

n-3 YAĞ ASİTLERİ İLE BESLENEN FARELERİN MEMBRAN LİPİT PEROKSİDASYONLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ VE VİTAMİN E SUPLEMENTASYONUNUN ETKİLERİ

Yrd.Doç.Dr. H.Tanju BESLER *

ÖZET

Bu çalışmada kronik olarak yüksek yağlı diyetle (mısır yağı veya balık yağı) beslenen farelerde *in vitro* koşullarda lipit peroksidasyonu ve balık yağı diyetine eklenen E vitamininin etkileri incelenmiştir. BY/75 grubunda MY/75 grubuna kıyasla serum ve karaciğer membran fraksiyonlarında E vitamini düzeyi düşük bulunmuştur ($p<0.006$). Balık yağı diyetine eklenen E vitamini (BY/500) bu değerleri MY/75 grubunun değerlerine yaklaştırmıştır. Lipit peroksidasyonu ve peroksidasyona olan hassasiyet balık yağı ile beslenen gruplarda daha yüksek bulunmuştur ($p<0.01$). Çalışma sonuçları, antioksidant ve hücre membranı koruyucu özelliğinden dolayı diyetin özelliğine de bağlı olarak optimum E vitamini alınması gerekliliğini destekler cinsden görünmektedir.

Anahtar sözcükler: n-3 yağ asitleri, vitamin E, hücre membranı, lipit peroksidasyonu, fare.

ABSTRACT: *Studies on the Effect of Vitamin E Supplementation on the Membrane Lipid Peroxidation in n-3 Fatty Acid Fed Mice*

In the present study, in vitro lipid peroxidation was studied in mice (B/W) fed diets containing high levels of maize oil or fish oil (menhaden oil). The results indicated that qualitative and quantitative differences in dietary fat intake exerted an effect upon the vitamin E concentration and membrane lipid peroxidation in mice. In mice receiving the fish oil diets, membrane lipid peroxidation was greatly increased ($p<0.005$) with a decrease in vitamin E concentration ($p<0.006$). Furthermore, in the fish-oil-fed animals membrane lipid peroxidizability was greatly enhanced ($p<0.005$). In general the data suggested that optimum vitamin E intake as an antioxidant and cell membrane stabilizing agent, should be maintained.

Key words: n-3 fatty acids, vitamin E, cell membranes, lipid peroxidation, mice.

GİRİŞ

Uzun zincirli doymamış yağ asitlerinin (PUFA) diyetle alımı ile kronik ve dejeneratif hastalık ilişkileri son yıllarda araştırılan konuların başında gelmektedir. Diyetle alınan n-3 ve n-6 yağ asitleri, bu yağ asitlerinin hipolipidemik, antitrombotik ve antiaritmik özelliklerinden dolayı, insanların kardiyovasküler hastalıklara yakalanma riskini azaltmaktadır (1). Bu olgu ilk olarak Greenland Eskimolarında dikkati çekmiştir (2). Bu insan gruplarında özellikle soğuk sulardan yakalanmış balık ve deniz ürünlerinin tüketimi (n-3 yağ asitleri açısından zengin kaynaklardır) diğer toplumlarla kıyaslandığında yüksek olduğu bilinmektedir.

