

T.C.
DICLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Biyokimya Anabilim Dalı

BALIK YAĞININ RATLARDA HEPATİK LİPİD PEROKSİDASYONUNA ETKİSİ ve BUNDA VİTAMİN E'NİN ANTIOKSİDAN ROLÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

Nihat GÜRKAN

TEZ YÖNETİCİSİ
Doç. Dr. Naime CANORUÇ

DICLE ÜNİVERSİTESİ MERKEZ KÜTÜPHANESİ	
Demirbaş No.	0038600
Tasnif No.	612.399
	GÜR
	1997

0038600

T. C.	
Dİ	EST
Tas.	1997/8-3

DIYARBAKIR - 1997

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ

GİRİŞ ve AMAÇ

1

GENEL BİLGİLER

3

MATERYAL ve METOD

17

BULGULAR

19

TARTIŞMA

20

ÖZET

22

KAYNAKLAR

23

ÖNSÖZ

Çalışmalarım sırasında her aşamada yardım ve destekğini gördüğüm hocalarımdan tez danışmanım Sayın Doç.Dr.Naime CANORUÇ'a, Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof.Dr.Belkıs AYDINOL'a, Sayın Doç.Dr.Nuriye METE'ye ve Anabilim Dalındaki tüm öğretim elemanlarına, ayrıca DÜSAM'da yardımlarını gördüğüm Dr.Aydın KETANİ ve Dr. Mustafa DENİZ'e teşekkür ederim.

Saygılarımla

Nihat GÜRKAN

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Yükselmiş kan lipid düzeyleri ile aterosklerotik kalp-damar hastalıkları arasındaki ilişki, geçmiş yıllarda olduğu gibi günümüzde de hala önemini korumaktadır. Bu ilişkide eskiden yükselmiş total kolesterol ve trigliserid düzeyleri ön planda tutulurken, bugün kolesterolün iyi ve kötü olarak sınıflara ayrıldığını görmekteyiz. Bunun yanısıra aterojenik olan ve aterojenik olmayan diğer lipidler ile apoproteinlerin de öneminden söz edilmektedir (1,2,3,4). Ateroskleroz gelişimi ile ilgili olarak lipidler faydalı ve zararlı olarak sınıflandırıldıkları gibi besinlerle alınan yağın türü ve miktarının nasıl olması gerektiği de günümüzde tartışılmaktadır.

Özellikle yağlardaki doymuş, doymamış ve çok doymamış yağ asitlerinin miktarları ve birbirlerine olan oranlarının serum lipid-lipoprotein fraksiyonları ile olan ilişkileri ön plana geçmiştir. Doymuş yağ asitleri ile trans yağ asitlerinin koroner kalp hastalığı (KKH) mortalitesini yükselttiği, buna karşılık tek doymamış yağ asitleri (MUFA) ile n-6 yada n-3 serisi çok doymamış yağ asitlerinin (PUFA) KKH mortalitesini düşürdüğü vurgulanmıştır (5,6).

Genel olarak n-3 PUFA olarak adlandırılan balık yağlarının önemli hipolipidemik etkileri olduğu belirtilmektedir (7,8). Özellikle yağlı balıkların diyetle mutlaka alınması gerektiği önerilmektedir.

Balık yağlarının bu faydalı hipolipidemik etkilerinin yanısıra, fazla miktarda PUFA içermeleri nedeni ile lipid peroksidasyonuna uğrama eğilimlerinin artabileceği düşüncesiyle konuya bu açıdan da bakılması gerektiği ortaya çıkmıştır.

Gerçekten üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu malondialdehit (MDA) üretimi ile sonuçlanmaktadır (9). MDA, membran komponentlerinin polimerizasyonuna ve çapraz bağlanmalarına neden olarak membran fonksiyonlarını bozmakta, DNA'nın azotlu bazları ile reaksiyona girerek mutajenik ve karsinojenik etkiler oluşturmaktadır. Yağ asidi peroksidasyonu sonucu

oluşan hidroperoksitlerinin bir başka toksik etkisinde araşidonik asit metabolizmasını bozmalarıdır. Böylece tromboksan sentezine doğru bir kayma olmaktadır.

Önemli hücrel ve metabolik fonksiyon bozukluklarına neden olan lipid peroksidasyonu hücrel savunma mekanizmaları ile dengede tutulmaktadır. Son yıllarda çeşitli antioksidanların kullanımından da yarar umulmuştur.

Bu araştırmada yemlerinin %10'unu balık yağının oluşturduğu bir diyetle beslenen ratlarda hepatik lipid peroksidasyonunun nasıl değiştiğini ve bir antioksidan olan E vitaminini balık yağı ile birlikte farklı dozlarda uygulayarak koruyucu etkisinin olup olmadığını araştırmayı amaçladık.

2.GENEL BİLGİLER

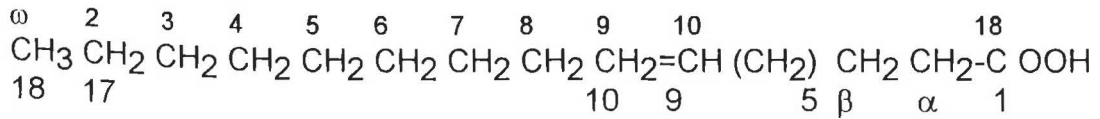
2.1.YAĞ ASİTLERİ

Yağ asitleri, başlıca doğal katı ve sıvı yağlarda esterleri halinde bulunurlar. Plazmada ise bir transport şekli halinde esterleşmemiş olarak yani serbest yağ asidi olarak bulunurlar. Doğal yağlarda bulunan yağ asitleri genelde düz zincir türevleridir. İki karbonlu birimlerden sentez edildikleri için çift sayıda karbon atomu içerirler. Bu hidrokarbon zinciri çift bağ taşıyorsa doymuş, çift bağ taşıyorsa doymamış yağ asidi olarak adlandırılır.

Yağ asitleri alifatik hidrokarbonların karboksilli türevleridir. Karbon sayıları 4 ile 24 arasında olabilir. İnsan vücudu için fizyolojik ve besinsel önem taşıyan doymuş ve doymamış yağ asitleri Tablo 1 ve Tablo 2'de gösterilmiştir.

Karbon atomları, karboksil karbonundan itibaren numaralandırılır. Bu karbon 1 nolu karbon atomudur. Karboksil karbonuna bitişik olan karbon atomu yani 2 nolu karbon atomu α -karbon diye bilinir. 3 nolu karbon atomu β -karbonudur. Son metil karbonu ise ω -karbonu veya n-karbon atomu olarak bilinir (Şekil 1).

Doymamış yağ asitlerinde çift bağların sayı ve konumlarını göstermek için çeşitli düzenlemeler kullanılmaktadır. Örneğin Δ^9 , söz konusu yağ asidinin 9 ve 10'uncu karbon atomları arasında bir çift bağı gösterir. ω_9 gösterimi ise, ω karbon atomundan itibaren sayıldığında çift bağı 9.karbonda olduğu gösterir. Doymamış bir yağ asidi olan oleik asit'te karbon atomlarının numaralandırılması ve çift bağların konumu Şekil 1'de gösterilmiştir.



ω -9, C 18: 1 veya n-9, 18: 1

Şekil 1: Oleik asit (10)

Tablo 1: Doymuş Yağ Asitleri (10)

Genel Adı	Karbon Atomlarının Sayısı	
Formik*	1	Bir karbonlu "C" birimlerin metabolizmasında yer alır
Asetik	2	Ön-midede bulunan mikroorganizmalar tarafından oluşturulan karbonhidrat fermentasyonunun ana son ürünü +
Propyonik	3	Ön-midede bulunan mikroorganizmalar tarafından oluşturulan karbonhidrat fermentasyonunun bir son ürünü +
Bütirik	4	Bazı katı yağlar (özellikle terayağı) içinde az miktarda bulunurlar. Ön-midede bulunan mikroorganizmalar tarafından oluşturulan karbonhidrat fermentasyonunun bir son ürünüdür +
Valerik	5	
Kaproik	6	
Kaprilik	8	Birçok katı yağlarda (terayağı dahil) özellikle bitki kökenli katı-yağlar içinde küçük miktarlarda bulunur.
Kaprik (Dekanoik)	10	
Laurik	12	Spermecet, tarçın, hurma çekirdeği, hindistan cevizi sıvı yağları, defne
Miristik	14	Küçük hindistan cevizi, hurma çekirdeği, hindistan cevizinin sıvı yağları, mersin ağacı
Palmitik	16	Bütün hayvansal ve bitkisel katı-yağlarda ortak olarak bulunur.
Stearik	18	
Araşidik	20	Yer fıstığı (arachis) sıvı yağı.
Behenik	22	Tohumlar
Lignoserik	24	Serebrozidler, yer fıstığı sıvı yağı

* Tam anlamı ile bir alkil türevi değildir.

