

TC  
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DİETİL NİTROZAMİN VERİLEN RATLARDA OMEGA-3 YAĞ  
ASİTLERİNDEN ZENGİN BALIK YAĞININ KORUYUCU ROLÜNÜN  
ARAŞTIRILMASI

Arş.Gör. Emine ATAKİŞİ  
Biyokimya Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ

Danışman  
Doç. Dr. Ayla ÖZCAN

2005-KARS

TC  
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DİETİLNİTROZAMİN VERİLEN RATLARDA OMEGA-3 YAĞ  
ASİTLERİNDEN ZENGİN BALIK YAĞININ KORUYUCU ROLÜNÜN  
ARAŞTIRILMASI

Arş.Gör. Emine ATAKİŞİ  
Biyokimya Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ

Danışman  
Doç. Dr. Ayla ÖZCAN

Bu Çalışma KAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Tarafından Desteklenmiştir. Proje No:2003-VF-014

2005-KARS

T.C.  
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Biyokimya Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde Arş. Gör. Emine ATAKİŞİ tarafından hazırlanmış olan "Dietilnitrozamin Verilen Ratlarda Omega-3 Yağ Asitlerinden Zengin Balık Yağının Koruyucu Rolünün Araştırılması" adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sonunda jüri üyeleri tarafından Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 31/01/2005

Adı Soyadı

İmza

Başkan : Prof. Dr. Necati KAYA  
Üye : Prof. Dr. Arif ALTINTAŞ  
Üye : Doç. Dr. Şaban MARAŞLI  
Üye : Doç. Dr. Sedat YILDIZ  
Üye : Doç. Dr. Ayla ÖZCAN (Danışman)



Bu tezin kabulü, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ..25../1.02/05 gün ve .....88.....sayılı kararıyla onaylanmıştır.

  
Doç. Dr. Ayla ÖZCAN  
Enstitü Müdürü

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
Simgeler ve Kısaltmalar	I
Grafikler Dizini	III
Tablolar Dizini	IV
Şekiller Dizini	V
Önsöz	VI
1 GİRİŞ ve GENEL BİLGİLER	1
1.1 Yağ Asitleri Hakkında Genel Bilgi	1
1.2 Omega-3 Yağ Asitleri	4
1.2.1 Adlandırılması, Numaralandırılması ve Metabolik Dönüşümleri	4
1.2.2 Diyetteki Kaynakları	6
1.2.3 Barsaklardan Emilimi	7
1.2.4 Doku ve Hücre İçi Dağılımı	8
1.2.5 Doymamış Yağ Asitlerinin Biyosentezi	9
1.2.6 Biyolojik Etkileri	10
1.2.7 Omega-3 Yağ Asitlerinin Organizma Üzerine Etkileri	13
1.2.7.1 Gebelik ve Yavru Performansına Etkileri	13
1.2.7.2 Serbest Radikaller ve Antioksidanlar Üzerine Etkileri	15
1.2.7.3 İmmun Sistem Üzerine Etkileri	21
1.2.7.4 Kalp Damar Hastalıkları ve Hipertansiyon Üzerine Etkileri	23
1.2.7.5 Kansere Oluşumu Üzerine Etkileri	25
1.3 Nitrozaminler	26
1.3.1 Doğadaki Kaynakları ve Vücutta Oluşumu	27
1.3.2 Organizma Üzerine Etkileri	30
1.4 Adenozin Deaminaz	31
1.4.1 Yapı ve Fonksiyonları	31
1.4.2 Klinik Önemi	34
2 MATERYAL ve METOT	38
2.1 Materyal	38
2.1.1 Kan Örneklerinin Toplanması ve İşlenmesi	38
2.1.2 Karaciğer Dokularının Alınması	39

2.2 Metot	39
2.2.1 Analizler İçin Kullanılan Cihazlar	39
2.2.2 Analizler İçin Kullanılan Kimyasal Maddeler	39
2.2.3 Tüm Kanda GSH Tayini	40
2.2.3.1 Deneyin Prensibi	40
2.2.3.2 Deneyde Kullanılan özeltiiler	41
2.2.3.3 Deneyin Yapılışı	41
2.2.3.4 Sonuçların Hesaplanması	42
2.2.4 Plazmada MDA Tayini	42
2.2.4.1 Deneyin Prensibi	42
2.2.4.2 Deneyde Kullanılan özeltiiler	43
2.2.4.3 Deneyin Yapılışı	43
2.2.4.4 Sonuçların Hesaplanması	44
2.2.5 Plazmada ADA Aktivitesi Tayini	44
2.2.5.1 Deneyin Prensibi	44
2.2.5.2 Deneyde Kullanılan özeltiiler	45
2.2.5.3 Deneyin Yapılışı	46
2.2.5.4 Sonuçların Hesaplanması	47
2.2.6 Karaciğer Dokusunun Patolojik Olarak İncelenmesi	47
2.3 İstatistiksel Analizler	48
3 BULGULAR	49
3.1 Klinik ve Biyokimyasal Bulgular	49
3.2 Patolojik Bulgular	52
3.2.1 Makroskobik Bulgular	52
3.2.2 Mikroskobik Bulgular	53
4 TARTIŞMA ve SONUÇ	57
5 ÖZET	64
6 SUMMARY	66
7 KAYNAKLAR	68
8 ÖZGEÇMİŞ	81

**Simgeler ve Kısaltmalar**

$\omega$  : Omega

$\Delta$  : Delta

ADA : Adenozin deaminaz

ARA : Araşidonik asit

AsCoA : Asetil koenzim A

ATP : Adenozin trifosfat

BHA : Bütilhidroksi anilin

BHT : Bütilhidroksi toluen

CAT : Katalaz

CIO. : Hipoklorit

COX : Siklooksijenaz

DEN : Dietilnitrozamin

DHA : Dokosahekzaenoik asit

DNA : Deoksiribonükleik asit

DTNB : 5,5'-(2-ditiobis nitrobenzoik asit)

EDTA : Etilendiamin tetra asetik asit

EPA : Eikosapentaenoik asit

GLA :  $\gamma$ -linolenik asit

GSH : Glutatyon

GSH-Px : Glutatyon peroksidaz

GST-p : Plasental glutatyon s-transferaz pozitif

$\cdot\text{H}_2\text{O}_2$  : Hidrojen peroksit radikali

HDL : Yüksek dansiteli lipoprotein

$\text{HO}_2\cdot$  : Hidroperoksi radikali

IL : İnterlökin

LA : Linoleik asit

LDL : Düşük dansiteli lipoprotein

LNA :  $\alpha$ -Linolenik asit

LOX : Lipoksijenaz

LT : Lökotrien

MDA : Malondialdehit

NADPH: İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat

NDMA : Nitrozodimetilamin

NPIP : Nitrozopiperidin

NPYR : Nitrozopirrolidin

$\cdot O_2^-$  : Süperoksit radikali

OH : Hidroksil radikali

PAF : Platelet activating factor; trombosit aktive edici faktör

PG : Prostaglandin

RNA : Ribonükleik asit

RO $\cdot$  : Alkoksil radikali

RO $_2\cdot$  : Alkil peroksi radikali

ROT : Reaktif oksijen türleri

SC : Deri altı

-SH : Sülfidril grubu

SOD : Süperoksit dismutaz

TBA : Tiyobarbütirik asit

TCAA: Triklor asetik asit

TGF:Trombosit büyüme faktörü

TNF : Tümör nekrozis faktör

TX : Tromboksan

VLDL : Çok düşük dansiteli lipoprotein

<b>Grafikler Dizini</b>	<b>Sayfa No</b>
Grafik 2.1 MDA Düzeyinin Saptanmasında Kullanılan Kalibrasyon Eğrisi.	44
Grafik 3.1 Grupların Günlere Göre Ağırlık Değişimleri	49
Grafik 3.2 Plazma ADA Aktiviteleri	51
Grafik 3.3 Plazma MDA Düzeyleri	51
Grafik 3.4 Tüm Kan GSH Düzeyleri	52



<b>Tablolar Dizini</b>	<b>Sayfa No</b>
Tablo 1.1 Yağ Asitlerinin İsimlendirilmesi	3
Tablo 1.2 Oksijenden ve Nitrik Oksitten Oluşan Başlıca Reaktif Türler	18
Tablo 1.3 Uzun Zincirli Doymamış Yağ Asitlerinin Bazı Etkileri	22
Tablo 3.1 Grupların Günlere Göre Ağırlık Değişimleri	49
Tablo 3.2 Gruplarda ADA aktivitesi ile GSH ve MDA Düzeyleri	50

<b>Şekiller Dizini</b>	<b>Sayfa No</b>
Şekil 1.1 Yağ Asitlerinin İsimlendirilmesi	2
Şekil 1.2 Esansiyel Yağ Asitlerinin Adlandırılması	5
Şekil 1.3 Besinsel Yağlar ve Yağ Asitlerinin Kaynakları	7
Şekil 1.4 Uzun Zincirli Çoklu Doymamış Yağ Asitlerinin Biyosentez Yolu	10
Şekil 1.5 $\omega$ -3 Yağ Asitlerinin Hücre Biyolojisi Üzerine Etkileri	13
Şekil 1.6 Kovalent Bağların Homolitik Kırılması	16
Şekil 1.7 Normal Bir Molekülün Elektron Kaybetmesi	17
Şekil 1.8 $\omega$ -6 ve $\omega$ -3 Yağ Asitlerinden Eikozanoidlerin Sentezi	23
Şekil 1.9 Adenozinin ADA Etkisiyle İnozine Dönüşümü	31
Şekil 1.10 ADA'nın Nükleotidle Bağlanmış Üç Boyutlu Şekli	33
Şekil 1.11 ATP'nin Yıkılım Yolu Üzerinde ADA Etkisinin Önemi	36
Şekil 3.1 Karaciğerlerin Makroskobik Görünümleri (A: Grup II, B: Grup III ve C: Grup IV)	53
Şekil 3.2 Hidropik Dejenerasyon ve Fokal Nekrozlar (Kırmızı Oklar) Grup II, Karaciğer, X 40	54
Şekil 3.3 Hiperemi (Kırmızı Ok) ve Hidropik Dejenerasyon (Sarı Oklar), Karaciğer, Grup II X 25	55
Şekil 3.4 Anizonükleozis (Kırmızı oklar), Karaciğer, Grup II, X 25	55
Şekil 3.5 Hiperemi ve Perivasküler Yerleşimli Mononükleer Hücre İnfiltrasyonu (Sarı oklar) Karaciğer, Grup III, X 10	56

## ÖNSÖZ

Son yirmi yılda genelde çoklu doymamış yağ asitleri ve kısmen de omega ( $\omega$ )-3 yağ asitleri üzerine bir çok çalışma ve klinik araştırmalar yapılmıştır. Yapılan bu çalışmalarda;  $\omega$ -3 yağ asitlerinin normal büyüme ve gelişme için esansiyel olduğu, kolitis, atopik dermatitis, astım, psoriasis, otoimmün glomerulonefritis, multiple skleroz, koroner kalp hastalığı, hipertansiyon, diyabet, artrit, diğer yangısal ve otoimmün hastalıklar ile kanserin önlenmesi ve tedavisinde önemli bir rol oynayabileceği bildirilmektedir.

Et ve et ürünlerinin beslenmede çok önemli bir yeri olduğu bilinmektedir. Veteriner hekimlerin görevlerinden birisi de tüketime sunulan etlerin doğru yöntemlerle uzun süre muhafaza edilmesidir. Bu durum hem halk sağlığı hem de ekonomik açıdan gereklidir. Günümüzde tüketilen et ürünlerinin büyük bir kısmına hoş bir koku, lezzet ve doğal et rengine benzeyen bir görünüm sağlamak için kürlenme işlemi uygulanmaktadır. Kürlenmiş et ürünlerinde nitrozaminler oluşmaktadır. Nitrozaminlerin kanserojenik etkiye sahip oldukları 1954 yılından beri bilinmektedir. Bazı işletmelerde hesapsızca et ürünlerine katılan nitrat ve nitrit vücutta kanserojenik etkili nitrozaminlere dönüşebilmekte ve bu ürünler her geçen gün sağlığımızı tehdit etmektedir.

Nitrozaminler sadece et ve et ürünlerinde değil, yaşamımızın her aşamasında karşımıza çıkmaktadır. Bir alışkanlık halinde tüketilen sigara ile nitrat ve nitrit içeren gıdalar, bazı ilaçlar, alkollü içkiler, endüstriyel kirlenme yanında beslenme düzensizlikleri, bol katı yağlı ve kalorili diyetler, ızgara ve mangalı seven bir toplum oluşumuz bu etkileri daha da arttırmaktadır.

Gelişen gıda teknolojisi ile beraber nitrat, nitrit gibi katkı maddeleri ve değişen beslenme alışkanlıkları ( $\omega$ -3 yağ asiti oranı düşük, doymuş yağ oranı yüksek ve kolesterollü diyetler) organizmada geriye dönüşümsüz hasarlar meydana getirmekte ve metabolik olayların çoğunun meydana geldiği karaciğer bu durumdan en çok etkilenen organ olmaktadır.

Bu nedenle çalışmada, son yıllarda yoğun bir şekilde araştırılan  $\omega$ -3 yağ asitlerinin, dietilnitrozamin (DEN) ile meydana getirilen karaciğer hasarına karşı koruyucu etkisinin araştırılması amaçlanmaktadır.

Doktora eğitimimin her aşamasında yakın ilgi ve desteğini gördüğüm danışman hocam Doç Dr. Ayla ÖZCAN'a, eğitimim sırasında daima yardımlarını gördüğüm hocalarımız Prof. Dr. Necati KAYA ve Doç Dr. şaban MARAşLI'ya, tez çalışmalarım sırasında bana yardımları olan Arş. Gör. Onur ATAKIşI ve Yrd. Doç. Dr. Mahmut KARAPEHLİVAN'a, patolojik bulguların teşhisinde yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Mehmet TUZCU'ya, çalışmama maddi destek sağlayan Kafkas Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı'na teşekkürü bir borç bilirim.

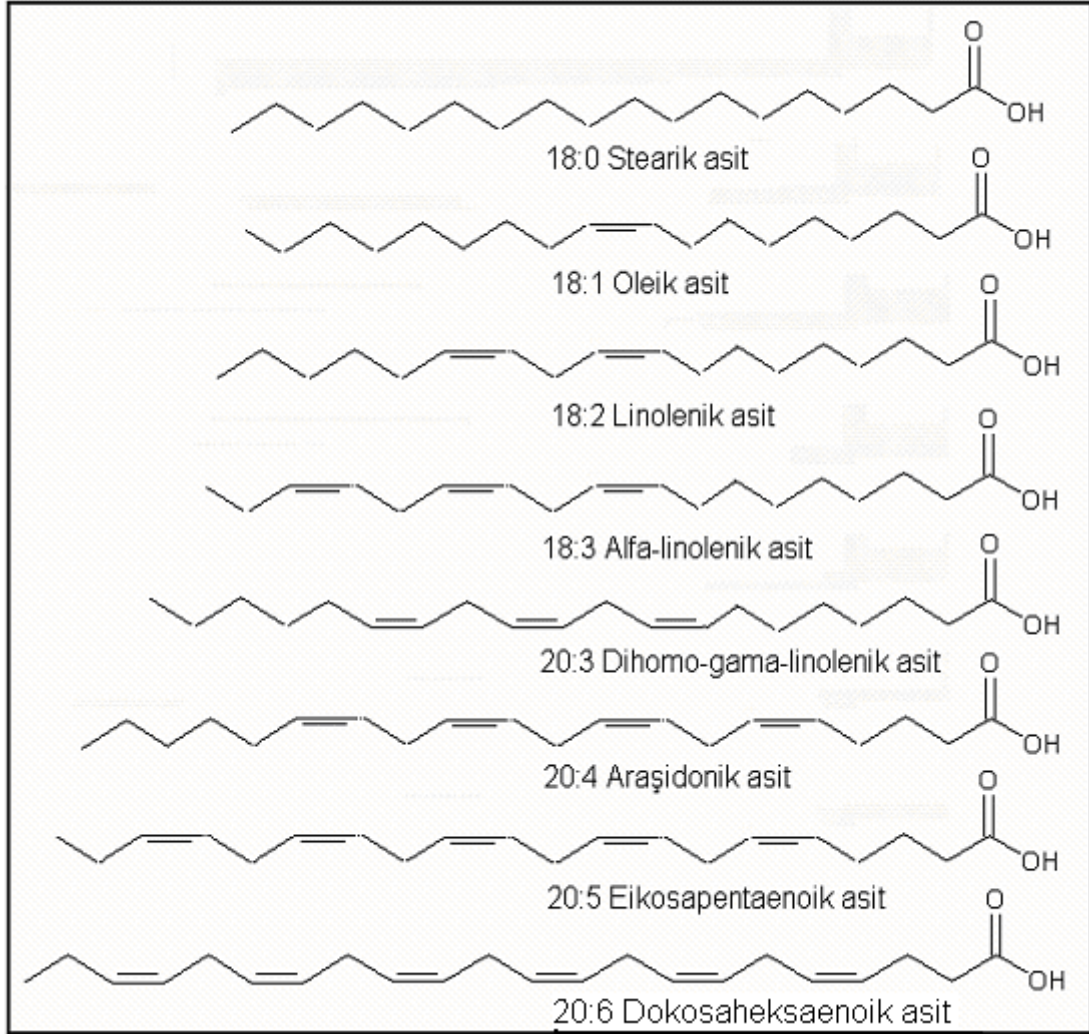
## 1 GİRİŞ ve GENEL BİLGİLER

### 1.1 Yağ Asitleri Hakkında Genel Bilgi

Yağ asitleri iyonlaşabilir karboksil grubu ve polar olmayan hidrokarbon zinciri içeren, monokarboksilik asitlerdir. Tuz ve ester oluşumu gibi kimyasal reaksiyonları polar grubundan ileri gelmektedir. Altı karbondan yüksek yağ asitlerinin metallerle yaptığı tuzlara sabun, yağ asitlerinin gliserolle yaptığı esterlere de yağ (gliserit) denmektedir (61).

Yağ asitleri genel isimleriyle anılmakla beraber, doğru bir adlandırma yağ asiti zincirindeki karbon atomu ile çift bağ sayısı ve çift bağın yerine göre yapılmaktadır (Şekil 1.1) (26).

Memelilerdeki metabolizmalarına bağlı olarak genellikle yağ asitleri üç başlık altında sınıflandırılmaktadır. Bunlar; doymuş ve tekli doymamış, linoleik asit (LA; 18:2 n-6) ile temsil edilen  $\omega$ -6 ve  $\alpha$ -linolenik asit (LNA; 18:3 n-3) ile temsil edilen  $\omega$ -3 yağ asitleri olarak belirtilmektedir. Memelilerde, palmitik ve stearik asit gibi doymuş yağ asitleri ile palmitoleik ve oleik asit gibi tekli doymamış yağ asitleri sentezlenmektedir. Memelilerde sentezlenmemekle beraber bitkilerde sentezlenerek büyük miktarlarda özellikle tohumlarında depolanan LA sindirildiği zaman organizmada çift bağ eklenmesi ve zincir uzama reaksiyonlarına uğrayarak  $\gamma$ -linolenik (GLA; 18:3  $\omega$ -6), dihomu GLA (20:3  $\omega$ -6) ve araşidonik asit (ARA; 20:4 n-6) meydana gelmektedir. LNA ise bitkilerde özellikle yapraklarda sentezlenmektedir (85).



Şekil 1.1 Yağ Asitlerinin İsimlendirilmesi (110).

Tablo 1.1 Yağ Asitlerinin İsimlendirilmesi (26).

Sistemik Adlandırma	Klasik Adlandırma	Kısa No	Kaynakları
Dekanoik asit	Kaprik asit	10:0	<i>De novo</i> sentez: Hindistan cevizi
Dodekanoik asit	Laurik asit	12:0	<i>De novo</i> sentez: Hindistan cevizi
Tetradekanoik asit	Miristik asit	14:0	<i>De novo</i> sentez: Süt
Hekzadekanik asit	Palmitik asit	16:0	<i>De novo</i> sentez: Süt, yumurta, hayvan yağı, et, balık yağı
Oktadekanik asit	Stearik asit	18:0	<i>De novo</i> sentez: Süt, yumurta, hayvan yağı, et
9-Hekzadekanik asit	Palmitoleik asit	16:1 $\omega$ -7	Palmitik asitin desaturasyonu, balık yağı.
9-Oktadekanik asit	Oleik asit	18:1 $\omega$ -9	Stearik asitin desaturasyonu, hayvansal gıdalar, bitkisel yağlar (özellikle zeytin yağı)
9,12-Oktadekadienik asit	Linoleik asit	18:2 $\omega$ -6	Memelilerce sentez edilemez. Hayvansal gıdalar, bitkisel yağlar (özellikle mısır, ayçiçeği, soya, yeşil yapraklar)
9,12,15-Oktadekatrienik asit	$\alpha$ -Linolenik asit	18:3 $\omega$ -3	Memelilerce sentez edilemez. Yeşil yapraklar, bazı sebze yağları (özellikle kolza, soya ve keten tohumu)
6,9,12-Oktadekatrienik asit	$\gamma$ -Linolenik asit	18:3 $\omega$ -6	Linoleik asitten (LA) sentezlenir. (Çuhaçiçeği ve bodan yağı)
8,11,14-Eikosatrienik asit	Dihomo- $\gamma$ -linolenik asit	20:3 $\omega$ -6	$\gamma$ -Linolenik asitten sentezlenir.
5,8,11,14-Eikosatetraenik asit	Araşidonik asit	20:4 $\omega$ -6	$\gamma$ -Linolenik asit ve dihomogamma-linolenik asit aracılığıyla linoleik asitten sentezlenir. Ette bulunur.
5,8,11,14,17-Eikosapentaenik asit	Eikosapentaenik asit	20:5 $\omega$ -3	$\alpha$ -Linolenik asitten sentezlenir. Balıkta bulunur.
4,7,10,13,16-Dokosapentaenik asit	Dokosapentaenik asit	22:5 $\omega$ -6	EPA aracılığıyla LA'dan sentezlenir.
4,7,10,13,16,19-Dokosaheksaenik asit	Dokosaheksaenik asit	22:6 $\omega$ -3	EPA aracılığıyla LA'dan sentezlenir ve balıkta bulunur.

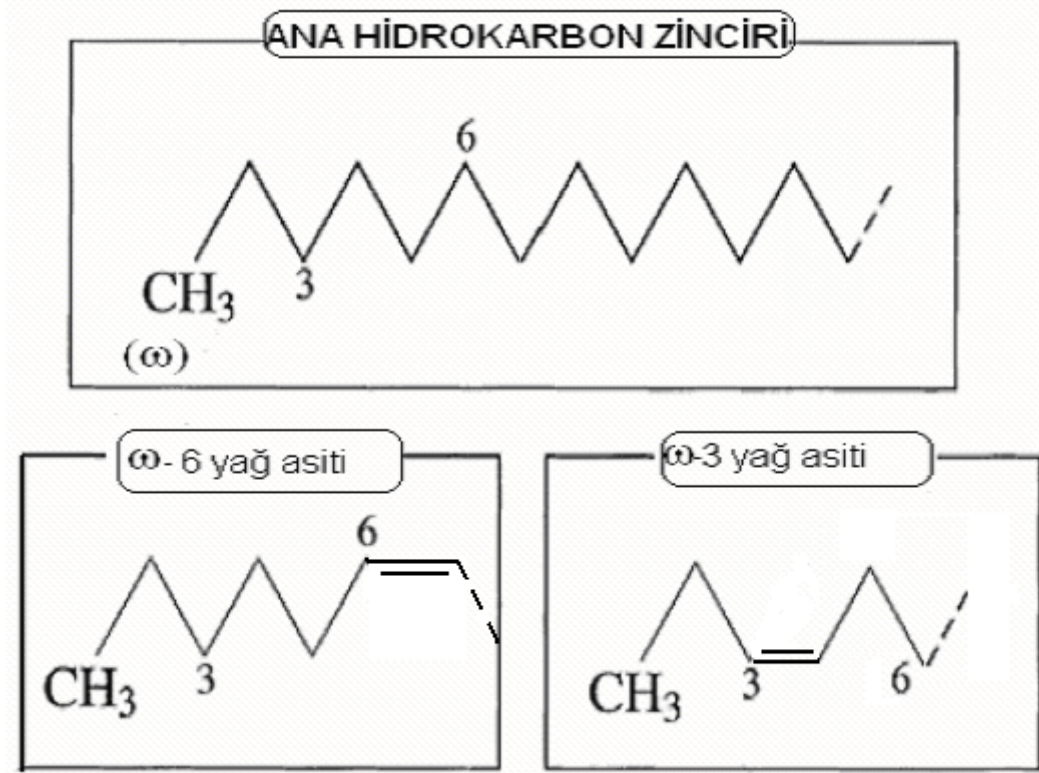
## 1.2 Omega-3 Yağ Asitleri

Günümüzde  $\omega$ -3 yağ asitleri kanser araştırmalarında (12), gebelik ve yavru performansının iyileştirilmesinde (54), kalp damar hastalıklarının önlenmesinde (91), artrit, ülseratif kolitis (19) gibi yangısal hastalıklarda yaygın olarak kullanılmakta ve her geçen gün yararlı etkilerine bir yenisini eklenmektedir.

### 1.2.1 Adlandırılması, Numaralandırılması ve Metabolik Dönüşümleri

Geleneksel kimyasal isimlendirme karbon atomlarının karboksil grubundan itibaren sistematik numaralandırılması ile yapılmaktadır. Karboksil grubundan sonraki 1. karbon atomu  $\alpha$ , 2. ise  $\beta$  olarak isimlendirilmektedir. Yağ asitindeki son karbon atomu  $\omega$ -veya n-harfleriyle, çift bağıın yeri  $\Delta$  sembolünü izleyen bir rakamla gösterilmektedir. Örneğin  $\Delta$ 9 sembolü yağ asitindeki çift bağıın karboksil grubundan itibaren 9. ve 10. karbonlar arasında olduğunu göstermektedir. Yağ asiti moleküllerinin kimyasal yapısını tanımlamada pratikte kabul edilen numaralamaya göre ise zincirde son metil grubundaki karbondan ( $\omega$ - veya n-) başlanarak isimlendirilmektedir. Örneğin, oleik asit son metil grubundan itibaren 9. ve 10. karbonları arasında yer alan bir çift bağına sahiptir. Bu nedenle  $\omega$ -9 (n-9) tekli doymamış yağ asiti olarak belirtilmektedir (92, 94, 110).





