

Ratlarda gıda kısıtlamasının lipit peroksidasyon ve kanın antioksidan durumuna etkisinin araştırılması

Fahri Bayıroğlu Dide Kılıçalp Recep Aslan

Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Van, TÜRKİYE

Özet: Kemirgenlerde gıda kısıtlaması, sebebi tam olarak bilinmeyen bazı mekanizmalarla ömür sürelerini artırmaktadır. Bu etkinin açıklanmasında, en fazla antioksidan ve lipit peroksidasyon düzeylerinin etkileri üzerinde durulmuştur. Metabolik hızın azaltılmasına bağlı olarak, lipit peroksidasyon hasarının düşürülebileceği öne sürülmüştür. Bu çalışmada 8 hafta süre ile % 50 gıda kısıtlaması uygulanan 6 haftalık yaşta erkek Wistar albino ratlarda, lipit peroksidasyon ve kan antioksidan düzeylerindeki değişimler gözlemlenmiştir. Deneme başlangıcı ve ilk 4 haftalık deneme süresince gözlenen parametrelerde hiçbir değişiklik görülmezken, daha sonraki günlerde deneme grubunun lipit peroksidasyon düzeyinin kontrollere göre istatistiksel önemde ($p < 0.05$) azaldığı bulundu. Deneme grubu süperoksididismutaz (SOD) düzeyinde kontrollere göre istatistiksel önemde olmayan bir artış gözlemlenirken, glutatyon peroksidaz (GSH-Px) düzeyinde bir değişiklik saptanmadı. Bu verilerin ışığında, deneme grubu lipit peroksidasyon düzeyindeki anlamlı azalma, metabolik hızın düşürülmesine bağlı olarak serbest radikal hasarının da azaltılabileceği görüşünü desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler: Gıda kısıtlaması, Lipit peroksidasyon, Antioksidan.

The effect of the food restriction on lipid peroxidation and blood antioxidant levels in rats

Abstract: Dietary restriction extends maximum life span in rodents by unknown mechanisms. In order to explain these effects, antioxidant and lipid peroxidation levels have been focused widely. It has been proposed that the deleterious effects of lipid peroxidation could be prevented by decreasing the metabolic rate. In this study, in 6-week-old Wistar Albino rats fed with 50% decreased food compared to the controls during 8 weeks were observed the changes of the lipid peroxidation and antioxidant levels. At the beginning and the first 4 weeks of the experiment, there was no change in the parameters being observed. However after the 4 weeks the lipid peroxidation levels of the restricted group were found to be significantly ($P < 0.05$) decreased compared to the controls. Although SOD enzyme levels tended to slightly increased in the restricted group, those were not statistically significant. GSH-PX enzyme levels were not found to change during the study. These data suggest that food restriction might decrease the deleterious effects of the lipid peroxidation by reducing the metabolic rate.

Key Words: Food restriction, Lipid peroxidation, Antioxidant.

GİRİŞ

Uzun bir süreden beri, gıda kısıtlamasının kemirgenlerde (rodentlerde) ortalama ve maksimum yaşam süresini artırdığı bilinmesine karşın, etki mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır (1-5). Ayrıca gıda kısıtlamasının yaşlanmaya bağlı olarak gelişen fizyolojik işlevlerindeki kaybı önlediği ve yaşlanmayla ilgili birçok hastalıkların oluşumunu engellediği bildirilmektedir (6, 7).

