmium tetraoksit solüsyonu ile 2 saat daha tespit edildi. Ve tekrar Millonig fosfat tamponunda iki defa 10'ar dakika yıkandı. Daha sonra artan alkol serilerinden geçirilerek dehidratasyon yapıldı.

- +4 °C'de 15 dakika %50'lik etil alkol
- +4 °C'de 15 dakika %70'lik etil alkol
- +4 °C'de 15 dakika %86'lık etil alkol
- + 4 °C'de 15 dakika %96'lık etil alkol
- +4 °C'de 15 dakika %100'lük etil alkol
- +4 °C'de 15 dakika %100'lük etil alkol

Buraya kadar yapılan işlemlerin hepsi +4 °C'de gerçekleştirildi. Daha sonra aşağıdaki işlemler sırasıyla oda ısısında gerçekleştirildi:

- 15 dakika %100'lük etil alkol
- 15 dakika propilen oksit
- 15 dakika propilen oksit

Dehidratasyon işlemi tamamlanan doku parçaları 1 hacim propilen oksit ve 1 hacim rezin (gömme materyali)'den oluşturulmuş karışım içerisinde 2'şer defa 30'ar dakika bekletildi ve immerse edildi. Dokular taze hazırlanmış rezin içerisine alınarak 1 gece boyunca rotatorda döndürüldü. Bu işlem rezinin doku içerisine daha iyi nüfuz etmesi için yapıldı. Ertesi gün taze rezin hazırlandı.

Gömme materyalinin hazırlanışı

- 20 ml Araldehit (CY212)
- 20 ml Sertleştirici (DDSA)
- 0.6 ml Hızlandırıcı (HDMA)
- 1 ml Plastikleştirici (Dibütil fitalat)

Rotatordan alınan dokular 00 polietilen kapsüllere yerleştirilerek üzerlerine taze hazırlanmış rezin döküldü ve etüvde 60^0C'de 48 saat polimerize edildi. Bloklar etüvden çıkarılıp soğumaya bırakıldı. Bloklardan Riechert Ultracut S

ultramikrotomuyla 1µm kalınlığında yarı ince kesitler alındı. Kesitler toluidin blue ile boyandı ve ince kesit öncesi uygun alanların seçimi yapıldı. Daha sonra doku bloklarından 50 nm kalınlığında ince kesitle elde edildi. Kesitler 200-300 gözenekli bakır gridlere alınarak %70'lik etil alkolde doymuş uranil asetat ve Reynolds'un kurşun sitrat solüsyonları ile boyandı. Jeol JEM 1400 Transmisyon elektron mikroskobu ile incelendi.

3.3. Işık mikroskobi yöntemleri

Işık mikroskobik incelemeler için alınan doku parçaları, %10'luk tamponlu nötral formalin içerisine alındı ve doku parçaları oda ısısında 48-72 saat süreyle tespit edildi. Daha sona formalinin uzaklaştırılması amacıyla dokular su ile yıkandı ve Leica ototeknikon otomatik doku takip cihazı ile rutin doku takipleri yapıldı. Bloklama işlemini takiben 5 µm kalınlığında alınan parafin kesitler, Hematoksilen-Eozin boyası ile boyandı ve ışık mikroskobunda incelendi. Bloklardan ayrıca immünohistokimyasal incelemeler için de doku kesitleri alındı ve uygun yöntemlerle hazırlandı.

3.4. İmmünohistokimyasal yöntemler

Tümor nekroz faktor alfa ve monosit kemotaktik protein 2 aktivitesinin belirlenmesi amacı ile elde edilen histolojik kesitler, polilizin kaplı lamlar üzerine alındı. Buzdolabında bekletilen kesitler işaretleme işlemine geçilmeden önce fön ile kurutulup tekrar buzdolabına alındı ve 15 dakika kadar bekletildi. Buzdolabından çıkarıldıktan sonra tekrar fön makinesi ile kurutuldu ve 60 °C'de etüvde ksilol içerisinde 15 dakika deparafinize edildi. Daha sonra kesitler oda ısısında ksilol serilerinden geçirildi ve derecesi giderek azalan alkol serileri içerisinde hidrate edildi ve distile su içerisine alındı.

Kesitler daha sonra, EDTA solüsyonu içerisinde mikrodalga fırında, 12-15 dakika süreyle tutularak antijen toplanması işlemi gerçekleştirildi. Oda ısısında 45 dk soğutulan kesitler, distile suda çalkalandı ve %3'lük Hidrojen peroksit (H_2O_2) içerisine alındı. H_2O_2'te yaklaşık 6 dk kadar bekletildikten sonra, kesitler,

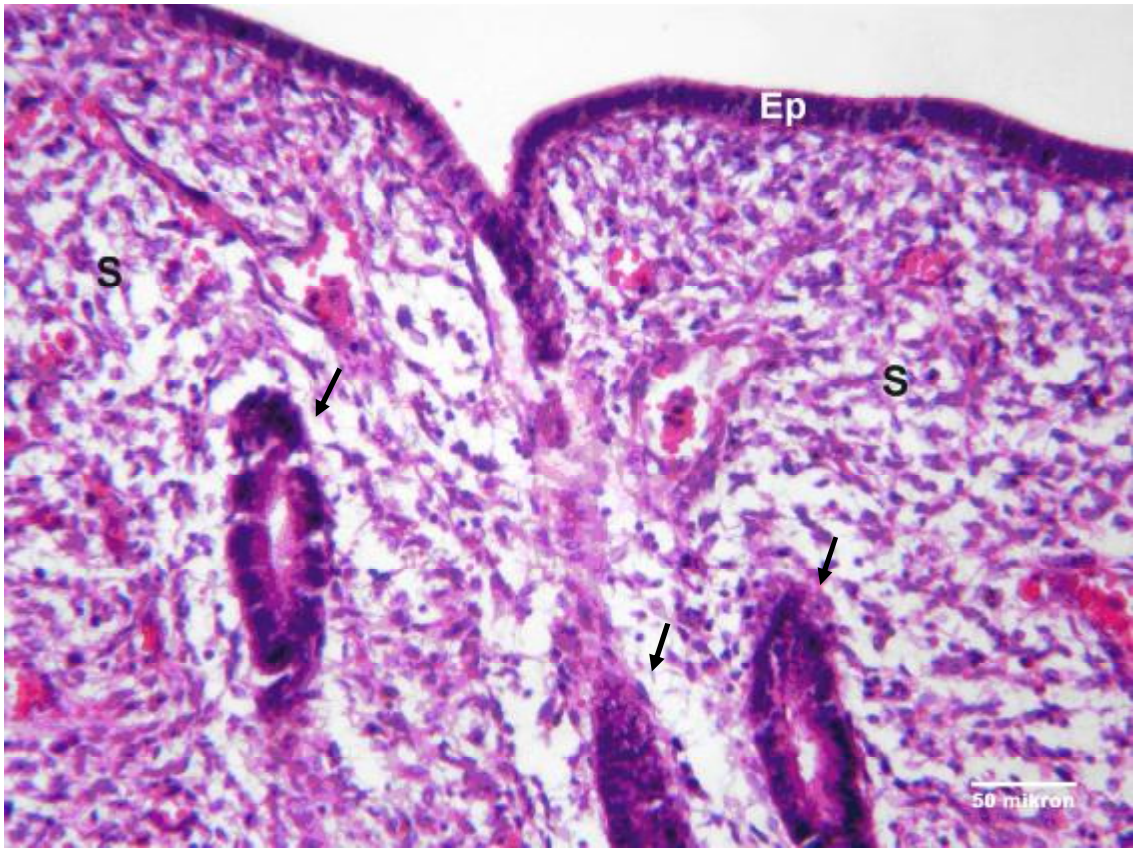
saf su ve fosfat tamponundan (PBS, pH: 7,2-7,4) geçirildi. Her bir kesitin etrafı dikkatlice silinip, kurulandıktan sonra, üzerine nonspesifik bağlanmayı engellemek amacıyla serum damlatıldı ve oda ısısında, nemli ortamda 10 dakika bekletildi. Ardından, kesitler üzerindeki solüsyon dökülerek, dokuların etrafı kurulandı ve 1/400 oranında sulandırılan, anti-MCP-2 (MCP-2; anti-human rabbit polyclonal antibody, LS-C5476, Lifespan, USA) ve anti-TNF-α (TNF-α; anti-human rabbit poyclonal antibody, ab6671, Abcam, USA) ve anti-CD68 (CD68, monoclonal mouse anti-human, M0876, Dako, Denmark) primer antikorları damlatıldı. Anti-TNF-α antikoru damlatılan kesitler +4°C'de, nemli ortamda bir gece bekletildi. Anti-MCP-2 antikoru damlatılan kesitler, 1-1,5 saat oda ısısında nemli ortamda bekletildi. Negatif kontrol için alınan kesitlere primer antikorlar yerine, tampon solüsyonu damlatıldı. Primer antikorla muamele edildikten sonra, kesitler distile su ve PBS'den geçirildi ve ardından, üzerlerine Biotin (D01-125, Lifespan, USA) damlatılarak 30 dk süreyle oda ısısında tutuldu. Takiben distile su ve PBS'de çalkalandı ve kesitlerin etrafı kurulandıktan sonra Avidin (D01-125, Lifespan, USA) damlatılalarak, 30 dakika süreyle oda ısısında bekletildi. Distile su ve PBS'den geçirilen kesitler üzerine, Aminoetilkarbozol (AEC) solüsyonu damlatıldı ve 10 dakika bekletildi, çeşme suyu içerisinde yıkandı ve doku kesitleri, zıt boyama için hematoksilen ile boyandı ve ardından çeşme suyunda yıkanarak kurumaya bırakıldı. Su bazlı kapama maddesi damlatılarak dokular lamel ile kapatıldı ve Olimpus BX51 ışık mikroskobu ile incelendi ve fotografları çekildi.

4. BULGULAR

4.1. Histolojik Bulgular

4.1.1. Kontrol endometriyum

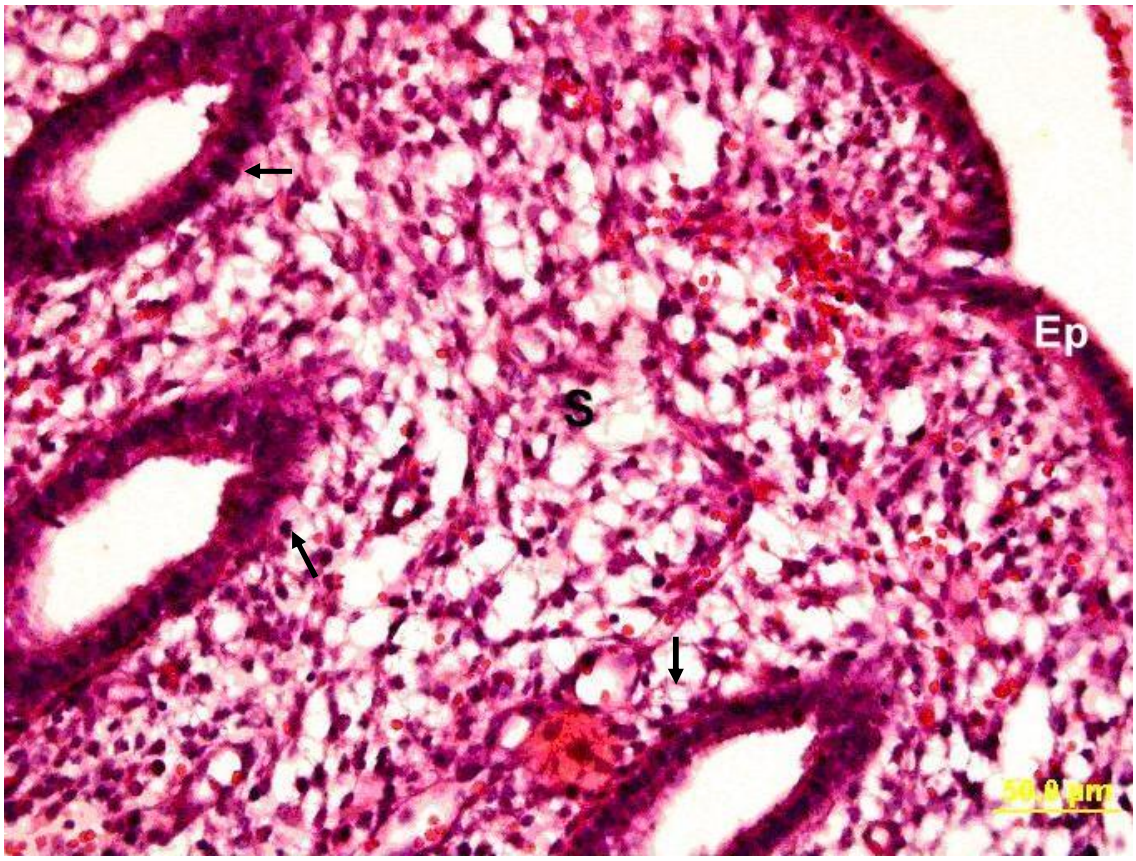
Kontrol hastalarından elde edilen endometriyumlarının ışık mikroskobik incelenmesinde, endometriyumun tipik yüzey epiteli, endometriyal bezler ve stromadan oluştuğu gözlendi. Yüzey epiteli prizmatik tipte olup, hücrelerin lümene bakan, apikal yüzeylerinde mikrovillus ve silyumlar ayırt edilmekteydi. Endometriyal bezler, prizmatik tipte bez epiteli ile döşeliydi ve stroma derinlerine doğru uzanmaktaydı. Endometriyal stroma, stromal hücreler, makrofajlar, bağ dokusu lifleri ile kan damarlarını içermekteydi (Şekil 1).



Şekil 1: Kontrol endometriyumun ışık mikroskobik görünümü. Endometriyumun, yüzey epiteli (Ep), endometriyotik bezler (oklar) ve stromadan (S) oluştuğu izlenmektedir (H&E).

4.1.2. Ötopik endometriyum

Endometriyozisli hastaların uterus endometriyumlarından elde edilen ötopik endometriyum dokularının ışık mikroskobik görünümü kontrol endometriyumlara benzemekteydi. Endometriyum, kontrol grubunda olduğu gibi yüzey epiteli, bez epiteli ve stromadan oluşmaktaydı. (Şekil 2).

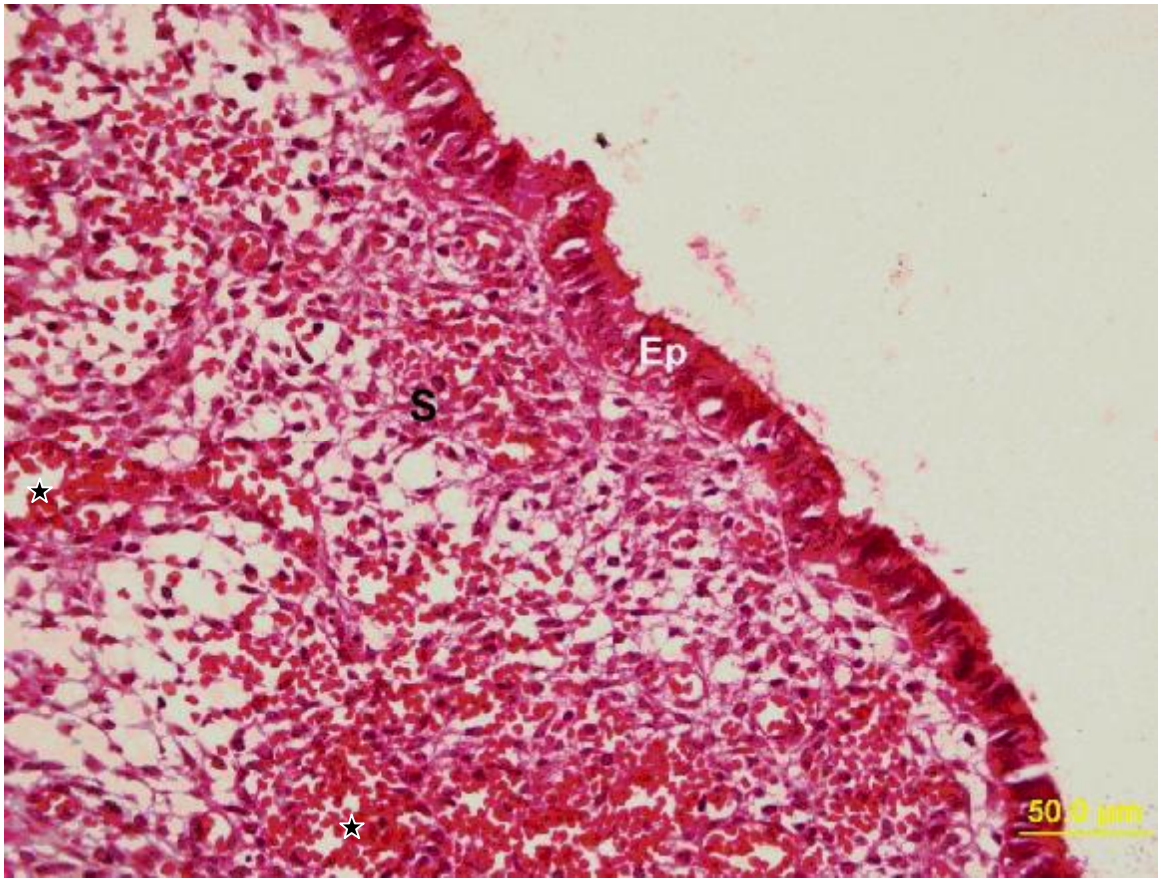


Şekil 2: Ötopik endometriyumun ışık mikroskobik görünümü. Endometriyumda yüzey prizmatik epiteli (Ep), endometriyotik bezler (oklar) ve stroma (S) izlenmektedir (H&E).

4.1.3. Ektopik endometriyum

Ovaryan endometriozisli hastalardan elde edilen, endometriyotik dokuların ışık mikroskobik incelenmesinde, dokunun yüzey epiteli ve altında yer alan stromadan oluştuğu izlenmekteydi. Endometriyotik dokularda sınırlı alanlarda, bez yapılarına benzer invaginasyonlar gözlense de, genellikle belirgin bir bez oluşumuna rastlanmadı. Epitel ve altında bulunan stroma alttan yoğun fibröz bir

doku ile çevrelenmişti. Endometriyotik dokuda normal ve ötopik endometriyuma göre doku kalınlığı oldukça incelmişti. Stromada oval veya yuvarlak çekirdekleriyle karakterize stromal hücreler ile makrofajlar yer almaktaydı. Ektopik endometriyumda, subepiteliyal alanlarda ve stroma derinlerinde makrofaj sayılarında belirgin bir artışın varlığı dikkati çekmekteydi. Ayrıca, stroma içerisinde, geniş kapiller damarlar ve yaygın ödematöz alanların varlığı da izlendi (Şekil 3).



