

Sıçanlarda Psikolojik Strese Bağlı Oksidan Doku Hasarında Over Hormonlarının Rolü

Role of Ovarian Hormones in Psychological Stress-induced Oxidative Organ Damage in Rats

Gülsün Memi¹, Berrak Ç. Yeğen²

¹Trakya Üniversitesi Keşan Sağlık Yüksekokulu, Edirne, Türkiye

²Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Öz

Amaç: Hipotalamus-hipofiz-gonad aksının etkisiyle, stres yanıtının cinsiyetler arasında farklılıklar gösterdiği bilinmektedir. Bu çalışmada postmenopozal dönemde over hormonlarının yokluğunun, psikolojik stres yanıtı ve oksidatif hasar üzerindeki rolünün araştırılması amaçlandı.

Yöntemler: Dişi Sprague-Dawley sıçanlar (250-300 g, n=56) kontrol, taklit cerrahi ve overektomi (OVX) olarak 3 gruba ayrıldı. Anestezi sonrası taklit cerrahi ve OVX işlemi uygulandı. Cerrahi işlemden 60 gün sonra psikolojik stres oluşturmak üzere sıçanlar elektrik şokunun uygulandığı özel bir bölmeye yerleştirildiler. Ardından 3 gün daha aynı bölmede, aynı süre ile şok uygulanmadan tutuldular. Stres uygulamalarının 10'ar dakika öncesinde sıçanlara intraperitoneal yolla glukokortikoid reseptör antagonisti RU-486 (10 mg/kg) veya oksitosin reseptör antagonisti atosiban (1 mg/kg) veya serum fizyolojik verildi. Dördüncü günde delikli levha testi uygulanmasını takiben sıçanlar dekapite edilerek, doku ve kan örnekleri alındı.

Bulgular: Psikolojik stres, RU-486 verilen gruplarda kortizol düzeylerini anlamlı olarak arttırırken atosiban verilen gruplarda azalttı. Stres uygulaması ile serum IL-1 β düzeyleri artarken, serum TNF- α düzeylerinde değişiklik gözlenmedi. Stres, özellikle overektomi uygulanmış sıçanlarda mide, kolon ve beyin dokularında oksidatif hasarı arttırırken (p<0,05-0,001), RU-486'nın bu hasarı daha fazla arttırdığı, atosibanın ise bu etkiyi kısmen geri döndürdüğü gözlemlendi. Stres uygulaması ile azalan doku antioksidan miktarını RU-486 tedavisi değiştirmede, ama atosiban kısmen arttırdı.

Sonuç: Çalışmanın bulguları, psikolojik stres durumunda over hormonlarının yokluğunun kortizol düzeyinde ya da anksiyete düzeyinde değişikliğe neden olmadığı halde, sitokin düzeylerinde ve dokuların oksidatif hasar durumlarında değişikliklere yol açabildiğini ortaya koymuştur.

Anahtar kelimeler: Hipotalamus-hipofiz-adrenal bez aksı, hipotalamus-hipofiz-gonad aksı, glukokortikoid reseptörü, atosiban, oksitosin

Abstract

Objective: Stress response varies with respect to gender via the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. We aimed to investigate the effect of ovarian hormone deficiency on psychological stress response and oxidative damage.

Methods: Female Sprague Dawley rats (250–300 g, n=56) were divided as control, sham, and ovariectomy (OVX) groups. Sham operation or surgical OVX were conducted under anesthesia. After 60 days, the rats were placed in a special chamber to induce psychological stress by electric shock and were kept in the same chamber for 30 min on the following 3 days. Glucocorticoid receptor antagonist RU-486 (10 mg/kg), oxytocin receptor antagonist atosiban (1 mg/kg), or saline was intraperitoneally administered 10 min before stress exposure. After the hole-board anxiety test, the rats were decapitated on the 4th day; tissue and blood samples were obtained.

Results: Psychological stress increased cortisol levels in the RU-486-administered group, while cortisol levels were decreased in the atosiban-administered group. Serum interleukin (IL)-1 β levels, but not TNF- α levels, were increased by inducing stress. Stress increased oxidative damage in the stomach, colon, and brain of ovariectomized rats (p<0.05–0.001), while atosiban partially reversed and RU-486 exaggerated oxidative damage. GSH levels that were depleted because of stress were partially replenished by administering atosiban; however, RU-486 had no effect on GSH levels.

Conclusion: Although the absence of ovarian hormones during psychological stress had no effect on cortisol or anxiety levels, changes in cytokine levels and oxidative tissue damage were observed.

Keywords: Hypothalamopituitary-adrenal axis, hypothalamopituitary gonadal axis, glucocorticoid receptor, atosiban, oxytocin

GİRİŞ

Stres durumunda hipotalamus-hipofiz-adrenal bez (HPA) aksının uyarılması ile oluşan "stres yanıtı"nda cinsiyet farkının olduğu (1) ve kadınlarda HPA aksının strese daha güçlü yanıt verdiği gösterilmiştir (2). Cinsiyete bağımlı bu farklılığın, HPA aksı ile hipotalamus-hipofiz-gonad (HPG) aksının yakın ilişkisine bağlı olarak dolaşımdaki gonadal steroid hormonları nedeniyle meydana geldiği (3) ve HPA

aksının ürünü olan kortikosteronun geribildirim yoluyla HPG aksını veya gonadal steroidlerin de HPA aksını etkileyebileceği düşünülmektedir (3, 4). Kadınlarda HPA ve HPG aktivitelerinin menstrüel döngü ve menopozla değişim gösterdiği bilinmektedir (5, 6). Diğer yandan, kadınlarda menopoz döneminde (7) ve farelerde overektomi ile yapılan deneysel menopozda (8) kronik emosyonel strese bağlı oluşan depresyon ve anksiyete-benzeri davranışların arttığı ortaya konulmuştur.

Bu çalışma İngiliz Nöroendokrinoloji Derneği'nin yıllık toplantısında sözel bildiri olarak sunulmuştur, 3-5 Temmuz 2011, Cambridge, İngiltere. This study was presented as an oral presentation at the British Society for Neuroendocrinology Annual Meeting, 3-5 July 2011, Cambridge, UK.

Sorumlu Yazar/Correspondence Author: Berrak Ç. Yeğen E-posta/E-mail: byegen@marmara.edu.tr

Geliş Tarihi/Received: 19.01.2016 Kabul Tarihi/Accepted: 17.02.2016 DOI: 10.5152/clinexphealthsci.2016.04

©Telif Hakkı 2016 Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü - Makale metnine www.clinexphealthsci.com web sayfasından ulaşılabilir

©Copyright by 2016 Journal of Marmara University Institute of Health Sciences - Available online at www.clinexphealthsci.com

Post-menopozal dönemde over hormonlarındaki azalmanın, damar dokusu başta olmak üzere tüm dokularda inflamatuvar süreçleri başlattığı (9) ve endotelde başlayan inflamasyonun adhezyon moleküllerinin anlatımını, kemotaktik faktörlerin (sitokin gibi) üretimini ve kimyasal araçların salgılanmasını (serbest radikaller gibi) uyardığı bilinmektedir (10). Benzer şekilde stresin de dolaşımında bulunan inflamasyon belirteçlerinde artışa neden olduğu ve bu faktörlerin stresle ilişkili çeşitli hastalıkları tetikleyen psikososyal faktörlere aracılık ettiği öne sürülmektedir (11). Akut psikolojik stresle indüklenen sitokin üretiminin post-menopozal kadınlarda menopoz öncesindeki kadınlara ve erkeklere kıyasla daha fazla olduğu ve bunun menopozdaki kadınları strese bağlı inflamasyona daha duyarlı kıldığı ifade edilmektedir (12). Diğer taraftan, yakın zamanda yapılan bir çalışmada menopoz sonrası kadınlarda, pre-menopozal dönemdeki kadınlara kıyasla, oksidatif stresin daha az, antioksidan kapasitenin ise daha fazla olduğu gösterilmiştir (13).

