



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

**OOFEREKTOMİZE RATLARDA
ÖSTROJEN TEDAVİSİNE EKLENEN
MELATONİN VE DEKSPANTENOL'ÜN
ANTİOKSİDAN PARAMETRELER ÜZERİNE
ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. OZAN TURGUT

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Samet KAFKAS

AYDIN- 2009

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

**OOFEREKTOMİZE RATLARDA
ÖSTROJEN TEDAVİSİNE EKLENEN
MELATONİN VE DEKSPANTENOL'ÜN
ANTİOKSİDAN PARAMETRELER ÜZERİNE
ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. OZAN TURGUT

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Samet KAFKAS

AYDIN- 2009

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince, bilgi, görgü ve sabırlarını esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ergün ONUR'a,

Tez çalışmam ve eğitimim süresince bilgi birikimi ve pratik görüşleriyle beni yönlendiren, değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Samet KAFKAS'a, uzmanlık eğitimime değerli katkılarda bulunan ve mesleki gelişimimde büyük emeği geçen, başta Anabilim Dalı Başkanımız değerli hocam Doç. Dr. Ali Rıza ODABAŞI'na ve değerli hocalarım Sayın Doç. Dr. Hasan YÜKSEL'e, ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Selda DEMİRCAN SEZER'e,

Ayrıca tezimin hazırlanmasında emeği geçen Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Çiğdem YENİSEY'e, ve Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Turhan DOST'a,

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm asistan arkadaşlarıma, kliniğimiz hemşire ve personeline,

Her zaman bana destek olan sevgili eşime,

TEŞEKKÜR EDERİM...

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
TABLO DİZİNİ	iii
ŞEKİL DİZİNİ	iv
KISALTMALAR DİZİNİ	v
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER:	3
2.1. Oksijen Toksisitesi Nedir	3
2.2. Antioksidatif Sistem ve Hücrel Korunma Mekanizmaları Nelerdir	5
2.3. Östrojenin Oksidatif Sistem Üzerindeki Etki Mekanizması ve Östrojen Replasman Tedavisinin (ERT) Önemi	11
2.4. Melatonin ve Oksidatif Stres ile İlişkisi	14
2.5. Dekspantenol ve Oksidatif Stres ile İlişkisi	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1. Gereçler	24
3.2. Çalışma Grupları	24
3.3. Kan Örneklerinin Alınması, İşlenmesi ve Saklanması	25
3.4. Çalışmada Kullanılan Yöntemler	25
3.5. İstatistiksel Değerlendirme	28
4. BULGULAR	29
5. TARTIŞMA	38
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	50
ÖZET	51
İNGİLİZCE ÖZET	52
KAYNAKLAR	54

TABLO DİZİNİ

Tablo 1: Gruplardaki GSH düzeylerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi

Tablo 2: Gruplardaki GPx düzeylerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi

Tablo 3: Gruplardaki GR düzeylerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi

Tablo 4: Gruplardaki MDA düzeylerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi

Tablo 5: Gruplardaki SOD düzeylerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi

Tablo 6: Gruplardaki NO düzeylerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi

Tablo 7: Gruplardaki CAT düzeylerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi

ŞEKİL DİZİNİ

- Şekil 1: Oksijen metabolizmasının ürünleri
- Şekil 2: Hücre içindeki anti-oksидatif sistemler
- Şekil 3: Eritrositlerde yer alan anti-oksидatif enzim sistemleri
- Şekil 4: Oksидatif savunma mekanizmaları
- Şekil 5: Süperoksид anyonunun dismutazı ve anti-oksидatif enzimlerin çalışması
- Şekil 6: Pineal bezde melatonin sentezinin şematik gösterilişi
- Şekil 7: Melatonin'in serbest radikal temizleyici özelliği
- Şekil 8: Nötrofillerde MPO'nun yer aldığı reaksiyonlar
- Şekil 9: Peroksinitrit anyonu (OONO^-), hidroksil radikaline (OH^\bullet) parçalanması
- Şekil 10: Antioksidan enzimler üzerinde melatonin etkileri
- Şekil 11: GSH düzeylerinin grafiksel olarak gösterilişi
- Şekil 12: GPx düzeylerinin grafiksel olarak gösterilişi
- Şekil 13: GR düzeylerinin grafiksel olarak gösterilişi
- Şekil 14: MDA düzeylerinin grafiksel olarak gösterilişi
- Şekil 15: SOD düzeylerinin grafiksel olarak gösterilişi
- Şekil 16: NO düzeylerinin grafiksel olarak gösterilişi
- Şekil 17: CAT düzeylerinin grafiksel olarak gösterilişi

KISALTMALAR DİZİNİ

- CAT: Katalaz
CEE: Konjuge Ekin Östrojen
ERT: Estrogen Replacement Therapy; Östrojen Replasman Tedavisi
GSH: Glutasyon
GSSG: Glutasyon Disülfid
GPx: Glutasyon Peroksidaz
GR: Glutasyon Redüktaz
HDL: High Density Lipoprotein ; Yüksek Dansiteli Lipoprotein
HRT: Hormone Replacement Therapy; Hormon Replasman Tedavisi
H₂O₂: Hidrojen Peroksit
HOCl: Hipoklorik Asit
KVH: Kardiyovasküler Hastalık
LDL: Düşük Dansiteli Lipoprotein
LPO: Lipid Peroksidasyonu
MPO: Myeloperoksidaz
MDA: Malondialdehit
NO: Nitrik Oksit
NOS: Nitrik Oksit Sentaz
O₂^{•-} : Süperoksit radikali
ONOO⁻: Peroksinitrit radikali
•OH: Hidroksil radikali
ROT: Reaktif oksijen türleri
SOD: Süperoksit Dismutaz
TBARS: Tiobarbituric Acid Reactive Substance; Tiyobarbitürik Asit Reaktif Substans
TAS: Total Antioksidan Status
VLDL: Very Low Density Lipoprotein; Çok Düşük Dansiteli Lipoprotein
VSMCs: Vascular Smooth Muscle Cells; Vasküler Düz Kas Hücresi

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Menopozla beraber oluşan östrojen kaybının, kardiyovasküler hastalıklarda (KVH) risk artışına katkıda bulunduğu gibi osteoporoz, sıcak basması, depresyon, nörodejeneratif hastalıklar gibi bir takım sağlık problemlerinde de artışa sebep olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Bu sağlık problemlerinin azaltılmasında hormon replasman tedavisi (HRT) en yaygın olarak kullanılan ajandır (1, 2).

Yapılan bir çok çalışmada postmenapozal kadınlarda azalmış östrojen sentezinin, oksidatif stresin artmasından sorumlu olduğu öne sürülmektedir (3, 4, 5, 6). Menopozal dönemde östrojen eksikliği nedeniyle östrojenin koruyucu etkisinden muaf olunması oksidatif stresi içeren ciddi metabolik bozukluklara neden olmaktadır (7).

Oksidatif stres kanser, ateroskleroz, osteoporoz ve yaşlanma gibi bir takım rahatsızlıkların patofizyolojisinde önemli rol almaktadır. Lipid peroksidasyonu doymamış yağ asitlerinin reaktif oksijen radikalleri ile zincirleme reaksiyonu olarak bilinir. Aynı zamanda protein, lipit, ve özellikle düşük dansiteli lipoprotein (LDL) oksidatif strese maruz kalır. Özellikle LDL oksidasyonu ateroskleroz gelişiminde anahtar rol oynamaktadır (8, 9).

Yaşam süresinin artması, postmenopozda geçirilen sürenin artmasıyla sonuçlandığından, kadınların bu döneme özgü olan hastalıklara daha çok maruz kalmalarına yol açmaktadır. Dolayısıyla bu döneme özgü hastalıkların tedavisi giderek daha önemli hale gelmektedir.

Melatonin (MT), serbest radikal oluşumunu artırarak doku hasarına neden olan çeşitli ajanlara karşı, koruyucu olarak yaygın bir şekilde kullanılır. Hem fizyolojik hem de farmakolojik dozlarda serbest radikal yakalayıcı ajan ve antioksidan özelliği olan bir hormondur. Oksidatif stresi anlamlı olarak azaltmakla birlikte, antioksidan sistemi de stimüle etmektedir (10,11, 12, 13).

Dekspantenol (Dxp) ise Pantotenik asit'in (PA) biyolojik aktif alkol derivesi olup, lipid peroksidasyonu ve oksidatif strese karşı en önemli savunma sistemi olan glutasyon ve glutasyon peroksidaz aracılığı ile antioksidan etki göstermektedir(14, 15).

HRT veya bu tedaviye ek olarak verilen antioksidanların, oksidatif sistem üzerine etkilerinin değerlendirildiği çeşitli çalışmalarda, oksidatif sistemi olumlu olarak

etkiledikleri, KVH ve oksidatif stresle ilişkili hastalıklarda yararlı etkide bulunabilecekleri gösterilmiştir (16, 17, 18, 19).

Bu araştırmada oofektomize ratlarda, östrojen tedavisine eklenen melatonin ve deksantenol' ün antioksidan parametreler üzerine etkisi araştırıldı. Böylece menopozda östrojen eksikliği sonucu artan oksidatif stresin, östrojen tedavisine ek olarak verilen antioksidanlarla azaltılıp, başta KVH'lar olmak üzere osteoporoz, gibi hastalıkların önlenebileceği düşünöldü.

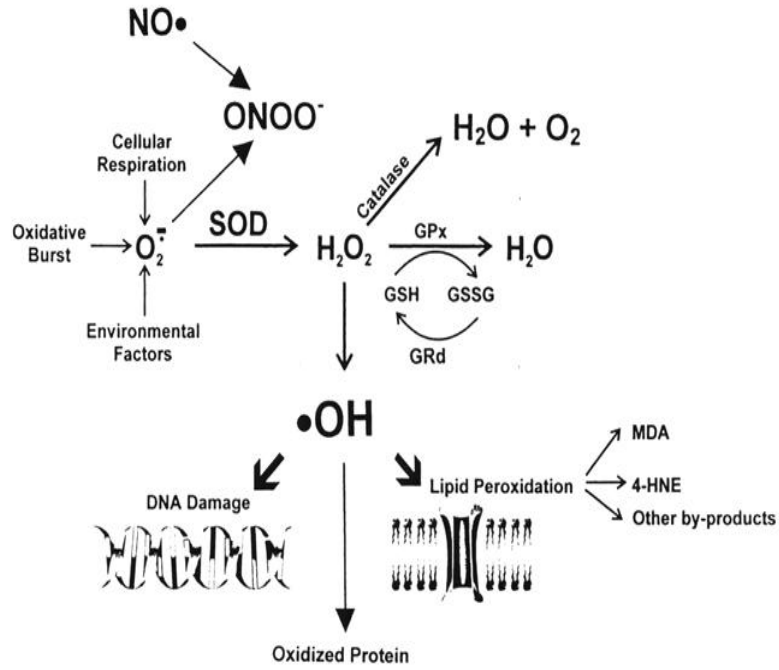
2. GENEL BİLGİLER:

2.1. Oksijen Toksisitesi Nedir?

Moleküler oksijen (O_2) temel olarak metabolizma için gerekli olup aynı zamanda aerobik organizmalarda bir zehir görevini görmektedir. Oksijen, oksidatif fosforilasyon yoluyla mitokondrilerde enerji üretimi için gerekli iken, oksijen yoluyla oluşan diğer ürünler, hücrelerin optimal fonksiyonları görebilmelerini de engelleyebilmektedir. Böylece, O_2 majör çevresel kirlilik yaratan bir molekül olarak değerlendirilmektedir (20).

Oksijen molekülü, serbest radikaller ve reaktif türler olarak tanımlanan ürünleri yoluyla, hücrelerde esansiyel olan makromolekülleri bozmakta ve böylece fizyolojik etkilerini azaltmaktadır. Devamlı bir şekilde, bu moleküler yıkım sürdüğünde, organellerin yaşamları kısalmakta ve apoptozis veya nekroz yoluyla hücrelerin ölümleri görülmektedir (20).

Aeroblar tarafından inhale edilen O_2 'nin %95'inden fazlası mitokondrilerde ATP üretiminde kullanılmaktadır. Geri kalan ise, kimyasal olarak indirgenmekte ve süperoksit anyon radikalini ($O_2^{\bullet-}$) oluşturmaktadır (Şekil 1). $O_2^{\bullet-}$ normal hücresel fonksiyonlar neticesinde üretilebildiği gibi, ilaçların metabolizması, makrofajlardaki oksidatif patlama, psikolojik, fiziksel stres ve radyasyon gibi çevresel faktörler sonucunda da üretilmektedir. Bütün bu olayların sonucunda, ortalama 70 kg bir kişide her yıl yaklaşık 2 kg $O_2^{\bullet-}$ üretildiği tahmin edilmektedir (20).



Şekil 1: Oksijen metabolizmasının ürünleri.

Bu durum oksijen toksisitesinin sınırlı bir şekilde kaldığı dikkate alındığı zaman tahmin edilebilen bir durumdur. Oysa $O_2^{\bullet-}$ daha reaktif, yani daha hızlı tepkimeye giren ve daha yıkıcı ürünlere dönüşebilmektedir. Örneğin, nitrik oksit ($NO\cdot$) ile reaksiyona girerek, reaktif nitrojen bileşiği olan, peroksinitrit anyon radikali'ni ($ONOO^-$) oluşturmakta olup, bu molekül çok daha yıkıcı bir etkiye sahiptir (20).

Ayrıca, $O_2^{\bullet-}$ spontan ve enzimatik olarak hidrojen peroksit'e (H_2O_2) dönüşmektedir. Bu reaksiyonda gerekli olan enzim süperoksit dismutaz (SOD) olarak adlandırılır, CuZnSOD ve MnSOD olmak üzere iki farklı formu olup, hücre içindeki dağılımları farklıdır. H_2O_2 bir serbest radikal değildir, toksisitesi düşüktür, bununla beraber yarı ömrü uzun olup (saniyeler içinde), hücre membranı boyunca geçebilmekte, bu esnada serbest radikal oluşumlarını indükleyerek hücre hasarına neden olmaktadır. H_2O_2 enzimatik olarak $O_2^{\bullet-}$ 'e parçalanmaktadır ve bu arada bir kısmı kurtulmakta ve geçiş metallere (çoğunlukla demir) varlığında, H_2O_2 , hidroksil radikali ($\cdot OH$) metabolize olmaktadır. Bu, Fenton reaksiyonu olarak bilinmekte ve bu yolla oluşan $\cdot OH$ 'in hücreler için çok yıkıcı olduğu bilinmektedir. Yine, hücrelerdeki

total moleküler hasarın %50'den fazlasının $\cdot\text{OH}$ yoluyla olduğu tahmin edilmektedir. Bu molekülün hücrelere saldırması tümüyle rastgeledir. Bu moleküller lipidler, DNA, proteinler, karbohidratlar v.b. moleküller olabilmektedir ve bu nedenle lipidlerin, DNA moleküllerinin ve proteinlerin bozulmaya uğramış ürünlerinin ölçülmesi, tipik olarak genellikle serbest radikal hasarının ve özellikle de $\cdot\text{OH}$ hasarının bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Özellikle hücre membranındaki doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu sonucunda oluşan malondialdehid (MDA) seviyelerinin ölçülmesi ile biyolojik sistemlerde lipid peroksidasyonunun değerlendirilmesi yapılabilmektedir. $\text{O}_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 'in aksine, $\cdot\text{OH}$ hücrelerde enzimatik olarak detoksifikasyona uğramamaktadır. Böylece, sadece serbest radikal temizleyicileri ile direkt olarak nötralize edilebilmektedir (20).

Neticede serbest oksijen radikalleri normal metabolizma sırasında sürekli olarak üretilmekte olup, bunun sonucunda membran fosfolipidlerinde peroksidasyona, protein, karbohidrat ve DNA moleküllerinde de çeşitli hasarlara sebep olurlar.

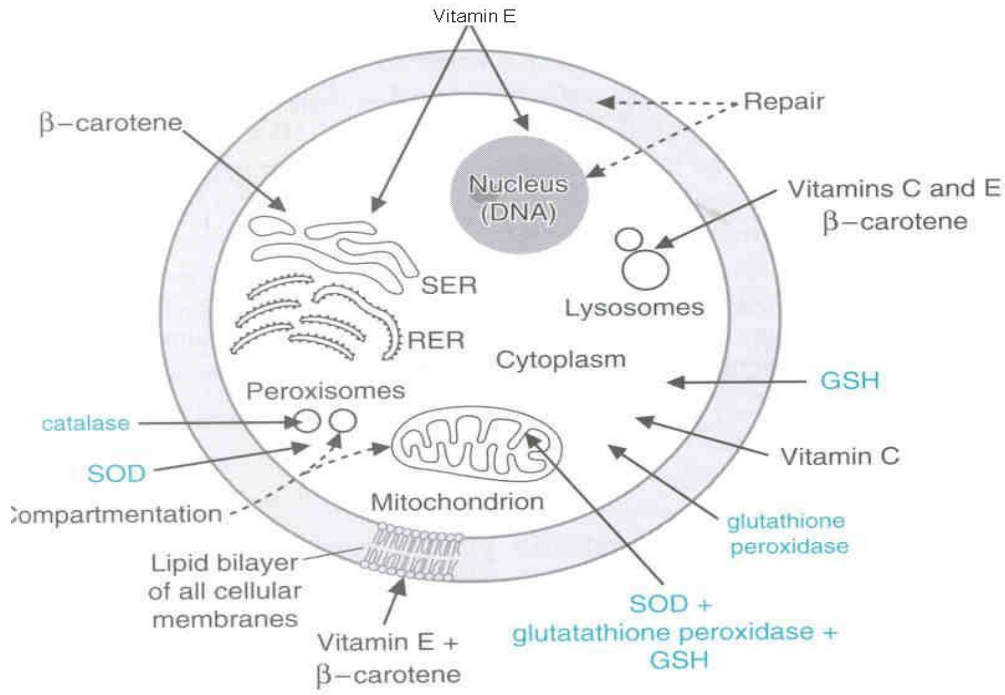
Deneyel ve epidemiyolojik çalışmalar, ateroskleroz, KVH, iskemi-reperfüzyon hasarları, dolaşımsal şok hasarı, romatoid artrit, kanser, enfeksiyon, beyin ve derinin dejeneratif bozuklukları ve yaşlanma ile ilişkili bazı hastalıkların patogeneğinde, serbest oksijen radikallerinin etkili olduğunu göstermektedir. (21, 22, 23).

2.2. Antioksidatif Sistem ve Hücresel Korunma Mekanizmaları Nelerdir?

Deneyel çalışmalarda, en çok kullanılan antioksidanlar vitaminler olup, bunlar; askorbik asit, tokoferol ve β -karoten'dir. Bunlar diyetle alınabilmekte olup, reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin neden olduğu moleküler hasarın azaltılmasında kullanılan anahtar moleküllerdir. Vitaminlerin, genellikle antioksidan etkilerinin olduğu düşünölmekle birlikte, bazı durumlarda toksisite ve hatta pro-oksidan olarak davrandıkları rapor edilmiştir (20).

İnsanlarda serumdaki antioksidatif kapasite, enzimatik ve non-enzimatik sistem ile ilişkilidir. Vitamin E, A ve C, albumin, urat, sistein, serüloplazmin, transferrin, tiroksin, selenyum (Se) ve glutatyon (GSH) gibi anti-oksidatif moleküller, serbest radikal temizleyicileridirler. Östrojenlerin, serbest radikal temizleyici

özelliğinin, fenol halkalarından hidrojen atomunu alma gücüne sahip olmasına bağlı olarak, membranlardaki fosfolipidlerin peroksidasyonunu ve düşük dansiteli lipoproteinlerin (LDL) oksidasyonunu inhibe etmesi nedeniyle, anti-oksidatif etkileri olduğu rapor edilmiştir. Bazı araştırmacılar, östrojenlerin aynı zamanda, hücresel anti-oksidatif enzim sistemlerini etkileyebileceğini de ileri sürmüşlerdir (24). Anti-oksidatif enzim sistemlerine süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) enzimleri dahildir. GPx enzimi hücrelerde en çok bulunan bir molekül olup, majör anti-oksidan olarak tanımlanan GSH ile birlikte çalışmaktadır (Şekil 2).

