

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI ve DOĞUM ANA BİLİM DALI
BAŞKAN: PROF. DR. ONUR BİLGİN

**CERRAHİ MENOPOZ OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARDA RALOKSİFEN
TEDAVİSİNİN BEYİN DOKUSUNDA OKSİDAN-ANTIOKSİDAN DAĞILIMINA
ETKİLERİNİN SAPTANMASI VE ÖĞRENME ÜZERİNE ETKİLERİ**

UZMANLIK TEZİ
DR. SÜREYYA OSMANOVA

DANIŞMAN
DOÇ. DR. MUSTAFA COŞAN TEREK

İZMİR – 2009

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	3
ÖZET.....	4
GİRİŞ ve AMAÇ.....	5
GENEL BİLGİLER.....	6
YÖNTEM.....	23
BULGULAR.....	26
TARTIŞMA.....	37
SONUÇLAR.....	44
KAYNAKLAR.....	47

ÖNSÖZ

Başta Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim dalı başkanı Prof. Dr. Onur BİLGİN olmak üzere, değerli öğretim üyelerine ve sevgili araştırma görevlisi arkadaşlarıma uzmanlık sürem boyunca bana gösterdikleri yakın ilgiden ve yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım sırasında, yardımlarını esirgemeyen sayın Doç. Dr. M. Coşan TEREK'e; tez çalışmalarımın her aşamasında bana her türlü desteği sunan Ege Üniversitesi Biokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Uzm. Dr. Ebru SEZER ve Ege Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Lütfiye KANIT'a teşekkürü bir borç bilirim.

Bugünlere gelmem de sonsuz emekleri olan sevgili anneme, babama ve aileme desteklerinden dolayı çok teşekkür ederim.

CERRAHİ MENOPOZ OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARDA RALOKSİFEN TEDAVİSİNİN BEYİN DOKUSUNDA OKSİDAN-ANTIOKSİDAN DAĞILIMINA ETKİLERİNİN SAPTANMASI VE ÖĞRENME ÜZERİNE ETKİLERİ

ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı raloksifenin bilişsel süreçler ve öğrenme davranışı üzerine olan etkileri ve beyin dokusunda oksidan-antioksidan dağılımına olan etkilerinin saptanmasıdır.

Yöntem: Cerrahi menopoz oluşturulmuş sıçanlarda çalışma grubuna (n=8) raloksifen ve kontrol grubuna (n=8) plasebo verilerek öğrenme davranışı ses ve elektrik stresi kullanılarak aktif sakınma kafesinde çalışılmıştır. Sıçanlardan alınan beyin dokusu örneklerinde oksidan-antioksidan düzeyleri (katalaz, superoksid dismutaz, malondialdehid) biyokimyasal yöntemle ölçülerek gruplar arasında farklı beyin bölgelerini içeren değerler karşılaştırılmıştır.

Bulgular: Bilişsel işlevleri değerlendirmek amacıyla kullandığımız aktif sakınma kafesi öğrenme düzeneğinde raloksifen enjekte ettiğimiz çalışma grubunda, plasebo alan kontrol grubuna göre daha iyi öğrenme ve daha çok arama davranışı ortaya çıkmışsa da aradaki fark anlamlı bulunmamıştır. Tüm beyin bölgelerinde raloksifen alan grupta antioksidan düzeyleri yüksek bulunmuştur. Malondialdehid düzeyi raloksifen alan grupta anlamlı olarak düşük saptanmıştır.

Sonuç: Raloksifen alan grupta antioksidan düzeylerinin yüksek bulunması beyin için koruyucu etkisi olduğu anlamına gelmektedir. Öğrenme ve bilişsel işlevler üzerine anlamlı etkisi olmadığı gözlenmektedir.

GİRİŞ VE AMAÇ

Postmenopozal dönemde östrojen eksikliğine bağlı birçok sistemi ilgilendiren yakınmalar ortaya çıkmaktadır. Klinik çalışmalarda östrojen replasman tedavisinin postmenopozal kadınlarda bilişsel süreçleri desteklediği gösterilmiştir (1). Bilişsel işlevleri üzerine en fazla etkisi olan hormon östrojendir (2-4). Deney hayvanlarında yapılan davranış çalışmalarında östrojenin bellek üzerine olan yararlı etkileri ortaya konmuş ve nöron çoğalmasında etkili olabileceği ayrıca bilişsel süreçler ve depresif davranış üzerine olan etkileri gösterilmiştir (5-10).

Selektif östrojen reseptör modülatörleri östrojen reseptörleri üzerinden etki etmekte ancak östrojenden farklı olarak etki ettikleri dokuya bağlı olarak östrojen agonisti ya da antagonisti olarak etki göstermektedirler (11). Raloksifen kemikte östrojen agonisti, meme ve uterusu östrojen antagonisti gibi etki göstermektedir ve postmenopozal dönemde osteoporoz profilaksi ve tedavisinde kullanılmaktadır.

Raloksifenin beyinde östrojen agonisti gibi etki gösterdiği düşünülmektedir (12) ve postmenopozal kadınlarda yapılan klinik çalışmalarda bilişsel işlevlere olumlu etkisi olduğu gösterilmiştir (13-14).

Bu çalışmanın amacı, asıl olarak osteoporoz tedavisinde östrojen agonisti olarak kullanılan raloksifenin bilişsel işlevler ve öğrenme üzerine olan etkilerinin ve beyin dokusunda farklı anatomik yerlerde oksidan-antioksidan düzeylerine olan etkilerinin araştırılmasıdır.

GENEL BİLGİLER

RALOKSİFEN VE İLGİLİ ÇALIŞMALAR

Raloksifen, selektif östrojen reseptör modülatörleri ailesine dahil bir tamoksifen analogudur (15). Raloksifen de tamoksifen gibi belirgin doku spesifik etki özelliği taşımaktadır. Lipid metabolizması ve iskelet sistemi üzerinde östrojen benzeri, meme ve endometrium üzerinde ise östrojen karşıtı etkiler göstermektedir (16). Temelde raloksifenin biyolojik etkisi, spesifik östrojen reseptörlerine bağlanması aracılığı ile gerçekleşmektedir. Raloksifen östrojen reseptörlerine, östrodiolden 1.5-2.9 kat daha yüksek afinite ile bağlanmaktadır (17). Bu bağlanma neticesinde, farklı dokulardaki östrojene bağlı genlerde, farklı ekspresyon mekanizmaları harekete geçmektedir. Östrojen reseptörleri gen ekspresyonunu ligand, doku veya gen spesifik olmak üzere yönlendirebilir (18). Günümüzde alfa ve beta olarak adlandırılan iki ayrı östrojen reseptörü olduğu bilinmektedir ve östrojenlerin veya selektif östrojen reseptör modülatörlerinin (SERM) farklı dokularda farklı reseptörleri etkileyerek etki gösterdikleri düşünülmektedir (19). Yine etki mekanizmasında östrojen reseptörlerinden bağımsız faktörlerin de rol oynadığı, örneğin raloksifenin TGF-beta 3 faktörünü kodlayan geni uyardığı ve diğer bazı sitokinlerin de yardımıyla osteoblastik aktiviteyi arttırdığı, osteoklastik aktiviteyi ise inhibe ettiği bilinmektedir.(20). Raloksifen bileşiminde antiöstrojenik etkiden sorumlu esas bölge alkil-amino-etoksi yan zinciridir. Bu zincirde yer alan nitrojen, spesifik olarak östrojen reseptöründeki aspartat ile etkileşime girmekte ve antiöstrojenik etkinin sergilenmesini başlatmaktadır (21).

Oral yol ile verilen raloksifenin yaklaşık %60 kadarı emilmekte, kalan kısmı hızlı bir glukuronidasyona uğramaktadır. Biyoyararlanımı %2 civarında kalmaktadır. Raloksifen ve monoglukuronid metabolitleri proteinlere yüksek oranda bağlanma göstermektedir. İlaç büyük oranda albümine bağlanmakta, seks steroidlerine ise bağlanmamaktadır. Raloksifen büyük oranda bir ilk geçiş metabolizasyonuna tabi

tutulmakta ve çok sayıda glukuronid metabolitleri ortaya çıkmaktadır (22). Bu metabolitlerin sitokin oluşturma veya osteoklastik aktivite üzerinde etkisinin minimal olduğu bilinmektedir. Kemiklerde ve uterusu bu metabolitler oldukça düşük oranda saptanmaktadır. Yarı ömrü ilaç ile metabolitleri arasında dönüşüm ve enterohepatik sirkülasyon nedeniyle 11-27 saat arasında değişmektedir. Raloksifen ve metabolitleri esas olarak feçes ile atılmaktadır (16).

Raloksifenin, insan osteoblastik hücre kültüründe hücre bölünmesinin bir işareti olan kreatinin kinaz aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir (23). Raloksifenin, ooferektomi yapılan ya da GnRH analogu verilen dişi sıçanlarda kemik kaybını engellediği belirlenmiştir (24). Tomografi, histomorfometri ve mekanik kemik gücü testleri ile raloksifenin kemik koruyucu bu etkisinin etinil östrodiol ile benzer güçte olduğu bildirilmektedir (25).

Raloksifenin kolesterolden zengin diyetle beslenen ooferektomize sıçanlarda aortik kolesterol depolanmasını engellediği fakat bu etkinin 17-beta östrodiol kadar güçlü olmadığı bildirilmektedir (26). Buna karşın raloksifenin kolesterol düzeylerini azaltıcı etkisinin etinil östrodiol'den daha güçlü olduğu gösterilmiştir (27).

Raloksifenin in vitro ortamda, insan meme kanseri hücrelerinde östrojen uyarımı ile oluşturulan proliferasyonu, tamoksifene oranla daha güçlü bir şekilde inhibe ettiği bildirilmektedir (28, 29). Aynı şekilde raloksifen in vitro sıçanlarda kimyasal uyarı ile meme kanseri indüksiyonunu da engellemektedir (30).

Ooferektomize sıçanlarda 6 aylık raloksifen uygulamasının uterin ağırlığı etkilemediği, buna karşın etinil östrodiol'ün uterin ağırlığı dört kat arttırdığı gösterilmiştir (31). Raloksifenin, ooferektomize sıçanlarda östrojen ile oluşturulan uterotropik etkiyi antagonize ettiği, hatta tamoksifen ile oluşturulan uyarıcı etkiyi de bloke ettiği bildirilmektedir (30, 32).

Raloksifen esas olarak iskelet sistemindeki etkilerinden dolayı klinikte kullanılmaktadır ve osteroporoz profilaksisinde yer bulmuştur (33,34). Lipidler üzerine olan etkileri ile ilgili çalışmalar vardır; ancak net bir metabolik etkisi gösterilememiştir (35, 36).

Raloksifenin meme dokusu üzerine etkileri konusunda da çalışmalar yapılmıştır. 7704 sağlıklı postmenopozal kadında yapılan randomize, çift kör, plasebo kontrollü bir çalışmada, 60-120 mg/gün raloksifen kullanan grupta ortalama 28.9 aylık takip sonucunda, meme kanseri insidansında plasebo grubuna oranla belirgin derecede azalma saptanmış, raloksifen grubunda meme kanseri rölatif riski 0.26 olarak belirlenmiştir (37). Jordan ve arkadaşlarının (38), 13500 sağlıklı postmenopozal kadın ile gerçekleştirdikleri randomize, çift kör, plasebo kontrollü çok merkezli bir çalışmada da meme kanseri insidansının plasebo grubuna göre belirgin azalma gösterdiği saptanmış ve raloksifen grubunda rölatif risk 0.42 olarak hesaplanmıştır. Aynı çalışmada raloksifenin özellikle östrojen ve progesteron reseptörü pozitif olan kanserlerin insidansını azalttığı, reseptör negatif tümörlerin insidansını belirgin oranda değiştirmede gösterilmiştir.

Draper ve arkadaşlarının (35) çalışmasında, raloksifen ve HRT gruplarında 8 hafta sonunda yapılan endometrial biopsi incelemelerinde, raloksifen grubunda değişiklik saptanmazken, HRT grubunda belirgin endometrial proliferasyon bulguları saptanmıştır. Delmas ve arkadaşlarının (33) yaptıkları çalışmada, 24 ay süre ile raloksifen kullanan hastaların endometrial örneklemelerinde, proliferatif özellikler tesbit edilmemiştir. Her iki grup arasında ateş basması veya vajinal kanama yönünden fark saptanmamıştır. Huster ve arkadaşlarının çalışmasında (39), 969 postmenopozal kadın 6 ay aralıklarla yapılan transvajinal ultrasonografi ile değerlendirilmiş ve 30-150 mg/gün raloksifen kullanan grupla, plasebo grubu arasında endometrial kalınlık açısından fark bulunmamıştır. Daha öncekilerden farklı bir çalışma olarak Baker ve arkadaşları (40), raloksifenin premenopozal dönemdeki etkilerini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda, normal

menstrüel sıklara sahip sağlıklı postmenopozal kadınlarda, 100-200 mg/gün raloksifen kullanımının ovülasyonu engellemediği, siklus süresini değiştirmedeği ve normal siklus süresince ortaya çıkan yüksek östrojen varlığında endometrium üzerinde antiöstrojenik etkiler sergilemediği gösterilmiştir.

Preklinik çalışmalarda raloksifenin, santral sinir sisteminde östrojen agonisti gibi davrandığı (12), postmenopozal osteoporotik kadınlar üzerinde yapılan klinik çalışmalarda ise duygudurum ya da bilişsel işlevler üzerine olumsuz etkilerinin bulunmadığı gösterilmiştir (13). Sağlıklı postmenopozal kadınlar üzerinde yapılan başka bir araştırmada, raloksifenin anksiyete-korku skorlarını 12 aylık sürede düşürdüğü ortaya konmuştur (41). Bu verilerden yola çıkarak, raloksifenin postmenopozal kadınlardaki duygudurum üzerine olumlu etkileri olabileceği düşünülebilir. Yapılan başka bir klinik çalışmada, 7478 postmenopozal dönemdeki osteoporotik kadın, üç yıl boyunca raloksifen ve plasebo ile tedavi edilmiş ve raloksifen grubunda kognitif skorlar değişmemiştir (42).

BİLİŞSEL İŞLEVLER VE ÖĞRENME DAVRANIŞI

Pratik tecrübe yada gözlem sonucu bir cevabın az ya da çok kalıcı olabilen şekilde değiştirilmesine öğrenme adı verilir. Öğrenme deneylerinin temel amaçları öğrenme ve hafızanın altında yatan mekanizmaları ortaya çıkarmaktır. Bu amaç, farklı öğrenme düzeneklerinde çeşitli madde ve ilaçların etkisini göstermekten, öğrenmenin altında yatan hücrenel hatta moleküler mekanizmaların ortaya çıkarılmasına kadar geniş bir yelpazeyi kapsar.

