

**T.C
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**ÖSTROJEN REPLASMAN (ERT) VE HORMON
REPLASMAN TEDAVİSİ (HRT) ALAN POST-
MENOPOZAL KADINLARDA SERUM sVCAM,
sE-SELEKTİN, LEPTİN DÜZEYLERİNİN MENOPOZUN
PATO FİZYOLOJİSİ VE OKSİDATİF STRES
PARAMETRELERİ İLE İLİŞKİSİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

**DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ
PROF. DR. ÇİĞDEM YENİSEY**

DR. TUNCAY BIÇAKÇI

AYDIN – 2007

ÖNSÖZ

Uzmanlık Öğrenciliği eğitimimin süresince bilgi deneyimlerinden faydalandığım, tezimin yazılması ve yürütülmesi aşamasında desteklerini hiç esirgemeyen sevgili hocam Prof.Dr. Çiğdem YENİSEY'e, çalışmamda Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı ile ilişkili kısımların gerçekleştirilmesinde ve tezimin düzeltmelerindeki emekleri için Yrd.Doç.Dr. Samet KAFKAS'a Anabilim Dalımızdaki tüm hocalarıma, asistanlığım boyunca her zaman uyum içinde ve zevkle çalıştığım asistan ve teknisyen arkadaşlarıma, bugünlere gelmemde en büyük emeği olan canım aileme, her konuda beni destekleyen ve daima yanımda olan biricik eşime teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No:</u>
Önsöz.....	I
İçindekiler.....	II
Şekiller.....	III
Tablolar.....	IV
Kısaltmalar.....	VI
1. GENEL BİLGİLER	
1.1. Östrojenin Etki Mekanizması.....	1
1.2. Hormon Replasman Tedavisi (HRT) ve Önemi	2
1.3. Östrojen, Vasküler Endotel ve Vazoaktif Ajanlar.....	3
1.4. Östradiol ve Eritrosit Enzim Sistemleri.....	5
1.5. Östrojen ve Glutasyon (GSH)	8
1.6. Östrojen, Lipidlerin Peroksidasyonu ve Malondialdehit (MDA) Oluşumu.....	9
1.7. Östrojen ve Nitrik Oksit (NO*).....	10
1.8. Östrojen ve Myeloperoksidaz (MPO)	15
1.9. Östrojen ve Leptin.....	17
2. ÇALIŞMANIN AMACI	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM	
3.1. Gereçler.....	19
3.2. Çalışma Grupları.....	19
3.3. Kan Örneklerinin Alınması, İşlenmesi ve Saklanması.....	21
3.4. Rutin Biyokimya Testleri ve Hormon Analizleri.....	21
3.5. CAT Ölçüm Yöntemi.....	22
3.6. MDA Ölçüm Yöntemi.....	22
3.7. GSH Ölçüm Yöntemi.....	22
3.8. GSH-Px Ölçüm Yöntemi.....	23
3.9. GR Ölçüm Yöntemi.....	23
3.10. NO* (Nitrit+Nitrat) Ölçüm Yöntemi.....	24
3.11. MPO Ölçüm Yöntemi.....	24
3.12. ELISA İle Ölçülen Parametreler (sVCAM-1, sE-Selektin ve Leptin).25	25
3.13. İstatistiksel değerlendirme.....	25
4. BULGULAR	26
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	51
6. ÖZET	60
7. SUMMARY(İNGİLİZCE ÖZET)	61
8. KAYNAKLAR	63

Şekil 1.	Endotelial hücrelerdeki vazoaaktif ajanlar	4
Şekil 2.	Hücre içindeki anti-oksidatif sistemler.....	6
Şekil 3.	Eritrositlerde yer alan anti-oksidatif enzim sistemleri.....	6
Şekil 4.	Süperoksit'in dismutasyonu ve antioksidatif enzimler.....	7
Şekil 5.	CAT enziminin katalizlediği reaksiyon.....	7
Şekil 6.	GSH'ın yapısı ve GSH-Px enziminin işlevi.....	8
Şekil 7.	GR enziminin işlevi.....	9
Şekil 8.	Lipidlerin peroksidasyonu ve MDA oluşumu.....	10
Şekil 9.	L-arginin'den NO [•] sentezi.....	11
Şekil 10.	NO [•] radikali ve hücrel savunma mekanizmasında ilişkili olduğu sistemler.....	14
Şekil 11.	Nötrofillerde MPO'nun yer aldığı reaksiyonlar.....	17
Şekil 12.	E ₂ düzeylerinin grafiksel olarak gösterilmesi.....	27
Şekil 13.	FSH düzeylerinin grafiksel olarak gösterilmesi.....	28
Şekil 14.	LH düzeylerinin grafiksel olarak gösterilmesi.....	29
Şekil 15.	AKŞ düzeylerinin grafiksel olarak gösterilmesi.....	30
Şekil 16.	BUN düzeylerinin grafiksel olarak gösterilmesi.....	31
Şekil 17.	CRE düzeylerinin grafiksel olarak gösterilmesi.....	32
Şekil 18.	ALT düzeylerinin grafiksel olarak gösterilmesi.....	33
Şekil 19.	AST düzeylerinin grafiksel olarak gösterilmesi.....	34
Şekil 20.	CHOL düzeylerinin grafiksel olarak gösterilmesi.....	35
Şekil 21.	HDL düzeylerinin grafiksel olarak gösterilmesi.....	36
Şekil 22.	LDL düzeylerinin grafiksel olarak gösterilmesi.....	37
Şekil 23.	TG düzeylerinin grafiksel olarak gösterilmesi.....	38
Şekil 24.	CAT düzeylerinin grafiksel olarak gösterilmesi.....	39
Şekil 25.	MDA düzeylerinin grafiksel olarak gösterilmesi.....	40
Şekil 26.	GSH düzeylerinin grafiksel olarak gösterilmesi.....	41
Şekil 27.	GSH-Px düzeylerinin grafiksel olarak gösterilmesi.....	42
Şekil 28.	GR düzeylerinin grafiksel olarak gösterilmesi.....	43
Şekil 29.	NO düzeylerinin grafiksel olarak gösterilmesi.....	44
Şekil 30.	MPO düzeylerinin grafiksel olarak gösterilmesi.....	45
Şekil 31.	sVCAM-1 düzeylerinin grafiksel olarak gösterilmesi.....	46
Şekil 32.	sE-Selektin düzeylerinin grafiksel olarak gösterilmesi.....	47
Şekil 33.	Leptin düzeylerinin grafiksel olarak gösterilmesi.....	48
Şekil 34.	FM grubunda BMI'e göre leptin düzeylerinin grafiksel olarak gösterilmesi.....	49
Şekil 35.	Obez olmayan gruplarda leptin düzeylerinin grafiksel olarak gösterilmesi.....	50

TABLolar

Sayfa No:

Tablo 1. ERT ve HRT'nin NO ⁺ üretimine etkisi ile ilgili veriler.....	12
Tablo 2. Grupların klinik olarak karakteristikleri.....	26
Tablo 3. Gruplardaki E ₂ düzeylerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	27
Tablo 4. Gruplardaki FSH düzeylerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	28
Tablo 5. Gruplardaki LH düzeylerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	29
Tablo 6. Gruplardaki AKŞ düzeylerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	30
Tablo 7. Gruplardaki BUN düzeylerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	31
Tablo 8. Gruplardaki CRE düzeylerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	32
Tablo 9. Gruplardaki ALT düzeylerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	33
Tablo 10. Gruplardaki AST düzeylerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	34
Tablo 11. Gruplardaki CHOL düzeylerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	35
Tablo 12. Gruplardaki HDL düzeylerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	36
Tablo 13. Gruplardaki LDL düzeylerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	37
Tablo 14. Gruplardaki TG düzeylerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi	38
Tablo 15. Gruplardaki CAT düzeylerinin istatistiksel olarak Değerlendirilmesi.....	39
Tablo 16. Gruplardaki MDA düzeylerinin istatistiksel olarak Değerlendirilmesi.....	40
Tablo 17. Gruplardaki GSH düzeylerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	41
Tablo 18. Gruplardaki GSH-Px düzeylerinin istatistiksel olarak Değerlendirilmesi.....	42
Tablo 19. Gruplardaki GR düzeylerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	43
Tablo 20. Gruplardaki NO düzeylerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	44

Tablo 21. Gruplardaki MPO düzeylerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	45
Tablo 22. Gruplardaki sVCAM-1 düzeylerinin istatistiksel olarak Değerlendirilmesi.....	46
Tablo23. Gruplardaki sE-Selektin düzeylerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	47
Tablo 24. Gruplardaki leptin düzeylerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	48
Tablo 25. HRT almayan grupta BMI'lerine göre leptin düzeylerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	49
Tablo 26. Obez olmayan FM grubu ile diğer gruplardaki leptin düzeylerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	50

KISALTMALAR

ERT: Östrojen Replasman Tedavisi

HRT: Hormon Replasman Tedavisi

GnRH: Gonadotropin Salgılatıcı Hormon

FM: Fizyolojik Menopoz

HUVEC: Human Umbilical Vein Endothelial Cell (İnsan Göbek Kordonu Toplardamar Endotel Hücresi)

mRNA: Messenger RNA (Haberci RNA)

E₂: Östradiol

PAI-1: Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1

HDL: Yüksek Dansiteli Lipoproteinler

LDL: Düşük Dansiteli Lipoproteinler

FSH: Follikülü Stimüle Edici Hormon

LH: Luteinize Edici Hormon

AKŞ: Açlık Kan Şekeri
BUN: Üre
CRE: Kreatinin
ALT: Alanin Amino Transferaz
AST: Aspartat Amino Transferaz
CHOL: Kolesterol
PGI₂: Prostaksilin
NO: Nitrik Oksit
ET-1: Endotelin-1
PGH₂: Prostaglandin H₂
EDHF: Endotelden-Türeyen Hiperpolarize edici faktör
ICAM-1: Intercellular Adhesion Molecule-1
VCAM-1: Vascular Cell Adhesion Molecule
sE-selektin: Soluble Endothelial-Leukocyte Adhesion Molecule-1
vWF: von Willebrand Factor
TM: Thrombomodulin
cFn: Cellular Fibronectin
NOS: Nitrik Oksit Sentaz
MPO: Myeloperoksidaz
SOD: Süperoksit Dismutaz
CAT: Katalaz
GSH: Glutasyon
GSH-Px: Glutasyon Peroksidaz
GR: Glutasyon Redüktaz
MDA: Malondialdehit
H₂O₂: Hidrojen Peroksit
NADPH: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
Se: Selenyum
MPA : Medroxyprogesterone Acetate
LPO: Lipid Peroksidasyonu
TBARS: Thiobarbituric Acid Reactive Substances
TAS: Total Antioxidant Status
OHSS: Overlerde Hiperstimülasyon Sendromu
BMI: Body Mass Index
ELISA: Enzyme-Linked Immuno- Sorbent Assay

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Östrojenin Etki Mekanizması

Östrojenler, 18 karbonlu steroid hormonlardır. Kanda bulunan başlıca östrojen, östradiol (E_2) dür. Her ne kadar, 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. İnsan uterin damarları, safenöz venleri ve koroner arter duvarlarında E_2 reseptörleri saptanmıştır. Önemli bir 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. Ayrıca, tavşan aortundan elde edilen endotel hücre hatlarında östrojen reseptörüne benzer bağlayıcı bir aktivite bulunmuş olup, rat testisinden elde edilen diğer endotel hücre hattında bu aktiviteye rastlanmamıştır. Bazı çalışmalarda, immunohistokimya teknikleri kullanarak, kobaylarda endotelde östrojen reseptörü saptanmıştır, halbuki insanlarda uterus damarlarında endotelde veya endometriumda spiral arterlerde boyanabilir bir reseptör tespit edilememiştir. Bununla beraber, iki farklı grup çalışmalarında, HUVEC ve aynı zamanda insan aort ve koroner arter endotel hücrelerinde östrojen reseptörlerine ait mRNA saptamışlardır. Bu veriler klasik östrojen reseptörlerinin insan vasküler endotel hücrelerinde var olduğunu göstermektedir. Ayrıca, E_2 'nin HUVEC hücrelerini östrojen reseptörleri aracılığı ile ilgili mekanizmalar yoluyla hücre apoptozisinden koruduğu görülmektedir (1).

1.2. Hormon Replasman Tedavisi (HRT / ERT) ve Önemi

Menopoz, aterojenik risk faktörleri nedeniyle, kardiyovasküler risklerin artması ile ilişkili bir durumdur. Ayrıca, menopozdan sonra abdominal obezite, dislipidemi, kan basıncının yükselmesi, proinflamatuvar ve protrombik durumlar ortaya çıkmakta ve bunlar insülin rezistansına neden olmaktadır. Ateroskleroz ise, damarlarda lipidden zengin lezyonların infiltrasyonu, E-selektin gibi hücre-adhezyon moleküllerinin üretimi, fibrinojen ve PAI-1 gibi prokoagülan faktörler yoluyla fibröz dokunun stimülasyonu ile ortaya çıkmaktadır.

Epidemiyolojik çalışmalar, erkekler ile kıyaslandığında, üreme çağındaki kadınların kardiyovasküler hastalıklara karşı korunduğunu göstermektedir. Bu farklılığın menopoz ile birlikte azaldığı gösterilmiş olup, bu durum östrojenin kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu bir etki oluşturabileceği hipotezini ortaya çıkarmıştır. Epidemiyolojik veriler, HRT'nin sağlıklı post-menopozal kadınlarda kardiyovasküler riskleri azalttığını öne sürmektedir. Randomize ve kontrollü bir çalışmada ise, HRT'nin ilk dört yılda kardiyovasküler risklerin azalması ile ilgili olmadığı ileri sürülmektedir (2).

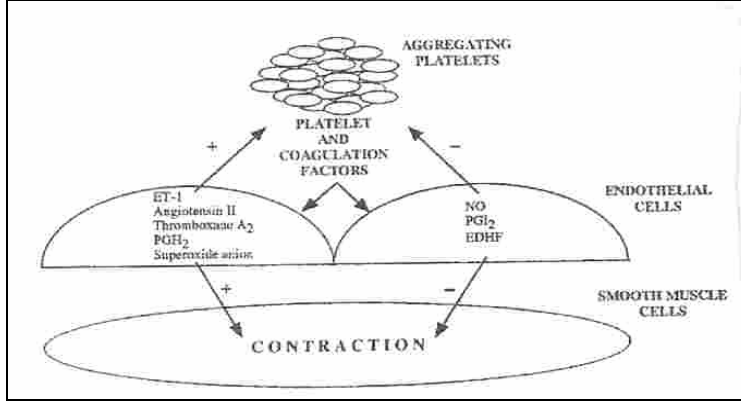
Menopozdan önce, kadınların kardiyovasküler hastalıklara karşı riski erkekler ile kıyaslandığında önemli ölçüde azdır, fakat menopozdan sonra erkekler ile arasındaki bu fark kapanmaktadır. Daha da önemlisi, kardiyovasküler hastalıklar nedeni ile mortalitenin erken menopozda bağımsız bir risk faktörü olduğu saptanmıştır.. Bu nedenle, endojen olarak oluşan östrojenin kardiyoprotektif bir etkisi olduğu ileri sürülmüştür. Hormon replasman tedavisininin önemli bileşeni östrojen olup, bazen progestinlerin, östrojenin vasküler yararlılığını azaltabileceği ileri sürülmüştür. Bununla beraber, son veriler kombine şekilde olan HRT'nin de kardiyovasküler hastalıklara karşı koruduğunu göstermiştir (1).

Kardiyovasküler hastalıklara karşı HRT'nin koruyucu mekanizması ile ilişkili çeşitli indirekt mekanizmalar öne sürülmüştür. Bunlar, lipid profilinin olumlu bir şekilde değişmesi, karbohidrat homeostazının ve kan basıncının

düşürülmesidir. HRT'nin damar koruyucu etkisinin, östrojenin HDL'yi yükseltmesi ve LDL'yi düşürmesidir. Bununla beraber, genel düşünce, östrojen aracılığı ile oluşan kan lipid ve lipoproteinlerindeki bu olumlu değişimin aslında bütün bu kardiyovasküler korumada % 20-30 oranında sorumlu olmasıdır. Kanıtları gittikçe artan bir durum ise, damar duvarları üzerindeki östrojenin direkt ve oldukça hızlı olan etkilerinin östrojen aracılığı ile sürdürülen kardiyovasküler korumada majör bir rol oynadığıdır (1).

1.3. Östrojen, Vasküler Endotel ve Vazoaktif Ajanlar

Endotel hücreler, bütün kan damarlarının iç yüzeyinde tek katlı bir tabaka oluşturmaktadır. Bu bariyere ve dolaşımdaki kan ile onun altındaki kan damarları arasındaki transporta ek olarak, endotel de biyolojik aktif faktörleri salgılayarak bu çevreyi değiştirmektedir (Şekil 1). Bunlar arasında, vazodilatasyon ve antiagregasyon etkisi bulunan ajanlar olup, PGI₂ ve NO ve bunun karşıtı bir molekül olan ET-1'dir. Böylece, endotelden türeyen vazoaktif moleküller arasındaki dengenin, kan damarlarının fizyolojisi ve vasküler hastalıkların patogenezinde anahtar bir rol oynayabileceği açıktır (1).



Şekil 1. Endotel hücreler birçok vazoaktif ajan üreterek vasküler tonusu regüle etmede anahtar bir rol oynamaktadırlar. ET-1, PGH₂, NO*, PGI₂, EDHF (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).

Vasküler inflamasyon prosesi, aterosklerozun gelişiminde başlıca rolü oynamaktadır. ICAM-1, VCAM-1 ve E-selektin gibi hücrel adhezyon molekülleri, aterogenezin erken evrelerinde endotel tarafından üretilmektedir. Bu moleküller, mononükleer lökositlerin endotelden geçişini kolaylaştırmakta, ardından lipid molekülleri içeren köpük hücreler oluşmakta ve aterosklerotik plak gelişmek suretiyle, koroner arter hastalıklarının gelişmesinde belirleyici olmaktadır. Selektin grubundaki moleküller lökositlerin endotele sarılmasında etkili olup, ICAM-1 ve sVCAM-1 molekülleri lökositlerin endotele tutunmasını ve endotelden alt tabakaya migrasyonunda etkili olmaktadır (3-6).

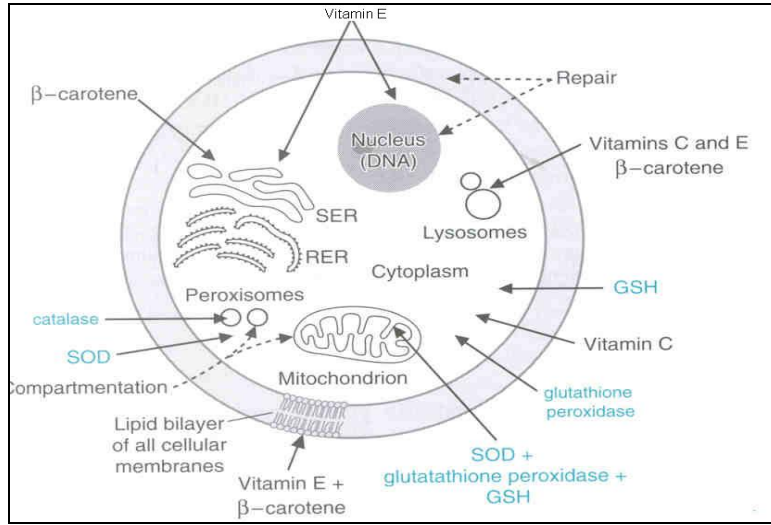
sE-selektin, sVCAM-1 ve ICAM-1 gibi adhezyon molekülleri lökositlerin endotele adhezyonuna aracı olmaktadır, bu da aterosklerozun başlaması ve ilerlemesinde önemli bir adımdır. İnsanlarda, endotelin fonksiyonlarını ve endotelde-lökosit adhezyonunu ölçmek için direkt bir metod yoktur. Bununla beraber, akışkanlar yoluyla sürdürülen endotele-bağımlı vazodilatasyonun ve endotelden-türeyen regülatör proteinlerin plazma düzeyleri, çözümlü adhezyon moleküllerin ölçülmesi yoluyla indirekt olarak saptanabilmektedir. Bazı çalışmalarda, yüksek düzeylerdeki vWF, sE-selektin, TM, cFN ve sICAM'ın kötü kardiyovasküler prognoz ile ilgili olduğu gösterilmiştir (2).

