

Overektomi uygulanan sıçanlarda uterus dokuları üzerinde astaksantin etkisi: histopatolojik çalışma*

Effect of astaxanthin on uterus tissues in ovariectomized rats: a histopathological study*

Esra Bihter Gürler¹, Özlem Tuğçe Çilingir Kaya²¹Atlas Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, İstanbul²Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

Esra Bihter Gürler orcid.org/ 0000-0001-8259-521X

Özlem Tuğçe Çilingir Kaya orcid.org/ 0000-0002-2591-9174

Öz

Amaç: Güçlü bir antioksidan olarak bilinen astaksantin (AST), inflamasyona karşı yararlı etkilere sahiptir. Bu çalışmada, overektomili sıçanlarda astaksantin uterus dokuları üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Sprague-Dawley sıçanlar (n = 18); rastgele üç gruba ayrıldı (n = 6): sağlıklı kontrol, overektomi (OVT) ve overektomi+ astaksantin (OVT + AST). AST (1 mg / ml), overektomiden dört hafta önce başlanarak günlük 50 ml su ile deney grubuna oral yoldan verildi. AST tedavisi overektomi sonrası dört hafta daha sürdürüldü. Sekizinci haftanın sonunda, hayvanlar servikal dislokasyon ile ötenazi edildi. Ötenazi sonrası uterus formalin ile sabitlendi ve Hematoksin-Eozin boyaması ile histolojik açıdan incelendi.

Bulgular: OVT ile ortaya çıkan uterus epitelinde apiko-bazal yükseklikteki azalma ve hücresel bozulma, uterus bezlerindeki dejenerasyon ve stromadaki inflamasyon belirtileri, AST uygulanan sıçanlarda kontrole yakın düzelme göstermiştir.

Sonuç: Tuba uterina, uterus ve vajinada menopoza sonrası ortaya çıkan değişiklikler menopozun klinik bulgularıyla yakından ilişkilidir. Astaksantin bu dokular üzerindeki olumlu etkisinin mekanizmasının araştırılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Astaksantin, uterus, postmenopoz

Abstract

Objective: Astaxanthin (AST), known as a powerful antioxidant, has beneficial effects against inflammation. In this study, the effect of astaxanthin on uterine tissues in ovariectomized rats was investigated.

Material and Methods: Sprague-Dawley rats (n = 18); randomly divided into three groups (n = 6): healthy control, ovariectomy (OVT) and ovariectomy + astaxanthin (OVT + AST). AST (1 mg/ml) was given orally to the experiment group with 50 ml of water daily starting four weeks prior to ovariectomy. AST treatment was continued for another four weeks after ovariectomy. At the end of the 8th week, animals were euthanized by cervical dislocation. The uterus removed after euthanasia was fixed with formalin and examined with Hematoxylin & Eosin staining.

Results: The symptoms of decrease in epithelial apico-basal thickness and cellular deterioration in the uterine epithelium caused by OVT, degeneration in the uterine glands, and inflammation in the stroma showed improvement in AST treated rats.

Conclusion: The changes occurring in the tuba uterina, uterus, and vagina after atrophic menopause are closely related to the clinical manifestations of menopause. The mechanism of the positive effect of astaxanthin on these tissues should be investigated.

Key words: Astaxanthin, uterus, postmenopause

Genel Tıp Derg 2021;31(1):40-44

Alınan: 02.08.2020 / 16.09.2020 / Yayınlanma: 30.03.2021

Yazışma adresi: Esra Bihter Gürler, Atlas Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

E-posta: ebgurur@gmail.com

Giriş

Astaksantin (ATX), güçlü serbest radikal süpürücü özelliğiyle bilinen doğal bir karotenoiddir (1). Antioksidan etkisini, hücre membranlarını ve hücreleri lipid peroksidasyon ve oksidatif hasardan koruyarak göstermektedir. Ayrıca çeşitli kardiyovasküler hastalıkların hayvan modellerinde antiaterojenik ve antioksidan etkisi de gösterilmiştir (2,3).

