



T.C.
YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI ve DOĞUM ANABİLİM DALI

**OOFEREKTOMİZE RAT ENDOMETRİYOZİS
MODELİNDE MELATONİN DOZ ve SÜRE
ÇALIŞMASI**

DR. NİLÜFER ÇETİNKAYA KOCADAL

UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL 2011

DR. NİLÜFER ÇETİNKAYA KOCADAL

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI YRD. DOÇ. DR. RUKSET ATTAR

İSTANBUL 2011

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasında elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlar için referans gösterdiğimi ve bu referansları listelediğimi, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Bu tezin yayınlanması konusundaki tasarruf hakkı üniversiteye aittir ve yayınlanması için izin gerekmektedir. Yine bu tezden yazarının izni olmadan fotokopi ile çoğaltma yapılamayacağı ve tezden ancak referans vermek kaydıyla alıntı yapılabileceği unutulmamalıdır.

Dr. Nilüfer ÇETİNKAYA KOCADAL

KABUL ve ONAY SAYFASI

‘ Minnettar olduğum aileme ve eşim Dr.Onur KOCADAL’a sevgilerimle ‘

TEŞEKKÜR

Yeditepe Üniversitesi Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalında 2006-2011 yılları arasında uzmanlık eğitimi aldığım süreçte mesleki bilgi ve görgümün gelişmesinde emeği geçen sayın hocalarım Prof. Dr. Cem FIÇICIOĞLU , Prof. Dr. Ateş KARATEKE , Doç. Dr. Celalettin Narter YEŞİLDAĞLAR , Doç. Dr. Aslı SOMUNKIRAN İŞ , Doç. Dr. Cem Murat BAYKAL , Doç. Dr. Oluş API , Yrd. Doç. Dr. Rukset ATTAR , Yrd. Doç. Dr. Gazi YILDIRIM ve Yrd. Doç. Dr. Petek Feriha ARIOĞLU'na ,

DeneySEL bir çalışma olarak planlanan tezim sırasında sonsuz bilgi ve becerileri ile proje yürütücülüğünü üstlenen sayın hocam Doç. Dr. Celalattin Narter YEŞİLDAĞLAR'a ,

DeneySEL operasyonlarda bizzat aktif rol alan tez danışmanım sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Rukset ATTAR'a,

Çalışma sonunda engin bilgisiyle istatistiksel hesaplamalarda bana destek veren sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Gazi YILDIRIM'a,

Histopatoloji skorlarının incelenmesinde yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Ferda ÖZKAN'a

Tezim sırasında gerekli hormonal aktif madde olan Melatonin'in temininde aktif rol üstlenen Merk-Serono firmasına ve gerekli cerrahi materyalin desteği için Schering-Plough firmasına,

Yine biyokimyasal parametrelerin değerlendirilmesi sırasında gerekli kitlerin temininde maddi destek sağlayan 'Yeditepe Üniversitesi Hastanesi Bilimsel Kurulu ' adına sayın Prof. Dr. Kemal SARICA ve Başhekimimiz Prof. Dr. Canan AYKUT BİNGÖL hocamıza,

DeneySEL operasyonlar sırasında ve sonrasında ratların bakım ve tedavilerini üstlenen Vet. Hekim. Burcu ÇEVRELİ ve teknisyeni Gürkan ÜÇİŞIKLAR'a ,

Tezim sırasında rat temini , uygun operasyon malzemesi ve operasyon odası olanaklarından yararlanmamı sağlayan Yeditepe Üniversitesi Deneysel Tanı ve Araştırma Merkezi adına sayın hocam Prof. Dr. Bayram YILMAZ'a,

Tezim sırasında yardımlarını esirgemeyen sevgili asistan arkadaşlarım Arş.Gör.Dr. Canan YILMAZ TORUN, Arş.Gör.Dr. Özge KIZILKALE ve Arş.Gör.Dr. Yücel İNAN'a

Hafta sonları rat enjeksiyonları sırasında bana yardımcı olan annem Nihal ÇETİNKAYA, babam Muzaffer ÇETİNKAYA ve ablam Nilgün ALPTEKİN'e,

Tüm bu zamanlarda yanımda bulunan ve bana destek veren sevgili eşim Arş.Gör. Dr. A.Onur KOCADAL'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Nilüfer ÇETİNKAYA KOCADAL

İÇİNDEKİLER

ETİK KURUL ONAY SAYFASI.....	xi
KISALTMA LİSTESİ.....	xii
GRAFİK LİSTESİ	xiv
RESİM LİSTESİ	xv
TABLO LİSTESİ.....	xvi
I. ÖZET	1
II. ABSTRACT	4
III. GİRİŞ	7
IV. GENEL BİLGİLER	10
1. ENDOMETRİÖZİS.....	10
1.1. Tanım.....	10
1.2. Patogenez Teorileri	12
1.2.1. Retrograd Menstürasyon/Transplantasyon.....	12
1.2.2. Çöломik Metaplazi/İndüksiyon Teorisi	12
1.2.3. Lenfovasküler Metastaz	13
1.2.4. İmmunolojik Teori	13
1.2.5. Genetik	14
1.2.6. Çevresel Faktörler	14
1.3. Etopik ve Ektopik Endometriyal Doku Farklılığı.....	15
1.3.1. Lokal Östrojen Yapımı.....	15
1.3.2. Progesteron Rezistansı	15
1.3.3. Etopik Endometriyumda Ekspere Olan Genler	16
1.4. Epidemiyoloji ve Etiyolojik Faktörler	17
1.5. Semptomlar.....	18

1.6. Tanı	19
1.7. Tedavi	19
1.7.1. Medikal Tedavi	20
1.7.1.1. Progesteron / Östrojen - Progesteron Kombinasyonları	20
1.7.1.2. GnRH Analogları	21
1.7.1.3. Danazol ve Gestrinon	21
1.7.1.4. Aromataz İnhibitörleri	22
1.7.1.5. Tümör Nekrozis Faktör-Alfa İnhibitörleri.....	22
1.7.1.6. Anjiogenez ve Matriks Metalloproteinaz İnhibitörleri.....	23
1.7.1.7. RU486 (Mifepriston) ve Selektif Progesteron Reseptör Modülatörleri (SPRM)	23
1.7.2. Cerrahi Tedavi.....	23
2. MELATONİN NEDİR ?	25
2.1. Tanım	25
2.2. Melatonin ile İlgili Deneysel Çalışmalardan ve Klinik Gözlemlerden Edinilen Bilgiler.....	26
2.3. Çalışmada Neden Melatonin Kullanıldı?.....	28
V. MATERYAL ve METOD:.....	29
1. HAYVAN MODELİ	29
2. DENEYSEL TASLAK VE CERRAHİ PROSEDÜRLER	30
2.1. Birinci operasyon; endometriyotik odakların indüksiyonu	33
2.2. Östrojen Hazırlanışı:	38
2.3. İkinci operasyon: endometriyotik odakların değerlendirilmesi ve grupların belirlenmesi.....	38
2.4. Melatonin Hazırlanması:.....	41
2.5. Üçüncü operasyon: Melatonin etkisi	44
2.6. Dördüncü operasyon: Nekropside rekürrens durumunun değerlendirilmesi	46
3. VOLÜM ANALİZLERİ.....	46
4. HİSTOPATOLOJİK ANALİZLER	47
5. BİYOKİMYASAL ANALİZLER.....	50

6. İSTATİSTİK ANALİZLER	53
V. SONUÇLAR	54
1. GRUPLAR ARASI KARŞILAŞTIRMA	55
2. GRUPLARIN KENDİ İÇİNDE KARŞILAŞTIRILMASI	66
2.1. Birinci Grup (10 mg/kg/gün melatonin grubu).....	66
2.2. İkinci Grup (20 mg/kg/gün melatonin grubu).....	70
2.3. Üçüncü Grup (Kontrol Grubu)	73
VI. TARTIŞMA	78
KAYNAKLAR	87

ETİK KURUL ONAY SAYFASI

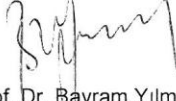
T.C.
YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ
DENEYSEL TIP ARAŞTIRMA ENSTİTÜSÜ
DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU


Doç. Dr. Narter Yeşildağlar, Y. Ü. Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Abd

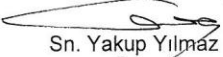
İlgi: 29. 06. 2009 tarihli yazınız.

Sorumluluğunu üstlendiğiniz "Ooferektomize rat endometriozis modeli üzerinde melatonin tedavisinde doz ve süre çalışması" isimli projenin Etik Kurul İlkelerine uygun olduğu, kurulun 29 Haziran 2009 tarihli toplantısında onaylanmıştır.



Prof. Dr. Ece Genç
Y.Ü.D.H.E.K Başkanı


Prof. Dr. Bayram Yılmaz
Üye


Doç. Dr. İsmail Kurnaz
Raportör


Sn. Yakup Yılmaz
Üye


Prof. Dr. Kemal Şencift
Başkan Yardımcısı


Prof. Dr. Erdem Yeşilada
Üye


Sn Arif Sarıkaya
Üye

KISALTMA LİSTESİ

ASRM: American Society for Reproductive Medicine

CA 125: Cancer Antigen 125

COX-2: Cyclooxygenase type 2

Cu-Zn SOD: Copper-Zinc Superoxide Dismutase

DNA: Deoxyribonucleic Asid

EC-SOD: Extracellular Superoxide Dismutase

EGF: Endothelial Growth Factor

FGF: Fibroblast Growth Factor

FSH: Folicle Stimulation Hormone

Gi: Inhibitory G protein

GnRH: Gonadotropin Releasing Hormon

HE: Hemotoxylen- Eosin

HGF: Hepatocyte Growth Factor

IFN: Interferon

IL: Interleukin

LH: Luteinization Hormone

MCP: Monocyte chemoattractant protein

MDA: Malondialdehyte

Met-enkephalin: Methionin enkephalin

MMP: Matrix Metalloproteinase

Mn-SOD: Mangan Superoxide Dismutase

MR: Magnetik Resonance

MT 1-2: Melatonin Reseptors

NK: Natural Killer Cell

NO: Nitric oxide

PDGF: Platelet Derived Growth Factor

pg/ml: picogram/mililiter

PGE2: Prostaglandin E2

pmol/ml: picogrammol/mililiter

RANTES: Regulated on activation normal T expressed and secreted

RNA: Ribonucleic Acid

SEM: Standart Error of Mean

SOD: Superoxide Dismutase

SPRM: Selective Progesteron Reseptor Modulators

TNF: Tumor Necrosis Factor

U/ml: Units/mililiter

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

VEGFR: Vascular Endothelial Growth Factor Reseptor

YÜDETAM: Yeditepe Üniversitesi Deneysel Tanı ve Araştırma Merkezi

GRAFİK LİSTESİ

Grafik 1 Deney grupları, gruplardaki rat sayısı ve yüzdeleri	30
Grafik 2 Deneysel Taslak.....	32
Grafik 3 Gruplar arası ortalama volüm değerlerinin karşılaştırılması	63
Grafik 4 Gruplar arası ortalama histopatoloji skorlarının karşılaştırılması	63
Grafik 5 Gruplar arası ortalama SOD seviyelerinin karşılaştırılması	64
Grafik 6 Gruplar arası ortalama VEGF seviyelerinin karşılaştırılması.....	64
Grafik 7 Gruplar arası ortalama MDA seviyelerinin karşılaştırılması.....	65
Grafik 8 Grup 1'in ortalama volüm ve histopatoloji parametrelerinin karşılaştırılması	67
Grafik 9 Grup 1'e ait SOD, VEGF ve MDA parametrelerinin karşılaştırılması	69
Grafik 10 Grup 2'nin ortalama volüm ve histopatoloji parametrelerinin karşılaştırılması	72
Grafik 11 Grup 2'nin ortalama SOD, VEGF ve MDA parametrelerinin karşılaştırılması	72
Grafik 12 Kontrol Grubunun ortalama volüm ve histopatoloji parametrelerinin karşılaştırılması	74
Grafik 13 Kontrol Grubunun ortalama SOD, VEGF ve MDA parametrelerinin karşılaştırılması	75
Grafik 14 Gruplar arasında ve grupların kendi içlerinde ortalama lezyon volümlerinin ve histopatoloji skorlarının karşılaştırılması	77
Grafik 15 Gruplar arasında ve grupların kendi içlerinde ortalama SOD, VEGF ve MDA parametrelerinin karşılaştırılması	77

RESİM LİSTESİ

Resim 1 Rompun (veteriner ilaç) ve Ketasol (beşeri ilaç)	33
Resim 2 Operasyona hazırlık evreleri ve midline insizyon	34
Resim 3 Bilateral uterin boynuz ve overler klemler ile tutularak gösterilmekte	34
Resim 4 Uterin boynuzların parametriyal dokulardan temizlenmesi.....	35
Resim 5 Uterin boynuzlar uzunlamasına kesilerek endometriyal yüzleri açıldıktan sonra dört eşit parçaya bölünmüş.....	35
Resim 6 Sağ hipokondriyak alandaki vasküler yapılar	36
Resim 7 Bilateral hipokondriyak alanda vasküler trase üzerine implante edilmiş uterin boynuz dokuları	36
Resim 8 Postoperatif insizyon kapatılması, uygun pozisyon verilmesi ve kafese yerleştirme.....	37
Resim 9 Sefazolin sodyum (İespor)	37
Resim 10 (10 mg/100 ml) Östrojen içeren mısırözü yağ çözeltisi.....	38
Resim 11 İkinci operasyonda gözlenen endometriyotik odaklar ok işaretleri ile gösterilmiştir	39
Resim 12 \geq %98 Melatonin tozu (Sigma Aldrich).....	41
Resim 13 Melatonin tedavisi sonrasında izlenen lezyonlar ok işaretleri ile gösterilmiştir.	45
Resim 14 Giyotin ve dekapitasyon işlemi.....	46
Resim 15 Histopatolojik görüntüde endometriyal doku gelişimi görülmemekte,	48
Resim 16 Histopatolojik görüntüde nadir olarak epitel doku varlığı izlenmekte (ok ile gösterilmiş), histopatolojik skor 1	49
Resim 17 Histopatolojik görüntüde endometriyal doku gelişimi (mor ok) yanında lökosit infiltrasyonu (mavi ok) izlenmekte, histopatolojik skor 2	49
Resim 18 Histopatolojik görüntüde iyi korunmuş endometriyal doku varlığı görülmekte (ok ile gösterilmiş), histopatolojik skor 3	50

TABLO LİSTESİ

Tablo 1 Melatonin dozunun hesaplanması.....	41
Tablo 2 Etil Alkol dozunun hesaplanması	42
Tablo 3 Histopatolojik Skorlama	48
Tablo 4 İkinci operasyon (birinci biyopsi) sonrası parametrelerin gruplar arası karşılaştırılması	57
Tablo 5 Üçüncü operasyon (ikinci biyopsi) parametrelerinin gruplar arası karşılaştırılması	59
Tablo 6 Nekropside elde edilen parametrelerin gruplar arasında karşılaştırılması....	61
Tablo 7 Gruplar arası karşılaştırma özet sonuçlar.....	62
Tablo 8 Grup 1'e ait parametrelerin karşılaştırılması.....	68
Tablo 9 Grup 2'ye ait parametrelerin karşılaştırılması.....	71
Tablo 10 Grup 3'e ait parametrelerin karşılaştırılması.....	73
Tablo 11 Grupların kendi içlerinde parametrelerin karşılaştırılması, özet sonuçlar ..	76

I. ÖZET

OOFEREKTOMİZE RAT ENDOMETRİYOZİS MODELİNDE MELATONİN DOZ ve SÜRE ÇALIŞMASI

AMAÇ

Farklı dozlardaki melatonin tedavilerinin ooferektomize rat endometriyozis modelinde oluşturulan endometriyotik odaklar üzerinde regresyon yapıcı etkisinin gösterilmesi; antioksidan bir enzim olan süperoksit dismutaz (SOD), anjiogenez faktörü olan vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ve lipid peroksidasyonunun atık ürünü olan malondialdehit (MDA) seviyelerine olan etkisinin araştırılması.

PLAN

Prospektif, randomize, kontrollü deneysel çalışma

BİRİM

Yeditepe Üniversitesi Deneysel Tanı ve Araştırma Merkezi (YÜDETAM)

HAYVANLAR

33 adet, dişi, gebe olmayan, nulligravid, *Sprague-Dawley* albino rat

GİRİŞİMLER

Ooferektomize edilen 33 adet ratın otolog endometriyometrial dokuları rat batın duvarında oldukça vasküler olan abdominal peritoneal yüzeye transplante edilerek endometriyotik lezyonlar oluşturuldu. Östradiol tedavisi birinci operasyonda başlatıldı ve çalışma sonuna kadar devam ettirildi. İndüksiyon operasyonundan 2 hafta sonra ikinci operasyon yapıldı ve endometriyotik lezyonlar değerlendirildi. Bu dönemde ratlar 1 adet kontrol grubu ve farklı dozlarda melatonin tedavisi alacak şekilde (10 mg/kg/gün ve 20 mg/kg/gün) iki adet tedavi grubuna raslantısal olarak ayrıldı. Melatonin tedavisi başladıktan 2 hafta sonra üçüncü operasyon yapıldı ve endometriyotik lezyonlardaki küçülme derecesi kaydedildi. Tedavi gruplarındaki lezyon regresyon oranları kontrol grubuna göre kıyaslandı. Bu operasyondan sonra melatonin tedavisi kesildi ve 6.hafta sonunda rekürrens durumlarının değerlendirilebilmesi için nekropsi operasyonu yapıldı. Tüm operasyonlarda endometriyal lezyonlardan histopatolojik skor değerlendirilebilmesi için biyopsi alındı ve biyokimyasal parametrelerin değerlendirilebilmesi için 1 ml peritoneal sıvı örneği alındı.

TEMEL SONUÇ KRİTERLERİ

Endometriyotik lezyonların volüm - histopatolojik skorlarının değerlendirilmesi; peritoneal sıvıda SOD, VEGF ve MDA değerlerinin ölçülmesi

BULGULAR

On mg/kg/gün melatonin alan grupta indüksiyon sonrası ilk biyopside ortalama lezyon volümleri milimetrik olarak 98.8 ± 17.2 (SEM), ikinci biyopside 54.1 ± 15.6 (SEM) ve üçüncü biyopside 42.8 ± 10.5 (SEM) olarak ölçüldü

Yirmi mg/kg/gün melatonin alan grupta ise indüksiyon sonrası ilk biyopside ortalama lezyon volümleri milimetrik olarak 108 ± 17.5 (SEM), ikinci biyopside 25.8 ± 3.6 (SEM) ve üçüncü biyopside 32.7 ± 6 (SEM) olarak ölçüldü

Gruplar arasında karşılaştırma yapıldığında melatonin tedavisi altındaki gruplarda (Grup1 ve 2) dördüncü ve altıncı hafta biyopsilerinde endometriyotik odak volümlerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı ($p=0.001$ ve $p=0.001$); dördüncü ve altıncı hafta batın yıkantı sıvısı örneklerinde MDA seviyelerinin kontrol grubunda, 10 mg/kg/gün melatonin alan gruba göre (Grup 1) anlamlı derecede az olduğu gözlemlendi ($p=0.004$ ve $p=0.03$).

Gruplar kendi içlerinde değerlendirildiklerinde ise;

- Melatonin ile tedavi edilen gruplarda (Grup1 ve 2) lezyon volümlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptandı ($p=0.001$ ve $p=0.001$).
- On mg/kg/gün melatonin grubunda melatoninin kesilmesinden sonra istatistiksel olarak anlamlı derecede SOD aktivitesinde azalma saptandı ($p=0.001$).
- Kontrol grubunda altıncı hafta batın yıkantı sıvısı örneklerinde dördüncü hafta örneklerine göre SOD aktivitelerinde anlamlı sayılacak derecede azalma ($p=0.02$), MDA seviyelerinde ise anlamlı sayılabilecek derecede bir artış olduğu gözlemlendi ($p=0.02$).

SONUÇ

Melatonin tedavisi ratlarda endometriyotik lezyonların regresyonuna yol açmaktadır. Bu etkinin yüksek doz melatonin tedavisi uygulandığında istatistiksel anlamlılıkta olmasa da düşük doz tedavisine göre daha belirgin olabileceği gösterilmiştir.

ANAHTAR KELİMELELER

Endometriyozis, rat, deneysel endometriyozis modeli, melatonin

II. ABSTRACT

MELATONIN DOSING AND TIME EFFECTS ON OOFERECTOMIZED RAT ENDOMETRIOSIS MODEL

OBJECTIVE

To determine and compare the antioxidant and regressive effects of different doses of melatonin on endometrial implants, the distribution of the activity of antioxidant enzyme superoxide dismutase (SOD), angiogenesis factor vascular endothelial growth factor (VEGF) and waste metabolite product of lipid peroxidation malondialdehyde (MDA) in the ooforectomized rat endometriosis model.

DESIGN

Prospective, randomized, controlled experimental study

SETTING

Experimental Studies and Research Center of Yeditepe University (YUDETAM).

ANIMALS

Thirtythree, female, nonpregnant, nulligravid *Sprague-Dawley* albino rat

INTERVENTIONS

Endometriosis was surgically induced in ooforectomized 33 rats by transplanting an autologous endomyometrial tissue to the highly vascular area on the abdominal peritoneal surface. Estradiol treatment was begun at the first operation and applied until the end of study. Two weeks after the induction operation second look operations were performed and endometriotic lesions evaluated and rats were randomized into three groups: control group and melatonin treatment groups (10 mg/kg/day versus 20 mg/kg/day). After 2 weeks of melatonin treatment third look operations were performed and endometriotic regressions were noted. After these operations melatonin treatment stopped and at the end of the sixth week necropsies were performed to evaluate the rate of recurrence. At all operations endometriotic lesions were biopsied and nearly 1 ml of peritoneal fluid were collected to study histopathological and biochemical parameters.

MAIN OUTCOME MEASURES

The volume and histopathologic scores of endometriotic foci, and levels of superoxide dismutase, vascular endothelial growth factor, and malondialdehyde in the peritoneal fluid

RESULTS

The mean volumes of the endometriotic foci were 98.8 ± 17.2 (SEM), 54.1 ± 15.6 (SEM), 42.8 ± 10.5 (SEM) and histopathological scores were 2.2 ± 0.2 (SEM), 2.6 ± 0.2 (SEM), and 2.6 ± 0.1 (SEM) in the 10 mg/kg/day melatonin group at the end of the second, fourth, and sixth weeks.

The mean volumes of the endometriotic foci were 108.2 ± 17.5 (SEM), 25.8 ± 3.6 (SEM), 32.7 ± 6.0 (SEM) and histopathological scores were 1.7 ± 0.1 (SEM), 2.2 ± 0.2

(SEM), and 2.7 ± 0.2 (SEM) in the 20 mg/kg/day melatonin group at the end of the second, fourth, and sixth weeks.

When the groups were compared, endometriotic volumes were significantly decreased in melatonin treated groups at the 4th and 6th week ($p=0.001$, $p=0.001$) and MDA levels were lower at 4th and 6th week in control group than 10 mg/kg/day melatonin group ($p=0.004$, $p=0.03$).

When the groups were compared;

- There was a statistically significant decrease in endometriotic volumes treated with melatonin at 4th and 6th weeks (Group 1 and 2) ($p=0.001$, $p=0.001$)
- After cessation of melatonin in the 10 mg/kg/day group, SOD activity was significantly decreased ($p=0.001$).
- SOD activities were decreased and MDA levels were increased at 6th week (according to 4th week) significantly in the control group ($p=0.02$, $p=0.02$).