Hipotalamustaki paraventricüler ve supraoptik çekirdeklerde üretilen oksitosin (OT) (14), doğum sırasında uterus kontraksiyonlarının ve süt bezlerinden süt salınmasının uyarılmasını ve annelik davranışını düzenlemektedir (15). OT'nin birçok canlı türünde sosyal davranışları kolaylaştırdığı ve insanda da aynı etkilere sahip olduğu bilinmektedir (16). Deneysel çalışmalar OT'nin stres yanıtında yer aldığını ve özellikle HPA etkinliğini zayıflatarak stres yanıtını azalttığını göstermiştir (17). Dişi sıçanların OT ile uzun süreli tedavileri sonunda kortikosteron düzeyinde geçici bir artış ve ardından HPA aksında süregelen bir baskılanma olduğu gözlenmiştir (18). OT enjeksiyonlarının azalmış kortizol düzeyiyle birlikte olumlu duygulanımlara (19), anksiyolitik ve sedatif etkilere yol açtığı (20) ve ağırlı uyaranlara verilen yanıtı azalttığı gösterilmiştir (21). Daha önceki çalışmalarımızda, OT'nin bu etkilerinin yanı sıra anti-inflamatuvar etkilerinin de bulunduğu çeşitli inflamasyon modelleri ile oluşturulmuş oksidan doku hasarlarında (deri, mide, karaciğer ve böbrek) belirlenmiştir (22, 23). Ancak, kadınlarda stres yanıtının menopoz döneminde değişmesine bağlı olarak, stresin organlarda yol açtığı oksidan hasarın nasıl etkilendiğini ortaya koyan bir çalışma bulunmamaktadır.

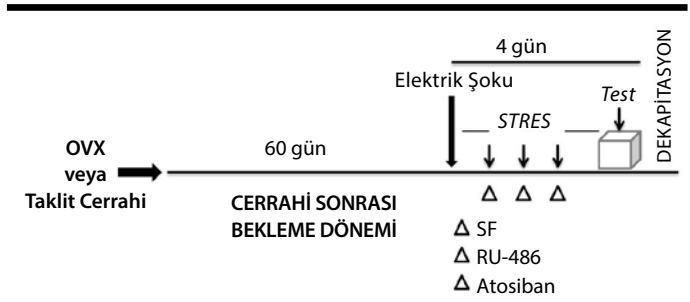
Bu bilgilerin ışığında, dişi sıçanlarda psikolojik strese verilen inflamasyon yanıtında over hormonlarının etkisini ve bu etkilerde oksitosin ile glukokortikoid reseptörlerinin rolünü araştırmak amacıyla bu çalışma planlanmıştır.

YÖNTEMLER

Deney Hayvanları ve Deneysel Tasarım

Çalışmamızdaki tüm hayvanlar Marmara Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi (DEHAMER)'den temin edildi. Marmara Üniversitesi Deney Hayvanı Araştırma Etik Kurulu'ndan onay alındı (16.04.2009-21.2009). Çalışmada Sprague-Dawley türü dişi sıçanlar (250-300 g, n=56) kullanıldı.

Sıçanlar rastgele kontrol (n=8), taklit cerrahi (n=24) ve overektomi (OVX, n=24) olarak 3 gruba ayrıldı. Kontrol grubunda herhangi bir cerrahi işlem yapılmazken, OVX ve taklit cerrahi gruplarında intraperitoneal (ip) yolla verilen ketamin (100 mg/kg) ve klorpromazin (0,75



Şekil 1. Deneysel işlemleri gösteren şema. Overektomi (OVX) veya taklit cerrahi sonrası 60 gün bekleme dönemini takiben sıçanlara elektrik şoku uygulandı ve ardından şok verilen kamaraya konularak 3 günde 30'ar dakika psikolojik strese maruz bırakıldılar. Stres uygulamalarının hemen öncesinde sıçanlara serum fizyolojik (SF), RU-486 (10 mg/kg/gün) veya atosiban (1 mg/kg/gün) enjeksiyonları yapıldı. Dekapite edilecekleri gün önce delikli levha testi ile anksiyeteleri değerlendirildi.

mg/kg) anestezisi altında orta hatta laparotomi yapıldı. Overektomi için bilateral olarak overler 2/0 ipekle sütüre edilerek çıkarıldı. Taklit cerrahi grubunda ise overler ellenecek yerlerinde bırakıldı. Laparotomiler kapatıldıktan sonra sıçanlar kafeslerine alındı ve cerrahi menopoz sonrası over hormonlarının düzeylerinin düşmesi için 60 gün beklendi (Şekil 1). Bu sürenin sonunda elektrik şoku ve sonraki 3 gün içinde 30'ar dakika kronik psikolojik stres uygulandı. Stres uygulamalarının 10'ar dakika öncesinde sıçanlara glukokortikoid reseptör antagonisti veya oksitosin reseptör antagonisti veya serum fizyolojik enjeksiyonları yapıldı. Taklit cerrahi ve OVX uygulanan gruplar kronik stres uygulamasını takiben 4. günde (cerrahi sonrası 64. gün) dekapite edildiler. Kontrol grubu da diğer sıçanlarla aynı koşullarda 60 gün tutuldu, ama elektrik şoku veya kronik stres uygulanmadan 64. günde dekapite edildiler. Kan ile iskelet kası, beyin, mide ve kolon doku örnekleri alınarak -80°C'de saklandı. Tüm gruplar dekapite edilmeden hemen önce anksiyete değerlendirmeleri için delikli levha testine tabi tutuldular.

Kronik Stres Uygulaması ve Reseptör Antagonistleri ile Tedavi

Kontrol grubu hariç, sıçanlar pasif-kaçınma cihazının (Northel; İstanbul, Türkiye) karanlık bölmesine yerleştirilerek 30 dakika boyunca aralarında en az 5 saniye olacak şekilde rastgele 20 elektrik şokuna (0,3 – 0,5 mA) maruz bırakıldılar. Sonraki üç günde her sıçan aynı kamaraya aynı saatlerde konularak elektrik şoku verilmeden 30 dakika bekletilmek suretiyle kronik psikolojik stres uygulandı (24). Kronik stres uygulanan 3 günde, uygulamalardan 10 dakika önce ip olarak glukokortikoid reseptör (GR) antagonisti (Sigma, RU-486; 10 mg/kg/gün, ip) veya oksitosin/vazopresin reseptör antagonisti (Tractocile®, Ferring İlaç, atosiban; 1 mg/kg/gün, ip) veya serum fizyolojik (SF; 1 mL/kg/gün) toplamda 3'er kez olacak şekilde verildi. Düşük dozlardaki RU-486'nın progesteron antagonisti ve 4,5 mg/kg dozunun üstünde ise GR antagonisti olarak etki gösterdiği bilindiğinden, GR'yi bloke etmek üzere 10 mg/kg dozu seçildi. Oksitosin reseptör (OTR) antagonisti atosibanın dozu da önceki çalışmalara dayanılarak belirlendi (25).

Delikli Levha ile Anksiyete Testi

Kronik stres uygulamasının 3. gününün sonunda anksiyete değerlendirildi. Delikli levha testi, sıçanların araştırmacı davra-

nışlarını irdeleyen ve bu davranışlarda azalma olmasının anksiyete düzeyinde artış olarak değerlendirildiği sık kullanılan bir yöntemdir. Delikli levha (100 x 100 x 50 cm), tabanında 16 eşit deliğin (her birinin çapı 3,8 cm) eşit aralıklı olarak yer aldığı üstü açık tahta bir kutudur. Sıçan tek başına delikli tabanda merkeze konulduktan sonra 5 dakika boyunca serbestçe etrafı araştırması beklendi ve bu sırada video kamera ile kayıt yapıldı. Delikli levha testini takiben sıçanlar dekapite edildiler. Daha sonra izlenen video kayıtlarında 5 dakika içindeki başını delikten sokma sayısı ölçüldü ve başını deliğe sokma sayısındaki azalma, artmış anksiyete olarak değerlendirildi.