Yaşlanmanın oluşumunda temel neden olarak, normal aerobik metabolizma sırasında meydana gelen serbest radikal tepkimeleri gösterilmektedir (8). Normal metabolizma sırasında moleküler oksijenin yaklaşık

%98' i oksidaz yolu tarafından tamamen suya kadar indirgenir. Diğer kalan kısmı oksijenaz yolu ile oldukça toksik olan reaktif oksijen türlerine (süperoksit, hidroksil radikalleri ve hidrojen peroksit gibi) çevrilir. Bu reaktif oksijen indirgenme ürünleri, hücrel ve özellikle membran yapılarında lipit ve lipit moleküllerine saldırırlar. Yaşlanma işleminin, hücrel metabolik etkinlikle ilişkili olarak ortaya çıkan, serbest radikal ürünlerinin yığımsal birikiminden kaynaklandığı belirtilmektedir (8-10). Gıda kısıtlamasının, metabolik hızı azaltarak, lipit peroksidasyonu düşürdüğü öne sürülmektedir (9-11). Oksijen metabolizmasının bu ara indirgenme ürünlerinin seviyeleri, hücrel savunma mekanizmasını oluşturan süperoksididismutaz (SOD),

katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve enzimatik olmayan (glutatyon ve α -tokoferol) yakalayıcı sistemleri ile kontrol edilir. Kısıtlı beslemenin antioksidatif savunma sistemini destekleyip güçlendirdiği de bildirilmektedir (11, 12).

Bu çalışmada, gıda kısıtlaması süresince kan lipit peroksidasyon ve antioksidan düzeylerindeki zamana bağlı olarak değişimler gözlemlenmiştir.

MATERYAL VE METOT

Çalışmada İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Ünitesinden sağlanan erkek Wistar albino ratlar kullanıldı. Ratlar 3 haftalık iken alındı. Denemenin yapılacağı laboratuvar ortamına uyum (adaptasyon) sağlanması için, 6 haftalık yaşa kadar tüm ratlar standart rat yemi ile ad libitum beslendiler.

Deneme, 24-26°C oda sıcaklığında, nem oranı, %50±10 olan ve aydınlık-karanlık siklusu herbiri 12 saat olacak şekilde ayarlanan bir ortamda gerçekleştirildi. Su, deneme ve kontrol gruplarına kısıtlamaksızın ad libitum olarak verildi. Deneme ve kontrol yemleri Van Yem Sanayii A.Ş. de özel olarak yapıldı. Kontrol grubu için standart rat yemi hazırlanırken, deneme grubu için birim miktarda normalden iki kat fazla vitamin ve mineral katkısı içerecek şekilde hazırlatıldı. Böylece total gıda kısıtlaması yapılırken, vitamin ve mineral eksikliğinin oluşmaması sağlandı. Üç haftalık uyum sağlama süresi sonunda ratların ağırlıkları her grupta dengeli dağılacak şekilde rastgele deneme ve kontrol olmak üzere iki gruba ayrıldı. Teker teker kafeslere yerleştirilerek kontroller ad libitum beslenirken, deneme grubundaki hayvanlar ise kontrol grubunun günlük yem tüketiminin yarısı olacak şekilde beslenmeleri sağlandı. Deneme boyunca kontrollerin günlük yem tüketim kayıtları tutularak, deneme grubuna sağlanacak %50 kısıtlamalı miktarlar belirlendi. Bu şekildeki yem günde bir kez olmak üzere 17.00-18.00 saatleri arasında verildi. Deneme başlangıcında deneme grubundakilerin yem tüketimi için, bir önceki hafta kendi ad libitum tüketimlerinin yarısı esas alınırken, daha sonraları, kontrollerin tüketim miktarına göre belirlendi.

