

RATLARA UYGULANAN LEVONORGESTREL VE/VEYA MELATONİNİN HEPATİK GLUTATYON VE MALONDİALDEHİT SEVİYELERİNE ETKİSİ The effects of levonorgestrel and/or melatonin treatment on hepatic glutathione and malondialdehyde levels in rats

Kader KÖSE¹, Cevad YAZICI²

Özet

Amaç: Rat modeli üzerinde, tek başına ya da melatonin (MEL)'e birlikte kullanılan progestin türevi levonorgestrel (LNG)'in, hepatositlerdeki oksidan-antioksidan sistemin komponentlerinden olan redükte (GSH) ve okside (GSSG) glutatyon ile malondialdehit (MDA) seviyeleri üzerine etkisini araştırmak.

Gereç ve Yöntem: Dişi ratlar, beş gün süreyle subkutan olarak LNG (5.0 mg/kg/gün), MEL (25.0 mg/kg/gün), ve bunların kombinasyonu (5.0 mg LNG/25.0 mg MEL/kg/gün) uygulanan gruplar ve kontrol grubu olmak üzere, her biri 10 rat içeren, dört gruba ayrıldı. Son uygulamayı takiben, ratlardan elde edilen karaciğer (KC) dokularında GSH, GSSG ile MDA tayinleri yapıldı ve GSH/GSSG oranları hesaplandı.

Bulgular: Kontrol ve MEL grupları arasında GSH, GSSG seviyeleri ve GSH/GSSG oranlarının birbirinden farklı olmadığı; fakat MDA seviyelerinin MEL grubunda daha düşük olduğu bulundu. Kontrol ve MEL gruplarına göre, LNG grubunda GSH seviyeleri ile GSH/GSSG oranının azaldığı; buna karşılık GSSG ve MDA seviyelerinin yükseldiği belirlendi. LNG ve MEL'in birlikte uygulandığı grupta, LNG grubuna göre, GSSG ve MDA seviyelerinin önemli ölçüde azaldığı; buna karşılık GSH seviyeleri ile GSH/GSSG oranının yükseldiği ve bu değerlerin kontrol grubu değerlerinden istatistik olarak farklı olmadığı gözlemlendi.

Sonuç: Bu çalışmada, LNG'nin yol açtığı oksidatif hasarın, MEL varlığında önlenemediği gözlemlendiğinden; MEL'in bir antioksidan olarak, kontraseptif steroidlerle birlikte kullanılması önerilebilir.

Anahtar Kelimeler: Levonorgestrel, Malondialdehit, Melatonin, Okside glutatyon, Redükte glutatyon

Abstract

Purpose: To investigate the effects of levonorgestrel (LNG), progestin derivative, alone or in combination with melatonin (MEL) on the levels of hepatic reduced (GSH) and oxidised (GSSG) glutathione and malondialdehyde (MDA) which are components of the oxidant-antioxidant system, by using rat as a model.

Material and Methods: Female rats were divided into four groups (10 in each) as follows: 1-subcutaneous treatment group with LNG (5.0 mg/kg/day) 2-subcutaneous treatment group with MEL (25.0 mg/kg/day) 3-subcutaneous treatment group with a combination of 5.0 mg LNG and 25.0 mg MEL/kg/day and also a control group; the subcutaneous injections were performed for five consecutive days. Following the last treatment, the levels of GSH and GSSG and MDA were measured and the ratios of GSH/GSSG calculated in the rat liver tissues.

Results: There were no significant differences with respect to GSH or GSSG levels, and GSH/GSSG ratios between the control and MEL groups; but MDA levels were lower in the MEL group. Although GSSG and MDA levels were found to be higher, GSH levels and GSH/GSSG ratio were lower in the LNG group compared with control and the MEL groups. Significant decreased GSSG and MDA levels, but increased GSH levels and GSH/GSSG ratios were observed in the group treated with LNG and MEL combination, in respect to the LNG group.

Conclusion: Oxidative damage induced by LNG may be prevented in the presence of MEL; therefore the usage of MEL, as an antioxidant, together with contraceptive steroids may be proposed.