Hücre membranlarının lipit bileşimi diyetin lipit içeriğinden etkilenmektedir (3). Örneğin n-3 yağ asitleri yönünden zengin beslenen bireylerin hücre membranlarında n-3 yağ asitlerinin daha yoğun olarak bulunması beklenen bir olgudur. Ancak son yıllarda PUFA tüketiminin kronik olarak yüksek düzeylerde tutulmasının bazı sakıncalarının olabileceği görüşü mevcuttur (4). Bunun nedeni olarak, çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyona karşı hassas olma özellikleri gösterilmektedir. Perokside olmuş yağ asitleri bulunduğu hücre membranının dayanıklılığını bozarak ve/veya diğer serbest radikal oluşumlara zemin hazırlayarak birçok patolojiye neden olabilir (5). Bunların en başında gelen ise karsinogenezisdir (5). Ayrıca perokside olmuş yağ asitlerinin yüksek dansiteli lipoproteinlerin (HDL) düzeyini azaltarak kardiyovasküler hastalıklara da zemin oluşturabileceği görüşü mevcuttur (6). Tüm bunlara ilave olarak, diyetle PUFA tüketiminin yüksek olması ve buna bağlı olarak peroksidasyon ürünlerinin olası artışı antioksidant özelliğe sahip moleküllere olan ihtiyacı arttırmaktadır (7). Bu moleküllerin başında da E vitamini gelmektedir. Bu çalışmada kronik olarak balık yağından zengin beslenen farelerde membran ve serum E vitamini düzeyleri ile hücre membranındaki lipit peroksidasyonu ve ayrıca diyetle eklenen E vitamininin bu parametrelere etkisi incelenmiştir.

* H.Ü. Beslenme ve Diyetetik Bölümü Öğretim Üyesi

ARAŞTIRMA YÖNTEMİ VE ARAÇLARI

Southampton Üniversitesi Hayvan Evi tarafından özel olarak üretilen farelerde (NZB % NZB) F1 (B/W) çalışma yürütülmüştür. Sütten kesilmiş (weanling) 4 haftalık fareler, 8 haftalık oluncaya kadar standard fare yemi ile nem, sıcaklık ve ışık ayarlaması yapılmış özel odalarda barındırılarak çalışmaya hazırlanmışlardır. Hayvanların 8 haftalık olmalarını takiben çalışma süreci başlatılmış ve hayvanlar 5 aylık oluncaya kadar çalışma devam etmiştir. Hayvanların 8 haftalık olmasını takiben 75 adet fare arasından random yöntemiyle her bir grupta 25 adet hayvan olacak şekilde üç grup oluşturulmuştur. Çalışma esnasında daha önceden neoplastik ve otoimmün hastalık oluşumunu arttırdığı gösterilen yüksek yağlı diyet kullanılmıştır. Özel olarak hazırlanan diyetin bileşimi (w/w); %20 kazein, %25 dekstroz, %25 nişasta, %20 yağ (mısır yağı; MY/75 veya balık yağı; BY/75), % 3.5 mineral karışımı, %1.5 vitamin karışımı, %0.3 dL-metionin, %0.2 kolin ve %2 agardan oluşmuştur. Kullanılan bu diyet batı toplumlarında yüksek yağlı diyetle karşılık gelmektedir. Sentetik diyetin hazırlanmasında kullanılan vitamin karışımı diyetin gramı başına yaklaşık olarak 0.065 IU dl- α -tokoferol sağlamaktadır (65 IU/kg diyet). Sentetik diyetlerin hazırlanması esnasında, mısır yağı ve balık yağının E vitamini içerikleri farklı olduğundan dl- α -tokoferol asetat (Sigma) kullanılarak son E vitamini konsantrasyonun 0.075 IU/g diyet (75 IU/kg) olmasına dikkat edilmiştir. Üçüncü grupta yer alan hayvanların yedikleri diyetin E vitamini içeriği, yukarıda açıklanan yöntem kullanılarak son konsantrasyon 0.5 IU/g diyet (500 IU/kg) olacak şekilde hazırlanmıştır. Bu grupta kullanılan yağ türü ise balık yağı olmuştur (BY/500). Hazırlanan diyetlerde bekleme sırasında oluşabilecek oksidasyonu önlemek için azami ölçülerde dikkat gösterilmiştir. Bundan dolayı diyetler haftalık olarak hazırlanmış ve hava geçirmez plastik koruyucularda 4°C'de saklanmıştır. Su ve yem her gün taze olarak ad lib olarak verilmiştir. Hayvanların vücut ağırlıkları haftalık, yedikleri yem miktarı ise günlük olarak ölçülmüştür.