Deneme başlangıcında ve deneme süresince her iki haftada bir eter anestezisi altında kuyruk kesme yöntemiyle heparinize tüplere kan alınarak analizler gerçekleştirildi. Serbest radikallerin membranlarda doymamış yağ asidi peroksidasyonunu artırması sonucu oluşan peroksidasyon ürünlerinden malondialdehit (MDA), TBARS yöntemiyle ölçülerek lipit peroksidasyon düzeyi belirlendi (13). Kan antioksidan enzimlerinden süperoksitdismutaz (SOD) tayini, pirogallol (0.2 mmol/L) otooksidasyonunun gözlenmesiyle yapıldı (14). Bir ünite Cu-Zn SOD etkinliği, pirogallol otooksidasyonunu %50' ye kadar inhibe etmek için gerekli enzim miktarı olarak tanımlandı. Glutatyon peroksidaz etkinliği tayini, Paplia-Valentin metoduna dayanılarak özel kitleri yolu ile spektrofotometrik okuma ile otoanalizörde (Technicon RAX) belirlendi (15). Lipit peroksidasyon düzeyinin belirlenmesi tüm kanda yapılırken, SOD ve GSH - Px analizleri eritrosit paketinde gerçekleştirildi. Hemogloblin tayini Sahli hemogloblinometresi yoluyla ölçüldü (16). İstatistiksel değerlendirme, minitab paket programı kullanılarak gerçekleştirildi. Gruplar arasındaki değerlendirmeler için Varyans analizi ve Student t-testi kullanıldı.

BULGULAR

Kontrol ve deneme gruplarının çalışma boyunca vücut ağırlık değişimleri Tablo 1'de gösterilmektedir. Kontrollere kıyasla deneme grubunun vücut ağırlığında belirgin azalma gözlemlenmektedir. Yem tüketimi ile ilgili bilgiler Tablo 2'de verilmektedir. Deneme başında, boyunca ve deneme sonunda kan lipit peroksidasyon, SOD ve GSH-Px seviyeleri Tablo 3,4 ve 5' de sırasıyla sunulmaktadır. Tablolardan da görülebileceği gibi deneme başlangıcı ve ilk 4 hafta sonrasındaki analizlerde hiçbir parametrede istatistiksel anlamda bir farklılık gözlenmedi. Buna karşın daha sonraki günlerde deneme grubunun lipit peroksidasyon düzeyinin kontrollere göre istatistiksel önemde ($p < 0.05$) azaldığı gözlemlendi. Deneme grubu SOD düzeyinde ise kontrollere göre bütün ölçümlerde gözlemlenen hafif bir artış istatistiksel anlamda önemli bulunmadı. Glutatyon peroksidaz düzeylerinde ise deneme ve kontrol grupları arasında bir fark gözlenmedi.

Tablo 1. Deneme süresince gruptaki vücut ağırlık değişimleri (g).

Gruplar	0. Hafta	2. Hafta	4. Hafta	6. Hafta	8. Hafta
Kontrol (n=14)	125 ± 4 ^a	167 ± 3 ^a	193 ± 6 ^a	221 ± 5 ^a	267 ± 7 ^a
Deneme (n=14).	125 ± 4 ^a	136 ± 4 ^b	141 ± 5 ^b	148 ± 4 ^c	153 ± 6 ^c

Aynı sütunda farklı harfler gruplar arasındaki önemi göstermektedir. (a-b, $p < 0.05$; a-c, $p < 0.01$)

Tablo 2. Deneme süresince gruptaki yem tüketim miktarları (g).

Gruplar	0. Hafta	2. Hafta	4. Hafta	6. Hafta	8. Hafta
Kontrol (n=14)	18 ± 2	19 ± 2	19 ± 2	17 ± 2	18 ± 2
Deneme (n=14)	18 ± 2	9.5 ± 2	9.5 ± 2	8.5 ± 2	9 ± 2

Tablo 3. Gıda kısıtlamasının haftalara göre lipit peroksidasyon miktarı üzerine etkisi (nmol MDA/ml kan).

Gruplar	0. Hafta	2. Hafta	4. Hafta	6. Hafta	8. Hafta
Kontrol (n=14)	1.23 ± 0.18 ^a	1.29 ± 0.17 ^a	1.36 ± 0.21 ^a	0.94 ± 0.06 ^a	0.98 ± 0.03 ^a
Deneme (n=14)	1.32 ± 0.15 ^a	1.31 ± 0.13 ^a	1.39 ± 0.31 ^a	1.37 ± 0.27 ^b	1.41 ± 0.36 ^b

Aynı sütunda farklı harfler gruplar arasındaki önemi göstermektedir (a-b, p< 0.05).