Öğrenme modelleri, davranışsal sinir bilimin temel çalışma alt alanlarından biridir. Davranışsal sinir bilimcilerin paylaştıkları ortak amaç insan ya da hayvandaki bir davranışı gözlemleyip bunu ölçülebilir hale getirmek ve bununla ilgili beyindeki özel işlemeyle ilişkilendirmektir. Bunu başarabilmek için merkez sinir sisteminin ilaçlar, elektriksel stimölasyonlar, lezyonlama teknikleri ile manipule edilmesi gereklidir.

Bazı durumlarda travma hastalık ya da başka nedenlerle ortaya çıkan anormal davranışlarda araştırılabilir. Davranışsal sinirbilimde değişmez katı kurallar yoktur. O deneye özgü çok sayıda değişik problemler ortaya çıkabilir ve herbirinin çözümü yine kendine özgüdür.

Genel prensipler :

- Denek seçimi
- En uygun davranışsal yöntemin seçilmesi
- Deneysel parametrelerin saptanması (grup büyüklüğü, doz aralığı ve lezyon alanı gibi)
- Uygun istatistik yönteminin saptanması
- Deneyin uygun yapılması
- Kısmi nörokimyasal/histokimyasal veri elde edilmesi için ayarlamalar yapılması
- Verini sunulması

Öğrenme deneyim sonucu bilgi edinmek ve bu bilgiyi depolayabilmek anlamında kullanılmaktadır. Hayvanlarda genelde, bir uyarana verilen yanıtın görülme olasılığındaki artış olarak gözlemlenir. Ödüller veya cezalar, çevreyle temas ve çevre manipülasyonu öğrenmede önemli rol oynar. Bellek ise öğrenilen bilginin kalıcı biçimde depolanması ve gerektiğinde bulunup çıkartılmasıdır

Öğrenme deneylerinin temel tipleri:

Tip I: Klasik şartlanma (Pavlov)

Tip II: Instrumental şartlanma

- a) Kaçma ve sakınma
- b) Operant şartlanma
- c) Ayırdetme
- d) Problem çözme

Hayvanlarda genellikle orta uzun süreli bellek (genelde prosedürel bellek) ve işetim belliği araştırılmaktadır. Dekleratif belleğin hayvanlarda çalışılması mümkün olmadığından nondekleratif belleğin özellikle prosedürel bellek araştırılmaktadır. Bellek çalışmaları genel olarak öğrenme denemelerinin sonunda bir yada bir kaç gün olarak uygulanmaktadır.

Tip I: Klasik Şartlanma

Asosiyatif öğrenme için klasik örnek sayılır. Daha önce çok küçük bir yanıt oluşturan veya hiç bir yanıt oluşturmayan bir uyarının ikinci bir uyararla eşleştirilmesi sonucunda yanıt oluşturmaktadır. Klasik şartlanma ilk olarak Pavlov tarafından gösterilmiştir. Pavlov'un klasik deneylerinde zil sesi başta salya salgısı oluşturmadığı halde yemek ile eşleştirildiğinde salya salgısı oluşturmaya başlar. Köpeğin ağzına yemek konmadan önce zil çalınır. Bir süre sonra yemek konmadan zil sesini duyan köpekte salya salgısı oluşur.

Bu deneyde:

- yemek şartsız uyarı
- zil şartlı uyarı

Tip II: Instrumental şartlanma

- Kaçma ve sakınma

Kaçma ve sakınma deneyleri bir cezadan kaçınması ya da yapması beklenen bir davranışı yapmaması şeklinde dizayn edilmişlerdir. Bu yüzden aktif ve pasif olarak ikiye ayrılırlar. Hayvan cezadan kurtulmak için bir iş yapıyorsa o zaman aktif, yapması beklenen bir davranışı uygulamıyorsa buna da pasif sakınma adı verilir.

Aktif sakınmaya bir örnek verirsek altı elektrik vermeye göre düzenlenmiş bir deney ortamında hayvanın elektrik almaktan kaçacağı başka bir ortam ya da bölüm vardır. Genel olarak bu kutunun tavanından sarkan bir tahta çubuktur. Zeminden elektrik verildiğinde elektrik almaktan hayvanın kurtulabileceği tek yer bu tahta çubuktur. Elektrik şoku nötral bir uyararla (ses ya da ışık) eşleştirilir. Hayvandan beklenen yanıt sesi duyunca ya da ışığı görünce elektrik şokunu almadan çubuğa tırmanmasıdır.

Pasif sakınmada ise ödüle ulaşmamak ya da cezadan kaçmak şeklinde düzenlenmiş deney protokolleri vardır. Örneğin biri karanlık diğeri aydınlık iki bölümlü bir deney düzeneği bulursa içine sıçan konduğunda karanlığa gitmeyi tercih edecektir. Karanlık kısma geçince şok verilirse karanlık kısma geçme süresi kısalır. Başka bir örneğe aç bırakılan bir sıçanın yemek kafesine uzanmamayı öğrenmesidir. Burada hayvan yemek kafesine uzandığı zaman elektrik şoku alır, bu yüzden aç olsa bile yemeğe uzanmamayı öğrenir.(43)

Seks steroidleri kadın nörobiyolojisinde çok önemli rol oynamaktadırlar. Postmenopozal dönemde gonadal hormonların azalmasının duygudurum değişikliklerine ve bilişsel işlev bozukluklarına neden olduğu düşünülmektedir. Bu durum kadın hayatı için oldukça önemlidir. Klinik çalışmalar göstermiştir ki, östrojen sadece santral sinir sisteminde vazomotor semptomların rezolüsyonuna neden olmakla kalmamakta, aynı zamanda depresyon, davranış değişiklikleri ve kognitif disfonksiyon gibi çeşitli psikososyal bozukluklar üzerine de etki etmektedir (44,45). Beyin dokusunda seks

steroidlerinin diğer hedef dokularda olduğu gibi hem genomik hem de non-genomik etkileri mevcuttur. Genomik etkiler, spesifik intraselüler reseptörlere bağlanarak nöronal gen transkripsiyonunu ve protein sentezinden ibarettir. Gonadal hormonlar birçok nöropeptidin ve nöroaktif transmitterin sentezinden ve metabolizmasından sorumludur (46, 47). Duygudurum değişiklikleri, anksiyete, depresyon, uykusuzluk, başağrılar ve kognitif fonksiyonlardaki değişiklikler, limbik sistemdeki postmenopozal değişikliklerle ilişkilidir. Postmenopozal kadınlarda santral serotoninerjik ve noradrenerjik aktivitelere değişiklikler duygudurum bozukluklarını açıklayabilir (44).

Menopozal opioidderjik peptidlerin sentez ve sekresyonundaki regülyasyon da, bu dönemdeki kadınların davranış ve duygudurum modifikasyonlarında role sahip olabilir (48, 49). Hormon replasman tedavisi, birçok hastada, bu nörotransmitterlerin seviyelerini restore ederek, duygudurum, psikolojik ve bilişsel bozukluklar üzerine iyileştirici etkiye sahip olabilir (50).

Klimakterik dönemdeki kadınların önemli bir kısmında bilişsel etkinliklerde azalma ortaya çıkmaktadır (51). Bu kadınlarda östrojen uygulamalarının, hafıza ve reaksiyon zamanı gibi bilişsel işlevlerde iyileşmeler ortaya konmuştur (52, 53). Özellikle östrojen kullananlarda kullanmayanlara göre spasyal ve sözel hafızada daha iyi sonuçlar ortaya çıkarılmıştır (54). Postmenopozal kadınlarda, östrojen tedavisinin kognitif işlevlerin sürdürülmesinde önemli rolü olabilir (55, 56). Bilişsel işlevlerin sürdürülmesinde çok sayıda nörohormonal uyarı ve yolak rol almaktadır. Östrojen hormonunun bilişsel işlevlere etkisi konusunda yapılan çalışmaların % 71'i, en az bir veya daha fazla nöropsikolojik testin anlamlı olarak östrojen kullananlarda daha iyi sonuçlar verdiği gösterilmiştir (57).

Östrojen, beyinin değişik bölgelerinde birkısm nörotransmitterlerin lokal konsantrasyonlarını değiştirerek etki göstermektedir. Östrojen, hem hipotalamik hem de ekstrapotalamik bölgelerdeki noradrenerjik ve dopaminerjik sistemleri düzenleyerek,

insanlarda ve hayvanlarda davranış biçimlerini kontrol etmektedir. Dişi sıçanlarda yapılan çalışmalarda, östrojen seviyelerinin yükselmesi, norepinefrin ve dopamin turn-over hızlarında artışa neden olmaktadır. Dişi sıçanlara ovariektomi uygulandığında noradrenalin düzeylerinde yükselme, dopamin seviyelerinde ise düşüş izlenmiştir (58). Bu hayvanlara ekzojen östrojen verildiğinde noradrenalin düzeyleri azalmış dopamin seviyeleri ise yükselmiştir. Östrojen aynı zamanda, seratonin ve onun metaboliti olan 5-HIAA düzeylerini de artırarak seratoninerjik agonist olarak davranmaktadır.

ANTIOKSİDAN-OKSİDAN SİSTEMİ

Biyolojik yapılar, özellikle membranlar, yüksek oranda doymamış yağ asidi içermektedir. Doymamış yağ asitleri bir radikal başlatıcının ya da serbest oksijenin varlığında oksidasyona uğramaktadır. Lipid peroksidasyonu, serbest radikaller tarafından başlatılan ve zar yapısındaki çok doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu içeren kimyasal bir olay olarak tanımlanmaktadır. Lipid peroksidasyonundaki asıl etkili radikalın hidroksil radikali (OH) olduğu kabul edilmektedir. Bu radikal superoksit radikalinden veya H_2O_2 'ten demirin katalitik etkisi altında oluşmaktadır.

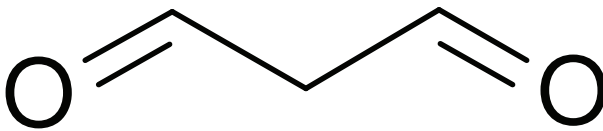
Serbest radikal etkisi ile yağ asidi zincirinden hidrojen atomunun uzaklaşması, bu yağ asit zincirinin radikal niteliği kazanmasına neden olmaktadır. Daha sonra lipid radikalının moleküler oksijen ile tepkimeye girmesi ile lipid peroksit radikali meydana gelmektedir. Bu lipid peroksit radikali de zar yapısındaki çok doymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumunu sağlamakta, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid hiperoksitlerine dönüşmektedir. Lipid peroksidasyonu lipid hidriperositlerinin aldehid ve diğer karbonil bileşkelere dönüşmesi ile sona ermektedir. Lipid peroksidasyonun son aşamasında oluşan bileşkelere biri malondialdehid'dir. Malondialdehid peroksidasyona uğramış olan poliansature yağ asitlerinden oluşan 3 karbonlu bir bileşiktir. Malondialdehid miktarı tiyobarbiturik asit

testti (TBA) ile ölçülmekte ve bu yöntem lipid peroksid düzeylerinin saptanmasında kullanılmaktadır.

Malondialdehid ve Konjuge Dienler

Peroksidasyona uğramış olan poliansatüre yağ asidlerinden oluşan reaktif bileşiklerden biri olan üç karbonlu malondialdehid (MDA) bir ketoaldehiddir. Araşidonik asidden, birçok lipoksidden, hidroperoksidlerden, endoperoksidlerden, prostaglandinlerden ve tromboksanlardan oluşabilen MDA'nın ana kaynağı doymamış yağ asidlerinin peroksidasyonudur (59).

Birçok makromolekül ile hızlı bir şekilde tepkimeye giren ve çok reaktif bir bileşik olan MDA, serbest olarak ya da farklı doku bileşenleri ile kompleks oluşturmaktadır. Doku lipid peroksidasyonu sonucu oluşan MDA hücresel düzeyde metabolize edilir. Karaciğer aldehid dehidrogenazı tarafından enzimatik yıkılıma uğrayan MDA, CO₂'e metabolize olmakta ya da mitokondriyal yolda yıkılabilmektedir. İdrarda asid ile hidrolize edilebilen formda küçük miktarlarda ekskrete edilir. Eritrosit membranının aminofosfolipid organizasyonunu bozan MDA, hücre hasarında ve yaşlanma pigmenti olan lipofusinlerin oluşumunda etkili olduğu gösterilmiştir. MDA'nın mutajenik olduğu ve kimyasal karsinojen gibi davrandığı da bilinmektedir (59, 60).

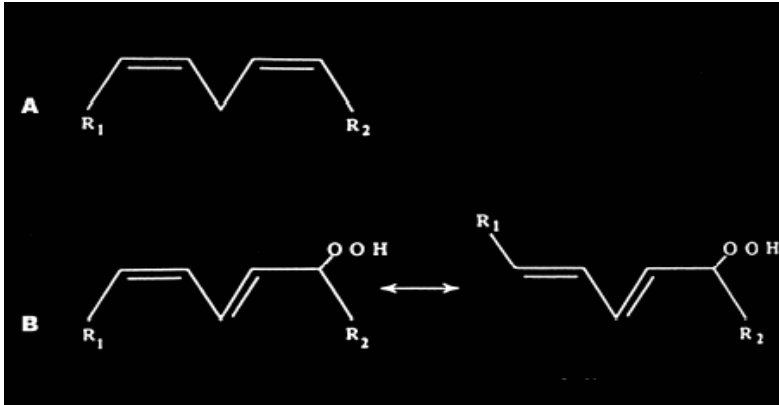


Şekil 1. Malondialdehid kimyasal görünümü

Biyolojik örneklerde lipid peroksidasyonunun ve serbest radikal aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan en kolay ve yaygın yöntem, MDA'nın tiobarbitürik asid (TBA) ile tepkimesidir (61). Lipid peroksidasyonunun belirlenmesi için kullanılan ve

spesifik olmayan bir yöntem olmasına rağmen TBA tepkimesi, MDA üretiminin iyi bir göstergedir. Bu tepkime MDA ile TBA arasındaki etkileşime dayanır. Asidik koşullarda TBA ile birlikte ısıtılan örnek sonuçta 532 nm dalga boyunda absorban veren pembe bir ürün oluşturur. TBA tepkimesinin spesifitesi yöntemin hassasiyeti kadar yüksek değildir. Bunun nedeni TBA'nın MDA dışında albumin, periodat ile okside olan glikoproteinler, pirimidinler gibi bazı bileşiklerle de renkli ürünler oluşturabilmesidir. Ayrıca TBA testinin kaynatma aşamasında daha önce oluşmuş olan lipid hidroperoksidlerinin yıkılması sonucunda artefakt bir MDA üretimi olmaktadır. Okside lipidlerde bulunan 2,4-alkadienler ve 2-alkenaller de TBA ile pozitif sonuç vermektedir. HPLC, serbest MDA ölçümünde en güvenilir yöntemdir.