1.4. Östradiol ve Eritrosit Enzim Sistemleri

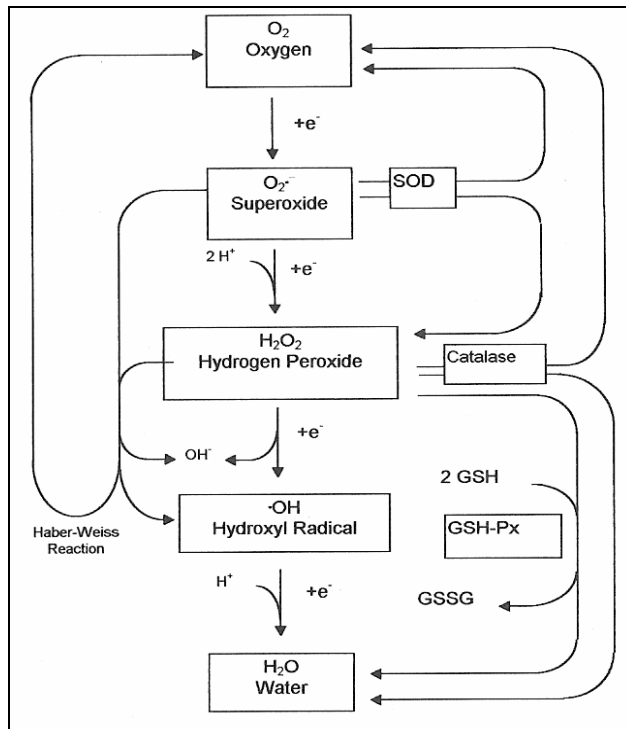
Serbest radikaller normal metabolizma sırasında sürekli olarak üretilmekte olup, bunun sonucunda membran fosfolipidlerinin peroksidasyonu, membran proteinlerinde, karbohidrat ve DNA moleküllerinde çeşitli hasarlar meydana gelmektedir. Deneysel ve epidemiyolojik çalışmalarda ateroskleroz, kardiyovasküler hastalıklar, iskemi-reperfüzyon hasar, dolaşımsal şok hasarında, romatoid artrit, karsinogenez, enfeksiyonlar, beyinde ve deride dejeneratif oluşumlarda ve yaşlanma ile ilgili bazı hastalıklarda oksidatif hasarla ilgili bulgular saptamıştır (7).

İnsanlarda serumdaki antioksidatif kapasite, enzimatik ve non-enzimatik sistem ile ilişkilidir. Vitamin E, A ve C, albumin, urat, sistein, seruloplazmin, transferrin, tiroksin, Se ve GSH gibi anti-oksidatif moleküller, serbest radikal temizleyicileridirler. Östrojenlerin, serbest radikal temizleyicilerinin 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, hücresele anti-oksidatif enzim sistemini etkileyebileceğini de ileri sürmüşlerdir, fakat bu veriler halen tartışmalıdır (7).

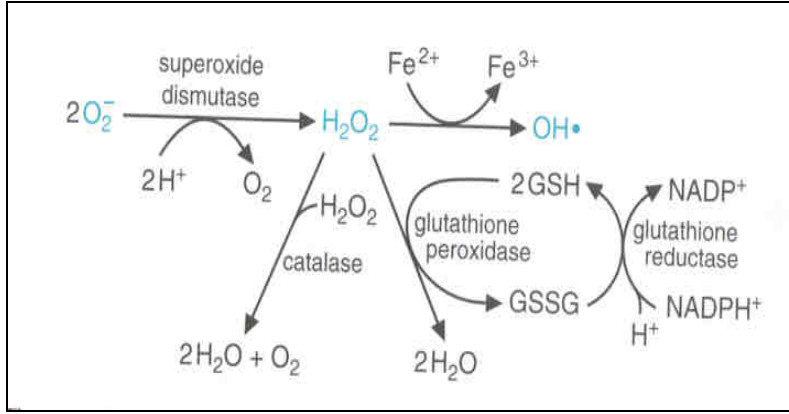
Anti-oksidatif enzim sistemlerine SOD, CAT ve GSH-Px enzimleri dahildir. GSH-Px enzimi hücrelerde en çok bulunan bir tiol olup, majör anti-oksidant olarak tanımlanan GSH ile birlikte çalışmaktadır (Şekil 2 ve 3). SOD ise, anti-oksidatif sistemde ilk harekete geçen enzim olup, çok toksik olan süperoksid anyonunun dismutasyonunu katalizlemektedir. Süperoksid anyonunun dismutasyonu yoluyla oluşan H_2O_2 ise GSH-Px veya CAT yoluyla inaktive olmaktadır (Şekil 4 ve 5). CAT ise, GSH-Px aktivitesi eksikliğinde bu enzimin aktivitesini kompanze etmektedir. GSH-Px enzimi, dokuları H_2O_2 ve lipoperoksitlerin oluşturduğu oksidatif hasara karşı koruyan başlıca enzimdir. GSH-Px enzimi, aktivitesi için koenzim olarak Se'a ihtiyaç duymaktadır (7).



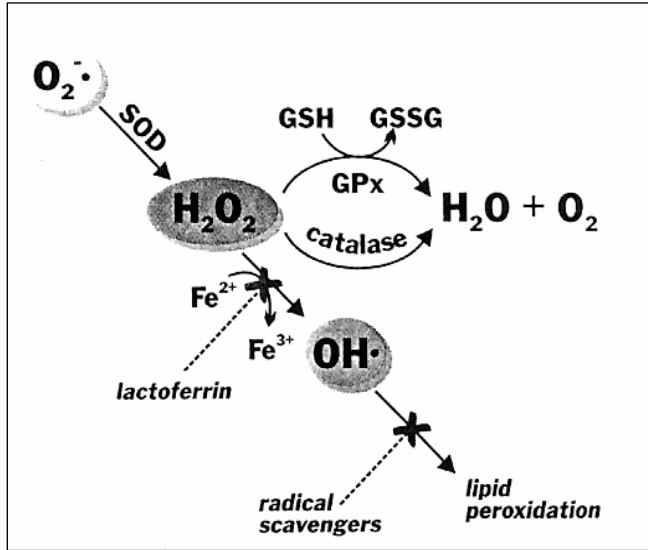
Şekil 2. Hücre içindeki anti-oksidatif sistemler (Basic Medical Biochemistry A Clinical Approach, Second Edition, Colleen Smith, Ph.D., Allan D. Marks, MD, Michael Lieberman, Ph.D. Lippincott Williams& Wilkins , Kluwer Company, USA)



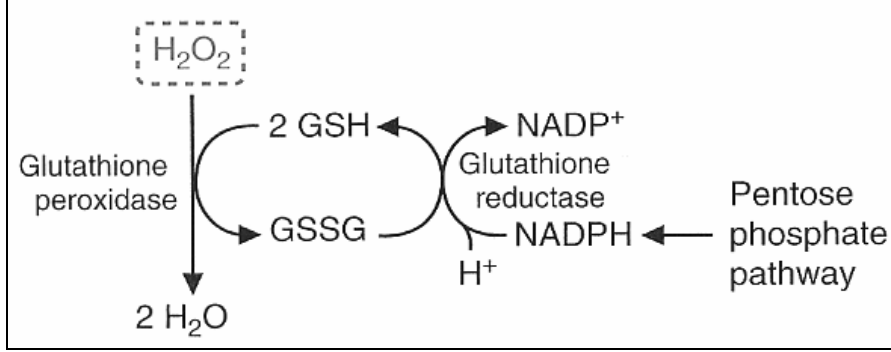
Şekil 3. Eritrositlerde yer alan anti-oksidatif enzim sistemleri (Free Radicals, Oxidative Stres, and Antioxidants, Edited by Tomris Özben, NATO ASI Series, Life Sciences vol.296).



Şekil 4. Süperoksid 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).



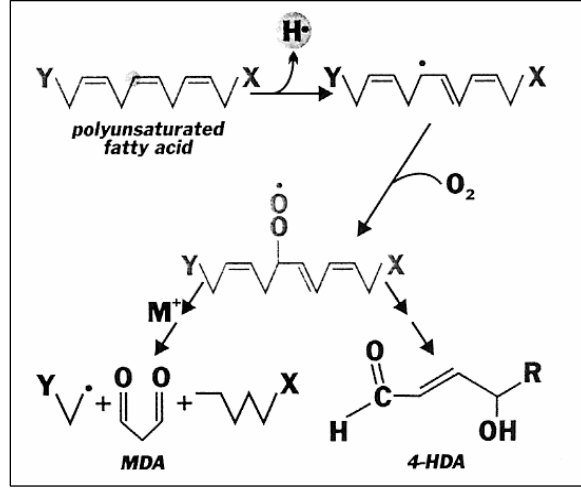
Şekil 5. CAT enziminin katalizlediği reaksiyon (Free Radicals, Oxidative Stres, and Antioxidants, Edited by Tomris Özben, NATO ASI Series, Life Sciences vol.296).



Şekil 7. GR indirgenmiş GSH'ı tekrar oluşturmaktadır (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).

1.6. Östrojen, Lipidlerin Peroksidasyonu ve Malondialdehit (MDA) Oluşumu

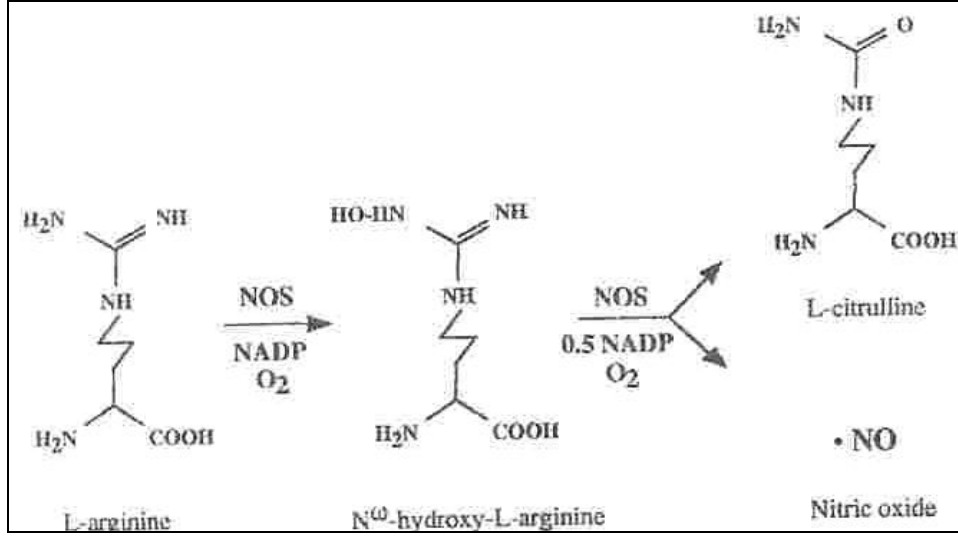
Lipid peroksidasyonunun başlaması için, bir lipid yapısına atak yaparak, metilen ($-CH_2-$) grubundan bir hidrojen atomu çıkartabilecek reaktiflikte, herhangi bir örneğin ortamda olması yeterli olmaktadır (Şekil 8). Malondialdehit (bazen malonildialdehit olarak da isimlendirilmektedir) oluşumu yıllardan beri lipid peroksidasyonuna odaklanmanın nedeni olmuştur, çünkü *in vitro* tiyobarbitürik asid (TBA) testi serbest MDA'yı saptamada ve lipid peroksidasyonunu göstermede en yaygın olarak kullanılan test olma özelliğini günümüzde halen korumaktadır. Her ne kadar, demir tuzlarının varlığında, karaciğer mikrozomlarının peroksidasyonunda çok büyük miktarlarda oluşsa da, gerçekte, MDA çoğu lipidlerin peroksidasyonu sırasında sadece küçük bir miktar oluşmaktadır.



Şekil 8. Lipidlerin peroksidasyonu ve MDA oluşumu (Free Radicals, Oxidative Stres, and Antioxidants, Edited by Tomris Özben, NATO ASI Series, Life Sciences vol.296).

1.7. Östrojen ve Nitrik Oksit (NO•)

Endotelden türeyen gevşetici faktör, ilk olarak 1980’de tanımlanmış olup, hemen ardından bunun küçük bir gaz molekülü radikali olduğu saptanmışve böylelikle 1987’de NO• bulunmuştur (Şekil 9). NO• (nitrojen monoksit) renksiz bir gazdır. Suda orta derecede çözünür olup (20 °C’de en fazla 2 mM), organik çözücülerde, tıpkı O₂ gibi, daha fazla çözünmektedir. Bu nedenle, NO• hücreler arasında rahatlıkla diffüze olabilmektedir. NO• molekülü ortaklanmamış bir elektronu bulunmasından dolayı, paramanyetik bir molekül olup, serbest radikaldir. NO•, yaşayan organizmada, bir grup enzim olan ve nitrik oksit sentaz (NOS) olarak isimlendirilen üç farklı enzim yoluyla sentezlenmekte olup, bunlar bir amino asit olan L-arjinini, NO• ve L-sitrülline dönüştürürler.



Şekil 9. L-arginin'den, NOS yoluyla NO sentezi. Üç farklı NOS izoformu tanımlanmış olup, biri endotel hücrelerinde (eNOS), diğeri belli nöronal hücrelerde (nNOS) ve kalsiyum/kalmodulin'e bağımlı, diğeri ise kalsiyumdan bağımsız olan ve sitokinler ile indüklenen NOS izoformu (iNOS) dur (Mikkola T, Viinikka L, Ylikorkala O. Estrogen and postmenopausal estrogen/progestin therapy: effect on endothelium-dependent prostacylin, nitric oxide and endothelin-1 production. Eur J Obstet Gynecol 1998;79: 75-82).

NO[•]'in, kadınlarda üreme organları dahil, çeşitli organ sistemlerinde fizyolojik ve patofizyolojik olarak değişik etkilerinin olduğu gösterilmiştir. 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 nitrata (NO₃⁻) oksidasyonudur. Normal fizyolojik koşullar altında, endojen NO[•] oluşumu düşük olup, sağlıklı kişilerde plazma nitrit konsantrasyonları sifıra yakındır. Diğer yandan, NO[•]'in diğeri metaboliti olan nitratin plazma konsantrasyonu çeşitli yayınlarda farklılık göstermesine rağmen, ölçülebilecek düzeylerde olup, örneğin septik şokta 100 µM/L'ye kadar yükselebilmektedir. Nitrat böbrekler yolu ile atılmakta olup, kandaki yarı ömrü 5-8 saat arasındadır. Sağlıklı kişilerde plazma klerensi 20 ml/dak olarak bildirilmiştir (1). NO[•]'in direkt ölçülmesi oldukça güç olup, plazmadaki nitratin endojen olarak kaynağı sadece NO[•]'dir. Bu nedenle plazmadaki nitrat düzeyleri NO[•] üretiminin bir göstergesi olarak

kabul edilmektedir (9,10). NO[•] üretiminin östrojenler ile regüle edilebileceği ve endotelial NO[•] üretiminin östrojen aracılığı ile artması nedeniyle, üreme yaşındaki kadınlarda kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu olabileceği bildirilmiştir. Yine, kadınlarda menstrüal siklusda E₂ düzeylerinin en yüksek olduğu 14. günde, NO[•] düzeylerinin en yüksek konsantrasyonlara ulaştığı rapor edilmiştir (11).

Östrojenin, insan endotel hücrelerinde NOS'ın ekspresyonunu arttırdığı saptanmıştır. Bazı çalışmalarda, siğir endotelial aortik hücrelerde, E₂'nin, NO[•] üretimini arttırdığı, bazılarında ise arttırmadığı bildirilmiştir (Tablo 1). Bununla beraber, overektomize ratlardan izole edilen aortik halkalarda, 10 gün E₂ ile tedavi sonrasında, NO[•] salınımının etkilenmesi başılamamıştır. Böylece, farklı metodların kullanılması sonucunda, NO[•] üretiminde farklı sonuçlar ortaya çıkmakta ve bu da çalışmalarda, E₂'nin neden endotelial hücrelerdeki NO[•] üretiminde farklı sonuçlar doğurduğunu ancak kısmen ortaya koymaktadır (1).

Tablo 1. ERT veya HRT'nin NO[•] üretimine etkisi ile ilgili veriler.

	Çalışma dizaynı	NO üretimine etkisi	Kaynak
<i>İn vitro</i>	Siğir aortik endotelial hücreler	+	Schray-Utz et al. 1993
	Siğir aortik endotelial hücreler	0	Sayegh et al. 1993
	İnsan aortik endotelial hücreler	+	Ishikawa et al. 1995
	HUVEC	+	Mikkola et al. 1996
	Tavşan femoral arter	+	Gisclard et al. 1988
	Rat aort	+	Williams et al. 1988
	Rat aort	0	Vedernikow et al. 1997
<i>İn vivo</i>	Koroner arterde vazodilatasyon (maymunlarda)	+	Williams et al. 1992
	Asetilkolinle stimüle edilmiş Vasküler vazodilatasyon	+	Gilligan et al. 1994 Gilligan et al. 1995
	Akışın artması ve vasküler Rezistansın azalması	+	Volterrani et al. 1995
	Plazma nitrit/nitrat	+	Cicinelli et al. 1997
	Plazma nitrit/nitrat	+	Imthurn et al. 1997

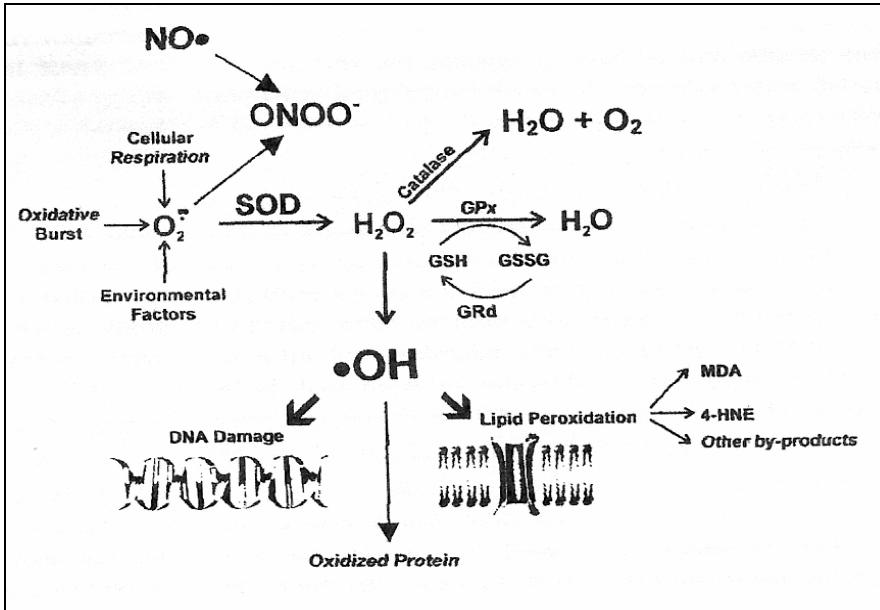
0=etkisi yok

+ =stimüle ediyor

Post-menopozal kadınlarda, E₂'nin *in vivo* akut olarak verilmesinden sonra tıpkı asetilkolin ile stimüle olmuşçasına geçici olarak bir vazodilatasyon ortaya çıkmakta, fakat bu etki transdermal E₂ uygulamalarında 3 hafta sonra kaybolmaktadır. Yine, post-menopozal kadınlarda, sublingual E₂ uygulamalarında, ön kolda kan akımının arttığı ve vasküler direncin azaldığı saptanmıştır. Bütün bu sonuçlar, insanlarda E₂'nin post-menopozal kadınlarda NO• üretimini hızlı bir şekilde arttırdığını göstermiştir. Post-menopozal kadınlarda, transdermal olarak 24 saat boyunca E₂ uygulamalarında plazma NO• düzeylerinin arttığı rapor edilmiştir. Halbuki, NO• düzeylerindeki aynı artış, oral HRT alanlarda 12 ay sonra gözlenmiş olup, tedaviye progestinler ilave edildiğinde bu durum ortadan kalkmıştır. Östrojen eksikliği olan ve aynı zamanda koroner aterosklerozu bulunan dişi maymunlarda, anjiyografide, asetilkolin infüzyonunda arter içinde önce bir daralma ve ardından i.v. olarak etinil östradiol verildiğinde ise, bir dilatasyon olduğu saptanmıştır (1).

