

Postmenopozal Dönemdeki Kadınlarda Serum Nitrik Oksit, Malondialdehit ve Süperoksit Dismutaz Düzeylerinin Araştırılması

THE INVESTIGATION OF SERUM LEVELS OF NITRIC OXIDE, MALONDIALDEHYDE AND SUPEROXIDE DISMUTASE IN POSTMENOPAUSAL WOMEN

Nihayet MEHMET*, Mehmet REFİK**, Ayşe KAFKASLI***

* Öğr.Gör.Dr., İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya AD,

** Yrd.Doç.Dr., İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji AD,

*** Doç.Dr., İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum AD, MALATYA

Özet

Amaç: Postmenopozal dönemdeki kadınlarda yapılan son çalışmalarda, oksidatif reaksiyonların, artmış nitrik oksit düzeylerinin ve lipid peroksidasyonun önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Çalışma postmenopozal dönemdeki kadınlarda serum nitrik oksit, malondialdehit ve süperoksit düzeylerindeki değişiklikleri saptamak amacıyla yapıldı.

Materyel ve Metod: Postmenopozal dönemdeki 55 kadından kan örnekleri alındı, serum nitrik oksit (NO), malondialdehit (MDA) ve süperoksit dismutaz (SOD) düzeyleri ölçüldü ve istatistiksel anlamlılık değerleri hesaplandı. Kontrol grubu tümüyle sağlıklı 35 kadından oluştu.

Bulgular: Postmenopozal dönemdeki kadınlarda serum SOD, NO ve MDA seviyelerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, değerlerde anlamlı bir azalma görüldü (sırasıyla $p<0.005$, $p<0.001$, $p<0.001$).

Sonuç: Postmenopozal dönem ile serum nitrik oksit, malondialdehit ve süperoksit dismutaz, apoprotein A1, apoprotein B1 ve lipoprotein a'nın yakın ilişkisi olduğunu vurgulayan çalışmalar vardır. Bu çalışmada postmenopozal dönemdeki kadınlarda serum SOD, NO ve MDA seviyelerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, değerlerde anlamlı bir artma saptanmıştır. Bu bulgular postmenopozal dönemdeki kadınlarda hücre membranı hasarında, aterosklerozda, kanser ve yaşlanmada etiyolojik bir faktör olarak NO, MDA ve SOD görülebilir.

Anahtar Kelimeler: Postmenopozal dönem, Nitrik oksit, Malondialdehit ve süperoksit dismutaz

T Klin Jinekoloj Obst 2001, 11:274-277

Summary

Objective: Recent studies performed on women in postmenopausal periods demonstrated an increased oxidative reaction and important roles of nitric oxide and lipid peroxidation. This study was conducted to investigate the serum levels of nitric oxide, malondialdehyde and superoxide dismutase in postmenopausal women.

Materials and Methods: This study included 55 postmenopausal women and control group of 35 apparently healthy women. Blood samples were collected and serum levels of nitric oxide, malondialdehyde and superoxide dismutase were measured.

Results: The serum values of superoxide dismutase, nitric oxide and malondialdehyde were significantly increased in postmenopausal women when compared with controls ($P<0.005$, $P<0.001$, $P<0.001$ respectively).

Conclusion: Serum values of superoxide dismutase, nitric oxide and malondialdehyde, apoprotein A1, apoprotein B1 and lipoprotein a had closely related to postmenopausal periods as emphasized in previous studies. The results of our study established increased levels of superoxide dismutase, nitric oxide and malondialdehyde. Furthermore, these results demonstrated that NO, MDA, SOD might be etiological factors seen in cell membrane damage, arteriosclerosis, cancer and ageing in postmenopausal periods.

Key Words: Postmenopausal periods, Nitric oxide, Malondialdehyde, Superoxide dismutase

T Klin J Gynecol Obst 2001, 11:274-277

Menopoz son adet demektir. Ancak hiç bir kadında son adet birden ortaya çıkmaz, son adet habercisi olan bir

Geliş Tarihi: 20.11.2000

Yazışma Adresi: Dr.Nihayet MEHMET
İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya AD, MALATYA

seri adet düzensizliklerini takiben hafiften şiddetli dereceye varabilen nörovegetatif ve psikolojik bozuklukların ortaya çıktığı devreye postmenopozal dönem denmektedir (1-3). Yüksek FSH ve düşük E2 düzeylerinin saptanması ile menopoz tanısı konur (4,5).