Anestezi (eter) altında hayvanların karaciğerleri çıkartılarak 0.15M NaCl ile yıkama işlemi yapılmış, takiben karaciğer örnekleri homojenize edilerek mitokondriyal ve mikrozomal membran fraksiyonları ultrasantrifüj yöntemi ile ayrıştırılmıştır (8). Gruplardan elde edilen membran fraksiyonları pool yöntemiyle biriktirilerek likit nitrojenle muamele edilmiş ve -70°C'de saklanmıştır. Membran analizleri en kısa süre içerisinde yapılmıştır. Membranlardaki in vitro lipid peroksidasyonu non-enzimatik ve enzimatik

olarak modifiye edilmiş Laganieri ve Yu (8) yöntemiyle çalışılmıştır. Membran ve serum E vitamini analizleri spektrofotometrik (9) olarak, tokoferol asetat (Sigma) standardı kullanılarak yapılmıştır. Membran lipidleri kloroform/methanol (2:1) kullanılarak ekstrakte edilmiş, yağ asitleri metanolik-HCl ile derivitize edilmiştir. Yağ asit analizleri sıkıştırılmış silika kapiller kolon kullanılarak gaz-likit kromatografisi ile analiz edilmiştir (8). Witting ve Horwitt (10) yöntemiyle peroksidasyona olan hassasiyet (PC, peroxidizability) değeri hesaplanmıştır. Bu hesaplama yapılırken aşağıdaki formül kullanılmıştır.

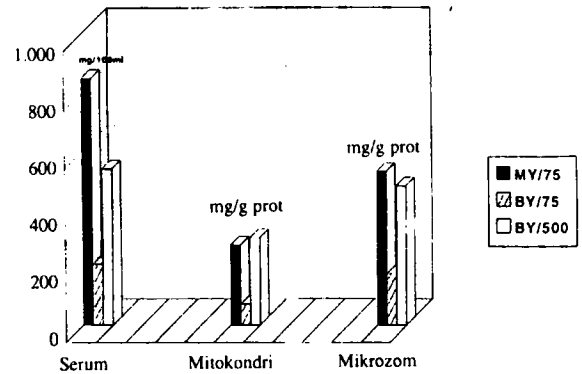
$$PC = (\% \text{ tekli doymamış yağ asitleri} \times 0.025) + (\% \text{ çiftli doymamış yağ asitleri} \times 1) + (\% \text{ üçlü yağ asitleri} \times 2) + (\% \text{ dördümlü yağ asitleri} \times 4) + (\% \text{ beşli yağ asitleri} \times 5) + (\% \text{ altılı yağ asitleri} \times 6)$$

Çalışmada kullanılan balık yağının (menhaden oil) içeriği: palmitik asit (16:0), %19; palmitoleik asit (16:1 n-7), %12; oleik asit (18:1 n-9), %15; linoleik asit (18:2 n-6), %5; eikozapentanoik asit (20:5 n-3), %15; dekozahekzanoik asit (22:6 n-3), %11 iken mısır yağının bileşimi: 16:0, %12; 16:1 n-7, %0.1; 18:1 n-9, %28; 18:2 n-6, %58 bulunmuştur.

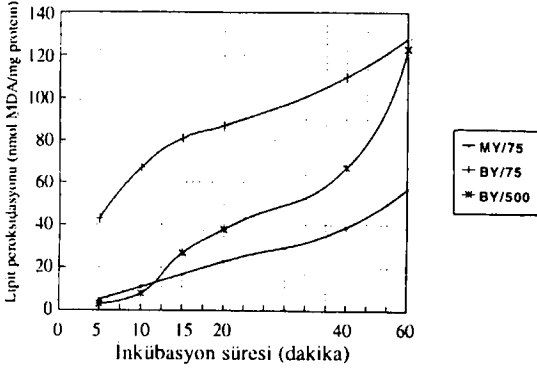
İstatistik analizler Minitab-8.2 paket programı ile bilgisayarda yapılmıştır. Veri analizlerinde çoklu varyans ve Duncan's testleri kullanılmıştır. Bütün sonuçlar ortalama ve standart hata olarak verilmiştir.

