

# A TÖBBSZÖRÖSEN TELÍTETLEN ZSÍRSAVAK HATÁSA AZ AGY FEJLŐDÉSÉRE ÉS ÖREGEDÉSÉRE

Hőgyes Endre

*Szegedi Tudományegyetem Orvosi Vegytani Intézete,  
Szegedi Biológiai Kutatóközpont Biokémiai Intézete*

2004

## Bevezetés

Egyre növekvő érdeklődés kíséri a hosszú szénláncú többszörösen telítetlen zsírsavakat (LC-PUFA) és hatásait az agyban az utóbbi néhány évtizedben. Elsősorban a dokosahexaénsav (DHA) és az arachidonsav (ARA) tűnik fontosnak a neuronok számára. Kiderült, hogy az agy normális fejlődéséhez és működéséhez, megfelelő mennyiség szükséges ezen zsírsavakból. A DHA és az ARA hiánya, vagy nem elégséges mennyisége súlyos zavarokhoz vezet a tanulásban, a memóriában valamint a látási és a hallási funkciókban. Az agy növekedéséhez és funkcionális fejlődéséhez biztosítani kell az elegendő mennyiségű DHA-t és ARA-t a magzat és az újszülött számára, különben az idegrendszer fejlődése károsodást szenved. Patkányokban kimutatták hogy, a DHA nagy mennyiségű beépülése a fejlődő agyba akkor történik, mikor az agy a legnagyobb mennyiségi gyarapodáson esik át, a szinaptogenezis ideje alatt. Az ARA mennyisége szintén növekszik az agy érésével. Számos patológiás esetről kiderült, hogy összefüggésben van az agy fejlődése alatt kapott nem megfelelő DHA mennyiséggel (unipoláris depresszió, magzati alkohol szindróma). Az is kiderült a patkány kísérletekből, hogy az agy csökkenő DHA tartalma együtt jár a patkányok leromló tanulási teljesítményével a tanulási tesztekben. Öregedés során az agy fokozatosan veszít LC-PUFA tartalmából és talán ez lehet az egyik oka a bekövetkező tanulási nehézségeknek. Hasonló hanyatlást vettek észre a kognitív funkciókban a spontán magas vérnyomású patkányoknál (SHR), mely szintén kapcsolatba hozható az agyi zsírsavösszetétel megváltozásával. Láthatjuk, hogy az LC-PUFA-k hiánya vagy csökkenő mennyisége milyen káros hatással van az agyi funkciókra és ez a jelenség meglehetősen jól tanulmányozott. Az ellenkező eset, az LC-PUFA-k többlet mennyisége az agyban, melyet a táplálék LC-PUFA dúsításával el lehet érni, viszont kevésbé tanulmányozott. Ennek a tanulmánynak a célja, hogy bizonyítékokat találjon az LC-PUFA-ban gazdag táp pozitív agyi hatásaira újszülött, öreg és magasvérnyomású patkányokban.

## Célkitűzések

1. Feltételeztük, hogy a talán a táplálék megnövelt DHA tartalma neuroprotectív lehet az újszülött patkányok számára. Hogy teszteljük hipotézisünket, az anya állatokat három fajta táplálékkal kezeltük, egy LC-PUFA hiányossal (Placebo), egy olyanal mely n-6 zsírsavakban gazdag de n-3 zsírsavakban szegény volt (Kontrol), és egy olyanal, mely mindkét fajtában gazdag volt (Supplement). Az utódok NMDA injekciót kaptak az egyik oldali nucleus basalis magnocellularisba (NBM) 14 napos korukban. Az NBM kolinerg rostjai a kéregbe vezetnek, ahol fontos szerepet játszanak az ottani neuronok normális működésében. Két nappal az injekció után a sejtpusztulás mértéke a NBM-ben és a rost degeneráció a kéregben meg lett határozva. A foszfolipidek (PE, PC, PS, PI) zsírsavtartalma szintén meg lett mérve.

2. Tanulmányoztuk továbbá a megnövelt anyai LC-PUFA bevitel késői hatását az utódok tanulási képességére. Az anya állatok három csoportba lettek osztva és az előbbi kísérletben is használt három fajta tápot kapták a terhesség és a szoptatás alatt. Ezután minden csoport a kontrol diétát kapta. Az utódok térbeli tanulási képességét vizsgáltuk 12 és 26 hónapos korban. Az agy zsírsavösszetételét folyamatosan néztük az öregedés alatt.