CONCLUSION

Melatonin treatment resulted in regressed endometriotic lesions in oophorectomized rats. Twenty mg/kg melatonin caused a more pronounced effect than 10 mg/kg/day melatonin did.

KEY WORDS

Endometriosis, rats, experimental endometriosis models, melatonin

III. GİRİŞ

Yaklaşık yüz yılı aşkın bir süredir varlığı bilinmesine rağmen endometriyozis patogenezi konusunda hala anlaşılamayan bazı noktalar bulunmaktadır(1). Etik sorunlar nedeniyle geniş populasyon örneklerinde çalışma yapılamaması, etiyolojik neden-sonuç ilişkilerinin araştırılabilmesindeki zorluklar (1), endometriyozis gelişimine ve progresyonuna etki edebileceği düşünülen ilaçların klinik çalışmalar öncesinde tetkik edilmesi gerekliliği gibi sebepler nedeniyle hayvan çalışmaları günümüzde endometriyozis patogenezinin anlaşılmasında sıkça kullanılmaktadır.

Endometriyozis patogenez teorilerinin anlaşılabilmesi için en ideal model siklik endometriyal dökülmenin gözleendiği insan dışı primatlarda oluşan spontan endometriyotik odaklardır (1). Ancak bu durumun çok nadir saptanması nedeniyle tercih edilen retrograd menstürasyonun sağlanması yoluyla oluşturulan endometriyotik lezyonların incelenmesidir (1). Baboonlarda servikal okluzyon ya da endometriyal dokunun ektopik bölgelere transplantasyonu yöntemiyle endometriyozis benzeri lezyonlar oluşturulabilmekte, bu lezyonların immunolojik ve endokrin aktiviteleri ya da prelinik çalışmaları yapılan ilaçlara karşı verdiği yanıtlar değerlendirilebilmektedir (1). Ancak etik sebeplerden ötürü primat kullanımındaki kısıtlamalar, yüksek maliyetleri ve immun yanıtlarının insanlardan az da olsa farklılıklar göstermeleri gibi nedenlere bağlı olarak primat modellerin kullanımı oldukça sınırlıdır (1).

Kemirgenler, maliyetlerinin düşük olması, kolay üretilmesi, bakımlarının nispeten daha kolay olması, denek sayısının artırılabilmesi ve oluşturulan lezyonların genetik olarak benzer özelliklerin gözleendiği bireylerde yapılabilmesi nedeniyle primatlara göre daha sık tercih edilmektedirler (1). Laboratuarda yetiştirilen ratlarda ve farelerde endometriyozis lezyonlarının oluşturulabilmesinin en etkin yöntemi

menstrüel siklusle endometriyal dökülmenin gözlenmemesi nedeniyle cerrahi indüksiyon ya da peritoneal endometriyal doku enjeksiyonudur (1). Kullanılan endometriyal dokunun tipine göre kemirgen modelleri homolog ve heterolog modeller olmak üzere iki grupta incelenir.

Homolog modellerde cerrahi yöntemle bir kemirgenden elde edilen endometriyal doku parçaları yine aynı kemirgene allograft olarak transfer edilir. Burada kemirgenin immun sistemi fonksiyoneldir. Fareler, ratlar ve hamsterler bu amaçla en sık kullanılan kemirgenlerdir (1). Homolog modellerde endometriyal doku tek başına ya da daha kolay olması nedeniyle myometriyal dokuyla birlikte peritoneal yüzeye implante edilebilmektedir.

Heterolog modellerde ise insan endometriyal dokusu immun sistemi afonksiyonel olan bir kemirgene xenograft olarak transfer edilir. Transfer subkutan ya da intraperitoneal enjeksiyon yöntemiyle yapılabildiği gibi minilaparotomi yöntemiyle de endometriyal dokunun implantasyonu ile indüksiyon gerçekleştirilebilmektedir (1). Heterolog modellerin ucuz olmaları, transfer edilen endometriyal dokuya karşı rejeksiyonun az olması ve oluşturulan lezyonlarda insan endometriyal dokusu ile kemirgenlere ait endometriyal doku arasındaki farkın ortadan kaldırılabilmesinin yanında bu kemirgenlerde immun yanıtın yetersizliği gerçek endometriyozis patogenezinin anlaşılmasına engel olabilmektedir (1). Aynı zamanda immun sistemdeki bu yetmezlik kemirgenleri bazı patojenlere karşı hassas kıldığından dolayı kemirgenler kolaylıkla kaybedilebilmektedirler. Ayrıca insan endometriyum dokusunun bu tür kemirgenlerde dört haftalık bir süreç içerisinde spontan olarak regrese olduğu da bilinmektedir (1).

Son zamanlarda endometriyozis indüksiyonu için tavşan modelleri geliştirilmiştir. Burada amaç endometriyal dokunun homolog olarak aynı tavşana implantasyonunun yapılması olup östros siklus yokluğu nedeniyle siklus kısıtlamalarının yaşanmaması ve ratlara göre boyutça büyük olan tavşanlarda videolaparoskopik yöntemlerle endometriyotik odakların incelenebilmesi avantajdır (2).

Bu çalışmada deneysel taslağın hazırlanması sırasında maliyetlerinin ucuz olması, bakımlarının kolay olması ve merkezimizce (YÜDETAM) sayıca yeterli üretilibilmeleri nedeniyle kemirgen ratlarda homolog hayvan modeli kullanılmıştır. Endometriyal doku kolaylık açısından myometriyal tabaka ile birlikte implante edilmiştir.

IV. GENEL BİLGİLER

Bu başlık altında kısaca endometriyozis patofizyolojisi, tanı ve tedavi yöntemleri ele alındıktan sonra çalışmada neden melatonin tercih edildiği, melatoninin yapısı ve önceki deneysel çalışmalarda endometriyotik odaklar üzerine gösterdiği etkileri ele alınacaktır.

1. ENDOMETRİYOZİS

1.1. Tanım

Endometriyozis reproduktif yaşamda oldukça sık görülen (%10 insidans), östrojen bağımlı, benign karakterli olmasına rağmen ileri derecede pelvik distorsiyona ve organ disfonksiyonuna bağlı dismenore, disparoni ve infertilite gibi problemlere yol açabilen kronik progresif bir hastalıktır. Histopatolojik olarak endometriyozis hastalığı uterin endometriyal dokunun sıklıkla; pelvik periton, overler, rektovajinal septum, çevre barsak dokusu gibi ekstrauterin pelvik alanda ya da beyin dokusu, perikardium, akciğer, göz, cilt altı dokusu gibi vücudun ekstrapelvik her hangi bir bölgesinde bulunmasıyla karakterizedir.

Prevelansı yaklaşık %6-10 arasında olup infertilite ve/veya dismenoresi olan kadınlarda bu oran %35-50 düzeylerine ulaşmaktadır (3). Pelvik endometriyozisin kesin tanısı, laparoskopi ya da laparotomi ile lezyonların görülmesi ve histopatolojik olarak endometriyotik doku varlığının gösterilmesidir.

Cerrahi sırasında ASRM (American Society for Reproductive Medicine, 1997) kriterlerine göre endometriyozis hastalığının evrelemesi yapılabilmektedir. Endometriozis minimal, hafif, orta ve ciddi olarak sınıflandırılır. Minimal evre endometriyoziste yüzeysel peritoneal ya da over implantları, nadir ince adezyonlar görülebilirken, ciddi endometriyoziste cul de sac obliterasyonu, dev endometriyomalar ve yoğun adezyonlar görülmektedir.

Semptomların ciddiyeti hastalığın evresinden bağımsızdır, minimal endometriyozis varlığı bazı kadınlarda şiddetli pelvik ağrı nedeni olabilirken, ileri evre endometriyozisi olan bazı kadınlar minimal düzeyde semptomatik olabilirler. En sık over, douglas poşu, uterus ve tuba serozası ve çevre pelvik organ (sigmoid, mesane yüzeyi vb.) tutulumu görülmektedir. Rektovajinal septum, uterosakral ligament ve vajen de de tutulum olabilir. Periton yüzeyinde maküler, veziküler ya da nodüler pigmenter yapıda lezyonlar dikkat çeker. Hemosiderin birikimine bağlı bal renginde lezyonlar, fibrozis derecesine ve hastalığın aktivite durumuna göre beyaz opak lezyonlar ya da koyu kahve – siyah barut yanığı renginde odaklar görülebilmektedir.

Overde, içerisinde koyu kahverengi visköz madde bulunan kistik lezyonlar (endometriyoma) oluşabilmektedir. Mikroskopik olarak lezyonlardan alınan örneklerde, endometriyal glandüler ve stromal yapılar, hemoraji ve inflamasyona bağlı fibrozis odakları görülmektedir.

İlk defa 1860 yılında tanımlanmış olup günümüzde; genetik, çevresel faktörler, immun sistem ve östrojenik etkiler araştırılmasına rağmen etiyolojisi ve patogenezi konusunda hala kesin veriler elde edilememiştir (3).

1.2. Patogenez Teorileri

1.2.1. Retrograd Menstürasyon/Transplantasyon

Bu teoride; endometriyal doku hücrelerinin, menstürasyon sırasında, retrograd olarak patent tüplerden geriye doğru akımı ile peritoneal kaviteye ulaştığı, uygun mikro çevre varlığında periton yüzeyine implante olduğu, invazyon sonrası çoğaldığı , vasküler gelişim ve uygun immunolojik adaptasyon sonrasında lezyonların büyüyerek endometriyotik odak oluşumunu tamamladığı savunulmaktadır. Her mens döneminde bu lezyonun siklik değişikliklere uygun değişim göstermekte olduğu ve kendi kitlesi içerisine doğru döküldüğünden gittikçe büyüdüğü düşünülmektedir. Fonksiyonel fallop tüpü olan kadınların %70-95'inde retrograd menstrüasyon gösterilmiştir. Yine endometriyozise sahip kadınlarda daha fazla retrograd menstürasyon varlığının gösterilmesi, genital sistemin çıkış yolu tıkanıklıkları durumunda endometriyotik lezyonların sık görülmesi ve benzer durumun incelendiği deneysel çalışmalar bu teoriyi desteklemektedir (3).

Ancak retrograd menstürasyon bu kadar sık görülürken neden bütün kadınlarda endometriyozis görülmediği farklı düşüncelerle açıklanmaya çalışılmıştır. Örneğin endometriyozis görülen kadınlarda retrograd akımla peritoneal alana ulaşan endometriyal hücre sayılarının daha fazla olabileceği, endometriyal hücrelerin implantasyona daha yatkın olabildiği ya da endometriyal hücre implantasyonuna karşı immunolojik mekanizmalarda yetersizliğin rolü olabileceği düşünülmüştür (4).

1.2.2. Çöломik Metaplazi/İndüksiyon Teorisi

Mülleryen kanalın epitel örtüsünü oluşturan çöломik epitelium aynı zamanda peritoneal, plevral ve overin yüzey epiteline diferansiye olmaktadır ve endometrial dokuya dönüşme potansiyeli olan farklılaşmamış hücreler içermektedir. Uygun indükleyici etkenler varlığında epitel metaplazisi endometriyotik odak gelişimini

tetikleyebilmektedir. Bu teori toraks, rektovajinal septum gibi organlarda endometriyozis oluşumunu, erkeklerde ya da uterusu olmayan kadınlarda endometriyozis varlığını açıklayabilmektedir (4).

İndüksiyon teorisi, çöломik metaplazi teorisinin genişletilmiş bir formu olup bu teoride peritoneal kaviteye ulaşmış endometriyal doku debrislerinin salgıladıkları faktörlerle ya da endojen, biyokimyasal ya da immunolojik uyarıcıların farklılaşmamış periton hücrelerini metaplaziye uğrattığı savunulmaktadır (5).

1.2.3. Lenfovasküler Metastaz

Endometriyotik hücrelerin lenfovasküler yollarla sistemik metastazları uzak organlarda endometriyotik odak varlığını açıklayabilmektedir. Benzer şekilde küretaj gibi cerrahi bir müdahalede endometriyal hücrelerin basal lenfovasküler damar sistemine giriş yapabileceği düşünülmektedir (4).

1.2.4. İmmunolojik Teori

Sağlıklı bir bayanda reflü ile peritoneal kaviteye gelen endometriyotik hücreler lokal inflmatuar hücreler tarafından yok edilerek endometriyotik hücrelerin peritona adezyonu, implantasyonu ve invazyonu önlenmektedir. Ancak reflü ile gelen madde miktarı çok olduğunda ya da immun mekanizmaların yetersiz kaldığı durumlarda (hüresel ya da humoral mekanizmalar) ektopik endometriyum implantasyonu ve büyümesi görülmektedir. Endometriyozis olduğu bilinen kadınlarda peritoneal makrofaj hücrelerinin fagositik aktivitelerinde azalma olduğu, buna karşın sitokin salınımının arttığı görülmektedir. Yine aynı kadınlarda peritoneal Naturel Killer hücrelerinde aktivite azlığı, disfonksiyonel B ve T lenfosit sayısında artış dikkat çekmektedir. B hücrelerinde ve otoantikör oluşumunda artış görülmektedir. Endometriyal antijenlere karşı sitotoksik T hücre yanıtında küntleşme izlenmiştir.

Pritoneal sıvıda ektopik endometriyal odaklardan, makrofaj ve benzeri diğler iltihabi hücrelerden artmış miktarlarda salınan sitokinler, büyüme faktörleri ve anjiogenik faktörler bulunmaktadır. Proinflamatuvar olan (IL 1, IL 8, TNF α , IFN γ) bu maddeler lokal inflamasyonu artırarak daha fazla inflamatuvar hücrenin bu alana gelmesine ve hastalığın progresyonunun devamına yol açmaktadırlar. Benzer şekilde monosit ve T lenfositlere kemoatraktan olan RANTES (regulated on activation, normal T expressed and secreted), makrofaj kemoatraktan olan monocyte chemoattractant protein 1, endometriyal hücre büyümesini tetikleyen lipid peroksidasyon ürünleri inflamasyon zemininde artış göstermektedir (3).

1.2.5. Genetik

Endometriyozisin ailevi boyutuna ikizler üzerindeki klinik çalışmalarda dikkat çekilmiştir. Birinci derece yakınında endometriyozis varlığı endometriyozis riskini yaklaşık 6 kat kadar artırmaktadır. Kalıtımın maternal olarak aktarıldığı düşünülmektedir (4). Endometriyozise yatkınlığı arttırdığı düşünülen durumlar; östrojen/progesteron/androjen reseptör defektleri; sitokrom P450 1A1, N-asetil transferaz 2, glutatyon-S-transferaz M1,T1 enzim defektleri; PTEN, p53 gen mutasyonları; PPAR γ 2 Pro-12-Ala polimorfizmi varlığıdır (3).

1.2.6. Çevresel Faktörler

Gelişmiş ülkelerde endometriyozis sıklığının yüksek olarak görülmesi patogeneizde çevre kirliliğiliğinin önemli bir maddesi olan dioxin'leri akla getirmiştir. Dioxinler kuvvetli kimyasal toksik maddeler olup dioxine maruz kalan bir hayvanın otopsi sırasında şiddetli endometriyozisin görülmesiyle dikkat çekmişlerdir (4).

1.3. Etopik ve Ektopik Endometriyal Doku Farklılığı

1.3.1. Lokal Östrojen Yapımı

Endometriyotik lezyonlarda (ektopik endometriyal doku), etopik endometriyuma göre daha fazla miktarlarda östrojen yapımı olduğu bilinmektedir. Hastalığın östrojen bağımlı olması ve tedavide antiöstrojenik etkiden yararlanması sebebiyle lokal östrojen artışının nedenleri iyi bilinmelidir. Aromataz, androstendion ve testosterondan, östron ve östradiol biyosentezini tetikleyen bir enzimdir. Özellikle over ve adrenal dokunun yanı sıra plasentada da bulunmaktadır. Etopik endometriyal dokuda aromataz enzimi bulunmamaktadır. Ancak yapılan çalışmalarda bu enzimin ektopik endometriyal dokuda eksprese olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle ektopik endometriyal dokuda androstendiondan oluşan östron miktarı artmıştır. Östron, 17 β -hidroksisteroid dehidrojenaz tip 1 enzimi ile daha potent olan östradiole çevrilmektedir. Östradiol, 17 β -hidroksisteroid dehidrojenaz tip 2 enzimi ile inaktive edilir ancak ektopik endometriyal dokuda etopik endometriyal dokudan farklı olarak bu enzim bulunmamaktadır. Bu nedenlerle lokal olarak endometriyotik odaklarda östrojen hakimiyeti bulunmaktadır. Östrojenler ektopik endometriyal dokuda özellikle Prostaglandin E₂ (PGE₂) salınımını artırır. PGE₂ ise aromataz aktivitesini artırır. Böylelikle östrojen hakimiyetini destekleyen bir kısır döngü izlenir (3).

1.3.2. Progesteron Rezistansı

Progesteron endometriyal dokuda A ve B tipi reseptörleri üzerinden etki ederek desidualizasyona yol açmaktadır. Asıl fonksiyonel olan reseptör formu progesteron reseptör B'dir. Reseptör A formu, B tip reseptörleri inaktive ederek regülatuar rol oynar. Etopik endometriyal dokuda her iki tip reseptör bulunmaktadır ve menstrüel siklusun farklı fazlarında farklı ekspresyonları görülmektedir. Endometriyozis tanısı alan kadınların etopik endometriyumlarında ise progesteron reseptör disregülasyonu olduğu izlenmektedir. Endometriyotik odaklarda ise sadece tip A progesteron

reseptörleri bulunmaktadır. Bu reseptörlerin disregülasyonu endometriyozis odaklarındaki progesteron rezistansını açıklamaktadır (3).

1.3.3. Eutopik Endometriyumda Eksprese Olan Genler

Eutopik endometriyumdaki bazı anomalilerin endometriyozise yol açabileceği düşünülmektedir. Luteal dönemde endometriyal dokuda matriks metalloproteinaz (MMP) denen enzimlerde (MMP 7 ve MMP 11) artış olmaktadır. Bu enzimler endometriyal tabakanın kırılmasını ve sıvılaşmasını sağlamaktadır. Aktiviteleri progesteron ile sınırlanmaktadır. Progesteron rezistansı varlığında peritoneal kaviteye ulaşan ektopik endometriyal dokudaki MMP 7 ve MMP 11 enzimlerinin aktivitelerinin suprese olmaması ektopik hücrelerin periton invazyonuna yol açmaktadır (3).

Benzer bir başka durum bu kadınlarda endometriyal stroma dokusundan salınan hepatosit büyüme faktörü (Hepatocyte Growth Factor/HGF) ve vasküler endotelial büyüme faktörü (Vascular Endothelial Growth Factor/VEGF) düzeylerinin artmış olduğudur. HGF invaze olan ektopik endometriyal dokuda mitojenik etki göstererek büyümeyi sağlamaktadır. VEGF ise anjiogenezi uyarmaktadır (3). Önemli bir diğer konu ise bu kadınların eutopik ve ektopik endometriyal dokularında BCL2 ve BAX ailelerinden proapoptotik genlerde down regülasyon, antiapoptotik genlerde ise up regülasyon olmasıdır. Bu parametreler, endometriyozis hastalığının görüldüğü kadınlarda aslında eutopik endometriyal dokudaki değişikliklerin endometriyozise yol açabildiğini göstermektedir (3).

1.4. Epidemiyoloji ve Etiyolojik Faktörler

Endometriyozis prevalansı güvenilir bilgilere göre yaklaşık %10 düzeyindedir. İnsidansının reproduktif yaşamda arttığı düşünülmektedir. Pelvik ağrı nedeniyle laparoskopi yapılan hastaların %12-32'sinde, infertilite nedeniyle laparoskopi yapılan hastaların ise %21-48'inde endometriyozis varlığı görülür. Epidemiyolojik çalışmalar nullipar ve yoğun mens kanaması olan kadınlarda endometriyozis sıklığının arttığını göstermektedir ve retrograt menstrasyon hipotezini desteklemektedir (6).

Endometriyozis puberte öncesinde çok nadir olup reproduktif dönemde oldukça aktivite göstermektedir. Kronik pelvik ağrı ve dismenore nedeniyle laparoskopi olan genç kızların %50'sinde endometriyozis tespit edilmektedir. Menapozal dönemde ise endometriyozisin regrese olduğu bilinmektedir. Bu bulgular etiyojide östrojen stimülasyonunun rolü olduğunu düşündürmektedir. Beyaz ırkta ve sosyo ekonomik olarak zengin kesimde hastalığın sık görülmesi dismenore ya da disparoni gibi şikayetleri nedeniyle olguların ileri düzeyde tetkik edilebilirliğinden dolayıdır. Yapılan çalışmalar, menarşin erken dönemde görüldüğü, menstrüel döngüleri sık ve vajinal kanamaları yoğun olan kadınlarda endometriyozisin sık görüldüğünü desteklemektedir (6). Oral kontraseptifler ovulasyonu baskılayarak ve menstrasyonla kaybedilen (ve bu nedenle retrograt akımı azaltarak) vajinal kanama miktarında azalmaya neden olarak teorikte endometriyozis odaklarını atrofiye edip hastalığı remisyona sokarlar. Ancak bu ilaçlar bırakıldığında atrofik endometriyotik doku aktive olarak hastalık semptomlarını tekrar gündeme getirir. Öyküde birinci derece yakınlarında endometriyozis varlığı önemlidir. Çünkü bu olgularda endometriyozisin daha erken dönemde ortaya çıktığı ve daha şiddetli olabileceği bilinmektedir. Önemli bir epidemiyolojik faktör olarak sigara içiciliği, antiöstrojenik etkisi nedeniyle endometriyozis oluşumunu azaltmaktadır (6).

1.5. Semptomlar

Endometriyozisde semptomların ciddiyeti hastalığın evresinden bağımsızdır. Minimal endometriyozisi olan bir kadın ileri evre endometriyozisi olan bir kadından daha fazla semptomatik olabilmektedir. En sık görülen semptomlardan birisi dismenoredir. Endometriyotik odağın hormonal değişiklikler nedeniyle proliferasyonu lezyonlarda menstrüasyon öncesi irileşmeye ve peritoneal adezyonların gerilmesine sebep olmaktadır. Ağrı menstrüasyon döngüsü bitiminde gerilemektedir. Bu hastalarda dismenore dışında kronik pelvik ağrı bulunmaktadır. Bu ağrının nedeni muhtemelen endometriyotik odaklar tarafından sinirsel yapıların invazyonu ve adezyonlara bağlı periton gerilmeleridir. Ağrı kramp tarzında, künt ya da keskin olarak tarif edilebilir. Ağrı tek ya da iki taraflı olabilir. Endometriomanın rüptürü sonucu oluşan kanamadan dolayı akut karın ağrısı oluşabilir.

Barsak adezyonları varlığında kronik kabızlık ya da diyareik dönemler ve gastrointestinal semptomlar görülebilmektedir. Birçok hasta rektal basınç hissi veya bel ağrısından yakınır. Disparoni, özellikle derin ilişkide rektovajinal ya da uterosakral endometriyotik odaklar nedeniyle oluşabilmektedir. Bu olgularda ileri derecede inflamasyona bağlı lokal fibrotik değişiklikler ağrı nedeni olabilmektedir. Anormal uterin kanamalar (oligomenore, polimenore, ara kanama vb.) endometriyozise eşlik edebilen diğer durumlardan (myoma uteri, anovulasyon vb) kaynaklanıyor olabilir. Üriner sistem tutulumunda, hematüri, bası hissi, ureter darlığına bağlı üriner obstrüksiyon, hidronefroz gibi durumlar görülebilmektedir.