BULGULAR

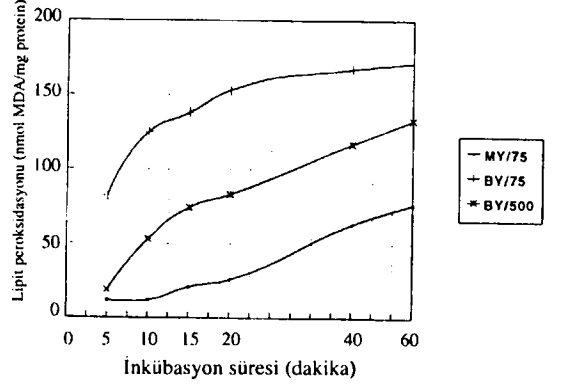
Her üç grupta yer alan hayvanlar çalışma sürecinde ve sonunda normal beklenen büyümeyi göstermişler ve gruplar arası vücut ağırlığı açısından bir fark gözlenmemiştir. Ayrıca günlük tüketilen besin miktarla-



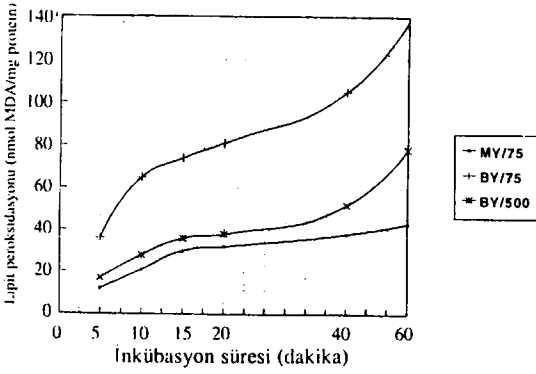
Şekil 1. Çalışma Gruplarında Serum ve Karaciğer Membran Fraksiyonlarında E Vitamini Düzeyleri



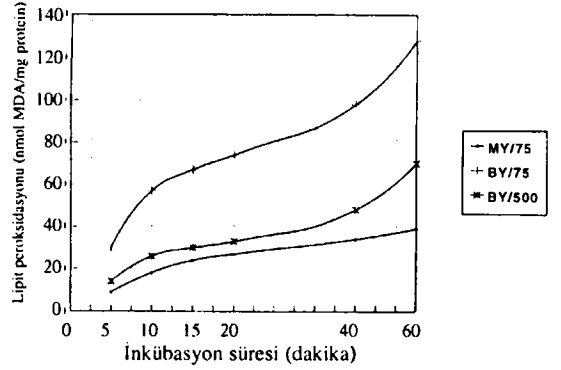
Şekil 2-A. Çalışma Gruplarında Karaciğer Membran Fraksiyonlarında *in vitro* Koşullarda Enzimatik Mitokondriyal Lipit Peroksidasyonu



Şekil 2-B. Çalışma Gruplarında Karaciğer Membran Fraksiyonlarında *in vitro* Koşullarda Enzimatik Mikrozoal Lipit Peroksidasyonu



Şekil 3-A. Çalışma Gruplarında Karaciğer Membran Fraksiyonlarında *in vitro* Koşullarda Non-Enzimatik Mitokondriyal Lipit Peroksidasyonu



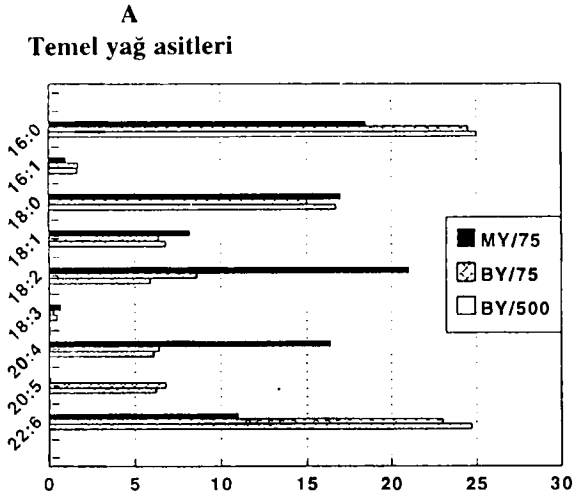
Şekil 3-B. Çalışma Gruplarında Karaciğer Membran Fraksiyonlarında *in vitro* Koşullarda Non-Enzimatik Mikrozoal Lipit Peroksidasyonu