Şekil 3: Ektopik endometriyumun ışık mikroskobik görünümü. Endometriyumda yüzey prizmatik epiteli (Ep) ve altında yer alan stroma (S) izlenmektedir. Stromada yaygın kan damarları (★) ve ödematöz alanlar dikkati çekmektedir (H&E).

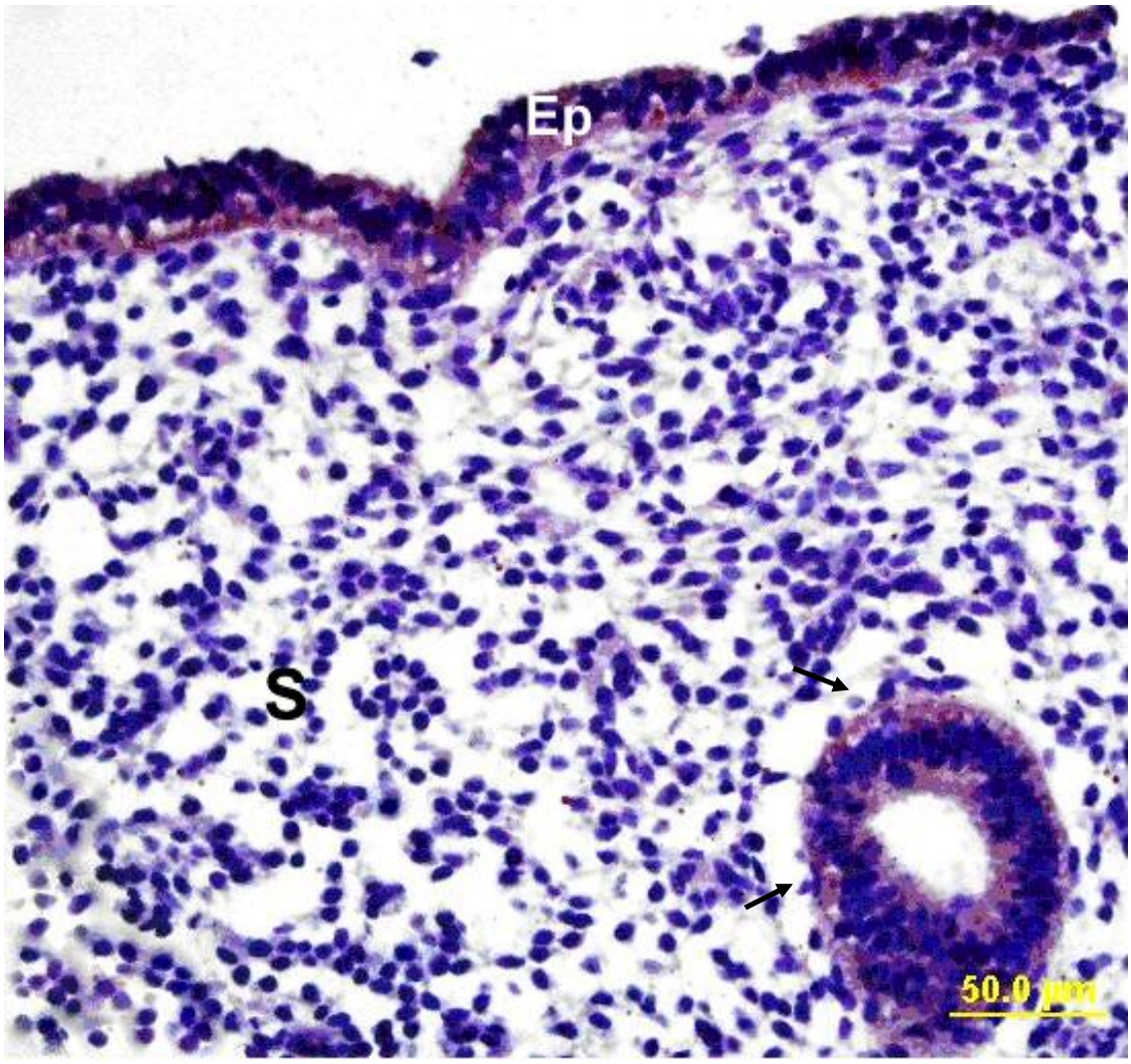
4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular

4.2.1. Kontrol endometriyum

4.2.1.1.TNF-α

Kontrol grubundan elde edilen endometriyum doku örneklerinde, TNF-α işaretlemesinde, yüzey epiteli hücrelerinin sitoplazmalarında, zayıftan orta

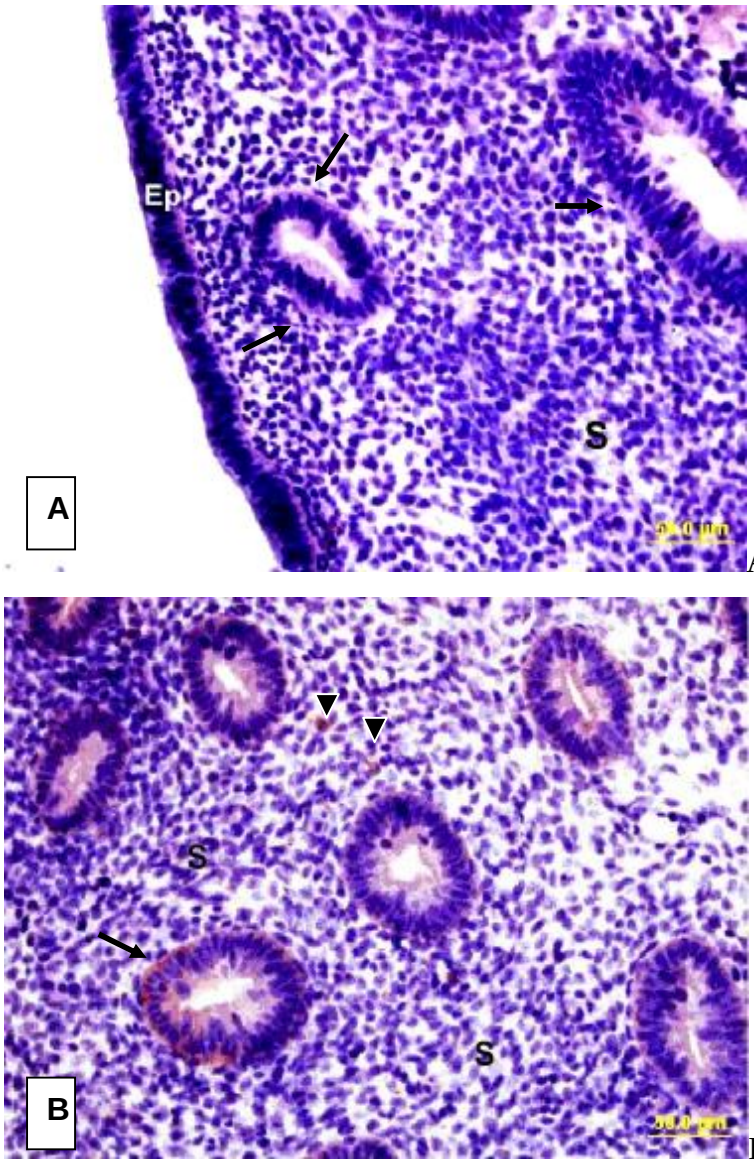
dereceye kadar değişen düzeylerde TNF-α immünoreaktivitesi gözlendi. Bez epitel hücrelerinde de, yüzey epiteline oranla daha zayıf olmak üzere, TNF-α ekspresyonu hücre sitoplazmalarında tespit edildi. Bununla birlikte, stromal hücrelerde belirgin bir boyanmaya rastlanmadı (Şekil 4).



Şekil 4: Kontrol endometriyumda TNF-α immünoreaktivitesi. Yüzey epiteli (Ep) ve bez epitel hücre (oklar) sitoplazmalarında TNF-α immünoreaktivitesi izlenmekle birlikte stromal hücrelerde (S) belirgin bir reaktivite görülmemektedir.

4.2.1.2. MCP-2

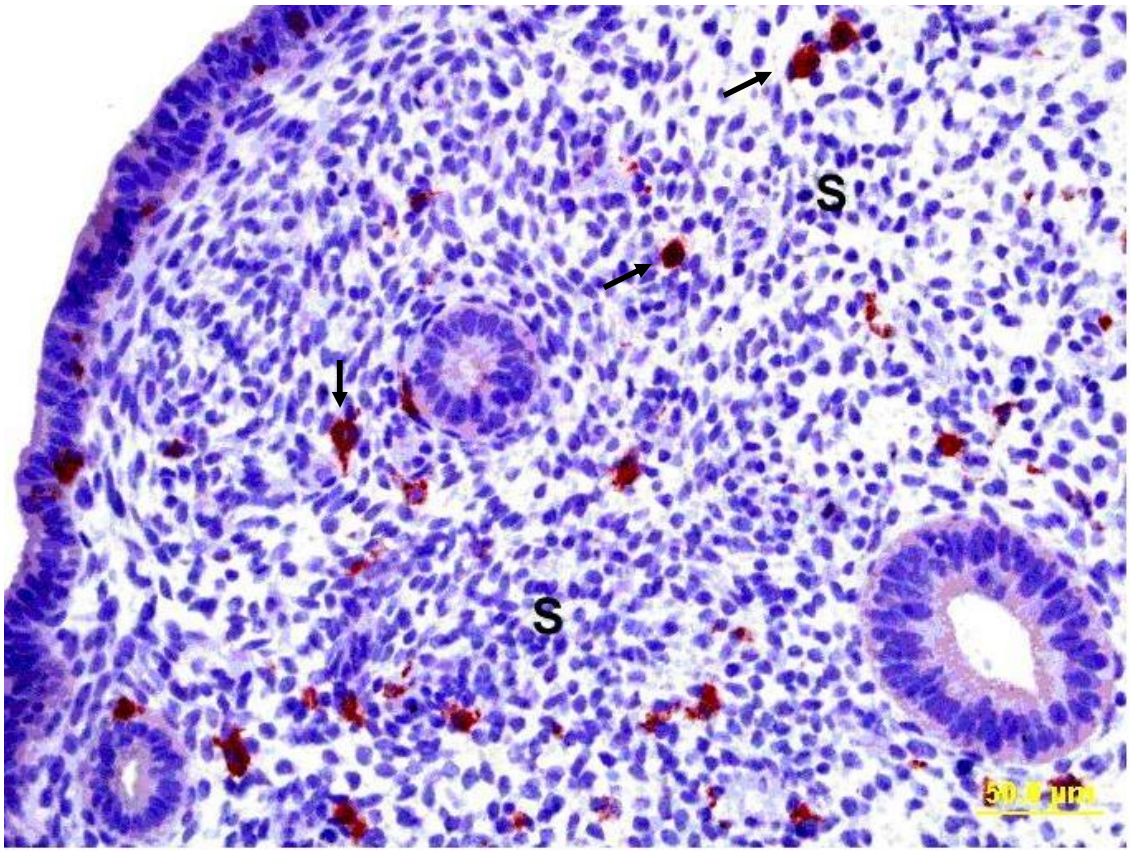
Kontrol grubu örneklerinde endometriyum yüzey epitelinde MCP-2 ekspresyonu, bazı alanlarda zayıf şekilde izlenmiş olmakla birlikte, çoğu alanlarda belirgin bir boyanma gözlenmedi. Bez epitelinde yüzey epiteline benzer şekilde, hücrelerin bazal ve apikal sitoplazmalarında zayıf olarak MCP-2 boyanması görüldü. Stromada yer alan makrofajlarda MCP-2 ekspresyonunun belirgin olduğu izlenmekle birlikte, stromal hücrelerde belirgin bir boyanma gözlenmedi. (Şekil 5).



Şekil 5: Kontrol endometriyumda MCP-2 immünoreaktivitesi. A.Yüzey epiteli (Ep) ve bez epitelinde (oklar) MCP-2 immünoreaktivitesinin zayıf olarak işaretlendiği görülmektedir. B. Bez epitel hücrelerinde (oklar) ve stromada (S) yer alan makrofajlarda (okbaşı) hafif bir boyanmanın olduğu görülmektedir.

4.2.1.3.CD68

Kontrol grubundan elde edilen endometriyum örneklerinin CD68 ile işaretlenmesinde, subepiteliyal alanlarda ve stroma derinlerinde yer alan makrofajlarda belirgin bir boyanma gözlendi (Şekil 6).



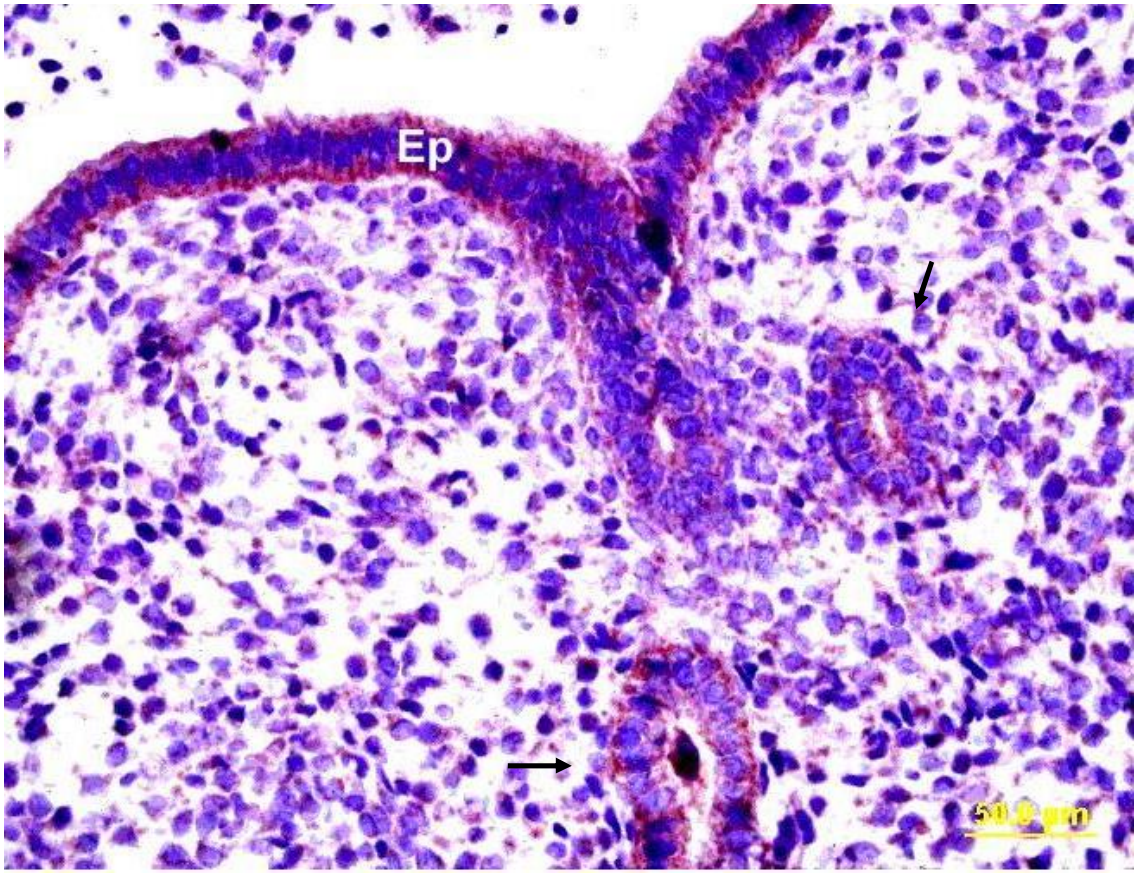
Şekil 6: Kontrol endometriyumda CD68 immünoreaktivitesi. Stromada (S) yer alan makrofajlarda belirgin CD68 işaretlenmesi gözlenmektedir (oklar).

4.2.2 Ötopik endometriyum

4.2.2.1.TNF-α

Ötopik endometriyumdan elde edilen doku örneklerinin TNF-α işaretlenmesinde, yüzey epiteli hücrelerinin apikal ve bazal sitoplazmalarında TNF-α boyanmasının belirgin olduğu dikkati çekti. Benzer işaretleme bez epitel

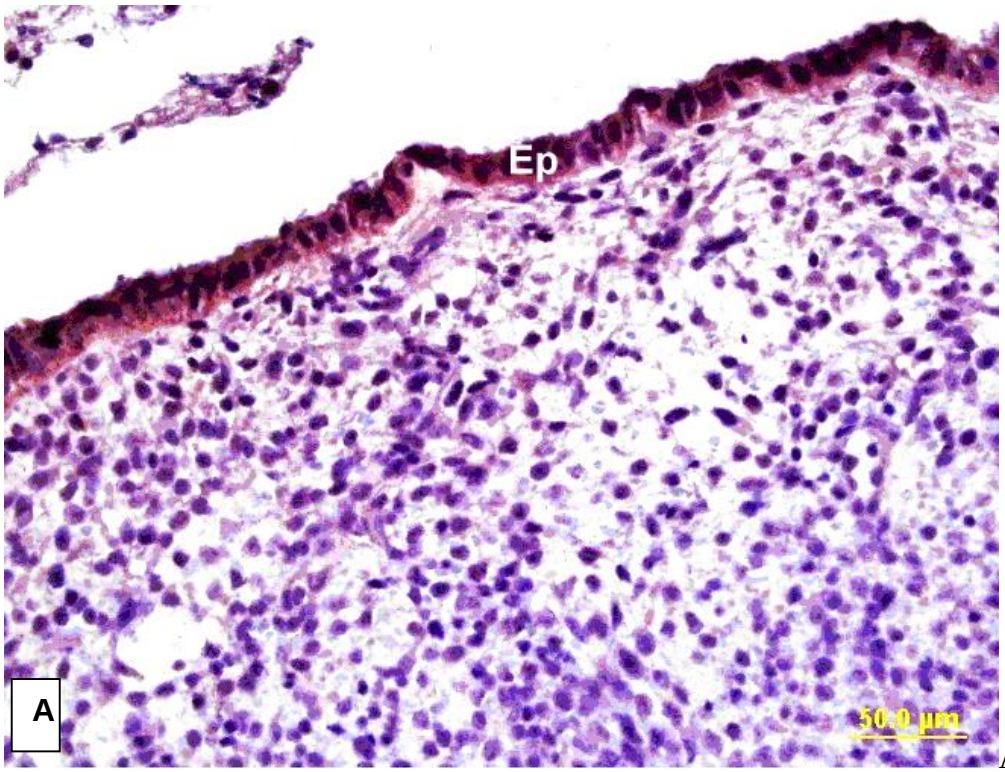
hücrelerinde de gözlendi. Bununla birlikte stromal hücrelerde belirgin bir boyanma gözlenmedi (Şekil 7).