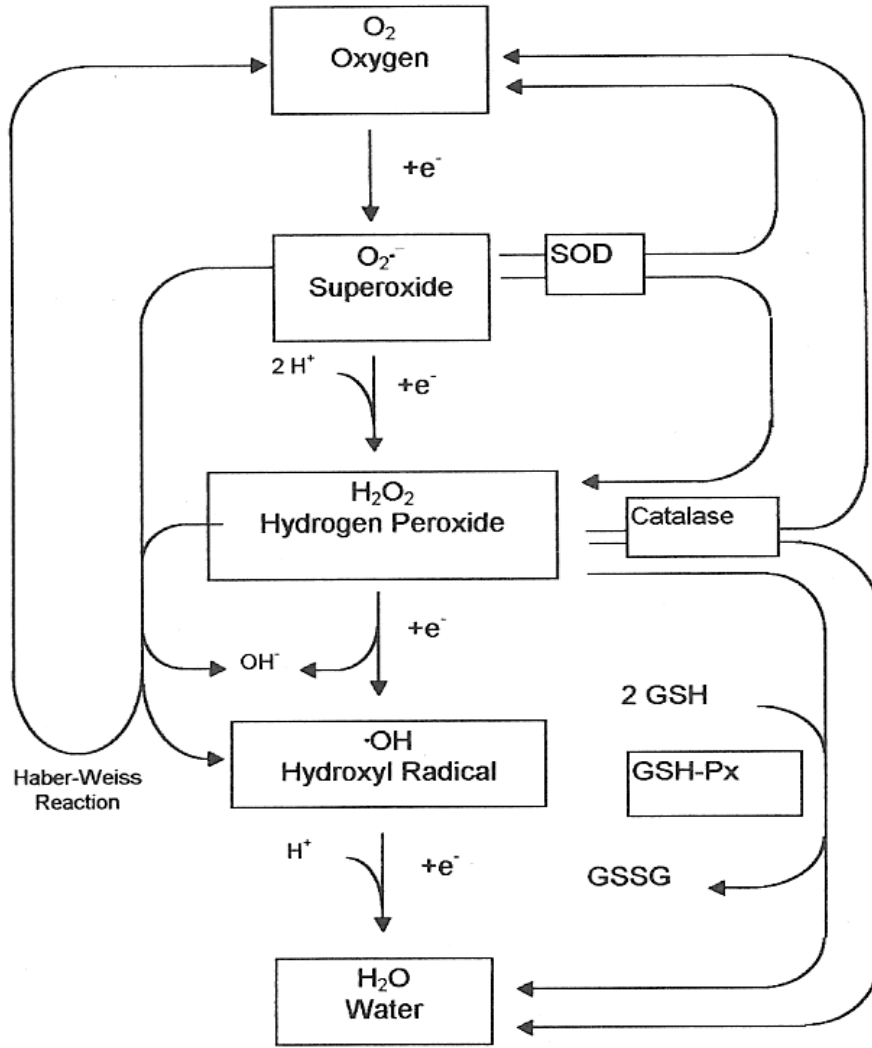


Şekil 2: Hücre içindeki anti-oksidatif sistemler (Basic Medical Biochemistry A Clinical Approach, Second Edition, Colleen Smith, Ph.D., Allan D. Marks, MD, Michael Lieberman, Ph.D. Lippincott Williams & Wilkins, Kluwer Company, USA)

Vitaminlerin yanı sıra, direkt olarak serbest radikal temizleyicisi veya indirekt yolla, antioksidan olarak davranan birçok molekül bulunmaktadır. Endojen antioksidatif savunma mekanizmaları oksijen ve nitrojen'den kaynaklanan reaktif ürünlerin neden olduğu moleküler düzeydeki toksisiteyi azaltmaktadır. Bu sistemler

yüksek oranda reaktif olan hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$), çiftleşmemiş oksijen, hidrojen peroksit (H_2O_2), nitrik oksit ($\text{NO}\cdot$) ve peroksinitrit anyonu'nu (ONOO^-) detoksifikasyona uğratmakta ve aynı zamanda çeşitli antioksidatif enzim sistemlerini stimüle etmektedirler (25).

Antioksidanlar ya direkt olarak serbest radikalleri ve reaktif oksijen türlerini temizlerler, ya da indirekt olarak serbest radikalleri veya onların ara ürünlerini metabolize ederler ve zararsız ürünlere dönüştürürler. Birçok antioksidan enzim yapısında olup, toksik molekülleri ya hücrelere zarar vermeden önce yok ederler ya da onlardan oluşacak olan toksik moleküllerin meydana gelmesini önlerler (25).



Şekil 3: Eritrositlerde yer alan anti-oksidatif enzim sistemleri (Free Radicals, Oxidative Stres, and Antioxidants, Edited by Tomris Özben, NATO ASI Series, Life Sciences vol.296)

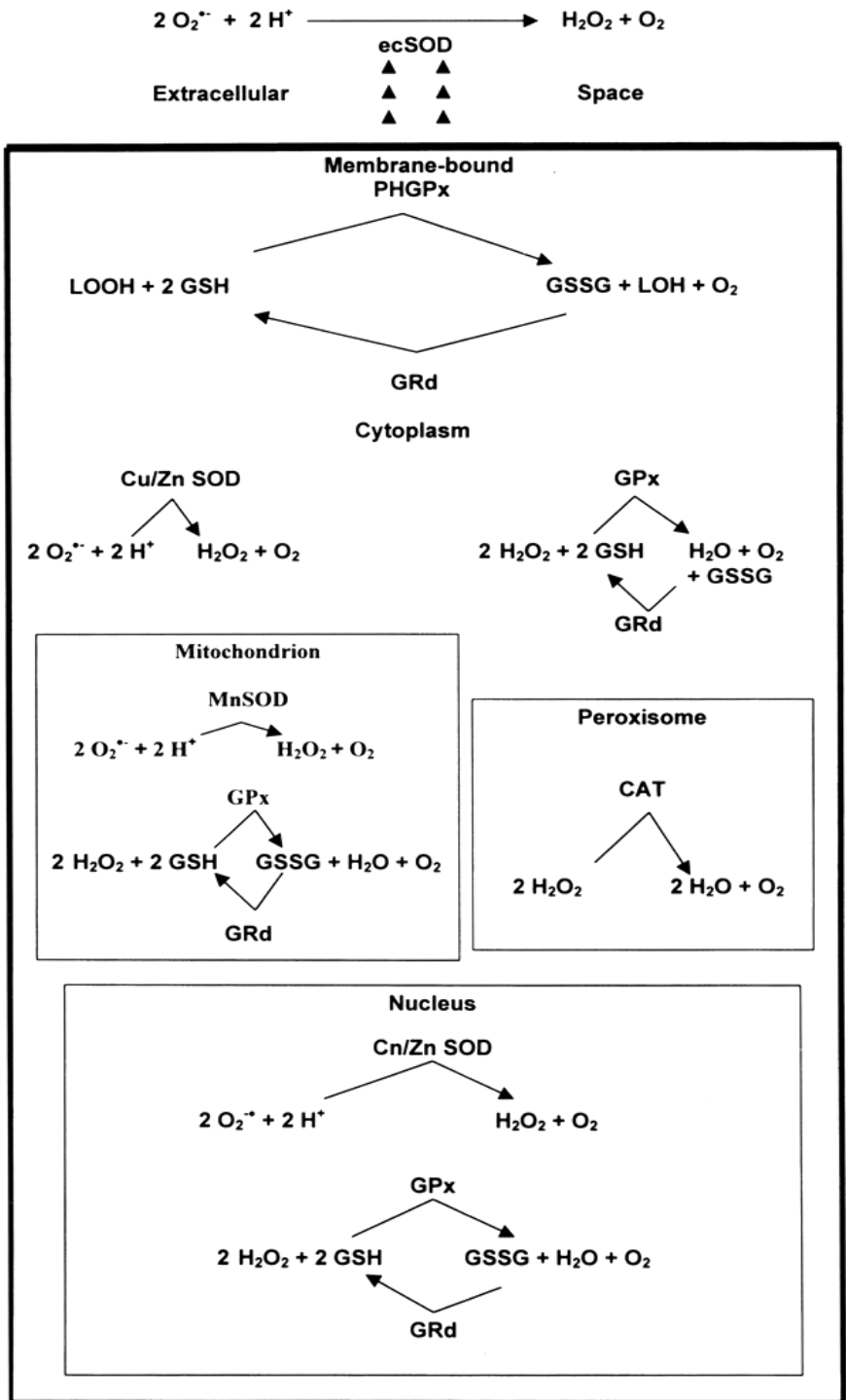
Bütün aerobik hücrelerde redoks durumlarının sürdürülebilmesi için mutlaka glutatyon'un (γ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycine) indirgenmiş formunda yani GSH olarak tutulması gerekmektedir. Direkt olarak serbest radikal temizleyicisi olarak görev yapan GSH, aynı zamanda, H₂O₂'in H₂O'ya indirgenmesini ve katalize eden bir enzim olan glutatyon peroksidaz (GPx) enziminin ko-substratıdır (Şekil 3). Bu sırada lipid hidroperoksidler GSH'ı, disülfid şekline (GSSG) okside ederler. Normalde, GSH/GSSG oranı; 99/ <1'dir. Eğer bu oran GSSG lehine değişir ise, yani GSSG oranı daha da yükselir ise, bu hücreler için oldukça zararlı olmaktadır. Sitozolik bir

enzim olan glutatyon redüktaz (GR), GSSG'den GSH'ın tekrar elde edilmesi için çok önemlidir (20).

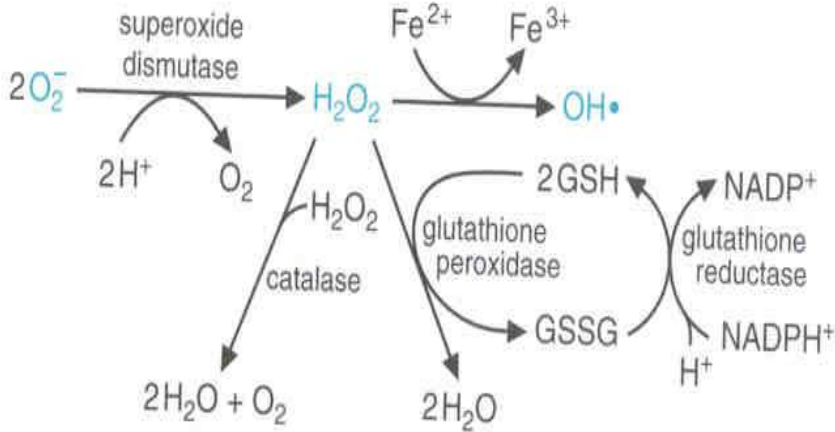
Enzimler, hücrelerin alt birimlerinde, toksik maddelerin temizlenmesinde çok önemli rol oynamaktadır. Antioksidatif etkileri olan enzimler süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR) ve katalaz (CAT) olup, hücrelerde lokalize olmuşlardır. Şekil 4 'de bu katalitik ajanların hücre içinde dağılımı görülmektedir.

GPx ve CAT, katalitik olarak hücrelerden H_2O_2 ve lipid peroksitleri temizlemekte ve böylece $\cdot OH$ oluşumunu önlemektedirler. Bu işlem sırasında, GPx, GSH'ı oksitlenmiş ürünlerine yani GSH disülfid yapısına (GSSG) dönüştürmektedir. GR ise, GSSG'yi tekrar GSH'a dönüştürmekte olup, böylece radikal hasarını azaltmakta işe yaramaktadır. GPx 'in hücrelerden H_2O_2 çıkarmasının yanı sıra, aynı zamanda $OONO^-$ azaltma görevi vardır, böylece oksidatif stresi azaltmakta ek bir katalitik fonksiyonu vardır (20).

SOD ise, anti-oksidatif sistemde ilk harekete geçen enzim olup, çok toksik olan süperoksit anyonunun dismutasyonunu katalizlemektedir. Süperoksit anyonunun dismutasyonu yoluyla oluşan hidrojen peroksit (H_2O_2) ise GPx veya CAT yoluyla inaktive olmaktadır (Şekil 5). CAT ise, GPx aktivitesi eksikliğinde bu enzimin aktivitesini kompanse etmektedir. GPx enzimi, dokuları H_2O_2 ve lipoperoksitlerin oluşturduğu oksidatif hasara karşı koruyan başlıca enzimdir. GPx enzimi, aktivitesi için koenzim olarak selenyum'a (Se) ihtiyaç duymaktadır (24). Deneysel olarak SOD'un birçok durumda oksidatif hasarı azalttığı saptanmıştır. Bazı istisnai durumlarda, örneğin Down sendromunda SOD aktivitesinin arttığı saptanmış ve bunun oksidatif hasarı arttırdığı gösterilmiş olup, bu durumun $\cdot OH$ 'nin oluşumunun artması ile ilgili olduğu bulunmuştur (20).



Şekil 4: Oksidatif savunma mekanizmaları



Şekil 5: Süperoksit anyonunun dismutazı ve antioksidatif enzimlerin çalışması (Basic Medical Biochemistry A Clinical Approach, Second Edition, Colleen Smith, Ph.D., Allan D. Marks, MD, Michael Lieberman, Ph.D. Lippincott Williams& Wilkins , Kluwer Company, USA)

2.3. Östrojenin Oksidatif Sistem Üzerindeki Etki Mekanizması ve Östrojen Replasman Tedavisinin (ERT) Önemi

Oksidatif stresin aterosklerozun patogeneğinde önemli bir rol oynadığı ve radikal temizleyici enzimlerin aktivitesi ve ekspresyonu yoluyla bu etkinin değiştirebileceği araştırmalarda belirtilmiştir. Östrojenin vazoprotektif etkisinin onun antioksidan özelliği ile ilgili olduğu destekleyen çalışmalar bulunmaktadır (26).

Kanda bulunan başlıca östrojen, östradiol (E_2)dür. Kadınlarda üreme organları E_2 için majör bir hedef ise de, çeşitli dokular, örneğin vasküler duvarlar, E_2 reseptörleri içermektedirler ve böylece E_2 için hedef doku olmaya başlarlar. 17β -östradiol'ün vasküler düz kas hücrelerinde, angiotensin-II ile indüklenen serbest radikal üretimini bozduğu rapor edilmiştir. İnsan uterin damarları, safenöz venleri ve koroner arter duvarlarında E_2 reseptörleri saptanmıştır. Ayrıca diğer bir önemli bulgu ise, kadınlarda, sağlıklı ve aterosklerotik koroner arterler kıyaslandığında, aterosklerotik damarların daha az östrojen reseptörleri içerdikleri gösterilmiştir. İnsanlar ve hayvanlarda her iki türde de, vasküler düz kas hücreleri östrojen için reseptör içermektedirler (27, 28).

Östrojen eksikliğinde kadınlarda kardiyovasküler riskin arttığı saptanmış olup, bu durum lipid düşürücü, renin-anjiyotensin sistem ve kalsiyum-kanal blokajı üzerine olan etkilerine rağmen, östrojenlerin asıl etkilerini vasküler sistemde oksidatif stresi azaltmakla gösterdiği bildirilmiştir. Hidrojen peroksit, süperoksit ve hidroksil radikali direkt olarak hücrelerde toksik etki göstermekte, endotelde disfonksiyona, proliferasyona ve vasküler düz kas hücrelerinde (VSMCs) apoptozise neden olmaya ve bu durum aterosklerotik plağın destabilasyonunu ile sonuçlanmaktadır. Reaktif oksijen türlerinin (ROT) bu kötü etkileri, NO[•] molekülü yoluyla dengelenmeye çalışmakta olup, bu molekülün ateroprotektif etkilerinin olduğu bildirilmiştir. ROS'un artmasıyla, NO[•] molekülünde parçalanma olup, bu da vasküler hasara yol açmaktadır. Birçok yazar, östrojenin, NO[•] molekülünün sentezini arttırmak yoluyla vazoprotektif etkisini sürdürdüğünü bildirmiştir (26).

NO oldukça reaktif bir molekül olup, in vivo yarı-ömrünün sadece birkaç saniye olduğu saptanmıştır. Endojen olarak oluşan NO[•]'in majör yolu, nitrit (NO₂⁻) ve nitrate (NO₃⁻) oksidasyonudur. Normal fizyolojik koşullar altında, endojen NO[•] oluşumu düşük olup, sağlıklı kişilerde plazma nitrit konsantrasyonları ölçülemeyecek seviyelerdedir. NO[•]'in diğer metaboliti olan nitratın plazma konsantrasyonu, ölçülebilecek düzeylerde olup, örneğin septik şokta 100 µM/L'ye kadar yükselebilmektedir. Böbrekler yolu ile atılan nitratın, yarı ömrü 5-8 saat ve plazma klerensi 20 ml/dak düzeylerindedir. NO[•]'in direkt ölçülmesi oldukça güçtür, plazmadaki nitratın endojen olarak kaynağı sadece NO[•]'dir. Bu nedenle plazmadaki nitrat düzeyleri NO[•] üretiminin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (29,30). Östrojenin NO[•] üretimini regüle edilebileceği ve endotelial NO[•] üretiminin östrojen aracılığı ile artması nedeniyle, üreme yaşındaki kadınlarda kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu etkide bulunabileceği bildirilmiştir. Ayrıca, kadınlarda menstrüal siklusda E₂ düzeylerinin en yüksek olduğu 14. günde, NO[•] düzeylerinin en yüksek değerlere ulaştığı rapor edilmiştir (31).

Menstruasyonun ve ovaryan fonksiyonun kalıcı olarak sonlanması durumu olan menopoza, 40-55 yaşları arasında başlamakta, ortalama başlangıç yaşı ise 50'dir. Bu dönemde sık eşlik eden semptomlar olan sıcak basması, dejeneratif durumlardan olan ateroskleroz, osteoporoz, derideki atrofik değişiklikler ve yaşlılık

sürecinin hızlanması östrojen yokluğu ile tetiklenmektedir. Bu rahatsızlıkların giderilmesinde HRT mevcut, yaygın olarak kullanılan ajandır (1, 2, 32).

Postmenapozal dönemde, östrojen eksikliği nedeniyle östrojenin koruyucu etkisinden muaf olunması, ateroskleroz, osteoporoz, KVH'lar, gibi patofizyolojisinde oksidatif stresi içeren ciddi metabolik bozukluklara neden olmaktadır. Organizmada proteinler, nükleik asitler, karbonhidrat, ve lipidler oksidatif strese maruz kalmakta ve özellikle LDL'nin oksidatif strese maruz kalması ateroskleroz gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Organizmada meydana gelebilecek bu hasarları önlemede çeşitli antioksidan sistemler görev almaktadır (7, 8, 9).

Antioksidan enzimler, normal metabolizma sırasında üretilen reaktif oksijen türlerinin (ROT) aerobik hücrelerde sebep olduğu oksidatif hasara karşı hücreleri korurlar. Aşırı derecede ROT üretimi veya enzimatik-enzimatik olmayan antioksidan sistemdeki eksiklik oksidatif stres ile sonuçlanır. Oksidatif stres menapoz sonrası bir takım fizyolojik değişikliklerin oluşması ile ilişkilidir, antioksidan enzim düzeylerindeki değişiklikler ve artmış oksidatif hasar bu dönemde meydana gelir (33, 34).

Östrojenlerin ROT türlerinin oluşumunu azalttığı ve böylece oksidatif stresi oluşumunu önlediği, hem in vivo hemde in vitro olarak önemli kanıtlarla gösterilmiştir (3, 35).

Östradiol bir antioksidan ve serbest radikal toplayıcısıdır. Östradiolün antioksidan özelliğinin hidroksifenolik yapıdan ve doğal antioksidan enzimlerin aktivitelerini stimüle edici etkilerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (36, 37). Ancak etki mekanizması tam olarak açıklanamamış değildir. Bazı görüşler antioksidan etkinin fenolik halka yapısından kaynaklandığını (38, 39), diğer bir görüşe göre ise antioksidan enzim aktivitelerini değiştirmek yoluyla etkili olduğunu savunmuşlardır (40, 41, 42).

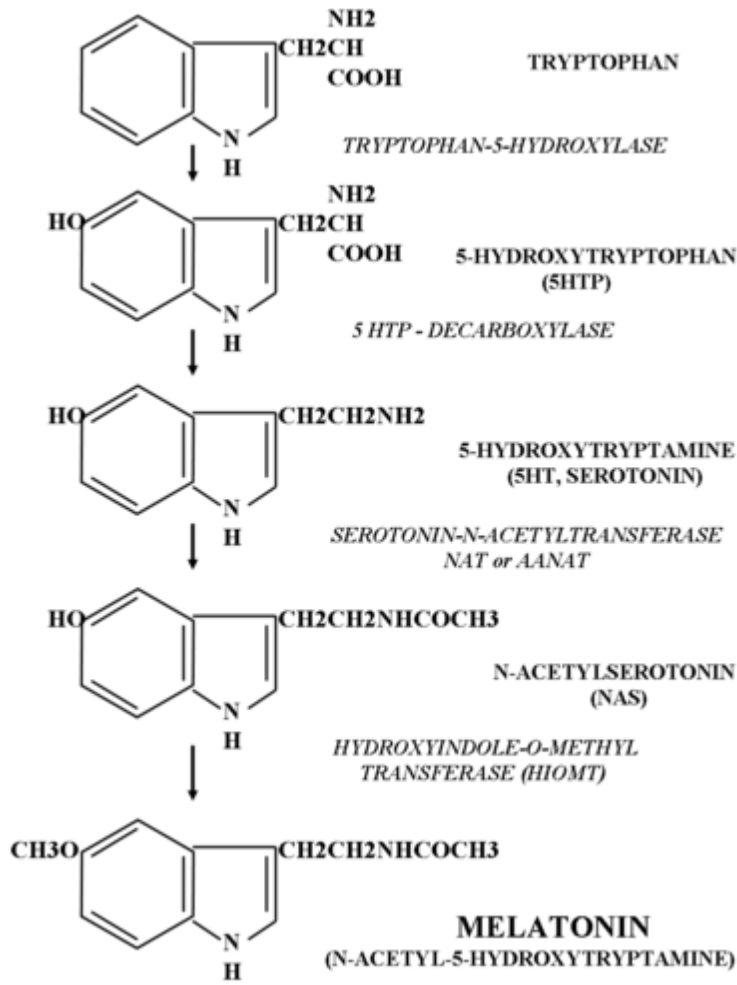
Postmenopozal kadınlarda önemli oranda artmış kardiyovasküler hastalıklar temelde, östrojen eksikliğinin neden olduğu artmış ateroskleroz gelişiminin sonucudur. Bu dönemde LDL eliminasyonunu bozulması sonucunda, LDL kolesterol ve TG seviyelerinde yükselme görüldüğü gibi, LDL'nin karaciğer ve arterial intimada oksidasyonunda da artma meydana gelmektedir (43, 44).

