

Östrojen Yerine Koyma Tedavisinin Overektomili ve Overektomili-Diyabetik Sıçanlarda Doku Lipid Peroksidasyonu ve Antioksidan Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkisi

Aslı F. Ceylan-Işık*, Özlem B. Erdoğan-Tulmaç**, Fügen Aktan***,
Nuray Arı*, Gülgün Ozansoy*

ÖZET

Menopoz ve diyabet, birbirinden bağımsız olarak serbest radikal üreten durumlardır. Postmenopozal dönemde kullanılan östrojen yerine koyma tedavisi, antioksidan özelliği nedeniyle pek çok yararlı etkiye sahiptir. Çalışma grupları: overektomi (n=8), overektomi+17β-östradiol (n=8), overektomi+diyabet (n=10) ve overektomi+diyabet+17β-östradiol (n=8) biçimindedir. Overektomiden 1 hafta sonra streptozotosin (45 mg/kg) ile diyabet oluşturulmuş ve sonrasında başlanan tedavi 17β-östradiol (0.1 mg/kg /gün) ile oral olarak 8 hafta sürdürülmüştür. Süre sonunda hayvanların aort ve uterus dokuları alınmış, malondialdehit konsantrasyonu ile glutatyon peroksidaz ve katalaz aktiviteleri ölçülmüştür. Östrojen tedavisinin kan glukozu üzerine belirgin bir etkisinin olmadığı, tedavinin plazma östradiol konsantrasyonlarını yükselttiği saptanmıştır. Aortta diyabetik ve diyabetik olmayan overektomili gruplarda artmış olan malondialdehit konsantrasyonunun östrojen tedavisiyle düşürüldüğü, uterusu ise tedavinin diyabetik durumda malondialdehit konsantrasyonunu azaltırken, sadece overektomi yapılan hayvanlarda arttırdığı bulunmuştur. Östrojen tedavisinin, aortta artmış olan glutatyon peroksidaz ve katalaz aktivitelerini düşürdüğü, uterusu ise arttırdığı görülmüştür. Sonuçlarımız, tedavinin doku çeşidine göre prooksidan ya da antioksidan gibi davrandığını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Aort, Diyabet, Oksidatif Stres, Östrojen, Uterus.

Effects of Estrogen Replacement Therapy on Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzyme Activities of Ovariectomized and Ovariectomized-Diabetic Rats

SUMMARY

Menopause and diabetes are conditions producing free radicals independently from each other. Estrogen replacement therapy which widely used in postmenopausal period has beneficial effects because of its antioxidant property. The study groups were as follows: ovariectomy (n=8), ovariectomy+17β-östradiol (n=8), ovariectomy+diabetes (n=10) and ovariectomy+diabetes+17β-östradiol (n=8). Diabetes was induced by streptozotocin (45 mg/kg i.p.) and the treatment with 17β-östradiol (0.1 mg/kg/day) was started a week after ovariectomy. After-week long experimental period aortic and uterine tissues were collected from the animals and the malondialdehyde concentration, glutathione peroxidase and catalase activities were quantified. The treatment did not effect blood glucose concentrations, but increased plasma estradiol concentrations. Increased malondialdehyde concentrations were reduced by the treatment in aorta from diabetics and nondiabetics, but the treatment increased malondialdehyde concentrations in nondiabetic uterine while were reducing in diabetic uterine. The treatment also reduced the increased activities of catalase and glutathione peroxidase in aorta from diabetics and nondiabetics, on the other hand the treatment increased the activities of those enzymes in uterine from diabetics and nondiabetics. Our results suggested that estrogen acts as an antioxidant or prooxidant depending on the tissues.

Key Words: Aorta, Diabetes, Ovariectomy, Oxidative Stress, Uterine.

* Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji A.D. / Ankara

** Dr. Zekai Tahir Burak Kadın Sağlığı Eğitim ve Araştırma Hastanesi / Ankara

*** Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya A.D. / Ankara



GİRİŞ

Postmenopozal dönemde östrojen eksikliği ile ortaya çıkan gerek psikolojik gerekse fizyolojik bir takım etkileri giderebilmek amacıyla uygulanan östrojen (E2) yerine koyma tedavisi (ÖYT), son yıllarda yarar/zarar ilişkisi tartışmalı duruma gelmiş olan önemli bir konudur. Her ne kadar, “Estrogen-Progestin Replacement Study (HERS)” ve “Women’s Health Initiative (WHI)” çalışmaları hormon yerine koyma tedavisinin (HYT) özellikle ileri yaşta hipertansif kadınlarda yararlı etkilerini savunmasa da (1, 2), diğer çalışmalar HYT’nin koroner arter hastalık görülme sıklığını azaltarak, damar yatağında koruyucu bir etki oluşturduğunu göstermektedir (3,4). Çalışmalar bu etkinin en önemli kaynaklarından biri olarak, östrojenin fenolik yapısından kaynaklandığı bilinen (5), antioksidan özelliğini göstermektedir.

