



Koç Katımının Kandaki Malondialdehit ve Bazı Antioksidanlar Üzerine Etkileri

Mine ERİŞİR¹✉, Fatih Mehmet KANDEMİR², Fulya BENZER²

1. Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, ELAZIĞ
2. Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, ELAZIĞ

ÖZET: Bu çalışmada koç katımı öncesi, esnası ve sonrasında 6 koçta (2 Sakız, 2 Akkaraman ve 2 Ost-friz) kan malondialdehit (MDA) ve glutatyon (GSH) düzeyleri ile glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz (CAT) aktivitelerinin incelenmesi amaçlandı. Koç katımından 15 gün önce, koç katımı sırasında ve koç katımından 15 gün sonra *v. jugularis* yoluyla kan örnekleri alınarak plazma MDA düzeyleri, eritrosit GSH düzeyleri, GSH-Px ve CAT aktiviteleri ölçüldü. Koç katımı öncesi, esnası ve sonrasında antioksidan parametrelerinde istatistiksel açıdan önemli fark bulunmadı. Bununla birlikte, koç katımı esnasında plazma MDA düzeyinde istatistiksel olarak önemli olmayan bir artış saptandı. Sonuç olarak, koç katımının kandaki MDA ve ölçülen antioksidan parametreleri üzerine anlamlı bir etkisinin olmadığı saptandı.

Anahtar sözcükler: Koç katımı, Malondialdehit, Glutatyon, Glutatyon peroksidaz, Katalaz.

The Effects of Mating in Rams on Blood Malondialdehyde and Some Antioxidants

ABSTRACT: The aim of the study was to investigate the malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH) levels and glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT) activities in the blood on pre-, during and post-mating days in rams (2 Chios, 2 Awassi and 2 Ost-Friz). Blood samples were collected from the jugular vein on 15 day earlier, on the day of mating and 15th day after mating. The MDA level in the plasma, GSH level and GSH-Px, CAT activities in the erythrocytes were measured. No statistically significant difference was found for antioxidant parameters measured on pre-, during and post-mating days. However, MDA levels were slightly increased during mating. In conclusion, it was found that mating in rams had no influence on blood MDA level and the antioxidant parameters measured herein.

Key words: Mating in rams, Malondialdehyde, Glutathione, Glutathione peroxidase, Catalase.

✉ Sorumlu yazar / Corresponding author;

☎ 0424 2370000,

✉ mineerisir@yahoo.com

GİRİŞ

Reaktif oksijen türevi (ROT) bileşikler; hücrelerde dopamin ve adrenalin oksidasyonu, pürin katabolizması, aerobik metabolizma gibi normal biyokimyasal reaksiyonlar sırasında üretilen oldukça toksik bileşiklerdir (Cheeseman ve Slater, 1993). Reaktif oksijen türevi bileşikler yapısal özellikleri nedeni ile lipid, protein ve nükleik asit gibi hücre bileşenlerini okside etme kapasitesine sahiptir. Özellikle hücre membran yapısında bulunan doymamış yağ asitleri oksidasyona duyarlıdır ve bunların oksidasyonu lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarının başlamasına neden olur. Lipid peroksidasyonu sonucu, hücre membranlarının özelliklerini ve fizyolojik fonksiyonlarını etkileyen lipid peroksitler ve diğer ara ürünler oluşur (Akkuş, 1995). Bu ürünlerin en yaygını malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksinonenal'dir (Comporti, 1989).

Reaktif oksijen türevi bileşiklerinin zararlı etkilerinden korunmak için hücreler enzimatik ve nonenzimatik antioksidan savunma sistemlerini kullanırlar. Serbest oksijen radikalleri başlıca; superoksid dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), katalaz (CAT) gibi enzimatik ve glutatyon (GSH), α -tokoferol, karotenoidler ve C-vitamini gibi enzimatik olmayan çeşitli antioksidanlarla uzaklaştırılabilir (Miller ve Brzezinska-Slebozinska, 1993; Stahl ve Sies, 1997).