Şekil 1.2 Esansiyel Yağ Asitlerinin Adlandırılması (93).

Memeliler ω-9 yağ asitlerini sentez edebilmelerine rağmen, ω-3 ve ω-6 doymamış yağ asitlerini sentez edememektedirler. Bu nedenle dışardan diyetle almak zorundadırlar. Esansiyel yağ asitleri olarak da isimlendirilen ω-3 yağ asitleri LNA, ω-6 yağ asitleri ise LA ile temsil edilmekte ve her ikisi de karaciğerde daha uzun zincirli yağ asitlerine çevrilmektedir. LA ARA'ya, LNA ise eikosapentaenoik asit (EPA; timnodonik asit) ve ardından da dokosahekzaenoik asite (DHA; nervonik asit) metabolize edilmektedir. Bu reaksiyonlar zincir uzunluğunun ve çift bağ sayısının artmasıyla meydana gelmektedir (92). Δ4 ve Δ6 desatürazların ω-6'ya göre, ω-3 yağ asitlerine daha çok ilgi duydukları (92, 96) ve diyetle ω-3 yağ asitlerinin fazla miktarda alınmasının LA'nın desatürasyonunu, dolayısıyla ARA oluşumunu azalttığı, Δ6 desatüraz aktivitesinin yaşla ilgili olarak azalabileceği bildirilmektedir (92).

İnsanlarda LNA'dan EPA sentezlenebilmesine rağmen, bu dönüşümü yapabilme kapasitesinin henüz çok iyi aydınlatılmış olmadığı rapor edilmektedir (59). Düşük LA içeren diyetle beslenen gönüllüler üzerinde yapılan deneysel bir çalışmada, LNA'nın EPA'ya etkili bir şekilde dönüştüğü ortaya konulmaktadır (78).

Aslan ve kediler gibi karnivorlar hariç, insan ve diğer hayvanların LA'yı ARA'ya, LNA'yı EPA ve DHA'ya çevirebilme yeteneğine sahip oldukları ve prematüre bebeklerde, hipertansiyon ve diyabet hastalarında LNA'dan EPA ve DHA dönüşümünün sınırlandığı bildirilmektedir (96).

Bazı enzimatik reaksiyonlar sonucu LNA EPA'ya ve EPA ise DHA'ya dönüşmektedir. Fakat sadece LNA'nın %5'i bu metabolik yola girebilmektedir. Diğer yandan doku EPA seviyesi, diyetle LNA alındığı zaman artarken, DHA seviyesi değişmemektedir. DHA, beyin hücre zarlarının fosfolipit yapı taşlarından birisi olduğundan, nöronal fonksiyonun devamı için esansiyel olduğu ileri sürülmektedir (93).

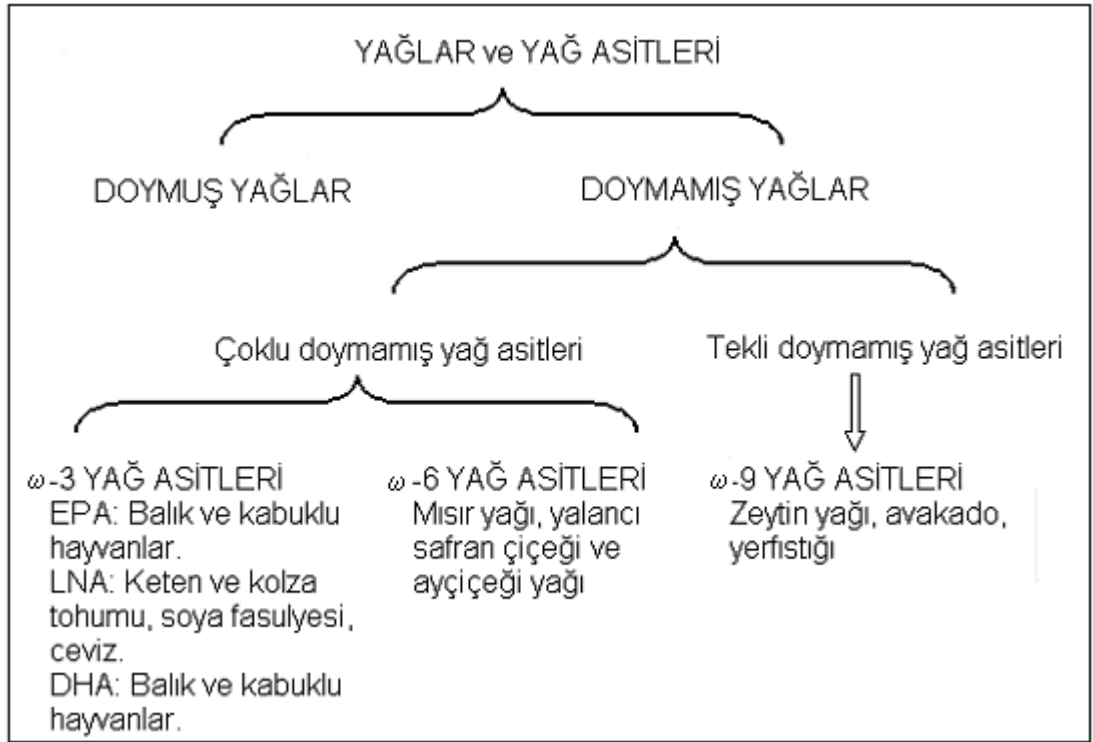
### **1.2.2 Diyetteki Kaynakları**

Doğada çok bol miktarda bulunan LA, hindistan cevizi, kakao ve palmye hariç, çoğu bitki tohumlarında, LNA yeşil yapraklı sebzelerin kloroplastlarında, EPA ve DHA ise balık yağının (92) yanısıra bitkiler, siyanobakteriler, nematodlar (88) ve denizde yaşayan mikroalglerde bulunmaktadır. Deniz balıkları  $\omega$ -3 yağ asitlerinin çoğunluğunu mikroalgleri tüketerek elde etmektedirler (89).

Balık yağının yağ asiti içeriğinin balıkların yaşadığı coğrafik bölge, mevsimler ve yıllara göre büyük miktarlarda etkilendiği bildirilmektedir (92). Balık yağında bulunan EPA ve DHA türler arasında önemli derecede farklılıklar göstermektedir. Bununla birlikte tatlı su balıkları, deniz balıklarına oranla daha düşük seviyelerde EPA içermektedir. Balık ve balık yağlarına ilave

olarak soya ve kanola yağlarının da önemli derecede  $\omega$ -3 yağ asiti kaynağı olduğu kaydedilmektedir (59).

Günümüz diyeti  $\omega$ -6 yağ asitlerinden zengin olduğu için insanlarda  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 dengesizliği meydana gelmektedir. Bazı araştırmacılar, bu dengesizliğin kalp damar hastalıklarının ve meme kanseri gibi bazı kanserlerin oluşum riskini arttırabileceğini ileri sürmektedirler (92, 106).



Şekil 1.3 Besinsel Yağlar ve Yağ Asitlerinin Kaynakları (35)

### 1.2.3 Barsaklardan Emilimi

Sindirim ve emilim sırasında DHA içeren trigliseritler, ilk olarak duodenumda pankreatik lipaz tarafından monoaçilgliserollere ve serbest yağ asitlerine hidroliz edilmektedir. Daha sonra safra tuzlarıyla miselleri oluşturarak, barsak epitel hücreleri içerisine girmektedirler. Burada trigliseritler yeniden sentezlenmekte ve daha sonra lenf sıvısına geçmektedir (71).

Balık ve balık yağı ürünlerindeki yağ asitleri genelde trigliserit olarak sindirilmektedir (92). Balık yağı verilmesinden yaklaşık 5 saat sonra, plazma DHA derişimi maksimum düzeye ulaşmaktadır. Çok yağlı bir diyetin  $\omega$ -3 yağ asiti etil esterlerinin emilimini, az yağlı bir diyete göre 3 katı daha fazla arttırdığı bildirilmektedir (71).

Gıdalarla birlikte alınan  $\omega$ -3 yağ asitlerinin şeklinin, barsaklardan emilimlerini etkilediği ve insanlarda EPA etil esterlerinin serbest yağ asitleri kadar iyi emilmediği ortaya konulmaktadır (37). Dokosapentaenoik asitin (C22: 5) emilim kapasitesinin EPA ve DHA'dan daha fazla olduğu rapor edilmektedir (92).

Sağlıklı bireylerde hem EPA hem de DHA'nın, trigliserit ya da etil ester olarak barsaktan iyi absorbe edildiği bildirilmektedir (37, 83).

#### **1.2.4 Doku ve Hücre İçi Dağılımı**

LNA ve bunların uzun zincirli türevleri hayvan ve bitki hücre zarlarının önemli bileşenleridirler. Memeli ve kuşlarda  $\omega$ -3 yağ asitleri lipit sınıfları içinde seçici olarak dağılmaktadır. LNA, trigliseritlerde, kolesterol esterlerinde ve çok küçük miktarlarda da fosfolipitlerde, EPA, kolesterol esterleri, trigliseritler ve fosfolipitlerde, DHA ise çoğunlukla fosfolipitlerde bulunmaktadır. Memelilerde özellikle serebral korteks (% 15-20'si), retina (92, 93, 96), testis (92, 96) ve sperm DHA bakımından zengindir. DHA beynin yapısal lipitlerinin en önemli bileşeni olup, direkt sindirim veya diyetteki EPA ve LNA'dan sentez edilebilmektedir (96).

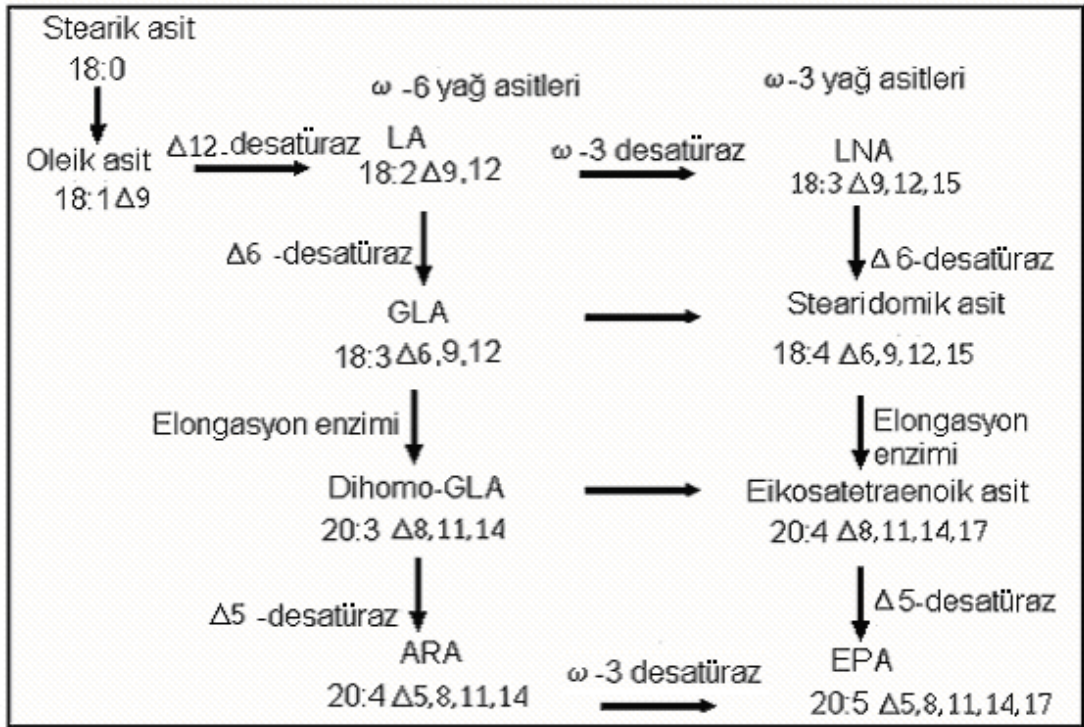
DHA ilave edilmiş diyetle beslenme sonucu,  $\omega$ -3 yağ asitlerinin karaciğer ve akciğerde olduğu kadar kalp kasında da konsantre olduğu bildirilmektedir (92).

$\omega$ -3 ve  $\omega$ -6 yağ asitleri hücre zarlarının önemli bileşenleridirler. Yağlı diyetlerle beslenme hayvanların sağlıklı veya neoplastik dokularının hücre zarı yağ asiti bileşenlerinin değişmesine neden olmaktadır.  $\omega$ -3 yağ asitleri fosfatidil kolin, fosfatidil etanolamin ve trigliseritlerde bulunmaktadır (32). Meme kanseri hücrelerinde yapılan bir çalışmada LA'nın öncelikle fosfatidilkolinle, EPA'nın ise çoğunlukla fosfatidiletanolaminle esterleştiği ve aynı zamanda LA'nın fosfolipitlerden doğal lipid havuzuna geçmesinde etkili olduğu ileri sürülmektedir (92).

### 1.2.5 Doymamış Yağ Asitlerinin Biyosentezi

Yağ asitinin karbon zincirindeki  $\omega$ -6 ve  $\omega$ -3 pozisyonlarına çift bağ eklemek için gerekli olan ve çoğunlukla bitkilerde bulunan  $\Delta$ 12 (26) ve  $\omega$ -3 desatüraz enzimleri memelilerde bulunmamaktadır (88). Bu nedenle memeli hücreleri  $\omega$ -6 ve  $\omega$ -3 yağ asitlerini *de novo* yolla sentez edememektedirler (26). Bitkilerde, siyanobakterilerde ve nematodlarda bulunan  $\omega$ -3 desatürazlar,  $\omega$ -6'dan  $\omega$ -3 yağ asitlerinin oluşumunu katalizlemektedirler (88).

LA ve LNA sindirim yoluyla alındıklarında daha uzun zincirli, daha fazla doymamış yağ asitlerine çevrilebilmektedir. Böylece LA, GLA ve dihomog LA aracılığıyla ARA'ya, LNA ise EPA (20:5  $\omega$ -3) ve DHA (22:5  $\omega$ -3)'ya çevrilmektedir. Çoklu doymamış yağ asitleri, birden çok biyosentez yoluyla yükseltgenmektedirler. Ökaryotik organizmaların çoğu, doymuş yağ asiti içerisinde cis konumunda çift bağ ekleyen  $\Delta$ 9 desatüraza sahiptirler. Hayvanlardaki LA diyetle alınan bitkilerden elde edilmekte ve GLA'yı meydana getirmek üzere metil grubundan karboksil grubuna doğru çift bağ eklenmektedir (101).



Şekil 1.4 Uzun Zincirli Çoklu Doymamış Yağ Asitlerinin Biosentez Yolu (88)

### 1.2.6 Biyolojik Etkileri

Çoklu doymamış yağ asitleri, lipid metabolizmasının düzenlenmesi, lipidlerin taşınması ve hedef dokulara girmesinde rol oynamaktadırlar. Örneğin, uzun zincirli doymamış yağ asitleri karaciğer triaçilgliserol sentezinin inhibisyonuna yol açmaktadır. Hücre zarlarının önemli bileşenleri olan çoklu doymamış yağ asitleri, fosfolipitlerde bulunmakta ve hücre zarı akışkanlığına katılarak, proteinlerin aktivitesini düzenlemede rol oynamaktadır. Hücre zarının yaklaşık % 50'sini oluşturan fosfolipitler, triaçilgliserol, fosfatidik asit, inositol-1,4,5-trifosfat, seramid ve ARA gibi ikinci habercilerin kaynağıdır (26, 94).

Prostaglandin (PG), tromboksan (TX) ve lökotrien (LT)'ler gibi biyolojik olarak aktif moleküllerin sentezinde kullanılan ω-3 yağ asitleri diyetle alındığı zaman ARA ile yarışarak hücre zarı fosfolipitlerinin içerisine girmekte ve böylece yangı yapıcı eikozanoid sentezi için kullanılacak olan ARA miktarı

azalmaktadır. EPA, siklooksijenaz (COX) tarafından ARA'nın oksidasyonunu da inhibe ederek, PGE<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub> ve LTB<sub>4</sub> gibi yangı yapıcı eikozanoidlerin üretimini azaltmaktadır (26, 65, 94).

$\omega$ -3 yağ asitleri trombositlerin kümelenmesini, kanın pıhtılaşmasını, düz kas kontraksiyonunu ve lökositlerin kemotaksisini azaltarak, yangı yapıcı sitokin üretimini ve immun sistemi düzenleyebilmektedir. ARA metabolizmasını inhibe etmesinin yanısıra EPA, hem COX hem de 5-lipoksijenaz (LOX) için substrat olarak hareket edebilmektedir. Böylece ARA'dan sentezlenen yangı yapıcı eikozanoidlerin üretimi baskılanırken, EPA'dan sentezlenen yangı önleyicilerin üretimi artmaktadır. Bu durum balık yağının yangı giderici etkilere sahip olduğunu göstermektedir (26).

$\omega$ -3 yağ asitleriyle beslenme, karaciğerde bulunan ve LNA'dan ARA sentezini azaltan  $\Delta$ 6 ile  $\Delta$ 9 desatürazların aktivitesini inhibe etmektedir.  $\omega$ -3 yağ asitlerinin diyetle fazla miktarda alınması eritrosit, nötrofil, beyin, karaciğer gibi dokuların hücrelerinin zarında bulunan  $\omega$ -3 yağ asitlerinin  $\omega$ -6'ya oranını değiştirmektedir. Balık yağı oral yolla verildiği zaman  $\omega$ -3 yağ asitlerinin hücre zarlarına girişi birkaç hafta, parenteral verilirse 1-2 gün içinde sonuçlanmaktadır. EPA asetil koenzim A (AsCoA) karboksilaz aktivitesini azaltarak, karaciğerdeki *de novo* yağ asiti sentezini inhibe etmektedir (28).

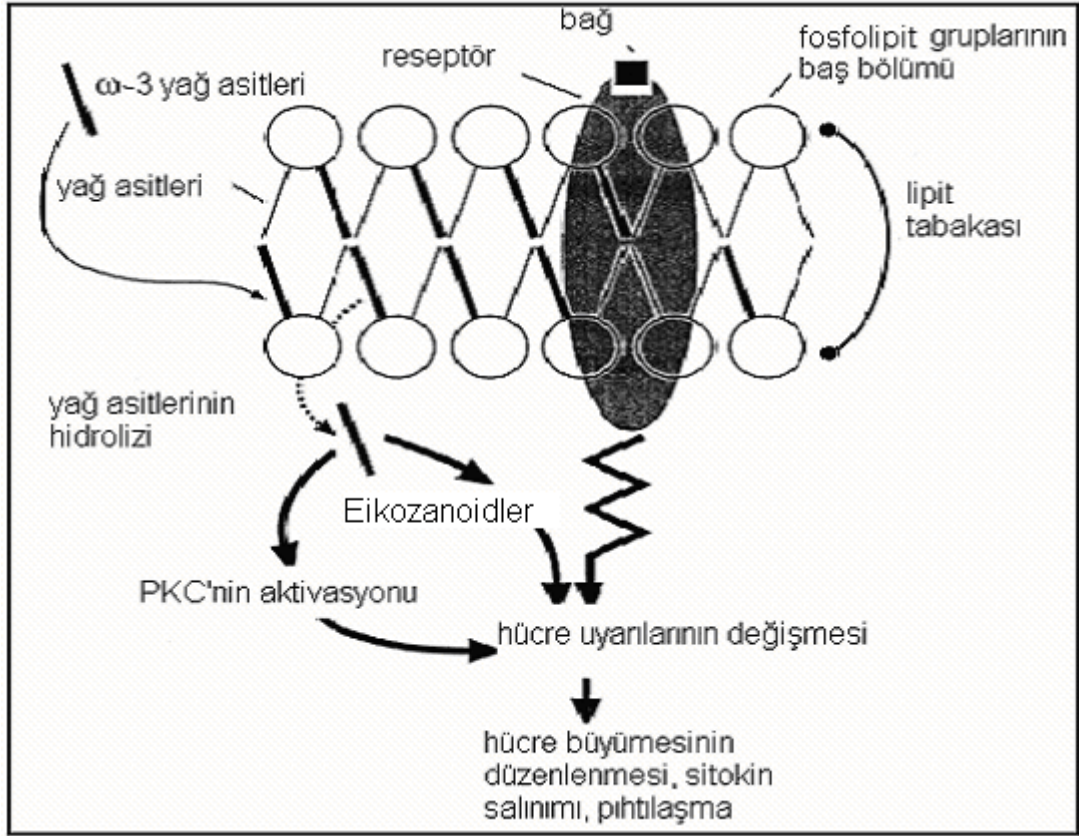
EPA ve DHA gliserolle esterleşmede zayıf bileşikler olduğundan bu yağ asitleri karaciğerde çok düşük dansiteli lipoprotein (very low density lipoprotein; VLDL) sentezini azaltarak plazma trigliserit düzeyini düşürmektedir (49, 74). Diyetteki yağın kaynağının  $\omega$ -3 yağ asitlerinden zengin balık yağı olması durumunda, plazma serbest yağ asiti düzeyi ve karaciğer hücreleri içerisine serbest yağ asitleri girişi azalarak karaciğer trigliserit miktarının düştüğü ve yağlı karaciğer sendromununun engellendiği ileri sürülmektedir (74).

Aveldano ve ark. (14), trombositlerin DHA'yı öncelikle 14 ve 11-hidroksi DHA'ya metabolize ettiğini bildirmektedirler. Her iki izomerin de sentezinin indometazinden etkilenmediğini fakat bir LOX inhibitörü olan 5,8,11,14-heneikosa tetraenoik asit tarafından inhibe edildiğini, EPA'dan zengin balık yağının diyet katılması sonucu kan pulcuklarında bu asitin miktarının artabileceğini ve pıhtılaşma zamanını uzatabileceğini ileri sürmektedirler.

$\omega$ -3 yağ asitleri ve bunların uzun zincirli türevleri hayvan ve bitki hücre zarlarının önemli bileşenleridir. İnsanlar balık veya balık yağını sindirdikleri zaman EPA ve DHA özellikle trombositler, eritrositler, nötrofiller, monositler ve karaciğer hücrelerinin zarlarında  $\omega$ -6 yağ asitleriyle (özellikle ARA) yer değiştirmektedirler. Bunun sonucu olarak balık veya balık yağından EPA ve DHA'nın sindirimi, PGE<sub>2</sub> metabolitlerinin, tromboksan A<sub>2</sub>'nin (trombositlerin kümelenmesine ve damar daralmasına neden olur), LTB<sub>4</sub>'ün (yangı, lökosit kemotaksisi ve birbirlerine yapışmasını uyarıcı) oluşumunun azalmasına neden olmaktadır (94, 95).

$\omega$ -3 yağ asitleri sperm, retina ve beyin lipitlerinin normal bileşiminde bulunur. Doğum öncesi dönemde görme ve beyin korteksi fonksiyonlarının gelişmesi için gereklidir (101).





Şekil 1.5  $\omega$ -3 Yağ Asitlerinin Hücre Biyolojisi Üzerine Etkileri (94).

### 1.2.7 Omega-3 Yağ Asitlerinin Organizma Üzerine Etkileri

$\omega$ -3 yağ asitlerinin organizma üzerine etkilerinden birkaçı aşağıda açıklanmaktadır. Bunların yanında siroz (107), ruh ve sinir hastalıkları (116), normal beyin fonksiyonlarının korunması (56) ve kaşekside (109) de  $\omega$ -3 yağ asitlerinin yararlı etkileri olduğu bildirilmektedir.

#### 1.2.7.1 Gebelik ve Yavru Performansına Etkileri

DHA ve LNA memelilerdeki merkezi sinir sisteminin gelişimi için önemlidir. LNA'nın fötusta DHA'ya elongasyon ve desatürasyonla çevrilme kapasitesi yetersiz kalmaktadır. Gebelik sırasında annenin çoklu doymamış yağ asitleri miktarı yeni doğanlardaki seviyesi için çok önemlidir. Anne sütü bir çok

mamada bulunmayan DHA ve ARA içermekle birlikte bunların düzeyi annenin diyetine bağlı olarak çeşitlilik göstermektedir (52, 81).

Bebek mamalarına  $\omega$ -3 ve  $\omega$ -6 yağ asitlerinin katılmasının etkileri üzerine yapılan çalışmalarda, görme fonksiyonunun, zekanın, problem çözme ve sinir sisteminin gelişiminin daha iyi olduğu ileri sürülmektedir (54, 55).

Erken doğan bebeklerin anneden yeterli DHA alamadıkları için, normal bebeklere göre DHA eksikliğine daha hassas oldukları, az miktardaki yağ depolarının elongasyon ve desaturasyon aracılığıyla yağ asitlerinin metabolik dönüşümü için normal doğanlara göre daha yetersiz olduğu bildirilmektedir (52). Erken doğan bebeklere DHA verilmesinin, görme fonksiyonunun ve bilgi sürecinin şekillenmesinin gelişimini hızlandırabileceği öne sürülmektedir (52, 55).

Gelişmekte olan fütustaki çoklu doymamış yağ asiti seviyesinin annedeki miktarına bağlı olduğu ve annenin doymamış yağ asiti tüketimiyle yavrudaki miktarı arasında pozitif bir ilişki olduğu bildirilmektedir (81). Merkezi sinir sistemi, gebelik boyunca yeni dokuların şekillenmesi ve fetal gelişim için esansiyel olan LNA ve DHA bakımından zengindir. Beyin gelişimi gebeliğin son üç ayı ve bebeklik döneminde en üst düzeydedir. Bu nedenle doğum öncesi ve doğum sonrası dönemde bu uzun zincirli türevlerin ve öncül maddelerinin alınmasının fütusta ve doğumdan sonra normal nörolojik, fonksiyonel gelişim, öğrenme ve davranış için esansiyel oldukları rapor edilmektedir (55).

Balık yağı verilmiş 16 adet laktasyondaki koyunda yapılan bir çalışmada bu yağ asitlerinin önemli derecede süte geçtiği ve  $\omega$ -3 yağ asitlerinden zengin koyun sütü üretiminin mümkün olabileceği ileri sürülmektedir (67).