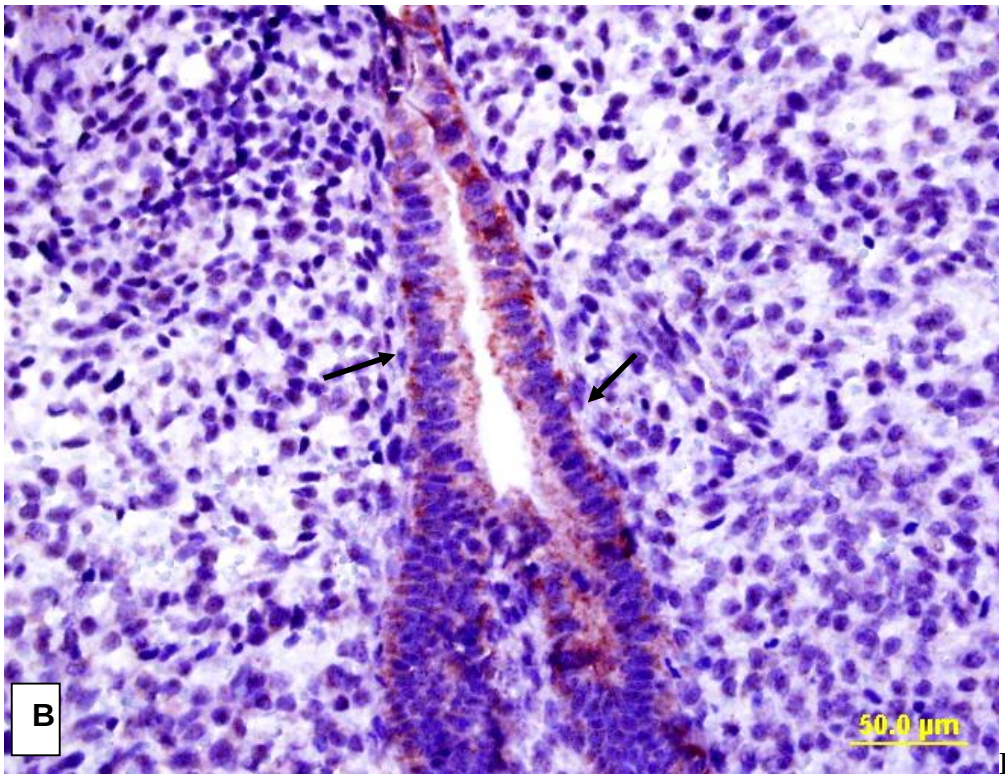
Şekil 7: Ötopik endometriyumda TNF-α immünoreaktivitesi. Yüzey epiteli (Ep) ve bez epitel hücrelerinde (oklar) TNF-α immünoreaktivitesi izlenmektedir.

4.2.2.2. MCP-2

Ötopik endometriyum örneklerinde MCP-2 ekspresyonu, yüzey epiteli ve bez epitel hücrelerinin sitoplazmalarında oldukça belirgindi. Ayrıca stromada yer alan makrofajlarda da MCP-2 boyanması izlendi. Bununla birlikte stromal hücrelerde belirgin bir boyanma kaydedilmedi (Şekil 8).



A

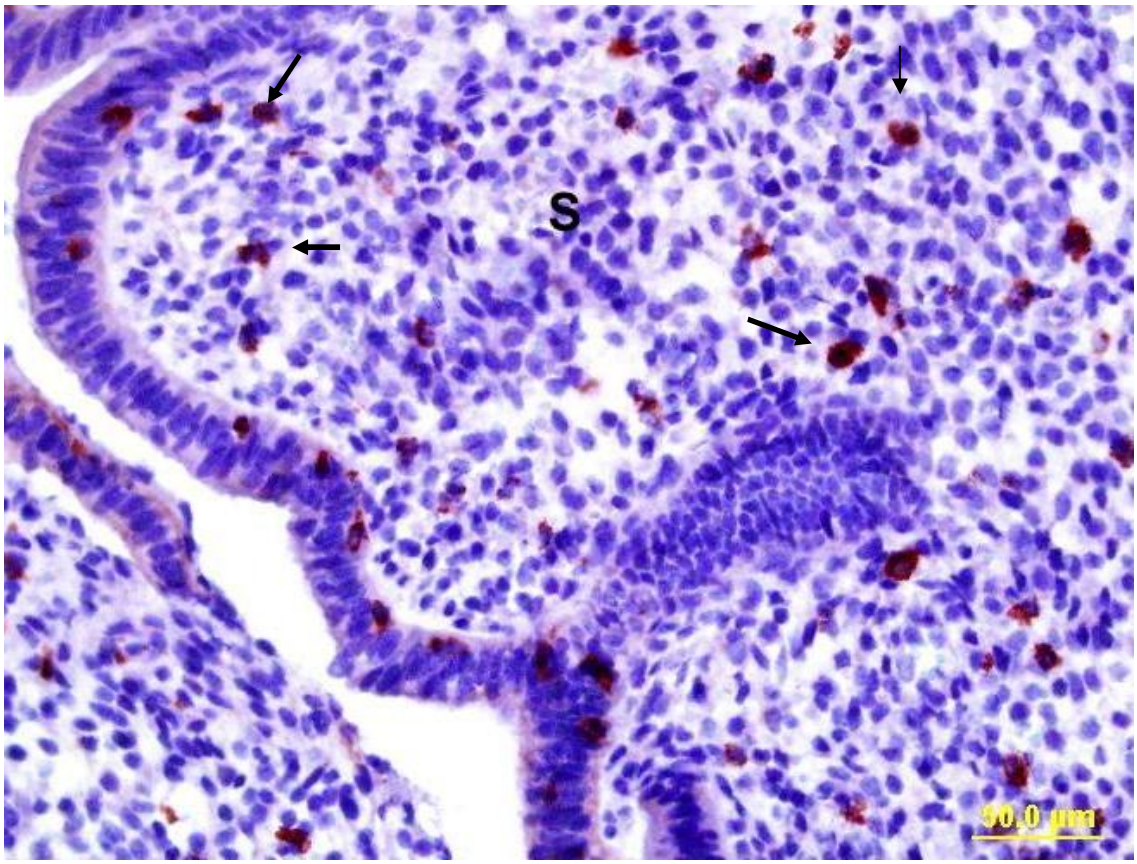


B

Şekil 8: Ötopik endometriyumda MCP-2 immünoreaktivitesi. A. Yüzey epitelinde (Ep) MCP-2 immünoreaktivitesinin belirgin olduğu izlenmektedir. B. Bez epitel hücrelerinde (oklar) boyanmanın nisbeten daha zayıf olduğu görülmektedir.

4.2.2.3.CD68

Ötopik endometriyum doku örneklerinin CD68 ile işaretlenmesi sonucunda, epitel altında ve stroma derinlerinde yer alan makrofajların sitoplazmalarında belirgin bir boyanma gözlendi (Şekil 9).



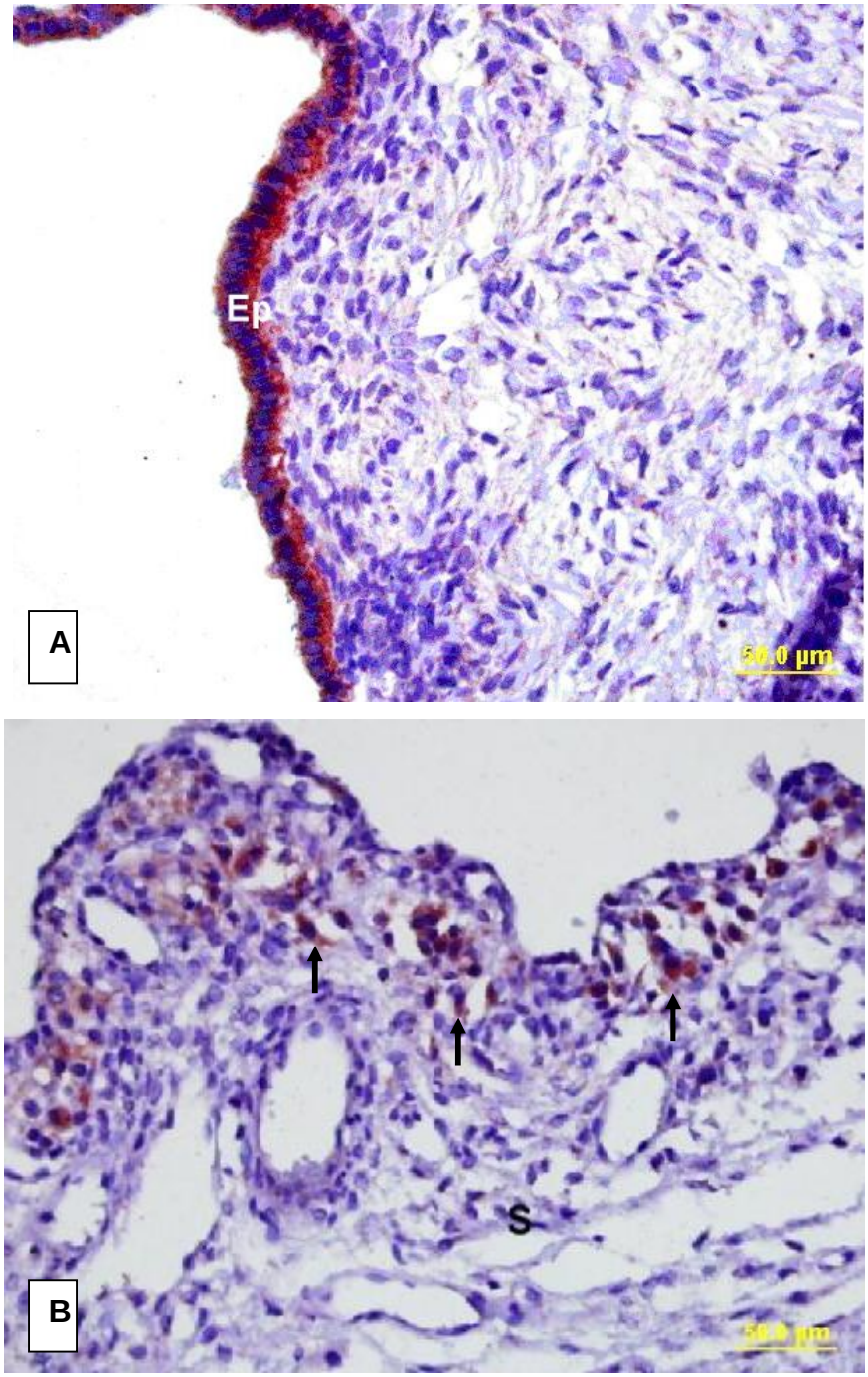
Şekil 9: Ötopik endometriyumda CD68 immünoreaktivitesi. Subepiteliyal alanlarda ve stromada (S) yer alan makrofajllarda (oklar) belirgin CD68 işaretlenmesi gözlenmektedir.

4.2.3. Ektopik endometriyum

4.2.3.1. TNF-α

Ektopik endometriyum doku örneklerinin TNF-α ile işaretlenmesi sonucunda, yüzey epiteli hücrelerinin sitoplazmalarında güçlü bir boyanmanın olduğu dikkati çekti. Yüzey epiteli altında bulunan makrofajlarda belirgin bir

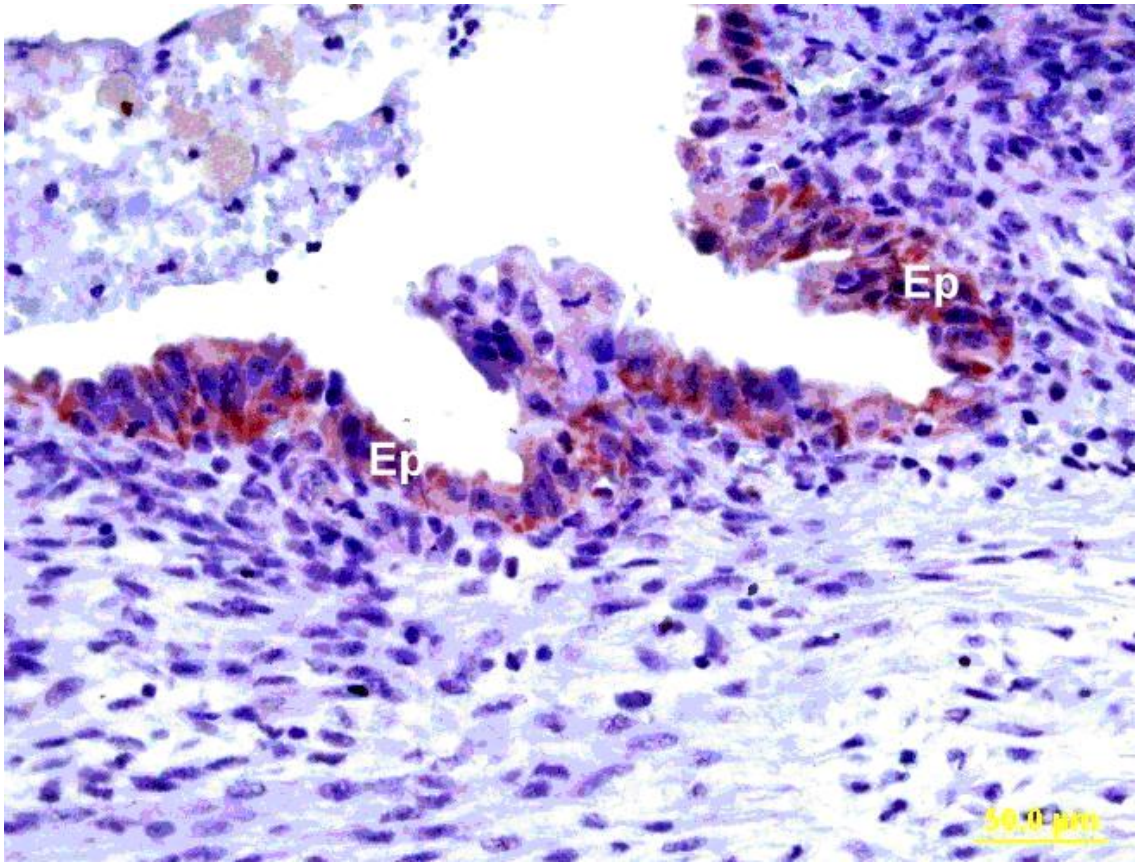
TNF-α ekspresyonu gözlenmiş olsa da, stromal hücrelerde belirgin bir TNF-α işaretlenmesi izlenmedi (Şekil 10).



Şekil 10: Ektopik endometriyumda TNF-α immünoreaktivitesi. A. Yüzey epitelinde belirgin işaretlenme izlenmektedir. B.Stroma (S) derinlerinde yer alan makrofajlarda belirgin TNF-α immünoreaktivitesi görülmektedir (oklar).

4.2.3.2. MCP-2

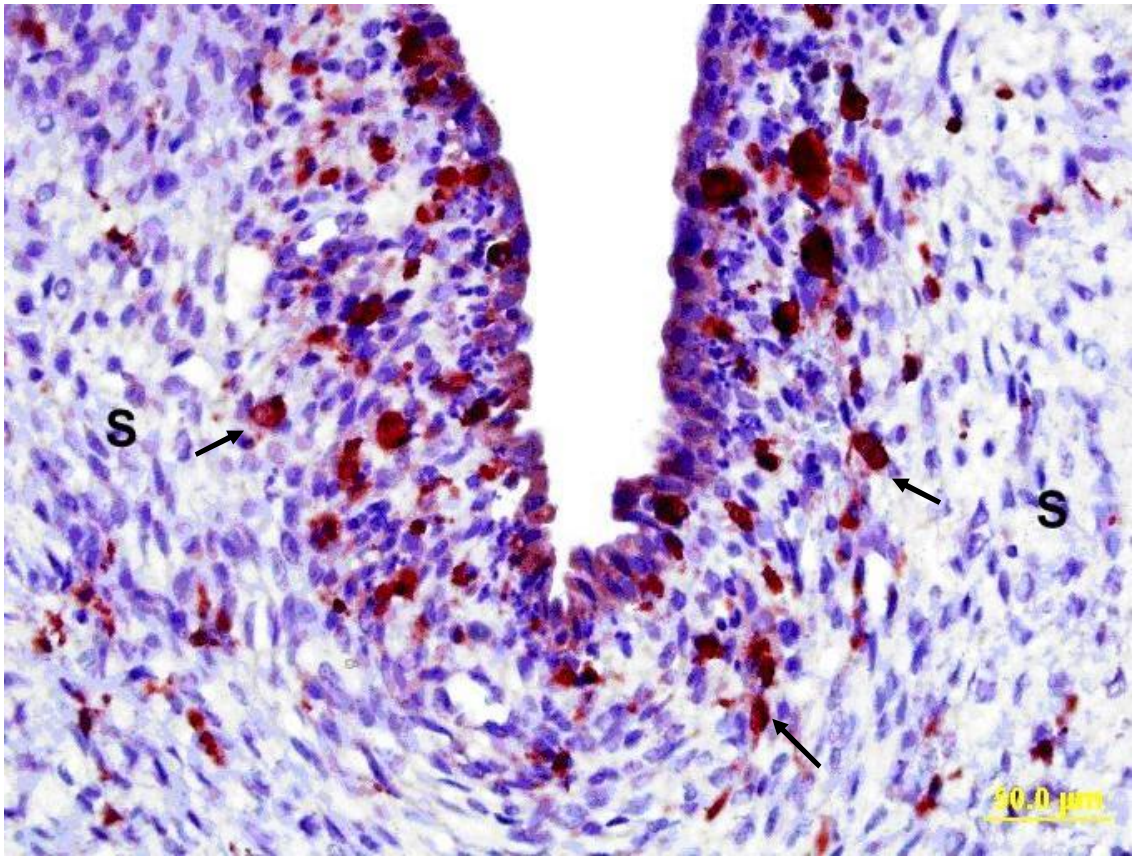
Ektopik endometriyuma ait yüzey epitelinde, zayıftan-orta dereceye kadar değişen seviyelerde, MCP-2 boyanmasının varlığı gözlendi. MCP-2'nin epitel hücrelerinin bazal sitoplazmalarında eksprese olması dikkati çekti. Stromal hücrelerde belirgin bir boyanma gözlenmemekle beraber, makrofajlarda MCP-2 ekspresyonun zayıf olarak işaretlendiği bulundu (Şekil 11).