Reaktif oksijen türevi bileşikler memeli dokularında hem fizyolojik hemde patolojik şartlar altında şekillenir. Yüksek testosteron seviyelerinin oksidatif strese rolünün olduğunu ilk olarak von Schantz ve ark. (1999) bildirmişlerdir. Koç katımı sezonunda koçlarda testosteron düzeyinin arttığı saptanmıştır (Gomes ve Joyce, 1975). Bu çalışmada koç katımı esnasındaki fizyolojik testosteron artışının plazma MDA ve kan GSH düzeyleri ile GSH-Px ve CAT aktiviteleri üzerine etkisinin olup olmadığı, koç katımı esnasında, öncesinde ve sonrasında bu parametreler ölçülerek araştırılmıştır.

MATERYAL ve METOT

Bu çalışmada Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Çiftliğinde bulunan, yaklaşık 60-65 kg ağırlığında ve 4-5 yaşlarındaki 6 koç (2 sakız, 2 Akkaraman ve 2 Ost-friz) kullanıldı. Aynı bakım, beslenme ve barınak özelliğine sahip, klinik olarak sağlıklı koçlardan koç katımından 15 gün önce, koç katımı sırasında (15 Temmuz) ve koç katımından 15 gün sonra olmak üzere 3 kez vena jugularis'lerinden heparinli tüplere kan alındı. Alınan kanların bir kısmı tam kan olarak ayrılıp GSH-Px aktivitesi (Beutler E, 1975) ve GSH konsantrasyonu (Beutler ve ark, 1963) ölçüldü. GSH-Px aktivitesi, NADPH oksidasyonunu takiben spektrofotometrik olarak 340 nm'de sistemin optik dansitesindeki düşüşten hesaplanır. GSH-Px aktivitesi U/g hemoglobin şeklinde hesaplandı. GSH seviyesi, 5, 5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (Ellmann's solüsyonu) ile sülfhidril gruplarının sarı renk oluşturması ve bu rengin 412 nm'de ölçülmesi esasına dayanır. GSH seviyesi $\mu\text{mol/g}$ hemoglobin olarak verildi.

Geriye kalan kanlar ise 1500 g'de 5 dakika santrifüj edilerek eritrosit ve plazması ayrıldı. Plazmada MDA seviyesi Placer ve ark. (1966)'nın metoduna göre tespit edildi. Oluşan MDA, tiyobarbitürük asitle (TBA) pembe renkli bir kompleks oluşturmakta ve bu çözeltinin absorbanı 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülerek LPO'nun derecesi saptanmaktadır. Plazma MDA düzeyi nmol/ml olarak hesaplandı.

Serum fizyolojik ile 3 kez yıkanan eritrosit hemolizatlarında CAT aktivitesi Aebi (1984)'nin bildirdiği metoda göre tespit edildi. Aktivite ölçümü ortamındaki H_2O_2 'nin CAT vasıtasıyla suya dönüşümü sağlanırken meydana gelen absorbanın azalmasının 240 nm'de ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Harcanan H_2O_2 miktarından CAT aktivitesi sonuçları k/g hemoglobin cinsinden verildi.

Hemoglobin (Hb) miktarını ölçmede ise siyanmethemoglobin metodu (Fairbanks ve Klee, 1986) kullanıldı.

İstatistiksel analiz

Gruplar arasındaki farkın kontrolünde SPSS 12.0 paket programı kapsamında tekrarlı ölçümlerde varyans analizi ve Duncan testinden faydalanıldı, sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak verildi.

BULGULAR

Koç katımı öncesi, esnasında ve sonrasında koçların plazma MDA ve kan GSH düzeyleri ile GSH-Px ve CAT aktiviteleri Tablo 1'de verildi. Koç katımı öncesi, esnası ve sonrasında bu parametrelerde istatistiki açıdan önemli fark bulunmadı. Bununla birlikte, koç katımı esnasında plazma MDA düzeyinde istatistik olarak önemli olmayan artış tespit edildi.

Tablo 1: Koç katımı öncesi, esnasında ve sonrasında koçların plazma MDA düzeyleri, kan GSH düzeyleri, GSH-Px ve CAT aktiviteleri (n=6).

Table 1: The malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH) levels and glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT) activities in the blood on pre-, during and post-mating days in rams.

