

Omega-3 yağ asitlerinin sıçan testis dokusu üzerine koruyucu etkileri

The protective effects of omega-3 fatty acids on rat testicular tissue

İsmail Zararsız¹, İlter Kuş², Mürsel Davarcı³, Murat Abdulgani Kuş⁴, Dilara Kaman⁵,
Mustafa Sarsılmaz⁶

¹Mevlana Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, Selçuklu, Konya, Türkiye

²Bahkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, Bahkesir, Türkiye

³Mustafa Kemal Üniversitesi Tayfur Ata Sökmen Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, Antakya, Türkiye

⁴Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu, Burdur, Türkiye

⁵Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye

⁶Şifa Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 13.05.2011, Kabul Tarihi / Accepted: 05.08.2011

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada testis dokusu üzerine omega-3 yağ asitlerinin koruyucu etkisi biyokimyasal düzeyde araştırılması amaçlandı.

Gereç ve yöntem: Toplam 16 adet Wistar-Albino cinsi erişkin erkek sıçan 2 gruba ayrılarak incelendi. Grup I'deki sıçanlar kontrol grubu olarak alındı ve sadece intragastrik gavaj ile serum fizyolojik verildi. Grup II'deki sıçanlara ise, 400 mg/kg dozundaki ω-3 yağ asiti intragastrik gavaj yoluyla günlük olarak verildi. Altı haftalık deney süresi sonunda tüm sıçanlar dekapitasyon yöntemiyle öldürüldü. Hayvanlardan alınan testis doku örneklerinde superoksit dismutaz, Glutasyon peroksidaz, malondialdehit aktiviteleri spektrofotometrik olarak tayin edildi. Ayrıca kan testosteron düzeyleri incelendi.

Bulgular: Çalışmamızda, ω-3 yağ asidi verilen sıçanlarda superoksit dismutaz, Glutasyon peroksidaz düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artarken, malondialdehit düzeylerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş tespit edildi. Ayrıca omega-3 yağ asidi verilen sıçanların kan testosteron düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü.

Sonuç: Sonuç olarak omega-3 yağ asitlerinin sıçan testis dokusunda gerek oksidatif hasarı önleyerek, gerekse testosteron düzeyini artırarak olumlu etki gösterdiği tespit edildi.

Anahtar kelimeler: ω-3 yağ asiti, testis, testosteron, sıçan

ABSTRACT

Objectives: In this study, the protective effect of omega-3 fatty acids on testicular tissue was aimed to investigate at biochemical levels.

Materials and methods: Totally, 16 adult male Wistar rats were divided into two groups. Rats in Group I were used as control and only saline was given by intragastric gavage. Rats in Group II, 400 mg/kg dose ω-3 fatty acids were given daily by intragastric gavage. At the end of the six-week experimental period, all rats were killed by decapitation. The testicular tissue specimens taken from animals, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, malondialdehyde, enzyme activities were measured spectrophotometrically. In addition, blood testosterone levels were examined.

Results: In our study, ω-3 fatty acids in rats were given a statistically significant increase in the levels of superoxide dismutase, and glutathione peroxidase a statistically significant decrease in malondialdehyde levels were determined when compared to control group. In addition, ω-3 fatty acids in rats given a statistically significant increase in blood testosterone levels were observed.

Conclusion: We concluded that ω-3 fatty acid had favorable effects in rat testis tissue by preventing oxidative damage and increasing the level of testosterone.