Karbon merkezli lipid radikaller kendilerini stabilize eden bir düzenlemeye uğradıktan sonra konjuge dien olarak adlandırılırlar ve bu ürünler 234 nm dalga boyunda karakteristik bir absorpsiyon bandı oluştururlar. Deney hayvanlarından elde edilen dokularda ve saflaştırılmış lipid sistemlerde bu absorbanın tayini önemli bir indeks olarak kullanılmaktadır.



Şekil 2. Konjuge dien yapısı. A. Poliansatüre yağ asidi B. Yağ asidi hidroperoksidi ve konjuge dien

Antioksidan sistemler

Hücrelerde oksidatif hasarı önleyen, ortadan kaldıran veya kısmen azaltan bazı mekanizmalar bulunmaktadır. Doğrudan etki ile oksidanları inaktif hale getiren ve bu etkilerinde dört farklı mekanizma kullanan maddelere “antioksidanlar” adı verilmektedir.

Bu mekanizmalar;

1. **Çöpçü etkisi:** Oksidanları tutma ve zayıf bir moleküle dönüştürme şeklinde bir etki olup enzimler bu mekanizma ile hareket etmektedirler.
2. **Bastırıcı etkisi:** Bir hidrojen aktararak oksidanları etkisiz hale getirme etkisidir. Vitaminler ve flavanoidler bu şekilde etki eder.
3. **Onarma etkisi**
4. **Zincir koparma etkisi:** Oksidanları bağlayarak işlevlerinin önlenmesidir. Ağır mineraller hemoglobin, seruplazmin ile doğrudan oksidanları bağlayarak etkisiz hale getirmek etkisidir. Okside edilebilen substrata göre daha düşük düzeylerde bulunan ve substratın oksidasyonunu geciktiren veya inhibe eden maddelerdir (62, 63).

Doğal antioksidanlar ve antioksidan özelliğe sahip ilaçlara ek olarak günümüzde lipid düşürücü ilaçlar arasında olan probukol ve statinler ile kalsiyum antogonistleri, antioksidan etki açısından yoğun olarak araştırılmaktadır (62, 64).

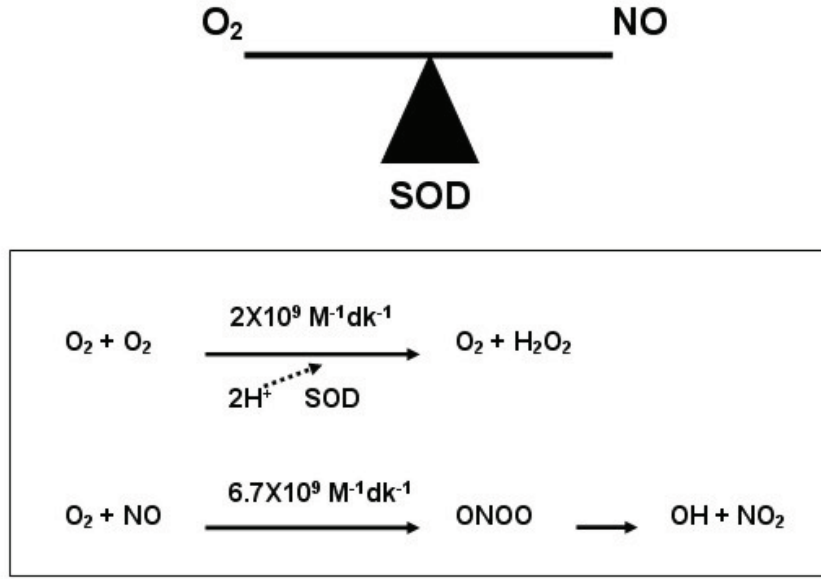
Tablo 1’de doğal antioksidan moleküller gösterilmiştir.

Tablo 1. Doğal antioksidan moleküller

Enzim	Enzim dışı
<i>Süperoksit dismutaz:</i> $O_2^{\bullet-}$ 'nin H_2O_2 'ye dismütasyonunu katalizler	<i>Seruloplazmin:</i> Demiri yükseltir.
<i>Katalaz:</i> H_2O_2 'nin dismütasyonunu katalizler.	<i>Transferrin:</i> Demiri bağlamaktadır.
<i>Glutasyon peroksidaz:</i> H_2O_2 'nin ve lipid peroksidlerinin indirgenmesini katalizlemektedir.	<i>Hemoglobin:</i> Oksidanları bağlar.
<i>Glutasyon redüktaz:</i> Okside glutasyonu redükte glutatyona dönüştürerek dolaylı antioksidan etki gösterir	<i>E vitamini ve analogları:</i> Lipid peroksyon tepkimelerini engeller. <i>C vitamini:</i> Doğrudan $O_2^{\bullet-}$ ve OH^{\bullet} tutar, E vitaminini rejenere eder.
<i>Hidroperoksidaz</i>	<i>A vitamini:</i> Direkt olarak peroksillere etki eder.
<i>Sitokrom C oksidaz</i>	<i>Ürik asit:</i> Süperoksit, hidroksil ve peroksil tutucusudur.

Süperoksit Dismutaz

Süperoksidin protonlanmış formu olan HO_2 ile doğrudan oksitleme, bakır (Cu^{+2}) ile demir (Fe^{+2}) gibi metallerle veya seruloplazminle katalizlenen tepkimeler ve NO^{\bullet} ile $O_2^{\bullet-}$ arasındaki tepkimelerde oluşan reaktif peroksinitritler aracılığıyla LDL değişikliğe uğramaktadır. Damar duvarındaki $O_2^{\bullet-}$ kaynakları arasında endotel hücreleri, düz kas hücreleri, makrofajlar ve adventisyal fibroblastlar yer almaktadır. (65).



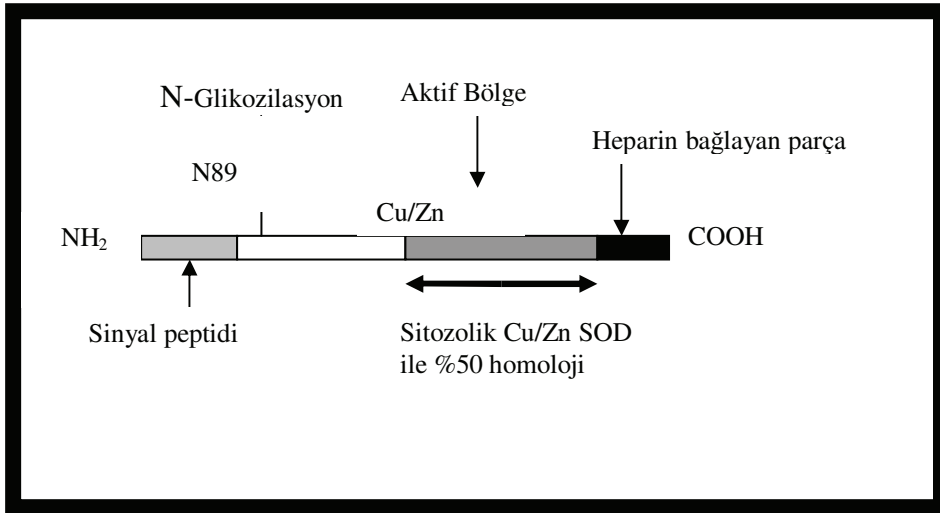
Şekil 3. NO^\bullet ile $O_2^{\bullet-}$ arasındaki denge ve bu dengede süperoksid dismutazın rolü

Süperoksid anyon radikallerine karşı ana savunma aracı olan süperoksid dismutaz (SOD), süperoksidin hidrojen perokside dismutasyonunu katalizleyen bir metalloenzimdir. Genetik olarak 21. kromozomda lokalizedir (66).

SOD tarafından katalizlenen tepkimenin hız sabiti $2 \times 10^9/ms$ 'dir. Hücre içi SOD aktivitesindeki artış dioksijenin toksisitesine karşı gelişen bir direnç artışına neden olur (62,63)

Memeli dokularının oksijeni metabolize eden tüm hücrelerinde süperoksid dismutaz [Cu/Zn SOD (SOD 1)], [Mn SOD (SOD 2)] ve [ekstrasellüler SOD (ecSOD veya SOD 3)] olmak üzere üç farklı formda bulunur (67). Doku yerleşimleri farklılık gösteren bu izoformlardan Cu/Zn SOD sitozolde, MnSOD mitokondride ve adından da anlaşılacağı gibi ecSOD hücre dışında bulunmaktadır. Cu/Zn SOD ve MnSOD, total SOD aktivitesinin çoğunluğunu oluştururlar, ancak ecSOD aktivitesi damar duvarında diğer dokulara göre 100 kat fazla bulunmaktadır (68).

Molekül kütlesi 31.2 kDa olan Cu/Zn SOD, yapısındaki her bir dimerik protein için birer molekül bakır ve çinko içerir. Çinko stabiliteyi sağlamakta, bakır ise aktiviteden sorumludur. Yapıdan çinkonun ayrılması geri dönüşümsüz, bakırın ayrılması ise geri dönüşümlüdür. Bu izoform karaciğer, beyin, testiste en yüksek, akciğer ile pankreasta ise en düşük konsantrasyonlarda bulunur. MnSOD kalp, karaciğer ve böbrekte yüksek konsantrasyonlardadır. Bu iki izoform arasındaki bir diğer önemli fark, Cu-Zn SOD izoformunun siyanürle inhibe olması, Mn SOD izoformunun ise inhibe olmamasıdır. (69)



Şekil 4. ecSOD'un yapısı

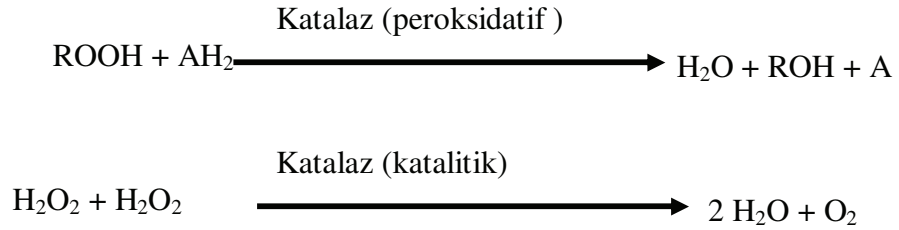
Sekretuar bir Cu/Zn içeren süperoksit dismutaz olan ve pek çok hücre yüzeyinde bulunan ecSOD başlıca sağlıklı damar düz kas hücrelerinde üretilmektedir. Endotel hücrelerinin ecSOD üretmediği gösterilmiştir (67,68). Bu güçlü antioksidan enzim endotel hücreleri yüzeyindeki heparan sülfatlara bağlanarak endotel hücrelerine alınabilmektedir. Damar düz kas hücrelerinde üretilen bu enzim, komşu endotel hücrelerine geçmektedir. EcSOD disülfid bağıyla bağlanmış iki dimerden oluşan bir tetramer yapısındadır. Her alt ünite 34 kDa ağırlığındadır.

Dört bölgeden oluşan ecSOD proteininin birincisi hücreden sekrete edilmesini sağlayan amino ucu sinyal peptididir. Sitozolik Cu/Zn Superoksid dismutaz ile farklılık gösteren ikinci bölgenin Asn-89 amino asidi, N-bağlı glikozilasyon bölgesidir ve bu proteinin çözünürlüğünü büyük ölçüde artırır. Üçüncü bölge çinko ve bakırı bağlayan aktif gövdedir (amino asid 96-193) ve Cu/Zn SOD ile %50 homoloji gösterir. Dördüncü bölge heparin bağlama bölgesini de içeren karboksil terminal bölgesidir. Pozitif yüklü kalıntılar içeren bu bölge, heparan sülfat glikozaminoglikanlarına bağlanmayı sağlamaktadır (67,70-72).

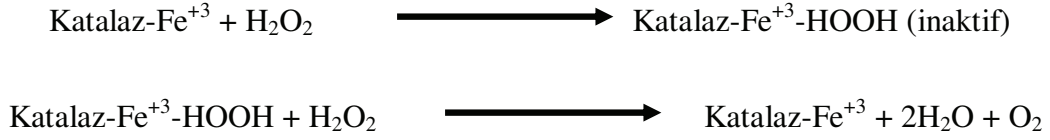
Eritrositlerde SOD tayini için kolorimetrik, immünolojik ve palografik yöntemler vardır. İmmünolojik yöntemler daha hassas olmalarına karşın uygulama güçlüğü ve pahalılığı nedeniyle rutin kullanımlar için uygun değildir. Epinefrinin otooksidasyonu ve nitroblutetrazoliumun (NBT) indirgenmesi temeline dayanan kolorimetrik yöntem sıklıkla kullanılmaktadır. (73).