	Koç Katımı Öncesi	Koç Katımı Zamanı	Koç Katımı Sonrası	P
MDA (nmol/ml)	4.77 \pm 0.34	5.73 \pm 0.74	3.96 \pm 0.98	-
Katalaz (k/g Hb)	33.37 \pm 6.89	32.32 \pm 6.50	29.09 \pm 4.15	-
GSH-Px (U/g Hb)	222.16 \pm 17.25	216.66 \pm 11.20	211.83 \pm 12.81	-
GSH (μ mol/g Hb)	1.98 \pm 0.25	2.03 \pm 0.10	2.36 \pm 0.13	-

NS - P>0.05

TARTIŞMA

Oksidatif stres, ROT'nin üretimi ve antioksidan savunmalar arasındaki dengesizliğin sonucudur (Finkel ve Holbrook, 2000). Testosteron genellikle metabolik hızı artırdığından dolayı (Buchanan ve ark., 2001; Fryburg ve ark., 1997), yüksek testosteron seviyeleri ROT üretimi ve antioksidan savunmalar arasındaki dengeyi değiştirebilir ve oksidatif stres riskinin artmasına sebep olabilir.

Yüksek testosteron seviyelerinin oksidatif streste rolünün olduğunu ilk olarak bildiren von Schantz ve ark. (1999) takiben çeşitli çalışmalar testosteronun prooksidan özelliklere sahip olduğunu bildirmişlerdir (Aydilek ve ark., 2004; Chainy ve ark., 1997; Klapcinska ve ark., 2008; Prasad ve ark, 2006; 2008;

Mooradian, 1993). Swiss albino farelerin testosteron ile muamelesi lipid peroksidasyonun prostatta %90, karaciğerde %35 artışına sebep olmuştur (Prasad ve ark, 2006; 2008). Yine yüksek testosteron seviyelerinin rat ve tavşan testis dokusunda (Aydilek ve ark., 2004; Chainy ve ark., 1997), rat kasında (Pansarasa ve ark., 2002) ve insan plasentasında (Zhu ve ark., 1997) oksidasyona dolayısıyla artmış oksidatif strese sebep olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada koç katımı esnasında plazma MDA düzeyinde istatistik olarak önemli olmayan artış saptandı. Mooradian (Mooradian, 1993) da testosteronun önemsiz prooksidant özelliği olduğunu göstermiştir. Kastre edilmiş ratların testosteronla muamele edilmesiyle ratların sol ventrikülündeki TBARS seviyeleri, istatistik

öneme ulaşmaksızın daha yüksek değerlere eğilim göstermiştir (Klapcinska ve ark., 2008). Tam ve ark. (2003b) Noble ratların testesteronla muamelesinin prostatta lipid peroksidasyonu değiştirmedeğini bildirmişlerdir. Bunlara zıt olarak testesteronun insan prostatında, rat nervöz sisteminde ve makrofajlarında antioksidan özelliklere sahip olduğu ve lipid peroksidasyonu azalttığı da bildirilmiştir (Tam ve ark., 2003a; Tamagno ve ark., 1998). Tüm bu bulgular testesteronun etkisinin dokuya ve türe göre değişebileceğine işaret eder.

Reaktif oksijen türevlerinin sebep olduğu membranlardaki lipid peroksidasyon/oksidasyon ve DNA hasarı gibi zararlı etkilere karşı, hücrelerin kendi kendilerini korumada sahip oldukları SOD, CAT, GSH-Px gibi enzim aktivitelerinin hormonlarla düzenlenebileceği gösterilmiştir (Pereira ve ark., 1998). Yüksek testesteron seviyelerinin rat ve tavşan testis, fare prostat ve karaciğer dokusunda CAT, GSH-Px ile beraber diğer antioksidan enzimlerde de azalmaya sebep olduğu gösterilmiştir (Aydilek ve ark., 2004; Chainy ve ark., 1997; Prasad ve ark., 2008). Testesteronla muamele edilen Noble ratların prostatında da antioksidan enzimlerde azalmalar bildirilmiştir (Tam ve ark., 2003b). Sadece bir çalışmada testesteronun antioksidan enzim aktivitelerini indüklediği (prostat kanser hücrelerinde) gösterilmiştir (Ripple ve ark., 1997). Bu çalışmada koç katımı esnasındaki fizyolojik testesteron artışının kan CAT ve GSH-Px aktivitesini değiştirmedeği saptandı. Bununla beraber, erkek ratlarda gonadektominin de plasma CAT ve GSH-Px aktivitesini değiştirmedeği bildirilmiştir (Sullivan ve ark., 2007). Menstrual döngü esnasında plasma androjenleri ile SOD, CAT, GSH-Px aktiviteleri arasındaki değişimleri inceleyen bir araştırmada da bu parametreler arasında önemli bir korelasyon bulunmamıştır (Massafra ve ark., 2000.).