Key words: ω-3 fatty acids, testicle, testosterone, rat

GİRİŞ

Omega-3 (ω -3) yağ asitleri balık yağı başta olmak üzere keten tohumu, ceviz, soya yağı gibi bitkisel yağlarda ve yeşil yapraklı sebzelerde bol miktarda bulunur. ω -3 yağ asitleri hücre membranının yapısına katılan esansiyel yağ asitleridir ve hücrenin normal fonksiyonlarını sürdürebilmesi için gereklidir. Hücre membranının akışkanlığı ve fleksibilitesi esansiyel yağ asitlerinin membrandaki miktarına bağlıdır.^{1,2} Gen ekspresyonu ve hücre içi haberleşme üzerinde etkili olan omega-3 yağ asitleri, ayrıca hücrenin enerji ihtiyacını sağlar ve vücut ısısının korunmasına yardımcı olur.³ Dokozaheksanoik asit (DHA, C22:6: w3), eikozapentaenoik asit (EPA, C20: 5:w3) ve α -linolenik asit (ALA, C18: 3: w3) ω -3 yağ asitleri olarak bilinirler (Şekil 1). DHA ve EPA uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA: polyunsaturated fatty acids) üyelerindedir. Mutlaka diyetimizin içinde PUFA bulunmalıdır.^{4,5} DHA özellikle beyin, retina ve diğer nöral dokularda yoğun olarak bulunan bir yağ asididir. Kısa zincirli bir ω -3 yağ asidi olan ALA sağlıklı erişkinlerin metabolizmasında yer alır. ALA ve EPA DHA'ya dönüştürülebilirler. Ancak yeni doğanda bu metabolizma olmadığı için bu dönüşüm gerçekleşmemektedir. Bu sebeple yeni doğanlarda DHA ve EPA'nın hücrenin normal fonksiyonlarını sürdürebilmesi için mutlaka diyetle alınması gerekmektedir.⁶⁻⁸

Erişkin bir insanın normal şartlarda günlük olarak 1-1,5 gram ω -3 yağ asidi alması tavsiye edilmektedir. Bazı özel hastalıkların tedavisinde 3 gr ve daha fazlası kullanılabilir.⁹ ω -3 yağ asitlerinin antioksidan, antiinflamatuvar, antihipertansif, antihiperlipidemik, antiaterojenik, antiaritmik ve antiagregan özellikleri olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda, DHA'nın kardiyovasküler hastalıklar, hipertansiyon, allerjik astma, romatoid artrit, glomerulonefrit gibi hastalıkların tedavisinde kullanılabileceği bildirilmiştir. Akciğer kanseri riskini azalttığı tespit edilen DHA, ayrıca kolon ve meme kanserinde tedaviye eklenebileceği ifade edilmiştir. Ayrıca ω -3 yağ asitlerinden fakir beslenmenin, şizofreni ve depresyon gibi bazı psikolojik hastalıkların ortaya çıkmasına katkıda bulunacağı bildirilmiştir.¹⁰⁻¹²

ω -3 yağ asidi bakımından zengin diyetle beslenmenin testis dokusu açısından da çok önemli olduğunu yapılan klinik çalışmalarla ortaya konulmuştur. Subfertil erkeklerde ω -3 yağ asitlerinin

yeterli miktarda alınmamasının sperm motilitesini azalttığı tespit edilmiştir.¹³ Sıçanlar üzerinde yapılmış olduğumuz bu çalışmada, ω -3 yağ asidi alımının testis dokusu üzerindeki etkileri biyokimyasal düzeyde araştırıldı.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamızda 280-310 gr ağırlığında toplam 16 adet Wistar-Albino cinsi erkek sıçan kullanıldı. Hayvanlar rastgele iki gruba ayrıldı; Grup I (n=8)'deki kontrol sıçanlara gün aşırı sadece intragastrik gavaj ile serum fizyolojik verildi. Grup II (n=8)'deki sıçanlara ise, 400 mg/kg dozundaki ω -3 yağ asidi (Marincap kapsül®) intragastrik gavaj yoluyla günlük olarak verildi. Altı haftalık deney süresi sonunda tüm sıçanlar dekapite edilerek alınan kan örneklerinden serum testosteron düzeyleri incelendi. Daha sonra sıçanların testisleri hızla çıkarıldı. Doku örnekleri 0.15 M'lık soğuk (+4°C) potasyum klorür (KCl) ile yıkandı ve kurutma kağıdı ile kurutuldu. Daha sonra dokular homojenizatör ile (Ultra Turrax Type T25-B, IKA Labortechnik, Germany) 0.15 M'lık KCl çözeltisi içinde 16000 rpm'de 3 dakika homojenize edildi. Homojenizasyon bir buz kabının içerisinde gerçekleştirildi. Homojenat 5000xg'de 1 saat (+4°C'de) santrifüjlenerek süpernatant elde edildi ve analiz zamanına kadar (1 hafta) -40°C'de bekletildi. Süperoksit dismutaz (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) enzim aktiviteleri süpernatantta ve malondialdehit (MDA) seviyeleri homojenatta spektrofotometrik olarak tayin edildi.