Katalaz

Sığır karaciğerinde yapılan çalışmalar sonucunda katalazın yapısal olarak 248 kDa molekül kütlesinde olduğu ve kovalent olmayan bağla bağlı protoporfirin IX Fe (hem) grubu içeren bir hemoprotein olduğu gösterilmiştir. Mukoz, kemik iliği, enzim, membran, böbrek, kan, karaciğerde ve eritrosit dışında özellikle peroksizomlarda yüksek miktarda bulunur. Katalaz hidrojen peroksidi, yüksek hızlı tepkimlerde katalitik tepkime ile düşük hızlı veya yüksek elektron alıcısı konsantrasyonlarının bulunduğu ortamlarda peroksidatif tepkime ile suya çevirerek ortamdan uzaklaştırmaktadır



Katalazın aktif kısmı olan Fe^{+3} -protoporfirinin iki fonksiyonel döngüsü bulunur



Ortamdaki çok az H_2O_2 konsantrasyonunda aktif olmayan enzim, elektron alıcısı ile tepkimeye girmektedir:



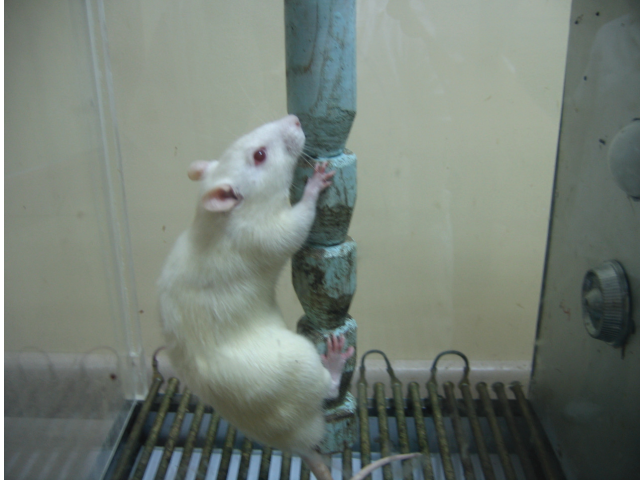
Oksidanların GSH-Px aktivitesini bastırarak düzeye ulaştığında mitokondrial katalaz, membran hasarına neden olan hidrojen peroksidin etkisini önler. Son çalışmalarda sıçan kalp mitokondrisinde lipid peroksidasyonuna karşı katalazın koruyucu rol oynadığı saptanmıştır. (69)

YÖNTEM

Deney Hayvanları. Deneyleerde, erişkin (3-4 aylık) dişi Sprague Dawley 24 adet sıçan kullanıldı. Sekiz sıçan naif olarak deneye katıldı. Hayvanlar, Ege Üniversitesi deney hayvanları merkezinden alındıktan sonra, her bir kafeste 4 hayvan bulunacak şekilde yerleştirilip 20-22°C sabit oda sıcaklığında ve 12 saat karanlık/aydınlık siklusunda tutulup sınırsız su ve yiyeceklerle beslenerek birkaç gün laboratuara alışmaları sağlandı. Bilateral ovariektomi için sıçanlara pentotal ile intraperitoneal 30 mg/kg dozunda anestezi uygulandı. Lateral girişimle bilateral ooferektomi yapıldı. Bunun için her iki lateral batın duvarında ayrı insizyonlarla karın tabakaları geçilerek batına ulaşıldı. Overler, karın içi diğer organlardan ayırılarak penslerle tutularak kesilip bağlanıp çıkarıldılar. Daha sonra tabakalar 2/0 krome katgüt sütürlerle kapatıldı. Hayvanlara postoperatif bakım için 10 cc serum fizyolojik enjeksiyonu yapıldı. Cerrahi menopoz oluşması için girişim sonrası 21 gün beklendi. Hayvanlar davranış çalışmalarından önce 3 gün süre ile insan eliyle manipülasyona alıştırdılar.

İlaçlar. Raloksifen hidroklorür (Raloxifene, Sigma) %1'lik karboksimetil selüloz içerisinde çözerek subkutan 1 mg/kg dozunda (raloksifen grubu) ve kontrol olarak karboksimetil selüloz %1'lik çözeltisinden (karboksimetilselüloz grubu) 1 ml/kg subkutan enjeksiyon yapıldı. Sekiz naif sıçana sadece 1 mL/kg serum fizyolojik enjeksiyonu yapıldı (kontrol grubu). Tüm enjeksiyonlar hayvanlar davranış enjeksiyonlar devam ettirildi. Enjeksiyonlar hergün sabah saat 08:30- 09:30 arasında yapıldı. Öğrenme deneği başlagıcından 12 gün önce enjeksiyonlar başlandı. Ses ve elektrik verilerek deneylerin birinci ve ikinci günü de devam edilerek 14 güne tamamlandı.

Aktif sakınma deneyi. Deneylere sabah saat 09:00'da başlanarak ardışık beş gün ve günde 15 deneme olarak gerçekleştirilmiştir. Deney düzeneği ortamına alınan sıçanın alışması için 1 dakika beklendikten sonra, önce 3 sn ses uyarısı (78dB, 380Hz) ardından 5 saniye bekleme ve 3 saniye süreli 50 V ayak şoku uygulandı. Hayvanın sesi duyar duymaz, elektrik şoku almadan çubuğa tırmanması (şekil 5) doğru yanıt (öğrenme) olarak kabul edildi.



Şekil 5: Aktif sakınma deneyinde sıçanın çubuğa tırmanması

Malondialdehid Ölçümü:

Homojenatlardaki Malondialdehid düzeyinin belirlenmesinde, spektrofotometrik olarak tiyobarbitürik asid reaktif maddelerinin varlığının ölçülmesi yöntemi kullanılmıştır. Homojenat üzerine TBA (Tiyobarbitürik asid) eklendikten sonra 100°C'de 20 dakika kaynatılarak 2000 rpm 10 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatantta 532 nm dalga boyunda kolorimetrik ölçüm yapıldı. 1,1,3,3-Tetraetoksipropan ile hazırlanan standart grafikten nmol/mL Malondialdehid hesaplanarak sonuçlar nmol/g doku olarak ifade edilmiştir.

Katalaz ölçümü:

Homojenatlar fosfat tampon ile 1/100 dilue edilerek hidrojen peroksidin katalaz tarafından parçalanması temeline dayalı ultraviole spektrofotometrik yöntem ile düzeyleri tayin edilmiştir. Taze hazırlanan 30 mM H₂O₂ içeren fosfat tampon çözeltisi üzerine örnek eklenerek 240 nm dalga boyunda absorbansın azalması 15 saniye ara ile 2 dakika boyunca okunmuş ve lineer regresyonlara göre her bir analiz için en uygun absorbanslar bulunarak, k değeri ve enzim miktarı hesaplanmıştır. Sonuçları standardize etmek için; veriler U/gr protein enzim aktivitesi olarak ifade edilmiştir.

Süperoksid Dismutaz ölçümü:

Homojenatlar fosfat tampon ile 1/100 dilue edilerek pH:10.2'de epinefrinin adenokroma otooksidasyonu temeline dayalı kolorimetrik yöntem ile SOD düzeyleri hesaplandı. 2 mL karbonat tampon üzerine örnek ve %0,55 epinefrin çözeltisinden eklenerek absorbans artışı 15 saniye ara ile 3 dakika boyunca 480 nm dalga boyunda izlendi. Enzimin epinefrinin adenokroma otooksidasyonunu inhibe etme yüzdesi hesaplandıktan sonra standard grafikten elde edilen veriler U/mg protein olarak değerlendirildi. (95)

Sıçan beyin bölgeleri farklı anatomik lokalizasyonlarda diseke edilerek her beyin bölgesi için ayrı ölçümler yapılmıştır. Diseke edilen sıçan beyin bölgeleri korteks, striatum, hipokampus ve serebellum'dır.

İstatistiksel değerlendirme :

Verilerin analizi SPSS paket programı kullanılarak yapılmıştır. Noparametrik verilerin karşılaştırılmasında Mann Whitney U testi kullanılmıştır. Birden fazla non-parametrik verinin karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis testi ve post hoc Mann Whitney U testi kullanılmıştır.

BULGULAR

Beyin bölgeleri ile gruplar arası karşılaştırma:

Tablo 2’ de dört beyin bölgesi ile üç grup arasındaki superoksid dismutaz değerine göre karşılaştırma gösterilmiştir. Korteks bölgesinde SOD değeri her üç gruba göre karşılaştırma yapıldığında serum fizyolojik grubunda 4.57 ± 0.83 U/mgr.protein iken karboksimetil sellüloz grubunda 5.64 U/mgr.protein, raloksifen grubunda 5.08 U/mgr.protein olarak saptanmıştır (P=0.251). Striatum bölgesinde SOD için serum fizyolojik grubunda 3.93 U/mgr.protein; karboksimetilselülöz grubunda 4.49 U/mgr.protein; Raloksifen grubunda 4.31 U/mgr.protein olarak saptandı (p=0.163). Hipokampus bölgesi için araştırıldığı zaman serum fizyolojik grubunda 3.91 U/mgr.protein, karboksimetilselülöz grubunda 4.31 U/mgr.protein iken raloksifen grubunda 3.99 U/mgr.protein saptandı. Bu bölgede de anlamlı istatistiksel fark saptanmadı (P=0.348). Serebellum bölgesine bakıldığında serum fizyolojik grubu için 3.51 U/mgr.protein, karboksimetilselülöz grubunda 3.31 U/mgr.protein, raloksifen grubunda 3.67 U/mgr.protein olarak bulundu (P=0.733).

Tablo 2: Beyin bölgeleri içinde süperoksid dismutaz değerleri

SUPEROKSİD DİSMUTAZ				
	Serum	Karboksimetil	Raloksifen	P değeri
	Fizyolojik	selülöz		
	(U/mgr.protein)	(U/mgr.protein)	(U/mgr.protein)	
Korteks	4.57 ± 0.83	$5,64 \pm 0,65$	$5,08 \pm 0,54$	0,251
Striatum	$3.93 \pm 0,52$	$4,49 \pm 0,62$	$4,31 \pm 0,42$	0,163
Hipokampus	$3,91 \pm 0,36$	$4,31 \pm 0,68$	$3,99 \pm 0,80$	0,348
Serebellum	$3,51 \pm 0,45$	$3,31 \pm 0,89$	$3,67 \pm 0,68$	0,733

Tablo 3'de ayrı ayrı dört beyin bölgesi ile üç grup (serum fizyolojik, karboksimetilseluloz, raloksifen) arasında MDA değeri için yapılan karşılaştırma gösterilmiştir. MDA değeri korteks bölgesinde serum fizyolojik grubunda 14.81 nmol/mgr.protein iken karboksimetilseluloz grubunda 20.16 nmol/mgr.protein, raloksifen grubunda 13.66 nmol/mgr.protein olarak saptandı (p=0.001). Bu istatistiksel hesaplama Kruskal-Wallis Testine göre yapılmıştır. Mann Whitney testi ile post hoc hesaplama yapıldığında serum fizyolojik grubu ile karboksimetilseluloz grubu arasında istatistiksel fark anlamlı bulunmuştur (P=0.003). Serum fizyolojik grubu ile raloksifen grubu arasındaki fark anlamlı değil iken (P=0.328); karboksimetilseluloz ile raloksifen grubu arasında anlamlı fark bulunmuştur (p<0.01). Striatum bölgesinde MDA için değer serum fizyolojik grubunda 13.84 nmol/mgr.protein; karboksimetilseluloz grubunda 18.78 nmol/mgr.protein; raloksifen grubunda 12.37 nmol/mgr.protein olarak saptandı (P=0.001). Bu istatistiksel hesaplama Kruskal -Wallis Testine göre yapıldı. Mann Whitney testine göre post hoc karşılaştırma yapıldığında serum fizyolojik grubu ile karboksimetilseluloz grubu arasındaki fark anlamlı bulunmadı (P=1.0). Serum fizyolojik grubu ile raloksifen grubu arasındaki fark anlamlı bulundu (P=0.001). Karboksimetilseluloz ile raloksifen grubu arasındaki fark anlamlı (P=0.001) saptanmıştır. Hipokampus bölgesi için araştırıldığı zaman serum fizyolojik grubunda 15.36 nmol/mgr. protein, karboksimetilseluloz grubunda 19.59 nmol/mgr.protein iken raloksifen grubunda 13.26 nmol/mgr.protein bulundu (P=0.002). Bu istatistiksel hesaplama Kruskal Wallis testine göre yapıldı. Mann Whitney testi ile post hoc karşılaştırma yapıldığında serum fizyolojik grubu ile karboksimetilseluloz grubu arasındaki fark anlamlı bulundu (P=0.002). Serum fizyolojik grubu ile raloksifen grubu arasında anlamlı fark bulunmazken (P=0.065); karboksimetilseluloz ile raloksifen grubu arasında anlamlı fark (P=0.001) ortaya çıkmıştır. Serebellum bölgesine bakıldığında serum fizyolojik grubu için 15.60 nmol/mgr. protein, karboksimetilseluloz grubunda 19.74 nmol/mgr.protein, raloksifen grubunda 12.98 nmol/mgr. protein değerleri bulunmuştur.

Kruskal-Wallis Testine göre (P=0.007) anlamlı fark saptandı. Mann Whitney testi ile post hoc değerlendirme yapıldığında serum fizyolojik grubu ile karboksimetilseluloz grubu arasında fark bulunmadı (P=0.083). Serum fizyolojik grubu ile raloksifen grubu arasında (P=0.038) ve karboksimetilseluloz ile raloksifen arasında (P=0.005) anlamlı fark bulundu.

Tablo 3. Beyin bölgeleri içinde malondialdehid değerleri

MALONDİALDEHİD				
Bölgeler	Serum fizyolojik	Karboksimetil	Raloksifen	P
	(nmol/mgr. protein)	sellüloz (nmol/mgr. protein)	(nmol/mgr. protein)	
Korteks	14.81 ± 1.71	20.16 ± 3.21	13.66 ± 1.67	0.001
Striatum	13.84 ± 1.05	18.78 ± 2.29	12.37 ± 1.73	0.001
Hipokampus	15.36 ± 1.91	19.59 ± 3.01	13.26 ± 1.58	0.002
Serebellum	15.60 ± 1.55	19.74 ± 4.28	12.98 ± 2.39	0.007

Tablo 4’de ayrı ayrı dört beyin bölgesi ile üç grup (serum fizyolojik, karboksimetil seluloz, raloksifen) arasındaki katalaz ölçümü için yapılan karşılaştırma gösterilmiştir.

Korteks bölgesinde katalaz değeri için her üç grup karşılaştırıldığında serum fizyolojik grubunda 0.70 U/mgr. protein iken karboksimetilseluloz grubunda 0.70 U/mgr. protein, raloksifen grubunda 0.69 U/mgr. protein olarak saptandı (P=0.867). Striatum bölgesinde serum fizyolojik grubunda 0.52 U/mgr. protein; karboksimetilseluloz grubunda 0.64 U/mgr. protein; raloksifen grubunda 0.54 U/mgr. protein olarak bulundu (P=0.142). Hipokampus bölgesi için araştırıldığı zaman serum fizyolojik grubunda 0.61 U/mgr. protein, karboksimetilseluloz grubunda 0.70 U/mgr. protein iken raloksifen grubunda 0.64 U/mgr. protein saptandı (P=0.445). Serebellum bölgesine bakıldığında serum fizyolojik grubu için 0.51 U/mgr. protein, karboksimetilseluloz grubunda 0.52 U/mgr. protein, raloksifen grubunda 0.52 U/mgr. protein olarak saptandı (P=0.911). Bu istatistiksel hesaplama Kruskal -Wallis Testine göre yapılmıştır.

Tablo 4 : Bölgeler içinde katalaz değerinin gruplara göre karşılaştırılması.