3. Próbáltuk bizonyítani, hogy a megnövekedett DHA tartalom az agyi membránokban jótékony hatással van az öreg patkányok tanulási képességére. 24 hónapos állatok egy hónapon keresztül vagy halolajban dúsított vagy normál tápot kaptak. Az egy hónapos etetés után térbeli tanulási tesztben vettek részt az állatok, majd az agy zsírsavösszetétele meg lett határozva.

4. Végezetül vizsgáltuk a magasvérnyomás és a hosszútávú LC-PUFA kezelés hatását az agy zsírsavösszetételére és a patkányok tanulási képességére. Az állatok vagy LC-PUFA-ban dúsított tápot vagy normál tápot kaptak egész életen át. A szisztolés vérnyomás, az agy zsírsavtartalma és az állatok térbeli tanulását vizsgáltuk. Az individuális adatokat korreláltattuk, hogy kezelés és a magas vérnyomás hatása a tanulásra pontosan nyilvánvalóvá váljon.

## Anyagok és módszerek

*NMDA okozta lézió az NBM-ban.*

20 nmol racemát NMDA-t (Sigma, ST. Louis, MO, USA) 0,4 µl PBS-ben (pH 7,4) oldottunk, majd 0,1 µl-es adagokban a jobb oldali nucleus basalis magnocellularisba injektáltuk. Sztereotaxiás keret segítségével rögzítettük az állatok fejét. A sértetlen bal oldal szolgált kontrollként minden egyes esetben

*Kolinerg sejt szám.*

Kolin acetiltranszferázt (Chat) és p75 receptor proteint festettünk immunocitokémiai módszerrel, hogy a NBM sejtjeit és rostjait jelöljük. A összes megfestődött sejttest meg lett számolva a NBM-ben az injektált és az ép oldalon egyaránt. Az ép oldali sejt számot 100 %-nak véve, a sejtpusztulás az injektált oldalon megmaradt sejt szám, százalékosan kifejezve az ép oldalihoz képest.

*Dendrit denzitás.*

Komputerizált képanalízis segítségével (Quantimet 600HR, Leica, Germany) lett meghatározva a dendrit arborizáció mértéke a penumbra régióban. Szintén mindkét kolinerg marker, Chat és p75, eredményeit felhasználtuk.

*Axon degeneráció.*

Az axondegeneráció mértéke a neocortexből lett mérve, ahova a NBM a rostokat projektálja. A kolinerg rost denzitás meghatározása a felszíni (I-IV) rétegekben és a mélyebb rétegekben (V és VI) egyaránt megtörtént.

*Zsírsavanalízis.*

A lipidosztályok elválasztása vékonyrétegen történt (20x20, Silica G 60), metil-acetát/i-propanol/kloroform/metanol/0,25% KCl (25:25:25:10:9 vol/vol%) mozgó fázis segítségével. A lipidek metilálódása 5% HCl-t tartalmazó abszolút metanolban történt 80 °C-on 2,5 órán át. A zsírsav metilészterek meghatározása gáz kromatográffal történt (Hewlett-Packard Model 6890) FFAP oszlop segítségével (30mX0,32mmX0,25µm film vastagság; Supelco, Bellefonte, PA, USA.) A csúcsok azonosítása Supelco standard segítségével történt (Catalogue No. 4-7085-U, 4-7015).

„Holeboard” térbeli tanulási teszt.

A teszt doboz padlóján 16 kivehető üreg található négy sorban, melyek közül mindig ugyanabba a négybe csokoládé darab lett elhelyezve. Az állatoknak meg kellett tanulni a teli üregek elhelyezkedését a hét napos kísérlet alatt (2 próba volt egy nap). A próbának akkor volt vége, ha az állat megtalálta mind a négy teli üreget, vagy letelt a kísérleti idő, ami három perc volt. Az egyes próbák referencia memória ponttal lettek értékelve, melyet a következő képlettel számoltunk ki: referencia memória pont = a teli üregek megtalálásának és újbóli megtalálásának a száma / a teli üregek megtalálásának és újbóli megtalálásának a száma + az üres üregek megtalálásának és újbóli megtalálásának a száma.

„Morris water maze” térbeli tanulási teszt.