Üreme yaşlanmasının bir formu olan menopoza, ovariumun foliküler aktivitesinin ve nihayetinde menstrual döngünün kalıcı olarak kesilmesi olarak tanımlanır (4,5). Normalde menopoza vücudun doğal bir sürecidir; bununla birlikte, cerrahi, kemoterapi veya iyatrojenik nedenlerin bir sonucu da olabilir (4). Ayrıca, menopoza sırasında üreme yaşlanmasının ayrılmaz iki hormonu olan progesteron ve östrojen üretilmemektedir (6-8).

Oksidatif stres, yaşlanma sürecinin ayrılmaz bir parçasıdır ve vücudun antioksidan savunma mekanizmalarını bozan reaktif oksijen türleri (ROT) gibi serbest radikallerin aşırı üretiminden kaynaklanır. Normal olarak, antioksidanlar ROT'u nötralize eder ve böylece oksidatif strese aşırı maruz kalmayı önlemeye yardımcı olurlar. (9,10) Bununla birlikte, vücut yaşlandıkça doğal antioksidan seviyeleri azalır (11,12). Bu düşüş, kadın üreme sisteminde kademeli östrojen kaybı ile birlikte kalp hastalığı, vazomotor rahatsızlıklar ve osteoporoz gibi çeşitli menopoza sendromları ile büyük ölçüde ilişkilidir (12,13). Östrojendeki belirgin azalmanın, bu hormonun konsantrasyonuna ve kimyasal yapısına bağlı olarak vücuttaki oksidatif stres seviyelerini artırdığı gösterilmiştir (14).

Menopoza, doğal bir antioksidan olan östrojenin azalması nedeniyle vücutta pro-oksidan bir durum oluşturur (15,10). Bu durum da oksidatif stresin menopoza yol açıp açmayacağı sorusunun ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Yapılan birçok çalışmada, menopoza öncesi kadınlarda tek başına oksidatif stresin menopoza uyaramadığı, öte yandan çeşitli patolojilere yol açabileceği gösterilmiştir. Çalışmalarda özellikle oksijen radikallerinin ovarium içinde önemli bir fizyolojik role sahip olduğu vurgulanmıştır. Bununla birlikte, bu zararlı ajanların zaman içinde sürekli sentezi, ovarium patolojilerinde kümülatif riskin artmasına neden olabilir. Söz konusu patolojiler, enfeksiyon ve otoimmün hastalıklar gibi antioksidan du-

rumun azaldığı koşullar altında alevlendiği ileri sürülen erken ovarium yetmezliğini de içermektedir (16).

Yapılan bu çalışmada, astaksantin menopoza ortaya çıkan uterus atrofi üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem

Deney hayvanları

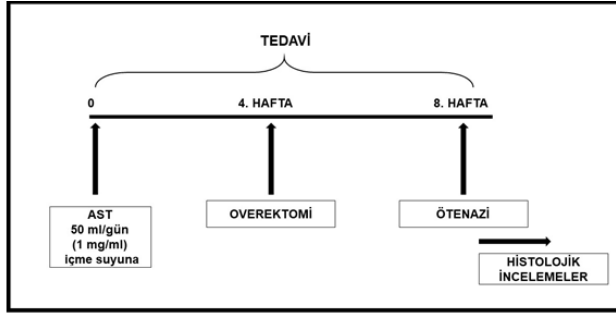
Bu çalışma için Marmara Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan deneysel ve diğer bilimsel amaçlar için kullanılan hayvanların refah ve korunmasına dair yönetmeliğe ve Newyork Bilimler Akademisinin kılavuzuna uygun olarak izin alınmıştır (35.2020mar). Marmara Üniversitesi'nden temin edilen, 6-10 aylık 18 adet dişi Sprague Dawley sıçan kapalı zarf usulü ile seçilerek yalancı opere grup (kontrol; n=6), overektomi grubu (OVT; n=6) ve astaksantin+overektomi (OVT+AST; n=6) olacak şekilde gruplandırılmıştır. Normal koşullar altında (20-22 °C, %65-70 nem) deney gruplarında birer, kontrol gruplarında üçer olarak kafeslere yerleştirilen sıçanlara, 12 saat gündüz /12 saat gece düzeninde ışık uygulanmıştır. Deney süresince yem ve su tüketimleri ad libitum olarak sağlanmıştır.