Ayrıca, vasküler endotelde salınan NO•'in, östrojenin kardioprotektif etkilerinden biri olduğu rapor edilmiştir. Bu hipotezde, NO• salınımının, hipertansiyon ve ateroskleroz gibi kardiovasküler hastalıkları azalttığı ve ayrıca, NO•'in vazodilatasyon, trombosit adhezyonunun inhibisyonu ve agregasyonu ve düz kas hücrelerinin proliferasyonu ve migrasyonunun inhibisyonu gibi çeşitli kardioprotektif etkilerinin olduğu öne sürülmüştür. Bu hipotezi kanıtlamak için çeşitli çalışmalar yapılmış olup, bunlardan birisi endotelde dilatasyona yol açan asetilkolin'in kullanılması ile ilgilidir. Hayashi ve ark. erkek ve dişi tavşanların aortik halkalarını kıyaslamışlar ve dişi tavşanlarda NO• düzeylerinin daha yüksek olduğunu ve düzeylerinin dolaşımdaki östradiol seviyeleri ile korelasyon gösterdiğini bildirmişlerdir (10). Bir diğer çalışmada ise, overektomize ve aterosklerotik maymunlarda asetilkolin infüzyonunun koroner arterlerde kasılmaya neden olduğu ve asetilkolin'in bu vazokonstrüktif etkisinin transdermal östrojen tedavisinin sürekli uygulanması yoluyla vazodilatasyona dönüştüğü gösterilmiştir (12).

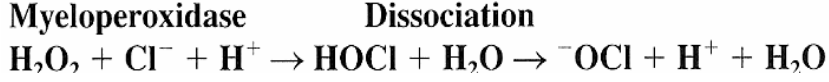
Her ne kadar, hayvan çalışmalarında NO^\bullet 'in bu etkisi kanıtlanmış ise de, insanlarda bu hipotezi kanıtlamak için çok az çalışma yapılmıştır. NO^\bullet molekülünün çok labil olması insanlarda vasküler endotelden salınımını ölçmede zorluk çıkarmaktadır. Bununla beraber, NO^\bullet biyolojik sıvılarda nitrit (NO_2^-) ve nitrat'a (NO_3^-) parçalanmakta ve bu da serum, plazma ve çeşitli vücut sıvılarında ölçülmek suretiyle, NO_2^- ve NO_3^- düzeylerinin toplamı, *in vivo* NOS enziminin aktivitesinin belirleyicisi olarak kullanılmaktadır. Rosselini ve ark. yaptıkları çalışmada dolaşımdaki NO^\bullet düzeylerinin folliküler gelişim ile arttığı ve direkt olarak östradiol düzeyleri ile korele olduğu göstermiş, NO^\bullet düzeylerinin progesteron, FSH ve LH ile korele olmadığını rapor etmişlerdir (21).



Şekil 10. NO^\bullet radikali ve hücrel savunma mekanizmasında ilişkili olduğu sistemler (Reiter R, Tan D, Osuna C, Gitto E. Action of melatonin in the reduction of oxidative stres. J Biomed Sci 2000;7:444-458).

1.8. Östrojen ve Myeloperoksidaz (MPO)

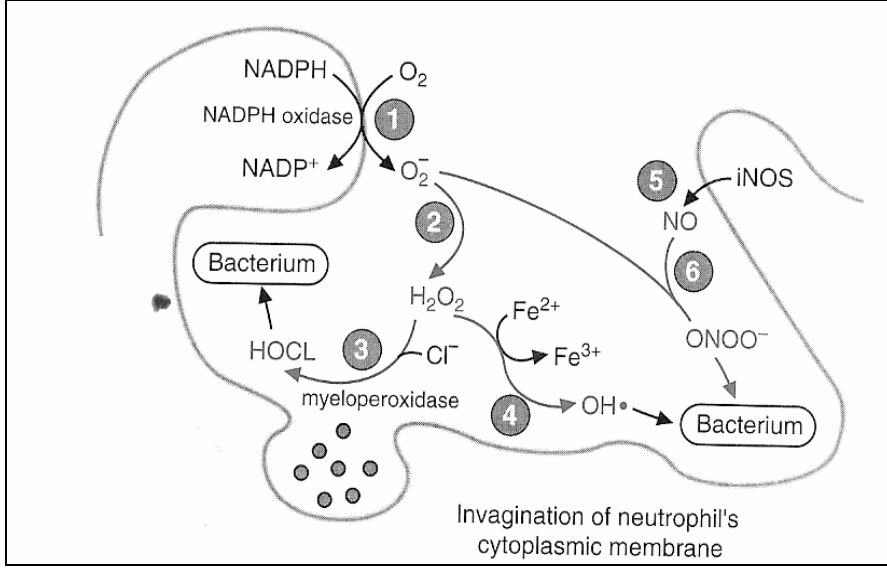
Myeloperoksidaz, hipokloroz asidin (HOCl), H₂O₂'den oluşumunu katalizleyen bir enzimdir.



MPO, nötrofillerde, monositlerde ve doku makrofajlarında en çok bulunan protein olup, savunma mekanizmasında ve inflamasyon doku hasarında kritik bir rolü olduğuna inanılmaktadır (Şekil 11). MPO yüksek oranda katyonik ve tek bir disülfid bağı ile bağlı iki idantik altüniteden oluşan glikozillenmiş hem proteininden oluşmuştur. NO•'in birçok biyolojik aktivitesinin efektör proteinlerin hem veya demir-sülfür bölgelerine çok kolay bağlanması yoluyla gerçekleştirdiği düşünülmektedir. NO•, guanilat siklazın hem demirine bağlanmakta ve enzimin aktive olmasına yol açmaktadır. NO'un aynı zamanda, NOS'ın aktivitesini de regüle ettiği düşünülmektedir. MPO ve iNOS, nötrofillerde başlıca olarak granüllerde lokalize olmuşlardır. Lökositler aktive olduğunda, örneğin; bakterilerin fagositozunda, MPO ve iNOS birlikte fagolizozomlar ve ekstrasellüler bölgeye yayılmakta, böylece bakteriyel proteinlerin nitrasyonu görülmektedir. MPO biyolojik fonksiyonlarını, NO• ile doymuş biyolojik bir ortamda göstermesine rağmen, MPO'nun merkezinde bulunan hem ile NO•'in potansiyel olarak etkileşimi tam olarak açıklanamamıştır. Abu-Saud ve Hazen çalışmalarında NO•'in MPO'nun hem ferrik [Fe (III)] hem de ferröz [Fe (II)] durumundaki demir moleküllerine bağlandığı ve altı koordinatlı stabil nitrozil bir kompleks oluşturduğunu göstermişlerdir. Bunun sonucunda, NO• düzeylerinin arttığı durumlarda, MPO-Fe(III)-NO nitrozil kompleksini oluşturduğu ve MPO'nun katalitik aktivitesinin düştüğü gösterilmiştir (52).

MPO, fagositlerde bulunan antimikrobal bir enzim olup, kanda lökositlerin yükselmesi ile MPO düzeylerinin artması koroner arter hastalıklarının insidansı ile ilişkilidir. MPO, aterosklerotik lezyonlarda bulunmakta olup, oksidatif aracı moleküller yoluyla proaterosklerotik

partiküller oluşturabilmektedirler. MPO eksikliği olan kişiler kardiyovasküler hasarlara karşı düşük risk taşımaktadırlar (54). Bununla beraber, Brennan ve ark. MPO eksikliği olan ratlarda, MPO değerleri yüksek olanlara göre aterosklerozun geliştiğini bildirmişlerdir (55). Östrojenin myeloid hücrelerde MPO aktivitesini yükselttiği ve aynı zamanda plazma MPO aktivitelerinin miktarını da arttırdığı rapor edilmiştir (56). Santanam ve ark. menopozda plazma MPO konsantrasyonlarının önemli ölçüde düştüğünü, fakat HRT tedavisi sonrasında eski değerlerine döndüğünü rapor etmişlerdir (57). Makela ve ark. MPO'nun ateroskleroz için potansiyel etki oluşturduğunu ve östrojenin MPO aktivitesini etkileyebileceğini bildirmiş olup, farklı MPO genotipi taşıyan [-463 G (yüksek ekspresyon)/A (düşük ekspresyon)] kişilerde, HRT'nin ateroskleroz gelişimine etkisini araştırmışlardır. HRT tedavisinin (5 yıllık) MPO'yu yüksek eksprese eden genin bulunduğu (GG tipi) kişiler ile, aynı genotipi taşıyan fakat HRT almayan kişiler ile kıyaslandığında aterosklerozun ilerlemesinde durdurucu etkisi olduğunu rapor etmişlerdir. Buna rağmen, MPO geninin düşük ekspre eden tipi bulunan (AG veya AA), HRT kullanan veya kullanmayan kişiler ile yine HRT alan veya almayan kontrol grubu ile karşılaştırdıklarında, HRT'nin koruyucu bir etki göstermediğini ve aterosklerozun ilerlemesinin aynı durumda olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, HRT'nin ateroskleroz üzerindeki yararlı etkilerinin, hastalığın başlangıcında etkili olduğunu, hastalığın ilerlemesiyle bir yarar bulunmadığını ve HRT kullananlarda kardiyovasküler olayların en çok ilk 5 yılda ortaya çıktığını bildirmişlerdir (54).



Şekil 11. Nötrofillerde, MPO'nun 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).

1.9. Östrojen ve Leptin

Menopozdan sonra obezitenin gelişmesi yaygın görülen klinik bir durum olup, östrojenin kaybı ile birlikte sadece vücut yağları ve ağırlığı artmamakta, aynı zamanda vücuttaki yağların dağılımı da değişmektedir. Uzun süren hormon replasman tedavisinin, menopozdan sonra görülen, vücut ağırlığındaki artışı ve derinin kalınlaşmasını önlediği rapor edilmiştir. HRT'nin vücut ağırlığını ve yağ dağılımını nasıl etkilediğinin mekanizması tam olarak ortaya konmamakla birlikte, post-menopozal kadınlarda HRT ve leptin metabolizması arasında bir ilişki olduğu yapılan çalışmalarda öne sürülmüştür (13).

Leptin *ob* geninin bir ürünü olup, adipoz dokuda tanımlanmıştır. Adipoz dokudan salgılanan leptin, yiyeceklerin alınımı, yağ depolarının oluşumunu ve enerji kullanımını regüle eden bir moleküldür (13-24). Leptinin vücut ağırlığı üzerine etkisi, santral sinir sistemi üzerine etki etmesi yoluyla sürdürülmekte olup, hormon hipotalamik bölgelere etki etmekte, iştahı azaltmakta ve aynı zamanda tiroid, adrenal, büyüme, gonadal ve

laktasyon eksenlerinin aktivitelerini kontrol etmektedir. Aynı zamanda leptin, cinsiyetin gelişimi ve üreme ile ilgili bir moleküldür. Serum leptin konsantrasyonlarının vücut yağları ile sıkı bir ilişkisi bulunmakta olup, dolaşımdaki açlık insülin konsantrasyonları yoluyla regüle edilmekte ve sirkadien bir ritmi bulunmaktadır. Leptin konsantrasyonlarının kadınlarda erkekler ile kıyaslandığında 2-4 kat daha yüksek olduğu bildirilmiştir (25,26). Çalışmaların çoğunda ise, veriler leptin konsantrasyonlarındaki bu farklılığın obezitedeki farklılık ile açıklanamayacağını göstermiştir (27,28). Bu nedenle, leptin konsantrasyonlarının obezitenin yanında, çevresel faktörler, genetik ve cinsiyet gibi diğer faktörlerin etkisinde olabileceği düşünülmektedir (14). Ayrıca, seks steroidleri ile leptin konsantrasyonları arasında bir bağlantı olduğu öne sürülmekte olup (15,23,24), birkaç çalışmada serum östradiol düzeyleri ile leptin arasında bir ilişki olduğu bildirilmesine rağmen (16), bunun aksine bulgular öne süren çalışmalar da vardır (27,29). Paolissa ve ark. obez ve non-obez post-menopozal kadınlarda, HRT'nin vücut yapısını ve leptin düzeylerini farklı etkilediğini göstermişlerdir (17).

Bazı klinik çalışmalarda, menopozdan sonra kiloda artış bildirilmiş olup, post-menopozal kadınlarda östrojenin azalması ile birlikte, vücut yağlarının artabildiği ve tercihen abdominal bölgede toplandığı rapor edilmiştir. HRT'nin post-menopozal obeziteyi önlediği rapor edilmiş olup, östrojenin vücut yağı ve dağılımı üzerine nasıl bir etki yaptığı halen açık değildir. Farklı olası mekanizmalar arasında, bazı araştırmacılar leptin metabolizması ve cinsiyet hormonları arasında bir bağlantı olduğunu öne sürmüşlerdir (30).

2. ÇALIŞMANIN AMACI

Çalışmanın amacı post-menopozal olarak serum E₂ düzeylerinin azalmasına bağlı olarak, post-menopozal kadınlarda ERT ve HRT tedavisinde CAT, GSH; GSH-Px, GR, NO, MPO, MDA miktarlarının saptanması ve bu düzeylerin fizyolojik olarak menopoza girmiş, fakat hiç

tedavi almamış olgular ve pre-menopozal kadınlardan elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılmasıdır. Ayrıca, oksidatif sistem parametreleri ile sVCAM-1, sE-selektin ve leptin düzeyleri arasındaki ilişkinin de gösterilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmaların çoğunda leptin konsantrasyonlarının sadece post-menopozal veya pre-menopozal kadınlarda saptandığı görülmüştür. Çalışmamızda, ERT ve HRT'nin leptin konsantrasyonlarını nasıl etkilediğini gösterecek ve ayrıca, fizyolojik olarak menopoza girmiş ve herhangi bir hormon tedavisi almamış kadınlardaki değerler ile korelasyonunu inceledik. Ayrıca, FM'daki kadınları BMI değerlerine göre sınıflayıp, obez ve obez olmayan grup arasındaki değerleri karşılaştıracamız. İkinci kontrol grubumuzu oluşturan sağlıklı pre-menopozal olgulardan elde edilecek sonuçları ise, tüm post-menopozdaki kadınlardan elde edeceğimiz değerler ile karşılaştıracak olup, östrojenin leptin üzerindeki etkilerini tartışacağız.

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. NO* ve ELISA çalışmalarında ise, mikropate okuyucu (XL-800) kullanılmış, sonuçlar otomatik olarak cihaz tarafından hesaplanmıştır.

3.2. Çalışma Grupları

Çalışma grubunu 132 post-menopozal kadın oluşturdu. Bu grup kendi içinde üç gruptan oluşmaktadır: ERT grubu; 28 kadın ameliyat sonrasında menopoza girenler ve sadece östrojen tedavisi alanlar (yaş ortalaması

50.2 ± 2.7 yıl), HRT grubu: 48 kadın fizyolojik olarak menopoza girmiş olup, östrojen-progestin tedavisi alanlar (yaş ortalaması 52.9 ± 4.2 yıl), FM grubu: fizyolojik olarak menopoza girmiş fakat hiçbir tedavi almamış 56 kadın (yaş ortalaması 52.2 ± 4.4 yıl) aynı zamanda birinci kontrol grubu olarak kabul edildi.. ERT grubu ortalama 6.6 ± 3.3 yıl, HRT grubu ortalama 4.9 ± 2.2 yıl ve FM grubu 4.8 ± 3.3 yıl post-menopozal konumda bulunmaktadır. ERT grubu 3.3 ± 2.2 yıl, HRT grubu ise, 3.0 ± 1.4 yıldır ilaç tedavisi almakta idi.

Post-menopozal hastalar klimakterik sendromun tipik semptomlarını göstermekte olup, FSH düzeyleri 30 mIU/ml ve serum E₂ düzeyleri ise 50 pg/ml'den düşüktü. Olguları dışlama kriterleri ise, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, venöz tromboemboli ve meme kanseri idi. İkinci kontrol grubunu ise (K grubu) ise yaş ortalaması 31.1 ± 3.7 yıl olan, 30 sağlıklı kadın oluşturmuştur.

Bu olgulardan hiçbiri, özel bir diyetle olmayıp, sigara içme öyküsü bulunmamakta ve çalışmaya dahil edildikleri anda, yaklaşık 4 ay önceden çalışmayı etkileyecek herhangi bir tedavi almamışlardır. Olguların hepsinin ağırlığı, boyu, vücut ölçüleri ve kan basınçları ölçülmüş, fiziksel muayene sonrasında kan örnekleri alınmıştır. Obezitenin derecesi vücut kitle indeksi (BMI) olarak kaydedilmiş olup obezitenin sınırı 25 kg/m² olarak alınmıştır.

ERT grubu günlük olarak 2 mg E₂ [Estrofeam, estradiol hemihydrate (17-beta estradiol), Novo Nordisk, DENMARK] tablet olarak östrojen terapisi (ET) almıştır. HRT grubu ise oral olarak östrojen-progestin Kliogest (estradiol hemihydrate + norethisterone acetate), Novartis, Basel, SWITZERLAND] tedavisini her bir siklustan sonra 12 gün boyunca 3 mg olacak şekilde almış bulunmaktadırlar.

3.3. Kan Örneklerinin Alınması, İşlenmesi ve Saklanması

Kan örnekleri 12 saat açlık sonrasında sabah, ikisi EDTA'lı olmak üzere üç tüpe alındı. EDTA'sız tüplere alınan kan örnekleri 4000 rpm'de 7 dakika santrifüj edildikten sonra, serumları ayrıldı. Rutin biyokimya tetkikleri ve hormon düzeyleri (E₂, FSH ve LH) ölçüldü ve serumlar ELISA testleri (sE-selektin, SVCAM-1 ve leptin) çalışılmak üzere ependorf tüplerine ayrılıp, derin dondurucuda (-85 °C) saklandı.

EDTA'lı tüplere alınan kan örneklerinde, alındığı anda tam kan sayımı, direkt kandan GSH ve lökositlerin izolasyonundan sonra MPO ölçümleri yapıldı. Daha sonra, eritrositlerde antioksidatif enzim kapasitelerini (CAT, GSH-Px ve GR) ölçmek için hemolizat örnekleri hazırlandı. Eritrositler üç kez soğuk serum fizyolojik ile yıkandı ve CAT, GSH-Px ve GR düzeylerini ölçmek için hemolizat hazırlandı. Örneklerde CAT düzeyleri ölçüldükten sonra topluca çalışılmak üzere, geri kalan hemolizatlar derin dondurucuya (-85°C) konuldu.

3.4. Rutin Biyokimya Testleri ve Hormon Analizleri

Olgularda rutin biyokimya parametreleri olan, AKŞ (referans aralığı 70-109 mg/dl), üre (referans aralığı 13-43 mg/dl), kreatinin (referans aralığı 0.7-1.3 mg/dl), AST (referans aralığı 5-34 U/L), ALT (referans aralığı 0-55 U/L), kolesterol (referans aralığı 0-200 mg/dl), HDL (referans aralığı 45-65 mg/dl), LDL (referans aralığı 30-130 mg/dl), TG (referans aralığı 0-149 mg/dl), Abbott firmasına ait C-8000 biyokimya analizöründe saptanmış olup, referans aralıkları ticari kit prospektüslerinde verilen değerler baz alınarak yazılmıştır.

Menopoz hastalarında ve kontrol gruplarındaki, hormon parametreleri olan E₂ (referans aralığı 0-498 pg/ml), LH (referans aralığı 1.0-95.6 mIU/ml) ve FSH (referans aralığı 1.7-134.8 mIU/ml), Roche firmasına ait E170 hormon analizöründe saptanmış olup, referans aralıkları ticari kit prospektüslerinde verilen değerler baz alınarak yazılmıştır.

