

Ya lanmanın Kısraclarda Plazma Oksidan ve Antioksidan Parametreler Üzerine Etkisi

Nurettin AYD LEK¹, Halil M EK²

¹ Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Vanlıurfa-TÜRK YE

² Veteriner Kontrol ve Ara tırma Enstitüsü, Elazığ -TÜRK YE

Özet: Ya lanma, her organizmanın ya amı için kaçınılmaz bir süreçtir. Ya lanmayla ilgili oldukça geni kabul gören teorilerden biri de serbest radikal teorisi. Bu çalışmada oksidatif stresin bir göstergesi olan malondialdehit (MDA) ve bazı antioksidan parametreler ölçülerek ya lanmanın kısraclardaki oksidan ve antioksidan de erleri üzerine etkisi araştırıldı. Çalışmada 15 genç (5-10 ya) ve 15 ya lı (15-20 ya) Arap kısra cı kullanıldı. Ya lı atlardaki kısraclarda plazma MDA seviyesi gençlere göre önemli derecede yüksek bulunurken (P<0.05), buna karşılık glutatyon (GSH) seviyesinin düşük (P<0.05) oldu u belirlendi. E vitamini ve β-karoten konsantrasyonlarında gruplar arasında fark olmadı ı gözlemlendi. Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz aktivitelerinin ise ya lı gençlere göre daha yüksek (P<0.05) oldu u tespit edildi. Sonuç olarak, kısraclarda plazma oksidan ve antioksidan parametrelerin ya lanma sürecinden etkilendi i görüldü.

Anahtar Kelimeler: Ya lanma, Kısracl, Oksidan, Antioksidan.

Effects of Aging on Plasma Oxidant-Antioxidant Values in Horses

Summary: Aging is an inevitable process in every organism's life. Free radical theory of aging is one of the most widely accepted theories. This study was conducted to determine the effects of aging on the oxidant-antioxidant status by quantifying malondialdehyde-index of oxidative stress and some antioxidant parameters in horse plasma. The effects of aging on plasma oxidant-antioxidant values were investigated on 15 young (5-10 year-old) and 15 old (15-20 year-old) Arabian mares. Plasma malondialdehyde level was significantly higher (P<0.05), whereas glutathione level was lower (P<0.05) in old mares compared with those in young mares. No significant differences were observed in vitamin E and β-carotene concentrations between groups. Glutathione peroxidase and catalase activities were higher (P<0.05) in old mares than young mares. As a result, plasma oxidant and antioxidant parameters were affected by aging process in mares.

Key Words: Aging, Mare, Oxidant, Antioxidant.

Giriş

Ya lanma, çe itli fizyolojik i levlerdeki gerileme ile kendini gösteren kaçınılmaz bir biyolojik süreçtir. Ya lanma sırasında görülen bu zararlı süreci açıklayan birçok teori ileri sürülmü tür. Bu teorilerden en önemlisi, vücutta oksidatif hasara neden olan serbest radikaller teorisi (2).

Serbest radikaller, aerobik organizmaların normal metabolizmaları sırasında bir yan ürün olarak bol miktarda üretilen reaktif oksijen türleridir (1). Ba ta mitokondriyal elektron transport zinciri olmak üzere peroksizomlarda, ksenobiyotik metabolizmasında, fagositik aktivasyon reaksiyonlarında, sitokrom P-450 enzimi aktivasyonu ve çe itli sentez ve yıkım reaksiyonlarında serbest radikaller üretilir. Hava kirlili i, ultraviyole ı ıması ve toksikasyonlar gibi çevresel faktörler de radikal üretimine neden olurlar. Süperoksit anyonu, hidroksil radikalleri ve hidrojen peroksit gibi radikaller oldukça reaktif moleküller olup birçok önemli hücre bile eninde zincir-