Ekstra pelvik alanda örneğin akciğerde endometriyozis varlığında hemoptizi, hemotoraks; cilt altı ektopik odak varlığında siklik olarak kitlerde büyüme, ağrı; nazal mukoza tutulumunda nazal kanama vb. gibi semptomlar nadir de olsa görülebilmektedir.

Endometriyozis benign natürlü olmasına rağmen ileri derecede pelvik distorsiyona yol açabilmesi nedeniyle, adnekslerde konglomerasyon, tubal tıkanıklıklar ve hidrosalpenks, overde destüriktif endometrioma varlığı gibi sebeplerden ötürü infertiliteye sebep olmaktadır. İnfertil kadınların %25-50'sinde endometriozis görülmektedir. Benzer bir şekilde endometriozisi olan kadınların %30-35'i ise infertildir. İnfertilite nedeni olarak anatomik distorsiyon yanında, periton sıvısındaki sitokinler, prostoglandinler ve inflamatuvar hücre yanıtı gösterilmektedir.

1.6. Tanı

Semptomatik olgularda detaylı bir anamnez ve fizik muayene tanı için ilk basamaktır. Vajinal muayenede cul de sac veya uterosakral ligamanda lokalize hassasiyet, rektovajinal septumda palpasyonla hassas nodül varlığı; uterusun palpasyonla ağırlı olması; hassas, büyümüş adneksiyel kitle varlığı; uterus veya adneksin fiksasyonu gibi bulgular edinilebilir. Ultrasonografik olarak overe lokalize endometriyozis (endometriyoma) hemoraji nedeniyle tipik heterojen görüntüsü ile dikkat çekmektedir. Obez ve güç muayene edilen vakalarda MR görüntüleme gerekli olmaktadır. Endometriyozis olgularının önemli bir kısmında CA 125 tümör belirtecinin artmış olduğu görülmektedir. Ancak bütün bu tetkikler ciddi derece endometriyozisi olan kadınlarda tanıya yardımcı olmaktadır. Minimal ya da hafif endometriyozisi olup adneksiyel kitlesi izlenmeyen olgularda sadece semptom varlığı hastalığı düşündürtebilir. Bu nedenle endometriyozisin kesin tanısı cerrahi olarak (laparoskopi/laparotomi) lezyonların görülmesi ve alınan biyopsilerde histopatolojik olarak endometriyal doku varlığının gösterilmesiyle konur.

1.7. Tedavi

Fizyopatolojik olarak kronik inflamasyon görülen endometriyozisin tedavisi küratif değildir. Tedavinin amacı, hormonal regülasyon ile endometriyotik odakların suprese edilmesidir. Bu yöntemle semptomatik tedavi sağlanmaya çalışılmaktadır. Kombine

oral kontraseptifler, progestinler, Gonadotropin-salgılatıcı hormon (GnRH) analogları, danazol ve gestrinon hormonal supresyonda tercih edilen en sık medikal tedavi seçenekleridir. Hastalığın aktivitesine ve hastanın semptomlarına göre bu ajanlardan uygun olanı seçilmektedir. Medikal tedavi yanında gerekli olgularda cerrahi yöntemler de kullanılabilir.

1.7.1. Medikal Tedavi

Medikal tedavinin kontrendike sayılabileceği tek koşul endometriyozise bağlı infertilite durumunun varlığıdır. Ovulasyon baskılanacağından ve geçici süre menapoz durumu oluşturulacağından dolayı infertilitenin önlenmesinde medikal tedavi uygun değildir.

1.7.1.1. Progesteron / Östrojen - Progesteron Kombinasyonları

50 µg altında östrojen içeriğine sahip kombine oral kontraseptifler endometriyozise bağlı dismenore ve kronik pelvik ağrı gibi semptomları çözebilmektedir. Oral olarak alınmaları, siklik mens döngüsünün devamı ve semptom giderici olmaları nedeniyle hasta uyumu oldukça iyidir. Üç-altı aylık tedaviler ile endometriyotik odaklar atrofiye uğratılır. Kontrol altındaki hastalarda ara verilmeden devamlı kullanılabilirleri supresif etkiyi artırması nedeniyle önemli bir avantajdır. Noretindron asetat (5-20 mg/gün), cyproteron asetat (10 mg/gün), medroksiprogesteron asetat (30 mg/gün) gibi oral tabletler, depomedroksiprogesteron asetat (150 mg/3 ay) gibi intramusküler enjekte edilebilen preparatlar, levonorgestrelli rahim içi araç (20 µg/gün) gibi insertler progestajenik etkiyle endometriyozis supresyonu yapmaktadırlar (7).

1.7.1.2. GnRH Analogları

GnRH hipotalamustan salınan ve ön hipofize etkiyerek FSH ile LH salınımını regüle eden bir dekapeptittir. Pulsatil olarak salınır ve etkisini spesifik reseptörleri üzerinden gösterir. GnRH analogları agonistik ya da antagonistik etki gösterebilmektedir. Agonistler akut dönemde kullanıma bağlı olarak ön hipofizden FSH ve LH salınımını artırır. Klinikte flare up denilen bu etki, agonistlerin pulsatil olmayan devamlı kullanımları ile yaklaşık bir hafta sonra kaybolur. GnRH preparatları devamlı kullanıldığında ön hipofizde reseptör down regülasyonu olur ve hipoöstrojenizmin görüldüğü medikal menapoz durumu elde edilir. Östrojen seviyelerinin düşmesi endometriyotik implantları regresyona sokar. GnRH tedavisi ideal olarak 3-6 ay kadar sürdürülmelidir. Çünkü bu süre geçildiğinde hipoöstrojenizme bağlı osteoporoz durumu oluşmaya başlamaktadır. Tedavi ile hastalarda menapoz semptomlarının belireceği unutulmamalıdır. Ciddi endometriyozisi olan ve 6 aydan daha fazla süreli tedavi ihtiyacı olan hastalara mutlaka add-back tedavisi uygulanmalıdır. Add-back östrojen tedavisi; endometriyotik odakları aktive etmeyecek kadar düşük ancak kemik erimesini ve hipoöstrojenizmin neden olduğu menapozal semptomları baskılayabilecek yeterlilikte östrojen tedavisi başlanmasıdır. Tibolon 2,5 mg/gün oral tedavi bu amaçla kullanılabilir. Agonistler dismenore, nonsiklik pelvik ağrı ve disparoni gibi semptomların giderilmesinde oldukça başarılı olmalarına karşın ilk seçenek tedavi değildirler. GnRH antagonistleri ise agonistlerde görülen flare up etkiyi göstermeden etkili bir şekilde gonadotropin supresyonu ile hipoöstrojenik ortam oluştururlar (7).

1.7.1.3. Danazol ve Gestrinon

Danazol androjenik bir preparat olup hipofiz supresyonu ile hipoöstrojenizm ve amenore oluşturmaktadır. Ancak belirgin androjenik etki ile akne, yağlanma, kilo artışı ve hirsutizm gibi semptomlara yol açmaktadır. Üç-6 ay 200 mg/gün oral-vajinal kullanımı tedavi için yeterli sayılmaktadır.

Gestrinon; androjen ve progesteron reseptörlerine agonistik ve antagonistik etkiyle bağlanabilen ve foliküler gelişimi baskılayarak östrodiol sentezini kısıtlayan bir preparattır. Haftada 2,5 mg iki kez oral tedavi uygulanır. Ancak danazol benzeri yan etkileri nedeniyle kullanımı sınırlıdır (7).

1.7.1.4. Aromataz İnhibitörleri

Periferik dokuda (yağ dokusu) ve endometriyotik odaklarda östrojen oluşumu androjenlerin aromatazasyonu sonucu oluşmaktadır. Daha önce belirtilen tedavi seçeneklerinde folikülogenezin suprese edilmesiyle östrojen sentezi baskılanırken östrojen sentezinin diğer iki yolağı (periferik aromatazasyon ve endometriyotik odaklardaki aromatazasyon) ancak aromataz enzim inhibitörleri ile sağlanabilmektedir. Olgu sunumlarında endometriyozis tedavisinde etkili olabileceğı gösterilen bu grup ilaçların olası osteoporoz riski dikkate alınmalıdır.

1.7.1.5. Tümör Nekrozis Faktör-Alfa İnhibitörleri

TNF- α endometriyozis patogeneğinde önemi oldukça fazla olan inflamatuvar bir sitokindir. Peritoneal inflamatuvar hücre aktivasyonuna ve bu yolla pek çok büyüme faktörünün salınımına neden olmaktadır. Büyüme faktörlerinden zengin olan mikroçevre endometriyotik implantların tutunmasını ve büyümesini kolaylaştırmaktadır. Yapılan hayvan çalışmalarında TNF- α bağlayıcı protein-1 ile endometriyotik implantların tutunması ve büyümesi önemli ölçüde önlenmiştir. Ancak TNF- α inhibitörlerinin tedavide kullanılması için daha fazla klinik çalışmalar ve zaman gerekmektedir.

1.7.1.6. Anjiogenez ve Matriks Metalloproteinaz İnhibitörleri

VEGF (Vasküler Endotelyel Büyüme Faktörü) endometriyotik implantların invazyonu sonrasında anjiogenezi uyarak doku kanlanmasının artmasına, böylece endometriyotik odakların hormonal beslenmesinin kolaylaşmasına yol açmaktadır. VEGF inhibitörlerinin (endostatin, TNP-470, celecoxib ve rosiglitazon) kullanıldığı bir hayvan çalışmasında endometriyotik implantların boyutlarında önemli ölçüde azalmalar olduğu gösterilmiştir.

Benzer şekilde endometriyozis olgularında ektopik endometriyal odakta matriks metalloproteinaz enzim aktivitesinde artış olduğu bilinmektedir. Bu enzimler sayesinde endometriyotik implantların doku invazyonu sağlanmaktadır. Teorik olarak enzim inhibitörlerinin endometriyozis üzerine supresif etki edebileceği düşünülmektedir.

1.7.1.7. RU486 (Mifepriston) ve Selektif Progesteron Reseptör Modülatörleri (SPRM)

Onapriston ve ZK135,695 progesteron reseptör komplekslerinin sinyal iletiminde bir alt basamağa bağlanmalarını inhibe eden progesteron antagonistleridir. RU486, ZK137,316 ve SPRM'ler progesteron reseptörlerine etkiyerek agonist, parsiyel agonist ya da antagonist olarak aktivite gösterebilirler. Endometriyotik odaklarda atrofik etkileri ve vaskülaritenin azaldığı gösterilmiştir.

1.7.2. Cerrahi Tedavi

Peritoneal, ovaryen ve derin rektovajinal endometriyozisin cerrahi tedavi yaklaşımları birbirlerinden farklılık göstermektedir (8). Peritoneal endometriyozis varlığında cerrahi olarak eksizyon ya da ablasyon yapılmasının fertilitte üzerine

olumlu etkisi olabileceğini savunan yayınlar bulunmaktadır. Tanısal laparoskopi sırasında hafif ya da orta derecede endometriyozis varlığı görüldüğünde cerrahi rezeksiyon uygulanması önerilmektedir (8). Endometriyoma varlığında ise tek başına medikal tedavi ile kist yok edilememektedir. Medikal tedavi sonrası rezidü kisti olan olgularda cerrahi uygulanarak endometriyotik doku çıkartılmalıdır. Üç cm ve daha küçük olan endometriyomalarda kist aspirasyonu sonrasında kist cidarının koagüle edilerek yok edilmesi sağlanabilir (8). Üç cm'den büyük olan endometriyomalarda ise aspirasyon sonrası kistektomi uygun görülmektedir (8). İnfertil olgularda cerrahi tedavi birincil basamaktır. Kistektomi yapılırken sağlam over dokusuna zarar verilmemelidir. Kanama kontrolü için yoğun koagülasyonun gerekebileceği durumlarda over rezervini olumsuz etkilememek için kistin hilusa uzanan cidarı keskin diseksiyonlar ile eksize edildikten sonra kist cidarının koagülasyonu tercih edilebilen bir yöntemdir. Kist duvarının eksize edildiği olgularda; tekrar operasyon gerekliliğinin düşük olduğu, ağrı ve subfertilite gibi durumların daha etkili gerilediği ve gebelik oranlarının daha fazla olduğu bildirilmiştir (9). Rektovajinal derin endometriyozis tedavisinde ise fibrotik nodüler odakların arka vajen, rektum, arka serviks ve uterosakral ligamentlerden eksize edilmesi gerekmektedir (8).

2. MELATONİN

2.1. Tanım

Melatonin; ritmik olarak pineal bezden salınan, sirkadian ritimden sorumlu bir hormondur. Geceleri (karanlıkta) salınımı artarken ışııkta inhibe olur. N-asetil-5-metoksitriptamin olarak da bilinen melatonin bir indolamin türevi olup serotoninden türetilmektedir (10). Vücutta triptofan aminoasidinin 5-hidroksilasyon, dekarboksilasyon, N-asetilasyon ve O-metilasyonu sonrasında sentezlenir (10). Melatonin fizyolojik fonksiyonunu otokrin, parakrin ve hormonal etkileri ile göstermektedir. Melatonin sentezi nörepinefrinin adrenerjik $\beta 1$ reseptörlerine bağlanmasıyla başlamaktadır (11). Sentezdeki hız kısıtlayıcı enzimlerin aktivasyonu adrenerjik sistemin cAMP sekonder haberci aktivasyonunu başlatmasıyla gerçekleşmektedir (11). Melatonin yağda çözünebilir olması sayesinde hücre membranından kolaylıkla geçebilir (12). Kanda %60-70 oranında albumin bağlı olarak taşınır (12). Melatonin >%90 karaciğerde metabolize edilir (12). Oral alımın etkinliği düşüktür. Hidroksilasyon sonrasında sülfat ve glukronid konjugatları şeklinde atılır (11).

Mononükleer hücrelerden salınımı gösterilmiştir (10). Membran reseptörleri (M1 ve M2) etkilerini Gi proteini üzerinden gerçekleştirir (10). RZR/ROR α ve RZR β olarak bilinen nüklear reseptörleri de bulunmaktadır (10). Mebran ve nüklear reseptörleri üzerinden immun modülasyonda rol oynar (10). T, B lenfositleri, NK hücreler ve monositler üzerinde aktive edici etki yanında timosit proliferasyonu, sitokin salınımı (IL-1, IL-2, IL-6, IL-12 ve IFN γ), met-enkefalin ve immunoopioid madde salınımı, anti-apoptotik ve anti-glukokortikoid aktiviteleri bulunmaktadır (10). Antiinflamatuvar etkileri PGE₂ etkisinin inhibisyonu, COX-2 downregülasyonu üzerinden gerçekleştirmektedir (10).

2.2. Melatonin ile İlgili Deneysel Çalışmalardan ve Klinik Gözlemlerden Edinilen Bilgiler

Ratlarda yapılan bir çalışmada mast hücrelerinde de melatonin sentezi olduğu gösterilmiştir (13). De novo olarak üretilen melatoninin lokal olarak antiinflamatuvar etkide bulunduğu ve mast hücre degranülasyonu sırasında ortaya çıkan inflamatuvar maddelerin supresyonunun otokrin ya da parakrin etkiyle melatonin üzerinden (MT1 ve MT2 reseptörleri) gerçekleştirilebileceği belirtilmiştir (13). MT1 ve MT2 reseptörleri üzerinden östrojen reseptör dawn regülasyonu gösterilmiştir (10).

Melatonin antioksidan bir maddedir. Reaktif oksijen ve nitrojen moleküllerini inaktive etmesinin yanında antioksidan enzimlerin (glutasyon peroksidaz, glutasyon redüktaz, γ -glutamilsistein sentaz, glukoz 6-fosfat dehidrojenaz, katalaz, Cu- Zn ve Mn-superoksit dismutaz) indüksiyonunu sağlarken pro-oksidan enzimleri (NO sentaz, lipoksijenaz) down regüle eder (10). Melatonin aynı zamanda adezyon moleküllerinin salınımını azaltarak lökositlerin endotel hücrelerine adezyonunu, transendotelial hücre migrasyonunu ve ödem oluşumunu önlemektedir (13). Ratlarda yapılan bir diğer çalışmada MT2 ve MT3 membran reseptörleri üzerinden selektif olarak mikrovasküler yapılarda melatoninin lökosit yuvarlanmasını (MT2) ve lökotrien B4 bağımlı lökosit adezyonunu (MT3) azalttığı gösterilmiştir (14).

Tavşanlarda yapılan bir çalışmada ise membran reseptörleri üzerinden arterial yapılarda antioksidan özelliği üzerinden vazorelaksan etkisi olduğu gösterilmiştir (15). Literatür taramasında ayrıca melatoninin pek çok reproduktif sistem fonksiyonunda aktif rol aldığı da gözlenmiştir. Overlerde folikülogenez, foliküler atrezi, ovulasyon, oosit maturasyonu ve korpus luteum formasyonu üzerinde rolü olduğu bilinmektedir (16).

Ratlarda yapılan bir çalışmada antioksidan etkisi ile melatoninin postoperatif adezyon oluşumunu azalttığı başka bir çalışmada ise SOD, katalaz gibi antioksidan enzim aktivitelerini artırdığı ve MDA seviyelerini azalttığı gösterilmiştir (17-18).

Melatoninin progesteron sekresyonunu artırdığı ve onkostatik, antiproliferatif, antiöstrojenik etkileri olduğu da bilinmektedir (18).

Pinealektomi yapılan ratlarda endometriyotik odakların incelendiği bir çalışmada pinealektomi sonrası endometriyotik lezyonların boyutlarında büyüme olduğu ve antioksidan enzim aktivitesinde azalma olduğu saptanmıştır. Bu ratlara tedavi amaçlı melatonin enjekte edildiğinde ise endometriyotik odaklarda küçülme ve antioksidan enzim aktivitelerinde artış olduğu saptanmıştır (18).

Ratlarda yapılan diğer bir çalışmada benzer şekilde melatoninin endometriyotik implantlar üzerine etkisi yanında melatoninin antioksidan, antiinflamatuvar ve immunmodulatuvar etkileri incelenmeye çalışılmıştır. Melatonin tedavisi sonrasında endometriyal odak volümlerinde anlamlı azalma olduğu, SOD, katalaz gibi enzim aktivitelerinde artış olduğu, MDA seviyesinde azalma saptandığı ve endometriyal histolojik skorlarda melatonin tedavisi ile azalma saptandığı gözlenmiştir. Sonuçta endometriyozis üzerine melatoninin regresyon ve atrofi yapıcı etkide bulunduğu kanısına varılmıştır (19).

Diğer bir deneysel çalışmada ratlarda oluşturulan endometriyotik implantlar üzerine letrozol ve melatonin etkisini karşılaştıran Yıldırım G. melatonin kullanılan grupta letrozole göre endometriyotik lezyonlarda anlamlı olarak daha fazla küçülme olduğunu ve melatonin tedavisi kesildikten sonra lezyon rekürrens hızının letrozol kullanılan gruba göre melatonin kullanılan grupta daha yavaş olduğu sonucunu elde etmiştir. Çalışmada önceki verileri destekler şekilde melatonin tedavisi ile SOD ve katalaz aktivitelerinde anlamlı bir artış olduğu da görülmüştür (20).

Günümüzde melatonin diyet destek amaçlı kullanılabilir. Etki profili açısından kanser hastalığından Alzheimer Hastalığına kadar oldukça geniş bir tedavi spektrumuna sahiptir (21). Uyku bozukluklarında ve jet-lag durumunun önlenmesinde sıkça kullanılmaktadır. Fizyolojik kan düzeyleri ilerleyen yaşla birlikte azalmaya başlamaktadır (21). Karanlık süresinin uzun olduğu kış aylarında artan melatonin GnRH puls jeneratörünü baskılar ve reproduktif fonksiyonlar

minimalize edilir (21). Araştırmalar Alzheimer Hastalığı ve meme kanserinin etiolojisinde de melatonin eksikliğinin rolü olduğunu düşündürmektedir (21). Ayrıca melatonin desteği ile perimenopozal ya da postmenopozal kadınlarda depresif duygu durumunda düzelme olduğu gösterilmiştir (21).

2.3. Melatonin Kullanılma Nedeni

Deneysel çalışmaların ortak sonucunda; antioksidan madde olan melatoninin endometriyotik lezyonlarda regresyona yol açtığı ve lezyonların rekürrensini azalttığı sonucuna varılmıştır. Bu noktadan sonra, toksik etkinin gözlenmediği, etkin regresyonu sağlayıp rekürrensi uzun süre baskılayacak olan optimal dozun belirlenmesidir. Bu amaçla farklı rat gruplarında standart lezyonlar oluşturduktan sonra 10 mg/kg/gün ve 20 mg/kg/gün dozunda melatonin tedavisinin sonuçlarını inceleyen bu tezin ileride 50-100 mg/kg/gün gibi yüksek dozlarda melatonin tedavisinin etkilerinin incelendiği deneysel çalışmalara yol gösterici olabileceğini düşünmekteyim

V. MATERYAL ve METOD:

1. HAYVAN MODELİ

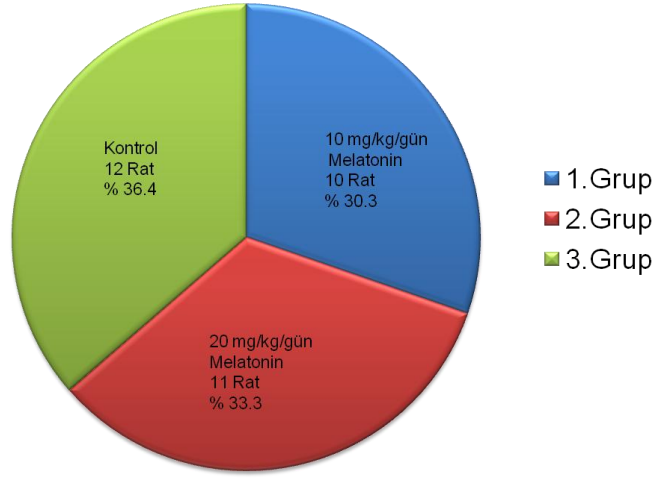
YÜDETAM'da daha önceden geliştirilen rat endometriozis modeli örnek alınarak, aynı merkezde yetiştirilen yaklaşık 200-250 gr ağırlığında, nulligravid, reproduktif dönemde olup gebeliği bulunmayan, otuzyediyedi adet Spraque-Dawley albino rat çalışmada kullanıldı. Ratlar çalışma boyunca oda ısısında (21 derece), %60 nemli ortamda, 12 saatlik aydınlık/karanlık koşullarda, ayrı kafeslerde muhafaza edilerek ad libitum olarak beslendiler.

Toplam 4 adet rat, yeterli lezyon oluşturulamaması ya da intraperitoneal abse oluşumu nedeniyle çalışma dışı bırakıldı. Geriye kalan 33 adet rat rastgele üç gruba ayrıldı (Grafik 1). On adet rat 10 mg/kg/gün melatonin tedavi grubu, 11 adet rat 20 mg/kg/gün melatonin tedavi grubu ve 12 adet rat ise kontrol grubu olarak belirlendi.

Tüm gruplara cerrahi endometriyozis modeli oluşturulduktan sonra yüksek doz depo östrojen tedavisi (50 µg/kg, subkutan, haftada iki kez) başlandı ve çalışma sonuna kadar devam etti. Sadece tedavi gruplarına melatonin verildi. Nekropsileri dahil her rat 14 günlük aralıklarla toplam dört adet operasyon geçirdi.