Diyabetin artmış oksidatif stresle bağlantılı olduğu, önceki çalışmalarda gösterilmiştir (6,7). Bununla birlikte, cerrahi yolla oluşturulan menopoz (overektomi; OVX), deneysel çalışmalarda oksidatif stres modeli olarak kullanılmıştır (8). İnsan ve hayvan çalışmalarında, E2’nin OVX ile artan oksidatif stresin azaltılmasında etkili olduğu ve bu yönüyle de antioksidan olarak değerlendirildiği görülmektedir (9,10). E2 ile antioksidan enzimlerin ekspresyonlarının arttığının gösterilmesi de bu görüşe destek vermektedir (11). Deneysel modellerde sadece OVX ya da sadece diyabet (DIA) oluşturularak, E2 gibi antioksidanların etkilerinin aort ve uterus preparatlarında lipid peroksidasyon ve antioksidan enzim aktiviteleri üzerine olan etkileri incelenmiştir; ancak, OVX ve DIA birlikte kullanılarak ortaya çıkabilecek olan etki ve bunlar üzerine E2 tedavisinin olası etkileri üzerine yapılan çalışmalar yetersizdir.

Çalışmamızda kullanmış olduğumuz cerrahi yolla menopoz oluşturma yöntemi ile artacak olan oksidatif stres üzerine, diyabetin ve ÖYT’nin olası etkilerini, aort ve uterus preparatlarında inceleyerek, günümüzde, özellikle genç postmenopozal kadınlarda, ÖYT ve HYT ile ilgili tartışmalar üzerine katkı sağlanması planlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Deney Hayvanları

Deneylerde, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Deney Hayvanları Yetiştirme Ünitesi’nden elde edilen, eş-yaştaki 200-220 g ağırlığında olan Wistar dişi sıçanlar kullanılmıştır. Oniki saatlik karanlık-aydınlık döngü ortamında, oda sıcaklığında barındırılan sıçanlara yem ve su kısıtlaması yapılmadan, deney süresince bakılmıştır. Deneylerde kullanılan sıçanlar, 4 gruba ayrılmıştır: OVX (n=8), OVX+E2 (n=8), OVX+DIA (n=10); OVX+DIA+E2 (n=8).

Deney Planı

Deneylerimizde kullanılan sıçanların tümüne, bilateral overektomi uygulanmıştır. Ketamin+xylazine (60 ve 20 µg/kg i.p.) (12) anestezisi altındaki dişi sıçanların operasyon bölgesindeki tüyler temizlenerek, abdominal kaviteyi açılmış, sağ ve sol tubaları bulunarak, tubaların proksimal ve distal uçları klampelenmiş ve overler izole edilmiştir. Açıkta kalan tuba uçları vikril ile ligate edilmiş ve operasyon sonrasında, abdominal kavite ve cilt dokusu dikilmiştir. Operasyon, kadın doğum uzmanı bir cerrah tarafından yapılmıştır. Overektomi uygulamasından 1 hafta sonra, bir kısım deney hayvanına 45 mg/kg streptozotosin (STZ) i.p. olarak uygulanmıştır. STZ enjeksiyonunu izleyen 3. günde, hayvanların kuyruk venlerinden alınan örneklerinde kan glukozu, glukoz ölçer ile ölçülmüş ve kan glukozu 250 mg/dl ve üzerinde olan hayvanlar, diyabetik kabul edilmiştir. Bir grup deney hayvanına 17β-östradiol (E2) tedavisi, her gün sabah saat 9.00-10.00’da oral olarak uygulanmıştır (1 mg/kg). Gruplara uygulanan tedavi, OVX operasyonununundan 1 hafta sonra başlamış ve 8 hafta sürdürülmüştür. Deney süresince, tüm gruplardaki hayvanların kan glukozu konsantrasyonları haftalık olarak ölçülünerek, ortalamaları saptanmıştır. 8 haftalık deney süresi sonunda, sıçanların beden ağırlıkları ölçülüp, ketamin ile anestezize edilmiştir. Anestezize edilen sıçanların göğüs kafesleri açılarak, kardiyak ponksiyon ile alınan kanlar santrifuj edilmiş ve elde edilen



plazmalardan östradiol konsantrasyonları ticari kitler kullanılarak saptanmıştır. Deney hayvanlarından alınan aort ve uterus, doku malondialdehit (MDA) konsantrasyonu, glutatyon peroksidaz (GPx) ve katalaz (KAT) aktivitelerinin saptanması amacıyla sıvı nitrojende dondurulup, -80°C 'lik derin dondurucuda saklanmıştır. Tedavinin ve diyabetin uterus ağırlığı üstüne etkisinin anlaşılması amacıyla, uterus ağırlıkları da belirlenmiştir.

