

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI**

**RAT ENDOMETRİOZİS MODELİNDE RESVERATROLÜN
ETKİLERİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Pınar Özcan**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Haldun Güner**

**Bu tez Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından G.Ü.ET-
08.031 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**ANKARA
2009**

TEŐEKKÖR

Kadın Hastalıkları ve Doğum uzmanlık tezimi sunarken, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı' ndaki asistanlık eğitimim süresince bana yol gösteren ve eğitimimde katkısı bulunan tüm hocalarıma, Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Onur KARABACAK' a, tezimin hazırlanma süreci içinde benden yardımını esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. Haldun GÜNER ve tezimin her aşamasında emeği geçen Doç. Dr. Mesut ÖKTEM'e ve yardımından ötürü Patoloji Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Özlem ERDEM'e; hayatım boyunca bana yol gösteren, bugünlere gelmem için bana sonsuz destek olan ve sevgilerini esirgemeyen aileme; acı tatlı günleri beraber paylaştığımız değerli asistan arkadaşlarıma sonsuz teşekkür ederim.

Pınar ÖZCAN

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
ENDOMETRİOZİS.....	3
Endometriozis oluşumu ile ilgili teoriler.....	3
Endometriozis oluşumuna neden olan faktörler.....	4
Endometriozisin yerleşim bölgeleri.....	7
Tanı.....	7
Evreleme.....	9
Tedavi.....	10
Yeni medikal tedavi ajanları.....	14
RESVERATROL.....	17
GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	21
Araştırmanın yeri ve ortamı.....	21
Araştırma Tipi.....	21
Aneztezi.....	21
Araştırma Grupları.....	22
Araştırma Parametreleri ve Yöntemi.....	22
Histopatolojik Değerlendirme.....	24
Sitokin Ölçümleri.....	26
İstatistiksel Analiz.....	26
BULGULAR.....	27
TARTIŞMA.....	31
SONUÇ.....	35
KAYNAKLAR.....	36
RAT ENDOMETRİOZİS MODELİNDE RESVERATROLÜN ETKİLERİ.....	47
THE EFFECT OF RESVERATROL ON ENDOMETRIOTIC IMPLANTS IN THE RAT MODEL.....	49

GİRİŞ

Endometriozis, normalde uterin kavite içerisinde bulunan endometrial gland ve stromasının kavite dışında yerleşmesidir. Kronik inflamatuvar bir süreç olup, çoğunlukla reproduktif çağıdaki kadınlarda görülmektedir. Reproduktif çağıdaki kadınların %7-10'u, kronik pelvik ağrısı olan kadınların %71-87'i, infertil kadınların ise %38' inde görülmektedir (1)

Endometriozisin etyolojisi, kompleks ve multifaktöryel olup, genetik bağımlı, kalıtsal bir hastalık olduğu düşünülmektedir (2). Hastalığın etyopatogenezi kesin olarak bilinmemekle birlikte, endometriozis östrojen bağımlı bir hastalıktır ve standart medikal tedavi, hipoöstrojenik ortam oluşturmaya yöneliktir. Hipoöstrojenizme dayalı medikal tedaviler, fertilitenin gecikmesi, östrojen azlığı sonucu sıcak basmaları, terleme ve osteoporoz gibi yan etkilerin ortaya çıkması ve hastaların çoğunun üreme çağında olması nedeniyle uzun süre devam ettirilememektedir. Ayrıca hipoöstrojenik durum ortadan kalktığında da hastalığın tekrarlama oranı yüksektir.

Endometriozisin etyopatogenezi hakkında yapılan çalışmalarda inflamatuvar süreç, ekstraselüler matriks invazyonu ve anjiogenezisin hastalığın gelişmesinde önemli olduğu, endometriotik odaklarda anjiogenezisin arttığı gösterilmiştir (3-4). Bunların sonucunda endometriozis tedavisinde farklı ajanların kullanımı gündeme gelmiş ve bazı ajanlar üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Çalışmalarına devam edilen ajanlar içinde antiinflamatuvar ve anjiogenezisi inhibe edici etkisi olanlar da bulunmaktadır.

Resveratrol (3,4',5-trihidroksi-trans-stilbene), üzümde yapılmış kırmızı şarap ekstresi olup, özellikle üzümde bulunmakla beraber yeşil çay, çilek, kiraz, erik gibi birçok bitkide bulunan polifenol ve fitoaleksinin içeren doğal bir bileşimdir. Antioksidan, antiinflamatuvar, antitümör, apoptozisi indükleyici,

anjiogenezisi inhibe edici ve kardiyovasküler sistemde koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir. İnsan endometriotik odaklarında ekstraselüler matriks yıkımı ve yeni damar oluşumunda görev alan matriks metalloproteinazları (MMP) ve vasküler endotelyal büyüme faktörünün (VEGF) ekspresyonunun arttığı bilinmektedir. Resveratrolün MMP ve VEGF' u inhibe ederek antianjiogenetik etkisi gösterilmiştir. Ayrıca, monosit kemotaktik peptid-1 (MCP-1) başta olmak üzere inflamasyonda rol oynayan birçok proinflamatuvar sitokininde transkripsiyonunu inhibe ederek antiinflamatuvar etkinliği de gösterilmiştir.

Endometriozisin oluşumunda inflamatuvar süreç ve anjiogenezisin önemli rol oynadığı düşünöldüğünde; anjiogenezis için en önemli faktör olan VEGF'u ve inflamasyonda rol oynayan MCP-1'i inhibe eden resveratrolün rat modelinde tedavide etkili olabileceğini düşünmekteyiz.

GENEL BİLGİLER

ENDOMETRİOZİS

Endometriozis, endometrial bez ve stromanın uterin kavite dışında yerleşmesidir (5-6). İlk kez 1860 yılında Rokitansky tarafından tarif edilmiştir (7). Reprodüktif çağıdaki kadınların %7-10'u, kronik pelvik ağrısı olan kadınların %71-87'i, infertil kadınların ise %38' de görülmektedir (1). Sıklıkla üreme çağındaki kadınlarda görülen östrojen bağımlı bir hastalık olduğu bilinmektedir. Hastalığın etyopatogenezi net olarak bilinmemesine rağmen, hastalığın oluşumu ile ilgili bazı teoriler ve risk faktörleri öne sürülmüştür. Bunlar; retrograd transtubal menstruasyon, çölömik metaplazi, indüksiyon ve lenfatik teorileri ile genetik, immünolojik ve inflamasyon, hormonal ve çevresel faktörlerdir.

Endometriozis oluşumu ile ilgili teoriler

Retrograd transtubal menstruasyon: 1920' de Sampson tarafından öne sürülen, bu teoriye göre, menstruasyon sırasında transtubal regürjitasyonu ile peritoneal kaviteye ulaşan endometrial hücrelerin implantasyonu sonucu endometrial odaklar oluşmaktadır. Fakat bu teori ile sadece pelvik endometriozis açıklanabilir. Sık menstruasyon gören, menstruasyon kanaması fazla olan ve menstruasyonu uzun süren kadınlarda endometriozis daha sık görülür (8). Bununla beraber, kadınların %70-90'ında retrograde menstruasyon olmasına rağmen, üreme çağındaki kadınların sadece %7-10' unda endometriozis görülmesi retrograd menstruasyon ile endometriozis sıklığı arasında korelasyon olmadığını düşündürür (9).

Çölömik metaplazi: 1919' da Meyer tarafından öne sürülen bu teori periton boşluğunu döşeyen hücrelerin hormonal ya da infilamatuar uyarılar ile

endometrial hücrelere dönüştüğü temeline dayanır (10). Fakat teoriyi destekleyen yeterli çalışma bulunmamaktadır.

İndüksiyon teorisi: Farklılaşmamış periton hücrelerinin bozulmuş endometrium tarafından üretilen endojen kimyasal uyarıların etkisiyle endometrial hücrelere dönüştüğü temeline dayanan bu teori, 1955'te Levander ve Norman tarafından öne sürülmüştür (11).

Halban teorisi: Endometrial hücrelerin lenfoid yolla yayılımı esasına dayanır.

Endometriozis oluşumuna neden olan faktörler

Genetik faktörler: Endometriozisli hastaların birinci derece akrabalarında hastalığın 6-7 kat daha sık görülmesi genetik geçişin hastalığın oluşmasında rol oynayabileceğini düşündürmektedir (12-13). Klasik Mendelyen kalıtım sergilemediği gösterilmiş ve geçişin multifaktöryel olduğu düşünülmektedir (14). Yapılan çalışmalarda, bazı genlerle ilgili polimorfizm ve mutasyonların endometriozis gelişmesinde rol oynadığı üzerinde durulmuştur. Galaktoz-1-fosfat üridil transferaz (GALT) geni, Faz I detoksifikasyon genleri (Ah reseptör, CYP1A1, N-asetil transferaz 1), Faz II detoksifikasyon genleri (glutatyon-S transferaz, N-asetil transferaz 2), steroid ilişkili genler [östrojen reseptör, aromataz (CYP29)], hücre içi adezyon genleri (ICAM-I), anjiyojenik faktörler, sitokinler ve kemokinlerle ilgili genler bunlar arasında sayılabilir (15-16-17). Endometriozisin gelişiminde tümör baskılayıcı genler ve DNA hatalarını onaran genlerde heterozigot yapı kayıplarının da rolü olabilir. Sonuçta endometriozisin oluşumunda genetik nedenlerle ilgili bilgiler bulunmasına rağmen, etyopatogenezle ilişkisi henüz tam olarak ortaya konamamıştır (18).

İmmünolojik faktörler ve inflamasyon: Menstrüasyon sırasında kadınların çoğunda peritoneal kavitede endometrial hücrelere rastlanmasına rağmen, bunların hepsinde endometriozis oluşmamasının bu hücrelerin temizlenmesinde rol alan immünolojik yanıtın farklılığından kaynaklandığını düşündürmüştür (19). Endometriozisli kadınlarda defektif immun yanıt, peritoneal sıvılarında Naturel Killer(NK) hücrelerin ve makrofajların aktivitelerinde azalma; inflamatuvar ve kemotaktik sitokinler, büyüme faktörleri, anjiogenezisi başlatıcı faktörler ve matriks metalloproteinazlarında artış, endometrial hücrelerin apoptozisinde azalma ve fokal inflamatuvar reaksiyon olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla, yeni tedavi yöntemleri geliştirilirken bu değişiklikler göz önüne alınmıştır. Ayrıca, endometriotik odakta artan aromataz aktivitesi prostaglandin E artışına sebep olarak lokal inflamatuvar yanıtın büyümesine katkıda bulunur (20-21-22-23-24-25-26).

Makrofaj endometriozisin oluşması ve devamında önemli bir faktördür. Aktif makrofajlar, makrofaj aktivasyonunu, endometrial proliferasyon ve vaskülarizasyonu arttıran lenfosit aktive edici faktör, sitokinler ve anjiogenik faktörlerin salınımı ile immün disfonksiyona katkıda bulunurlar (25-26-27-28). Bu durum, makrofaj ve sirkülasyondaki monositlerin azaltılması ile endometriozisin hafifletilebileceğini düşündürmüştür (29).

MCP-1 hem endometriozis dokusundan, hem de makrofajların kendisi tarafından üretilen ve inflamatuvar bölgeye endometriozisin etyopatogenezinde rol oynayan monosit ve makrofajların kemotaksisini sağlayan önemli bir proinflamatuvar sitokindir (25-29). Endometriozisli kadınların serum ve peritoneal sıvılarında MCP-1 düzeyinin belirgin derecede arttığı ve MCP-1 düzeyinin hastalığın derecesi ile korelasyon gösterdiği görülmüştür (30). Bu sonuç, endometriozisin gelişim sürecinde MCP-1 gibi proinflamatuvar sitokinlerin, monosit ve makrofajların önemini gündeme getirmektedir.

Hormonal faktörler: Endometriozis östrojen bağımlı bir hastalıktır. Yapılan çalışmalarda endometriotik dokuda yüksek oranda östrojen üretildiği gösterilmiştir (31-32-33). Normal endometriumda aromataz olmamasına rağmen, endometriozisli hastaların hem ektopik hem de ötopik endometriumlarında aromataz üretimi için gerekli olan transkripsiyon faktörlerinin bulunduğu ve aromataz üretildiği gösterilmiştir. Aynı zamanda, son yıllarda östrojen ile inflamasyon arasındaki ilişkiyi değerlendiren birçok çalışma da yapılmıştır (34-35).

Çevresel faktörler: Polivinil kloridin yanması ile ortaya çıkan dioksinin inflamasyon ve farklılaşmada rol oynayan sitokrom p450, plazminojen aktivator inhibitor-2 ve interlökin1-beta genlerini etkilediği ve endometriozise yol açtığı düşünülmektedir (36-37).