Şekil 11: Ektopik endometriyumda MCP-2 immünoreaktivitesi. Yüzey epitelinde (Ep) MCP-2 immünoreaktivitesinin belirgin olduğu dikkati çekmektedir.

4.2.3.3. CD68

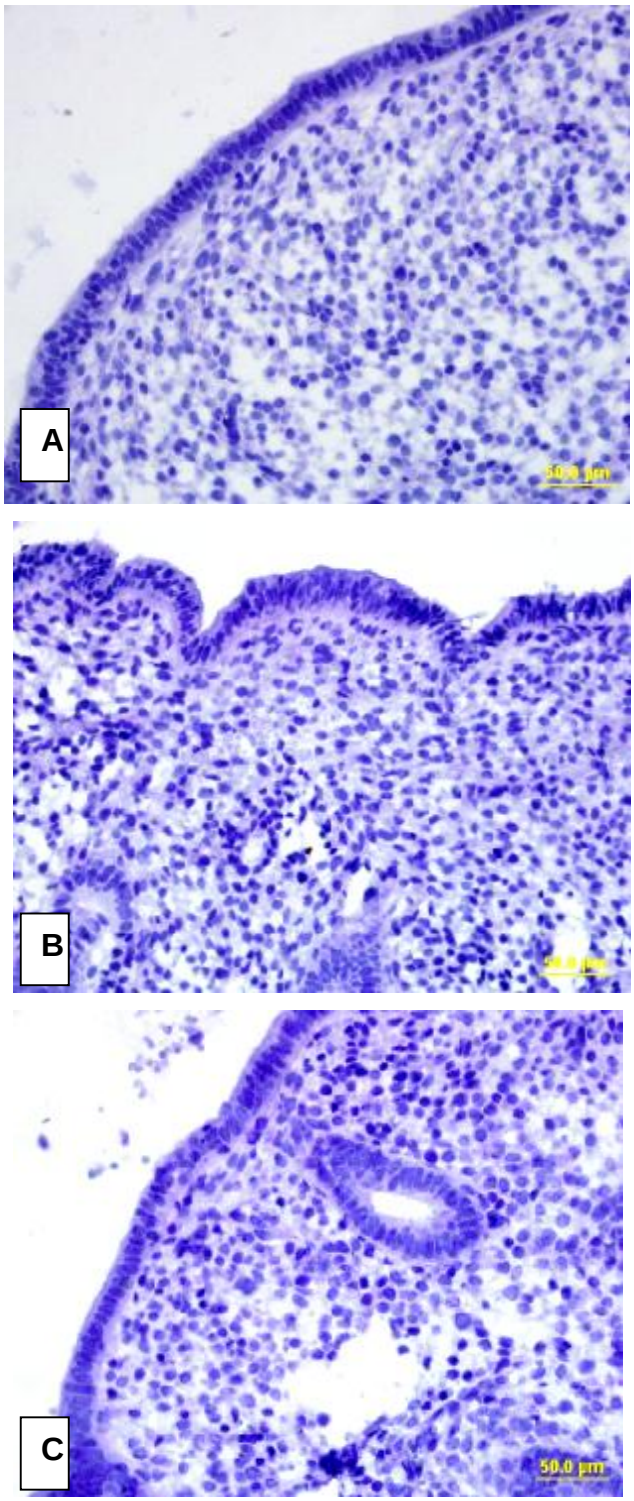
Ektopik endometriyum biyopsi örneklerinin CD68 ile işaretlenmesinde subepitelyal alanlarda ve stroma derinlerindeki makrofajlarda belirgin CD68 boyanması gözlendi. Bazı alanlarda makrofajların büyük gruplar halinde bir arada bulunmaları dikkati çekmekteydi(Şekil 12).



Şekil 12: Ektopik endometriyumda CD68 immünoreaktivitesi. Subepiteliyal alanlarda ve stromada (S) yer alan makrofajlarda CD68 işaretlenmesinin çok belirgin olduğu izlenmektedir (oklar).

4.2.4. Negatif kontroller

Primer antikorların damlatılmadığı negatif kontrol örneklerinde, her üç grupta da, yüzey epiteli, stroma ve bez epitelinde herhangi bir işaretlenme gözlenmedi. (Şekil 13).

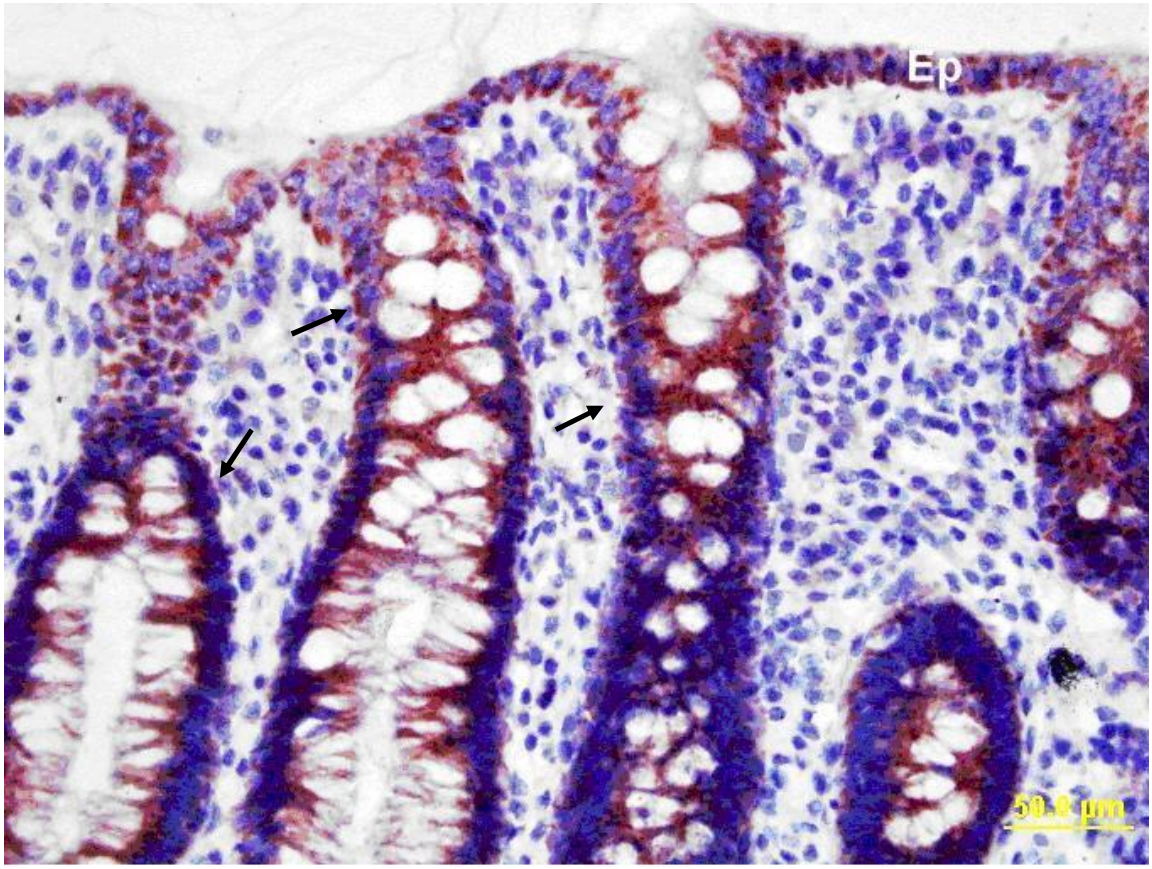


Şekil 13: Negatif kontroller. A.TNF-α, B. MCP-2 ve C. CD68 primer antikorlarının damlatılmadığı negatif kontrol kesitlerinde herhangi bir immünoreaktivite izlenmemektedir.

4.2.5. Pozitif kontroller

4.2.5.1. TNF- α

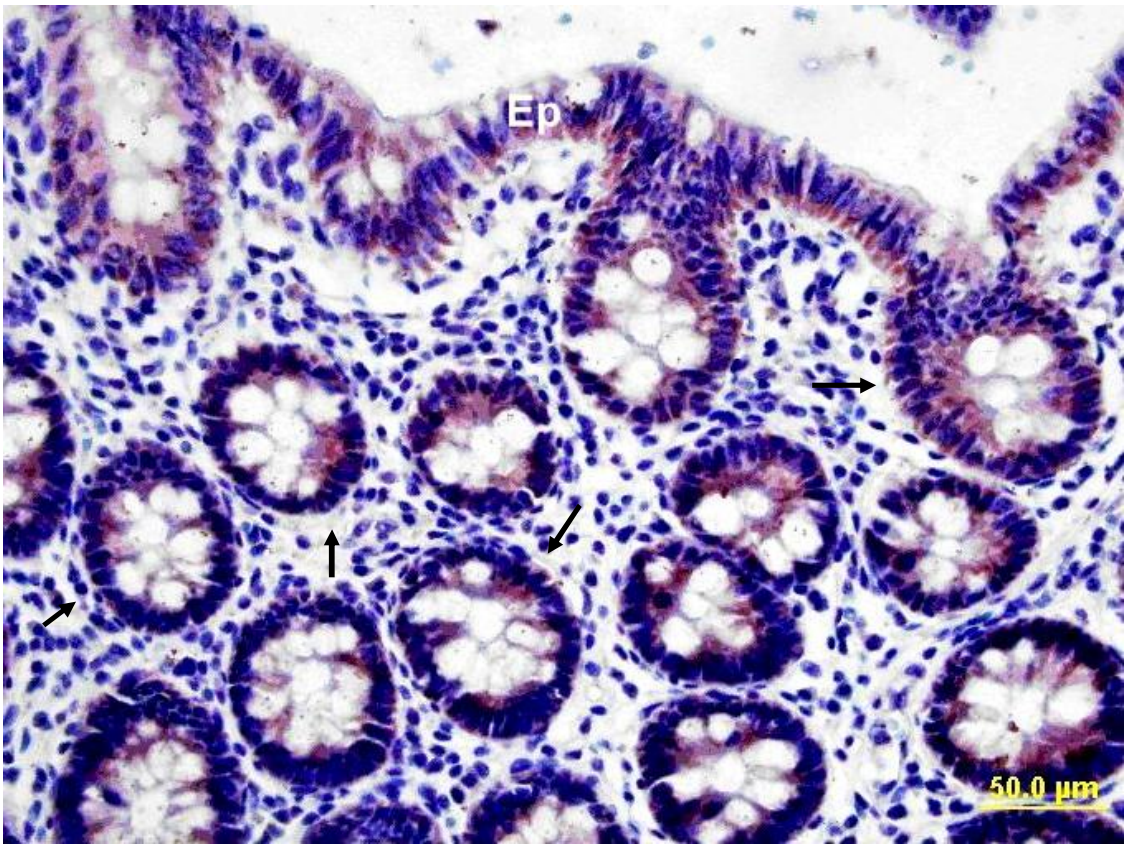
İnsan kalın barsak biyopsisinde pozitif kontrol amacıyla TNF-α işaretlemesi yapıldı. Kolonda TNF-α'nın, yüzey epiteli ve kripta epitel hücrelerinde belirgin olarak işaretlendiği gözlendi (Şekil 14).



Şekil 14: Pozitif kontrol. İnsan kalın barsağında, TNF-α'nın, yüzey epiteli (Ep) ve kripta epitel (oklar) hücrelerinde belirgin olduğu görülmektedir.

4.2.5.2. MCP-2

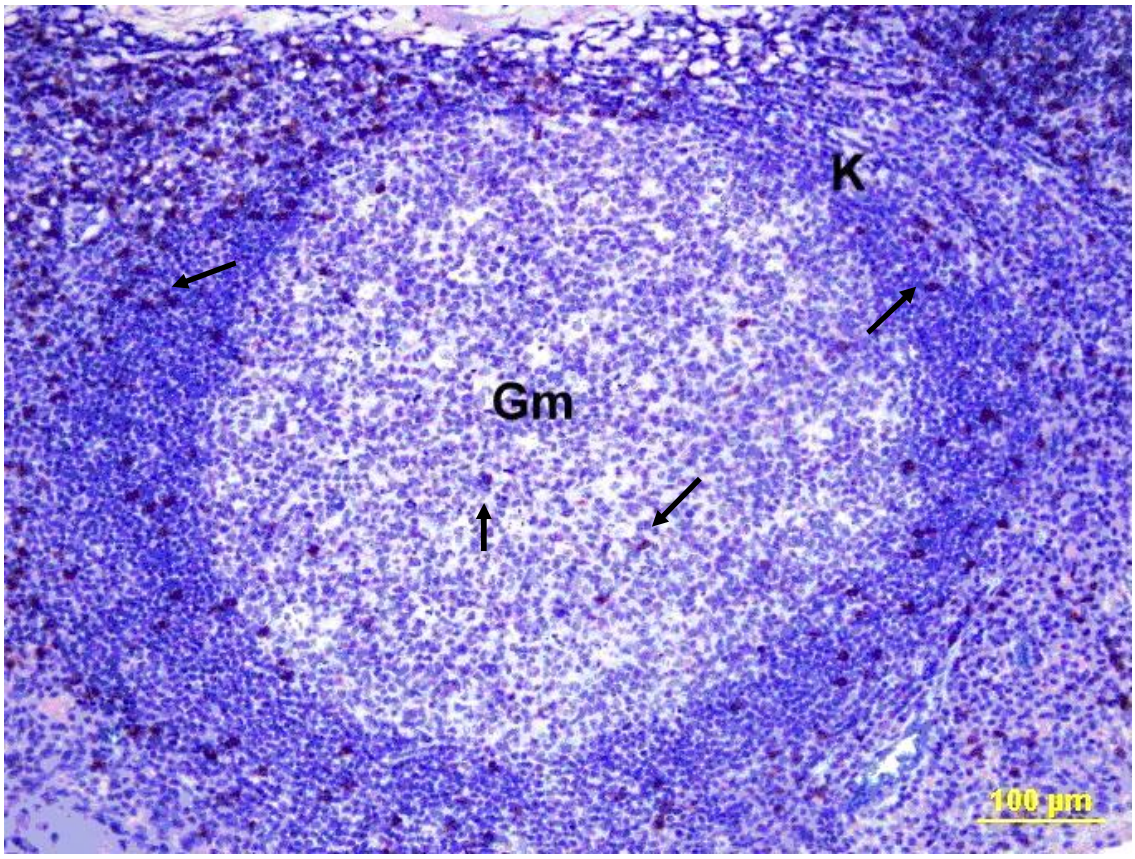
İnsan kolon epitelinde pozitif kontrol amacıyla yapılan boyamada, MCP-2 ekspresyonunun yüzey epiteli ve kripta epitelinde orta dereceli olarak, özellikle apikal ve bazal sitoplazmada belirgin olduğu izlendi (Şekil 15).



Şekil 15: Pozitif kontrol. İnsan kalın barsağında, MCP-2'nin yüzey epiteli (Ep) ve kripta epitel hücrelerinde (oklar) belirgin olduğu görülmektedir.

4.2.5.3. CD68

İnsan lenf düğümünden elde edilen biyopsi örnekleri CD68 için pozitif kontrol olarak değerlendirildi. Bu amaçla yapılan boyamada, lenf folliküllerinin korteks ve germinal merkezlerinde yer alan makrofajlarda belirgin CD68 reaktivitesi gözlendi (Şekil 16).



Şekil 16: Pozitif kontrol. İnsan lenf düğümünde, follikül germinal merkezi (Gm) ve korteksinde (K) yer alan makrofajlarda belirgin CD68 immünreaktivitesi görülmektedir (oklar).

4.3. Elektron Mikroskobik Bulgular

4.3.1. Kontrol endometriyum

Kontrol grubundan elde edilen endometriyum örneklerinde, yüzey epitelinin uzun prizmatik hücrelerden oluştuğu, hücrelerin lümene bakan apikal yüzeylerinde çok sayıda mikrovilluslar ve silyumlara sahip oldukları görülmekteydi.

