

SIÇANLARDA BEYİN PREFRONTAL KORTEKS DOKUSU ÜZERİNE OMEGA - 3 YAĞ ASİTLERİNİN KORUYUCU ETKİSİ

THE PROTECTIVE EFFECTS OF OMEGA - 3 FATTY ACIDS ON PREFRONTAL CORTEX OF BRAIN IN RATS

Burak Gülcen¹ Ömür Karaca¹ Murat Abdulgani Kuş² Emrah Özcan¹ Dilara Kaman³ Murat Ögetürk⁴ İlter Kuş¹

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

Yazışma Adresi:

Burak Gülcen
Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi Çağış Yerleşkesi 10145 Balıkesir - Türkiye

E posta: burakgulcen@balikesir.edu.tr

Kabul Tarihi: 20 Şubat 2014

Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi

ISSN: 2146-9601
e-ISSN: 2147-2238

bsbd@balikesir.edu.tr

www.bau-sbdergisi.com

ÖZET

AMAÇ: Çalışmamızda prefrontal korteks dokusu üzerine omega - 3 yağ asitlerinin olumlu etkilerinin biyokimyasal düzeyde incelenmesi amaçlandı.

YÖNTEMLER: Çalışmamız esnasında kullanılan 16 adet Wistar - Albino cinsi erişkin erkek sıçan iki ayrı gruba ayrıldı. Grup I'deki sıçanlar kontrol grubu olarak değerlendirildi ve intargastrik gavaj ile serum fizyolojik gün aşırı zerk edildi. Grup II'deki sıçanlara ise 0.4 g/kg dozdaki omega - 3 yağ asiti intragastrik gavaj yolu ile her gün verildi. Altı hafta devam eden deney süresi sonunda hayvanlar dekapite edilerek prefrontal korteks dokuları çıkarıldı. Alınan prefrontal korteks dokusu örneklerine ait süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH - Px) enzim aktivasyonları ile malondialdehit (MDA) düzeyleri spektrofotometrik olarak belirlendi.

BULGULAR: Çalışmamız neticesinde omega - 3 yağ asiti verilen hayvanların prefrontal korteks dokularında SOD ve GSH - Px enzim aktiviteleri kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir artış gösterdi. MDA düzeyleri ise kontrol grubuna oranla anlamlı bir düşüş seyri gösterdi.

SONUÇ: Sonuç olarak omega - 3 yağ asitlerinin beyin prefrontal korteks dokusundaki oksidatif hasara karşı önleyici bir etki yarattığı ve dolayısıyla bu doku üzerinde koruyucu bir işlev yürüttüğü tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Omega - 3 yağ asiti, prefrontal korteks, sıçan

SUMMARY

OBJECTIVE: In our study of prefrontal cortex on the positive effects of omega - 3 fatty acids was aimed to investigate the biochemical level.

METHODS: During our study used 16 Wistar - Albino male rats in the two groups were divided. Rats in Group I are used as control group and they are only intragastric gavaged with normal saline. Rats in group II, 0.4 g / kg dose of omega - 3 fatty acid was given every day by intragastric gavage. At the end of six weeks the ongoing experiments animals were decapitated and prefrontal cortex were removed. Get in the prefrontal cortex of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH - Px) enzyme activation and malondialdehyde (MDA) levels were determined spectrophotometrically.

RESULTS: As a result of our study of omega - 3 fatty acids in the prefrontal cortex of animals SOD and GSH - Px enzyme activity compared to the control group showed a statistically significant increase. MDA levels compared to the control group showed a significant downward trend.

CONCLUSION: As a result, omega - 3 fatty acids in the prefrontal cortex of the brain, a preventive effect against oxidative damage and therefore conducted a protective function on these tissues were detected.