Endometriozis ve anjiogenez: Endometriozis gelişiminde anjiogenezisin de önemi büyüktür. Endometrium, hücre çoğalması ve anjiogeneziste rol oynayan fibroblast growth faktör (FGF)-1 ve 2, VEGF, interlökin-8 (IL-8), monosit kemotaktik peptid (MCP)-1, epitelyal büyüme faktörü (EGF) gibi sitokinlerden zengindir. Ayrıca matriks metalloproteinazları da endometrial hücrelerin implantasyonunda rol aldığı düşünülen diğer önemli protein grubunu oluşturmaktadır. Endometriozis gelişiminde önemli rol oynadığı düşünülen bu proteinlerin baskılanması ile ektopik endometrial dokunun gelişimi önenebilir (78-79-103-104).

Endometriumun döngüsel değişikliklerinde apoptozisin de önemli rolü olduğundan, apoptozise duyarlılığın azalması da etyopatogenezde etkili olabilir.

Endometriozisin yerleşim bölgeleri

Ektopik endometriotik odaklar sıklıkla overler, sakrouterin ligamentler, uterusun posterior yüzü, broad ligament ve pelvik peritonda yerleşmekle birlikte, mesane, barsaklar, üreterler ve posterior vajinal fornikte de yerleşim gösterebilir. Nadiren böbrek, akciğer, beyin ve laparotomi skarları gibi pelvis dışı lokalizasyonda da yerleşebilirler (38).

Semptom ve bulgular

Hastaların bazıları asemptomatik olmakla birlikte, ektopik endometriotik odaklar en sık pelviste yerleştiğinden, dismenore, disparoni, kronik nonmenstruel ağrı ve infertilite gibi şikayetlerle doktora başvurdıklarında tesbit edilirler (39). Ayrıca endometriotik odaklar pelvis dışında yerleşmişse, yerleştiği bölgeye özgü semptomlarla da ortaya çıkabilir. Örneğin; intestinal sistem tutulumu olan endometriozisli hastalarda siklik rektal kanama, tenesmus, konstipasyon gibi bulgular ortaya çıkarken; üriner sistem tutulumunda hematüri, pulmoner sistem tutulumunda hemoptizi gibi bulgular da gözlenebilir (40-41-42).

Tanı

Endometriozisin tanısında klinik prezentasyon, fizik muayene, görüntüleme yöntemleri ve CA-125 yardımcı faktörler olmasına rağmen, kesin tanı histopatolojik inceleme ile konur (43).

Klinik prezentasyon hastalığın lokalizasyonuna göre değişmekle birlikte sıklıkla, disparoni, dismenore, kronik pelvik ağrı, infertilite ve pelvik kitledir (44). Fizik ve pelvik muayene bulguları değişkenlik gösterebilir. Minimal endometriozisli hastaların pelvik muayenesi normal olabilir. Overlerdeki

endometriomalar adneksiel dolgunluğa sebep olurken, douglas yerleşimli derin infiltratif endometrioziste douglasta nodularite saptanabilir (45). Spekulum muayenesinde özellikle derin pelvik endometrioziste posterior fornikte mavimsi kırmızimsı implantlar saptanabilse de, pelvik muayenenin endometriozis tanısında yeri sınırlıdır (46).

CA-125, çölömik epitel türevlerinden sentezlenen bir hücre yüzey antijenidir. CA-125 düzeyi başta epitelyal over kanserleri olmak üzere birçok malign ve benign hastalıkta artış gösterir (47). Kan örneklemesinin yapıldığı menstrual siklus CA-125 düzeyini etkilemekle birlikte, menstruasyon sırasında en düşüktür (48). Serum cut-off düzeyi 35 U/ml olup, tarama ve tanı için yeterli güvenilirlik aralığına sahip değildir ve hastalığın tanısında faydası sınırlıdır (49). Tanıda faydası sınırlı olmasına rağmen, CA-125 düzeyindeki düşüşün medikal ve cerrahi tedaviye yanıtın göstergesi olarak kabul edilebileceği düşünülmektedir (50).

Görüntüleme yöntemi olarak ultrasonografi özellikle overde yerleşimli düşük dansiteli ekolar içeren kistik yapıların görülmesi ile endometrioma açısından tanıda yardımcı olabilir. Ultrasonografinin endometrioma tanısında sensitivitesi %80, spesifitesi %95'in üzerinde bildirilmiştir. Fakat tanısal değeri 2 cm'in üzerindeki endometriomalar için geçerlidir (51). Ayrıca ultrasonografide öpüşen overlerin görülmesi de endometriozisin varlığı ve şiddeti konusunda değerli bir bilgi olarak kabul edilmektedir (52). Manyetik rezonans görüntüleme (MRI) ise özellikle derin endometriozisli hastaların tanısında yardımcı olabilir. Sensitivitesi %92, spesifitesi %98'dir (53).

Endometriozis tanısında altın standart, laparotomi veya laparoskopi ile lezyonların doğrudan görülüp, alınan örneklerin histopatolojik incelenmesi ile tanının doğrulanmasıdır (54). Laparoskopik incelemede lezyonların görüntüsü

çeşitlilik gösterebilir. Bu çeşitliliği yaratan gland-stroma oranı, skarlaşma, lezyon içi kanama, hemosiderin miktarı gibi nedenlerdir (55).

Klasik lezyon mavi-siyah ya da kül yanığı şeklinde olup, beyaz lezyonlar, çilek benzeri kırmızı lezyonlar peritoneal defektler ve ovaryen çikolata kistleri de görülebilir. Lezyonların tipik histopatolojik özellikler gösterme oranı %50-70'tir. Yani tanı her zaman histopatolojik olarak doğrulanmayabilir, ancak histopatolojinin negatif olması tanıyı ekarte ettirmez (56). Endometriozis tanısında hem cerrahi hem de histopatolojik tekniklerin de kendi içinde sınırlamaları bulunmaktadır. Cerrahi olarak lezyonun saptanamaması veya saptanan lezyonun histopatolojisinin negatif çıkması tanıda zorluklar yaratabilmektedir. Son zamanlarda endometriozis tanısına yönelik çalışmalar daha çok genetik ve biyokimyasal indikatörlere dayanmaktadır (57)

Evreleme

Hastalığın tanısı ve prognozunda lezyonların boyutu ve lokalizasyonları önemli olduğundan ve makroskopik değerlendirme aşamasında subjektiviteyi ortadan kaldırmak, infertilite ve pelvik ağrı prognozunu değerlendirebilmek için evreleme yapılmıştır. Halen Amerikan Üreme Tıbbı Derneği'nin 1996'da revize edilmiş klasifikasyon sistemi kullanılmaktadır (Tablo1) (58-59).

Tablo 1: Endometriozisin evrelendirilmesi

PERİTON	ENDOMETRİOZİS		< 1 cm	1-3 cm	> 3 cm	
		Yüzeysel		1	2	4
	Derin		2	4	6	
OVER	Sağ	Yüzeysel	1	2	4	
		Derin	4	16	20	
	Sol	Yüzeysel	1	2	4	
		Derin	4	16	20	
POSTERİOR CULDESAC OBLİTERASYONU		Parsiyel	Komplet			
		4	40			
OVER	ADEZYON		< 1/3'ü kaplı	1/3-2/3'ü kaplı	> 2/3'ü kaplı	
	Sağ	İnce	1	2	4	
		Dens	4	8	16	
	Sol	İnce	1	2	4	
		Dens	4	8	16	
	TUBA	Sağ	İnce	1	2	4
			Dens	4	8	16
		Sol	İnce	1	2	4
Dens			4	8	16	

Evre I (minimal):1-5;

Evre II (hafif): 6-15;

Evre III(orta): 16-40

Evre IV(şiddetli): >40

Tedavi

Endometriozis tedavisindeki amaç, endometriozise bağlı olarak oluşan semptomların ve infertilitenin ortadan kaldırılmasıdır. Endometriozis tedavisi ve takibi uzun süre gerektiren bir hastalıktır. Günümüzde tedavide seçilebilecek yöntemler cerrahi (Tablo 2), medikal (Tablo 3) veya medikal-cerrahi tedavi şeklinde olabilir. Laparoskopi endometrioziste hem tanı hem de tedavi seçeneği sunabilmektedir.

Tablo 2: Cerrahi metodlar

Endometriotik odakların eksizyonu veya ablasyonu
Adezyolizis
Cul-de-sac liberasyonu
Laparoskopik uterin sinir ablasyonu (LUNA)
Presakral nörektomi
Histerektomi ve bilateral salpingooferektomi (seçilmiş olgularda)

LUNA ve presakral nörektomi özellikle endometriozise bağlı ağrının tedavisinde seçilebilecek yöntemlerdir. LUNA sakrouterin ligament boyunca uterusun sempatik, serviksin parasempatik liflerinin , presakral nörektomi ise superior hipogastrik pleksus hizasında uterusun sempatik innervasyonunun kesilmesidir. 1 yıllık takipte LUNA ile ağrıda %62-81, presakral nörektomide %80-91 azalma izlenmiştir. Cerrahi sonrası özellikle evre III ve IV olgularda 6 ay boyunca medikal tedavi verilmesi pelvik ağrı nüksünün azalmasını sağlamaktadır.

Endometriozis östrojen bağımlı bir hastalık olduğundan geleneksel medikal tedaviler genellikle hipoöstrojenizm (kombine oral kontraseptifler, GnRH analogları, danazol gibi) oluşturmaya yöneliktir. Fakat son zamanlarda yeni tedavi yöntemlerine yönelik daha çok moleküler düzeyde çalışmalar yapılmaktadır. Selektif progesteron veya östrojen reseptör modülatörleri, aromataz inhibitörleri, anjiogenezis inhibitörleri, matriks metalloproteinaz inhibitörleri bunlar arasındadır (Tablo 3) (60).

Tablo 3: Medikal tedavide kullanılan ajanlar

Medikal tedavide kullanılan ajanlar	Yeni medikal tedavi seçenekleri
Kombine oral kontraseptifler	Antiprogestinler
GnRH analogları	Selektif progesteron reseptör modülatörleri
Progestagenler	Selektif östrojen reseptör modülatörleri (SERM)
Danazol	Östrojen reseptör beta Agonistleri
NSAID	GnRH antagonistleri
Levonorgestrelli intrauterin sistem	Aromataz inhibitörleri
	COX-2 inhibitörleri
	TNF-alfa inhibitörleri
	Immunmodulatorler
	Anjiogenezis inhibitorleri
	Matriks metalloproteinaz inhibitörleri

Kombine oral kontraseptifler (OKS): Endometriozisin tedavisinde genellikle ilk seçenek olarak sürekli veya siklik düşük doz monofazik OKS yaygın olarak kullanılmaktadır. Esas etki mekanizması ektopik endometriumun desidualizasyonu (yalancı gebelik) sağlamakla birlikte, ovulasyonun inhibisyonu ve apoptozisi indükleyici etkiye de sahiptir. Yapılan çalışmalarda etkinlik açısından GnRH analogları ile aralarında anlamlı fark bulunmamıştır (61).

GnRH analogları: Hipofizdeki GnRH reseptörlerine bağlanarak down regülasyonla gonadotropinleri azaltır (yalancı menapoz). Sıcak basması, vajinal kuruluk, libido azalması, osteoporoz kullanım sırasında oluşabilecek yan etkilerdendir. 6 aylık kullanımda trabeküler kemik kaybı %6-8'dir. Kemik mineral dansitesindeki bu azalma ilacın kullanımını sınırlamasına rağmen, add-back tedavi ile bu önlenbilir (62). Add-back tedavi GnRH analogunun sebep olduğu hipoostrojenizme bağlı oluşacak yan etkileri önlemek için östrojen ve progesteron içeren preparatlarla yapılabilir. GnRH analogları ile plaseboyu karşılaştıran çalışmalarda pelvik ağrıda anlamlı derecede azalma bildirilmiştir(63).

Progestagenler: Hem ötopik hem de ektopik endometriumda desidualizasyon ve atrofi oluşturur. Ayrıca ovulasyon, matriks metalloproteinazları ve anjiogenezi inhibe edici ve inflamasyonu azaltıcı etki de gösterir (64). Hangi tip progesteronun kullanılabileceği kesin olarak kanıtlanmamıştır. Medroksiprogesteron asetat, megestrol asetat, gestrinon, noretisteron asetat, siproteron asetat seçenekler arasındadır. Kullanım sırasında depresyon, kilo alımı, düzensiz kanamalar, başağrısı gibi yan etkiler oluşabilir.

