

OMEGA-3 YAĞ ASİTLERİNİN BÖBREK ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ: DENEYSEL BİR ÇALIŞMA

EFFECTS OF OMEGA - 3 FATTY ACIDS ON KIDNEY ANTIOXIDANT DEFENSE SYSTEM: AN EXPERIMENTAL STUDY

Burak GÜLCEN¹ Ömür KARACA¹ Murat Abdulgani KUŞ² Dilara KAMAN³ Murat ÖGETÜRK⁴ İlter KUŞ¹

¹Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, Balıkesir, Türkiye
²Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Sağlık Yüksek Okulu, Burdur, Türkiye
³Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye
⁴Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye

Yazışma Adresi:

Burak GÜLCEN

Balıkesir Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Çağış Kampüsü, Bigadiç Yolu, 18.km 10145 Balıkesir

E posta: burakgulcen@balikesir.edu.tr

Kabul Tarihi: 03 Temmuz 2012

Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi

ISSN: 2146-9601

e-ISSN: 2147-2238

bsbd@balikesir.edu.tr

www.bau-sbdergisi.com

ÖZET

AMAÇ: Bu çalışmada böbrek dokusu üzerine omega – 3 yağ asitlerinin koruyucu etkisinin biyokimyasal düzeyde araştırılması amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM: Toplam 16 adet Wistar – Albino cinsi erişkin erkek sıçan iki gruba ayrıldı ve incelendi. Grup I'deki sıçanlar kontrol grubu olarak kullanıldı ve intragastrik gavaj yöntemi ile serum fizyolojik verildi. Grup II'deki sıçanlara ise, 400 mg/kg dozundaki omega – 3 yağ asidi intragastrik gavaj yöntemi ile günlük olarak verildi. Altı haftalık deney süresinden sonra sıçanlar dekapitasyon yöntemi ile öldürüldü. Hayvanlardan alınan böbrek doku örneklerinde malondialdehit (MDA) düzeyi ve superoksit dizmutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH - Px) enzim aktiviteleri spektrofotometri yöntemi ile tayin edildi.

BULGULAR: Çalışmamızda omega – 3 yağ asiti verilen sıçanların böbrek SOD ve GSH – Px aktiviteleri istatistiksel açıdan anlamlı bir şekilde artarken MDA düzeylerinin ise kontrol grubuna göre anlamlı bir düşüşü tespit edildi.

SONUÇ: Omega – 3 yağ asitlerinin sıçan böbrek dokusunda antioksidan savunma sistemini güçlendirdiği, oksidatif hasarı önlediği ve böbrek dokusu üzerinde koruyucu etki gösterdiği belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Omega – 3 yağ asiti, böbrek, sıçan

SUMMARY

OBJECTIVE: In this research, protective effect of omega – 3 fatty acids on kidney tissue is biochemically investigated.

MATERIAL AND METHOD: For his purpose, 16 adult Wistar – Albino rats are divided into two groups and investigated. Rats in Group I are used as control group and they are only intragastric gavaged with normal saline. However, rats in Group II are intragastric gavaged daily with a dose of 400 mg/kg fatty acid. All rats are killed by using decapitation method at the end of six weeks experiment period. Kidney tissues collected from experimental subjects are spectrophotometric investigated for malondialdehyde level and superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH – Px) enzyme activities.

RESULTS: It has been observed that SOD and GSH – Px activities in kidney are statistically increased in rats treated with omega – 3 fatty acid. Along with this, there had been statistical decrease in their MDA levels compared to the results coming from control group subjects.

CONCLUSION: It is concluded that omega – 3 fatty acids prevent the oxidative damage in rat kidney tissue. These fatty acids have positive antioxidant effect, thus protect kidney tissue.