leme reaksiyonları sonucu hasar olurlar (1). Organizmalar reaktif oksijen türlerine karşı enzimatik (süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz [GSH-Px], katalaz) ve enzimatik olmayan (glutatyon [GSH], E, A ve C vitaminleri, ürik asit, albümin, seruloplazmin, bilirubin vb.) kompleks antioksidan savunma sistemleri geli tirmi lerdir. Normalde serbest radikaller ve antioksidan savunma sistemleri arasında bir denge vardır. Fakat çe itli nedenlerle serbest radikallerinin miktarı antioksidan savunma sistemlerinin kapasitesini a arsa hücrelerin lipid, protein ve DNA gibi bile enlerinde oksidatif hasara neden olurlar (10). Oksidatif hasar başladıktan sonra telafi edilmezse, zamanla artar ve ateroskleroz, diabet, Alzheimer, koroner kalp hastalıkları ve kanser gibi ya lanmayla ilgili birçok hastalığın patogenezinde rol oynayabilir (10, 14).

Rat, fare gibi deney hayvanları ve insanların ya lanma sürecinde oksidan ve antioksidanların durumunu ara tıran bir çok çalışmada, ya lı atlardaki lipid peroksidasyon ürünlerinin genellikle yüksek oldu u bildirilmektedir (13, 14, 21). Ya lanma sonucu artan oksidatif stresin nedeni olarak antioksidan sa-

vunma sistemlerinin zayıflaması dü ünülse de antioksidatif parametrelerde ya lanmayla ilgili de i imlerin tutarsız sonuçlar verdi i görülmektedir (2, 13, 18, 23, 32). Yaptı ımız literatür taramalarında, atlarda ya lanmanın plazma antioksidan seviyesine etkisi ile ilgili olarak Gorecka ve ark. (7)'nin yaptı ından ba ka bir çalı maya rastlanmamı tır. Gorecka ve ark. (7)'nin çalı masında, plazma katalaz aktivitesi, GSH, E vitamini, β -karoten ve herhangi bir oksidan parametre incelenmezken, total antioksidan kapasitesi ile superoksit dismutaz ve GSH-Px aktivitelerinde ya lanmanın herhangi bir de i ime neden olmadı ı bildirilmi tir.

Gereç ve Yöntem

Bu çalı mada, hepsi diöstrus döneminde olan 15 genç (5-10 ya) ve 15 ya lı (15-20 ya) olmak üzere toplam 30 safkan Arap kısra ı kullanıldı. Kırakların anemnez ve fiziksel muayenelerinde sa lıklı oldukları belirlendi. Vena jugularisten EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri 1500 g'de 10 dakika santrifüj edildi ve alınan plazma örnekleri analiz edilinceye kadar -80°C'de muhafaza edildi.

Oksidatif stresin bir göstergesi olan MDA düzeyi, Matkovics ve ark. (17) tarafından modifiye edilen Placer ve ark. (20)'nin metoduna göre tespit edildi. Bunun için tiyobarbiturik asitle reaksiyona giren maddelerin (TBARS) konsantrasyonları spektrofotometrede (Janway 6100, ngiltere) 532 nm'de ölçüldü. TBARS ölçümünde standart olarak 1,1,3,3-tetramethoxypropane kullanıldı.

E vitamini analizleri, Desai (3)'nin bildirdi i metoda göre yapıldı. 1 ml plazma, potasyum hidroksit (% 60) ve askorbik asit (%1) ilavesi ile saponofiyeye edilerek 70 °C'de ısıtıldı. So utulan örneklerin üzerlerine *n*-hexan ilave edilerek faz ayırımı yapıldı. Süpernatanttaki *n*-hexan uçurularak tekrar metanol içinde çözdürüldü. Metanol ekstraktına, bathophenanthroline ve orthofosforik asit ilave edilerek spektrofotometrede 536 nm'de ölçümler yapıldı. Spektrofotometrik kalibrasyon için α -tokoferol standardı kullanıldı.