KATALAZ				
Bölgeler	Serum fizyolojik (U/mgr. protein)	Karboksimetil selüloz (U/mgr. protein)	Raloksifen (U/mgr. protein)	P
Korteks	0.70±0.83	0.70±0.19	0.69±0.19	0.867
Striatum	0.52±1.27	0.64±0.14	0.54±0.14	0.142
Hipokampus	0.61±0.12	0.70±0.16	0.64±0.19	0.445
Serebellum	0.51±0.62	0.52±1.46	0.52±0.12	0.911

Ortalama değerler ile grupların karşılaştırılması:

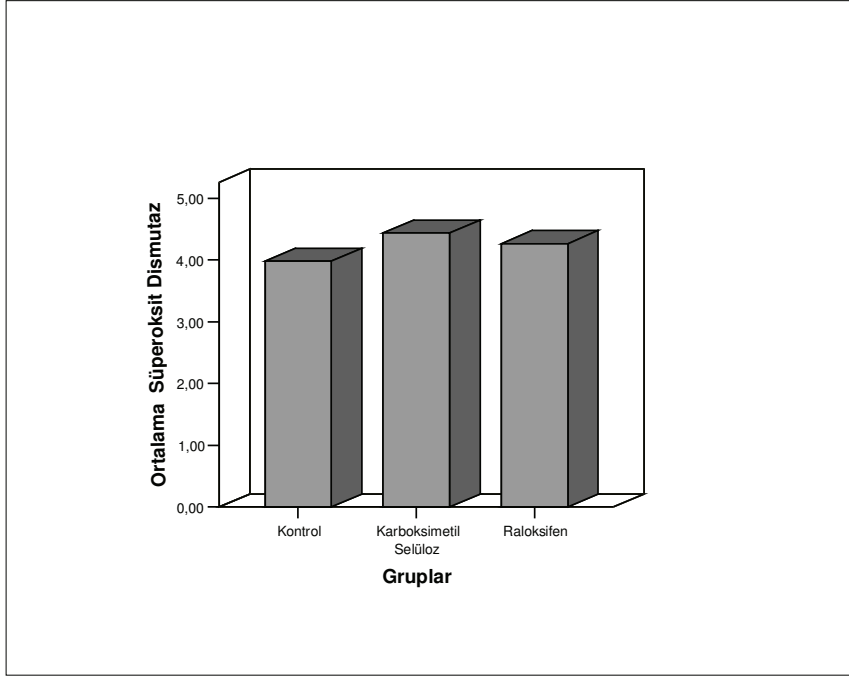
Ortalama superoksiddismutaz, malondialdehid, katalaz değerlerinin gruplara göre karşılaştırılması ve toplamı Tablo 5’te gösterilmiştir. Kruskal-Wallis testine göre superoksiddismutaz ve katalaz’ın gruplara göre karşılaştırılması ($p=0,059$, $p=0,375$) istatistiksel olarak anlamlı saptanmamıştır. Malondialdehid’in gruplara göre karşılaştırılması anlamlı ($P=0,001$) bulunmuştur. Mann Whitney testine göre 1. ve 2. gruplar arasında ortalama superoksiddismutaz ve malondialdehid değerlerinin fark $P=0,023$ ve $P=0,001$ olarak saptandı. Katalaz için ise $P=0,186$ olarak bulundu. 1. ve 3. gruplar arasında sadece malondialdehid istatistiksel değeri anlam taşırken ($P=0,001$); superoksiddismutaz ve katalaz için anlamlı fark (sırasıyla $P=0,118$ ve $P=0,846$) gözlenmemiştir. İkinci ve 3. gruplara arasında sadece malondialdehid anlamlı ($P=0,001$) saptanmıştır. Superoksiddismutaz ve katalaz için anlamlı fark bulunmamıştır (sırasıyla $P=0,368$ ve $P=0,286$).

Tablo 5: Ortalama süperoksid dismutaz, katalaz, malondialdehid'in bölgelere göre karşılaştırılması

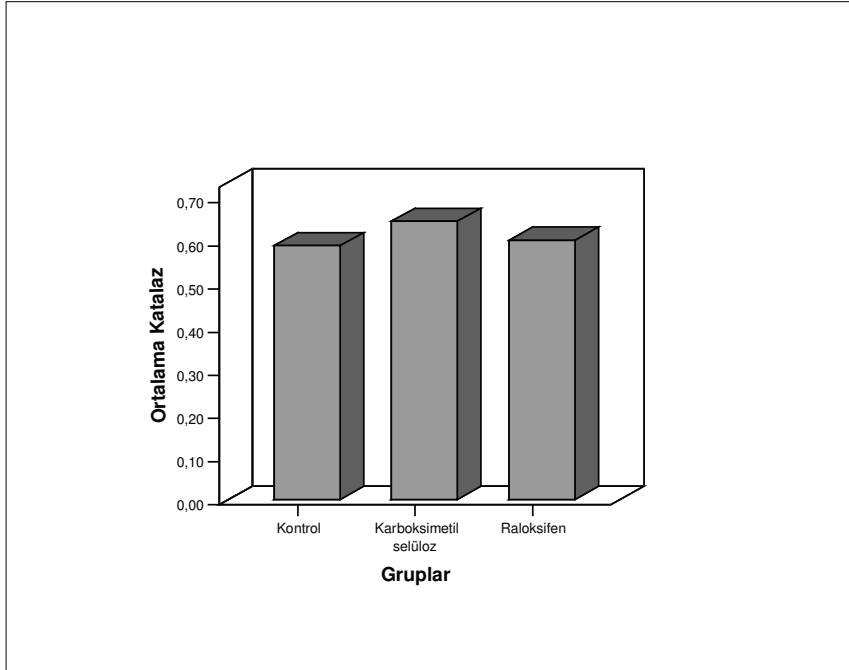
	Superoksid-dismutaz	Katalaz	Malondialdehid
	(U/mgr. protein)	(U/mgr. protein)	(nmol/mgr. protein)
Serum fizyolojik	3,98 ± 0,66	0,58 ± 0,14	14,90 ± 1,66
(1.grup)			
Karboksimetilseluloz	4,44 ± 1,08	0,64±0,17	19,56 ± 3,15
(2.grup)			
Raloksifen	4,26 ± 0,80	0,60 ± 0,17	13,07 ± 1,84
(3.grup)			
Total	4,23 ± 0,87	0,61 ± 0,16	15,84 ± 3,58

Ortalama superoksididismutaz değeri gruplara göre karşılaştırıldığında şekil 6'da görüldüğü gibi anlamlı fark olmamakla beraber karboksimetilseluloz grubu daha yüksek saptandı.

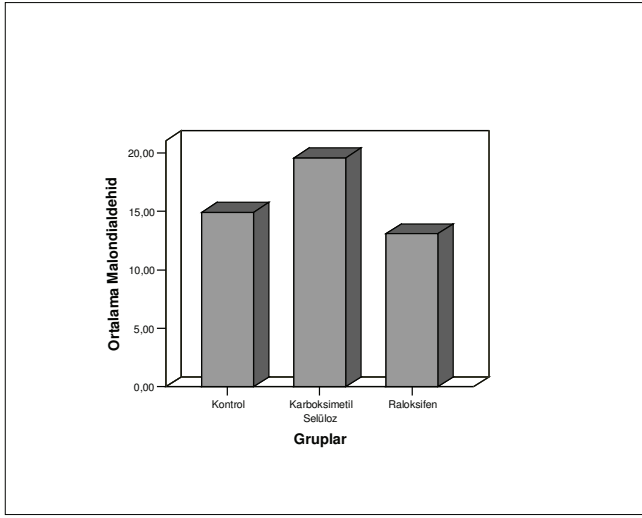
Şekil--6: Ortalama superoksidismutaz değerinin gruplara göre karşılaştırılması.



Şekil-7 : Ortalama katalaz değerinin gruplara göre karşılaştırılması



Şekil -8: Ortalama malondialdehid değerinin gruplara göre karşılaştırılması



Ortalama parametrelerin beyin bölgelerine göre karşılaştırılması:

Ortalama superoksid dismutaz, malondialdehid, katalaz değerlerinin bölgelere göre karşılaştırılmasında Kruskal Wallis testine göre superoksid dismutaz ve katalaz'ın gruplara göre karşılaştırılması ($P=0,001$ ve $P=0,001$) istatistiksel olarak anlamlı saptanmıştır. Malondialdehidin gruplara göre karşılaştırılması istatistiksel olarak anlamlı saptanmamıştır ($P=0,591$). Mann-Whitney Testi'ne göre post hoc karşılaştırma yapıldığında korteks ve striatum bölgeleri arasında superoksiddismutaz değeri $P=0.001$; katalaz için $P=0.007$; malondialdehid için $P=0.232$ olarak saptandı. Korteks ve hipokampus bölgeleri arasında superoksid dismutaz için $P=0.001$; katalaz için $P=0.274$; malondialdehid için $P=0.805$ olarak bulundu. Korteks ve serebellum bölgeleri arasında kıyaslama yapıldığında superoksid dismutaz için $P=0.001$; katalaz için $P=0.001$; malondialdehid için $P=0.934$ olarak bulunmuştur. Striatum ile hipokampus arasında kıyaslama yapıldığında superoksid dismutaz $P=0.343$; katalaz için $P=0.055$; malondialdehid için $P=0.266$ olarak ortaya çıkmıştır. Striatum ile serebellum arasında kıyaslama yapıldığında superoksid dismutaz için $P=0.001$; katalaz için $P=0.231$; malondialdehid için $P=0.303$ olarak bulunmuştur.

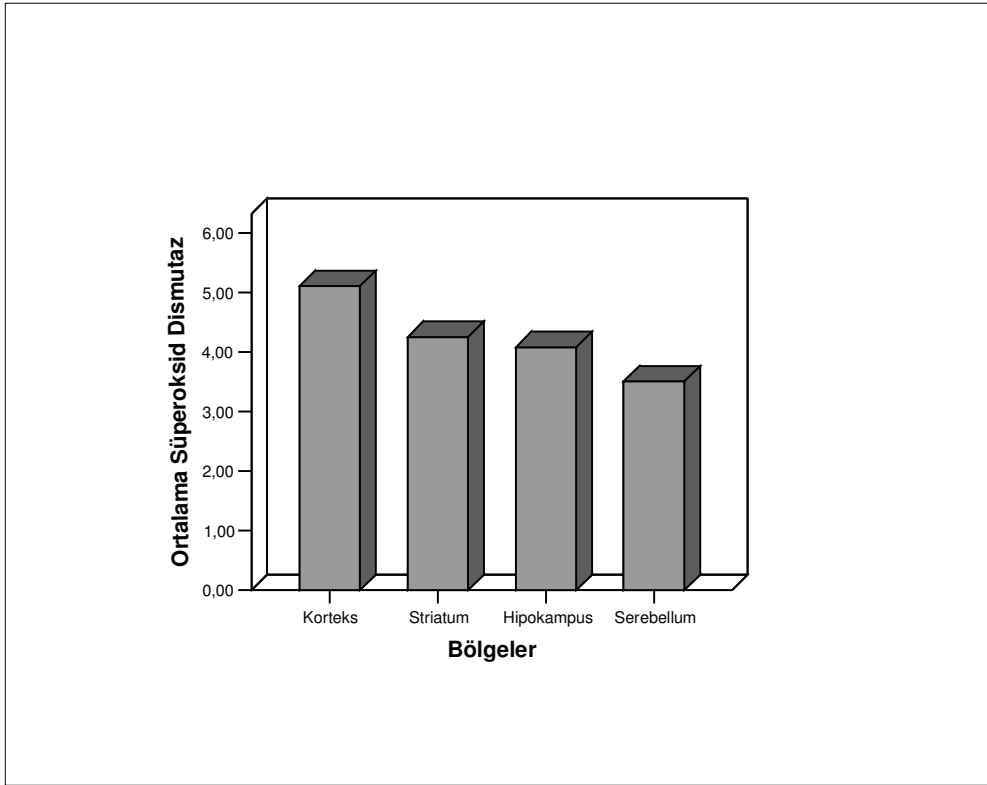
Hipokampus ile serebellum arasında kıyaslama yapıldığında superoksid dismutaz için P=0.008 katalaz için P=0.002; malondialdehid için P=0.902 olarak saptandı.

Tablo 6: Ortalama süperoksid dismutaz, malondialdehid ve katalaz değerlerinin beyin bölgelerine göre karşılaştırılması

Bölge	Superoksidismutaz (U/mgr. protein)	Katalaz (U/mgr. protein)	Malondialdehid (nmol/mgr. protein)
Korteks	5,10±0,79	0,70 ± 0,18	16,21 ±3,64
Striatum	4,24 ± 0,56	0,56 ± 0,14	15,00 ± 3,27
Hipokampus	4,07 ± 0,63	0,65 ± 0,15	16,07 ± 3,44
Serebellum	3,50 ± 0,68	0,51 ± 0,11	16,10 ± 4,01
Total	4,23 ± 0,87	0,61 ± 0,16	15,84 ± 3,58

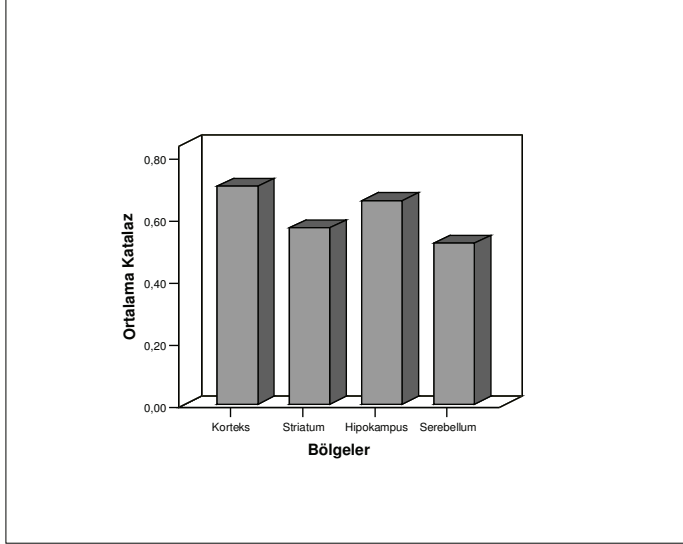
Ortalama enzim değerlerinin bölgelere göre karşılaştırılması aşağıda şekilde gösterilmiştir
Ortalama superoksid dismutaz değeri sadece bölgelere göre karşılaştırıldığında birinci bölge
(korteks) en yüksek değerde dördüncü bölge (serebellum) en küçük değeri aldı (şekil 9).