Çalışma 'Yeditepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu' tarafından onay alındıktan sonra uluslararası hayvan çalışmaları etik kurallarına uygun olarak yapıldı.

Rat Sayı ve Grupları



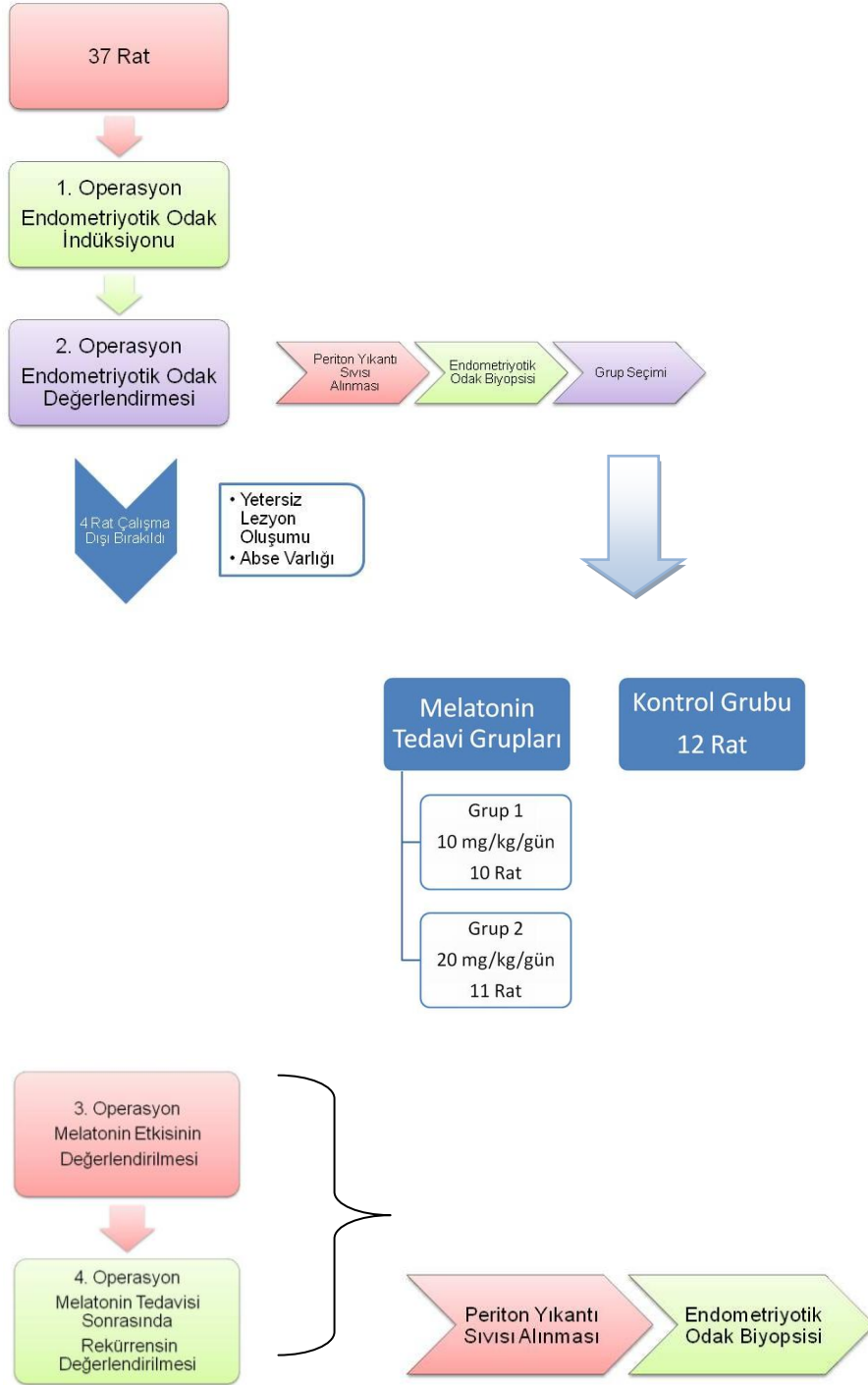
Grafik 1 Deneysel grupları, gruplardaki rat sayısı ve yüzdeleri

2. DENEYSEL TASLAK VE CERRAHİ PROSEDÜRLER

Her rat toplam dört adet operasyon geçirdi. Birinci operasyonda bilateral ooferektomi sonrasında homolog uterin boynuz ootransplantasyonu ile endometriyotik odak induksiyonu yapıldı. Cerrahi induksiyon sonrası endometriyotik odakların oluşturulabilmesi için haftada iki kez yüksek dozda depo östrojen (50 µg/kg) subkütan olarak verildi. Ondört gün (2 hafta) sonunda ratlara ikinci operasyonları yapıldı ve endometriyotik odakların durumu incelendi. Yeterli sayıda endometriyotik odağın gelişmediği ya da abse oluşumu gözlenen ratlar çalışma dışı bırakıldı (Grafik 2).

Bu operasyon sonrasında ratlar üç gruba ayrıldı ve iki grup bir sonraki operasyona kadar (14 gün/2 hafta) farklı dozlarda (10 ve 20 mg/kg/gün) melatonin ile muamele edilirken üçüncü grup kontrol grubu olarak izlendi. Üçüncü operasyon tedavi amaçlı verilen melatoninin endometriyotik odaklar üzerindeki etkisini görmek amacıyla yapıldı. Bu operasyonun ardından melatonin tedavisi kesildi ve ratlar sadece östrojen

tedavisi altında 14 gün daha izlendikten sonra anestezi altında dekapitasyon işlemi yapılarak (nekropsi, 4. operasyon) endometriyotik odakların melatonin tedavisi kesildikten sonraki rekürrens durumları kontrol grubuyla karşılaştırıldı (Grafik 2).



Grafik 2 Deneysel Taslak*

Birinci operasyondan itibaren her grup rutin olarak haftada 2 gün 50 µg/kg sk östradiol tedavisi almıştır. İkinci operasyonda tedavi gruplarına farklı dozlarda melatonin başlanırken kontrol grubu sadece östradiol tedavisi almıştır. Üçüncü operasyonda melatonin tedavisi kesilmiştir. Her operasyonda periton yıkantı sıvısı alındıktan sonra endometriyal odak biyopsisi yapılmıştır.

2.1. Birinci operasyon; endometriyotik odakların indüksiyonu

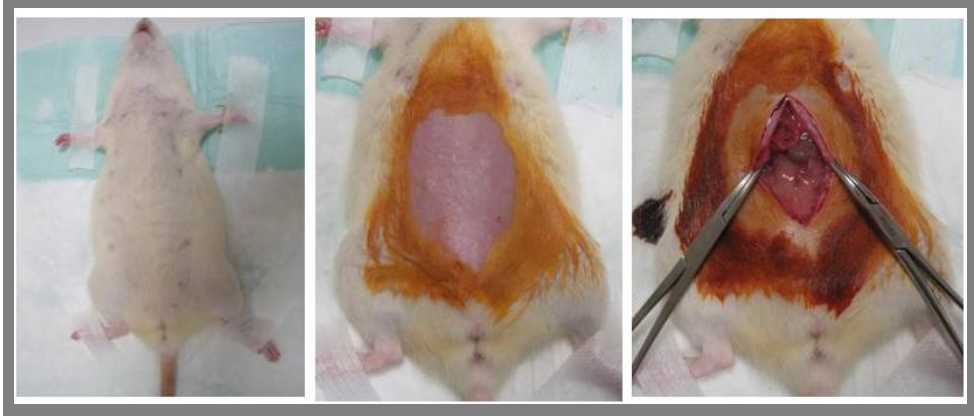
Tüm ratlar önceden belirtildiği gibi intramüsküler 60 mg/kg ketamin hidroklorid (Ketalar; Eczacıbaşı İlaç Sanayi, Levent, İstanbul, Türkiye) ve 7 mg/kg xylazin hidroklorid (Rompun; Bayer İlaç Sanayi, Şişli, İstanbul, Türkiye) ile genel anesteziye alındı (Resim 1) (22-23).



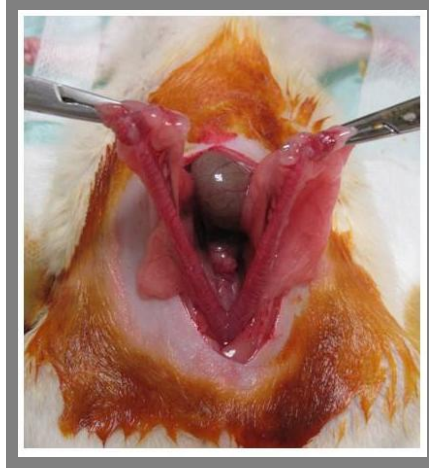
Resim 1 Rompun (veteriner ilaç) ve Ketazol (beşeri ilaç)

Anestezi altında endometriyotik odakların indüksiyonu Vernon ve Wilson modeli (24) ile Lebovic (25) ve Uygur tarafından uygulanan modifiye tekniğe (26) göre yapıldı.

Genel anestezi indüksiyonunu takiben vertikal insizyonla batına girildi (Resim 2). Uterin boynuzlar ve overler visualize edildi. Ardından uterin boynuzlar ve overler en block olarak serviks hizasından ve overlerin 1cm üzerinden klemlenerek çıkartıldı (Resim 3). Hemostaz elektrokoterizasyon ile sağlandı.

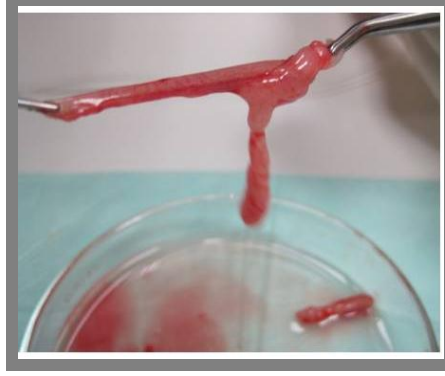


Resim 2 Operasyona hazırlık evreleri ve midline insizyon



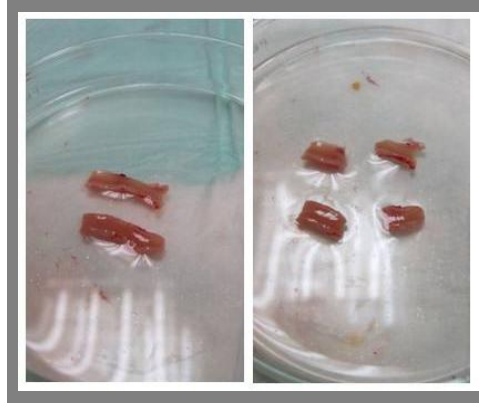
Resim 3 Bilateral uterin boynuz ve overler klemler ile tutularak gösterilmekte

Uterin boynuzlar ve overler 37 derecedeki fosfat tamponlu izotonik solusyonu içerisine alınarak overler eksizye edildikten sonra uterin boynuzlar parametrijal yağlı dokulardan temizlendi (Resim 4).



Resim 4 Uterin boynuzların parametrijal dokulardan temizlenmesi

Ardından silindir şeklindeki uterin boynuzlar uzunlamasına kesilerek iç yüzü endometriyal doku ile döşeli myometriyal tabaka içeren dikdörtgen şeklinde 2 adet greft oluşturuldu (Resim 5). Greftler 6x3x1 mmlik dört adet eşit parçaya bölünerek implantasyona hazırlandı (Resim 5).

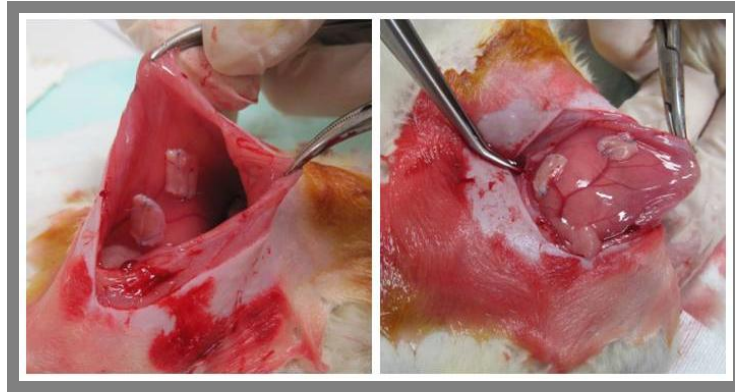


Resim 5 Uterin boynuzlar uzunlamasına kesilerek endometriyal yüzleri açıldıktan sonra dört eşit parçaya bölünmüş

Greftlerin ikisi sağ hipokondriak bölgeye, 6-0 absorbe olmayan polipropilen suturler ile, endometriyal doku peritoneal yüzeyle değecek şekilde, batın duvarına ait ana vasküler yapıların bifurkasyon alanı üzerine implante edildi (Resim 6-7). Diğerleri ise benzer şekilde sol hipokondriak alana implante edildi (Resim 7).



Resim 6 Sağ hipokondriak alandaki vasküler yapılar



Resim 7 Bilateral hipokondriak alanda vasküler trase üzerine implante edilmiş uterin boynuz dokuları

Cerrahi operasyon sırasında peritoneal yüzeyler steril izotonik solusyon ile yıkanarak nemli tutuldu. İmplantasyon sonrası hemostaz ve batın kontrolü ardından vertikal insizyon cilt altı ve cilt olarak çift kat 3-0 vicryl ile kilitli kontunie suture edildi (Resim 8).



Resim 8 Postoperatif insizyon kapatılması, uygun pozisyon verilmesi ve kafese yerleştirme

Tüm ratlara intraperitoneal enfeksiyonu önleyebilmek için postoperatif 3 gün 50 mg/kg/gün sefazolin sodyum (IE Ulagay Ilac Sanayi, Istanbul, Turkey) intramusküler olarak uygulandı (Resim 9).



Resim 9 Sefazolin sodyum (İespor)

Tüm ratlara 50 µg/kg haftada iki kez sk. yüksek doz depo östrojen (östradiol powder, ≥98% Sigma-Aldrich®) tedavisi başlandı ve çalışma sonuna kadar devam etti.

2.2. Östrojen Hazırlanışı:

$\geq 98\%$ toz östrojenden (Sigma-Aldrich®) 0.0020 gr alınarak, 20 ml mısırözü yağı ve 5 ml etil alkolden oluşan karışıma eklendi. Isıtıcı karıştırıcıda 20 dakika kadar karıştırılarak östrojenin çözülmesi ve alkolün uçması sağlandıktan sonra $10\mu\text{g}/0.1\text{ ml}$ östrojen konsantrasyonu elde edildi.(Resim 10)

Çalışma sonuna kadar $50\ \mu\text{g}/\text{kg}$ depo östrojen haftada iki kez subkutan olarak uygulandı. 200 gr (0.2 kg) olan bir rata yapılacak östrojen dozu $50 \times 0.2 = 10\mu\text{g}$ olarak hesaplandığından hazırlanan karışımdan 0.1 ml haftada iki gün kullanıldı.

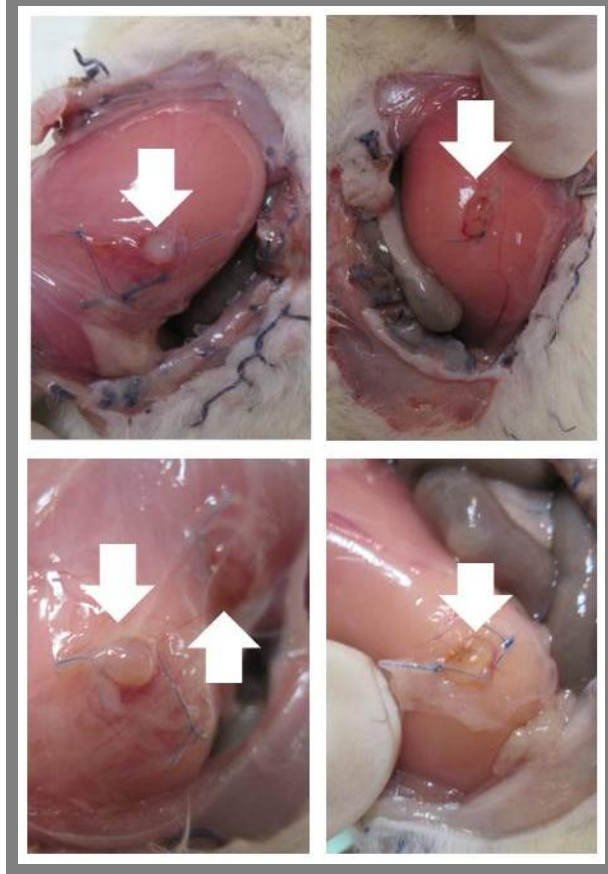


Resim 10 (10 mg/100 ml) Östrojen içeren mısırözü yağ çözeltisi

2.3. İkinci operasyon: endometriyotik odakların değerlendirilmesi ve grupların belirlenmesi

Ondört gün süren, haftada iki kez $50\ \text{mg}/\text{kg}$ yüksek doz östrojen tedavisi sonrasında yapılan ikinci operasyonda oluşan endometriyotik odaklar değerlendirildi (Resim 11). Batın visualizasyonu sonrasında biyokimyasal parametrelerin (süperoksit dismutaz, malondialdehit ve vasküler endotelyal büyüme faktörü)

değerlendirilebilmesi için her rattan 1 ml batın yıkantı sıvısı alınarak -80 derecede saklandı. Tüm endometriyotik lezyonlar cetvel ile üç boyutlu olarak (uzunluk x genişlik x yükseklik, mm cinsinde) aynı araştırmacı tarafından (N.Ç.K.) ölçüldü.



Resim 11 İkinci operasyonda gözlenen endometriyotik odaklar ok işaretleri ile gösterilmiştir

Toplam 37 adet ratın 4 tanesi (3'ü yetersiz endometriyotik odak oluşumu, 1 tanesi ise intraperitoneal abse oluşumu nedeniyle) çeşitli sebeplerden ötürü dekapitasyon yöntemi ile çalışma dışı bırakıldı. Diğer ratlarda oluşan dörder adet endometriyotik lezyonların ölçümleri ve özellikleri kayıt edildikten sonra histopatolojik inceleme için randomizasyon yöntemi ile her rattan bir adet lezyon eksizyonel biyopsi ile alındı. Bu aşamadan sonra ratlar rastgele 3 gruba ayrıldı. Grup 1, 10 mg/kg/gün melatonin grubu; Grup 2, 20 mg/kg/gün melatonin grubu ve Grup 3, kontrol grubu olarak belirlendi.

Günlük melatonin dozu ikiye bölünerek eşit miktarlarda intramusküler ve intraperitoneal olarak uygulandı.

2.4. Melatonin Hazırlanması:

200 gr'lık bir rata ondört gün boyunca, günde 10 mg/kg ve 20 mg/kg dozunda melatonin ($\geq\%98$ powder Melatonin Sigma-Aldrich [Resim 12]) uygulama için gereken melatonin miktarı tabloda gösterilmektedir (Tablo1).

10 mg/kg/gün 10x0.2x14= 28 mg Melatonin	10 mg/kg/gün grubunda 10 adet rat için hesaplama 28x10= 280 mg Melatonin
20 mg/kg/gün 20x0.2x14= 56 mg Melatonin	20 mg/kg/gün grubunda 11 adet rat için hesaplama 56x11= 616 mg Melatonin

Tablo 1 Melatonin dozunun hesaplanması



Resim 12 $\geq\%98$ Melatonin tozu (Sigma Aldrich)

Melatonin tozu etil alkol çözeltisinde çözülebilmektedir. Ancak etil alkolün toksik etkisi nedeniyle ratlara uygulanabilecek olan melatonin çözeltisindeki etil alkol miktarının minimum düzeyde tutulması gerekmektedir (etil alkol oranı %10 düzeyinde tutulmalıdır).

Melatonin tedavisinin eşit dozlara bölünmüş şekilde intraperitoneal ve intramusküler enjeksiyonlar ile uygulanması nedeniyle özellikle intramusküler enjeksiyonların tolere edilebilmesi için düşük miktarlarda enjeksiyon volümü kullanılmalıdır. Bu amaçla etil alkol oranı %10 olan stok çözeltiden rat başına 0.2 ml'lik intraperitoneal ve 0.2 ml'lik intramusküler enjeksiyon hacmi uygulanması planlandığında gereken etil alkol miktarı tabloda gösterilmiştir (Tablo 2).

10 mg/kg/gün Melatonin grubunda %10x(0.2+0.2)x10x14= 5.6 ml Etil Alkol	20mg/kg/gün Melatonin grubunda %10x(0.2+0.2)x11x14= 6.16ml Etil Alkol
---	--

Tablo 2 Etil Alkol dozunun hesaplanması

Hesaba göre;

280 mg melatonin 5.6 ml etil alkol çözeltisinde (50 mg melatonin/ml) ve 616 mg melatonin 6.16 ml etil alkol çözeltisinde (100 mg melatonin/ml) vortex ile çözündürülür ve -20°C de stok solüsyon olarak saklanır. Melatonin her gün enjeksiyon öncesinde taze olarak serum fizyolojik ile sulandırılarak hazırlanmalıdır. Bu amaçla -20°C de saklanan stok solüsyon kullanılır.

Günde;

10 mg/kg/gün melatonin grubunda 10 adet rat için 0.2 ml'lik 20 enjeksiyon yapılabilmesi için: $0.2 \times 20 = 4 \text{ ml total hacim}$

20 mg/kg/gün melatonin grubunda ise 11 adet rat için 0.2 ml'lik 22 enjeksiyon yapılabilmesi için: $0.2 \times 22 = 4.4 \text{ ml total hacim}$ gerekir

Enjeksiyon başına 0.2 ml'lik total hacmin 0.02 ml'si etil alkol içeren stok solüsyondan olacak şekilde planlandığında;

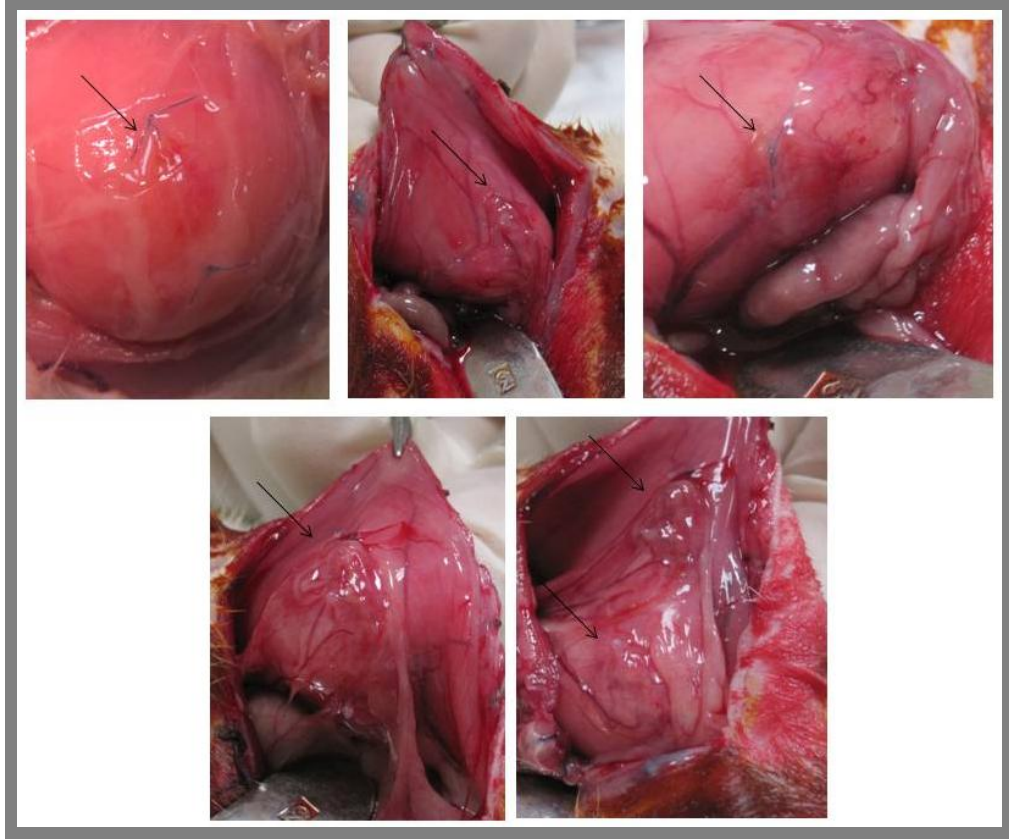
10 rat için gereken 4 ml'lik total hacim: 0.4 ml etil alkol içeren stok solüsyon ve 3,6 ml serum fizyolojik karışımından elde edilmelidir.