Danazol: Hipotalamo-hipofizer aksı inhibe ederek (yalancı menapoz) etki gösteren androjenik bir ajandır. Akne, hirsutismus, kilo alımı, lipid profilinde olumsuz etki, meme atrofisi, depresyon, ses kalınlaşması gibi kullanımını kısıtlayan önemli yan etkileri mevcuttur. Yan etkilerinin fazla olması nedeniyle tedavide tercih edilmemektedir.

Nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar: Siklooksijenaz enzimini inhibe edip, prostaglandin sentezini azaltarak semptom giderici etki gösterir. Aynı zamanda yapılan bir çalışmada endometriotik odakların büyümesini de inhibe edici etkisi gösterilmiştir, fakat bu etkiye yönelik insan çalışması yoktur (65).

Yeni medikal tedavi ajanlari

Selektif progesterone reseptör modölatörleri: Asoprisnil, progesteron reseptörüne yüksek affinite ile, glukokortikoid reseptörlerine düşük affinite ile bağlanırken; östrojen ve minerelokortikoid reseptörlerine bağlanmaz. Doza, dokuya ve ortamdaki progesteron oranına bağlı olarak agonist veya antagonistik etki gösterir. Östrojene bağlı oluşan endometrial proliferasyonu suprese edip, aynı zamanda endometrial damarları direk etkileyerek amenore oluşturur. Hem ötopik hem de ektopik endometriumda sitokin salınımını azaltarak dismenoreye de faydalı olur (66).

Selektif östrojen reseptör modölatörleri: Agonist ya da antagonistik etki ortamdaki östrojen konsantrasyonuna bağlıdır (67). Genistein, östrojen reseptör beta agonisti olan nonsteroidal fitoöstrojendir. Yüksek östrojenik ortamda antagonistik etki yapar. Kardiyoprotektif ve lipid profili üzerine de olumlu etkileri vardır (68). Raloksifen de postmenapozal osteoporoz tedavisinde kullanılan östrojen reseptör alfa antagonistidir. Rat endometriozis modellerinde yapılan çalışmalarda genistein ve raloksifenin endometrial odakları küçülttüğü gösterilmiştir (69).

Antiprogestagenler: Östrojenin endometrium üzerindeki etkisini ve ovulasyonu inhibe ederek amenore oluştururlar. Mifepriston ve onapriston gibi progesteron reseptör antagonistlerinin endometriotik odaklarda küçölmeye sebep olduğu gösterilmiştir (70-71).

Östrojen reseptör beta agonisti: Deneysel endometriozis modelinde, östrojen beta agonisti olan ERB-041' in endometriotik odakları küçölttüğü gösterilmiştir (72).

GnRH antagonistleri: GnRH agonistlerine göre daha kısa sürede etki göstermesi, hasta uyumunun daha iyi olması ve flare etkisinin olmaması gibi avantajları vardır (73).

Aromataz inhibitörleri: Ektopik endometrial odaklarda östrojen sentezinde hız kısıtlayıcı basamak olan aromataz aktivitesinin arttığı bilinmektedir. Dolayısıyla, aromataz inhibisyonu ile ortamdaki östrojenin azaltılması tedavide faydalı olabilir. Letrozol ve anastrozol kullanılan aromataz inhibitörlerindedir.

Immunomodülatörler: Rat endometriozis modellerinde leflunomidin, makrofaj aktivitesini engelleyip, TNF alfa'yı azaltarak endometriotik odakları küçülttüğü gösterilmiştir (74).

TNF alfa inhibitörleri: TNF alfa makrofajlardan salınan ve anjiogenik, endometrial hücre proliferasyonunu ve matriks metalloproteinazlarının ekspresyonunu arttırıcı etkiye sahiptir. Bu etkilerinden dolayı TNF alfanın inhibisyonunun endometriozis tedavisinde faydalı olacağı düşünülmektedir. Fakat TNF alfa ile ilgili bildirilen bir olgu sunumunda endometrial implantlarda gerileme tesbit edilmemiştir (75).

COX-2 inhibitörleri: Hem ötopik hem de ektopik endometriumda COX-2 ekspresyonu gösterilmiştir. Selekoksisib, rofekoksib gibi COX-2 inhibitörlerinin hem prostaglandin sentezini hem de anjiogenezisi inhibe ederek endometrial odakları geriletteği gösterilmiştir. Fakat morbidite ve mortalitesi nedeniyle bu ilaçlar kullanılmamaktadır (76-77).

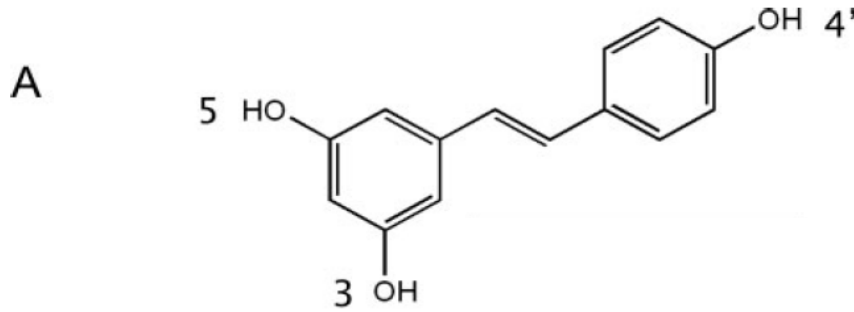
Anjiogenezis inhibitörleri: Endometriozisin gelişiminde anjiogenezis önemli rol oynamaktadır. Endometriotik odaklarda vaskülarizasyonun ve peritoneal sıvıda da anjiogenik faktörlerin arttığı gösterilmiştir. RANTES

(regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) tarafından kontrol edilen monosit ve makrofajlarda endometriozis gelişiminde önemli rol oynarlar. Makrofaj ve nötrofillerden eksprese edilen ve en önemli anjiogenik faktör olan VEGF'un endometrioziste peritoneal sıvıda ve endometriotik odakta arttığı bulunmuştur. Östrojen ve prostaglandin sentezinde görev alan COX-2 ve aromatazda dolaylı olarak VEGF ile ilişkilidir. Dolayısıyla anjiogenezisi inhibe eden ajanlar (endostatin, anjiostatin, yüksek doz statin, PPAR gama ligandları) ve VEGF inhibisyonu sağlayan ajanlar (VEGF antikoru, rapamisin, rosiglitazon spesifik COX-2 inhibitörleri) endometriozis tedavisinde faydalı olabilir (78-79).

Matriks metalloproteinaz inhibitörleri: Vasküler bazal membran yıkımı, ekstraselüler matriks yıkımı ve endotel hücre migrasyonu anjiogenezis için gereklidir. Ekstraselüler matriks yıkımı ile endotelden anjiogenik faktörler salınır ve bu faktörlerin (fibroblast growth faktör, TGF-alfa, TGF-beta, TNF-alfa ve VEGF) parakrin ve otokrin etkileri sonucu anjiogenez başlar. Çinko bağımlı peptidazlardan olan MMP'lar ekstraselüler matriksin yıkımı ve proanjiogenik faktörlerin yapımına neden olmasından dolayı anjiogeneziste önemli rol oynar. Bunların kontrolü önemlidir ve gen transkripsiyonu, posttranlasyonel zimojen enzim aktivasyonu ve salgılanan MMP doku inhibitörleri ile sağlanmaktadır. Invazyon, anjiogenezis, büyüme ve metastaz gibi tümör gelişiminin tüm aşamasında da etki göstermektedir. Squalamine:(AE-941,U-995), genistein, nobiletin, mirisetin, curcumin, xanthorhizzol, catechins, theaflavin, resveratrol, BB-94 (Batimastat), doksisiklin, Ro-28-2653 ve GM6001 MMP inhibitörü yapan bazı maddelerdir (80-81-82-83-84).

RESVERATROL

Resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) ilk kez 1976 yılında Langcake ve Pryce tarafından üzümde fitoaleksinin olarak bulunmuştur (Resim 1) (85). Başta üzüm olmak üzere fındık, çilek ve birçok taze meyvede bulunmaktadır. Resveratrolun trans-resveratrol ve cis-resveratrol olmak üzere iki izoformu bulunmaktadır. Yüksek pH ve ultraviyole ışık trans- cis dönüşümüne sebep olurken; düşük pH, yüksek ısı ve gün ışığı cis- trans dönüşümüne sebep olmaktadır. Trans izomer daha stabil olan formdur (86). Resveratrolün yaklaşık %20'lik kısmı duodenumdan absorbe edilip, bütün organlara yayılır ve absorbe edilen major form resveratrol-glukuroniddir (87). Resveratrolün glukuronidasyonu duodenum ve karaciğerde gerçekleşir. Glukuronidasyonun major ürünü trans-resveratrol-3-O-glukuronid, trans-resveratrol-4'-glukuronid, and trans-resveratrol-3-O-sulfattir (88). Plazmada serbest trans-resveratrol çok az miktarda bulunur ve yarı ömrü kısadır.



Resim 1: Resveratrolun kimyasal yapısı

Resveratrolün tümör gelişimindeki çeşitli hücrel olayları inhibe ederek kanserden koruyucu etki oluşturduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (89-90-91-92). Resveratrolün antitümör etkisi tam olarak anlaşılmasına rağmen; antiöstrojenik etkisi, p53, fas-fas ligand sistem ve mitojen aktif edilmiş protein kinaz (MAPK) ekspresyonunu aktive etmesi; p4501A1, ribonükleotid redüktaz,

ornitin dekarboksilaz, protein kinaz C, DNA polimeraz inhibisyonu ve apoptozisi indüklemesi nedeniyle antitümör etkisi gösterdiği düşünülmektedir (90-91-92-93-94-95-96-97-98-99-100-101). Bunun yanında, anjiogenezisi inhibe edici etkisinde oluşturduğu antitümör etkide rol oynadığı düşünülmektedir. Yeni damar oluşumu endotelial hücre aktivasyonu ve proliferasyonu, bazal membrane hasarı, aktive ve proliferen olan endotelial hücrelerin stromal boşluğa invazyonu gibi çok basamaklı bir süreçtir (102). Anjiogenezisde rol oynayan VEGF veya FGF gibi moleküllerin inhibisyonu ve kapiller benzeri tüp formasyonunun supresyonu ile anjiogenezis kontrol altına alınabilir. Yapılan çalışmalarda t-resveratrolün endotelial hücre mikrotubul destabilizasyonu ve FGF beta ve VEGF inhibisyonu ile anjiogenezisi inhibe ettiği gösterilmiştir (103-104-105-106).

Resveratrolün monosit ve alveolar epitelyal hücrelerde nükleer faktör- kappa B ve aktivatör protein -1 inhibisyonu ile siklooksijenaz 2 ve nitrikoksit sentaz enzimlerini suprese ederek inflamasyonu sınırlayıcı etkisi gösterilmiştir (107-108). Aynı zamanda, nükleer faktör- kappa B (NF-kappa B) ile regüle edilen matriksmetalloproteinaz-9, hücre yüzey adezyon molekülleri (intersellüler adezyon molekülü-1 (ICAM-1), endotelial lökosit adezyon molekülü-1 (ELAM), vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1) gibi çeşitli moleküllerin de supresyonunu sağlar. Antiinflamatuvar etkinin yanı sıra NF-kappa B aracılı eksprese olan bazı genlerin supresyonuyla da antikanserojenik etki gösterir (105). C-resveratrol de NF-kappa B gen ailesinin ekspresyonunu, monosit kemotaktik peptid-1 (MCP-1), RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) transkripsiyonunu, monosit koloni-stimüle edici faktör-1 (M-CSF), granülosit-monosit koloni sitümüle edici faktör 2 (GM-CSF), granülosit koloni sitümüle edici faktör 3 (G-CSF), transforming growth faktör beta (TGF-beta) ve ekstrasellüler ligand interlökin 1 (IL-1) gibi proinflamatuvar sitokinleri inhibe eder. Buna karşın, c resveratrol interlökin 6 (IL-6), tümör nekrozis faktör alfa (TNF alfa), interlökin regulatuar faktör-1 (IRF-1) gibi bazı proinflamatuvar sitokinleri de sitümüle ederek pro-inflamatuar yolakta dengeleyici etki gösterir (109).