Key words: Omega – 3 fatty acid, kidney, rat

GİRİŞ

Omega – 3 yağ asitleri en başta balık yağı olmak üzere ceviz, keten tohumu, soya yağı gibi bitkisel yağlarda ve yeşil yapraklı sebzelerde fazla miktarda bulunur. Omega – 3 yağ asitleri hücre membranının yapısına katılan esansiyel yağ asitleridir ve hücrenin normal fonksiyonlarını idame ettirebilmesi açısından önemlidir.¹

Hücre membranının akışkanlığında esansiyel yağ asitlerinin membrandaki miktarı çok önemlidir.^{1,2} Retina, beyin ve üreme sistemleri daha fazla miktarda omega – 3 yağ asitleri içerir.¹ Dokozaheksanoik asit (DHA, 22:6nn-3), eikozapentaenoik asit (EPA, 20:5n-3) ve alfa linoleik asit (ALA 18:3n-3) omega – 3 (n-3) yağ asitleri olarak bilinirler.^{3,4} DHA ve EPA uzun zincirli çoklu doymamış yağ

asitleri (PUFA: polyunsaturated fatty acids) gurubundadırlar. Diyet ile beraber mutlaka PUFA alınmalıdır.^{5,6} Sinir sisteminin gelişmesinde büyük bir önemi olan DHA beyin korteks tabakasının yağ miktarının % 15 – 20'sini meydana getirmektedir. Bununla beraber DHA aksonun yapısını muhafaza ederek elektriksel uyarıların iletilmesine yardımcı olmaktadır.⁷ ALA bir omega – 3 yağ asitidir ve sağlıklı erişkinlerin metabolizmalarında yer almaktadır. ALA ve EPA kimyasal reaksiyonlar ile EPA ve DHA'ya dönüşebilmektedirler. Yeni doğanlarda ise bu metabolizma mevcut olmadığı için bu dönüşüm gerçekleşmemektedir. Bundan ötürü yeni doğanların mutlaka normal fonksiyonlarının idamesi için DHA ve EPA'yı diyetleri ile almaları gerekmektedir.^{8,9}

Omega – 3 yağ asitlerinin antihipertansif, antiinflamatuar, antioksidan, antiaterojenik, antiapitotik, antihiperlipidemik, antiagregan ve antiaritmik özellikler taşıdığı ortaya konulmuştur.^{10,11} Daha önceki yapılan çalışmalarda DHA'dan kardiyovasküler hastalıklar, hipertansiyon, alerjik astım, glomerulonefrit, otoimmün hastalıklar, romatoid artrit, meme ve kolon tümörlerinin tedavisinde istifade edilebileceği bildirilmiştir.^{11,12} Ayrıca akciğer kanseri ve meme kanseri tedavisinde protokol'e omega – 3 yağ asitlerinin de eklenebileceği bildirilmiştir. Diyetle omega – 3 yağ asitlerinin yetersiz alınmasının, şizofreni ve depresyon gibi bazı psikolojik rahatsızlıkların oluşmasında bir faktör olduğu da ortaya konulmuştur.^{13,14}

Omega - 3 yağ asitlerinin biyolojik etkileri içerisinde en önemlisi, omega – 6 yağ asidi metabolizması ile etkileşimleri ve sonuçta aktif arakidonik asit (AA) metabolitleri yerine inaktif lökotrien (LT) ve tromboksanların (TX) oluşmasıdır. Sonuçta eikosapentaenoik asit / arakidonik asit (EPA / AA) alım oranı arttıkça trombosit aggregasyonunun inhibe edilmesi ve vasküler tonusun azalması yönünde bir denge kurulur. Omega – 3 yağ asidi alımı ile renal vazodilatatör rezerv artmaktadır.¹⁵ Grande JP ve arkadaşlarının farelerde yaptıkları çalışmalarda, DHA'nın mezengial proliferatif glomerulonefrit modelinde renal mezenşimde antiproliferatif etkileri olduğu gösterilmiştir.¹⁶ Bizim de sıçanlar üzerinde yürütmüş olduğumuz çalışmamızda böbrek dokusu üzerine omega – 3 yağ asitlerinin koruyucu etkisinin biyokimyasal düzeyde araştırılması amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda toplam 16 adet Wistar – Albino cinsi erişkin erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar rastgele iki gruba ayrıldı; Grup I (n=8)'deki kontrol sıçanlara gün aşırı intragastrik gavaj yöntemi ile serum fizyolojik verildi. Grup II (n=8)'deki sıçanlara ise, 400 mg/kg dozda omega – 3 yağ asiti (Marincap kapsül®) intragastrik gavaj yolu ile günlük