Malondialdehit ölçümü: Lipid peroksidasyon ölçüm metodu olan Esterbauer metodu uygulanarak yapıldı.¹⁴ Tiyobarbitirik asit ile 90-95°C'de reaksiyona giren malondialdehit, pembe renkli kromojen oluşturmaktadır. On beş dakika sonra hızla soğutulan numunelerin absorbansları 532 nm'de spektrofotometrik olarak okundu. Elde edilen değerler nmol/g protein cinsinden belirtildi.

Süperoksit dismutaz ölçümü: Süperoksit dismutaz enzimi Sun ve arkadaşlarının¹⁵ modifiye ettiği metotla tayin edildi. Bu metodun prensibi nitroblue tetrazolium'un (NBT) süperoksit üreticisi olan ksantin-ksantinoksidaz sistemi tarafından indirgenmesi esasına dayanmaktadır. SOD aktivitesi ünite/g doku proteini olarak ifade edildi.

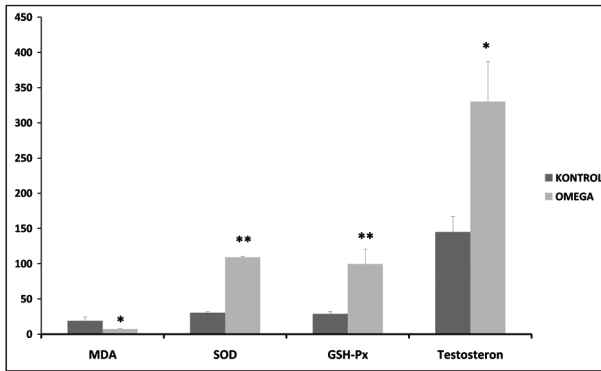
Glutasyon peroksidaz ölçümü: GSH-Px aktivitesi Paglia ve arkadaşlarının metoduna göre çalışıl-

dı.16 GSH-Px hidrojen peroksit varlığında redükte glutatyonun (GSH) okside glutatyona (GSSG) yükseltgenmesini katalizler. Hidrojen peroksidin bulunduğu ortamda GSH-Px'in oluşturduğu GSSG, glutatyon redüktaz ve NADPH yardımı ile GSH'a indirgenir. GSH-Px aktivitesi NADPH'ın NADP⁺'ya yükseltgenmesi sırasındaki absorbanın 340 nm'de okunmasıyla hesaplanır.

İstatistiksel Analiz: PC ortamında "SPSS 14.0 for windows" istatistik programı kullanıldı. Grupların dağılımları Non-parametrik testlerden Mann Whitney U test ile değerlendirildi. İstatistiksel anlamlılık için p< 0.05 olan değerler anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Spektrofotometrik olarak testis dokusunda SOD, GSH-Px ve MDA enzim değerleri ve plazma testosteron düzeyi ölçüldü. Omega-3 yağ asiti verilen grubun testis SOD ve GSH-Px enzim seviyelerinin kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı artış meydana geldiği görüldü (p=0.002). Ayrıca oksidatif hasarı belirlemede önemli bir parametre olarak alınan MDA değerlerinin, istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş tespit edildi (p=0.015). Aynı grubun serum testosteron düzeylerinde ise, istatistiksel olarak anlamlı (p=0.026) artış görüldü (Grafik 1).



Grafik 1. Gruplara ait malondialdehit (MDA), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve serum testosteron düzeyinin gösterilmesi. Değerler ortalama ± SS şeklinde verildi.

* p< 0.05, ** p< 0.01 (Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında)



Dokozahekzoenik Asit (DHA, C22:6: w3)



α-Linoleik Asit (ALA, C18: 3: w3)



Eikozapentenoik Asit (EPA, C20: 5:w3)

Şekil 1. Omega-3 Yağ Asitlerinin kimyasal yapısı

TARTIŞMA

ω-3 yağ asitleri, hücresel fonksiyonların normal yürütülebilmesi için hücre membranı, endoplazmik retikulum ve mitokondri gibi organeller için gereklidir. Bu nedenle ω-3 yağ asitlerinin oksidatif süreç içerisine giren dokudaki azalan PUFA yerine geçerek koruyucu etki gösterdiği öne sürülmektedir.¹⁷⁻¹⁹ Biz de daha önce yapmış olduğumuz çalışmalarda, prefrontal korteks, serebellum, böbrek gibi dokularında formaldehitin oluşturduğu oksidatif hasarın omega-3 yağ asitleri tarafından azaltıldığını saptadık.^{4,5,20}