Plazma karoten seviyesi, Suziki ve Katoh (29)'un bildirdi i metotla ölçüldü. Bunun için koyu renkli test tüpüne konulan 1 ml plazmanın üzerine %1'lik askorbik asit ve *n*-hexan ilave edildi. Tüpler karı tırıldıktan sonra santrifüj edildi ve *n*-hexan tabakası alınarak 453 nm'deki absorbansları spektrofotometrede ölçüldü.

Glutasyon analizi, Sedlak ve Lindsay (24)'in bildirdi i metoda göre yapıldı. 5,5'dithio-bis-2-nitrobenzoic acid kullanılarak olu an renk de i imi spektrofotometrede 412 nm'de ölçüldü. Glutasyon

peroksidaz aktivitesi Lawrence ve Burk (15)'un bildirdi i metoda göre 412 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Katalaz aktivitesi ise Goth (8)'un metoduna göre ölçüldü. Bu amaçla amonyum molibdat ve hidrojen peroksidin olu turdu u renkli kompleksin absorbansı 405 nm'de ölçüldü.

statistiksel analizler SPSS (10.01) paket programı ile yapıldı. Gruplar arası farklılıklar ba ımsız t testi ile belirlendi. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak gösterildi. Önemlilik derecesi $P < 0.05$ kabul edildi.

Bulgular

Genç ve ya lı kıraklardaki oksidan ve antioksidan parametrelere ait ortalamalar Tablo 1'de sunulmu tur. Ya lı kıraklardaki plazma MDA seviyesi önemli derecede yüksek bulunurken ($P < 0.05$) buna kar ılık GSH seviyesinin dü ük ($P < 0.05$) oldu u tespit edildi. E vitamini ve β -karoten seviyeleri ya lı kıraklarda yüksek olmakla birlikte bunun istatistiksel bakımdan önemli olmadı ı saptandı ($P > 0.05$). Ya lı atlardaki plazma GSH-Px ve katalaz enzim aktivitelerinin ise gençlere oranla yüksek oldu u ($P < 0.05$) belirlendi (Tablo 1).

Tartı ma

Son yıllarda ya lanma sürecinin açıklanmasında oksidatif hasarın önemli rol oynadı ı dü ünülmektedir (2). Bu çalı mada, ya lı kıraklardaki plazma MDA seviyesinin yüksek olu u ($P < 0.05$), insan (13) ve ratlarda (14) yapılan çalı malarda elde edilen bulgularla uyum içindedir. Ya lı hayvanlarda oksidatif stres artı ı farklı ekillerde yorumlanabilir. Örne in, geli mi organizmaların normal metabolizması sırasında tüketilen oksijenin % 4'ü mitokondriyal elektron transport zincirinde serbest radikallere dönü ür (30). Ya lı hayvanlarda oksidatif stresin artı ı, mitokondriyal serbest radikal üretiminin ya lanmayla birlikte artı ından kaynaklanabilir (5). Benzer ekilde, Sohal ve ark. (27)'nin fare kalbinde, Hagen ve ark. (9)'nin ise rat hepatositlerinde yaptı ı çalı malarda, ya lı hayvanlardaki mitokondriyal hidrojen peroksit üretimini %23 daha yüksek oldu u bildirilmektedir.

Ya lanma sürecinde oksidatif stresin artı ı nedeni olarak antioksidan savunma sistemlerinin zayıflaması da akla gelmekle birlikte, bu konuda yapılan çalı malar ya lılardaki antioksidatif parametrelerdeki de i imlerin tutarlı sonuçlar vermedi ini göstermektedir. Hücresel ya lanma sürecinde rol oynayan önemli bile iklerden biri de tripeptit yapısındaki GSH'dır (4). Glutasyon, hem önemli bir indirgeyici olarak E ve C vitaminlerini oksidasyondan

Tablo 1. Genç (n=15) ve Ya lı Kısraklarda (n=15) Plazma Oksidan ve Antioksidan Parametreler.