şekil 9: Ortalama süperoksid dismutaz değerinin bölgelere karşılaştırılması



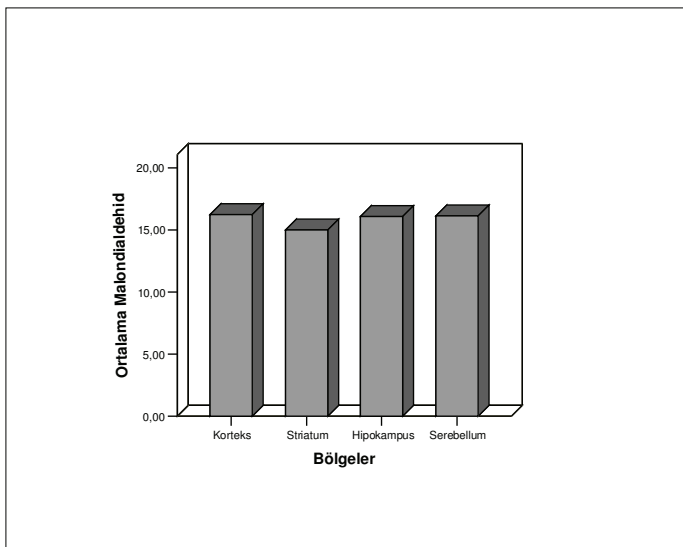
Ortalama katalaz değeri sadece bölgelere göre kıyaslandığında şekil 10’da gösterildiği gibi 1 ve 3 de yüksek (korteks ve hipokampus) 2 ve 4 de daha düşük saptanmış (striatum ve serebellum)

Şekil-10 : Ortalama katalaz değerinin bölgelere karşılaştırılması



Ortalama malondialdehid değeri bölgelere göre kıyaslandığında anlamlı fark saptanmadı (şekil 11)

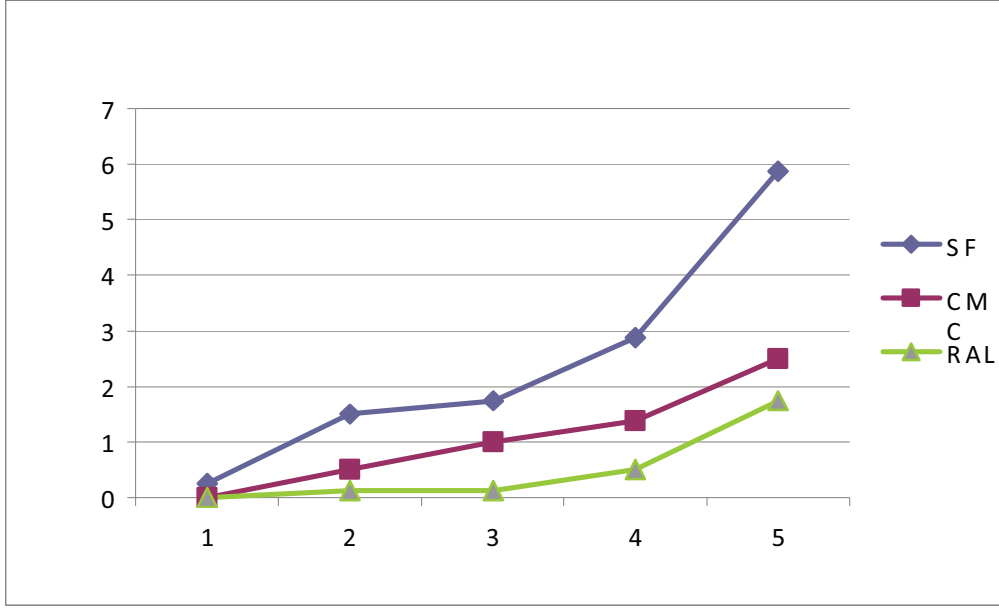
Şekil -11: Ortalama malondialdehid değerinin bölgelere göre karşılaştırılması



AKTİF SAKINMA NIN GRUPLARAGÖRE GÖRE GÖRE KARŞILAŞTIRILMASI

Her üç grupta 5 gün verilen eğitim sonuçları kıyaslandığında serum fizyolojik verilen naif grup daha iyi öğrenmiş olarak izlendi, karboksimetil seluloz ve raloksifen grupları arasında anlamlı fark saptanmadı. Bu veriler aşağıdaki Tablo 6 ve Şekil 12’de gösterilmiştir.

Şekil -12 : Raloksifen uygulamasının aktif sakınma öğrenmesi üzerine etkileri



Serum fizyolojik, karboksimetilseluloz, raloksifen grupları arasındaki aktif sakınma davranışı üzerinde yapılan beş günlük çalışma verileri Tablo 7’de özetlenmiştir.

Tablo 7: Aktif sakınma davranışı üzerinde yapılan beş günlük çalışma verileri

GRUPLAR	GÜNLER				
	1	2	3	4	5
Serum fizyolojik	0.25	1.5	1.75	2.87	5.87
Karboksimetilseluloz	0	0.5	1	1.37	2.5
Raloksifen	0	0.125	0.125	0.5	1.75

TARTIŞMA

Östrojen hormonu ve raloksifen gibi östrojen benzeri etki yapan bileşiklerin beyin üzerine olan etkileri araştırılmaktadır. Ortalama yaşı 77 olan postmenopozal bir grup kadına 12 farklı kognitif test uygulanmış ve uzun süreli östrojen tedavisi alan grupta sonuçlar, tedavi almayanlara göre daha olumlu ve istatistiksel olarak daha anlamlı bulunmuştur (59). Altmış beş yaşında, sağlıklı ve östrojen kullanan kadınların, aynı yaş grubunda ve tedavi almayanlara göre, kısa ve uzun dönem sözel bellek karşılaştırıldığında daha iyi sonuçlar verdiği ortaya konmuştur (74). Östrojenin bu konuda etkisiz olduğunu söyleyen araştırmacılar da vardır. Konjuge östrojenlerle tedavi edilmiş postmenopozal kadınların plasebo ile karşılaştırılmalarında, sözel akıcılık, hafıza, psikomotor hız ve dikkat gibi kognitif fonksiyonlarda herhangi bir değişiklik olmadığı ortaya konmuştur (75). Bilişsel işlevler birçok farklı değişkenin birbiriyle etkileşimi neticesinde bir ifadeye ulaşmaktadır. Tek başına bazı değişkenlerle bir yorum yapmak pek doğru olmayacaktır.

MORE çalışmasında raloksifen kullanan 7705 postmenozal kadında 3 yıllık rejimin etkilerini araştırmış bu kadınlarda bilişsel işlevleri artırıcı etkilerini anlayabilmek için testler uygulanmıştır. Kadınlara randomize olarak oral plasebo alanlar ve 120 mg raloksifen alanlar olarak ayrılmıştır. Kadınlara ayrıca kalsiyum ve D vitamin desteği sağlanmıştır. Çalışmacılar tarafında kadınlarda amnezi, demans, konfuzyon gibi bulgular kaydedilmiştir. Kadınlar 0-15 puanlar içeren geriatrik skala ile değerlendirilmiştir. Bu büyük randomize kontrollü çalışma sonucunda raloksifenin çalışma grubunda 3 yıllık kognitif testlerde herhangi bir farklı sonuç oluşturmadığı bulunmuştur. Buna rağmen raloksifen alan grubun kelime hafızası ve dikkat alanında daha düşük kognitif düşüş riski taşımaktadır. (76).

Yaffe ve arkadaşlarının (77) yaptığı çalışmada SERM'lerin Alzheimer hastalığının üzerine etki eden risklerini araştırılmıştır. Bu çalışmada osteoporozlu postmenopoz kadınlarda raloksifen verilmiş randomize ve plasebo kontrollü çalışma yapılmıştır. Günlük 60 mg ve 120 mgr/gün verilen raloksifenin primer sonuçları vertebral kırıklar üzerine sekonder sonuçları kognitif işlevlerde bozulma ve demans ile ilgili değerlendirilmiştir. Bu kadınların klinik ve

kognitif değerleri çalışmanın başında ve yıllık olarak değerlendirilmiştir. Üç yıl sonra klinik olarak demans yakınmaları olan ya da bilişsel taraması 10 persentilin altında olan 5386 kadın ve tomografi ve laboratuvar testleri ile demans uzmanı tarafından demans etiolojisi araştırılmıştır. Sonuçlarda 5386 kadından 5153'ü (%95.7) bilişsel işlevler açısından normal olarak sınıflandırılmıştır. 181 kadın %3.4 orta derecede kognitif bozukluk, 52 hastada (%1) belirgin demans saptandı.

Plasebo alan grup ile günde 120 mg raloksifen alan grup karşılaştırdığında %33 de daha az orta derecede kognitif bozukluk ve daha az Alzheimer hastalığı gelişme riski ve diğer kognitif bozukluklar daha az saptanmıştır. Orta derecede kognitif bozukluk, Alzheimer hastalığı ve diğer bozuklukların gelişimi açısından günde 60 mg raloksifen alan grupta anlamlı derecede bir fark saptanmamıştır. Günde 120 mg raloksifen postmenopozal kadınlarda bilişsel işlevlerin bozulma riskini azaltmaktadır (77).

Raloksifenin kültüre edilmiş hücrelerde nöronal büyümeyi stimüle ettiği deneysel olarak gösterilmiştir (64). Ayrıca ooferektomi uygulanmış sıçanlarda asetil kolin transferaz aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir ki bu etki kognitif fonksiyonlardaki iyileşmelerden sorumlu olabilir (65). Yaffe ve arkadaşlarının (42) yaptıkları bir çalışmada, raloksifen tedavisi alan postmenopozal kadınlarda, plaseboya göre bilişsel işlevlerde anlamlı farklılık bulunmamıştır. Genel olarak raloksifen ve östrojenle yapılan klinik çalışmalara baktığımızda, raloksifen ve östrojenin özellikle genç postmenopozal kadınlarda bilişsel işlevlerde çok fazla etkilemediği, ancak yaşa bağlı olarak ortaya çıkan bilişsel işlevlerde gerilemeye karşı koruyucu olduklarını görmekteyiz.

Özgönül ve ark (80) tarafından yürütülen çalışmada göstermektedir ki; östrojenin antioksidan sistemi üzerine olan çelişkili özellikleri in vivo ve in vitro ortamlarda yapılan çalışmalarda benzerdir. Bu çalışmada östrodiol ve raloksifenin antioksidan enzimler üzerine etkisi araştırılmıştır. Ooferektomi yapıldıktan 12 hafta sonra dişi sıçanlar 3 gruba ayrıldı. Ooferektomili sıçanların altısına serum fizyolojik verildi(grup 1), 10 sıçana 0.1 mgr./kg etinil östrodiol, (grup 2), 10 sıçana 1mgr /kg raloksifen (grup 3) verildi. Sekiz hafta boyunca

enjeksiyon yapıldı. On sıçan naiv hayvan hiçbir tedavi ve ooferektomi uygulanmadan takip edildi. Ooferektomi yapılmış hayvanlarda karaciğer dokusundan elde edilen CAT değeri sham grubuna göre daha yüksek bulundu. Östrojen katalaz değerlerini normal sınırlara getirirken raloksifen etkisiz kaldı. SOD ve MDA seviyeleri bütün gruplarda değişmedi. Beyin dokusundaki SOD ve CAT aktivitelerinde kontrol ooferektomili östrojen tedavisi ve raloksifen tedavisi alan gruplar arasında fark yoktur. Sadece beyin dokusunda ooferektomili sıçanlarda MDA seviyesi yüksek bulunmuştur ($p=0.02$). Raloksifen verilen grupta MDA seviyesi normale gelirken östrojen tedavisi başarısız olmuştur. Elde edilen bilgiler göstermektedir ki östrojen karaciğerdeki CAT ve SOD değerleri üzerine etkisi ile antioksidan sistemi üzerine etki etmektedir. Östrojen ve raloksifenin antioksidan etkileri karaciğere göre beyinde daha fazla bulunmuştur. Raloksifen etkileri daha iyi anlaşıldıktan sonra raloksifen postmenopozal kadınlarda oksidatif stresin sebep olabileceği hastalıklarda tedavi amacıyla kullanılabilir (80). Birçok çalışmada kadın gonad hormonu olan östrojenin kadınları çeşitli nörodejeneratif hastalıklara ve serebral iskemiye karşı çeşitli mekanizmalar ile koruduğu gösterilmiştir. Östrojen bu koruyucu etkisini ana olarak üç yol ile göstermektedir. Bunlar steroid reseptörlerinin aktivasyonu ve/veya nörotransmitterlerin modülasyonu ve/veya direk antioksidan aktivitesi iledir. Bu nedenle Ögeve ark (81) tarafından yürütülen çalışmada ooferektomili dişi sıçanların beyin korteksinde östradiol ve raloksifenin nitrik oksit ve antioksidan enzim düzeylerine etkisini araştırmayı amaçlandı. 120 ile 140 günlük iken ooferektomi yapılan 32 sıçandan 10 Sprague-Dawley sıçan kontrol grubu olarak kullanıldı. Ooferektomiden 12 hafta sonra (1) ooferektomili plasebo gruba ($n=11$) serum fizyolojik verildi (2), östrojen grubuna ($n=10$) etinil östradiol 0.1 mg/kg subkütanöz yolla verildi (3). Raloksifen grubuna ($n=10$) raloksifen 1 mg/kg sübkütanöz yolla verildi. Tedavi periodunun sonunda (8 hafta) sıçanlar dekapitaze edildi ve korteks örnekleri alındı. Sonuçlar göstermiştir ki ooferektomi total nitrit nitrat seviyelerinde azalmaya neden olmaktadır. NO düzeyleri östrojen ve raloksifen grubunun her ikisinde de plasebo grubuna göre daha yüksek düzeyde saptanmıştır. Katalaz aktivitesi gruplar arasında anlamlı derecede bir fark göstermemiştir. SOD aktivitesinde

ooferektomi nedeniyle artış tespit edilmiştir. Östradiol ve raloksifen tedavisinin SOD aktivitesi üzerine istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir etkisi olmadığı gösterilmiştir (81).

Terek tarafından yürütülen tez çalışmasında (82) aktif sakınma deneyi için : Kontrol (n=10), Ovariektomi ve fıstık yağı (n=10), Ovariektomi ve östrojen (n=10), Ovariektomi ve östrojen-progesteron (n=10), Ovariektomi ve östrojen-kesikli progesteron (n=10) grupları oluşturulmuştur. Enjeksiyon Tamoksifen 5 mg/kg dozda %10 DMSO içinde çözülerek intraperitoneal olarak uygulandı. Tamoksifen çalışma grubundaki kontrol sıçanlarına %10 DMSO enjeksiyonu yapıldı. Aktif sakınma deneyi: 5 gün günde 15 deneme olarak uygulanmıştır. Zil sesini duyup hiç şok almadan tahta çubuğa tırmanmaları doğru yanıt olarak kaydedilmiştir. Aktif sakınma deneylerinde, her gün yapılan 15 denemeden doğru yanıt (sesi duyunca şoku almadan tahta çubuğa tırmanma) sayıları kaydedilmiş, 3 gün 3 ve altında doğru yanıtı sahip olan sıçanlar deneyden dışlanmıştır. En iyi skorları ovariektomisiz gruplar (tamoksifen ve kontrol) yaparken en kötü skorlar hormon replasmanı almayan ovariektomili grupta görülmüştür. Günler ve gruplar arasında istatistiksel anlamlı bir etkileşim saptanamamıştır. Yani grupların skorlarının günlerle değişimi farklı olmasına rağmen aralarında ters yönde bir etki bulunduğu gözlenmemiştir (82).

