

## ETANERCEPT TEDAVİSİNİN DENEYSEL ENDOMETRİOZİSLİ SIÇAN MODELİNDE SERUM MALONALDİALDEHİD DÜZEYLERİNE ETKİSİ

### THE EFFECT OF ETANERCEPT TREATMENT ON SERUM MALONALDIALDEHYDE LEVELS IN EXPERIMENTAL ENDOMETRIOSIS RATS MODEL

Fatma Ceyla ERALDEMİR<sup>1,\*</sup>, Cihan Deniz KELEŞ<sup>2</sup>, Tuğba KUM<sup>1</sup>, Birol VURAL<sup>2</sup>,  
Canan BAYDEMİR<sup>3</sup>

\* Sorumlu Yazar

<sup>1</sup> Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Umuttepe, 41380, Kocaeli, TÜRKİYE

E-posta: ceyraldemir@yahoo.com.tr

<sup>2</sup> Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Obstetrik ve Jinekoloji Ana Bilim Dalı, Umuttepe, 41380, Kocaeli, TÜRKİYE

<sup>3</sup> Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyoistatistik Ana Bilim Dalı, Umuttepe, 41380, Kocaeli, TÜRKİYE

#### ÖZET

#### Anahtar Kelimeler:

Endometriozis,  
etanercept,  
malondialdehid,  
lipit  
peroksidasyonu,  
Oksidatif stres

**Amaç:** Amacımız oluşturulan deneysel endometriozisli sıçan modelinde etanerceptin endometriozisi tedavi edebilme yeteneğini serum lipid peroksidasyonuna olan etkisi üzerinden değerlendirmektir.

**Yöntem:** Bu deneysel çalışmada 30 adet Wistar albino cinsi dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlardan 20'sinde endometriozis modeli cerrahi olarak oluşturulurken, 10'unda ise anestezi ve cerrahinin etkisini dışlamak amacıyla yalancı operasyon uygulandı. İlk operasyondan 4 hafta sonra sıçanların ektopik endometrial doku volümleri ikinci bir operasyonla değerlendirildi ve kan alındı. Daha sonra sıçanlar 3 gruba ayrıldı: Grup I (herhangi bir tedavi almamış, yalancı operasyon, n=10), grup II (2 ml/gün subkutan serum fizyolojik, endometriozis modeli, n=10), grup III (2 mg/kg/haftada 3 kez, subkutan etanercept, endometriozis modeli, n=10). İki haftalık tedavi sonrası sıçanların 3. operasyonla ektopik endometrial doku volümleri değerlendirildi ve 2. kanları alındı. Serum malondialdehid (MDA) düzeyleri spektrofotometrik olarak analiz edildi.

**Bulgular:** Tedavi sonrası dönemde ektopik endometrial doku volümleri karşılaştırıldığında grup III te grup II ye göre anlamlı düşük sonuçlar elde edildi (p=0.000). Aynı zamanda grup III tedavi sonrası dönemde, tedavi öncesi döneme göre anlamlı düşük doku volüm değerleri gösterdi (p=0.005). Tedavi sonrası dönemde ise MDA düzeylerinde gruplar arası anlamlı farklılık mevcuttu (p=0.001). Tedavi sonrası dönemde MDA düzeyleri Grup III te grup II ye göre anlamlı düşüktü (p=0.001). Ek olarak, grup III te MDA düzeyleri tedavi sonrası dönemde öncesine göre anlamlı düşüktü (p=0.028).

**Sonuç:** Çalışmamızın sonuçları bize etanerceptin serum lipid peroksidasyonu düşürücü etkisini ve endometriozis tedavisinde etkili bir şekilde kullanılabileceğini düşündürmektedir.

#### ABSTRACT

#### Keywords:

Endometriosis,  
etanercept,  
malondialdehyde,  
lipid  
peroxidation,  
oxidative stress

**Objectives:** The purpose of this study was to evaluate the serum lipid peroxidation in rats with experimental endometriosis who received etanercept (anti-tumor necrosis factor alpha) treatment.