Az állatok öt egymást követő napon, napi négyszer teljesítették a tesztet. Az elrejtett platform megtalálásához szükséges idő jelezte a tanulás mértékét. Az elrejtett platform helye a kísérlet során nem változott. A próba akkor ért véget, ha a 90 másodperc letelt vagy az állatok megtalálták a platformot. A napi átlagos megtalálási idő és az első próba ideje lett megmérve.

Vérnyomás mérés.

Az állatok szisztolés vérnyomása a farok vénán történt, 53, 54, 55 és 79 hetes korban.

## Eredmények

*A neuroprotektív kísérlet eredményei.*

A táp magas n-3 zsírsavtartalmának köszönhetően a DHA szintje megnőtt a Supplement csoportban a PE-ben a Kontrollhoz és a Placebohoz viszonyítva, míg az ARA és a 22:5n6 szintje csökkent. A 22:4n6 koncentrációja nem különbözik a három csoportban. Az egyszerűen telítetlen és telített zsírsavak csökkentek a Supplementben a Placebohoz képest (1. Táblázat). A Placebóban nagyon lecsökkent a DHA szintje, melyet n-6 zsírsavakkal, egyszerűen telítetlenekkel és telítettekkel helyettesített. A Kontroll eredményei a másik két csoport között vannak.

1. Táblázat. PE zsírsavtartalma újszülött patkánygyanban

Zsírsavak	Supplement	Placebo	Kontroll	Anova P
16:0	7,99±0,44*	9,75±0,32	8,57±0,80	0,019
18:0	19,60±0,44	19,97±0,27	19,69±0,71	0,660
18:1n7	0,79±0,02**	1,13±0,02 <sup>##</sup>	0,88±0,03	0,000
18:1n9	4,87±0,25*	5,59±0,17	4,73±0,28	0,043
20:4n6	17,57±0,24**	18,82±0,28	17,83±0,59	0,016
22:4n6	4,70±0,13	4,78±0,11	5,13±0,27	0,233
22:5n6	1,08±0,03** <sup>§§</sup>	2,89±0,07 <sup>##</sup>	2,26±0,08	0,000
22:6n3	25,19±0,71** <sup>§§</sup>	19,36±0,39	20,45±1,34	0,000

átlag±S.E.M. ; \* $P<0,05$ ; \*\* $P<0,01$  Placeboval szemben; <sup>§</sup> $P<0,05$ ; <sup>§§</sup> $P<0,01$  Kontrollal szemben; <sup>##</sup> $P<0,01$  versus Kontrollal szemben.

Az eredmények a többi foszfolipid osztályban (PC, PS, PI) is hasonlóak voltak. A Chat immunohisztokémiai festés kimutatta, hogy a Supplement csoportban a neuronok mindössze 18,9±6,5% pusztult el, míg ugyanez a Placebo esetén 52,8±8,1%, a Kontroll csoportban 50,9±5,3% volt. A dendrit denzitás is jobban megtartott volt a Supplement csoportban. A p75 immunohisztokémiai festés megerősítette a ChaT festés eredményét. Az axon rost denzitás mind a felszíni, mind a mélyebb rétegekben nagyobb volt a Supplement csoportban, mint a Kontroll és Placebo csoportokban.

*A terhesség és a szoptatás alatti LC-PUFA kezelés késői hatásai.*

Az eltérő LC-PUFA összetételű táp hatásai az agy zsírsav tartalmára az öregedés alatt fokozatosan eltűnnek. Szignifikáns különbségeket felnőtt korban, az egy éves állatoknál már nem tapasztalunk (2. Táblázat). Az öregedés során valamennyi zsírsav szintje változik az agyban. Az LC-PUFA-k koncentrációja fokozatosan csökken öregedés során. A legdrámaibb módon a DHA szintje csökken, a kétéves állatokban átlagosan 38%-al csökkent az újszülöttekhez képest. Az ARA szintje gyorsan csökken a születéstől a pubertásig (34-39%-al), majd lassabban kétéves korig (14-19%-al). Az elveszett LC-PUFA mennyiség egyszerűen telítetlen zsírsavakkal pótlódik. Főleg az olajsav mennyisége nő meg mely 270-300%-al nő meg az újszülött kortól a felnőtt (1 éves) korig. Kétéves állatoknál jelentősebb telített zsírsav növekedést mértünk ki.