MDA konsantrasyonunun ölçümü

MDA konsantrasyonu, tiyobarbitürik asid reaktif substratlarının ölçümüne dayalı, Yağ (14) tarafından tanımlanan florometrik yöntemle ölçülmüştür. 200 μl doku homojenatına 42 mmol/l 250 μl 2-tiyobarbitürik asid ve 0.19 mmol/l 750 μl H_3PO_4 eklenerek, 95°C 'de 60 dakika ısıtılmıştır. Standart çözelti, malondialdehit-bis-dietilasetalden hazırlanmıştır. Örnekler, metanol ve 1 mol/l NaOH ile çöktürülüp, 4000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Supernatant, 532 nm eksitasyon ve 553 emisyon dalgaboylarında florometrik olarak, ölçümlenmiştir.

GPx ve KAT aktivitesinin saptanması

GPx aktivitesi, daha önceden Lawrence ve Burk (15) tarafından tanımlanan yöntemle dayanılarak ölçülmüştür. Yöntemde, GPx aktivitesi redükte nikotin amid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) kullanımına bağlıdır. Ortaya çıkan okside nikotin amid adenin dinükleotid fosfat (NADP^+) üretimi, spektrofotometrik olarak 340 nm'de ölçülür. EDTA ve NaN_3 (pH 7) bulunan 76 mmol/l fosfat çözeltisi, 0.1 mmol/l NADPH, 4.0 mmol/l glutatyon (GSH) ve 1.5 U glutatyon reduktaz ile birlikte 0.150 mg protein içeren 500 μl 'lik analiz karışımına, 3.0 mmol/l H_2O_2 eklenerek reaksiyon başlatılmıştır. GPx aktivitesi, dakikada mg doku proteini başına NADP^+ 'a okside olan NADPH'nin nmol cinsinden karşılığı olarak verilmiştir.

KAT aktivitesi Aebi (16) tarafından tanımlanmış olan yöntemle dayanılarak spektrofotometrik olarak saptanmıştır. Temizlenerek, küçük parçalara ayrılmış olan doku, Triton X-100 içeren 50 mmol/l fosfat çözeltisi (pH 7) ile homojenize edilmiştir. 20 $\mu\text{mol/l}$ 'lik homojenata, ölçüm hacmi 2.0 ml olacak biçimde fosfat

çözeltisi eklenmiştir. Karışıma 1 ml 20 mmol/l H_2O_2 eklenerek reaksiyon başlatılmış ve H_2O_2 bozunması, 20°C 'de enzim solusyonu standartına karşı 240 nm'de okunmuştur. Enzim aktivitesi mg protein/k/s olarak tanımlanmıştır.

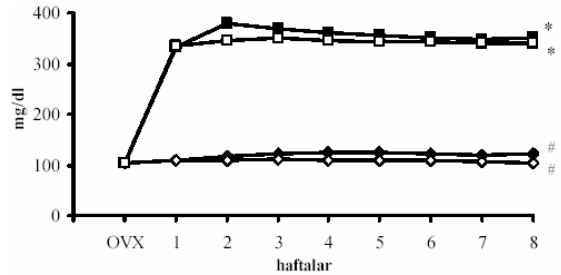
Veri Analizi

Biyokimyasal analiz sonuçları arasındaki farkın anlamlılık derecesinin belirlenmesi amacıyla tek yönlü ANOVA ve sonrasında gruplar arası farkın önemliliğinin kontrolü için de Student Newman-Keuls testi yapılmıştır; istatistiksel analiz, $P<0.05$, $P<0.01$ ve $P<0.001$ anlamlılık düzeylerinde değerlendirilmiştir.

BULGULAR

Kan glukozu ve plazma östradiol konsantrasyonları

Deney hayvanlarının kan glukozu profilleri değerlendirildiğinde, diyabetik sıçanların kan glukozu konsantrasyonunun yüksek olduğu saptanmıştır ($P<0.001$; Şekil 1.). OVX+DIA grubuna uygulanan E2 tedavisinin kan glukozu üzerine önemli bir etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir ($P>0.05$). Tek başına OVX' in de kan glukozunu etkilemediği saptanmıştır.



Şekil 1. Deney gruplarının kan glukozu profilleri. n= kullanılan hayvan sayısı; OVX n=8, OVX+E2 n=8, OVX+DIA n=10, OVX+DIA+E2 n=8. * $P<0.001$ vs. OVX+E2 ve # $P<0.001$ vs. OVX+DIA+E2.

Deney hayvanlarına uygulanan OVX ve ÖYT'nin başarısını değerlendirebilmek amacıyla, deney süresi sonunda deney hayvanlarından elde edilen plazmalardan östradiol konsantrasyonuna bakılmıştır. E2 tedavisinin, plazma östradiol konsantrasyonunu yaklaşık 4 kat arttırdığı saptanmıştır ($P<0.001$; Şekil 2). Diyabetin OVX'te plazma E2 konsantrasyonu üzerine etkili olmadığı görülmüştür.

