

Wistar Ratlarında (*Rattus rattus norvegicus*) Kalitatif ve Kantitatif Protein Yetersizliklerinin İskelet Kası Malondialdehit Düzeylerine Etkileri¹

K. METİN*, M. BALKAYA**, A. KARUL***, H. ÜNSAL**, C. ÜNSAL**,
Z.B. BAKIR*

* Adnan Menderes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, 09010 Aydın.

** Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, 09016 Aydın.

*** Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, 09100 Aydın.

Received;25.03.2003, Accepted;04.04.2003

Özet:Çalışmada 41 adet yaklaşık 2.5 aylık erkek Wistar ratı (*Rattus rattus norvegicus*) kullanıldı. Hayvanlar rat yetiştirme yemi (n=7, kontrol), jelatin içeren (n=17) ve protein içermeyen (n=17) yemlerle 35 gün beslendiler. Deney sonunda hayvanlar ötenazi edilerek yaklaşık 1 g kadar iskelet kası örneği alındı ve gram kas dokusu için malondialdehit (MDA) düzeyleri belirlendi. Jelatinle beslenen grupta iskelet kası MDA değerleri kontrol grubu ve N-free diyetle beslenen hayvanlarından daha düşüktü. Ancak gruplar arasında fark istatistiksel olarak onaylanmadı. Bu durumun organizmanın ileri düzeydeki protein yetmezliklerine gösterdiği metabolik uyuma bağlı olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: Wistar ratı, protein malnutrisyonu, iskelet kası, antioksidan, malondialdehit.

Summary: In this study 41 male Wistar rats (*Rattus rattus norvegicus*) were used. Animals were divided into three groups and were fed either with a rat chow diet (n=7, controlgroup) or with a semisynthetic diet containing %20 gelatine as protein source (n=17, gelatin group) and no protein (n=17, N-free group). At the end of experiment animals were euthanized, approximately 1 g skeletal muscle samples were taken and MDA levels per gram of muscle tissue were determined. Tissue MDA levels of the rats fed gelatin-containing diet were lower than the controls and animals fed with N-free diet. However, the differences in mean MDA levels among groups were not confirmed statisticcally. It was

¹ Bu çalışma kısmen TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir (VHAG – 1498).

concluded that this may be the result of metabolic adaptation processes of organismus to severely protein malnutrition conditions.

Key Words: Wistar rats, protein malnutrition, sceletal muscle, antioxydant, malondialdehyde.

Giriş

Vücut proteinlerinin önemli bir bölümünü iskelet kası proteinleri oluşturur ve iskelet kası beslenme yetersizliklerinden en çok etkilenen dokular arasında yer alır. Protein ve amino asit yetmezliklerinin en önemli sonuçlarından biri vücut proteinlerinin, özellikle iskelet kası proteinlerinin net kaybıdır [1,2] Yaşlanma ve alkolizm iskelet kasını etkileyen diğer önemli faktörlerdendir [3,4]. Diyet protein yetersizliklerinde plazma serbest amino asit konsantrasyonları ile üre, kreatin ve ürik asit gibi metabolitlerin konsantrasyonları önemli ölçüde azalmaktadır [5-7]. Amino asitler antioksidan enzimleri de içeren proteinlerin yapı taşıdır. Bazı amino asitler (ör. arjinin, glisin, sitrulin, taurin ve histidin), küçük peptidler (GSH ve karnozin) ve azot içeren metabolitler (ürik asit ve kreatin) direkt olarak oksijen içermeyen radikalleri temizlerler. Kantitatif protein yetersizliklerinde tüm amino asitler diyet protein kısıtlaması oranına bağlı olarak azalırken, kalitatif protein yetersizlikleri belirli bazı amino asit yetersizlikleri ile karakterizedirler. Bir başka deyişle, kalitatif protein yetersizlikleri amino asit imbalansı oluşturmaktadırlar.

Diyet protein veya kalori kısıtlamalarının antioksidan enzimlerin sentezini, doku antioksidan düzeylerini ve bazı antioksidan savunma sistemlerini modifiye ettiği bilinmektedir [8-13]. Diyet protein düzeylerinin hücre glutation konsantrasyonunu etkilediği rapor edilmiştir [14,15]. Ratlarda %3 kazein içeren diyetle besleme akciğer süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinde azalmaya neden olmuştur [14]. Benzer şekilde Peuchant ve ark. [16], kronik renal yetmezliği olan insanlarda esansiyel amino asitler ve vitamin A, C ve E ile desteklenmiş çok düşük oranda bitkisel protein içeren diyetle 6 ay beslemenin eritrositlerin serbest ve toplam MDA düzeylerinde azalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir. Doku antioksidan düzeyleri azaldığında bireyler serbest radikallerin neden olduğu doku yıkımına oldukça duyarlı hale gelirler.