Ayrıca östrojenin lipid parametreleri üzerine olumlu etki göstermesi, ateroskleroza karşı koruyucu etki mekanizmalarından birini oluşturmaktadır. Ancak

çalışmalarda östrojen, uygunsuz lipid profili bulunan durumlarda dahi ateroskleroza karşı koruyucu etki göstermiştir. Bu durum onun serbest radikal toplayıcı, böylece LDL oksidasyonunu inhibe edici özelliğinden kaynaklanmaktadır (45).

2.4. Melatonin ve Oksidatif Stres ile İlişkisi

Melatonin klinik olarak yıllardır kullanılmakta olup, güvenle kullanılabileceğı ve iyi tolere edildiğı bilinmektedir. Melatoninin günlük dozu kısa süreli bir kullanımda 0.1-1000 mg arasında değişmektedir (46). Melatonin 40 yıl öncesinden keşfedilmesine rağmen, serbest radikalleri temizleyici ve antioksidan etkisi son 10- 15 yıllık bir dönem içinde dikkat çekmeye başlamıştır. Bundan daha önce, melatonin'in sirkadian ritmi bilinmekte, buna ek olarak immun fonksiyonun modülasyonu, tümör büyümesinin inhibisyonu ve retinanın fizyolojisi ile ilişkisi bilinen etkilerindedir. Melatonin'in bir amino asid olan triptofandan türediğı ve pineal bezde üretildiğı bilinmektedir (şekil 6). Bununla beraber, kemik iliğı, lenfositler, retina, ovaryum, lens, gastrointestinal sistemde de oluřtuğú saptanmıştır. Bazı hücreler ve vücut sıvıları yüksek düzeylerde melatonin içermektedirler. Örneğın, kemik iliğı hücrelerinde, safra ve serebrospinal sıvıda melatonin düzeyleri serumdaki seviyelerinden önemli derecede yüksektir. Canlı hücrelerde, melatonin konsantrasyonları hücrelerin alt bölümlerinde düzgün bir dağılım göstermemektedir ve bu nedenle melatonin'in hücre içindeki düzeylerine ait bilgiler azdır (20, 47).



Şekil 6: Pineal bezde melatonin sentezinin şematik gösterilişi

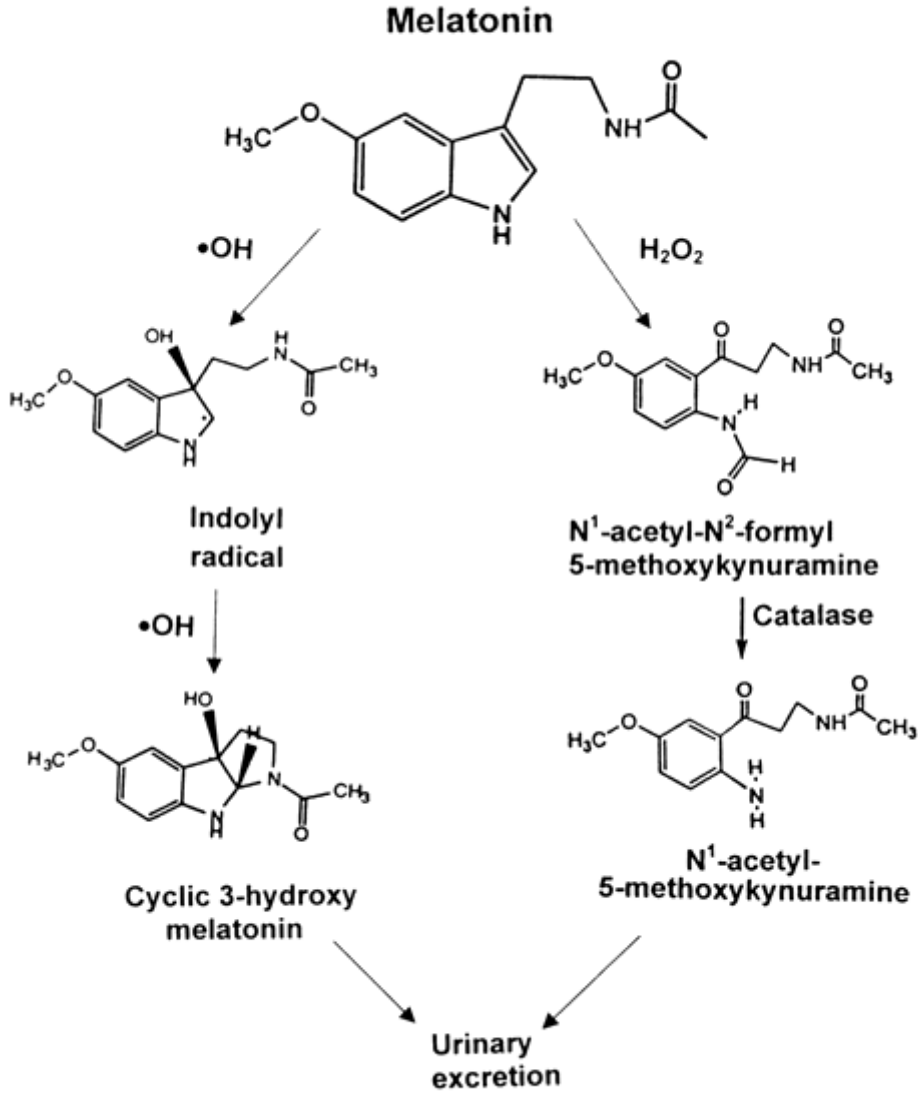
Daha önce de bahsedildiği gibi, $\cdot\text{OH}$ radikali hücreler için son derece tehlikeli bir molekül olup, ilk olarak melatonin tarafından temizlenen serbest radikal olarak rapor edilmiştir (48). Melatoninin, $\cdot\text{OH}$ radikalının % 50'sini temizlemek için gerekli olan dozu $21 \mu\text{M}$ olarak saptanmıştır. Bu doz $\cdot\text{OH}$ radikalini temizlemek için gerekli olan antioksidan moleküllerden glutatyon ve mannitol'ün dozundan 5- 10 kat daha azdır. $\cdot\text{OH}$ radikali'nin yarı ömrü uzun olduğundan ve bunu temizleyici moleküllerin ona ulaşması için hücre içinde oldukça uzun yol almak zorunda olduklarından, bu tür temizleyicilerin hasarı azaltmaları için bu radikalın olduğu hemen her yerde bulunmaları gerekmektedir. Melatonin'in ise organizmadaki her hücreye girdiği ve bütün subsellüler katmanları geçtiği bilinmektedir. Böylece, hücre membranlarında

bulunan poliansatüre yağ asidlerini, sitozoldeki organelleri, çekirdekdeki ve mitokondrideki DNA'yı koruduğu bildirilmiştir (20, 49, 50, 51).

Melatoninin klasik antioksidanlara (örneğin; E vitamini, ki bulunduğu yer lipidden oluşmuş çevre ile sınırlıdır, çünkü lipid ortamda çözünmektedir) göre subsellüler dağılımının daha iyi olduğu bilinmektedir. Ayrıca, melatoninin kan-beyin bariyerini ve plasentayı geçtiği ve bu iki bölgenin de E vitamini için, girilmesi oldukça zor bölgeler olduğu bilinmektedir. Bu arada, tokoferol'ün tokoferol radikalinden tekrar rejenere edildiği ve etkisinin devamlı olduğu bildirilse bile, aynı durum melatonin için de geçerlidir. İlk basamakta oluşan indol radikalinden tekrar melatonin oluştuğuna ve bu etkisinin E vitaminin gibi sürekli olduğuna dair kanıtlar mevcuttur (20)

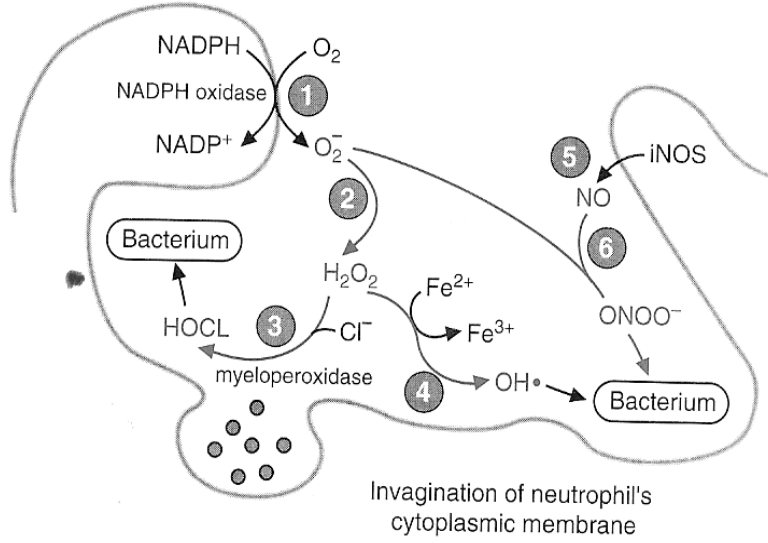
Melatonin'in bir diğer koruyucu etkisi Zang ve ark. (52) bildirdiğine göre, H_2O_2 ile etkileşimi yoluyla olmaktadır. Daha önce bahsedildiği gibi, $\bullet OH$ molekülünün oluşumunun engellenmesi, onun yol açacağı zararlı etkilerin önlenmesinden daha kolay olmaktadır. Bu birkaç yolla olmaktadır. H_2O_2 'in, Fe^{2+} veya Cu^{2+} ile birleşmesi ve böylece Fenton reaksiyonu ile $\bullet OH$ radikaline dönüşümünü engellemek için, H_2O_2 enzimatik olarak veya antioksidan moleküller yoluyla temizlenmektedir (Şekil 7). Melatoninin çeşitli araştırmalarda H_2O_2 molekülünü temizlemede oldukça etkili olduğu gösterilmiştir (47, 52, 53, 54).

Feng ve ark. (46), Alzheimer hastalığı olan transjenik farelerde ve overektomize olmuş algılama yeteneği düşmüş adult farelerde in vivo olarak yaptıkları çalışmalarında, uzun süreli olarak melatonin uygulamasının frontal korteksde apoptozisi önemli ölçüde azalttığını ve bu modellerde öğrenmeyi ve hatırlamayı düzelttiğini rapor etmişlerdir.



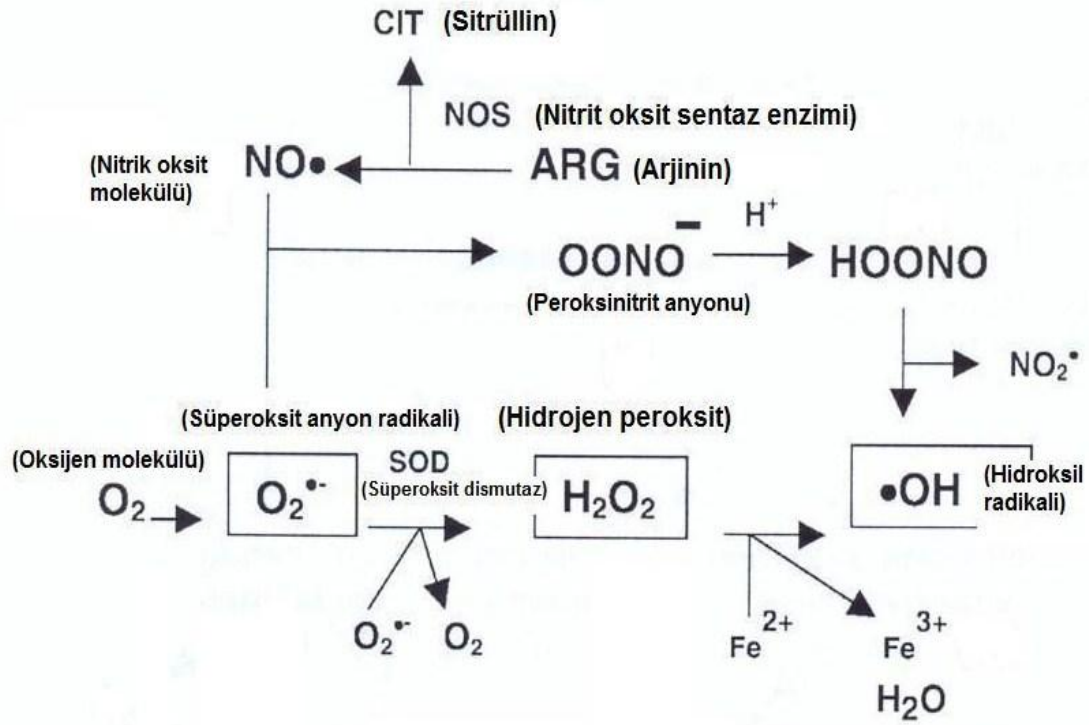
Şekil 7: Melatonin'in serbest radikal temizleyici özelliği

Hipoklorik asit (HOCl), bakterileri öldürmek amacıyla aktive olmuş makrofajlarda üretilir, bununla beraber yakınındaki moleküllere zarar verebilmektedir. (Şekil 8). HOCl, 5-thio-2-nitrobenzoic acid'in (TNB) oksidasyonu ile indüklenmektedir ve melatoninin TNB'nin oksidasyonunu azalttığı saptanmıştır (55). Marshall ve ark.'nın bu bulgularını, Cahn ve Tang (56) desteklemişler ve makalelerinde melatoninin HOCl'yi nötralize ettiğini bildirmişlerdir.



Şekil 8: Nötrofillerde, Miyeloperoksidaz'ın (MPO) yer aldığı reaksiyonlar (Basic Medical Biochemistry A Clinical Approach, Second Edition, Colleen Smith, Ph.D., Allan D. Marks, MD, Michael Lieberman, Ph.D. Lippincott Williams & Wilkins, Kluwer Company, USA)

NO^\bullet , nitrojen molekülü ile ilgili bir radikal olup, bazı deneysel durumlarda (örneğin, serebral iskemi-reperfüzyon hasarı) hasarlayıcı bir makromolekül olduğu bulunmuştur. Melatonin'in ortamdaki NO^\bullet molekülünü temizlediği saptanmıştır (57). NO^\bullet ve $\text{O}_2^{\bullet-}$ reaksiyona girmesiyle peroksinitrit (ONOO^-) meydana gelmektedir (Şekil 9). Bu molekül bir serbest radikal değilse de, bulunduğu ortamdaki makromolekülleri yıkmakta ve nöronların kaybına neden olmaktadır (58). Melatoninin, ONOO^- 'i nötralize ettiği ve in vitro çalışmalarda DNA'nın çift sarmalının ONOO^- 'i tarafından kırılmasını engellediği bildirilmiştir (59). Cuzzocrea ve arkadaşları (60, 61, 62, 63), bu bilgilerden yararlanarak yaptıkları hayvan deneylerinde, inflamasyon oluşturmuşlar ve her seferinde immunohistokimyasal olarak melatoninin nitrotirozini (ONOO^- yoluyla tirozinin nitrasyonu ile oluşmaktadır) azalttığını bulmuşlardır.



Şekil 9: Peroksinitrit anyonu (OONO⁻), hidroksil radikaline (•OH) parçalanabilmekte ve toksik molekülleri oluşturabilmektedir.

Reaktif oksijen türlerini (ROT) temizleyen ve onların yıkıcı etkilerinden korunma sağlayan çeşitli enzim sistemleri bulunmakta olup, majör antioksidan enzim sistemleri SOD, CAT ve GPx'dir. Fizyolojik, ve en düşük farmakolojik dozunda verilen melatoninin, bu enzimlerin gen düzeyinde sentezlenmelerini ya da aktivitelerini arttırdığı gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada melatonin verilmesinin SOD' un her iki türü olan, MnSOD ve CuZnSOD'un mRNA düzeylerini, sırasıyla %35 ve %52 düzeylerinde arttırdığını saptanmıştır. SOD düzeylerindeki artışın ise, tıpkı trizomi 21'deki gibi, CAT veya GPx (veya her ikisi birden) düzeylerinde herhangi önemli bir artış olmadan da olabileceğini bildirmişlerdir (20, 64).

Ratlara akut olarak (bir enjeksiyonda 500 µg/kg) ve kronik olarak (30 gün boyunca 50 µg/kg veya 50 gün süre ile 500 µg/kg) melatonin verilmiş ve beyin dokularında MnSOD ve CuZnSOD gen düzeylerinde artış olduğu saptanmıştır. Bununla beraber, kronik olarak melatonin verilmesinin her iki molekülün mRNA düzeylerinde daha büyük artışa neden olduğu bulunmuştur (65).

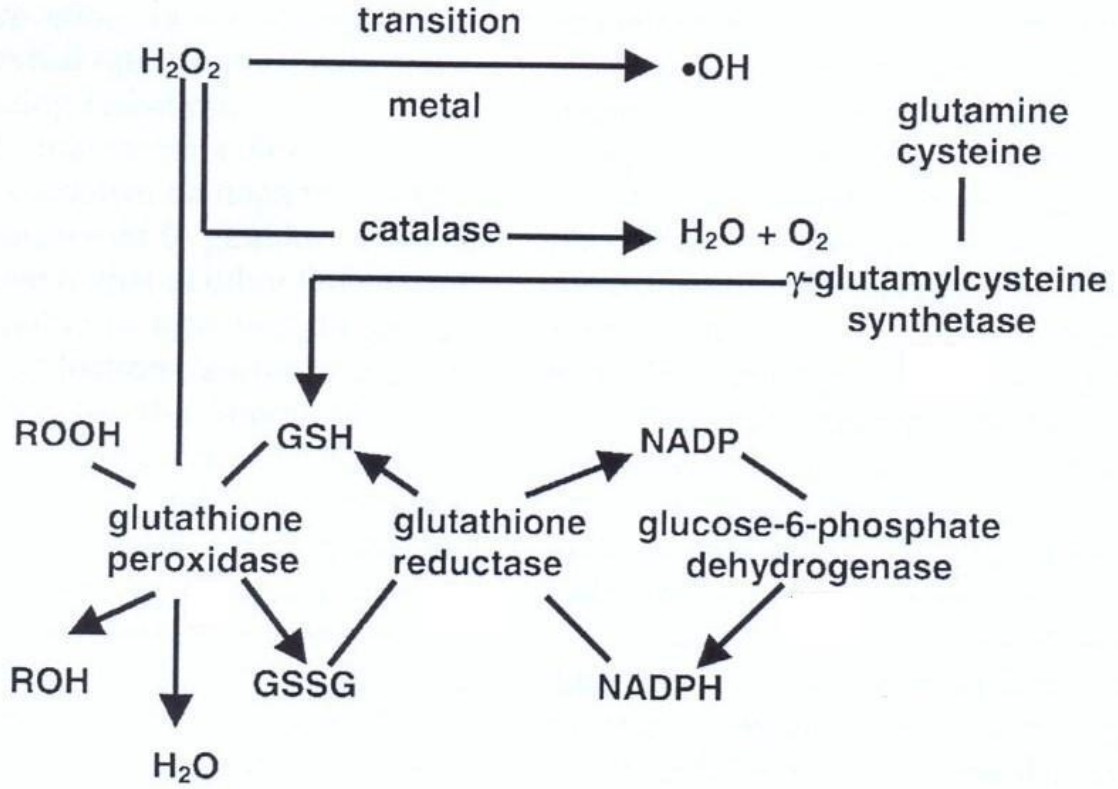
Diğer bir çalışmada, oluşan H_2O_2 'in ortamda çeşitli metabolik yolları olduğu gösterilmiştir (66). Fenton reaksiyonu ile $\cdot OH$ radikaline dönüşmekte olup, çok miktarda oluşan bu molekülün sürekli dönüşümünün organizmada gerçekten yıkıcı etkilere neden olduğu bilinmektedir. H_2O_2 'in temizlenmesinde rol oynayan diğer iki enzim ise GPx ve CAT'dır. Melatonin'in GPx aktivitesini etkilediği, ilk olarak 1995 yılında Barlow-Walden ve ark. (67) tarafından rapor edilmiştir. Daha sonra ise, melatoninin beyinde GPx aktivitesi üzerinde stimülatör etkisinin olduğu ve H_2O_2 molekülünün temizlenmesinde CAT'dan daha etkili bir rol oynadığı iddia edilmiştir (68). Yapılan bir çalışmada, beyin GPx aktivitesinin anneye melatonin verilmesinden sonra bebeklerde de saptandığı bildirilmiştir (69). Ayrıca, melatoninin GPx aktivitesi üzerine etkisinin, sadece beyin ve diğer memeli dokuları üzerinde etkili olmadığı, farmakolojik dozlarda (500 $\mu g/kg$) melatonin enjeksiyonundan 90 dakika sonra civcivlerde akciğer, bağırsak, böbrek, pineal bez, karaciğer, beyin, kalp ve eritrositlerde bu enzimin aktivitesinin % 22- 138 oranında önemli ölçüde arttığı bildirilmiştir (70). Yine, aynı çalışmada, GPx aktivitesindeki bu artışın gece melatonin düzeyindeki artış ile beraber olduğu, gece ışıktaki bırakılan civcivlerde bu aktivitenin artmadığı rapor edilmiştir. Bu metabolizma sırasında, H_2O_2 ve hidroperoksid molekülleri, GPx molekülü yoluyla katalitik olarak temizlenmektedirler; bu reaksiyonlarda GSH disülfid formuna (GSSG) oksitlenmekte olup, hücrelerdeki total glutatyonun % 99'u GSH olarak bulunmaktadır. Böylece, GSSG oluştuğunda hızlı bir şekilde, GR enzimi yoluyla GSH'a dönüştürülmektedir. Bu etkisinden dolayı, GR' de önemli bir antioksidatif etki olarak dikkate alınmaktadır. Civciv ve farelerde yapılan çalışmalarda yine gece boyunca GR aktivitesinde melatonin düzeyi ile birlikte artış saptanmıştır (71).