3.5. CAT Ölçüm Yöntemi

Aebi'nin yöntemine göre saptandı (31). Fosfat tamponu (50 mM pH:7) olacak şekilde, potasyum dihidrojenfosfat (KH_2PO_4 MERC Kat. No. A986373) ve disodyum hidrojengfosfat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, MERCK, Kat. No. K25979680) ile hazırlandı. H_2O_2 (30 mM) olarak hazırlandı.

Tampon ile dilüe edilmiş örneğe, H_2O_2 'li tamponun eklenmesi ile başlayan absorbands değişimi, spektrofotometrede 240 nm'de izlenerek, 15 saniyedeki absorbands değişimi saptandı ve aşağıdaki formüle göre hesaplama yapıldı. Sonuçlar U/g Hb olarak verildi.

$$k = (2.3/\Delta t) \log (\text{Abs}_1/\text{Abs}_2) = 0.1175/\Delta t (\text{sn}^{-1})$$

3.6. MDA Ölçüm Yöntemi

Ohkawa'nın yöntemine göre yapıldı (32). % 8,1'lik laurilsulfate (SDS, Sigma, Kat. No. L-4390), % 20'lik asetik asit (MERCK, Kat. No. K23815056), % 0,67'lik TBA (2-Thiobarbutiric acid, Sigma, Kat. No.T-5500) çözeltileri kullanıldı.

MDA standardı olarak, malonaldehit bis-(dimetil asetal) (Aldrich, Kat. No. 10,838-3) kullanılarak, 1-40 nmol'lük standartlar hazırlandı.

Örneklerdeki absorbandslar spektrofotometrede, 532 nm'de köre karşı okundu ve sonuçlar standard eğriden hesaplandı

3.7. GSH Ölçüm Yöntemi

Tietze'in metoduna göre yapıldı (33). Presipite edici solüsyon; metafosforik asit (Sigma, Kat. No. M-5043), disodyum EDTA (Sigma, Kat. No. E-1644) ve sodyum klorür (NaCl , J.T.Baker) kullanılarak hazırlandı.

Disodyum fosfat solüsyonu; di sodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4 , MERCK, Kat. No. F368386) ile hazırlandı. DTNB solüsyonu; [5,5'-Dithio-bis (2-nitrobenzoic acid), Sigma, Kat. No. D-8130] ve sodyum sitrat (Sigma, Kat. No. S-4641) ile hazırlandı. GSH standardı; (reduced glutathione, Sigma, Kat. No. G-4251) kullanılarak 1-60 mg/dl'lik standartlar olarak hazırlandı. Standartlar ve örnekler spektrofotometrede 412 nm'de köre karşı okutuldu.

3.8. GSH-Px Ölçüm Yöntemi

GSH-Px aktivitesi Paglia ve Valentine'in yönteminde minör modifikasyonlar yapılmak suretiyle ölçüldü (34). 50 µl örnek, içinde 950 µl reaksiyon karışımı olan (Tris tampon, pH 7.6, Na_2EDTA , reduced glutathione, sodyum azid, glutatyon redüktaz ve NADPH) 1 ml'lik kuartz küvete kondu. Reaksiyon karışımı küvet tutucusu 37 °C'ye ayarlanan sperofotometreye kondu. Reaksiyon 25 µl H_2O_2 (%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.

3.9. GR Ölçüm Yöntemi

GR, 340 nm'de 37°C'de NADPH'ın oksidasyonunun izlenmesi yoluyla saptandı (35). Reaksiyon, 50 µl örneğin, 1.0 ml deney karışımı (Tris tampon, pH 7.6, Na_2EDTA , GSSG ve NADPH) içeren kuartz bir küvet içine konması ile başladı. Örnek yerine su kullanılarak, aynı şekilde kör çalışılarak elde edilen sonuç, örneklerden elde edilen sonuçtan çıkartıldı. Reaksiyon 2-3 dakika izlendi. Sonuçlar U/gHb olarak verildi.

3.10. NO[•] (NİTRİT+ NİTRAT) ÖLÇÜM YÖNTEMİ

Glisin-NaOH tamponu; glisin (MERCK, Kat. No. K23214990) ve sodyum hidroksit (PROLABO, Kat. No. EMB 45053) kullanılarak hazırlandı. Glisin- NaOH tamponu içindeki CuSO₄ çözeltisi; glisin, NaOH ve bakır sülfat (MERCK, Kat. No. 4187427) kullanılarak hazırlandı. Sülfanilamid çözeltisi; hidroklorid asid %37 (MERCK, Kat. No. K24016914) ve sülfanilamid (Sigma, Kat. No. S-9251) ile hazırlandı. NED çözeltisi [N-(1-Naphtyl)Ethyl-Enediamine dihydrochloride, Sigma, Kat. No. N-5889] kullanılarak hazırlandı. Standartlar, sodyum nitrit (Sigma, Kat. No. S-3421) kullanılarak, 10-100 µg konsantrasyonlarda hazırlandı.

Örneklerdeki nitrit ve nitrat konsantrasyonları Griess reaksiyonu sonucunda ölçüldü. Örnekler ve standartlar, ELISA mikroplate okuyucuda 540 nm'de okutuldu. Konsantrasyon hesapları otomatik olarak cihaz tarafından hesaplanmış olup, sonuçlar µM/L olarak verildi (36).

3.11. MPO Ölçüm Yöntemi

MPO ölçümü için EDTA'lı tüpe alınan kan örnekleri kullanıldı. Lökositleri izole etmek için, EDTA'lı kan örneği Histopak 1077 (Sigma Kat. No.10771) üzerine konuldu ve tabakalandırıldı. Örnek oda sıcaklığında 2000 g'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra, tabakalanan opak kısım (plazma ve histopak arasındaki bulanık kısım) başka bir tüpe alındı. Buradan alınan lökositlerde MPO düzeyleri saptandı. Bunun için belirli bir miktar örnek üzerine deterjanlı tampon konuldu. Daha sonra, TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin, Sigma Kat. No. T-2885) eklendi ve H₂O₂ eklenip hızla karıştırılarak reaksiyon başlatıldı. Reaksiyondaki absorbans (A) değişimi spektrofotometrede 5 sn'de bir ölçüldü ve kaydedildi. Daha sonra absorbans değişimini veren enzim miktarı formülle hesaplandı (37). Sonuçlar U/lökosit miktarı olarak verildi.

3.12. ELISA İle Ölçülen Parametreler (SVCAM-1, sE-Selektin ve Leptin)

sVCAM-1 ticari kiti Becman Coulter (Fransa) firmasına ait, ticari adı Cell Com (Cellular Communication Investigation) olup, katalog numarası IM3242 idi. Sonuçlar direkt olarak mikroplak okuyucu tarafından standartlara göre hesaplanmış ve ng/ml olarak verilmiştir.

sE-selektin ticari kiti IBL (Almanya) firmasına ait olup, katalog numarası BE59061 idi. Sonuçlar direkt olarak mikroplak okuyucu tarafından standartlara göre hesaplanmış ve ng/ml olarak verilmiştir.

Leptin ticari kiti dbc (Diagnostic Biochem Canada) firmasına ait olup, katalog numarası CAN-L-4260 idi. Sonuçlar direkt olarak mikroplate okuyucu tarafından standartlara göre hesaplanmış ve ng/ml olarak verilmiştir.

3.13. İstatistiksel Değerlendirme

Bulguların istatistiksel değerlendirmesi GrapPad InStat istatistik paket programı kullanılarak yapıldı. Örneklerdeki belirleyicilerin ortalamaları arasındaki farkın istatistiksel açıdan anlamlı olup olmadığı saptamada Student's 't' testi nden yararlanılmıştır. Ayrıca, her gruba, non-parametrik Mann-Whitney *U* testi uygulanmıştır. $p < 0.05$ 'in altında çıkan sonuçlar anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışma popülasyonunun karakteristikleri Tablo 2. de gösterilmiştir. Çalışma grubundaki kişiler, herhangi özel bir diyet almamış, hiçbirinin sigara içimi öyküsü yok ve hiçbiri çalışmaya etki edecek sistematik bir hastalığı ve ilaç kullanımı olmayan kadınlardan oluşmuştur. Rutin biyokimya parametreleri hariç, çalışma parametrelerinin hepsi ikişer kez çalışılmış olup, sonuçlar her iki sonucun ortalaması alınarak istatistik döküm yapılmıştır.

Tablo 2. Grupların karakteristikleri.

Grup	Ort. Yaş (yıl)	Menopoz Zamanı (yıl)	Vücut Kitle İndeksi (kg/m²)
ERT (n=26)	50.2 ± 2.7	6.6 ± 3.3	23.8 ± 2.6 ^a
HRT (n=54)	52.9 ± 4.2	4.9 ± 2.2	25.1 ± 1.9 ^{b,c}
FM (n=32)	52.2 ± 4.4	4.8 ± 3.3	27.8 ± 3.3 ^d
K (n=30)	31.1 ± 3.7	-	22.5 ± 1.7

Sonuçlar ortalama değer (mean) ± standart sapma (SD) olarak verilmiştir.

^ap<0.05 (FM ile kıyaslandığında)

^bp<0.05 (FM ile kıyaslandığında)

^cp<0.01 (K ile kıyaslandığında)

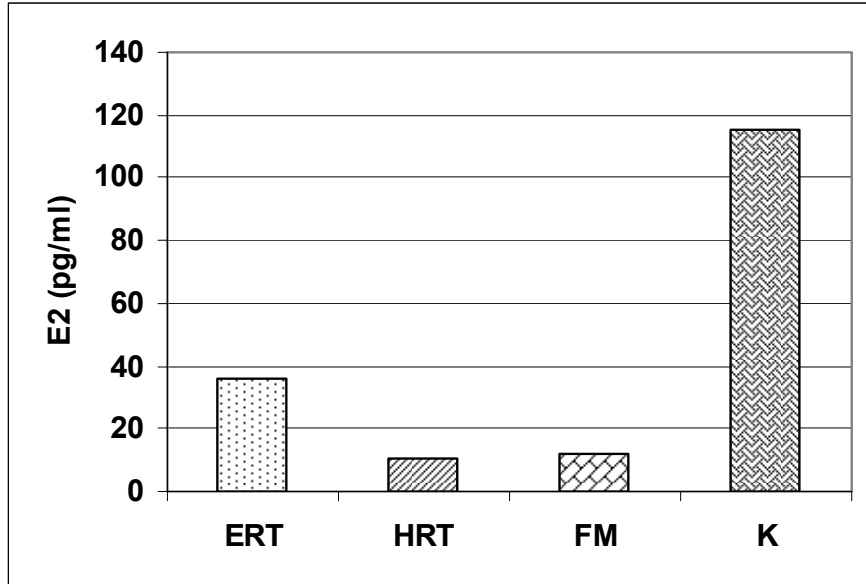
^dp<0.001 (K ile kıyaslandığında)

Gruplardaki hormon düzeyleri (E₂, FSH ve LH) grafiksel olarak şekil 12, 13 ve 14’de gösterilmiştir.

Tablo 3. Gruplardaki E₂ düzeylerinin (pg/ml) istatistiksel olarak değerlendirilmesi.

	ERT	HRT	FM	K
Ort.D	35.8	10.2	12.3	115.3
Median	36.0	8.0	12.0	93.5
SD	11.9	7.7	4.5	58.7
s.e.m	5.3	2.0	1.0	20.8
Min	17.0	5.0	5.0	43.3
Max	49	34	21.0	207.5

ERT ile HRT grubu kıyaslandığında p=0.002
ERT ile FM grubu kıyaslandığında p=0.0005
ERT ile K grubu kıyaslandığında p=0.003
HRT ile K kıyaslandığında p=0.0000
FM ile K kıyaslandığında p=0.0000

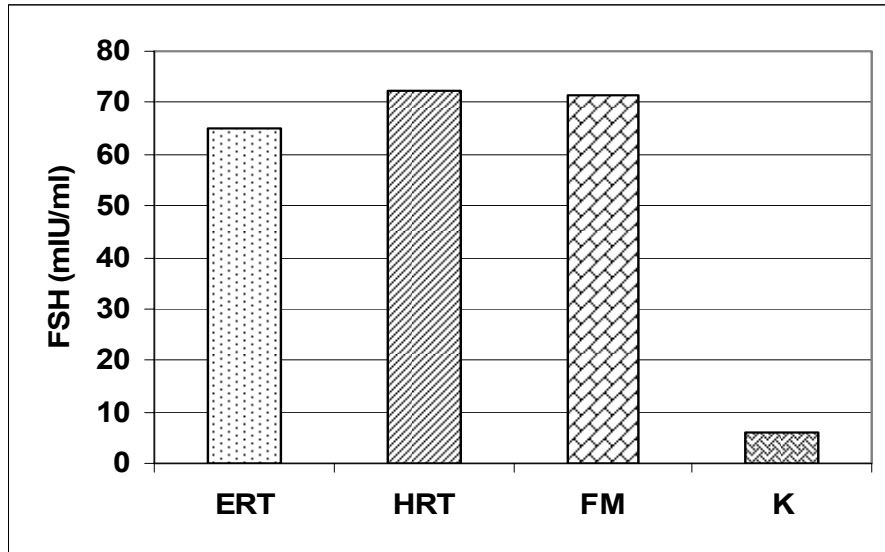


Şekil 12. E₂ düzeylerinin grafiksel olarak gösterilişi.

Tablo 4. Gruplardaki FSH düzeylerinin (mIU/ml) istatistiksel olarak değerlendirilmesi

	ERT	HRT	FM	K
Ort.D	65.2	72.4	71.6	5.8
Median	60.0	72.0	68.5	4.5
SD	14.7	14.5	14.5	4.1
s.e.m	6.6	3.8	3.2	1.5
Min	51.0	50.0	48.0	1.1
Max	85.0	98	106.0	13.6

ERT ile K grubu kıyaslandığında $p=0.001$
HRT ile K kıyaslandığında $p=0.0000$
FM ile K kıyaslandığında $p=0.0000$



Tablo 13. FSH düzeylerinin grafiksel olarak gösterilişi.

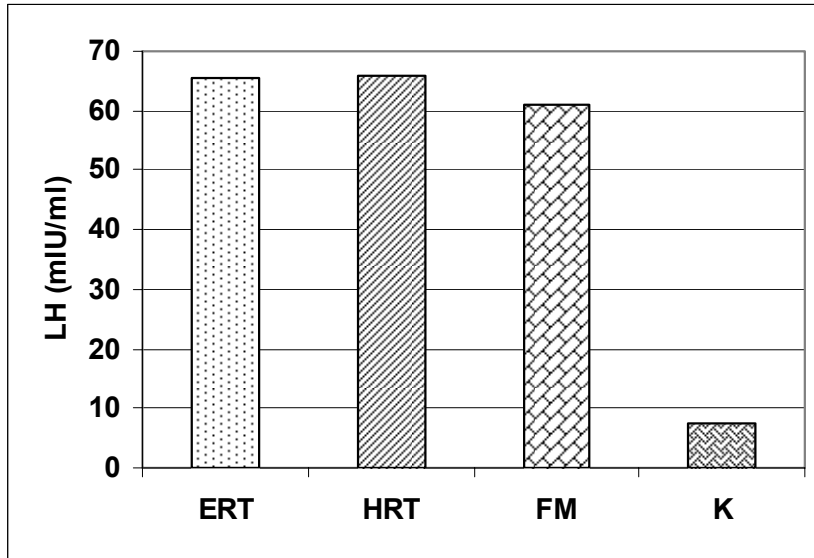
Tablo 5. Gruplardaki LH düzeylerinin (mIU/ml) istatistiksel olarak değerlendirilmesi

	ERT	HRT	FM	K
Ort.D	65.4	65.9	61.2	7.5
Median	64.0	66.0	62.0	6.7
SD	8.5	13.7	10.9	5.9
s.e.m	3.8	3.5	2.4	2.2
Min	54.0	45.0	45.0	0.47
Max	76.0	94.0	80.0	18.2

ERT ile K grubu kıyaslandığında $p=0.0000$

HRT ile K kıyaslandığında $p=0.0000$

FM ile K kıyaslandığında $p=0.0000$



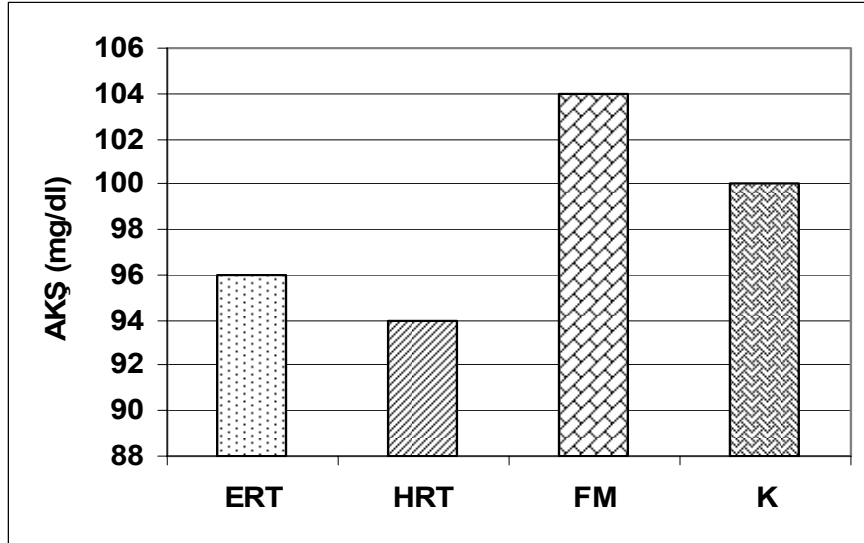
Şekil 13. LH düzeylerinin grafiksel gösterilişi.

Gruplardaki AKŞ, BUN, CRE, AST, ALT, CHOL, HDL, LDL ve TG düzeylerinin grafiksel olarak şekil 15-23 arasında gösterilmiştir.

Tablo 6. Gruplardaki AKŞ düzeylerinin (mg/dl) istatistiksel olarak değerlendirilmesi

	ERT	HRT	FM	K
Ort.D	96	94	104	100
Median	97	93	100	101
SD	12.8	9.1	12.3	6.9
s.e.m	5.7	2.4	2.8	2.2
Min	80	82	85	84
Max	115	117	126	110

HRT ile FM kıyaslandığında $p=0.013$

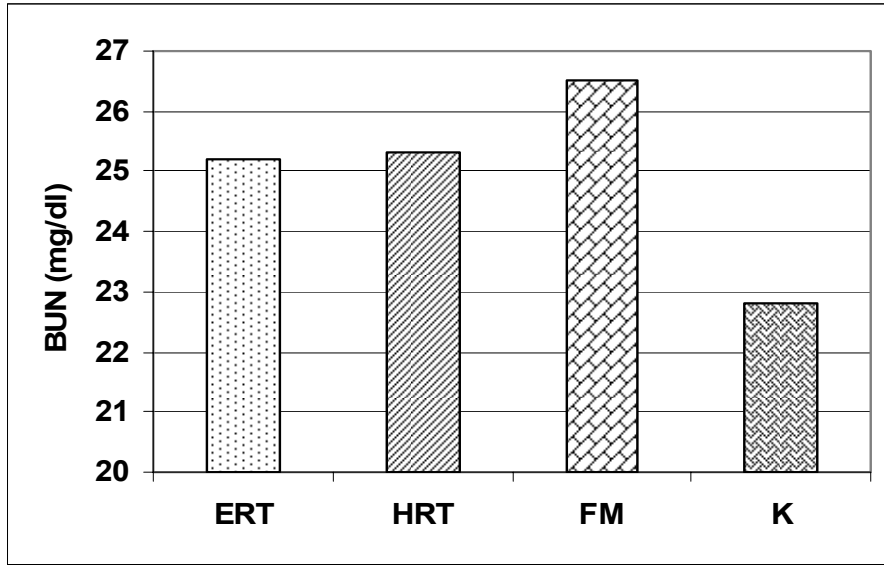


Şekil 15. AKŞ düzeylerinin grafiksel olarak gösterilişi

Tablo 7. Gruplardaki üre (BUN) düzeylerinin (mg/dl) istatistiksel olarak değerlendirilmesi

	ERT	HRT	FM	K
Ort.D	25.2	25.3	26.5	22.8
Median	20.0	22.0	24.5	18.2
SD	9.3	7.8	6.6	6.4
s.e.m	4.1	2.0	1.5	2.0
Min	17.0	18.0	15.0	15.0
Max	38.0	46.0	39.0	32.0

Gruplar arasında anlamlı bir fark saptanamamıştır.