Serumda Kortizol ve Sitokin Düzeylerinin Tayini

Gövde kanından ayrılan serumlarda kortizol düzeyi otomatik cihaz (Beckman Coulter Cell) ile kortizol kiti (Access Immunoassay Cortisol, kat no:33600) ile radyoimmün test (radioimmunoassay - RIA) yöntemiyle ölçüldü. TNF- α (Biosource; kat no: KRC3011) ve IL-1 β (Invitrogen; kat no: KRC0011) düzeyleri ELISA ile önerilen standart prosedürler uygulanarak ölçüldü.

Dokularda Glutasyon Düzeylerinin ve Miyeloperoksidaz Aktivitesinin Tayini

Ayrılan ve derin dondurucuda saklanan iskelet kası, beyin, mide ve kolon dokularında glutasyon (GSH) düzeyleri ve miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesi ölçüldü. GSH için %10'luk triklorasetik asit çözeltisi içinde dokular 10 kez sulandırıldıktan sonra 30 saniye homojenize edilip (Janke & Kunkel, IKA-Laborstechnik), 15 dakika süreyle 4°C sıcaklıkta 3000 devir/dk'da santrifüjlendi (Universal 16R, Hettich Zentrifugen). Süpernatant Ellmann prosedürüne göre çalışılarak GSH seviyeleri spektrofotometrik olarak tayin edildi.

Dokuya nötrofil infiltrasyonunu değerlendirmek için kullanılan miyeloperoksidaz (MPO) nötrofillerin granülleri içine yerleşmiş bir enzimdir. Doku MPO aktivitesinin ölçümü için 0,2-0,3 gramlık iskelet kası, beyin, mide ve kolon dokusu örnekleri, 20 μ M K_2HPO_4 (pH: 7,4) çözeltisi ile 10 kat sulandırılıp, 30 saniye homojenize edildikten sonra 12.000 devir/dk'da 4°C'de 10 dakika boyunca santrifüje edildi. Üst kısımda kalan süpernatant atıldıktan sonra tüp içinde kalan pelet, içinde %0,5'lik heksadesiltrimetilamonyum bromür (HETAB) bulunan 50 μ M K_2HPO_4 ile yeniden homojenize edildikten sonra MPO aktivitesi, o-Dianizidin-2HCl'nin H_2O_2 'ye bağımlı oksidasyonunun spektrofotometrik (Pharmacia LKB-Ultraspec III) ölçümü ile saptandı. Bir ünite MPO enzim aktivitesi, 37°C'de 460 nm absorbansta dakikada 1 ünite değişikliğe yol açan MPO miktarı olarak tanımlandı ve ünite/gram olarak ifade edildi.

İstatistiksel Analiz

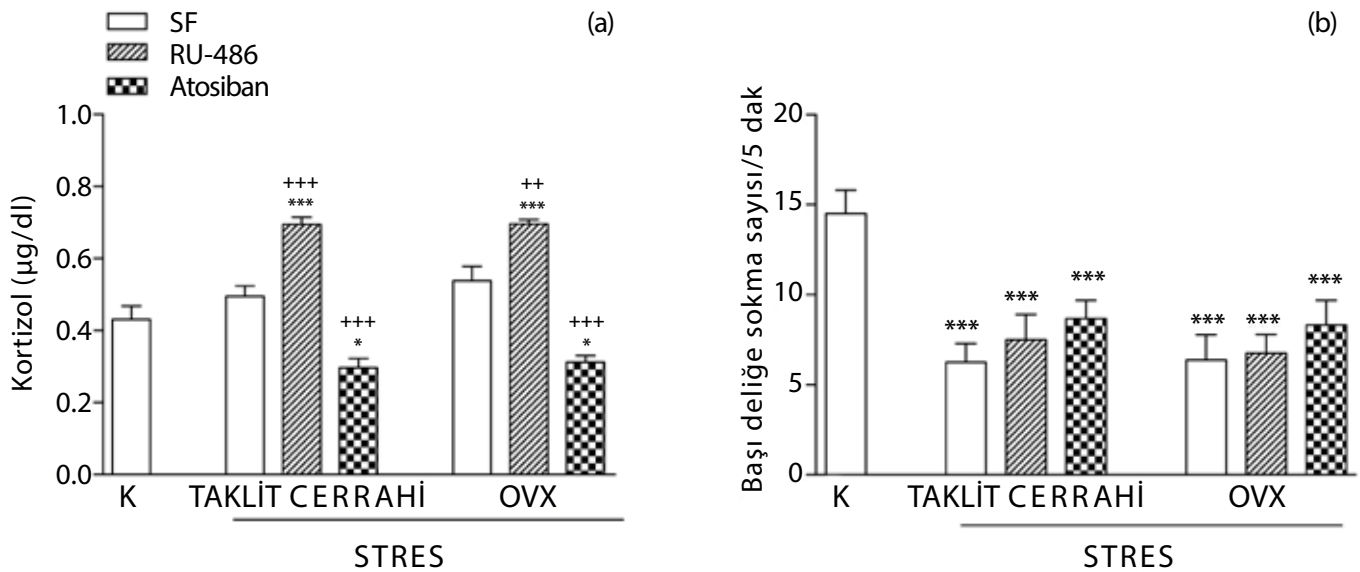
İstatistiksel analiz GraphPad Prism 6,0 (GraphPad Software; San Diego, USA) programı kullanılarak yapıldı. Veriler metin içinde ortalama \pm standart sapma olarak verildi, şekillerde ise ortalama \pm standart hata olarak gösterildi. İkili karşılaştırmalarda Student t-testi veya Mann-Whitney U testi kullanılırken çoklu karşılaştırmalarda tek-yönlü-varyans analizi (ANOVA) veya Kruskal-Wallis testi uygulandı. $p < 0,05$ anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

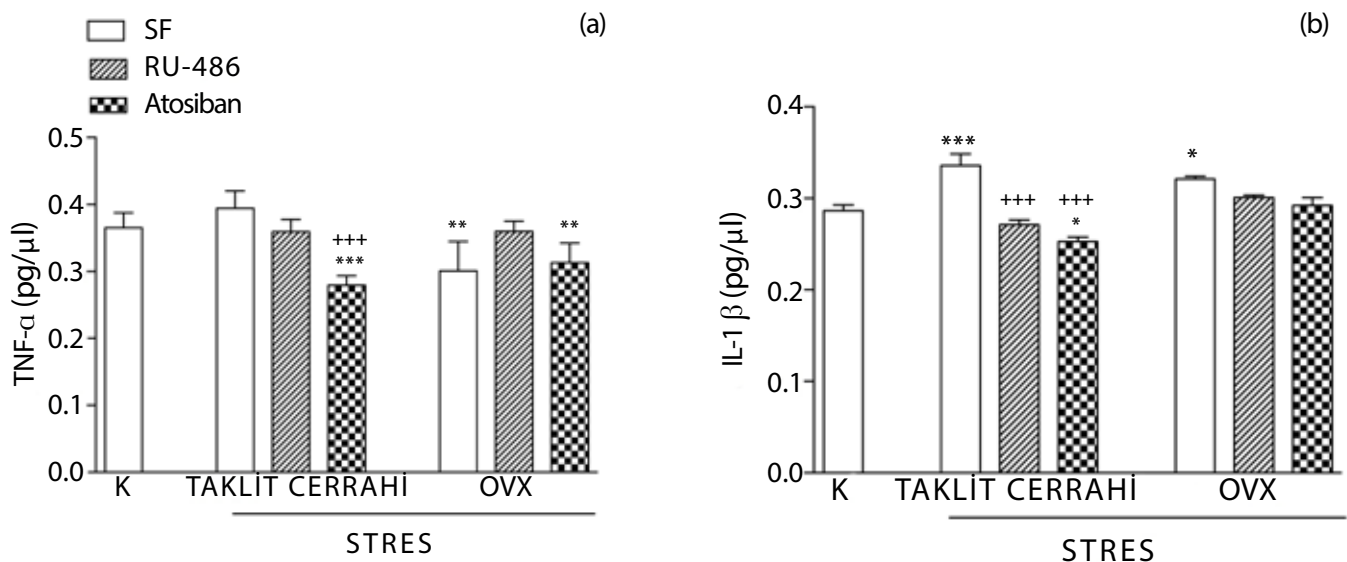
Elektrik şoku sonrasında sıçanların şok verilen mekânda 3 gün tutulmasıyla oluşturulan kronik stresin delikli levha testinde başı deliğe sokma sayısında ($6,25 \pm 1,03/5$ dk) kontrole göre ($14,5 \pm 1,3/5$ dk) anlamlı derecede azalmaya ($p < 0,001$), dolayısıyla anksiyete düzeylerinde artışa neden olduğu ve bu artmış anksiyetenin uygulanan farklı cerrahi ve farklı tedavilerde benzer olduğu gözlemlendi (Şekil 2a). Kontrol grubu ($0,43 \pm 0,09$ mg/dL) ile kıyaslandığında, taklit cerrahi ($0,49 \pm 0,04$ mg/dL) veya OVX ($0,53 \pm 0,08$ mg/dL) uygulandıktan sonra kronik stres öncesinde SF tedavisi alan grupların serum kortizol seviyelerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmezken, GR antagonisti RU-486 tedavisi (taklit cerrahi: $0,69 \pm 0,02$ mg/dL ve OVX: $0,69 \pm 0,02$ mg/dL) ile anlamlı derecede artış gözlemlendi ($p < 0,001$; Şekil 2b). OTR antagonisti atosiban ile tedavi ise, OVX ($0,31 \pm 0,04$ mg/dL) ya da taklit cerrahi ($0,29 \pm 0,05$ mg/dL) yapıldıktan sonra strese maruz kalmış sıçanlarda serum kortizol seviyelerini kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşürdü ($p < 0,001$).