olarak verildi. Altı haftalık deney süresi sonunda tüm hayvanlar dekapitasyon yöntemiyle öldürüldü. Daha sonra hayvanların böbrekleri çıkartıldı. Doku örnekleri 0.15 M'lık soğuk (+4 C°) potasyum klorür (KCl) ile yıkandı ve ardından kurutma kağıdı ile kurutuldu. Dokular homojenizatör ile (Ultra Turrax Type T25-B, IKA Labortechnik, Germany) 0.15 M'lık KCl çözeltisi içinde 16000 rpm'de 3 dk homojenize edildi. Homojenizasyon bir buz kabı içerisinde yapıldı. Homojenat 5000xg'de 1 saat (+ 4 C°) santrifüjlendi ve süpernatant elde edildi. Analiz zamanını kadar (1 hafta) – 40 C°'de bekletildi. Süperoksit dismutaz (SOD), glutathione peroxidaz (GSH – Px) enzim aktiviteleri süpernatantta, malondialdehid (MDA) seviyesi homojenatda spektrofotometrik olarak tespit edildi.

Süperoksit dismutaz tayini: Süperoksit dismutaz enzimi Sun ve arkadaşlarının modifiye ettiği metotla tayin edildi.¹⁷ Bu metodun prensibi nitroblue tetrazolium'un (NBT) süperoksit üreticisi olan ksantin – ksantinokinaz sistemi tarafından indirgenmesi temeline dayanmaktadır. SOD aktivitesi ünite/g (U/g) doku proteini olarak ifade edilir.

Malondialdehid tayini: Lipid peroksidasyon ölçüm metodu olan Esterbauer metodu uygulanarak yapıldı.¹⁸ Tiyobarbütirik asit ile 90 – 95 C°'de reaksiyona giren malondialdehid pembe renkli bir kromojen oluşturmaktadır. On beş dakika sonra numuneler hızla soğutuldu ve absorbansları 532 nm'de spektrofotometrik olarak okundu. Elde edilen değerler nmol/g protein cinsinden belirtildi.

Glutasyon peroksidaz tayini: Glutasyon peroksidaz aktivitesi Paglia ve arkadaşlarının metoduna göre çalışıldı.¹⁹ GSH-Px hidrojen peroksit varlığında redükte glutasyonun (GSH) okside glutatyona (GSSG) yükseltgenmesini katalizler. Hidrojen peroksidin bulunduğu ortamda GSH-Px'in oluşturduğu GSSG, glutasyon redüktaz ve NADPH yardımı ile GSH'a indirgenir. GSH-Px aktivitesi NADPH'ın NADP+ya yükseltgenmesi sırasındaki absorbans azalmasının 340 nm'de okunmasıyla hesaplandı.

İstatistiksel Analiz: Biyokimyasal parametrelerin (SOD, GSH – Px, MDA) analizinde "SPSS 16.0 for Windows" istatistik programı kullanıldı. Grupları karşılaştırmak için "Mann – Whitney U Testi" uygulandı. İstatistiksel olarak p<0.005 olan değerler anlamlı kabul edildi. Elde edilen veriler aritmetik ortalama ± standart hata (SH) şeklinde tabloya (grafiklere) geçirildi.

BULGULAR

Spektrofotometrik olarak böbrek dokusunda MDA değeri, SOD ve GSH – Px enzim aktivite değerleri ölçüldü (Tablo 1).

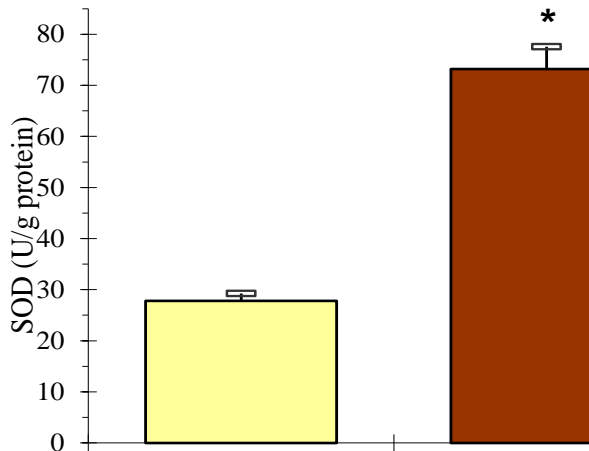
Tablo 1. Gruplara ait böbrek doku örneklerindeki SOD, GSH-Px ve MDA değerleri (n=8).