11 rat için gereken 4.4 ml'lik total hacim: 0.44 ml etil alkol içeren stok solüsyon ve 3.96 ml serum fizyolojik karışımından elde edilmelidir.

Karışım süspansiyon şeklinde çöktüğünden dolayı homojenite sağlanabilmesi amacıyla enjeksiyon öncesinde total volümün 5 dakika kadar vortexte karıştırılması önerilmektedir.

2.5. Üçüncü operasyon: Melatonin etkisi

Dördüncü haftada yapılan üçüncü operasyonda 14 günlük melatonin tedavisi sonrasında endometriyotik odakların durumu değerlendirildi. Odakların ölçümleri daha önce de belirtildiği koşullarda aynı araştırmacı tarafından yapıldı. Çalışma sırasında endometriyotik odakların boyutlarında görsel olarak azalma olduğu fark edildi (Resim 13).



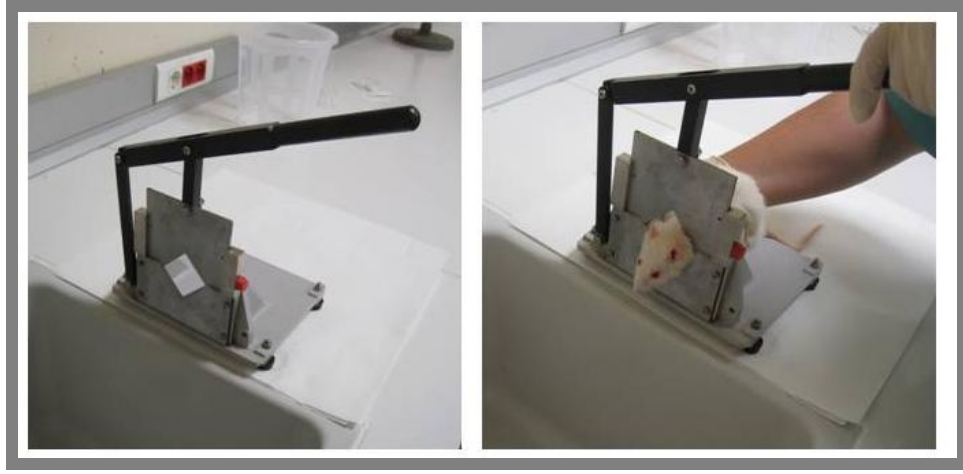
Resim 13 Melatonin tedavisi sonrasında izlenen lezyonlar ok işaretleri ile gösterilmiştir.

Lezyon volümlerindeki azalma dikkat çekmektedir

Biyokimyasal parametrelerin değerlendirilebilmesi için 1 ml batın yıkantı sıvısı alınarak -80° C’de saklandı. Üç adet lezyondan rastgele bir tanesi eksize edilerek histopatolojik değerlendirme için formaldehit solusyonunda saklandı. Bu operasyondan sonra melatonin enjeksiyonu kesildi ancak östrojen desteği devam ettirildi. Bu sayede bir sonraki operasyonda (6. hafta sonunda) melatonin tedavisi kesildikten sonra endometriotik odakların östrojen tedavisi altındaki rekürrens durumlarının değerlendirilmesi planlandı.

2.6. Dördüncü operasyon: Nekropside rekürrens durumunun değerlendirilmesi

Altıncı haftada ratlar anestezi altında dekapitasyon yöntemi ile (Resim 14) ötenazi edildikten sonra endometriyotik odakların kontrol edilmesi ile rekürrens değerlendirilmesi yapıldı. Geriye kalan iki adet lezyon benzer şekilde ölçüldü, ratlardan batın yıkantı sıvısı alındı ve histopatolojik değerlendirme için tüm lezyonlar eksize edildi.



Resim 14 Giyotin ve dekapitasyon işlemi

3. VOLÜM ANALİZLERİ

Uterin boynuzların peritoneal yüzeye implantasyonu sonrasında östrojen tedavisi ile oluşan küresel endometriyotik odakların volüm ölçümleri yayvan elipsoid ölçüm formülü: $V \text{ (mm}^3\text{)} = 0.52 \times \text{uzunluk} \times \text{genişlik} \times \text{yükseklik}$ (mm cinsinde) kullanılarak yapıldı (26).

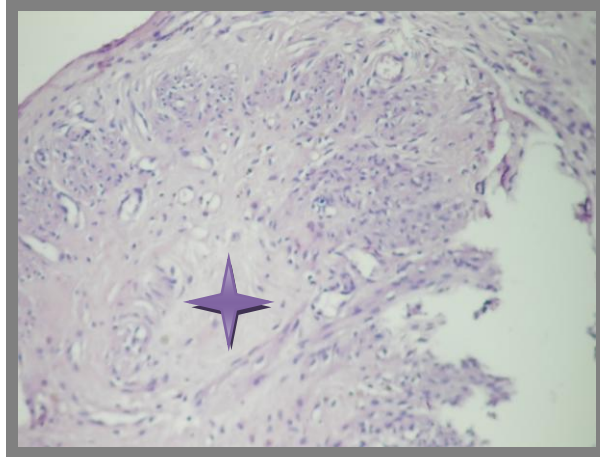
4. HİSTOPATOLOJİK ANALİZLER

Operasyonlarda alınan biyopsi örnekleri %10 luk formaldehit solusyonu ile fikse edildi. Dehidratasyon işlemi sonrasında parafin bloklara gömüldü. Mikrotom ile 3 µm lik kalınlıklarda kesildikten sonra hemotoksilen–eosin (HE) ile boyandı. Rastgele numaralandırılan tüm preparatlar araştırmacı N.Ç.K. tarafından ışık mikroskobu altında okunduktan sonra Patolog Doç. Dr. F.Ö. tarafından konsülte edildi.

Mikroskopik incelemede endometriyal gland oluşumu ve stroma varlığına dikkat edildi. İmplantlardaki endomeriyal epitel hücrelerin özelliğine göre histopatolojik skorlama Tablo 3 ve Resim 15-18 de gösterildiği gibiydi.

Histopatolojik skora (27)	
3 puan	İyi korunmuş epitel varlığı
2 puan	Orta düzeyde korunmuş epitel varlığı ve lökosit infiltrasyonu
1 puan	Nadir epitel varlığı
0 puan	Epitel yokluğu

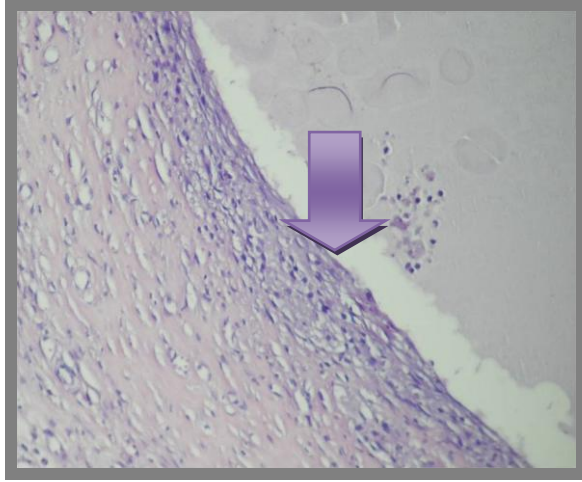
Tablo 3 Histopatolojik Skora



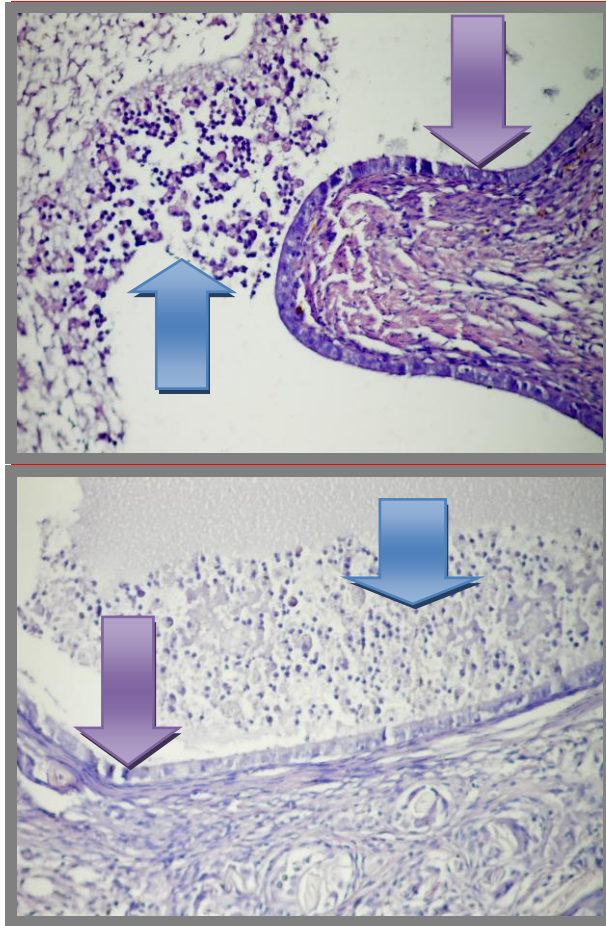
Resim 15 Histopatolojik görüntüde endometriyal doku gelişimi görülmemekte,

histopatolojik skor 0

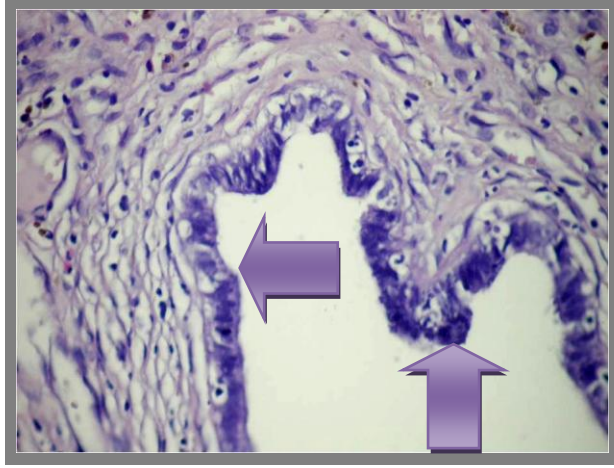
Yıldız ile işaretlenmiş alan stromayı göstermektedir



Resim 16 Histopatolojik görüntüde nadir olarak epitel doku varlığı izlenmekte (ok ile gösterilmiş), histopatolojik skor 1



Resim 17 Histopatolojik görüntüde endometriyal doku gelişimi (mor ok) yanında lökosit infiltrasyonu (mavi ok) izlenmekte, histopatolojik skor 2



Resim 18 Histopatolojik görüntüde iyi korunmuş endometriyal doku varlığı görülmekte (ok ile gösterilmiş), histopatolojik skor 3

5. BİYOKİMYASAL ANALİZLER

Serbest radikallerin proinflamatuvar özellikleri nedeniyle reproduktif sistemde endometriyozis oluşumunu tetiklediği bilinmektedir. Superoksit anyonları pek çok fizyolojik ve patolojik olaylarda rol almaktadırlar (28).

Hücre içi aerobic solunum sonucu oluşan reaktif oksijen molekülleri doku üzerine toksik etkide bulduklarından dolayı biyolojik sistemlerce antioksidan mekanizmalarla yok edilmelidirler (29). Toksik etkilerinin yanında oksidan maddeler düşük konsantrasyonlarda hücre fonksiyonların regülasyonunda rol almaktadırlar (29). Örneğin süperoksit anyonu immun modulatuar olarak görev yapmaktadır (29). Süperoksit anyonları antioksidan süperoksit dismutaz enzimi aracılığıyla oksijen ve hidrojen peroksite dönüştürülür. Hidrojen peroksit ise katalaz enzimi ile oksijen ve su molekülüne dönüştürülmektedir. Ökaryotik hücrelerde Cu-Zn SOD ve Mn SOD olmak üzere başlıca iki tip SOD enzimi varlığı bilinmekteyken 1982 yılında EC SOD adı verilen başlıca lenf sıvısı, sinovyal sıvı ve plazma gibi ekstrasellüler ortamda bulunan üçüncü bir enzim varlığı keşfedildi (29). Cu-Zn SOD sitoplazma ve

nukleusta, Mn SOD mitokondri matriksinde bulunurken EC SOD ekstrasellüler ortamda görev yapmaktadır (29). EC SOD vasküler sistemde özellikle arterial dokuda vasküler düz kas hücrelerinden ekspresyona edilmektedir (29). IFN- γ ve IL-4 gibi sitokinler EC SOD ekspresyonunu artırırken TNF- α azaltmaktadır (29). Platelet derive büyüme faktörü (PDGF), fibroblast growth factor (FGF) ve endotelial büyüme faktörü (EGF) EC SOD ekspresyonunu azaltmaktadır (29). Nötrofil hücrelerden salınan ya da inflamatuvar reaksiyonlarla oluşan proteazlar EC SOD'u inactive ederler (29). Özetlenecek olursa; endometriyozis gibi inflamasyonun yoğun olduğu lezyonlarda EC SOD düzeyinde azalma olacağı düşünülebilir.

Malondialdehit benzer şekilde serum, plazma, doku ve idrar gibi çoğu biyolojik sistemde lipid peroksidasyonu sonucu bulunur ve oksidatif stress etkisinin değerlendirilmesinde kullanılır (30). Oksidatif stressin pek çok moleküle (DNA, RNA, proteinler...) etki edebileceği bilinmesine rağmen lipidler üzerine olan etkisi oldukça önemlidir. Lipid oksidasyonu sonucu oluşan en önemli sekonder ürünler aldehitler olup oksidatif stress etkisini artırmaktadırlar (31). Malondialdehit (MDA) çoklu sature olmamış yağ asitlerinin peroksidasyon ürünüdür (31). DNA ve proteinler ile ilişkisi sonucu pek çok fizyolojik sistemde defekte yol açabilmektedir (31). Karsinojenik ve genotoksik etkisi yanında diğer sistemlere özgü patolojik durumların ortaya çıkmasında rolü bulunmaktadır (31). Endometriyozis gibi inflamatuvar bir zeminde, serbest radikal oluşumunun artmış olduğu bir lezyonda lipid peroksidasyon ürünü olan MDA seviyesinin artmış olabileceği düşünülebilir.

VEGF'in (Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü) endometriyotik odaklarda vaskülarizasyonu artırdığı, endometriyotik implantın büyümesini kolaylaştırdığı bilinmektedir. VEGF, tirozin kinaz aktivitesi gösteren başlıca üç adet reseptör üzerinden etkisini göstermektedir (VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3).

VEGFR-1 aktivasyonu ile matriks metalloproteinaz-9 aktivasyonu ve doku spesifik büyüme faktörleri yapımı artış gösterirken VEGFR-2 endotel proliferasyonunu ve maturasyonunu sağlar (32). VEGFR-3 lenfanjiogenez üzerinde etkili olup endotel proliferasyonu ve maturasyonu üzerinde aktif etkisi olmadığı bilinmektedir (32).

VEGF'ün endotel hücreleri üzerine etkisi migrasyon, bazal membranın invazyonu, proliferasyon ve angiogenезin uyarılmasıdır. Endometriyozis patofizyolojisinde aktif rolü olan VEGF'in endometriyotik lezyonlarda artmış olabileceği düşünölmektedir.

Çalışma sırasında endometriyotik odak indüksiyonu için yapılan ilk operasyon hariç diğer tüm operasyonlarda ratlardan 1 ml batın yıkantı sıvısı alındı. Örnek elde etmek için batın inspeksiyonu sonrasında 2 ml steril izotonik solusyonu ile batın irrigasyonu yapıldı ve her rat için farklı enjektör kullanılarak 1 ml sıvı geri aspire edildi.

Opere edilen tüm ratlardan alınan batın yıkantı sıvıları çalışma sonuna kadar -80°C'de bekletildi ve çalışma sonunda superoksit dismutaz, vasküler endotelyal büyüme faktörü ve malondialdehit yönünden tetkik edildi.

Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi, Rat Superoxide Dismutase Assay Kit (Cayman Chemical CompanyTM, Ann Arbor, MI, USA) ile değerlendirildi. SOD aktivitesi U/ml cinsinde belirtildi.

Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), Rat VEGF Elisa Kit (RayBiotech,Inc.) ile değerlendirildi ve pg/ml cinsinde belirtildi.

Malondialdehit (MDA), Elisa Kit for Rat Malondialdehyde (Uscn Life Science Inc. Wuhan) ile değerlendirildi ve pmol/ml cinsinde belirtildi.

6. İSTATİSTİK ANALİZLER

İstatistik hesapları Windows programı için uygun olan SPSS 11.5 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) ile yapıldı. Bulgular ortalama \pm standart ortalama hatası olarak belirtildi (SEM). Gruplar arası parametrelerin değerlendirilmesinde Kruskal-Wallis testi (Post-hoc test olarak Mann-Whitney U testi), gruplar içinde ise lezyon volümlerinin, histopatolojik bulguların ve biyokimyasal parametrelerin değerlendirilmesinde Friedman's testi (Post-hoc test olarak Wilcoxon's test) kullanıldı. $p \leq 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

V. SONUÇLAR

Tüm çalışma süresi boyunca ratlar, YÜDETAM'da veteriner hekim ve teknisyeni tarafından kontrol altındaydı. Günlük bakımları teknisyen tarafından yapılırken haftada iki gün uygulanan depo östrojen enjeksiyonu (subkutan) ve sadece tedavi gruplarına (grup 1 ve 2) ondört gün süreyle uygulanan melatonin enjeksiyonları (intramusküler ve intraperitoneal) veteriner hekim tarafından yapıldı.

Takip sırasında insizyonel alanda ya da ilaç enjeksiyon yerlerinde enfeksiyon görülmedi. Toplam 37 adet ratın 4 tanesi (3'ü yetersiz endometriyal odak oluşumu, 1 tanesi ise endometriyal implant yerinde intraperitoneal abse oluşumu nedeniyle) çeşitli sebeplerden ötürü dekapitasyon yöntemi ile çalışma dışı bırakıldı. Tedavi sırasında ratlarda toksik ilaç etkisi görülmedi.

Toplam otuzyediy adet rata, yüz kırksekiz adet uterin doku implante edildi. İmplantların sadece üç tanesinde (bir ratta) abse oluşumu izlendi (%2,02). Sadece on implantta endometriyal odak oluşturulamadı (%6,75). Toplam yüzotuzbeş adet endometriyal odak oluşumu gerçekleştirildi (%91,2). Bunların yüzotuziki tanesi 4/4 lezyon olarak otuzüç adet ratta oluşturuldu (%89,1). Endometriyal odak oluşumunun kontrolü için yapılan ikinci operasyonda periton vaskülaritesinin genel olarak arttığı görüldü. Endometriyal odakların bazı lezyonlarda kistik, içi berrak ya da koyu kahverenkli sıvı ile dolu olduğu görülürken bazılarında ise yüzeyden kabarık hiperpigmente lezyonlar şeklinde olduğu tesbit edildi.

Bu çalışmanın süresi her rat grubu için 6 hafta olmak üzere planlandı. Toplam oniki hafta süren operasyon döneminde sırasıyla 10 mg/kg/gün melatonin grubu, 20 mg/kg/gün melatonin grubu ve kontrol grubu ratları belirlendi. Her grup 6 haftalık tedavileri bitene kadar haftada iki gün yüksek doz eksojen östrojen desteği aldı. Tedavi gruplarında melatonin tedavisi kesildikten sonraki dönemde standart östrojen tedavisinin devam etmesi sebebiyle kontrol grubuna göre melatonin alan gruplarda rekürrens durumu değerlendirilebildi. Operasyonlarda alınan biyopsiler formaldehit solusyonunda bekletildi ve çalışma sonunda iki haftalık bir süreçte kaset takibine alınarak histopatolojik açıdan değerlendirilmeleri yapıldı. Batın yıkantı sıvıları biyopsilere benzer şekilde her operasyonda alınarak -80° C'de ependorflarda saklandı ve çalışma sonunda 2 haftalık bir süreç içerisinde biyokimya laboratuvarı tarafından çalışıldı.

1. GRUPLAR ARASI KARŞILAŞTIRMA

Endometriyozis indüksiyonu sonrası yapılan ilk operasyonda (ikinci operasyon) lezyonların volümleri açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p=0.54$) (Tablo 4). Gruplara göre lezyonlar (volüm A) sırasıyla (Grup 1,2,3; 10 mg/kg/gün melatonin, 20 mg/kg/gün melatonin, kontrol grubu); 98.8 ± 17.2 (SEM), 108.2 ± 17.5 (SEM), 124.5 ± 14.8 (SEM) olarak ölçüldü.

Aynı operasyonda elde edilen biyopsilerin histopatolojik olarak değerlendirilmesiyle oluşturulan skorlamada (histoloji A) gruplar arasında anlamlı bir fark izlenmedi ($p=0.26$) (Tablo 4). Histopatolojik skorlar gruplara göre sırasıyla (Grup 1,2,3); 2.2 ± 0.2 (SEM), 1.7 ± 0.1 (SEM) ve 2.2 ± 0.2 (SEM) olarak izlendi.

Biyokimyasal olarak incelenen SOD, VEGF ve MDA açısından (SOD1, VEGF1, MDA1) gruplar arasında anlamlı bir fark izlenmedi ($p=0.48$, $p=0.13$, $p=0.12$) (Tablo 4).

SOD aktivitesi (U/ml) ortalama olarak sırasıyla (Grup 1,2,3); 0.07 ± 0.005 (SEM), 0.06 ± 0.007 (SEM) ve 0.07 ± 0.009 (SEM) olarak ölçüldü (Tablo 4).

VEGF düzeyi (pg/ml) sırasıyla (Grup 1,2,3); 85.2 ± 3.4 (SEM), 85.7 ± 2.2 (SEM) ve 79.5 ± 1.4 (SEM) olarak ölçüldü (Tablo 4).

MDA düzeyleri ise (pmol/ml) sırasıyla (Grup 1,2,3); 587.3 ± 101.5 (SEM), 730.9 ± 105.6 (SEM) ve 453.8 ± 76.9 (SEM) olarak ölçüldü (Tablo 4).