Key words: Omega - 3 fatty acid, prefrontal cortex, rat

GİRİŞ

Dokozaheksanoik asit (DHA, 22:6n-3), eikozapentanoik asit (EPA, 20:5n-3) ve alfa linolenik asit (ALA 18:3n-3) omega - 3 yağ asitleri olarak adlandırılırlar ve balık yağında fazla miktarda bulunurlar.^{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 Omega - 3 yağ asitleri uzun karbon zincirli bileşiklerdir ve insanlar da dahil olmak üzere tüm memelilerde vücut için gereklidir. İn vivo ortamda sentezlenemediğinden dolayı mutlak suretle diyet ile alınmak zorundadır. Omega - 3 yağ asitleri vücuttaki fosfolipid membranlar için anahtar bir yapısal komponent teşkil ederler ve santral sinir sistemi ve insan beyinde yüksek konsantrasyonda bulunmaktadırlar.⁴ Omega - 3 yağ asitleri sinir sistemi aktivasyonunda, sinir membranlarının nöroplastisitesinde ve sinaptogenez'de rol oynamaktadır.^{5,6} DHA ve EPA uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA: polyunsaturated fatty acids) ailesindedirler. Diyetimizde kesin suretle PUFA bulunmalıdır.^{7,8} Bu yağ asitlerinin ana metaboliti dokozaheksanoik asit (DHA)'dır.⁹ Bu yağ asitlerinin önemli bir özelliği de kan beyin bariyerinden geçebilme yeteneğine sahip olmalarıdır.¹⁰ Omega - 3 uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA)'nin öğrenme kapasitesinin yanı sıra hafıza ve kognitif fonksiyonların da geliştirilmesinde ve iyileştirilmesinde etkin olduğu hayvan ve insan çalışmaları ve ek olarak epidemiyolojik araştırmalar sonucunda gösterilmiştir.¹¹

Motor cevabın planlanması, düşüncelerin olgunlaştırılması, hafıza, öğrenme ve bilgilerin analizi gibi işlevleri yerine getiren prefrontal korteks; gyrus frontalis superior, gyrus frontalis medius ve gyrus frontalis inferior'un önemli bir kısmı ile gyri orbitales ve gyrus cinguli'nin ön yarısını içine alır. Prefrontal korteks; premotor sahanın önünde yer alır ve Brodmann'ın 9, 10, 11, 12 numaralı sahalarını kapsar.^{12,13} Prefrontal alanın kişilik ve davranışların düzenlenmesi, dikkatin sürdürülmesi, yazılan sözcüklerin tanınması gibi bilinçsel fonksiyonları bulunmaktadır. Bunların yanı sıra geleceği tahmin etme, motor hareketlerin uygulanmadan sonucunun tahmin edilmesi, komplike matematik problemlerin çözülmesi gibi fonksiyonları da mevcuttur. Her yeni bilginin beyne iletilmesi ve çalışan belleğin yapılandırılmasında rol aldığı tahmin edilmektedir.¹⁴⁻¹⁶

Yapmış olduğumuz bu çalışmada da, sıçanlarda prefrontal korteks dokusu üzerine omega - 3 yağ asitlerinin olumlu ve savunucu etkilerinin biyokimyasal düzeyde araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız esnasında 16 adet Wistar - Albino cinsi erkek erişkin sıçan kullanıldı. Sıçanlar randomize 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 ile günlük olarak tatbik edildi. Altı haftalık deney süresinin ardından bütün hayvanlar dekapitasyon metodu ile öldürüldü. Sıçanların beyinleri hızlı bir şekilde çıkartılarak prefrontal korteks dokusu soğuk (+4 C°) 0.15'lik potasyum klorür (KCL) ile yıkandı. Daha sonra kurutma kağıdı ile kurutuldu. Dokular homojenizatör ile (Ultra Turrax Type T25-B, İKA Labortechnik, Germany) 0.15 M'lik KCL çözeltisi içerisinde 16000 rpm'de üç dakika homojenize edildi. Homojenasyon bir buz kalıbı içerisinde gerçekleştirildi. Homojenat 5000xg'de 1 saat (+4 C°) santrifüj işlemine tabi tutularak süpernatant oluşturuldu. Analiz zamanı gelinceye kadar (1 hafta) - 40 C°'de bekletildi. Süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH - Px) enzim aktiviteleri süpernatanda, malondialdehid (MDA) seviyesi ise homojenat'da spektrofotometrik olarak tayin edildi.

Süperoksit dismutaz tayini: Süperoksit dismutaz enzimi Sun ve arkadaşlarının modifiye ettiği metot ile belirlendi.¹⁹ Bu metodun prensibi nitroblue tetrazolium'un (NBT) süperoksit üreticisi olan ksantin - ksantokinaz sistemi tarafından indirgenmesi esasına dayanmaktadır. SOD aktivitesi ünite/g (U/g) doku protein'i olarak ifade edilir.