Deney protokolü ve cerrahi yöntem

İlk 4 hafta boyunca deney grubundaki sıçanların (n=6) suyuna (50 ml) 50 mg astaksantin katılmıştır. (Şekil I) Deney grubunda yer alan her bir hayvan ayrı olarak kafeslenerek içme sularının tamamını tüketmeleri sağlanmıştır. Astaksantin eklenmiş su tüketimini bitiren hayvanların suya sınırsız erişimlerine izin verilmiştir. Dördüncü haftanın sonunda deney ve kontrol gruplarına overektomi, sağlıklı kontrol grubuna ise yalancı cerrahi uygulanmıştır. Overektomi, 100 mg/kg ketamin (Ketalar) ve 10 mg/kg ksilazin (Rompun) anestezisi altında yapılan abdominal kesi ile ovariumların ortaya çıkarılmasının ardından 3/0 ipekle ligatüre edilerek ligatürün üst kısmından eksize edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Deri ve kaslar 2/0 ipekle sütüre edilmiştir. Yalancı cerrahi grubunda ise yalnızca abdominal kesi yapılarak bölge dikilmiştir.

Sekizinci haftanın sonunda, eter anestezisi altında servikal dislokasyonla dekapite edilen hayvanların uterusları histopatolojik inceleme için %10 formalinde fikse edilmiştir.

Şekil 1.



Histolojik analiz

Işık mikroskopik incelemeler için, tüm deney gruplarından elde edilen uterus dokuları %10 formaldehit ile fikse edilerek rutin histolojik takip prosedürü uygulanmıştır (Leica, TP1020). Özetle, yükselen alkol serilerinden (%70, 90, 96 ve 100) geçirilerek dehidrate edilen dokular, ksilen içerisinde şeffaflandırılmıştır. Gece boyu sıvı parafinde inkübe edilen uterus doku örnekleri, parafine gömülerek bloklanmıştır. 5µm kalınlığında kesilen (Leica, RM-2125RT) doku örnekleri, cam lamalar üzerine alınmıştır. Dokuları içeren parafin kesitler, ksilen ile deparafinize edilerek hematoksilin ve eozin boyaması için hazırlanmıştır. Boyalı kesitler, Olympus BX51 ışık mikroskopunda histopatolojik değişiklikler açısından değerlendirilmiş ve Olympus DP72 kamera sistemi kullanılarak fotoğraflanmıştır.

Bulgular

Kontrol grubu sıçanların uterus dokularının, düzgün morfolojide hücrelere sahip endometriyum epiteli ile normal bez yapılarını içeren, düzenli şekilde organize olmuş stromaya sahip olduğu görülmüştür. Overektomi uygulanan sıçanların uterus dokuları incelendiğinde, mukoza tabakasında incelmeye, endometriyum yüzey epitelinde ileri derecede dejenerasyon ve epitel hücre yüksekliğinde azalma olduğu, uterus bezlerinin epitel hücrelerinin sitoplazma kaybı ile yer yer hiyalin kast oluşumu gösterdiği belirlenmiştir. Bununla birlikte, endometriyal stromada polimorfonükleer hücre infiltrasyonuna rastlanmıştır. Astaksantin uygulanan overektomi grubunda ise, genel görünümün kontrole benzer yapıda olduğu, endometriyal yüzey epitel hücrelerinin yüksekliğinin normal seviyelerde olduğu ve

prizmatik şekline geri döndüğü belirlenmiştir. Bez yapıların normal histolojik morfolojiye sahip olduğu gözlenmiştir, ancak bunun yanında, stromada yer yer eozinofilik hücre infiltrasyonu görülmüştür.

Tartışma

Sağlıklı kadınlarda serbest radikaller ve bunların ortadan kaldırılmasını sağlayan antioksidan mekanizmalar arasında homeostatik bir denge vardır. Bu nedenle, menopoza öncesi oksidatif stres seviyesi, menopoza başlangıcına kadar üreme organlarını etkileyecek kadar yeterli değildir.