Taklit cerrahi yapıp SF ($0,39 \pm 0,02$ pg/ μ L) veya RU-486 ($0,35 \pm 0,01$ pg/ μ L) tedavisi alan gruplarda stres uygulanması serum TNF- α düzeylerinde anlamlı farklılık oluşturmazken OTR antagonisti ($0,27 \pm 0,01$ pg/ μ L) ile tedavi TNF- α düzeyini kontrol grubuna ($0,36 \pm 0,02$ pg/ μ L) göre anlamlı olarak azalttı ($p < 0,001$; Şekil 3a). Post-menopozal 2. ayda olan sıçanlarda stres uygulaması TNF- α düzeylerini hem SF ($0,30 \pm 0,04$ pg/ μ L) hem de atosiban ($0,31 \pm 0,02$ pg/ μ L) tedavisi alanlarda anlamlı derecede ($p < 0,01$) düşürürken, RU-486 ($0,35 \pm 0,01$ pg/ μ L) uygulanan grupta bu düşüşün engellendiği gözlemlendi. Stres uygulaması taklit cerrahi ($0,33 \pm 0,03$ pg/ μ L) ve OVX ($0,32 \pm 0,01$ pg/ μ L) gruplarında IL-1 β düzeylerini kontrole ($0,28 \pm 0,01$ pg/ μ L) göre anlamlı şekilde yükseltti ($p < 0,001$ ve $p < 0,05$; Şekil 3b). Taklit cerrahi gruplarında RU-486 ($0,27 \pm 0,01$ pg/ μ L) ve atosiban ($0,25 \pm 0,01$ pg/ μ L) tedavileri IL-1 β düzeylerindeki artışı engellerken ($p < 0,001$), OVX gruplarında antagonistlerin, IL-1 β düzeylerini azaltıcı etkileri anlamlı düzeye ulaşmadı.

Strese maruz kalmış sıçanların mide, iskelet kası ve beyin dokusunda ölçülen ve dokuda nötrofil birikiminin göstergesi olan MPO aktivitesinin, kontrol grubundaki sıçanların dokularında ölçülen MPO aktivitesinden farklı olmadığı bulundu (Şekil 4). Buna karşın, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da taklit cerrahi grubunda ($37,49 \pm 3,89$ U/g doku) kontrol grubuna göre ($31,05 \pm 8,09$ U/g doku) artış gösteren mide MPO düzeyinin her iki antagonist (RU-486: $28,37 \pm 4,61$ U/g doku, atosiban: $26,71 \pm 2,95$ U/g doku) tarafından azaltıldığı gözlemlendi ($p < 0,05-0,01$). Post-menopozal dönemde strese maruz kalmış sıçanların kas ($17,31 \pm 0,9$ U/g doku) ve beyin ($37,56 \pm 0,97$ U/g doku) MPO aktiviteleri OTR antagonisti (kas: $28,0 \pm 3,61$ U/g doku ve beyin: $47,30 \pm 6,18$ U/g doku) ile anlamlı olarak artmış bulunurken ($p < 0,001$), GR antagonisti sadece beyindeki ($41,71 \pm 5,06$ U/g doku) MPO aktivitesini artırdı ($p < 0,05$). Taklit cerrahi ($30,39 \pm 5,29$ U/g doku) ve OVX ($36,12 \pm 6,17$ U/g doku) gruplarının kolon dokusunda MPO düzeylerinin stres uygulanmamış kontrol grubuna ($18,60 \pm 2,13$ U/g doku) göre anlamlı yükseldiği ($p < 0,001$), bu artışları taklit cerrahi grubunda OTR antagonistin ($23,09 \pm 1,64$ U/g doku; $p < 0,01$), OVX grubunda ise GR antagonistin ($24,37 \pm 1,06$ U/g doku) engellediği gözlemlendi ($p < 0,01$).



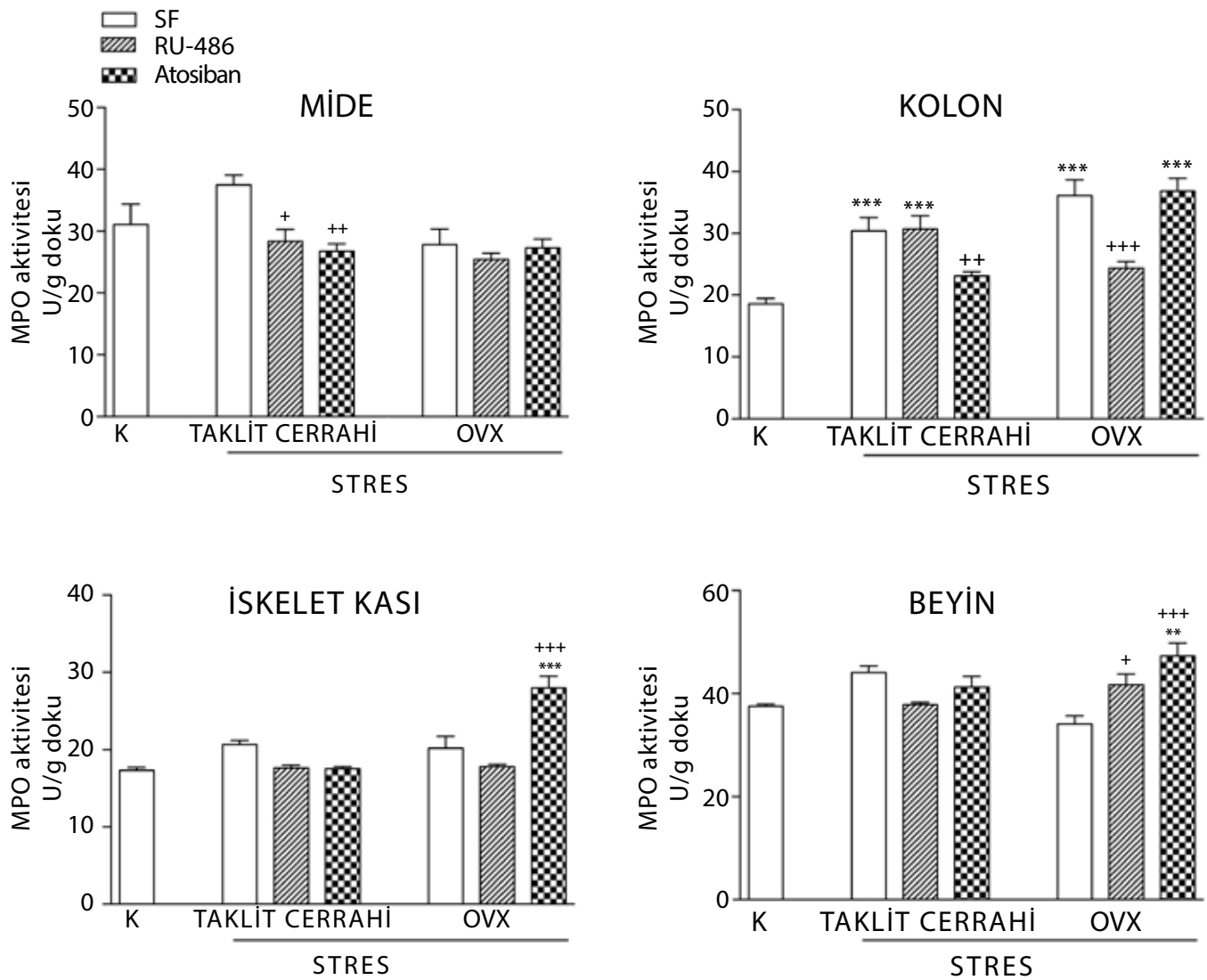
Şekil 2. a, b. (a) Cerrahi işlem ya da stres uygulanmayan kontrol grubu (K) ile stres uygulamaları öncesinde serum fizyolojik (SF), RU-486 (glukokortikoid reseptör antagonisti) veya atosiban (oksitosin reseptör antagonisti) tedavisi alan, taklit cerrahi ya da overektomi (OVX) yapılmış dişi sıçanların serum kortizol düzeyleri ve anksiyeteyi değerlendirmek amacıyla (b) delikli levha testinde ölçülen başı deliğe sokma sayısı. Metin içinde ortalama \pm standart sapma olarak verilen veriler şekilde ortalama \pm standart hata olarak gösterilmiştir. *** p <0,001 kontrol grubuna göre; ++ p <0,01, +++ p <0,001, SF-tedavisi alan kendi grubuna göre.