Protein malnütrisyonları insan ve hayvanlarda oldukça yaygın görülen bir problem olmasına karşın, kalitatif ve kantitatif malnütrisyonun antioksidan savunma sistemi üzerine etkileri konusunda ayrıntılı bilgiler bulunmamaktadır. Bu çalışma ile

deneysel oluşturulan ileri düzeydeki kalitatif ve kantitatif protein yetersizliklerinin Wistar ratlarının iskelet kası MDA düzeylerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Yöntem

Çalışmada 41 adet yaklaşık 2.5 aylık erkek Wistar ratı (*Rattus rattus norvegicus*) kullanıldı. Hayvanlar yetiştirme sürecinde %23 ham protein içeren ticari bir yetiştirme yemi ile *ad libitum* beslendiler (Best Yem, Gebze). Yetiştirme ortamı %45-70 neme sahipti ve ışıklandırma gün ışığı ile yapıldı. Deney süresince hayvanlar semi-klimatize bir deney odasında bireysel kafeslerde tutuldular. Deney odası 28 ± 1 °C sıcaklık, 12/12 saat ışık/karanlık ve %50-70 nem koşullarına sahipti. Yem ve su *ad libitum* uygulandı

Hayvanlar üç gruba ayrıldı. Grup I (n=7) rat yetiştirme yemi ile, grup II (n=17) pratik olarak protein içermediği kabul edilen (toplam azot içeriği <1 g/kg kuru madde) ve grup III (n=17) protein taşıyıcısı olarak %20 jelatin içeren semisentetik yemlerle 35 gün süreyle beslendi [17,18] Deneyin 35. gününde saat 18:00'de hayvanların yemleri uzaklaştırıldı ve ertesi gün saat 8:30-11:30 arasında hayvanlar ötenazi edilerek yaklaşık 1 gr iskelet kası örneği (M. biceps femoris, M. semitendinosus, M. semimebranosus ve quadriceps) soğuk Tris-HCl tampon çözeltisine alındı (pH 7.4). Soğuk zincirde laboratuara taşınan örnekler IKA-Ultraturax homojenizatörde 5 dakika süreyle 15.000 devir/dk ve 4 °C'de homojenize edildi. Homojenatta malondialdehit (MDA) düzeyleri Yoshika ve arkadaşlarının metoduna göre saptandı [19]. Elde edilen sonuçlar gram doku olarak hesaplandı. Sonuçların istatistiksel değerlendirmesinde Kruskal Wallis tek yön varyans analizi kullanıldı ve değerler aritmetik ortalama ± 1 SD olarak verildi.

Bulgular

İskelet kası MDA değerleri Tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo 1. Wistar ratlarında iskelet kası ortalama MDA değerleri.

Gruplar	N	MDA/g kas $\bar{X} \pm SD$
Grup I (Kontrol)	7	11.61 \pm 6.04
Grup II (N-free)	17	10.65 \pm 8.15
Grup III (%20 Jelatin)	17	8.81 \pm 4.52

Tabloda da görüldüğü gibi gram doku bazında hesaplanmış olan ortalama MDA değerleri %20 jelatin içeren diyetle beslenen grupta kontrol grubu ve protein içermeyen diyetle beslenen gruplardakinden daha düşüktür. Ancak, gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($p>0.05$).

Tartışma

MDA lipid peroksidasyonunun önemli göstergelerinden biridir. Peuchant ve ark. [16] protein oranı az diyetle beslenmenin eritrosit MDA düzeylerinde artışa neden olduğunu rapor etmişlerdir. Yaşlılarda veya alkol bağımlılarında etanole bağlı kas erimesi olaylarında da doku lipid peroksidasyonunun belirgin artışlar gösterdiği bilinmektedir [20]. Golden ve Ramdath [21] kwashiorkorun patogeneziinde serbest radikallerin işe katıldığını saptamışlardır. Araştırmacılar yaptıkları çalışmalarda diyetle protein, antioksidan mineral veya vitaminlerin oranının belirli bir düzeyin altına düşmesi durumunda antioksidan savunmada bozulmalar olduğunu gözlemlemişlerdir.