Organizmada herhangi bir patolojik olay sonucunda yada fizyolojik koşullarda oluşan serbest radikaller ile bunların koruyucusu olan antioksidan savunma sistemi arasında bir denge söz konusudur. Bu dengenin serbest radikaller lehine kayması oksidatif stresi gösterir. Canlılar oksidatif hasara karşı enzimatik ve nonenzimatik antioksidan sistem ve moleküllerle korunur. Enzimatik antioksidan sistemler içerisinde hücresel düzeyde etkili SOD ve GSH-Px yer alır.²¹

Comhaire ve Mahmoud¹³ yapmış oldukları çalışmalarında, ω-3 yağ asitlerinin yetersiz alınımının subfertil erkeklerde sperm motilitesini düşürdüğünü bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da, ω-3 yağ asidi uyguladığımız ratlarda sperm sayısı ve matürasyonu üzerine olumlu etkileri bulunan testosteron düzeyinin yükseldiği tespit edildi. Sarsılmaz ve ark⁸ sıçan corpus striatumunda ω-3 yağ asitlerinin oksidan/antioksidan parametreler üzerine etkilerini in-

celedikleri çalışmalarında, ω -3 yağ asitlerinin oksidatif hasara karşı da koruyucu etkilerinin olduğunu bildirilmişlerdir. Biz de daha önce yapmış olduğumuz çalışmada, formaldehite maruz kalan sıçanlara uygulanan ω -3 yağ asitlerinin testis dokusunda formaldehitin oluşturduğu oksidatif hasarı azalttığını, bir başka deyişle azalan SOD ve GSH-Px enzim aktivitelerini kontrole yaklaştırdığını tespit ettik.²² Bu çalışmamızda ise, fizyolojik olarak organizmada oluşabilen serbest radikallerin süpürücüsü olan antioksidan savunma sistemlerinden SOD ve GSH-Px enzim aktivitelerinde meydana gelen değişiklikler araştırıldı. ω -3 yağ asidi uygulamasının, sıçan testis dokusu SOD ve GSH-Px enzim aktivitelerinde kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı artışa sebep olduğu görüldü.

MDA lipid peroksidasyonu sonucu oluşan ürünlerden biridir ve oksidatif hasarı göstermede yaygın olarak kullanılan bir parametredir.²³ Daha önce toksik bir kimyasal olan formaldehite maruz kalan sıçanların testis dokularında MDA düzeylerini incelediğimiz çalışmada, MDA seviyelerinde artış olduğu ve bu artışın ω -3 yağ asidi uygulaması ile düşerek kontrol grubuna yaklaştığını tespit ettik. Bu çalışmamızda da, benzer şekilde ω -3 yağ asidi verilen sıçanların testis MDA düzeylerinde kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş görüldü.

Gerek yaşlanma ile, gerekse fizyolojik koşullar altında organizmada serbest radikaller oluşmaktadır. ω -3 yağ asitleri, serbest radikallerin organizmaya olan zararlı etkilerinden korunmak için onların süpürücüsü olan SOD ve GSH-Px enzim aktiviteleri artırmakta iken, dokudaki oksidatif hasarı gösteren MDA düzeylerini ise düşürmektedir. Serum testosteron düzeylerinde ise, çok önemli artışa neden olmaktadır. Sonuç olarak, sıçanlar üzerinde biyokimyasal düzeyde yapılan bu deneysel çalışmada, ω -3 yağ asitlerinin sıçan testis dokusunda koruyucu etkilerinin olduğu tespit edildi. Bu bulgular ışığında klinikte infertilite tedavisi gören hastalara, kullandıkları ilaçlara ilave olarak ω -3 yağ asiti preparatları verilmeli ve diyetlerinde de mutlaka ω -3 yağ asitinden zengin ürünler yer almalıdır.