+ Ayrıca, insan kalın bağırsağında.

Tablo 2: Doymamış Yağ Asitleri (10)

Karbon Atomlarının Sayısı ve Çift Bağların Konumu	Seriler	Genel Adı	Sistemik Adı	Bulunduğu Yer
Monenoik asitler (1 çift bağlı)				
16:1,9	7	Palmitoleik	sis-9-Heksadesenoik	Hemen hemen tüm katı yağlarda
18:1,9	9	Oleik	sis-9-Oktadesenoik	Nötral yağlarda olasılıkla en sık bulunan yağ asitidir.
18:1,9	9	Elaidik	trans-9-Oktadesenoik	Hidrojenlenmiş ve ön-midede bulunan yağlarda
22:1,13	9	Erusik	sis-13-Dokosenoik	Kolza ve hardal tohumu sıvı yağlarında
24:1,15	9	Nervonik	sis-15-Tetrakosenoik	Serebrozidlerde
Dienoik asitler (2 çift bağlı)				
18:2,9,12	6	Linoleik	tüm sis-9-12 Oktadekatrienoik	Mısır yer fıstığı pamuk çekirdeği soya fasulyesi ve birçok bitki sıvı yağlarında
Trienoik asitler (3 çift bağlı)				
18:3,6,9,12	6	γ -Linolenik	tüm sis-6,9,12 oktadekatrienoik	Bazı bitkilerde örneğin akşam çuha çiçeği sıvı yağında hayvanlarda en az miktarda bulunan yağ asiti
18:3,9,12,15	3	α -Linolenik	tüm sis-,9,12,15 oktadekatrienoik	Sıklıkla linolenik asitle birlikte özellikle keten tohumu sıvı yağında
Tetraenoik asitler (4 çift bağlı)				
20:4,5,8,11,4	4	Araşidonik	tüm sis-5,8,11,14 Eikozatetraenoik	Özellikle yer fıstığı sıvı yağında linolenik asitle birlikte bulunur, hayvanlarda bulunan fosfolipidlerin önemli bir yapı taşıdır.
Pentaenoik asitler (5 çift bağlı)				
20:5,5,8,11,14,17	3	Timnodonik	tüm sis-5,8,11,14,17 Eikozapentaenoik	Balık sıvı yağlarında özellikle morina balık yağında önemli bir komponent.
22:5,7,10,13,16,19	3	Klupanodonik	tüm-sis-7,10,13,16,19 Dokozapentaenoik	Balık sıvı yağlarında, beyin fosfolipidlerinde
Hekzaenoik asitler (6 çift bağlı)				
22:5,4,7,10,13,16,19	3	Servonik	tüm-sis-4,7,10,13,16,19 Dokozahekzaenoik	Balık sıvı yağlarında, beyin fosfolipidlerinde

ile [örneğin, oktadekanoik (oleik)] sonlanırlar Karbon atomları, karboksil karbonundan (1 nolu karbon) itibaren numaralandırılırlar. Karboksil karbonuna bitişik karbon atomu (No 2). α -karbon diye bilinir. Üç nolu karbon atomu (No 3) β -karbondur ve son metil karbonu (1)-karbonu veya n-karbon atomu diye bilinir.

Şekil 16-4: Lökotrien A4 (LTA4)

2.1.1. Doymuş Yağ Asitleri

Hidrokarbon zinciri doymuş olan yani çift bağ içermeyen yağ asitleridir (Tablo 1). Karbon sayısı 8'den küçük olan doymuş yağ asitleri oda ısısında sıvı olup suda çözünürler. Karbon sayısı yüksek olanlar ise oda ısısında katı olup, suda çözünmezler, ancak eter, benzen ve alkolde çözünürler. Doymuş yağ asitlerinden, palmitik asit, stearik asit ve miristik asit insan vücudundaki depo yağlarının önemli bölümünü oluşturur.

Aşırı doymuş yağ asidi (DYA) ve kolesterol alınışının hiperkolesterolemiye neden olduğu, dolayısıyla ateroskleroz eğilimini arttırdığı uzun zamandır bilinmektedir (11). Ancak DYA'nın tümü aynı derecede hiperkolesterolemik değildir. Yiyeceklerde en çok bulunan DYA'lerinden palmitik asit (C:16) ve miristik asit (C:14), stearik asite (C:18) oranla daha hiperkolesterolemiktir (12,13). Stearik asitçe zengin bir diyetin serum kolesterolünü yükseltmediği belirlenmiştir. Zincir uzunluğu 10 C'den kısa olan yağ asitleri de serum kolesterolünü artırmaz (14). Hindistan cevizi ve palmiye yağında bol bulunan miristik asidin aterojenik etkisi palmitik asidinkinden dört kat fazla bulunmuştur (12).

Uzun zincirli DYA'lerinin trombojenik özelliği de vardır. Trombojenik DYA'leri miristik, palmitik ve stearik asitlerdir (15). Trombogenez sürecinde DYA alınışının yol açtığı hiperkolesteroleminin de önemi vardır. Plazma kolesterol düzeyi yüksek olduğunda genellikle protrombin ile faktör VIII ve X aktivitelerinde artış görülür (16).

Aşırı DYA alınışı plazma trigliserid düzeyini yükseltir. Bu da faktör VII'yi aktifler ve plazma fibrinolitik aktivitesini azaltır (17).

Sıçanlarda yapılan yeni çalışmalarla, diyetteki doymuş yağ asitlerinin trombosit fosfolipidlerinde aykozatrienoik (ETA) asitin ortaya çıkmasına neden olduğu kanıtlanmıştır (18). Bu da trombositlerin pıhtılaşma aktivitesi ile ilgili tek yağ asididir.

2.1.2. Doymamış Yağ Asitleri

Bir veya daha fazla doymamış bağ içeren yağ asitleridir. Doymamışlık derecesine göre alt gruplara ayrılırlar.

Tek Doymamışlık Taşıyan Yağ Asitleri

En çok araştırılan tek doymamışlığı olan yağ asidi (MUFA: Monounsaturated fatty acids) oleik asittir. Epidemiyolojik çalışmalarla MUFA'lerinin aterojenezi önleme açısından yararlı olduğu kanıtlanmıştır. Akdeniz halklarında oleik asit kullanımı fazladır. Eskimolarda da MUFA kullanımı fazladır. Gerek Akdeniz halkları, gerekse Eskimolarda genel olarak yağlı bir diyet uygulandığı halde KKH sıklığı oldukça düşüktür. Bu durum genel olarak MUFA'lerine, özel olarak da oleik asite bağlanmaktadır (19).

MUFA'lerinin başlangıçta plazma lipidleri üzerine herhangi bir etkilerinin olmadığı düşünülmüştü. Oleik asitle yapılan deneysel çalışmalarda ne trombojenik, ne de antitrombotik eğilim görülmüştür (20). Ancak, artık MUFA'lerinin nötral olmadığı açıklığa kavuşmuştur (21). Toplam kalorinin %30-40'ı kadar yağ içeren ve bu yağın da büyük kısmını oleik asitin oluşturduğu bir diyetle yapılan çalışmalarda hem serum kolesterolünde hem de LDL kolesterolünde düşme görülmüş, HDL-kolesterol düzeyi değişmemiştir. Oleik asidin aterojenezi yavaşlatıcı etkisi kısmen bu değişikliğe bağlı olabilir.