Bütün bu bilgilerin sonucunda, GSH döngüsünü ve tekrar sentezini kontrol altında tuttuğu için melatoninin önemli bir antioksidan molekül olduğu sonucuna varılmıştır. Bununla beraber, melatoninin hücrelerde H_2O_2 'in temizlenmesinde etkili olan CAT enzimi üzerine etkileri hakkında geniş bilgi bulunmamaktadır. CAT bütün aerobik organizmalarda bulunmakta olup, normal olarak peroksizomlarda lokalize olmuştur. Diğer antioksidatif enzimlerde olduğu gibi CAT aktivitesi de yoğun bir oksidatif stres altında bozulmakta yani azalmaktadır. Bazı durumlarda, CAT aktivitesindeki bu düşmenin, melatonin ortamda olsa bile görülebileceği saptanmıştır.

Bunun, melatoninin proteinleri de içine alan, makromoleküller üzerindeki genel koruyucu etkilerinden biri olduğu bildirilmiştir (20).

Bununla birlikte, melatonin'in fizyolojik veya farmakolojik dozlarında, çeşitli antioksidan enzim aktivitelerinin arttığı bilinmektedir. Potansiyel olarak pro-oksidatif yani oksidan olarak öncül bir molekül olan NO sentezinde görev alan nitrik oksit sentaz (NOS) aktivitesinin ise melatonin yoluyla inhibe edilebileceği gösterilmiştir. NOS, arjininden NO• oluşumunu katalize eden bir enzimdir. NO• molekülü fazla miktarda üretildiğinde O₂^{•-} ile birleşerek, oldukça toksik bir molekül olan ONOO⁻i oluşturmaktadır. Bu nedenle, NOS pro-oksidatif bir enzim olarak değerlendirilmektedir (20). İlk olarak Pozo ve ark (72). ve Bettani ve ark (73). hem in vitro, hem in vivo melatoninin fizyolojik konsantrasyonlarının NOS aktivitesini inhibe ettiğini göstermişlerdir. Daha sonraki çalışmalarda da iskemi/reperfüzyon hasarında NOS aktivitesinin melatonin yoluyla inhibe olduğu rapor edilmiştir (74).

Antioksidan enzimler üzerine melatoninin etkisi şekil 10'da özetlenmiştir (20).



Şekil 10: Antioksidan enzimler üzerinde melatoninin etkileri

Yukarıdaki şekil aşağıdaki gibi özetlenebilir;

1. İndirgenmiş glutatyon (GSH) hücrelerde majör antioksidatif moleküldür. Melatonin, GSH hemostazını, antioksidatif enzimler olan GPx ve GR enzimlerini stimüle etmek yoluyla teşvik etmektedir.
2. Melatonin, GPx enzimini arttırmak yoluyla, H_2O_2 'i ve ROOH'i ortamdan çıkartmak yoluyla oksidatif hasarı önlemektedir.
3. Enzimatik olarak H_2O_2 'i yıkan enzimlerden biri olan CAT'ın oksidatif stresde azaldığı gösterilmiş olup, bu enzimin yıkılımının melatonin ile engellendiği saptanmıştır.

2.5. Dekspantenol ve Oksidatif Stres ile İlişkisi

Dekspantenol (Provitamin B5), B-kompleks vitaminlerinden biri olan pantotenik asit (PA)'in ön maddesidir ve deri tarafından hızla emilerek vücutta pantotenik asit'e dönüşür. PA, karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasında enerji dönüşümü basamaklarında yer alan ve yaşamın sürdürülebilmesi için esansiyel bir koenzim olan koenzim A prekürsörüdür. Bir nörotransmitter olan asetil kolinin sentezinde görev alır. Bu etkisi nedeniyle intravenöz formu bağırsak atonilerinin tedavisinde kullanılır (75).

Yapılan araştırmalarda oral ve topikal olarak uygulanan pantotenik asitin epitelizasyonu ve yara iyileşmesini hızlandırdığı gösterilmiştir. Bunların yanı sıra, pantotenik asitin antioksidan ve antiinflamatuvar etkileri de vardır (76, 77, 78).

PA ve derivelerinin serbest oksijen radikalleri tarafından meydana getirilen hücre hasarına, radyasyona karşı koruyucu etki gösterdiği ve antioksidan etkileri olduğu bir çok çalışma ile rapor edilmiştir. Pantotenik asitin, bu etkisini GSH(redükte glutatyon), koenzim A ve ATP sentezini artırarak etki gösterdiği saptanmıştır (79, 80, 81).

Slyshenkov ve ark. (79) tarafından tümör hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada PA ve derivelerinin, koenzim A ve glutatyon düzeyini arttırdığı gibi aynı zamanda, fosfolipid ve kolesterol sentezinde de artışa yol açtığı saptanmıştır. Sonuçta bu çalışma ile koenzim A'nın, oksidatif strese karşı önemli bir hücre defansı sağlayan GSH biyosentezini etkilediği saptanmıştır. Aynı zamanda membran fosfolipitleri ve kolesterol sentezini içeren onarım mekanizmalarını da etkileyerek serbest oksijen radikal hasarına karşı koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir. Aynı yazarların 2003 yılında yaptıkları çalışma ile koenzim A prekürsörleri olan pantetonik asit, pantenol ve diğer derivelerinin, GSH seviyelerini artırarak hücreleri ve tüm organları oksidatif hasara karşı korudukları saptanmıştır (82).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

Çalışmamızda gerekli olan bidistile su Millipore PCR cihazından elde edildi. 37°C'lik enkübasyonlarda Kotterman çalkalamalı su banyosu ve pipetleme işlemlerinde 5- 50 µl, 10- 100 µl, 20- 200 µl ve 200- 1000 µl'lik otomatik ayarlanabilir pipetler kullanıldı. Çalışmalarda Shimadzu UV 160 spektrofotometresinden yararlanılmıştır. MDA ve NO[•] çalışmalarında ise, mikrolate okuyucu (XL- 800) kullanılmış, sonuçlar otomatik olarak cihaz tarafından hesaplanmıştır.

3.2. Çalışma Grupları

Çalışmamız Adnan Menderes Üniversitesi deney hayvanları laboratuvarından elde edilen 270- 310 gram ağırlığında 50 adet matür dişi Wistar albino sıçan kullanılarak yapıldı. Çalışma süresince tüm hayvanlar standart laboratuvar koşulları (12 saat gün ışığı, 12 saat karanlık, havalandırılmalı, sabit ısı ve serbest su ve gıda sağlanan) altında tutuldu. Sıçanlara cerrahi işlem öncesi intraperitoneal (i.p.) anestezi (ketamin 50mg/kg ve ksilazin 5mg/kg) uygulandı. Ardından geri çekme ve göz kırpma refleksleri kontrol edildikten sonra orta hat insizyon yapılarak alt abdominal kavite eksplorasyonu sağlandı ve her iki over total olarak çıkarıldı. Menopoz gelişimi için 3 haftalık bekleme süresinin ardından sıçanlar 7 gruba ayrıldı; kontrol grubuna (n=8) herhangi bir işlem uygulanmadı, diğer gruplar ise (n=7) ooferektomili olup, 14 gün tedavi verildi. Tedavide kullanılan toz haldeki 17β- estradiol (Sigma, E 8515-5G) susam yağı içerisinde eritilerek 100 µg/kg olacak şekilde subkutan (s.c.) olarak uygulandı. Melatonin (Sigma, M5250-1G) %96'lık etil alkol içinde çözüldükten sonra %0.9 fizyolojik serum ile dilüe edilerek 5-20 mg/kg konsantrasyonlar sağlanıp, i.p. olarak enjekte edildi. Dekspantenol (Bepanthe® ampul) 250- 500 mg/kg konsantrasyonlarda i.p. olarak enjekte edildi. Tedavi bitiminde Adnan Menderes Üniversitesi Farmakoloji Anabilim Dalı laboratuvarında intraperitoneal anestezi (ketamin 50 mg/kg ve ksilazin 5 mg/kg) altında intrakardiak kan alınan sıçanlar, operasyon sırasında eksanguinasyon işlemi ile sakrifiye edilmiştir.

Gruplar aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır:

1. Kontrol grup
2. Oofektomi yapılan grup (Ovx),
3. Oofektomize + östrodiol (100 µg/kg/gün) (Ovx+E₂)
4. Oofektomize + östradiol+ melatonin (5 mg/kg/gün) (Ovx+E₂+MT 5)
5. Oofektomize + östradiol+ melatonin (20 mg/kg/gün) (Ovx+E₂+MT 20)
6. Oofektomize+ östradiol+ deksantenol (250 mg/kg/gün) (Ovx+E₂+Dxp 250)
7. Oofektomize + östradiol+ deksantenol (500 mg/kg/gün) (Ovx+E₂+Dxp 500)

3.3. Kan Örneklerinin Alınması, İşlenmesi ve Saklanması

Kan örnekleri biri EDTA'lı diğeri düz kan tüpü olmak üzere iki tüpe alındı. Alınan EDTA'lı kan örneklerinde total GSH düzeyleri bakıldı ve bu değerin hesaplanabilmesi için aynı zamanda Hb düzeyleri saptandı. Daha sonra kan örnekleri 4.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve eritrositlerde antioksidatif enzim kapasitelerini CAT, GSH-Px ve GR ölçmek için eritrositler üç kez soğuk serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra hemolizat örnekleri hazırlandı. Yine, bu hemolizat örneklerinde de Hb düzeyleri saptandı ve değerler buna göre verildi. Düz kan örnekleri ise yine 4. 000 rpm de 10dakika santrifüj edildi ve serum kısmı ayrıldı. Serum örneklerinde MDA ve NO[•] (nitrit+nitrat) düzeyleri saptandı.

3.4. Çalışmada Kullanılan Yöntemler

CAT Ölçüm Yöntemi

Aebi'nin yöntemine göre saptandı (83). Fosfat tamponu (50 mM pH:7.4) olacak şekilde, potasyum dihidrojen fosfat (KH₂PO₄) ve disodyum hidrojen fosfat (Na₂HPO₄.2H₂O) ile hazırlandı. H₂O₂ (30 mM) olarak hazırlandı.

Tampon ile dilüe edilmiş örneğe, H₂O₂'li tamponun eklenmesi ile başlayan absorbands değışimi, spektrofotometrede 240 nm'de izlenerek, 15 saniyedeki absorbands değışimi ölçüldü ve aşağıdaki formüle göre hesaplama yapıldı. Sonuçlar U/g Hb olarak verildi.

$$k = (2.3/\Delta t)\log (Abs_1/Abs_2) = 0.1175/\Delta t \text{ (sn}^{-1}\text{)}$$

MDA Ölçüm Yöntemi

Serumda MDA saptanması Ohkowa'nın yöntemine göre yapıldı (84). % 0,67'lik TBA (2-Thiobarbutiric acid) çözeltisi ve n-butanol kullanıldı. Tiyobarbitürik asid ile MDA'nın reaksiyona girmesinden sonra reaksiyon ürünü n-butanol ile ekstrakte edildi. MDA standardı olarak, malonaldehit bis-(dimetil asetal) kullanılarak, 1- 40 nmol'lük standartlar hazırlandı.

Örneklerdeki absorbandslar spektrofotometrede, 540 nm'de mikroplate okuyucusunda okundu ve hesaplar otomatik olarak çizilen standart eğriden hesaplandı. Sonuçlar µol/L olarak verildi.

GSH Ölçüm Yöntemi

Tietze'in metoduna göre tam kanda ölçüldü (85). Presipite edici solüsyon; metafosforik asit, disodyum EDTA ve sodyum klorür (NaCl) kullanılarak hazırlandı. Disodyum fosfat solüsyonu; di sodyum hidrojen fosfat (Na₂HPO₄) ile hazırlandı. DTNB solüsyonu; [5,5'-Dithio-bis (2-nitrobenzoic acid)] ve sodyum sitrat ile hazırlandı.

GSH standardı; (reduced glutathione) kullanılarak 1-60 mg/dl'lik standartlar olarak hazırlandı. Standartlar ve örnekler spektrofotometrede 412 nm'de köre karşı okutuldu. Sonuçlar mg/ g Hb olarak verildi.

GPx Ölçüm Yöntemi

GPx aktivitesi Kakkar ve ark. (86) yöntemine göre minör modifikasyonla saptandı. GPx reaksiyon karışımı; 75 mmol fosfat tamponu (pH 7.0), 60 mmol GSH, 30U/ml GR, 15 mmol Na₂EDTA içermektedir. Küvet 37°C'ye ayarlanan spektrofotometreye kondu. Küvetin içine reaksiyon karışımı konarak gerektiği kadar, dilüe edilmiş hemolizat eklendi. Reaksiyon H₂O₂ (%30) ile başlatıldı ve NADPH'daki absorbansın azalması 340 nm'de 3 dakika izlendi. Non enzimatik reaksiyon hızı kör çalışılarak hesaplandı ve elde edilen sonuçlardan çıkartıldı. Sonuçlar U/g Hb olarak verildi.

GR Ölçüm Yöntemi

GR, Racker ve ark. (87) yöntemine göre saptanmıştır. Reaksiyon karışımı; 50 mmol/L Tri, Ph 7.6, 100 µmol/L EDTA, 4 mmol/L GSSG (oksitlenmiş glutatyon), 120 µmol/L NADPH ile hazırlandı. Reaksiyon karışımı küvetlere kondu ve uygun oranda eritrositlerden hazırlanmış hemolizat konarak reaksiyon başlatıldı. 340 nm'de 37°C'de NADPH'ın oksidasyonunun izlenmesi yoluyla GR düzeyleri saptandı. Örnek yerine su kullanılarak, aynı şekilde kör çalışılarak elde edilen sonuç, örneklerden elde edilen sonuçtan çıkartıldı. Reaksiyon 3 dakika izlendi. Sonuçlar U/gHb olarak verildi.

Cu, Zn SOD Ölçüm Yöntemi

Eritrositlerde SOD ölçümü Sun ve ark (88) yöntemine göre saptandı. Öncelikle eritrositler kloroform, etanol ile iyice çalkalandı ve örnekler içindeki SOD 12.000 1 saat santrifüjlendikten sonra ekstrakte edildi. SOD deney çözeltisi; 0.3 mmol/L xantine, 0.6 mmol/L EDTA, 150 µmol/L nitroblue tetrazolium (NBT), amonyum sülfat (NH₄SO₄), 20167 U/L xantine oxidase (XOD) içermekteydi. Bu çalışma çözeltisine örnekler eklendikten sonra 25° C'de su banyosunda, XOD çözeltisi eklendi. Reaksiyon bakır klorür (Cu₂Cl) eklenerek durduruldu. Ayrıca kör çözeltisi hazırlandı. Deney sonunda oluşan renk 560 nm'de spektrofotometrede ölçüldü.

SOD standardı (<Cu, ZnSOD porcine erythrocytes) ile, 0-270 ng/tüp ve % inhibisyon değerleri karşılıklı gelecek şekilde oluşturuldu. İnhibisyon değerleri aşağıdaki formülden hesaplandı. Her örnek için elde edilen inhibisyon değeri, grafik kullanılarak SOD değeri saptandı. SOD düzeyleri ng/g Hb olarak verildi.

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{(\text{Absorbans}_{\text{Kör}} - \text{Absorbans}_{\text{Örnek}})}{\text{Absorbans}_{\text{Kör}}}$$

NO (nitrit+nitrat) Ölçüm Yöntemi

NO düzeyleri, Navarro-Gonzalves ve ark. (89) yöntemine göre saptandı. Glisin-NaOH tamponu; glisin ve sodyum hidrokisit kullanılarak hazırlandı. Glisin- NaOH tamponu içindeki CuSO₄ çözeltisi; glisin, NaOH ve bakır sülfat kullanılarak hazırlandı. Sülfanilamid çözeltisi; hidroklorid asid %37 ve sülfanilamid ile hazırlandı. NED çözeltisi [N-(1-Naphtyl)Ethyl-Enediamine dihydrochloride] kullanılarak hazırlandı. Standartlar, sodyum nitrit (NaNO₂) kullanılarak, 2-80 µg konsantrasyonlarda hazırlandı.

Örneklerdeki NO konsantrasyonu, Griess reaksiyonu sonucunda ölçüldü. Örnekler ve standartlar, ELISA mikropate okuyucuda 540 nm'de okutuldu. Konsantrasyon hesapları otomatik olarak cihaz tarafından hesaplanmış olup, sonuçlar µM/g Hb olarak verildi.

3.5. İstatistiksel Değerlendirme

Bulguların istatistiksel değerlendirmesinde veriler ortalama ± standart hata değerleri olarak alındı. Gruplar arası farklılığı saptamada Anova testi kullanıldı. Anlamli farkların hangi gruplardan kaynaklandığını saptamak için post-hoc test olarak Student –Newman-Keuls veya Dunn's testi kullanıldı. p <0,05 değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

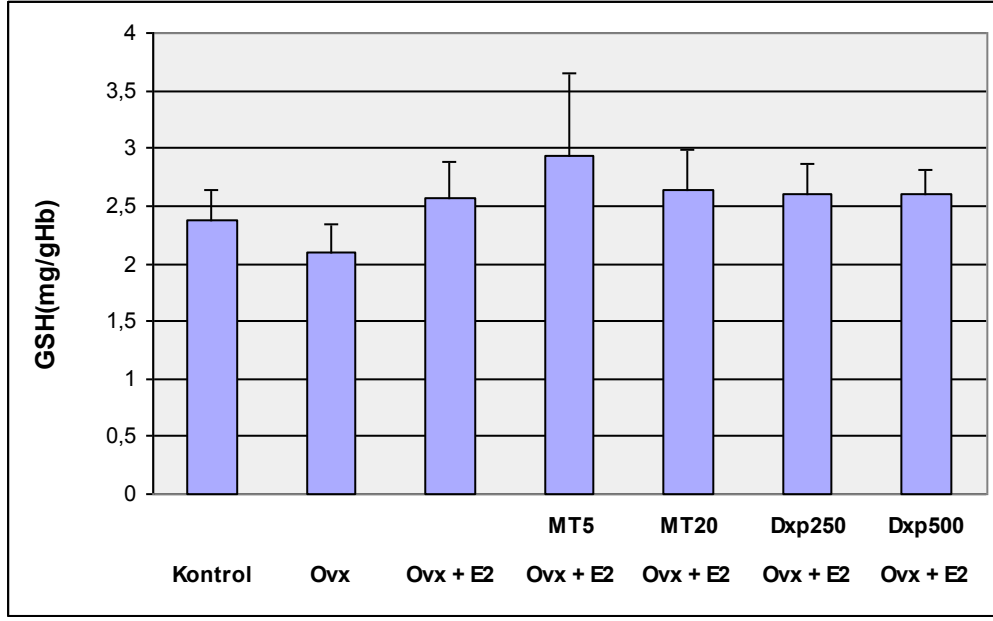
4. BULGULAR

Ooferektomi sonrası, 3 haftalık bekleme süresi ardından sıçanlardan intra kardiyak kan alınarak, CAT, SOD, GSH, GPx, GR, MDA, NO düzeyleri incelendi. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilip, tablo ve grafiksel olarak aşağıdaki gibi gösterilmiştir.