**Methods:** In this experimental study, 30 Wistar albino female rats were used. The surgical endometriosis model operation applied to 20 rats from those, in the 10's sham operation was performed in order to exclude the effects of anesthesia and surgery. Ectopic endometrial implants volumes of rats 4 weeks after the first operation were evaluated and blood samples were taken with a second operation. Then the rats were divided into 3 groups: Group I (did not receive any treatment, false operation, n = 10), group II (2 ml / day subcutaneous saline, endometriosis model, n = 10), group III (2 mg / kg / week etanercept subcutaneously 3 times, endometriosis model, n = 10). 3. After two weeks of treatment, ectopic endometrial implants volumes were evaluated with and second blood samples were taken from rats. Serum malondialdehyde (MDA) levels were analyzed by spectrophotometry.

**Results:** The ectopic endometrial implant volumes of group III showed significantly lower results than group II in the post-treatment period (p = 0.000). According to the same time group III implants showed significantly lower volume in the post-treatment period before the treatment (p = 0.005). In the post-treatment period, there was a significant difference between the groups in the MDA levels (p = 0.001), and group III was showed significantly lower levels of MDA compared to group II (p = 0.001). In addition, pre-treatment levels of MDA were also significantly lower compared to post-treatment period in group III (p = 0.028).

**Conclusion:** In summary, these results suggest that etanercept has protective effects against endometriosis in rats, which may be attributed to attenuating oxidative stress.

## GİRİŞ

Endometriozis, endometrial dokunun uterin kavite dışında (ektopik endometrial doku) bulunup, fonksiyon göstermesi ile karakterize bir hastalıktır. Asemptomatik hastaların varlığı ve kesin tanının konulabilmesi için cerrahi ihtiyaç olduğundan endometriozisin prevalansı kesin olarak bilinmemektedir<sup>1</sup>. Ancak doğurganlık çağındaki kadınlarda prevalansının %2-10 civarlarında olduğu, infertil kadınlarda ise bu oranın %50'lere yükseldiği gözlemlenmektedir<sup>2</sup>. Endometriozisin artmış sistemik oksidatif stresle ilişkisi gösterilmiş olmakla birlikte<sup>3,4</sup>, endometrioziste gelişen infertilitenin oksidatif denge bozuklukları nedeniyle olabileceği düşünülmektedir<sup>5,6,7</sup>.

Hastalığın tedavisinde uygulanan alternatif yöntemler arasında cerrahi ve medikal tedaviler yer almaktadır<sup>2,8</sup>. Cerrahi yaklaşım; endometriozis tedavisinde yaygın olarak kullanılmakla birlikte, hastalığın tekrarlama riski vardır<sup>1</sup>. Medikal tedavilerde ise uygulanabilen farklı seçenekler mevcuttur. Tümör nekroz faktör-alfa inhibitörleri de bu seçeneklerden birisi olarak göze çarpmaktadır<sup>9</sup>. Etanercept endometriozisin<sup>10,11</sup> yanı sıra romatoid artrit<sup>12</sup>, psöriasis<sup>13</sup>, kron hastalığı<sup>14</sup> gibi birçok farklı kronik inflamatuvar hastalıkta da kullanılması önerilen tümör nekrozis alfa antagonisti bir ajandır.

Bu çalışmada amacımız, etanerceptin endometriozis medikal tedavisinde tercih edildiğinde endometrial odak boyutlarına ve lipid peroksidasyon belirteci olan serum malondialdehid (MDA) düzeyleri üzerine olan etkilerinin durumunu değerlendirmektir.