Beden ve uterus ağırlıkları

Deney gruplarına ait hayvanların son beden ağırlıkları karşılaştırıldığında, OVX+DIA grubu hayvanların beden ağırlıklarının ortalamasının, diğer gruplardan düşük olduğu görülmüştür ($P<0.001$; Tablo 1). Bu gruba uygulanan tedavinin beden ağırlığında artmaya neden olduğu saptanmıştır. OVX grubunda ortaya çıkan beden ağırlığındaki artma eğiliminin, E2 tedavisi ile düşürüldüğü gözlemlenmiştir (Tablo 1.).

Tablo 1. Beden, aorta ve uterus ağırlıkları ile aorta ve uterus ağırlıklarının beden ağırlığına oranları.

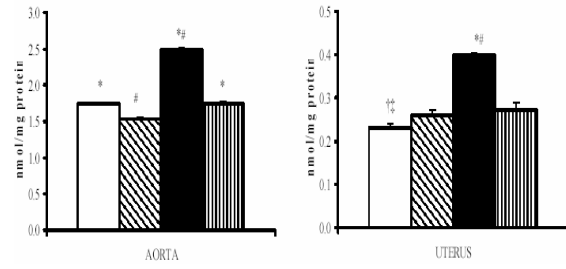
	OVX	OVX+E2	OVX+DIA	OVX+DIA+E2
Beden Ağırlığı (BA; g)	250±2*#	230±1	194±2*#	220±1
Uterus Ağırlığı (UA; mg)	120±42*#	562±63	131±52*#	548±26
UA/BA (mg/g)	0.480±0.02*#	2.450±0.31	0.670±0.05*#	2.500±0.26

n= kullanılan hayvan sayısı; OVX n=8, OVX+E2 n=8, OVX+DIA n=10, OVX+DIA+E2 n=8. * $P<0.001$ vs. OVX+E2 ve # $P<0.001$ vs. OVX+DIA+E2.

Uterus ağırlıklarının E2 ile tedavi edilmeyen gruplarda azalmış olduğu ve bunun da istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($P<0.001$; Tablo 1.). Bu azalma üstüne diyabetin fazladan bir katkısının olmadığı da saptanmıştır ($P>0.05$; Tablo 1.).

Aort ve Uterus MDA konsantrasyonu

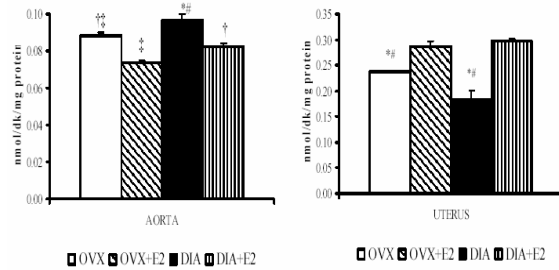
Aort doku örneklerinde, OVX ve OVX+DIA gruplarında artmış olan MDA konsantrasyonunun E2 tedavisi ile düşürülebildiği, yine de OVX+DIA+E2 grubunda, bu değer OVX+E2 değerinden yüksek olduğu saptanmıştır ($P<0.001$; Şekil 3). OVX grubu hayvanlardan izole edilen uterus doku örneklerinde ise, E2 tedavisi ile MDA düzeylerinin bir miktar arttığı, bununla birlikte, OVX+DIA grubunda artmış olan MDA düzeyinin ise E2 ile azaltılabildiği saptanmıştır ($P<0.001$; Şekil 3.).



Şekil 3. Aorta ve uterus malondialdehit (MDA) konsantrasyonları. n= kullanılan hayvan sayısı; OVX n=6, OVX+E2 n=6, OVX+DIA n=6, OVX+DIA+E2 n=6. * $P<0.001$ vs. OVX+E2 ve # $P<0.001$ vs. OVX+DIA+E2.

Aort ve Uterus GPx aktivitesi

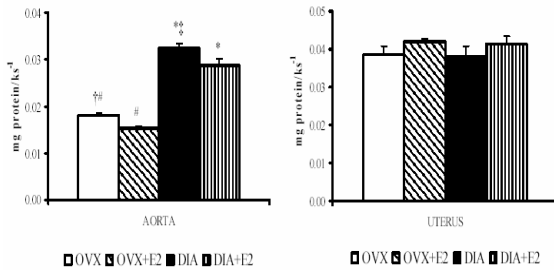
Aortta, gerek OVX+DIA gerekse OVX gruplarında, E2 tedavisi ile artmış olan GPx aktivitesinin azaldığı saptanmıştır ($P<0.001$; Şekil 4.) ve OVX+DIA+E2 grubu aktivitesinin OVX+E2 grubu aktivitesinden yüksek olduğu bulunmuştur ($P<0.01$). Uterusta ise, aortdakinin aksine, E2 tedavisi ile bu enzimin aktivitesinde, tedavisiz gruplara oranla artma olduğu ve bunun da istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($P<0.001$; Şekil 4.).