Bir çeşit üreme yaşlanması olan menopoza, ovaryum foliküllerinin aktivitesinin ve nihayetinde menstrual dönünün kalıcı olarak kesilmesi olarak tanımlanır (17,18). Menopozla beraber azalan östrojen vücutta prooksidan bir duruma sebep olmaktadır (19, 20). Östrojenle beraber progesteronda da ortaya çıkan düşüş (21-23) sıcak basmaları, gece terlemeleri, meme hassasiyeti, vajinal kuruluk ve endometriyal değişimlere yol açar (6, 24).

Endometriyum, gonadotropin ve ovaryum hormonlarındaki değişime hassasiyetle cevap verdiği için menstrual döngünün bir aynasıdır. Endometriyumun histolojik görünümü menopozdan önceki son hormonal paterne göre değişir. Son döngü yetersiz proliferasyon veya sekresyonla sona erdiğinde, basit atrofi yoğun ve lifli bir stroma içinde atrofik epitel ile kaplı seyrek ve dar bezler olarak görünecektir. Östrojen seviyelerindeki düşüşten önce düzensiz proliferasyon veya kistik bezlerde hiperplazi meydana gelirse kistik atrofi belirginleşmektedir (24,25). Menopoz öncesi endometriyum daha kalınken menopozla beraber miyometriyumdaki incelmeye fibröz doku ve atrofi eşlik eder (26).

Pek çok araştırma, antioksidan açısından zengin gıdaların menopozla beraber ortaya çıkan semptomlara faydalı olduğunu göstermiştir (27-29). Bunlar arasında Vitamin C, Vitamin E, fitoöstrojenler, melatonin öne çıkmaktadır (30-32). Astaksantin, β-karoten, vitamin E, Vitamin C ile kıyaslandığında göreceli olarak çok güçlü bir antioksidandır (33). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada ise Vitamin E ile sinerjistik etkisi gösterilmiştir (34). 20 yıldan bu yana ise diyetle alınan astaksantin herhangi bir zararlı etkisi rapor edilmemiştir (35). Son çalışmalar, astaksantin erkek üreme sistemindeki oksidasyon ve antioksidanlar

arasındaki dinamik dengeyi etkili bir şekilde düzenleyerek infertilite üzerine olumlu etki gösterdiğini ortaya koymaktadır (36,37). Benzer olarak, astaksantin ineklerde luteal fonksiyonu artırdığı gösterilmiştir (38).

Post-menopozal dönemdeki hormonal değişikliklerin ve özellikle östrojen miktarında azalmanın; tuba uterina, uterus ve vajinada atrofik değişikliklere neden olduğu ve bu histolojik değişikliklerin, hastalardaki klinik bulgularla da yakından ilişkili olduğu bilinmektedir. Söz konusu histolojik değişikliklere örnek olarak, uterus yüzey epitel hücrelerinde dejenerasyon, endometriyumda görülen hiperplazi, uterusun bez yapılarında peynir benzeri dejenerasyon görüntü veya kistik bez oluşumları verilebilir (24).

Bizim çalışmamızda, önceki çalışmalara paralel olarak, OVT grubunda yüzey epitel hücrelerinde dejenerasyon, atrofiye uğramış dejenerasyon bez yapıları, yer yer hiyalin kast oluşumları ve stromada inflamasyon işaretleri gözlenmiştir (39). AST uygulaması, stromadaki inflamasyon ve fibrozis etkilerini oldukça azaltmıştır. Bu da AST'nin, antioksidan etkinliğini OVT uygulanmış uterus dokusu üzerinde de gösterdiğine işaret etmektedir.

Sonuç

OVT grubundaki histolojik görünümün AST uygulamasından sonra kontrol grubundakine yaklaşması, AST'nin uterus üzerindeki iyileştirici etkisini ortaya koymaktadır. Çalışmamızda astaksantin uterus üzerindeki bu etkisi ilk kez ortaya konulmuştur. Ancak, bu etki ve mekanizmasının daha ileri çalışmalarla araştırılması gerekmektedir.