Tablo 1: Gruplardaki GSH düzeylerinin (mg/g Hb) istatistiksel olarak değerlendirilmesi

GSH	Kontrol	Ovx	Ovx + E ₂	Ovx + E ₂ + MT 5	Ovx + E ₂ + MT 20	Ovx + E ₂ + Dxp 250	Ovx + E ₂ + Dxp 500
Ort.D	2,379	2,097	2,569	2,943	2,644	2,600	2,595
Median	2,444	2,104	2,641	2,745	2,576	2,681	2,535
SD	0,264	0,245	0,320	0,701	0,349	0,269	0,219
s.e.m	0,093	0,093	0,121	0,265	0,132	0,101	0,083
Min	2,014	1,617	2,143	2,274	2,196	2,165	2,319
Max	2,728	2,436	2,899	4,316	3,352	2,911	2,929

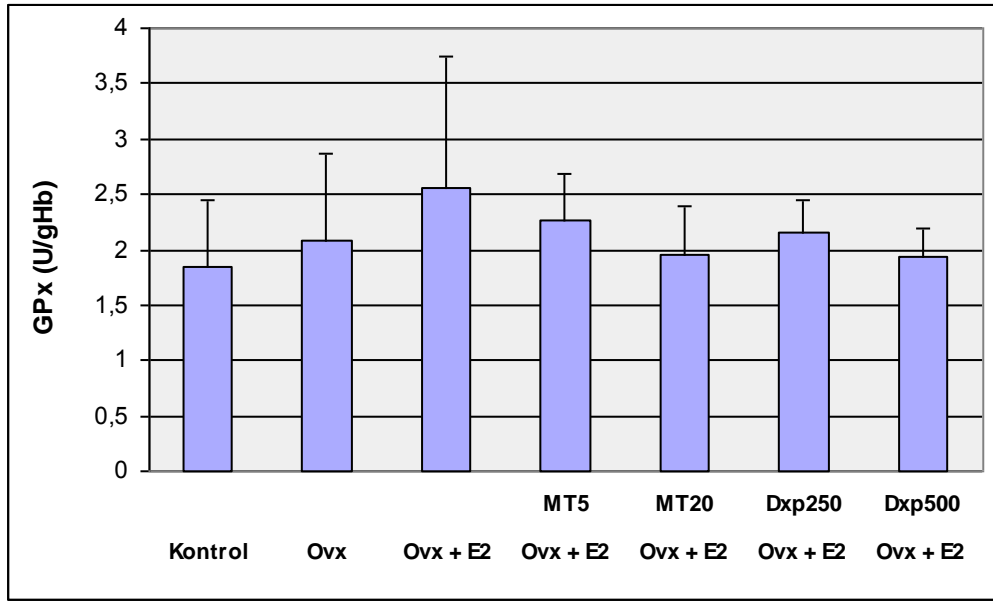
Gruplar	p	p
Ovx – Ovx+ E ₂ + MT 5	0.008	p<0.05
Ovx - Ovx + E ₂ + MT 20	0.011	p<0.05
Ovx – Ovx + E ₂ + Dxp 250	0.009	p<0.05
Ovx - Ovx + E ₂ + Dxp 500	0.005	p<0.05
Ovx - Ovx + E ₂	0.003	p<0.05



Şekil 11: GSH düzeylerinin grafiksel olarak gösterilişi

Tablo 2: Gruplardaki GPx düzeylerinin (U/gHb) istatistiksel olarak değerlendirilmesi

GPx	Kontrol	Ovx	Ovx + E ₂	Ovx + E ₂ +	Ovx + E ₂ +	Ovx + E ₂ +	Ovx + E ₂ +
				MT5	MT 20	Dxp 250	Dxp 500
Ort.D	1,839	2,083	2,551	2,264	1,963	2,163	1,934
Median	1,859	1,876	2,017	2,137	1,947	2,125	1,917
SD	0,607	0,785	1,199	0,428	0,427	0,289	0,262
s.e.m	0,214	0,297	0,453	0,162	0,161	0,109	0,099
Min	1,041	1,322	1,887	1,811	1,440	1,761	1,532
Max	3,041	3,481	5,216	3,055	2,682	2,663	2,271



Şekil 12: GPx düzeylerinin grafiksel olarak gösterilişi

GPx düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p > 0.05$).

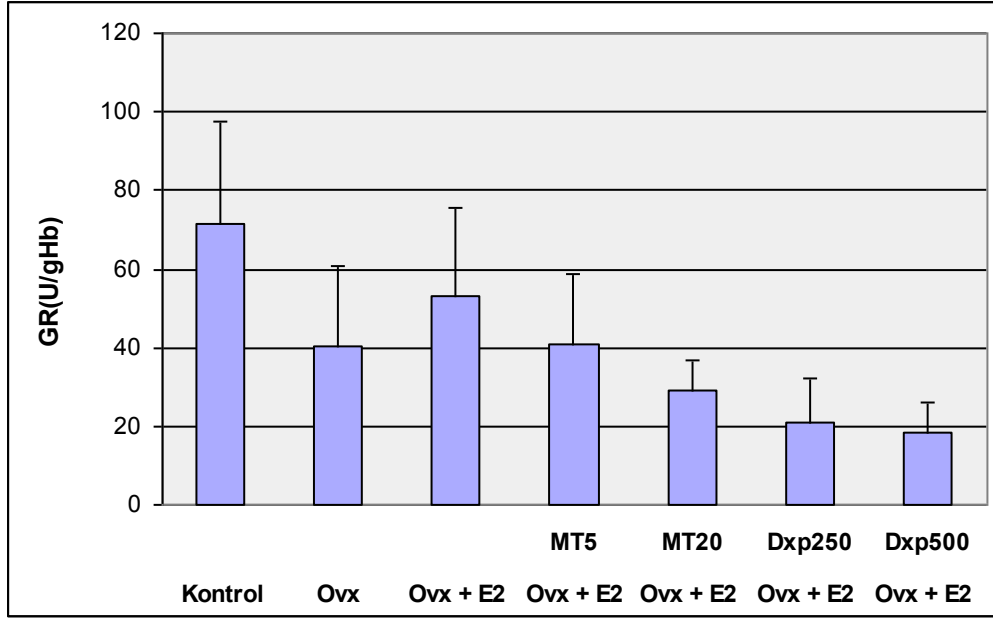
Tablo 3: Gruplardaki GR düzeylerinin (U/gHb) istatistiksel olarak değerlendirilmesi

GR	Kontrol	Ovx	Ovx + E ₂	Ovx + E ₂ + MT 5	Ovx + E ₂ + MT 20	Ovx + E ₂ + Dxp 250	Ovx + E ₂ + Dxp 500
Ort.D	71,41	40,11	52,86	40,96	29,32	20,98	18,44
Median	75,59	34,45	55,82	40,98	30,14	18,37	17,69
SD	25,91	20,75	22,81	17,77	7,261	11,05	7,39
s.e.m	9,16	7,84	8,62	6,717	2,74	4,18	2,79
Min	34,21	20,1	10,72	16,077	19,04	8,93	11,03
Max	103,8	84,53	80,39	73,08	40,19	40,19	31,85

Gruplar	p	p
Kontrol- Ovx	0,008	p<0.05
Kontrol – Ovx+E2+MT 5	0,006	p<0.05
Kontrol – Ovx+E2+MT 20	< 0.001	p<0.001
Kontrol – Ovx+E2+Dxp 250	< 0.001	p<0.001
Kontrol – Ovx+E2+Dxp 500	< 0.001	p<0.001

Gruplar	p	p
Ovx – Ovx + E ₂ + Dxp 250	0,016	p<0.05
Ovx – Ovx + E ₂ + Dxp 500	0,016	p<0.05
Ovx + E ₂ + MT 5 – Ovx + E ₂ + Dxp 500	0,003	p<0.01
Ovx + E ₂ + MT 5 – Ovx + E ₂ + Dxp 250	0,003	p<0.01

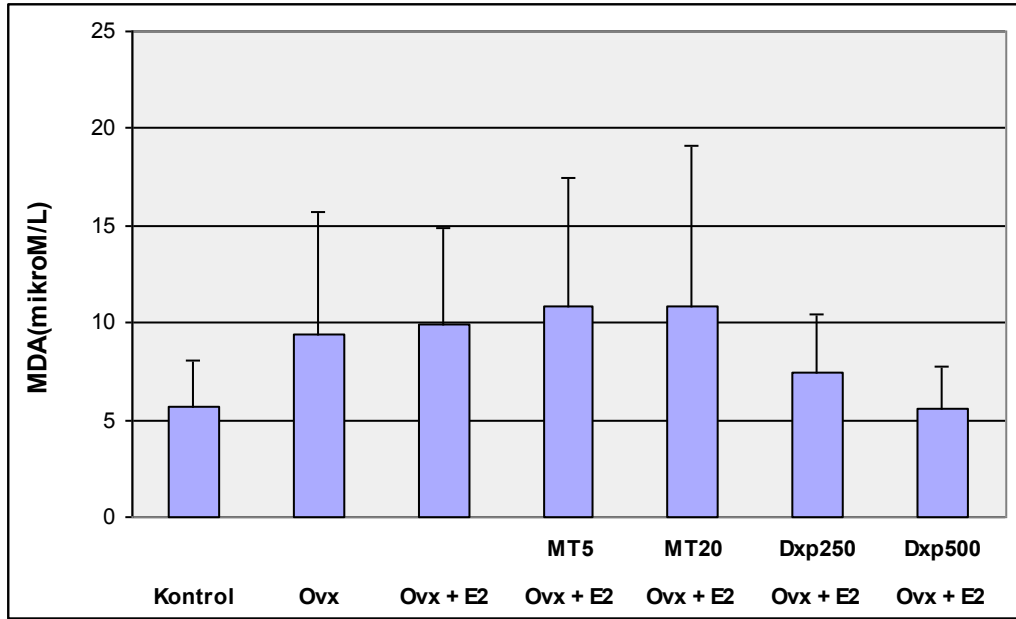
Gruplar	p	p
Ovx + E ₂ – Ovx + E ₂ + Dxp 250	0,003	p<0.01
Ovx + E ₂ – Ovx + E ₂ + Dxp 500	0,003	p<0.01
Ovx + E ₂ – Ovx + E ₂ + MT 20	0,003	p<0.01
Ovx + E ₂ + MT 20 – Ovx + E ₂ + Dxp 500	0,003	p<0.01



Şekil 13: GR düzeylerinin grafiksel olarak gösterilişi

Tablo 4: Gruplardaki MDA düzeylerinin ($\mu\text{M/L}$) istatistiksel olarak değerlendirilmesi

MDA	Kontrol	Ovx	Ovx + E ₂	Ovx + E ₂ + MT 5	Ovx + E ₂ + MT 20	Ovx + E ₂ + Dxp 250	Ovx + E ₂ + Dxp 500
Ort.D	5,69	9,43	9,93	10,84	10,81	7,41	5,59
Median	5,69	5,52	7,41	9,48	6,38	6,55	4,48
SD	2,35	6,28	4,92	6,61	8,28	3,052	2,11
s.e.m	0,83	2,37	1,86	2,49	3,13	1,154	0,79
Min	2,58	3,45	4,48	5,17	3,97	3,793	3,62
Max	9,48	18,28	17,58	24,48	26,21	11,72	8,28

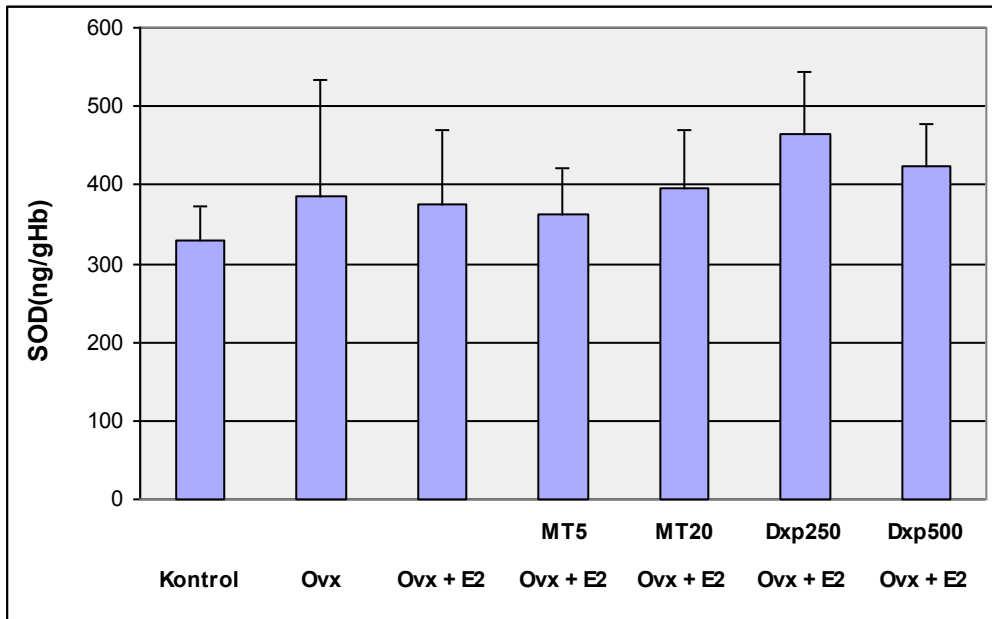


Şekil 14. MDA düzeylerinin grafiksel olarak gösterilişi

MDA düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p > 0.05$).

Tablo 5: Gruplardaki SOD düzeylerinin (ng/g Hb) istatistiksel olarak değerlendirilmesi

SOD	Kontrol	Ovx	Ovx + E ₂	Ovx + E ₂ + MT 5	Ovx + E ₂ + MT 20	Ovx + E ₂ + Dxp 250	Ovx + E ₂ + Dxp 500
Ort.D	329,25	386,04	375,45	362,94	396,07	464,88	425,07
Median	317,93	327,61	396,39	340,46	369,32	454,01	418,83
SD	44,08	147,54	95,21	57,23	73,65	77,78	52,34
s.e.m	15,58	55,76	35,98	21,63	27,84	29,39	19,78
Min	278,75	293,99	171,08	302,74	299,63	374,53	355,55
Max	407,22	711,09	458,04	466,19	511,74	574,82	510,41



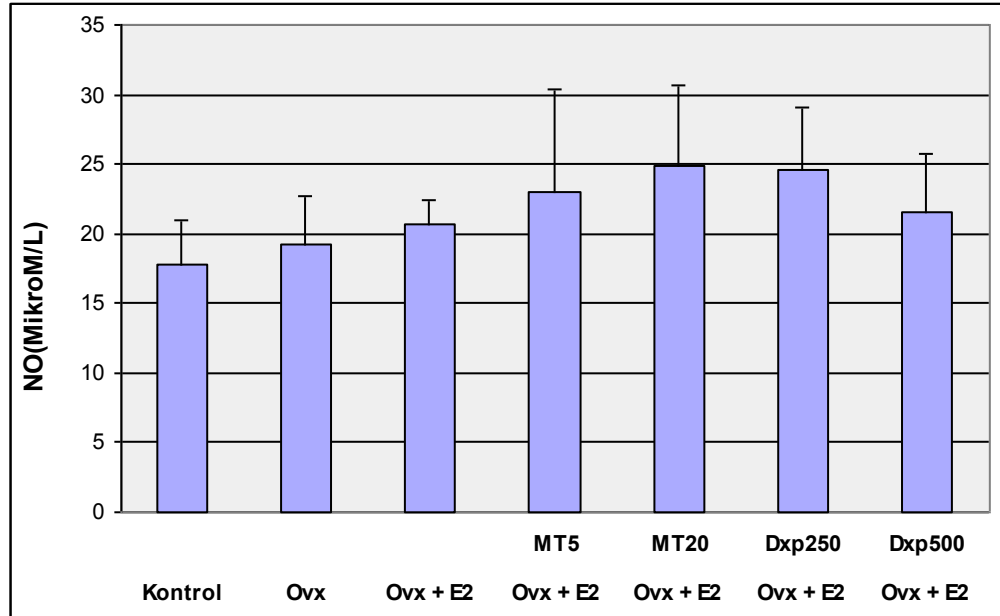
Şekil15: SOD düzeylerinin grafiksel olarak gösterilişi

SOD düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p > 0.05$).

Tablo 6: Gruplardaki NO düzeylerinin ($\mu\text{M/L}$) istatistiksel olarak değerlendirilmesi.

NO	Kontrol	Ovx	Ovx + E ₂	Ovx + E ₂ + MT 5	Ovx + E ₂ + MT 20	Ovx + E ₂ + Dxp 250	Ovx + E ₂ + Dxp 500
Ort.D	17,81	19,16	20,68	22,93	24,83	24,63	21,55
Median	17,58	18,55	20,46	19,98	25,27	22,45	21,73
SD	3,11	3,6	1,75	7,42	5,83	4,41	4,26
s.e.m	1,1	1,36	0,66	2,81	2,21	1,67	1,59
Min	13,29	13,89	18,86	13,09	15,81	21,14	15,66
Max	23,6	24,28	23,77	32,94	33,56	31,21	26,72

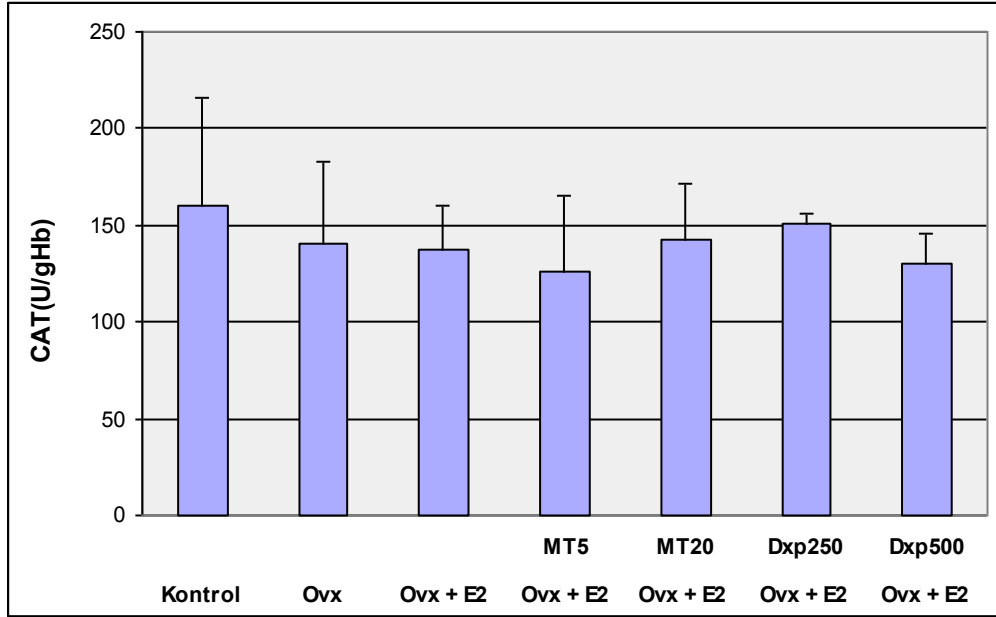
Gruplar	p	p
Ovx– Ovx + E ₂ + Dxp 250	0,026	p<0.05
Ovx – Ovx + E ₂ + MT 20	0,049	p<0.05



Şekil16: NO düzeylerinin grafiksel olarak gösterilişi

Tablo 7: Gruplardaki CAT düzeylerinin (U/gHb) istatistiksel olarak değerlendirilmesi

CAT	Kontrol	Ovx	Ovx + E ₂	Ovx + E ₂ + MT 5	Ovx + E ₂ + MT 20	Ovx + E ₂ + Dxp 250	Ovx + E ₂ + Dxp 500
Ort.D	159,9	140,9	137,34	126,08	142,49	150,47	130,32
Median	134,87	137,09	143,48	135,82	151,87	151,32	128,34
SD	55,62	42,12	22,99	38,72	29,46	5,69	14,89
s.e.m	19,67	15,91	8,69	14,64	11,14	2,15	5,63
Min	97,87	99,34	113,89	41,51	106,67	142,08	106,29
Max	245,95	227,37	178,11	154,33	187,94	157,57	150,24



Şekil 17: CAT düzeylerinin grafiksel olarak gösterilişi

CAT düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p > 0.05$).