Şekil 3. a, b. (a) Cerrahi işlem ya da stres uygulanmayan kontrol grubu (K) ile stres uygulamaları öncesinde serum fizyolojik (SF), RU-486 (glukokortikoid reseptör antagonisti) veya atosiban (oksitosin reseptör antagonisti) tedavisi alan, taklit cerrahi ya da overektomi (OVX) yapılmış dişi sıçanların serum TNF- α düzeyleri. (b) Metin içinde ortalama \pm standart sapma olarak verilen veriler şekilde ortalama \pm standart hata olarak gösterilmiştir * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001 kontrol grubuna göre; +++ p <0,001, SF-tedavisi alan kendi grubuna göre.

SF verilen taklit cerrahi gruplarında mide ($0,23 \pm 0,04$ $\mu\text{mol/g}$; $p < 0,001$) ve kas ($0,20 \pm 0,04$ $\mu\text{mol/g}$ ve $p < 0,05$) dokusu GSH düzeyleri kontrol grubuna (mide; $0,55 \pm 0,07$ $\mu\text{mol/g}$ ve kas; $0,27 \pm 0,03$ $\mu\text{mol/g}$) göre anlamlı azalma gösterdi; benzer azalma OVX yapılmış grubun mide ($0,29 \pm 0,03$ $\mu\text{mol/g}$; $p < 0,01$) dokusunda da görüldü (Şekil 5). Bu bulguların aksine, OVX yapılmış sıçanların diğer dokuları olan kas ($0,32 \pm 0,05$ $\mu\text{mol/g}$; $p < 0,05$), beyin ($0,87 \pm 0,14$ $\mu\text{mol/g}$; $p < 0,01$) ve kolonda

($0,98 \pm 0,29$ $\mu\text{mol/g}$; $p < 0,001$) ise GSH düzeylerinin anlamlı olarak arttığı izlendi (Şekil 3a). OVX gruplarında artmış bulunan kas ($0,32 \pm 0,05$ $\mu\text{mol/g}$), beyin ($0,87 \pm 0,14$ $\mu\text{mol/g}$) ve kolon ($0,98 \pm 0,29$ $\mu\text{mol/g}$) GSH düzeylerini GR antagonisti RU-486 tedavisi anlamlı derecede düşürdü (kas: $0,05 \pm 0,02$ $\mu\text{mol/g}$; beyin: $0,56 \pm 0,12$ $\mu\text{mol/g}$ ve kolon: $0,65 \pm 0,14$ $\mu\text{mol/g}$; $p < 0,05-0,001$). OTR antagonisti atosibanın ise taklit cerrahi olmuş sıçanların mide ($0,72 \pm 0,14$ $\mu\text{mol/g}$), kas ($0,27 \pm 0,03$



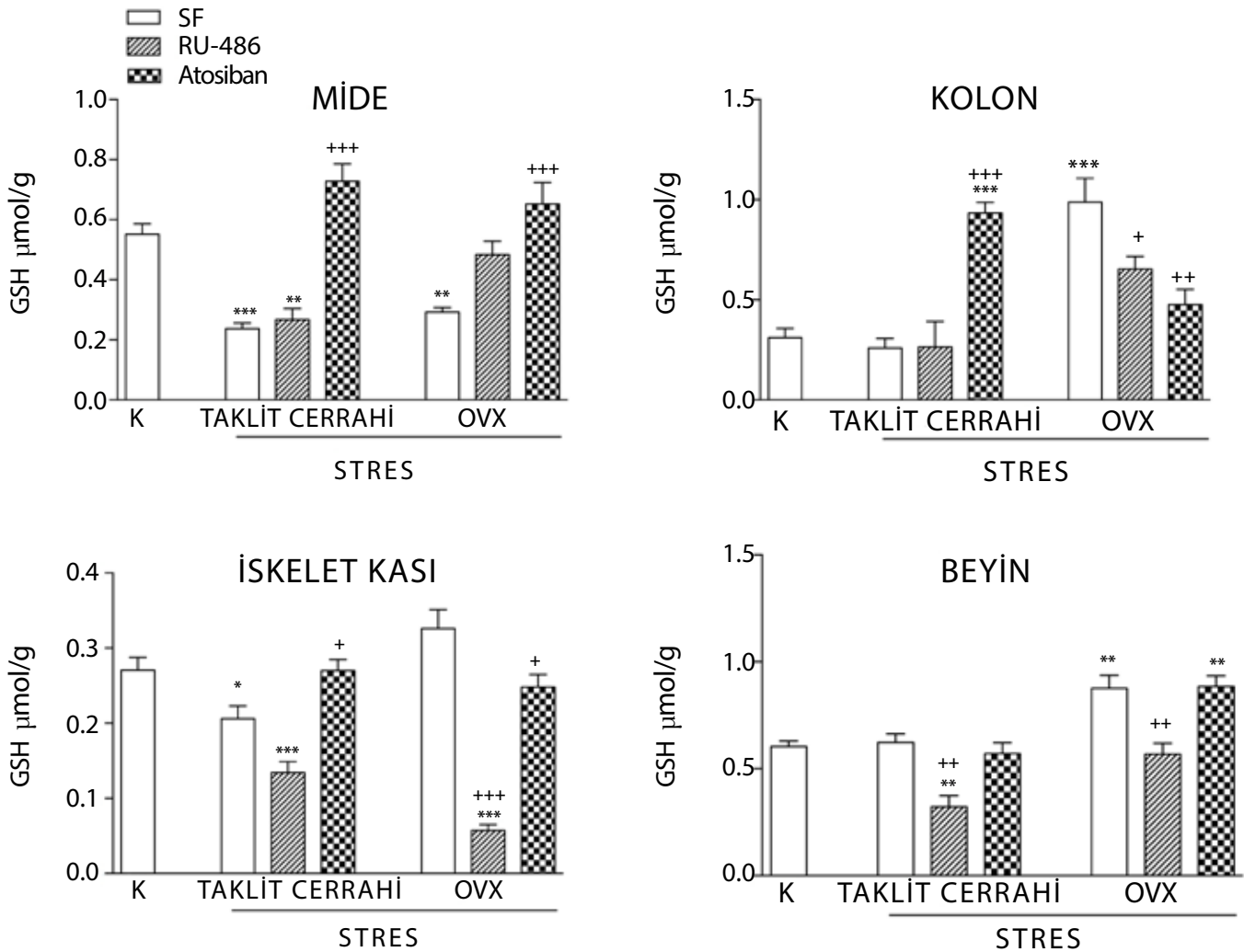
Şekil 4. Cerrahi işlem ya da stres uygulanmayan kontrol grubu (K) ile stres uygulamaları öncesinde serum fizyolojik (SF), RU-486 (glukokortikoid reseptör antagonisti) veya atosiban (oksitosin reseptör antagonisti) tedavisi alan, taklit cerrahi ya da overektomi (OVX) yapılmış dişi sıçanların mide, kolon, iskelet kası ve beyin dokularında miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesi. Metin içinde ortalama \pm standart sapma olarak verilen veriler şekilde ortalama \pm standart hata olarak gösterilmiştir ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ kontrol grubuna göre; ++ $p < 0,05$, +++ $p < 0,001$, SF-tedavisi alan kendi grubuna göre.