### 1.2.7.2 Serbest Radikaller ve Antioksidanlar Üzerine Etkileri

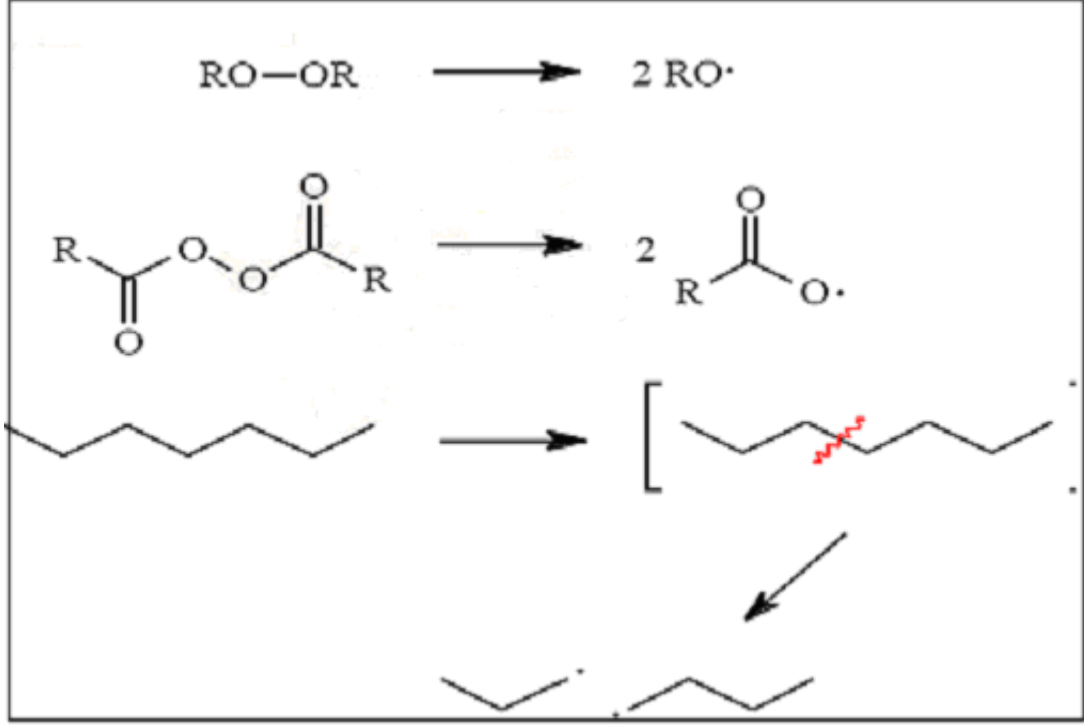
Serbest radikaller; son yörüngesinde bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron içeren, yüksek reaksiyon yeteneğine sahip atom veya moleküller olup, ortaklanmamış elektron genel olarak üst kısma yazılan bir nokta ile gösterilmektedir. Organizmanın oksijen ihtiyacının artmasıyla mitokondriyal elektron transport zincirindeki ortaklanmamış elektron çiftlerinin artışına bağlı olarak reaktif oksijen türleri (ROT) meydana gelmektedir. Bunlar; süperoksit radikali ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), hidroksil radikali ( $\cdot\text{OH}$ ), alkoksil radikali ( $\text{RO}\cdot$ ), alkil peroksi radikali ( $\text{RO}_2\cdot$ ), hidroperoksi radikali ( $\text{HO}_2\cdot$ ) hidrojen peroksit radikali ( $\cdot\text{H}_2\text{O}_2$ ) ve hipoklorit ( $\text{ClO}\cdot$ ) gibi reaktif moleküllerdir. Bu maddeler hem normal metabolizmanın yan ürünü olarak hem de ilaçlar ve diğer kimyasal maddelerin etkisiyle oluşabilmektedir (2).

ROT bir çok nöronal fizyolojik süreç için esansiyel olup, fizyolojik olarak üretilmekte ve eikozanoid metabolizmasında rol alan iki ana PG sentezi yolunda (COX ve LOX) ara ürün veya ürün olarak rol almaktadır. Enzim katalizli reaksiyonlarda mikroorganizmaların saldırılarına karşı doku reaksiyonlarındaki olayların bir parçası olan ROT biyokimyasal ve fizyolojik olarak düzenleyici moleküllerdir. Bununla birlikte üretimleri iyi kontrol edilmediği takdirde dokular ve hücreler için tehlikeli olabilmektedirler (93).

İçinde bulunduğumuz çevrede çeşitli fiziksel etkenler ve kimyasal olaylar nedeniyle devamlı bir radikal yapımı meydana gelmektedir. Nerede ve nasıl üretildiklerine bakılmaksızın, radikaller başlıca 3 temel mekanizma ile oluşmaktadırlar (2, 64).

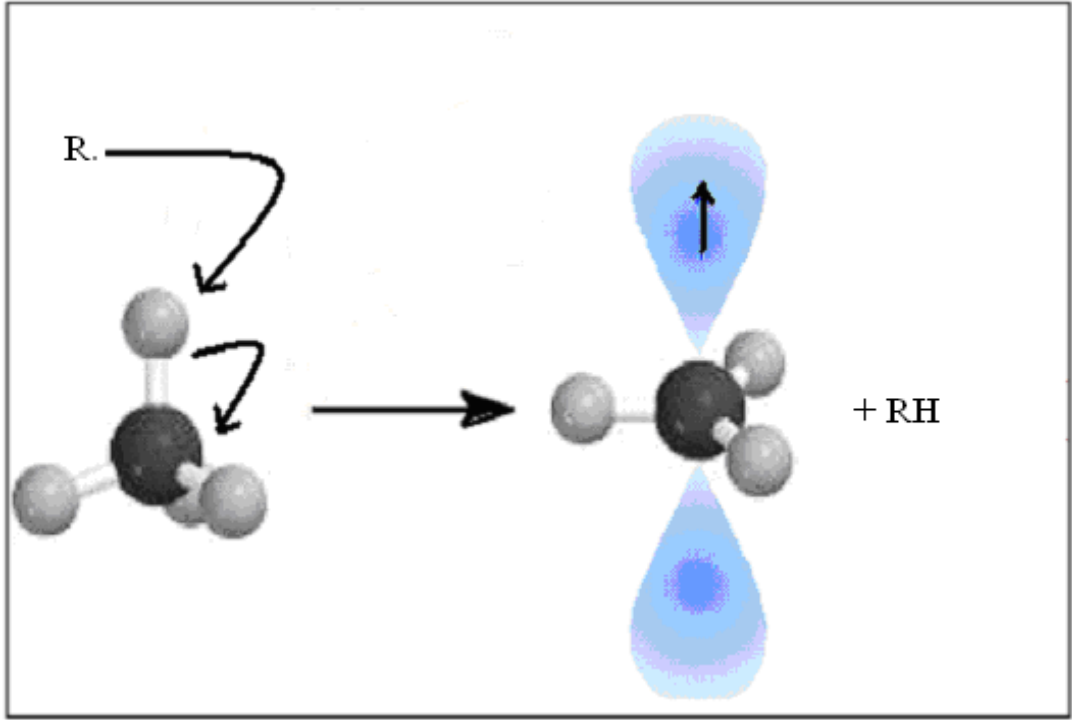
**1. Kovalent Bağların Homolitik Kırılması:** Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcaklık ( $500-600^\circ\text{C}$ ) kimyasal bağların kırılmasına neden olmaktadır. Kırılma sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalıyorsa, bu tür kırılmaya homolitik kırılma denmekte ve her iki atom üzerinde de paylaşılmamış elektron kalmaktadır. Organik

moleküllerdeki bağların heterolitik kırılması durumunda reaktif, zıt yüklü iyon çiftleri oluşmaktadır (2, 64, 117).



Şekil 1.6 Kovalent Bağların Homolitik Kırılması (117)

**2. Normal Bir Molekülün Elektron Kaybetmesi:** Radikal özelliği bulunmayan bir molekülden elektron kaybı sırasında dış orbitalinde paylaşılmamış elektron kaldığı takdirde, radikal formu oluşmaktadır. Örneğin askorbik asit, glutatyon (GSH) ve tokoferoller (E vitamini) gibi hücrel antioksidanlar, tek elektron verip radikalleri indirgerken, kendilerinin radikal formları oluşmaktadır. GSH radikalleri indirgerken, kendisinin tiyil radikali oluşmakta, İki tiyil radikalinin birbiriyle tepkimesi sonucu ise GSH'ın oksitlenmiş (GSSG) formu meydana gelmektedir (64, 117).



Şekil 1.7 Normal Bir Molekülün Elektron Kaybetmesi (117)

**3. Normal Bir Moleküle Elektron Transferi:** Radikal özelliği taşımayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde paylaşılmamış elektron meydana geliyorsa, bu tür indirgenme radikal oluşumuna neden olabilmektedir. Örneğin, moleküler oksijenin tek elektron ile indirgenmesi sonucu, radikal formu olan  $\dot{O}_2^-$  meydana gelmektedir. Bu mekanizma ile radikal yapımı biyolojik sistemlerde yaygın olarak gerçekleştiğinden canlılar için önemli olmaktadır. Canlılarda çok sayıda enzimatik ve enzimatik olmayan tepkimelerle  $O_2^-$  üretilmektedir (2, 64).

Tablo 1.2 Oksijenden ve Nitrik Oksitten Oluşan Başlıca Reaktif Türler (64).

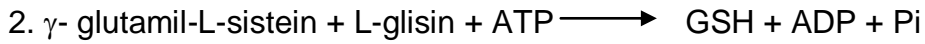
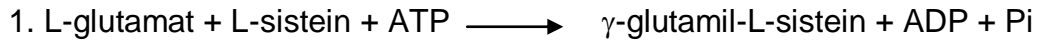
TÜR	ADI	TÜR	ADI
$^1\text{O}_2$	Singlet oksijen	$^*\text{NO}$	Nitrik oksit
$^*\text{O}_2$	Süperoksit	$^*\text{NO}_2$	Nitrojen dioksit
$\text{H}_2\text{O}_2$	Hidrojen peroksit	$\text{NO}_2^+$	Nitril katyonu
$\text{OH}$	Hidroksil radikali	$\text{NO}^-$	Nitroksil
$^*\text{ROO}$	Peroksi radikali	$\text{NO}^+$	Nitrozil (Nitrozonyum iyonu)
$\text{ROOOH}$	Hidroperoksit	$^*\text{ONOO}$	Peroksinitrit radikali
$^*\text{RO}$	Alkoksil radikali	$\text{ONOO}^-$	Peroksinitrit
$^*\text{ROOR}$	Endoperoksit	$\text{N}_2\text{O}_3$	Dinitrojenioksit
$^*\text{HO}_2$	Hidroperoksit radikali	$\text{N}_2\text{O}_4$	Dinitrojentetraoksit

Serbest radikalleri ortadan kaldıran antioksidanlar, ROT'un meydana gelmesini ve kötü etkilerini baskılayan bileşiklerdir. ROT oluşumu, düşük moleküler ağırlıklı antioksidanlar (askorbik asit, GSH, tokoferoller) ile bu antioksidanların indirgenmiş formlarını rejenere eden ve ROT ile etkileşime giren enzimler (süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), peroksidazlar) tarafından engellenmektedir (23, 44).

Küçük molekül ağırlıklı suda eriyebilir bir molekül olan GSH, genetik bilgiye ihtiyaç olmaksızın karaciğerde sentezlenebilen ve yapısında  $\gamma$ -glutamin, sistein ve glisin amino asitlerini bulunduran bir tripeptittir. Molekülde, glutamat sisteinin  $\gamma$ -karboksil ucundan bağlıdır. Çoğu bitkilerde, mikroorganizmalarda ve tüm memeli dokularında bulunan GSH'ın % 10'u sitoplazmada, % 10'u mitokondride, küçük bir yüzdesi ise endoplazmik retikulumdadır. GSH'ın protein disülfid bağı şekillenmesinin olduğu endoplazmik retikulumda GSSG'ye oranı 3:1, sitoplazma ve mitokondride ise 10:1'dir (75).

GSH, adenozin trifosfat (ATP) gerektiren iki enzimatik basamakla tüm memeli hücrelerinin sitoplazmalarında sentez edilmektedir. Birinci basamakta  $\gamma$ -

glutamil sentetaz tarafından kataliz edilen bir reaksiyonla sistein ve glutamattan  $\gamma$ -glutamil sistein oluşmaktadır. GSH biyosentezinin ilk adımı genel olarak hız sınırlayıcı basamak olarak bilinmektedir.  $\gamma$ -glutamil sistein sentetaz, GSH ve sistein tarafından feed back yarışmalı inhibisyonla fizyolojik olarak düzenlenmektedir. İkinci basamakta GSH sentetaz tarafından kataliz edilen bir reaksiyonla  $\gamma$ -glutamil sistein ve glisinden GSH meydana gelmektedir (58).



Çok önemli antioksidanlardan biri olan GSH, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korumaktadır. Endojen olarak üretilen  $\text{H}_2\text{O}_2$ , selenyum bağlı glutatyon peroksidaz (GSH-Px) varlığında GSH tarafından indirgenmektedir. GSH'ın okside olmasıyla meydana gelen GSSG ise redoks siklusunda oluşan indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) varlığında GSSG redüktaz tarafından GSH'a yeniden indirgenmektedir.  $\text{H}_2\text{O}_2$  CAT tarafından da indirgenmesine rağmen, mitokondride CAT olmadığından dolayı GSH daha önemlidir. GSH, antioksidan etkilerinin yanında proteinlerdeki sülfidril gruplarını (-SH) redükte halde tutarak bu grupların oksidasyonunu önlemektedir. Böylece fonksiyonel grupların ve enzimlerin inaktivasyonunu engellemektedir. Yabancı bileşiklerin detoksifikasyonunu ve amino asitlerinin hücre zarından taşınmasını sağlamaktadır. Hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşmesini önlemede önemli rol almaktadır (75).

Yaşlanma, karsinogenesis ve arteriosklerozdaki serbest radikal teorisine göre, hücrelerde üretilen serbest radikaller veya reaktif oksijenlerin lipid peroksitleri şekillendirmek üzere doymamış yağ asitlerine saldırdığına inanılmaktadır. Serbest radikal hasarına uğrayan hücreler, serbest radikallerin neden olduğu hastalıkların sürecini hızlandırmaktadır. Buna göre

serbest radikal ve lipit peroksit hasarı genellikle birlikte kullanılmaktadır. Hücre zarı fosfolipitlerinin doymamış yağ asiti kısımları, yağ asitinin çift bağları taşınmasından dolayı kısmen oksidan hasarı etkisi altında kalmaktadır. Bununla birlikte hücre sel yağ asitlerinin doyurulma miktarı ile oksidanlara duyarlılık arasındaki ilişki çok karmaşıktır (21).

Serbest radikaller, molekülleri hasara uğratarak yaşlanma, kanser ve arteriyoskleroz oluşumunu hızlandırmaktadır.  $\omega$ -6 yağ asitlerine göre  $\omega$ -3 yağ asitleri, atmosfer havası koşullarında otooksidasyona daha duyarlı olmasına rağmen, bu tür hastalıkların oluşumunu baskılamaktadır. Serbest radikaller ve ROT genel olarak *in vivo* ortamlarda işemi ve yangı durumlarında üretilmektedir.  $\omega$ -6 yağ asitleri ve özellikle de LA, ARA'dan yangı yapıcı eikozanoidlerin aşırı ve dengesiz üretimine neden olarak bu olayları hızlandırırken,  $\omega$ -3 yağ asitleri işemi, yangı ve ardından serbest radikallerin aşırı oluşumunu baskılamaktadır (85).

Sarsılmaz ve ark. (93), korus striatum dokusunda MDA miktarının  $\omega$ -3 yağ asiti verilen ratlarda önemli derecede azalabileceğini,  $\omega$ -3 yağ asitlerinden biri olan EPA'nın, fosfolipaz A<sub>2</sub> enzimini inhibe ederek hücre zarı yapısının stabilizasyonuna yol açabileceğini ve böylece LOX ve ROT üretimini azaltabileceğini kaydetmişlerdir. Hücre zarı  $\omega$ -3 yağ asiti içeriğindeki değişikliklerin mikro çevreyi etkileyerek, hücre zarı reseptörlerinin yapı ve fonksiyonlarını, iyon kanallarını, taşıyıcı ve yapısal proteinler ile diaçilgliseroller gibi intra ve intersellüler uyarı iletiminde yer alan enzimleri değiştirebileceğini ileri sürmektedirler.

Liu ve ark. (72), 36 adet hiperlipidemili bireyde günlük balık yağı alımının etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, balık yağının lipit peroksidasyonunu uyarmadığını, tam tersi plazmada lipit peroksidasyonunun bir belirteci olan MDA değerlerini önemli derecede azalttığını ileri sürmektedirler.



### 1.2.7.3 İmmun Sistem Üzerine Etkileri

Klinik veriler  $\omega$ -3 yağ asitlerinden zengin balık yağı tüketiminin romatoid artrit, septisemi, astım, psoriasis, işemi ve kistik fibrozis gibi yangısal ve otoimmün hastalıklar üzerine yararlı etkilere sahip olabileceğini göstermektedir (46, 79, 95).

$\omega$ -3 yağ asitleri tümör nekrozis faktör (TNF)- $\alpha$ , interlökin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, monositler, makrofajlar ve endotel hücreler tarafından uyarılan doku faktörü üretimini azaltabilmektedir (26, 79).  $\omega$ -3 yağ asitlerinin sitokinler ve eikozanoidler üzerine etkilerinden dolayı, yangıyı azaltabilecekleri ileri sürülmektedir (7, 79). Romatoid artritiste, T hücrelerinin hiperproliferasyonu ve ardından yangı yapıcı sitokinlerin üretimi sonucu yangı meydana gelmektedir. Son zamanlarda  $\omega$ -3 yağ asitlerinden zengin diyetlerin tüketiminin TNF- $\alpha$  ve IL-1 üretimini de azaltabileceği bildirilmektedir (79).

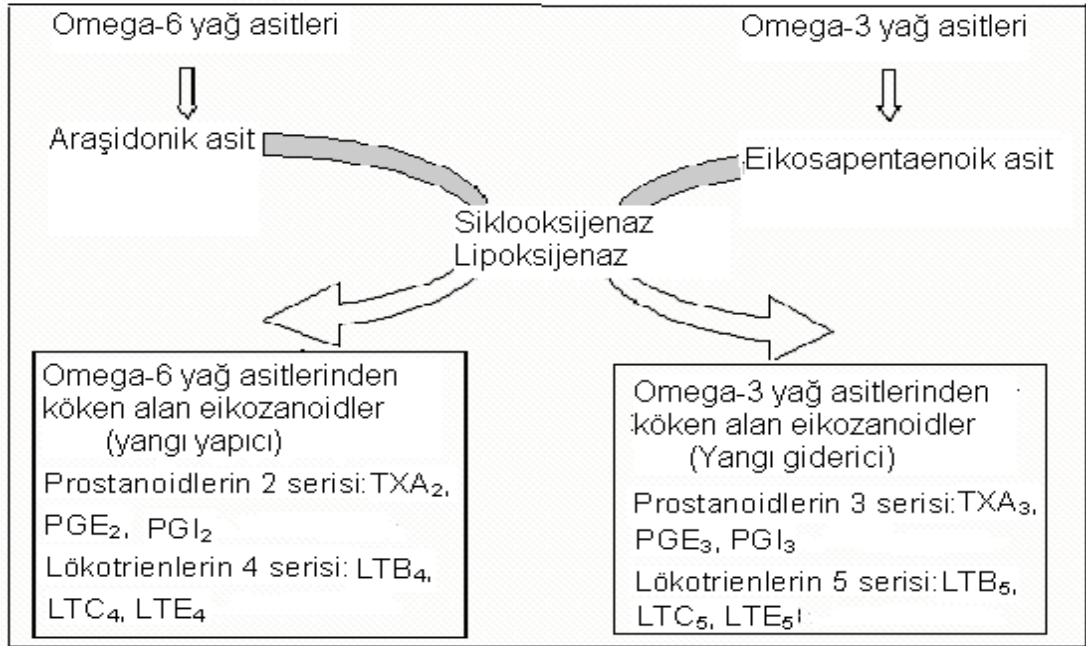
$\omega$ -3 yağ asitlerinin genel olarak  $\omega$ -6 yağ asitleriyle karşılaştırıldığında enfeksiyöz hastalıklara karşı koruma sağlayabildiği ileri sürülmektedir (79). Bu moleküllerin, hücre zarına girdikleri zaman hücre zarı fonksiyonlarını, akışkanlığını ve sekonder uyarıların oluşumunu değiştirebileceği, bu fonksiyonlarını önemli derecede hücreler arası uyarıları etkileyebilen ilaçlar ve diğer biyomoleküllerle (arginin, glutamin, A, C, E vitamini) beraber yapabileceği öne sürülmektedir (7, 80).

Vücutta ARA ve EPA, COX ve LOX tarafından PG ve LT'ye çevrilmektedir. EPA'dan sentezlenen eikozanoidler yangı giderici etkilere sahipken, ARA'dan sentezlenenler yangı yapıcı etkilere sahiptir. Yangı giderici etkilerin; LTB<sub>4</sub> ve sitokinlerin uyarısıyla salınan trombosit aktive edici faktörün (PAF: Platelet Activating Factor) üretimini ve sitokinler tarafından uyarılmış PGE<sub>2</sub> ile tromboksan B<sub>2</sub> sentezinin azalmasından dolayı olabileceği öne sürülmektedir (7). ARA ve EPA yangının düzenlenmesinde zıt etkilere sahip olduğundan vücutta  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 yağ asiti oranının tespiti yangısal hastalıklarda önemli

olmaktadır. Yangısal barsak hastalığındaki temel bozukluklardan biri ülseratif kolitis, diğeri chrohn hastalığıdır.  $\omega$ -6 yağ asitlerinin diyetle yüksek miktarda alınmasının,  $\omega$ -3 yağ asitlerinin miktarını azaltarak (hücre zarında  $\omega$ -3 yağ asitleriyle yer değiştirdiğinden) ülseratif kolitis gelişimine neden olabileceği, diyetle  $\omega$ -3 yağ asitlerinin alınmasının ülseratif kolitisteki barsak hasarını iyileştirebileceği ileri sürülmektedir (34, 35, 101).

Tablo 1.3 Uzun Zincirli Doymamış Yağ Asitlerinin Bazı Etkileri (7).

<b>Sitokin üretimi üzerine etkileri</b>		<b><math>\omega</math>-3</b>	<b><math>\omega</math>-6</b>	<b><math>\omega</math>-9</b>
	IL-1	↑↓	↑	↑↓-
	IL-2	↓	↑	↑
	IL-4	↓	↑	↑
	IL-8	↓		
	IL-10	↓		
	TGF-beta	↓		
	TGF-gama	-↓	↑	↑
	TGF-alfa	↓	↑↓	↓
<b>Hücreler arası uyarı üzerine etkisi</b>				
	Adenilat siklaz	↑↓	↑	↑
	Protein kinaz A	↑↓	↓	↑↓
	Protein kinaz C	↓	↑	↑
<b>Yangı üzerine etkileri</b>				
	Lenfosit yapışması	↓		
	Monosit yapışması	↓		
	Nötrofil kemotaksis	↓		
	C-Reaktif protein	↓		
	Nitrik oksit üretimi	↑↓	↑	↑
	Süperoksit üretimi	↑↓	↑	↑
<b>İmmun sistem üzerine etkileri</b>				
	Allograft yaşaması	↑		↑
	Antijen uyarılması	↓	↓	
	Lenfosit cevabı	↓	↓	
<b>İnfeksiyon üzerine etkisi</b>				
	Mikoplazma hipopnömonia	↓	↑	
	Gut sebepli sepsis	↓		
	Peritonitis	↓	↑	↓



Şekil 1.8  $\omega$ -6 ve  $\omega$ -3 Yağ Asitlerinden Eikozanoidlerin Sentezi (35).

#### 1.2.7.4 Kalp Damar Hastalıkları ve Hipertansiyon Üzerine Etkileri

Giderek artan veriler, özellikle EPA ve DHA olmak üzere  $\omega$ -3 yağ asitlerinden zengin gıdaların kardiyovasküler etkilerini göstermektedir. Bu maddelerin özellikle kan basıncını düşürdüğü ve hipertansiyon gelişimini önlediği belirtilmektedir (38, 91, 101).

Uzun zincirli yağ asitlerini içeren balık yağı işemik kalp hastalığını ve kısmen de ani kardiyak ölümü önleyebilmektedir. Yapılan bir çalışmada balık yağıyla alınan  $\omega$ -3 yağ asitlerinin, kalp kası dokusunu, deneysel olarak meydana getirilmiş miyokardiyal enfarktüstten koruyabileceği ileri sürülmektedir (82).

Balık tüketimi ya da balık yağının gıdalarla alınımının özellikle koroner kalp hastalığından dolayı olan ölümleri azaltabileceği ileri sürülmektedir (72).  $\omega$ -3 yağ asitlerinin trombosit kümelenmesini azaltarak, plazma trigliserit ve VLDL düzeylerini düşürerek, damar daraltıcı TXA<sub>2</sub> biyosentezini inhibe ederek kardiyovasküler koruyucu etkilere sahip olabileceği belirtilmektedir (45, 49, 75, 101).

Doymuş,  $\omega$ -6 ve  $\omega$ -3 yağ asitleriyle ayrı ayrı beslenildiğinde plazma lipit ve lipoprotein seviyelerinin en düşük düzeyinin  $\omega$ -3 yağ asitlerinde olduğu,  $\omega$ -3 yağ asitleriyle beslenildiği zaman, doymuş yağ asitlerine göre total kolesterol, trigliserit, yüksek dansiteli lipoprotein (HDL; High density lipoprotein), VLDL ve LDL kolesterol,  $\omega$ -6 yağ asitlerine göre ise total kolesterol, trigliserit, VLDL kolesterol düzeylerinin önemli derecede düşük olduğu bildirilmektedir (108)

Yüksek dozlarda EPA ve DHA (3-4g/gün) alan hipertrigliseridemili hastalarda plazma trigliserit düzeyinin düştüğü, kadınlarda LNA'nın miyokardiyal enfarktüsü ve fetal işemik kalp hastalığı riskini azaltabileceği belirtilmektedir (100). Aritmilerin  $\omega$ -3 yağ asitleri tarafından önlenmesinin nedeninin  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ve  $\text{Ca}^{++}$  kanalları üzerine olan etkilerinden kaynaklanabileceği öne sürülmektedir (77).