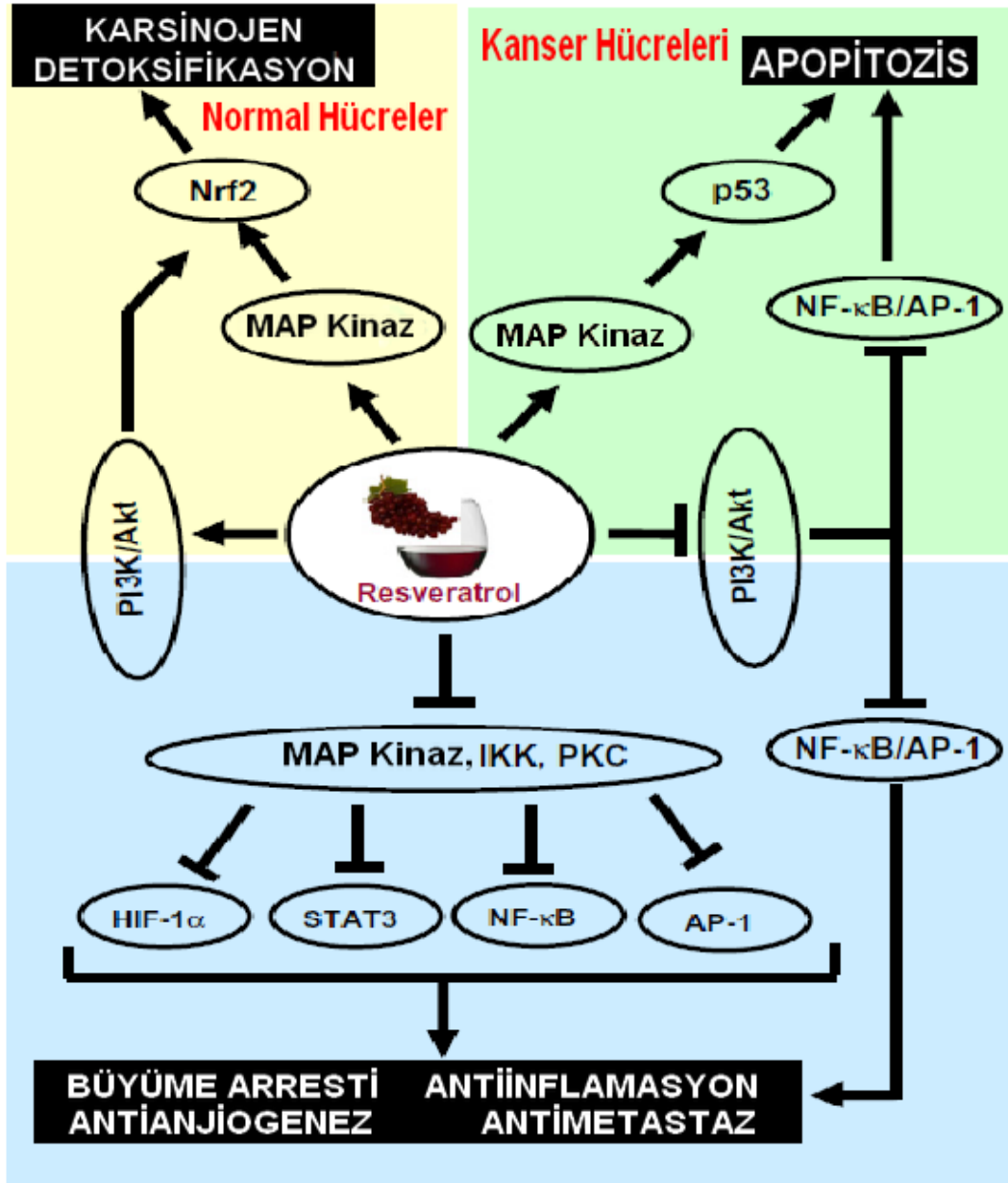
Aromataz aktivitesini suprese ederek östrojen sentezini sınırlayıcı etkiside yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (110).

Karaciğerde lipid sentezi ve lipoprotein oksidasyonunu engelleyerek antioksidan etki gösterir (111-112-113). Ek olarak, damarları aterosklerozdan korur, trombosit agregasyonunu ihibe eder ve eikanazoid sentezini azaltır (100-114)

Bugüne kadar yapılmış çalışmalara göre endometriozis tedavisinde medikal ajanlar tedavi edici değildir ve genel olarak birbirlerine üstünlükleri yoktur. Medikal tedavi sonrasında rekkürens yıllık %5-20, 5 yıl sonra %40'tir (115). Şu an için cerrahi tedavi medikal tedaviden daha üstündür. Dolayısıyla daha efektif, daha az yan etkiye sahip medikal tedavi için ajan arayışı devam etmektedir.

Tablo 4: Resveratrolün etkileri

DNA sentezinin inhibisyonu
Apopitozis indüksiyonu
Anjiogenezis inhibisyonu
Antiinflamatuvar etki
Aromataz inhibisyonu ile antiöstrojenik etki
Trombosit agregasyonunun inhibisyonu
Aterosklerozdan koruyucu etki
Antioksidan etki
Kanserden koruyucu etki



GEREÇ VE YÖNTEMLER

Araştırmanın yeri ve ortamı

Bu çalışma, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi hayvan deneyleri laboratuvarında ağırlıkları 200-250 gr arasında değişen 24 adet wistar-albino dişi rat üzerinde yapıldı. Hayvanlar çalışmaya başlamadan 1 hafta önce araştırma merkezine getirilerek, 22°C sabit sıcaklıkta, 12 saat gündüz, 12 saat gece ortamında tutularak ve standart rat yemi verilerek deneye hazırlandı. Deneyde kullanılacak hayvanlar, 12 saat önce aç bırakılarak sadece su içmelerine izin verildi.

Araştırma Tipi

Deneyssel müdahale; deneyssel çalışma protokolü Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneyssel Araştırma Kurulu tarafından, etik ve bilimsel yönden onaylandıktan sonra, National Institute of Health 'Guide for the care and Use of Laboratory Animals' kurallarına uygun olarak gerçekleştirildi. Deneyde kullanılan ratlar, Gazi Üniversitesi Araştırma Merkezine bağlı hayvan laboratuvarından temin edildi (Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu G.Ü.ET-08.031 projesi) (69).

Anestezi

Bütün hayvanların anestezi 50 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar; Eczacıbaşı Warner-Lambert ilaç sanayi, Levent- İstanbul) ve 7 mg/kg xylazine hidroklorit'in (Rompun-Bayer Sisli- İstanbul) aseptik şartlarda intraperitoneal verilmesi ile sağlandı.

Araştırma Grupları

Deneysel çalışma, daha önce Başkent Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'nda yapılan bir tez çalışmasında tarif edilen hayvan modeline uygun olarak planlandı (74). Ratlarda birinci laparotomi ile endometrial implantlar oluşturuldu. 21 günlük bekleme süresi sonrasında kontrol laparotomilerinde endometrial implant odaklarının başarılı biçimde olduğu tespit edildi ve deneysel çalışma, randomize seçilen 3 grup üzerinde yapıldı.

Grup I: Resveratrol, 60mg/kg/gün (peroral, 21 gün) (104) (Resveratrol; now foods, bloomingdale, USA)

Grup II: GnRH analogu grubu (Löprolid asetat,1mg/kg, subkutan, tek doz) (Lucrin; Abbott, Cedex, Istanbul, Turkey)

Grup III: Kontrol grubu

Araştırma Parametreleri ve Yöntemi

Laparotomi Modeli

Araştırma için işlemler 3 aşamada yapıldı:

1. aşama: Araştırmaya 24 adet rat ile başlandı. Ratların tamamına ilk işlem sırasında %10 povidone iodin solüsyonu kullanılarak cilt antisepsisi sağlandı. Bütün ratlarda, 50 mg/kg ketamin HCL ve 5-7 mg/kg xylazin HCL aseptik şartlarda intraperitoneal verilerek anestezi sağlandı.

Laparotomi ile 5 cm alt orta hat insizyonu yapıldıktan sonra sol uterin horn, uterotubal junction ve servikal bölge arasında tutulup kesilerek uzaklaştırıldı. Alınan dokudan endometrium diseke edilerek steril salin solüsyona yerleştirildi. Takiben batın ön duvarı peritonuna vaskülarizasyonun yoğun gözleendiği alanlara endometrial doku (ortalama 30 mm²), 5/0 prolene sütün ile tutturuldu. Batın ön duvarı ve cilt sırasıyla vicryl 3/0, prolene 4/0 kullanılarak kapatıldı. Tüm operasyonlar standart şekilde tek bir araştırmacı tarafından uygulandı.

2. aşama: Tüm ratlar, 21 gün boyunca sadece günlük besinlerini alacak şekilde ek bir ilaç verilmeden takip edildi. 3 haftalık takip süresi sonrası bütün ratlara endometrial implantların durumlarını gözlemek ve implantlarının alanlarının ölçümlerini yapmak üzere 2. laparotomi işlemi aynı yöntemler ile uygulandı. İşlem sırasında endometrial implantların başarı ile oluştuğu gözleendi (Resim 2). Odakların çapları metrik cetvel ile ölçülerek alanları mm² cinsinden tek tek not edildi. Peritoneal kaviteye 2 cc serum fizyolojik (SF) verildikten sonra geri çekilerek, tedavi öncesi peritoneal sıvı örnekleri elde edildi.

Ölçüm işlemleri sonrası ratların batınları, aynı şekilde kapatılarak 3 günlük dinlenme süresi verildi. Dinlenme süresinin ardından toplam 24 rat, randomize olarak 3 eşit gruba ayrıldı (Grup I, Grup II ve Grup III) ve ayrı kafeslere alındı. 21 gün boyunca grup III, sadece günlük su ve yemleri ile beslenirken; grup I'e ek olarak, 60 mg/kg resveratrol orogastrik tüp ile verildi. Grup II'e ise 1 mg/kg subkutan, tek doz olacak şekilde löprolid asetat verildi. Bu işlemler sırasında grup 1 ve grup 3'ten birer rat bilinmeyen bir nedenle eks oldu. Kalan 22 rat 21 gün boyunca izlendi.

3. aşama: 21 günlük tedavi sonunda, 3. laparotomi işlemi yapıldı. İşlem sırasında, endometriotik odakların çapları tek tek ölçülerek not edildi ve tekrar peritoneal kaviteye 2 cc SF verildikten sonra geri çekilerek tedavi sonrası olan

peritoneal sıvı örnekleri elde edildi. Takiben histopatolojik inceleme için endometrial implantlar eksize edildi. Ardından intrakardiak kan alınarak, hayvanlara ötenazi uygulandı.



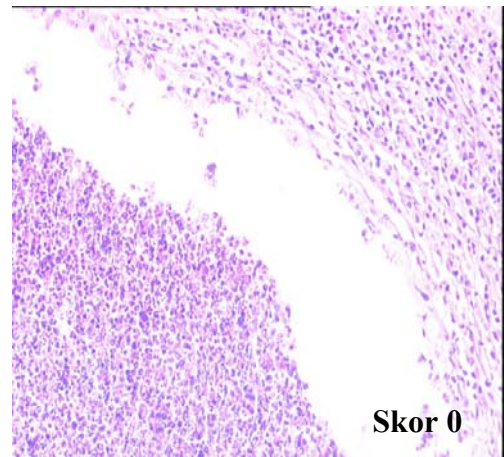
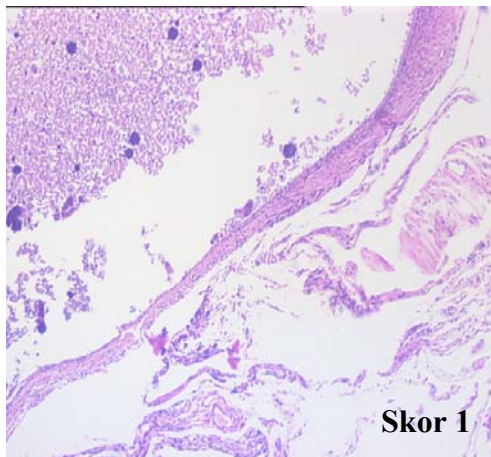
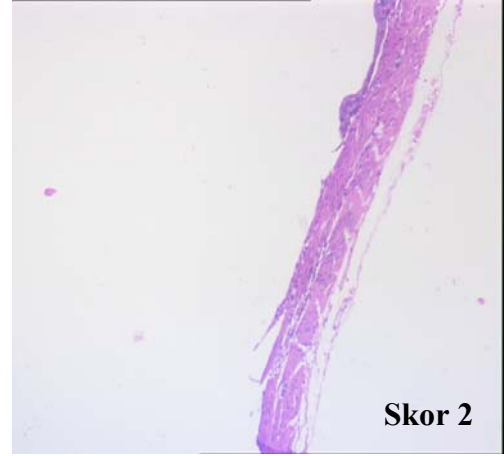
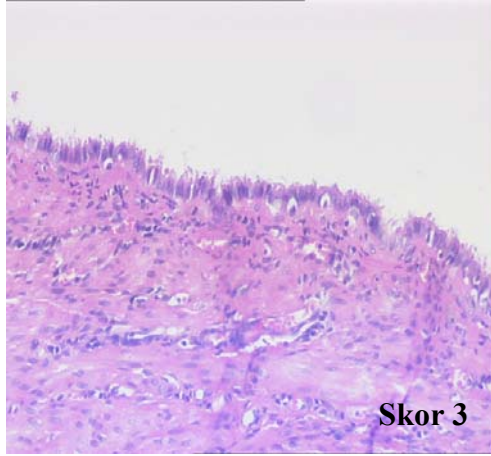
Resim 2: Oluşturulan ektopik endometriotik odaklar

Histopatolojik Değerlendirme

Eksize edilen endometrial implantlar, histopatolojik inceleme yapılmak üzere %10 formalin solüsyonu ile tespit edildi. Formalin ile tespit edilmiş endometriotik odaklardan yaklaşık 5 mikrometre kalınlıkta olan parafin kesitler alındı (her örnekten 4 kesit). Örnekler, hematoxilen-eozin ile boyanarak ışık mikroskopisi altında incelendi. İncelemede endometriozis dokusunun, endometrial tabakasının devamlılığı gözönünde bulundurularak histopatolojik skorlama yapıldı (Tablo 4) (Resim 3).