PARAMETRE	KONTROL	OMEGA-3	P değeri
MDA (nmol/g protein)	26,60 ± 7,12	7,05 ± 0,56	0,001
SOD (U/g protein)	27,79 ± 1,44	73,21 ± 4,32	0,001
GSH-Px (U/g protein)	20,83 ± 2,49	49,79 ± 7,08	0,009

Değerler ortalama ± SH şeklinde verilmiştir.

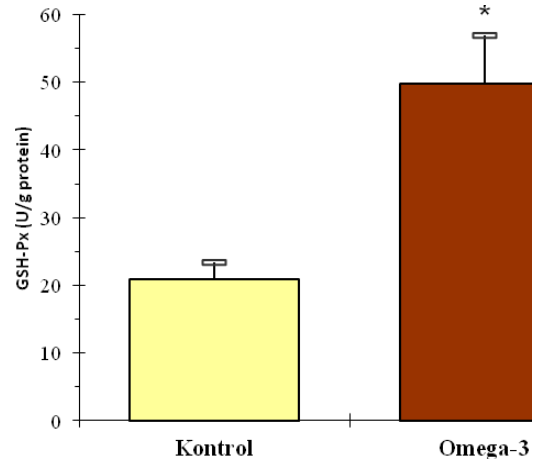
Omega – 3 yağ asidi verilen grubun böbrek SOD ve GSH – Px enzim aktivite değerlerinin kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış sergilediği belirlendi (Şekil 1) ($p<0,05$) ve (Şekil 2) ($p<0,05$). Oksidatif hasarı işaret etmesi bakımından önemli bir parametre olan MDA değerinin ise kontrol grubu ile kıyaslandığında omega – 3 yağ asidi verilen grupta istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş sergilediği tespit edildi ($p<0,05$) (Şekil 3).

Şekil 1. SOD değerleri (U/g protein). * $p=0.005$.

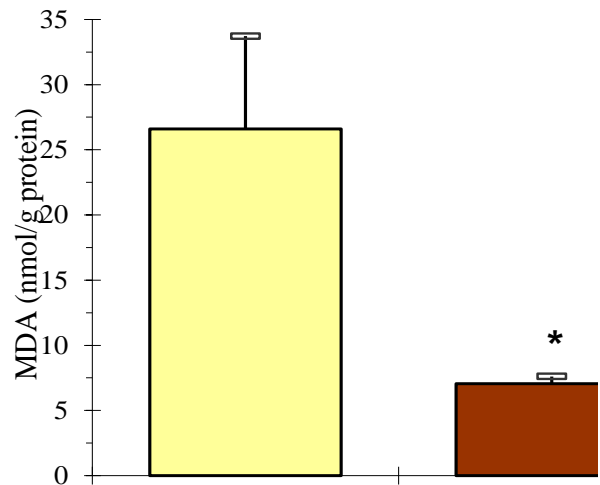
**TARTIŞMA**

Hücrel fonksiyonların sağlıklı bir şekilde sürdürülebilmesi ve hücre membranı, endoplazmik retikulum, mitokondri gibi organeller için omega – 3 yağ asitleri önemlidir. Bu sebeple omega – 3 yağ asitlerinin oksidatif süreç içerisinde dokuda azalan PUFA (çoklu doymamış yağ asitleri) yerine geçerek koruyucu etki gösterdiği ortaya konulmuştur.^{10,21} Balık yağında fazla miktarda bulunan omega – 3 yağ asitlerinin (DHA, EPA ve ALA) antihipertansif ve antiinflamatuvar özelliklere sahip

Şekil 2. GSH-Px değerleri (U/g protein). * $p=0.009$.