$\omega$ -3 yağ asitleri miyositlerin elektrofiziksel özellikleri üzerine de etki edebilmektedirler. Aritmi yapıcı bir glikozid olan oubaine maruz bırakılan rat kalp hücrelerinin kültür ortamına  $\omega$ -3 yağ asitleri ilave edildiğinde ventriküler fibrilasyonun önlediği ve bu etkinin oubain tarafından açığa çıkarılan sitoplazmik kalsiyum artışının  $\omega$ -3 yağ asitlerinden etkilenmesinden dolayı olabileceği ileri sürülmektedir (101).

Kardiyovasküler patolojilerle yakından ilgili diğer bir faktör de antioksidatif durumdur. Kardiyovasküler hastalıklarda miktarı artan okside LDL'ler makrofajlar tarafından ortadan kaldırılırken, köpük hücre şekillenmesine ve damar duvarı üzerinde birikerek arteriyoskleroza neden olmaktadır.  $\omega$ -3 yağ asitlerinin ratlarda VLDL ve LDL'lerin oksidasyonunu önlediği ve antioksidan seviyesini arttırdığı, aynı zamanda plazma total kolesterol seviyesini azalttığı, bu şekilde  $\omega$ -3 yağ asitlerinin bu hastalıklarda koruyucu olabileceği ileri sürülmektedir (45).

### 1.2.7.5 Kanser Oluşumu Üzerine Etkileri

Diyetle alınan  $\omega$ -3 yağ asitleri tümör büyüme hızını yavaşlatabilmektedir. Yüksek seviyelerde  $\omega$ -3 yağ asiti içeren gıdalarla beslenmenin *in vitro* ya da *in vivo* olarak tümör oluşumu üzerine etkisi, bu yağ asitlerinin hücre zarlarına girmesi ile hücrelerin lipit peroksidasyonuna duyarlılığının artırılması ve artan lipit peroksidasyonunun hücreyi öldürmesi esasına dayandığı ileri sürülmektedir (26, 27).

Tümör oluşumunun artması üzerine gıdalardaki yağların etkileri, trigliserit formunda tüketilen yağ asitlerinin miktar ve tipine bağlı olup, bu konudaki çalışmalar  $\omega$ -3 yağ asitlerinden zengin balık yağının  $\omega$ -6 yağ asitlerinin tersine karsinojenlerle uyarılmış bir çok dokuda tümör sayı ve büyüklüğünü azaltabileceğini göstermektedir (12, 68).

Karaciğer kanserinde gıdalardaki yağın düzenleyici etkisinin mekanizması henüz tam olarak açıklanamamakla birlikte, kanser sürecinin başlangıcı ve ilerlemesiyle ilgili bir çok mekanizma öne sürülmektedir. Bunlardan birincisi zar fosfolipitlerinin yağ asiti kompozisyonunu ve gen transkripsiyonunu değiştirerek nükleer olayları düzenlemesi, ikincisi  $\omega$ -3 yağ asitlerinin elongasyon ve desaturasyon için LA ile yarışarak tümör proliferasyonu ile ilgili olabilen PG sentezini azaltması (65, 84), üçüncü olarak ise balık yağı ile uzun süre beslenme sonucu kanserin ilerleme safhasında hücrelerin apoptosise hassasiyetinin artmasıdır. Bu nedenle gıdalardaki balık yağı hücredeki mitoz ve apoptosis dengesini düzenleyerek, neoplastik lezyonların uyarılmasını baskılamaktadır (65, 66).

Meme tümörü üzerine balık yağının inhibe edici etkisinin PG'lerle ilgili olabileceği ileri sürülmektedir (25). LA'dan ARA'nın, ARA'dan da kanser oluşumunu uyarabilen PG'lerin sentezlendiği ve bu nedenle LA'nın tümör sayı ve büyüklüğünü artırırken, ARA metabolizmasını inhibe edebilen DHA ve EPA'nın azaltabileceği öne sürülmektedir (24, 33).  $\omega$ -3 yağ asitlerinin

meme kanseri oluşumunu ve metastazını önleme potansiyelinin  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 oranının 2:1'den küçük olmasından, kadınlarda meme kanseri riskinin artmasının EPA ve DHA'nın öncülü olan LNA'nın meme yağ dokularındaki seviyelerinin düşük olmasından dolayı olabileceği öne sürülmektedir (25, 101).

Kim ve ark. (66) yaptıkları bir çalışmada, LNA'dan zengin sebze yağlarına göre,  $\omega$ -3 yağ asitlerinden zengin balık yağının plasental glutatyon s-transferaz pozitif (GST-p; tümör oluşumu belirteci) şekillenmesini daha etkili olarak azalttığını ve  $\omega$ -3 yağ asitlerinin karaciğer mikrozomal monooksijenaz sistemini uyararak karaciğer kanserine karşı koruyucu etkilere sahip olabileceğini ileri sürmektedirler.

Kimyasal olarak uyarılan meme, kolon ve rektum tümörlerinin çoğunda  $\omega$ -3 yağ asitlerinin etkisi yaygın olarak çalışılmakta ve diyetle balık yağı ilavesinin tümör oluşumunda önemli bir azalma meydana getirebileceği ileri sürülmektedir (20, 25, 33, 60).

### 1.3 Nitrozaminler

M.Ö. 3000 yıllarında et ürünlerini kürelemede tuzdan yararlanıldığı, M.Ö. 900 yıllarında ise tuz ve odun tütsüsünün gıda saklama yöntemleri olarak kullanıldığı kaydedilmektedir. Ortaçağlarda etlere koruyucu amaçla tuz ve tütsünün yanı sıra katılan nitrat, etin rengini olumlu yönde değiştirmek ve botulizmi önlemek amacıyla kullanılmaktaydı. M.Ö. 50. yılda baharatlardan lezzet verici olarak yararlanılmış, gıda boyaları ise günümüzden yaklaşık 3500 yıl kadar önce Mısırlılar tarafından renklendirici amaçla kullanılmışlardır. 19. yüzyıldaki hızlı şehirleşmenin paralelinde katkı maddelerinin kullanılışları, özellikle gıdaları bozulmalara karşı koruma amacıyla yaygınlaşmış olup, günümüzde ise bu maddeler gelişen gıda teknolojisinin vazgeçilmez bir parçasını oluşturmuşlardır (8, 11, 87).

### 1.3.1 Doğadaki Kaynakları ve Vücutta Oluşumu

Gıdalar hastalıkları önlemede olduğu kadar hastalık sebebi olarak da önemli bir rol oynamakta, bir yandan beslenme ihtiyacını karşılarken, diğer yandan sağlık riski yaratabilmektedir (97). Hem gıdalarla alınan hem de çevrede bulunan N-nitrozaminlerin bu risklerden biri olduğu tespit edilmektedir (62, 97).

Genellikle gıdalarda koruyucu amaçla kullanılan nitrit ve nitratların sekonder aminlerle reaksiyona girerek oluşturdukları N-nitrozaminler, nitrit ya da nitrojen oksitlerden ve aminlerden pişirme sırasında şekillenmektedirler (87, 97).

Gıdalarla alınan nitrat, mide-barsak kanalında amonyağa indirgenmektedir. Özellikle midenin asit ortamında (pH 2-4) nitrattan oluşan nitrit, ikincil aminler ve N-amidlerle tepkimeye girerek nitrozaminler ve nitrozamidleri oluşturmaktadır (62).

Nitrozaminler kimyasal reaksiyon ve mikrobiyal etkinin bir sonucu olarak da şekillenebilmektedir. Mikroorganizmaların, nitratları nitritlere indirgeyerek, proteinleri amin ve amino asitlere parçalayarak, nitrosillenmeyi sağlayan enzimlerin üretimini ve nitrosillenme için uygun asidik pH ortamını sağlayarak N-nitrozaminlerin oluşumuna neden olabilecekleri, bazı Laktobasillus casei gibi türlerin nitrozodimetilamin (NDMA), DEN, nitrozopirrolidin (NPYR) ve nitrozopiperidin (NPIP) gibi nitrozaminlerin şekillenmesi üzerine biyokatalitik etkiler gösterebilecekleri ileri sürülmektedir (36).

İkincil aminin türevi olan nitrozaminlerin 10'dan fazla üyeleri vardır. Bunların başlıcaları dibütilnitrozamin, NDMA, DEN, NPYR, nitrososarkosin ve NPIP'dir. Ön karsinojen halinde bulunan bu maddeler, vücutta sırasıyla, diazoalkan, diazonium tuzu ve karbonium iyonuna dönüşmektedirler. Esas karsinojenik etkili olan ve elektrofilik özellikteki bu sonuncu iyon,

deoksiribonükleik asit (DNA), ribonükleik asit (RNA) ve amino asitlerdeki nükleofilik gruplarla birleşerek onları alkiler. Örneğin DNA'da guanin N7- ve O6-grubu üzerinden alkilenir. Bu alkilenme molekülün mutajenik ve karsinojenik özellik kazanmasına neden olmaktadır (62).

Nitrozaminlerin çevredeki kaynaklarını nitrat veya nitrit içeren gıdalar (özellikle ıspanak, şeker pancarı, turpgiller gibi), su, nitratlı etler (sucuk gibi), alkollü içecekler (mayalı içecekler gibi), kozmetikler, sigara ve sigara dumanı ile kauçuk üretimi gibi mesleki maruziyet oluşturmaktadır (1, 48, 62, 98). Bazı gıda maddelerindeki nitrozamin miktarları verilmektedir.

Acet ve ark. (1)'nin tekel satış müdürlüğünden elde ettikleri 8 değişik içki çeşidinde yaptıkları nitrozamin analizi bulguları verilmektedir. Nisbeten düşük miktarlarda tespit edilen nitrozamin düzeylerinin, insanlar için gerçek tehlike olup olmayacağına bilinmediğini fakat kaygı verebilecek miktarda da olabileceğini ileri sürmektedirler.

Çok sayıda ilacın (Aminoprin, fenasetin, kloramfenikol, oksitetrasiklin, karbaril, propoksür, atrazin, fenuron, simazin, thiram, ziram) sodyum nitritle birlikte verildiğinde, nitrozamin şekillenmesine ve karaciğerde tümör riskinin artmasına yol açabileceği, E ve C vitamini, bütil hidroksi anilin (BHA), bütil hidroksi toluen (BHT) gibi yükseltgenmeyi önleyici maddeler, amino asitler, kafein, selenyum, sülfamat, proteinler, sistein, tanen, üre gibi maddelerin N-nitrozo bileşiklerinin şekillenmesini önleyebileceği bildirilmektedir (62).

Akut nitrit zehirlenmesi oluşturulan tavşanlarda yapılan bir çalışmada nitrit verilmesini takiben kontrol grubuna göre, 12. saatte GSH düzeyinde önemli derecede düşme, MDA düzeyinde artış gözlenirken, E vitamini verilen grupta ise değişiklik olmadığı rapor edilmiştir (13).



Nitrozamin oluşumunu etkileyen diğer faktörlerin; gıdalardaki öncül maddelerin miktarı ve varlığı, değıştirici ve inhibitörler, lipitler, antioksidanlar ve su içeriği olduğu öne sürölmektedir (97, 99).

Etteki öncül maddelerin içeriğinin özellikle de glukoz içeriğinin pişirme sırasında nitrozamin oluşumu üzerine önemli derecede azaltıcı bir etkisi olduğu ileri sürölmektedir (97).

Bir kimyasal karsinogen olan DEN'in insektisitlerden, tarımda kullanılan kimyasallardan ve nitrattan şekillendiği, sigara dumanında bulunduğu ve aynı zamanda besinlerde bulunan nitratın midede sekonder ve tersiyer aminlerle reaksiyonu sonucu da meydana geldiği, dokulardaki çok fonksiyonlu mikrozomal monooksijenazlar aracılığıyla mutajenik aktif ara ürönlere çevrildiği bildirilmektedir (5).

Nitrozaminlere endüstride de maruz kalınabilmektedir. Kauçuk endüstrisi işçilerinin bu nedenle kanser riski taşıyabilecekleri ileri sürölmektedir (98).

Birçok ölkede insanların öncelikle NDMA, NPİP ve NPYR olmak üzere 0.3-1 µg/gün nitrozaminlere maruz kaldığı rapor edilmiştir. Maltın direkt ateşte kurutulmasıyla birada şekillenen NDMA'nın miktarının, endüstride indirekt kurutulması sonucu 1979'dan sonra 30 kat azaltıldığı, mutajenik ve karsinogenik nitrozaminlerin bir çoğunun et, tavuk ve balığın, pişirme metodu, zaman ve ısıya bağlı olarak şekillenebileceği öne sürölmektedir (97).

Üretim döngüsünün bitiminden hemen sonra et fabrikalarından toplanan 18 farklı sosis çeşidi üzerinde yapılan bir çalışmada nitrozamin miktarının taze numunelerde düşük tespit edilirken, 72 saat 4-8°C'de depolanan numunelerde 100 kat daha fazla olduğu kaydedilmektedir (36).

### 1.3.2 Organizma Üzerine Etkileri

Nitrozaminler çoğunlukla laboratuvar hayvanları olmak üzere hayvanlarda yaygın bir şekilde çalışılmaktadır (18, 36, 90). Nitrozaminlerin ratlar, fareler ve insan olmayan primatlardaki uzun dönemli çalışmalarında birçok dokuda kansere sebep oldukları ileri sürülmekte fakat kanserlerin oluşumunda nitrozaminlerin rolünün mekanizması hala açıklanamamış bir soru olarak kalmaktadır (87, 97).

Kauçuk endüstrisi işçilerinde nitrozaminlere maruz kalmaları nedeniyle özellikle dudak, ağız ve farenks kanseri oluşumunun yaygın olduğu öne sürülmektedir (98).

Genel olarak yenilen et ve balık ürünleri, pişirmeden sonra mutajenik etkilere sebep olabilmektedir. Nitrozaminlerin oluşumları, gıdalardaki miktarları, maruziyet seviyeleri, alım ve biyotransformasyonlarını etkileyen faktörleri ve bu karsinojenlerle temas eden bireylerin duyarlılık kapasiteleri hala çalışılmaktadır (97).

Elektrofilik bir madde olan DEN'in, nükleik asitlere ve proteinlerde bulunan nükleofilik atomlara bağlanabileceği, RNA ve DNA'da alkilasyona neden olarak protein sentezini inhibe edebileceği bildirilmektedir (5, 48).

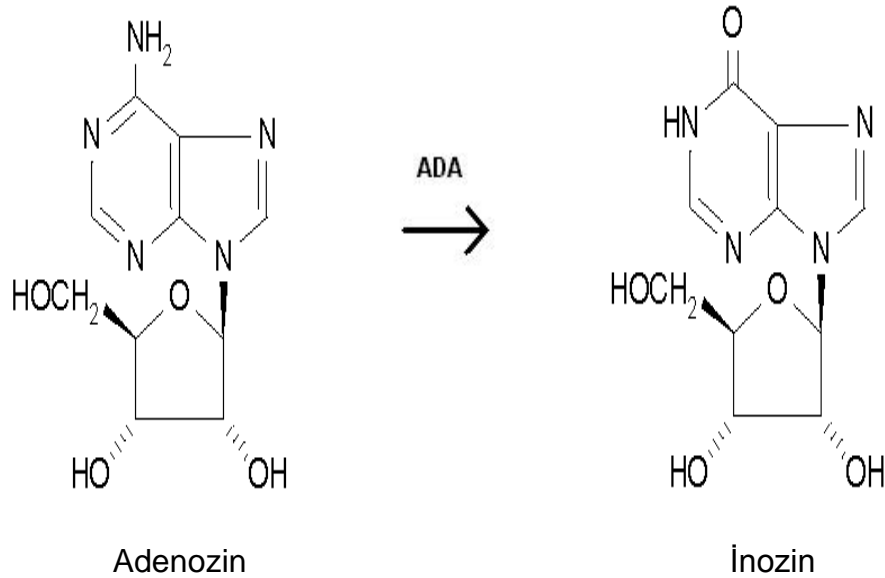
DEN metabolizmasının çok fonksiyonlu sitokrom P-450'ye bağlı monooksijenaz sisteminin enzimleri tarafından katalizlendiği ve metabolik aktivasyonu sonucu toksik etkilerinin başladığı, DEN biyoaktivasyonundan kaynaklanan reaktif ara ürünlerin bağlayıcı enzimlerin katalitik bölgeleri için ilgilerinin çok az olduğu, bu nedenle idrarla atılmak yerine önemli hücre bileşenleriyle kovalan bağlar oluşturabildikleri, bu şekilde mutasyon, kanser ve nekrozun başlamasını uyardıkları öne sürülmektedir (97).

DEN tarafından hücre hasarının uyarılmasında başka bir mekanizma hücre zarı yağ asitlerinin lipoperoksidasyonudur. Nitrozaminlerden salınan serbest radikallerin varlığı mikrozomlarda bulunan lipid peroksidasyonundan köken alan ürünlerdeki ve SOD, CAT, GSH gibi antioksidan maddelerin hücrede kullanılmalarındaki artışlarla belirlenmektedir (97, 99).

#### 1.4 Adenozin Deaminaz (ADA)

Bir aminohidrolaz olan ADA (EC 3.5.4.4) purin metabolizmasının anahtar enzimi olup, adenozin ve deoksi adenozinin hücre içindeki düzeylerini kontrol etmektedir. Adenozinin inozine ve deoksiadenozinin deoksiinozine dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir (4, 104, 113).

##### 1.4.1 Yapı ve Fonksiyonları



Şekil 1.9 Adenozinin ADA Etkisiyle İnozine Dönüşümü (31).

Son yıllarda ADA<sub>1</sub> ve ADA<sub>2</sub> olmak üzere iki izoenzimi belirlenmiştir (31). ADA<sub>1</sub> ana izoenzim olup, özellikle lenfoid organlarda, eritrositlerde, serumda bulunmakta (103) ve ADA<sub>1m</sub> ile ADA<sub>1c</sub> olmak üzere iki dimere ayrılmaktadır (4). Küçük olanı 33.000, büyüğü ise 280.000 daltondur. Sadece 1

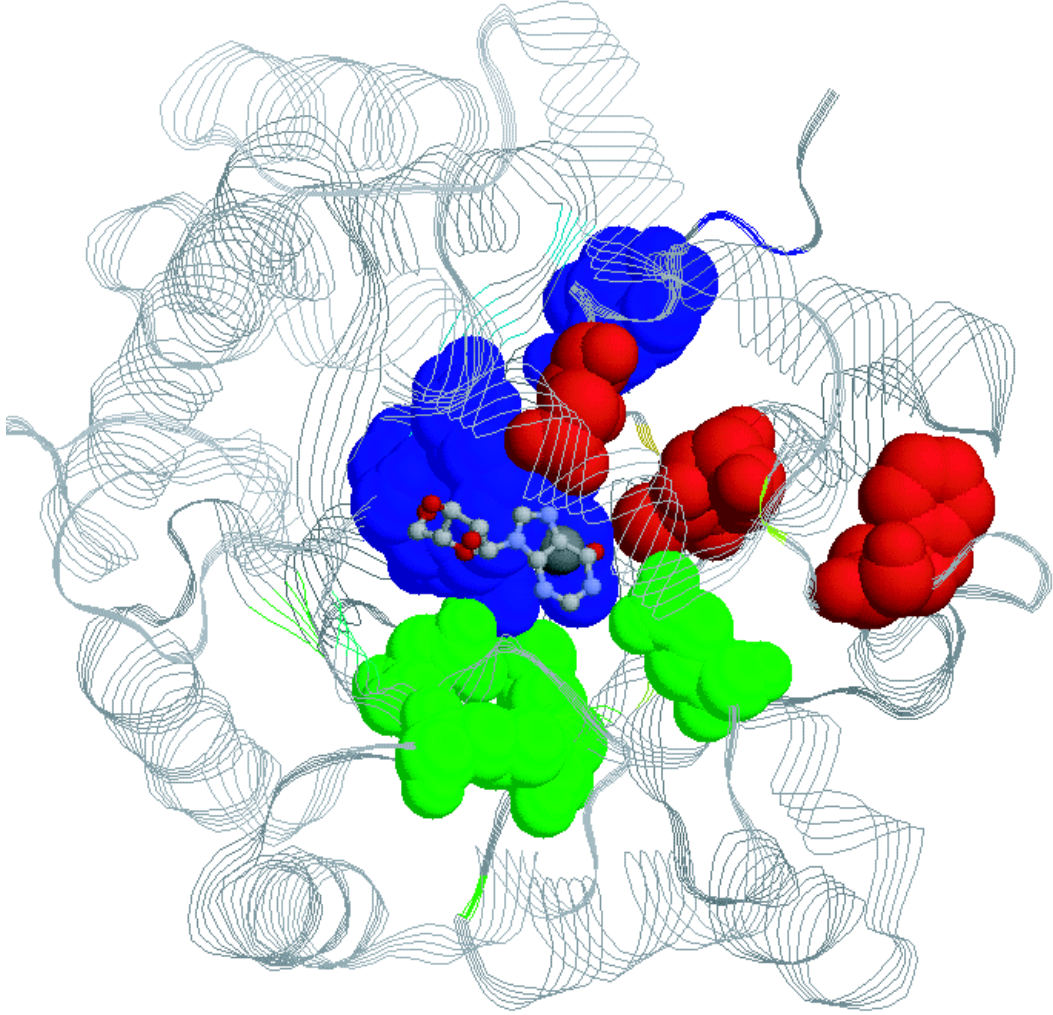
monomerden oluşan ADA<sub>2</sub> (molekül ağırlığı 100.000 dalton) ise diğer dokularda da olmakla beraber temel olarak serumda bulunmakta (31, 103) ve monosit/makrofaj aktivasyonunu göstermektedir (4). Hücrede ise sitoplazmada ve çekirdekte bulunmaktadır (9).

Pürin metabolizması enzimlerinin kongenital bozuklukları bir çok immun yetmezlik sendromuna neden olmaktadır. ADA eksikliği, T ve B hücrelerinin gelişim ve fonksiyon bozukluğuna yol açarak ciddi kombine immun yetmezlik sendromuna neden olmaktadır. Bu gibi immun yetmezlikler hücre içi pürin metabolizması anormalliği ve ardından toksik metabolitlerin birikimine yol açar. Lenfositlerin hücre yüzeyinde (ekto-ADA) de bulunduğundan ADA'nın spesifik rolü sadece hücre içi ile sınırlı değildir. Bu nedenle, ekto-ADA ile diğer hücre yüzeyi molekülleri arasında bir etkileşim vardır. Böyle etkileşimler bir hücrede bulunan ekto-ADA ile diğer hücredeki yüzey molekülleri arasında da meydana gelebilmektedir. Bundan dolayı ekto-ADA immun dokuların kanserleşmesinde gösterge olabilmektedir (43).

Hücrelerde ATP havuzlarının yenilenmesi için yüksek adenzin düzeylerine ihtiyaç duyulmaktadır. Hem reseptör aktivasyonu hem de ATP sentezi için adenzinin kullanılabilirliği adenzin miktarıyla belirlenmektedir. ADA adenzini yıkımlayan en önemli enzim olduğundan stres koşullarında aktivitesinin inhibisyonu dokularda adenzinin birikimini sağlayan en önemli yol olmaktadır (17).

ADA'nın en önemli fizyolojik rolü lenfositlerin farklılaşması ve çoğalmasıyla ilgilidir. ADA aktivitesi lenfositlerde eritrositlere oranla 10 kat daha fazla, T lenfositlerde ise B lenfositlere göre daha yüksek oranlarda bulunmaktadır. T hücrelerinin farklılaşması esnasında özellikle olgunlaşmamış ve farklılaşmamış hücrelerde belirgin artış olmaktadır (15, 50, 114). Antijenik uyarılardan sonra lenfositlerde ve monositlerin makrofajlara dönüşümü sırasında ADA'nın aktivitesinin artabileceği öne sürülmektedir (53).

Farelerin farklı dokularında ADA aktivitesinin yüksekten düşüğe doğru sırasıyla dil, özafagus, plasenta, duodenum, mide, timus, dalak, kolon, karaciğer ve beyinde olduğu rapor edilmiştir (111).



Şekil 1.10 ADA'nın Nükleotidle Bağlanmış Üç Boyutlu Şekli. (Mavi renk  $\beta$ -1 zinciri ve üzerinde bulunan halkalı yapı ise substratı göstermektedir. Büyük yeşil ve kırmızı kümeler adenosin halkasına özel N1 ve N7 belirleyicilerdir. Ortadaki kırmızı histidin metal bağının aromatik halkasına karşı bir sistein paketidir) (51).

### 1.4.2 Klinik Önemi

Özellikle tüberkülozda yüksek düzeyde saptanan ADA aktivitesinin esas kaynağının ADA<sub>2</sub> olduğu, pahalı bir yöntem olması nedeniyle olguların büyük çoğunluğunda ADA izoenzimlerinin ayırımına gitmeye gerek kalmadığı kaydedilmiştir. ADA aktivitesinin tayininin biyopsi ve kültür yöntemlerine alternatif olarak tercih edilebileceği ve konvansiyonel yöntemlerin tanı açısından olumsuz kaldığı hastalarda uygulanabileceği bildirilmektedir. Tüberkülozda diğer eksüdatlara oranla çok daha yüksek ADA aktivitesinin saptandığı, bununla birlikte parapnömonik effüzyon, ampiyem, romatoid plörezi, sistemik lupus eritematozis ve özellikle hemotopoietik kökenli neoplazmlarda da yüksek ADA aktivitesinin görülebileceği ileri sürülmektedir (4).

Lösemili sığırlarda yapılan bir çalışmada subklinik vakalarda lösemnin teşhis ve prognozunda serum ADA aktivitesinin bir gösterge olabileceği öne sürülmektedir (113).

Deri leishmaniosisinde de serum ve lenfositlerde ADA aktivitesinin arttığı, serumdaki bu artışın makrofajların fagositik aktivitesini gösterebileceği rapor edilmiştir (40).