$\mu\text{mol/g}$; $p < 0,05$) ve kolon ($0,93 \pm 0,13 \mu\text{mol/g}$; $p < 0,001$) dokularında GSH düzeylerini kontrol değerlerine kıyasla (mide: $0,23 \pm 0,04 \mu\text{mol/g}$; kas: $0,20 \pm 0,04 \mu\text{mol/g}$ ve kolon $0,26 \pm 0,1 \mu\text{mol/g}$) artırdığı, buna karşın OVX olmuş sıçanların mide GSH düzeylerini ($0,65 \pm 0,16 \mu\text{mol/g}$; $p < 0,001$) artırırken kas ($0,24 \pm 0,04 \mu\text{mol/g}$; $p < 0,05$) ve kolon ($0,47 \pm 0,18 \mu\text{mol/g}$; $p < 0,001$) dokularındaki GSH düzeylerinin kontrol değerlerine (mide: $0,55 \pm 0,01 \mu\text{mol/g}$; kas: $0,27 \pm 0,03 \mu\text{mol/g}$ ve kolon: $0,31 \pm 0,11 \mu\text{mol/g}$) baskılandığı bulundu.

TARTIŞMA

Çalışmanın sonuçları, dişi sıçanlarda strese maruziyetin IL-1 β düzeyinin anksiyeteyi artırdığını, midede ve iskelet kasında antioksidan GSH düzeyini düşürdüğünü ve kolona nötrofil göçünü artırdığını göstermiştir. Psikolojik stres ile post-menopozal dönemde karşılaşılan sıçanlarda da, kas GSH düzeyindeki artış dışında, benzer etkiler meydana

gelmiş; ek olarak kolon ve beyinde GSH düzeylerinde artış ve TNF- α düzeyinde düşme gözlenmiştir. GR antagonisti RU-486, hem taklit cerrahi, hem de OVX gruplarında serum kortizol düzeyini artırmış ve stresle IL-1 β 'da oluşan artışları engellemiştir. RU-486, post-menopozal dönemde kolon, kas ve beyin dokularında artmış bulunan GSH düzeylerini ve kolon MPO düzeyini baskılamıştır. OTR antagonisti atosiban ise, hem taklit cerrahi hem de OVX gruplarında serum kortizol düzeyini azaltmış ve stresle IL-1 β oluşan artışları engellemiştir. OVX olmamış grupta beyin hariç GSH düzeylerini yükselten atosiban, OVX grubunda mide GSH düzeyini artırırken, kas ve kolon GSH düzeylerini düşürmüştür. OVX olmamış grupta mide ve kolon MPO düzeyini düşüren atosiban, kas ve beyinde ise MPO aktivitesini artırmıştır. Bu sonuçlar, farklı dokuların strese bağlı inflamatuvar yanıtlarında menopoz sonrası dönemde değişiklikler oluştuğunu, menopozda karşılaşılan strese dokuların antioksidan GSH düzeylerinin yüksek bulunduğunu ve farklı dokularda strese oluşan inflamatuvar yanıtların OTR ve/veya GR aracılı olduğunu göstermektedir.



Şekil 5. Cerrahi işlem ya da stres uygulanmayan kontrol grubu (K) ile stres uygulamaları öncesinde serum fizyolojik (SF), RU-486 (glukokortikoid reseptör antagonisti) veya atosiban (oksitosin reseptör antagonisti) tedavisi alan, taklit cerrahi ya da overektomi (OVX) yapılmış dişi sıçanların mide, kolon, iskelet kası ve beyin dokularında glutasyon (GSH) düzeyleri. Metin içinde ortalama \pm standart sapma olarak verilen veriler şekilde ortalama \pm standart hata olarak gösterilmiştir ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ kontrol grubuna göre; ++ $p < 0,05$, +++ $p < 0,001$, SF-tedavisi alan kendi grubuna göre.

İnflamatuvar yanıt, doku hasarı veya monosit/makrofajlar aktive olduğu zaman başlar ve pro-inflamatuvar sitokinlerin (IL-6, IL-1 β , TNF- α gibi) serbestleşmesine yol açarak, hasar bölgesine lökositlerin toplanmasına, endoteldeki adhezyon moleküllerinin ifadesinin artırılmasına ve akut faz proteinlerinin serbestleşmesine neden olur (26). Akut fizyolojik stres, yaşa ve cinsiyete göre değişen şekilde, immün sistemi daha büyük inflamatuvar yanıtlarla başa çıkacak şekilde uyarır (27). Strese karşı verilen inflamasyon yanıtında cinsiyet farklılıklarının olduğu ve erkeklerde daha fazla TNF- α , kadınlarda ise daha çok IL-6 ve IL-1 artışlarının olduğu saptanmıştır (28). Ayrıca, post-menopozal dönemdeki kadınlarda stres durumunda üretilen IL-6 ve TNF- α düzeylerinin erkeklere göre daha yüksek olduğu öne sürülmüştür (29). Benzer şekilde bizim çalışmamızda da strese verilen sitokin yanıtının overleri sağlam ve OVX yapılmış sıçanlar arasında farklılıklar gösterdiği ortaya konmuştur. Ancak, her iki grupta da artmış bulunan IL-1 β düzeyine karşın, TNF- α düzeylerinin insan

çalışmasına zıt olarak düşük bulunduğu gözlenmiştir. Bu farklılığın, deneklerin insan yerine sıçan olması, uygulanan stres yönteminin mental stres yerine elektrik şoku içermesi ve sadece dişi hayvanların kullanılması nedeniyle erkek sıçanlardaki durumun bilinmemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Menopoz sonrasında östrojen düzeyleri (<15 pg/mL), menopoz öncesi kadınlara (50–250 pg/mL) veya erkeklere göre (50 pg/mL) (30) anlamlı düşüş göstermektedir. Bu nedenle, menopoz sonrası östrojenin azalmasıyla birlikte, östrojenin pro-inflamatuvar sitokin gen anlatımını, nükleer faktör kappa-B (NF- κ B) bağlanmasını ve pro-inflamatuvar sitokinlerin üretimini inhibe edici (31) etkilerinin de azaldığı, dolayısıyla menopoz sonrası kadınların stres ile ilişkili inflamasyona daha hassas olduğu öne sürülmektedir. Sonuçta, menopozda sitokin üretimi üzerinde östrojenle olan inhibisyonun kalkması sonucunda artması beklenen TNF- α , stres maruziyetinde aksine düşerek zayıf bir akut faz yanıtına yol açmaktadır.