KAYNAKLAR

1. Nordoy A. Is there a rational use for n-3 fatty acids (fish oils) in clinical medicine? *Drugs* 1991; 42(3):331-42.
2. Bourre JM, Bonneil M, Chaudiere J, Clement M, Dumont O, Durand G. Structural and functional importance of dietary

- polyunsaturated fatty acids in the nervous system. *Adv Exp Med Biol* 1992;318(1):211-29.
3. Masters C. Omega-3 fatty acids and the peroxisome. *Mol Cell Biochem* 1996;165(2):83-93.
4. Zararsız İ, Kuş İ, Akpolat N, Songur A, Ögetürk M, Sarsılmaz M. Protective Effects of Omega-3 Essential Fatty Acids Against Formaldehyde-Induced Neuronal Damage in Prefrontal Cortex of Rats. *Cell Biochem Funct* 2006;24(3):237-44.
5. Zararsız I, Sonmez MF, Yılmaz HR, et al. Effects of omega-3 essential fatty acids against formaldehyde induced nephropathy in rats. *Toxicol Ind Health* 2006b;22(5):223-9.
6. Gamoh S, Hashimoto M, Sugioka K, Shahdat Hossain M, Hata N, Misawa Y, Masumura S. Chronic administration of docosahexaenoic acid improves reference memory-related learning ability in young rats. *Neuroscience* 1999;93(1):237-41.
7. Zararsız İ, Sönmez MF, Yılmaz HR, Pekmez H, Kuş İ, Sarsılmaz M. Sıçanlarda formaldehit uygulamasıyla akciğerlerde oluşan hasar üzerine omega-3 yağ asitlerinin koruyucu etkisi. *Selçuk Tıp Dergisi* 2004;20(3):93-8.
8. Sarsılmaz M, Songur A, Ozyurt H, et al. Potential role of dietary ω -3 essential fatty acids on some oxidant/antioxidant parameters in rats' corpus striatum. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2003;69(4):253-9.
9. Wills E D. The role of Dietary Components in Oxidative Stress in Tissues. Sies H (Ed.). Academic Press. Orlando, 1985; s: 197-220.
10. Yılmaz, H.R, Songur A, Özyurt B, Zararsız İ, Sarsılmaz M. The effects of n-3 polyunsaturated fatty acids by gavage on some metabolic enzymes of rat liver. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2004;71(2):131-5.
11. Parker G, Gibson N.A, Brotchie H, Heruc G, Rees A.M, Pavlovic D.H. Omega-3 Fatty Acids and Mood Disorders. *Am J Psychiatry* 2006;163(6): 969-78.
12. Saravanan P, Davidson NC, Schmidt EB, Calder PC. Cardiovascular effects of marine omega-3 fatty acids. *The Lancet* 2010; 376 (9740): 540-50.
13. Comhaire FH, Mahmoud A. The role of food supplements in the treatment of the infertile man. *Reprod Biomed Online* 2003;7(4): 385-91.
14. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hidroksynonenal. *Methods Enzymol* 1990;186(1):407-21.
15. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34(3):497-500.
16. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterisation of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967;70(1): 158-69.
17. Stone NJ. Fish consumption, fish oil, lipids, and coronary heart disease. *Am J Clin Nutr* 1997;65(4):1083-6.
18. Miyasaka CK, de Souza JA, Torres RP, Filho JM, Lajolo FM, Curi R. Effect of the administration of fish oil by gavage on activities of antioxidant enzymes of rat lymphoid organs. *Gen Pharmacol* 1998;30(5):759-62.
19. Halliwell B. Free radicals, antioxidants and human disease; curiosity, course or consequence? *Lancet* 1994; 344 (8924):721-4.

20. Zararsız İ, Meydan S, Sarsılmaz M, Songur A, Ozen OA, Sogut S. Protective effects of omega-3 essential fatty acids against formaldehyde-induced cerebellar damage in rats. *Toxicol Ind Health* 2011;27(6):489-95.
21. Akyol Ö. Beyin tümörlerinde doku SOD, CAT ve GSH-Px aktiviteleri. Uzmanlık tezi, Ankara: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Bölümü, Ankara 1994.
22. Kus İ, Zararsız İ, Ögetürk M, Yılmaz H.R, Sarsılmaz M. Deneysel formaldehit toksisitesinde testis SOD, GSH-Px, MDA düzeyleri ve ω -3 yağ asitlerinin koruyucu etkisi. *Fırat Tıp Dergisi* 2008;13(1): 10-4.
23. Pompella A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. *Int J Vitam Nutr Res* 1997;67(5): 289-97.