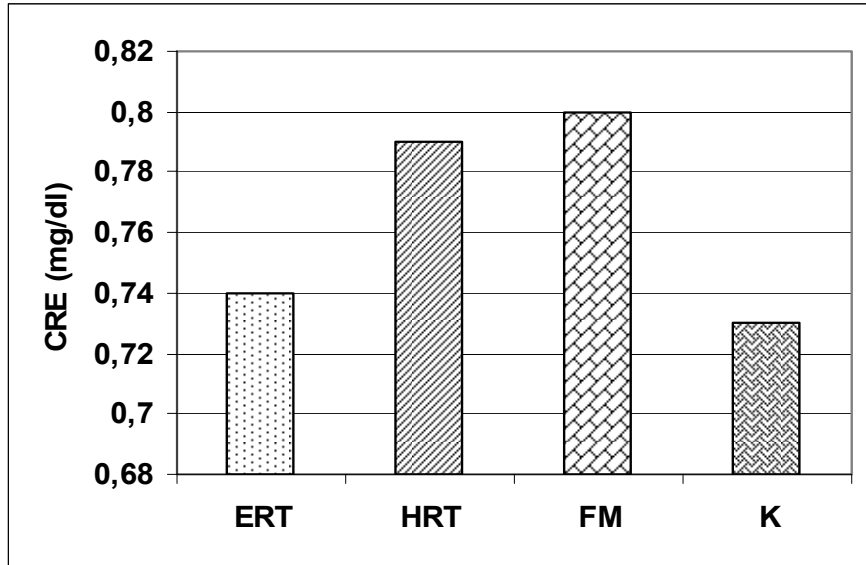


Şekil 16. BUN düzeylerinin grafiksel olarak gösterilişi

Tablo 8. Gruplardaki CRE düzeylerinin (mg/dl) istatistiksel olarak değerlendirilmesi

	ERT	HRT	FM	K
Ort.D	0.74	0.79	0.8	0.73
Median	0.8	0.8	0.8	0.7
SD	0.13	0.09	0.13	0.05
s.e.m	0.06	0.02	0.03	0.02
Min	0.6	0.7	0.6	0.7
Max	0.9	0.9	1.1	0.8

Gruplar arasında anlamlı bir fark saptanamamıştır.

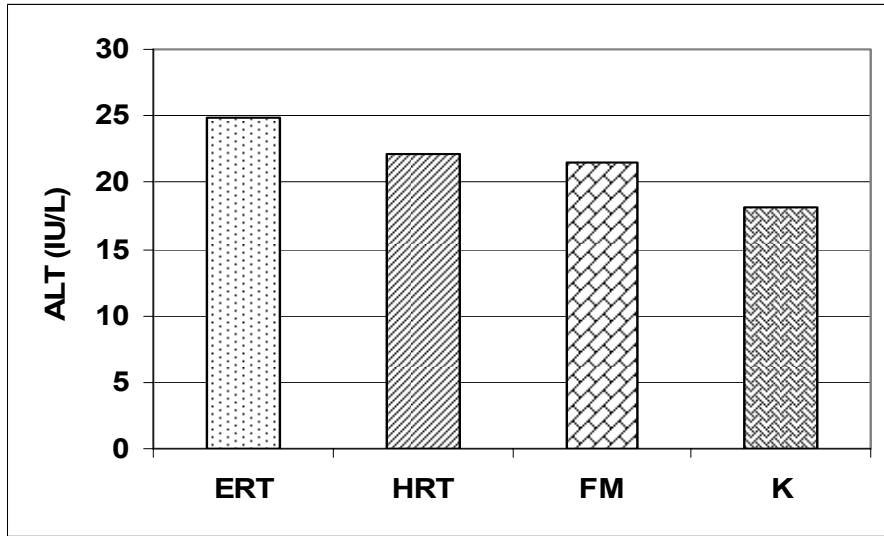


Şekil 17. CRE düzeylerinin grafiksel olarak gösterilişi.

Tablo 9. Gruplardaki ALT düzeylerinin (IU/L) istatistiksel olarak değerlendirilmesi

	ERT	HRT	FM	K
Ort.D	24.8	22.2	21.5	18.2
Median	25.0	22.0	19.0	15.5
SD	4.2	5.6	6.7	10.2
s.e.m	1.9	1.4	1.5	3.2
Min	20.0	14.0	12.0	11.0
Max	31.0	36.0	38.0	46.0

Gruplar arasında anlamlı bir fark saptanamamıştır.

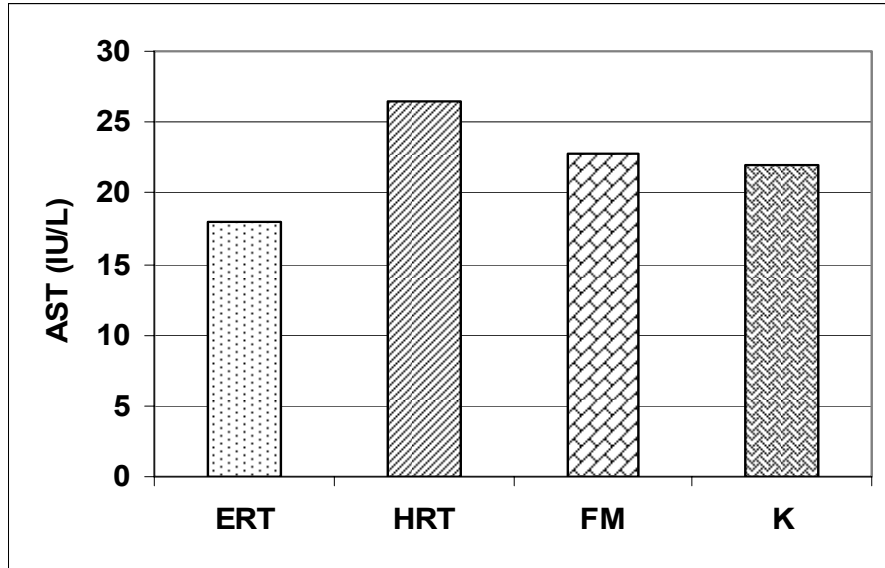


Şekil 18. ALT düzeylerinin istatistiksel olarak gösterilişi.

Tablo 10. Gruplardaki AST düzeylerinin (IU/L) istatistiksel olarak değerlendirilmesi

	ERT	HRT	FM	K
Ort.D	18.0	26.4	22.8	22.0
Median	19.0	27.0	20.5	19.5
SD	6.8	9.1	9.8	5.4
s.e.m	3.0	2.4	2.2	1.7
Min	8.0	14.0	11.0	18.0
Max	27.0	45.0	55.0	34.0

Gruplar arasında anlamlı bir fark saptanamamıştır.

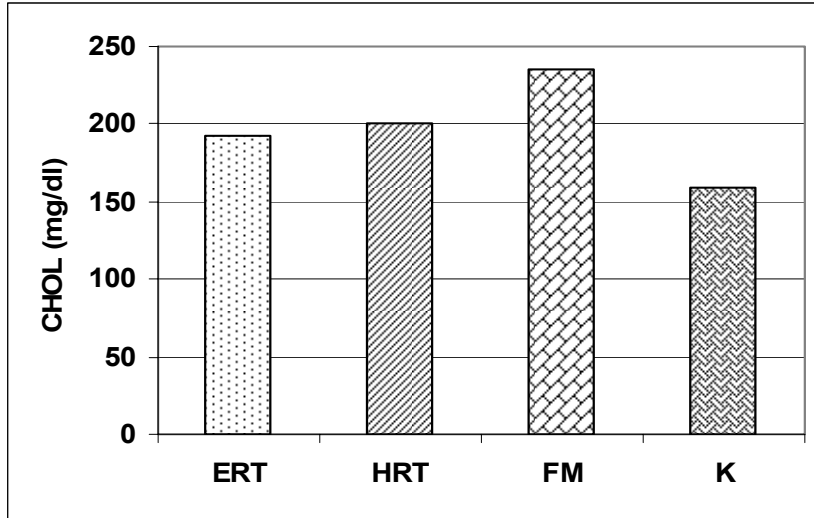


Şekil 19. AST düzeylerinin istatistiksel olarak gösterilişi.

Tablo 11. Gruplardaki CHOL düzeylerinin (mg/dl) istatistiksel olarak değerlendirilmesi

	ERT	HRT	FM	K
Ort.D	193.0	201.0	235.0	159.0
Median	185.0	192.0	250.0	162.0
SD	34.7	47.4	65.7	25.0
s.e.m	7.8	12.2	29.4	7.9
Min	135.0	118.0	128.0	115.0
Max	267.0	331.0	296.0	186.0

ERT ile K kıyaslandığında $p=0.016$
HRT ile K kıyaslandığında $p=0.012$

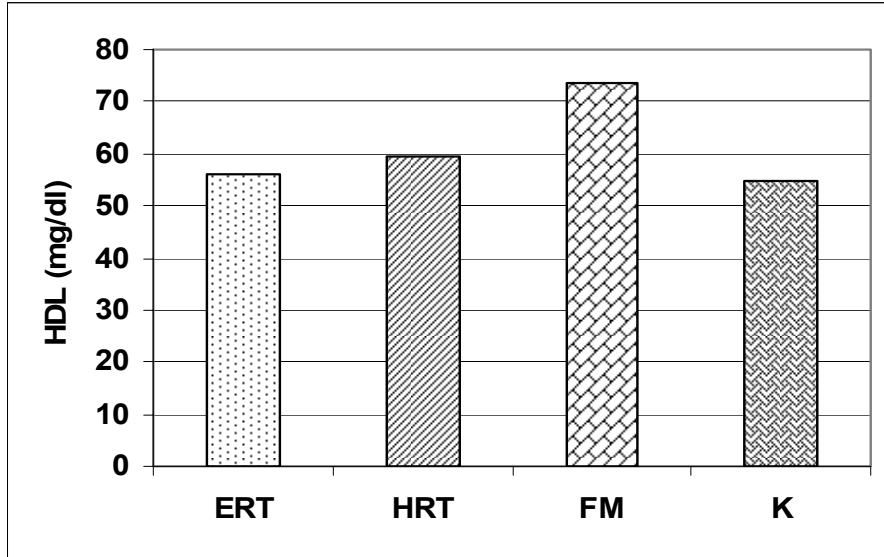


Şekil 20. CHOL düzeylerinin grafiksel olarak gösterilişi.

Tablo 12. Gruplardaki HDL düzeylerinin (mg/dl) istatistiksel olarak değerlendirilmesi

	ERT	HRT	FM	K
Ort.D	56.2	59.5	73.4	54.7
Median	55.0	56.0	65.0	55.5
SD	8.8	12.7	17.2	8.9
s.e.m	2.0	3.3	7.7	2.8
Min	39.0	39.0	58.0	37.0
Max	73.0	87.0	93.0	65.0

ERT ile FM kıyaslandığında $p=0.021$

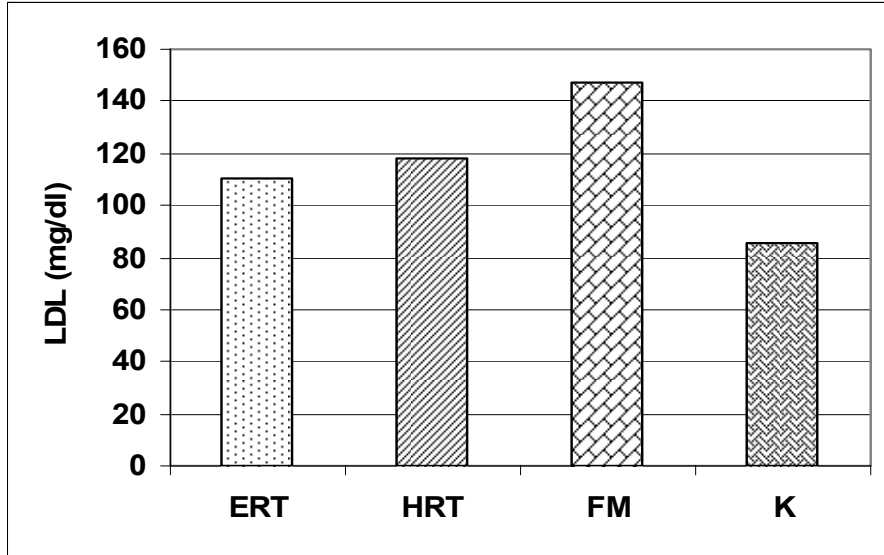


Şekil 21. HDL düzeylerinin grafiksel olarak gösterilişi.

Tablo 13. Gruplardaki LDL düzeylerinin (mg/dl) istatistiksel olarak değerlendirilmesi

	ERT	HRT	FM	K
Ort.D	110.0	118.0	147.0	85.2
Median	96.0	124.0	160.0	88.0
SD	29.7	33.9	28.2	17.8
s.e.m	6.6	8.7	12.6	5.6
Min	52.0	47.0	114.0	56.0
Max	164.0	124.0	177.0	112.0

ERT ile FM kıyaslandığında $p=0.023$
ERT ile K kıyaslandığında $p=0.019$
HRT ile K kıyaslandığında $p=0.011$
FM ile K kıyaslandığında $p=0.0007$

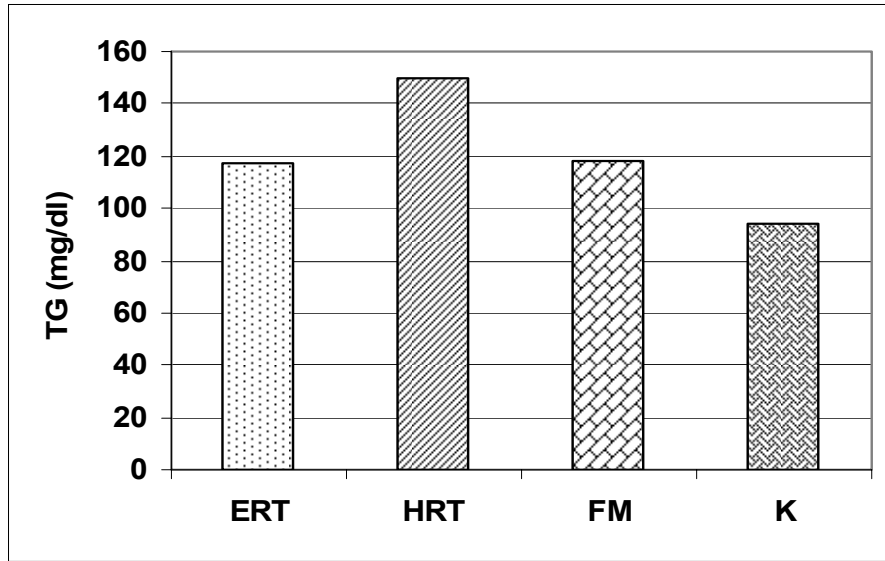


Şekil 22. LDL düzeylerinin grafiksel olarak gösterilişi.

Tablo 14. Gruplardaki TG düzeylerinin (mg/dl) istatistiksel olarak değerlendirilmesi

	ERT	HRT	FM	K
Ort.D	117.0	150.0	118.5	94.5
Median	110.0	96.0	104.5	66.44
SD	52.66	122.18	63.73	39.22
s.e.m	23.55	31.55	14.25	12.4
Min	62.0	40.0	41.0	53.0
Max	200.0	439.0	286.0	170.0

Gruplar arasında fark saptanamamıştır.



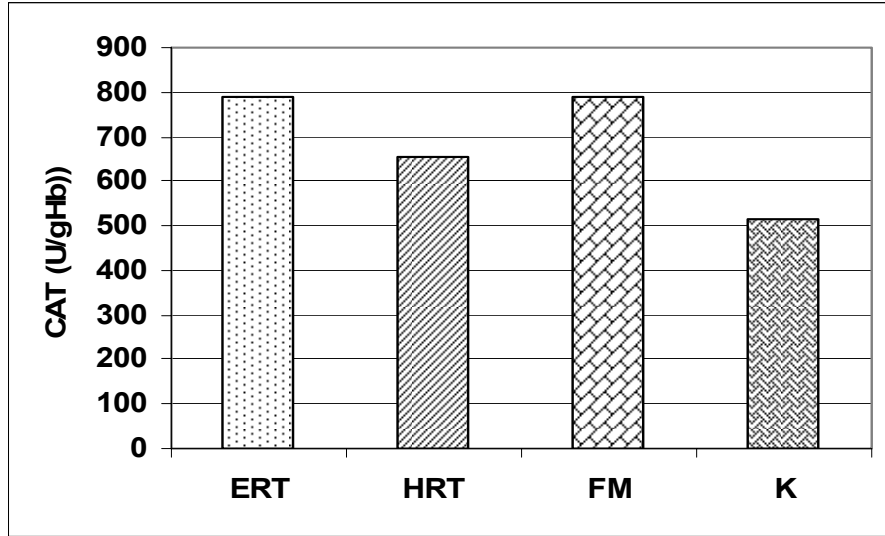
Şekil 23. TG düzeylerinin grafiksel olarak gösterilişi.

Gruplardaki oksidatif stres parametreleri olan CAT, MDA, GSH, GSH-Px, GR, NO ve MPO düzeyleri sırasıyla şekil 24-30 arasında gösterilmiştir.

Tablo 15. Gruplardaki CAT düzeylerinin (U/gHb) istatistiksel olarak değerlendirilmesi

	ERT	HRT	FM	K
Ort.D	790.8	656.0	788.2	512.6
Median	550.2	509.4	656.4	541.3
SD	546.5	423.2	470.2	245.4
s.e.m	244.4	109.3	105.2	77.59
Min	476.8	177.7	251.5	139.9
Max	1758.9	1717.8	2320.8	795.3

Gruplar arasında anlamlı bir fark saptanamamıştır.



Şekil 24. CAT düzeylerinin grafiksel olarak gösterilişi.

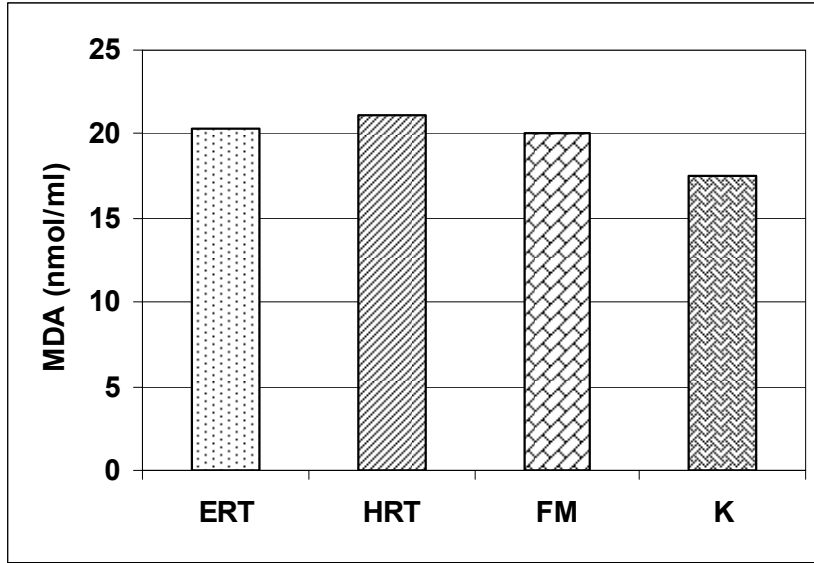
Tablo 16. Gruplardaki MDA düzeylerinin (nmol/ml) istatistiksel olarak değerlendirilmesi

	ERT	HRT	FM	K
Ort.D	20.36	21.09	20.04	17.51
Median	20.01	21.41	20.28	17.68
SD	2.2	1.31	1.32	1.83
s.e.m	0.98	0.35	0.29	0.65
Min	18.21	18.95	17.81	14.68
Max	23.28	20.08	22.15	19.75

ERT ile K kıyaslandığında $p=0.045$

HRT ile K kıyaslandığında $p=0.0005$

FM ile K kıyaslandığında $p=0.005$



Şekil 25. MDA düzeylerinin grafiksel olarak gösterilişi.