2. Táblázat. 1 éves patkányagy zsírsavösszetétele

Zsírsavak	Supplement	Placebo	Kontrol	Anova P
16:0	3,96±0,24	4,95±0,42	4,39±0,17	0,107
18:0	13,04±0,26	14,10±0,53	13,52±0,75	0,336
18:1n7	2,35±0,05	2,23±0,13	2,32±0,09	0,662
18:1n9	13,96±0,27	15,20±0,81	14,18±0,36	0,266
20:1n9	3,49±0,18	3,34±0,28	3,07±0,17	0,482
20:4n6	10,88±0,15	10,64±0,47	11,00±0,18	0,746
22:4n6	5,70±0,18	5,07±0,27	5,35±0,08	0,118
22:5n6	0,41±0,01	0,43±0,02	0,48±0,03	0,156
22:6n3	17,74±0,35	15,12±1,11	16,73±0,35	0,065

átlag±S.E.M.

A „holeboard” térbeli tanulási teszt jelentős különbséget nem mutatott ki. A Placebo csoport tendenciózusan rosszabbul teljesített mint a másik kettő, szignifikáns különbség azonban csak két nap tudtunk kimérni. A Kontrol és a Supplement között különbséget nem tapasztaltunk.

*Egyhónapos halolaj kezelés hatásai.*

Egy hónapos halolaj kezelés hatására a kezelt csoportban a PE-ben szignifikánsan megnőtt a DHA mennyisége az öreg patkányoknál (3. Táblázat).

3. Táblázat. Zsírsavösszetétel öreg patkányagyban

Zsírsavak	Kontrol	Halolaj
16:0	5,75±1,56	5,52±0,13
16:1n7	0,73±0,29	0,63±0,15
18:0	13,81±0,74	13,83±0,81
18:1n9	13,22±0,76	13,72±0,56
18:1n7	5,44±0,53	5,59±1,28
18:2n-6	0,83±0,22	0,61±0,20
20:1n-9	3,39±0,33	3,69±0,62
20:4n-6	10,92±1,05	9,32±0,57
22:4n-6	5,60±0,38	5,05±0,35
22:6n-3	15,97±0,56*	17,21±0,54

átlag±S.E.M. \*P<0,05

Viszont ez a növekmény nem társult jobb tanulási eredménnyel. A „Morris water maze” térbeli tanulási teszt nem mutatott javulást a kezelt állatokban, sőt mintha alul teljesítettek volna, habár szignifikáns különbség nem volt.

*A vérnyomás és a hosszútávú LC-PUFA kezelés hatásai.*

A magas vérnyomás növelte az agyban az n-6/n-3 zsírsavak arányát, míg a hosszútávú etetés csökkentette. Az individuális adatok korreláltatása után kiderült, hogy az n-6/n-3 zsírsavak aránya pozitívan korrelált a szisztolés vérnyomással (r=0,711) a magas vérnyomású állatokban. Továbbá, az n-6/n-3 zsírsavak aránya negatívan korrelált a „holeboard” térbeli tanulási teszt memória referencia pontjával (r=0,023).

## Összefoglalás

Etetéses kísérleteink során két életkorra fókuszáltunk, az egyik a magzati kor, mikor az agy kialakulása során annak nagyobb mennyiségű LC-PUFA-ra van szüksége, a másik az öreg kor, mikorra is jelentős LC-PUFA veszteség áll be az agyban. Próbáltuk bizonyítani, hogy LC-PUFA-k, elsősorban a DHA adása a táplálékban, jótékony hatással van az agyi funkciókra mindkét életkorban.

1. Különböző típusú tápok használva, kimutattuk hogy az LC-PUFA-k közül a DHA-nak jelentős neuroprotektív hatása van az NMDA toxicitással szemben. Több neuront találtunk mely túlélte a NBM-ben a Supplement csoportban, mint a Kontrol valamint Placebo csoportban. A neuronok jobban megtartottak voltak a Supplement csoportban, ezt a csekélyebb dendrit és axon degenerációval bizonyítottuk. A DHA mennyisége valamennyi foszfolipid osztályban megnövekedett volt a Supplement csoportnál, szemben a Kontrol és Placebo csoportokkal. Ebből vontuk le azt a következtetést, hogy a DHA megnöveli a neuronok ellenállását.