5. TARTIŞMA

Menopozla beraber oluşan östrojen kaybı, KVH'da risk artışına katkıda bulunduğu gibi osteoporoz, sıcak basması, depresyon ve nörodejeneratif hastalıklar gibi bir takım sağlık problemlerinde de artışa sebep olmaktadır. Bu problemlerin azaltılmasında HRT, en sık kullanılan ajandır (1, 2). Ortalama yaşam süresinin uzamasıyla, menopozal dönemde geçirilen sürenin artması, bu olumsuz durumların tedavisini ön plana çıkarmıştır.

Yapılan çalışmalarda, postmenopozal kadınlarda azalmış östrojen sentezinin, oksidatif stresin artmasından sorumlu olduğu düşünülmektedir (3, 4, 5, 6). Menopozal kadınlarda östrojen kaybı nedeniyle, östrojenin koruyucu etkisinden muaf olunması, oksidatif stresi içeren ciddi metabolik bozukluklara neden olmaktadır (7). Oksidatif stres ateroskleroz, osteoporoz, kanser ve yaşlanma gibi birçok rahatsızlığın gelişiminde önemli rol almaktadır. Organizmada proteinler, lipidler, karbonhidratlar, nükleik asitler gibi birçok moleküller oksidatif strese maruz kalmaktadır. Özellikle LDL'nin oksidasyonu ateroskleroz gelişiminde anahtar rol oynamaktadır (8).

Östrojenin antioksidatif özelliğinin olasılıkla iki mekanizmadan kaynaklandığı rapor edilmiştir: Hidrofenolik yapılarından dolayı, östrojenler serbest radikalleri temizleyici özelliktedirler ve ikinci olası mekanizma ise, endojen antioksidatif enzim sistemi ile ilişkisi olmasıdır (24).

Araştırmamızda, eritrositlerde antioksidatif enzim sistemlerini ölçmemizin nedeni ise, bu hücrelerin devamlı olarak oksidatif strese maruz kalması nedeni ile iyi bir materyal olmasıdır (24).

Biz araştırmamızda ooferektomize ratlarda, östrojen tedavisine eklenen melatonin ve dekspantenol' ün antioksidan parametreler üzerine etkisini araştırdık. Böylece menopozda östrojen eksikliği sonucu artan oksidatif stres, östrojen tedavisine eklenen antioksidanlarla azaltılarak, başta kardiyovasküler hastalıklar olmak üzere osteoporoz gibi bu döneme özgü hastalıkların önlenebileceği düşünüldü.

Literatürde bu konu ile ilgili kısıtlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Ayrıca östrojenin, antioksidan enzimlere etkisini araştıran çeşitli çalışmalarda, oldukça farklı sonuçlar bulunmuştur. Çalışmaların bir kısmında östrojen ile GPx arasında pozitif korelasyon saptanırken (90, 91), diğer bazı çalışmalarda ise GPx ve östrojen

arasında negatif korelasyon saptanmıştır (92, 93). Bazı çalışmalarda ise antioksidan enzimlerle östrojen arasında korelasyon saptanmamıştır (94, 95).

Bizim araştırmamızda GSH düzeyi, melatonin ve dekspantenol alan gruplarda, Ovx grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Ovx+E₂ grubunda da, Ovx grubuna göre GSH düzeyi anlamlı olarak yükseldi. Ancak sadece östrojen alan grup ile östrojene ek tedavi verilen gruplar kıyaslandığında, ek tedavi gruplarında değerlerde artış saptanmakla beraber, istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.

Araştırmamızda GPx düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmemekle beraber, östrojen tedavisi verilen grupta daha belirgin olmak üzere, melatonin ve dekspantenol tedavisi ile, Ovx gruba göre değerlerde bir miktar yükselme izlenmesi, antioksidan sistemi olumlu yönde etkileyebileceğini düşündürmektedir.

GR düzeyinde, tedavi alan gruplarda kontrole göre anlamlı azalma saptadık. Ovx grup ile tedavi alan gruplar karşılaştırıldığında ise östrojen ve melatonin (5mg/kg/gün) tedavisi dışında kalan diğer gruplarda anlamlı azalma bulundu. Tedavi grupları kendi içinde karşılaştırıldığında ise GR düzeyi, Dxp (250-500 mg) alan gruplarda, melatonin (5 mg/kg/gün) alan gruba göre çok daha düşük bulundu.

NO düzeylerinin, Ovx gruba göre Ovx+E₂+MT20 ve Ovx+E₂+Dxp250 gruplarında istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunması, bu tedavilerin ateroprotektif etki açısından, yararlı olabileceğini düşündürmektedir.

CAT düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. MDA ve SOD düzeylerinde, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemekle beraber Dxp tedavisi ile, MDA düzeyinde ooferektomi sonrasında saptanan yükselmiş değerlerin düşmesi ve SOD düzeyinde ise artış saptanması, Dxp tedavisinin oksidatif hasar oluşumunu önleyici etkileri olabileceğini göstermektedir.

Elli sağlıklı postmenopozal kadın üzerinde yapılan bir araştırmada, premenopozal kadınlara göre postmenopozal dönemde, plazma MDA seviyesinde artış saptanırken, GSH, GPx ve SOD düzeylerinde önemli oranda azalma saptandı. Antioksidan enzimlerden olan CAT seviyesinde ise artış olduğu bildirildi (96). Neticede bu çalışma ile postmenopozal dönemde oksidatif stresin arttığı ileri sürülmüştür.

Postmenopozal dönemdeki 51 ve fertil dönemde, düzenli menstruasyonu olan 50 sağlıklı kadın üzerinde yapılan bir araştırmada, oksidatif stres göstergeleri incelendiğinde MDA, 4-hidroksinonenal ve okside LDL konsantrasyonları postmenopozal kadınlarda, fertil kadınlara göre yüksek olarak saptanmıştır (34). GPx konsantrasyonu ise fertil kadınlarda, postmenopozal kadınlara göre yüksek olarak bulunmuştur. Sonuçta bu çalışma ile oksidatif stresin postmenopozal kadınlarda, fertil kadınlara göre daha yüksek olduğu ve bu durumun östrojen eksikliğine bağlı olabileceği ileri sürülmüştür.

Özden ve ark. (97) yaptıkları bir araştırmada, ortalama 3,5 yıl süreyle konjuge ekin östrojen (CEE) ve CEE + medroksiprogesteron asetat (MPA) kullanımı sonucunda, eritrosit tiyobarbitürik asit reaktif substans (TBARS) seviyelerinde azalma izlenirken, GSH ve GPx aktivitelerinde ise artış saptanmıştır. Östrojenin yalnız kullanımı veya MPA ile kombine kullanımı, istatistiksel olarak anlamlı farklılık oluşturmamıştır. Bu araştırma sonucunda ERT veya HRT'nin oksidatif hasar oluşumuna karşı yararlı etki gösterebileceğini bildirmişlerdir.

Ooferektominin kemik dokusundaki antioksidan sisteme etkisinin incelendiği bir araştırmada, ooferektomi yapılan ratlarda 60 gün sonrasında femur dokusunda, MDA ve H₂O₂ seviyesinde artış izlenirken, antioksidan enzimlerden SOD, GPx düzeylerinde ise azalma saptanmıştır (9). Bu sonuç ile ooferektominin rat kemik dokusunda, oksidatif stresi indüklediği ve osteoporoz gelişiminde oksidatif stresin etkisi olabileceği gösterilmiştir.

Unfer ve ark. (18), çalışmalarında premenopozal, postmenopozal ve HRT verilen hastalarda, antioksidan enzim parametreleri incelendiğinde premenopozal ve postmenopozal hastalarda CAT, GPx ve TBARS aktivitelerinde önemli bir fark saptanmazken, SOD aktivitesinde postmenopozal hastalarda önemli miktarda azalma saptanmıştır. Ancak ortalama 4 yıl HRT (konjuge östrojen + progestin) tedavisi alan grupta, SOD aktivitesindeki azalmanın gözlenmediği ve HRT'nin menopozdaki SOD aktivite azalmasını antagonize ettiğini bildirmişlerdir.

Aynı şekilde Strehlow ve ark. (26) yaptıkları çalışmalarında, östrojenin in vitro ve in vivo olarak SOD ekspresyonunu, östrojen reseptör aktivitesi üzerinden arttırdığını göstermişlerdir. Aynı araştırmacılar östrojenin bu etkisinin SOD selektif olduğu ve GPx ve CAT seviyelerinde değişiklik olmadığını bildirmişlerdir.

Delibaşı ve ark. (98) çalışmalarında, üç ay boyunca HRT(0.625 mg CEE+ 2.5 mg MPA) tedavisi verilen postmenopozal hastalarda, HRT almayan hastalara göre plazma total antioksidan kapasitesi önemli oranda yüksek saptandı. Antioksidan kapasitedeki bu artış, özellikle LDL oksidasyonunu önlemesi ve dolayısıyla ateroskleroz sürecinin başlangıç aşamasında önem arz etmektedir. Bu araştırma sonucunda östrojenin, üç aylık tedavi sonrasında antioksidan etki gösterebileceğini bildirdiler.

Krstevska ve arkadaşları (99), sağlıklı ve koroner arter hastalığı olan pre, peri ve post menopozal gruplara ayrılmış 140 kadın üzerinde yaptıkları çalışmada, GPx aktivitesi ve total antioksidan status (TAS) seviyeleri, peri-post menopozal kadınlarda, premenopozal kadınlara göre önemli oranda düşük olarak saptandı. SOD aktivitesi de peri-post menopozal kadınlarda, istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber düşük olarak saptandı. SOD, GPx aktivitesi ve TAS seviyesi koroner arter hastalığı olan gruplar kıyaslandığında, post menopozal grupta, perimenopozal gruba göre önemli oranda düşük saptadılar. Sonuçta antioksidan enzim aktiviteleri, kontrol grubuna göre koroner hastalığı olan peri-post menopozal kadınlarda önemli oranda düşük saptandı. Araştırmacılar bu çalışmalarını ile, koroner kalp hastalığı olan menopozal kadınlarda TAS düzeylerinin önemli ölçüde düştüğünü ve sonuçta antioksidanların, ateroskleroza karşı koruyucu etki gösterdiği hipotezini doğrulamış olduklarını bildirmişlerdir.

Genel düşünce ERT ve HRT arasında oksidatif sisteme etki yönünden önemli fark olmadığı yönünde olsa da, HRT tedavisinin bir parçasını oluşturan gestagenlerin antioksidan sistem içindeki yerleri hala tartışmalıdır. Massafra ve arkadaşlarının (100), hipotalamik amenoreesi olan 48 kadın üzerinde yaptıkları çalışmada, transdermal E₂ (100 µg/gün), oral MPA (10 mg/gün), ve ikisinin beraber bir ay kullanımı sonucunda, eritrosit SOD, MDA ve CAT değerlerinde gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı. GPx değerinde östrojen tedavisi ile artış saptanırken, tedaviye gestagen eklenmesinin bu sonucu etkilemediği gözlemlendi. Sonuç olarak progestin kullanımı ile antioksidan/prooksidan dengede herhangi bir değişim gözlemediklerini ileri sürdüler. Bizim çalışmamızda SOD, MDA, CAT değerlerinde anlamlı fark saptanamamıştır.

Yapılan başka bir çalışmada ise progestinlerin, tek başlarına ya da transdermal E₂ ile birlikte kullanıldıklarında, lipid peroksidasyonunu azalttığı ve antioksidan etkilerinin bulunduğu bildirilmiştir. Ayrıca, HRT alanlarda lipid peroksidasyonunun azalmasının sadece östrojenlere bağlı olmayıp, seks steroidlerinin birlikte etkilerinden kaynaklandığının sonucuna varılmış ve E₂ olmadan MPA kullanımının dahi lipidlerin peroksidasyonunda inhibitör etkili olduğunu rapor etmişlerdir (90).

Hormon replasman tedavisinin, serumdaki total antioksidan status ve lipid peroksidasyonuna etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, menopozal dönemde oksidatif stresin arttığı, HRT veya ERT'nin oksidatif stresi azalttığı ve ikisi arasında etkinlik açısından fark olmadığı saptandı. Aynı zamanda her iki tedavinin de total antioksidan status değerinde, aralarında önemli fark olmadan artışa sebep olduğu saptandı (101). Sonuçta östrojen tedavisine, gestagen eklenmesinin östrojenin antioksidan aktivitesini engellemediği saptandı.

Postmenopozal 80 kadın üzerinde ERT (transdermal E₂ 50µg/gün) ve HRT'nin (E₂+ MPA 5 mg/gün, 12 gün) dört ay süreyle kullanımının antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmada, serbest radikal üretiminin ve membran fosfolipidlerinin oksidasyonunun bir göstergesi olan serum lipid peroksit seviyelerinin menopozdan sonra çok yükseldiğini ve hormonal terapiden sonra ise düştüğünü saptamışlardır. GSH ve GPx seviyelerinin menopozdan sonra düştüğünü ve hormonal terapi sonrasında yükseldiği, SOD ve CAT aktivitesinin ise tüm gruplarda benzer olduğu ve hormonal terapi sonrasında CAT aktivitesinin azaldığı, SOD aktivitesinde ise değişiklik olmadığı saptandı. Östrojen tedavisine MPA eklenmesinin sonuçlarda farklılık yaratmadığı gözlemlendi (24).

Sonuçta gruplar arasında CAT aktivitesinde bir fark saptanmamış ve bu enzim düzeylerinin, ERT veya HRT alımı sonrasında, iki tedavi arasında önemli farklılık olmadan düştüğünü bildirmişlerdir. CAT seviyesindeki azalmayı, tedavi sonrası GPx aktivitesinin artmasına bağlamışlar ve bu durumun oluşmasında CAT ve GPx enzimlerinin aynı substratı (H₂O₂) inaktive etmesinin etkili olduğunu ileri sürmüşlerdir (24). Bu ilişki sonucunda, GPx aktivitesindeki artışın, beraber çalıştığı anti-oksidatif bir enzim olan CAT aktivitesinde azalmaya neden olabileceğini rapor etmişlerdir.

Tüm bu çalışmalar menopozdan sonra membran fosfolipidlerinin peroksidasyonunun ve serbest radikal üretiminin arttığını ve E₂'nin yerine konmasıyla, serbest radikal hasarının inhibe edildiğini göstermişlerdir. Bednarek ve arkadaşları araştırmalarında bu sonuçları destekler nitelikte, postmenopozal kadınlarda E₂ replasman tedavisinin, serbest radikal reaksiyonlarını inhibe ettiğini, menopozdan önceki antioksidan kapasitenin tekrar kazanıldığını ve hem ERT hem de HRT alan grupta, TBARS düzeylerinin birbirinden farklı olmadığını bildirmişlerdir (3).

Araştırmamızda diğer çalışmalara benzer şekilde ERT ile GSH seviyesinde anlamlı yükselme saptadık. GPx değerinde ise istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber artış izlendi. Tüm tedavi gruplarındaki GR seviyesinde izlenen düşüş ERT'de gözlenmedi ve oofektomize gruba göre artış saptandı. Çalışmamızda GR düzeyinin düşük olmasının, GSH düzeylerinin yüksek olmasına bağlı olduğu düşünülebilir. Çünkü GR, okside glutatyonun redükte hale dönüşümünde görev almaktadır.

Oral kontraseptif steroid kullanımının hücrel antioksidatif enzim aktiviteleri üzerine etkilerinin incelendiği bir araştırmada, seks hormonlarının, hücrel antioksidatif enzim aktivitelerini arttırmak yoluyla, antioksidatif özellik gösterebilecekleri ileri sürüldü (91). Sex steroidlerinin hücrel antioksidatif enzim aktiviteleri üzerine stimülatör etki yapması, diğer yazarlar tarafından da doğrulanmış olup, GPx aktivitesinin, menstrüel sikluskaki değişimlerinin önemli olduğundan söz edilmiştir. Özellikle, folliküler fazın sonlarına doğru ve luteal fazın erken dönemlerinde yüksek GPx düzeyleri rapor edilmiş olup, bu iki fazda da östrojen düzeyleri en yüksek durumundadır (40).

Ancak farklı olarak Jendryczko ve arkadaşlarının (92), 28 sağlıklı kadında, iki farklı düşük doz oral kontraseptif kullanımının, antioksidan parametreler üzerine etkilerini inceledikleri çalışmalarında, hastalara trifazik (30, 40, 30 mcg etinil östradiol (EE) + 50, 75, 125 mcg levonorgestrel) veya kombine (30 mcg EE + 150 mcg desogestrel) preparatlar üç siklus boyunca kullanıldı. Neticede her iki grupta SOD, CAT ve GPx aktivitelerinde önemli derecede azalma saptanırken, lipid peroksidasyon göstergesi olan MDA seviyelerinde ise artış gözlemlendi. Bu sonuç düşük doz oral kontraseptif kullanımının, antioksidan enzim aktivitelerini azaltıp, lipid

peroksidasyonunu arttırarak, kardiyovasküler hastalık riskinin artmasına neden olabileceğini destekler niteliktedir.

Kanaley ve arkadaşlarının (93) yaptıkları çalışmada, amenoreik ve normal menstrüel siklusu olan atletlerde, egzersiz sonrası antioksidan enzim seviyeleri incelendiğinde, amenoreik kadınlarda hem dinlenme anında hem de egzersiz sırasında, östrojen seviyelerinin daha düşük olduğu saptandı. GPx aktivitesinin dinlenme zamanı ve egzersiz boyunca amenoreik kadınlarda yüksek olduğu, GR aktivitesinin ise dinlenme anında her iki grupta benzer iken, egzersiz sırasında ise amenoreik kadınlarda daha yüksek olduğu gözlemlendi. Plazma lipid peroksidasyon ve CAT aktivitesinde hem dinlenme hem de egzersiz sırasında, önemli değişim saptanmadı. Sonuçta bu çalışma ile geçici hormonal değişikliklerin amenoreik kadınlarda, kan antioksidan enzim sistemini etkilediği ve GPx aktivitesi ile östrojen düzeyleri arasında negatif korelasyon olduğunu bildirmişlerdir.

Öztekin ve arkadaşlarının (17) yaptıkları bir araştırmada, ooforektomi yapıldıktan iki hafta sonra rat böbrek dokusunda, kontrol grubuna göre lipid peroksidasyon ürünü olan MDA değerinde yükselme saptanırken, GSH ve GPx değerlerinde azalma saptandı. Ooforektomize gruba birinci ve üçüncü haftalarda estradiol propionate (450 µg/kg), ikinci ve dördüncü haftalarda MPA (15 mg/kg), olmak üzere toplam dört haftalık tedavi verilmesinin, MDA düzeylerini azaltırken, GSH ve GPx düzeylerini ise yükselttiği saptandı. Ooforektomiye pinealektomi eklenince MDA'da önemli artış, GSH ve GPx değerlerinde de önemli oranda azalma saptandı. Pinealektomi eklenen gruba hormonal tedavi verilmesiyle, MDA değerinde azalma ve GSH ve GPx değerlerinde de artış izlendi. Sonuçta ooforektominin lipid peroksidasyonunu arttırdığı ve antioksidan enzimlerden GSH ve GPx değerlerini azalttığı saptandı. Ooforektomiye ek olarak pinealektomi yapılmasının oksidatif hasarı önemli oranda arttırdığı saptandı. Ancak hormon tedavisinin, ooforektomize ve/veya ooforektomize + pinealektomize ratlarda, antioksidan sistemi aktive ederek, dokuları lipid peroksidasyonuna karşı koruduğu gösterildi.

Aynı şekilde Baydaş ve ark. (102) ratlar üzerinde yaptıkları araştırmada, ışığa maruz bırakılarak melatonin sentezinin inhibe edilmesi durumunda beyin, karaciğer ve böbrek dokusunda, lipid peroksidasyon ürünü olan MDA düzeyinin arttığı saptandı. Subkutan olarak verilen iki haftalık melatonin (1 mg/kg) tedavisinin,

özellikle beyin olmak üzere, böbrek ve karaciğer dokularında, lipid peroksidasyonunu azalttığını, aynı zamanda GPx aktivitesini de arttırdığını saptadılar. Sonuçta melatoninin sadece serbest radikal tutucusu olmayıp, aynı zamanda antioksidan enzim olan GPx aktivitesini de uyardığı gösterildi.

Feng ve ark. (46) çalışmalarında, ooferektomi yapıldıktan 16 hafta sonra, rat beyinde, MDA düzeylerinde artış, SOD ve GSH düzeylerinde ise azalma saptamışlar ve uzun süreli melatonin veya östradiol kullanımının ooferektomize ratlarda, oksidatif stresi azalttığını öne sürmüşlerdir. Çalışmalarında 16 hafta süreyle melatonin (5, 10, 20 mg/kg) veya 17- β östradiol (80 μ g/kg) kullanımı sonucunda, rat beyinde MDA değerinde azalma saptanırken, GSH ve SOD düzeylerinde ise artış saptanmıştır. Melatoninin en düşük dozunun (5 mg/kg), en yüksek doz (20 mg/kg) kadar MDA üzerinde etkili olduğunu bildirmişlerdir. Yine, sonuçlarına göre, uzun süreli, düşük doz melatonin kullanımının yararlı etkilerinin daha belirgin olacağı görüşünü savunmuşlardır.