rı açısından da herhangi bir fark gözlenmemiştir (sonuçlar verilmemiştir).

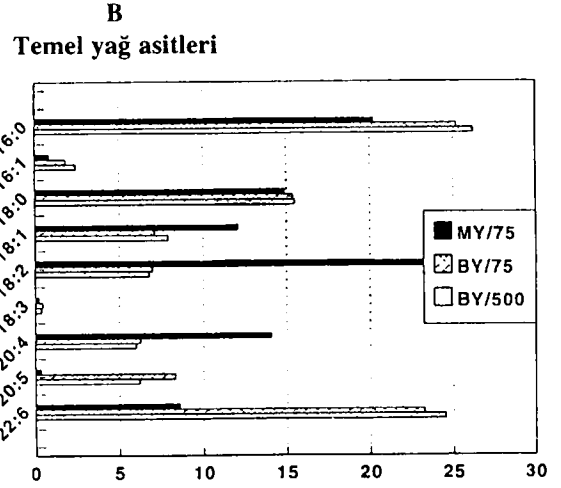
Yüzde 20 yağ ve 75 IU E vitamini içeren her iki diyetle (MY/75 ve BY/75) beslenen hayvanlar karşılaştırıldığında; serum ve karaciğer E vitamini düzeyleri BY/75 grubunda düşük bulunmuştur ($p < 0.006$). Şekil 1'den görüleceği üzere balık yağı ile yaklaşık 4 aylık besleme periyodu, mısır yağı ile beslenen gruba oranla serum ve membran E vitamini düzeylerini %23 - 30 oranında azaltmıştır. %20 balık yağı içeren diyetin E vitamini konsantrasyonu 500 IU ye (BY/500) çıkarıldığında ise serum ve membran E vitamini düzeyleri, BY/75 grubuna kıyasla %25 - 40 yüksek bulunurken MY/75 grubuna oranla %6 - 8 düşük olduğu saptanmıştır.

Karaciğerden elde edilmiş mitokondrial ve mikrozoal membranlar prooksidant olarak tiyobarbitürik

asit (TBA) reaktifi ile muamele edilerek lipit peroksidasyon ürünü olan malondialdehit (MDA) değerleri *in vitro* koşullarda enzimatik (Şekil 2-A ve Şekil 2-B) ve non-enzimatik (Şekil 3-A ve Şekil 3-B) olarak değerlendirilmiştir. Zamana bağlı olarak izlenen lipit peroksidasyonun mısır yağı ile beslenen grupta (MY/75) en az olduğu saptanmıştır. Serum ve karaciğer E vitamini düzeylerinde görüldüğü gibi, balık yağı diyetinin E vitamini içeriği 500 IU/kg çıkarıldığında lipit peroksidasyonu BY/75 grubuna kıyasla daha az olduğu saptanmıştır. Bir başka deyişle, balık yağı diyetine eklenen E vitamini lipit peroksidasyonunu azaltmaktadır. Ayrıca Şekil 2 ve 3 den görüleceği üzere, zamana bağlı oluşan MDA birikimi değerlendirildiğinde balık yağı ile beslenen farelerden elde edilen membranların peroksidasyona olan hassasiyeti mısır yağı ile beslenen hayvanlara oranla daha yüksek bulunmuştur.