Cinsiyetler arasında kortikotropin serbestleyici hormon (CRH) yanıtı ve negatif-geribildirim mekanizmasının farklılık gösterdiğini ortaya koyan çalışmalar mevcuttur (32). Oral kontraseptif kullanan kadınlarda sosyal stresörlere karşı serbest kortizol miktarında azalma görüldükçe, aynı tedavi alan erkeklerde stres yanıtına karşı adrenokortikotropik hormon (ACTH) ve kortizol miktarının arttığı gösterilmiştir (33). Kadın ve erkekte HPA aksının düzenlenmesindeki farklılıklar nedeniyle kadınların depresyona daha fazla maruz kalabildikleri iddia edilmektedir (34). Bu hipotezi destekleyecek şekilde depresif erişkin kadınlarda, normal erişkin kadınlara göre daha düşük düzeylerde bulunan östradiolün (35), stres yanıtı üzerine inhibitör etkilerinin olduğu ve serotonin sinyal sistemi aracılığıyla mental sağlığın düzenlenmesinde de yararlı etkisinin olduğu iddia edilmektedir (36). Çalışmamızda, stresle artan anksiyete düzeyinin OVX olan ve olmayan gruplar arasında farklılık göstermediği, buna karşın bu gruplardaki kortizol düzeylerinin ise kontrolden farklı olmadığı ortaya konmuştur. Strese verilen anksiyete yanıtının menopozla değişmediği, ancak uzun dönemde depresyon açısından farklılık oluşabileceği düşünülebilir. Diğer taraftan, hem menopoz öncesi hem de sonrasındaki sıçanlarda strese verilen kortizol yanıtının GR antagonisti ile artması ve OTR antagonisti ile azalması, östrojen durumundan bağımsız olarak her iki reseptörün de HPA aksının düzenlenmesinde aracı olduğunu ortaya koymuştur. Benzer şekilde, OTR antagonisti verilmesinin dışı sıçanlarda yüzme stresiyle artan ACTH ve kortikosteron düzeylerinde daha fazla artışa neden olduğu gösterilmiştir (37). Bunu destekleyecek şekilde, düşük dozda santral olarak verilen OT'nin gürültü stresine karşı kortikosteron yanıtını azalttığı (38) veya kronik olarak OT uygulanmasının HPA aktivitesini azalttığı gösterilmiştir (39).

Östrojenin, nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) oksidazların ve antioksidan enzimlerin (süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz vb) anlatımını ve işlevini düzenleyerek oksidan stresi azalttığı gösterilmiştir (40). Deneysel çalışmalar da OVX ile oluşturulan östrojen yoksunluğunun redoks durumunu değiştirdiğini ve bu durumda uygulanan östrojen tedavisinin oksidan stresi azalttığını düşündürmüştür (41). Ayrıca, östrojen molekülünün kimyasal yapısının da serbest radikal süpürücü olarak etki ettiği ve fenol halkasındaki A pozisyonu sayesinde oksidan hasarı engellediği öne sürülmektedir (42). Bu bulgulara dayanılarak östrojen yokluğu ile kendini gösteren menopozun oksidan stres için bir risk faktörü olduğu kabul edilmektedir (43). Benzer şekilde, psikolojik stresin de çeşitli organlarda antioksidan enzimlerin aktivitesinde değişmeye ve GSH düzeylerinde dokuya-özel değişikliklerle birlikte oksidan strese yol açtığı gösterilmiştir (44). Çalışmamızda, sıçanlarda menopoz öncesi dönemde uygulanmış stresin özellikle midede ve kasta GSH'nın azalması ve kolonda MPO aktivitesinin artmasıyla kendini gösteren oksidan strese yol açtığı, buna karşın menopoz sonrası dönemdeki stres durumunda ise kolonda, kasta ve beyinde antioksidan GSH düzeylerinin arttığı gözlenmiştir. Bu durum, kendisi oksidan stres olan menopozun bir ön-koşullama yaparak, psikolojik stres durumunda antioksidan kapasiteyi artırdığını düşündürmektedir. Bulgularımız, antioksidan kapasitenin pre-menopozal dönemdeki kadınlara kıyasla menopozdaki kadınlarda artmış bulunduğunu gösteren klinik çalışma ile uyum göstermektedir (13). Ayrıca, çalışmamızın sonuçları menopozda strese bağlı olarak dokularda gözlenen artmış GSH yanıtında, artmış HPA aktivitesinin yer aldığını ve hem OTR hem de GR'nin bu yanıtlarda aracılık ettiğini düşündürmektedir.

SONUÇ

Sonuç olarak, psikolojik stres durumunda over hormonlarının yokluğunun kortizol düzeyinde ya da anksiyete düzeyinde değişikliğe neden olmadığı halde, sitokin düzeylerinde ve dokuların oksidatif stres durumlarında değişikliklere yol açabildiği ortaya konmuştur. Bu farklılıkların menopoz sonrasındaki dönemde OTR ve GR aracılığı ile HPA aktivitesindeki değişikliklere bağlı olduğu ileri sürülebilir. Menopoz döneminde psikolojik strese bağlı organ yanıtının daha iyi ortaya konması için ek deneysel ve klinik çalışmalara gereksinim vardır.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik kurul onayı Marmara Üniversitesi Deneysel Hayvanı Araştırma Etik Kurulu'ndan alınmıştır (16.04.2009-21.2009).

Hasta Onamı: Bu çalışma için hasta onamına gerek yoktur.

Hakem Değerlendirmesi: Dış Bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - B.Ç.Y.; Tasarım - B.Ç.Y., G.M.; Denetleme - B.Ç.Y.; Kaynaklar - B.Ç.Y., G.M.; Malzemeler - G.M.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - G.M.; Analiz ve/veya Yorum - B.Ç.Y., G.M.; Literatür taraması - G.M., B.Ç.Y.; Yazıyı Yazan - B.Ç.Y., G.M.; Eleştirel İnceleme - B.Ç.Y.

Teşekkür: Bu çalışma Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nde yapılan bir yüksek lisans tezinden kaynaklanmıştır.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (SAG-C-YLP-211009-0304).

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received for this study from of Marmara University Experimental Animal Research Ethics Committee (16.04.2009-21.2009).

Informed Consent: Not required in this study.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author contributions: Concept - B.Ç.Y.; Design - B.Ç.Y., G.M.; Supervision - B.Ç.Y.; Resource - B.Ç.Y., G.M.; Materials - G.M.; Data Collection&/or Processing - G.M.; Analysis&/or Interpretation - B.Ç.Y., G.M.; Literature Search - B.Ç.Y., G.M.; Writing - B.Ç.Y., G.M.; Critical Reviews - B.Ç.Y.

Acknowledgements: The study is originated from the Master's Thesis made in the Marmara University Health Sciences Institute.

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Financial Disclosure: This study was supported by the Marmara University Scientific Research Projects Commission (SAG-C-YLP-211009-0304).

KAYNAKLAR

1. Viau V. Functional cross-talk between the hypothalamic-pituitary-gonadal and -adrenal axes. *J Neuroendocrinol* 2002; 14: 506-13. [CrossRef]
2. Kudielka B M, Kirschbaum C. Sex differences in HPA axis responses to stress: a review. *Biol Psychol* 2005; 69: 113-32. [CrossRef]
3. Handa RJ, Burgess LH, Kerr JE, O'Keefe JA. Gonadal steroid hormone receptors and sex differences in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Horm Behav* 1996; 28: 464-76. [CrossRef]
4. Toufexis D, Rivarola MA, Lara H, Viau V. Stress and the Reproductive Axis. *J Neuroendocrinol* 2014; 26: 573-86. [CrossRef]
5. Handa RJ, Weiser MJ. Gonadal steroid hormones and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Front Neuroendocrinol* 2014; 35: 197-220. [CrossRef]
6. Kajantie E, Phillips DI. The effects of sex and hormonal status on the physiological response to acute psychosocial stress. *Psychoneuroendocrinology* 2006; 31: 151-78. [CrossRef]
7. Frey BN, Lord C, Soares CN. Depression during menopausal transition: a review of treatment strategies and pathophysiological correlates. *Menopause Int* 2008; 14: 123-8. [CrossRef]
8. Lagunas N, Calmarza-Font I, Diz-Chaves Y, Garcia-Segura LM. Long-term ovariectomy enhances anxiety and depressive-like behaviors in mice submitted to chronic unpredictable stress. *Horm Behav* 2010; 58: 786-91. [CrossRef]