Tablo-4: Histopatolojik skorlama

Skor 3	Iyi korunmuş epitelyal tabaka
Skor 2	Orta derecede korunmuş epitelyal tabaka (lökosit infiltrasyonlu epitel)
Skor 1	Kötü korunmuş epitelyal tabaka (seyrek epitel hücresi)
Skor 0	Epitel hücresi yok



Resim 3: Histopatolojik skorlama (3,2,1,0)

Bu skorlama sistemi ve değerlendirme önceki endometriozis çalışmaları temel alınarak yapıldı (74).

Sitokin Ölçümleri

Peritoneal sıvı ve serumda VEGF ve MCP-1 ölçümleri kantitatif olarak “Enzyme-linked immunosorbent assay” (ELISA) kiti (VEGF için RayBiotech, Inc., Norcross, Georgia, USA); MCP-1 için Bender MedSystems Inc. Burlingame, California, USA) kullanılarak gerçekleştirildi MCP-1 için, intra-assay değişkenlik (CV) % 6.7 inter-assay değişkenlik % 11; VEGF için, intra-assay değişkenlik (CV) % 10 inter-assay değişkenlik % 12 olarak bildirilmiştir. Konsantrasyonlar pg/ml olarak verildi.

İstatistiksel Analiz

Araştırma bulgularının istatistiksel analizi SPSS for windows 13.0 programı ile yapıldı.

Normal dağılımlı (Shapiro-Wilk testi ile belirlendi) parametrik değişkenler ANOVA (varyans analiz) testi ile, post hoc analizi ise Bonferroni test kullanılarak yapıldı. Aynı grubun tedavi öncesi ve sonrası endometriotik odakların ortalama yüzey alanlarının, VEGF ve MCP düzeylerinin analizi paired sample t-test kullanılarak yapıldı .Non normal dağılım gösteren değişkenler için ise Bonferroni düzeltmeli ‘Kruskal-Wallis ve Mann-Whitney U testi testleri kullanıldı. $P < 0.05$ anlamlı olarak kabul edildi. Tüm veriler ortalama \pm SD (\pm Standart Deviasyon) şeklinde bildirildi.

BULGULAR

Grup I (resveratrol grubu) ve III'e (kontrol grubu) ait eksitus olan 2 rat dışında diğer ratlarda çalışma tamamlanabildi. Tedavi öncesinde tespit edilen peritoneal endometrial implantların yüzey alanları ve peritoneal sıvı VEGF ve MCP-1 seviyeleri; tedavi sonrası değerler ile karşılaştırıldı. Aynı zamanda, tedavi sonunda alınan serum örneklerindeki VEGF ve MCP-1 düzeyleri ve tedavi sonrasında, endometriotik dokunun hemotoksilen-eozin ile yapılan boyaması sonucu elde edilen skorlar da gruplar arasında karşılaştırıldı.

Tedavi başlanmadan ölçülen endometriotik odakların ortalama yüzey alanları ve peritoneal sıvıdaki VEGF ve MCP-1 düzeyleri tüm gruplarda benzerdi.

Yüzey Alanı: Tedavi sonrasında kontrol grubu (Grup III) ile karşılaştırıldığında GnRH analogu (Grup II) ve resveratrol grubunda (Grup I) endometriotik odakların ortalama yüzey alanlarında istatistiksel olarak anlamlı küçülme tesbit edilmiştir ($p=0.000$). Ayrıca, Grup I (resveratrol grubu)'deki azalma Grup II (GnRH grubu)'deki kadar anlamlı çıkmıştır ($p=1.00$). Peritoneal endometrial implantların ortalama yüzey alanı, ilaçla tedaviden sonra; grup I'de 44.15 ± 5.01 'den 7.14 ± 2.96 ' ya; grup II'de 46.00 ± 11.16 'dan 6.37 ± 2.82 'ye düşmüştür. Kontrol grubunda tedavi öncesi ve sonrasında beklendiği gibi istatistiksel olarak anlamlı değişiklik olmamıştır ($p=0.145$) (Tablo 5).

Histopatolojik skora: GnRH agonisti (Grup II) ve resveratrol (Grup I) gruplarında, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, endometrial odakların ortalama histopatolojik skorlarında istatistiksel olarak anlamlı azalma tespit edilmiştir . Resveratrol grubunda ki azalma GnRH grubundaki azalma kadar anlamlı olarak bulunmuştur (Tablo 5).

VEGF ve MCP-1 düzeyleri: Peritoneal sıvıdaki VEGF ve MCP-1 düzeyleri değerlendirildiğinde; grup I (resveratrol grubu) (VEGF için $p=0.019$, MCP-1 için $p=0.025$) ve grup II'de (GnRH analogu grubu) (VEGF için $p=0.016$, MCP-1 için $p=0.017$), tedavi öncesi ve sonrasındaki değerler grup III (kontrol grubu) ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı azalma tesbit edilmiştir. Grup I'de peritoneal sıvı VEGF düzeyi, 80.95 ± 15.95 ' den, 31.36 ± 30.44 'ye; MCP-1 düzeyi 2.68 ± 1.87 ' den, 2.07 ± 2.06 'ya düşerken; grup II'de peritoneal sıvı VEGF düzeyi, 69.88 ± 9.64 ' den, 31.64 ± 27.32 'ye; MCP-1 düzeyi 3.74 ± 2.11 ' den, 2.00 ± 1.89 ' ye düşmüştür (Tablo 6).

Tedavi sonrası alınan kan örneklerinde bakılan VEGF ve MCP-1 düzeylerine değerlendirildiğinde; resveratrol (grup I) (VEGF için $p=0.000$, MCP-1 için $p=0.027$) ve GnRH analogu (grup II) (VEGF için $p=0.000$, MCP-1 için $p=0.005$) gruplarında kan VEGF ve MCP-1 düzeyleri kontrol grubu (grup III) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düşük saptanmıştır (Tablo 6) .

Tablo 5: Tedavi öncesi ve sonrası endometriotik yüzey alanlarının ve tedavi sonrası endometriotik implantların histopatolojik skorlarının karşılaştırılması

Değişkenler	Grup 1 (resveratrol grubu)	Grup 2 (GnRHa grubu)	Grup 3 (kontrol grubu)	P değeri
Rat sayıları	7	8	7	
Tedavi öncesi ortalama endometriotik yüzey alanı (mm ²)	44.14±5.01	46.00±11.16	45.77±7.96	NS
Tedavi sonrası ortalama endometriotik yüzey alanı (mm ²)	7.14±2.96^a	6.37±2.82^a	43.71±6.47	<.05
Tedavi sonrası endometriotik implantların histopatolojik skoru	1.28±1.25^a	1.25±0.88^a	2.57±0.53	<.05

^a Kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı

Tablo 6: Tedavi öncesi ve sonrası peritoneal sıvı VEGF, MCP-1 düzeyleri; tedavi sonrası VEGF ve MCP-1 düzeylerinin karşılaştırılması

Değişkenler	Grup 1 (resveratrol grubu)	Grup 2 (GnRHa grubu)	Grup 3 (kontrol grubu)	P değeri
Rat sayısı	7	8	7	
Tedavi öncesi peritoneal sıvı VEGF düzeyi	80.95±15.95	69.88±9.64	77.69±9.89	NS
Tedavi sonrası peritoneal sıvı VEGF düzeyi	31.36±30.44^a	31.64±27.32^a	79.48±30.60	P<0.05
Tedavi öncesi peritoneal sıvı MCP-1 düzeyi	2.68±1.87	3.74±2.11	5.45±2.5	NS
Tedavi sonrası peritoneal sıvı MCP-1 düzeyi	2.07±2.06^a	2.00±1.89^a	5.17±1.95	P<0.05
Tedavi sonrası kan VEGF düzeyi	4.55±2.102^a	4.59±1.66^a	10.47±1.78	P<0.05
Tedavi sonrası kan MCP-1 düzeyi	106.01±33.8^a	80.27±33.60^a	224.89±126.66	P<0.05

^a Kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı

TARTIŞMA

Deneysel çalışmamızda, endometriozis oluşturulan ratlarda resveratrol ve GnRH analogunun peritoneal sıvı ve serumdaki VEGF ve MCP-1 düzeyleri ile, ektopik endometriotik odaklar üzerindeki etkisini saptamayı ve bu etkilerin karşılaştırılmasını amaçladık.

Endometriozisin klasik medikal tedavisinde amaç, hipoöstrojenik ortam oluşturmaktır. Bu amaçla en sık kullanılan konvansiyonel medikal tedavi GnRH analoglarıdır. Aynı zamanda, oral kontraseptifler, danazol ve progesteron da bu amaçla kullanılan medikal tedaviler içindedir. Bu ajanlar endometriozis tedavisinde başarılı olmalarına rağmen, oluşturdukları yan etkiler ve infertilite üzerindeki olumsuz etkileri uzun süreli kullanımlarını kısıtlamaktadır. Dolayısıyla, son zamanlarda yan etkisi ve infertilite üzerine olumsuz etkileri daha az olan ve endometriozis tedavisinde etkin yeni ajanlar bulmaya yönelik çalışmalar ağırlık kazanmıştır. Selektif östrojen reseptör modülatörleri, aromataz inhibitörleri, COX-2 inhibitörleri, TNF-alfa inhibitörleri, anjiogenezis inhibitörleri, antiinflamatuvarlar ve matriks metalloproteinaz inhibitörleri etkinliği araştırılan yeni ajanlar arasında dikkati çekmektedir.

Literatürde de gördüğümüz gibi ratlar endometriozis modeli oluşturulmasında uygun hayvanlardır. Otolog endometrial parçalar karın duvarına implante edilerek endometriotik odaklar kolaylıkla oluşturulmaktadır. Oluşturulan modellerde hem endometriozisin patofizyolojisi hem de yeni tedavi ajanlarının etkinliği değerlendirilebilmektedir.

GnRH analogu grubunda endometrial yüzey alanlarında ve peritoneal sıvıdaki VEGF ve MCP-1 düzeylerinde beklenildiği gibi tedavi sonrasında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azalma tesbit edilmiştir. Bunun yanı sıra, tedavi sonrasında bakılan serum VEGF ve MCP-1 düzeyleri ve histolojik

skorlamalar da kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük tesbit edilmiştir. GnRH analogu ile tedavi edilen gruptaki bu anlamlı düşüşlerin endometrial odaklardaki gerilemeden kaynaklandığı düşünülebilir.

Bizim çalışmamızda, resveratrol ile tedavi edilen grupta da GnRH analogunda elde edilen anlamlı düşüşler ve endometrial odaklarda gerileme tesbit edildi. Resveratrol bu etkilerini muhtemelen anjiogeneziste önemli rol oynayan VEGF ve inflamatuvar yanıtta önemli olan MCP-1 gibi ajanları inhibe ederek göstermektedir. Literatürde resveratrolun kanserden

koruyucu etkisi üzerinde durulmuş ve DNA daki oksidatif hasarı önlemesi, inflamatuvar yanıtı azaltması, kanser hücrelerinin proliferasyonunu azaltması, apoptozisi indüklemesinin yanısıra anjiogeneziside bloke ettiği ve bunun da antikanser etkinin oluşmasında önemli olduğu gösterilmiştir (116-117-118-119-120).