Şekil 3. MDA değerleri (nmol/g protein). * $p=0.005$.



olduğu ve bundan ötürü de organizma için koruyucu özellik taşıdığı ifade edilmiştir.^{9,10,21} Özellikle retina, beyin ve diğer nöral dokularda fazla miktarda bulunan ve hücre membranının yapısına katılan DHA, sinir sisteminin gelişmesinde önemli rol oynamaktadır. DHA aksonal yapıyı korumak suretiyle elektriksel uyarıların düzgün olarak iletilmesinde önemli bir role sahiptir.^{7,10,21,22}

Oksidatif hasara karşı organizmalar enzimatik ve non enzimatik antioksidan sistem ve moleküllerle korunur. Bu enzimatik antioksidan sistemler dahilinde GSH-PX ve SOD yer almaktadır.²³ MDA ise lipid peroksidasyonu sonucu meydana gelen moleküllerden biridir ve dokuda oluşan oksidatif hasarı işaret etmede kullanılan parametrelerden birisidir.^{24,25} Biz de yapmış olduğumuz çalışmada omega 3 yağ asidi verilen sıçanların GSH-Px ve SOD enzim aktivite düzeylerinin arttığını buna karşın MDA düzeyinin ise azalma gösterdiğini tespit ettik.

Antioksidan savunma sistemi, lipid peroksidasyon sürecinin başlamasında kritik rolü olan reaktif oksijen türlerinin temizlenmesinde önemlidir.²⁶ Omega – 3 yağ asitleri TNF-alfa ve IL-1 beta gibi proinflatuar sitokinlerin oluşumunu azaltır.²⁷ Daha önce yapılmış olan bir takım araştırmalarda formaldehid toksisitesi sonucu akciğer, böbrek ve prefrontal korteks de oluşan oksidatif hasarın omega – 3 yağ asitleri tarafından engellendiği gösterilmiştir.^{5,6,28}

Obezite, koroner kalp hastalığı, insülin direnci ve bazı kanser tipleri gibi önemli rahatsızlıkların aşırı yağ ve karbonhidrat tüketimi ile ilişkili olduğu ortaya konulmuştur. Doymuş yağ asitlerinin tüketimi kronik rahatsızlıkların gelişmesine sebebiyet vermesine karşılık, omega – 3 yağ asitlerinin (özellikle balık omega – 3 yağ asitlerinin) alımı birçok hastalığa karşı önleyici ve tedavi edici etki yarattığı aşikârdır.^{1,3} Omega – 3 yağ asitleri trombosit agregasyonunu, fibrinojeni ve kan viskozitesini azaltarak koroner kalp hastalığına bağlı ölümlerde gerileme yarattığı gösterilmiştir.^{1,3,10,29}

Rousseu ve arkadaşlarının farelerde renovasküler hipertansiyon modelinde yaptıkları çalışmada omega – 3 yağ asidi kullanımı sonucu anjiotensin konverting enzim (ACE) ile ilgili muhtemel mekanizmalarla kan basıncı kontrolünün kolaylaştığını ve tek taraflı renal arter klemplenmesi suretiyle yapılan çalışmalarda da hipertansiyon gelişmesinin engellendiğini belirtmişlerdir.²² Yapılmış olan bir başka çalışmada da omega – 3 yağ asidi ile zenginleştirilmiş diyet ile beslenen ratlarda sodyum nitroprusid (SNP)'in indüklediği nefrotoksititeye karşı olası koruma sağlandığı tespit edilmiştir.³⁰

Sonuç olarak bizim de sıçanlar üzerinde biyokimyasal düzeyde yapmış olduğumuz bu çalışmamızda omega – 3 yağ asitlerinin sıçan böbrek dokusunda antioksidan savunma sistemini güçlendirdiği, oksidatif hasarı önlediği ve böbrek dokusu üzerine koruyucu bir etki gösterdiğini tespit edildi.