ADA aktivitesi hücre immunitisini uyaran enfeksiyonlarda artmaktadır. Kronik hepatit, karaciğer sirozu, hepatosellüler karsinoma gibi immun sistemin uyarıldığı karaciğer hastalıklarında serum ADA aktivitesi yüksek bulunmaktadır (9, 41, 104).

ADA immun sistemin bir belirteci olduğundan tifo, enfeksiyöz mononükleoz, sarkoidoz, karaciğer hastalıkları, akut lösemi, bruselloz, akut pnömoni, romatoid artrit ve mesothelioma gibi malignitelere serumdaki aktivitesinin arttığı bildirilmektedir (15, 50, 114).

Özellikle T lenfositlerinde aktivitesi yüksek bulunan enzimin kalıtsal eksikliği T ve B lenfositlerinin fonksiyonlarının bozulması ile şiddetli kombine immun yetmezlik sendromuna yol açmaktadır (6, 42). Sayısal ve fonksiyonel T lenfosit defektlerine bağlı immun sistem bozukluklarında ADA aktivitesinin azaldığı ve bu nedenle ADA'nın hücrel immunitenin bir göstergesi olarak kullanılabileceği kaydedilmektedir (6, 50).

İmmun sistemle ilgili özelliklerinden dolayı ADA inhibitörlerinin immun sistemi baskılayıcı tedaviler (doku naklinde) ve lenfoproliferatif hastalıklarda kullanılabileceği ileri sürülmektedir (105).

Koyunlarda yapılan bir çalışmada (6), ADA aktivitesinin gebeliğin ilerlemesiyle paralel olarak düştüğü izlenmiş, bu durumun fötusun büyümesi ve enerji depolaması için adenozinin yüksek olması nedeniyle ADA'nın düşük olmasından veya gebelikte hücrel immunitenin baskılanmasından kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür.

Aktepe ve ark. (3), serum ADA aktivitesini sıtma hastalarında sağlıklı bireylerlere göre önemli derecede yüksek tespit etmiş ve bu durumun parazitin enzim aktivite artışına neden olmasından veya eritrosit hücre hasarından kaynaklanabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Kedilerde enfeksiyöz peritonitis ve bakteriyel enfeksiyonlarda pleural ve peritoneal eksudatlarda ADA aktivitesinin yükseldiği ve bu durumun hastalıkların ayırıcı teşhisinde yardımcı olabileceği bildirilmiştir (53).

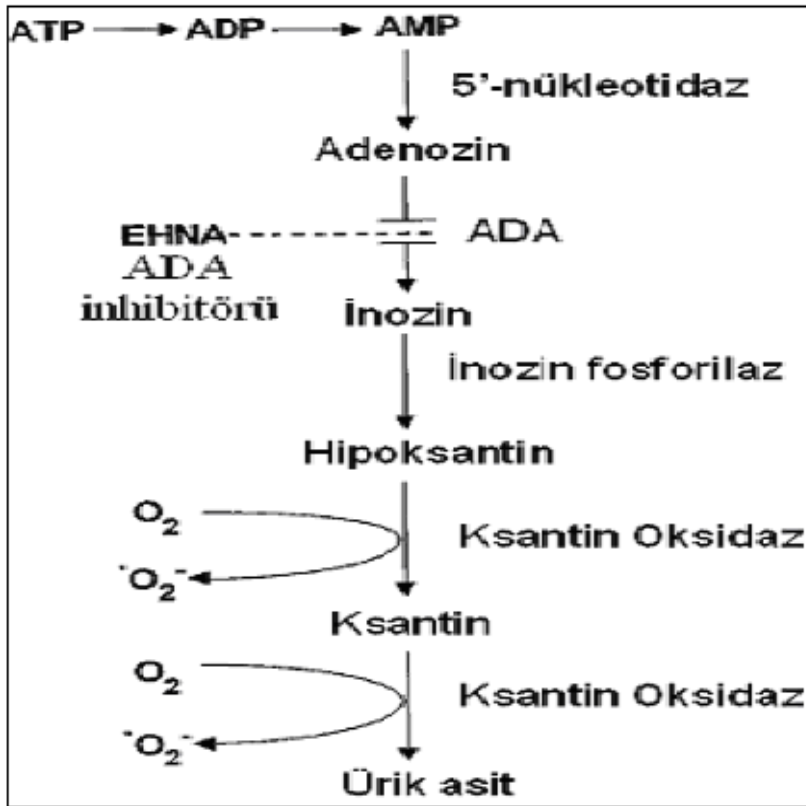
Doku adenozin miktarını azaltarak insulinin glukoz ve lipit metabolizması üzerine etkilerini düzenlenmede önemli rol oynayan ADA aktivitesinin Tip II diyabetli hastalarda arttığı bulunmuştur (39).

Bahçecioğlu ve ark. (16), karaciğer sirozlu hastalarda serum ADA aktivitesinin arttığını, bunun nedeninin sirotik karaciğerin yetersiz kalması

nedeniyle nükleotid sentezinin diğer dokularda artmış olmasından kaynaklanabileceğini ve serum ADA aktivitesiyle hastalığın klinik evresinin ilişkilendirilebileceğini ileri sürmektedirler.

ADA aktivitesi fare plasentasında yüksek düzeylerde bulunmakta ve purin metabolizması için gerekli olmaktadır. Bu enzimin eksikliği fötusların bağlı olduğu plasentada da eksikliğe yol açarak, gebeliğin ileri döneminde fetal ölümlere sebep olmaktadır. ADA koriyoallantoik plasentanın trofoblast hücrelerinde yoğunlaşmakta, embriyonik ve fetal gelişim için önemli rol oynamaktadır (6, 69).

Xia ve ark. (112), reperfüze rat kalbinde ADA'yı inhibe etmişler ve böylece hipoksantin ve ksantin miktarlarını azaltmak suretiyle serbest radikal üreten ksantin oksidazı (Şekil 1.11) inhibe ederek radikal oluşumunun önlenebileceğini ileri sürmektedirler.



Şekil 1.11 ATP'nin Yıkılım Yolu Üzerinde ADA Etkisinin Önemi (112).



Gelişen gıda teknolojisi ile beraber nitrat, nitrit gibi katkı maddeleri ve değişen beslenme alışkanlıkları ( $\omega$ -3 yağ asiti oranı düşük, doymuş yağ oranı yüksek ve kolesterollü diyetler) organizmada geriye dönüşümsüz hasarlar meydana getirmekte ve metabolik olayların çoğunun meydana geldiği karaciğer bu durumdan en çok etkilenen organ olmaktadır.

Bu nedenle çalışmada, son yıllarda yoğun bir şekilde araştırılan  $\omega$ -3 yağ asitlerinin, DEN ile meydana getirilen karaciğer hasarına karşı koruyucu etkisinin araştırılması amaçlanmaktadır.

## 2 MATERYAL ve METOT

### 2.1 Materyal

Çalışmada materyal olarak satın alınan ebeveynlerden yetiştirilen, ortalama 4 aylık ve  $212 \pm 6,41$  g olan 40 adet Wistar albino cinsi erkek rat kullanıldı. Ratlar havalandırma, ısı (20-22°C), nem, ışık kontrollü (12 saat aydınlık 12 saat karanlık) olarak üretildi. Tüm hayvanlara ticari rat yemi ve su *ad libitum* olarak verildi. Denemeye başlamadan önce ratlar her grupta 10'ar adet olmak üzere 4 gruba ayrıldı.

**Grup I (Kontrol):** Periton içi (IP) yolla tek doz % 0,9'luk NaCl çözeltisi verildi.

**Grup II:** Tek doz 150 mg/kg DEN (IP) verildi.

**Grup III:** Tek doz 150 mg/kg DEN (IP) ve  $\omega$ -3 yağ asiti içeren balık yağı 0,4 g/kg/gün dozda yedi gün boyunca derialtı (SC) verildi.

**Grup IV:**  $\omega$ -3 yağ asiti içeren balık yağı 0,4 g/kg/gün dozda yedi gün boyunca SC verildi.

Uygulamaya başlamadan önce ve deneme boyunca ratlar her gün tartılarak ağırlıkları kaydedildi.

#### 2.1.1 Kan Örneklerinin Toplanması ve İşlenmesi

Uygulama sonunda eter anestezisi altında ratların kalplerinden heparinli tüplere alınan kan örneklerinden bir miktar GSH düzeylerinin saptanması amacıyla ayrıldı. Geriye kalan kanın, MDA ve ADA parametrelerinin ölçülmesi için 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek plazması ayrıldı.

Numuneler ölçümleri yapıncaya kadar -25°C'de derin dondurucuda saklandı. GSH Beutler (22), MDA Yoshoiko ve ark. (115) ve ADA analizleri Giusti ve Galanti'nin metoduna (47) göre yapıldı.

### **2.1.2 Karaciğer Dokularının Alınması**

Kan örnekleri alındıktan sonra öldürülen ratların karın boşlukları açılarak alınan karaciğer dokuları patolojik bulgular yönünden incelenmek amacıyla % 10'luk formolde saklandı.

## **2.2 Metot**

### **2.2.1 Analizler İçin Kullanılan Cihazlar**

Spektrofotometre (UV-1201, Shimadzu)  
Santrifüj (Heraeus christ)  
Etüv (Nüve)  
Su banyosu (SB100, Nüve)  
Otomatik pipetler (Eppendorf)  
Hassas terazi (Scaltec)  
Taşınabilir terazi  
Vorteks (Labinco-524)  
Saf su cihazı (Heidolph, type-mono, Dest -3000)  
Manyetik karıştırıcı (Labinco-532)  
pH metre (Consort C 732)  
Derin dondurucu (So-low Environmental Equip.Co.)

### **2.2.2 Analizler İçin Kullanılan Kimyasal Maddeler**

DEN (Sigma) (d: 0,95 g/ml)  
ω-3 yağ asiti kapsülü (Marinkap: Koçak Farma)  
Metafosforik asit (Merck)

Etilendiamin tetra asetik asit (EDTA) (Merck)

NaCl (Merck)

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (Merck)

5,5'-(2-ditiobis nitrobenzoik asit (DTNB)

Sodyum sitrat (Merck)

GSH (Merck)

Tiyobarbütirik asit (TBA) (Merck)

Triklor asetik asit (TCAA) (Merck)

1,1,3,3-tetraetoksiopropan (Sigma)

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (Merck)

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O (Merck)

Adenosine (Calbiochem)

Amonyum sülfat (Merck)

Fenol (Merck)

Na-nitroprussid (Merck)

NaOCl (Merck)

NaOH (Merck)

### **2.2.3 Tüm Kanda GSH Tayini**

Tüm kanda GSH analizleri Beutler yöntemi (22) ile yapıldı.

#### **2.2.3.1 Deneyin Prensibi**

EDTA'lı kanın distile su ile hazırlanan hemolizatında, -SH taşımayan tüm proteinler çöktürülür. Elde edilen berrak sıvıda -SH gruplarının DTNB (5,5'-(2-ditiobis nitrobenzoik asit) ile oluşturduğu sarı renkli kompleks, 412 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçülür.

### 2.2.3.2 Deneyde Kullanılan Çözeltiler

**Çöktürücü Çözelti:** 1,67 g metafosforik asit, 0,2 g EDTA, 30 g NaCl alınarak bir miktar distile suda çözüldü ve hacim 100 ml'ye tamamlandı.

**Fosfat Çözeltisi (0,3 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>):** 53,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O distile suda çözümlenerek, hacim litreye tamamlandı.

**DTNB (Ellman's çözeltisi):** 40 mg DTNB alındı ve % 1'lik sodyum sitrat ile hacim 100 ml'ye tamamlandı.

**Standart GSH Çözeltisi:** 40 mg GSH distile suda çözüldü ve hacim 100 ml'ye tamamlandı.

### 2.2.3.3 Deneyin Yapılışı

Kör, standart ve test olarak işaretlenen tüplerden test tüpüne, EDTA'lı kandan 200 µl, standart tüpüne standart çözeltisinden 200 µl alındı. Üzerine 1800 µl distile su (kanın hemoliz olması için) ve 3 ml çöktürücü çözelti eklendi. Kör olarak işaretlenen tüpe 800 µl distile su üzerine 1200 µl çöktürücü çözelti pipetlendi. Tüpler karıştırıldı ve buzlu suda 5 dakika bekletilip, 3000 devirde 10 dakika santrifüj edildi. Kör tüpü aynen alındı. Standart ve test olarak işaretlenen yeni tüplere 2'şer ml süpernatant alındı. Bütün tüplere 8'er ml fosfat çözeltisi ilave edilip karıştırıldı. 1 ml DTNB eklenerek 412 nm dalga boyunda köre karşı standart ve testin optik dansitesi okundu.

	<b>Kör</b>	<b>Standart</b>	<b>Test</b>
<b>EDTA'lı Kan</b>	-	-	200 µl
<b>Standart</b>		200 µl	-
<b>Distile Su</b>	800 µl	1800 µl	1800 µl
<b>Çöktürücü Çözelti</b>	1,2 ml	3 ml	3 ml
Buzlu suda 5 dakika bekletildi. Ardından 3000 devirde 10 dakika santrifüj edildi ve başka tüplere süpernatantdan 2 ml aktarıldı.			
<b>Fosfat Çözeltisi</b>	8 ml	8 ml	8 ml
Karıştırıldı			
<b>DTNB</b>	1 ml	1 ml	1 ml
412 nm'de tüplerin optik dansitleri köre karşı okundu.			

#### 2.2.3.4 Sonuçların Hesaplanması

Tüm kan GSH derişimi mg/dl olarak aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

GSH (mg/dl)=Testin Optik Dansitesi / Standardın Optik Dansitesi x Standardın derişimi (40 mg/dl).

#### 2.2.4 Plazmada MDA Tayini

Plazma MDA analizi Yoshiko ve ark.'nın (115) bildirdiği yöntem kullanılarak yapıldı.

##### 2.2.4.1 Deneyin Prensibi

TBA tepkimesinde lipit içerik, düşük pH ve TBA varlığında ısıtıldığında 532-535 nm'de minimum pik oluşturan MDA molekülü ile iki TBA molekülünün birleşmesi sonucu oluşan kromojenden dolayı stabil kırmızı-pembe renk meydana gelir. MDA'nın bir kısmı peroksidasyon sırasında, büyük çoğunluğu

ortam asitleştirildikten sonra uygulanan ısıtma aşamasında lipit peroksitlerinin yıkılması sonucu oluşur.

#### 2.2.4.2 Deneyde Kullanılan Çözeltiler

**Triklorasetik asit (% 20):** 20 g TCAA distile suda çözüldü ve hacim 100 ml'ye tamamlandı.

**Tiyobarbütirik asit (% 0,67):** 1,675 g TBA distile suda çözüldü ve hacim 250 ml'ye tamamlandı.

#### 2.2.4.3 Deneyin Yapılışı

Test ve kör olarak işaretlenen cam deney tüpleri alındı ve test tüpüne 0,5 ml plazma pipetlendi. Kör tüpüne 3 ml ve test tüpüne 2,5 ml % 20'lik TCAA ilave edildi. Daha sonra her iki tüpe 1 ml TBA alındı ve tüpler 90°C'lik su banyosunda 30 dakika inkübe edildi, soğutuldu ve üzerine 4 ml n-butanol pipetlenerek 3000 devirde 10 dakika santrifüj edildi. Daha sonra n-butanol tabakası spektrofotometre küvetine aktarılarak 535 nm'de köre karşı testin absorbansı spektrofotometrede okundu.

	<b>Kör</b>	<b>Test</b>
<b>Plazma</b>	-	500 µl
<b>TCAA</b>	3 ml	2,5 ml
<b>TBA</b>	1 ml	1 ml
90 °C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra tüpler su altında soğutuldu.		
<b>n-Bütanol</b>	4 ml	4 ml

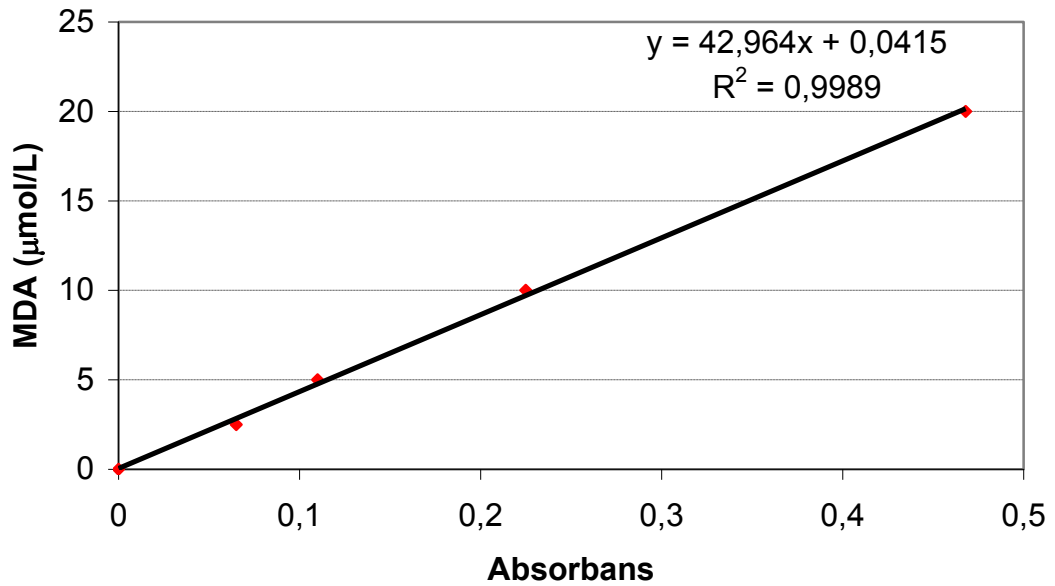
3000 devirde 10 dakika santrifüj edildi.

Oluşan tabaka ayrılarak 535 nm'de köre karşı optik dansiteler okundu.

#### 2.2.4.4 Sonuçların Hesaplanması

Sonuçlar kalibrasyon eğrisinden bulundu.

0,494 ml 1.1.3.3-tetraetoksipropan 100 ml alkolde çözülerek, 20 mmol/L'lik stok standart çözelti hazırlandı. Bundan 0,1 ml alınarak hacmi 100 ml'ye tamamlandı ve 20  $\mu\text{mol/L}$ 'lik standart çözelti elde edildi. Bu çözelti ile 2,5-5-10  $\mu\text{mol/L}$ 'lik dilüsyonlar hazırlanarak yukarıdaki şekilde çalışıldı ve 535 nm'de köre karşı optik dansiteleri okunarak kalibrasyon eğrisi çizildi.



Grafik 2.1 MDA Düzeyinin Saptanmasında Kullanılan Kalibrasyon Eğrisi.

#### 2.2.5 Plazmada ADA Aktivitesinin Tayini

ADA aktivitesi Giusti ve Galanti metodu (47) ile tayin edildi.

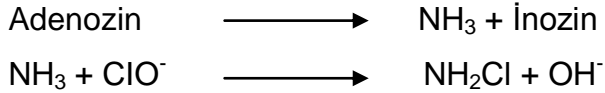
##### 2.2.5.1 Deneyin Prensibi

Bu deneyde substrat olarak kullanılan adenozin, numune ile 37°C'de 1 saat inkübe edilmek suretiyle oluşan amonyak, alkali ortamda sodyum hipoklorit



ve fenol ile kuvvetli olarak mavi indofenol oluşturur. Amonyak derişimi indofenolün absorbansıyla doğru orantılıdır. Sodyum nitroprussid katalizör etkisi gösterir.

Toplam reaksiyonlar şu şekilde gösterilebilir



### 2.2.5.2 Deneyde Kullanılan Çözeltiler

**Fosfat tamponu (50 mmol/L, pH: 6,5):** 5,34 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ve 5,62 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  redistile suda çözüldü. pH 6,5'e ayarlanarak hacmi litreye tamamlandı.

**Tamponlanmış adenozin çözeltisi (adenozin 21 mmol/l, fosfat 50 mmol/l, pH: 6,5):** 50 ml'lik balonda 280 mg adenozin üzerine yaklaşık 30 ml fosfat tamponu ilave edildi. pH'sı 6,5'e ayarlanarak fosfat tamponu ile hacmi 50 ml'ye tamamlandı.

**Amonyum sülfat stok çözeltisi (15 mmol/L):** 1,982 g amonyum sülfat redistile suda çözümlenerek hacmi litreye tamamlandı.

**Amonyum sülfat standart çözeltisi (75  $\mu\text{mol/L}$   $\text{NH}_3$ ; 150  $\mu\text{mol/L}$ ):** 0,5 ml amonyum sülfat stok çözeltisi fosfat tamponu ile 100 ml'ye dilue edildi.

**Fenol nitroprussid çözeltisi (fenol 106 mmol/L, nitroprussid 0,17 mmol/L):** 10 g fenol ve 50 mg sodyum nitroprussid 500 ml redistile suda çözümlenerek hacmi litreye tamamlandı.

**Alkali hipoklorid çözeltisi (NaOCl 11 mmol/L, NaOH 125 mmol/L):** 5 g NaOH ve 8,2 ml NaOCl karıştırılarak hacmi redistile su ile litreye tamamlandı.

### 2.2.5.3 Deneyin Yapılışı

Reaktif körü, standart, numune ve numune körü olmak üzere 4 adet deney tüpü alındı. Reaktif körü tüpüne 1 ml fosfat tamponu ile 0,05 ml distile su, standart tüpüne 1 ml amonyum sülfat ile 0,05 ml distile su, numune tüpüne 1 ml adenzin çözeltisi ile 0,05 ml numune, numune körü tüpüne ise 1 ml adenzin çözeltisi pipetlendi. Tüplerin ağzı parafilmle kapatıldıktan sonra 37°C'lik su banyosunda 1 saat inkübe edildi. Bütün tüplere 3 ml fenol/nitroprussid çözeltisinden ilave edildi. Numune körü tüpüne 0,05 ml numune eklendikten sonra bütün tüplere 3 ml alkali hipoklorid çözeltisinden ilave edilerek tekrar tüplerin ağzı parafilmle kapatıldı ve 37°C'lik su banyosunda 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra su körüne karşı tüplerin optik dansiteleri 625 nm'de okundu.

	Reaktif Körü	Standart	Numune Körü	Numune
Fosfat tamponu	1,0 ml	-	-	-
Adenzin	-	-	1,0 ml	1,0 ml
Amonyum sülfat	-	1,0 ml	-	-
Plazma	-	-	-	0,05 ml
Distile su	0,05 ml	0,05 ml	-	-
Parafilmle ağzıları kapatılarak vorteks ile karıştırıldı. 37°C'de 1 saat inkübe edildi.				
Fenol/nitroprussid	3,0 ml	3,0 ml	3,0 ml	3,0 ml
Plazma	-	-	0,05 ml	-
Alkali hipoklorid	3,0 ml	3,0 ml	3,0 ml	3,0 ml

Tüplerin ağzı tekrar parafilmle kapatılarak vorteks ile karıştırıldı. 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra su körüne karşı tüplerin optik dansiteleri 625 nm'de okundu.

#### 2.2.5.4 Sonuçların Hesaplanması

ADA değerleri U/L cinsinden aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$\text{ADA (U/L)} = \text{A/B} \times 50 = \mu\text{mol/dakika/L}$$

A: Numunenin absorbansı – numune krnn absorbansı

B: Standartın absorbansı – reaktif krnn absorbansı

50: Sulandırma faktörü ve standart derişiminden elde edilen faktör.

#### 2.2.6 Karaciğer Dokusunun Patolojik Olarak İncelenmesi

Karaciğer dokusunun patolojik yönden incelenmesi Luna'nın bildirdiği metoda göre (76) yapıldı.

Doku parçaları alındıktan sonra %10'luk tamponlu formalinde, özel yağ boyaması içinde, karaciğerlerin bir bölümü kalsiyum-formol zeltisine alınarak tespit edildi. Tamponlu formaldehit zeltisinde tespit edilen dokular eşme suyunda yıkanarak dereceli alkoller, ksilol ve parafin serilerinden geçirilerek parafinde bloklandı.

Parafin bloklardan mikrotom ile 5  $\mu$  kalınlığında kesitler alınarak, bu kesitlere rutin hemotoksilen-eozin boyaması, gerekli görülen kesitlere de PAS ve Gomori'nin methenamine-silver boyamaları uygulandı. Kalsiyum-formolde tespit edilen dokulardan kriostatta 10  $\mu$  kalınlığında kesitler alınarak Sudan siyahı ile boyandı.

Bütün kesitler ışık mikroskopunda incelenerek gerekli görülenlerden fotoğraflar alındı.

### 2.3 İstatistiksel Analizler

Elde edilen verilerin istatistik analizlerinin hesaplanmasında SPSS Windows 6,0 paket programından yararlanıldı. Gruplar arasındaki ortalama değerler arasındaki farklılıklar varyans analizi (ANOVA) ve duncan testi ile belirlendi. Sonuçlar; ortalama±standart hata ( $\bar{x}\pm S_x$ ) olarak verildi.

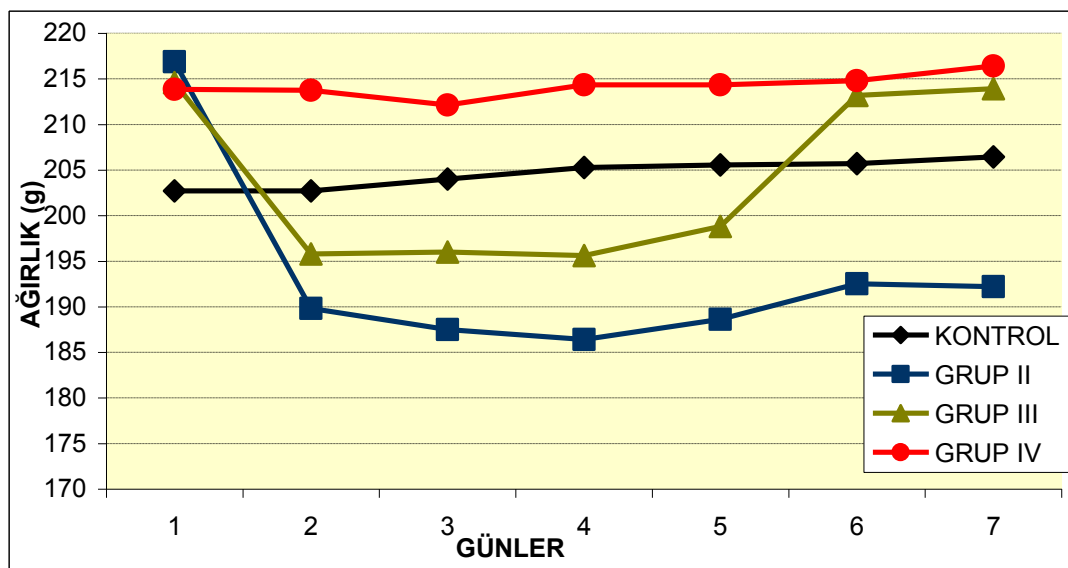
### 3 BULGULAR

#### 3.1 Klinik ve Biyokimyasal Bulgular

Gruplardaki hayvanların günlere göre ağırlık değişimleri Tablo ve Grafik 3.1'de gösterilmiştir. Kontrol ve grup IV'te bulunan hayvanların ağırlıklarında anormal bir dalgalanma gözlenmezken, grup II ve III'teki hayvanlarda özellikle denemenin 2. gününden başlayan ve 4. günde en düşük seviyeye ulaşan azalmalar tespit edildi. Grup II ve III'te denemenin 4. gününden itibaren ağırlıkta bir toparlanma görüldü. Ancak grup III'teki ağırlık kazanımı denemenin sonunda başlangıçtaki ağırlık değerlerine oldukça yakın bulundu.