Şekil 4. Aorta ve uterus glutatyon peroksidaz (GPx) aktiviteyi. n= kullanılan hayvan sayısı; OVX n=6, OVX+E2 n=6, OVX+DIA n=6, OVX+DIA+E2 n=6. * $P<0.001$, † $P<0.01$ vs. OVX+E2 ve # $P<0.001$, ‡ $P<0.01$ vs. OVX+DIA+E2.

Aort ve Uterus KAT aktivitesi

Aortta E2 tedavisi ile artmış olan KAT aktivitesinin azaldığı saptanmıştır. OVX+DIA+E2 grubunda düşmüş olan bu değer, OVX+E2’ye göre yine de yüksek olduğu gösterilmiştir ($P<0.001$; Şekil 5). Uterusta ise, aortadakinin aksine, E2 tedavisi ile bu enzimin aktivitesinde, tedavisiz gruplara oranla artma olduğu görülmüştür; ancak, istatistiksel olarak bir fark saptanamamıştır ($P>0.05$; Şekil 5).



Şekil 5. Aorta ve uterus katalaz (KAT) aktiviteleri. n= kullanılan hayvan sayısı; OVX n=6, OVX+E2 n=6, OVX+DIA n=6, OVX+DIA+E2 n=6. * $P<0.001$, † $P<0.01$ vs. OVX+E2 ve # $P<0.001$, ‡ $P<0.01$ vs. OVX+DIA+E2.

TARTIŞMA

Son zamanlarda yarar/zarar ilişkisi tartışmalı bir duruma gelmesine karşın, ÖYT yine de postmenopozal dönemdeki kadınlarda kullanılması ön görülen tedavi rejimidir. Östrojen eksikliğine bağlı olarak ortaya çıkan gerek psikolojik gerekse fizyolojik bir takım etkileri giderebilmek amacıyla uygulanan ÖYT’nin yararlı etkilerinin başında, antioksidan etkisinden kaynaklandığı bilenen etkiler gelmektedir. Bu noktadan yola çıkılarak, ÖYT’nin deneysel diyabetin de eşlik ettiği overktomideki aort ve uterus ile deney hayvanlarının genel karakteristikleri üzerine olan etkileri incelenmiştir.

İnsan çalışmalarında menopozun yağ kitlesini arttırdığı, KVH ve metabolik sendroma kadar ilerleyen genel durum bozukluklarına neden olduğu ortaya konmaktadır (16). Menopoz ile birlikte kilo alımının arttığı ve östrojen tedavisinin, gerek fiziksel aktivite gerekse yağ kitlesi üzerine olan etkilerinin sonucunda, vücut ağırlığını azalttığı vurgulanmaktadır (17, 18). Bir çalışmada, diyabetik olmayan maymunlarda gerek doğal yolla oluşan

menopoz gerekse OVX sonrasında uygulanan E2 ile, düşmüş olan FSH düzeylerinin de normalize edildiği ve bunun beden ağırlığını düzenlediği gösterilmiştir (19). Çalışmamızda da, yukarıdaki sonuçlarla benzer biçimde, OVX’te artmış olan beden ağırlığını, E2 tedavisinin azalttığı saptanmıştır.

STZ-diyabetik hayvanlarda, artan yem tüketimine karşın beden ağırlığındaki azalmanın kaynağı, katabolik yolların aktivasyonu olarak gösterilmektedir (20). Daha önce diyabetle yapılan çalışmalara benzer biçimde (7, 21), diyabetin eşlik ettiği overktomide de beden ağırlığında azalma ortaya çıktığı gözlemlenmiştir. Çalışmamızda E2 tedavisinin, diyabetin sözü edilen bu etkisini OVX’te baskılayabildiği görülmüştür. E2 ile yapılan çalışmaların çoğu klinikte ve insülin rezistansının bulunduğu durumlarda yapılmış, çalışmamıza benzer nitelikteki hayvan çalışmalarında ise, E2’nin beden ağırlığı üzerine olan etkisi incelenmemiştir. Bu nedenle, sonuçlarımızı destekleyen ya da karşısında olan herhangi bir veri bulunmamaktadır. Bununla birlikte, çalışmamızda, E2 tedavisinin kan glukozu konsantrasyonu üzerine belirgin bir etkisinin olmaması, beden ağırlığındaki E2-kaynaklı düzenleyici etkinin, gerek diyabetik gerekse diyabetik olmayan OVX’te, kan glukozu ile ilintili olmayan başka bir mekanizma aracılığıyla gerçekleştiğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda plazma E2 konsantrasyonlarının OVX ve OVX+DIA’da düşük oluşu, yapılan operasyonunun başarılı olduğunun ve uygulanan E2 tedavisi ile plazma E2 konsantrasyonlarının artması da tedavide uygun dozun ve uygun uygulama yolunun seçilmiş olduğunun bir kanıtıdır. Sonuçlarımız, daha önceden yapılmış olan çalışmalarla da benzerlik göstermektedir (12, 22). OVX’in uterus ağırlıklarında azalmaya neden olduğu ve ÖYT ile uterus ağırlıklarının arttığı önceden gösterilmiştir (24). Çalışmamızda da uterus ağırlığında azalma OVX’e eşlik etmekte ve E2 tedavisi de ağırlıkları arttırmaktadır; bu da, tedavinin beklenen olumlu etkisi olarak karşımıza çıkmaktadır.