## YÖNTEM

Bu çalışma Kocaeli Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulunun onayı alınarak Kocaeli Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Biriminde (DETAB) yürütüldü. Çalışmada 30 adet 200-280 gr ağırlıklarında 2-4 ay yaş aralığında olan Wistar albino tipi dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlardan 20'sine cerrahi olarak endometriozis modeli oluşturma operasyonu Vernon ve Wilson tarafından tarif edildiği şekilde yapıldı<sup>15</sup>. Endometriozis oluşturma operasyonu sırasında 2 boynuzu olan sıçan uterusunun bir boynuzu kesilerek endometrial doku alt batın içi peritonuna dikildi. Kontrol grubu haricinde tüm gruplara endometrial doku dikme işlemi yapıldı ve batın içine dikilen endometrial doku boyutları eşit tutulmaya çalışıldı. Sıçanlardan 10 tanesinde ise endometrial dokuya dokunulmadan cerrahi olarak periton açılıp, tekrar kapatılarak yalnızca cerrahi girişimin ve anestezinin oluşturacağı etki altında kalan grup oluşturuldu (yalancı operasyon) (Grup I). Operasyonlar sırasında tüm sıçanlara intraperitoneal 50 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar; Eczacıbaşı Warner-Lambert İlaç Sanayi, Levent, İstanbul, Türkiye) ve 10 mg/kg ksilazin hidroklorid (Alfazyne; Alfasan International BV, Woerden, Netherlands) olacak şekilde anestezi dozu uygulaması yapıldı. Tüm sıçanlara ilk operasyondan sonraki postoperatif ilk 5 gün sefazolin 50 mg/kg/gün IM uygulaması yapıldı. İlk operasyondan 4 hafta sonra ikinci operasyonla laparotomi yapılarak endometriozis odaklarının büyüklüğü milimetrik cerrahi cetvel ile ölçüm yapılarak değerlendirildi (uzunluk, genişlik, yükseklik, mm olarak). Her bir grup için tedavi öncesi ve sonrası ektopik endometrial doku volümleri, bu ölçüm sonuçlarına göre hesaplandı. Volüm hesaplamalarında elipsoid hacim formülünden ( $0.52 \times \text{uzunluk} \times \text{genişlik} \times \text{yükseklik}$ ) yararlanıldı.

İkinci operasyon sonrasında uygulanan tedaviler: Grup I'e (yalancı operasyonlu) herhangi bir tedavi uygulanmazken, Kontrol grubuna (Grup II) 2 ml serum fizyolojik/gün subkütan enjeksiyon, etanercept grubuna (Grup III) 2 mg/kg subkütan enjeksiyon haftada 3 kez ve 2 haftalık tedavi olacak şekilde uygulandı.

Sıçanlardan ilk kan numuneleri model oluşturulduktan 4 hafta sonra alındı, ikinci kan örnekleri ise 2 haftalık tedavi sonunda alındı. Antikoagülsüz düz tüpe alınan kan numuneleri 3500 rpm de 10 dakika santrifüj edilerek ayrılan serumlar analiz edilene kadar -40° C'de saklandı. Serum MDA düzeyleri Buege yöntemiyle spektrofotometrik olarak çalışıldı<sup>16</sup>.

## İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirme, IBM SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) paket programı ile yapıldı. Normal dağılıma uygunluk testi Kolmogorov-Smirnov Testi ile değerlendirildi. Nümerik değişkenler Ortalama  $\pm$  standart sapma ve medyan (25. persantil - 75. persantil) olarak verildi. Gruplar arasındaki farklılık normal dağılıma sahip olan nümerik değişkenlerde tedavi öncesi ve tedavi sonrası değerlerin karşılaştırılmasında Bağımlı Örneklerde t Testi ve normal dağılıma sahip olmayan nümerik değişkenler için tedavi öncesi ve tedavi sonrası değerlerin karşılaştırılmasında Wilcoxon t testi, grupların karşılaştırılmasında ise Mann Whitney U Testi, Student t testi, Kruskal Wallis tek yönlü varyans analizi ve Dunn's Çoklu Karşılaştırma Testi kullanıldı.  $p < 0.05$  istatistiksel olarak önemlilik için yeterli kabul edildi.