Menopozlu kadınlarda damar endoteli oksijen radikallerine ve lipid peroksidlerine karşı çok duyarlıdır

Tablo 1. Postmenopozal dönemdeki hastalar ve kontrol grubunun yaş, serum apolipoprotein A, apolipoprotein B ve lipoprotein a değerleri

	Premenopozal Kontrol grubu (Ortalama ± SD)	Postmenopozal dönemdeki hastalar (Ortalama ± SD)	Hasta anlamlılık değerleri
Yaş Y ıl	30.89 ± 4.72	50.42 ± 3.37	P<0.001
Apolipoprotein A g/L	1.48 ± 0.37	1.23 ± 0.48	P<0.002
Apolipoprotein B g/L	31.09 ± 0.29	1.015 ± 0.25	P<0.011
Lipoprotein a mg/dl	31.894 ± 5.404	9.29 ± 0.49	P<0.016

Tablo 2. Serum direkt nitrit, total nitrit (nitrik oksit), nitrat, MDA ve SOD kontrol grubu ve postmenopozal dönemdeki hasta değerleri

	Premenopozal dönem Kontrol grubu (Ortalama ± SD)	Postmenopozal dönem Çalışma grubu (Ortalama ± SD)	Hasta anlamlılık değerleri
Direk nitrit (mmol/dl)	8.65 ± 1.57	27.81 ± 3.97	P<0.001
Totalnitrit (nitrikoksit (mmol/dl)	54.70 ± 6.66	177.80 ± 48.83	P<0.001
Nitrat (mmol/dl)	46.80 ± 5.76	149.30 ± 44.83	P<0.001
MDA (mmol/L)	1.72 ± 0.28	4.48 ± 0.61	P<0.001
SOD (U/ml)	1.67 ± 0.34	2.55 ± 0.36	P<0.005

(6). Reaktif oksijen radikallerinin, vasküler düz kas hücrelerinin büyüme ve proliferasyonunu stimule ettiği gösterilmiştir (6). Özellikle serbest oksijen radikalleri ve proteolitik en-zimler, hücre membranında zedelenmeye yol açan lipit geçirgenliğini artırarak, başta albumin olmak üzere plazma proteinleri ve lipoproteininin tamamının geçişini sağlarlar. Bu monosit makrofajların damar duvarına geçişini daha da arttırarak aterogenezi hızlandırır (7,8),

Lipoprotein a (Lp a), yapı itibariyle fibrinolitik enzim olan plazminin inaktif prekürsörüne benzer, bu özelliğinden dolayı hem trombojenik hem de aterojenik özelliği olan bir proteindir (9).

Postmenopozal durumda NO'in oksidan moleküllerle etkileşimi tam olarak bilinmemekle birlikte en iyi incelenen etkileşim süperoksit radikali ile olanıdır, bu durumda yine toksik etkisi bulunan peroksinitrit ve nitrik oksit radikali (NO.) üretildiği hücreden dışarı çıkarak direkt hedef hücresi içine girer, hedef molekülle bağlanır ve direkt yada enzim aktivitesini değiştirerek amaçlanan etkiyi oluşturur (10-11). Yapılan çalışmalarda peroksinitrit, aterosklerozis gelişmesindeki başlangıç oksidan molekülleridir. Nitrik oksit radikali (NO.) sentezini sağlayan nitrik oksit sentetaz enzimidir (12,13).

Çalışmamızın temel amacı, postmenopozal dönemdeki kadınların NOx türevlerinin (nitrit + nitrat) aterosklerozda önemli bir faktör olarak incelenmesi, bunların birbirleriyle etkileşimlerini ve postmenopozal ety-

opatogenezinde rollerini araştırmaktır.

Materyel ve Metod

Hasta ve kontrol grubu olarak bu çalışmaya alınan 90 kişi, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Turgut Özal Tıp Merkezi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalına başvuran kişiler arasından seçildi. Hasta grubunu menopoz tanısı almış 55 kadın oluşturdu. Kontrol grubu (premenopozal dönemdeki kadınlar) ise; yapılan klinik ve laboratuvar bakı sonucu herhangi bir hastalık belirtisi taşımayan 35 kadından oluştu. SOD ve NO yüksek lökosit aktivasyonunun bir sonucu olarak fazla üretilirler, bu yüzden postmenopozal kadınların ve kontrol grubunun vajinal sürüntüsünün mikrobiyoloji laboratuvarında ekimi yapıldı, bakteriyel enfeksiyonu olmayan kadınlar seçildi (14).