Diyabetin artmış oksidatif stresle paralellik gösterdiği, önceki çalışmalarda da gösterilmiştir (6,7). Çalışmamızda lipid peroksidasyon

göstergesi olarak bilinen MDA düzeyi hem aortda hem de uterusda ölçümlenmiştir. Aortda hem OVX hem de OVX+DIA gruplarında görülen MDA düzeyindeki artış, E2 tedavisi ile azaltılmıştır. Yapılan çalışmalar, yumurtalık hormonlarının azalmasının önemli bir oksidatif stres kaynağı olduğunu göstermiştir (8, 23). Gerek insan gerekse hayvan çalışmalarında, E2 tedavisinin OVX ile ortaya çıkan oksidatif stresi azalttığı ve bu yönü nedeniyle de E2'nin bir antioksidan olarak nitelendirildiği görülmektedir (9, 10). E2 ile antioksidan enzimlerin ekspresyonlarının arttığına gösterilmesi de bu görüşe destek vermektedir (11). Östrojenin antioksidan etkisinin, yapısında bulunan fenolik halkadan kaynaklandığı ve lipid peroksidasyonunu bu yapı aracılığıyla önlediği de gösterilmiştir (5). Uterus MDA düzeyleri değerlendirildiğinde ise, OVX grubuna uygulanan E2 tedavisinin, MDA düzeylerini arttırdığı görülmüştür. OVX+DIA grubunda E2 tedavisi ile MDA düzeylerinde azalma gözlenmiş olsa da, ortaya çıkan tablo, yine de bu değerlerin hem OVX+E2 hem de OVX grup değerlerinden anlamlı olarak yüksek olduğunu göstermektedir. Yapılan çalışmalarda, uterus MDA düzeyleri ile plazma östradiol düzeyleri arasında sıkı bir ilişki olduğu saptanmıştır (24, 25). Yine aynı çalışmalarda, OVX hayvanlara uygulanan östrojen tedavisinin, uterus MDA düzeylerini arttırdığı da saptanmıştır. Bunun nedeni, östrojenin bu dokuda prooksidan özelliğinin olduğu biçiminde açıklanabilmektedir. Aort dokusunda antioksidan enzimlerden KAT ve GPx aktiviteleri de incelenmiş ve gerek OVX gerekse OVX+DIA'da her iki enzimin aktivitelerinin artmış olduğu görülmüştür. KAT ve GPx, özellikle H₂O₂'nin aşırı üretilmesi sonucu ortaya çıkan peroksidatif stresi detoksifiye etmekle sorumlu olan antioksidan enzimlerdir. KAT aktivitesindeki artışın nedeni H₂O₂ üretimindeki artış olarak gösterilmektedir ve hipoinsülinemide, açıl KoA redüktaz etkinliğinin artması ile β-oksidasyon sonucu H₂O₂ üretiminin de arttığı bildirilmiştir (21). H₂O₂ kaynaklı zararlı etkilerin başında ise, H₂O₂'nin hücrelere kolayca girebilmesi sonucunda, demir ve bakır gibi geçiş elementleriyle kolayca reaksiyon (Haber-Weiss Reaksiyonu)