MUFA'lerinin aterojenezi önleme açısından başka bir avantajları ise lipid peroksidasyonuna daha az uğramalarıdır. Yüksek oranda oleik asit içeren ayçiçeği yağı ile beslenen sıçanlarda LDL'nin oleik asitçe zenginleştiği ve bu yapıdaki LDL'nin oksidasyona dirençli olduğu ileri sürülmektedir (22). Oleik asitçe zengin bir diyet LDL düzeyini azaltıcı etkisi yanısıra LDL oksidasyonunu azaltarak ve böylece LDL tarafından antioksidan harcanmasını azaltarak, dolayısıyla antioksidanları daha etkili kılarak aterojeneze karşı koyabilir.

Çok Doymamışlık Taşıyan Yağ Asitleri

Bu gruba giren yağ asitleri genel olarak bitkisel tohumların yağlarında bulunurlar ve kaynakları linoleik asittir.

Genel olarak bakıldığında diyetteki tereyağının yerini linoleik asitçe zengin yağlar aldığı ölçüde koroner kalp hastalığı (KKH) oranı azalmaktadır. Uzun süreli

linoleik asit alındığında adipoz dokudaki linoleik asit miktarı artar. Adipoz dokudaki linoleik asit düşüklüğünün KKH'ı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (23).

Organizmada üç farklı çok doymamış yağ asitlerinden (polyunsaturated fatty acid: PUFA) oluşan üç farklı prostanoid serisi vardır. Bunlar dihomogamalinolenik asit (DHHA), araşidonik asit (AA), ve aykozapentaenoik asittir (EPA). DHHA ve AA linoleik asidin metabolitleri olup, oldukça yavaş oluşurlar. Normalde prostanoidler esansiyel yağ asitlerinin (EFA) oluşturduğu bir metabolik havuzdan türerler: Bu durumda kaynakları fosfolipaz A₂ enzimi ile membran fosfolipidlerinden salınan AA'dir. AA'ten hem çok güçlü trombosit agregasyonu yapan bir madde olan tromboksan A₂ (TXA₂), hem de trombosit agregasyonunu engelleyen PGI₂ (prostasiklin) oluşur. TXA₂ oluşumunun daha ağır basması nedeni ile sonuçta pıhtılaşma başlar (24).

PUFA n-3 serisi α -linolenik asit (C18:3), bitkilerin yeşil kısımlarında bulunan başlıca n-3 PUFA'idir. Hayvansal organizmada α -linolenik asit zincir uzamasına uğrar ve bu arada doymamışlığı da artar. Böylece aykozapentaenoik asit (EPA) ve dokozahekzaenoik asit (DHA) oluşur. Bu nedenle EPA ve DHA ette bulunur. α -linolenik asit fitoplanktonlarda bol bulunur. Bu nedenle bundan türeyen EPA ve DHA miktarı balıklarda çok daha fazladır. Bu PUFA'lerini özellikle soğuk denizlerin yağlı balıklarında ve konsantre şekilde bu balıkların yağlarında görmek mümkündür. Dolayısıyla n-3 PUFA'lerini "Balık Yağları" olarak adlandırmak yanlış olmaz.

BALIK YAĞLARI

Morina balığının taze karaciğeri alınır ön kesesi ve diğer yaramaz kısımları ayıklandıktan sonra özel bir cihazın içine konur, su buharı ile hafif hafif ısıtılır. Elde edilen yağ açık sarı renkte ve balık kokuludur.

Balık yağları uzun süre diyetle alındıklarında, trombosit, lökosit, eritrosit ve endotel hücrelerinin zarlarına yerleşirler. Yapıca AA'e benzediklerinden, onun gibi siklooksijenaz ve lipoksijenaz enzimleri tarafından parçalanırlar. Böylece ortaya özellikleri ve etkileri oldukça farklı, değişik prostanoidler çıkar. Balık yağlarının güçlü biyolojik etkileri burada aranmalıdır (25).

Balık yağlarının, önemli hipolipidemik etkileri olduğu belirtilmektedir. En önemli etkilerini trigliserid üzerinde gösterirler. İnsanda serum trigliserid düzeyi balık yağları ile doza bağımlı bir şekilde azalır. Günde 20-30 g. gibi çok yüksek dozlara çıkıldığında hipotrigliseridemik etki gösteren en güçlü ajanlar olarak değerlendirilmektedir (26).

Total kolesterol düzeyi üzerine olan etkileri çok net değildir. Ancak hipotrigliseridemik etki sonucu azalan VLDL-kolesteroldeki azalma dolayısıyla total kolesterol düzeyinin de azaldığı bildirilmiştir (25). LDL ve HDL kolesterol düzeyleri üzerine olan etkisinin de hep aynı yönde olmadığı belirtilmektedir (27,28).

Balık yağlarının prostaglandin metabolizması üzerine olan etkileri iyi bilinmektedir. Balık yağlarınca zengin bir diyetle beslenen gönüllülerde trombosit zarlarına EPA'nın girdiği ve bundan da TXA₃'ün oluştuğu belirtilmiştir (29,30). Yapılan klinik çalışmalarda, hiperlipidemik ve aterosklerozlu hastalarda balık yağı destekli diyetle besleme sonucu trombositlerin ömürlerinin uzaması, dolayısıyla trombosit-damar duvarı etkileşiminin azalması, n-3 PUFA'lerinin prostaglandin metabolizması üzerinden hemostatik dengeyi olumlu yönde değiştirdiğini kanıtlamaktadır (31).

Balık yağları lökotrien (LT) metabolizmasında da çok önemli değişikliklere neden olurlar. LT'ler, nötrofil ve monosit zarlarındaki yağ asitlerinden türeyen ve enflamatuvar cevabın oluşmasına katkıda bulunan maddelerdir. Ateroskleroz

sürecinde rolleri büyüktür. Deneysel çalışmalarla balık yağları ile beslenme sonucunda endotelyuma nötrofil adezyonunun ve monosit kemotaksisinin azaldığı gösterilmiştir (32,33).

n-3 PUFA'lerinin bir diğer olumlu etkisi ise organizmada peroksidasyonu azaltmalarıdır. Gerçekte doymamış yağ asitlerinin lipid peroksidasyonuna daha çok uğradıkları bir genel doğru olmakla birlikte, yapılan çalışmalarda n-3 yağ asitlerinin peroksidasyonu azalttığı görülmüştür (34,35).

Bütün bu çalışmalar n-3 PUFA'lerinin ateroskleroz ve KKH riskini azaltacağını desteklemektedir.

2.2. OKSİJEN RADİKALLERİ: ÜRETİLMELERİ, FONKSİYONLARI ve TOKSİK ETKİLERİ

Oksijen, canlılar için bir yüzü "iyi", diğer yüzü "kötü" diye nitelendirilebilen iki yüzlü bir bileşiktir. Moleküler oksijen bütün canlılar için toksik etkili olup, atmosferdeki değerinin %20 artması ile toksisite kendini gösterir. Oksijenin tam olmayan indirgenmesi ile oluşan toksik ürünlerine karşı canlılar korunma mekanizmasına sahip olmakla birlikte; bu korunma pekçok koşulda aşılabilen ve yetersiz kalabilmektedir (36).

Canlılar için oksijen iki temel fonksiyonu nedeni ile önemlidir. Birincisi yapısal görevi olup, her canlının yapısındaki 100 atomdan 25'ini oksijen oluşturur. Oksijenin ikinci temel görevi ise fonksiyonel nitelikte olup, bu görev oksijenin canlılarda meydana gelen oksidasyon tepkimeleri ile solunum sisteminde rol alması şeklindedir.

Yaşamları için oksijene devamlı olarak gereksinim duyan aerobik canlılarda oksijene acil ve mutlak gereksinim, onu elektron transport sisteminde (solunumda) son elektron alıcısı olarak kullanmalarından ileri gelir (37).