Rutin biyokimya inceleme sırasında kan örnekleri steril tüplere alındı. İnceleme sırasında alınan kan örnekleri 3000 g' de 15 dakika süreyle santrifüj edilerek serumlarda apolipoprotein A, apolipoprotein B ve lipoprotein a neflometrik olarak (Dade Behring) Behring Nephloimeter analizör 100 cihazlarında çalışıldı. Kalan serumlar 4 ayrı steril tüpe paylaştırıldı, bu tüplerde analiz yapılmaya dek -30 °C' da derin dondurucuda saklanan örneklerde, toplu olarak NO, MDA ve SOD düzeyleri ölçüldü. Nitrik oksit düzeyleri, örneklerde total nitrit olarak ölçülmüştür. Direk nitrit örnekleri Greiss reaktifi ile renklendirildi ve 545 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Total nitrit için, örnekler kadmiyum ile 2 saat süreyle işleme alındı. Örnekteki nitratın (NO3) nitrite (NO2) çevrildikten sonra, Greiss reaktifi ile renklendirildi ve 545 nm'de spektrofotometrik yöntemiyle ölçüldü (15). Nitrat değerleri ise total nitrattan direk nitritin çıkarılması ile

saptandı. Bu tüplerden MDA analizi için saklanacak olana koruyucu olarak EDTA 1.34 mmol/ L ve GSH 0.65 mmol/L eklendi. MDA'nın 96°C'de thiobarbitürik asit ile reaksiyonu sonucu oluşan pembe renkli pigment kompleksi, extinction: 525, emission 547 nm'ye ayarlı bir floresan spektrofotometre ile saptandı. Okunan değer 1,1,3,3 tetraametoksi propan standardı ile hazırlanan konsantrasyon ekstinksiyon grafiğinden okundu (16).

SOD'nin tayini; bu metotta süperoksit dismutaz aktivitesi, ksantin-ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksitin nitroblue tetrazoliumu indirgemesi esasına dayanır. Oluşan süperoksit radikalleri NBT'yi indirgeyerek renkli formazanı oluşturur. Bu kompleks 560 nm'de maksimum absorbans verir. Enzimin olmadığı ortamda SOD olduğunda ise indirgenme olmayıp mavi-mor renk meydana gelmemekte veya enzimin miktar ve aktivitesine bağlı olarak açık renk oluşmaktadır (17).

Gruplar arasındaki farkın analizi için varyans analizinden sonra, ikili karşılaştırma testi olan Tukey HSD testi kullanıldı (18).

Bulgular

Tablo (1)'de çalışma ve kontrol grubu yaş, serum apolipoprotein A, apolipoprotein B ve lipoprotein a düzeyleri gösterildi. Serum apolipoprotein A, apolipoprotein B ve lipoprotein a düzeyleri çalışma grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermiştir.

Tablo (2)'de serum direkt nitrit, total nitrit (nitrik oksit), nitrat, MDA ve SOD seviyeleri ve anlamlılık değerleri görülmektedir. Tablo (2)'de görüldüğü gibi serum direkt nitrit, total nitrit (nitrik oksit), nitrat, MDA ve SOD düzeyleri hasta grubunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermiştir (P<0.01).

Tartışma

Lp (a) ve plazminojen yapısal benzerliklerinden dolayı plazminojen reseptörlerine bağlanmak için yarışır (18-19). Lp (a) fibrinolitik aktiviteyi stimüle etmez, sadece plazminojen reseptörlerini bloke eder (6). Çalışmamızda serum apolipoprotein A, apolipoprotein B ve lipoprotein (a) değerlerinin postmenopozal dönemde anlamlı derecede azaldığı görülmüştür (Tablo 1). Bizim bulduğumuz sonuçlar bir çok çalışmanın sonuçlarıyla uyum göstermektedir (6-8).