Glutatyon peroksidaz tayini: Glutatyon peroksidaz aktivitesi Paglia ve arkadaşlarının metodu kullanılarak belirlendi.²⁰ GSH - Px hidrojen peroksit varlığında redükte glutatyonun (GSH) okside glutatyon (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'nin NADP+ya yükseltgenmesi sırasındaki absorban azalmasının 340 nm'de okunması ile tayin edildi.

Malondialdehid tayini: Lipid peroksidasyon ölçüm metodu olan Esterbauer metodu kullanılarak gerçekleştirildi.²¹ Tiyobarbitirik asit ile 90 - 95 C°'de reaksiyona giren malondialdehid pembe renkli bir kromojen meydana getirmektedir. Onbeş dakika sonra numuneler hızla soğutuldu ve absorbanları 532 nm'de spektrofotometrik olarak okundu. Elde edilen değerler nmol/g protein cinsinden ortaya konuldu.

İstatistiksel Analiz: Biyokimyasal parametrelerin (MDA, SOD ve GSH – Px) analizinde " SPSS 16.0 for windows" istatistik programı kullanıldı. Grupları karşılaştırmak için "Mann - Whitney U Testi" uygulandı. İstatistiksel olarak $p < 0.05$ olan değerler anlamlı kabul edildi. Elde edilen veriler aritmetik ortalama \pm standart hata (SH) şeklinde tabloya (grafiklere) geçirildi.

BULGULAR

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

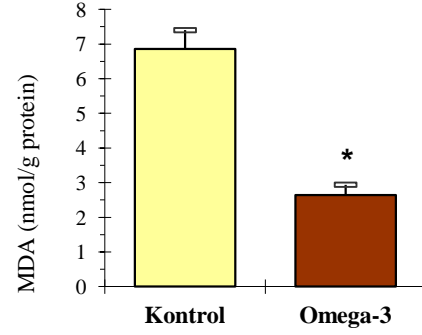
Tablo 1. Gruplara ait prefrontal korteks doku örneklerindeki SOD, GSH-Px ve MDA değerleri (n=8).

PARAMETRE	KONTROL	OMEGA-3	P
MDA (nmol/g protein)	6,86 \pm 0,54	2,64 \pm 0,30	0,001
SOD (U/g protein)	68,61 \pm 4,63	177,02 \pm 16,93	0,001
GSH-Px (U/g protein)	30,64 \pm 2,08	103,34 \pm 11,45	0,001

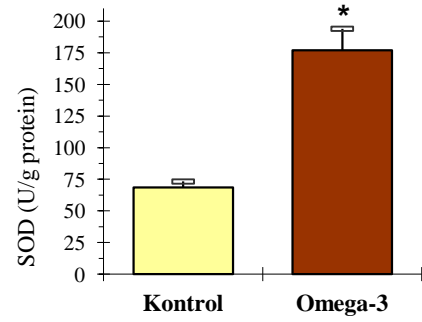
Değerler ortalama \pm SH şeklinde verilmiştir.

Oksidatif hasarı ortaya koymasından bakımından önemli bir parametre olan MDA değerinin kontrol grubu ile kıyaslandığında omega - 3 yağ asiti verilen grupta istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gösterdiği tespit edildi ($p < 0.001$) (Şekil 1). Omega - 3 yağ asiti verilen grubun prefrontal korteks dokusu SOD enzim değerlerinin kontrol grubu ile mukayese edildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış sergilediği ($p < 0.001$) (Şekil 2) belirlendi. Yine omega - 3 yağ asiti verilen grubun prefrontal korteks GSH - Px enzim değerinin de kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdiği belirlendi ($p < 0.001$) (Şekil 3).

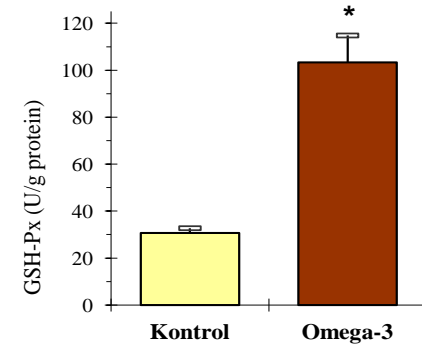
Şekil 1. MDA değerleri (nmol/g protein). * $p=0.001$.