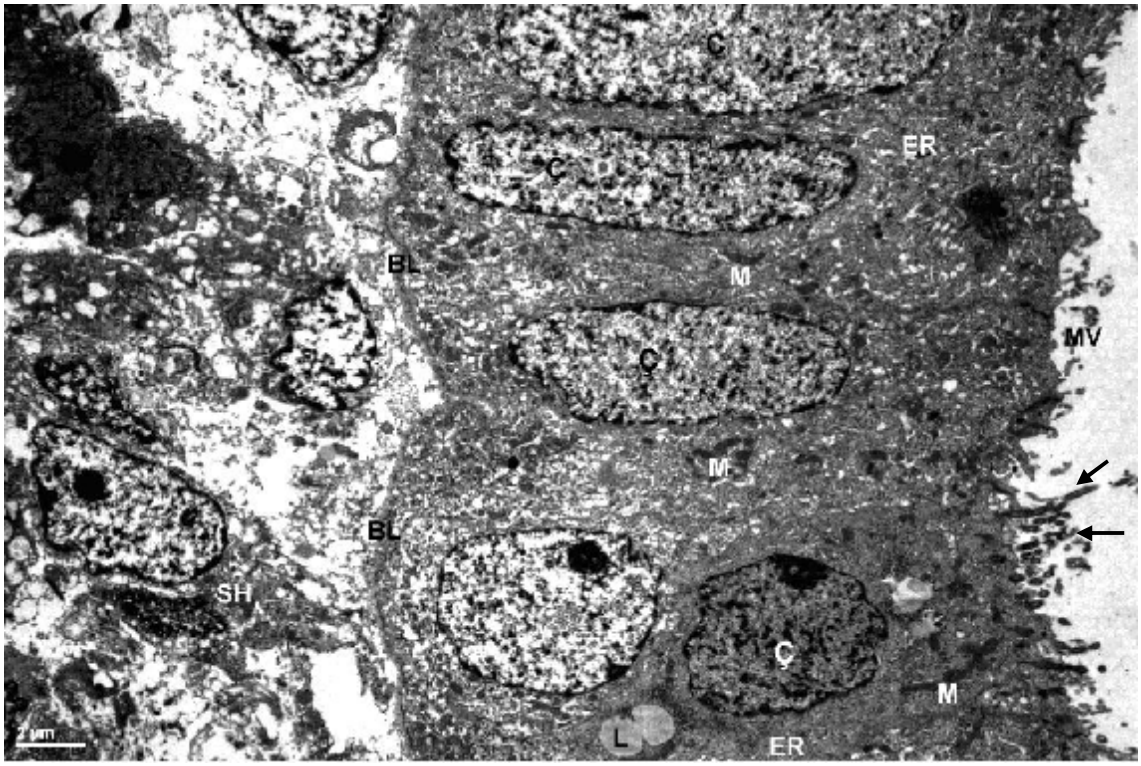
Mikrovilluslu hücrelerde, apikal yüzeyde pek çok mikrovillusun lümene doğru uzandığı, lateral yüzeylerde, silyalı ve mikrovilluslu hücrelerin, sıkı bağlantılarla birbirlerine bağlı oldukları gözlenmekteydi. Lateral yüzeylerde ayrıca desmozom benzeri bağlantı komplekslerinin varlığı da ayırt edilmekteydi. Hücrelerin yaklaşık olarak orta hat hizasında oval ya da yuvarlak bir adet çekirdeğe sahip oldukları izlendi. Çekirdek içerisinde kromatin dağılımı genellikle homojendi ve bir veya birden fazla çekirdekçik bulunmaktaydı. Bazı bölgelerde çekirdek kılıfına yakın heterokromatik alanlar da ayırt edilmekteydi. Hücrelerin sitoplazmalarında çok sayıda ince uzun mitokondriyonlar, granüler endoplazmik retikülüm (GER) sisternaları, dağınık halde bulununan serbest ribozomlar ve az miktarda glikojen partikülleri de gözlenmekteydi. Bazı alanlarda bir kaç lipid damlacığının varlığı da izlendi.

Silyalı hücreler, apikal yüzeylerinde çok sayıda silyumlara sahipti. Bu hücreler, özellikle apikal yüzde, mikrovilluslu hücreler ve diğer silyalı hücrelerle, bağlantı kompleksleriyle birbirlerine bağlanmışlardı. Hücrelerin sitoplazmalarında mikrovilluslu hücrelerde olduğu gibi, ince, uzun mitokondriyonlar yer almaktaydı. Mitokondriyonların özellikle apikal sitoplazmada yoğunlaştıkları dikkat çekti. Hücre sitoplazmalarında ayrıca GER sisternaları, serbest ribozomlar ve az miktarda glikojen partikülleri de ayırt edilmekteydi (Şekil 17).

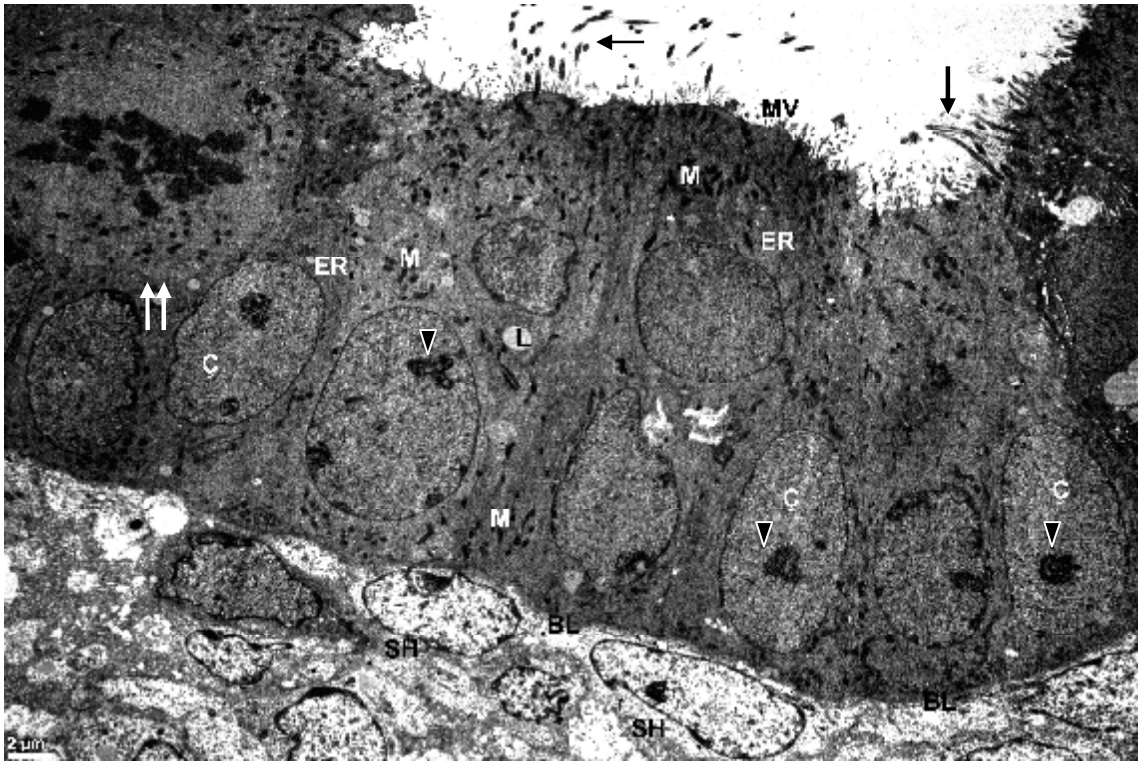
Endometriyal bezlerde de yüzey epiteline benzer şekilde mikrovilluslu ve silyalı olmak üzere iki tip hücre ayırt edildi. Bez hücreleri prizmatik tipte olup apikal yüzeylerinde birbirlerine sıkı bağlantılarla bağlanmışlardı. Bez hücrelerin apikalinden lümene doğru mikrovilluslar ve silyumlar uzanmaktaydı. Bez

epitelinde çoğunlukla mikrovilluslu hücrelerin yer aldığı dikkati çekmekteydi. Bez epiteli hücrelerinin, bazale yakın, oval bir çekirdeğe sahip oldukları, çekirdek içerisinde belirgin bir çekirdekçiğin varlığı gözlenmekteydi. Sitoplazmada mitokondriyonlar, GER sisternaları, lipid damlacıkları ve glikojen partikülleri izlenmekteydi. Epitel hücreleri stromaya komşu yüzde bir bazal lamina üzerine oturmuştu. Bazal lamina oldukça ince olup, stromal yüzeyde kollajen lifler ile desteklenmişt. Bez epiteli içerisinde yer yer mitotik figürlerin varlığı da ayırt edilmekteydi (Şekil 18).

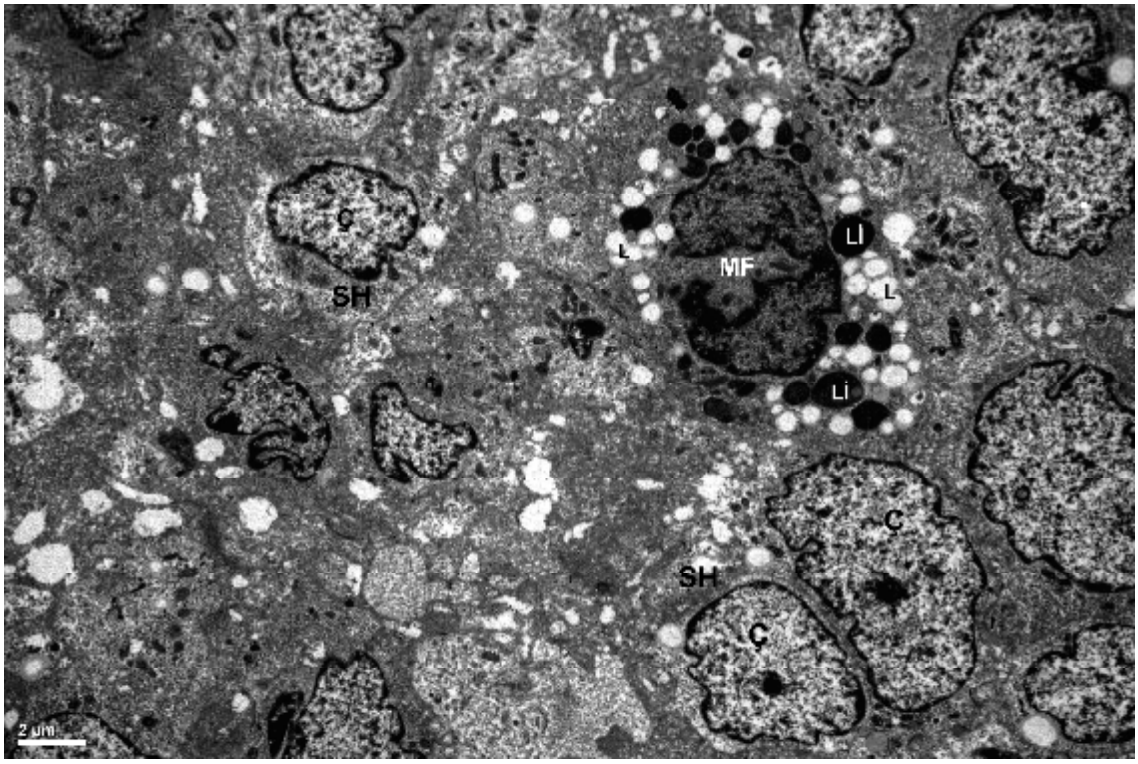
Endometriyal stroma içerisinde oval ya da yuvarlak çekirdeğe sahip stromal hücreler yer almaktaydı. Stromal hücrelerin çekirdekleri ökromatik görünümde olup, çekirdek içerisinde bir adet çekirdekçiğin varlığı izlenmekteydi. Çekirdek kılıfı yer yer çekirdek içerisine doğru indentasyonlar göstermekteydi. Stromal hücrelerin sitoplazmalarında az sayıda mitokondriyonlar, GER sisternaları, birkaç lipid damlacığı ve glikojen partikülleri ayırt edilmekteydi. Stromada ayrıca makrofajların varlığı da gözlendi. Makrofajlar sitoplazmalarında lizozomlar, lipid damlacıkları ve fagozomlar yer almaktaydı. Bunlara ilaveten stromada, kan damarları ve bağ dokusu lifleri de ayırt edildi (Şekil 19).



Şekil 17: Kontrol endometriyumunun elektron mikroskobik görünümü. Endometriyum yüzey epitelinin uzun prizmatik hücrelerden oluştuğu, hücrelerin lümene bakan apikal yüzeylerinde çok sayıda mikrovillus (MV) ve silyumlara (Oklar) sahip oldukları görülmektedir. Epitel hücrelerinde, çekirdek (Ç), sitoplazmada mitokondriyonlar (M), GER sisternaları (ER) ve lipid damlacıkları (L) gözlenmektedir. Epitelin altında, stromal hücreler (SH) ve bazal lamina (BL) görülmektedir.



Şekil 18: Kontrol endometriyumunun elektron mikroskobik görünümü. Endometriyal bez epitelinin prizmatik hücrelerden oluştuğu, hücrelerin lümene bakan yüzeylerinde mikrovillus (MV) ve silyumlara (oklar) sahip oldukları görülmektedir. Hücrelerde çekirdeğin (Ç) yuvarlak veya oval olduğu ve bir ya da iki adet çekirdekçiğin (okbaşı) bulunduğu gözlenmektedir. Bez epitel hücrelerinin sitoplazmaları, yüzey epiteline göre oldukça elektron dens görünümdedir. Sitoplazmada GER sisternaları (ER), mitokondriyonlar (M) ve lipid damlacıkları (L) gözlenmektedir. Epitel içerisinde mitoz bölünme dikkati çekmektedir (Çift oklar). Stromal hücreler (SH) ve bazal lamina (BL) görülmektedir.

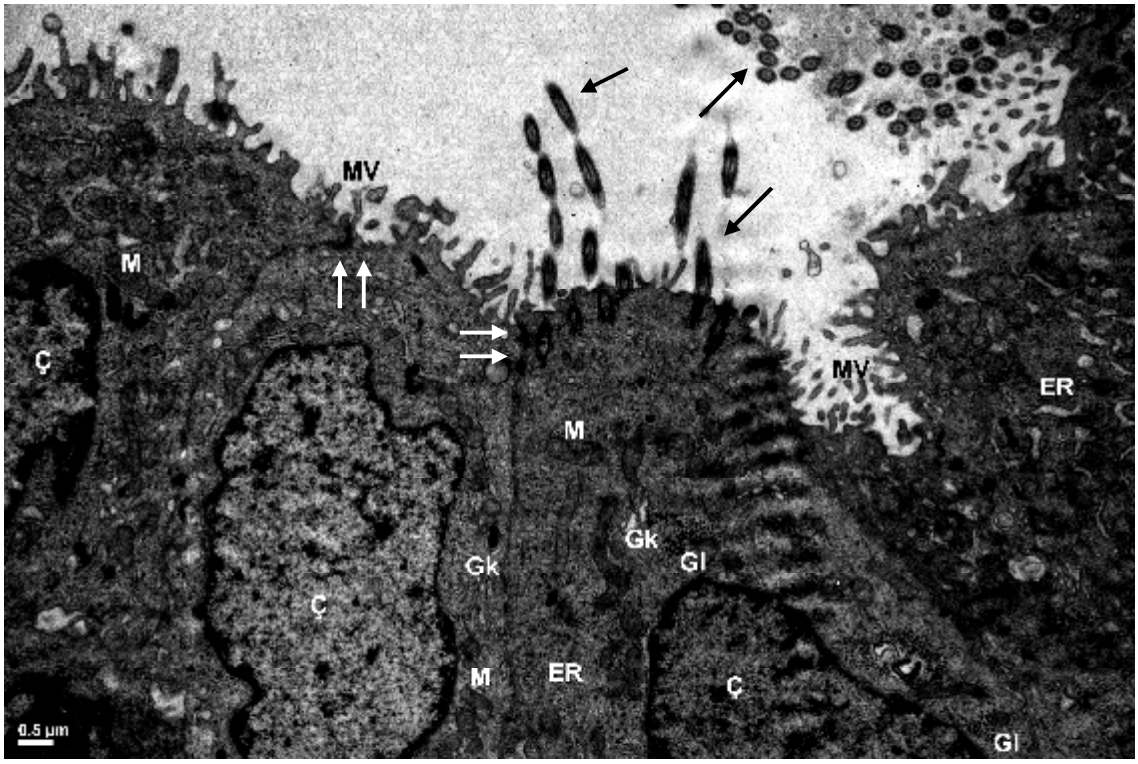


Şekil 19: Kontrol endometriyumunun elektron mikroskobik görünümü. Endometriyal stromada stromal hücreler (SH) ve sitoplazmasında lizozom (Li) ve lipid (L) damlacıklarıyla karakterize makrofaj (MF) görülmektedir. Çekirdek (Ç).

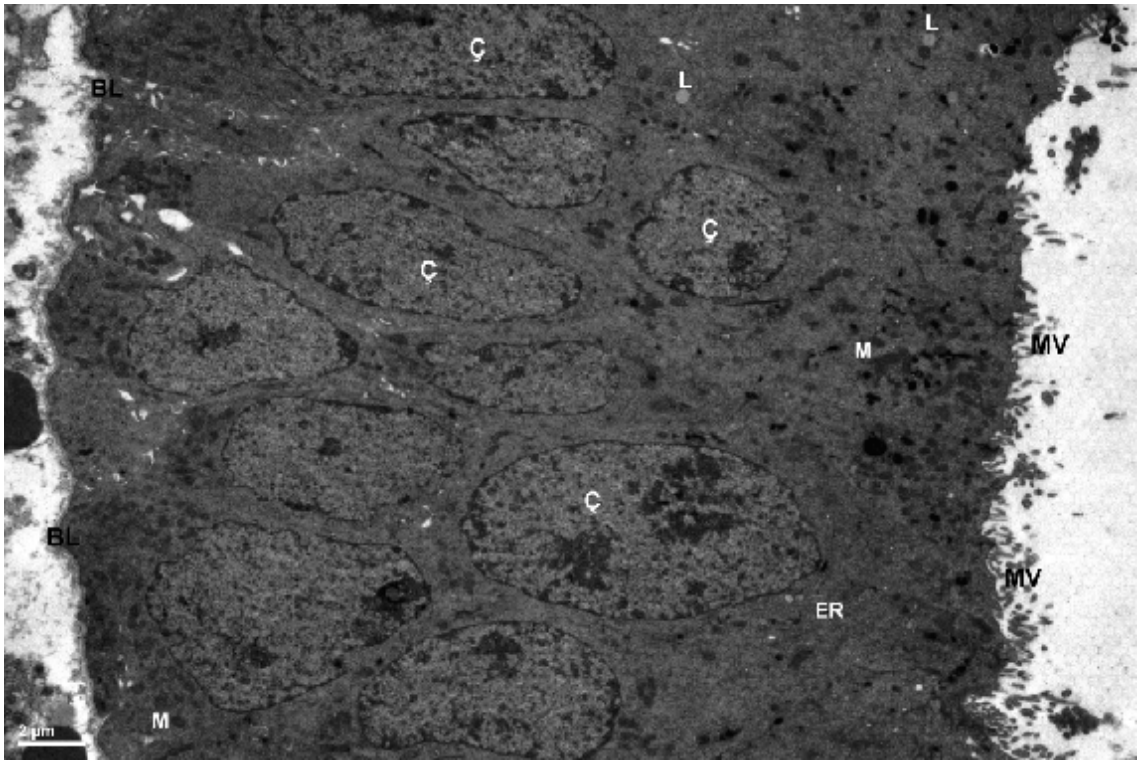
4.3.2. Ötopik endometriyum

Ötopik endometriyum doku örneklerinin elektron mikroskobik incelenmesinde, endometriyum yüzey epitelinin uzun, tek sıralı prizmatik epitelden oluştuğu, epitelde mikrovilluslu ve silyalı olmak üzere iki tip hücrenin bulundğu gözlendi. Epitel hücrelerinin çekirdekleri ince, uzun ve oval şekilli olup, hücrelerin orta hattında yerleşmişti. Çekirdek genellikle ökromatik görünümdeydi. Çekirdek içerisinde bir adet çekirdekçiğin varlığı ayırt edilmekteydi. Hücrelerin sitoplazmalarında ince, uzun mitokondriyonlar, GER sisternaları ve Golgi kompleksinin varlığı izlendi. Ayrıca sitoplazma içerisinde serbest ribozomlar, glikojen partikülleri ve lipid damlacıkları da bulunmaktaydı. Epitelin alt kısımda, ince bir bazal laminaya sahip olduğu gözlendi (Şekil 20)