Key Words: Levonorgestrel, Malondialdehyde, Melatonin, Oxidized glutathione, Reduced glutathione

Diğer taraftan, KVH riskinin pek çok faktörün yanı sıra serbest oksijen radikalleri (SOR) ile indüklenen oksidatif hasarla da ilişkili olabileceği; hatta aterosklerotik dokularda lipid peroksidasyonunun arttığı ve hastalık riskinin belirlenmesinde lipid peroksit düzeylerinden faydalanılabileceği öne sürülmektedir (4,5).

Oksidan-antioksidan sistemle ilgili olarak, sentetik seks steroidlerinin oksidatif hasara yol açtığı (6,7); antioksidan savunma sistemini baskıladığı ve bu yolla KVH riskini arttırılabileceği (8,9) görüşünü destekleyen çalışmaların yanı sıra; bu steroidlerin antioksidan gibi davrandıkları ya da mevcut antioksidan sistemi güçlendirdikleri (10) şeklinde çelişkili görüşler de mevcuttur.

Pineal bez hormonu olan melatonin (MEL)'in, endokrin fonksiyon ve sirkadien ritim üzerine bilinen etkileri (11)'nden başka; in vitro (12) ve in vivo (13) çalışmalarla antioksidan aktiviteye de sahip olduğu gösterilmiştir.

Başta karaciğer (KC) olmak üzere, organizmada yaygın olarak bulunan ve antioksidan özelliğe sahip olan glutatyon (GSH) (14), ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda da rol oynamaktadır (15). Ksenobiyotiklerin varlığı hepatik GSH tüketimine ve okside glutatyon (GSSG) seviyelerinin yükselmesine yol açacağından; KC'in SOR redükleme kapasitesi azalacaktır (16).

Sentetik seks steroidleri, organizmada ksenobiyotikler gibi metabolize edildiğinden; bu çalışmada, tek başına ya da MEL ile birlikte kullanılan, bir progestin türevi olan levonorgestrel (LNG)'in, hepatik glutatyon ve oksidatif hasarı gösterebilen malondialdehit (MDA) seviyelerine etkileri, rat modeli üzerinde araştırıldı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Grubu: Swiss-albino, 90-120 günlük, ortalama 200 g ağırlığında 40 dişi rat ile çalışma

grubu oluşturuldu. Standart pellet yem ve musluk suyu ile beslenen ratlar, deney süresince normal oda sıcaklığı ve neminde tutuldu. Ratların 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık döngüsünde bulunmaları sağlandı.

Deney Planı: Ratlar LNG, MEL, LNG-MEL uygulanan gruplar ve kontrol grubu olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Çalışmada kullanılan LNG (Sigma, N-2260) ve MEL (Sigma, M-5250), absolü etanolde çözüldükten sonra; Tablo 1'de gösterilen dozlarda olacak şekilde, propilen glikol (PEG; Sigma, P-1009) ile uygun biçimde dilüe edilerek beş gün süreyle, ratlara subkutan yolla uygulandı.

Son enjeksiyonu takiben, bir gece aç bırakılan ratların, ertesi sabah eter anestezisi altında KC'leri çıkarıldı. Soğuk serum fizyolojik ile birkaç kez yıkanan KC'ler, küçük parçalar halinde, çalışma gününe kadar -20°C'de bekletildi.

KC dokularından hazırlanan homojenatlarda total (GSH ve GSSG) ve okside (GSSG) glutatyon seviyeleri, Tietz (17) tarafından geliştirilen metoda göre bir ay içerisinde tayin edildi (18).

GSSG standart eğrisi üzerinden değerlendirilen total ve okside glutatyon seviyeleri, mikromol/g doku şeklinde ifade edildi. Total glutatyon değerlerinden, GSSG değerleri çıkarılarak GSH seviyeleri bulundu; ayrıca GSH/GSSG oranları hesaplandı.