Tablo 3.1 Grupların Günlere Göre Ağırlık (g) Değişimleri

Günler	Kontrol	Grup II	Grup III	Grup IV
1.	202,71±15,43	216,86±12,75	214,57±14,82	213,86±09,42
2.	202,71±15,59	189,83±10,88	195,79±10,57	213,74±09,93
3.	204,00±15,51	187,51±10,28	196,00±09,69	212,14±09,58
4.	205,29±15,49	186,41±10,48	195,60±09,20	214,34±09,01
5.	205,57±15,36	188,63±10,92	198,81±09,03	214,35±08,77
6.	205,71±15,42	192,51±11,08	213,20±12,44	214,79±08,80
7.	206,43±15,17	192,21±10,99	213,90±12,36	216,40±08,59



Grafik 3.1 Grupların Günlere Göre Ağırlık Değişimleri

Kontrol, grup II, III ve IV'ün plazma ADA aktiviteleri sırasıyla  $6,82\pm 0,47$ ,  $2,67\pm 0,26$ ,  $3,30\pm 0,31$ ,  $6,89\pm 0,36$  U/L olarak bulundu (Tablo 3.2), II. ve III. gruplarda, kontrole göre plazma ADA aktivitelerinde bir azalma ( $p<0,001$ ) bulunurken, grup IV'te istatistiksel olarak fark bulunamadı. Grup III'te grup II'ye göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış tespit edildi.

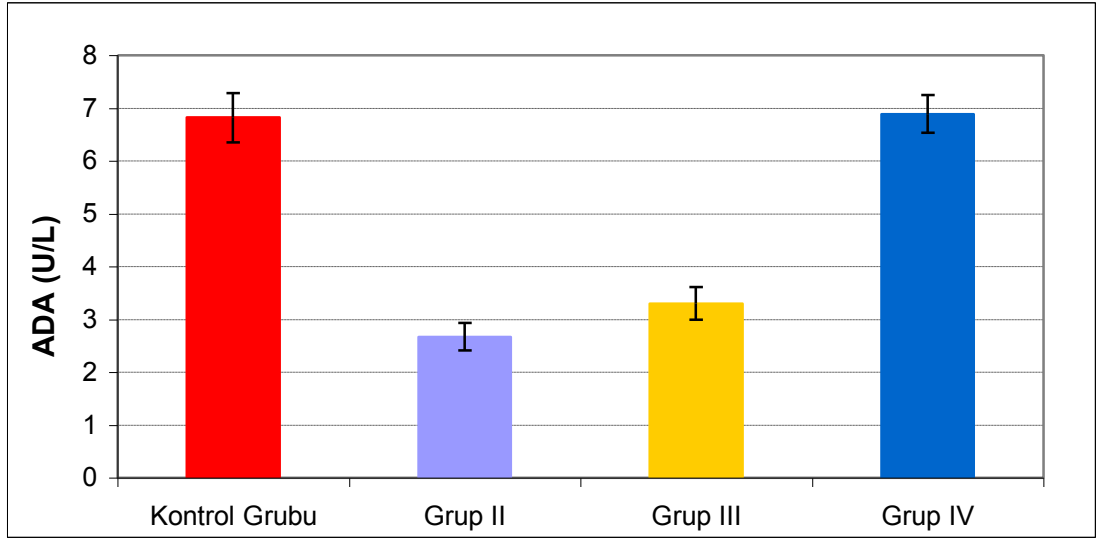
Kontrol, grup II, III ve IV'ün plazma MDA düzeyleri sırasıyla  $4,23\pm 0,16$ ,  $6,27\pm 0,34$ ,  $3,82\pm 0,20$ ,  $4,09\pm 0,13$   $\mu\text{mol/L}$  olarak bulundu (Tablo 3.2). Grup II'de kontrol grubuna göre plazma MDA konsantrasyonlarında  $p<0,001$  düzeyinde artış bulunurken, grup III ve IV'te istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilemedi. Grup III'te grup II'ye göre önemli derecede düşüş ( $p<0,001$ ) bulundu.

Kontrol, grup II, III ve IV'ün tüm kan GSH konsantrasyonları sırasıyla  $58,67\pm 1,88$ ,  $29,11\pm 1,58$ ,  $52,83\pm 1,37$ ,  $55,80\pm 1,06$  mg/dl olarak bulundu (Tablo 3.2). GSH derişimlerinde kontrole göre, grup II ve III'te bir azalma ( $p<0,001$ ) bulunurken, grup IV'te önemli bir fark tespit edilemedi. Grup III'te ise grup II'ye göre bir artış ( $p<0,001$ ) tespit edildi.

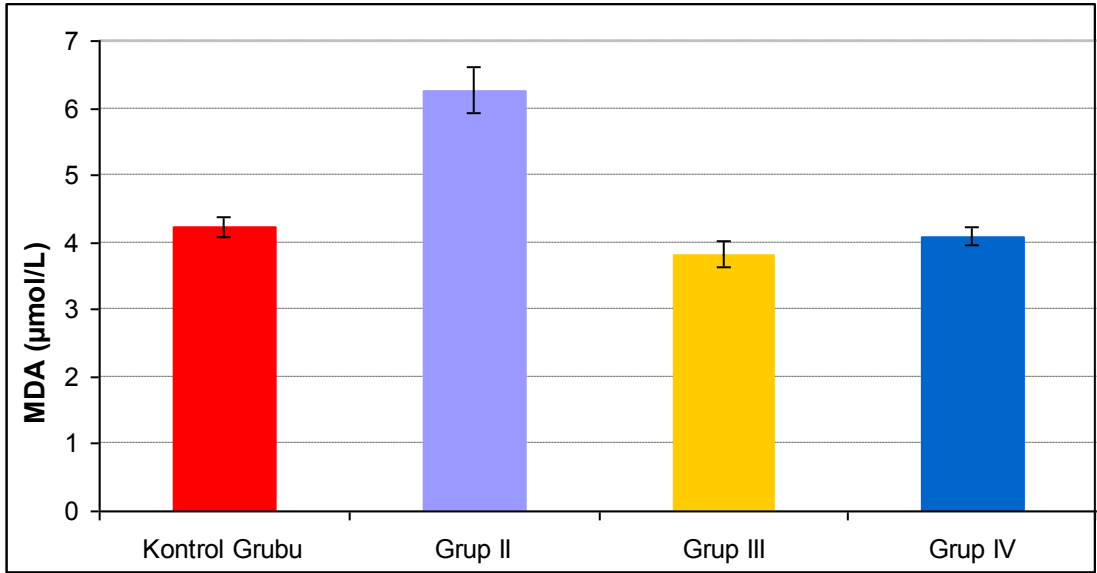
Tablo 3.2 Gruplarda ADA aktivitesi ile GSH ve MDA Düzeyleri.

	KONTROL	GRUP II	GRUP III	GRUP IV	P
<b>ADA</b> (U/L)	$6,82\pm 0,47^a$	$2,67\pm 0,26^b$	$3,30\pm 0,31^b$	$6,89\pm 0,36^a$	<0,001
<b>MDA</b> ( $\mu\text{mol/L}$ )	$4,23\pm 0,16^b$	$6,27\pm 0,34^a$	$3,82\pm 0,20^b$	$4,09\pm 0,13^b$	<0,001
<b>GSH</b> (mg/dl)	$58,67\pm 1,88^a$	$29,11\pm 1,58^c$	$52,83\pm 1,37^b$	$55,80\pm 1,06^{ab}$	<0,001

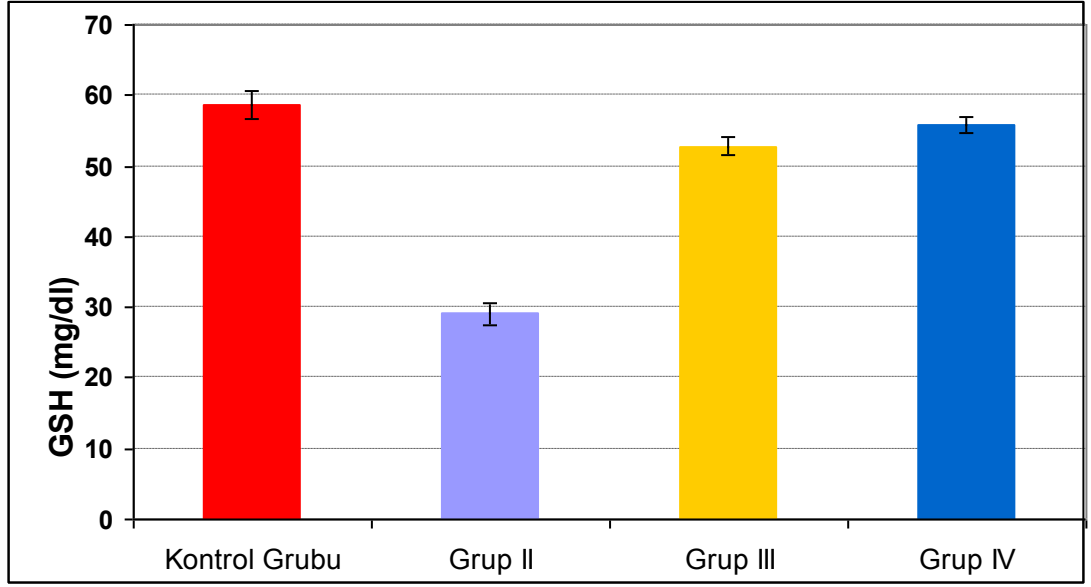
a, b, c: Aynı satırdaki gruplar arası istatistiksel farkı gösterir.



Grafik 3.2 Plazma ADA Aktiviteleri.



Grafik 3.3 Plazma MDA Düzeyleri.



Grafik 3.4 Tüm Kan GSH Düzeyleri.

### 3.2 Patolojik Bulgular

#### 3.2.1 Makroskopik Bulgular

Kontrol grubu: Makroskopik olarak bu gruptaki ratların karaciğerlerinde herhangi bir patolojik bulguya rastlanmadı.

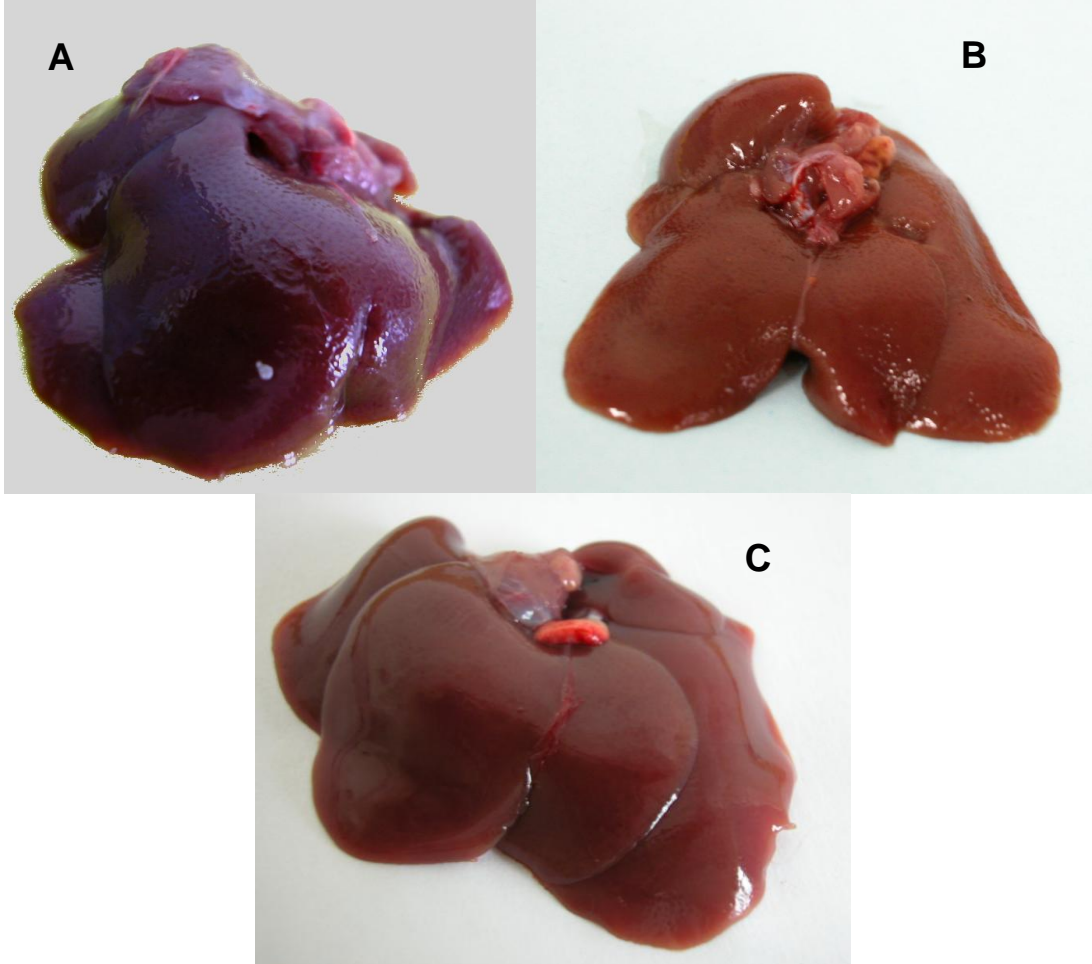
Grup II: Otopsi yapılan ratların makroskopik incelenmesinde karaciğerlerinin şiddetli hiperemik görünümde, kenarlarının küt ve gevrek kıvamda olduğu, karaciğer kapsulasının pürüzlü ve yaygın bir şekilde toplu iğne ucu büyüklüğünde çöküntülerle kaplı olduğu gözlemlendi (Şekil 3.1 A).

Grup III: Otopsi yapılan ratların makroskopik incelenmesinde karaciğerlerinin sarımsak soluk renkli olduğu, kapsulanın pürüzlü görüldüğü, yer yer toplu iğne ucu büyüklüğünde çöküntü alanları içerdiği belirlendi (Şekil 3.1 B).

Grup IV: Otopsi yapılan ratların makroskopik incelenmesinde karaciğerlerinin oldukça büyümüş, keskin kenarlarının düzleşmiş olduğu görüldü. Karaciğer



kapsulasının parlak, pürüzsüz ve muntazam, kesit yüzünün normal görünümde, kıvamının gevrek olduğu olduğu belirlendi (Şekil 3.1 C).



Şekil 3.1 Karaciğerlerin Makroskopik Görünümleri (A: Grup II, B: Grup III ve C: Grup IV).

### 3.2.2 Mikroskopik Bulgular

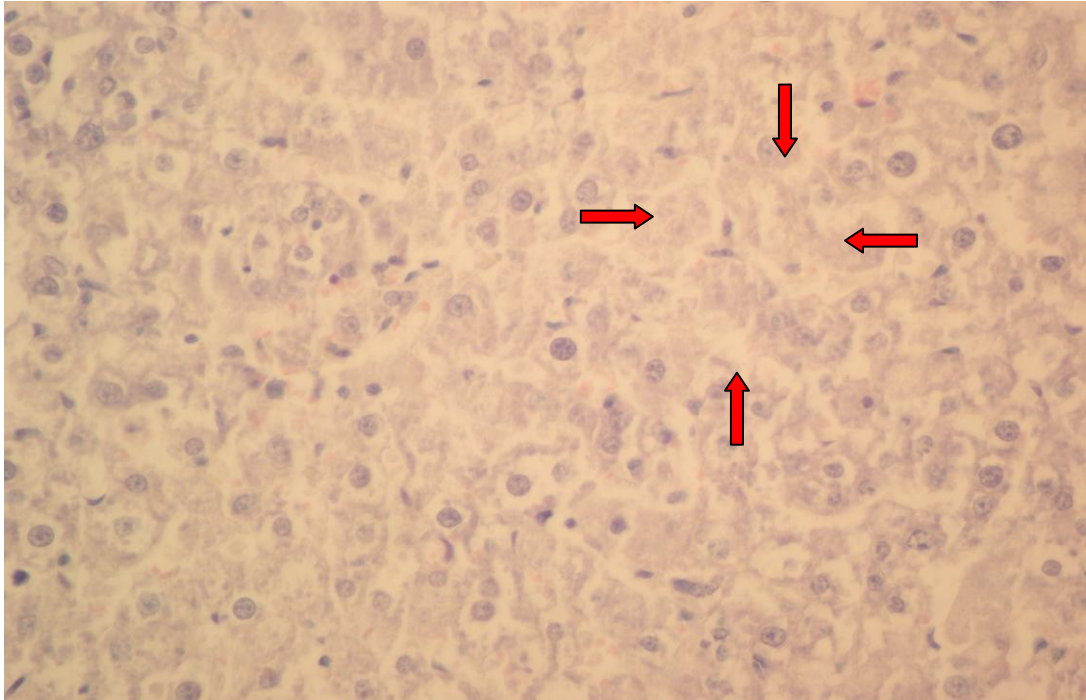
Kontrol grubu: Otopsi yapılan ratların karaciğerlerinde mikroskopik olarak herhangi bir patolojik bulguya rastlanmadı.

Grup II: Otopsi yapılan ratların karaciğerlerinin mikroskopik incelenmesinde vena sentralislerin şiddetli hiperemik, lobçukların periferinde bulunan hepatositlerin şiddetli dejenere olduğu, bazı bölgelerdeki hepatositlerden

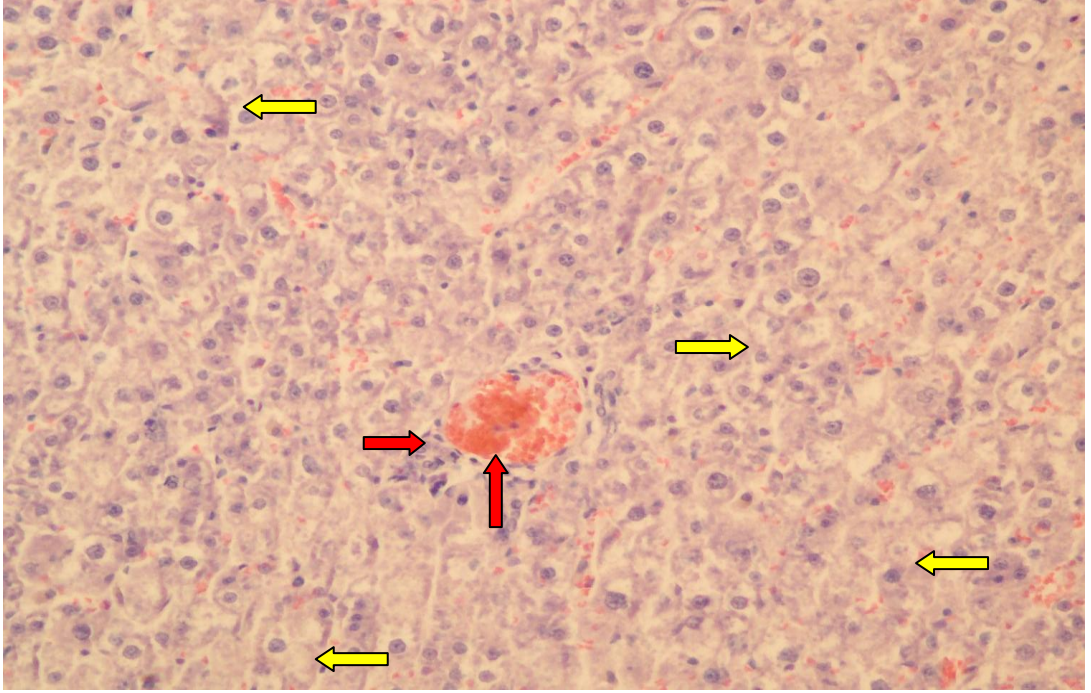
birkaçının nekroze olarak, küçük nekroz odaklarını oluşturduğu ve kupffer hücrelerinin aktive olduğu belirlendi. Yine bazı hepatositlerin çekirdeklerinin oldukça büyük ve koyu, bazı hepatositlerin çekirdeklerinin ise oldukça soluk renkte boyandığı, remark kordonlarının dizilimlerinin bozulduğu, sinuzoidlerin daraldığı gözlemlendi.

Grup III: Otopsi yapılan ratların karaciğerlerinin mikroskopik incelenmesinde hepatositlerde şiddetli dejenerasyon bulunduğu, remark kordonlarının dizilimlerinin bozulduğu, yer yer birkaç hepatositten oluşan fokal nekroz bölgelerinin olduğu, bazı hepatositlerin çekirdeklerinin oldukça büyük ve koyu, bazı hepatositlerin de çekirdeklerinin oldukça az boyandığı, bazı hepatositlerin sitoplazmalarında küçük ve içleri boş vakuollerin bulunduğu, perivasküler yerleşimde mononükleer hücre infiltrasyonunun olduğu gözlemlendi.

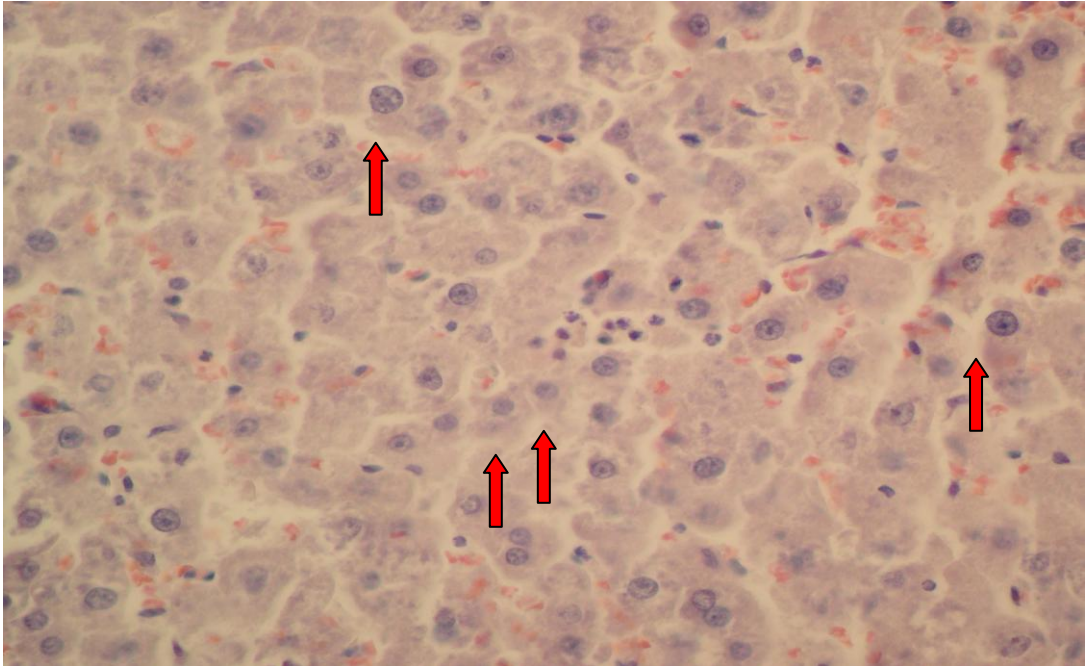
Grup IV: Otopsi yapılan ratların karaciğerlerinin mikroskopik incelenmesinde hepatositlerin şişkin, sinuzoidlerin daralmış olduğu belirlendi. Kiernan aralıklarında tek tük lenfositlere rastlandı.