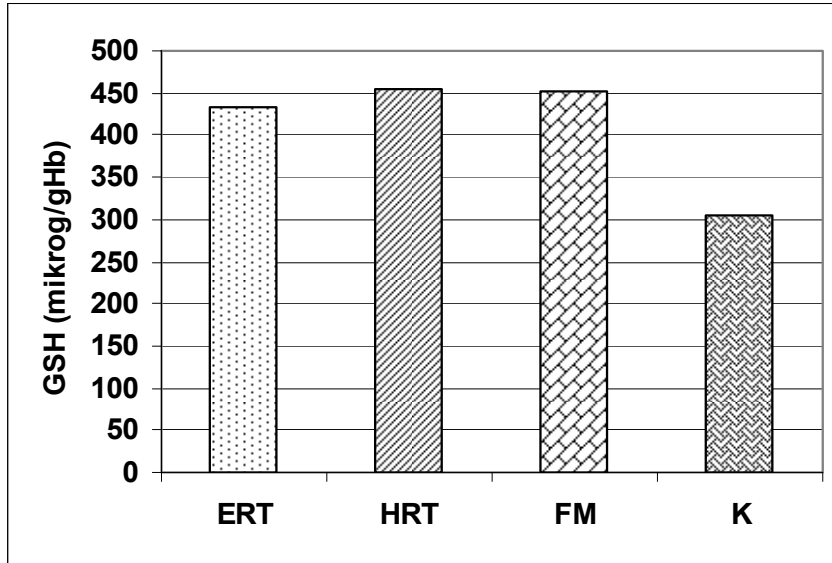
Tablo 17. Gruplardaki GSH düzeylerinin ($\mu\text{g/gHb}$) istatistiksel olarak değerlendirilmesi

	ERT	HRT	FM	K
Ort.D	432.7	453.5	453.0	305.8
Median	414.1	453.4	470.7	319.0
SD	84.47	96.1	101.6	42.26
s.e.m	37.78	24.81	22.72	14.09
Min	355.8	297.8	247.5	253.7
Max	556.0	660.0	618.1	377.5

ERT ile K kıyaslandığında $p=0.013$

HRT ile K kıyaslandığında $p=0.001$

FM ile K kıyaslandığında $p=0.0009$

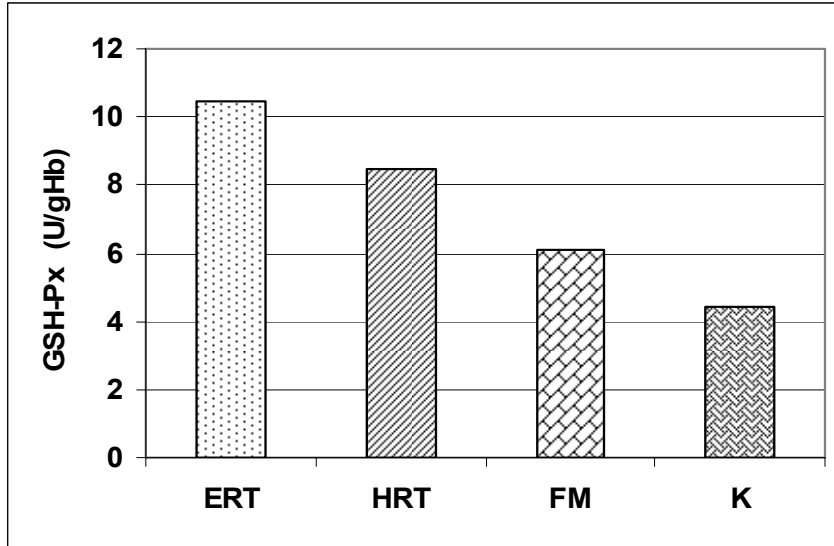


Şekil 26. GSH düzeylerinin grafiksel olarak gösterilişi.

Tablo 18. Gruplardaki GSH-Px düzeylerinin (U/gHb) istatistiksel olarak değerlendirilmesi

	ERT	HRT	FM	K
Ort.D	10.43	8.49	6.07	4.43
Median	10.17	7.01	6.36	3.96
SD	2.21	3.46	1.68	1.7
s.e.m	0.99	0.89	0.37	0.54
Min	7.98	3.46	2.85	2.51
Max	14.03	15.74	9.17	7.18

ERT ile FM grubu kıyaslandığında $p=0.0002$
ERT ile K grubu kıyaslandığında $p=0.0007$
HRT ile FM kıyaslandığında $p=0.038$
HRT ile K kıyaslandığında $p=0.0029$
FM ile K kıyaslandığında $p=0.031$



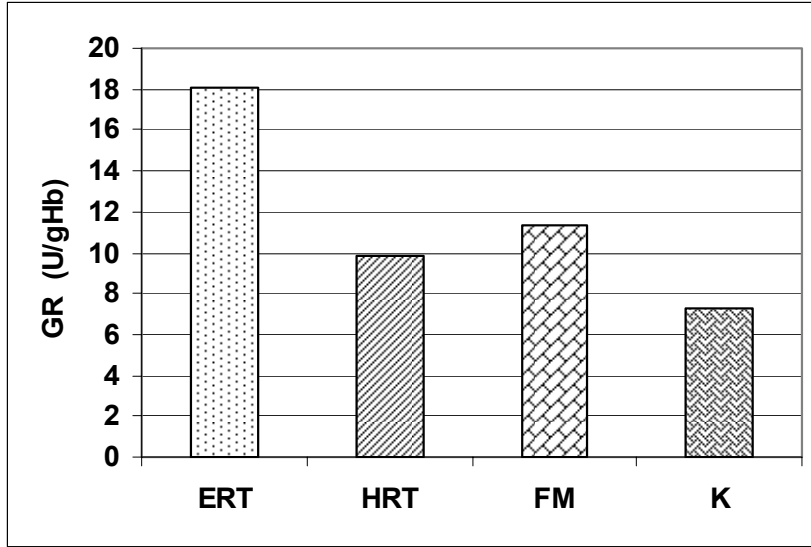
Şekil 26. GSH-Px düzeylerinin grafiksel olarak gösterilişi.

Tablo 19. Gruplardaki GR düzeylerinin (U/gHb) istatistiksel olarak değerlendirilmesi

	ERT	HRT	FM	K
Ort.D	18.06	9.8	11.35	7.23
Median	17.73	9.3	8.65	7.02
SD	10.81	4.25	7.0	3.31
s.e.m	4.83	1.1	1.56	1.05
Min	8.31	4.05	2.88	3.41
Max	34.61	18.99	24.13	12.12

ERT ile K kıyaslandığında $p=0.028$

FM ile K kıyaslandığında $p=0.038$



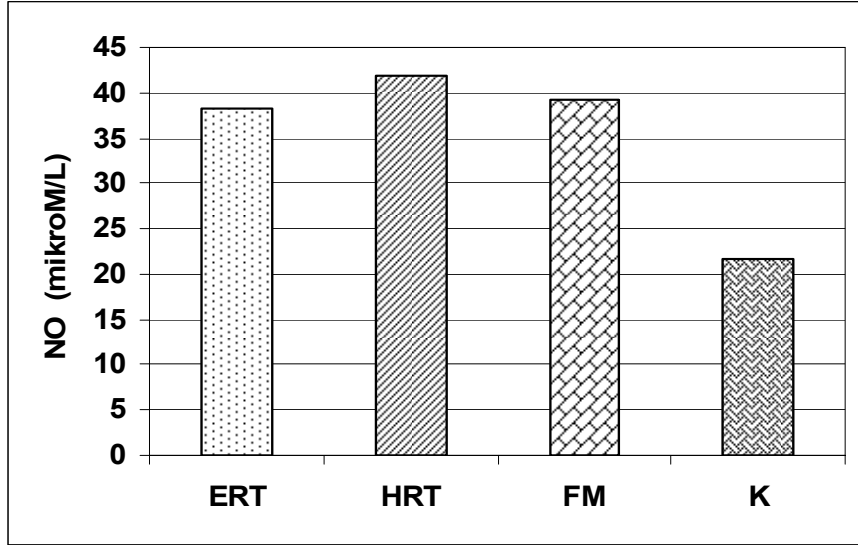
Şekil 28. GR düzeylerinin grafiksel olarak gösterilişi.

Tablo 20. Gruplardaki NO düzeylerinin ($\mu\text{M/L}$) istatistiksel olarak değerlendirilmesi

	ERT	HRT	FM	K
Ort.D	38.38	41.97	39.28	21.75
Median	35.38	36.91	35.57	21.58
SD	9.88	18.89	17.18	3.34
s.e.m	4.42	4.88	3.94	1.36
Min	27.94	24.57	17.35	16.64
Max	52.29	99.16	89.53	27.0

ERT ile K kıyaslandığında $p=0.004$

HRT ile K kıyaslandığında $p=0.0000$

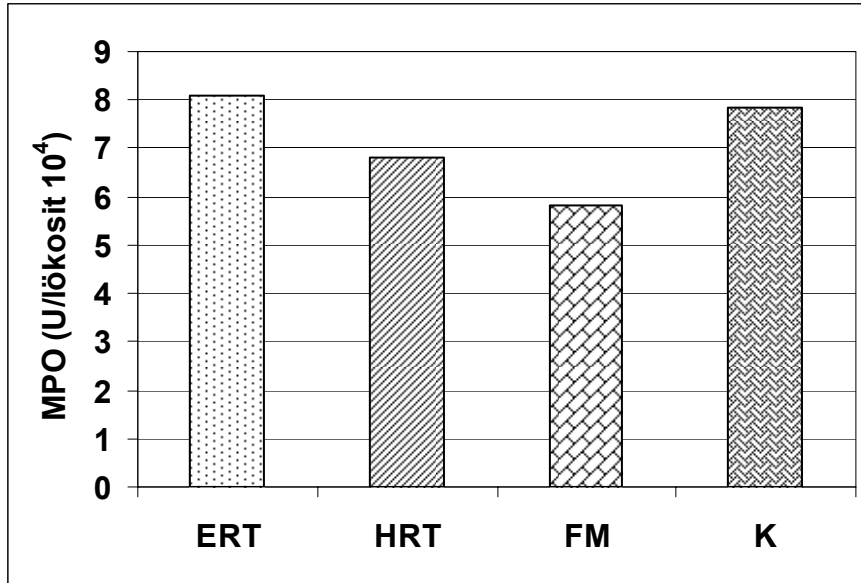


Şekil 29. NO düzeylerinin grafiksel olarak gösterilişi.

Tablo 21. Gruplardaki MPO düzeylerinin (U/lökosit 10^4) istatistiksel olarak değerlendirilmesi

	ERT	HRT	FM	K
Ort.D	8.1	6.81	5.82	7.86
Median	6.69	6.68	5.66	7.37
SD	2.91	3.38	2.53	3.11
s.e.m	0.67	0.91	1.13	1.1
Min	4.31	2.84	2.71	3.18
Max	15.02	13.0	9.29	12.8

Gruplar arasında anlamlı bir fark saptanamamıştır.



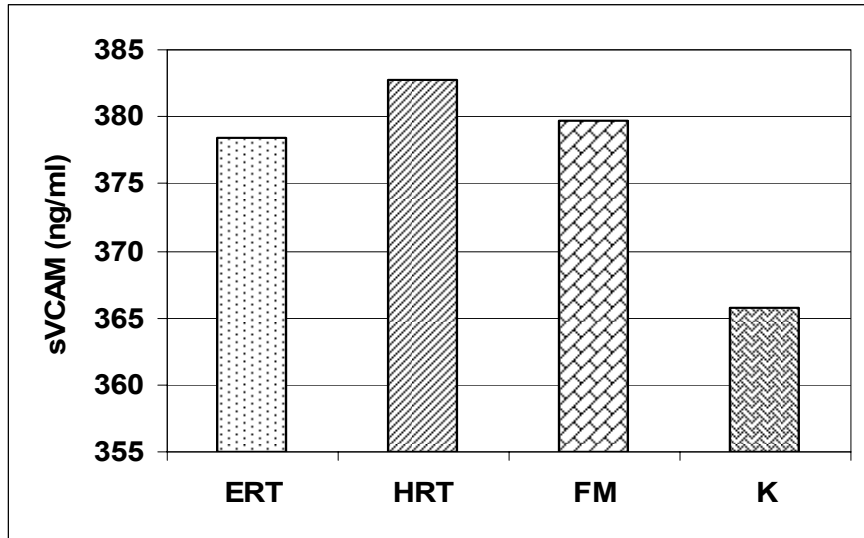
Şekil 30. MPO düzeylerinin grafiksel olarak gösterilişi.

Kardiyovasküler belirleyiciler olan SVCAM-1 ve sE-selektin düzeyleri şekil 31 ve 32’de gösterilmiştir.

Tablo 22. Gruplardaki sVCAM-1 düzeylerinin (ng/ml) istatistiksel olarak değerlendirilmesi

	ERT	HRT	FM	K
Ort.D	378.4	382.7	379.7	365.7
Median	375.9	382.7	380.9	369.8
SD	15.91	10.54	11.35	20.87
s.e.m	7.11	2.72	2.54	7.89
Min	357.6	358.5	361.5	369.8
Max	401.4	400.3	404.1	369.8

Gruplar arasında anlamlı bir fark saptanamamıştır.

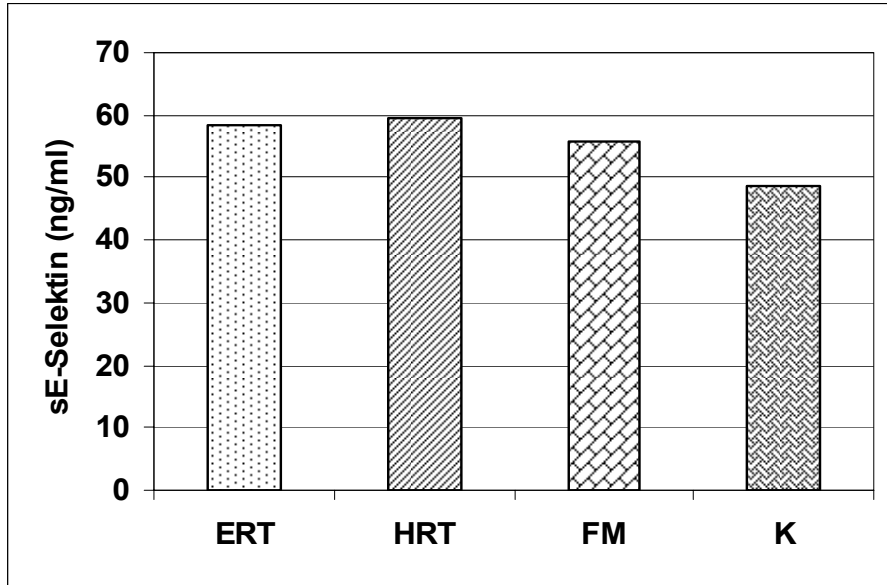


Şekil 30. sVCAM-1 düzeylerinin grafiksel olarak gösterilişi.

Tablo 23. Gruplardaki sE-selektin düzeylerinin (ng/ml) istatistiksel olarak değerlendirilmesi.

	ERT	HRT	FM	K
Ort.D	58.23	59.63	55.96	48.64
Median	60.86	66.58	53.02	34.68
SD	27.32	28.68	21.62	21.96
s.e.m	12.22	7.41	4.83	6.34
Min	26.33	16.01	22.11	16.01
Max	91.66	104.5	95.29	78.18

Gruplar arasında anlamlı bir fark saptanamamıştır.



Şekil 32. sE-Selektin düzeylerinin grafiksel olarak gösterilişi.

Gruplardaki leptin düzeyleri şekil 32, 33 ve 34’de gösterilmiştir.

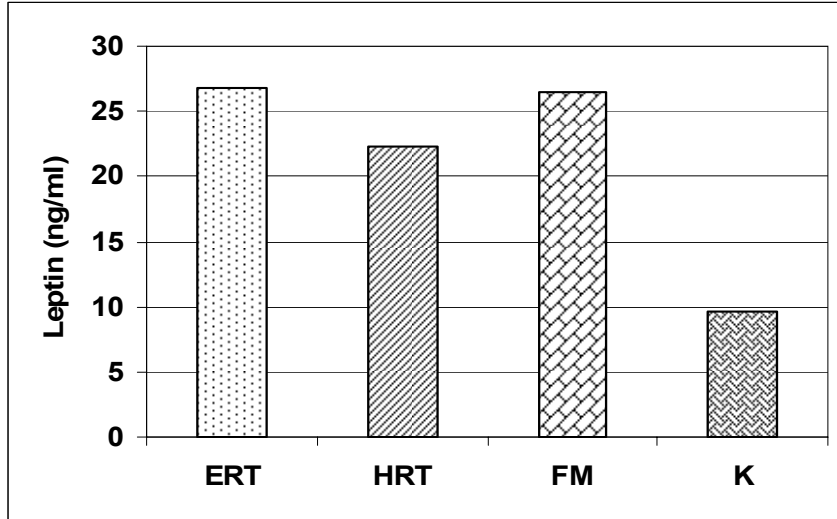
Tablo 24. Gruplardaki leptin düzeylerinin (ng/ml) istatistiksel olarak değerlendirilmesi

	ERT	HRT	FM	K
Ort.D	26.78	22.22	26.4	9.62
Median	13.5	14.15	19.04	8.03
SD	18.95	13.74	15.73	2.23
s.e.m	8.47	3.67	3.52	0.71
Min	12.44	9.97	9.25	6.48
Max	48.03	49.21	49.97	13.79

ERT ile K kıyaslandığında $p=0.0047$

HRT ile K kıyaslandığında $p=0.0000$

FM ile K kıyaslandığında $p=0.0000$



Şekil 32. Leptin düzeylerinin grafiksel olarak gösterilmesi.

ERT ve HRT alan post-menopozal gruplardaki olguların hiçbiri, BMI için bazal düzey olarak alınan 25 kg/m^2 düzeyini geçmemiş bulunduğu için, hiçbir tedavi almayan post-menopozal grupta, leptin

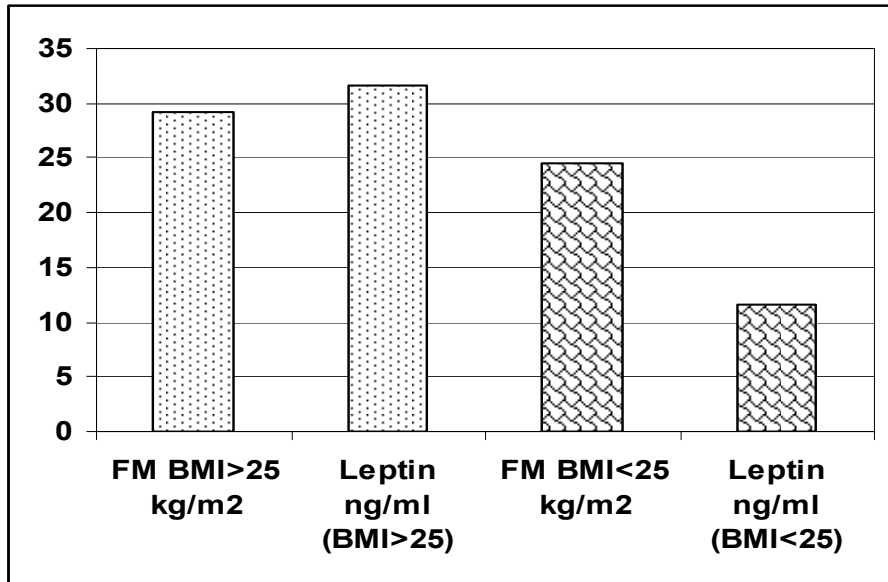
düzeylerinin obesiteden kaynaklanıp kaynaklanmadığının gösterilmesi amacı ile olgular iki gruba ayrılıp, leptin düzeyleri kendi içlerinde istatistiksel olarak tekrar değerlendirilmiş ve tablo 25’de gösterilmiştir.

Tablo 25. HRT almayan grupta BMI’lerine göre leptin düzeylerinin (ng/ml) istatistiksel olarak değerlendirilmesi.