Tablo 4.	10 mg Grubu Grup 1		20 mg Grubu Grup 2		Kontrol Grubu Grup 3		P
	Ort	± SEM	Ort	± SEM	Ort	± SEM	
1.Biyopsi							
Volum A	98.8	17.2	108.2	17.5	124.5	14.8	0.54
Histoloji.. A	2.2	0.2	1.7	0.1	2.2	0.2	0.26
SOD 1	0.07	0.005	0.06	0.007	0.07	0.009	0.48
VEGF 1	85.2	3.4	85.7	2.2	79.5	1.4	0.13
MDA 1	587.3	101.5	730.9	105.6	453.8	76.9	0.12

Tablo 4 İkinci operasyon (birinci biyopsi) sonrası parametrelerin gruplar arası karşılaştırılması

İstatistik analizinde Kruskal-Wallis testi ve posthoc test olarak Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. $P < 0.05$ = anlamlı kabul edilmiştir. 2. Operasyonda gruplar arasında volüm, histopatoloji ya da biyokimyasal değerler açısından anlamlı bir fark izlenmemiştir ($p > 0.05$).

İndüksiyon sonrası yapılan ikinci biyopside (üçüncü operasyon) gruplar arasında lezyon volümleri ve MDA sonuçları açısından anlamlı bir fark elde edilirken histopatolojik skor, SOD ve VEGF açısından anlamlı bir fark elde edilememiştir (Tablo 5).

Gruplara göre lezyonlar (volüm B) sırasıyla (Grup 1,2,3); 54.1 ± 15.6 (SEM), 25.8 ± 3.6 (SEM), 122.4 ± 23.1 (SEM) olarak ölçüldü. Lezyon volümleri açısından gruplar değerlendirildiğinde 4.hafta biyopsilerinde 2.hafta biyopsilerine göre grup 1 (10 mg/kg/gün melatonin) ve 2 de (20 mg/kg/gün melatonin) kontrol grubuna göre anlamlı olarak lezyon boyutlarında azalma olduğu görüldü ($p = 0.001$).

Aynı operasyonda elde edilen biyopsilerin histopatolojik olarak değerlendirilmesiyle oluşturulan skorlamada (histoloji B) gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi ($p=0.72$) (Tablo 5). Histopatolojik skorlar gruplara göre sırasıyla (Grup 1,2,3); 2.6 ± 0.2 (SEM), 2.2 ± 0.2 (SEM) ve 2.4 ± 0.3 (SEM) olarak izlendi.

Biyokimyasal olarak incelenen SOD ve VEGF açısından (SOD2, VEGF2) gruplar arasında anlamlı bir fark izlenmezken ($p=0.99$, $p=0.7$); MDA açısından (MDA2) gruplar irdelendiğinde kontrol grubu ile 10 mg/kg/gün melatonin tedavisi uygulanan birinci grup arasında anlamlı bir fark olduğu, MDA 2 seviyelerinin kontrol grubunda Grup 1'e göre anlamlı olarak ($p=0.004$) düşük olduğu görüldü (Tablo 5).

SOD aktivitesi (U/ml) ortalama olarak sırasıyla (Grup 1,2,3); 0.08 ± 0.007 (SEM), 0.08 ± 0.011 (SEM), 0.08 ± 0.008 (SEM) ve VEGF düzeyi (pg/ml) 86.4 ± 3.3 (SEM), 86.0 ± 3.3 (SEM), 83.5 ± 1.2 (SEM) olarak ölçülürken MDA düzeyleri (pmol/ml) 928.9 ± 98 (SEM), 589.3 ± 103.7 (SEM), 381.3 ± 111.5 (SEM) olarak elde edildi.

Tablo 5.	10 mg Grubu Grup 1		20 mg Grubu Grup 2		Kontrol Grubu Grup 3		P
	Ort	± SEM	Ort	± SEM	Ort	± SEM	
2.Biyopsi							
Volum B	54.1	15.6	25.8	3.6	122.4	23.1	0.001
Histoloji B	2.6	0.2	2.2	0.2	2.4	0.3	0.72
SOD 2	0.08	0.007	0.08	0.011	0.08	0.008	0.99
VEGF 2	86.4	3.3	86.0	3.3	83.5	1.2	0.7
MDA 2	928.9	98	589.3	103.7	381.3	111.5	0.004

Tablo 5 Üçüncü operasyon (ikinci biyopsi) parametrelerinin gruplar arası karşılaştırılması

İstatistik analizinde Kruskal-Wallis testi ve posthoc test olarak Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. $P < 0.05$ = anlamlı kabul edilmiştir. Volüm B değerleri Grup 1 ve 2' de kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır ($p = 0.001$). MDA 2 değeri ise grup 1' de kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmış bulunmuştur ($p = 0.004$).

Nekropsi (üçüncü biyopsi) sırasında elde edilen sonuçlar incelendiğinde lezyon volümleri ve MDA seviyeleri açısından gruplar arasında anlamlı bir fark elde edilirken ($p=0.001$, $p=0.03$); histopatoloji skorları, SOD ve VEGF düzeyleri açısından anlamlı bir fark elde edilememiştir ($p=0.9$, $p=0.18$, $p=0.68$) (Tablo6). Lezyon volümleri kontrol grubuna göre tedavi gruplarında (Grup 1 ve 2) anlamlı olarak azalma göstermiştir ($p=0.001$). MDA düzeyleri ise kontrol grubunda Grup 1'e (10 mg/kg/gün melatonin) göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p=0.03$).

Gruplara göre lezyonlar (volüm C) sırasıyla (Grup 1,2,3); 42.8 ± 10.5 (SEM), 32.7 ± 6 (SEM), 109.2 ± 12.8 (SEM) olarak; histopatolojik skorlar (histoloji C) ise 2.6 ± 0.1 (SEM), 2.7 ± 0.2 (SEM) ve 2.6 ± 0.2 (SEM) olarak ölçüldü (Tablo 6).

SOD aktivitesi (U/ml) (SOD3) ortalama olarak sırasıyla; 0.04 ± 0.003 (SEM), 0.05 ± 0.005 (SEM) ve 0.05 ± 0.003 (SEM) olarak ölçüldü (Tablo 6).

VEGF düzeyi (pg/ml) (VEGF3) sırasıyla; 85.7 ± 3 (SEM), 84 ± 2.4 (SEM) ve 82.4 ± 2.4 (SEM) olarak ölçüldü (Tablo 6).

MDA düzeyleri (MDA3), (pmol/ml) sırasıyla; 869.6 ± 79.1 (SEM), 837.8 ± 82.2 (SEM) ve 573.5 ± 88.2 (SEM) olarak ölçüldü (Tablo 6).

Tablo 6.	10 mg Grubu Grup 1		20 mg Grubu Grup 2		Kontrol Grubu Grup 3		P
	Ort	± SEM	Ort	± SEM	Ort	± SEM	
3.Biyopsi							
Volum C	42.8	10.5	32.7	6.0	109.2	12.8	0.001
Histoloji C	2.6	0.1	2.7	0.2	2.6	0.2	0.9
SOD 3	0.04	0.003	0.05	0.005	0.05	0.003	0.18
VEGF 3	85.7	3	84	2.4	82.4	2.4	0.68
MDA 3	869.6	79.1	837.8	82.2	573.5	88.2	0.03

Tablo 6 Nekropside elde edilen parametrelerin gruplar arasında karşılaştırılması

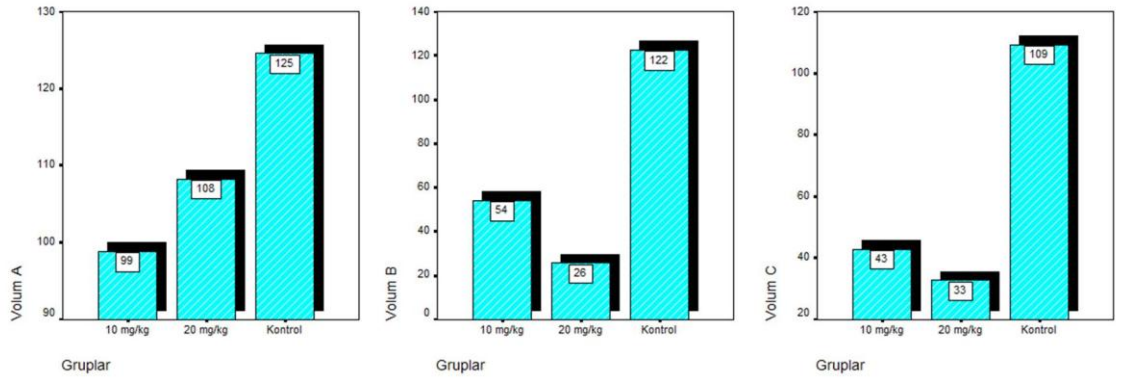
İstatistiki analizde Kruskal-Wallis testi ve posthoc test olarak Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. $P < 0.05$ = anlamlı kabul edilmiştir. Volüm C değerleri Grup 1 ve 2' de kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır. MDA 3 değeri ise grup 1'de kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmış bulunmuştur.

İndüksiyon sonrası operasyonlarda elde edilen tüm veriler Tablo 7'de özetlenmiştir. Grafik 3-7'de ise gruplar arası parametrelerin ortalama değerlerinin karşılaştırılması yapılmıştır.

Tablo 7.	10 mg Grubu Grup 1		20 mg Grubu Grup 2		Kontrol Grubu Grup 3		P
	Ort	± SEM	Ort	± SEM	Ort	± SEM	
1.Biyopsi							
Volum A	98.8	17.2	108.2	17.5	124.5	14.8	0.54
Histoloji A	2.2	0.2	1.7	0.1	2.2	0.2	0.26
SOD 1	0.07	0.005	0.06	0.007	0.07	0.009	0.48
VEGF 1	85.2	3.4	85.7	2.2	79.5	1.4	0.13
MDA 1	587.3	101.5	730.9	105.6	453.8	76.9	0.12
2.Biyopsi							
Volum B	54.1	15.6	25.8	3.6	122.4	23.1	0.001
Histoloji B	2.6	0.2	2.2	0.2	2.4	0.3	0.72
SOD 2	0.08	0.007	0.08	0.011	0.08	0.008	0.99
VEGF 2	86.4	3.3	86.0	3.3	83.5	1.2	0.7
MDA 2	928.9	98	589.3	103.7	381.3	111.5	0.004
3.Biyopsi							
Volum C	42.8	10.5	32.7	6.0	109.2	12.8	0.001
Histoloji C	2.6	0.1	2.7	0.2	2.6	0.2	0.9
SOD 3	0.04	0.003	0.05	0.005	0.05	0.003	0.18
VEGF 3	85.7	3	84	2.4	82.4	2.4	0.68
MDA 3	869.6	79.1	837.8	82.2	573.5	88.2	0.03

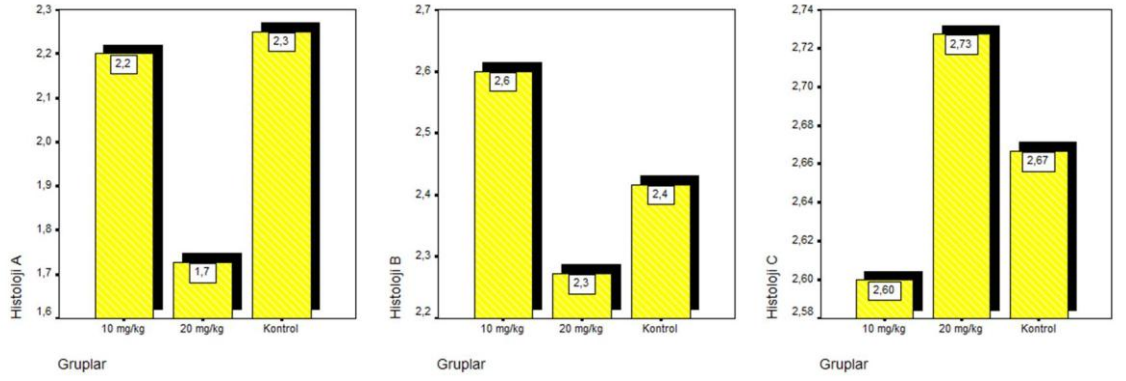
Tablo 7 Gruplar arası karşılaştırma özet sonuçlar

İstatistiksel analizde Kruskal-Wallis testi ve posthoc test olarak Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. P<0.05=anlamli kabul edilmiştir.



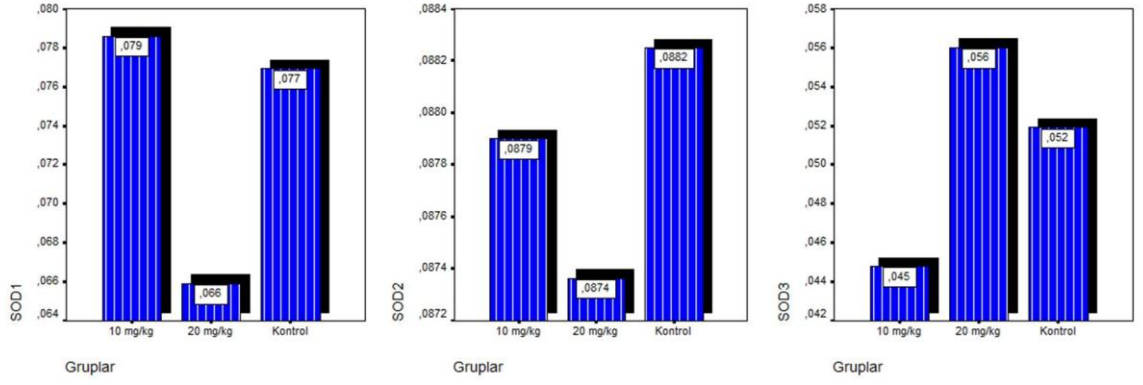
Grafik 3 Gruplar arası ortalama volüm değerlerinin karşılaştırılması

Ortalama volüm değerleri sütunlar üzerindeki kutucuklarda gösterilmektedir. Grup 1 ve 2'de kontrol grubuna göre ortalama Volüm B ve C değerleri anlamlı olarak azalmıştır



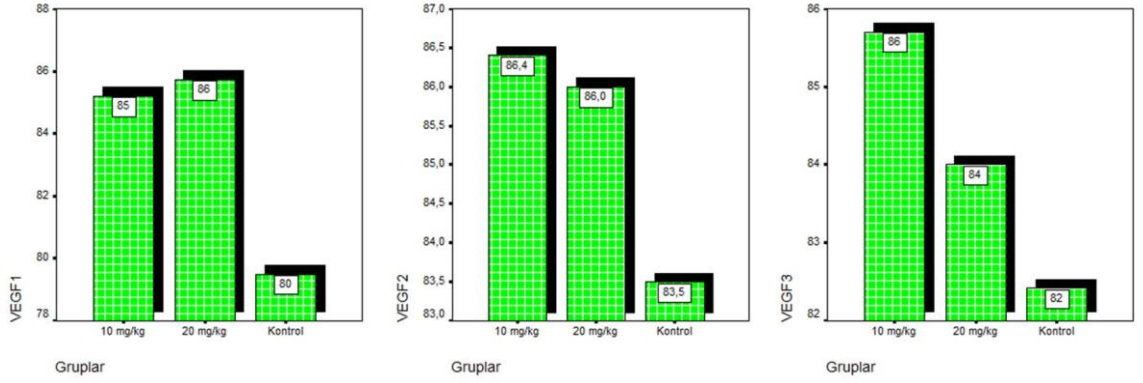
Grafik 4 Gruplar arası ortalama histopatoloji skorlarının karşılaştırılması

Ortalama histopatolojik skor değerleri sütunlar üzerindeki kutucuklarda gösterilmektedir. Gruplar arasında anlamlı bir fark izlenmemiştir.



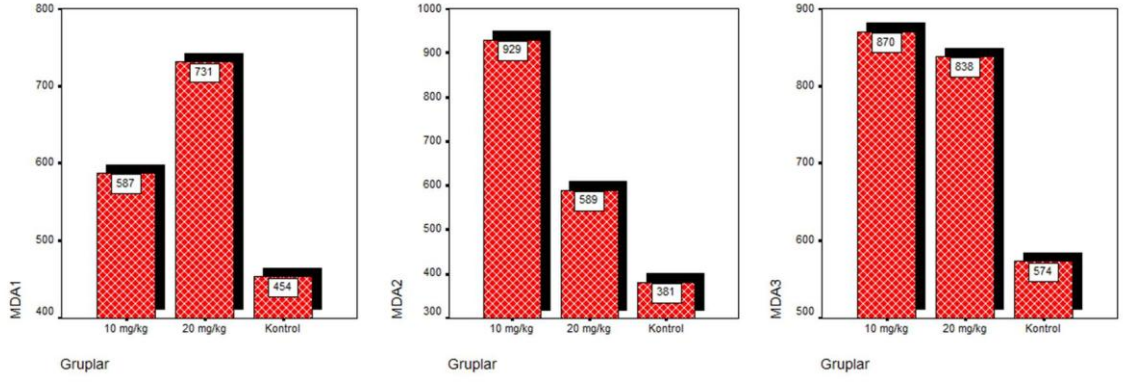
Grafik 5 Gruplar arası ortalama SOD seviyelerinin karşılaştırılması

Ortalama SOD değerleri sütunlar üzerindeki kutucuklarda gösterilmektedir. Gruplar arasında anlamlı bir fark izlenmemiştir.



Grafik 6 Gruplar arası ortalama VEGF seviyelerinin karşılaştırılması

Ortalama VEGF değerleri sütunlar üzerindeki kutucuklarda gösterilmektedir. Gruplar arasında anlamlı bir fark izlenmemiştir.



Grafik 7 Gruplar arası ortalama MDA seviyelerinin karşılaştırılması

Ortalama MDA değerleri sütunlar üzerindeki kutucuklarda gösterilmektedir. Grup 1’de ortalama MDA2 ve MDA3 seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksektir

2. GRUPLARIN KENDİ İÇİNDE KARŞILAŞTIRILMASI

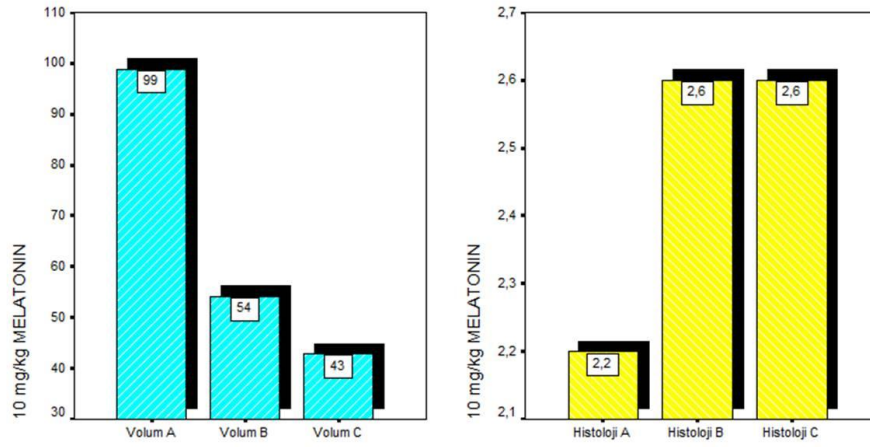
2.1. Birinci Grup (10 mg/kg/gün melatonin grubu)

Birinci grupta ilk biyopside (ikinci operasyon) lezyon volümü milimetrik olarak 98.8 ± 17.2 (SEM), ikinci biyopside (üçüncü operasyon) 54.1 ± 15.6 (SEM), üçüncü biyopside (dördüncü operasyon/nekropsisi) 42.8 ± 10.5 (SEM) olarak ölçüldü (Tablo 8).

Grup içinde volümler karşılaştırıldığında volüm ölçümlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptandı ($p = 0.001$) (Tablo 8, Grafik 8). Birinci biyopsiye göre (volüm A) melatonin tedavisi sonrası alınan ikinci biyopside (volüm B) endometriyotik odakların volümü anlamlı olarak küçülmüş ($p=0.02$) bulundu.

Birinci biyopsi ile (volüm A), melatonin tedavisi kesildikten iki hafta sonra yapılan üçüncü biyopside (volüm C) de benzer şekilde lezyonların volümünün anlamlı olarak ($p=0.005$) küçüldüğü izlendi (Tablo 8). Nekropside alınan lezyonda (volüm C) ise, ikinci biyopside (volüm B) elde edilen lezyonlara göre istatistiksel olarak anlamlı sayılmayan bir küçülme izlendi (Tablo 8).

Birinci biyopside lezyonların ortalama histopatoloji skoru (histoloji A) 2.2 ± 0.2 (SEM), ikinci biyopside (histoloji B) 2.6 ± 0.2 (SEM), üçüncü biyopside (histoloji C) 2.6 ± 0.1 (SEM) olarak ölçüldü. Histopatolojik skorlamada Grup 1'in biyopsileri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilemedi ($p=0.65$) (Tablo 8).



Grafik 8 Grup 1'in ortalama volüm ve histopatoloji parametrelerinin karşılaştırılması

Ortalama volüm ve histopatoloji skorları sütunlar üzerindeki kutucuklarda gösterilmektedir. Volüm A>Volüm B>Volüm C. Volüm B'de Volüm A'ya göre anlamlı sayılacak düzeyde küçülme, Volüm C'de Volüm A'ya göre anlamlı sayılacak düzeyde küçülme, Volüm C'de Volüm B'ye göre anlamlı sayılmayacak düzeyde küçülme olduğu gözlenmektedir. Histopatolojik açıdan A,B ve C değerleri arasında anlamlı sayılabilecek bir fark izlenmemiştir.

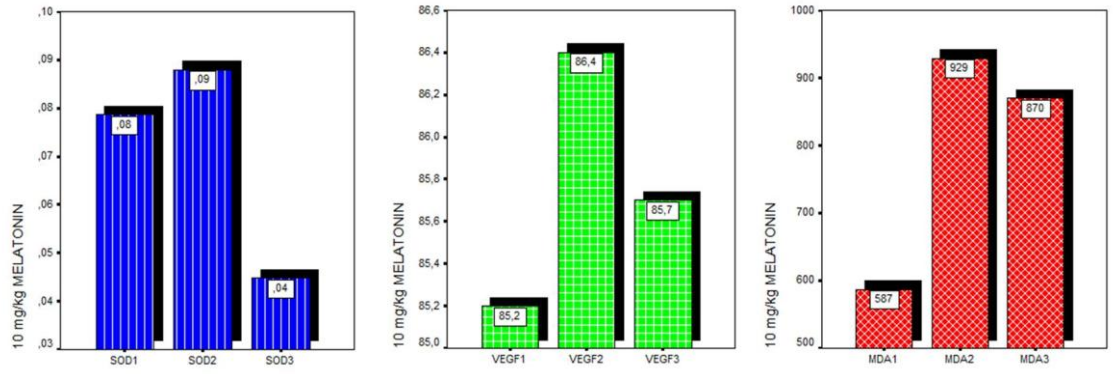
İndüksiyon sonrası operasyonlarda elde edilen batın yıkantı sıvılarındaki SOD (SOD1-2-3) aktiviteleri sırasıyla; 0.07 ± 0.005 (SEM), 0.08 ± 0.007 (SEM) ve 0.04 ± 0.003 (SEM) olarak ölçüldü. Grup içi SOD aktiviteleri kıyaslandığında SOD 1, 2 ve 3 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edildi ($p= 0.001$) (Tablo 8, Grafik 9). Nekropsi sırasında (melatonin tedavisi kesildikten 2 hafta sonraki operasyon) elde edilen batın yıkantı sıvısında SOD3 düzeyi ikinci biyopside (melatonin tedavisi bittikten sonraki operasyon) elde edilen batın yıkantı sıvısındaki SOD2 düzeyine göre istatistiksel olarak anlamlı sayılacak düzeyde azalma göstermekteydi ($p=0.005$). Benzer şekilde SOD3 düzeyi birinci biyopside (melatonin tedavisi başlamadan önceki operasyon) elde edilen batın yıkantı sıvısındaki SOD1 düzeyine göre istatistiksel olarak anlamlı sayılacak düzeyde azalma göstermekteydi ($p= 0.005$).