Parametreler	Genç Kısрак (5-10 ya) X±SD (n=15)	Ya lı Kısрак (15-20 ya) X±SD (n=15)	p
MDA (µmol/L)	0.81±0.120	1.00±0.130	<0.05
GSH (µmol/L)	0.0175±0.0034	0.0130±0.002*	<0.05
β-carotene (µmol/L)	1.22±0.29	1.40±0.25	<0.05
E Vitamini (µmol/L)	6.50±1.32	7.03±1.41	<0.05
GSH-Px (IU/gr protein)	4.41±0.34	6.76±1.01*	<0.05
Katalaz (KU/L)	25.01±3.04	30.07±5.21*	<0.05

X±SD = ortalama ± standart sapma

MDA : Malondialdehit, GSH: Glutasyon, GSH-Px: Glutasyon peroksidaz.

korur, hem de GSH-Px enziminin kofaktörü olarak önemli bir antioksidan etkinlik gösterir (16). Samiec ve ark. (22)'nin insan plazmasında, Pansarasa ve ark. (19)'nin insan iskelet kasında ve Kim ve ark. (14)'nin rat plazmasında yaptığı ı çalı malarda, ya lanmayla birlikte GSH konsantrasyonun önemli derecede dü tü ü bildirilmektedir. Bu çalı mada ya lı kısrakların GSH konsantrasyonundaki dü me (P<0.05) yukarıdaki bildirimlerle (14, 19, 22) paralellik göstermektedir. Ya lı larda GSH konsantrasyonunun dü ük olması, artan oksidatif stresin GSH'ı okside ederek tüketebilece i gibi, ya la birlikte GSH sentez hızının dü -mesi veya GSH'ı redükte eden glutasyon redüktaz enzim aktivitesinin azalmasına ba lı olabilir (28). Ayrıca, ya lanma sonucu plazma aminoasit klirensinin azalması da plazma GSH konsantrasyonunun dü mesinin di er bir nedeni olabilir. Çünkü, ya lı hayvanlarda GSH prekürsörlerinden biri olan sistein kan dola ımından hemen temizlenemedi inden büyük oranda okside olarak fonksiyonunu kaybeder (4).

A vitamini prekürsörü olan karoten, dü ük oksijen basınçlarında güçlü bir singlet oksijen tutucusu ve serbest radikal reaksiyonları için önemli bir substrattır (25). E vitamini ise vücutta önemli bir zincir kırıcı antioksidan olup hücre membranlarını oksidatif hasardan korur (31). Gardner ve ark. (6)'nın insanlarda yaptığı benzer bir çalı mada plazma E vitamini ve β-karoten seviyelerinin ya lı larda daha yüksek oldu unu bildirilirken, Sawada ve ark. (23) genç ve ya lı ratların plazma de erlerinde önemli bir fark olmadığını bildirmektedirler. Bu çalı mada da ya lı kısraklardaki plazma E vitamini ve β-karoten seviyelerinin istatistiksel önemi

olmasa da gençlerdekinden yüksek oldu u gözlendi (P>0.05). Hollander ve Dadufalza (11, 12)'nin ratlarda yaptığı ı çalı malarda, ya lı larda E ve A vitaminlerinin lenfatik transportu ve intestinal metabolitlerinin arttı ı bildirilmektedir. Bu çalı mada β-karoten ve E vitamini seviyelerinin artma e ilimi göstermesi, ya lanmaya adapte olan organizmanın bu vitaminlerden sistemik yararlanmayı artırması olarak de erlendirilebilir (11, 12).