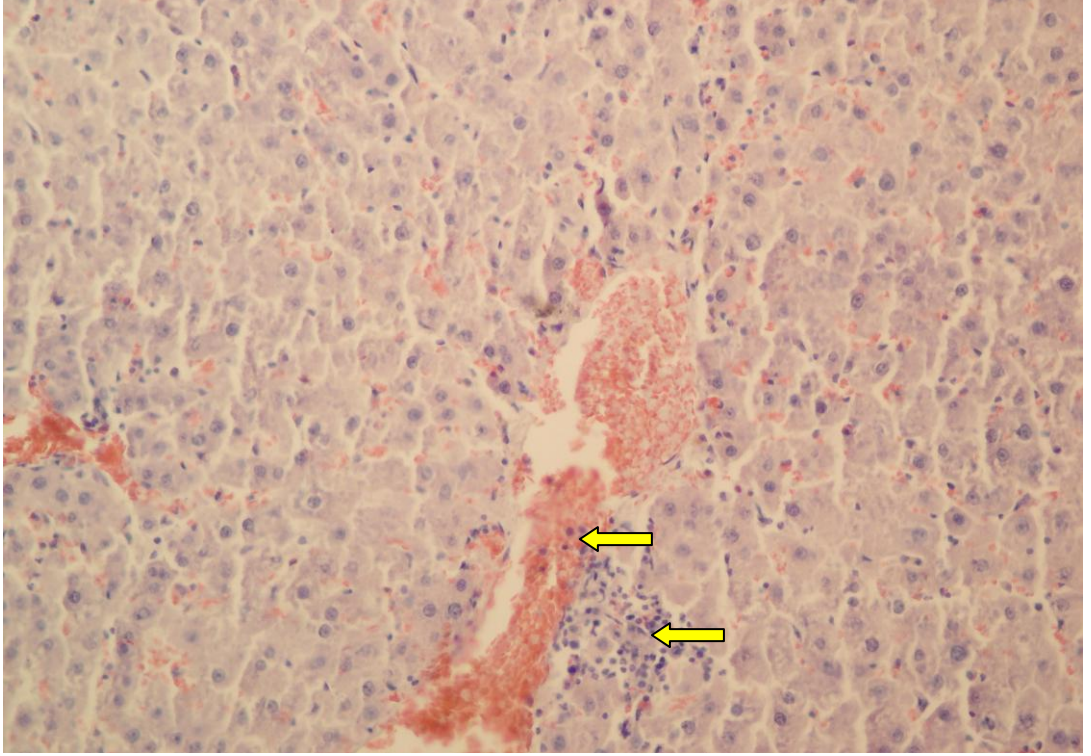
Şekil 3.2 Hidropik Dejenerasyon ve Fokal Nekrozlar (Kırmızı Oklar) Grup II, Karaciğer, X 40



Şekil 3.3 Hiperemi (Kırmızı Ok) ve Hidropik Dejenerasyon (Sarı Oklar), Karaciğer, Grup II X 25



Şekil 3.4 Anizonükleozis (Kırmızı oklar), Karaciğer, Grup II, X 25



Şekil 3.5 Hiperemi ve Perivasküler Yerleşimli Mononükleer Hücre İnfiltrasyonu (Sarı oklar) Karaciğer, Grup III, X 10

#### 4 TARTIŞMA ve SONUÇ

Son yıllarda  $\omega$ -3 yağ asitlerinin bir çok hastalıkta etkilerinin araştırıldığı çalışmalar mevcuttur. Başta kanser (12) olmak üzere kalp damar hastalıkları (101), görme ve beyin fonksiyonlarının gelişimi (52), bağışıklık sistemi (35), siroz (107), ruh ve sinir hastalıkları (116) ile kaşeksi (109) gibi bir çok hastalıkta yararlı etkilerinin olduğu bildirilmektedir.

DEN karsinojenik bileşiklerden birisi olup, iş sahalarında (kauçuk endüstrisi gibi) (99), işlenmiş et ürünlerinde (11), sigara dumanı (48) ve alkollü içkilerde (1) bulunmakta, bazı terapötik ilaçların karaciğerde metabolize edilmesi sırasında da ortaya çıkabilmektedir (62).

Tessitore (102), 200 mg/kg tek doz DEN verdiği ratlarda denemenin ikinci gününden itibaren 4. güne kadar vücut ağırlığının, gıda alımının ve karaciğer ağırlığının azaldığını, daha sonra tekrar normale döndüğünü kaydetmiştir.

Bu çalışmada da benzer olarak DEN ve DEN+ $\omega$ -3 yağ asiti verilen gruplarda denemenin 2. gününden itibaren 4. güne kadar bir azalma tespit edildi. Bu durumun DEN verilmesi sonucu meydana gelen iştahsızlık nedeniyle gıda alımının azalmasından dolayı olabileceği düşünülmektedir. 4. günden sonra tekrar artmaya başlayan vücut ağırlıklarının DEN+ $\omega$ -3 yağ asiti verilen grupta daha fazla olduğu görüldü.

Deney hayvanlarında genellikle karaciğer kanseri oluşturmak veya sitotoksik hasarla ilgili mekanizmaların açıklığa kavuşturulması amaçlarıyla kullanılan DEN, sitokrom p-450 bağlı monooksijenaz sisteminin enzimleri tarafından katalizlenmekte, bu sırada meydana gelen reaktif ara ürünlerin bağlayıcı enzimlerin katalitik bölgelerine ilgileri az olduğu için idrarla atılamayarak

önemli hücre bileşenleriyle kovalan bağlar oluşturarak nekroz, mutasyon ve kansere neden olmaktadır. İnsan ve kemirgenlerin karaciğerinde en önemli DEN metaboliti olan asetaldehit etildiazohidroksit karbonunda DEN'in oksidasyonu meydana gelmekte ve hücre bileşenleriyle reaksiyona girebilmektedir. Bu oksidatif metabolizma,  $H_2O_2$  ve  $\cdot O_2$ 'nin meydana gelmesiyle sonuçlanan oksijenin indirgenmesi gibi indirgenme reaksiyonlarını da kataliz eden sitokrom p-450'ye bağlı enzimatik sistem aracılığıyla meydana gelmekte ve böylece hepatik sentrolobüler bölgedeki artan p-450'ye bağlı enzimatik sistem aktivitesi bölgedeki oksijen tüketiminin paralelinde ROT üretimini arttırabilmektedir. Chiarello ve ark. (29), periton içi toksik dozda (200 mg/kg) DEN verdikleri Wistar albino ratlarda 24, 48 ve 72. saatlerde yaptıkları ölçümlerde en yüksek MDA değerini 48. saatte tespit etmişler ve lipid peroksidasyonundaki bu artışın paralelinde antioksidan enzim aktiviteleri ile GSH miktarında bir düşme meydana gelebileceğini kaydetmişlerdir.

Akyüz ve ark. (5), 200 mg/kg DEN vererek akut toksikasyon oluşturdukları ratların karaciğer dokusunda yaptıkları çalışmada MDA seviyelerinde DEN ve DEN+GSH verdikleri gruplarda kontrole karşılaştırıldığında önemli derecede artış olduğunu ( $p < 0,05$ ) tespit etmişlerdir. DEN'in özellikle karaciğerde olmak üzere lipid peroksidasyon artışına bağlı olarak toksik etkilere sebep olduğunu, GSH'ın DEN aracılığıyla meydana getirilen SOD aktivite düşüşünü önlediğini ve bu durumun da antioksidan bir molekül olan GSH'ın reaktif metabolitler üzerine temizleyici bir etkiye sahip olması gerçeğine bağlı olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bu çalışmada da kontrole göre DEN verilen grupta plazma MDA derişimlerinde anlamlı bir artış ( $p < 0,001$ ) ve GSH düzeyinde ise önemli derecede bir düşüş ( $p < 0,001$ ) tespit edildi.

Akyüz ve ark. (5), DEN verilen ratların hepatositlerinde ciddi hidropik dejenerasyon, piknoz, fokal nekroz, orta derecede mononükleer hücre infiltrasyonları ve karaciğer kesitlerinde hiperemik kan damarları gözlemlenmiştir. Yine Chiarello ve ark. (29), Wistar albino cinsi ratlarda

toksik dozda (200 mg/kg) DEN uygulamasından 72 ve 120 saat sonra karaciğerde yaygın nekrozlara rastlamışlardır. Yapılan çalışmada DEN verilen grupta benzer patolojik bulgular saptanırken, DEN+ $\omega$ -3 yağ asiti verilen grupta ise aynı bulguların daha hafif şiddette seyrettiği gözlemlendi.

Lonerger ve ark. (73), radyasyona maruz bıraktıkları ratlara göre, EPA verilen ve radyasyon uygulanan ratların beyinlerinin hipokampus bölgesinde ROT birikiminde önemli derecede azalma ( $p < 0,001$ ) tespit etmişlerdir. Radyasyonun yangı yapıcı PG'lerin salınımını arttırdığı, yangının ROT üretimine yol açabileceği, EPA'nın ise yangı önleyici etkilerinden dolayı koruyucu rol oynayabileceğini öne sürmüşlerdir.

Kim ve ark. (66) DEN enjekte edilerek ve kısmi hepatotektomi uygulanarak karaciğer kanserini uyardıkları ratlara farklı oranlarda  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 yağ asiti içeren gıda vermişler ve çalışmanın sonunda balık yağındaki  $\omega$ -3 yağ asitlerinin ratlarda karaciğer kanseri oluşumu aşamasında lipit peroksidasyonunu düşürerek, mikrozomal membran stabilizasyonunu ve karaciğer mikrozomal monooksijenaz sistemini uyararak koruyucu bir rol oynayabileceğini, karaciğer kanserinin erken dönemlerinde meydana gelen lipit peroksidasyonunun hücre hasarına neden olduğu ve organizmada savunma amacıyla lipit peroksidasyonuna karşı antioksidan enzim aktivitelerinde artış meydana geldiğini ileri sürmüşlerdir.

Sarsılmaz ve ark., (93) 30 gün boyunca  $\omega$ -3 yağ asiti verdikleri sağlıklı ratlarda beyin dokusunda MDA miktarının azaldığını ve SOD aktivitesinin önemli derecede arttığını tespit etmişlerdir. MDA miktarının ve ksantin oksidaz aktivitesinin azalmasının yanısıra SOD aktivitesinde meydana gelen artışın  $\omega$ -3 yağ asitlerinin antioksidatif sistem üzerine düzenleyici etkisini gösterebileceğini ileri sürmüşlerdir. ROT'un, LOX ve COX sentezinde, enzimle kataliz edilen reaksiyonlarda ara ürün, ürün ve mikroorganizmaların saldırılarına karşı doku reaksiyonundaki olayların bir parçası olarak organizmada önemli rol oynadığını, bununla birlikte ROT üretiminin iyi kontrol

edilmediği takdirde hücre ve dokular için tehlikeli olabileceğini,  $\omega$ -3 yağ asitlerinin direkt hücre zarı yapısına girerek, fosfolipaz A<sub>2</sub>'yi inhibe ederek, böylece zar yapısının stabilizasyonunu, ROT ve lipit peroksidasyon üretimini azaltarak koruyucu rol oynayabileceğini ileri sürmektedirler.

Hossain ve ark. (57), dişi ratlardan bir gruba yüksek kolesterollü, diğer gruba ise yüksek kolesterol yanında DHA içeren gıda vermişler, çalışmanın sonunda DHA'nın beyin dokusunda ROT'a karşı CAT, GSH-Px aktiviteleri ile GSH'in miktarını değiştirdiğini tespit etmişler ve  $\omega$ -3 yağ asitlerinin lipit peroksidlerin ve endoperoksidlerin artışıyla ilgili olabilen ARA üretimini inhibe ederek, antioksidatif enzimlerin aktivasyonunu sağlayarak oksidatif savunmayı uyarmada önemli bir rol oynayabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Chitra ve ark. (30), sigaraya maruz bıraktıkları farelerde kontrol grubuna göre MDA miktarının önemli derecede arttığını, balık yağının bu artışı engellediğini ve antioksidan özelliklere sahip olabileceğini öne sürmüşlerdir.

$\omega$ -3 yağ asitlerinden zengin balık yağı ile beslenen ülseratif kolitisli hastalarda plazma antioksidan kapasitesinin önemli derecede arttığı, plazma lipoperoksid oluşumunda bir azalma olduğu kaydedilmiştir.  $\omega$ -3 yağ asitlerinin bu etkilerini ya hastalığın yangı yapıcı etkisini azaltmak suretiyle serbest radikal üretimini baskılayarak veya bir serbest radikal temizleyicisi gibi davranarak sağlayabileceği öne sürülmüştür (19),

25:1 ve 5:1 oranlarında  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 yağ asiti verilmiş yaşlı köpeklerde oksidatif durumun bir belirteci ve ARA metabolizmasının son ürünü olarak belirtilen MDA düzeyinin 5:1 oranında  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 yağ asiti verilen grupta azaldığı bu durumun ARA sentezini  $\omega$ -6 yağ asitleri artırırken,  $\omega$ -3' lerin azaltmasından dolayı olabileceği ileri sürülmüştür (63).

Zararsız ve ark. (118), formaldehit uygulanan ratlarda kontrole göre MDA seviyelerinde önemli derecede bir artış olurken, SOD ve GSH-Px



aktivitelerinde önemli derecede azalma, formaldehit uygulamasının yanında  $\omega$ -3 yağ asiti verilen grupta ise MDA seviyelerinde anlamlı bir düşme görülürken, SOD ve GSH-Px aktivitelerinde önemli bir artış tespit etmişler, çoklu doymamış yağ asitlerinin hücre zarı, endoplazmik retikulum ve mitokondri gibi hayati organeller için gerekli olduğunu, bunların yapısal bozulmalarının hücre fonksiyonları için çok önemli sonuçlar doğurabileceğini,  $\omega$ -3 yağ asitlerinin nöronal hasara karşı olan koruyucu etki mekanizmasının tam olarak bilinmediğini ancak  $\omega$ -3 yağ asitlerinin, oksidatif süreç içine giren nöronal dokularda azalmaya yüz tutmuş çoklu doymamış yağ asitlerinin yerine geçmek suretiyle koruyucu etkisini gösterebileceğini öne sürmüşlerdir.

Balık yağının antioksidatif etkisini destekleyen bir başka çalışma da arteriyosklerozlu maymunlarda yapılmıştır. Gıdalarına balık yağı katılan maymunların damarlarında ve kalp kaslarında  $\cdot O_2^-$  oluşumunun azalabileceği ve bunu hücre zarı fosfolipitlerinin yapısına girerek, ARA metabolizmasını yarışmalı bir şekilde inhibe ederek ve yangısal reaksiyonları değiştirmek suretiyle yapabileceği ileri sürülmüştür (100). Yapılan çalışmada DEN verilen gruba göre DEN+ $\omega$ -3 yağ asit verilen grupta MDA'nın önemli derecede düştüğü ( $p<0,001$ ) ve GSH'nin ise önemli derecede arttığı ( $p<0,001$ ) bulundu. Bu bulgular ışığında  $\omega$ -3 yağ asitlerinin, oksidatif hasarla ilgili olabilen ARA sentezini inhibe ederek, antioksidan enzimlerin aktivitelerini arttırarak ve bir serbest radikal temizleyicisi gibi rol oynayarak, DEN tarafından meydana getirilen oksidatif hasarı önleyebileceği düşünüldü.

Üstündağ ve ark. (104), ratlarda, Altuğ ve ark. (9), köpeklerde karbontetraklorürle oluşturdukları karaciğer toksikasyonunda serum ADA aktivitesinin önemli derecede arttığını ve bu artışın karaciğer hasarının teşhisinde önemli bir gösterge olabileceğini rapor etmektedirler. Yapılan çalışmada ise, kontrol grubuna göre DEN verilen grupta plazma ADA aktivitesinde düşme ( $p<0,001$ ) tespit edildi. Yapılan literatür incelemelerine dayanılarak bu düşüşün olası sebepleri aşağıda sıralandı.

ADA aktivitesi immun sistemin aktive olduğu durumlarda artmakta (50, 114), baskılandığında ise azalmaktadır (6, 50). Türköztan ve ark. (103), farelerde DEN ile meydana getirilen kanserleşme olayının erken döneminde kontrol grubuna göre karaciğer dokusu ADA aktivitesinde istatistiksel olarak önemli bir düşme tespit etmişler ve DEN'in özellikle kanser oluşum sürecinin başında immun sistemde baskılanmaya neden olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Liang ve ark. (70) hücre kültüründe yaptıkları çalışmalarında GSH'ın İL-2 salgılayan T-lenfositleri üzerine aktive edici bir etkisi olduğu, GSH'ın fizyolojik düzeylerde hücrelerin İL-2'ye cevabını etkileyebileceği ve değişen doku GSH seviyeleriyle İL-2 salınımının düzenlenebileceğini ileri sürmüşlerdir. Yapılan çalışmada DEN verilen grupta azalan GSH derişimi ile ADA aktivitesinin DEN'in T-lenfositlerini dolayısıyla immun sistemi baskılamış olabileceğini düşündürmektedir.

Olson ve ark. (86), yaptıkları bir çalışmada periton içi verilen DEN'in siklik adenzin 3' 5'-monofosfat (c-AMP)-bağlı protein kinaz aktivitesini arttırdığını tesbit etmişlerdir. Yapılan çalışmada DEN verilen grupta ADA aktivitesinin önemli derecede düştüğü ( $p < 0,001$ ) tespit edildi. Bu düşüşün sebeplerinden birinin de ortamdaki adenzinin, c-AMP'ye bağlı protein kinaz sentezinde kullanılmasından dolayı olabileceği düşünöldü.

Enerji metabolizmasının incelendiği transgenik farelerde yapılan bir çalışmada (10) DEN verildikten sonra enerji ihtiyacının dolayısıyla ATP sentezinin artabileceği öne sürölmüştür. Yapılan çalışmada ADA aktivitesindeki azalmanın bir başka sebebinin de DEN verilmesiyle meydana gelen enerji ihtiyacındaki artışa bağlı olarak ve dolayısıyla ATP sentezinde adenzin kullanılmasından kaynaklanabileceği düşünölmektedir.

Yapılan çalışmada DEN verilen grupta kontrol grubuna göre MDA düzeyinin önemli derecede artarken, GSH miktarı ve ADA aktivitesinin anlamlı

derecede düştüğü, DEN+ $\omega$ -3 yağ asiti verilen grupta ise DEN verilen gruba göre önemli derecede MDA düzeyi düşerken, GSH 'ın arttığı tespit edildi.

Sonuç olarak  $\omega$ -3 yağ asitlerinin oksidatif hasarla ilgili olabilen ARA sentezini inhibe ederek, mikrozomal membran stabilizasyonunu sağlayarak, antioksidan enzimlerin aktivitelerini arttırarak ve bir serbest radikal temizleyicisi gibi rol oynayarak, DEN tarafından meydana getirilen oksidatif hasara karşı koruyucu etki gösterebileceği kanaatine varıldı. DEN'in ADA aktivitesinde meydana getirdiği azalmanın  $\omega$ -3 yağ asitleri tarafından etkili bir şekilde önlenemediği, bu nedenle de bu konu üzerine daha ileri araştırmaların yapılmasının gerekli olduğu düşünüldü.

## 5 ÖZET

### Dietilnitrozamin Verilen Ratlarda Omega-3 Yağ Asitlerinden Zengin Balık Yağının Koruyucu Rolünün Araştırılması

Gelişen gıda teknolojisi ile beraber nitrit, nitrat gibi katkı maddelerinin fazla kullanılması ve değişen beslenme alışkanlıkları (omega ( $\omega$ )-3 yağ asiti oranı düşük, doymuş yağ asiti oranı yüksek ve kolesterollü diyetler) organizmada geriye dönüşümsüz hasarlar meydana getirmekte ve metabolik olayların çoğunun meydana geldiği karaciğer bu durumdan en çok etkilenen organ olmaktadır. Bu nedenle yapılan çalışmada son yıllarda yoğun bir şekilde araştırılan  $\omega$ -3 yağ asitlerinin, dietilnitrozamin (DEN) ile meydana getirilen karaciğer hasarına karşı koruyucu etkisinin araştırılması amaçlandı.

Materyal olarak kullanılan yaklaşık 4 aylık,  $212 \pm 6,41$  g ağırlığında 40 adet Wistar albino cinsi erkek rat 4 eşit gruba ayrıldı. Kontrol grubundaki ratlara periton içi (IP) olarak tek doz % 0,9'luk NaCl çözeltisi, grup II'dekilere IP tek doz 150 mg/kg DEN, grup III'tekilere IP tek doz 150 mg/kg DEN ile derialtı (SC) 0,4 g/kg/gün  $\omega$ -3 yağ asiti içeren balık yağı ve grup IV'tekilere 0,4 g/kg/gün SC  $\omega$ -3 yağ asiti içeren balık yağı yedi gün süreyle verildi. Uygulamanın sonunda eter anestezisi altında heparinli tüplere kalplerinden kan örnekleri alınan ratların karaciğer dokuları çıkarılarak % 10'luk formolde saklandı. Kan örneklerinden bir kısmı glutatyon (GSH) ölçümü amacıyla ayrıldı. Geriye kalanlar 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek plazmaları elde edildi. GSH ve malondialdehit (MDA) düzeyleri ile adenozin deaminaz (ADA) aktivitesi spektrofotometrik olarak tayin edildi

Plazma ADA aktivitesi ve kan GSH düzeyi grup II ve III'te kontrol grubuna göre düşme ( $p < 0,001$ ), kan GSH derişimi grup III'te grup II'ye göre artış

( $p < 0,001$ ) gösterdi. Plazma MDA düzeyinde grup II'de kontrol grubuna göre artış ( $p < 0,001$ ) tespit edildi.

Patolojik muayenede makroskopik olarak grup II ve III'ün karaciğer renklerinin şiddetli hiperemik görünümde, kapsulalarının pürüzlü ve toplu iğne ucu büyüklüğünde çöküntülerle kaplı olduğu tespit edildi. Mikroskopik olarak II. ve III. gruplarda şiddetli dejenerasyonlar, nekroz odakları, mononükleer hücre infiltrasyonları gözlemlendi.

Sonuç olarak  $\omega$ -3 yağ asitlerinin oksidatif hasarla ilgili olabilen araşidonik asit sentezini inhibe ederek, mikrozomal membran stabilizasyonunu sağlayarak, antioksidan enzimlerin aktivitelerini arttırarak ve bir serbest radikal temizleyicisi gibi rol oynayarak, DEN tarafından meydana getirilen oksidatif hasara karşı koruyucu etki gösterebileceği kanaatine varıldı. DEN'in ADA aktivitesinde meydana getirdiği azalmanın  $\omega$ -3 yağ asitleri tarafından etkili bir şekilde önlenememesi sebebiyle, bu konu üzerine daha ileri araştırmaların yapılmasının gerekli olduğu düşünüldü.

**Anahtar Sözcükler;**  $\omega$ -3 Yağ Asitleri, Dietilnitrozamin, Glutasyon, Malondialdehit, Adenozin Deaminaz

## 6 SUMMARY

### Investigation of the Protective Role of Omega-3 Fatty Acids Riched Fish Oil on Rats Given Diethylnitrosamine

As the food technology develops, food additives such as nitrit, nitrate and increasing bad feeding habit (reduced omega ( $\omega$ )-3 fatty acid ratio, increased saturated fatty acid ratio and high cholesterol diets) could result in irreversible injuries in the organisms. Liver is known to be mostly affected organ where the majority of metabolic and biochemical reactions take place. Therefore, we aimed to investigate the protective effect of  $\omega$ -3 fatty acids on diethylnitrosamine (DEN) induced liver damage.

Fourty male Albino Wistar rats aged up to 4 months, weighing  $212\pm 6,41$  g were divided to in 4 groups. Rats in control group received a single dose of NaCl (0,9 %) via intraperitoneal (IP) injection. Group II was given only DEN at the dose of 150 mg/kg, IP. Rats in group III were treated with single dose of DEN at the rate of 150 mg/kg, IP and  $\omega$ -3 fatty acid in fish oil at the dose rate of 0,4 g/kg/day, subcutan (SC) for 7 days. Group IV received  $\omega$ -3 fatty acid in fish oil at the dose rate of 0,4 g/kg/day, SC for 7 days. At the end of experiment, blood samples were collected in to the heparinized tubes via cardiac puncture under ether anesthesia. Following blood collection, the rats were killed and liver tissues were taken into 10 % formol containing vials. For blood glutation (GSH) measurement a portion of blood was seperated, and remaining blood was centrifuged at 3000 rpm for 15 minutes to obtain plasma. Blood GSH, plasma malondialdehyde (MDA) concentrations and adenosine deaminase (ADA) activities were measured by spectrophotometric method.

Plasma ADA activity and blood GSH level were significantly reduced in group II and III with respect to the control. However blood GSH in group III were higher than in group II. In addition, plasma MDA level of group II was higher than that of control.

On gross pathological examination, liver appeared severely hyperemic and rough depressed pinpoint areas on the capsula were noticed. On microscopic examination, severe degeneration, focal necrosis and mononuclear cell infiltration were observed in the livers of animals in the group II and III.

In conclusion, the results suggest that  $\omega$ -3 fatty acids had protective effects against DEN induced oxidative injury as a free radical scavenger by reducing oxidative stress through inhibition of arachidonic acid synthesis, and increasing antioxidant activities, resulting in stabilization of microsomal membranes. Since  $\omega$ -3 fatty acids fail to reduce DEN induced ADA activities, there is a need for further investigation on this subject.

**Key Words:**  $\omega$ -3 fatty acids, Diethylnitrosamine, Glutathione, Malondialdehyde, Adenosine deaminase

## 7 KAYNAKLAR

1. Acet, HA., Traş, B., Karahan, İ., Baş, AL.: Alkollü içkilerde nitrozamin düzeylerinin belirlenmesi. Tr. J. Vet. Anim. Sci., 17: 275-279, 1993.
2. Akkuş, İ.: Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, Mimoza Yay., Konya, 1995.
3. Aktepe, N., Avcı, Ş., Erel, Ö., Koçyiğit, A.: Sıtma hastalarında serum adenzin deaminaz, guanaz ve ürik asit düzeylerinin incelenmesi. Biyokimya Derg., 1:24, 26-29, 1999.
4. Aktoğlu, S.: Tüberküloz plörezi. Solunum, 4 (Ek 1):127-131, 2002.
5. Akyüz, F., İnal, M., Bayçu, C., Kanbak, G.: Changes in antioxidant status and lipid peroxidation at liver and kidney tissues of the rats that were given diethylnitrosamine. Ann. Med. Sci., 10 (2): 50-54, 2001.
6. Alan, M., Ağaoğlu, ZT., Uyar, A., Altuğ, N.: Koyunlarda gebeliğin çeşitli dönemlerinde serum adenzin deaminaz düzeyleri. Tr. J. Vet. Anim. Sci., 26: 487-490, 2002.
7. Alexander, JW.: Immunonutrition: The role of  $\omega$ -3 fatty acids. Nutr., 14: 627-633, 1998.
8. Altuğ T.: Gıda katkı maddeleri. Hekim ve Yaşam, Haziran, 29-31,1999.
9. Altuğ, N., Ağaoğlu, ZT.: Serum adenosine deaminase activity in dogs: its importance in experimental liver intoxication. Isr. J. Vet. Med., 55 (4): 2000.
10. Arai, T., Ogava, T., Nakamura, M., Hosoya, Ohnishi, Y.: Changes in hepatic enzyme activities in transgenic mice carrying human prototype c-ha-ras gene treated with diethylnitrosamine. J. Vet. Med. Sci., 64 (11): 1065-1067, 2002.
11. Archer, DL.: Nitrite and the impact of advisory groups. Food Technology, 55 (3): 26, 2001.
12. Aronson, WJ., Glaspy, JA., Reddy, ST., Reese, D., Heber, D., Bagga, D.: Modulation of omega-3/omega-6 polyunsaturated ratios with dietary fish oils in men with prostate cancer. Urology, 58 (2): 283-288, 2001.