## BULGULAR

Çizelge 1'de deneysel endometriozis oluşturulan gruplara ait (Grup II ve III) tedavi öncesi ve sonrası ektopik endometrial doku volümleri ortalamaları karşılaştırıldı. Tedavi öncesi dönemde grup II ve III arasında volümler açısından anlamlı fark bulunamadı ( $p=0.113$ ). İki haftalık tedavi sonrası ektopik endometrial doku volümleri karşılaştırıldığında ise grup III'ün grup II'ye göre anlamlı olarak düşük olduğu saptandı. ( $p=0.000$ ). Aynı zamanda grup III tedavi sonrası dönemde tedavi öncesi döneme göre anlamlı olarak düşük doku volüm değerleri

gösterdi ( $p=0.005$ ). Grup II'de ise tedavi öncesi ve sonrası dönem arasında doku volümleri açısından farklılık bulunamadı ( $p=0.635$ ).

**Çizelge 1.** Deneysel endometriozis oluşturulan rat gruplarında (Grup II ve III) tedavi öncesi ve sonrası ektopik endometrial doku volümleri ortalamalarının karşılaştırılması.

	Grup II (Salin grubu) (n=10)	Grup III (Etanercept grubu) (n=10)	p değerleri
İkinci operasyonda Tedavi öncesi (mm <sup>3</sup> )	18.72 (10.14-81.90)	75.36 (18.69-234.00)	0.113
Üçüncü operasyonda Tedavi sonrası (mm <sup>3</sup> )	29.12 (10.92-75.88)	4.2 (3.02-6.14)	<0.001
p değerleri	0.635	0.005	

Not; Veriler medyan (25 - 75 persantil) olarak verilmiştir.

Çizelge 2'de tüm gruplara ait (grup I, II, III) tedavi öncesi ve sonrası serum MDA düzeyleri karşılaştırılmıştır. Tüm grupların tedavi öncesi döneme ait MDA düzeyleri değerlendirildiğinde anlamlı farklılık bulunamadı ( $p=0.558$ ). Tedavi sonrası döneme ait MDA düzeylerinde ise gruplar arasında anlamlı farklılık mevcuttu ( $p=0.001$ ). Tedavi sonrası dönemde MDA düzeylerinde anlamlılık değerleri; Grup III'te grup II'ye göre anlamlı olarak düşük iken ( $p=0.001$ ), grup I ile grup III ( $p=0.142$ ) ve grup II arasında anlamlı bir farklılık saptanamadı ( $p=0.280$ ). Ayrıca grup II'de MDA düzeyleri tedavi sonrası dönemde, tedavi öncesi döneme göre anlamlı olarak düşük bulundu ( $p=0.028$ ).

**Çizelge 2.** Grup I, II ve III ratlarda tedavi öncesi ve sonrası serum MDA düzeylerinin karşılaştırılması.

	Grup I (Yalancı operasyon) (n=10)	Grup II (Salin grubu) (n=10)	Grup III (Etanercept grubu) (n=10)	p değerleri
		MDA (µmol/L)		
İkinci operasyonda (Tedavi öncesi)	22.46 ± 0.96	23.08 ± 3.08	23.20 ± 1.89	0.558
Üçüncü operasyonda (Tedavi sonrası)	22.82 ± 1.64	23.73 ± 1.10	21.51 ± 0.87	0.001 <sup>x,y,z</sup>
p değerleri	0.630	0.139	0.028	

Notlar; Veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

MDA: Malondialdehid ; x: Grup III ile grup II arasında fark vardır ( $p=0.001$ ); y: grup I ile grup III arasında fark yoktur ( $p=0.142$ ); z: grup I ile grup II arasında farklılık yoktur ( $p=0.280$ ).