Süperoksit dismutaz, GSH-Px ve katalaz gibi antioksidan enzimler biyolojik makromolekülleri oksidatif hasardan korurlar. Glutasyon peroksidaz, ba ta organik hidroperoksitler ve H₂O₂'i su ve oksijene dönü türürken, katalaz ise sadece H₂O₂'i su ve oksijene dönü türerek antioksidatif savunma mekanizmasında görev alır (10). Glutasyon peroksidaz ve katalaz aktivitelerinin ya la ilgili de i imlerinin incelendi i daha önceki çalı malarda farklı sonuçlar alınmı tır. Mecocci ve ark. (18)'nin insanlarda yaptığı ı çalı mada ya lanmayla birlikte plazma GSH-Px aktivitesinin önemli olmasa da arttı ı bildirilmektedir. Yargıço lu ve ark. (32) ya lı ratların eritrositlerinde katalaz ve GSH-Px aktivitelerinin dü tü ünü, buna kar ılıklı nal ve ark. (13) ise ya lı insanlarda eritrosit GSH-Px ve katalaz aktivitelerinin giderek arttı ını bildirmektedirler. Yaptı ımız bu çalı mada ise ya lı kısraklardaki plazma GSH-Px ve katalaz aktivitelerinin gençlere göre önemli derecede yüksek oldu u gözlenmi tir (P<0.05). Enzim aktivitelerinde görülen bu artı , ya lı kısraklarda artan oksidatif stresin antioksidan savunma sisteminin kompensatuar cevabını tetiklemesi sonucu olabilir. Di er bir ifade ile, oksidatif stres bu enzimlerin DNA'sını indükleyerek enzimatik aktivitelerini artırmı olabilir (26).

Sonuç olarak, ya lı kısırlarda plazma MDA seviyesi artarken buna kar ın GSH seviyesi dü mü - tür. E vitamini ve β -karoten gibi antioksidan maddelerin konsantrasyonları, artan oksidatif stres kar ısında kendi seviyelerini korumu , GSH-Px ve katalaz gibi enzimlerin ise adaptasyon cevabı olarak aktivitelerinin arttı ı görülmü tür. Kısaca, kısırlarda plazmada oksidan stres ve antioksidan savunma sistemlerinin ya lanma sürecinden etkilenebilece i söylenebilir.

Kaynaklar

1. **Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM**, 1993. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci.*, 90: 7915-7922.
2. **Beckman KB, Ames B**, 1998. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev.*, 78: 547-581.
3. **Desai ID**, 1984. Vitamin E analysis methods for animal tissues. *Methods Enzymol.*, 105: 138-147.
4. **Dröge W**, 2002. Aging-related changes in the thiol/disulfide redox state: Implications for the use of thiol antioxidants. *Exp Gerontol.*, 37: 1331-1343.
5. **Dröge W**, 2002. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev.*, 82: 47-95.
6. **Gardner EM, Bernstein ED, Dorfman M, Abrutyn E, Murasko DM**, 1997. The age-associated decline in immune function of healthy individuals is not related to changes in plasma concentrations of β -carotene, retinol, a-tocopherol or zinc. *Mech Ageing Dev.*, 94: 55-69.
7. **Gorecka R, Sitarska E, Klucinski W**, 2002. Antioxidant parameters of horses according to age, sex, breed and environment. *Pol J Vet Sci.*, 5: 209-16.
8. **Goth L**, 1991. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin Chim Acta.*, 196: 143-57.
9. **Hagen TM, Yowe DL, Bartholomew JC, Wehr CM, Do KL, Park JY, Ames BN**, 1997. Mitochondrial decay in hepatocytes from old rats: Membrane potential declines, heterogeneity and oxidants increase. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 94: 3064-3069.
10. **Halliwell B, Gutteridge J**, 1996. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Second Edition. Oxford: Clarendon Press.
11. **Hollander D, Dadufalza V**, 1989. Lymphatic and portal absorption of vitamin E in aging rats. *Dig Dis Sci.*, 34: 768-72.
12. **Hollander D, Dadufalza V**, 1990. Influence of aging on vitamin A transport into the lymphatic circulation. *Exp Gerontol.*, 25: 61-5.
13. **nal ME, Kanbak G, Sunal E**, 2001. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging. *Clin Chim Acta.*, 305: 75-80.
14. **Kim JW, No JK, Ikeno Y, Yu BP, Choi JS, Yokozawa T, Chung HY**, 2002. Age-related changes in redox status of rat serum. *Arch Gerontol Geriat.*, 34: 9-17.
15. **Lawrence RA, Burk RF**, 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun.*, 71: 952-958.
16. **Maher P**, 2005. The effects of stres and aging on glutathione metabolism. *Ageing Res Rev.*, 4: 288-314.
17. **Matkovics B, Szabo L, Varga I**, 1988. Determination of enzyme activities in lipid peroxidation and glutathione pathways (in Hungarian). *Lab Diag.*, 15: 248-250.
18. **Mecocci P, Polidori MC, Troiano L, Cherubini A, Cecchetti R, Pini G, Straatman M, Monti D, Stahl W, Sies H, Franceschi C, Senin U**, 2000. Plasma antioxidants and longevity: A study on healthy centenarians. *Free Radic Biol Med.*, 28: 1243-1248.
19. **Pansarasa O, Bertorelli L, Vecchiet J, Felzani G, Marzatico F**, 1999. Age-dependent changes of antioxidant activities and markers of free radical damage in human skeletal muscle. *Free Radic Biol Med.*, 27: 617-622.
20. **Placer ZA, Cushman LL, Johnson BC**, 1966. Estimation of products of lipid peroxidation (as malondialdehyde) in biochemical systems. *Anal Biochem.*, 16: 359-364.
21. **Rodriguez MMA, Ruiz TA**, 1992. Homeostasis between lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in healthy human aging. *Mech Ageing Dev.*, 66: 213-222.