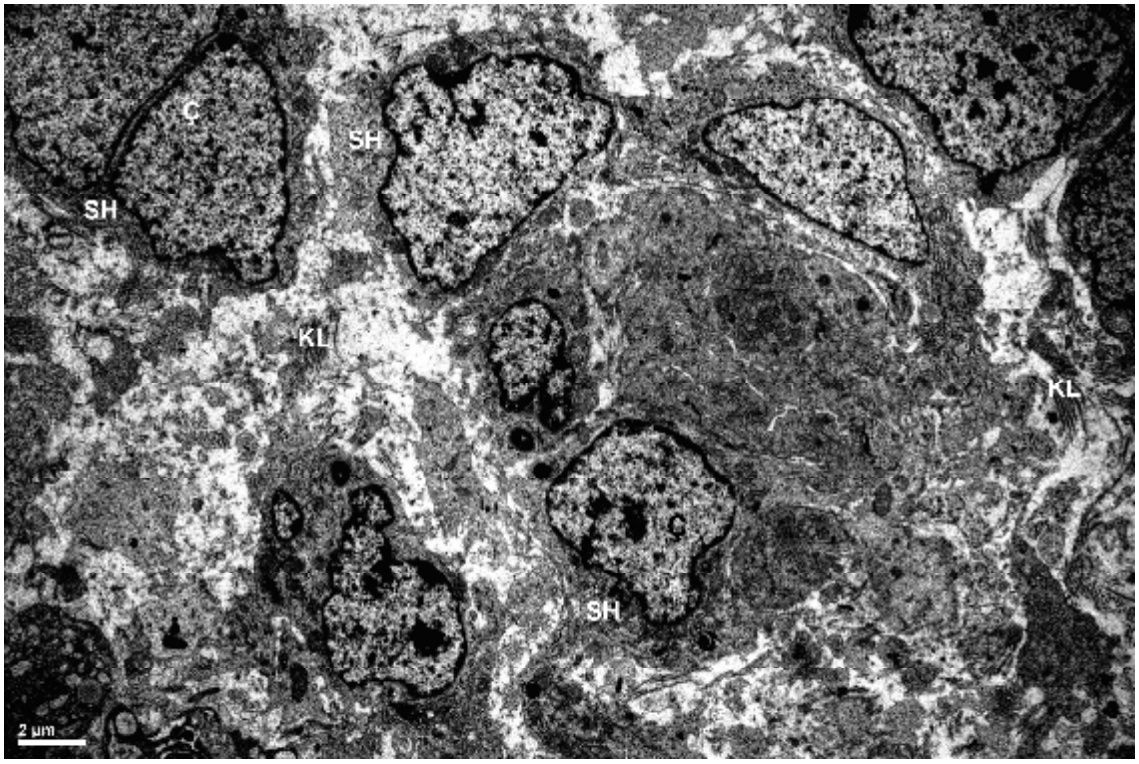
Bez epitel hücrelerin çoğunlukla mikrovilluslu hücrelerden oluştuğu gözlendi. Aralarında az sayıda silyalı hücrelere de rastlanmaktaydı. Hücrelerin sitoplazmalarında çok miktarda serbest ribozomlar, GER sisternaları ve mitokondriyonlar gözlendi. Bazı alanlarda epitel içerisine göç etmiş lökositlere de rastlanmaktaydı. Bez epiteli alt kısmından ince bir bazal lamina ile stromadan ayrılmıştı (Şekil 21).Endometriyal stromada, kontrol endometriyumda olduğu gibi, tipik stromal hücreler ve makrofajlara sahipti (Şekil 22).



Şekil 20: Ötopik endometriyumun elektron mikroskobik görünümü. Endometriyum yüzey epitelinin prizmatik hücrelerden oluştuğu, hücrelerin lümene bakan apikal yüzeylerinde mikrovillus (MV) ve silyumların (oklar) yer aldığı görülmektedir. Epitel hücrelerinin birbirlerine sıkı bağlantılar (çift oklar) ile bağlı oldukları ayırt edilmektedir. Hücrelerde çekirdek (Ç) ve sitoplazmik organellerin normal yapıda oldukları izlenmektedir. Mitokondriyon (M), GER sisternaları (ER), Golgi kompleksi (Gk), glikojen partikülleri (Gl) ve lipid damlacıkları (L) gösterilmiştir.



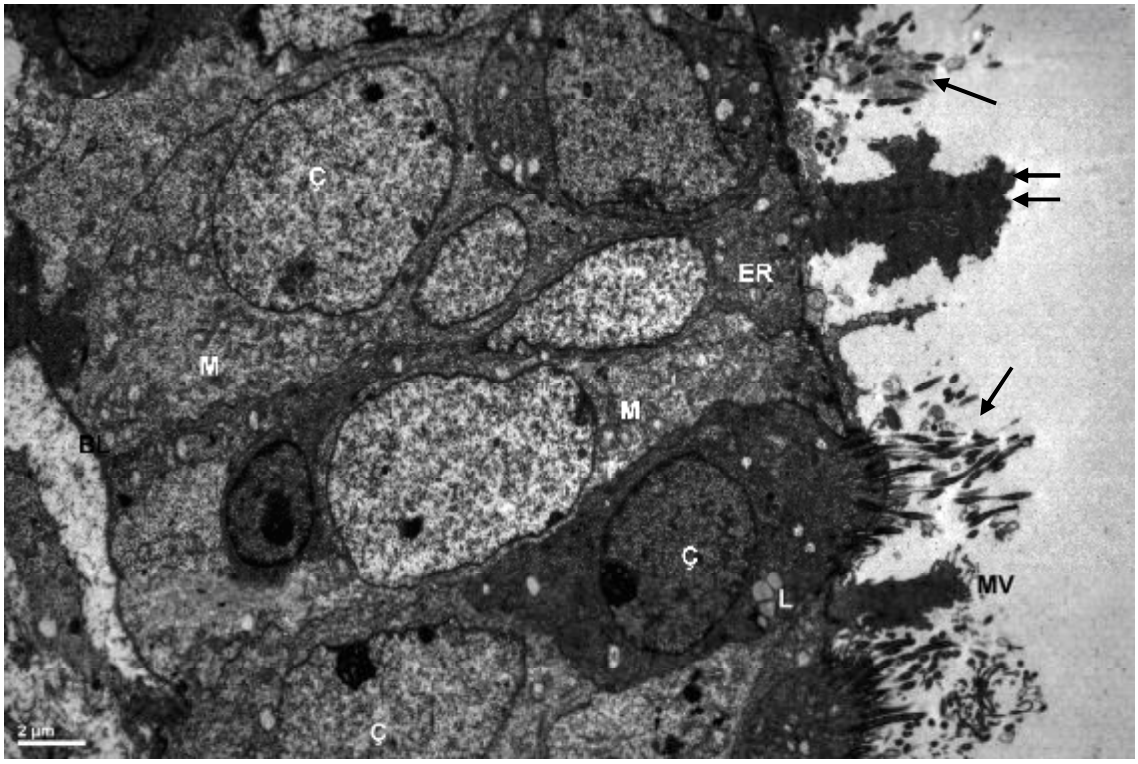
Şekil 21: Ötopik endometriyumun elektron mikroskobik görünümü. Endometriyal bez epitelinin prizmatik hücrelerden oluştuğu, hücrelerin lümene bakan yüzeylerinde çoğunlukla mikrovilluslara (MV) sahip oldukları görülmektedir. Hücrelerde çekirdek (Ç) ve sitoplazmada bulunan organeller normal görünümdedir. Hücre sitoplazmalarında yer alan, GER sisternaları (ER), mitokondriyonlar (M) ve lipid damlacıkları (L) gösterilmiştir. Bazal lamina (BL).



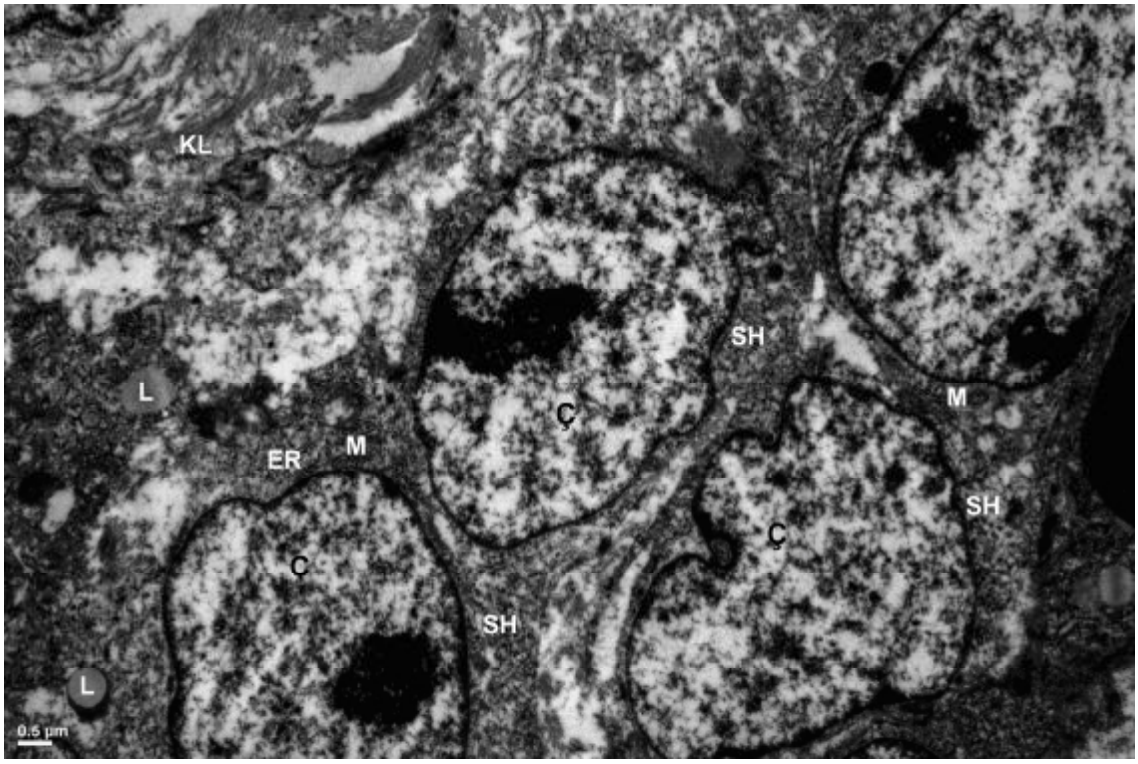
Şekil 22: Ötopik endometriyumun elektron mikroskobik görünümü. Endometriyal stromada stromal hücreler (SH) ve hücreler arası madde izlenmektedir. Stromal hücrelerde çekirdek (Ç) ve sitoplazmik organellerin normal yapıda oldukları görülmektedir. Kollajen lifler (KL).

4.3.3. Ektopik endometriyum

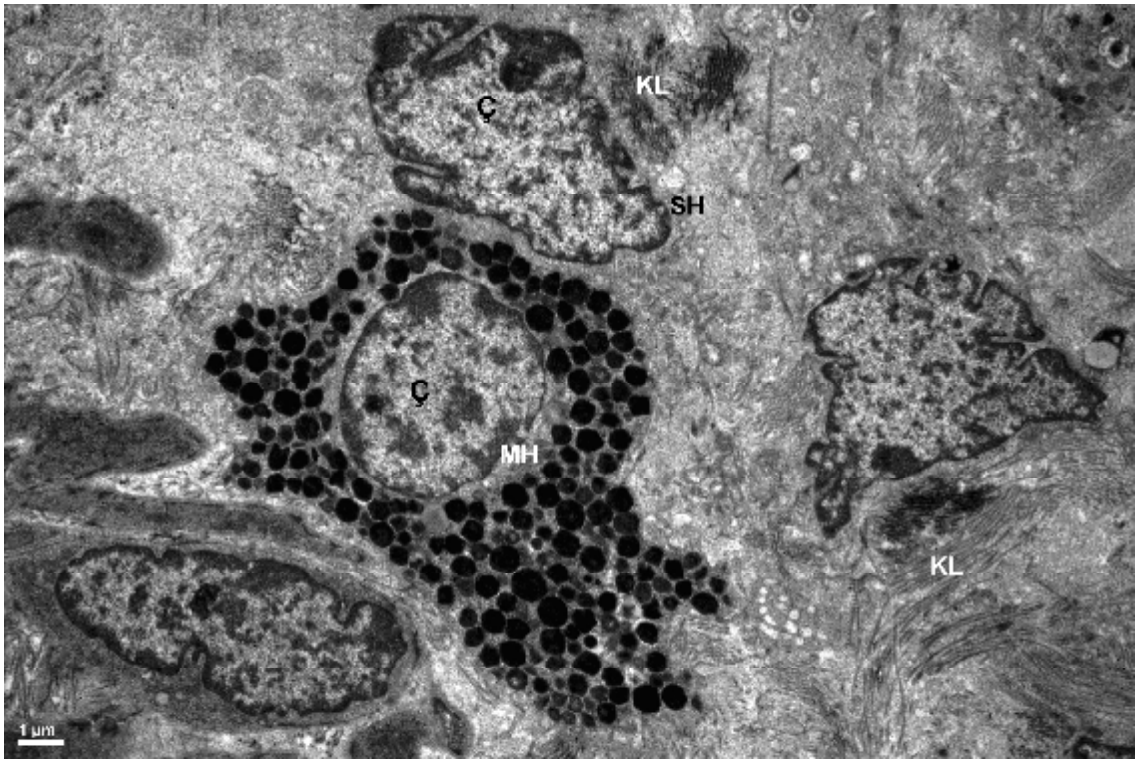
Ovaryumdan elde edilen ektopik endometriyum doku örneklerinin elektron mikroskobik incelemesinde, endometriyumun yüzey epiteli ve altında bulunan stromadan oluştuğu dikkati çekti. Yüzey epitelinin, çok sayıda silyalı hücreler içeren prizmatik tipte epitel olduğu gözlendi. Ayrıca epitel içerisinde mikrovilluslu hücreler de bulunmaktaydı. Bazı mikrovilluslu hücrelerde apikal sitoplazmaların lümene doğru pinopod benzeri uzantılar gönderdiği ve bu uzantıların da çok sayıda mikrovilluslara sahip olduğu gözlendi. Yüzey epitel hücreleri birbirlerine sıkı bağlantılar ile bağlanmışlardı. Lateral yüzeylerde, komşu epitel hücreleri arasında, desmozom benzeri bağlantılar görülmekteydi. Mikrovilluslu hücrelerde, hücrenin orta hattında yerleşen, oval ya da yuvarlak bir çekirdeğin varlığı izlenmekteydi. Hücrelerin sitoplazmalarında, mitokondriyonlar, GER sisternaları, serbest ribozomlar, glikojen partikülleri ve lipid damlacıkları gözlendi. Silyalı hücreler, apikal yüzeylerinde çok sayıda silyumlara sahiplerdi. Hücrelerin içerisinde, bir veya iki çekirdekçiğe sahip, oval bir çekirdek yer almaktaydı. Hücre sitoplazmalarında, mitokondriyonlar, GER sisternaları ve çok sayıda serbest ribozomlar yer almaktaydı. Sitoplazmada ayrıca bir kaç lipid damlacığı ve glikojen partikülleri de bulunmaktaydı. Epitel alttan ince bir bazal lamina üzerine oturmuştu (Şekil 23). Bazal laminanın devamında ince bir stroma tabakası yer almaktaydı. Stroma içerisinde yuvarlak ya da oval şekilli stromal hücreler ve tipik makrofajlar bulunmaktaydı. Stromal hücrelerin içerisinde bir veya iki çekirdekçik içeren, ökromatik bir çekirdek yer almaktaydı. Sitoplazmada az sayıda mitokodriyonlar, GER sisternaları, ribozomlar, lipid damlacıkları ve glikojen partikülleri bulunmaktaydı (Şekil 24). Stroma içerisinde ayrıca makrofajlar ve kapiller damarlar da bulunmaktaydı. Bunların yanı sıra, mast hücrelerinin de özellikle subepitelyal alanlarda belirgin oldukları dikkati çekti (Şekil 25). Makrofaj sitoplazmalarında çok miktarda sekonder lizozomların varlığı görülmekteydi (Şekil 26).