Şekil 2. SOD değerleri (U/g protein). * $p=0.001$.



Şekil 3. GSH-Px değerleri (U/g protein). * $p=0.001$.



TARTIŞMA

Balık yağında bol miktarda mevcut olan omega - 3 yağ asitlerinin (DHA, EPA ve ALA), antiinflamatuvar ve antihipertansif özellikler taşıdığı ve bundan ötürü organizma için koruyucu bir karakter sergilediği ortaya konulmuştur.^{17,18,19}

Organizmada bulunan biyomembranlar ve hücre içi organaller; membran fosfolipitlerindeki PUFA (çoklu doymamış yağ asitleri) varlığı nedeni ile oksidatif ataklara karşı hassastır. PUFA, hücre fonksiyonların devamı için ve özellikle hücre membranı, mitokondri ve endoplazmik retikulum gibi hayati önem taşıyan organeller için gereklidir. DHA ve EPA, PUFA üyelerinden olan yağ asitleridir ve omega - 3 yağ asitleri olarak bilinirler. Omega - 3 yağ asitlerinin oksidatif sürece dahil olan dokudaki azalmaya başlamış çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) yerine geçerek koruyucu etki gösterdiği ifade edilmiştir.²⁰⁻²²

Organizmada normal fizyolojik şartlarda veya herhangi başka bir patolojik olay neticesinde serbest radikaller oluşur. Oluşan bu serbest radikaller ile bunların koruyucusu olan antioksidan savunma sistemi arasında bir denge söz konusudur. Bu dengenin serbest radikaller lehine bozulması oksidatif stresi gösterir. Oksidatif hasara karşı organizmalar enzimatik ve non enzimatik antioksidan sistem ve moleküllerle korunur. Bu enzimatik antioksidan sistemler içerisinde GSH - Px ve SOD yer almaktadır.²³ MDA ise lipid peroksidasyonu sonucunda meydana gelir ve dokuda oluşan oksidatif hasara dikkat çekmede kullanılan moleküler parametrelerdendir.^{21, 24} Yapmış olduğumuz çalışmada bizler de omega - 3 yağ asiti tatbik edilen sıçanlara ait prefrontal korteks doku örneklerinde GSH - Px ve SOD enzim aktivitelerinin artış gösterdiğini, MDA düzeyinin ise azalma seyri izlediğini ortaya koyduk.

Lipid peroksidasyon sürecinin başlamasında önemli bir rolü olan reaktif oksijen türlerinin ortadan kaldırılmasında da antioksidan savunma sistemi önem teşkil eder.²⁵ IL - 1 beta ve TNF - alfa gibi proinflamatuvar sitokinlerin oluşumu, omega - 3 yağ asitleri tarafından azaltılır.²⁶ Lonergan ve ark.²⁷'nin sıçanlar üzerinde yürütmüş oldukları bir çalışmada, gama radyasyon maruziyeti sonucunda hipokampusta oluşan nöronal hasar üzerine EPA'nın koruyucu bir etki sergilediğini göstermişlerdir.²⁷ Yine Martin ve ark.²⁸'ları, radyasyon ve yaşa bağlı beyinde oluşan apoptotik zedelenmeler üzerine, EPA'nın elle tutulur düzeyde tamir edici etkisinin olduğunu ortaya koymuşlardır.²⁸ Sarsılmaz ve ark.¹⁷'ları sıçan corpus striatum'unda omega - 3 yağ asitlerinin oksidan ve antioksidan parametreler üzerindeki etkilerini inceledikleri çalışmalarında, omega - 3 yağ asitlerinin oksidatif hasara karşı koruyucu etkiler taşıdığını ortaya koymuşlardır.¹⁷

Doymuş yağ asitlerinin tüketimi kronik rahatsızlıkların oluşmasına neden olmasına karşın, omega - 3 yağ asitlerinin (özellikle balık omega - 3 yağ asitlerinin) alımı oldukça fazla hastalığa karşı koruyucu ve tedavi edici etki gösterdiği göz önündedir.^{1,29}

Sonuç itibarı ile bizimde sıçanlar üzerinde biyokimyasal düzeyde yapmış olduğumuz bu çalışmada, omega - 3 yağ asitlerinin sıçan prefrontal korteks dokusu üzerinde antioksidan savunma sistemini kuvvetlendirdiği ve kontrol grubuna karşın omega - 3 yağ asiti verilen sıçanların SOD ve GSH - Px enzim değerlerinin arttığı, MDA seviyelerinin ise azaldığı tesbit edildi.