Tablo 4. Gıda kısıtlamasının haftalara göre eritrosit SOD enzim seviyeleri üzerine etkisi (U/g hemoglobin).

Gruplar	0. Hafta	2. Hafta	4. Hafta	6. Hafta	8. Hafta
Kontrol (n = 14)	768 ± 35 ^a	781 ± 43 ^a	785 ± 51 ^a	778 ± 44 ^a	781 ± 48 ^a
Deneme (n = 14)	772 ± 41 ^a	784 ± 39 ^a	791 ± 48 ^a	778 ± 51 ^a	801 ± 54 ^a

Deneme ve kontrol grupları arasında istatistiksel anlamda önem bulunmadı.

Tablo 5. Gıda kısıtlamasının haftalara göre eritrosit GSH-Px enzim seviyeleri üzerine etkisi (U/g hemoglobin)

Gruplar	0. Hafta	2. Hafta	4. Hafta	6. Hafta	8. Hafta
Kontrol (n = 14)	876 ± 37	869 ± 61	881 ± 54	890 ± 39	879 ± 42
Deneme (n = 14)	892 ± 46	861 ± 52	894 ± 48	887 ± 45	889 ± 38

Deneme ve kontrol grupları arasında istatistiksel anlamda önem bulunmadı.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Yaşlanmanın oluşumunu açıklamak için ortaya atılan savlardan en fazla ilgi çeken, üzerinde epeyce tartışma yapılagelse de, serbest radikal hipotezi olmuştur (8, 17). Bu teoriye göre, normal aerobik metabolizma sırasında üretilen serbest radikallerin zaman içerisinde bünyede zararlar meydana getirmesi, bunun da fizyolojik işlevlerde gerilemeye ve hastalık insidensinde artışa sebep olmasıyla yaşlılığa neden olduğu ileri sürülmektedir. Serbest radikallerin normal oksijen metabolizması sırasında üretildiği bilindiğinden, gıda kısıtlamasının normal metabolik hızı azaltmak yoluyla serbest radikal oluşumunu daha aza indireceği düşünülmektedir (6, 8, 12, 17).

Bir diğer söyleyişle, metabolik hızın düşürülmesiyle serbest radikal hasarının azaltılacağı

öne sürülmektedir (6, 8, 10, 12, 17). Yapılan diğer birçok çalışmalarla da bu tez desteklenmektedir (18-22).

Bu iddianın bir parçası olarak da yaşlanmanın oluşumunda antioksidan savunma sisteminin zayıfladığı bildirilmektedir (23). Ayrıca çeşitli türlerde ömür süreleri ile antioksidan enzim düzeyleri arasında pozitif bir ilişki (korelasyon) olduğu da belirtilmektedir (24). Her ne kadar bazı çelişkili sonuçlar alınmış olsa da, uygun bir antioksidan / prooksidan dengesinin, yaşlanmada önemli bir yer aldığı öne sürülmektedir (25, 26).

Bu çalışmada, 8 hafta süre ile uygulanan %50 gıda kısıtlamasının ratlarda lipit peroksidasyon oluşumunu azalttığı gözlemlenmesine karşın, SOD ve GSH-Px düzeylerinde bir değişiklik meydana getirmediği gözlemlendi. Lipit peroksidasyon

düzeylerinde görülen bu anlamlı azalma, Weindruch ve ark. (3), Yu ve ark. (6), Laganier ve ark. (11), Xia ve ark.(26), ve Koizumi ve ark. (27)'nin çalışmalarıyla uyum göstermektedir.