Bizim çalışmamızda, bir selektif östrojen modülatörü olan raloksifenin, overleri alınmış ve cerrahi menopoza sokulmuş sıçanlarda öğrenme üzerine etkilerini incelemeye çalıştık. Beş gün boyunca yapılan aktif sakınma deney sonuçlarında kontrol grubu daha iyi öğrenmiş olarak görüldü, ooferektomili gruplar arasında iyi öğrenme izlenmedi anlamlı istatistiksel fark saptanmadı.

Raloksifenin malondialdehid düzeylerinde oluşturduğu azalma lipid peroksidasyonu üzerine olumlu etkilerinin bir sonucudur ve uzun dönem kullanımı ile oluşabilecek potansiyel yararları sham grubunda daha yüksek saptanmıştır. Katalaz beyin bölgesinde bakıldığında gruplar arası belirgin fark yokken karaciğerde özellikle raloksifen grubunda daha yüksek saptanmıştır. Malondialdehid beyin bölgesinde bakıldığında özellikle overektomili grupta daha yüksek bulunmuştur. Karaciğerde gruplararası belirgin bir fark saptanamamıştır. Çok az kontrol ve

raloksifen grubunda daha yüksektir. Ovariectomi sonrasında beyin dokusunda, lipid peroksidasyon ürünü, MDA düzeylerinde artış görülürken karaciğerde böyle bir artışa rastlanmaması östrojenin dokuya spesifik antioksidan etki gösterdiği bulgusunu desteklemektedir. Etkili olan faktörlerden bir diğeri de beyinde östrojen reseptör sayısının fazlalığı olabilir. Postmenapozal dönemde yaygın kullanımı olan östrojenle yapılan çok sayıda in vitro çalışma da hormonun prooksidan ve antioksidan etkilerini, doz ve dokuya spesifik olarak gösterdiğini ortaya koymaktadır. Ovariectomi ile raloksifen ve östrojen tedavileri sonrasında SOD ve katalaz düzeylerinde anlamlı bir değişiklik olmaması, östrojen ve raloksifenin antioksidan etkilerinin bu enzimlerden bağımsız olduğunu düşündürmektedir. Beyin dokusunda ovariectomi sonrasında artan MDA düzeylerinde, raloksifen tedavisiyle azalma görülürken ekzojen östrojen tedavisi etkili olmamıştır. Östrojen ve raloksifenin kardiyovasküler sistem üzerine koruyucu etkileri üzerine çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir (66).

Raloksifenin antioksidan sistem ve lipid peroksidasyonu üzerine Ozgocmen ve ark (67) yaptığı çalışmada günlük aktivitesini yapabilecek olan daha önce osteoporoz tedavisi ve tanısı almamış 40-65 yaş grubu 87 postmenopozal dönemdeki hastalar seçilmiştir. 23 non osteoporotik kadın kontrol grubu olarak ele alınmıştır. Bu kadınların lumbar vertebra ve femurun proksimal bölgesini kemik dansitometrisine bakıldıktan sonra superoksid dismutaz, katalaz malondialdehid ve glutathionperoksidaz enzim düzeyleri bakılmıştır. Postmenopozdaki osteoporotik kadınlarda kontrol grubuna göre katalaz daha düşük; NO, malondialdehid superoksid dismutaz glutathion peroksidaz değerleri daha yüksek saptanmıştır. Sonuç olarak postmenopozdaki osteoporotik kadınlarda kemik kaybı için oksidatif belirteçler anlamlı bulunmuştur(67).

Konyalıoğlu ve arkadaşlarının (83) yaptığı çalışmada üç grup ele alınmıştır: Kontrol, Plasebo ve Raloksifen grubu. Kontrol grubu 8 adet non-overiektomize sıçan olarak ele alınmıştır. Plasebo grubunda 8 adet ooferektomili sıçanlara ooferektomi yapıldıktan beş hafta sonra 12 gün fizyolojik salin verilmiştir. Raloksifen grubuna 8 adet ooferektomize hayvanlara 12 gün boyunca 1 mg/kg subkutan olarak raloksifen verilmiştir. Plasebo

grubunda anlamlı derecede SOD, CAT, GPX aktiviteleri yüksek saptanmış, beyin, kalp ve karaciğer dokularında MDA düzeylerinin yükselmesine neden olmuştur ($p < 0,05$). Raloksifen tedavisi kalpte SOD aktivitesini, beyinde GPX aktivitesini ve karaciğerdeki CAT aktivitesini nonoveriektomili grup ile kıyaslandığında anlamlı şekilde düşürmüştür ($p < 0,05$) fakat buna karşın tüm grupların TrxR aktivitesinde herhangi bir değişim yapmamıştır. Tüm dokularda artmış olan MDA düzeyleri raloksifen tedavisi sonucunda beyin ve kalpde çok anlamlı azalmalara neden olmuştur ($p < 0,05$). Aynı zamanda nonoveriektomize gruba göre mukayese edilen overiektomik grupta tüm dokularda azalan GSH düzeyleri dikkat çekicidir. Raloksifen uygulaması özellikle beyin ve kalp üzerinde daha anlamlı yüksek GSH düzeylerine neden olmuştur ($p < 0,05$). Sonuç olarak, raloksifenin karaciğer dokusundan çok beyin ve kalp üzerinde oksidatif strese karşı daha etkili olduğu bulunmuştur (68).

Bizim çalışmamızda raloksifen verilen grupta malondialdehid düzeyi kontrol grubu (serum fizyolojik) ile benzer bulunmuştur; (kontrol grubunda 14.9 nmol/mgr. protein ve raloksifen grubunda 13.07 nmol/mgr. protein) karboksimetil selüloz verilen plasebo grubunda yüksek (19.5 nmol/mgr. protein) bulunmuştur. Çalışmamızda malondialdehid düzeyleri beyin bölgeleri arasında anlamlı fark saptanmamakla beraber korteks bölgesinde hafif daha düşük saptandı. Diğer yapılan çalışmalarda da postmenopozal dönemde osteoporoz saptanan hastalara verilen raloksifen tedavisi sonrası malondialdehid düzeyleri düşük bulunmuştur (80). Superoksid dismutaz ve katalaz değerleri de gruplara göre ve beyin bölgeleri arasında ayrı ayrı karşılaştırılmıştır. Gruplar arası CAT ve SOD değerleri arasında anlamlı fark saptanmamakla beraber karboksimetilseluloz ve raloksifen grubunda anlamsız derecede daha yüksek değerler bulunmuştur: süperoksid dismutaz raloksifen grubunda 4.26 iken karboksimetilseluloz grubunda 4.44; kontrol grubunda 3.98; katalaz raloksifen grubunda 0.60 iken karboksimetilseluloz grubunda 0.64, kontrol grubunda 0.58 olarak saptandı. Bölgeler arası bakıldığında SOD korteks bölgesinde daha yüksek (5.1), CAT korteks ve hipokampus bölgelerinde daha yüksek (0.70, 0.65) saptandı ve aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

SONUÇLAR

1. Raloksifen lipid peroksidasyonu oksidan ve antioksidan sistemi üzerine etkilerinde oksidanlar olarak malondialdehid düzeylerini anlamlı ölçüde düşürerek beyin koruyucu etkisini sağlamaktadır. Süperoksid dismutaz ve katalaz antioksidan sistemleri üzerinde anlamlı etkinlik saptanmadı.
2. Raloksifen'in öğrenme üzerine olumlu etkileri net olarak ortaya konamamıştır çünkü öğrenme çok karmaşık süreçleri içermektedir ve çok faktörlerden etkilenmektedir.
3. Beyin bölgeleri içinde gruplara göre karşılaştırma :
 - Süperoksid dismutaz enzimin dört beyin bölgesi ile (korteks, striatum, hipokampus ve serebellum) gruplar arasındaki karşılaştırmada (serum fizyolojik, raloksifen, karboksimetil seluloz) istatistiksel anlamlı fark saptanmadı.(3.98; 4.44, 4.26 U/mgr.protein)
 - Malondialdehid değerinin için ayrı ayrı dört beyin bölgesi ile üç grup (serum fizyolojik, karboksimetilseluloz, raloksifen) arasında yapılan karşılaştırmada serum fizyolojik ile raloksifen grubunda daha düşük saptandı(14.9 ve 13.07 nmol/mgr.protein), karboksimetilseluloz grubu daha yüksek değerlerde bulundu(19.56 nmol/mgr.protein). Raloksifen, malondialdehid düzeylerini anlamlı ölçüde düşürerek beyin koruyucu etkisini sağlamaktadır.
 - Katalaz için karşılaştırma yapıldığında ayrı ayrı dört beyin bölgesi ile üç grup (serum fizyolojik, karboksimetil seluloz, raloksifen) arasında anlamlı istatistiksel fark saptanmamıştır. (0.58; 0.64; 0.60 U/mgr.protein)

4. Gruplara göre ortalama enzim değerlerinin karşılaştırılması:

- Ortalama superoksid dismutaz ve katalaz değerlerinin gruplara göre karşılaştırılması ve Kruskal-Wallis testine göre hesaplandı. ($p=0,059$, $p=0,375$) istatistiksel olarak anlamlı saptanmadı. Ortalama malondialdehidin gruplara göre karşılaştırılması $P=0,0001$ olarak saptandı. Bu hem ortalama değerlerinin hem de ayrı ayrı bölgelere göre değerlerin istatistiksel anlamlı olduğunu göstermektedir.
- Serum fizyolojik ve karboksi metilseluloz grupları arasında ortalama superoksid dismutaz ve malondialdehid değerlerinin istatistiksel fark $P=0,023$ ve $P=0,001$ olarak saptandı. Katalaz için ise $P=0,186$ bulundu.
- Serum fizyolojik ve raloksifen grupları arasında sadece malondialdehid istatistiksel değeri $P=0,001$ saptandı. Superoksid dismutaz ve Katalaz için $P=0,118$, $P=0,846$ saptanmıştır.
- Karboksimetilseluloz ve raloksifen grupları arasında sadece malondialdehid $P=0,001$ saptanmıştır. Superoksid dismutaz ve katalaz için $P=0,368$, $P=0,286$ saptanmıştır.

5. Bölgelere göre ortalama superoksid dismutaz, malondialdehid, Katalazın karşılaştırılması

- Korteks ve striatum bölgeleri arasında superoksid dismutaz değeri $P=0.001$; katalaz için $P=0.007$; malondialdehid için $P=0.232$ olarak saptandı.
- Korteks ve hipokampus bölgeleri arasında superoksid dismutaz için $P=0.001$; katalaz için $P=0.274$; malondialdehid için $P=0.805$ olarak saptandı.
- Korteks ve serebellum bölgeleri arasında kıyaslama yapıldığında superoksid dismutaz için $P=0.001$; katalaz için $P=0.001$; malondialdehid için $P=0.934$ olarak saptandı.
- Striatum ile hipokampus arasında kıyaslama yapıldığında superoksid dismutaz $P=0.343$; katalaz için $P=0.055$; malondialdehid için $P=0.266$ olarak saptandı.

- Striatum ile serebellum arasında karşılaştırma yapıldığında superoksid dismutaz için $P=0.001$; katalaz için $P=0.231$; malondialdehid için $P=0.303$ olarak saptandı.
- Hipokampus ile serebellum arasında karşılaştırma yapıldığında superoksid dismutaz için $P=0.008$ katalaz için $P=0.002$; malondialdehid için $P=0.902$ olarak saptandı.
- Ortalama superoksid dismutaz değeri sadece bölgelere göre karşılaştırıldığında birinci bölge (korteks) en yüksek değerde (5.10U/mgr.protein) dördüncü bölge (serebellum) en küçük değeri aldı (3.50 U/mgr.protein).

Aktiv sakinme ile yapılan çalışmamızda öğrenme ve bilişsel işlevler üzerine etkilerini araştırdık. Bu sonuçlara göre gruplar arasında anlamlı istatistiksel fark saptanmamıştır.

KAYNAKLAR

1. Kimura D. Estrogen replacement therapy may protect against intellectual decline in postmenopausal women. *Horm Behav* 1995;29:312-321.
2. Greene RA, Dixon W. The role of reproductive hormones in maintaining cognition. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2002;29:437-453.
3. Prange-Kiel J, Wehrenberg U. Para/autocrine regulation of estrogen receptors in hippocampal neurons. *Hippocampus* 2003;13:226-234.
4. McEwen B. Estrogen actions throughout the brain. *Recent Prog Horm Res* 2002;57:357-384.
5. Markham JA, Pych JC. Ovarian hormone replacement to aged ovariectomized female rats benefits acquisition of the morris water maze. *Horm Behav* 2002;42:284-293.
6. Pfaff DW, Vasudevan N. Estrogens, brain and behavior : studies in fundamental neurobiology and observations related to women's health . *J Steroid Biochem Mol Biol* 200;30:365-373.
7. Manev R, Uz t, Manev H. Fluoxetine increases the content of neurotrophic protein S100beta in the rat hippocampus. *Eur J Pharmacol* 2001;25:420.
8. Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci* 2000;15:9104-110.
9. Fink G, Sumner BE, Rosie R, Grace O. Estrogen control of central transmission : effect on mood, mental state and memory. *Cell Mol Neurobiol* 1996;16:325-344.
10. Archer JSM. Relationship between estrogen, serotonin and depression. *Menopause* 1999;6:71-78.
11. Mittleman BH, Cohen FJ. Selective estrogen receptor modulators : a look ahead *Drugs* 1999;57:653-663.