Çevreden kaynaklanan kimyasal ve özellikle fiziksel etkenlerle; ayrıca oksijeni kullanan canlılarda oksijenin yer aldığı pekçok biyokimyasal tepkimelerde oksijenin bazı toksik ürünleri meydana gelir. Canlılarda toksik etkili olan moleküler oksijenin kendisi değil, onun tam olmayan indirgenmesi veya elektromanyetik dalgaların

oluşumlarına neden olduğu oksijen radikalleridir. Bu radikaller biyolojik sistemlerce tanınan en reaktif ve toksik maddeler olup, oksijenin toksik etkisinin gerçek nedenidirler. Bunlardan superoksit radikali (O_2^-) hem çevresel etkenler, hem de organizmalardaki enzimatik ve enzimatik olmayan tepkimlerle en çok ve en kolay oluşan oksijen radikalidir. Canlılarda diğer radikallerin oluşumu çoğunlukla superoksit radikallerinin birikmesine bağlıdır ve bir kez bu radikaller biriktikten sonra, bir seri zincirleme radikalik tepkimler sonucu diğer radikaller de oluşur.

2.2.1. SUPEROKSİT RADİKALİ (O_2^-)

Moleküler oksijen dış orbitallerinde paylaşılmamış iki elektron içerir. Bu elektronlar paylaşılmadığında, ayrı ayrı orbitallerde bulduklarında ve spinleri aynı yönde olduğu zaman en düşük enerji seviyesindedirler. Bu dış orbitallerden her biri birer elektron daha kabul edebilir. Bu orbitallerin tek elektron alması ile superoksit anyonu (süperoksit radikali, O_2^-), iki elektron alması ile de peroksi anyonu oluşur. (O_2^{2-}). Süperoksit radikali bir oksitleyici gibi davranarak bir elektron daha alabilir, böylece oluşan peroksi anyonu ortamdaki iki proton alarak hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşturabilir. Süperoksit radikali aldığı elektronu başka bir elektron alıcıya vererek oksijene oksitlenebilir ve böylece bir indirgeyici olarak davranır veya iki süperoksit radikali birbiri ile etkilenerek biri oksitlenirken, diğeri ise indirgenir ve böylece H_2O_2 ve O_2 meydana gelir (38).



Süperoksit radikallerinin ortadan temizlendiği bu tepkimeye dismutasyon tepkimesi denir.

Canlılarda O_2^- üreten başlıca önemli tepkimeler şunlardır.

- Hidrokinonların, katekolaminlerin, tiollerin, tetrahidropteridin, ferrodoksin ve hemoproteinlerin otooksidasyonu tepkimelerinde
- Çeşitli enzimatik tepkimelerde: Örneğin ksantin oksidaz ve flavoprotein dehidrojenaz gibi
- Bazı oksidaz ve hidroksilaz enzimlerinin katalitik etkileri sırasında
- Mikokondri iç zarındaki elektron transportu sırasında kullanılan oksijenin %1-5'i

O_2^- oluşumu ile sonuçlanır.

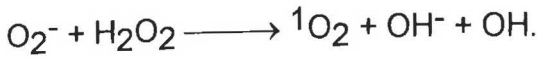
- Fagositoz yapan hücreler tarafından

- Ortamda biriken süperoksit radikallerinin girebileceği başlıca tepkimeler aşağıdaki gibi özetlenebilir (38).

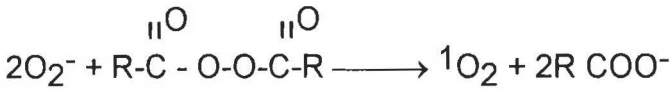
1-Kendiliğinden dismutasyon

2-Ortamdan bir proton alarak perhidroksi radikali (HO_2) oluşumu

3- H_2O_2 ile tepkimeye girerek hidroksi radikali ($OH\cdot$) ve singlet oksijen (1O_2) oluşumu



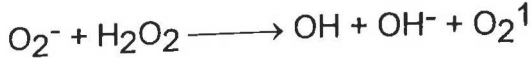
4- Diaçil peroksitlerle olduğu gibi, diğer tepkimeler ile singlet oksijen yapımına neden olur.



Oluşumlarına süperoksit radikallerinin neden olduğu yukarıdaki radikaller diğer radikalik tepkimeleri başlatırlar ve süperoksidin kendisinden çok daha reaktif ve toksik etkilidirler. Bu nedenle süperoksit radikalleri oluştuğu anda uzaklaştırılmazlarsa, diğer radikallerin oluşması kaçınılmazdır. Oksijenin toksik ürünlerinden H_2O_2 'in katalaz tarafından parçalanarak uzaklaştırıldığı uzun yıllardan beri bilinmektedir. Oysa O_2^- radikaline karşı benzer bir enzimatik korunma 1968 yılına kadar bilinmiyordu. Organizmalarda pekçok tepkimelerle üretilebilen ve diğer radikallerin oluşumunu başlatan O_2^- olduğuna göre, aerobik canlılarda oksijenin toksik etkilerine karşı korunma mekanizmasının süperoksit radikallerinin birikmesini önlemek şeklinde olması beklenmelidir. Gerçekten de, canlılarda oksijen toksisitesine karşı savunma bu basamaktadır ve enzimatik bir mekanizmadır. Bu korunma süperoksit distumaz (SOD) tarafından başarılmakta olup enzimin görevi süperoksit radikallerinin dismutasyonunu katalizlemektir (39).

2.2.2.HİDROKSİL RADİKALİ (OH.)

1934 yılında Haber ve Weiss, H₂O₂'in O₂⁻ ile indirgenmesiyle hidroksil radikali oluşabileceğini göstermişlerdir (40,41).

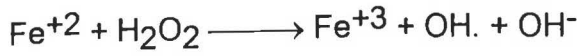


İn vivoda OH. yapımına neden olabilen önemli tepkimeler şunlardır:

- İyonlaştırıcı radyasyonun suya etkisi ile



- Fenton tepkimesi ile



- Ozana elektron transferi ile

- H₂O₂'nin fotolizi ile



- Haber Weiss tepkimesi ile : İn vivoda O₂⁻ radikalinin H₂O₂ ile OH. üretmesi şelart yapmış demir tarafından katalizlenir.

- Radikal tepkimeleri ile oluşabilen bir organik radikal, H₂O₂ ile tepkimeye girerek OH. üretebilir.



Oksijen radikalleri içinde en reaktif olanı ve bu nedenle en toksik etkili olanı OH.radikalidir. OH. üretildiği yerde hemen her melokül ile tepkimeye girebilir ve radikal tepkimelerini başlatabilir.

OH. radikalinin katıldığı başlıca tepkimeler üç grupta toplanabilir.

1-Hidrojen çıkarma tepkimeleri ile organik radikal oluşumuna neden olur.



2-Çift bağ içeren aromatik bileşiklere katılarak aromatik amino asitlerin hidroksilasyonuna neden olur.



3-Organik ve inorganik bileşiklerde elektron transfer tepkimelerine neden olur. Aynı etkiyi O₂⁻ radikalide gösterir.



Hidroksil radikalinin yüksek reaktivitesi nedeniyle istenmeyen toksik etkileri yanısıra, üretimleri normal biyolojik fonksiyon içinde gereklidir. Fagositoz ve pekçok enzimatik katalizin zorunlu bir parçası olarak OH. üretilir ve kataliz olayına doğrudan katılır.

2.2.3.SINGLET OKSİJEN (1O_2)

Enerji absorpsiyonu ile oksijenin paylaşılmamış dış elektronları spinlerini değiştirebilirler. Oksijenin bu şekilde uyarılmış durumunda dış iki elektron ayrı ayrı (sigma formu) veya aynı (delta formu) orbitali işgal edebilirler. Oksijenin uyarılmış bu iki formuna singlet oksijen denir (42). Singlet oksijenin her iki formu da aldığı enerjii ışık enerjisi halinde vererek eski durumlarına dönebilirler.