9. Pradhan AD, Manson JE, Rossouw JE, Siscovick DS, Mouton CP, Wallace RB et al. Hormone replacement therapy, and incident coronary heart disease. *JAMA* 2002; 288: 980-7. [\[CrossRef\]](#)
10. Halcox JPJ, Schenke WH, Zalos G, Mincemoyer R, Prasad A, Waclawiw MA et al. Prognostic value of coronary vascular endothelial dysfunction. *Circulation* 2002; 106: 653-8. [\[CrossRef\]](#)
11. Steptoe A, Hamer M, Chida Y. The effects of acute psychological stress on circulating inflammatory factors in humans: A review and meta-analysis. *Brain Behav Immun* 2007; 21: 901-12. [\[CrossRef\]](#)
12. Prather AA, Carroll JE, Fury JM, McDade KK, Ross D, Marsland AL. Gender differences in stimulated cytokine production following acute psychological stress. *Brain Behav Immun* 2009; 23: 622-8. [\[CrossRef\]](#)
13. Victorino VJ, Panis C, Campos FC, Cayres RC, Colado-Simão AN, Oliveira SR et al. Decreased oxidant profile and increased antioxidant capacity in naturally postmenopausal women. *Age (Dordr)* 2013; 35: 1411-21. [\[CrossRef\]](#)
14. Gimpl G, Fahrenholz F. The oxytocin receptor system: structure, function and regulation. *Physiol Rev* 2001; 81: 629-83.
15. Ross HE, Young LJ. Oxytocin and the neural mechanisms regulating social cognition and affiliative behavior. *Front Neuroendocrinol* 2009; 30: 534-47. [\[CrossRef\]](#)
16. Taylor SE, Klein LC, Lewis BP, Gruenewald TL, Gurung RA, Updegraff JA. Biobehavioral responses to stress in females: tend-and-befriend, not fight-or-flight. *Psychol Rev* 2000; 107: 411-29. [\[CrossRef\]](#)
17. Yeğen BÇ. Oxytocin and hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Marmara Pharm J* 2010; 14: 61-6. [\[CrossRef\]](#)
18. Petersson M, Hulting AL, Uvnas-Moberg K. Oxytocin causes a sustained decrease in plasma levels of corticosterone in rats. *Neurosci Lett* 1999; 264: 41-4. [\[CrossRef\]](#)
19. Uvnas-Moberg K. Oxytocin may mediate the benefits of positive social interaction and emotions. *Psychoneuroendocrinology* 1998; 23: 819-35. [\[CrossRef\]](#)
20. Uvnas-Moberg K, Ahlenius S, Hillegaart V, Alster P. High doses of oxytocin cause sedation and low doses cause an anxiolytic-like effect in male rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1994; 49: 101-6. [\[CrossRef\]](#)
21. Lundeborg T, Uvnas-Moberg K, Agren G, Bruzelius G. Anti-nociceptive effects of oxytocin in rats and mice. *Neurosci Lett* 1994; 170: 153-7. [\[CrossRef\]](#)
22. Düşünceli F, Işeri SO, Ercan F, Gedik N, Yeğen C, Yeğen BC. Oxytocin alleviates hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *Peptides* 2008; 29: 1216-22. [\[CrossRef\]](#)
23. Işeri SO, Sener G, Saglam B, Gedik N, Ercan F, Yeğen BC. Oxytocin protects against sepsis-induced multiple organ damage: role of neutrophils. *J Surg Res* 2005; 126: 73-81. [\[CrossRef\]](#)
24. Gülpinar MA, Ozbeyli D, Arbak S, Yeğen BC. Anti-inflammatory effect of acute stress on experimental colitis is mediated by cholecystokinin-B receptors. *Life Sci* 2004; 21: 77-91. [\[CrossRef\]](#)
25. Cetinel S, Hancıoğlu S, Sener E, Uner C, Kiliç M, Sener G, et al. Oxytocin treatment alleviates stress-aggravated colitis by a receptor-dependent mechanism. *Regul Pept* 2010; 160: 146-52. [\[CrossRef\]](#)
26. Maier SF, Watkins LR. Cytokines for psychologists: implications of bidirectional immune-to-brain communication for understanding behavior, mood, and cognition. *Psycho Rev* 1998; 105: 83-107. [\[CrossRef\]](#)
27. Kim OY, Chae JS, Paik JK, Seo HS, Jang Y, Cavaillon JM, et al. Effects of aging and menopause on serum interleukin-6 levels and peripheral blood mononuclear cell cytokine production in healthy nonobese women. *Age (Dordr)* 2012; 34: 415-25. [\[CrossRef\]](#)
28. Steptoe A, Owen N, Kunz-Ebrecht S, Mohamed-Ali V. Inflammatory cytokines, socioeconomic status, and acute stress responsivity. *Brain Behav Immun* 2002; 16: 774-84. [\[CrossRef\]](#)
29. Prather AA, Carroll JE, Fury JM, McDade KK, Ross D, Marsland AL. Gender differences in stimulated cytokine production following acute psychological stress. *Brain Behav Immun* 2009; 23: 622-8. [\[CrossRef\]](#)
30. Walsh B, Shiff I. Menopause. Becker et al. *Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism*. Philadelphia, PA : Lippincott, Williams & Wilkins. 2001; p. 982-91.
31. Liu H, Liu K, Bodenner DL. Estrogen receptor inhibits interleukin-6 gene expression by disruption of nuclear factor κB transactivation. *Cytokine* 2005; 31: 251-7. [\[CrossRef\]](#)
32. Kuriyama H, Shibasaki T. Sexual differentiation of the effects of emotional stress on food intake in rats. *Neuroscience* 2004; 124: 459-65. [\[CrossRef\]](#)
33. Kirschbaum C, Schommer N, Federenko I, Gaab J, Neumann O, Oellers M, et al. Short term estradiol treatment enhances pituitary-adrenal axis and sympathetic response to psychosocial stress in healthy young men. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 3639-43. [\[CrossRef\]](#)
34. Hoeksema SN. Gender Differences in Depression. *Current Directions in Psychological Science* 2002; 10: 173-6. [\[CrossRef\]](#)
35. Yayou K, Ito S, Kasuya E, Sutoh M, Ohkura S, Okamura H. Intracerebroventricularly administered oxytocin attenuated cortisol secretion, but not behavioral responses, during isolation in Holstein steers. *J Vet Med Sci* 2008; 70: 665-71. [\[CrossRef\]](#)
36. Lu NZ, Bethea CL. Ovarian steroid regulation of 5-HT1A receptor binding and G protein activation in female monkeys. *Neuropsychopharmacology* 2002; 27: 12-24. [\[CrossRef\]](#)
37. Neumann ID, Tornet L, Wigger A. Brain oxytocin: differential inhibition of neuroendocrine stress and anxiety-related behaviour in virgin, pregnant, and lactating rats. *Neuroscience* 2000; 95: 567-75. [\[CrossRef\]](#)
38. Windle RJ, Shanks N, Lightman SL, Ingram CD. Central oxytocin administration reduces stress-induced corticosterone release and anxiety behavior in rats. *Endocrinology* 1997; 138: 2829-34. [\[CrossRef\]](#)
39. Parker KJ, Buckmaster CL, Schatzberg AF, Lyons DM. Intranasal oxytocin administration attenuates the ACTH stress response in monkeys. *Psychoneuroendocrinology* 2005; 30: 924-9. [\[CrossRef\]](#)
40. Miller AA, De Silva TM, Jackman KA, Sobey CG. Effect of gender and sex hormones on vascular oxidative stress. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007; 34: 1037-43. [\[CrossRef\]](#)
41. Hernández I, Delgado JL, Díaz J, Quesada T, Teruel MJ, Llanos MC et al. 17β-Estradiol prevents oxidative stress and decrease blood pressure in ovariectomized rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000; 279: 1599-1605.
42. Subbiah MT. Mechanisms of cardioprotection by estrogens. *Proc Soc Expert Biol Med* 1998; 217: 23-9. [\[CrossRef\]](#)
43. Sanchez-Rodriguez MA, Zacarias-Flores M, Arronte-Rosales A, Correa-Muno E, Mendoza-Nunez VM. Menopause as risk factor for oxidative stress. *Menopause* 2012; 19: 361-7. [\[CrossRef\]](#)
44. Sahin E, Gümüçlü S. Stress-dependent induction of protein oxidation, lipid peroxidation and anti-oxidants in peripheral tissues of rats: comparison of three stress models (immobilization, cold and immobilization-cold). *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007; 34: 425-31. [\[CrossRef\]](#)