Ooferektomize ratlarda, gece total melatonin düzeyinin düştüğü ve bunun östradiol verilmesiyle restore edilebileceği düşünülmektedir. Bu noktada, melatonin ve östradiolün oksidatif stres üzerine etkileri benzer olup, yine de ikisinin farklı dozlarda birlikte kullanımı ve ek olarak dekspantenol kullanımının etkileri üzerinde çalışmaların yetersiz olduğu görülmektedir.

Baydaş ve arkadaşları (103) yaptıkları çalışmada, pinealektomi yapılan ratların, karaciğer ve beyin dokularında lipid peroksidasyon düzeyleri, GPx aktivitesi ve okside glutatyon gibi antioksidan enzimlerin günlük değişimlerini incelemişler. Kontrol grubu ratlarda, gece endojen melatoninin, GPx aktivitesi ve GSSG seviyelerinde artışa neden olduğu ayrıca, GPx' in günlük ritmini de düzenlediğini saptamışlardır. Ancak pinealektominin, melatoninin günlük ritmini bozarak, GPx aktivitesinde baskılanmaya neden olduğunu saptamışlardır. Neticede yalnızca farmakolojik dozlarda değil, fizyolojik konsantrasyonlardaki melatoninin de antioksidan enzimleri stimüle edebileceğini bildirmişlerdir.

Homosisteinin oksidan-antioksidan sistem ve koroner damarlarda oluşturduğu değişiklikler üzerine, melatoninin etkisinin incelendiği bir araştırmada, ratlara altı hafta süre ile verilen, homosistein (0.71 mg/kg) ve homosistein (0.71 mg/kg) + melatonin (1 mg/kg) tedavilerinin ardından, antioksidan enzim düzeyleri

incelendiğinde; homosistein uygulanan grupta plazma MDA düzeyinde artma saptanırken, SOD, CAT, GSH ve GPx aktivitelerinde ise azalma saptandı. Tedaviye melatonin eklenen grupta ise MDA seviyesi azalırken, SOD, CAT, GSH ve GPx aktivitelerinde ise artış saptandı (104). Sonuçta tedaviye antioksidan bir madde olan melatonin eklenmesi ile homosisteinin, antioksidan sistem üzerinde oluşturduğu olumsuz etkisinin önlenebileceği bildirildi.

Biz de araştırmamızda GSH seviyelerini, melatonin tedavisi alan gruplarda yüksek olarak saptadık. Aynı zamanda istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber melatonin tedavisi ile GPx seviyesinde de artış saptandı.

Shehata ve ark. (16) çalışmalarında, ooforektomize ratlara dört hafta süre ile HRT (E₂ 30 µg/kg+ Progesterone 1 mg/kg) ve ek olarak antioksidan (vitamin E 30 mg/kg ve C 20 mg/kg) tedavi verilen gruplar kıyaslandığında, oksidatif stres parametreleri olan MDA, ox-LDL (okside LDL) ve GSSG seviyelerinin ooforektomize ratlarda artış, GSH seviyelerinde ise azalma gösterdiğini saptadılar. Ooforektomize ratlara HRT eklendiğinde MDA, ox-LDL ve GSSG seviyelerinde düzelme meydana gelirken GSH seviyelerinde değişiklik izlenmedi. HRT tedavisine antioksidan eklendiğinde ise özellikle GSH seviyelerinde önemli oranda düzelme (artış) izlendiği bildirildi. Sonuçta HRT' ye antioksidan eklenmesinin antioksidan sistemi olumlu yönde etkilediği ve kardiyovasküler hastalıklardan korunmada yararlı etki gösterebileceği ileri sürüldü.

Hormon replasman tedavisine antioksidan eklenmesinin (Vitamin C ve E) diabet eşlik eden postmenopozal hastalarda, antioksidan enzim seviyelerine etkisini araştıran bir çalışmada, altı hafta süre ile verilen HRT (0.625 mg estradiol ve 5 mg MPA) tedavisi sonunda, GSH, GPx ve CAT seviyelerinde yükselme saptanırken, MDA' da ise azalma saptandı (19). HRT'ye antioksidan eklendiğinde, sadece HRT alan gruba göre, antioksidan enzim konsantrasyonlarını önemli düzeyde yükselterek antioksidan sistemi kuvvetlendirici etki yapabildiğini bildirdiler.

Postmenopozal HRT ve bu tedaviye antioksidan bir madde olan vitamin E eklenmesinin, antioksidan enzimlere etkisini araştıran bir çalışmada, hastalar üç gruba ayrılarak sırasıyla transdermal östradiol, transdermal östradiol (0.05 mg) + MPA (10 gün oral) ve transdermal estradiol + MPA + vitamin E (600 mg/gün) tedavisi altı ay süresince uygulandı. Kontrol grubu ile postmenopozal grup arasında, SOD ve

GPx değerlerinde farklılık saptanmazken, postmenopozal grupta MDA değerinin arttığı saptandı. Östrojen tedavisi MDA, SOD ve GPx aktivitelerinde farklılık meydana getirmedi. Östrojene MPA eklenmesi de MDA, SOD ve GSH-Px değerlerinde farklılık oluşturmadı. Süre sonunda MDA değeri vitamin E eklenen grupta istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük saptanırken, SOD ve GPx değerlerinde değişiklik izlenmedi (94). Neticede vitamin E eklenen grupta MDA değerinin azalması, tedaviye antioksidan eklenmesinin oksidatif hasarı azaltabileceğini göstermektedir.

Guemouri ve ark. (95) ise yaptıkları çalışmada, menopoz döneminin, premenopozal döneme kıyasla, SOD, CAT ve GPx gibi antioksidan enzim aktiviteleri üzerinde değişiklik meydana getirmediğini bildirmişlerdir.

Cerrahi menopozlu 36 kadının, altı ay süre ile ERT (CEE 0.625 mg/gün) kullanımının, eritrositlerde antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkisinin incelendiği bir araştırmada, ERT'nin CAT, paraoksonaz (PON) ve MDA seviyelerinde değişiklik meydana getirmediğini saptadılar (8). Araştırmacılar çalışmalarında, ERT'nin antioksidan enzim sistemini etkilemediğini ve bu konuyu incelemek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğunu bildirmişlerdir.

Biz de araştırmamızda HRT veya eklenen antioksidan tedavi ile GSH seviyesinde artış saptanırken, SOD, CAT, MDA ve GPx değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptamadık.

Etensel ve ark. (105) çalışmalarında ratlarda deneysel testis torsiyonu oluşturulduktan sonra, farklı iki dozda (250-500 mg/kg) dekspantenol (Dxp) tedavisinin doku hasarına ve lipid peroksidasyonuna etkisi incelendiğinde, 500 mg/kg Dxp verilen grupta, serum MDA seviyelerinde önemli miktarda azalma saptandı. Ancak 250 mg/kg Dxp verilen grupta ise MDA seviyelerinde farklılık saptanmadı. Sonuçta Dxp'nin lipid peroksidasyonu ve doku hasarını azaltıcı etkisi doza bağımlı olup, 500 mg/kg dozunda verildiğinde etkili olduğu gösterildi.

Ratlarda gama radyasyonun zararlı etkisine karşı pantotenolün koruyucu etkisinin incelendiği bir araştırmada (106), ratlara uygulanan 0.25 Gy dozunda 3 kür radyasyon sonrasında, rat karaciğer dokusunda GSH ve koenzim A azalırken, GSSG ve MDA seviyelerinde artış saptandı. Her kürden iki gün önce verilen D-Pantotenol tedavisi (26mg/kg/IV) sonrasında MDA ve GSSG değerlerinde azalma meydana gelirken, antioksidan özelliği olan GSH ve koenzim A seviyesinde ise artış saptandı.

Neticede pantotenolün ve derivelerinin GSH ve koenzim A seviyelerinde yükselme sağlayarak, reaktif oksijen radikallerinin ve iyonize radyasyonun zararlı etkilerine karşı koruyucu etki gösterebileceği bildirildi.

Sonuçta dekspantenol ile ilgili kısıtlı sayıdaki çalışmalar, oksidatif hasar oluşumunu önleyebilecek etkisinin olabileceğini göstermiştir. Biz de çalışmamızda Dxp (250-500 mg) tedavisi ile, GSH seviyesinin arttırdığı ve istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber lipid peroksidasyon ürünü olan MDA düzeyini azalttığını saptadık.

Östrojenin oksidatif stres üzerine etkisinin incelendiği diğer bir çalışmada, ooferektomi yapılan ratlarda, kontrol gruba kıyasla plazma lipid peroksidlerinin önemli oranda arttığı ve total antioksidan status' un (TAS) ise azaldığı saptandı. Subkutan implant olarak verilen 17-β estradiol (1.5 mg/ 8hafta) tedavisi sonucunda TAS artarken, lipid peroksid ürünlerinde azalma saptandı. NO seviyeleri ise ooferektomize ratlarda önemli oranda azalırken, ERT ile önemli oranda yükselme saptandı (107). Sonuç olarak artan oksidatif stres, NO' in vasküler yatak üzerindeki olumlu etkisinin bozulmasına sebep olabileceğinden, ERT ile bu olumsuz etkinin önlenebileceği ileri sürüldü.

Ooferektomize sıçanlarda östrojen yerine koyma tedavisinin klitoral kavernoza dokü üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, ratlara üç ay boyunca subkutan olarak uygulanan, 17-β estradiol Benzoate (10 µgr/kg/gün) tedavisi sonrasında, serum ve dokü NO düzeylerinde artış saptanırken, dokü endotelin-1 seviyelerinde ise azalma saptandı (108). Bu araştırma, cerrahi olarak oluşturulmuş menopozda östrojen replasmanının, endotelin-1 ve NO' nun serum ve dokü düzeyleri arasında denge sağlayarak, aterosklerozdan koruyucu etki oluşturabileceği ileri sürüldü.

ERT'nin plazma NO ve endotelin-1 seviyelerine etkisinin incelendiği bir çalışmada, 15 postmenopozal kadının, altı ay süreyle 17-β estradiol(2 mg/gün) ve ek olarak üç ayda bir 10 gün boyunca MPA (5 mg/gün) kullanımının, plazma NO seviyelerini arttırdığı ve endotelin-1 düzeyinde ise azalmaya neden olduğu bildirildi (109). Sonuçta ERT'nin bu mekanizma üzerinden kardiyovasküler sisteme yararlı etkisi olabileceği ileri sürülmüştür.

Yılmaz ve arkadaşları (110), tarafından yapılan kısa süreli HRT'nin serum NO düzeyine etkisinin incelendiği çalışmada, 20 sağlıklı postmenopozal kadının üç ay

HRT (2 mg/gün östradiol-17-valerat + 1 mg/gün siproteron asetat) sonrasında, serum NO düzeylerinde anlamlı artış olduğu gösterildi (110). Bu araştırma ile kısa süreli hormon replasmanının, NO düzeyinde artışa sebep olarak, menopozda bozulan endotel fonksiyonunu geri kazanmada etkili olabileceğine dikkat çekilmiştir.

Biz de çalışmamızda ERT ile NO düzeylerinde, istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemekle beraber artış saptadık. NO değerindeki bu yükselmenin, tedaviye melatonin (20 mg/kg/gün) ve Dxp (250 mg/kg/gün) eklenmesi ile istatistiksel olarak anlamlı olacak düzeye geldiğini saptadık.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Postmenopozal dönem yaşam beklentisinin artmasıyla beraber giderek uzamaktadır. Bu dönemin uzaması kadınların bu dönemdeki hastalıklara daha çok maruz kalmalarına yol açmaktadır. Menopozal dönemde sık görülen hastalıklardan olan koroner arter hastalıkları, osteoporoz ve nörodejeneratif hastalıkların oksidatif stres ile ilişkili olduğu çeşitli araştırmalarda güçlü kanıtlarla gösterilmiştir.

ERT genel olarak oksidatif stres üzerine olumlu etki göstermekte ve bu tedavi veya tedaviye eklenen antioksidan kullanımı ile bu etkinin güçlendiği bir takım çalışmalarda gösterilmekle beraber (16, 19) kimi çalışmalarda bu etki gözlenmemiştir (94,95). Ancak literatür incelendiğinde, bu konu ile ilgili kısıtlı sayıda çalışma bulunduğundan bu etki tam olarak açığa kavuşturulmuş değildir.

Melatonin ve dekspanenol alan gruplarda GSH düzeyini yüksek bulduk. Ayrıca istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber Dxp tedavisi ile, ooferektomi sonrasında saptanan yükselmiş MDA değerinde azalma ve SOD düzeyinde ise artış saptadık. GPx düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmemekle beraber, östrojen tedavisi verilen grupta daha belirgin olmak üzere Ovx+E₂+MT5 ve Ovx+E₂+Dxp250 gruplarında, değerlerde yükselme izlenmesi bu tedavilerin, antioksidan etkinliği artırmak için yararlı etkide bulunabileceğini göstermektedir.

GR düzeyinde, tedavi alan gruplarda, kontrole göre anlamlı azalma saptadık. Ooferektomize grup ile tedavi alan gruplar karşılaştırıldığında ise östrojen ve melatonin (5mg/kg/gün) tedavisi dışında kalan diğer gruplarda anlamlı azalma bulundu. Tedavi grupları kendi içinde karşılaştırıldığında ise GR düzeyi, dekspanenol alan gruplarda, melatonin (5mg) alan gruba göre çok daha düşük bulundu. GR, okside glutasyonu redükte hale dönüşümünde görev aldığından, araştırmamızda bulduğumuz düşük GR düzeyinin, GSH düzeylerinin yüksek olmasına bağlı olduğu düşünülebilir. NO düzeylerinin ise melatonin (20 mg/kg/gün) ve Dxp (250 mg/kg/gün) tedavisi ile yükselmesi, tedavilerin ateroprotektif etki açısından yararlı etkide bulunabileceğini düşündürmektedir.

Araştırmamız, östrojen replasman tedavisine melatonin veya dekspantenol eklenmesinin, östrojenin antioksidan etkisine katkı sağlayabileceğini göstermekle beraber, literatürde kısıtlı sayıda çalışma bulunması, konunun açıklığa kavuşturulabilmesi için daha ileri çalışmalara gereksinim olduğunu göstermektedir.

ÖZET

Çalışmamızdaki amaç ooferektomize ratlarda, östrojen replasman tedavisi (ERT) ve bu tedaviye eklenen melatonin (MT) veya dekspantenol (Dxp) tedavisinin antioksidan parametreler üzerine etkisinin belirlenmesidir.

Elli adet dişi Wistar albino sıçan kullanıldı. Kontrol grubu dışında diğer ratlara anestezi eşliğinde ooferektomi uygulandı. Tedavi öncesi menopoz gelişimi için üç hafta beklendi. 14 gün tedavi verildi. Sıçanlar yedi gruba ayrıldı; kontrol grubuna (n=8) herhangi bir işlem uygulanmadı, diğer gruplara ise (n=7) ooferektomi yapıldı. (Ovx): Ooferektomize, (Ovx+E₂): ooferektomize + östradiol (100 µg/kg/gün), (Ovx+E₂+MT5): ooferektomize + östradiol + melatonin (5 mg/kg/gün), (Ovx+E₂+MT20): Ovx + östradiol + melatonin (20 mg/kg/gün), (Ovx+E₂+Dxp250): Ovx + östradiol + dekspantenol (250 mg/kg/gün), (Ovx+E₂+Dxp500): Ovx + östradiol + dekspantenol (500 mg/kg/gün). Östrojen subkutan, diğer ilaçlar intraperitoneal yoldan uygulandı. Kanda katalaz (CAT), süperoksid dismutaz (SOD), glutatyon (GSH), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR), malondialdehit (MDA), nitrik oksit (NO) seviyelerine bakıldı.

GSH seviyesi, melatonin (5–20 mg) ve dekspantenol (250-500 mg) tedavisi alan gruplarla kıyaslandığında, Ovx grubunda önemli düzeyde düşük bulundu. Ayrıca Ovx+E₂ grubunda, Ovx gruba göre GSH seviyelerinde önemli derecede yükselme saptadık.

GR düzeyinde, tüm tedavi alan gruplarda kontrole göre anlamlı azalma saptadık. Ayrıca GR düzeyi, Ovx grup ile kıyaslandığında, diğer tüm gruplarda (Ovx+E₂ ve Ovx+E₂+MT5 dışında) anlamlı derecede düşük olarak saptandı. Tedavi gruplarında ise, Dxp alan gruplarda (250- 500 mg/kg/gün), melatonin (5 mg/kg/gün)

alan gruba göre çok daha düşük bulundu. NO seviyelerinde, Ovx gruba göre, Ovx+E2+MT20 ve Ovx+E2+Dxp 250 gruplarında anlamlı yükselme saptandı.

Gruplar arasında SOD, CAT, GPx ve MDA enzim değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptamadık.

Sonuç olarak ERT'ye melatonin veya dekspantenol eklenmesi, GSH ve antioksidan enzim seviyelerini etkileyerek, östrojenin antioksidan etkisine katkı sağlayabilir.

Anahtar sözcükler: Östrojen, Ooferektomize rat, Oksidatif stres, Dekspantenol, Melatonin

İletişim adresi: Adnan Menderes Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum

Anabilim Dalı AYDIN / TÜRKİYE

Tel:05357001654

SUMMARY

The aim of this study was to evaluate the effects of melatonin and Dexpanthenol addition to the estrogen therapy on antioxidant parameters in ovariectomized rats.

Fifty Wistar albino rats were used. Rats were ovariectomized under anesthesia twentyone days before the treatment except control group. Treatment was given for fourteen days. The rats were divided into seven groups. Control group(n=8) and overiectomized groups (n=7), treated as follows: Control group: received no treatment, (Ovx): ovariectomized group received no treatment, (Ovx+E₂): ovariectomized+ estradiol group received E₂ (100 µg/kg/day), (Ovx+E₂+MT5): Ovariectomized+ E₂ + Melatonin group received (5mg/kg/d) melatonin addition to estradiol. (Ovx+E₂+MT20): ovariectomized + E₂ + Melatonin group received (20 mg/kg/d) of melatonin addition to estradiol, (Ovx+E₂+Dex250): Ovariectomized+ E₂ + dexpanthenol group received (250 mg/kg/d) of dexpanthenol addition to estradiol. (Ovx+E₂+Dex500) group received (500 mg/kg/d) of dexpanthenol addition to

estradiol. Estradiol was given subcutaneously (SC), melatonin and dexpanthenol administered intraperitoneally (IP). Rats were decapitated on the fourteenth day.

Catalase (CAT), Superoxide dismutase (SOD), Glutathione (GSH), Glutathione peroxidase (GSH-Px), Glutathione reductase (GR), Malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO) activities in blood were measured.

GSH levels were significantly lower in Ovx group compare to melatonin (5–20 mg/kg/d) and dexpanthenol (250-500 mg/kg/d) groups. Also in Ovx+ E₂ group GSH levels were significantly higher than Ovx group.

GR levels were significantly decreased in all treatment group compare to Control groups. GR levels were significantly lower in all other groups compare to Ovx group but Ovx+ E₂ and Ovx+ E₂+MT5. Comparison of GR levels in treatment groups, dexpanthenol receiving groups (250-500 mg/kg/d) were significantly lower than melatonin (5 mg/kg/d) receiving group. There were no significant differences between groups in SOD, CAT, Gpx and MDA. NO levels were significantly higher in Ovx+E₂+MT20 and Ovx+ E₂+Dxp 250 group than ovx group.

Additional Melatonin and Dexpanthenol treatment, may increase beneficial effects of estrogen therapy via alteration of GSH levels and antioxidant enzyme levels.

Key Words: Estrogens, Ovariectomized rat, Oxidative stress, Dexpanthenol, Melatonin .

Correspondence: Adnan Menderes Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum
Anabilim Dalı AYDIN/ TÜRKİYE
Tel: 05357001654

KAYNAKLAR

1. Sowers JR. Diabetes mellitus and cardiovascular disease in women. Arch Intern Med 1998; 58: 617- 21.
2. Greendale GA, Lee NP, Arriola ER. The menopause. Lancet 1999; 353: 571- 80.
3. Bednarek-Tupikowska G, Tupikowski K, Bidzinska B, et al. Serum lipid peroxides and total antioxidant status in postmenopausal women on hormone replacement therapy. Gynecol Endocrin 2004;19: 57- 63.
4. Gura T. Estrogen: key player in heart disease among women. Science 1995; 269: 771- 3.
5. Trevisan M, Browne R, Ram M, et al. Correlates of markers of oxidative status in the general population. Am J Epidemiol 2001; 154: 348- 56.
6. Ke RW, Pace DT, Ahpkas RA. Effect of hormone therapy on oxidative stress and endothelial function in African American and Caucasian postmenopausal women. Fertil Steril 2003; 79: 1118–22.
7. Kankofer M, Radzki RP, Bienko M, Albera E. Anti-oxidative/Oxidative Status of Rat Liver After Ovariectomy. J Vet Med 2007; 54: 225-229.
8. Şendağ F, Akçay D.Y, Öztekin K, Sözmen Y.E. The effect of estrogen replacement therapy on paraoxonase, erythrocyte catalase and erythrocyte MDA in postmenopausal women. Türk Jinekoloji ve Obstetrik Derneği Dergisi 2005; 2: 107-110.