Singlet oksijen üretimine neden olan başlıca önemli tepkimeler şunlardır;

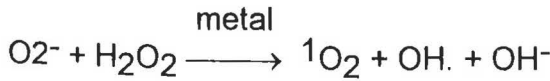
1-Süperoksit radikali üretilen ortamda kendiliğinden dismutasyon ile



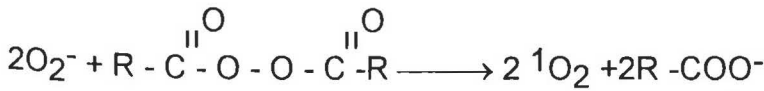
2- O_2^- ile OH. nin etkileşmesi ile



3-Haber-Weiss tepkimesi ile



4-Süperoksit radikallerinin diaçilperoksitlerle tepkimesinde



5-Fagositoz sırasında

Yukarıdaki tepkimelerde görüldüğü gibi, singlet oksijen ve OH. radikallerinin üretimi tümüyle ortamda O_2^- ve H_2O_2 in birikmesine bağlıdır. Bu iki bileşiğin anında uzaklaştırılmadığı durumda, iki molekülün birbirine rastlaması 1O_2 ve OH. üretimi için yeterlidir. Oksijenin diğer radikalleri ile kıyaslandığında O_2^- radikalinin reaktivesi çok azdır.

2.2.4.RADİKAL ETKİLERİNİN MEKANİZMASI

1-Organizmada genel bir oksitleyici gibi davranırlar (sülfidril gruplarının, demirin oksidasyonu gibi)

2-Fonksiyonel metallerin okside reduksiyon düzeyini bozarlar.

3-Amino asitlerle tepkimeye girerler

4-Lipid peroksidasyonuna neden olurlar.

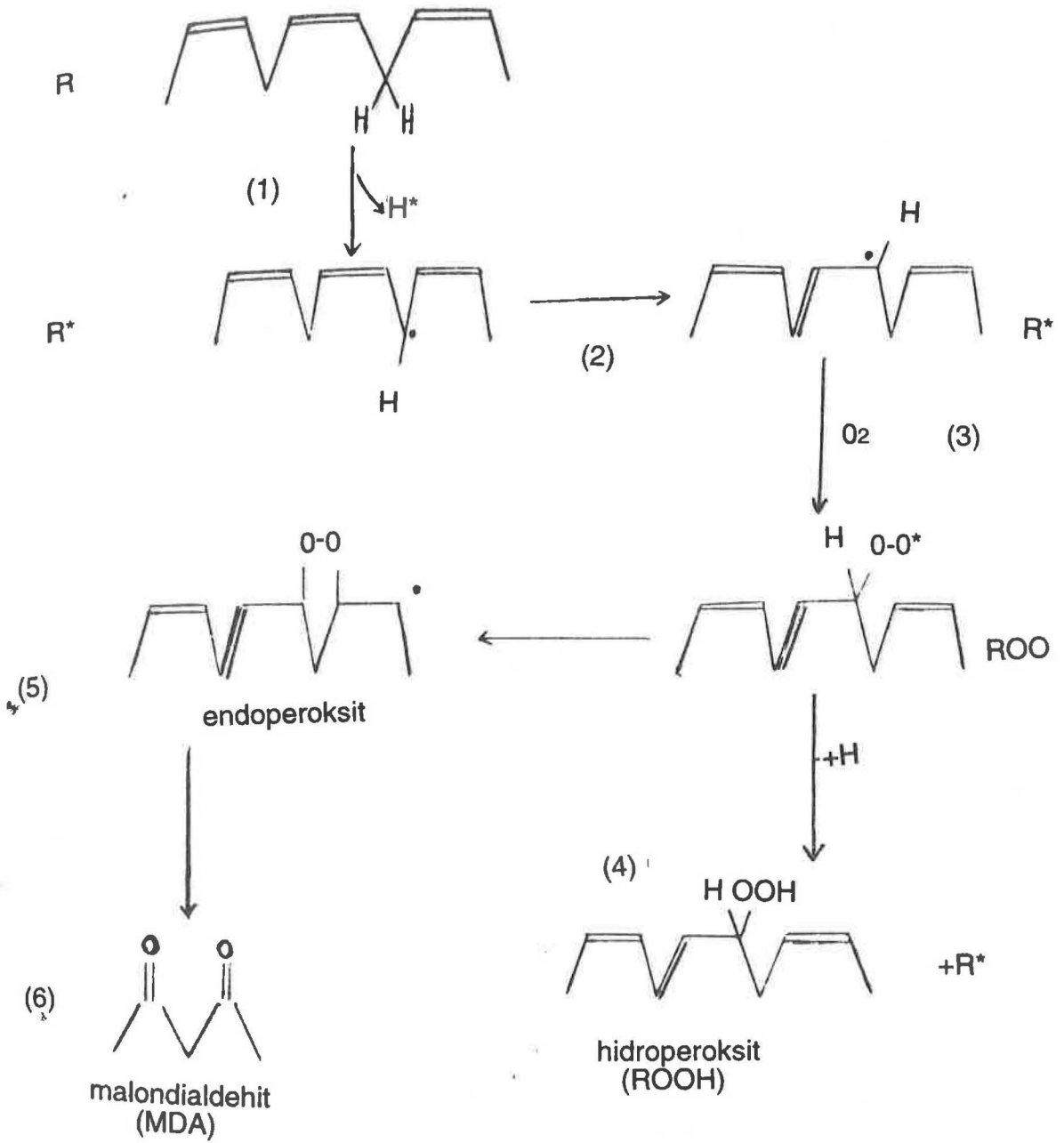
2.2.5.LİPİD PEROKSİDASYONU

Lipid peroksidasyonu, serbest radikaller tarafından başlatılan ve membran yapısındaki poliansature yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olan kimyasal bir olaydır. Bu olay, kanser, inflamatuvar hastalıklar, arteroskleroz ve yaşlanmaya neden olabilen doku hasarından sorumludur (43).

Membran kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikaller ile reaksiyona girerek peroksidasyon oluştururlar. Singlet oksijen ve hidroksil radikali bu peroksidasyona neden olan en önemli etkenlerdir. Hidroksil radikali, doymamış yağ asitlerinden hidrojen atomu çıkararak lipid peroksidasyonunu başlatır. Hidrojen çıkarılması ile oluşan ilk ürün organik bir radikal olacağından, radikalik tepkimeleri başlatır. Lipid peroksidasyonu bir zincir reaksiyonu olup meydana gelen $ROO\cdot$, $RO\cdot$ ve $OH\cdot$ radikalleri tarafından zararlı etkiler devam ettirilir. Tüm olay Şekil 2'de özetlenmiştir.

Hidroksil radikalının doymamış yağ asitlerinden hidrojen çıkarma ile başlattığı tepkimelerin aksine singlet oksijen (1O_2) doğrudan doymamış yağ asitleri ile tepkimeye girerek hidroperoksitlerin oluşumuna neden olur (44) Birden fazla çift bağ içeren doymamış yağ asitlerinin zarlardaki bolluğu nedeniyle, lipid peroksidasyonu zarsal değişimlerin en önemli nedenidir.

Lipid peroksidasyonunun son ürünü malondialdehittir (MDA). MDA üç karbonlu bir dialdehittir (Şekil 2). Bunun tiyobarbiturik (TBA) asit ile verdiği reaksiyon laboratuvarında LPO'nun bir göstergesi olarak kullanılır.



Şekil 2: Serbest Radikal ile Lipid Peroksidasyonunun başlama, ilerleme ve sonlanması

3. MATERYAL ve METOD

Bu araştırma Dicle Üniversitesi Sağlık Araştırma Merkezi (DÜSAM) ile Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Ağırlığı 250 ± 30 arasında değişen, 6 haftalık 32 erkek Sprague-Dawley rat kullanıldı. Ratlar, herbiri 8 adet olmak üzere dört gruba ayrılarak aşağıdaki işlemler uygulandı.

Kontrol Grubu: Bu gruba normal diyetlerine ilave olarak serum fizyolojik uygulandı.

I. Grup: Bu gruba diyetlerinin %10'u (w/w) balık yağı + 3 İU/kg diyet olacak şekilde E vitamini uygulandı.

II. Grup: Bu gruba diyetlerinin %10'u (w/w) balık yağı + 45 İU/kg diyet olacak şekilde E vitamini uygulandı.

III. Grup: Bu gruba ise diyetlerinin %10' u (w/w) balık yağı +209 İU/kg diyet olacak şekilde E vitamini uygulandı.

I. II. ve III. Gruplarda kullanılan balık yağına 1:10 oranında soya fasülyesi yağı ilave edildi.

Balık yağı ve soya fasülyesi yağının yağ asidi bileşimleri Tablo 3' de gösterilmiştir.