Şekil 4-A. Çalışma Gruplarında Karaciğer Membran Fraksiyonunda (Mitokondri) Temel Yağ Asidi Bileşimleri



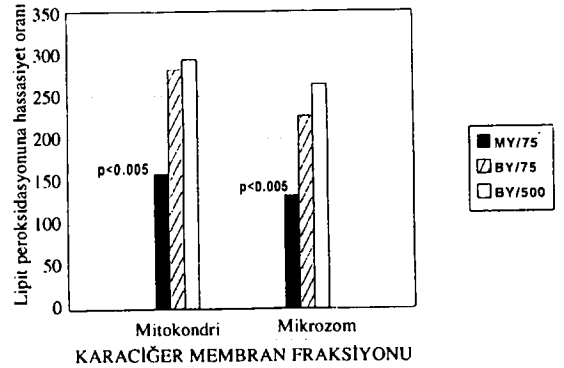
Şekil 4-B. Çalışma Gruplarında Karaciğer Membran Fraksiyonunda (Mikrozom) Temel Yağ Asidi Bileşimleri

Karaciğerden elde edilen mitokondri ve mikrozom membranlarının temel yağ asitleri bileşimi incelendiğinde (Şekil 4-A ve Şekil 4-B) mısır yağı ile beslenen hayvanların membranlarında linoleik asit (18:2 n-6) ve araşidonik asit (20:4 n-6) oranları yaklaşık %35-40 olarak saptanırken balık yağı ile beslenen hayvanlarda bu oranın % 11-17 arasında olduğu saptanmıştır (mısır yağı x balık yağı: $p<0.01$). Bunun tam karşılığı olarak, balık yağı ile beslenen hayvanların eikozapentanoik asit (20:5 n-3) ve dekozahekzanoik asit (22:6 n-3) oranları yaklaşık %29-33 olarak saptanırken mısır yağı ile beslenen hayvanlarda bu oran %7-10 arasında bulunmuştur (mısır yağı x balık yağı: $p<0.01$).

Araştırma yöntemi ve araçlarında açıklandığı gibi karaciğer membran fraksiyonlarının peroksidasyona olan hassiyetleri incelendiğinde (Şekil 5), balık yağı ile beslenen hayvanların gerek mitokondriyal gerekse de mikrozomal membranlarının peroksidasyona olan hassiyetlerinin mısır yağı ile beslenen hayvanlara oranla daha yüksek olduğu bulunmuştur ($p<0.01$).

TARTIŞMA

Bu çalışmada standart E vitamini içeren (0.075 IU/ g diyet) balık yağı ile beslenen hayvanlarda karaciğer membran ve serum E vitamini düzeylerinin düştüğü saptanmıştır. Diyetteki E vitamini düzeyi 0.5 IU/g düzeyine çıkartıldığında bu parametrelerde artışlar tesbit edilmiştir. Ancak bu değerlerin mısır yağı ile beslenen hayvanların değerlerinden düşük olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlardan da anlaşılacağı gibi diyetin doymamış yağ asit düzeyi ile E vitamini ara-



Şekil 5. Çalışma Gruplarında Karaciğer Membran Fraksiyonlarının Lipit Peroksidasyonuna Hassasiyet Oranları

sında sıkı bir ilişki söz konusudur. Diyetin doymamış yağ asit düzeyi arttıkça E vitamini olan gereksinim artmaktadır (11). Çoklu doymamış yağ asitlerinin organizmada perokside olma şansının daha yüksek olduğu gerek bu çalışmada gerekse diğer çalışmalarda gösterilmiştir (11, 12). Lipit peroksidasyonunun önlenmesinde antioksidant özelliğe sahip E vitamini önemli bir moleküldür (12). Bu çalışmada gözlemlendiği gibi yüksek derecede doymamış yağ asitlerinden (20:5 ve 22:6 n-3) zengin balık yağının karaciğer membranlarında in vitro lipit peroksidasyonunu mısır yağına (18:2 ve 20:4 n-6 yağ asitleri açısından zengindir) oranla daha fazla arttırdığı gözlenmiştir. Ancak diyetle eklenen E vitamini, antioksidant ve