KC doku homojenatlarında yapılan MDA tayininde Ohkawa ve ark (19)'nın metodu kullanıldı. Doku MDA seviyeleri, MDA standart eğrisi üzerinden değerlendirildi (nmol/ml). Aynı homojenatlarda, standart olarak bovine serum albumin kullanılarak, protein tayini de yapılarak (20); sonuçlar miligram protein başına verildi (nmol MDA/mg protein).

Çalışma gruplarından elde edilen veriler, SPSS for Windows 6.0 paket bilgisayar programı (ANOVA ve post-ANOVA-Scheffe) kullanılarak, istatistikî olarak karşılaştırıldı. Anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

BULGULAR

Çalışma gruplarında tayin edilen doku MDA, GSH ve GSSG seviyeleri ile GSH/GSSG oranları Tablo II'de gösterildi. Tabloda yer alan bulgular, aritmetik ortalama standart sapma (X SD) şeklinde verildi.

Tabloda görüldüğü gibi, doku MDA seviyeleri kontrol grubuna göre, MEL grubunda daha düşük; buna karşılık LNG grubunda daha yüksek olarak bulundu ($p < 0.01$). MEL grubu ile yapılan karşılaştırmada, doku MDA seviyelerinin hem LNG hem de LNG-MEL grubunda daha yüksek olduğu gözlemlendi ($p < 0.01$). LNG ile LNG-MEL grupları karşılaştırıldığında, doku MDA seviyelerinin LNG grubunda daha yüksek olduğu belirlendi ($p < 0.01$).

Kontrol ve MEL gruplarında, doku GSH ve GSSG seviyeleri ile GSH/GSSG oranlarının, istatistiki olarak birbirinden farklı olmadığı görüldü ($p > 0.05$). Kontrol ve MEL gruplarıyla karşılaştırıldığında; LNG grubunda, GSH değerlerinin azaldığı; GSSG değerlerinin yükseldiği ve GSH/GSSG oranlarının anlamlı şekilde düştüğü belirlendi ($p < 0.01$). LNG-MEL grubunda ise, LNG grubuna göre, GSH seviyeleri ile GSH/GSSG oranlarının yükseldiği, GSSG'nin azaldığı gözlemlendi ($p < 0.05$, $p < 0.01$). Diğer taraftan LNG-MEL grubu, kontrol ve MEL gruplarıyla karşılaştırıldığında, MDA ve GSH seviyelerinin kontrol grubundan farklı olmadığı belirlendi ($p > 0.05$).

Tablo I. Çalışma grubunu oluşturan ratların deney planı

Gruplar	Uygulanan Doz
Kontrol	1.0 ml PEG/kg rat ağırlığı/gün
MEL	25 mg MEL/ 1.0 ml PEG/kg rat ağırlığı/gün
LNG	5 mg LNG/ 1.0 ml PEG/kg rat ağırlığı/gün
LNG-MEL	5 mg LNG/25 mg MEL/ 1.0 ml PEG/kg rat ağırlığı/gün

Tablo II. Çalışma gruplarının karaciğer dokusu MDA, GSH ve GSSG seviyeleri ile GSH/ GSSG oranları

GRUPLAR	n	MDA (nmol/mg prot)	GSH (mmol/g doku)	GSSG (mmol/g doku)	GSH/GSSG
KONTROL	10	0.560 0.087	6.07 0.57	0.113 0.011	53.82 4.48
MEL	10	0.420 0.063*	6.20 0.52	0.120 0.003	51.58 4.22
LNG	10	0.740 0.106*,a	4.58 0.57 *,a	0.320 0.022*,a	14.32 1.77*,a
LNG-MEL	10	0.580 0.057b,d	5.37 0.48 c,e	0.135 0.011**,d	39.90 3.04*, b, d
F (ANOVA)		28.88	20.16	504.123	220.70
p değeri		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

İstatistiki karşılaştırma:

-*: $p < 0.01$; **: $p < 0.05$: Kontrolle karşılaştırma ve

-a: $p < 0.01$: MEL-LNG,

-b: $p < 0.01$; c: $p < 0.05$: MEL-(LNG-MEL),

-d: $p < 0.01$; e: $p < 0.05$: LNG-(LNG-MEL) gruplarının birbiriyle karşılaştırılması şeklinde yapıldı