Hipoksi durumunda hipoksinin indüklediği oksijen homeostazını ve neovaskülarizasyonu sağlayan bazı faktörler açığa çıkar ki, bunlardan en önemlisi VEGF'dür. Resveratrolun çeşitli mekanizmalarla (protein translasyon düzenleyicilerin inhibisyonu, proteozomal yıkımın arttırılması, mitojen-aktifleştirilmiş protein kinaz inhibisyonu gibi) VEGF gibi hipoksi durumunda ortaya çıkan oksijen homeostazını ayarlayan ve neovaskülarizasyonda görev alan faktörlerin ekspresyonunu azaltarak anjiogenezisi inhibe ettiği literatürde gösterilmiştir (121). Yapılan çalışmalarda resveratrolun insan dil skuamoz hücre kanserinde ve ratlarda gliomalarda VEGF ekspresyonunu önemli derecede azaltarak (104-122), endotelial hücre mikrotubul destabilizasyonu ve VEGF' yi inhibe ederek anjiogenezisi süprese ettiği (105), yine insan umbilikal veninde matriks metalloproteinaz inhibisyonu, kapiller tubul formasyonunu önleyici ve

endotelial hücre proliferasyon ve mobilizasyonunu engelleyici etkileriyle anjiogenezisi engellediği gösterilmiştir (123).

Resveratrolun VEGF'ü belirgin derecede suprese ederek anjiogenezisi inhibe etmesi sonucu endometrial odaklarda gerileme oluşturmalarının yanısıra ektopik endometriotik odaklarda artan aromataz aktivitesini suprese ederek östrojen sentezini sınırlamasının da regresyonda katkısı olabileceği düşünülmüştür (110).

Resveratrolun, siklooksijenaz 2 ve nitrikoksit sentaz enzimlerini ve monosit kemotaktik peptid-1 (MCP-1), RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) transkripsiyonunu, monosit koloni-stimule edici faktör-1 (M-CSF), granülosit-monosit koloni sitümüle edici faktör 2 (GM-CSF), granülosit koloni sitümüle edici faktör 3 (G-CSF), transforming growth faktor beta (TGF-beta) ve ekstrasellüler ligand interlökin 1 (IL-1) gibi proinflamatuvar sitokinleri inhibe ederek inflamasyonu sınırlayıcı etkisi de gösterilmiştir (107-108-109). Endometriozisin lokal pelvik inflamatuvar bir durum olduğu, aktif makrofajların ve sirkülasyondaki monositlerin endometriozis gelişiminde önemli rol oynadığı düşünüldüğünde; monositler için önemli kemotaktik madde olan ve inflamasyon bölgesine monositlerin toplanmasını sağlayan bir üyesi olan Monosit kemotaktik peptid-1 (MCP-1) büyük önem kazanmaktadır . Yapılan çalışmalarda endometriozisli kadınların peritoneal sıvılarında MCP-1 konsantrasyonunun belirgin derecede arttığı ve bunun hastalığın ciddiyeti ile korelasyon gösterdiği görülmüştür (124-125-126). Bizim çalışmamızda, resveratrol grubunda GnRH analogu grubundaki gibi tedavi sonrası peritoneal sıvıdaki MCP-1 konsantrasyonunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak ve GnRH grubu kadar da anlamlı azalma tesbit edilmiştir. Bunun yanısıra, tedavi sonrası bakılan serum MCP-1 konsantrasyonunda da GnRH analogu grubu kadar anlamlı, kontrol grubuna göre de istatistiksel olarak anlamlı düşüklük tesbit edilmiştir. Bu konsantrasyon düşüklüğünde resveratrolün endometrial odaklarda oluşturduğu regresyonun bir diğer nedeni olarak düşünülebilir (18 - 30).

Çalışmada, resveratrolün endometriozisi tedavi edebileceği konusunda net bir sonuç çıkarılamayacağı gibi; endometriozisin oluşumunu önleyebileceği veya varolan hastalığın ilerlemesine engel olabileceği öngörülebilir. Özellikle hastalığın tanısı konulmuş ve ablatif yöntemlerle tedavisi yapılmış kişilerde rekkürensın önlenmesinde alternatif ajan olarak kullanılabilir. Çalışmanın insan çalışmaları ile tamamlanması ve ilacı bıraktıktan sonraki rekkürens oranı ve süresi konusunda da yeterli bilgi sahibi olunması önemlidir.

Sonuç olarak; günümüzde endometriozisin tedavisinde kullanılan ajanların yan etkilerinin fazla olması ve bu nedenle uzun süreli kullanımının kısıtlı olması gelecekte resveratrol gibi doğal ajanların önemini attıracaktır. Bizim çalışmamızda kullandığımız rezveratrol dozunun endometriozis tedavisinde etkili olduğu görülmesine rağmen, ileride tedavide kullanılacak uygun resveratrol dozunu belirlemek için doza dayalı çalışmalar da planlanabilir.

SONUÇ

1. Reprodüktif çağda özellikle kronik pelvik ağrı ve infertilite gibi şikayetleri olan kadınlarda sık görülen bir problem olan endometriozisin etyopatogenezinde anjiogenezis ve inflamatuvar yanıt önemli rol oynamaktadır.

2. Endometrioziste peritoneal sıvıda ve kanda anjiogeneziste görev alan en önemli sitokin olan VEGF ve inflamatuvar yanıtta rol oynayan makrofaj ve monosit kemotaksisinde önemli sitokin olan MCP-1 artar.

3. VEGF gibi anjiogeneziste görev alan ve MCP-1 gibi inflamatuvar yanıtta rol oynayan sitokinlerin endometriozis oluşumunda önemli rol oynamasından dolayı, bu sitokinlerin inhibisyonu endometriozisin tedavisinde yararlı olabilir.

4. Resveratrol, VEGF ve MCP-1'i inhibe edip, antianjiogenik ve antiinflamatuvar etki göstererek endometriotik odakların gerilemesine neden olabilir.

KAYNAKLAR

1. Amsterdam LL, Gentry W, Jobanputra S, Wolf M, Rubin SD, Bulun SE. Anastrozole and oral contraceptives: a novel treatment for endometriosis. *Fertil Steril* 2005;84:300–4.
2. Vignali M, Infantino M, Matrone R, Chiodo I, Somigliana E, Busacca M, et al. Endometriosis: novel etiopathogenetic concepts and clinical perspectives. *Fertil Steril* 2002;78:665–78.
3. Groothuis PG, Koks CA, de Goeij AF, Dunselman GA, Arends JW and Evers JL Adhesion of human endometrial fragments to peritoneum in vitro. *Fertil Steril* 1999;71,1119–1124.
4. Maas JW, Le Noble FA, Dunselman GA, de Goeij AF, Struyker Boudier HA and Evers JL. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model to investigate the angiogenic properties of human endometrium. *Gynecol Obstet Invest* 1999;48,108–112.
5. Houston DE, Noller K, Melton LJ and Selwin BJ. The epidemiology of endometriosis. *Clinical Obstetrics and Gynecology* 1988;31:787-800.
6. Cramer DW and Missmer SA. The epidemiology of endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 2002;955:11-22; discussion 34-6, 396-406.
7. Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1927; 14:422-25.
8. Cramer DW, Wilson E, Stillman RJ, Berger MJ, Belisle S, Schiff I, Albrecht B, Gibson M, Sradel BV, Schoenbaum SC. The relation of endometriosis to menstrual characteristics, smoking and exercise. *JAMA*. 1986;11; 255 (14): 1904-8.
9. Halme J, Hammond MG, Hulka JF, Raj SG and Talbert LM. Retrograd menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstet Gynecol* 1984; 64: 151- 4.
10. Lauchian SC. The secondary Mullerian system. *Obstet Gynecol Surv* 1972;27:133- 46.
11. Levander G and Normann P. The pathogenesis of endometriosis; an experimental study. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1955; 34:366-98.

12. Kennedy S, Mardon H and Barlow D. Familial endometriosis. *J Assist Reprod Genet* 1995;12:32-4.
13. Kennedy S, Hadfield R, Mardon H and Barlow D. Age of onset of pain symptoms in non-twin sisters concordant for endometriosis. *Hum Reprod* 1996; 11: 403-5.
14. Simpson JL and Bischoff FZ, Heritability and Molecular genetic studies of endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 955:239-51.
15. Baranov VS, Ivaschenko T, Bakay B, Aseev M, Belotserkovskaya R, Baranova H, Malet P, Prriot J, Mouraire P, Baskakov VN, Savitskyi GA, Gorbushin S, Deyneka SI, Michnin E, Barchuck A, Vacharlovsky V, Pavlov G, Shilko VI, Guembitzkaya T, Kovaleva L. Proportion of the GSTM1 0/0 genotype in some Slavic populations and its correlation with cystic fibrosis and some multifactorial diseases. *Hum Genet* 1996; 97: 516-20.
16. Baranova H, Borthorishvilli R, Canis M, Albuissou E, Perriot S, Glowaczower E, Bruhat MA, Baranov V and Malet P. Glutathion S-transferase M1 gene polymorphism and susceptibility to endometriosis in a French population. *Mol Hum Reprod* 1997;3: 775-80.
17. Kennedy S. Genetics of endometriosis: a review of the positional cloning approaches. *Semin Reprod Med.* 2003 May;21(2):111-8. Review.
18. Geumenou AG, Arvanitis DA, Matalliotakis IM, Koumantakis EE, and Spandidos DA. Microsatellite DNA assays reveal an allelic imbalance in p16 (Ink 4), GALT, p53, and APOA2 loci in patients with endometriosis. *Fertil Steril* 2001;75: 160-5.
19. D'Hooghe TM, Hill JA. Immunobiology of endometriosis. In: Bronson RA, Alexander NJ, Anders DJ, et al, eds. *Immunology of reproduction*. Blackwell Science, 1996;322-358.
20. Dmowski WP, Gebel HM and Braun DP. The role of cell-mediated immunity in pathogenesis of endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl* 1994; 159:7-14.
21. Gaetje R, Kotzian S, Herrmann G, Baumann R and Starzinski-Powitz A. Invasiveness of endometriotic cells in vitro. *Lancet* 1995;346:1463-4.
22. Izumiya C, Maeda N, Kusume T, Masumoto T, Yamashita C, Yamamoto Y, Oguri H, Fukaya T. Coordinated but depressed expression of human leukocyte antigen-DR, intercellular adhesion molecule-1, and CD14 on peritoneal macrophages in women with pelvic endometriosis. *Fertil Steril* 2003;80:768-775.

23. Furuya K, Murakami M, Makimura N, Matsuda H, Ikou K, Saito K, Kawakami Y, Shibasaki T, Fukui U, Mizumoto Y et al. Immunological and endocrinological studies on lymphocyte subpopulation and medical treatment for infertility in patients with endometriosis. *Mol Cell Endocrinol* 2003;202:195–199.
24. Akoum A, Kong J, Metz C, Beaumont MC. Spontaneous and stimulated secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage migration inhibitory factor by peritoneal macrophages in women with and without endometriosis. *Fertil Steril* 2002;77:989–994.
25. Bruner-Tran KL, Webster-Clair D, Osteen KG. Experimental endometriosis—The nude mouse as a xenographic host. *Endometriosis: Emerging Research and Intervention Strategies*. New York: New York Acad Sciences, 2002:955;328-39.
26. Lebovic DI, Chao VA, Taylor RN. Peritoneal macrophages induce RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) chemokine gene transcription in endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:1397–1401.
27. Lin YJ, Lai MD, Lei HY, Wing LY. Neutrophils and macrophages promote angiogenesis in the early stage of endometriosis in a mouse model. *Endocrinology* 2006;147:1278–1286.
28. E. Haber, H.D. Danenberg, N. Koroukhov, R. Ron-El, G. Golomb, and M. Schachter Peritoneal macrophage depletion by liposomal bisphosphonate attenuates endometriosis in the rat model *Human Reproduction*, 2009;24,2 pp. 398–407
29. Boucher A, Mourad W, Mailloux J, Lemay A, Akoum A. Ovarian hormones modulate monocyte chemoattractant protein-1 expression in endometrial cells of women with endometriosis. *Mol Hum Reprod* 2000;6:618–626
30. Pizzo A, Salmeri FM, Ardita FV, Sofo V, Tripepi M, Marsico S. Behaviour of cytokine levels in serum and peritoneal fluid of women with endometriosis. *Gynecol Obstet Invest* 2002;54:82–87.
31. Zeitoun K, Takayama K, Michael MD and Bulun SE. Stimulation of aromatase P450 promoter (II) activity in endometriosis and its inhibition in endometrium are regulated by competitive binding of SF-1 and COUP-TF to the same cis-acting element. *Molecular Endocrinology* 1999; 13: 239-53.
32. Yang S, Fang Z, Takashi S, Hironobu S, Jianfeng Z, Gurates B, Tamura M, Ferrer K and Bulun SE. Regulation of aromatase P450 expression in endometriotic and endometrial stromal cells by CCAAT/enhancer binding proteins (C/EBPs): decreased C/EBPbeta in endometriosis is associated with overexpression of aromatase. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(5):2336-45.