Bu çalışmada süperoksit dismutaz, malondialdehit ve nitrik oksit (serum NO₂/NO₃) düzeylerinin postmenopozal dönemdeki kadınlarda anlamlı derecede arttığı görülmüştür, çalışmamız bir grup araştırmacının çalışmalarıyla uyum göstermektedir (7,20,21). Endotel hücreleri tarafından üretilen NO ile süperoksit radikali karşılaştıkları zaman eşlenmemiş elektronları paylaşarak radikal olmayan şekle dönüşürler, sonuçta süperoksit radikali, NO'ın vazodilatatör etkisini antagone eder. SOD ise NO'ın ömrünü uzatır. Damarda fazla miktarda üretilen süperoksidin, hipertansiyonun sebeplerinden biri

olabileceği öne sürülmüştür (7,21). Serbest radikaller tarafından oluşan lipid peroksidasyon hücre harabiyetinin başlama ve ilerlemesinde etkili olduğuna ilişkin bir çok kanıtlar bulunmaktadır (7,22). Literatürlerde bu konuyla ilgili çok az sayıda araştırma bulunmaktadır. Bizim araştırmamızın sonuçlarına benzer şekilde, hem SOD ve hem de serum malondialdehit değerleri kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur. Sonuçlarımıza göre yüksek olan SOD aktivitesi dolaşımında yükselen hidrojen peroksit ve bunun neden olacağı artmış lipid peroksidasyonu ile birliktedir. Muhtemeldir ki, bu peroksitler nedeniyle siklooksijenaz yolu uyarılarak tromboksan A₂ artar, prostoglandinler ise buna eşlik edemez ve sonuçta TXA/PGI₂ arasındaki denge tromboksan lehine bozulur. Tüm damarlardaki vazoplastik aktivite artarak postmenopozal klinik belirtiler ortaya çıkabilir (23,24). NO süperoksit ile etkileşerek güçlü bir oksidan olan peroksinitrit anyonuna dönüşmektedir (25). Nitrik oksit (nitrit + nitrat) olarak bilinmekle birlikte, en iyi incelenen etkileşimi süperoksit radikali ile olanıdır. Bu etkileşim sonunda toksik etkisi bulunan peroksi nitrit üzerine olabilecek faydalı etkisi engellenerek, lokal ve genel kan sirkülasyonu aksamaktadır (26,27). Bizim araştırma sonuçlarımıza göre postmenopozal dönemdeki kadınlarda anlamlı ölçüde nitrik oksit artışı vardır, bu da postmenopozal dönemdeki kadınlarda artmış oksidan yük nedeniyle nitrik oksiti bloke ederek (örneğin süper oksit ile), vazodilatatör etki dahil birçok fizyolojik işlevi gerçekleştirilmemektedir.

Sonuç: NO'ın oksidan moleküllerle etkileşimi tam olarak bilinmemekle birlikte, en iyi incelenen etkileşim süperoksit radikali ile olanıdır. Bu durumda yine toksik etkisi bulunan peroksinitrit ve lipid peroksidasyon son ürünü olan malondialdehit tayini yaparak hücre harabiyeti belirlenebilir, postmenopozal dönemdeki kadınlarda kardiyo-vasküler hastalık insidansı yüksektir, çünkü hipertansiyon ve atherosklerosisle endotel zayıflaması nitrik oksit ürünleriyle ilişkilidir, bunun gelişme riskini belirleyerek antioksidan durum ve lipid peroksidasyonu etkisini ortaya koymak olanaklıdır.

KAYNAKLAR

1. Beckman JS, Anderson PG, Draski DV. Extensive nitration of protein tyrosin in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. *Biol Chem* 1994; 75:81-8.
2. Behathena RK, Anklesaria BS, Ganatra AM, Pinto R. The influence of transdermal oestradiol replacement and medroxyprogesterone acetate on serum lipids and lipoproteins. *Br J Clin Pharmacol* 1998; 45(2):170-2.
3. Hanggi W, Lippuner K, Riesen W, Jaeger P, Birkhauser MH. Long-term influence of different postmenopausal replacement regimens on serum lipids and lipoproteins randomised study. *Br J Obstet Gynaecol* 1997; 104 (6):708-17.
4. Chen FP, Lee N, Soong YK. Changes in the lipoprotein profile in postmenopausal receiving hormone replacement therapy. Effects of synthetic progesterone. *J Reprod Med* 1998; 43(7):568-74.