TARTIŞMA

Glutatyon, glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GSSG-Rd) ve glukoz-6-fosfat dehidrojenaz (G6PD)'dan oluşan glutatyon redoks siklusu; hücrelerde SOR tarafından indüklenen toksisiteye ve ksenobiyotiklerin biyoredüksiyonuyla oluşan reaktif ara ürünlere karşı, antioksidan savunma sisteminin önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Siklus sırasında, peroksitlerin redüksiyonunu katalizleyen GSH-Px reaksiyonu ile oksitlenen glutatyon (GSSG); G6PD ile sağlanan NADPH varlığında, GSSG-Rd tarafından yeniden GSH'a redüklenmektedir (14). Glutatyonun redükte formda tutulması, GSH ile ilgili pek çok fonksiyonun gerçekleşmesi bakımından önemlidir. Bunlardan birisi de, ksenobiyotiklerin metabolizması sırasında açığa çıkan elektrofilik reaktantlara karşı GSH'ın enzimatik ya da nonenzimatik reaksiyonlarla, doku makromoleküllerinde bulunan serbest tiyoller ve diğer nükleofilik grupları korumasıdır (21). Ksenobiyotiklerin varlığında hepatik GSH'ın tüketilmesine bağlı olarak, KC'in SOR redükleme kapasitesinin azalması kaçınılmazdır (14).

Son yıllarda intraselüler GSH seviyelerindeki azalma, oksidatif hasar için erken bir bulgu olarak değerlendirildiğinden; normalde yüksek olması gereken intraselüler GSH/GSSG oranı, oksidatif hasarı yansıtan faydalı bir indikatör olarak kabul edilmektedir (22).

Kontrasepsiyon ya da yerine koyma amacıyla kullanılan sentetik seks steroidlerinin oksidan-antioksidan sistemle ilgili olarak KVH riskini indükleyebilecekleri (6-9) ya da azaltabilecekleri (10) halen tartışılmakla beraber; haloalkanlarla birlikte progesteron uygulanan ratların KC dokusunda MDA seviyelerinin yükseldiği belirlenmiştir (23). Maymunlara uygulanan LNG'nin, LDL oksidasyonu yoluyla, ateroskleroz olabileceği de gösterilmiştir (3).

Durand ve ark (24,25)'na göre, kontraseptif steroidlerin oksidatif hasara yol açmasının başlıca

nedeni SOR üretimini artırmalarıdır. Bu hipotezi destekler şekilde, hepatik mikrozomal sitokrom P-450 sisteminde, estrogenlerin redoks siklusu sırasında, serbest radikallerin üretildiği gösterilmiştir (26). İzole rat hepatositleri üzerinde yapılan in vitro bir çalışmada da, estradiolün GSH seviyelerini düşürdüğü gözlenerek, estradiolün detoksifikasyonu sırasında açığa çıkan reaktif metabolitlerin intraselüler GSH'ı tüketebileceği sonucuna varılmıştır (27).

Her ne kadar progestinlerin mikrozomal sistemdeki redüksiyonu ile ilgili yeterli düzeyde literatür bilgisi olmasa da; progestin türevlerinin de estrogenlere benzer şekilde, metabolizmaları sırasında SOR üretimine yol açabilecekleri varsayılabilir.

Bu çalışmada, LNG uygulamasıyla hepatik GSSG ve MDA seviyelerinin yükseldiği, buna karşılık GSH seviyeleri ile GSH/GSSG oranının azaldığı gözlemlendiğinden; LNG'nin oksidatif hasarı indükleyebileceği düşünülebilir. LNG'nin mikrozomal sitokrom P-450 sisteminde metabolize edilmesi sırasında, SOR üretiminin yanı sıra, GSH'ın tüketildiği ve sürekli GSH oksidasyonu ile GSSG seviyeleri yükselirken GSH/GSSG oranının düştüğü ve böylece KC'in SOR redükleme kapasitesinin azaldığı öne sürülebilir.