33. Gurates B, Sebastian S, Yand S, Zhou J, Suzuki T, Sasano H and Bulun SE. WT1 and DAX-1 inhibit aromatase P450 expression in human endometrial and endometriotic stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(9):4369-77.
34. Attar E and Bulun SE. Aromatase and other steroidogenic genes in endometriosis: translational aspects. *Human Reprod Update* 2006;12(1):49-56.
35. Noble LS, Takayama K, Putman JM, Johns DA, Hinshelwood MM, Agarwal VR, Zhao Y, Carr BR. Prostaglandin E2 stimulates aromatase expression in endometriosis-derived stromal cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1997;82(2):600-6.
36. Whitlock, JP, Jr., Genetic and molecular aspects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-pdioxin action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1990;30:251-77.
37. Sutter, TR, Guzman, K, Dold, KM and Greenlee, WF. Targets for dioxin: genes for plasminogen activator inhibitor-2 and interleukin-1 beta. *Science.* 1991;18;254(5030):415-8.
38. Sinha AK, Agarwal A, Lakhey M, Mishra A, Sah SP. Incidence of pelvic and extrapelvic endometriosis in Eastern region of Nepal. *Indian J Pathol Microbiol.* 2003;46(1):20-3.
39. Vercellini P, Cortesi I, Trespidi L, et al. endometriosis and pelvic pain: relation to disease stage and localization. *Fertil Steril* 1996;65:299-304.
40. Bouhmidi A, Sanchez Torres A, Martiez Jimenez T, Saez Macia R, Sanchez de la Villa G, Montes Clavero C. Rectosigmoid endometriosis. *Rev Esp Enferm Dig.* 2006;98(10):797-8.
41. Zugor V, Schott GE. Endometriosis involving the ureter. The Erlangen experience exemplified by two case reports. *Aktuelle Urol.* 2007;38(1):55-8.
42. Parker CM, Nolan R, Lougheed MD. Catamenial hemoptysis and pneumothoraces in a patient with cystic fibrosis. *Can Respir J.* 2007;14(5):295-7.
43. Guerriero S, Paoletti AM, Mais V, et al. Transvaginal ultrasonography combined with Ca-125 plasma levels in the diagnosis of endometrioma. *Fertil Steril* 1996;65:293-298
44. Spaczynski RZ, Duleba AJ . Diagnosis of endometriosis. *Semin Reprod Med.* 2003;21(2):193-208.

45. Koninckx PR, Meuleman C, Oosterlynck D, Cornillie FJ. Diagnosis of deep endometriosis by clinical examination during menstruation and plasma CA-125 concentration. *Fertil Steril*. 1996;65(2):280-7. .
46. Chapron C, Dubuisson JB, Pansini V, Vieira M, Fauconnier A, Barakat H, Dousset B Routine clinical examination is not sufficient for diagnosing and locating deeply infiltrating endometriosis. *J Am Assoc Gynecol Laparosc*. 2002;9(2):115-9.
47. Bedaiwy MA, Falcone T. Laboratory testing for endometriosis. *Clin Chim Acta*. 2004;340(1-2):41-56.
48. Bon GG, Kenemans P, Dekker JJ, Hompes PG, Verstraeten RA, van Kamp GJ, Schoemaker J. Fluctuations in CA 125 and CA 15-3 serum concentrations during spontaneous ovulatory cycles. *Hum Reprod*. 1999;14(2):566-70.
49. Mol BWJ, Bayram N, Lijmer JG, et al. The performance of Ca 125 measurement in the detection of endometriosis: a meta-analysis. *Fertil Steril* 1998;70:1101-1108
50. Cheng YM, Wang ST, Chou CY. Serum CA-125 in preoperative patients at high risk for endometriosis. *Obstet Gynecol*. 2002;99(3):375-80.
51. Patel MD, Feldstein VA, Chen DC, Lipson SD, Filly RA. Endometriomas: diagnostic performance of US. *Radiology*. 1999;210(3):739-45.
52. Ghezzi F, Raio L, Cromi A, Duwe DG, Beretta P, Buttarelli M, Mueller MD. "Kissing ovaries": a sonographic sign of moderate to severe endometriosis. *Fertil Steril*. 2005;83(1):143-7.
53. Kinkel K, Frei KA, Balleyguier C, Chapron C. Diagnosis of endometriosis with imaging: a review. *Eur Radiol*. 2006;16(2):285-98.
54. Scarselli G, Rizzello F, Cammilli F, Ginocchini L, Coccia ME. Diagnosis and treatment of endometriosis. A review. *Minerva Ginecol*. 2005;57(1):55-78.
55. PM, et al. endometriois: correlation between histolojic and visual findings at laparoscopy. *Am J Obstet Gynecol* 2001;184:1407-1413.
56. Kennedy S, Bergqvist A, Chapron C, D'Hooghe T, Dunselman G, Greb R, Hummelshoj L, Prentice A, Saridogan E; ESHRE Special Interest Group for Endometriosis and Endometrium Guideline Development Group ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Hum Reprod*. 2005 ;20(10):2698-704.
57. Klinik Aktuell Tip, 2006 cilt 11, sayı 12 sf:27-28

58. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril*. 1997;67(5):817-21.
59. Hoeger KM, Guzick DS. Classification of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 1997;24(2):347-59.
60. Chlouber RO, Olive DL, Pritts EA. Investigational drugs for endometriosis. *Expert Opin Investig Drugs*. 2006;15(4):399-407.
61. Davis L, Kennedy S, Moore J, Prentice A. Modern combined oral contraceptives for pain associated with endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007;18;(3):CD001019
62. Franke HR, van de Weijere PHM, Pennings TMM, et al. Gonadotropin-releasing hormone agonist plus “add-back” hormone replacement therapy for treatment of endometriosis: a prospective randomized placebo-controlled double-blind trial. *Fertil Steril* 2000;74:535.
63. Dlugi AM, Miller JD, Knittle J. Lupron depot (leuprolide acetate for depot suspension) in the treatment of endometriosis: a randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Lupron Study Group .Fertil Steril*. 1990;54(3):419-27.
64. Roman H. Guidelines for the management of painful endometriosis *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*. 2007;36(2):141-50.
65. Efstathiou JA, Sampson DA, Levine Z, Rohan RM, Zurakowski D, Folkman J, D'Amato RJ, Rupnick MA. Nonsteroidal antiinflammatory drugs differentially suppress endometriosis in a murine model. *Fertil Steril*. 2005;83(1):171-81.
66. DeManno D, Elger W, Garg R, Lee R, Schneider B, Hess-Stumpp H, Schubert G, Chwalisz K Asoprisnil (J867): a selective progesterone receptor modulator for gynecological therapy.. *Steroids*. 2003;68(10-13):1019-32.
67. Dhingra K Selective estrogen receptor modulation: the search for an ideal hormonal therapy for breast cancer. *Cancer Invest*. 2001;19(6):649-59.
68. Atteritano M, Marini H, Minutoli L, Polito F, Bitto A, Altavilla D, Mazzaferro S, D'Anna R, Cannata ML, Gaudio A, Frisina A, Frisina N, Corrado F, Cancellieri F, Lubrano C, Bonaiuto M, Adamo EB, Squadrito F. Effects of the phytoestrogen genistein on some predictors of cardiovascular risk in osteopenic, postmenopausal women: a two-year randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(8):3068-75.
69. Yavuz E, Oktem M, Esinler I, Toru SA, Zeyneloglu HB. Genistein causes regression of endometriotic implants in the rat model. *Fertil Steril*. 2007;88(4):1129-34.

70. OI shan tang, Pak chung ho Clinical applications of mifepristone Gynecological Endocrinology, 2006; 22(12): 655–659.
71. Stoeckemann K, Hegele-Hartung C, Chwalisz K. Effects of the progesterone antagonists onapristone (ZK 98 299) and ZK 136 799 on surgically induced endometriosis in intact rats. Hum Reprod. 1995;10(12):3264-71.
72. Harris HA, Bruner-Tran KL, Zhang X, Osteen KG, Lyttle CR. A selective estrogen receptor-beta agonist causes lesion regression in an experimentally induced model of endometriosis. Hum Reprod. 2005;20(4):936-41.
73. Schultze-Mosgau A, Griesinger G, Altgassen C, von Otte S, Hornung D, Diedrich K. New developments in the use of peptide gonadotropin-releasing hormone antagonists versus agonists. Expert Opin Investig Drugs. 2005;14(9):1085-97.
74. Uygur D, Aytan H, Zergeroglu S, Batioglu S. Leflunomide--an immunomodulator-- induces regression of endometrial explants in a rat model of endometriosis. J Soc Gynecol Investig. 2006;13(5):378-83.
75. Shakiba K, Falcone T Tumour necrosis factor-alpha blockers: potential limitations in the management of advanced endometriosis? A case report.Hum Reprod. 2006;21(9):2417-20.
76. Ebert AD, Bartley J, David M Aromatase inhibitors and cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors in endometriosis: new questions--old answers?Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2005;1;122(2):144-50.
77. Dogan E, Saygili U, Posaci C, Tuna B, Caliskan S, Altunyurt S, Saatli B. Regression of endometrial explants in rats treated with cyclooxygenase inhibit rofecoxib. Fertil Steril 2004; 82(3):1115-20.
78. Taylor RN, Lebovic DI, Mueller MD. Angiogenic factors in endometriosis. Ann N Y Acad Sci 2002;955:89-100.
79. Becker CM, D'Amato RJ Angiogenesis and antiangiogenic therapy in endometriosis. Microvasc Res. 2007;74(2-3);121-30.
80. Ferdinando Mannello. Natural Bio-Drugs as Matrix Metalloproteinase Inhibitors: New Perspectives on the Horizon? Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery, 2006, 1, 91-103 91.
81. Raffetto JD, Khalil RA, Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease, Biochem Pharmacol 2007;75(2):346-59.

82. Dorothe Burggraf, Andreas Trinkl, Martin Dichgans, Gerhard F. Hamann Doxycycline inhibits MMPs via modulation of plasminogen activators in focal cerebral ischemia. *Neurobiology of Disease* 2007;25;506–513
83. Riazi-Esfahani M, Peyman GA, Aydin E, Kazi AA, Kivilcim M, Sanders DR Prevention of corneal neovascularization: evaluation of various commercially available compounds in an experimental rat model. *Cornea*. 2006;25(7):801-5.
84. De Paiva CS, Corrales RM, Villarreal AL, Farley WJ, Li DQ, Stern ME, Pflugfelder SC Corticosteroid and doxycycline suppress MMP-9 and inflammatory cytokine expression, MAPK activation in the corneal epithelium in experimental dry eye. *Exp Eye Res*. 2006;83(3):526-35.
85. Siemann E, Creasy L. Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *Am J Enol Vitic* 1992;43:49–52.
86. Trela BC, Waterhouse AL. Resveratrol: isomeric molar absorptivities and stability. *J Agric Food Chem* 1996;44:1253–7.
87. Andlauer W, Kolb J, Siebert K, Fu"rst P. Assessment of resveratrol bioavailability in the perfused small intestine of the rat. *Drugs Exp Clin Res* 2000;26:47–55.
88. Yu C, Shin YG, Chow A, Li Y, Kosmeder JW, et al. Human, rat, and mouse metabolism of resveratrol. *Pharm Res* 2002;19:1907–14
89. M. Jang, L. Cai, G.O. Udeani, K.V. Slowing, C.F. Thomas, C.W.W. Beecher, H.H.S. Fong, N.R. Farnsworth, A.D. Kinghorn, R.G. Mehta, R.C. Moon, J.M. Pezzuto. *Science*, 1997;275, 218–220.
90. Schneider Y, Vincent F, Durantion B, et al. Anti-proliferative effect of resveratrol, a natural component of grapes and wine, on human colonic cancer cells. *Cancer Lett* 2000;158:85–91.
91. Surh YJ, Hurh YJ, Kang JY, Lee E, Kong G, Lee SJ. Resveratrol, an antioxidant present in red wine, induces apoptosis in human promyelocytic leukemia (HL-60) cells. *Cancer Lett* 1999;140:1–10.
92. Huang C, Ma WY, Goranson A, Dong Z. Resveratrol suppresses cell transformation and induces apoptosis through a p53-dependent pathway. *Carcinogenesis* 1999;20:237–42.
93. Miloso M, Bertelli AAE, Nicolini G, Tredici G. Resveratrol-induced activation of the mitogen-activated protein kinases, ERK1 and ERK2, in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neurosci Lett* 1999; 264:141–4.