	FM BMI>25 (n=25)	LEPTİN (OBEZ)	FM BMI<25 (n=31)	LEPTİN (OBEZ OLMAYAN)
Ort.D	29.24 ^a	31.58 ^b	24.56	11.63
Median	29.6	31.71	24.8	11.73
SD	2.75	14.56	0.52	1.72
s.e.m	0.76	4.04	0.23	0.77
Min	25.8	12.93	24.0	9.25
Max	34.0	49.97	25.0	13.99

^ap<0.001 BMI<25’den düşükler ile kıyaslandığında.

^bp<0.0001 obez olmayan grup ile kıyaslandığında.



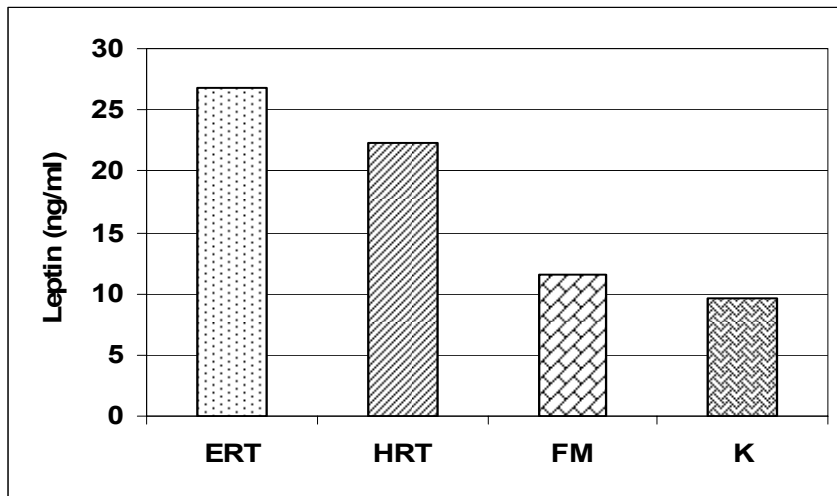
Şekil 34. FM grubunda BMI’lerine göre serum leptin düzeylerinin grafiksel olarak gösterilmesi.

ERT ve HRT alan post-menopozal gruplardaki olguların hiçbiri, BMI için bazal düzey olarak alınan 25 kg/m² düzeyini geçmemiş bulunduğundan, obez olmayan ve hiçbir tedavi almayan post-menopozal grupta, leptin düzeylerinin östrojenden etkilenip etkilenmeyeceğinin gösterilmesi amacı ile , FM grubundaki obez olgular çıkartılıp, diğer gruplar aynı kalmak üzere tekrar istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve sonuçlar tablo 26'de gösterilmiştir.

Tablo 26. Obez olmayan (BMI<25 kg/m²) FM grubu ile diğer grupların leptin düzeylerinin (ng/ml) istatistiksel olarak değerlendirilmesi.

	ERT	HRT	FM	K
Ort.D	26.78	22.22	11.63	9.62
Median	13.5	14.15	11.73	8.03
SD	18.95	13.74	1.72	2.23
s.e.m	8.47	3.67	0.77	0.71
Min	12.44	9.97	9.25	6.48
Max	48.03	49.21	13.99	13.79

ERT ile K kıyaslandığında p=0.0047
HRT ile FM kıyaslandığında p=0.026
HRT ile K kıyaslandığında p=0.0000



Şekil 35. Obez olmayan FM grubu ile diğer grupların leptin düzeylerinin grafiksel olarak gösterilişi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

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 (30).

Progestinler, HRT tedavisinin bir parçasını oluşturmakta olup, antioksidan/pro-oksidan sistem içindeki yerleri henüz tartışmalıdır. Tranquilli ve ark. progestinlerin tek başlarına ya da transdermal E₂ ile birlikte kullanıldıklarında antioksidan etkilerinin bulunduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, HRT alanlarda lipid peroksidasyonunun düşmesinin sadece östrojenlere bağlı olmayıp, seks steroidlerinin birlikte etkilerinden kaynaklandığının sonucuna varmışlar ve E₂ olmadan MPA kullanımının dahi lipidlerin peroksidasyonunda inhibitör etkili olduğunu rapor etmişlerdir (31). Aksine, Massafra ve ark. ise progestini hipotalamik amenore'si olan genç hastalarda kullanmışlar ve bunlarda antioksidan/prooksidan dengede herhangi bir değişme gözlemediklerini öne sürmüşlerdir (32)

Çalışmamızda, eritrositlerde antioksidatif enzim sistemlerini ölçmemizin nedeni ise, bu hücrelerin devamlı olarak oksidatif strese maruz kalması nedeni ile iyi bir materyal olmasıdır. HRT tedavisinde 6 aylık bir dönemin, eritrositlerde antioksidatif sistemlerdeki değişimi incelemek için yeterli olduğu bildirilmiştir. Çünkü eritrositlerin ömrü 120 gün olup, bu günden sonra, antioksidatif enzim sistemlerindeki herhangi bir değişimi saptamak mümkündür (30). Bununla beraber, bazı yazarlar 1 aylık bir HRT'denra veya menstrüel siklus sırasında dahi anti-oksidatif enzim sistemlerinde değişiklik bildirmişlerdir (37).

Çalışmadaki her üç post-menopozal grupta E₂ düzeylerinin menopoza girmemiş kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak farklı olduğu ve ortalama değerlerinin 50 pg/ml'den düşük olduğu saptanmıştır. Bu değer, çalışma gruptaki olguları seçerken belirlediğimiz değer olup, en

yüksek ortalama E₂ düzeyi ERT alan grupta belirlenmiş olmasına rağmen belirlenen sınır değerden oldukça düşüktür. Bununla beraber, sadece östrojen alan grupta ortalama E₂ düzeyleri, östrojen+progestin tedavisi alan ve ayrıca, fizyolojik olarak menopoza girmiş olan ve hiç tedavi almayan gruptaki değerler ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Çalışmadaki her üç post-menopozal grupta FSH düzeylerini menopoza girmemiş kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan farklı olduğu ve olguları seçerken belirlediğimiz 30 mIU/ml düzeylerinden oldukça yüksek olduğu saptanmıştır. Yine, bu değerlere paralel olarak LH düzeyleri de beklenen değerlerde bulunmuş olup, her üç post-menopozal grupta, kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel açıdan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.

Olgu gruplarında rutin biyokimya parametreleri incelendiğinde kardiyovasküler hastalıklar açısından önemli aterosklerotik belirleyiciler olan CHOL, HDL, LDL ve TG düzeylerinde gruplar arasında önemli farklılıklar saptanmıştır. Kolesterol düzeyleri incelendiğinde, en yüksek ortalama değer FM grubunda olup, bu değer referans aralığının üstünde olup, standart sapmasının yüksek olması nedeni ile, diğer gruplar ile kıyaslandığında aradaki fark anlamlı bulunmamıştır. Yine de, ERT ve HRT alan post-menopozal gruplarda elde edilen ortalama değerler, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek bulunmasına rağmen, her iki grupta da ortalama değerler referans aralıkları içinde yer almakta idi. Sadece FM grubunda ortalama HDL ve LDL düzeyleri referans aralıkları dışında bulunmuş olup, HDL değerleri, ERT ile FM kıyaslandığında istatistiksel açıdan önemlidir. En düşük ortalama LDL düzeyi K grubunda saptanmış olup, diğer üç grup ile kıyaslandığında istatistiksel açıdan anlamlıdır. TG düzeyleri incelendiğinde ise, ortalama değerler bütün gruplarda referans aralıkları içinde olmakla birlikte en düşük düzey K grubunda saptanmıştır. Olgu gruplarında lipid profilleri incelendiğinde, aterosklerotik bir riskleri olmadığı saptanmış olup, bu bulgularımız klinik veriler ile uyumda idi.

Bednarek-Tupikowska ve ark. çalışmalarında, hücrel antioksidatif enzim sistem aktivitesi üzerine post-menopozal E₂ eksikliğinin ve hormon replasman tedavisinin etkilerini incelemişler ve serbest radikal üretiminin ve membran fosfolipidlerinin peroksidasyonunun bir göstergesi olan LPO serum düzeylerinin menopozdan sonra çok yükseldiğini ve hormonal terapiden sonra ise düştüğünü saptamışlardır. Bu veriler ile, menopozdan sonra serbest radikal üretiminin ve membran fosfolipidlerinin peroksidasyonunun arttığını ve E₂'nin yerine konmasıyla, serbest radikal hasarının inhibe edildiğini göstermişlerdir (30). Bu bulgular, aynı araştırmacıların 2004 yılında yaptıkları yayınları da desteklemektedir. Bu sonuçların, post-menopozal kadınlarda E₂ replasman tedavisinin serbest radikal reaksiyonlarını inhibe ettiği ve menopozdan önceki antioksidan kapasitenin tekrar kazanıldığını gösterdiğini ve TBARS düzeylerinin hem ERT hem de HRT alan grupta birbirinden farklı olmadığını bildirmişlerdir (33). Aynı araştırmacılar, post-menopozal kadınlarda, eritrositlerde GSH-Px aktivitesini ve GSH konsantrasyonunu pre-menopozal kadınlar ile kıyasladıklarında daha düşük değerler saptamışlardır. Yine, bu değerlerin E₂ veya kombine E₂-progestin tedavisinden sonra arttığını rapor etmişlerdir. Pre- ve post-menopozal kadınlarda eritrosit GSH-Px aktivitesi ile serum E₂ düzeyleri arasında pozitif korelasyon saptanmıştır. Biz de post-menopozal kadınlarda GSH-Px aktivitesini pre-menopozal kadınlara kıyaslandığında anlamlı olarak düşük saptadık. ERT ve HRT 'nin GSH-Px aktivitelerini yükselttiği gözlenmiş olup, ERT ve HRT'de ortalama değerler arasında herhangi bir fark gözlenmemiştir. Eritrosit GSH konsantrasyonlarının, GSH-Px konsantrasyonları ile korele olduğu ve yine post-menopozal kadınlarda düzeylerinin azaldığı ve östrojen tedavisinden sonra ise yükseldiği ve premenopozal kadınlar ile aynı düzeye geldiği bildirilmiştir. Capel ve ark. ilk olarak seks hormonlarının, hücrel antioksidatif enzim aktivitelerini arttırmak yoluyla, antioksidatif özelliklerinin olabileceğini ileri sürmüşlerdir (36). Cinsiyet hormonlarının hücrel antioksidatif enzim aktiviteleri üzerine stimülatör etki yapması, diğer yazarlar tarafından da teyid edilmiş olup, özellikle GSH-Px

aktivitesinin menstrüel sikluskaki değişimlerinin önemli olduğundan söz edilmiştir. Özellikle, folliküler fazın sonlarına doğru ve luteal fazın erken dönemlerinde yüksek GSH-Px düzeyleri rapor edilmiş olup, bu iki fazda da östrojen düzeyleri en yüksek durumundadır (37).

Eritrosit CAT aktivitesinin ise, post-menopozal kadınlar ile pre-menopozal kadınlarda aynı ortalama değerde saptandığı, her iki tedaviden (E₂ veya kombine) sonra ise, CAT aktivitelerinin her iki tedaviyi alan grupta pre-menopozal gruptaki değerlerin altına indiğı bildirilmiştir (34,35). Bednarek-Tupikowska ve ark. diğer bazı yazarların aksine, gruplar arasında CAT aktivitesinde bir fark saptamamış ve bu enzim düzeylerinin tedavi sonrasında düştüğünü bildirmişlerdir. Bu durumu ise, hormon replasman tedavisinden sonra GSH-Px aktivitesinin artmasına, çünkü her iki enzim sisteminin aynı substratı (H₂O₂) inaktive etmesinin etkili olduğunu öne sürmüşlerdir. Böylece, GSH-Px aktivitesindeki artışın, birlikte çalıştığı anti-oksidatif bir enzim olan CAT aktivitesinde azalmaya neden olabileceğini rapor etmişlerdir (30). Aynı araştırmacılar ve Radowicki ve ark. ise, TAS düzeylerinin de koroner kalp hastalığı olan post-menopozal kadınlarda önemli ölçüde düştüğünü ve antioksidanların ateroskleroza karşı koruruyucu etki gösterdiği hipotezini konfirme etmiş olduklarını bildirmişlerdir (34).

Araştırmacıların bulguları ile çalışma bulgularımızı kıyasladığımızda, biz de bütün gruplar arasında CAT aktiviteleri arasında bir fark gözlemedik. En düşük CAT aktivitesine K grubunda rastlamamıza rağmen, diğer gruplar ile kıyaslandığında fark anlamsız bulundu. Bununla beraber, ERT ve HRT alan gruplardaki ortalama GSH-Px değerleri, FM ve K gruplarındaki düzeyler ile kıyaslandığında ortalama değerlerin anlamlı olarak yükseldiğı saptanmıştır. Bulgularımız, Bednarek-Tupikowska ve ark. Sonuçlarını desteklemektedir. Bu bulgular, ERT ve HRT'nin anti-oksidatif kapasiteyi yükseltme de GSH-Px enzimi üzerinde etkili olduğu sonucunu düşündürmektedir.

Lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA düzeyleri incelendiğinde ERT, HRT alan ve FM grubunda hemen aynı ortalama değerler saptanmış olup, bunlar K gubu ile karşılaştırıldığında aralarındaki

fark istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur. Bu bulgular, ERT ve HRT almanın MDA değerleri üzerinde bir etkisi olmadığını göstermektedir.

Ortalama GSH düzeyleri ise ERT, HRT alan ve FM grubunda hemen aynı saptanmış olup, bu değerler K grubuna göre yüksek ve istatistiksel açıdan önemli olarak saptanmıştır. GSH metabolizması ile ilgili bir diğer enzim sistemi GR olup, en yüksek ortalama değer ERT alan grupta saptanmıştır. En düşük düzey ise, K grubundadır. Buna dayanarak post-menopozal olgularda her iki tedavinin de glutatyonun döngüsünün sürdürülmesinde etkili olduğu söylenebilir.

NO• radikalinin gaz şeklinde olması onu vücut sıvılarında ölçmemizi zorlaştırmaktadır. Kan damarlarında, endotelden-türeyen NO• molekülleri alt katmandaki düz kas hücrelerine diffüze olmakta, vazodilatasyonu ve kan dolaşımını aynı düzeyde tutmaktadır (38). NO• kadınlarda üreme sisteminde, uterusda, Fallop tüplerinde ve ovaryumda sentezlenmektedir. *İn vitro* çalışmalar, NO•'in bu dokularda düz kas hücrelerinin gevşemesini sağlayan güçlü bir molekül olduğu ve aynı zamanda steroid oluşumunu regüle ettiği gösterilmiştir (40-42).

Ekerhovd ve ark. LH hormonunun pik yapmasından sonrakini izleyen günde plazma nitrat düzeylerinin önemli ölçüde artmış olduğunu ve bu bulguların spontan ovülasyonda NO•'in arttığını gösterdiğini bildirmişlerdir. Yine, GnRH ile tedaviden sonra NO•'in üretiminin inhibe olduğunu ileri sürmüşlerdir. Ayrıca, ovaryumların stimülasyonu ile plazma nitrat düzeylerinde bir artış olduğu, fakat bunun ancak yüksek konsantrasyonlardaki östradiol ile gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Bunun aksine, overlerin stimülasyonu sırasında östradiol konsantrasyonlarının yüksek olması durumunda, plazma nitrat düzeylerinin gerçekten daha da düşük olabileceğini, çünkü E₂'nin, NO• üretimi üzerinde feed-back bir etki oluşturabileceğini ileri sürmüşler ve plazma nitrat düzeylerinin ileri düzeydeki OHSS artmadığını rapor etmişlerdir (22).

Çalışmamızda her üç post-menopozal grupta ortalama NO• düzeylerinin hemen hemen aynı olduğu ve K grubu ile kıyaslandığında

yüksek olduğu görülmektedir. Bu bulgulara göre, ERT ve HRT tedavilerinin serum NO[•] düzeylerini fazla etkilemediği söylenebilir.

MPO aktivitesinin sağlıklı kadınlarda erkekler ile kıyaslandığında daha yüksek olduğu ve myeloid hücrelerde östrojenin MPO aktivitesini arttırdığının bilindiği ve dolayısı ile plazmada MPO düzeylerinin arttığı rapor edilmiştir (58). Yine, menopoza girildiğinde MPO aktivitesinin önemli ölçüde düştüğü, fakat HRT sonrasında artabildiği rapor edilmiş olup (54,56), bunun östrojenin immun sistem üzerine etkisi ile ilgili olduğu bildirilmiştir (59). Çalışmamızda, en yüksek MPO düzeyleri ERT alan grupta, en düşük düzeyler ise, FM grubunda saptanmış olup, gruplar arasında ortalama değer farklılıkları olmasına rağmen bunun istatistiksel açıdan önemli olmadığı görülmüştür. HRT'nin MPO düzeylerini arttırdığı çeşitli yayınlarda belirtilmiştir ki, bulgularımızda bunu desteklemekte olup, ERT ve HRT alan her iki grupta da düzeylerin, kontrol grubu ile kıyaslandığında ortalama değerlerin aynı olduğu, FM grubundaki ortalama değerden daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bununla beraber, anlamlı bir fark olmayışının nedeni ortamda H₂O₂'nin az olması olabilir diye düşünmekteyiz. Çünkü, CAT aktivitesinin de düşük olması bu bulgularımızı desteklemektedir.

Störk ve ark. çalışmalarında standart doz progestin+17 β -östradiol ile düşük doz progestin+17- β östradiol kullanacak grupta tedavi öncesinde elde ettikleri ICAM-1, SVCAM-1 ve sE-selektin düzeyleri arasında bir fark gözlemediklerini bildirmişler, fakat tedaviye başladıktan 48 ay sonrasında bu düzeylerde istatistiksel açıdan önemli farklarda düşme gözlendiğini bildirmişlerdir (3). Sumino ve ark. çalışmalarında transdermal HRT kullanan grupta bazal düzeyler ile 12 aylık bir tedavi sonrasında SVCAM-1 ve sE-selektin düzeylerinde anlamlı bir farklılık bildirmekle birlikte, tedavi sonrasındaki elde ettikleri sonuçların hormon tedavisi almayan post-menopozal gruptan elde edilen değerler ile aynı düzeye olduklarını bildirmişlerdir. Transdermal HRT tedavisinin bu düzeyler için çok yararlı olduğunu, fakat olgularda lipid düzeylerini etkilemediğini rapor etmişlerdir. Bunun da transdermal HRT'nin, oral HRT'ye göre karaciğerdeki lipid

metabolizmasını etkilemesinin az olmasından ileri gelebileceğini iddia etmişlerdir (6). Nikander ve ark. phytoestrogenlerin dolaşımdaki post-menopozal olgularda CRP, sE-selektin ve NO[•] düzeylerine olan etkilerini incelemişler ve tedaviden 3 ay sonra elde ettikleri sonuçlar ile aralarında herhangi bir fark olmadığını bildirmişlerdir. Ayrıca, bu değerleri hormon tedavisi almayan post-menopozal olgular ile karşılaştırmışlar ve yine bir fark gözlemlenemediklerini rapor etmişlerdir. sE-selektin ve NO[•]'in her ikisinin birden endotelial hücre ürünleri olduğunu, düşük düzeylerdeki sE-selektin ve yüksek NO[•] düzeylerinin damar sağlığı açısından yararlı olduğunu bildirmişlerdir. Bununla beraber, olgularındaki düşük NO[•] düzeylerinin kişilerdeki diyetten kaynaklanabileceğini ve bu tür bir çalışmanın klinik bir ortamda yapılmasının daha güvenilir sonuçlar verebileceğini öne sürmüşlerdir (51). Çalışmamızda ERT, HRT ve FM gruplarında elde edilen ortalama sVCAM-1 ve sE-selektin değerleri sağlıklı kontrol gruptan elde edilen değerler ile karşılaştırıldığında aralarında önemli bir fark olmadığı saptanmıştır. Çalışmaya alınan ERT, HRT, FM gruplarında koroner kalp hastalığı yok ise, bu parametreler arasında anlamlı bir farklılık olmaması da beklenen bir sonuç olabilir.