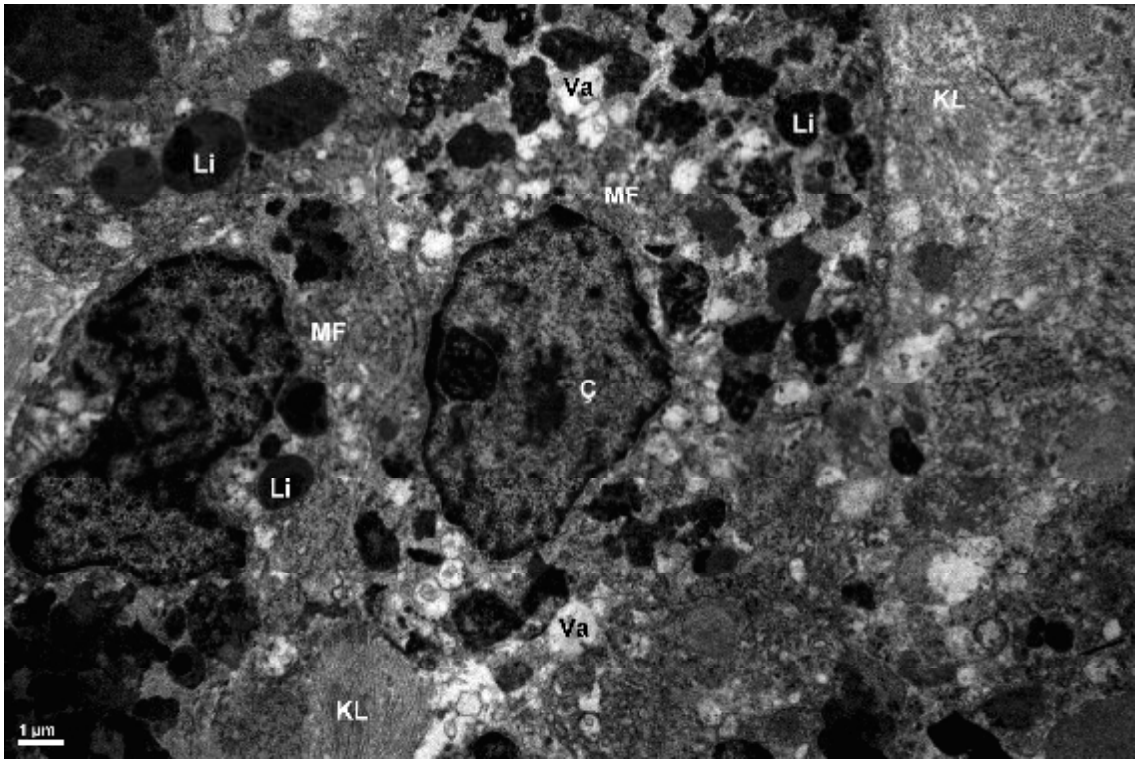
Şekil 23: Ektopik endometriyumun elektron mikroskobik görünümü. Endometriyal implantın yüzey epiteli ve altında yer alan stromadan oluştuğu görülmektedir. Epitel hücrelerinin prizmatik hücrelerden oluştuğu, lümene bakan yüzeylerinde mikrovillus (MV) ve silyumların (oklar) yer aldığı görülmektedir. Bazı epitel hücrelerinde apikalde pinopod adı verilen sitoplazmik çıkıntılar (Çift oklar) dikkati çekmektedir. Hücrelerde çekirdek (Ç) ve sitoplazmik organellerin normal yapıda oldukları izlenmektedir. Mitokondriyon (M), GER sisternaları (ER) ve lipid damlacıkları (L) gösterilmiştir. Bazal lamina (BL).



Şekil 24: Ektopik endometriyumun elektron mikroskobik görünümü. Ektopik endometriyumda epitel altında yer alan stromada, stromal hücreler (SH) izlenmektedir. Stromal hücrelerde oval veya yuvarlak, ökromatik çekirdeğin (Ç) varlığı gözlenmektedir. Hücre sitoplazmalarında mitokondriyonlar (M), GER sisternaları (ER) ve lipid damlacıkları (L) gösterilmiştir. Kollajen lifler (KL).



Şekil 25: Ektopik endometriyumun elektron mikroskobik görünümü. Ektopik endometriyumda epitel altında yer alan stromada, stromal hücreler (SH) ve mast hücresi (MH) dikkati çekmektedir. Çekirdek (Ç) ve kollajen lifler (KL) görülmektedir.



Şekil 26: Ektopik endometriyumun elektron mikroskobik görünümü. Ektopik endometriyumda epitel altında yer alan stromada, çok sayıda makrofajın (MF) varlığı izlenmektedir. Makrofajlarda çekirdeğin (Ç) hiperkromatik hale dönüştüğü, sitoplazmada lizozomların (Li) ve vakuollerin (Va) sayıca artmış oldukları dikkati çekmektedir. Kollajen lifler (KL).

Tablo 1: Endometriyumda gruplar arasında TNF-α, MCP-2 ve CD68 immünoreaktivitesi*

	Kontrol Endometriyum		**Ötopik Endometriyum**		**Ektopik Endometriyum**	
TNF-α	Yüzey epiteli	**+**	Yüzey epiteli	**++**	Yüzey epiteli	**+++**
	Bez epiteli	**+**	Bez epiteli	**++**		
	Stromal Hücre/Makrofaj	**-**	Stromal Hücre/Makrofaj	**-/+**	Stromal Hücre/Makrofaj	**-/+**
MCP-2	Yüzey epiteli	**-**	Yüzey epiteli	**++**	Yüzey epiteli	**++**
	Bez epiteli	**+**	Bez epiteli	**++**		
	Stromal Hücre/Makrofaj	**-/+**	Stromal Hücre/Makrofaj	**-/+**	Stromal Hücre/Makrofaj	**-/+**
CD68	**CD68 + Makrofaj**	**++**	**CD68 + Makrofaj**	**++**	**CD68 + Makrofaj**	**+++**

***: Zayıf : + , Orta: ++ , Şiddetli: +++**

5. TARTIŞMA

İnsanlarda normal endometriyum ve endometriyotik dokuların ince yapı özellikleri ile Tümör Nekroz Faktör Alfa (TNF-α) ve Monosit Kemotaktik Protein-2 (MCP-2) ekspresyonunun araştırıldığı bu çalışmada, endometriyotik dokularda TNF-α ve MCP-2 immünreaktivitesinin epitel hücrelerinde belirgin olarak artış gösterdiği bulundu. Ötopik endometriyumda da yüzey ve bez epitelinde TNF-α ve MCP-2 ekspresyonunun kontrol grubuna göre belirgin olarak arttığı tespit edildi. Bunların yanında, endometriyotik dokularda, makrofajların stromadaki sayılarının anlamlı olarak yükseldiği gösterildi. Ultrastrüktürel olarak proliferatif evrede yüzey ve bez epitelinde yalnızca mikrovilluslu ve silyalı hücrelerin yer aldığı gösterildi.

Daha önce yapılan çalışmalarda normal insan endometriyumu ile endometriyotik implantlar ve ötopik endometriyum dokularının karşılaştırmalı ultrastrüktürel incelemeleri yapılmıştır[2,24,42]. Bartosch ve arkadaşları endometriyum ultrastrüktürünü inceledikleri çalışmada, sekresyon döneminde yüzey ve bez epitelinde mikrovilluslu hücreler, pinopodlu hücreler, veziküllü hücreler ve silyalı hücreler olmak üzere 4 tip hücrenin varlığını tanımlamışlardır[24]. Bizim çalışmamızda orta proliferatif evredeki hastalardan elde edilen endometriyum örneklerinde yüzey epiteli ve bez epitelinde yalnızca mikrovilluslu ve silyalı hücrelerin geliştiği gözlendi (Şekil 17, 18). Bununla birlikte özellikle bez epitelinde yaygın mitotik figürlerin bulunması epiteldeki proliferasyonun bir göstergesi olarak değerlendirildi (Şekil 18). Elektron mikroskobik değerlendirmelerimizde veziküllü ve pinopodlu hücrelere kontrol ve ötopik endometriyumda rastlanmadı, ancak ektopik endometriyumda yüzey epitelinde bazı hücrelerde pinopod benzeri sitoplazmik çıkıntıların varlığı dikkati çekmekteydi (Şekil 23). Çalışmamızda normal, ötopik ve ektopik endometriyumda yüzey ve bez epitelinde daha önce literatürde tanımlanan hücre tiplerinden bazılarının gözlenmemesinin endometriyum biyopsilerinin zamanlamasıyla ilişkili olduğunu düşündürmektedir.

Çalışmamızda, TNF-α immünoreaktivitesinin kontrol grubunda yüzey ve bez epitelinde zayıftan orta dereceye kadar değişen düzeylerde olduğu gözlendi. Buna karşın stromal hücrelerde belirgin bir boyanmaya rastlanmadı (Şekil 4). Endometriyozisli hastalardan elde edilen ötopik endometriyumlarda yüzey ve bez epitelinde TNF-α ekspresyonunun belirgin olarak artış gösterdiği buna karşın stromada kontrol grubunda olduğu gibi negatif ya da zayıf bir boyanmanın varlığı gözlendi (Şekil 7). Diğer taraftan ektopik endometriyumda TNF-α immünreaktivitesinin epitelde oldukça belirgin olduğu dikkati çekti (Şekil 10). Ektopik endometriyumda immünreaktivitenin kontrol ve ötopik endometriyum epiteline göre çok daha güçlü olduğu izlendi (Tablo 1).

TNF-α, vücutta farklı hücre tipleri tarafından salgılanan ve enflamatuvar olaylarda görev alan önemli bir sitokindir. Esas olarak monosit ve makrofajlar tarafından salgılanan bu sitokinin oldukça geniş spektrumlu biyoaktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir[11]. Diğer taraftan TNF-α'nın dokularda rejenerasyon ve yıkım olayları olmak üzere birbirinden farklı ikili bir fonksiyonunun olduğu da yaygın olarak kabul edilmektedir. TNF-α'nın normalde immün sistem reaksiyonlarının kontrolü ve vücut savunmasındaki rolleri yanında, nörolojik travmalarda, homeostazis, hücre proliferasyonu ve hücre diferansiyasyonunda da görev aldığı bilinmektedir. TNF-α'nın, proenflamatuvar ve immün sistem uyarıcı etkilerinden dolayı vücuttaki pek çok patolojik olaylarla ilişkili olabileceği ileri sürülmektedir[11-14,16].

TNF-α 'nın normal endometriyum fizyolojisinde görev alan önemli bir sitokin olduğu bilinmekle birlikte, endometriyotik dokularda TNF-α'nın rolü henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Philippeaux ve Piguet[13] endometriyumda TNF-α' nın erken proliferatif fazda bez epitelinde negatif veya zayıf olarak işaretlendiğini, fazın ileri safhalarında boyanmanın giderek arttığını, geç proliferatif fazda ise maksimum seviyeye ulaştığını rapor etmişlerdir. Araştırmacılar, TNF-α seviyesinin sekretuvar faz boyunca yüksek düzeyde varlığını sürdürdüğünü buna karşın TNF mRNA seviyesinin siklusun sonlarına doğru azaldığını belirtmişlerdir. Öte yandan endometriyozisli hastaların periton sıvılarında TNF-α konsantrasyonunun oldukça yükseldiği, sitokin düzeyi ve hastalığın evresi arasında yakın bir ilişkinin bulunduğu rapor edilmiştir. Yapılan

diğer bir çalışmada da TNF-α'nın infertilitede rol alan önemli bir sitokin olduğu ileri sürülmüştür[12].

Çalışmamızda kontrol grubuna göre endometriyotik ve ötopik endometriyum epitelinde TNF-α'nın oldukça belirgin olduğu dikkati çekti. Bunların yanında bu dokularda stromada yer alan makrofajlarda da TNF-α reaktivitesinin varlığı, TNF-α - Makrofaj ilişkisinin endometriyozis gelişimi ile yakından ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Nitekim monoklonal CD68 antikoru ile işaretlenen makrofajların endometriyotik dokularda sayılarının anlamı olarak artış gösterdiği ve hücrelerin özellikle subepitelyal alanlarda bir araya toplandıkları gösterildi (Şekil 12). Endometriyotik dokularda TNF-α ekspresyonun belirgin olması ve makrofajların da bu bölgelerde yoğun olarak bulunması endometriyozis gelişiminde ve endometryotik dokularda TNF ve makrofaj ilişkisinin kanıtı olarak değerlendirildi. Gerçekten de endometriyotik dokuların implantasyonunda, IL-6, IL-8 ve TNF-α gibi sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin rolleri kabul edilmekle birlikte[3], diğer taraftan, TNF-α'nın immün sistem hücreleri ve makrofajlar üzerine uyarıcı etkileriyle implantasyon alanında endometriyotik dokuların izole edilmesi aşamalarını da başlatabileceği geniş olarak kabul edilmektedir[48].

Hunt ve arkadaşları[12] TNF'nin, erken ve orta proliferatif evrede epitel ve stromada zayıf olarak işaretlendiğini, geç proliferatif evrede ekspresyonunun çok daha belirgin olduğunu rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamızda orta proliferatif evrede, endometriyum ve endometriyotik dokularda TNF-α ekspresyonlarının normal endometriyumda epitelde nispeten zayıf olarak işaretlendiği, ötopik endometriyumda ekspresyonun artış gösterdiği, endometriyotik epitelde ise çok daha belirgin olduğu gözlendi (Tablo 1). Bullimore[48] anormal TNF-α düzeyi ile endometriyotik implantların yerleşim ve gelişimleri arasında yakın bir ilişki olduğunu belirtmiştir. Domowski ve Braun[54] TNF-α'nın in vitro koşullarda endometriyotik hücrelerin laminin, fibronektin ve kollajene bağlanmasını arttırdığını rapor etmişlerdir. Araştırmacılar, TNF-α varlığında matriks metalloproteinaz 3 seviyelerinin de yükseldiğini belirtmişlerdir[54].

TNF-α'nın endometriyum biyolojisi ve endometriyozis gelişimindeki rolleri günümüzde hala önemli araştırma alanı olarak güncelliğini korumaktadır. Yuge ve arkadaşları[58] deneysel araştırmalarında in vitro koşullarda TNF-α'nın endometriyal stromal hücrelerde kasılmayı uyardıklarını rapor etmişlerdir. Araştırmacılar, endometriyumun menstrüel siklus sırasında geçirdiği dinamik süreçler ve perimenstrüasyon aşamasında dokuların yeniden şekillenmesinde TNF-α'nın rolünün önemine işaret etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da TNF'nin özellikle endometriyotik dokularda hem epitel hücrelerinde ve hem de stromal hücrelerde belirgin olarak işaretlendiği gözlendi. TNF-α'nın proenflamatuvar etkisiyle endometriyotik alanda başta makrofajlar ve immün sistemde görevli hücrelerin toplanmasına neden oldukları, ayrıca diğer sitokin ve büyüme faktörlerinin etkisiyle fibrozisin uyarılacağı ve endometriyotik dokunun bulunduğu alanda izole edileceği, stromal hücrelerde kasılmayı uyararak, bölgesel kan damarlarınının kasılmasını sağlayarak, kan akımını azaltabileceği, sonuçta da endometriyal imlantın hücresel dinamiklerinin bozulacağı ileri sürülebilir[11,14,15]. Gerçekten de yapılan bir araştırmada, TNF-α mRNA miktarının endometriyumda oldukça fazla artış gösterdiği ve epitel ile endometriyum kıvrıntılı arterlerinin duvarında belirgin TNF-α işaretlenmesinin varlığı rapor edilmiş, damar duvarlarındaki aşırı TNF-α varlığının menstrüasyon süreciyle ilişkili olabileceği vurgulanmıştır[13]. Knöfler ve Haider[11] dişi üreme sisteminde, TNF-α konsantrasyonunun, reseptör dağılımının ve uyarının uzunluğunun, bu sitokinin zararlı veya yararlı yönde etkisine neden olacağını belirtmişlerdir. TNF'nin diğer sitokin ve kemokinlerle birlikte endometriyum fizyolojisi ve patolojisi üzerine etkilerinin araştırıldığı diğer bir çalışmada da, TNF'nin, MCP-1 ve IL-8 için önemli bir düzenleyici mediyatör olduğu ve anjiyogenez, apopitoz, proliferasyon, farklılaşma ve lökosit göçünde spesifik rollerinin bulunduğu rapor edilmiştir[3].

Üreme fizyolojisi ve patolojisinde endometriyumdaki çeşitli hücre tipleri tarafından salgılanan sitokinler ve kemokinler arasındaki ilişki günümüzde hala tartışma konusudur. Kemokinler, sitokinlerin geniş, multifonksiyonel bir ailesi olup, normal biyolojik ve patolojik süreçlerde görev alan, enfeksiyon veya yaralanma alanlarına hücre göçünü uyaran mediyatörlerdir[7-8,51]. Monosit

kemotaktik proteinler, pleotropik etkiye sahip CC kemokin alt ailesinin üyeleridirler[1,7,10]. Monosit ve lenfositler ile eozinofil ve bazofil lökosit kemoatraktanı olarak da bilinirler. Makrofajlar için güçlü bir kemotaktik protein olan MCP-2'nin normal endometriyal epitelde varlığı daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir[1]. Sunulan çalışmada MCP-2 ekspresyonunun literatürde belirtildiği gibi, kontrol grubunda yüzey epitelinde bazı alanlarda negatif olmakla birlikte, çoğu alanlarda zayıf bir immünreaktivite gösterdiği tespit edildi. Bununla beraber, stromada yer alan makrofajların bazılarında da zayıf olarak MCP-2 ekspresyonu gözlendi (Şekil 5). Ötopik endometriyumla kontrol grubu karşılaştırıldığında, yüzey ve bez epitelinde MCP-2 ekspresyonunun ötopik endometriyumda daha belirgin olduğu ancak stromal hücrelerdeki boyanmanın kontrol grubuyla benzerlik gösterdiği belirlendi (Şekil 8). Ektopik endometriyumda da yüzey epitelinde ötopik endometriyuma benzer şekilde MCP-2 ekspresyonunun varlığı görüldü (Şekil 11). Diğer taraftan TNF-α ekspresyonu ile karşılaştırıldığında, normal endometriyumda epitel ve bezlerde işaretlenmenin birbirine yakın olduğu, ötopik ve ektopik endometriyum epitelinde MCP-2 varlığının, TNF-α immünreaktivitesine göre daha zayıf olduğu gösterildi. Bunun yanında makrofaj infiltrasyonun belirgin olduğu ektopik endometriyotik alanlarda MCP-2 ekspresyonunun oldukça belirgin olduğu da dikkati çekti (Şekil 11). McManus ve arkadaşları[50] lezyon alanlarında MCP-1 ve MCP-2 varlığının oldukça yükseldiğini, MCP-2 immünoreaktivitesinin kronik aktif lezyonlarda çok daha belirgin olduğunu, kemokinlerin enflamatuvar kaskatın uyarılmasında, spesifik hücre tiplerinin kemotaksisi ve hedef hücre popülasyonunun aktivasyonu olmak üzere iki esas rolünün bulunduğunu rapor etmişlerdir. Çalışmamızda MCP-2 ekspresyonunun, ektopik ve ötopik endometriyal hücrelerde birbirine benzer olmasına rağmen, kontrol endometriyumla karşılaştırıldığında, daha yüksek reaktivitenin bulunması, bu kemokinin endometriyosiz oluşumu ve devamlılığında bir rolü olabileceğini düşündürmektedir.

Kemokinlerin endometriyum biyolojisindeki rolleri literatürde geniş olarak incelenmiş olmakla birlikte[7,8,10], endometriyozisin gelişimi ve endometriyotik dokulardaki muhtemel rolleri hakkında henüz bir görüş birliği oluşmamıştır.