Çalışmada, lipit peroksidasyon miktarındaki azalma ile birlikte antioksidan enzimlerden SOD ve GSH-Px düzeylerinde değişiklik olmaması, Chipalketti ve ark (19) ile Koizumi ve ark. (27)'nin sonuçları ile uyum içerisinde olmasına karşın, antioksidan enzimlerde artış bildiren Wohaib ve ark. (9), Cadanas ve ark. (28) Pieri ve ark. (29) Jung ve ark. (30)' nın sonuçları ile ters düşmektedir. Pieri ve ark. (29) ile Jung ve ark. (30)' nın gıda kısıtlaması değil de açlık denemesi yapmış olmalarının yanında, ayrıca lipit peroksidasyonda da artış bildirmişlerdir. Bir yerde gıda kısıtlaması denemesinin negatif kontrolü gibi değerlendirilirse, açlık uygulamasının lipit peroksidasyona neden olarak antioksidan enzim düzeylerinde artışa sebep olabileceği söylenebilir. Ayrıca antioksidan enzim düzeylerinin birlikte hareket etmediğini Koizumi ve ark. (27)'nin, katalaz enzim düzeyinde yükselme olduğunu bildirmelerine karşın, SOD düzeyinin buna eşlik etmediğini göstermelerinden anlıyoruz.

Sonuç olarak, açlık ve yetersizlik seviyelerine ulaşmayan gıda kısıtlamasının ratlarda serbest radikal hasarı azalttığı ortaya konulurken, bunun da var olan çalışmaların ışığı altında daha sağlıklı ve uzun bir hayat sürdürmeye etkili olabileceği söylenebilir.

Gıda kısıtlamasının gözlenen olumlu etkilerinin açıklanmasında metabolik hızın yavaşlatılması büyük yer tutmaktadır. Bu yüzden insanlar ve kemirgenler (rodentler) arasındaki metabolik hız farkı göz önüne alındığında, bu tip çalışmaların insanlara uyarlanabilmesi için bu durum önemli bir faktör olarak değerlendirilmelidir.

Teşekkür: Bu çalışmaya katkılarından dolayı Yüzüncü Yıl Üniversitesi Araştırma Fonu Başkanlığına teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Mccay CM, Crowell MF, Maynard LA: The effect of retarded growth upon the length of the lifespan and upon the ultimate body size. *J. Nutrition*. 10: 63-79, (1935).
2. Ross MH: Length of life and nutrition in the rat. *J. Nutr*. 75:197-210, (1961).
3. Weindruch R, Walford RL, Fligiel S, Guthrie D: The retardation of aging by dietary restriction: Longevity, immunity and life time energy intake. *J. Nutr*. 116: 641-651, (1986).
4. Masoro EJ: Nutrition and aging. A current assessment. *J. Nut*. 115: 842-848, (1984).
5. Masoro EJ: Food restriction in rodents: An evaluation of its role in the study of aging. *J. Gerontology*. 43: B 59-B64, (1988).
6. Yu BP, Masoro EJ, McMahan CA: Nutritional influences on aging of Fischer 344 rats: I physical metabolic, and longevity characteristics. *J. Gerontology* 40: 657-670, (1985).