9. Muthusami S, Ramachandran I, Muthusamy B. Ovariectomy induces oxidative stress and impairs bone antioxidant system in adult rats *Clin Chim Acta* 2005; 360: 81- 6.
10. Tirentini P, De Gaetani, S.F, Criscuola M. Fundamentals and clinics in pineal research. New York: Raven Pres, 1987; 291- 304.
11. Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Qi W. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogenspecies: a review of the evidence. *Cell Biochem Biophys* 2001; 34: 237–256.
12. Okatani Y, Wakatsuki A, Reiter RJ, Miyahara Y. Melatonin reduces oxidative damage of neural lipids and proteins in senescence-accelerated mouse. *Neurobiol Aging* 2002; 23: 639–644.
13. Reiter R. J, Tan D.X, Mayo J.C, Sainz R.M, Leon J. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochimica Polonica* 2003; 50: 1129–1146.
14. Slyshenkov VS, Rakowska M, Moiseenok AG, Wojtczak L. Pantothenic acid and its derivatives protect Ehrlich ascites tumor cells against lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* 1995; 19: 767–772.
15. Wojtczak L, Slyshenkov V.S. Protection by pantothenic acid against apoptosis and cell damage by oxygen free radicals—the role of glutathione. *Biofactors* 2003; 17: 61.
16. Shehata M, Kamel A. M. Protective effect of antioxidant adjuvant treatment with hormone replacament therapy against cardiovascular diseases in ovariectomized rats. *Endocrine Regulations* 2008; 42: 69-75.

17. Öztekin E, Baltacı A, Tiftik A. Lipid peroxidation in ovariectomized and pinealectomized rats: the effects of estradiol and progesterone supplementation. *Cell Biochem Funct* 2007; 25: 551–554.
18. Unfer C.T, Conterato M.G, Silva N.C. Influence of hormone replacement therapy on blood antioxidant enzymes in menopausal women *Clinica Chimica Acta* 2006; 369: 73 – 77.
19. Nazıroğlu M, Şimşek M, Şimşek H, Aydilek N. The effects of hormone replacement therapy combined with vitamins C and E on antioxidants levels and lipid profiles in postmenopausal women with Type 2 diabetes. *Clinica Chimica Acta* 2004; 344 63–71.
20. Reiter RJ, Tan D, Osuna C, Gitto E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stres: *J Biomed sci* 2000; 7: 444-458.
21. Halliwell, B. The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. *Haemostasis* 1993; 23: 118–126.
22. Harman, D. Free radical theory of aging: increasing the functional life span. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1994; 717: 1–15.
23. Southorn, P.A. & Poowis, G. Free radicals in medicine. Involvement in human disease. *Mayo Clinic Proceedings* 1988; 63: 390–408.
24. Bednarek-Tupikowska G, Tworowska U, Jedrychowska I, Radomska B, Tupikowski K, Bidzinska-Speichert B, Milewicz A. Effects of oestradiol and oestropregestin on erythrocyte antioxidative enzyme system activity in postmenopausal women. *Clin Endocrin* 2006; 64: 463- 468.
25. Reiter RJ. Melatonin: Lowering the high price of free radicals. *New Physiol Sci* 2000; 15: 246-250.

26. Strehlow K, Rotter S, Wassmann S, Adam O, Grohe C, Laufs K, Böhm M, Nickenig G. Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen. *Circ Res* 2003; 93: 170- 177.
27. Mikkola T, Viinikka L, Ylikorkala O. Estrogen and postmenopausal estrogen/progestin therapy: effect on endothelium-dependent prostacyclin, nitric oxide and endothelin- 1 production. *Eur J Obstet Gynecol* 1998; 79: 75- 82.
28. Van Baal W. M, Emeis J.J, Kenemans P, Kessel H, Peters-Muller ERA, Schalkwijk CG, van der Moorem MJ, Stehouwer CDA. Short-term hormone replacement therapy: reduced plasma levels of soluble adhesion molecules. *Eur J Clin Invest* 1999; 29: 913- 921.
29. Vennalm A, Bentin G, Petterson AS. Dependence of the metabolism of nitric oxide (NO) in healthy whole blood on the oxygenation of its red cell haemoglobin. *Br J Pharmacol* 1992;106: 507-508.
30. Vennalm A, Bentin G, Edlund A. Metabolism and excretion of nitric oxide in humans. *Circ Res* 1993;106: 507-508.
31. Ekerhovd E, Enskog A, Caidahl K, Klintland N, Nilsson L, Brannström M, Norstrom A. Plasma concentrations of nitrate during the menstrual cycle, ovarian stimulation and ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod* 2001; 16:334-1339.
32. Miquel J, Ramirez- Bosca A, Ramirez- Bosca V. J, Alperi D.J. Menopause: A review on the role of oxygen stress and favorable effects of dietary antioxidants *Archives of Gerontology and Geriatrics* 2006; 42: 289–306.
33. Gürdöl F, Öner-İyidoğan Y, Yalçın O, Genç S, Buyru F. Change in enzymatic antioxidant defense system in blood and endometrial tissue of women after menopause. *Res Commun Mol Pathol* 1997;97: 38– 46.

34. Signorelli S. S, Neri S, Sciacchitano S. Behaviour of some indicators of oxidative stress in postmenopausal and fertile women. *Maturitas* 2006; 53: 77-82.
35. Subbiah MTR, Kessel B, Agrawal M, Rajan R, Abplanalp W, Rymaszewski Z. Antioxidant potential of specific estrogens on lipid peroxidation. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77: 1095– 7.
36. Sugioka K, Shimosegawa Y, Nakano M. Estrogens as natural antioxidants of membrane phospholipid peroxidation. *FEBS Lett* 1987; 210: 137–9.
37. Bednarek-Tupikowska G. Antioxidant properties of estrogens. *Ginekol Pol* 2002; 73: 61– 7.
38. Sugioka K, Shimosegawa Y, Nakano M. Estrogens as natural antioxidant of membrane membrane phospholipid peroxidation. *FEBS Lett* 1987; 210: 37–9.
39. Moosmann B, Behl C. The antioxidant neuroprotective effects of estrogens and phenolic compounds are independent from their estrogenic properties. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 8867–72.
40. Massafra C, De Felice C, Gioia D, Buonocore G. Variations in erythrocyte antioxidant glutathione peroxidase activity during the menstrual cycle. *Clin Endocrinol* 1998; 49: 63–7.
41. Ghanam K, Javellaud J, Ea-Kim L, Oudart N. The protective effect of 17 beta-estradiol on vasomotor responses of aorta from cholesterol- fed rabbit is reduced by inhibitors of superoxide dismutase and catalase. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 249: 858–64.

42. Massafra C, Buonocore G, Gioia D, Sargentini I. Changes in the erythrocyte antioxidant enzyme system during transdermal estradiol therapy for secondary amenorrhea. *Gynecol Endocrinol* 1996; 10: 155–8.
43. Samsioe G. Cardioprotection by estrogens: mechanisms of action – the lipids. *Int J Fertil Menopausal Stud* 1994; 39: 43–9.
44. Newnham HH. Oestrogens and atherosclerotic vascular disease – lipid factors. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1993; 7:61–93.
45. Kuhl H. Cardiovascular effects and estrogen, gestagen substitution therapy. *Ther Umsch* 1994; 51: 748–54.
46. Feng Z, Zhang J. Long-ter melatonin or 17 β -estradiol supplementation alleviates oxidative stres in ovariectomized adult rats. *Free Radical Biol Med* 2005; 39: 195-204.
47. Kireev R.A, Tresguerres C. F, Garcia C, Ariznavarreta C, Vara E. Melatonin is able to prevent the liver of cold castrated female rats from oxidative and pro-inflammatory. *J Pineal Res* 2008; 45: 394- 402.
48. Tan DX, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC, Reiter RJ. Melatonin: A potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrine J* 1993; 1: 57-60
49. Borg DC. Oxygen free radical and tissue injury. In: Tan M, Samson F, eds. *Oxygen Free Radicals and Tissue Injury*. Boston, Birkhguser,1993: 12- 53.
50. Reiter RJ, Oh CS, Fijimori O: Metatonin: Its intracellular and genomic actions. *Trends Endocrinol Metab* 1996; 7: 22-26
51. Roberts JE, Hu DN, Wishart JF. Pulse radiolysis studies of melatonin and chloromelatonin. *J Photochem Photobio* 1997;142: 125-132

52. Zang LY, Cosma G, Gardner H, Vallynathan V. Scavenging of reactive oxygen species by melatonin. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1425: 467- 477.
53. Tan DX, Manchester C.L, Reiter RJ. Significance of melatonin in antioxidative defense system: Reactions and products. *Biol Signals and Receptors* 2000; 9: 137-159.
54. Poeggeler G, Saarela S, Reiter RJ, Tan DX, Chen LD. Melatonin, a highly potent endogenous scavenger and electron donor: new aspects of the oxidation chemistry of this indole assessed in vitro. *Ann NW Acad Sci* 1994; 738: 419-420.
55. Marshall KA, Reiter RJ, Poeggeler B, Aruoma OI, Halliwell B. Evaluation of the antioxidant activity of melatonin in vitro. *Free Radical Biol Med* 1996; 21: 307-315.
56. Chan TY, Tang PL. Characterization of the antioxidant effects of melatonin and related indoleamines in vitro. *J Pineal Res* 1996, 20: 187-191.
57. Noda Y, Mori A, Liburty R, Packer L. Melatonin and its precursors scavenge nitric oxide. *J Pineal Res* 1999; 27: 159-163.
58. Beckman JS, Chert J, Ischiropoulos H, Crow JP. Oxidative chemistry of peroxynitrite. *Methods Enzymol* 1994; 1233: 299- 240.
59. Gilad E, Cuzzocrea S, Zingarelli B, Salzman AL, Szabo C. Melatonin as a scavenger of peroxynitrite. *Life Sci* 1997; 60:169-174.
60. Cuzzocrea S, Costantino G, Mazzon E, Micoli A, De Sarro A, Caputi AP. Beneficial effects of melatonin in a rat model of splanchnic artery occlusion and reperfusion. *J Pineal Res* 2000; 28: 52-63.

61. Cuzzocrea S, Tan DX, Costantino G, Mazzon E, Caputi AP, Reiter RJ. The protective role of endogenous melatonin in carrageenan-induced pleurisy in the rat. *FASEB J* 1999; 13:1930-1938.
62. Cuzzocrea S, Zingarilli B, Costantino G, Caputi AP. Protective effect of melatonin in nonseptic shock model induced by zymosan in the rat. *J Pineal Res* 1998; 25: 24-33.
63. El-Sokkary GH, Reiter R J, Cuzzocrea S, Caputi AP, Hassanein AMM, Tan DX. Role of melatonin in reduction of lipid peroxidation and peroxynitrite formation in non-septic shock induced by zymosan. *Shock* 1999; 12: 402-408.
64. Antolin I, Obstet B, Burkhardt S, Hardeland R. Antioxidative protection in a high melatonin organism: The dinoflagellate *Gonyaulax polyedra* is rescued from lethal oxidative stress by strongly elevated, but physiologically possible concentrations of melatonin. *J Pineal Res* 1997;23: 182-190.
65. Antolin I, Rodriguez C, Sainz RM, Mayo JC, Uria H, Kotter M. Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect on gene expression for antioxidant enzymes. *FASEB J* 1996;10: 882- 90.
66. Harris E. D. Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J* 1992; 6: 2675- 83.
67. Barlow- Walden LR, Reiter RJ, Abe M, Pablos M, Menendez-Pelaez A, Poeggeler B. Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Neurochem Int* 26:447-502;1995.
68. Jain A, Martensson J, Stole E, Auld PAM, Meister A. Glutathione deficiency leads to mitochondrial damage in brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 1913-1917.

69. Okatani Y, Wakatsuki A, Kaneda C. Melatonin increases activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase in fetal rat brain. *J Pineal Res* 2000; 28: 89-96.
70. Pablos MI, Agapito Mt, Gutierrez R, Recio JM, Reiter RJ, Barlow-Walden IR, Acuna-Castroviejo D, Menendez-Pelaez A. Melatonin stimulates the activity of the detoxifying enzyme glutathione peroxidase in several tissues of chicks. *J Pineal Res* 1995; 19: 111-115.
71. Pablos MI, Reiter RJ, Ortiz GG, Guerrero JM, Agapito MT, Chuang JI, Sewerynek E. Rhythms of glutathione peroxidase and glutathione reductase in brain of chick and their inhibition by light. *Neurochem Int* 1998; 32: 69-75.
72. Pozo D, Reiter RJ, Calvo JR, Guerrero JM. Physiologically concentrations of melatonin inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum. *Life Sci* 1994; 55: 455-460.
73. Bettahi I, Pozo D, Osuna C, Reiter RJ, Acuna Castroviejo D, Guerrero JM. Melatonin reduces nitric oxide synthase activity in rat hypothalamus. *J Pineal Res* 1996; 20: 205-210.
74. Guerrero J.M, Reiter R.J, Ortiz G.G, Pablos M.I. Melatonin prevents increases in neural nitric oxide and cyclic GIVIP production after transient brain ischemia and reperfusion in the Mongolian gerbil. *J Pineal Res* 1997; 23: 24-31.
75. Akdeniz. Y, Tarhan R, Barut İ. Can dexpanthenol prevent peritoneal adhesion formation? An experimental study. *Turkish Journal of Trauma & Emergency Surgery* 2007; 13: 94- 100.
76. Aprahamian M, Dentinger A, Stock-Damge C, Kouassi JC, Grenier JF. Effects of supplemental pantothenic acid on wound healing: experimental study in rabbit. *Am J Clin Nutr* 1985; 41: 578-89.

77. Weimann BI, Hermann D. Studies on wound healing: effects of calcium D-pantothenate on the migration, proliferation and protein synthesis of human dermal fibroblasts in culture. *Int J Vitam Nutr Res* 1999; 69: 113-9.
78. Barton-Wright EC, Elliott WA. The pantothenic acid metabolism of rheumatoid arthritis. *Lancet* 1963; 38: 862-3.
79. Slyshenkov VS, Dymkowska D, Wojtczak L. Pantothenic acid and pantothenol increase biosynthesis of glutathione by boosting cell energetics. *FEBS Lett* 2004; 569: 169–172.
80. Slyshenkov VS, Piwocka K, Sikora E, Wojtczak L. Pantothenic acid protects jurkat cells against ultraviolet light-induced apoptosis. *Free Radic Biol Med* 2001; 30: 1303–1310.
81. Slyshenkov VS, Omelyanchik SN, Moiseenok AG, Trebukhina RV, Wojtczak L. Pantothenol protects rats against some deleterious effects of gamma radiation. *Free Radic Biol Med* 1998; 24: 894–899.
82. Wojtczak L, Slyshenkov VS. Protection by pantothenic acid against apoptosis and cell damage by oxygen free radicals—the role of glutathione. *Biofactors* 2003; 17: 61–73.
83. Aebi H. Catalase. In: *Methods of enzymatic analysis*, Bergmeyer HU (ed). Academic Press, New York, 1974; 673–677.
84. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-358.
85. Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione. Applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* 1969; 27: 502-522.

86. Kakkar R, Mantha S.V, Radhi J, Prasad K. Increased oxidative stress in rat liver and pancreas during progression of streptozotocin-induced diabetes. *Clinical Science* 1998; 94: 623- 632.
87. Racker E. Glutathione reductase (liver and yeast). In: *Methods in Enzymology*, Colowick SP, Kaplan N.O. (Editors), Academic Pres, New York, 1955; 2: 722-725.
88. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A. Simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34: 497- 500.
89. Navarro-Gonzalves J.A, Garcia-Benayas C, Arenas J. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. *Clin. Chem.* 1998; 44: 679- 81.
90. Tranquilli A.L, Mazzanti L, Cugini A.M. Transdermal estradiol and medroxyprogesterone acetate in hormone replacement therapy are both antioxidants. *Gynecol Endocrinol* 1995; 9: 137- 141.
91. Capel ID, Jenner M, Williams DC, Donaldson D, Nath A. The effect of prolonged oral contraceptive steroid use on erythrocyte glutathione peroxidase activity. *J Steroid Biochem* 1981; 14: 729- 732.
92. Jendryczko A, Tomala J, Janosz P. Effects of two low-dose oral contraception on erythrocyte superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities. *Zentralbl Gynakol* 1993;115: 469–72.
93. Kanaley JA, Ji L.L. Antioxidant enzyme activity during prolonged exercise in amenorrheic and eumenorrheic athletes. *Metabolism* 1991; 40: 88–92.
94. İnal M, Sunal E, Kanbak G, Zeytinoğlu S. Effects of postmenopausal hormone replacement and a-tocopherol on the lipid profiles and antioxidant status. *Clinica Chimica Acta* 1997; 268: 21–29.

95. Guemouri L, Artur Y, Hetbeth B, Jeandel C, Cuny G, Siest G. Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in blood. *Clin Chem* 1991; 37: 1932–7.
96. Vaishali S, Sanjeev S, Neelima S. Status of antioxidant enzymes and trace metals in postmenopausal women. *J Obstet Gynecol of india* 2005; 55: 64- 66.
97. Özden S, Dildar K, Kadir H. Y. The effects of hormone replacement therapy on lipid peroxidation and antioxidant status. *Maturitas* 2001; 38: 165–170.
98. Delibaşı T, Koçkar C, Çelik A. Antioxidant effects of hormone replacement therapy in postmenopausal women. *Swiss Med Wkly* 2006; 136: 510-514.
99. Krstevska M, Dzhekova-Stojkova S, Bosilkova G. Menopause, coronary artery disease and antioxidants. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39: 641- 644.
100. Massafra C, Buonocore G, Gioia D. Effects of estradiol and medroxyprogesterone acetate treatment on erythrocyte antioxidant enzyme activities and malondialdehyde plasma levels in amenorrhoeic women. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 173- 175.
101. Tupikowska G, Tupikowski K, Bidzinska B, Pawlak A. Serum lipid peroxides and total antioxidant status in postmenopausal women on hormone replacement therapy. *Gynecol Endocrinol* 2004; 19: 57–63.
102. Baydaş G, Erçel E, Canatan H, Dönder E. Effect of melatonin on oxidative status of rat brain, liver and kidney tissues under constant light exposure. *Cell Biochem Funct* 2001; 19: 37- 41.

103. Baydaş G, Gürsu M. F, Yılmaz S, Canpolat S. Daily rhythm of glutathione peroxidase activity, lipid peroxidation and glutathione levels in tissues of pinealectomized rats. *Neuroscience Letters* 2002; 323:195–198.
104. Yüce A, Aksakal M. Ratlarda homosisteinin oksidan-antioksidan sistem ve koroner damarlarda oluşturduğu değişiklikler üzerine melatoninin etkisi. *F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi* 2006, 20; 51-59.
105. Etensel B, Özkısacık S, Özkara E. Dexpanthenol attenuates lipid peroxidation and testicular damage at experimental ischemia and reperfusion injury. *Pediatr Surg Int* 2007; 23: 177–181.
106. Slyshenkov S. V, Omelyanchik N.S, Moiseenok G.A, Trebukhina V.R. Pantothenol protects rats against some deleterious effects of gamma radiation. *Free Radical Biology & Medicine* 1998; 24: 894- 899.
107. Hernandez I, Delgado J. L, Díaz J. 17 β -Estradiol prevents oxidative stress and decreases blood pressure in ovariectomized rats. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 2000; 279: 1599-1605.
108. Beder N, DüNDAR M, Yenisey Ç, Koçak İ. Ooferektomize sıçanlarda östrojen yerine koyma tedavisinin klitoral kavernozaal doku üzerine olan etkileri: NO, VEGF, endotelin düzeyleri. *Üroloji* 2007; 33: 284- 289.
109. Best P.J, Berger P.B, Miller V.M, Lerman A. The effect of estrogen replacement therapy on plasma nitric oxide and endothelin-1 levels in postmenopausal women. *Ann Intern Med* 1988; 128: 285- 288.
110. Yılmaz A, Kabaroğlu C, Habif S, Özmen D. Postmenapozal kadınlarda kısa süreli hormon replasman tedavisinin serum nitrik oksid düzeyleri ve lipid profiline etkileri. *Türk Geriatri Dergisi* 2004; 7: 66-69.