Literatürde, sentetik seks steroidleriyle birlikte vitamin E gibi antioksidan preparatların kullanılmasını öneren çalışmalar da vardır (6,28). Bilinen antioksidanlar içerisinde, MEL'in en güçlü radikal (özellikle OH. ve ROO.) tutucu olduğu gösterilmiştir (12,29).

Ratlara uygulanan bakteriyel lipopolisakkarit (30,31) ve safrol (32) ile indüklenen oksidatif KC hasarının, MEL ile tamamen önlenemediği (30,32); hepatik GSSG seviyelerinin azaldığı (31); ratların KC'inde oluşturulan iskemi-reperfüzyon hasarı ile yükselen MDA, GSSG ve azalan GSH seviyelerinin, MEL varlığında normal düzeylere ulaştığı (18) ve ayrıca yaşlı ratlara uygulanan MEL'in KC MDA seviyelerini baskımlarken GSH'ı yükselttiği (33) bildirilmektedir.

Sentetik steroidlerle birlikte MEL kullanımının oksidan-antioksidan sistem üzerine etkilerini kapsayan literatür bulgusu olmamasına rağmen; bu çalışmada MEL uygulanan gruplarda doku MDA seviyelerindeki azalmanın yanı sıra; GSH'ın yükselerek ve GSSG'nin azalarak bazal değerlere yaklaşması ve GSH/GSSG oranının yükselmiş olması; MEL'in antioksidan özelliklerini vurgulayan çalışmalarla uyumlu bulgulardır.

Sonuç olarak, bu çalışmada LNG'nin yol açtığı oksidatif hasarın, MEL varlığında önlenebildiği gözlemlendiğinden; LNG'nin detoksifikasyonu sırasında üretilen radikallerin MEL tarafından tutulabildiği öne sürülebilir ve bu nedenle MEL'in kontraseptif steroidlerle birlikte kullanılabileceği önerilebilir.

KAYNAKLAR

1. Fotherby K. Oral contraceptives, lipids and cardiovascular disease. *Contraception* 31: 367-394, 1985.
2. Brawn KH, Hammond CB. The risks and benefits of oral contraceptives. *Adv Intern Med* 1989; 34: 285-305.
3. Manning JM, Edwards IJ, Wagner WD, Wagner JD, Adams MR, Parks JS. Effects of contraceptive estrogen and progestin on the atherogenic potential of plasma LDLs in cynomolgus monkeys. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 1216-1223.
4. Kostner JF, Biemond P, Stam H. Lipid peroxidation and myocardial ischemic damage: Cause or consequence? *Basic Res Cardiol* 1987; 82: 253-260.
5. Piotrowski JJ, Hunter GC, Eskelson CD, Dubick MA, Bernhard VM. Evidence for lipid peroxidation in atherosclerosis. *Life Sci* 1990; 46: 715-721.
6. Ciavatti M, Blache D, Renaud S. Hormonal contraceptive increases plasma lipid peroxides in female rats. *Arteriosclerosis* 1989; 9: 84-89.
7. Köse K, Doğan P, Özesmî Ç. Contraceptive steroids increase erythrocyte lipid peroxidation in female rats. *Contraception* 1993; 47: 421-425.
8. Jendryczko A, Tomalu J, Janosz P. Effect of two low-dose oral contraceptives on erythrocyte superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities. *Zentralbl Gynakol* 1993; 115: 469-472.
9. Ciavatti M, Renaud S. Oxidative status and oral contraceptive. Its relevance to platelet abnormalities and cardiovascular risk. *Free Radic Biol Med* 1991; 10: 325-338.
10. Massafra C, Buonocore G, Gioia D, Sargentini I, Farina G. Effects of estradiol and medroxyprogesterone acetate treatment on erythrocyte antioxidant enzyme activities and malondialdehyde plasma levels in amenorrhoeic women. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 173-175.
11. Brzezinski A. Melatonin in humans. *N Engl J Med* 1997; 336: 186-195.
12. Pakkla R, Zilmer M, Kullisaar T, Rago L. Comparison of the antioxidant activity of melatonin and pinoline in vitro. *J Pineal Res* 1998; 24: 96-101.
13. Giusti P, Lipartiti M, Franceschini D, Schiavo N, Floreani M, Manev H. Neuroprotection by melatonin from kainate-induced excitotoxicity in rats. *FASEB J* 1996; 10: 891-896.
14. Reed DJ. Regulation of reductive processes by glutathione. *Biochem Pharmacol* 1986; 35: 7-13.
15. Voet D, Voet JG. *Biochemistry* (2nd ed.). Wiley J & Sons Inc, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore 1995, p 712.
16. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine* (2nd ed). Clarendon Press, Oxford 1989, pp 10, 73-128, 247-249.
17. Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione. *Anal Biochem* 1969; 27: 502-522.
18. Sewerynek E, Reiter RJ, Melchiorri D, Ortiz GG, Lewinski A. Oxidative damage in the liver induced by ischemia reperfusion: Protection by melatonin. *Hepatogastroenterology* 1996; 43: 898-905.
19. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric

- acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-358.
20. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
 21. Akerboom TPM, Sies H. Assay of glutathione, glutathione disulfide and glutathione mixed disulfides in biological samples. In: Colowick SP, Kaplan NO (eds), *Methods Enzymol, Volume 77*. Academic Press, Inc. New York, San Fransisco, London, 1981, pp 373-382.
 22. Rumley AG, Paterson JR. Analytical aspects of antioxidants and free radical activity in clinical biochemistry. *Ann Clin Biochem* 1998; 35:181-200.
 23. Rana SVS, Kumar S. Effect of sex hormones on lipid peroxidation in the necrotic liver of rat. *Gegenbaurs Morphol Jahrb* 1987; 133: 657-663.
 24. Durand P, Blache D. Enhanced platelet thromboxane synthesis and reduced macrophage-dependent fibrinolytic activity related to oxidative stress in oral contraceptive treated female rats. *Atherosclerosis* 1996; 121: 205-216.
 25. Durand P, Prost M, Blache D. Folic acid deficiency enhances oral contraceptive-induced platelet hyperactivity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 1939-1946.
 26. Wyllie S, Liehr JG. Release of iron from ferritin storage by redox cycling of stilbene and steroid estrogen metabolites: a mechanism of induction of free radical damage by estrogen. *Arch Biochem Biophys* 1997; 346:180-186.
 27. Larrea MBR, Garrida MJ, Lacort M. Estradiol-induced effects on glutathione metabolism in rat hepatocytes. *J Biochem* 1993; 113: 563-567.
 28. Gürdöl F, Genç S, Iyidoğan YÖ. Postmenapozal hormon replasman tedavisine alınmış olgularda plazma total antioksidan kapasitesinin incelenmesi. *Jinekoloji ve Obstetrik Dergisi*1997;11:216-220.
 29. Tan D-X, Chen L-D, Poeggeler B, Manchester LC, Reiter RJ. Melatonin: a potent endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endoer J* 1993; 1: 57-60.
 30. Sewerynek E, Melchiorri D, Reiter RJ, Ortiz GG, Lewinski A. Lipopolysaccharide-induced hepatotoxicity is inhibited by the antioxidant melatonin. *Eur J Pharmacol* 1995; 293: 327-334.
 31. Sewerynek E, Abe M, Reiter RJ et al. Melatonin administration prevents lipopolysaccharide-induced oxidative damage in phenobarbital-treated animals. *J Cell Biochem* 1995 ; 58:436-444.
 32. Tan D-X, Poeggeler B, Reiter RJ et al. The pineal hormone melatonin inhibits DNA-adduct formation induced by the chemical carcinogen safrole in vivo. *Cancer Lett* 1993; 70: 65-71.
 33. Akbulut KG, Gön IB, Akbulut H. Differential effects of pharmacological doses of melatonin on malondialdehyde and glutathione levels in young and old rats. *Gerontology* 1999; 45: 67-71.