KAYNAKLAR

1. Nordoy A. Is there a rational use for n – 3 fatty acids (fish oils) in clinical medicine?. *Drugs* 1991; 42: 331-342.
2. Bouurre JM, Bonneil M, Chaudiere J, Clement M, Dumont O, Durant G. Structural and functional importance of dietary polyunsaturated fatty acids in the nervous system. *Adv Exp Med Biol* 1992; 18 (1): 211-229.
3. Storlien LH, Higgins JA, Thomas TCI. Diet composition and insülin action in animal models. *Br J Nutr* 2000; 83: 85-90.
4. Mantzioris E, Cleland LG, Gibson RA. Biochemical effects of a diet containing foods enriched with n-3 fatty acids. *Am J Clin Nutr* 2000; 72: 42-48.
5. 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): 237-244.
6. Zararsız İ, Sönmez MF, Yılmaz HR, et al. Effects of omega - 3 essential fatty acids against formaldehyde induced nephropathy in rats. *Toxicol Ind Health* 2006; 22 (5): 223-229.
7. Bourre JM, Bonneil M, Chaudiere J, Clement M, Dumont O, Durant G. Structural and functional importance of dietary polyunsaturated fatty acids in the nervous system. *Adv Exp Med Biol* 1992; 318: 211-229.
8. Gomoh 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): 237-241.
9. Sarsılmaz M, Songur A, Ozyurt H, et al. Potential role of dietary omega – 3 essential fatty acids on same oxidant/antioxidant parameters in rats corpus striatum. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2003; 69 (4): 131-135.
10. Stone NJ. Fish consumption, fish oil, lipids and coronary heart disease. *Am J Clin Nutr* 1997; 65: 1083-1086.
11. Ramesh G, Das UN. Effects of free fatty acids on two-stage skin carcinogenesis in mice. *Cancer Lett* 1996; 100: 199-209.
12. Oosthuizen W, Vorster HH, Jerling JC, Bernard HC, Smuts CM, Silvis N, Kruger A, Venter CS. Both fish oil and olive oil lowered plasma fibrinogen in women with baseline fibrinogen levels. *Thromb Haemostasis* 1994; 72: 557-562.
13. Yılmaz HR, Songur A, Ozyurt 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): 131-135.
14. Saravanan P, Davidson NC, Schmidt EB, Calder PC. Cardiovascular effects of marine omega – 3 fatty acids. *The Lancet* 2010; 376 (9740): 540-550.
15. De Caterina RD, Enders S, Kristensen SD ve ark. N – 3 fatty acids and renal diseases. *Am J Kidney Dis* 1994; 24: 397-415.
16. Grande JP, Walker HJ, Holub BJ ve ark. Suppressive effects of fish oil on mesangial cell proliferation in vitro and in vivo. *Kidney int* 2000; 57: 1027-1040.
17. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34: 497-500.
18. Esterbauer H, Cheeseman KH: Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4 – hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 1990; 186: 407-421.
19. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterisation of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 158-169.
20. Halliwell B. Free radicals, antioxidants and human disease; curiocity, course or consequence? *Lancet* 1994; 344 (8924): 721-724.
21. 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): 759-762.
22. Rousseau D, Tusseaint CH, Reaerstorff D ve ark. Dietary n – 3 polyunsaturated fatty acids affect the development of renovascular hypertension in rats. *Molec Cell Biochem* 2001; 225: 109 – 119.
23. Akyol Ö. Beyin tümörlerinde doku SOD, CAT ve GSH-Px aktiviteleri. *Uzmanlık Tezi* Ankara: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi 1994.
24. Kamal AA, Gomaa A, el Khafif M, Hammad AS. Plasma lipid peroxides among workers exposed to silica or asbestos dust. *Environ Res* 1989; 49: 173-180.
25. Pompella A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* 1997; 67: 289-297.

26. Kanter M, Coskun O, Korkmaz A, et al. Effects of nigella sativa on oxidative stress and beta – cell damage in streptozotocin – induced diabetic rats. *The Anatomical Record. Part A, Discoveries in Molecular, Cellular and Evolutionary Biology* 2004; 279: 685-691.
27. Song C, Zhang XY, Manku M. Increased phospholipase A2 activity and inflammatory response but decreased nerve growth factor expression in the olfactory bulbectomized rat model of depression : effects of chronic ethyl – eicosapentaenoate treatment. *J Neurosci* 2009; 29: 14-22.
28. Zararsız İ, Sönmez MF, Yılmaz HR, ve ark. Sıçanlarda formaldehid uygulamasıyla akciğerlerde oluian hasar üzerine omega – 3 yağ asitlerinin koruyucu etkisi. *Selçuk Tıp Dergisi* 2004; 20: 93-98.
29. Pettersson EE, Rekola S, Berglund L, Sundqvist KG, Angelinm B, Diczfalusy U, et al. Treatment of Ig A nephropathy with omega – 3 polyunsaturated fatty acids: a prospective, double-blind, randomized study. *Clin Nephrol* 1994; 41: 183-190.
30. MW Khan, S Priyamvada, SA Khan, S Khan ve ark. Protective effect of ω -3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) on sodium nitroprusside-induced nephrotoxicity and oxidative damage in rat kidney. *Hum Exp Toxicol* 2012; May 1: 1- 15.