13. Atakişi, O., Özcan, A.: Protective effect of vitamin E on the oxidative damage caused by acute sodium nitrite intoxication. *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 8 (2): 123-126, 2002.
14. Avelano, M., Sprecher, H.: Synthesis of hydroxy fatty acids from 4, 7, 10, 13, 16, 19- ( $I-^{14}C$ ) docosahexaenoic acid by human platelets. *J. Biol. Chem.*, 258 (15): 9339-9343, 1983.
15. Baganha, M.F., Pego, A., Lima, M.A., Gaspar, E.U., Pharma, B.: Serum and pleural adenosine deaminase correlation with lymphocytic populations. *Chest*, 97 (3): 605-610, 1990.
16. Bahçecioğlu, H.İ., Kalkan, A., Erel, Ö., Bingöl, N.K., Koçköprü, İ., Demir, A.: Karaciğer sirozlu hastalarda serum adenzin deaminaz ve guanaz aktiviteleri. *J. Gastroenterohepatol.*, 11 (3): 136-140, 2000.
17. Barankiewicz, J., Danks, A.M., Abushanab, E., Makings, L., Wiemann, T., Wallis, R.A., Pragnacharyulu, P.L.P., Fox, A., Marangos, P.J.: Regulation of adenosine concentration and cytoprotective effects of novel reversible adenosine deaminase inhibitors. *J. Pharmacol. Exp. Therapeutics*, 283 (3): 1230–1238, 1997
18. Barbisan, L.F., Barbisan, T.A., Moreira, E.L.T., Salvadori, D.M.F., Ribeiro, L.R., Da Eira, A.F., De Camargo, L.V.: *Agaricus blazei* (himematsutake) does not alter the development of rat diethylnitrosamine-initiated hepatic preneoplastic foci. *Cancer Sci.*, 94 (2): 188-192, 2003.
19. Barbosa, D.S., Cecchini, R., El Kadri, M.Z., Rodriguez, M.A.M., Burini, R.C., Dichi, I.: Decreased oxidative stress in patients with ulcerative colitis supplemented with fish oil  $\omega$ -3 fatty acids. *Nutr.*, 19: 837-842, 2003.
20. Bartram, H.P., Gostner, A., Scheppach, W., Reddy, B.S., Rao, C.V., Dusel, G., Richter, F., Richter, A., Kasper, H.: Effects of fish oil on rectal cell proliferation, mucosal fatty acids, and prostaglandin  $E_2$  release in healthy subjects. *Gastroenter.*, 105: 1317-1322, 1993.
21. Bechoua, S., Dubois, M., Dominguez, Z., Goncalves, A., Nemoz, G., Lagarde, M., Prigent, A.F.: Protective effect of docosahexaenoic acid

- against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in human lymphocytes. *Biochem., Pharmacol.*, 57: 1021-1030, 1999.
22. Beutler, E., Duran, O., Kelley, B.M. Improved method for determination of blood glutathione. *J. Lab. Clin. Med.*, 61: 882-888, 1963.
  23. Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, KV.: Oxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review. *Annals of Botany*. 91: 179-194, 2003.
  24. Boudreau, M., Chanmugam, PS., Hart, SB., Lee, SH., Hwang, DH.: Lack of dose response by dietary n-3 fatty acids at a constant ratio of n-3 to n-6 fatty acids in suppressing eicosanoid biosynthesis from arachidonic acid. *Am. J. Clin. Nutr.*, 54: 111-117, 1991.
  25. Braden, LM., Carroll, KK.: Dietary polyunsaturated fat in relation to mammary carcinogenesis in rats. *Lipids*, 21 (4): 285-288, 1986.
  26. Calder PC.: Long-chain n-3 fatty acids and inflammation: Potential application in surgical and trauma patients. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 36 (4): 433-446, 2003.
  27. Chen DZ., Auburn, K.: Fish oil constituent docosahexaenoic acid selectively inhibits growth of human papillomavirus immortalized keratinocytes. *Carcinogenesis*, 20 (2): 249-254, 1999.
  28. Chen, WJ., Yeh, SL.: Effects of fish oil in parenteral nutrition. *Nutr.*, 19: 275-279, 2003.
  29. Chiarello, PG., Iglesias AC., Zucoloto, S., Moreno, F., Jordao, AA, Vannucchi, H.: Effect of a necrogenic dose of diethylnitrosamine on vitamin E-deficient and vitamin E-supplemented rats. *Food Chem. Toxicol.*, 36: 929-935, 1998.
  30. Chitra, S., Semalar, R., Devi, CSS.: Effect of fish oil on cigarette smoking induced dyslipidemia in rats. *Ind. J. Pharmacol.*, 32: 114-119, 2000.
  31. Cristalli, G., Costanzi, S., Lambertucci, G., Lupidi, G., Vittori, S., Volpini, R., Gamaioni, E.: Adenosine deaminase: Functional

- implications and different classes of inhibitors. *Med. Res. Rev.*, 21 (2): 105-128, 2001.
32. De Bravo, MG., De Antueno, RJ., Toledo, J., De Tomas, ME., Mercuri, OF., Quintans, C.: Effects of an eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid concentrate on a human lung carcinoma grown in nude mice. *Lipids*, 26 (11): 866-870, 1991.
33. Deschner, EE., Lytle, JS., Wong, G., Ruperto, JF., Newmark, HL.: The effect of dietary omega-3 fatty acids (fish oil) on azoxymethanol-induced focal areas of dysplasia and colon tumor incidence. *Cancer*, 66: 2350-2356, 1990.
34. Dichi, I., Frenhane, P., Dichi, JB., Correa, CR., Angeleli, AYO., Bicudo, MH., Rodrigues, MAM., Victoria, CR., Burini, RC.: Comparison of  $\omega$ -3 fatty acids and sulfasalazine in ulcerative colitis. *Nutr.*, 16: 87-90, 2000.
35. Din, JN., Newby, DE., Flapan, AD.: Omega 3 fatty acids and cardiovascular disease-fishing for a natural treatment. *BMJ*, 328: 330-5, 2004.
36. Domanska, K., Rozanska, H.: Microbiological quality of polish edible offals processed meat products during storage: Influence on n-nitrosamines content. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, 47: 217-223, 2003.
37. El Boustani, S., Colette, C., Monnier, L., Descomps, B., De Paulet, C., Mendy, F.: Enteral absorption in man of eicosapentaenoic acid in different chemical forms. *Lipids*, 22: 711-714, 1987.
38. Engler, MM., Engler, MB., Kroetz, DL., Boswell, KDB., Neeley, E., Krassner, SM.: The effects of a diet rich in docosahexaenoic acid on organ and vascular fatty acid composition in spontaneously hypertensive rats. *Prostaglan. Leukotr. Essent. Fatty Acids*, 61 (5): 289-295, 1999.
39. Erbağcı, AB., Araz, M., Köylüoğlu, O., Özdemir, Y., Tarakçıoğlu, M.: Elevated adenosine deaminase activity is not implicated in microvasculer complications of type 2 diabetes mellitus except HBA1c. *Tr. J. Endocrinol. Met.*, 3: 95-99, 2000.

40. Erel, Ö., Koçyiğit, A., Gürel, MS., Bulut, V., Seyrek, A., Özdemir, Y.: Adenosine deaminase activities in sera, lymphocytes and granulocytes in patients with cutaneous leishmaniasis. *Mem. Inst. Cruz.*, 93 (4): 491-494, 1998.
41. Fernandez, E., Rodrigo, L., Riesta, S., Garcia, S., Gutierrez, F., Ocio, G.: Adenosine deaminase isoenzymes and neopterin in liver cirrhosis. *J. Clin. Gastroenterol.*, 30: 181-186, 2000.
42. Franco, R., Aran, JM., Colomer, D., Matutes, E., Vives-Corrons, JL.: Association of adenosine deaminase with erythrocyte and platelet plasma membrane: An immunological study using light and electron microscopy. *J. Histochem.*, 38: 653-658, 1990.
43. Franco, R.: Enzymatic and extraenzymatic role of ecto-adenosine deaminase in lymphocytes. *Immunol. Rev.*, 161: 27-42, 1998.
44. Frei, B.: Molecular and biological mechanisms of antioxidant action. *FASEB J.*, 13 (9): 963-964, 1999.
45. Frenoux, JM., Prost, ED., Belleville, JL., Prost JL.: A polyunsaturated fatty acid diet lowers blood pressure and improves antioxidant status in spontaneously hypertensive rats. *J. Nutr.*, 131: 39-45, 2001.
46. Fritsche, KL., Byrge, M., Feng, C.: Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids from fish oil reduce interleukin-12 and interferon-gamma production in mice. *Immun. Lett.*, 65: 167-173, 1999.
47. Giusti, G., Galanti, B.: Adenosine deaminase: Colorimetric method. *Methods of Enzymatic Analysis*, H.U. Bergmeyer 4 (3): 315-323, 1984.
48. Goodsell, DS.: Molecular perspective: Nicotine and nitrosamines. *The Oncologist*, 9: 353-354, 2004.
49. Grimsgaard, S., Bonna, KH., Hansen, JB., Nordoy, A.: Highly purified eicosapentaenoic acid in humans have similar triacylglycerol-lowering effects but divergent effects on serum fatty acids. *Am. J. Clin. Nutr.*, 66: 649-659, 1997.
50. Hatipoğlu, K., Yüksekol, İ., Özkan, M., Balkan, A., Tozkoparan, E., Bedirhan, İ., Bilgiç, H., Demirci, N.: Tüberküloz tanısında serum

- adenozin deaminaz ölçümünün önemi. *Gülhane Tıp Derg.*, 45 (2): 165-168, 2003.
51. Heger, A., Holm, L.: Sensitive pattern discovery with 'fuzzy' alignments of distantly related proteins. *Bioinformatics*, 19 (Suppl. 1): 130-137, 2003.
52. Helland, IB., Smith, L., Saarem, K., Saugstad, O., Drevon, C.: Maternal supplementation with very-long-chain n-3 fatty acids during pregnancy and lactation augments children's IQ at 4 years of age. *Pediatrics*, 111 (1): 39-44, 2003.
53. Hirschberge, J., Koch, S.: Validation of the determination of the activity of adenosine deaminase in the body effusions of cats. *Res. Vet. Sci.*, 59: 226-229, 1995.
54. Hoffman, DR., Birch, EE., Castaneda, YS., Fawcet, S., Wheaton, DH., Birch, DG., Uauy, R.: Visual function in breast-fed term infants weaned to formula with or without long-chain polyunsaturates at 4 to 6 months: a randomized clinical trial. *J. Pediatr.*, 142: 669-677, 2003.
55. Hornstra, G.: Essential fatty acids in mothers and their neonates. *Am. J. Clin. Nutr.*, 71: 1262-1269, 2000.
56. Horrocks, LA., Yeo, YK.: Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). *Pharmacol. Res.*, 40 (3): 211-225, 1999.
57. Hossain S., Hashimoto, M., Gamoh, S., Masumura, S.: Antioxidative effect of docosahexaenoic acid in the cerebrum versus cerebellum and brainstem of aged hypercholesterolemic rats. *J. Neurochem.*, 72: 1133-1138, 1999.
58. Huang, ZZ., Chen, C., Zeng, Z., Yang, H., Oh, J., Chen, L., Lu, Sc.: Mechanism and significance of increased glutathione level in human hepatocellular carcinoma and liver regeneration. *FASEB J.*, 15 (1): 19-21. 2001.
59. Hunter, EJ.: n-3 fatty acids from vegetable oils. *Am. J. Clin. Nutr.*, 51: 809-814, 1990.

60. Jurkowski, JJ., Cave, WT.: Dietary effects of menhaden oil on the growth and membrane lipid composition of rat mammary tumors. *J. Natl. Cancer Res.*, 74: 1145-1150, 1985.
61. Kaya, N.: *Biyokimya*. Atatürk Üniv. Basımevi-Erzurum, 1993.
62. Kaya, S.: Soframızdaki tehlike: 4. Gıdaların pişirilmesi, işlenmesi, saklanması sırasında oluşan zehirli-zararlı maddeler. *Türk Vet. Hek. Birl. Derg.*, 2 (3-4): 50-52, 2002.
63. Kearns, RJ., Hayek, MG., Turek, JJ., Mohsen, M., Burr, JR., Grene, RJ., Marshall, VA., Adams, SM., Borgert, RC., Reinhart, GA.: Effect of age, breed and dietary omega-6 (n-6): omega-3 (n-3) fatty acid ratio on immune function, eicosanoid production, and lipid peroxidation in young and aged dogs. *Vet. Immun. Immunopathol.*, 69: 165-183, 1999.
64. Kılınç, K., Kılınç, A.: Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Derg.*, 33 (2): 110-118, 2002.
65. Kim, KH., Park, HS.: Dietary supplementation of conjugated linoleic acid reduces colon tumor incidence in DMH treated rats by increasing apoptosis with modulation of biomarkers. *Nutr.*, 19: 772-777, 2003.
66. Kim, Y., Ji, SK., Choi, H.: Modulation of liver microsomal monooxygenase system by dietary n-6/n-3 rations in rat hepatocarcinogenesis. *Nutrition and Cancer*, 71: 65-72, 2000.
67. Kitessa, SM., Peake, D., Bencini, R., Williams, AJ.: Fish oil metabolism in ruminants III. Transfer of n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) from tuna oil into sheep's milk. *Anim. Feed. Sci. Tech.*, 108: 1-14, 2003.
68. Kontogiannea, M., Gupta, A., Ntanios, F., Graham, T., Jones, P., Meterissian, S.:  $\omega$ -3 fatty acids decrease endothelial adhesion of human colorectal carcinoma cells. *J. Surg. Res.*, 92: 201-205, 2000.
69. Köylüoğlu, O., Özdemir, Y., Kutlar, İ., Ersoy, Ü., Ahi, S.: Maternal ve kord kanı adenoazin deaminaz (ADA) aktivitesi. *Tr. Biyokimya Derg.*, 27 (4): 135-138, 2002.

70. Liang, CM., Lee, N., Cattell, D., Mei, S.: Glutathione regulates interleukin-2 activity on cytotoxic T-cells. *J. Biol. Chem.*, 264 (23): 13519-13523, 1989.
71. Linko, YY., Hayakawa, K.: Docosahexaenoic acid: A valuable nutraceutical? *Trends in Food Sci., Tech.*, 7: 59-63, 1996.
72. Liu, M., Wallin, R., Saldeen, T.: Effect of bread containing stable fish oil on plasma phospholipid fatty acids, triglycerides, HDL-cholesterol, and malondialdehyde in subjects with hyperlipidemia. *Nutr. Res.*, 21: 1403-1410, 2001.
73. Lonergan, PE., Martin DSD., Horrobin, DF., Lynch, M.: Neuroprotective effect of eicosapentaenoic acid in hippocampus of rats exposed to  $\gamma$ -irradiation. *J. Biol. Chem.*, 227 (28): 20804-20811, 2002.
74. Lu, G., Windsor, SL., Haris, WS.: Omega-3 fatty acids alter lipoprotein subfraction distributions and the *in vitro* conversion of very low density lipoproteins to low density lipoproteins. *J. Nutr. Biochem.*, 10: 151-158, 1999.
75. Lu, SC.: Regulation of hepatic glutathione synthesis: Current concepts and controversies. *FASEB J.*, 13: 1169-1183, 1999.
76. Luna, LG.: *Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology*. Third Ed., McGraw-Hill Book Company, New York, 1968.
77. Macleod, JC., Macknight, ADC., Rodrigo, GC.: The electrical and mechanical response of adult guinea pig and rat ventricular myocytes to  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids. *Eur. J. Pharm.*, 356: 261-270, 1998.
78. Mantzioris, E., James, MJ., Gibson, RA., Cleland, LG.: Dietary substitution with an  $\alpha$ -linolenic acid-rich vegetable oil increases eicosapentaenoic acid concentrations in tissues. *Am. J. Clin. Nutr.*, 59: 1304-1309, 1994.
79. Mayer, K., Gokorsch, S., Fegbeutel, C., Hattar, K., Rosseau, S., Walmrath, D., Seeger, W., Grimminger, F.: Parenteral nutrition with

- fish oil modulates cytokine response in septic patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 15;167 (10): 1321-1328, 2003.
80. McCowen, KC., R Bistrian, B.: Immunonutrition: Problematic or problem solving? *Am. J. Clin. Nutr.*, 77: 764-70, 2003.
81. Montgomery, C., Speake, B., Cameron, A., Sattar, N., Weaver, LT.: Maternal docosahexaenoic acid supplementation and fetal accretion. *Br. J. Nutr.*, 90: 135-145, 2003.
82. Nageswari, K., Banerjee, R., Menon, VP.: Effect of saturated,  $\omega$ -3 and  $\omega$ -6 polyunsaturated fatty acids on myocardial infarction. *J. Nutr. Biochem.*, 10: 338-344, 1999.
83. Nordoy, A., Barstad, L., Connor, WE., Hatcher, L.: Absorption of the n-3 eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids as ethyl esters and triglycerides by humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, 53: 1185-1190, 1991.
84. Okuno, M., Tanaka, T., Komaki, C., Nagase, S., Shiratori, Y., Muto, Y., Kajiwara, K., Maki, T., Moriwaki, H.: Suppressing effect of low safflower and perilla oils on diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in male F344 rats. *Nutr. Cancer*, 30 (3): 186-193, 1998.
85. Okuyama, H., Kobayashi, T., Watanabe, S.: Dietary fatty acids. The n-6/n-3 balance and chronic elderly diseases. Excess linoleic acid and relative n-3 deficiency syndrome seen in Japan. *Prog. Lipid Res.*, 35 (4): 409-457, 1997.
86. Olson, JW., Russell, DH.: Prolonged induction of hepatic ornithine decarboxylase and its relation to cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase activation after a single administration of diethylnitrosamine. *Cancer Res.*, 39: 3074-3079, 1979.
87. Paik, DC., Saborio, DV., Oropeza, R., Freeman, HP.: The epidemiological enigma of gastric cancer rates in the US: Was grandmother's sausage the cause? *Int. J. Epidemiol.*, 30: 181-182, 2001.
88. Pereira, SL., Huang, YS., Bobik, EG., Kinney, AJ., Stecca, KL., Packer, JCL., Mukerji, P.: A novel  $\omega$ -3 fatty acid desaturase involved in the



- biosynthesis of eicosapentaenoic acid. *Biochem. J.*, 378: 665-671 2004.
89. Pereira, SL., Leonard, AE., Huang, YS., Chuang, LT., Mukerji, P.: Identification of two novel microalgal enzymes involved in the conversion of the omega 3-fatty acid, eicosapentaenoic acid (EPA), to docosahexaenoic acid (DHA). *Biochem. J.*, 384 (Pt 2): 357-366, 2004.
90. Reh, DB., Debord, DG., Butler, MA., Reid, TM., Mueller, C., Fajen, JM.: O<sup>6</sup>-Methylguanine DNA adducts associated with occupational nitrosamine exposure. *Carcinogenesis*, 21 (1): 29-33, 2000.
91. Ros, RMO., M. Torres-Marquez, E., Badillo, A., Guerrero, OA.: Dietary fatty acids effects on sucrose-induced cardiovascular syndrome in rats. *J. Nutr. Biochem.*, 12: 207-212, 2001.
92. Rose, DP., Connolly, JM.: Omega-3 fatty acids as a chemopreventive agents. *Pharmacol. Therapy*, 83: 217-244, 1999.
93. Sarsılmaz, M, Songur, A., Özyurt, H., Kuş, İ., Özen, OA., Özyurt, B., Söğüt, S., Akyol, Ö.: Potential role of dietary ω-3 essential fatty acids on some oxidant/ antioxidant parameters in rats' corpus striatum. *Prostaglan. Leukot. Essen. Fatty Acids*, 69: 253-259, 2003.
94. Schmitz, PG., A., Antony, KA.: ω-3 fatty acids in ESRD: Should patients with ESRD eat more fish? *Nephrol. Dial. Transplant*, 17: 11-14, 2002.
95. Simopoulos, A.: Essential fatty acids in health and chronic disease. *Am. J. Clin. Nutr.*, 70 (suppl): 560-569, 1999.
96. Simopoulos, AP.: Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am. J. Clin. Nutr.*, 54: 438-463, 1991.
97. Skog, K.: Problems associated with the determination of heterocyclic amines in cooked foods and human exposure. *Food Chem. Toxicol.*, 40: 1197-1203, 2002.
98. Straif, K., Weiland, SK., Bungers, M., Holthenrich, D., Taeger, D., Keil, U.: Exposure to high concentrations of nitrosamines and cancer mortality among a cohort of rubber workers. *Occup. Environ. Med.*, 57: 180-187, 2000.

99. Sundaresan, S., Subramanian, P.: S-allylcysteine inhibits circulatory lipid peroxidation and promotes antioxidants in n-nitrosodiethylamine-induced carcinogenesis. *Polish J. Pharmacol.*, 55: 37-42, 2003.
100. Supari, F., Ungerer, T., Harrison, DG., Williams, K.: Fish oil treatment decreases superoxide anions in the myocardium and coronary arteries of atherosclerotic monkeys. *Circulation*, 91: 1123-1128, 1995.
101. Tapiero, H., Ba, GN., Couvreur, P., Tew, KD.: Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies. *Biomed. Pharmacotherapy*, 56: 215-222, 2002.
102. Tessitore, L.: Apoptosis and cell proliferation are involved in the initiation of liver carcinogenesis by a subnecrogenic dose of diethylnitrosamine in re-fed rats. *J. Nutr.*, 130:104-110, 2000.
103. Türköztan, N., Özkurt, Ş., Arıvıoğlu, A., Görgün, M., Özkurt, M: Dietilnitrozaminle oluşturulan kanserleşme olayının erken döneminde fare karaciğer adenozin deaminaz aktivitesindeki değişimler. *Biyokimya Derg.*, XII (3): 19-24: 1987.
104. Üstündağ, B., Bahçecioğlu, İH., Canatan, H., Özercan, İH., Çinkılınç, N.: Deneysel siroz oluşturulmuş ratlarda serum adenozin deaminaz (ADA) aktivite düzeyleri. *Biyokimya Derg.*, 2 (24): 16-21, 1999.
105. Volpini, R., Camaioni, E., Luipidi, G., Vittori, S., Cristalli, G.: Adenosine deaminase inhibitors: Synthesis, diastereoisomeric resolution and biological activity of 1-(2-hydroxy-3-nonyl)-1,2,4-triazole-3-carboxamide. *IL Pharmacol.*, 52(6-7): 429-433, 1997.
106. Wahn, H., Ruenauer, N., Hammerschmidt, S.: Effect of arachidonic and eicosapentaenoic acids on acute lung injury induced by hypochlorous acid. *Thorax*, 57 (12): 1060-1066, 2002.
107. Watanabe, A., Saito, S., Tsuchida, T., Higughi, K., Okita, M.: Low plasma levels of docosahexaenoic acid in patients with liver cirrhosis and its correction with a polyunsaturated fatty acid-enriched soft oil capsule. *Appl. Nutr. Invest.*, 15 (4): 284-288, 1999.

108. Weintraub, MS., Zechner, R., Brown, A., Eisenberg, S., Breslow, JL.: Dietary polyunsaturated fats of the  $\omega$ -6 and  $\omega$ -3 series reduce postprandial lipoprotein levels chronic and acute effects of fat saturation on postprandial lipoprotein metabolism. *J. Clin. Invest.*, 82: 1884-1893, 1988.
109. Whitehouse, AS., Smith, HJ., Drake, JL., Tisdale, MJ.: Mechanism of skeletal muscle protein catabolism in cancer cachexia by eicosapentaenoic acid. *Cancer Res.*, 61: 3604-3609, 2001.
110. Wilker, W., Leibfritz, D.: Assignment of mono- and polyunsaturated fatty acids in lipids of tissues and body fluids. *Magn. Reson. Chem.*, 36: 79-84, 1998.
111. Witte, DP., Wiginton, DA., Hutton, JJ., Aronow, B.: Coordinate developmental regulation of purine catabolic enzyme expression in gastrointestinal and postimplantation reproductive tracts. *J. Cell Biol.*, 115 (1): 179-190, 1991.
112. Xia, Y., Khatchikian, G., Zweier, JL.: Adenosine deaminase inhibition prevents free radical-mediated injury in the postischemic heart. *J. Biol. Chem.*, 271 (17): 10096-10102, 1996.
113. Yasuda, J., Tanabe, T., Hashimoto, A., Too, K.: Adenosine deaminase (ADA) activity in tissues and sera from normal and leukaemic cattle. *Br. Vet. J.*, 152: 485-488, 1996.
114. Yıldırım, Z., Hasanoğlu, HC., Akyol, Ö., Gökırmak, M., Köksal, N.: Serum adenosine deaminase activities in lung cancer and mesothelioma. *Clin. Biochem.*, 32 (4): 283-285, 1999.
115. Yoshiko, T., Kawada, K., Shimada, T. Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against active-oxygen toxicity in the blood. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 135: 372-376, 1979
116. Young, C., Martin, A.: Omega-3 fatty acids in mood disorders: An overview. *Rev. Bras. Psiquiatr.*, 25 (3): 184-187, 2003.
117. Young, PR: Radicals. 2000 [www.chem.uic.edu/web1/PDF/CH10.PDF](http://www.chem.uic.edu/web1/PDF/CH10.PDF)

118. Zararsız, İ., Kuş, İ., Yılmaz, HR., Pekmez, H., Ögetürk, HM., Sarsılmaz, M.: Sıçan prefrontal korteksinde formaldehit maruziyetiyle oluşan oksidatif hasara karşı omega-3 yağ asitlerinin koruyucu etkisi. Fırat Tıp Derg., 9 (2): 35-39, 2004.

## **8 ÖZGEÇMİŞ**

1973 yılında Kahramanmaraş'ın Göksun ilçesinde doğdu. İlk öğrenimini İzmir Dikili Atatürk İlkokulu'nda, orta ve liseyi ise İzmir İnönü Lisesi'nde tamamladı. 1993 yılında girdiği Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden 1998 yılında mezun oldu. 11.01.1999 yılında Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı. 2000 yılında aynı üniversitenin Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda Doktora Öğrenimine başladı. Halen Araştırma Görevlisi olarak çalışmalarına devam etmektedir.