Çalışmamızdan elde edilen bulgular, protein veya kalori kısıtlamasına bağlı olarak lipid peroksidasyonu ve antioksidan savunma sistemlerinde azalmalar olduğunu bildiren literatürle uyumlu değildir. Jelatinle beslenen grupta MDA düzeylerinde görülen azalma eğilimi istatistiksel olarak onaylanmamıştır. Önceki çalışmalarda genelde kantitatif protein malnütrisyona (diyet protein oranı %3-14) veya protein-kalori kısıtlamalarının antioksidan savunma sistemi üzerine etkileri incelenmiştir [8,10,12,13,16]. Bu çalışmalarda değişik organ veya dokuların diyetle kısıtlamalara bağlı olarak lipid peroksidasyonu ve antioksidan savunma düzeylerinde özgün, farklı etkilenimlerin olabildiğidir. Bir başka deyişle etkiler organ ve enzim spesifik özellikler taşımaktadır [8,9,10,22,23]. Ayrıca, klinik çalışmalarda kullanılan subjeler genellikle protein malnütrisyona yanında parazitozis, organ yetmezlikleri, enfeksiyonlar, mineral ve vitamin yetmezlikleri ile genotip, yaş ve cinsiyet heterojenitesi gibi problemlere de sahip olduklarından, elde edilen bilgiler her zaman sadece protein yetmezliğini yansıtmayabilir.

Literatürde kantitatif ve kantitatif protein yetmezliklerinin antioksidan savunma mekanizmaları üzerine etkileri konusunda karşılaştırmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada teorik olarak protein içermeyen veya protein taşıyıcısı olarak jelatin içeren diyet kullanılmıştır. Proteinsiz beslenmede organizma kısa sürede uyum mekanizmaları

geliştirerek yaşamı sürdürmeye çalışır. Bu mekanizmalardan biri metabolizmanın bazal düzeye indirilmesidir [24]. Bir başka deyişle organizma anabolik konuma geçer. Jelatin hayvansal bir protein olmasına karşın bilinen proteinler içinde biyolojik değeri en düşük olanıdır. Zira jelatinin toplam amino asit içeriğinin önemli bir bölümünü prolin ve hidroksiprolin oluştururken, esansiyel amino asitlerden özellikle triptofan yok denecek kadar az, treonin, metiyonin vb. gibi amino asitler ise çok düşük konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Bu nedenle protein taşıyıcısı olarak jelatin içeren diyetle beslemenin proteinsiz beslenmeden daha olumsuz etkileri görülebilir [17] Pamplona ve ark. [12] 4 aylık kalori restriksiyonunun ratlarda kalp mitokondriyal proteinlerinin oksidatif strese bağlı yıkımını azalttığını saptamışlardır. MDA'nın proteinleri modifiye ve okside edici etkileri bilinmektedir [25,26]. Çalışmada deney gruplarının MDA düzeylerinde kontrol grubuna göre önemli farklılık ortaya çıkmamış olması, organizmanın ileri düzeydeki protein yetersizliği koşullarına metabolik adaptasyonunun bir sonucu olduğunu düşündürüyor. Bu konunun tam olarak açıklanabilmesi için değişik hücre, doku ve organların ve çeşitli antioksidanların inceleneceği başka çalışmalara gerek vardır.

Kaynaklar

- [1] Lane, H.W., Schulz, L.O.: Nutritional questions relevant to space flight. *Ann Rev Nutr* 12: 257-278,1992.
- [2] Stein, T.P.: Nutrition in the space station era. *Nutr Res Rev* 14: 87-117, 2001.
- [3] Grounds, M.D.: Reasons for the degeneration of ageing skeletal muscle: a central role for IGF-1 signalling. *Biogerontology* 3:19-24, 2002.
- [4] Preedy, V. R., Adachi, J., Asano, M., Koll, M., Mantle, D., Niemela, O., Parkkila, S., Paice, A. G., Peters, T., Rajendram, R., Seitz, H., Ueno, Y, Worrall, S.: Indices of damage and preventive studies. *Free Radical Biol Med* 32: 683–687, 2002.
- [5] Muramatsu, T., Okumura, J-I.: Effect of dietary methionine and arginine on uric acid excretion of cocks fed a protein-free diet. *J Nutr* 109: 1057-62,1979.
- [6] Koch, M.: Die Harnstoff- und Kreatininausscheidung der Albinoratte bei N-freier Ernährung. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig Universität Gießen, 1983.