KAYNAKLAR

1. Storlien LH, Higgins JA, Thomas TCl. Diet composition and insülin action in animal models. *Br J Nutr* 2000; 83: 85-90.
2. 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.
3. Masters C. Omega - 3 fatty acids and the peroxisome. *Mol Cell Biochem* 1996; 165 (2): 83-93
4. Salem N Jr, Litman B, Kim HY, Gawrish K. Mechanisms of docosahexaenoic acid in the nervous system. *Lipids* 2001; 36: 945-959.
5. Piomelli D. Eicosanoids in synaptic transmission. *Crit Rev Neurobiol* 1994; 8: 65-83.
6. Haag M. Essential fatty acids and the brain. *Can J Psychiatry* 2003; 48: 195-203
7. 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.
8. 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.
9. Wall R, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C. Fatty acids from fish: the antiinflammatory potential of long - chain omega - 3 fatty acids. *Nutr Rev* 2010; 68: 280-289.
10. Guest J, Garg M, Bilgin A, Grant R. Relationship between central and peripheral fatty acids in humans. *Lipids Health Dis* 2013; 12: 79.
11. Konagai C, Yanagimoto K, Hayamizu K, Han L, Tsuji T, Koga Y. Effects of krill oil containing n-3 polyunsaturated fatty acids in phospholipid form on human brain function: a randomized controlled trial in healthy elderly volunteers. *Clin Interv Aging* 2013; 8: 1247-1257.
12. Arıncı K, Elhan A. Anatomi, 2. Cilt, s.388, Güneş Kitapevi, Ankara (1995).
13. Duncan J. An adaptive coding model of neural function in prefrontal cortex. *Nat Rev Neurosci* 2001; 2: 820-829.
14. Nyberg L, Marklund P, Persson J, Cabeza R, Forkstam C, Peterss KM, Ingvar M. Common prefrontal activations during working memory, episodic memory and semantic memory. *Neuropsychology* 2003; 41: 371-377.
15. Ganong WF. Tıbbi Fizyoloji, s. 249-268, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul (2002).
16. Ranganath C, Jonson MK, D'Espisoto M. Prefrontal activity associated with working memory and episodic long - term memory. *Neuropsychologia* 2003; 41: 378-389.
17. Sarsılmaz M, Songur A, Ozyurt H, et al. Potential role of dietary omega - 3 essential fatty acids on some oxidant/antioxidant parameters in rats corpus striatum. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2003; 69 (4): 253-259.
18. Stone NJ. Fish consumption, fish oil, lipids and coronary heart disease. *Am J Clin Nutr* 1997; 65: 1083-1086.
19. 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.
20. Tekzaki T, Inoue M, Kataoka H, et al. Diet and Lung cancer risk from a 14 - year population-based prospective study in Japan with special reference of fish consumption. *Nutr Cancer* 2003; 45: 160-167
21. 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.
22. Halliwell B. Free radicals, antioxidants and human disease; curiosity, course or consequence? *Lancet* 1994; 344: 721-724.
23. Akyol Ö. Beyin tümörlerinde doku SOD, CAT ve GSH-Px aktiviteleri. Uzmanlık Tezi Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara 1994.
24. Pompella A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* 1997; 67: 289-297.
25. 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.
26. 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.
27. Lonergan PE, Martin DS, Horrobin DF, Lynch MA. Neuroprotective effect of eicosapentaenoic acid in hippocampus of rats exposed to gamma - irradiation. *J Biol Chem* 2002; 277: 20804-20811.
28. Martin DS, Lonergan PE, Boland B, Fogarty MP, Brady M. Apoptotic changes in the aged brain are triggered by interleukin - 1 beta - induced activation of p38 and reversed by treatment with eicosapentaenoic acid. *J Biol Chem* 2002; 277: 34239-34246.
29. Nordoy A. Is there a rational use for n - 3 fatty acids (fish oils) in clinical medicine? *Drugs* 1991; 42: 331-342.