Gruplar 10 hafta yukarıdaki şekilde beslendi. Deneyin sonunda "ketalar" anestezisi altında dekapite edildi. %0,9'luk NaCl ile organ perfüzyonları yapıldıktan sonra karaciğer dokusu buz üzerine alındı ve deneyde kullanılıncaya kadar -40°C 'de saklandı. Tüm karaciğer dokularında Tiyobarbitürik asit yöntemi ile, lipid peroksidasyonunun bir ölçüsü olarak kullanılan malondialdehid (MDA) tayini yapıldı (Tablo 3).

Kullanılan Cihazlar

- 1-Homojenizatör: Ultra - Turaks T25
- 2-Santrifüj: Heraeus Labofuge 200
- 3-Spektrofotometre: Shimadzu UV - 1201
- 4-Analitik Terazî : Sartorius
- 5-Otomatik pipetler: Oxford P-7000, Socorex

Deneyde Kullanılan Maddeler ve Sağlandığı Yerler

Madde	Cat no:	Firma
NaCl	5-7653	Sigma
Triklorasetik asit	C-5798	Sigma
Thiobarbitürik (TBA)	T-5500	Sigma

MALONDİALDEHİT (MDA) TAYİNİ: Doku MDA tayini, modifiye tiyobarbitürik asit yöntemi ile yapıldı (45,46). Bunun için 0.5 g. karaciğer örnekleri plastik tüplere kondu. Üzerine 4.5 ml % 5.5 lik triklorasetik asit ilave edilerek soğuk ortamda 20.000 devirde homojenize edildi. Homojenat 4000 devirde santrifüj edilerek süpernatant elde edildi. Süpernatant'dan 1ml alınarak üzerine 1 ml %0.67'lik TBA eklendi. Bu karışım 100°C'de 10 dakika süreyle ısıtıldı.

Süre sonunda karışım soğutuldu. Oluşan pembe rengin absorpsiyonu 532 nm. de spektrofotometrik olarak okundu.

Malondialdehidin molar ekstinksiyon katsayısı olan 1.56×10^5 'den yararlanılarak sonuçlar nmol/g . doku olarak hesaplandı.

İstatistiksel değerlendirmelerde students 't' testi kullanıldı (47).

Tablo 3: Diyet Yağlarının Yağ Asidi Bileşimi

Yağ Asidi	Soya Yağı	%	Balık Yağı
14:0	0.1		7.3
15:0	-		0.4
16:0	10.8		16.7
16:1	0.2		9.9
18:0	3.6		4.5
18:1	20.5		14.8
18:2n-6	55.7		10.7
18:3n-3	7.3		3.8
18:4n-3	-		4.2
20:5n-3	-		12.6
22:1	-		1.4
22: 5n-3	-		1.6
22: 6n-3	-		8.8
Total PUFA	63		41.7
n-3/n-6	0.13		2.9

BULGULAR

Tüm grupların karaciğer MDA düzeyleri Tablo 4'te gösterilmiştir. Ortalama değerler kontrol grubunda 140.5 ± 23 nmol/g doku, Grup I, II ve III'de sırasıyla 135.6 ± 13 , 86 ± 11 , 79.1 ± 10.8 olarak bulundu.

Tablo 4: Tüm grupların karaciğer MDA düzeyleri (nmol/g. doku)

n	Kontrol	Grup I	Grup II	Grup III
1	128	109	92	90
2	149	148	100	71
3	165	129	89	69
4	105	135	79	87
5	112	149	96	91
6	138	129	65	62
7	158	145	86	85
8	169	141	81	78
X \pm SD	140.5 ± 23	135.6 ± 13	86 ± 11	79.1 ± 10.8

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman grup II ve III'de lipid peroksidasyonunda çok anlamlı bir yükselme görüldü ($p < 0.001$). Grup I'deki yükselme grup II ve grup III'e göre çok anlamlı yüksekti ($p < 0.001$). Grup II ve III arasında çok anlamlı bir fark görülmedi ($p > 0.05$).

Tablo 4: Gruplar arası farklılıkların önemini gösteren P değerleri

Gruplar	t	P
Kontrol - Grup I	0.524	$P > 0.05$
Kontrol - Grup II	6.048	$P < 0.001$
Kontrol - Grup III	6.837	$P < 0.001$
Grup I - Grup II	8.298	$P < 0.001$
Grup I - Grup III	9.456	$P < 0.001$
Grup II - Grup III	1.266	$P > 0.05$

TARTIŞMA

Hayvanlar ve insanlar üzerinde yapılan epidemiyolojik çalışmalar, balık yağlarının koroner kalp hastalıkların önlenmesinde veya gerilemesinde yararlı etkilerinin olduğunu göstermektedir (48).

Soğuk denizlerin yağlı balıklarında bulunan yağ asitleri 20-22 C'lu olup çok doymamış yağ asitleridir (PUFA n-3 serisi).

PUFA'lerinin intraarteryel tıkanmayı ve trombosit agregasyonunu önlediğine ilişkin pekçok çalışma alanı vardır (49,50). Bu çalışmalara göre dienoik ve trienoik PUFA'leri MUFA'lerine göre daha güçlü antitrombotik etki gösterirler. Yağ asitlerinin trombosit agregasyonunu inhibe etme özellikleri genel olarak erime noktaları ile ters orantılıdır. Yani, bu etki açısından PUFA'leri MUFA'lerinden daha güçlüdür.

Balık yağları uzun süre diyetle alındıklarında trombosit, lökosit, eritrosit ve endotel hücrelerinin zarlarına yerleşirler. Yapıca araşidonik aside benzediklerinden, onun gibi siklooksijenaz ve lipoksijenaz enzimleri tarafından parçalanırlar. Böylece ortaya özellikleri ve etkileri oldukça farklı, değişik prostanoidler çıkar. Balık yağlarının güçlü biyolojik etkileri burada aranmalıdır (51). Gözlenen pozitif etkilerinden en önemlileri özellikle trigliseridler olmak üzere kan lipitlerini düşürmeleri, kan basıncını düzenlemeleri trombosit agregasyonu ve inflamasyonu azaltmalarıdır.

Bütün bu etkilerinin yanısıra uzun zincirli n-3^e yağ asitleri, membranları oksidasyona karşı daha hassas bir hale getirebilirler ve bu durumda antioksidanlara olan ihtiyaç artabilir (52,53).

Bu konuyu araştırmak amacıyla in vitro birçok araştırma yapılmıştır. Eikozapentaenoik ve dokoza hekzaenoik asit ile zenginleştirilmiş balık yağı ile beslenen hayvanlarda lipid peroksidasyonunda artış gözlenmiştir (54,55,56,57,58).

Bizde araştırmamızda linoleik asit eksikliğini gidermek için balık yağına %10 oranında soya yağı ilave ederek, böylece n-3 serisi PUFA'lerinin hepatic lipid peroksidasyonuna etkisini araştırdık. Birçok araştırmacının bulgusu ile uyumlu olarak

balık yağının hepatik lipid peroksidasyonunu çok önemli olarak artırdığı görüldü ($P < 0.001$) (54,55,56). Gerçekte doymamış yağ asitlerinin lipid peroksidasyonuna daha çok uğradıkları bir genel doğru olmakla birlikte yapılan bazı çalışmalarda da n-3 yağ asitlerinin peroksidasyonu azalttığı görülmüştür (34,35). Bu durum deney şartlarına ve kullanılan ratların yaşlı oluşuna bağlanmıştır. Ayrıca kullanılan balık yağının antioksidanca zengin olabileceğinin bunda bir etkisi olabileceği belirtilmiştir.

Yine yapılan araştırmalar, uzun süre balık yağı alanlarda plazma vitamin E düzeyinin düştüğü gösterilmiştir. Bu etki diyetle E vitamini alımı ile giderilmiştir (59,60). Ancak bu çalışmalarda, balık yağı ile beslenenlerde normal antioksidan durumun korunması için, uygun E vitamini miktarının ne olabileceği tavsiye edilmemiştir.