Kaynaklar

1. Fassett RG, Coombes JS. Astaxanthin, oxidative stress, inflammation and cardiovascular disease. *Future Cardiol* 2009; 5: 333–42.
2. Wolf AM, Asoh S, Hiranuma H, Ohsawa I, Iio K, Satou A, Ishikura M, Ohta S. Astaxanthin protects mitochondrial redox state and functional integrity against oxidative stress. *J Nutr Biochem* 2010; 21: 381–9.
3. Jacobsson LS, Yuan XM, Zieden B, Olsson AG. Effects of alpha-tocopherol and astaxanthin on LDL oxidation and atherosclerosis in WHHL rabbits. *Atherosclerosis* 2004; 173: 231–7.
4. Mishra GD, Kuh D. Health symptoms during mid-life in relation to menopausal transition: British prospective cohort study. *BMJ* 2011; 344: e402.
5. Te Velde ER, Scheffer GJ, Dorland M, Broekmans FJ, Fauser BC. Developmental and endocrine aspects of normal ovarian aging. *Mol Cell Endocrinol* 1998; 145:67–73.
6. Li Q, Geng X, Zheng W, Tang J, Xu B, Shi Q. Current understanding of ovarian aging. *Sci China Life Sci* 2012; 55:659–69.
7. Djahanbakhch O, Ezzati M, Zosmer A. Reproductive ageing in women. *J Pathol* 2007; 211:219–31.
8. Fitzgerald C, Zimon AE, Jones EE. Aging and reproductive potential in women. *Yale J Biol Med* 1988; 71:367–81.
9. Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, Shaman A, Gupta S. The role of oxidative stress of female reproduction: A review. *Reprod Biol Endocrinol* 2012;1 0:1–32.
10. Ruder EH, Hartman TJ, Bumberg J, Goldberg MB. Oxidative stress and antioxidants: Exposure and impact on female infertility. *Hum Reprod Update* 2008; 14: 345–57.
11. Witteman JC, Grobbee DE, Kok FJ, Hofman A, Valkenburg HA. Increased risk of atherosclerosis in women after the menopause. *BMJ* 1989;298: 642–4.
12. Becker BN, Himmelfarb J, Henrich WL, Hakim RM. Reassessing the cardiac risk profile in chronic hemodialysis patients: A hypothesis on the role of oxidant stress and other non-traditional cardiac risk factors. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8:475–86.
13. Bittner V. Menopause, age, and cardiovascular risk: A complex relationship. *J Am Coll Cardiol* 2009; 54:2374–5.
14. Wang Z, Chandrasena ER, Yuan Y, Peng KW, van Breen RB, Thatcher GR, Bolton JL. Redox cycling of catechol estrogens generating apurinic/apyrimidinic sites and 8-oxo-deoxyguanosine via reactive oxygen species differentiates equine and human estrogens. *Chem Res Toxicol* 2010; 23:1365–73.
15. Rannevik G, Jeppsson S, Johnell O, Bjerre B, Laurell-Borulf Y, Svanberg L. A Longitudinal study of the perimenopausal transition: Altered profiles of steroid and pituitary hormones, SHBG, and bone mineral density. *Maturitas* 1995; 21:103–13.
16. Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, Shaman A,