Grup içi karşılaştırmada VEGF ve MDA düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilemedi (Tablo 8, Grafik 9).

Tablo 8 Grup 1		Birinci operasyon		İkinci operasyon		Üçüncü operasyon		P
		Birinci biyopsi		İkinci biyopsi		Nekropsi		
		Ort	± SEM	Ort	± SEM	Ort	± SEM	
10 mg Grubu	Volum	98.8	17.2	54.1	15.6	42.8	10.5	0.001
	Histoloji	2.2	0.2	2,6	0.2	2.6	0.1	0.65
	SOD	0.07	0.005	0.08	0.007	0.04	0.003	0.001
	VEGF	85.2	3.4	86.4	3.3	85.7	3	0.71
	MDA	587.3	101.5	928.9	98	869.6	79.1	0.27

Tablo 8 Grup 1'e ait parametrelerin karşılaştırılması

İstatistiksel hesaplamada Friedman's Testi ve posthoc test olarak ise Wilcoxon's testi kullanılmıştır. $p < 0.05$ = anlamlı kabul edilmiştir. Volüm A'ya göre Volüm B ve C'de anlamlı derecede küçülme, SOD3'de SOD1 ve SOD2'ye göre anlamlı derecede azalma olduğu gözlenmektedir.



Grafik 9 Grup 1'e ait SOD, VEGF ve MDA parametrelerinin karşılaştırılması

Ortalama SOD, VEGF ve MDA değerleri sütunlar üzerindeki kutucuklarda gösterilmektedir. VEGF ve MDA açısından operasyonlar arasında anlamlı bir fark izlenmemektedirken SOD3'de SOD1 ve SOD2'ye göre anlamlı derecede azalma olduğu saptanmıştır.

2.2. İkinci Grup (20 mg/kg/gün melatonin grubu)

İkinci grupta birinci biyopside (ikinci operasyon) ortalama lezyon volümü milimetrik olarak 108 ± 17.5 (SEM), ikinci biyopside (üçüncü operasyon) 25.8 ± 3.6 (SEM), üçüncü biyopside (dördüncü operasyon/nekropsisi) ise 32.7 ± 6 (SEM) olarak ölçüldü (Tablo 9, Grafik 10).

Grup içinde volümler karşılaştırıldığında volüm ölçümlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptandı ($p=0.001$) (Tablo 9, Grafik 10).

Birinci biyopsiye göre (volüm A) melatonin tedavisi sonrası alınan ikinci biyopside (volüm B) endometriyotik odakların volümü anlamlı olarak küçülmüş ($p=0.003$) bulundu. Birinci biyopsi ile (volüm A), melatonin tedavisi kesildikten iki hafta sonra yapılan üçüncü biyopside (volüm C) de benzer şekilde lezyonların volümünün anlamlı olarak ($p=0.003$) küçüldüğü izlendi (Tablo 9). Nekropside alınan lezyonda (volüm C) ise ikinci biyopsiye (volüm B) göre istatistiksel olarak anlamlı sayılmayan bir artış izlendi (Tablo 9, Grafik 10)

Birinci biyopside (ikinci operasyon) lezyonların ortalama histopatoloji skoru 1.7 ± 0.1 (SEM), ikinci biyopside (üçüncü operasyon) 2.2 ± 0.2 (SEM), üçüncü biyopside (dördüncü operasyon/nekropsisi) 2.7 ± 0.2 (SEM) olarak ölçüldü. Grup içinde histopatolojik skorlamada istatistiksel olarak anlamlı sayılan bir artış izlendi ($p=0.009$) (Tablo 9, Grafik 10).

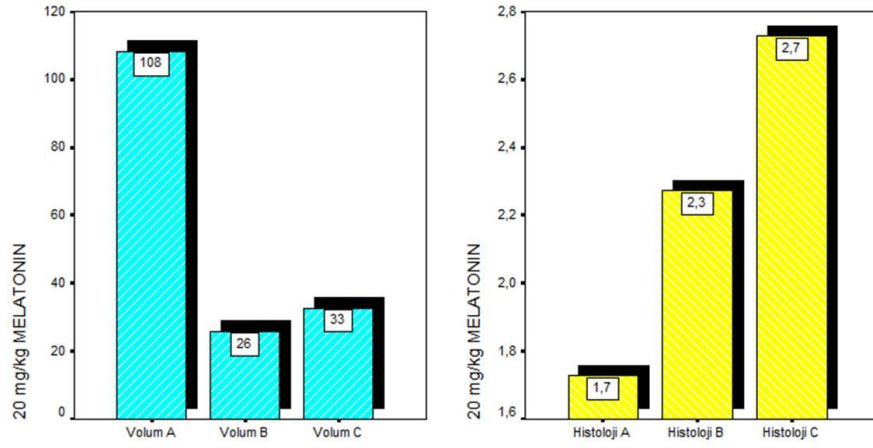
Birinci biyopsi ile (histoloji A), melatonin tedavisi kesildikten iki hafta sonra yapılan üçüncü biyopsi (histoloji C) karşılaştırıldığında lezyonların histopatolojik

değerlendirmelerinde anlamlı olarak ($p=0.02$) artış olduğu izlendi (Tablo 9, Grafik 10).

Tablo 9. Grup 2		Birinci operasyon		İkinci operasyon		Üçüncü operasyon		P
		Birinci biyopsi		İkinci biyopsi		Nekropsi		
		Ort	± SEM	Ort	± SEM	Ort	± SEM	
20 mg Grubu	Volum	108.2	17.5	25.8	3.6	32.7	6	0.001
	Histoloji	1.7	0.1	2.2	0.2	2.7	0.2	0.009
	SOD	0.06	0.007	0.08	0.01	0.05	0.005	0.40
	VEGF	85.7	2.2	86	3.3	84	2.4	0.91
	MDA	730.9	105.6	589.3	103.7	837.8	82.2	0.14

Tablo 9 Grup 2'ye ait parametrelerin karşılaştırılması

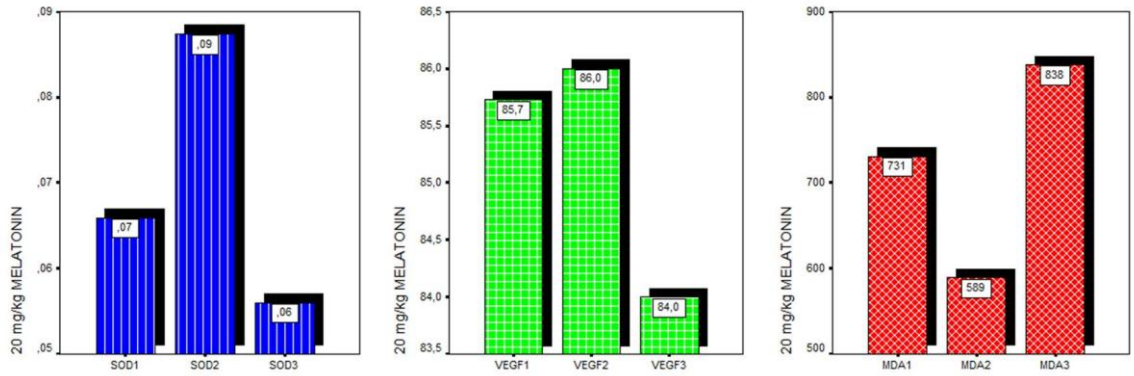
İstatistiksel hesaplamada Friedman's Testi ve posthoc test olarak ise Wilcoxon's testi kullanılmıştır. $p<0.05$ =anlamlı kabul edilmiştir. Volüm A>Volüm C>Volüm B. Volüm B ve C'de Volüm A'ya göre istatistiksel olarak anlamlı sayılan bir küçülme olduğu saptanmıştır. Histopatolojik skorlamada ise Histoloji C skorunun Histoloji A skoruna göre anlamlı derecede artmış olduğu saptanmıştır.



Grafik 10 Grup 2'nin ortalama volüm ve histopatoloji parametrelerinin karşılaştırılması

Ortalama volüm ve histopatoloji skorları sütunlar üzerindeki kutucuklarda gösterilmektedir. Volüm B ve C'de Volüm A'ya göre anlamlı sayılacak derecede küçülme olduğu, Histoloji C skorunda ise Histoloji A skoruna göre anlamlı derecede artış olduğu görülmektedir.

Grup içi karşılaştırmada batın yıkantı sıvılarının biyokimyasal analizinde SOD, VEGF ve MDA düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilemedi (Tablo 9, Grafik 11).



Grafik 11 Grup 2'nin ortalama SOD, VEGF ve MDA parametrelerinin karşılaştırılması

Ortalama SOD, VEGF ve MDA değerleri sütunlar üzerindeki kutucuklarda gösterilmektedir. Grup içerisinde parametreler arasında anlamlı bir fark izlenmemiştir.

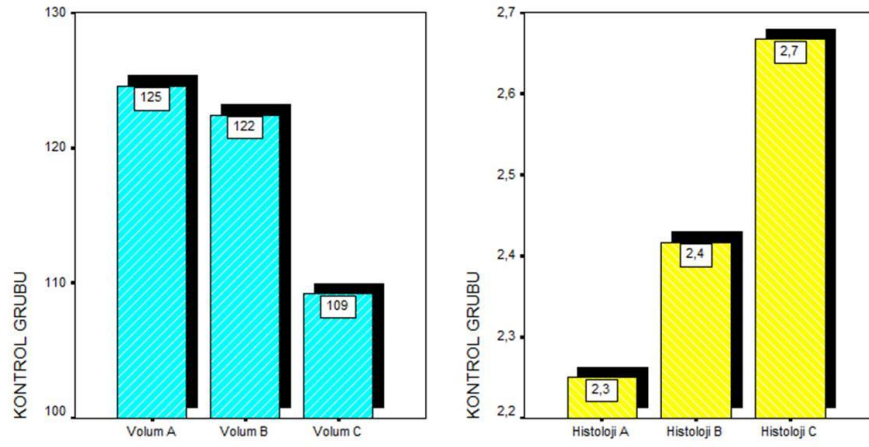
2.3. Üçüncü Grup (Kontrol Grubu)

Kontrol grubunun operasyonları arasında lezyon volümü ve histopatolojik skorlar açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Tablo 10, Grafik 12).

Tablo 10. Kontrol Grubu		Birinci operasyon		İkinci operasyon		Üçüncü operasyon		P
		Birinci biyopsi		İkinci Biyopsi		Nekropsi		
		Ort	± SEM	Ort	± SEM	Ort	± SEM	
Kontrol Grubu	Volum	124.5	14.8	122.4	23.1	109.2	12.8	0.20
	Histoloji	2.2	0.2	2.4	0.3	2.6	0.2	0.14
	SOD	0.07	0.009	0.08	0.008	0.05	0.003	0.02
	VEGF	79.5	1.4	83.5	1.2	82.4	2.4	0.20
	MDA	453.8	76.9	381.3	111.5	573.5	88.2	0.02

Tablo 10 Grup 3'e ait parametrelerin karşılaştırılması

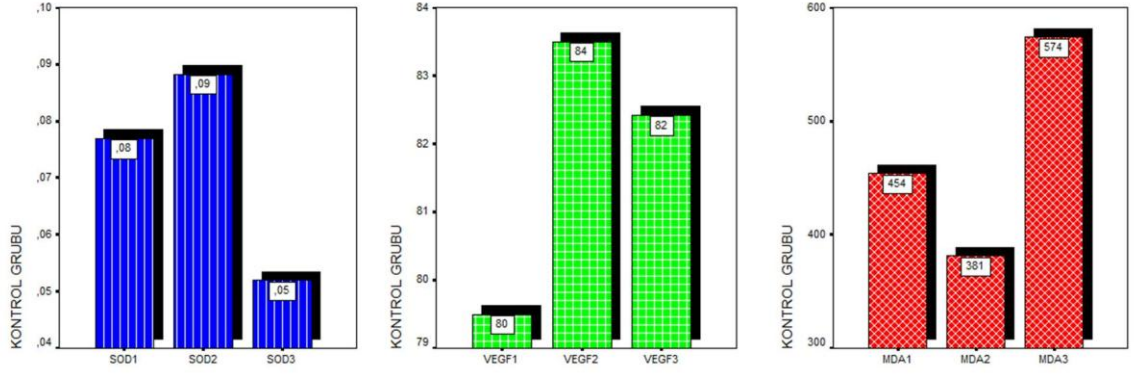
İstatistiksel hesaplamada Friedman's Testi ve posthoc test olarak ise Wilcoxon's testi kullanılmıştır. $P < 0.05$ = anlamlı kabul edilmiştir. SOD3 değerlerinde SOD2'ye göre anlamlı derecede azalma olduğu, MDA3 düzeylerinde ise MDA2'ye göre anlamlı derecede artış olduğu saptanmıştır. Volüm, histopatolojik skor ve VEGF açısından ise grup içinde anlamlı bir fark izlenmemektedir.



Grafik 12 Kontrol Grubunun ortalama volüm ve histopatoloji parametrelerinin karşılaştırılması

Ortalama volüm ve histoloji skorları sütunlar üzerindeki kutucuklarda gösterilmektedir. Grup içerisinde parametreler arasında anlamlı bir fark izlenmemiştir.

Biyokimyasal analizlerden VEGF düzeylerinde batın yıkantı sıvılarından elde edilen örneklerde istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmezken, SOD ve MDA değerlerinde istatistiksel anlamlı olarak fark izlenmiştir ($p=0.02$). SOD ve MDA ölçümleri incelendiğinde birinci operasyon ile (SOD1-MDA1) ikinci operasyon (SOD2-MDA2) arasında ya da birinci operasyon ile üçüncü operasyon (SOD3-MDA3) sırasında elde edilen batın yıkantı sıvılarında SOD ve MDA açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmezken, ikinci operasyonda (SOD2-MDA2) elde edilen batın yıkantı sıvılarıyla üçüncü operasyonda (SOD3-MDA3) elde edilen batın yıkantı sıvıları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmiştir ($p=0.02$) (Tablo 10). SOD3'te SOD2'ye göre anlamlı olarak azalma izlenirken ($p=0.004$), MDA3'te MDA2'ye göre anlamlı olarak artış olduğu görülmüştür ($p=0.004$) (Tablo 10, Grafik 13).



Grafik 13 Kontrol Grubunun ortalama SOD, VEGF ve MDA parametrelerinin karşılaştırılması

Ortalama SOD, VEGF ve MDA seviyeleri sütunlar üzerindeki kutucuklarda gösterilmektedir. SOD3 değerlerinde SOD2'ye göre anlamlı derecede azalma olduğu, MDA3 düzeylerinde ise MDA2'ye göre anlamlı derecede artış olduğu saptanmıştır.

VEGF açısından ise grup içinde anlamlı bir fark izlenmemektedir.

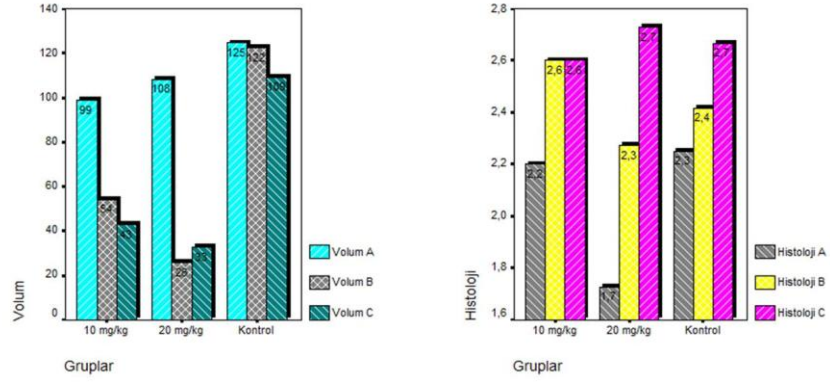
İndüksiyon sonrası operasyonlarda grupların kendi içlerinde tüm parametreler açısından karşılaştırılmaları Tablo 11'de özetlenmiştir.

Grafik 14-15'de ise gruplar arası ve grup içi tüm parametrelerin ortalama değerlerinin karşılaştırılması yapılmıştır.

Tablo 11. Gruplar		Birinci operasyon		İkinci operasyon		Üçüncü operasyon		P
		Ort ± SEM		Ort ± SEM		Ort ± SEM		
10 mg Grubu	Volum	98.8	17.2	54.1	15.6	42.8	10.5	0.001
	Histoloji	2.2	0.2	2,6	0.2	2.6	0.1	0.65
	SOD	0.07	0.005	0.08	0.007	0.04	0.003	0.001
	VEGF	85.2	3.4	86.4	3.3	85.7	3	0.71
	MDA	587.3	101.5	928.9	98	869.6	79.1	0.27
20 mg Grubu	Volum	108.2	17.5	25.8	3.6	32.7	6	0.001
	Histoloji	1.7	0.1	2.2	0.2	2.7	0.2	0.009
	SOD	0.06	0.007	0.08	0.01	0.05	0.005	0.40
	VEGF	85.7	2.2	86	3.3	84	2.4	0.91
	MDA	730.9	105.6	589.3	103.7	837.8	82.2	0.14
Kontrol Grubu	Volum	124.5	14.8	122.4	23.1	109.2	12.8	0.20
	Histoloji	2.2	0.2	2.4	0.3	2.6	0.2	0.14
	SOD	0.07	0.009	0.08	0.008	0.05	0.003	0.02
	VEGF	79.5	1.4	83.5	1.2	82.4	2.4	0.20
	MDA	453.8	76.9	381.3	111.5	573.5	88.2	0.02

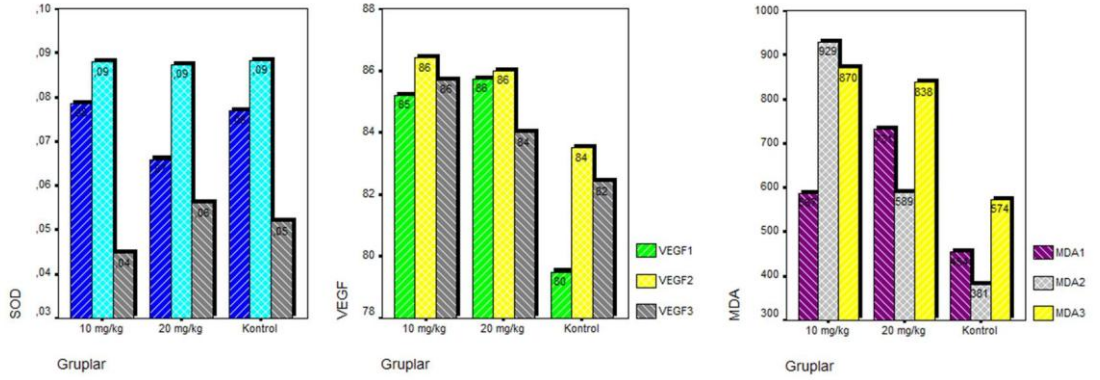
Tablo 11 Grupların kendi içlerinde parametrelerin karşılaştırılması, özet sonuçlar

İstatistiksel hesaplamada Friedman's Testi ve posthoc test olarak ise Wilcoxon's testi kullanılmıştır. P<0.05=anlamli kabul edilmiştir.



Grafik 14 Gruplar arasında ve grupların kendi içlerinde ortalama lezyon volümlerinin ve histopatoloji skorlarının karşılaştırılması

Ortalama değerler sütunlar üzerinde gösterilmiştir.



Grafik 15 Gruplar arasında ve grupların kendi içlerinde ortalama SOD, VEGF ve MDA parametrelerinin karşılaştırılması

Ortalama değerler sütunlar üzerinde gösterilmiştir.

VI. TARTIŞMA

Endometriyozisin medikal tedavi seçeneklerinin son yıllarda oldukça artış göstermesinin yanında kür sağlayıcı etkinliğe sahip bir ajan henüz saptanamamıştır. Kullanılan ilaçlar endometriyotik odak implantasyonunu, invazyonunu, vaskülarizasyonunu ve gelişimini gerek hormonal gerekse de antiinflamatuvar mekanizmalarla engellemektedir.

Bu çalışmada, antioksidan özelliği bulunan melatoninin deneysel olarak rat modelinde oluşturulmuş endometriyotik odaklar üzerine etkisi ve melatoninin tedavisi kesildikten sonra lezyonlardaki rekürrens durumu incelenmiştir.

Çalışmamızda Vernon ve Wilson tarafından geliştirilen rat endometriyozis modeli modifiye edilerek oluşturulan ‘YÜDETAM rat endometriyozis modeli’ kullanılmıştır (24). Rat modelinde eksojen etmenlerin ya da intrinsek kontrol mekanizmalarının endojen östrojen seviyelerinde yaratabileceği değişkenlikleri önleyebilmek ve her ratta istenen östrojen seviyesini stabil tutabilmek amacıyla ratlara ooferektomi yapılmıştır. Yüksek dozda östrojen verilmesi cerrahi endometriyozis implantasyonunu kolaylaştırarak lezyonların daha kısa sürede oluşmasını sağlamıştır. Kontrol grubunun varlığı sayesinde östrojen tedavisi ile oluşturulan endometriyotik odaklara melatoninin etkisi anlaşılabilmiştir. Melatonin dozunun iki grupta farklı olması sayesinde melatoninin doza bağlı etkisinin gösterilmesi hedeflenmiştir. Melatonin tedavisi kesildikten sonra yüksek doz östrojen desteğinin devam ettirilmesiyle melatoninin endometriyozis rekürrens durumuna olan etkisi değerlendirilebilmiştir.

İnsanların ve diğer primatların aksine östrus dönemde bulunan ratlarda endometriyum dökülmesi ve mens kanaması görülmediğinden spontan olarak endometriyozis oluşumu da görülmemektedir. Ancak deneysel modellerde rat endometriyal dokusunun tek başına ya da myometriyum dokusuyla birlikte vaskülarizasyondan zengin olan peritoneal yüzeylere cerrahi olarak transplante edilmesiyle endometriyozis oluşumu sağlanabilmektedir. Cerrahi endometriyozis modeli homolog ya da heterolog model olmak üzere iki şekilde yapılabilmektedir. Homolog modelde bağışıklık sistemi sağlam olan bir ratın endometriyum dokusunun transplantasyonu yine kendi vücudunda ancak ektopik bir alana yapılmaktadır. Heterolog modelde ise immunsuprese olan bir rata insan endometriyal doku parçaları intraperitoneal ya da subkutan yolla implante edilmektedir. Biz çalışmamızda ooferektomize homolog rat endometriyozis modeli oluşturarak endometriyotik lezyonlarda melatoninin etkisini incelemeyi planladık.

İmmunsuprese rat modelinde heterolog insan endometriyal dokusunun implantasyonu ile yapılabilecek gelecekteki çalışmalar endometriyozis hastalığının patofizyolojisinin belki de daha iyi anlaşılabilmesini sağlayabilecektir.