## TARTIŞMA

Endometriozisli kadınların hem ektopik endometrial dokularında hem de periferik kan örneklerinde oksidatif stresi yansıtan parametrelerde artışlar tesbit edilmiştir<sup>17</sup>. Bilindiği üzere oksijen metabolizmasının ara ürünleri olarak oluşan reaktif oksijen ürünleri (ROÜ), endojen antioksidan savunma sistemlerinin etkisizleştirilebileceğinden fazla miktarlarda üretildiğinde oksidatif hasar oluşturur<sup>18</sup>. Eritrositler, makrofajlar, apoptotik endometrial doku ve peritoneal kavite içerisine transplante edilmiş hücre kalıntıları endometrioziste oluşan oksidatif hasarın potansiyel uyarıcıları olarak düşünülmektedir<sup>19</sup>.

Düzeyleri yükselen ROÜ nin, ektopik endometrial dokuda yükselerek döllenmiş ovumun tutunmasını ve gelişimini engellediği hayvan deneyleriyle gösterilmiştir<sup>6,7</sup>. ROÜ hücrede yüksek düzeylere ulaştığında hücre lipit, protein ve nükleik asit yapılarında hasara neden olabilen önemli araçlar olarak davranırlar. Malondialdehide (MDA) oluşumu, lipit peroksidasyonu aracılığıyla oluşan oksidatif hasarın göstergesidir<sup>20</sup>. Ek olarak, endometriozisli kadınlarda lipit peroksidasyon ürünlerine karşı anlamlı yüksek antikor oluşumu da tespit edilmiştir<sup>4</sup>.

Çalışmamızda tedavi öncesi dönemde endometriozis modeli oluşturulmuş gruplarda, model oluşturulmamış gruba göre yüksek serum MDA değerleri gözlemlenmesine rağmen, tedavi grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamadı.

Endometriozisli hastalarda oksidatif stresin sistemik artışının gözlemlenebilmesi<sup>3,21</sup> hastalara uygulanabilecek medikal tedavilerin lipit peroksidasyonu üzerine olan etkisinin nasıl olabileceği sorusunu akla getirmektedir. Çalışma gruplarımızda etanercept tedavisinin ektopik endometrial doku volümlerini ve serum MDA düzeylerinin azaltarak etkili olduğunu gözlemlenmiştir.

Bizim çalışmamızla uyumlu olarak etanerceptin sıçanlarda endometriozis gelişimini etkili şekilde azalttığını bildiren çalışmalar mevcuttur<sup>10,11</sup>. Endometrioziste medikal tedavi seçeneklerinden birisi olarak düşünülebilecek TNF-alfa blokerlerinden etanerceptin, myokardial iskemi reperfüzyon sıçan modeli oluşturulmuş deney

gruplarında MDA düzeylerini azaltarak etkili olduğu gözlemlenmiş ve etanerceptin oksidatif stresi azaltarak koruyucu etki gösteriyor olabileceği kanısına varılmıştır<sup>22</sup>. Psöriazisli hastalarda etanercept tedavisinin, lipit peroksidasyonunu düşürücü ve total antioksidan düzeylerini yükseltici etkisi ile klinik iyileşme sağladığı düşünülmektedir<sup>23</sup>.

Çalışmanın sonuçları etanerceptin serum lipit peroksidasyonu düşürücü etkisini ve endometriozis tedavisinde etkili bir şekilde kullanılabileceğini, hormonal olmayan tedavi seçeneği olarak insanlarda endometriozis tedavisinde kullanılabileceğini düşündürmektedir. Ancak oksidatif hasarın göstergesi olarak oksidan veya antioksidan daha farklı parametreler eklenerek de etanerceptin oksidatif denge üzerine olan etkisinin incelenilebileceği daha ileri insan ve hayvan çalışmalarına ihtiyaç olabileceğini düşünmekteyiz.