5. Adami S, Rossini M, Zamberlan N, Bertoldo F, Dorizzi R et al. Long-term effects of transdermal and oral estrogens serum lipids and lipoproteins in postmenopausal women. *Maturitas* 1993; 17(3):191-6.
6. Farish E, Spowart K, Barnes JF, Fletcher CD, Calder A, et al. Effects of postmenopausal hormone replacement the lipoproteins including lipoprotein (a) and LDL subfraction. *Atherosclerosis* 1996; 126(1): 77-84.
7. Inal M, Sunal E, Kanbak G, Zeytinoğlu S. Effects of postmenopausal hormone replacement and tocopherol on the lipid profiles and antioxidant status. *Clin Chim Acta* 1997; 10;268(1-2):21-9.
8. Julius U, Fritsch H, Fritsch W, Rehak E, Fucker K, et al. Impact of hormone replacement therapy on postmenopausal lipoprotein and lipoprotein (a) in normolipidemic postmenopausal women. *Clin Investig* 1994; 72(7): 502-7.
9. Ye Y, Dai S, Zhang S. The effect of estrogen replacement therapy on plas oxide levels in postmenopausal women. *Chung Hua Fu Chan Ko Tsa Chih* 1998; 33(6):340-1.
10. Piccinini F, Rovati L, Zanni A, Cagnacci A, Facchir A. İndirect evidence that estrogen replacement therapy stimulates nitric oxide synthase in postmenopausal women. *Gynecol Endocrinol* 2000; 14(2):142-6.
11. Leal Hernandez M, Abellan AJ, Carbonell MF, Garcia SFA, Martinez SJM. Influence of the presence of hot flashes during men on the metabolism of nitric oxide. Effects of hormone replacement treatment. *Med Clin (barc)* 2000; 22;114(2):41-5.
12. Cincinelli E, Ignarro LJ, Matteo MG, Galantino P, Schonauer N. Effects of estrogen replacement therapy on plasma nitric oxide in postmenopausal women. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 180(2 pt 1):33-4-9.
13. Cincinelli E, Ignarro LJ, Matteo MG, Falco N Cincinelli E, Schonauer LM. Acute effects of transdermal estradiol administration plasma levels of nitric oxide in postmenopausal women. *Fertil Steril* 1997; 67(1):63-6.
14. Baylis C, Suto T, Conrad K. Importance of nitric oxide in control of systemic and renal hemodynamics during normal and pregnancy. *Hypertension Pregnancy* 1996; 15: 147-69.
15. Moshage H, Kok B, Johannes R, Zenga H, Jansen P LM. Nitrite and nitrate determinations in plasma: A critical evaluation. *Clin Chem* 1995; 41:6, 892-6.
16. Sinnuber RO, Yut C, Chang YT. Chareterization of the red pigment formed in the thiobarbituric acid determination of oxidative rancidity. *Food Res* 1958; 23: 626-32.
17. Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34: 497-50.
18. Sümbüloğlu K, Sümbüloğlu V. Biyoistatistik. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fak. Biyoistatistik bilim dalı, 4 basım, Ankara: Özdemir Yayıncılık LTD Şirketi, 1993: 59-67,70-99.
19. Manus J, Eneny J, Thompson W, Young IS. The Effect of hormone replacement therapy on the low density lipoprotein in postmenopausal women. *Atherosclerosis* 1997; 135(1):73-81.
20. Torun M, Yardim S, Gonenc A, Sargin H, Menevse A, et al. Serum beta-carotene, vitamin E, Vitamin C and malondialdehyde levels in several types of cancer. *J Clin Pharm Ther* 1995; 20(5): 259-63.
21. Imthurn B, Rosselli M, Jaeger AW, Keller PJ, Dubey RK. Differential effects of hormon-replacement therapy endogenous nitric oxide (nitrite/nitrate) levels in postmenopausal women substituted with 17 beta -esvalerate and cyproterone acetate or medroxyprogesterone acetate. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(2):388-94.
22. Rosselli M, Imthurn B, Keller PJ, Jackson EK, Dubey RK. Circulating nitric oxide (nitrite/nitrate) levels in postmenopausal women substituted with 17 beta -esvalerate and norethisterone acetate. A tow-year follow-up standarde. *Hypertension* 1995; 25(4 Pt 1):848-53.
23. Marray RK, Mayes PA, Granner DK, Rodwell VW. Harper'in Biyokimyası. Harper's Biochemistry 1990'dan Türkçeye çeviri, Barış Kitapevi 1993; 142.
24. Walsh SW. Lipid peroxidation in pregnancy. *Hypertension in pregnancy* 1994, 13:1-9.
25. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Reviews* 1991; 43(29):109-37.
26. Mullan TA, Caplan MS. Plasma nitrite as indicator of NO production. *AmJ obstet Gynecol* 1996; 175:1013-17.
27. Benjamin N, Vallance P. Plasma nitrite as amarker of nitric oxide production. *The Lancet* 1994; 344: 860-3.