membran koruyucu özelliğinden dolayı diyetle yer alan yağ cinsinin (dolayısıyla yağ asitleri) değiştirilmesine rağmen lipit peroksidasyonunu azalttığı bulunmuştur. Diyetle yer alan E vitamini düzeyi düşünülmediği takdirde hesaplama yolu ile bulunan PC değeri, bir yağ türünün organizma için lipit peroksidasyonu açısından değerlendirildiğinde hangi düzeylerde risk taşıyabileceği konusunda bilgi verebileceği açıktır. Tek başına hesaplama sonucu bulunan PC değerlerine baktığımızda, mısır yağının organizma açısından balık yağına oranla daha az zarar getireceği açıktır. Ancak PC değerleri ile in vitro karaciğer membran fraksiyonlarında enzimatik ve non-enzimatik lipit peroksidasyonu değerlendirildiğinde, organizma şartlarında lipit peroksidasyon düzeyini ayarlayan bir başka etmenin, E vitamini olduğu görülmektedir. Bundan dolayı diyetle yer alan yağ cinsi ve miktarı E vitamini gereksinimin belirlenmesinde önemli bir etmendir.

Sonuç olarak kanser, kronik inflamatuvar hastalıklar ve hiç şüphesiz kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde önemli bir parametre olan n-3 yağ asitlerinin (balık yağı gibi) diyetle yer alması gereken tüketim miktarları saptanırken ve önerilirken bu tür yağ asitlerinin organizma açısından getirebileceği olumsuz etkiler (lipit peroksidasyonu vb) gözardı edilmemelidir. Organizmada olası prooksidant aktivite sonucu gelişebilecek lipit peroksidasyonunu takiben serbest radikal oluşumlarının oluşturacağı zararlı etkileri önlemede diyetle yer alması gereken antioksidant moleküllerin (E, C vitaminleri ve b-karoten vb) önemi de düşünülmelidir.

KAYNAKLAR

1. Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am J Clin Nutr* 54:438-468, 1991.

2. Simopoulos AP, Kifer RR, Wykes AA. W 3 fatty acids: research advances and support in the field since June 1985 (worldwide). *World Rev Nutr Diet* 66:51-71, 1991.

3. Kinsella JE. Lipids, membrane receptors, and enzymes: effects of dietary fatty acids. *JPEN* 14:200S-217S, 1990.

4. Edwards-Webb JD, Gurr MI. The influence of dietary fats on the chemical composition and physical properties of biological membranes. *Nutr Res* 8:1297-1305, 1988.

5. Chow CK. Fatty acids in foods and their health implications. New York: Marcel Dekker, Inc., 1992.

6. Grimble RF. The maintenance of antioxidant defenses during inflammation. In: Wilmore DW, Carpentier YA, eds *Metabolic support of the critically ill patient*. Berlin: Springer-Verlag, 347-363, 1993.

7. Stampfer MJ, Remm EB. Epidemiologic evidence for vitamin E in prevention of cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 62(suppl): 1365S-1369S, 1995.

8. Lageniere S, Yu BP. Anti-lipoperoxidation action of food restriction. *Biochem Biophys Res Com* 145:1185-1189, 1987.

9. Taylor SL, Lambden MP, Tappel AL. Sensitive fluorometric method for tissue tocopherol analysis. *Lipids* 11:530-538 1976.

10. Witting LA, Horwitt MK. Effect of degree of fatty acid unsaturation in tocopherol deficiency-induced creatinuria. *J Nutr* 82:19-26 1964.

11. Puijn FB, Haenen GRMM, Bast A. Interplay between vitamin E, glutathione and dihydroliipoic acid in protection against lipid peroxidation. *Fat Sci Technol* 93:216-221, 1991.

12. De Keyser J, Klippel NDe, Merckx H, Vervaeck M, Herroelen L. Serum concentrations of vitamins A and E and early outcome after ischaemic stroke. *Lancet* 339:1562-1565, 1992.