- [7] Nau R.: Untersuchung zum N-stoffwechsel der Albinoratte. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig Universität Gießen, 1988.
- [8] Cao, G., Prior, R.L., Cutler, R.G., Yu, B.P.: Effect of dietary restriction on serum antioxidant capacity in rats, *Arch Gerontol Geriatrics* 25: 245-253,1997.
- [9] Maiti, S., Chatterjee, A. K.: Response of certain antioxidant enzymes to arsenite treatment in protein malnourished mice (BALB-C). *Pathophysiol* 5 (Suppl 1) 98, 1998.
- [10] Maiti, S., Chatterjee, A. K.: Differential response of cellular antioxidant mechanism of liver and kidney to arsenic exposure and its relation to dietary protein deficiency. *Environmental Toxicol Pharmacol* 8: 227–235, 2000.
- [11] Fang, Y.Z., Yang, S., Wu, G.: Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 18: 872– 879, 2002.
- [12] Pamplona, R., Otín, M. P., Requena, J., Gredilla, R., Barja, G.: Oxidative, glycoxidative and lipoxidative damage to rat heart mitochondrial proteins is lower after 4 months of caloric restriction than in age-matched controls. *Mechanisms Ageing Development* 123: 1437- 1446, 2002.
- [13] Shin, S. J.: Relation between oxidative damage and dietary protein: marginal protein level which modulates oxidative damage in mice with total body irradiation. *Nutr Res* 22: 1487–1495, 2002.
- [14] Deneke, S. M., Gershoff, S. N., Fanburg, B.L.: Potentiation of oxygen toxicity in rats by dietary protein or amino acid deficiency. *J Appl Physiol* 54:147–51,1983.
- [15] Hum, S., Koski, K.G., Hoffer, L.J.: Varied protein intake alters glutathione metabolism in rats. *J Nutr* 122: 2010, 1992.
- [16] Peuchant, E., Delmas-Beauvieux, M.C., Dubourg, L., Thomas, M. J., Perromat, A., Aparicio, M., Clerc, M., Combe, C.: Antioxidant effects of a supplemented very low protein diet in chronic renal failure. *Free Radical Biol Med* 22: 313-320,1997.
- [17] Balkaya, M.: Der Einfluß des Proteinmangels auf das weiße Blutbild von Wistar-Ratten und Hähnen der Rasse Weißes Leghorn. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig Universität Gießen, 1991.

- [18] Balkaya, M.: The effects of feeding gelatin containing diet and following complete feeding on the peripheral white blood cells of the male and female Wistar rats. *Tr. J. Vet Anim Sci* 23: 417-429, 1999.
- [19] Yoshioka, T., Kawada, K., Shimada, T., Mori M.: Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against activated-oxygen toxicity in the blood. *Am J Obstet Gynecol* 135: 372-376, 1979.
- [20] Niemelä, O.: Distribution of ethanol-induced protein adducts in vivo: Relationship to tissue injury. *Free Radical Biol Med* 31: 1533–1538, 2001.
- [21] Golden, M. H. N., Ramdath D.: Free radicals in the pathogenesis of kwashiorkor. In *Proceedings of the X111 International Congress on Nutrition*, Ed. T. G. Taylor, N. K. Jenkins, pp. 597-598, 1985.
- [22] Gong, X., Shang, F., Obin, M., Palmer, H., Scrofano, M.M., Jahngen-Hodge, J., Smith, D.E., Taylor, A., Antioxidant enzyme activities in lens, liver and kidney of calorie restricted Emory mice. *Mechan Ageing Develop* 99: 181–192, 1997.
- [23] Isong, E. U., Essien, E. U., Eka, U., Umoh, I. B.: Sex- and organ-specific toxicity in normal and malnourished rats fed thermoxidized palm oil. *Food Chemical Toxicol* 38, 997-1004, 2000.
- [24] Rufeger, H.: Ein neuer Weg zur biologischen Proteinbewertung mit Hilfe einer N-Bilanzfunktion, zugleich ein Beitrag zur Theorie des N-Stoffwechsels. *Habilitationsschrift, Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig Universität Gießen*, 1970.
- [25] Arshag, D., Mooradian, M.D., Deanna Reinacher, B.S., Jian Ping Li, M.S., Pinna, J. L.: Malondialdehyde modification of proteins in vitro is enhanced in the presence of acetaldehyde. *Nutr* 17: 619–622, 2001.
- [26] Tiku, M.L., Allison, G. T., Naik, K., Karry, S. K.: Malondialdehyde oxidation of cartilage collagen by chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 11: 159–166, 2003.