Glutasyon enzimatik olmayan antioksidan savunmada görev alır (Miller ve Brzezinska-Slebozinska, 1993). Aydilek ve ark. (2004) bizim çalışmamıza benzer olarak, testesteron ilavesinin

tavşan testis dokusunda GSH düzeyini etkilemediğini bildirmiştir. Kastre edilmiş ratların testesteronla muamele edilmesiyle ratların sol ventrikülündeki antioksidan enzim aktiviteleri ve GSH içeriğinin de azalma olduğu bildirilmiştir (Klapcinska ve ark., 2008). Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların testesterona cevabı da dokuya ve türe göre değişmektedir.

Yukarıda ifade edildiği gibi testesteron doku bağımlı prooksidan etkilere sahiptir. Testosterondaki fizyolojik farklılığın kan oksidan ve antioksidan dengede değişimlere sebep olup olmadığının araştırıldığı bu çalışmada sonuç olarak koç katımı öncesi, esnası ve sonrasının çalışılan antioksidan parametreler üzerine etkisinin olmadığı, fakat plazma MDA düzeyinde istatistik olarak önemsiz bir artışın olduğu tespit edilmiştir. Alonso-Alvarez ve ark.(2007) da testesteronun alyuvarların oksidatif strese direncini azalttığını bildirmişlerdir. Koç katımı esnasında oksidan ve antioksidan parametrelerde her ne kadar değişim görülmesede, MDA artmaya eğilim gösterdiği için, vücutta bu dönemde oksidatif dengeyi bozabilecek herhangi bir durum söz konusu olduğunda oksidatif strese duyarlılık artabilir.

KAYNAKLAR

- Aebi H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*, 105, 121-126.
- Akkuş İ., 1995. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri, 32-37, Mimoza Yay. Konya.
- Alonso-Alvarez C., Bertrand S., Faivre B., Chastel O., Sorci G., 2007. Testosterone and oxidative stress: the oxidation handicap hypothesis. *Proc Biol Sci*, 274, 819-25.
- Aydilek N., Aksakal M., Karakılıç AZ., 2004. Effects of testesteron and vitamin E on the antioxidant system in rabbit testis. *Andrologia*, 36, 277-281.
- Beutler E., Duron O., Kelly BM., 1963. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med*, 61, 882-888.