Literatürlerde, plazma leptin düzeyleri üzerine östrojen ve HRT tedavisinin etkileri ile ilgili birbirinden oldukça farklı sonuçlar rapor edilmiştir. Araştırmalarda, serum leptin düzeyleri ve şişmanlığın ölçütü (BMI) ile ilişkisi bildirilmiştir. Ayrıca, adipoz dokuda östrojen reseptörlerinin bulunduğu ve böylece leptin üretimini regüle eden bir mekanizma olabileceği, erkeklerde serum leptin düzeylerinin daha düşük olduğu ve bunun da kadınlarda yağ depositlerinin fazla olması ile açıklanabileceği rapor edilmiştir (20,21). Bununla birlikte, kadın ve erkeklerdeki leptin konsantrasyonlarındaki bu farklılığın kısmen östrojen düzeylerindeki farklılık ile açıklanabileceği öne sürülmüştür. Barash ve ark. yaptıkları çalışmada, leptin tedavisinden sonra overlerde ve testislerde ağırlıklarında artma saptamış ve ovaryum dokusunda folliküler oluşumun arttığını, testislerde ise, semini feröz tüplerde hücrel aktivitenin arttığını histolojik olarak göstermişlerdir (21).

Castracane ve ark. östrojenin, post-menopozal kadınlarda serum leptin düzeylerini etkilemediğini rapor etmiştir (22). Haffner ve ark. ise, serum leptin düzeylerinin oral kontraseptif alan pre-menopozal kadınlarda, HRT alan ve almayan post-menopozal kadınlarda birbirinden farklı olmadığını bildirmişlerdir (23). Shimizu ve ark. ratlarda ve insanlarda östrojenlerin serum leptin konsantrasyonunu regüle ettiği ileri sürmüşler ve pre-menopozal kadınlarda serum leptin konsantrasyonlarının, HRT almayan post-menopozal kadınlardan oldukça yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. Yine, luteal fazda östrojen konsantrasyonlarının iki kat fazla olması nedeni ile leptin düzeylerinin yaklaşık %33 oranında arttığını ve paralellik olduğu bildirilmiştir (24). Aynı zamanda, Rosenbaum ve ark.'da tedavi almayan post-menopozal kadınlarla, menopoza girmemiş kadınları kıyasladığında önemli ölçüde düşük leptin düzeylerinin olduğunu rapor etmişlerdir (43). Paolissa ve ark. sağlıklı ve obez olmayan kişilerde, plazma leptin düzeylerinin plazma östradiol düzeyleri ile korele gittiğini göstermiştir. Buna ek olarak, post-menopozal kadınlarda plazma testosteron düzeylerinin artmasının plazma leptin düzeylerini etkileyebileceği bildirilmiş olup, testosteronun adipositlerdeki *ob* genindeki transkripsiyon üzerinde inhibitör etkili olabileceği ileri sürülmüştür (17). Bir başka çalışmada, obezite oluşturulan rat modellerinde *ob* gen ekspresyonunun ve leptin düzeylerinin arttığı bildirilmiş ve insanlarda obezitede leptin düzeylerinin yağ kütlesi ile pozitif korelasyon gösterdiği rapor edilmiştir (27). Yine, Nagy ve ark obez kadınlarda serum leptin düzeylerinin artmasının, adipoz dokudaki *ob* gen ekspresyonunun artmasına bağlı olarak geliştiğini ortaya koymuşlardır (19). Diğer yandan, obez kişilerde leptin rezistansı olduğu ve bunun plazma leptin düzeylerindeki artış ile açıklanabileceğini bildirmektedir (45). Konukoğlu ve ark. yaptıkları çalışmada, HRT alan obez ve obez olmayan kadınlarda plazma leptin düzeylerini incelemişler. Bu değerleri, menopoza girmemiş (obez ve obez olmayan) olgular ile karşılaştırmışlardır. Post-menopozal kadınlarda (obez ve obez olmayan) HRT öncesinde plazma leptin düzeylerini, menopoza girmemiş (obez ve obez olmayan) göre oldukça

düşük saptamışlar, fakat tedavi sonrasında bu değerlerin, her iki grupta bulunan, menopoza girmemiş kadınlardaki ortalama değerlerden daha fazla arttığını rapor etmişlerdir (25).

Çalışmamızda, *ob* gen ürünü ve protein yapısında olan leptinin, fizyolojik olarak menopoza girmiş obez kadınlarda leptinin ortalama değerlerinin, aynı grupta yer alan fakat obez olmayan kadınların ortalama değerlerine göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak yüksek olduğu saptanmıştır. Veriler sonunda, daha geniş kapsamlı bir çalışmada ERT ve HRT alan ve aynı zamanda obez grubu oluşturan olguların tedaviye başlamadan önceki ve en az 6 aylık bir tedavi sonrasındaki değerlerinin, hiç tedavi almayan FM ve pre-menopozal grupta olup, yine obez olan kişilerin leptin düzeylerinin karşılaştırılması yoluyla konuya daha geniş kapsamlı bir bakış açısı getireceği açıktır.

Çalışmamızda elde edilen sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde:

1. ERT ve HRT tedavilerinin post-menopozal kadınlarda lipid profillerini düzeltmekte etkili olduğu saptanmıştır.
2. ERT ve HRT tedavilerinin anti-oksidatif bir molekül GSH döngüsünde etkili olduğu düşünülmektedir.
3. Olgu gruplarına dahil olan tüm kadınlarda hipertansiyon, diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar olmaması nedeni ile olgu gruplarında vazoaaktif ajanlar olan sVCAM-1 ve sE-selektin'in ortalama değerlerinin birbirinden farklı olmadığı gözlenmiş olup, bu bulgular lipid profillerini desteklemektedir.
4. Her ne kadar ERT ve HRT alan grupta ortalama BMI düzeyleri 25 kg/m² geçmese de, menopoz ile birlikte BMI'in arttığı ve buna bağlı olarak da leptin düzeylerinin yükseldiği gözlenmiştir. Yine, tedavi almayan post-menopozal grup ikiye ayrıldığında obez olmayan grupta leptin düzeylerinin anlamlı olarak düşük olduğu saptanmıştır.

Sonuç olarak, çalışmada ERT ve HRT alan gruplarda tedaviye bağlı olarak parametrelerin ortalama değerleri arasında çok önemli farklılıklar saptanmamış olup, ERT ve HRT'nin etkilerini daha çok GSH metabolizmasında gösterdiği, olguların lipid profillerini iyileştirdiği ve buna bağlı olarak da kardiyovasküler ajanların düşük olarak saptandığı düşünülmektedir.

6. ÖZET

Östradiol (E_2) antioksidatif özelliklere sahip bir moleküldür. Progestinlerin antioksidatif savunmadaki rolleri henüz tam bilinmemektedir. Çalışmamızda E_2 ve E_2 +progestinlerin eritrosit enzim sistemleri, oksidatif kapasite, adhezyon molekülleri olan sVCAM-1 ve sE-selektin ve leptin üzerindeki etkilerini inceledik. Olgu gruplarımız şöyledir: Fizyolojik olarak menopoza girmiş ve hiç tedavi almamış 32 kadın (FM), yine fizyolojik olarak menopoza girmiş ve hormon replasman tedavisi (HRT; E_2 +proegstin) tedavisi alan 54 kadın, cerrahi olarak menopoza girmiş ve östrojen replasman tedavisi (ERT; E_2) alan 26 kadın. Ayrıca ikinci kontrol grubu olarak hemüz menopoza girmemiş sağlıklı 30 kadın (K) olgudan yararlandık. Olgu gruplarında serum E_2 , FSH ve LH düzeyleri ile rutin biyokimyasal parametreler olan AKŞ, BUN, CRE, AST, ALT, CHOL, HDL, LDL düzeyleri saptanmıştır. Her üç post-menopozal grupta ortalama E_2 düzeyleri <50 pg/ml saptanmıştır. Aynı gruplarda, ortalama FSH düzeyleri ise <30 mIU/ml olarak bulunmuştur. Olgu gruplarında kardiyovasküler belirleyiciler olan CHOL, HDL, LDL ve TG düzeyleri arasında önemli farklılıklar saptanmamıştır. Çalışmamızın sonucunda, eritrositlerdeki en önemli anti-oksidatif enzim olan CAT aktivitesinde gruplar arasında bir fark saptanamamıştır. MDA düzeylerinin ise K grubunda post-menopozal gruplar ile kıyaslandığında anlamlı olarak düşük olduğu gözlenmiştir. Yine, en düşük GSH düzeyini K grubunda saptadık ve diğer gruplar arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı idi. GSH metabolizması ile diğer enzimler olan GSH-Px ve GR düzeyleri en düşük

olarak K grubunda saptanmış olup, post-menopozal druplar ile kıyaslandığında fark istatistiksel açıdan anlamlıdır. NO düzeylerinin ise, K grubunda en düşük düzeyde olduğu, diğer gruplarda ise yüksek olduğu bulunmuştur. Ortalama MPO aktivitesi ise her dört grupta yaklaşık aynı değerde saptanmıştır. Gruplarda, kardiyovasküler belirleyiciler olan sVCAM-1 ve sE-selektin düzeyleri arasında fark saptanamamış olup, bu durum olgularımızın hiçbirinin koroner bir yetmezliği olmaması ve lipid profillerinin düzgün olması ile açıklanabilmekte olup, inflamatuvar bir belirteç olan MPO bulguları da bu konuda çalışmamızı desteklemektedir. Obezitenin bir belirleyicisi olan leptin düzeylerinin, aynı zamanda östrojen ve BMI (kg/m²) ile ilişkisini değerlendirdiğimizde, ERT ve HRT grubunda ortalama leptin düzeylerinin FM grubu ile kıyaslandığında daha yüksek olduğu ve östrojenin leptin düzeylerini arttırdığı saptanmıştır. Yine post-menopozal obez grupta (FM) leptin düzeylerinin obez olmayan FM grubu ile kıyaslandığında daha yüksek olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak, çalışmamızda menopozun oksidatif sistemi bozduğu, lipidlerin peroksidasyonuna neden olduğu, GSH metabolizmasını etkili olduğu saptanmış olup, ölçtüğümüz parametreler arasında ERT ve HRT alan gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

7. SUMMARY (İNGİLİZCE ÖZET)

Estradiol (E₂) is a molecule which has antioxidative properties. The role of prOgestins in antioxidant defense is stil unknown. We evaluated the influence of E₂ and E₂ + progestin on erythrocyte antioxidative enzyme system activity and adhesion molecules sVCAM-1, sE-Selectin and leptin. Subjects consisted 32 women with physiological menopause (FM) had no therapy,54 women with natural menopause on hormone replacement therapy (HRT; E₂ plus progestin), 26 women with surgical menopause, before estrogen replacement therapy (ERT;E₂). Thirty healthy women (had no menopause) served as a control group (K). Serum E₂, FSA and LH levels, and also serum glucose, BUN, CRE, AST, ALT, CHOL, HDL, LDL,

and TG levels were evaluated. In each post-menopausal group the mean E₂ level was found as <50 pg/ml. In the same groups, the mean value of FSH was found <30 mIU/ml. The differences between CHOL, HDL, LDL, and TG levels were not found. As a result of our research, we couldn't find any difference between the groups mean CAT activity. MDA concentrations were found significantly lower as compared each of post-menopausal group. GSH concentration was found lower in K group as compared other groups. As the same, GSH-Px and GR enzymes were found lower in K as compared with the other groups. In post-menopausal groups the mean NO levels were found higher as compared with K. There was no difference between MPO levels. sVCAM-1 and sE-selectin levels were evaluated and was found that there was no difference between groups. Also, we evaluated the influence of ERT and HRT, and BMI (kg/m²) on the serum leptin concentration. We found that, leptin concentrations are significantly higher in obese post-menopausal women than in their non-obese counterparts. Also, we showed that serum leptin concentrations were influenced by ERT and HRT concentrations. Taken together, it is obvious that menopause was disturbed oxidative system and lipid peroxidation, and influenced metabolism of GSH. In addition, we couldn't find any differences according to the parameters in ERT and HRT regimen.

8. KAYNAKLAR

- 1.** 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.
- 2.** van Baal WM, 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.
- 3.** Störk S, von Schacky C, Angerer P. The effect of 17 β -estradiol on endothelial and inflammatory markers in postmenopausal women: a randomized, controlled trial. *Atherosclerosis* 2002;165:301-307.
- 4.** Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-126.
- 5.** Hwang SJ, Ballantyne CM, Sharrett AR, Smith LC, Davis CE, Gotto AM, et al. Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the atherosclerosis risk in communities. *Circulation* 1997;96:4219-4225.
- 6.** Sumino H, Ichikawa S, Kasama S, Kumakura H, Takayama Y, Sakamaki T, Kurabayashi M. Effect of transdermal hormone replacement therapy on Carotid Artery Wall thickness and levels of vascular inflammatory markers in postmenopausal women.
- 7.** Bednarek-Tupikowska G, Tworowska U, Jedrychowska I, Radomska B, Tupikowski K, Bidzinska-Speichert B, Milewicz A .Effects of oestradiol and oestroprogestin on erythrocyte antioxidative enzyme system activity in postmenopausal women. *Clin Endocrinol* 2006; 64:463-468.
- 8.** Free Radicals, Oxidative Stres and Antioxidants. Pathological and Physiological Significance. Edited by Tomris Özben NATO ASI Series, Series A:Life Sciences Vol.296 p.31, 1998 Plenium Press, New York.
- 9.** 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.

- 10.** Vennalm A, Bentin G, Edlund A. Metabolism and excretion of nitric oxide in humans. *Circ Res* 1993;106:507-508.
- 11.** 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; 16:1334-1339
- 12.** Rosselini M, Imthurn B, Keller PJ, Jackson EK, Dubey RK. Circulating nitric oxide (Nitrite/Nitrate) levels in postmenopausal women substituted with 17 β -estradiol and norethisterone acetate. *Hypertension* 1995;25:848-853.
- 13.** Hajdi P, Görke K, Hars O, Bauer T, Emons G, Schulz KD. The influence of hormone replacement therapy (HRT) on serum leptin concentration in postmenopausal women. *Maturitas* 2000;37:105-111.
- 14.** Rosenbaum M, Nicolson M, Hirsch J, Heymsfield SB, Gallagher D, Chu F, Leibel RL. Effects of gender, body composition, and menopause on plasma concentrations of leptin. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:9424-9427.
- 15.** Petersen SB, Hanen PS, Luna S, Andersen PH, Odgaard A, Richelson B. Identification of oestrogen receptors and oestrogen receptor mRNA in human adipose tissue. *Eur J Clin Invest* 1996;26:262-269.
- 16.** Kristensen K, Petersen SB, Vestergaard P, Mosekilde, Richelson LB. Hormone replacement therapy affects body composition and leptin differently in obese and non-obese postmenopausal women. *J Endocrinol* 1999;163:55-62.
- 17.** Paolissa G, Rizzo MR, Mone CM. Plasma sex hormones are significantly associated with plasma leptin concentrations in healthy. *Clin Endocrinol* 1998;48:291-297.
- 18.** Considine RV, Sinha MK, Heiman ML. Serum immunoreactive-leptin concentration in normal weight and obese humans. *New Engl J Med* 1996;334:292-295.
- 19.** Nagy TR, Davies SL, Hunter GR, Darnell B, Weinsier RL. Serum leptin concentrations and weight gain in obese postmenopausal women. *Obes Res* 1998;6:257-261.

- 20.** Wade GN, Gray JM. Cytoplasmic 17-beta [3H] estradiol binding in rat adipose tissues. *Endocrinology* 1978;103:1695-1701.
- 21.** Luukkaa V, Pesonen U, Huhtaniemi I, Lehtonen A, Tilvis R, Tuomilehto J, Koulu M, Huupponen R. Inverse correlation between serum testosterone and leptin in men. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:3243-3246.
- 22.** Castracane VD, Kraemer RR, Franker MA, Kraemer GR, Gimpel T. Serum leptin concentration in women: effect of age, obesity, and estrogen administration. *Fertil Steril* 1998;70:472-477.
- 23.** Haffner SM, Mykkanen L, Stern MP. Leptin concentrations in women in the San Antonio heart study: effect of menopausal hormone replacement therapy. *Am J Epidemiol* 1997;146:581-585.
- 24.** Shimizu H, Shimomura Y, Makaniski Y, Futawatari T, Ohtari K, Sato N. Estrogen increases in vivo leptin production in rats and human subjects. *J Endocrinol* 1997;154:285-292.
- 25.** Konukoglu D, Serin Ö, Ercan M. Plasma leptin levels in obese and non-obese postmenopausal women before and after hormone-replacement therapy. *Mturitas* 2000; 36:203-207.
- 26.** Kennedy A, Gettys TN, Watson P, Ganaway E, Pan Q. The metabolic significance of leptin in humans: gender-based differences in relationship to adiposity, insulin sensitivity and energy expenditure. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:3909-3913.
- 27.** Hickey MS, Gardiner SN, Thomson DP, Barakat HA. Gender differences in plasma leptin concentration are not influenced by menopause or hormone replacement therapy. *Med Sci Res* 1998;26:271-273.
- 28.** Ostlund RE Jr, Yang JW, Klein S, Gingerich R. Relation between plasma leptin concentration and body fat, gender, diet, age, and metabolic covariates. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:3909-3913.
- 29.** Havel PJ, Kasin-Karakas S, Dubuc GR, Mueller W, Phinney SD. Gender differences in plasma leptin concentration (lette). *Nature Med* 1996;2:949-950.
- 30.** 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.

- 31.** Tranquilli AL, Mazzanti L, Cugini AM. Transdermal estradiol and medroxyprogesterone acetate in hormone replacement therapy are both antioxidants. *Gynecol Endocrinol* 1995; 9:137-141.
- 32.** 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.
- 33.** Bednarek-Tupikowska G, Bohdanowich-Pawlak A, Bidzinska B, Milewicz A Antonowicz-Juchniewich J, Andrzejak R. Serum lipid peroxides and total antioxidant status in postmenopausal women on hormone replacement therapy. *Gynecol Endocrin* 2004;19:57-61.
- 34.** Radowicki S, Jankowska S, Kunicki M. Influence of hormone replacement therapy (oral and transdermal) on activity of erythrocyte Zn/Cu superoxide dismutase (Zn/Cu-SOD) in postmenopausal women. *Ginekologia Polska* 2003;74:282-287
- 35.** Krtevska M, Dzhekova-Stojkova S, Bosilkova G. Menopause, coronary artery disease and antioxidants. *Clin Chem Lab Med* 2003;39:641-644.
- 36.** 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.
- 37.** Massafra C, de Felice C, Gioia D, Buonocore G. Variations in erythrocyte antioxidant glutathione peroxidase activity during the menstrual cycle. *Clin Endocrin* 1998; 49: 63-67.
- 38.** Anggard E. Nitric oxide: mediator, murderer and medicine. *Lancet* 1994;343:1199-1206.
- 39.** Buhimschi I, Yallampalli C, Dong Y. Involvement of nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in control of human uterine contractility during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1995;172:1577-1584.
- 40.** Ekerhovd E, Brannaström M, Delbro D. Nitric oxide mediated inhibition of contractile activity in the human uterine cervix. *Mol Hum Reprod* 1998;4:915-920.

- 41.** Ekerhovd E, Brannaström M, Weijdegard B. Localization of nitric oxide donors on the human Fallopian tube. *Mol Hum Reprod* 1999; 5:1040-1047.
- 42.** Vega M, Johnson MC, Diaz HA. Regulation of human luteal steroidogenesis *in vitro* by nitric oxide. *Endocrine* 1998;8:185-191.
- 43.** Rosenbaum M, Nicolson M, Hirrsch J, Heymsfield SB, Gallagher D, Chu F, Leibel RL. Effects of gender, body composition, and menopause on plasma concentrations of leptin. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:3424:3427.
- 44.** Vettor R, Depergolo G, Pagano L. Gender differences in serum leptin in obese people: relationship with testosterone, body fat distribution and insulin sensitivity. *Eur J Clin Invest* 1997;1599:102398-102404.
- 45.** Auverix J. Staels B. Leptin. *Lancet* 1999;351:737:742.