12. Cyr M, Landry M, Di Paolo T. Modulation by estrogen –receptor directed drugs of 5-hydroxytryptamine-2A receptors in rat brain : *Neuropsychopharmacology* 2000;23:69-78.
13. Nickelsen T, Lufkin EG, Riggs BL, Cox DA. Raloxifene hydroxychloride, a selective estrogen receptor modulator : safety assessment of effects on cognitive function and mood in postmenopausal women. *Psychoendocrinology* 1999;24:115-128.
14. Jarkova NB, Martenyi F. Mood effect of raloxifene in postmenopausal women *Maturitas* 2002;42:71-75.
15. Yakin K, Dünder İ. Antiöstrojenler. *Türkiye Klinikleri Jinekoloji Obstetri Dergisi* 1998;8 (3):143-149.
16. Balfour JA, Goa KL: Raloxifene. *Drugs & Aging* 1998;12(4):335-341.
17. Howell A: Antiestrogens: Future prospects. *1997;Oncology* 11:59-64.
18. Mc Gregor JJ, Jordan VC: Basic guide to mechanisms of antiestrogen action. *Pharmacol Rev* 1998;50(2):151-196.
19. Barkhem T, Carlsson B, Nilsson Y, Enmark E, Gustafsson J, Nilsson S: Differential response of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta to partial estrogen agonists/antagonists. *Mol Pharmacol* 1998;54(1):105-112.
20. Yang NN, Bryant HU, Hardikar S: Estrogen and raloxifene stimulate transforming growth factor beta-3 gene expression in rat bone;a potential mechanism for estrogen or raloxifene mediated bone maintenance. *Endocrinology* 1996;137:2075-2084.
21. Levenson AS, Jordan VC: The key to antiestrogenic mechanism of raloxifene is aminoacid 351(aspartate) in the estrogen receptor. *Cancer Res* 1998; 58(9):1872-1875.
22. Knadler MP, Lantz RJ, Gillespie TA: The disposition and metabolism of 14C-labeled raloxifene in human. *Pharm Res* 1995;12:372.

23. Fournier B, Haring S, Kaye M: Stimulation of creatine kinase specific activity in human osteoblast and endometrial cells by estrogens and antiestrogens and its modulation by calcitropic hormones. *J Endocrinol* 1996;150:275-285.
24. Evans GL, Bryant HU, Magee DE, Cole HW, Rowley ER, Iversen P, Kim J: Raloxifene inhibits bone turnover and prevents further cancellous bone loss in adult ovariectomized rats with established osteopenia. *Endocrinology* 1996;137:4139-4144.
25. Sato M, Bryant HU, Iversen P, Rowley ER, Turner CH: Advantages of raloxifene over alendronate or estrogen on non-reproductive and reproductive tissues in the long term dosing of ovariectomized rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;279:298-305.
26. Bjarnason NH, Haarbo J, Byrjalsen I: Raloxifene inhibits aortic accumulation of cholesterol in ovariectomized cholesterol-fed rabbit. *Circulation* 1997;96:1964-1969.
27. Kauffman RF, Bensch WR, Roudebush RE: Hypocholesterolemic activity of raloxifene (LY39481): pharmacological characterization of a selective estrogen receptor modulator. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;280:146-153.
28. Wakeling AE, Valcaccia B, Newbould E: Nonsteroidal anti-estrogens-receptor binding and biological response in rat uterus, rat mammary carcinoma and human breast cancer cells. *J Steroid Biochem* 1994;20:111-120.
29. Wiznitzer I, Benz C: Tamoxifene versus raloxifene for treatment of human breast and prostate cancer in vitro. *Breast Cancer Res Treat* 1993;33:305.
30. Baynes KC, Compston JE: Selective estrogen receptor modulators: a new paradigm for HRT. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1998;10(3):189-192.
31. Turner CH, Sato M, Bryant HU: Raloxifene preserves bone strength and bone mass in ovariectomized rats. *Endocrinology* 1994;135:2001-2005
32. Fuchs-Young R, Rippy MK, Dorr FA: Raloxifene diminishes the uterotrophic effects of tamoxifene in treated ovariectomized rats. *Breast Cancer Res Treat* 1994;32:78.

33. Delmas PD, Bjarnason NH, Mitlak BH, Ravoux AC, Shah AS, Huster WJ, Draper MW, Christiansen C: Effects of raloxifene on bone mineral density, serum cholesterol concentrations and uterine endometrium in postmenopausal women. *N Engl J Med* 1997;337(23):1641-1647.
34. Lufkin EG, Whitaker MD, Nickelsen T, Argueta R, Caplan RH, Knickerbocker RK, Ribbs BL: Treatment of established postmenopausal osteoporosis with raloxifene: a randomized trial. *J Bone Miner Res* 1998;13(11):1747-1754.
35. Draper MW, Flowers DE, Huster WJ, Mitlak BH: A controlled trial of raloxifene (LY139481) HCl : impact on bone turnover and serum lipid profile in healthy postmenopausal women. *J Bone Mine Res* 1996;11:835-842.
36. Walsh BW, Kuller LH, Wild RA, Paul S, Farmer M, Lawrence JB, Shah AS, Anderson PW: Effects of raloxifene on serum lipids and coagulation factors in healthy postmenopausal women. *JAMA* 1998;279(18):1445-1451.
37. Cummings SR, Norton L, Eckert S, Grady D, Cauley J, Knickerbocker R, Black DM, Nickelsen T, Glusman J, Krueger K: Raloxifene reduces the risk of breast cancer and may decrease the risk of endometrial cancer in postmenopausal women. Two year findings from the multipl outcomes of raloxifene evaluation trial. Proceedings of American Society of Clinical Oncology 34th annual meeting, Los Angeles, 1998;17:2a/3.
38. Jordan VC, Glusman J, Eckert S, Lippman M, Powles TJ, Costa A, Morrow M, Norton L: Integreted data from multi-center, double blind, randomized trials in 120.000 postmenopausal women. Proceedings of American Society of Clinical Oncology 34th annual meeting, Los Angeles, 1998;17:122a/466.
39. Huster WJ, Shah A, Cohen F: Effect of raloxifene on the endometrium in healthy postmenopausal women. 8th Annual Meeting of the North American Menopause Society, Massachusetss 1997.

40. Baker VL, Draper MW, Paul S, Allerheiligen S, Glant M, Shifren J, Jaffe RB:
Reproductive endocrine and endometrial effects of raloxifene HCl, a selective estrogen receptor modulator, in women with regular menstrual cycles. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83(1):6-13.
41. Strickler R, Stowall DW, Merritt D, Shen W, Wong M, Silfen SL. Raloxifene and estrogen effects on quality of life in healthy postmenopausal women: A placebo-controlled randomized trial. *Obstet Gynecol* 2000;96:359-365.
42. Yaffe K, Kruger K, Sarkar S, Grady D, Barrett-Connor E, Cox DA, Nickerson T.
Cognitive function in postmenopausal women treated with raloxifene. *N Engl J Med* 2001 344:1207–1213.
43. Principles of Neural Sciences Edit By Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM Fourth
2000 Page 1227-80
44. A.R. Genazzani, F. Petraglia and R.H. Purdy *The brain: source and target for sex steroid hormones*, The Parthenon Publishing Group (1996).
45. R. Alonso-Soleis, P. Abreu, I. Leopez-Coviella, G. Hernandez and N. Fajardo ,
Gonadal steroid modulation of neuroendocrine transduction: a transynaptic view. *Cell. Mol. Neurobiol.* 1996;3:357–382.
46. L. Speroff, R.H. Glass and N.H. Kase *Clinical gynecological endocrinology and infertility* (5th edn ed.), Williams and Wilkins, Baltimore MA, USA (1995).
47. N. Panay, R.H. Sands and J.W.W. Studd , Oestrogen and behavior. In: A.R. Genazzani, F. Petraglia and R.H. Purdy, Editors, *The brain: source and target for sex steroid hormones*, The Parthenon Publishing Group 1996;257–276.

48. S.L. Lightman, H.S. Jacobs, A.K. Maguire, G. McGarrick and S.L. Jeffcoate ,
Climacteric flushing: clinical and endocrine response to infusion of naloxone. *Br. J. Obstet. Gynecol.* 1981;88:919–924.
49. T.L. O' Donouhe and D.M. Dorse , The opiomelanotropinergic neuronal and
endocrine system. *Peptides* 3 1982;383–395.
50. E.C. Ditkoff, W.G. Crary, M. Cristo and R.A. Lobo , Estrogen improves
psychological function in asymptomatic postmenopausal women. *Obstet. Gynecol.*
1991;78:991–995.
51. U. Halbreich , Role of estrogen in postmenopausal depression. *Neurology* 48 suppl 7
1997;S16–S20.
52. B.W. Hackman and D. Galbraith , Six month study of oestrogen therapy with
piperazine oestrone sulfate and its effect on memory. *Curr. Med. Res. Opin.* 4 (Suppl)
1977;21–27.
53. P. Fedor-Freybergh , The influence of oestrogen on well being and mental
performance in climacteric and postmenopausal women. *Acta. Obstet. Gynaecol.*
Scand. 1977;64:5–69.
54. S.J. Duff and E.A. Hampson , beneficial effect of estrogen on working memory in
postmenopausal women taking hormone replacement therapy. *Horm. Behav.*
2000;4:262–276.
55. Phillips SM, Sherwin BB. Effects on estrogen on memory function in surgically
menopausal women. *Psychoneuroendocrinology* 1992;17:485–495.

56. Duka T, Tasker R, McGowan JF. The effects of 3-week estrogen hormone replacement on cognition in elderly healthy females. *Psychopharmacology* 2000;149:129–139.
57. Zec RF, Trivendi MA. The effects of estrogen replacement therapy on neuropsychological function in postmenopausal women with and without dementia: a critical and theoretical review. *Neuropsychol Rev* 2002;12:65–109.
58. A.M. Etgen and G.B. Karkanias , Estrogen regulation of noradrenergic signaling in the hypothalamus. *Psychoneuroendocrinology* 1994;19:603–610.
59. Barrett-Connor E, Kritz-Silverstein D. Estrogen replacement therapy and cognitive function in older women. *JAMA* 1993;269:2637–2641.
60. Uchida K. Role of reactive aldehyde in cardiovascular disease. *Free Radical Biol Med.* 2000;28(12):1685-1696
61. Holley AE, Cheeseman KH. Measuring free radical reactions in vivo. *Brit Med Bull.*1993;49(3):494-505
62. Girgin Ferhan. Yaşlanmada MAO inhibitörlerinin sıçan kalp dokusunda oksidan stres ve antioksidan sistemlere etkileri. Doktora Tezi.1996
63. Rumley AG, Paterson JR. Analytical aspects of antioxidants and free radical activity in clinical biochemistry. *Ann Clin Biochem.*1998;35:181-200
64. Donetti E, Soma M R, Barberi L, Paoletti R, Fumagalli R, Roma P, Catapano A L. Dual effects of the antioxidant agents probucol and carvedilol on proliferative and fatty lesions in hypercholesterolemic rabbits. *Atherosclerosis*, 1998; 141: 45-51

65. Sentman ML, Brannström T, Westerlund S, Laukkaanen MO, Yla-Herttuala S, Basu S, Marklund SL. Extracellular superoxide dismutase deficiency and atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:1477-1482
66. Chan PH. Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke.* 1996;27(6):1121-1128
67. Ozgocmen S;Kaya Huseyin;Fadıllıoglu Ersin;Aydoğan Rabia;Yılmaz Zümrüt.Role of antioxidant systems, lipid peroxidation, and nitric oxide in postmenopausal osteoporosis. *Journal Title Molekular and cellular biochemistry* 2007 vol :295 ;1-2:45-52
68. Stralin P, Karlsson K, Johansson BO, Marklund SL. The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15:2032-2036
69. Onur E. Defibrotidin aterosjenik diyet uygulanan tavşanlarda beyin ve böbrek serbest radikal ve antioksidanlara etkisi. Uzmanlık tezi.1999
70. Oury D, Crapo JD, Valnickova Z, Enghild JJ. Human extracellular superoxide dismutase is a tetramer composed of two disulphate-linked dimers: a simplified high - yield purification of extracellular superoxide dismutase. *Biochem J.* 1996;317:51-57
71. Nilsson J.Absence of EC-SOD does not promote atherogenesis in mice.Have we lost yet another player? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:1387-1388
72. Landmesser U, Drexler H. Toward understanding of extracellular superoxide dismutase regulation in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:1367-1368
73. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the oxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J.Biol Chem.*1972;247(10)3170-3175

74. Kampen DL, Sherwin BB. Estrogen use and verbal memory in healthy postmenopausal women. *Obstet Gynecol* 83:979–983.
75. Binder EF, Schechtman KB, Birge SJ, Williams DB, Koher WM. Effects of hormone replacement therapy on cognitive performance in elderly women. *Maturitas* 2001;38:137–146.
76. Kristine Yaffe, M.D., Kathryn Krueger, M.D., Somnath Sarkar, Ph.D., Deborah Grady, M.D., M.P.H., Elizabeth Barrett-Connor, M.D., David A. Cox, Ph.D., and Nickelsen, M.D., for the Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation Investigators. *N Engl J Med*, 2001 Vol. 344
77. Yaffe K, Krueger K, Cummings SR, Blackwell T, Henderson VW, Sarkar S, Ensrud K, Grady D. *Am J Psychiatry* 2005 Apr;162(4):683-90
78. Nilsen J, Mor G, Naftolin F. Raloxifene induces neurite outgrowth in estrogen receptor positive PC12 cells. *Menopause* 1998;5:211-6.
79. Wu X, Glinn MA, Ostrowski NL. Raloxifene and estradiol benzoate both fully restore hippocampal cholin acetyltransferase activity in ovariectomized rats. *Brain Res* 1999;847:98-104.
80. Özgönül M ; Öge A ; Sezer E ; Bayraktar F ; Sözmen E. The effects of estrogen and raloxifene treatment on antioxidant enzymes in brain and liver of ovariectomized female rats. *Endocrine research* 2003, vol. 29, 183-189.
81. Oge A, Sezer E.D., Özgonul M., Bayraktar F, Sözmen E. *Neurosci Lett*. 2003. Mar 6;338:217-20

82. Terek M. C. .Farklı protokoller ile uygulanan hormon replazman tedavisi ve farklı protokoller ile uygulanan hormon replazman tedavisi ve tamoksifenin ovariektomili sıçanlarda kognitif işlevler ve depresyona etkisi. Doktora Tezi 2007.
83. Konyalıoğlu S, Durmaz G , Yalcin A. The potential antioxidant effect of raloxifene treatment:a study on heart, liver and brain cortex of ovariectomized female rats. Cell Biochem Funct 2007; 25: 259–266.
84. Sozmen EY, Sozmen B, Girgin F, Delen Y, Azarsız E, Erdener E, Ersöz B. Antioxidant enzymes and paraoxonase show a co-activity in preserving low density lipoprotein from oxidation. Clin Exp Med. 2001;1:195-199
85. Aebi H. Catalase in vitro. Method Enzymol. 1984;105:121-126
86. Lowry OH, Rosebrough MJ, Al F, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem.1951;193:265-275.