Endometriyozis, kadınlarda östrojen bağımlı olduğu bilinen bir hastalıktır ve östrojen seviyeleri suprese edildiğinde regresyon olduğu bilinmektedir (33-34). Rat modelinde uterin dokunun ototransplantasyonu ile oluşturulan endometriyotik lezyonlar östrojen bağımlılığı göstermektedirler. Uterin dokunun ototransplante edildiği ve endometriyotik lezyon oluşumunun sağlandığı ratlarda yapılan ooferektomi sonrasında östrojen ile tedavi edilen ratlardaki endometriyotik dokunun, ooferektomi sonrası östrojen ve progesteron tedavisi alan ratlarda görülen endometriyotik dokudan daha fazla aktif olduğu bilinmektedir (35).

Bu model sayesinde endometriyotik odakların steroid hormonlarına verdiği yanıt ve steroid hormon aktivitesi üzerine etkisi olduğu bilinen ilaçların etkileri gösterilebilmektedir (24-36-37). Fang ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada fare modelinde östrojen desteğinin endometriyotik lezyonların boyutlarını etkileyen en önemli faktör olduğunu ve progesteronun endometriyotik odaklar üzerindeki antiproliferatif etkisinin doğal progesteron reseptörü üzerinden gerçekleştirdiğini göstermişlerdir (38).

Endometriyozis tedavisinde gonodotropin salgılayıcı hormon analogları ve yüksek doz progesteron tedavisi gibi hormonal aktif ajanlar etkin olmalarına rağmen yan etkileri açısından oldukça riskli sayılmaktadırlar. Bu nedenle son yıllarda endometriyozis tedavisinde hormonal etkisi bulunmayan ilaç kullanımları gündeme gelmiştir. Oksidatif stresin endometriyozis patofizyolojisindeki rolünün gösterilmesiyle antioksidan etkili maddelerin bu amaçla kullanımı sorgulanmaya başlamıştır (39).

Melatoninin antioksidan özelliği sayesinde serbest oksijen radikallerini azaltırken endometriyotik odaklarda hormonal tedaviye benzer derecede kür sağlayabileceği düşünülmüştür. N-asetil-5-metoksi-triptamin olarak da bilinen melatonin endojen bir serbest radikal avcısı olarak bilinmektedir (40). Mekanizması tam olarak netlik kazanmamış olsa da deneyimlere göre melatonin yüksek difüzyon kabiliyetine bağlı hücrelere kolaylıkla girebilmekte, reseptör üzerinden ya da direkt etkiyle antioksidan olarak görev yapmaktadır. Ayrıca melatonin bazı antioksidatif enzimleri aktive edebilmekte ve hücre içerisinde kalmoduline bağlanarak pro-oksidatif enzimleri inhibe edebilmektedir (41).

Melatoninin endometriyozis üzerine etkisini inceleyen daha önceki çalışmalarda, rat endometriyozis modelinde melatonin tedavisi ile endometriyotik odaklarda regresyon ve atrofi oluşumu gösterilmiştir (19).

Yıldırım ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında benzer olarak melatonin tedavisi sonrasında endometriyotik lezyon volümlerinin azaldığını, histopatolojik skorlarda ise istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir düşüş saptadıklarını bildirmişlerdir (20).

Bu çalışmada bütün gruplar ele alındığında endometriyozis cerrahi indüksiyonu sonrasında elde edilen Volüm A yönünden gruplar arasında anlamlı bir fark elde edilmezken 10 mg/kg/gün ve 20 mg/kg/gün dozunda melatonin tedavisi başlanan gruplarda Volüm B ve Volüm C boyutlarında kontrol grubuna göre anlamlı olarak küçülme olduğu gözlemlendi. Bu sonuçların tıpkı Güney ve Yıldırım'ın sonuçları ile benzerlik gösterdiği görülmektedir. Grup 1 ve 2 de kontrol grubuna göre Volüm B ve C değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı sayılan bir küçülme izlenmesine rağmen Grup 2'de Grup 1'e göre Volüm B ve C düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı sayılmayan bir azalma görülmüştür. Bu durum daha yüksek melatonin doz farkının (örn. 10 mg/kg/gün ve 100 mg/kg/gün gibi) denendiği durumlarda melatoninin doz bağımlı olarak volüm üzerindeki etkilerinin daha net olarak gözlenebileceğini düşündürmektedir.

Gruplar tek başlarına değerlendirildiklerinde kontrol grubunda Volüm A'ya göre Volüm B ve C'de; Volüm B'ye göre ise Volüm C'de istatistiksel olarak anlamlı sayılmayan bir azalma olduğu görüldü. Melatonin tedavisi yapılmadığı halde istatistiksel olarak anlamlı sayılmayan volüm boyutlarındaki azalmaların aynı damar trasesi boyunca implantasyon yapılmasına, biyopsiler sırasında hemostaz amaçlı koterizasyon ya da suturasyon işlemine sekonder vasküler akımın azalarak üst seviyedeki implantın beslenmesinin bozulmasına bağlı olabileceği düşünüldü.

On mg/kg/gün dozunda melatonin verilen grup içinde volümler karşılaştırıldığında Volüm A'ya göre Volüm B ve C de istatistiksel olarak anlamlı derecede küçülme, Volüm B'ye göre Volüm C boyutlarında ise istatistiksel olarak anlamlı sayılmayan bir küçülme olduğu saptandı. Bu durum 10 mg/kg/gün melatonin tedavisi kesildikten iki hafta sonra bile östrojen stimülasyonuna rağmen melatoninin atrofi yapıcı etkisinin devam ettiği ve bu nedenle melatoninin lezyon rekürrensini azaltabileceği sonucunu düşündürmektedir.

Yirmi mg/kg/gün dozunda melatonin verilen grup içinde volümler karşılaştırıldığında Volüm A'ya göre Volüm B ve C'de istatistiksel olarak anlamlı sayılabilecek bir küçülme görülürken Volüm B'ye göre Volüm C'de istatistiksel olarak anlamlı sayılmayan bir artış saptanmıştır. Melatonin tedavisi kesildikten 2 hafta sonra yapılan biyopsilerde elde edilen Volüm C değerlerinde Volüm B'ye göre istatistiksel olarak anlamlı sayılmayan bu artış biyopsi için yapılan randomizasyon sırasında ilk haftalarda kistik olmayan lezyonların örneklenmesine bağlı açıklanabilir. Zira deneysel çalışma sırasında sıklıkla kistik lezyonlar üzerinde melatoninin regresyon yapıcı etkisinin minimal düzeyde olabileceği bilgisine varılmıştır. Bu durum yanında 20mg/kg/gün dozunda melatonin tedavisi kesildikten sonra lezyon boyutlarında anlamlı derecede artışın saptanmaması ile melatoninin endometriyozis rekürrensini azaltıldığı sonucuna varılabilir. Daha yüksek dozlardaki (örn. 100 mg/kg/gün gibi) tedavilerde belki de Volüm C düzeylerinde anlamlı sayılabilecek derecede küçülmeler saptanabileceği düşünülebilir.

Histopatolojik skorlar ele alındığında gruplar arasında anlamlı bir fark izlenmezken gruplar kendi içlerinde değerlendirildiklerinde; kontrol grubunda histopatolojik skorlar açısından Histoloji A'ya göre Histoloji B ve C'de, Histoloji B'ye göre ise Histoloji C'de istatistiksel olarak anlamlı sayılmayan bir artış olduğu saptanmıştır.

On mg/kg/gün dozunda melatonin tedavisi uygulanan grupta ise Histoloji A'ya göre Histoloji B ve C'de istatistiksel olarak anlamlı sayılmayan bir artış saptanırken Histoloji C ve Histoloji B skorları arasında anlamlı bir fark izlenmemiştir.

Yirmi mg/kg/gün dozunda melatonin tedavisi uygulanan grupta ise Histoloji B'de Histoloji A'ya göre ya da Histoloji C'de Histoloji B'ye göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış izlenirken Histoloji C skoru Histoloji A skoruna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir. Bu artışın eksojen östrojen desteğine ya da antioksidan mekanizma ile melatonin etkisine bağlanabileceği düşünülmüştür.

SOD aktiviteleri açısından gruplar arasında karşılaştırma yapıldığında SOD 1-2 ve 3 arasında anlamlı bir fark izlenmemiştir.

Gruplar kendi içlerinde kıyaslandığında ise kontrol grubunda SOD 2'de SOD 1'e göre istatistiksel olarak anlamlı sayılmayan bir artış, SOD 3'de SOD 1'e göre istatistiksel olarak anlamlı sayılmayan bir azalma, SOD 3'de SOD 2'ye göre ise istatistiksel olarak anlamlı sayılan bir azalma olduğu görülmüştür. Bu durum uzun sürede östrojenin endometriyotik aktivite üzerindeki etkisine bağlı artmış oksidatif stresin bir bulgusu olarak değerlendirilebilir. Daha uzun süreli östrojen tedavisi ile belki de SOD3 aktivitesindeki azalmanın istatistiksel olarak anlamlı düzeylere ulaşabileceği düşünülebilir.

On mg/kg/gün dozunda melatonin tedavisi alan grupta SOD 2 aktivitesinde SOD 1'e göre istatistiksel olarak anlamlı sayılmayan bir artış saptanmasına rağmen SOD 1 ve SOD2'ye göre SOD 3 aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı sayılan bir azalma saptanmıştır.

Yirmi mg/kg/gün dozunda melatonin tedavisi alan grupta ise SOD 2 aktivitesinde SOD 1'e göre istatistiksel olarak anlamlı sayılmayan bir artış saptanırken SOD 3 aktivitesinde SOD 1 ve 2'ye göre istatistiksel olarak anlamlı sayılmayan bir azalma saptanmıştır.

Melatonin tedavisi altında istatistiksel olarak anlamlı sayılmayan SOD2 aktivitesindeki artışın belki daha uzun süre ve yüksek doz melatonin tedavisi altında istatistiksel olarak anlamlı olup olmayacağını araştırılması ile melatoninin SOD aktivitesi üzerindeki net etkisinin anlaşılması sağlanabilir. Yine melatonin tedavisi kesildikten sonraki SOD3 aktivitesindeki istatistiksel olmayan azalma derecesi benzer koşullarda değerlendirildiğinde farklı sonuçlar elde edilebilir.

MDA açısından gruplar arası karşılaştırma yapıldığında MDA 2 ve MDA 3 düzeylerinde kontrol grubu ile 10 mg/kg/gün melatonin tedavisi uygulanan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı sayılan bir fark olduğu, MDA 2 ve MDA 3 seviyelerinin melatonin tedavisi alan grupta daha fazla olduğu saptanmıştır.

Gruplar kendi içlerinde karşılaştırıldıklarında kontrol grubunda MDA 2 seviyesinde MDA 1 seviyesine göre istatistiksel olarak anlamlı sayılmayan bir azalma, MDA 3 seviyesinde MDA 1 seviyesine göre istatistiksel olarak anlamlı sayılmayan bir artış saptanırken MDA 3 seviyesinde ise MDA 2 seviyesine göre anlamlı sayılabilecek bir artış saptanmıştır. İstatistiksel olarak dördüncü ve üçüncü operasyonlar arasında anlamlı bir fark elde edilmesi bu grupta zamana bağlı olarak MDA atık ürününün biriktiğini düşündürmektedir.

On mg/kg/gün dozunda melatonin uygulanan grup içinde MDA değerleri karşılaştırıldığında MDA 2 seviyesinde MDA 1'e göre istatistiksel olarak anlamlı

sayılmayan bir artış saptanırken MDA 3 seviyesinde MDA 2'ye göre istatistiksel olarak anlamlı sayılmayan bir azalma, MDA 3 seviyesinde MDA 1'e göre yine istatistiksel olarak anlamlı sayılmayan bir artış saptanmıştır. Bu nedenle kontrol grubuyla karşılaştırıldığında elde edilen MDA2 ve MDA3 seviyelerindeki istatistiksel olarak anlamlı sayılan farkın rastlantısal olduğu, 10 mg/kg/gün melatonin tedavisi ile MDA atık miktarında anlamlı bir azalma ya da artış olmadığı görülmektedir.

Yirmi mg/kg/gün dozunda melatonin tedavisi alan grupta ise MDA 2 seviyesinde MDA 1'e göre istatistiksel olarak anlamlı sayılmayan bir azalma saptanırken MDA 3 seviyesinde MDA 2 ve MDA 1'e göre istatistiksel olarak anlamlı sayılmayan bir artış saptanmıştır. Bu nedenle melatoninin MDA üzerine olan etkisinin net olarak değerlendirilebilmesi için daha yüksek tedavi dozlarının denenmesi uygun olabilir.

VEGF yönünden gruplar arası karşılaştırma yapıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

Gruplar kendi içlerinde karşılaştırıldığında ise kontrol grubunda VEGF düzeylerinde VEGF 2 ve VEGF 3'de VEGF 1'e göre istatistiksel olarak anlamlı sayılmayan bir artış saptanırken, VEGF 3'te VEGF 2'ye göre istatistiksel olarak anlamlı sayılmayan bir azalma saptanmıştır.

On mg/kg/gün dozunda melatonin tedavisi uygulanan grupta ise VEGF düzeylerinde VEGF 2 ve VEGF 3'de VEGF 1'e göre istatistiksel olarak anlamlı sayılmayan bir artış saptanırken, VEGF 3'te VEGF 2'ye göre istatistiksel olarak anlamlı sayılmayan bir azalma saptanmıştır.

Yirmi mg/kg/gün dozunda melatonin tedavisi alan grupta ise VEGF 2 düzeylerinde VEGF 1 düzeylerine göre istatistiksel olarak anlamlı sayılmayan bir artış saptanırken, VEGF 3 düzeylerinde VEGF 1 ve 2 seviyelerine göre istatistiksel olarak anlamlı sayılmayan bir azalma saptanmıştır.

Özetlenecek olursa, melatonin tedavisi ile lezyon volümlerinde anlamlı derecede azalma olduğu, histopatolojik skorlarda ise yüksek doz melatonin kullanıldığında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı sayılacak derecede artış olduğu saptanmıştır. Kontrol grubunda ve 10 mg/kg/gün melatonin tedavisi alan grupta SOD3 aktivite düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı sayılan bir azalma saptanırken bu durumun 20 mg/kg/gün melatonin tedavisi alan grupta gözlenmemiş olması yüksek doz melatonin tedavisi ile oksidatif stresin daha etkin bir şekilde azaltılarak rekürrensini daha etkin önenebileceğini akla getirmektedir. Kontrol grubunda MDA3 seviyesinin anlamlı olarak artış göstermesi ve bu durumun melatonin alan diğer gruplarda gözlenmemesi melatoninin antioksidan etkisiyle lipid peroksidasyonunu azalttığını göstermektedir. VEGF yönünden ise gruplar arası ya da gruplar içi anlamlı bir fark izlenmemiştir. Melatoninin endometriyotik lezyonlar üzerindeki etkilerinin (özellikle biyokimyasal parametreler açısından) net olarak değerlendirilebilmesi için bundan sonra yapılacak olan çalışmalarda tedavi dozunun daha yüksek olması (örneğin 10 mg/kg/gün'e karşı 50 mg/kg/gün ya da 100 mg/kg/gün gibi) yol gösterici olabilir.

KAYNAKLAR

1 Irene Tirado-Gonzalez, Gabriela Barrientos, Najda Tariverdian, Petra C. Arck, Mariana G. Garcia, Burghard F. Klapp et al. Endometriosis research: animal models for the study of a complex disease. *Journal of Reproductive Immunology* 2010; 86: 141-147.

2 J.C.R. Silva, A.C.J.S.R. Silva, F.J.C. Reis, S.B. Garcia, M.F.S. Sa, A.A. Nogueira. Development of an experimental model of endometriosis in rabbits. *International Congress Series* 2004; 1271: 248-251.

3 Linda C. Giudice, Lee C. Kao. Endometriosis. *Lancet* 2004; 364: 1789-1799.

4 R. Gazvani, A. Templeton. New considerations for the pathogenesis of endometriosis. *International Journal of Gynecology & Obstetrics* 2002; 76: 117-126.

5 D. Vinatier, G. Orazi, M. Cosson, P. Dufour. Theories of endometriosis. *Europena Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2001; 96: 21-34.

6 Paola Vigano, Fabio Parazzini, Edgardo Somigliana, Paolo Vercellini. Endometriosis: epidemiology and aetiological factors. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynecology* 2004; 18: 177-200.

7 Paolo Vercellini, Edgardo Somigliana, Paola Vigano, Annalisa Abbiati, Raffaella Daguati, Pier Giorgio Crosignani. Endometriosis: current and future medical

therapies. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynecology* 2008; 22: 275-306.

8 Jacques Donnez, Celine Pirard, Mireille Smets, Pascale Jadoul, Jean Squifflet. Surgical management of endometriosis. *Best Practise & Research Clinical Obstetrics and Gynecology* 2004; 18: 329-348.

9 McVeigh, E. The surgical management of endometriosis. *Women's Health Medicine* 2005; 2: 29-33.

10 Rüdiger Hardeland, S.R. Pandi-Perumal, Daniel P. Cardinali. Melatonin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2006; 38: 313-316.

11 Bruno Claustrat, Jocelyne Brun, Guy Chazot. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Medicine Reviews* 2005; 9: 11-24.

12 Daniel P. Cardinali, Paul Pevet. Basic aspects of melatonin action. *Sleep Medicine Reviews* 1998; 2: 175-190

13 M.D. Maldonado, M. Mora-Santos, L. naji, M.P. carrascosa-Salmoral, M.C. naranjo, J.R. Calvo. Evidence of melatonin synthesis and release by mast cells. Possible modulatory role on inflammation. *Pharmacological Research* 2010; 62: 282-287

14 Celina M.C. Lotufo, Cristiane Lopes, Margarita L. Dubocovich, Sandra H.P. Farsky, Regina P. Markus. Melatonin and N-acetylserotonin inhibit leucocyte rolling

and adhesion to rat microcirculation. *European Journal of Pharmacology* 2001; 430: 351-357

15 Mamdouh M. Anvar, Abdel-Raheim M.A. Meki, Hassan H. Abu Rahma. Inhibitory effects of melatonin on vascular reactivity: possible role of vasoactive mediators. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 2001; 130; 357-367.

16 Hiroshi Tamura, Yasuhiko Nakamura, Ahmet Korkmaz, Lucien C. Manchester, Dun-Xian Tan, Norihiro Sugino et al. Melatonin and the ovary: physiological and pathological implications. *Fertility and Sterility* 2009; 92: 328-343

17 Cengiz Ara, Hale Kirimlioglu, Aysun Bay Karabulut, Sacit Coban, Seyma Hascalik, Onder Celik, et al. Protective effects of melatonin against oxidative stress on adhesion formation in the rat cecum and uterine horn model. *Life Science* 2005;.77: 1341-1350

18 Onder Koc, Bülent Gunduz, Ata Topcuoglu, Güler Bugdaycı, Fahri Yilmaz, Bülent Duran. Effects of pinealectomy and melatonin supplementation on endometrial explants in a rat model. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2010; 153: 72-76

19 Mehmet Güney, Baha Oral, Nermin Karahan, Tamer Mungan. Regression of endometrial explants in a rat model of endometriosis treated with melatonin. *Fertility and Sterility* 2008; 89: 934-942

20 Gazi Yildirim, Rukset Attar, Ferda Ozkan, Banu Kumbak, Cem Ficicioglu, Narter Yesildaglar. The effects of letrozole and melatonin on surgically induced endometriosis in a rat model: a preliminary study. *Fertility and Sterility* 2010; 93: 1787-1792

21 Uwe D. Rohr, Jens Herold. Melatonin deficiencies in women. *MATURITAS, The European Menopause Journal* 2002; 41: 85-104

22 Demirbag S, Cetinkursun S, Tasdemir U, Ozturk H, Pekcan M, Yesildaglar N. Comparison of hyaluronate/carboxymethylcellulose membrane and ME for prevention of adhesion formation in a rat model. *Human Reproduction* 2005; 20: 2021-2024

23 Demirbag S, Atabek C, Guven A, Oztas E, Surer I, Ozturk H et al. Effects of pyrolytic carbon on postoperative adhesion formation in rats. *Arch Gynecol Obstet* 2009; 279: 11-15

24 Vernon MW, Wilson EA. Studies on the surgical induction of endometriosis in the rat. *Fertility Sterility* 1985; 44: 684-694

25 Lebovic DI, Kir M, Casey CL. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma induces regression of endometrial explants in a rat model of endometriosis. *Fertility Sterility* 2004; 82: 1008-1013

26 Uygur D, Aytan H, Zergeroglu S, Batioglu S. Leflunomide—an immunomodulator—induces regression of endometrial explants in a rat model of endometriosis. *J Soc Gynecol Investig* 2006; 13: 378-383

27 Keenan JA, Williams-Boyce PK, Massey PJ, Chen TT, Caudleb MR, Bukovsky A. Regression of endometrial explants in a rat model of endometriosis treated with the immune modulators loxoribine and levamisole. *Fertility Sterility* 1999; 72: 135–141

28 Ota H, Igarashi S, Hatazawa J, Tanaka T. Immunohistochemical assessment of superoxide dismutase expression in the endometrium in endometriosis and adenomyosis. *Fertility Sterility* 1999; 72: 129–134

29 Cheryl L. Fattman, Lisa M. Schaefer, Tim D. Oury. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Radical Biology & Medicine* 2003; 35: 236–256

30 Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals, other reactive species and disease. In: Halliwell B, Gutteridge JMC, editors. *Free radicals in biology and medicine*. 3rd ed. Oxford, United Kingdom: Oxford University Press, 1999 p.639–645

31 Daniele Del Rio, Amanda J. Stewart, Nicoletta Pellegrini. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Disease* 2005; 15: 316-328

32 John M. Lyons , Joshua E. Schwimer, Catherine T. Anthony, Jessica L. Thomson, Jason D. Cundiff, Douglas T. Casey et al. The Role of VEGF Pathways in Human Physiologic and Pathologic Angiogenesis. *Journal of Surgical Research* 2010; 159: 517-527

33 Lapp T. ACOG issues recommendations for the management of endometriosis. American College of Obstetricians and Gynecologists. *Am Fam Physician* 2000; 62: 1431-1434

34 Rice VM. Conventional medical therapies for endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 955: 343-352

35 Schor E, Baracat EC, Simões MJ, de Freitas V, Giannotti Filho O, de Lima GR. Effects of conjugated estrogens and progestogen in surgically induced endometriosis in oophorectomized rats. *Clin Exp Obstet Gynecol* 1999; 26: 158-161

36 Rajkumar K, Schott PW, Simpson CW. The rat as an animal model for endometriosis to examine recurrence of ectopic endometrial tissue after regression. *Fertility Sterility* 1990; 53: 921-925

37 Rossi G, Somigliana E, Moschetta M, Santorsola R, Cozzolino S, Filardo P et al. Dynamic aspects of endometriosis in a mouse model through analysis of implantation and progression. *Arch Gynecol Obstet* 2000; 263 : 102-107

38 Fang Z, Yang S, Lydon JP, DeMayo F, Tamura M, Gurates B et al. Intact progesterone receptors are essential to counteract the proliferative effect of estradiol in a genetically engineered mouse model of endometriosis. *Fertility Sterility* 2004; 82: 673-678

39 Gupta S, Agarwal A, Krajcir N, Alvarez JG. Role of oxidative stress in endometriosis. *Reprod Biomed Online* 2006; 7: 126–134

40 Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E. Actions of ME in the reduction of oxidative status. *J Biomed Sci.* 2000; 7: 444–458

41 Tan DX, Reiter RJ, Manchester LC, Yan MT, El-Sawi M, Sainz RM. Chemical and physical properties and potential mechanisms: ME as a broad-spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr Top Med Chem* 2002; 2: 181–197