## KAYNAKLAR

1. Selçuk I, Bozdağ G. Recurrence of endometriosis; risk factors, mechanisms and biomarkers; review of the literature. *J Turk Ger Gynecol Assoc.* 2013; 14 (2): 98-103.
2. Fadhlouli A, Bouquet de la Jolinière J, Feki A. Endometriosis and infertility: how and when to treat? *Front Surg.* 2014; 1: 24.
3. Lambrinoudaki IV, Augoulea A, Christodoulakos GE ve diğ. Measurable serum markers of oxidative stress response in women with endometriosis. *Fertil Steril.* 2009; 91(1):46-50.
4. Shanti A, Santanam N, Morales AJ ve diğ. Autoantibodies to markers of oxidative stress are elevated in women with endometriosis. *Fertil Steril.* 1999; 71 (6):1115-8.
5. Prieto L, Quesada JF, Cambero O ve diğ. Analysis of follicular fluid and serum markers of oxidative stress in women with infertility related to endometriosis. *Fertil Steril.* 2012; 98(1):126-30.
6. Barroso RP, Osuamkpe C, Nagamani M ve diğ. Nitric oxide inhibits development of embryos and implantation in mice. *Mol Hum Reprod.* 1998; 4: 503-507.
7. Ho YS, Gargano M, Cao J ve diğ. Reduced fertility in female mice lacking copper-zinc superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 1998; 273 (13): 7765-7769.
8. Kodaman PH. Current strategies for endometriosis management. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2015; 42(1): 87-101.
9. Zito G, Luppi S, Giolo E ve diğ. Medical treatments for endometriosis-associated pelvic pain. *Biomed Res Int.* 2014; 2014:191967.
10. Islimye M, Kilic S, Zulfikaroglu E ve diğ. Regression of endometrial autografts in a rat model of endometriosis treated with etanercept. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2011; 159(1):184-9.
11. Yildirim G, Attar R, Ficicioglu C ve diğ. Etanercept causes regression of endometriotic implants in a rat model. *Arch Gynecol Obstet.* 2011; 283(6):1297-302.
12. van Vollenhoven RF, Østergaard M, Leirisalo-Repo M ve diğ. Full dose, reduced dose or discontinuation of etanercept in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2015; pii: annrheumdis-2014-205726.
13. Woolacott N, Hawkins N, Mason A ve diğ. Etanercept and efalizumab for the treatment of psoriasis: a systematic review. *Health Technol Assess.* 2006; 10(46):1-233.
14. Dretzke J, Edlin R, Round J ve diğ. A systematic review and economic evaluation of the use of tumour necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) inhibitors, adalimumab and infliximab, for Crohn's disease. *Health Technol Assess.* 2011; 15(6):1-244.
15. Vernon MW, Wilson EA. Studies on the surgical induction of endometriosis in the rat. *Fertil Steril.* 1985; 44:684-94.
16. D'souza D, Subhas BG, Shetty SR ve diğ. Estimation of serum malondialdehyde in potentially malignant disorders and post-antioxidant treated patients: A biochemical study. *Contemp Clin Dent.* 2012; 3(4): 448-51.
17. Oner-Iyidoğan Y, Koçak H, Gürdöl F ve diğ. Indices of oxidative stress in eutopic and ectopic endometria of women with endometriosis. *Gynecol Obstet Invest.* 2004; 57(4):214-7.
18. Agarwal A, Gupta S, Sharma R. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol.* 2005; 3:1-21.
19. Murphy AA, Santanam N, Morales AJ ve diğ. Lysophosphatidylcholine, a chemotactic factor for monocytes/T-lymphocytes is elevated in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83:2110-3.
20. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J ve diğ. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 2006; 160:1-40.
21. Rosa e Silva JC, do Amara VF, Mendonça JL ve diğ. Serum markers of oxidative stress and endometriosis. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 2014; 41(4):371-4.
22. Yang M, Chen J, Zhao J ve diğ. Etanercept attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury by decreasing inflammation and oxidative stress. *PLoS One.* 2014; 9(9):108024.
23. Bacchetti T, Campanati A, Ferretti G ve diğ. Oxidative stress and psoriasis: the effect of antitumour necrosis factor- $\alpha$  inhibitor treatment. *Br J Dermatol.* 2013; 168(5):984-9.