- Beutler E., 1975. Red cell metabolism. In: A manual of biochemical methods. Beutler E (ed), New York: Grunef and Strottan; 67-69.
- Buchanan KL., Evans MR., Goldsmith AR., Bryant DM., Rowe LV., 2001. Testosterone influences basal metabolic rate in male house sparrows: a new cost of dominance signalling? *Proc R Soc B*, 268, 1337-1344.
- Chainy GB., Samantaray S., Samanta L., 1997. Testosterone-induced changes in testicular antioxidant system. *Andrologia*, 29, 343-349.
- Cheeseman KH., Slater TF., 1993. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull*, 49, 81-493.
- Comporti M., 1989. Three models of free radical-induced cell injury. *Chem Biol Interact*, 72, 1-56.
- Fairbanks VF., Klee GG., 1986. Biochemical aspects of hematology. In: Tietz NW (Ed.): Textbook of clinical chemistry. WB Saunders Company, Philadelphia, 1532-1534.
- Finkel T., Holbrook NJ., 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408, 239-247.
- Fryburg DA., Weltman A., Jahn LA., Weltman JY., Samojlik E., Hintz RL., Veldhuis JD., 1997. Short-term modulation of the androgen milieu alters pulsatile, but not exercise- or growth hormone (GH)-releasing hormone-stimulated GH secretion in healthy men: impact of gonadal steroid and GH secretory changes on metabolic outcomes. *J Clin Endocrinol Metab*, 82, 3710-3719.
- Gomes WR., Joyce MC., 1975. Seasonal changes in serum testosterone in adult rams. *J Anim Sci*, 41, 1373-1375.
- Klapcinska B., Jagsz S., Sadowska-Krepa E., Gorski J., Kempa K., Langfort J., 2008. Effects of castration and testosterone replacement on the antioxidant defense system in rat lenf ventricle. *J Physiol Sci*, 58, 173-177.
- Massafra C., Gioia D., De Felice C., Picciolini E., De Leo V., Bonifazi M., Bernabei A., 2000. Effects of estrogens and androgens on erythrocyte antioxidant superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities during the menstrual cycle. *J Endocrinol*, 167, 447-452.
- Miller JK., Brzezinska-Slebodzinska E., 1993. Oxidative stress, antioxidants and animal function. *J Dairy Sci*, 76, 2812-2823.
- Mooradian AD., 1993. Antioxidant properties of steroids. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 45, 509-511.
- Pansarasa O., D'Antona G., Gualea MR., Marzani B., Pellegrino MA., Marzatico F., 2002. Oxidative stress: effects of mild endurance training and testosterone treatment on rat gastrocnemius muscle. *Eur J Appl Physiol*, 87, 550-555.
- Pereira B., Costa-Rosa LF., Bechara EJ., Newsholme P., Curi R., 1998. Changes in the TBARs content and superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in the lymphoid organs and skeletal muscles of adrenodemedullated rats. *Braz J Med Biol Res*, 31, 827-833.
- Placer ZA., Cushman LL., Johnson BC., 1966. Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Anal Biochem*, 16, 359-364.
- Prasad S., Kalra N., Shukla Y., 2006. Modulatory effects of diallyl sulfide against testosterone-induced oxidative stress in Swiss albino mice. *Asian J Androl*, 8, 719-723.
- Prasad S., Kalra N., Singh M., Shukla Y., 2008. Protective effects of lupeol and mango extract against androgen induced oxidative stress in Swiss albino mice. *Asian J Androl*, 10, 313-318.
- Ripple MO., Henry WF., Rago RP., Wilding G., 1997. Prooxidant-antioxidant shift induced by androgen treatment of human prostate carcinoma cells. *J Natl Cancer Ist*, 89, 40-48.
- Stahl W., Sies H., 1997. Antioxidant defense: vitamins E and C and carotenoids. *Diabetes*, 46, 14-18.
- Sullivan JC., Sasser JM., Pollock JS., 2007. Sexual dimorphism in oxidant status in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Integr Comp Physiol*, 292, 64-68.
- Tam NN., Gao Y., Leung YK., Ho SM., 2003a. Androgenic regulation of oxidative stress in the rat prostate: involvement of NAD(P)H oxidases and antioxidant defense machinery during prostatic involution and regrowth. *Am J Pathol*, 163, 2513-2522.

- Tam NNC., Ghatak S., Ho SM., 2003b. Sex hormone-induced alterations in the activities of antioxidant enzymes and lipid peroxidation status in the prostate of noble rats. *The Prostate*, 55, 1-8.
- Tamagno E., Aragno M., Boccuzzi G., Gallo M., Parola S., Fubini B., Poli G., Danni O., 1998. Oxygen free radical scavenger properties of dehydroepiandrosterone. *Cell Biochem Funct*, 16, 57-63.
- von Schantz T., Bensch S., Grahn M., Hasselquist D., Wittzell H., 1999. Good genes, oxidative stress and condition-dependent sexual signals. *Proc R Soc B*, 266, 1–12.
- Zhu XD., Bonet B., Knopp RH., 1997. 17beta-Estradiol, progesterone, and testosterone inversely modulate low-density lipoprotein oxidation and cytotoxicity in cultured placental trophoblast and macrophages. *Am J Obstet Gynecol*, 177, 196-209.