vermesi yer almaktadır. KAT gibi, GPx aktivitesinde artış da oksidatif stresin bir sonucu olarak ortaya çıkmakta ve bu artış, süperoksid dismutazın (SOD) H₂O₂'nin zararlı etkilerinden korunmasını sağlamaktadır (21). SOD'un bu şekilde artışı da, hem KAT'ı hem de GPx'i, süperoksid anyon radikalinin (O₂^{•-}) zararlı etkilerinden korumaktadır; böylece, net sonuç KAT ve GPx düzeylerinde artış olarak ortaya çıkmaktadır (26). Yapılan çalışmalarda aort dokusunda gerek KAT gerekse GPx aktivitesinin, diyabetik hayvanlarda arttığı gösterilmiştir (6, 7). Si ve arkadaşları (27), E2'nin antioksidan etkisini gösterebilmek amacıyla, aortik dokuda parakuat ile oksidatif stres oluşturmuş, KAT ve GPx aktivitesinin aortda E2 tedavisi ile arttığını göstermiştir. Çok yeni bir çalışmada ise, OVX ile "Dahl" tuz duyarlı sıçanlarda oksidatif stresin arttığı ve reaktif oksijen türleri üreten sistemlerin aktive olduğu, üriner H₂O₂'nin artmış olmasının bunun bir kanıtı olduğu belirtilmiştir. Çalışmada E2 tedavisinin tüm bunları düzelttiği, dolayısıyla da E2'nin bir antioksidan olduğu gösterilmiştir (28). Bu bilgiler ışığında, tedavisiz grup aortlarında KAT ve GPx enzim aktivasyonlarının indüklenmiş olması, sözü edilen gruplarda, oksidatif stresin artmış olduğunun bir göstergesidir ve enzim sisteminin aktiviteyasyonunun artmış olması da dokuyu oksidatif hasardan koruma amaçlı bir mekanizma olarak gösterilebilmektedir. Gerek diyabetik gerekse diyabetik olmayan grupta bu enzim sisteminin aktivasyonunun E2 tedavisi ile azaltılmış olması, E2'nin bu dokudaki antioksidan etkisinin bir kanıtı olarak karşımıza çıkmaktadır. E2 bu dokuda antioksidan etkisini göstererek oksidatif stresi azaltmış, dolayısıyla da enzim aktivitelerinin de düşmesine neden olmuştur. Uterusta ise aortdaki durumun tersine, E2 tedavisi alan gruplarda hem KAT hem de GPx aktivitesinin arttığı bulunmuştur; ancak, KAT aktivitesindeki bu artışın gruplar arasında istatistiksel bir anlamı olmadığı görülmüştür. Endojen östrojenler sitokrom P-450 enzim sistemindeki enzimlerle hidrosillenerek, kinon ve semikinonları oluşturmakta (29) ve bu ürünler de O₂^{•-}'nin oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Oluşan O₂^{•-} metallerle kolayca reaksiyona



girerek hidroksil anyon raikali oluşumuna, dolayısıyla da DNA hasarına ve kansere neden olmaktadır (30). Mobley ve arkadaşları (31), genotoksik bir madde olan 8-oxo-2'-deoksiguanozin ile karşılaştırma yoluyla, 2-hidroksiöstradiol ve 4-hidroksiöstradiol ile oksidatif stresin arttığını ve glutatyon, SOD ve KAT gibi antioksidan enzimlerinin aktivasyonlarının da artarak, DNA hasarını azalttığını saptamışlardır. Bununla birlikte, OVX'te E2 tedavisi ile artmış olan MDA konsantrasyonunun, KAT aktivitesinde artmaya neden olduğu da gösterilmiştir (25). Bu durumun, artmış olan oksidatif strese ve lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu bir mekanizma olarak ortaya çıktığı saptanmıştır. Çalışmamız, E2 tedavisinin uterus dokusunda enzim aktivitesinde artmaya neden olarak, artmış olan lipid peroksidasyonunun ve olasılıkla yükselmiş olan oksidatif stresin azalmasına katkıda bulunduğunu göstermektedir.

Çalışma sonuçlarımız, E2 tedavisinin OVX ve OVX+DIA'da, deney hayvanlarının beden ağırlıklarını düzenlemeye yardımcı olduğunu, kan glukozunu etkilemediğini ve azalmış olan uterus ağırlıklarını arttırdığını göstermektedir. Sonuçlarımız aynı zamanda, E2'nin doku çeşidine bağlı olarak, prooksidan ya da antioksidan özellik gösterdiğini de vurgulamaktadır.

KAYNAKLAR

1. Khan NS, Malthora S. Effect of hormone replacement therapy on cardiovascular disease: current opinion. *Expert Opin Pharmacother*, 2003; 4: 667–674.
2. Grimes DA, Lobo RA. Perspectives on the Women's Health Initiative trial of hormone replacement therapy. *Obstet Gynecol*, 2002; 100: 1344–1353.
3. Gerhard M, Ganz P. How do we explain the clinical benefits of estrogen? From bedside to bench. *Circulation*, 1995; 92: 5–8.
4. Guiochon-Mantel A. Regulation of the differentiation and proliferation of smooth muscle cells by the sex hormones. *Rev Mal Respir*, 2000; 17: 604–608.
5. Green PS, Gordon K, Simpkins JW. Phenolic A ring requirement for the neuroprotective effects of steroids. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1997; 63: 229–235.

6. Ozansoy G, Akın B, Aktan F, Karasu C. Short-term gemfibrozil treatment reverses lipid profile and peroxidation but does not alter blood glucose and tissue antioxidant enzymes in chronically diabetic rats. *Mol Cell Biochem*, 2000; 216: 59–63.

7. Hunkar T, Aktan F, Ceylan A, Karasu C. Effects of cod liver oil on tissue antioxidant pathways in normal and streptozotocin-diabetic rats. *Cell Biochem Funct*, 2002; 20: 297–302.

8. Munoz-Castaneda JR, Muntane J, Herencia C, et al. Ovariectomy exacerbates oxidative stress and cardiopathy induced by adriamycin. *Gynecol Endocrinol*, 2006; 22: 74–79.