94. She QB, Bode AM, Ma WY, Chen NY, Dong Z. Resveratrol-induced activation of p53 and apoptosis is mediated by extracellular signal-regulated protein kinases and p38 kinase. *Cancer Res* 2001;61: 1604–10.
95. Chun YJ, Kim MY, Guengerich FP. Resveratrol is a selective human cytochrome P450 1A1 inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;262:20–4.
96. Fontecave M, Lepoivre M, Elleingand E, Gerez C, Guittet O. Resveratrol, a remarkable inhibitor of ribonucleotide reductase. *FEBS Lett* 1998;421:277–9.
97. Subbaramaiah K, Chung WJ, Michaluart P, et al. Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells. *J Biol Chem* 1998;273: 21875–82.
98. Sun NJ, Woo SH, Cassady JM, Snapka, RM. DNA polymerase and topoisomerase II inhibitors from *Psoralea corylifolia*. *J Natl Prod* 1998; 61:362–6.
99. Clement MV, Hirpara JL, Chawdhury SH, Hirpara JL, Chawdhury SH, Pervaiz S. Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, triggers CD95 signaling-dependent apoptosis in human tumor cells. *Blood* 1998;92:996–1002.
100. Lu R, Serrero G. Resveratrol, a natural product derived from grapes, exhibits antiestrogenic activity and inhibits the growth of human breast cancer cells. *J Cell Physiol* 1999;179:297–304.
101. Hsieh TC, Wu JM. Differential effects on growth, cell cycle arrest, and induction of apoptosis by resveratrol in human prostate cancer cell lines. *Exp Cell Res* 1999;249:109–15.
102. Carmeliet P (2000) Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6:389–395
103. Eun-Ok Lee, Hyo-Jung Lee, Hwa-Soo Hwang, Kyoo-Seok Ahn, Chanhee Chae, Kyung-Sun Kang, Junxuan Lu, Sung-Hoon Kim Potent inhibition of Lewis lung cancer growth by heyneanol A from the roots of *Vitis amurensis* through apoptotic and anti-angiogenic activities *Carcinogenesis* 2006;27;10 :2059–2069
104. Sheng-Hong Tseng, Swei-Ming Lin, Jin-Cherng Chen, Yen-Hao Su, Hsin-Yi Huang, Chia-Kang Chen, Po-Yin Lin, Yun Chen, Resveratrol Suppresses the Angiogenesis and Tumor Growth of Gliomas in Rats *Clinical Cancer Research* 2004;10, 2190–2202,
105. Mirella Belleri, Domenico Ribatti, Stefania Nicoli, Franco Cotelli, Luca Forti, Vanio Vannini, Lucia Anna Stivala, and Marco Presta Antiangiogenic and Vascular-Targeting Activity of the Microtubule-Destabilizing *trans-*

Resveratrol Derivative 3,5,4_-Trimethoxystilbene Mol Pharmacol 2005;67:1451–1459

106. K. Igura, T. Ohta, Y. Kuroda, K. Kaji. *Cancer Lett.*, 2001;171, 11–16.

107. Birrell MA, McCluskie K, Wong S, Donnelly LE, Barnes PJ, Belvisi MG. Resveratrol, an extract of red wine, inhibits lipopolysaccharide induced airway neutrophilia and inflammatory mediators through an NF-kappaB independent mechanism. *FASEB J* 2005;19:840–1.

108. Manna SK, Mukhopadhyay A, Aggarwal BB. Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF-kappaB, activator protein-1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *J Immunol* 2000;164:6509–19.

109. Leiro J, Arranz JA, Fraiz N, Sanmartin ML, Quezada E, Orallo F. Effect of cis-resveratrol on genes involved in nuclear factor kappa B signaling. *Int Immunopharmacol* 2005;5:393–406.

110. Le Corre, L., Chalabi, N., Delort, L., Bignon, Y. J., and Bernard-Gallon, D. J. Resveratrol and breast cancer chemoprevention: molecular mechanisms. *Mol. Nutr. Food Res.* 2005;49, 462–471.

111. Belguendouz L, Fremont L, Linard A. Resveratrol inhibits metal ion-dependent and independent peroxidation of porcine low-density lipoproteins. *Biochem Pharmacol* 1997;53:1347–55.

112. Frankel EN, Waterhouse AL, Kinsella JE. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet* 1993;34:1103–4.

113. Arichi H, Kimura Y, Okuda H, Baba K, Kozawa M, Arichi S. Effects of stilbene components of the roots of polygonium on lipid metabolism. *Chem Pharm Bull* 1982;30:1766–70.

114. Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. Resveratrol: a molecule whose time has come and gone? *Clin Biochem* 1997;30:91–113.

115. Fedele L, Bianchi S, Dinola G, et al. The recurrence of endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 1994;734:358-364

116. J.K. Kundu, Y.-J. Surh, Molecular basis of chemoprevention by resveratrol: NF- κ B and AP-1 as potential targets, *Mutat. Res.* 2004;555;65–80.

117. B.B. Aggarwal, A. Bhardwaj, R.S. Aggarwal, N.P. Seeram, S. Shishodia, Y. Takada, Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies, *Anticancer Res.* 2004;24;2783–2840.

118. S. Shankar, G. Singh, R.K. Srivastava, Chemoprevention by resveratrol: molecular mechanisms and therapeutic potential, *Front. Biosci.* 2007;12;4839–4854.
119. S. Fulda, K.M. Debatin, Resveratrol modulation of signal transduction in apoptosis and cell survival: a mini-review, *Cancer Detect. Prev.* 2006;30;217–223.
120. A.K. Garg, T.A. Buchholz, B.B. Aggarwal, Chemosensitization and radiosensitization of tumors by plant polyphenols, *Antioxid. Redox Signal.* 2005;7; 1630–1647.
121. Z. Cao, J. Fang, C. Xia, X. Shi, B.H. Jiang, Trans-3,4,5-trihydroxystibene inhibits hypoxia-inducible factor 1 α and vascular endothelial growth factor expression in human ovarian cancer cells, *Clin. Cancer Res.* 2004;10; 5253–5263.
122. Q. Zhang, X. Tang, Q.Y. Lu, Z.F. Zhang, J. Brown, A.D. Le, Resveratrol inhibits hypoxia-induced accumulation of hypoxia-inducible factor-1 α and VEGF expression in human tongue squamous cell carcinoma and hepatoma cells, *Mol. Cancer Ther.* 2005;4; 1465–1474.
123. Cao, Yu, Fu, Zhao-Di, Wang, Fang, Liu, Hong-Yan and Han, Rui. 'Anti-angiogenic activity of resveratrol, a natural compound from medicinal plants', *Journal of Asian Natural Products Research*, 2005;7:3,205 — 213
124. Rollins BJ, Walz A, Baggiolini M. Recombinant human MCP- 1/JE induces chemotaxis, calcium flux, and the respiratory burst in human monocytes. *Blood.* 1991;78:1112-1116.
125. Arici A, Oral E, Attar E, Tazuke SI, Olive DL. Monocyte chemotactic protein-1 concentration in peritoneal fluid in patients with endometriosis and its modulation in human mesothelial cells. *Fertil Steril.* 1997;67:1065-1072.
126. Akoum A, Lemay A, McColl SR, Paradis I, Maheux R. Increased monocyte chemotactic protein-1 level and activity in the peripheral blood of women with endometriosis. *Le Group d'Investigation en Gynécologie. Am J Obstet Gynecol.* 1996;175:1620-1625.

RAT ENDOMETRİOZİS MODELİNDE RESVERATROLÜN ETKİLERİ

Endometriozis, endometrial gland ve stromasının uterin kavite dışında ektopik yerleşmesi olarak tanımlanır. Özellikle reproduktif çağıdaki kadınlarda dismenore, disparoni, kronik pelvik ağrı ve infertilite gibi bulgularla karşımıza çıkar. Östrojen bağımlı bir hastalıktır ve konvansiyonel endometriozis tedavisi hipooestrojenizm oluşturmaya dayanmaktadır. Fakat hipooestrojenizme bağlı oluşan yan etkiler uzun süre kullanılmasını kısıtlamaktadır.

Endometriozisin oluşumundan çeşitli mekanizmalar sorumlu tutulmakla birlikte, endometriozisin oluşumu ve devamında inflamatuvar yanıtın ve anjiogenezisin önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Bizim çalışmamızın amacı, antiinflamatuvar ve anjiogenezisi inhibe edici etki gösteren resveratrolün rat endometriozis modelinde etkilerini araştırmaktır.

Çalışmamızda 24 rat'a 3 laparotomi yapıldı. 1. laparatomide ektopik endometriotik odaklar oluşturuldu. 2. laparatomide odakların tedavi öncesi boyutları ölçüldü ve peritoneal sıvı örnekleri alındı. Sonra,24 rat randomize olarak 3 gruba ayrıldı. Grup I'e resveratrol, 60mg/kg/gün (peroral, 21 gün); Grup II'ye GnRH analogu, Löprolid asetat,1mg/kg, subkutan, tek doz verilirken; Grup III'e kontrol grubu tedavi verilmedi. Medikal tedavi sonrası 3. laparotomi yapılarak, endometrial odakların boyutları ölçüldü, peritoneal sıvı örnekleri alındı ve endometrial odaklar histopatolojik skorlama için eksize edildi.

Çalışmamızın sonucunda, tedavi öncesi ve sonrası endometrial odakların ortalama yüzey alanları, peritoneal sıvıdaki VEGF ve MCP-1 düzeyleri karşılaştırıldığında Grup I (resveratrol grubu) ve Grup II (GnRH analogu grubu)'de kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azalma bulunmuştur. Tedavi sonrası bakılan histopatolojik skor ve kan VEGF ve MCP-1 düzeyleri

Grup I (resveratrol grubu) ve Grup II (GnRH analogu grubu)'de kontrol grubuna göre anlamlı düşük bulunmuştur.

Çalışmamızda, resveratrolün rat endometriozis modelinde, peritoneal sıvıda ve serumda VEGF ve MCP-1'i azaltıp, anjiogenezisi olumsuz yönde etkileyerek ve antiinflamatuvar etki oluşturarak endometriotik odaklarda küçülme sağladığı gösterilmiştir.

Rat endometriozis modelinde, oluşturulan endometriotik odaklar üzerinde resveratrolün etkilerini araştıran çalışmamızın, resveratrol ve endometriozis ile ilgili yapılacak çalışmalara yol gösterebileceğini ve endometriozis tedavisinde yeni bir umut oluşturabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: resveratrol, angiogenezis, endometriozis, vasküler endotelyal growth faktör, monosit kemotaktik peptit

THE EFFECT OF RESVERATROL ON ENDOMETRIOTIC IMPLANTS IN THE RAT MODEL

Endometriosis is defined as the presence of endometrial tissue, consisting of both glandular epithelium and stroma, outside the uterine cavity. This condition is predominantly found in women of reproductive age with chronic cyclic or noncyclic pelvic pain, dysmenoure, dyspareunia, and infertility. Endometriosis is an estrogen-dependent condition. Therefore, medical therapy is often aimed at lowering estrogen level. However, side effects occurring due to hipoostrojenizm restarins its long term use.

Along with various mechanisms held responsible of endometriozis formation, it is also shown that anjiogenezis plays an important role in formation of endometriozis and inflamatuar reaction in its continuation. Goal of our study is to research the effects of resveratrol which shows anti-inflamatuar and anjiogenezis inhibiting effect in rat endometriozis model.

Twenty-four adult female rats were used and all rats underwent three operations laparotomies. The ectopic endometrium was induced by the first surgery. the surface areas of the implants were measured and peritoneal lavage was performed in the second laparatomy. the rats were randomly divided into three groups after the second surgery. Group I (reveratrol group) were given 60mg/kg/day (peroral,21 day).Group II were given a single dose of 1 mg/kg s.c. leuprolide acetate (GnRH agonist group). Group III were given no medication and served as controls. After the end of the medical treatments the third laparotomy was performed. the surface areas of the implants were measured, peritoneal lavage was performed and the implants were then excised and fixed in

10% formalin for histopathological examination in the third laparotomy. At the end of the treatment, the mean areas of implants were statistically

significant smaller, VEGF and MCP-1 levels in peritoneal fluid were statistically significant lower in Groups I and II when compared with the control group. The mean score of the histopathological examination of the implants and VEGF and MCP-1 levels in blood at the end of the treatment was statistically significant lower in Groups I and II, when compared with (Group III) the control group

It is shown in our study that in rat endometriosis model decreasing VEGF and MCP-1 in peritoneal liquid resveratrol provides shrinkage in endometriotic foci by creating anti inflammatory effect and affecting angiogenesis in a negative way.

We think that in rat endometriosis model our study, which researches the effects of resveratrol on endometriotic foci, can lead other studies to be done on resveratrol and endometriosis and can be a new hope in endometriosis treatment.

Key words: resveratrol, angiogenesis, endometriosis, vascular endothelial growth factor, monocyte chemotactic peptide