- Gupta S. The role of oxidative stress of female reproduction: A review. *Reprod Biol Endocrinol* 2012; 10:1–32.
17. Mishra GD, Kuh D. Health symptoms during mid-life in relation to menopausal transition: British prospective cohort study. *BMJ* 2011;344: e402.
 18. Sluijmer AV, Heineman MJ, Koudstaal J, Theunissen PH, de Jong FH, Evers JL. Relationship between ovarian production of estrone, estradiol, testosterone, and androstenedione and the ovarian degree of stromal hyperplasia in postmenopausal women. *Menopause* 1998; 5: 207–10.
 19. Rannevik G, Jeppsson S, Johnell O, Bjerre B, Laurell-Borule Y, Svanberg L. A Longitudinal study of the perimenopausal transition: Altered profiles of steroid and pituitary hormones, SHBG, and bone mineral density. *Maturitas* 1995;21: 103–13.
 20. Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, Shaman A, Gupta S. The role of oxidative stress of female reproduction: A review. *Reprod Biol Endocrinol* 2012; 10: 1–32.
 21. Li Q, Geng X, Zheng W, Tang J, Xu B, Shi Q. Current understanding of ovarian aging. *Sci China Life Sci* 2012;55: 659–69.
 22. Djahanbakhch O, Ezzati M, Zosmer A. Reproductive ageing in women. *J. Pathol* 2007; 211:219–31.
 23. Fitzgerald C, Zimon AE, Jones EE. Aging and reproductive potential in women. *Yale J Biol Med* 1988; 71:367–81
 24. Novak E. Menopausal and Post-Menopausal Anatomic Changes in Uterus and Vagina. *J Clin Endocrinol Metab* 1944;575-80.
 25. Otiy M, Fuller J, Ross J, Shaikh H, Johns J. Endometrial pathology in the postmenopausal woman-an evidence based approach to management. *Obstet Gynaecol* 2014;17:29–38.
 26. Dutta M, Talukdar KL. A histological study of uterus in reproductive and postmenopausal women. *Nat J Clin Anatomy* 2015;4: 17–25.
 27. Doshi SB, Agarwal A. The role of oxidative stress in menopause. *J Midlife Health* 2013;4:140-6.
 28. Kushi LH, Folsom AR, Prineas RJ, Mink PJ, Wu Y, Bostick RM. Dietary antioxidant vitamins and death from coronary heart disease in postmenopausal women. *N Engl J Med* 1996; 334: 1156–62.
 29. Miguel J, Ramirez-Bosca A, Ramirez-Bosca JV, Alperi JD. Menopause: A review on the role of oxygen stress and favorable effects of dietary antioxidants. *Arch Gerontol Geriatr* 2006; 42: 289–306.
 30. Mlakar SJ, Osredkar J, Prezelj J, Marc J. Antioxidant enzymes GSR, SOD1, SOD2, and CAT gene variants and bone mineral density values in postmenopausal women: A genetic association analysis. *Menopause* 2012; 19: 368–76.
 31. Gürler EB, Çilingir-Kaya ÖT, Peker Eyüboğlu I, Akkiprik M, Ercan F, Çağlayan Yeğen B. Melatonin supports alendronate in preserving bone matrix and prevents gastric inflammation in ovariectomized rats. *Cell Biochem Funct* 2019; 37: 102-12.
 32. Moore TR, Franks RB, Fox C. Review of Efficacy of Complementary and Alternative Medicine Treatments for Menopausal Symptoms. *J Midwifery Womens Health* 2017; 62: 286-97.
 33. Igielska-Kalwat J, Gościńska J, Nowak I. Karotenoidy jako naturalne antyoksydanty [Carotenoids as natural antioxidants]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2015; 69: 418-28.
 34. Kogure K. Novel Antioxidative Activity of Astaxanthin and Its Synergistic Effect with Vitamin E. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2019; 65(Supplement):109-12.
 35. Capelli B, Talbott S, Ding L. Astaxanthin sources: suitability for human health and nutrition. *Functional Foods in Health and Disease* 2019; 9:430.
 36. Andrisani A, Donà G, Tibaldi E. Astaxanthin Improves Human Sperm Capacitation by Inducing Lyn Displacement and Activation. *Mar Drugs* 2015;13: 5533-51.
 37. Comhaire FH, El Gareem Y, Mahmoud A, Eertmans F, Schoonjans F. Combined conventional/antioxidant "Astaxanthin" treatment for male infertility: a double blind, randomized trial. *Asian J Androl* 2005; 7: 257-62.
 38. Kamada H, Akagi S, Watanabe S. Astaxanthin increases progesterone production in cultured bovine luteal cells. *J Vet Med Sci* 2017; 79: 1103-9.
 39. Schäfer-Somi S, Deichsel K, Beceriklisoy H, Korkmaz D, Walter I, Aslan S. Morphological, histological and molecular investigations on canine uterine tissue after ovariectomy. *Theriogenology* 2017; 102: 80-6.