9. Oztekin E, Tiftik AM, Baltacı AK, Mogulkoc R. Lipid peroxidation in liver tissue of ovariectomized and pinealectomized rats: effect of estradiol and progesterone supplementation. *Cell Biochem Funct*, 2006; 7: 551–554.

10. Munoz-Castaneda JR, Montilla P, Munoz MC, et al. Effect of 17-beta-estradiol administration during adriamycin-induced cardiomyopathy in ovariectomized rat. *Eur J Pharmacol*, 2005; 523: 86–92.

11. Kim YD, Farhat MY, Myers AK, et al. 17-Beta estradiol regulation of myocardial glutathione and its role in protection against myocardial stunning in dogs. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1998; 32: 457–465.

12. Bolego C, Cignarella A, Zancan V, et al (1999). Diabetes abolishes the vascular protective effects of estrogen in female rats. *Life Sci*, 1999; 64: 741–749.

13. Yagi K. Lipid peroxides and human disease. *Chem Phys. Lipids*, 1987; 45: 337–351.

14. Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun*, 1976; 71: 952–958.

15. Aebi HE. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*, 1983; 105: 121–126.

16. Carr MC. The emergence of the metabolic syndrome with menopause. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003; 88: 2404–2411.

17. Chu MC, Cosper P, Orio F, Carmina E, Lobo RA. Insulin resistance in postmenopausal women with metabolic syndrome and the measurements of adiponectin, leptin, resistin, and ghrelin. *Am J Obstet Gynecol*, 2006; 194: 100–104.

18. Choi SB, Jang JS, Park S. Estrogen and exercise may enhance beta-cell function and mass via insulin receptor substrate 2 induction in ovariectomized diabetic rats. *Endocrinology*, 2005; 146: 4786–4794.
19. Kavanagh K, Kouidy WJ, Wagner JD. Naturally occurring menopause in cynomolgus monkeys: changes in hormone, lipid, and carbohydrate measures with hormonal status. *J Med Primatol*, 2005; 34: 171–177.
20. Pfaffman MA, Hilman R, Darby A. Contractile and relaxing activity of arterial smooth muscle from streptozotocin-diabetic rats. *Res Commun ChemPathol Pharmacol*, 1980; 30: 283–299.
21. Ceylan A, Karasu C, Aktan F, Ozansoy G. Simvastatin treatment restores vasoconstriction and the inhibitory effect of LPC on endothelial relaxation via affecting oxidizing metabolism in diabetic rats. *Diabetes Nutr Metab*, 2004; 17: 203–210.
22. Geary GG, Krause DN, Duckles SP. Estrogen reduces myogenic tone through a nitric oxide-dependent mechanism in rat cerebral arteries. *Am J Physiol*, 1998; 275: H292-H300
23. Ha BJ, Lee SH, Kim HJ, Lee JY. The Role of Salicornia herbacea in Ovariectomy-Induced Oxidative Stress. *Biol Pharm Bull*, 2006; 29: 1305–1309.
24. Gomez-Zubeldia MA, Corrales S, Arbues J, Nogales AG., Millan J.C. Influence of estradiol and gestagens on oxidative stress in the rat uterus. *Gynecol Oncol*, 2002; 86: 250–258.
25. Gomez-Zubeldia MA, Hinchado G, Arbues JJ, Nogales AG, Millan JC. Influence of estradiol on oxidative stress in the castrated rat uterus. *Gynecol Oncol*, 2001; 80: 227–232.
26. Kakkar R, Kalra J, Mantha SV, Prasad K. Lipid peroxidation and activity of antioxidant enzymes in diabetic rats. *Mol.Cell Biochem*, 1995; 151: 113-119.
27. Si ML, Al-Sharafi B, Lai CC, et all. Gender difference in cytoprotection induced by estrogen on female and male bovine aortic endothelial cells. *Endocrine*, 2001; 15: 255–262.
28. Zhang L, Fuji S, Kosaka H. Effect of oestrogen on reactive oxygen species production in the aortas of ovariectomized Dahl salt-sensitive rats. *J Hypertens*, 2007; 25: 407–414.
29. Martucci CP, Fishman J. P450 enzymes of estrogen metabolism. *Pharmacol Ther*, 1993; 57: 237–257.
30. Wang MY, Dhingra K, Hittelman WN, et all. Lipid peroxidation-induced putative malondialdehyde-DNA adducts in human breast tissues. *Cancer Epidemiol Prev*, 1996; 5: 705–710.
31. Mobley JA, Bhat AS, Brueggemeier RW. Measurement of oxidative DNA damage by catechol estrogens and analogues in vitro. *Chem Res Toxicol*, 1999; 12: 270–277.

Yazışma Adresi

Aslı F. CEYLAN-IŞIK
Ankara Üniv. Ecz. Fak.Farmakoloji A.D. / Ankara
E-mail: aceylan@pharmacy.ankara.edu.tr