7. Maeda H, Gleiser CA, Masoro EJ, Murada I, McMahan CA, Yu BP: Nutritional influences on aging of Fischer 344 Rats: II. *Pathology J. Gerontology* 40:671-688, (1985).
8. Harman D: Free Radical Theory of Aging History In: *Free Radicals and Aging* (Emerit, I, and Chance, B., eds) pp.1-10. Khauser Verlag, Basel, Switzerland. (1992).
9. Wohaib SA, Godin DV: Starvation-related alterations in free radical tissue defense mechanisms in rats. *Diabetes* 36: 169-173, (1987).
10. Cutler RG: Antioxidants, Aging and Longevity. In: *Free Radicals in Biology* (Pryor, W.A., ed.) Vol.6, pp.371-428. Academic Press, New York. (1984).
11. Laganier S, Yu BP: Anti-lipoperoxidation action of food restriction. *biotechnical and biophysical research communications* 145(3): 1185-1191, (1987).
12. Yu BP: Antioxidant action of dietary restriction in the aging process. *J. Nut. Science Vitaminol*. 39: S75-S83, (1993).
13. Akkus I: Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. I. Baskı. Mımoza Yayınları. Konya. (1995).
14. Marklund S, Marklund G: Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of progallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem*, 47:469-474, (1974).
15. Flohe L, Gunzler WA: Assays of glutathione peroxidase. *Methods enzymology*: 105: 114-121, (1984).
16. Harman D: The Free-Radical Theory of Aging. In: *Modern Biological Theories of Aging* (Warnes, R.N., Butler, R.L. Sprott, R.L., Schneider, E.L., eds.) pp.81-87. Raves Press, New York. (1987).
17. Enesco HE, Kruke P: Dictory restriction reduces fluorescent age pigment accumulation in mice. *Exp. Gerontol*. 16:357-361, (1981).
18. Rao G, Xia E, Nadakavukaren MJ, Richardson A: Effect of dietary restriction on the age-dependent changes in the expression of antioxidant enzymes in rat liver. *J Nutr*. 120:602-609, (1990a).
19. Chipalkatti S, De AK, Aiyar AS: Effect of diet restriction on some biochemical parameters related to aging in mice. *J. Nutr*, 113:944-950, (1983).
20. Davis LJ, Todolini B, Biagi PL, Walford RL, Rutter WD: Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonucleases. *Biochemistry* 18:5294-5299, (1979).
21. Yu BP, Lee DW, Choi JH: Prevention of Free Radical Damage by Food Restriction. In: *Biological Effects of Dietary Restriction* (Fishbain, L. ed.), pp.191-197. Springer – Verlag, New York. (1991).
22. Warner HR: Overview. mechanisms of antioxidant action on life span. *Toxical industrial. Health* 9:151-161, (1993).
23. Barjade Quiroga G, Lopez Tores M, Perez – Compo R: Relationship Between Antioxidants, Lipid Peroxidation and Aging. In: *Free Radicals and Aging* [Emerit, I., Chance B., eds.) pp.109-123. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland. (1992).
24. Vericel E, Rey C, Calzada C, Haond P, Chapuy PH, Lagarde M: Age-related changes in arachidonic acid peroxidation and glutathione peroxidase activity in human platelets. *Prostagladins*. 43:75-85, (1992).
25. Niwa Y, Ishimoto K, Kanoh T: Induction of superoxide dismutase in leucocytes by paraquat: Correlation with age and possible predictor of longevity blood 76: 835-841, (1990).
26. Xia E, Rao G, Remmen HV, Heydari AR, Richardson A: Activities of antioxidant enzymes in various tissues of male Fischer 344 Rats are altered by food restriction. *J. Nutr*. 125: 195-201, (1995).

27. Koizumi A, Weindruch R, Walford RL: Influences of dietary restriction and age on liver enzyme activities and lipid peroxidation in mice. *J. Nutr.* 117: 361-367, (1987).
28. Cadenas S, Rojas C, Perez – Campo R, Lopez-Torres M, Barja G: Caloric and carbohydrate restriction in the kidney: Effects on free radical metabolism. *Exp. Gerontol.* 29:77-88, (1994).
29. Pieri C, Falasca M, Moroni F, Recchioni R, Marcheselli F, Ioppo C, Masmocchoni F: Antioxidant enzymes in erythrocytes from old and diet restricted rats. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* 10:909-914, (1990).
30. Jung K, Henke W: Effect of starvation of antioxidant enzymes and respiratory mitochondrial functions in kidney and liver from rats. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 22:163-169, (1997).

Yazışma Adresi:

Fahri Bayıroğlu
Yüzüncü Yıl Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı
VAN-TÜRKİYE

Not: Bu çalışma Yüzüncü Yıl Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 96 VF 001 nolu proje olarak desteklenmiştir.