2. Továbbiakban bizonyítottuk, hogy a nem megfelelő anyai DHA bevitelnek hosszútávú következményei lehetnek az utódok tanulási képességeire. Felnőtt korban a Placebo csoport valamivel gyengébben teljesített, mint a Kontrol és a Supplement csoport a térbeli tanulási tesztben, habár akkorra az agyi zsírsavösszetételben nem volt eltérés. Így, azt feltételezzük, hogy még a magzati kor során, az agy fejlődése alatt, a DHA hiánynak van később is jelentkező negatív hatása.

3. Idős állatokban az egy hónapos halolaj kezelés nem növelte azok tanulási képességét. A DHA szint szignifikánsan nagyobb volt ugyan a kezelt csoportban mint a kontrolban, de úgy tűnik ez nem volt elegendő ebben a korban.

4. A hosszútávú LC-PUFA kezelés enyhítette a magas vérnyomás okozta n-6/n-3 zsírsav arány növekedését az agyban a magas vérnyomásos patkányokban. Ez a tanulási tesztben is megnyilvánult, a csökkent n-6/n-3 zsírsav arányú állatok jobban teljesítettek a térbeli tanulási tesztben.

## Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani a következő embereknek, akik közreműködtek abban, hogy ez a munka megszülessen:

Dr. Farkas Tibor akadémikusnak, aki a témavezetőm volt. Ő volt az aki a lipidek világát megkedveltette velem. Mind tudósként és emberként is nagy hatással volt rám. Örökségét átvenni nem lehet. Folytatni a munkát a zsírsavakkal és a lipidekkel igen, és csinálni hasznos dolgokat ami Tibornak is és nekem is tetszene. Szerintem evvel ő nagyon elégedett lenne.

Dr. Nyakas Csaba professzornak, aki a legtöbb cikkem társszerzője volt. Ő tanította meg az immunitokémiai festési eljárásokat nekem Groningenben, ahová az ő segítségével jutottam el. Az egyik legjobb együttműködő partner, akivel remélem még sokáig együtt fogok dolgozni.

Dr. Penke Botond professzornak, akinek az alprogramjába tartoztam. Ő indított el avval, hogy megmentett az Élelmiszeripari Főiskolából. A későbbiekben is végig támogatott a Ph.D. alatt, és utána is.

Dr. Vigh László professzornak, aki az SZBK Biokémiai Intézetének vezetője. Köszönöm neki, hogy megengedte, hogy az intézetében dolgozhassak és segített nekem Tibor halála után.

Dr. Farkas Eszternek, aki téziseimet nyelviileg lektorálta. Van egy közös cikkünk is. Sokat tanultam tőle, amiért nagyon hálás vagyok neki.

Dr. Penke Zsuzsának a tanulási tesztekben nyújtott segítségéért.

És végül kedvenc kolléganőimnek: Baunoch Juditnak, Gwendolyn Barcelonak és Zukic Erikának a sok mindennapos segítségért. Ők teremtették meg azt a vidám légkört, amiben klassz volt dolgozni.

Köszönöm mindenkinek!!

## Publikációs lista

**Dietary fatty acids alter blood pressure, behavior and brain membrane composition of hypertensive rats.**

de Wilde MC, Hogyes E, Kiliaan AJ, Farkas T, Luiten PG, Farkas E. Brain Res. 2003 Oct 24;988(1-2):9-19.

**Modification by docosahexaenoic acid of age-induced alterations in gene expression and molecular composition of rat brain phospholipids.**

Barcelo-Coblijn G, Hogyes E, Kitajka K, Puskas LG, Zvara A, Hackler L Jr, Nyakas C, Penke Z, Farkas T. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Sep 30;100(20):11321-6. Epub 2003 Sep 17.

**Neuroprotective effect of developmental docosahexaenoic acid supplement against excitotoxic brain damage in infant rats.**

Hogyes E, Nyakas C, Kiliaan A, Farkas T, Penke B, Luiten PG. Neuroscience. 2003;119(4):999-1012.

**Gene expression and molecular composition of phospholipids in rat brain in relation to dietary n-6 to n-3 fatty acid ratio.**

Barcelo-Coblijn G, Kitajka K, Puskas LG, Hogyes E, Zvara A, Hackler L Jr, Farkas T. Biochim Biophys Acta. 2003 Jun 10;1632(1-3):72-9.