Bizim çalışmamızda kg diyet başına 45 IU E vitaminin en etkin korumayı sağladığı ortaya çıktı.

E vitamini çok önemli bir hücre sel antioksidandır. Askorbit asit, retinol, karotenoid, glutatyon ve ürik asit de E vitamini ile birlikte kooperatif olarak çalışan önemli antioksidanlardır.

E vitamini tüketiminin diğer antioksidanların durumunu bozduğu ve peroksidasyonun zararlı etkilerini, şiddetlendirdiği gösterilmiştir (61,62). Yang ve ark ratlarda E vitamini eksikliğinin plazma ve karaciğerde A vitamini düzeyini azalttığı ve lipid peroksidasyonundaki artışa bunun neden olduğunu ileri sürmüşlerdir (61).

Sung-Hee ve arkadaşları diyetle verilen E vitamininin sadece çeşitli antioksidanların durumu üzerine etkili olmayıp, plazma antioksidanları arasındaki ilişkiyi de etkilediğini rapor etmişlerdi (60). Aynı araştırmada balık yağının plazma ve karaciğer E vitamini düzeylerini azalttığı balık yağı ile beslenmede E vitaminine olan ihtiyacın arttığı kaydedilmiştir.

Sonuç olarak, belli oranda balık yağı içeren bir diyetle beslenen ratlarda hepatik lipid peroksidasyonunun arttığı ve E vitaminin bunda önemli bir koruyucu etkisinin olduğu görüldü.

ÖZET

Bu araştırma Dicle Üniversitesi Sağlık Araştırma Merkezi (DÜSAM) ile Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Balık yağı ile beslenmenin ratlarda hepatik lipid peroksidasyonunu nasıl etkilediği ve farklı dozlarda E vitamininin antioksidan etkisi araştırıldı. Bunun için ağırlığı 250 ± 30 arasında değişen, 6 haftalık 32 erkek Sprague-Dawley türü rat kullanıldı.

Ratlar biri kontrol olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Kontrol gruba normal diyetlerine ilave olarak serum fizyolojik verildi. Diğer I. II. ve III. gruplara ise diyetlerinin %10'unu balık yağı oluşturacak şekilde bir diyet uygulandı. Ayrıca bu üç gruba sırasıyla 3, 45, 209 IU/kg diyet olacak şekilde farklı dozlardaki E vitamini balık yağı ile birlikte verildi.

Gruplar 10 hafta bu şekilde beslendikten sonra dekapite edildi. Serum fizyolojik ile organ perfüzyonları yapıldı. Karaciğer dokusu buz üzerine alınarak deneyde kullanılıncaya kadar -40°C 'de saklandı.

Karaciğer dokusundaki lipid peroksidasyonu derecesi tiyobarbitürik asit yöntemi ile malondialdehit tayini yapılarak bulundu. Ortalama değerler kontrol grubunda 140.5 ± 23 nmol/g doku, Grup I, II ve III'de sırasıyla 135.6 ± 13 , 86 ± 11 , 79.1 ± 10.8 nmol/g doku olarak bulundu. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman grup II ve III'de lipid peroksidasyonunda çok anlamlı bir yükselme görüldü ($p<0.001$). Grup I'deki yükselme grup II ve grup III'e göre çok anlamlı yüksekti ($p<0.001$). Grup II ve III arasında çok anlamlı bir fark görülmedi ($p>0.05$).

Sonuç olarak belli oranda balık yağı içeren bir diyetle beslenen ratlarda hepatik lipid peroksidasyonunun arttığı ve E vitamininin bunda önemli bir koruyucu etkisinin olduğu görüldü. En etkin korunma 45 IU/kg diyet E vitamini uygulanan grupta görüldü.

KAYNAKLAR

1. Heller F.R., Parfonry A., Hondekijn J.C.: The lipoprotein (a): Significance and relation to atherosclerosis. *Acta. Clinica Belgica*. 56 (6): 371-383, 1991.
2. The Society Pages: Understanding the pathogeicity of low density lipoproteins (editorial). *J Lab. Clin. Med*, 120 (5):669-670, 1980.
3. Lamarche B.: Prevalence of dyslipidemic phenotypes in ischemic heart disease. *Am. J. Cardiol*. 75 (17):1189-95, 1995.
4. Saita M., Nakatsugawa K.: Increased susceptibility of liver to lipid peroxidation after ingestion of a high fish oil diet. *Int. J. Vitam-Nurt-Res*. 64 (2):144-51, 1994.
5. Machura E., Kalacinski W., Brus R.: Is a fish oil enriched diet therapeutically beneficial? *Pediatr. Pol*. 70 (7):597-602, 1995.
6. Suarez A., del-Carmen-Ramirez M., Faus MJ., Gil A.: Dietary long-chain polyunsaturated fatty acids influence tissue fatty acid composition in rats at weaning *J.Nutr*, 126 (4):887-97, 1996.
7. Ahtani C., Awtade A., Vasisht S., Srivastava LM.: Effect of fish oil on lipoproteins and its receptors in hypercholesterolemic rabbits. *Biochem. Mol.Biol.Int*. 37 (3):489-98, 1995.
8. Endres S., De Caterina R., Schmidt EB., Kristensen SD.: n-3 polyunsaturated fatty acids: update 1995. *Eur J Clin Invest*. 25 (9):629-39, 1995.
9. Connor WE.: Diabetes, fish oil, and vascular disease. *Ann Intern Med*, 123 (12):911-8, 1995.
10. Mayes PA.: In: *Harper's Biochemistry*, Edited by Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell Y.W., 21th Edition, Los Altos, Lange Medical Publications, 172-173, 1990.

11. Faggioto A., Ross R., Harker L.A. Studies of hypercholesterolemia in the non-human primate I. Changes that lead to fatty streak formation. *Arteriosclerosis* 4,323-340, 1984.
12. Hegsted D.M., McGandy R.D.B., Myers M.L., Stare F.J.: Quantitative effects of dietary fat on serum cholesterol in man. *Am.J.Clin.Nutr.* 17,281-295, 1985.
13. Keys A., Anderson J.T., Grande F.: Serum cholesterol response to changes in diet. IV. Particular saturated fatty acids in the diet. *Metabolism* 14,776-787, 1995.
14. Bonanome A., Grundy S.M.: Effect of dietary steric acid on plasma cholesterol and lipoprotein levels. *N.Eng. J.Med.* 318,1244-1248,1988.
15. O'Dea K., Steel M., Naughton J.: Butter-enriched diets reduce arterial prostacyclin production in rats. *Lipids* 23,234-241,1988.
16. Meade T.W., Mollows S., Brozvic M.: Hemostatic functions and ischaemic heart disease; principal results of the Northwick Park Heart Study. *Lancet* 2,533-537,1986.
17. Wilhelmsen L., Svardsudd K., Korsan-Bengtson K., Larson B., Welin L., Tibblin G.: Fibrinogen as a stroke and myocardial infarction. *N. Eng. J.Med.* 311,501-505,1984.
18. Lagarde M., Burtin M., Rigaud M., Sprecher H., Dechavanne M., Renaud S.: Prostaglandin E2-like activity of 20:3 ω -9 platelet lipoxygenase end product. *FEBS Lett.* 181,53-56,1985.
19. Malmros H., Wigand G.: The effects on cholesterol of diets containing different fats. *Lancet* 2,1-8,1975.
20. Hornstra G.: Dietary lipids, platelet function, and arterial thrombosis in animals and man. *Proc.Nurt.Soc.* 44,371-378,1985.
21. Oliver M.F.: Dietary fat and coronary heart disease. *Br. Heart J.* 58,423-428,1987.