22. **Samiec PS, Drews-Botsch C, Flagg EW, Kurtz JC, Sternberg P, Reed RL, Jones DP**, 1998. Glutathione in human plasma: Decline in association with aging, age-related macular degeneration, and diabetes. *Free Radic Biol Med.*, 24: 699-704.
23. **Sawada M, Carlson JC**, 1987. Changes in superoxide radical and lipid peroxide formation in the brain, heart and liver during the lifetime of the rat. *Mech Ageing Dev.*, 41: 125-37.
24. **Sedlak J, Lindsay RHC**, 1968. Estimation of total, protein bound and non-protein sulfhydryl groups in tissue with Ellmann's reagent. *Anal Biochem.*, 25:192-205.
25. **Sies H, Stahl W, Sundquist AR**, 1992. Antioxidant functions of vitamins: Vitamins E and C, beta carotene and other caratenoids. *Ann NY Acad Sci.*, 669: 7-20.
26. **Sinitsyna O, Krysanova Z, Ishchenko A, Dikalova AE, Stolyarov S, Kolosova N, Vasunina E, Nevinsky G**, 2006. Age-associated changes in oxidative damage and the activity of antioxidant enzymes in rats with inherited overgeneration of free radicals. *J Cell Mol Med.*, 10: 206-215.
27. **Sohal RS, Agarwal S, Sohal BH**, 1995. Oxidative stress and aging in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Mech Ageing Dev.*, 81: 15-25.
28. **Stio M, Iantomasi T, Favilli F, Marraccini P, Lunghi B, Vincenzini MT, Treves C**, 1994. Glutathione metabolism in heart and liver of the aging rat. *Biochem Cell Biol.*, 72: 58-61.
29. **Suzuki J, Katoh N**, 1990. A simple and cheap method for measuring vitamin A in cattle using only a spectrophotometer. *Jpn J Vet Sci.*, 52: 1282-1284.
30. **Turrens JF, Boveris A**, 1980. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J.*, 191: 421-427.
31. **Wang X, Quinn PJ**, 1999. Vitamin E and its function in membranes. *Prog Lipid Res.*, 38: 309-336
32. **Yargıço lu P, Gümü lü S, A ar A, Korgun DK, Kücükatay V**, 2001. Effect of sulfur dioxide inhalation on erythrocyte antioxidant status, food intake, and lipid peroxidation during aging. *Arch Environ Healt.*, 56: 53-57.

Yazı ma Adresi:

Ar . Gör. Dr. Nurettin AYD LEK
Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı
63300 ANLIURFA
Tel: 0414 312 84 56 (2436)
Faks: 0414 314 41 58
E-mail: naydilek@hotmail.com