Bunun yanında, MCP-2'nin normal endometriyumda immünohistokimyasal olarak işaretlenmesi ve hücre tiplerine göre dağılımı az sayıdaki çalışmada gösterilmiş olmasına rağmen[1] endometriyotik dokularda yapılmış immünohistokimyasal bir çalışmaya bugüne kadar literatürde rastlanmamıştır.

Sunulan çalışmada ilk defa endometriyozise sahip hastalarda, ötopik ve ektopik endometriyumda MCP-2 ekspresyonu ve hücre tiplerine göre dağılımı gösterilmiştir. Diğer tarftan çalışmamızda MCP-2 seviyesinin belirgin olduğu ektopik ve ötopik endometriyum kesitlerinde, TNF-α ekspresyonunun ve CD68+ makrofaj sayılarının da yüksek olması, bu mediyatörlerin endometriyozis gelişimi ve makrofajların bölgeye geçişi ve toplanmasında, sinerjik bir ilişki içerisinde olabileceklerini düşündürmektedir. Nitekim Arıcı ve arkadaşları[31], MCP-1 ve MCP-2 üretiminin in vitro koşullarda steroid hormonlar ile IL-1, TNF ve IFN gibi çeşitli sitokinlerin varlığında uyarılabildiklerini rapor etmişlerdir. Yapılan diğer bir çalışmada da kemokinlerin etkisiyle peritoneal makrofajların bir araya toplandıklarını, endometriyozisli hastalarda peritoneal kemokin düzeylerinin belirgin olarak arttığı rapor edilmiştir[40]. Garcia-Velasco ve Arıcı[10] da kemokinlerin lökositlerin enflamasyon alanına toplanmalarını düzenlediklerini, ayrıca makrofajlar için kemoatraktan ve aktivatör etkiye sahip olduklarını rapor etmişlerdir.

Kemokinlerin vücutta immün hücreler, endometriyal hücreler, trofoblastlar ve tümör hücreleri gibi pek çok hücre arafından sentez edildiği yaygın olarak kabul edilmektedir[7,10,59]. Çalışmamızda özellikle ötopik ve ektopik endometriyumda epitel hücrelerinde MCP-2 ekspresyonunun belirgin olması ayrıca stromada yer alan makrofajlarda da MCP-2 işaretlenmesinin varlığı, endometriyozis gelişiminde, bu kemokinin de rol alabileceğinin bir göstergesi olarak değerlendirildi. Sitokinler ve kemokinlerin otokrin, parakrin ve endokrin etkileri ile endometriyozis gelişimi ve devamlılığında karşılıklı olarak düzenleyici görevlere sahip olabilecekleri ileri sürülebilir. Gerçekten de çalışmamızda önemli bir sitokin olan TNF-α ile kemokinlerin bir üyesi olan MCP-2 ekspresyonlarının, ötopik ve endometriyotik dokulardaki varlığının birbiri ile örtüşmesi bu görüşü destekler niteliktedir.

Sonuç olarak, insanda normal endometriyum ve endometriyotik dokuların ince yapı özellikleri ile TNF-α ve MCP-2'nin hücresel ekspresyonlarının araştırıldığı bu çalışmada ultrastrüktürel olarak proliferatif evrede yüzey ve bez epitelinde yalnızca mikrovilluslu ve silyalı hücrelerin bulunduğu, kontrol, ötopik ve ektopik endometriyumda TNF-α ve MCP-2 immünreaktivitesinin epitel hücrelerinde belirgin olarak artış gösterdiği, ötopik endometriyumda yüzey ve bez epitelinde TNF-α ve MCP-2 ekspresyonunun kontrol grubuna göre belirgin olarak arttığı, ayrıca endometriyotik dokularda, makrofajların stromadaki sayılarının anlamlı olarak yükseldiği gösterildi. Bütün bu sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, TNF-α ve MCP-2'nin normal endometriyum biyolojisi yanında, endometriyozis gelişimi ve patogenezinde rol alabilecekleri sonucuna varıldı.

6. SONUÇLAR

İnsanda normal endometriyum ve endometriyotik dokuların ince yapı özellikleri ile TNF-α ve MCP-2'nin hücresel ekspresyonlarının immüno-histokimyasal olarak araştırıldığı bu çalışma sonucunda;

1- TNF-α işaretlemesinin kontrol grubunda, yüzey epitel hücrelerinde zayıftan orta dereceye kadar değişen düzeylerde olduğu, bez epitel hücrelerinde de yüzey epiteline oranla daha zayıf olmak üzere TNF-α ekspresyonunun gözlendiği, buna karşın stromal hücrelerde belirgin bir boyanmanın olmadığı,

2- TNF-α immünreaktivitesinin ötopik ve ektopik endometriyumda yüzey ve bez epitelinde belirgin olarak artış gösterdiği,

3- Ektopik endometriyumun stromasında aynı zamanda TNF-α ile boyanan makrofajların bulunduğu,

4- MCP-2 immünreaktivitesinin kontrol endometriyumda oldukça zayıf olarak işaretlendiği,

5- Ötopik ve ektopik endometriyum dokularında MCP-2 ekspresyonunun belirgin olarak artış gösterdiği,

6- Kontrol endometriyumda yüzey ve bez epitelinde TNF-α immünreaktivitesinin MCP-2 işaretlenmesine göre daha yoğun olduğu

7- Ötopik endometriyumda TNF-α ve MCP-2 immünreaktivitesinin benzer yoğunlukta olduğu,

8- Ektopik endometriyumda yüzey epitelinde TNF-α immünreaktivitesinin MCP-2 boyanmasına göre daha yoğun olduğu,

9- CD68+ Makrofajların ötopik endometriyumda, kontrol endometriyum ile karşılaştırıldığında, stromada daha yoğun olarak bulundukları,

10- CD68+ Makrofajların ektopik endometriyum stromasında, kontrol ve ötopik endometriyuma göre, çok daha belirgin oldukları,

11- Orta proliferatif fazda kontrol, ötopik ve ektopik endometriyum örneklerinde yüzey ve bez epitelinde mikrovilluslu ve silyalı olmak üzere iki tip hücrenin varlığı gösterildi.

Bütün bu sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde; ötopik endometriyumda yüzey ve bez epitelinde TNF-α ve MCP-2 ekspresyonunun kontrol grubuna göre belirgin olarak artması, ektopik endometriyumda TNF-α ve MCP-2 immünreaktivitesinin epitel hücrelerinde çok daha belirgin olarak artış göstermesi, ayrıca endometriyotik dokularda makrofajların stromadaki sayılarının anlamlı olarak yükselmesi, TNF-α ve MCP-2'nin normal endometriyum biyolojisi yanında, endometriyozis gelişimi ve patogenezinde rol alabileceklerini düşündürmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Hampton AL, Rogers P A.W., Affendi B, Salamonsen LA. Expression of the chemokines, monocyte chemotactic protein (MCP)-1 and MCP-2 in endometrium of normal women and norplant users, does not support a central role in macrophage infiltration into endometrium. *Journal of Reproductive Immunology*, **2001**; 49:115-132.

2. Cornillie F, Lauweryns M, Brosens A. Normal Human Endometrium. *Gynecol. Obstet. Invest,* **1985;** 20: 113-129.

3. Ulukus M, Ulukus E, Goker N, Tavmergen E, Zheng W, Arici A. Expression of interleukine-8 monocyte chemotactic protein 1 in women with endometriosis. *Fertility and Sterility,* **2009;** 91: 687-693.

4. Jones C, Ibrahim M, Inuwa I, Nardo L, Litta P, Fazleabas A. Eutopic endometrium from women with endometriosis shows altered ultrastructure and glycosylation compared to that from healty controls-a pilot observational study. *Reproductive Sciences,* **2009;**16: 559-572.

5. Vinatier D, Cosson M, Dufour P. Is endometriosis an endometrial disease?. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproduvtive Biology, **2000;** 91*: 113-125.

6. Hopkins S. The pathophysiological role of cytokines. *Legal Medicine,* **2003;** 5:45-57.

7. Laing K, Secombes C. Chemocines. *Developmental & Comparative Immunology,* **2004;** 28: 443-460.

8. Gangur V, Birmingham P, Thanesvorakul S. Chemokines in health and disease. *Veterinary Immunology and Immunopathology,* **2002;** 86:127-136.

9. Umezawa M, Sakata C, Tanaka N, Kudo S, Tabata M, Takeda K, Ihara T, Sugamata M. Cytokine and chemokine expression in a rat endometriosis is similar to that in human endometriosis. *Cytokine,* **2008;** 43:105-109.

10. Juan A, Garcia-Velasco, Arici A. Chemokines and human reproduction. *Fertility and Sterility*, **1999;** 71:984-993.

11. Haider S, Knöfler M. Human tumor necrosois factor: physiological and pathological roles in placenta and endometrium. *Placenta, **2009;*** 30:111-123.

12. Hunt JS, Chen HL, Hu XL, Tabibzadeh S. Tumor necrosis factor alpha messenger ribonucleic asid and protein in human endometrium. *Biol Reprod,* **1992;** 47:141-7.

13. Philippeaux MM, Piguet PF. Expression of tumor necrosis factor alpha and its mRNA in the endometrial mucosa during the menstruel cycle. *Am J Pathol,* **1993;** 143:480-6.

14. Kock A, Schwarz T, Kirnbauer R, Urbanski A, Perry P, Ansel JC, Luger TA. Human keratinocytes are a source for tumor necrosis factor alpha: evidence for synthesis and release upon stimulation with endotoxin or ultraviolet light. *J. Exp Med,* **1990;** 172: 1609-14.

15. Miethke T, Wahl C, Heeg K, Echtenacher B, Krammer PH, Wagner H. T cell-mediated lethal shock triggered in mice by the superantigen staphylococcal enterotoxin B: critical role of tumor necrosis factor. *J. Exp Med,* **1992;** 175: 91-8.

16. von Wolff M, Classen-Linke I, Heid D, Krusche CA, Beier-Hellwig K, Karl C, Beier HM. Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in human endometrium and uterine secretion: an evaluation by immunohistochemistry, ELISA and semiquantitative RT-PCR. *Mol. Hum. Reprod,*

17. Roby KF, Weed J, Lyles R, Terranova PF. Immunological evidence for a human ovarian tumor necrosis factor-alpha. *J. Clin Endocrinol Metab.* **1990;** 71: 1096-102.

18. Hunt JS. Expression and regulation of the tumour necrosis factor-alpha gene in the female reproductive tract. *Reprod Fertil Dev.* **1993;** 5: 141-53.

19. Zolti M, Ben-Rafael Z, Meirom R, Shemesh M, Bider D, Mashiach S, Apte RN. Cytokine involvement in oocytes and early embryos. *Fertil Steril.* **1991;** 56: 265-72.

20. Kim K, Rajarathnam K, Clarck-Lewis I, Sykes B. Structural characterization of a monomeric chemokine: Monocyte chemoatractant protein-3. *FEBS Letters, **1996;*** 395: 277-282.

21. Ross MH, Pawlina W. *Histology: A text and atlas.* Baltimore, Philadelphia, 6th ed, Lippincott Williams & Wilkins, **2011.**

22. Bloom and Fawcett. *A textbook of histology.* Philadelphia, 10th ed, W.B. Saunders Company, **1975.**

23. Novak and Woodruff. *Gynecologic ann Obstetric Pathology. Philadelphia, 7th ed,* W.B. Saunders Company, **1974.**

24. Bartosch C, Lopes JM, Beires J, Sousa M. Human endometrium ultrastructure during implantation window: A new perspective of the epithelium cell types. *Reproductive Sciences,* **2011;** (00): 1-15.

25. Vigano P, Parazzini F, Somigliana E, Vercellini P. Endometriosis: epidemiology and aetiological factors. *Best Practice & Clinical Obstetrics and Gynecology, **2004;*** 18:177-200.

26. Vinatier D, Orazi G, Cosson M, Dufour P. Therories of endometriosis. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproduvtive Biology*, **2001;** 96:21-34.

27. Farquhar C. Endometriosis. *Clinical review,* **2007;** 334: 249-53.

28. Koninckx P. Biases in the endometriosis literature ıllustrated by 20 years of endometriosis research in Leuven. *Obstetrics Gynecology,* **1998;** 81: 259-271.

29. Bedaiwy MA, Falcone T. Laboratory testing for endometriosis. *Clinica Chimica Acta,* **2004;** 340: 41-56.

30. Ning W, Huang H, Jin F. Expression of IL-18 in endometriosis. *International Congress Series,* **2004;** 1271: 244-247.

31. Arici A. Local cytokines in endometrial tissue: the role of interleukin-8 in the pathogenesis of endometriosis. *Ann N Y Acad Sci,* **1999;** 955: 101-9.

32. Kyama C, Overbergh L, Mihalyi A, Meuleman C, Mvenda J, Mathieu T. Endometrial and peritoneal expression of aromatase cytokines, and adhesion factors in women with endometriosis. *Fertility and Sterility,* **2008;** 89:301-310.

33. www.endometriosis.org

34. Nichols JL, Zhang XM, Bieber EJ. Case of accessory ovary in the round ligament with associated endometriosis. *J Minim Invasive Gynecol,* **2009;** 16: 216-8.

35. Abdalla H, Rizk B. *Endometriosis.* Oxford, UK, 1998.

36. Levander G, Normann P. The pathogenesis of endometriosis; an experimental study. Acta Obstet Gynecol Scand. **1955;**34:366-98.

37. Pan X, Li X, Weng Z, Wang B. Altered expression of claudin-3 and claudin-4 in ectopic endometrium of women with endometriosis. *Fertility and Sterility,* **2009;** 91: 1692-1699.

38. Banu S, Starzinski- Powitz A, Speights V, Burghadt R, Arosh J. Induction of peritoneal endometriosis in nude mice with use of human immortalized endometriosis epithelial and stromal cells: a potential experimental tool to study molecular pathogenesis of endometriosis in humans. *Fertility and Sterility,* **2009;** 91: 2199-2208.

39. Donnez J, Nisolle M, Gillet N, Smets M, Bassil S, Roux F. Large ovarian endometriomas. *Human reproduction,* **1996;** 11:641-646.

40. Taylor E, Williams C. Surgical treatment of endometriosis: location and patterns of disease at reoperation. *Fertility and Sterility,* **2010;** 93:57-61.

41. Watkins RE. Uterine retrodisplacements, retrograde menstruation and endometriosis. West J Surg Obstet Gynecol **1938**;46:480-94.

42. Scheweppe K, Wynn R, Fritz K, Beller M.D. Ultrastructural comparison of endometriotic implants and eutopic endometrium. *Am. J. Obstet. Gynecol,* **1984;** 148:1024-1039.

43. Harada T, Enatsu A, Mitsunari M, Nagano Y, Ito M, Tsudo T, Taniguchi F, Twabe T, Tanikawa M, Terakawa N. Role of cytokines in progression of endometriosis. *Gynecol Obstet Invest,* **1999;** 47: 34-9.

44. Kılıçturgay K. Sitokinler. *In: Kılıçturgay K (Ed.) İmmünoloji 2003. Nobel & Güneş. İstanbul,* **2003;**113-151.

45. Nicod Lp. Cytokines-1; *Overview,* Thorax **1993;** 48:660-67.

46. Abbas AK, Lichtman Alt. Cytokines. *In: Abbas K, Lichtman Alt (Eds.) Cellular and Molecular Immunology. 5th Ed. Sauders,* **2003;** 243-274.

47. Eisermann J, Gast MJ, Pineda J, Odem RR, Collins JL. Tumor necrosis factor in peritoneal fluid of women undergoing laparoscopic surgery. *Fertil Steril,* **1988;** 50:573-9.

48. Bullimore D. Endometriosis is sustained by tumour necrosis factor alpha. *Medical Hypotheses,* **2003;** 60: 84-88.

49. Tsudo T, Harada T, Iwabe T, Tanikawa M, Nagano Y, Ito M, Taniguchi F, Terakawa N. Altered gene expression and secretion of interleukin-6 in stromal cells derived from endometriotic tissues. Fertil Steril **2000**; 73:205-11.

50. McManus C, Berman JW, Brett FM, Staunton H, Farrell M, Brosnan CF. MCP-1, MCP-2 and MCP-3 expression in multiple sclerosis lesions: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Journal of Neuroimmunology,* **1998;** 86:20-29.

51. Mackay CR. Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat Immunol,* **2001;** 2:95-101.

52. Yamagami S, Tanaka H, Endo N. Monocyte chemoatractant protein-2 can exert its effects through the MCP-1 receptor(CC CKR2B). *FEBS Letters,* **1997;** 400: 329-332.

53. Bonfield T, John N, Malur A, Barna B, Culver D, Kavuru M, Thomassen M. Elevated monocyte chemotactic proteins 1,2 and 3 in pulmonary alveolaar proteinosis are associated with chemokine receptor supression. *Clinical Immunology,* **2005;** 114: 79-85.

54. Dmowski W, Braun D. Immunology of endometriosis. *Best Practice & Clinical Obstetrics and Gynecology,* **2004;** 18:245-263.

55. O'Reilly D, Quinn CM, El-Shanawany T, Gordon S, Greaves DR. Multiple ets factors and interferon regulatory factor-4 modulate CD68 expression in a cell type-specific manner. *The Journal of Biological Chemistr,*. **2003;** 278: 21909-21919.

56. Tzankov A, Matter MS, Dirnhofer S. Refined prognostic role of CD68-positive tumor macrophages in the context of the cellular micromilieu of classical Hodgkin lymphoma. *Pathobiology,* **2010;** 77(6):301-8.

57. Milloning G. Advantages of a phosphate buffer for O_sO_4 solutions in fixation. *J App Phy* **1961;** 32-1637.

58. Yuge A, Nasu K, Tsusue H, Ikegami E, Nishida M, Matsumoto H, Narahara H. Regulation of contractility of cultured human endometrial stromal cells by tumor necrosis factor-α. *European Journal of Obstetric & Gynecology and Reproductive Biology,* **2008;** 138: 66-70.

59. Ulukus M, Ulukus EC, Seval Y, Cınar O, Zheng W, Arici A. Expression of interleukin-8 receptors in patients with adenomyosis. *Fertility and Sterility,* **2006;** 85: 714-720.

8. ÖZGEÇMİŞ

Tiinçe Aksak, 1986 yılında Adana'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Adana'da tamamladı. 2004 yılında Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı ve 2008 yılında da mezun oldu. 2008 yılında, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimine başlayan Tiinçe Aksak, hala aynı Anabilim Dalında eğitimine devam etmektedir.