22. Patharasarathy S., Kloo J.C., Miller E., Barnett J., Witztum J.L., Steinberg D.: Low density lipoprotein rich in oleic acid is protected against oxidative modification: Implications for dietary prevention in atherosclerosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87,3894-3898,1990.
23. Riemersma R.A., Wood D.A., Butler S.: Linoleic acid content in adipose tissue and coronary heart disease. Br. Med. J. 292,1423-1427,1986.
24. Lagarde M., Guichardant M., Dechavanne M.: Human platelet PGE and dihomogammalinolenic acid. Comparison to PGE₂ and arachidonic acid. Prog. Lipid Res. 20,439-443,1981.
25. Israel D.H., Gorlin R.: Fish oils in the prevention of atherosclerosis. J. Am. Coll. Cardiol. 19,174185,1992.
26. Schectman G., Kual S., Cherayil G.D., Lee M., Kissebah A.: Can the hypotriglycerimedic effect of fish concentrate be sustained. Ann. Intern. Med. 110, 346-352,1989.
27. Herold P.M., Kinsella J.E.: Fish oil consumption and decreased risk of cardiovascular disease: a comparison of findings from animal and human feeding trials. Am. J. Clin. Nutr. 43,566-598,1986.
28. Harris W.: Fish oils and plasma lipid lipoprotein metabolism in humans: A critical review. J. Lipid. Res. 30,785-807,1989.
29. Von Schacky C., Fischer S., Weber P.C.: Long-term effects of dietary omega-3 fatty acids upon plasma and cellular lipids, platelet function and eicosanoid formation in man. J. Clin. Invest. 76,1626-1631,1985.
30. Knapp H.R., Reilly I.A.G., Alessandrini P., Fitzgerald G.A.: In vivo indexes on platelet and vascular function during fish oil administration in patients with atherosclerosis. N. Eng. J. Med. 314,937-942,1986.
31. Levine P.H., Fisher M., Schneider P.B.: Dietary supplementation with omega-3 fatty acids prolongs platelet survival in hyperlipidemic patients with atherosclerosis. Arch. Intern. Med. 149,1113-1116,1989.

32. Lewis L.A., Austen K.F.: The biologically active leukotrienes. *J.Clin. Invest.* 73,889-897,1984.
33. Schmidt E.D., Pederson J.O., Jersild C., Ditzel J., Grunnet N., Dyerberg J.: The effect of n-3 polyunsaturated fatty acids on lipids, haemostasis, neutrophil and monocyte chemotaxis in insulin dependent diabetes mellitus. *J.Intern. Med.* (Suppl) 225,201-206,1989.
34. McLennan P.L., Abeywardena M.Y., Charnock J.S.: Influence of dietary lipids on arrhythmias and infarction after coronary artery ligation in rats. *Can.J. Physiol. Pharmacol.* 63,1411-1417,1985.
35. Fisher M., Levine P.H., Weiner B.H.: Dietary n-3 fatty acid supplementation reduces superoxide production and chemiluminescence in a monocyte-enriched population of lymphocytes. *Am.J.Clin.Nutr.* 51,804-808,1990.
36. Cadenas E.: Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem* 58:79-110, 1989.
37. Chander R., Kapoor NK.: High-density lipoprotein is a scavenger of superoxide anions. *Biochem Pharmacol*, 40:1663-1665, 1990.
38. Clemens MR., Waller HD.: Lipid peroxidation in erythrocytes. *Chem Phys Lipids* 45:251-268, 1987.
39. Dormandy TL.: In praise of peroxidation. *Lancet* ii:1126-1128, 1988.
40. Feurstein G., Goldstein RE.: Lipid peroxides and coronary circulation. *Am Rev Respir Dis* 136:485-487, 1987.
41. Frank L., Massaro D.: Oxygen toxicity. *Am J Med* 69:117-126, 1980.
42. Freeman Ba, Crapo JD.: Biology of disease, Free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 47:412-426, 1982.
43. Nanji A.A., Griniuviene B., Sadrzadeh S.M., Levitsky S., Mc Cully J.D.: Effect of type of dietary fat and ethanol on antioxidant enzyme mRNA induction in rat liver. *J.Lipid. Res*, 36 (4):736-44, 1995.
44. Köse K, Doğan P.: Lipid peroksidasyonu, *Erciyes Tıp Dergisi Ek-1*, 340-350, 1992.

45. Gürsoy MA, Kayabalı M, Hazar H, Kotiloğlu E.: Sıçanlarda oluşturulan stres ülserlerinde serbest radikallerin ve radikal temizleyicilerin rolü. *Ulusal Cerrahi Dergisi* 8 (1):22-29,1992.
46. Steven HY, Joseph A.: Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of Malondialdehyde. Thiobarbituric Acid Adduct. *Clin Chem* 33 (2):214-220,1987.
47. Kutsal A.: Uygulamalı Temel İstatistik, Hacettepe Üniversite Yayınları, 114-116, Ankara, 1976.
48. Goodnight S.H., Harris S., Connor W.E., Illingworth P.R.: Polyunsaturated fatty acids, hyperlipidemia and thrombosis. *Arteriosclerosis* 2,87-113,1982.
49. Mc Gregor L., Marazain R., Renaud S.: A comparison of the effects dietary short and long saturated fatty acids on platelet functions, platelet phospholipids and blood coagulation in rats. *Lab. Invest.* 43,438-442,1980.
50. Renaud S., Morazain R., Godsey F., Thevenon C., Martin J.L., Mendy F.: Nutrients, platelet function and composition in nine groups of French and British farmers. *Atherosclerosis* 60,37-48,1986.
51. Roach P., Kambouris A., Trimble R., Topping D.L., Nestel P.J.: The effects of dietary fish oil on hepatic HDL and LDL lipoprotein receptor activities in the rat. *Lett.* 222,156-162,1987.
52. Alexander DW, Mc Guire SO, Cassity NA, Fritsche KL.: Fish oils lower rat plasma and hepatic, but not immune cell alpha-tocopherol concentration. *J.Nutr.* 125 (10):2640-9, 1995.
53. Samsonov MA, Pokrovskii VB, Pogozeva AV, Pokrovskaja GR.: Effects of diet containing polyunsaturated fatty acids omega-3 and different doses of vitamin E on the activity of lipid peroxidation in patients with hypertension *Vopr-Pitan,* 1:34-7, 1995.
54. Skuladottir GV, Shi Hua D, Brodie AE, Reed DJ, Wander RC.: Effects of dietary oils and methyl ethyl ketone peroxide on in vivo lipid peroxidation and antioxidants in rat heart and liver. *Lipids,* 29 (5):351-7, 1994.

55. Sugihara N, Tsuruta Y, Date Y, Furuno K, Kohashi K.: High peroxidative susceptibility of fish oil polyunsaturated fatty acid in cultured rat hepatocytes. *Toxicol-Appl-Pharmacol*, 126 (1):124-8, 1994.
56. Venkatraman JT, Chandrasekar B, Kim JD, Fernandes G.: Effects of n-3 and n-6 fatty acids on the activities and expression of hepatic antioxidant enzymes in autoimmune-prone N2BxN2W F1 mice. *Lipids*, 29 (8):561-8, 1994.
57. Saita M, Nakatsugawa K.: Increased susceptibility of liver to lipid peroxidation after ingestion of a high fish oil diet, *Int. J. Vitam-Nutr-Res*, 64 (2):144-51, 1994.
58. Xia E, Rao G, Van-Remmen H, Heydari AR, Richardson A.: Activities of antioxidant enzymes in various tissues of male Fischer 344 rats are altered by food restriction. *J. Nutr*, 125 (2):195-201, 1995.
59. Cho SH, Im JG, Choi YS, Son YS, Chung MH.: Lipid peroxidation and 8-hydroxy-deoxyguanosine formation in rats fed fish oil with different levels of vitamin E. *J Nutr. Sci Vitaminol*, 41 (1):61-72, 1995.
60. Cho SH, Choi YS.: Lipid peroxidation and antioxidant status is affected by different vitamin E levels when feeding fish oil. *Lipids* 29 (1):47-52, 1994.
61. Yang N.Y.J., Desi I.D.: Vitamin E and coronary heart disease. *J. Nutr.* 107:1418-1426, 1977.
62. Connor W.E.: Diabetes, fish oil, and vascular disease. *Annals of Internal Medicine*, 123 (12):950-951, 1995.