

**T.C.
İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü**

**OKSİDATİF STRESE MARUZ KALMIŞ FARELERİN
KETEN TOHUMU İLE BESLENMESİNİN
ÇEŞİTLİ BİYOBELİRTEÇLER ÜZERİNE ETKİSİ**

İncilay GÖKBULUT

**DOKTORA TEZİ
Biyoloji Anabilim Dalı**

MALATYA- 2009

Tezin Başlığı :“Oksidatif Strese Maruz Kalmış Farelerin Keten Tohumu İle Beslenmesinin eşitli Biyobelirteçler Üzerine Etkisi”

Tezi Hazırlayan : İncilay GÖKBULUT

Sınav Tarihi : 12 Haziran 2009

Yukarıda adı geçen tez jürimizce değerlendirilerek Biyoloji Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav Jürisi Üyeleri

Prof. Dr. Hasan Hüseyin BAŐIBÜYÜK

Cumhuriyet Üniversitesi

Prof. Dr. Murat ÖZMEN

İnönü Üniversitesi

Doç. Dr. Özen ÖZBOY ÖZBAŞ

İnönü Üniversitesi

Doç. Dr. Dilek ASMA

İnönü Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. M. Őevket ÇETİN

İnönü Üniversitesi

Prof. Dr. İsmail ÖZDEMİR
Enstitü Müdürü

Onur Sözü

Doktora Tezi olarak sunduğum “**Oksidatif Strese Maruz Kalmış Farelerin Keten Tohumu İle Beslenmesinin Çeşitli Biyobelirteçler Üzerine Etkisi**” başlıklı bu çalışmanın, bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın, tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların, hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden olduğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

GÖKBULUT

İncilay

ÖZET

Doktora Tezi

OKSİDATİF STRESE MARUZ KALMIŞ FARELERİN KETEN TOHUMU İLE BESLENMESİNİN ÇEŞİTLİ BİYOBELİRTEÇLER ÜZERİNE ETKİSİ

İncilay GÖKBULUT

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

105 + ix sayfa

2009

Danışman: Prof. Dr. Murat ÖZMEN

Bu çalışma ile son yıllarda halk arasında popüler bir besin maddesi olan ve gün geçtikçe tüketimi artan keten bitkisi tohumunun, antioksidatif ve antikarsinojen etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada ağırlıkları ortalama 20 (± 2 gr) gram olan 8 haftalık 60 adet dişi fare (*Mus musculus*, *Bulb-C*) çeşitli formlarda beslenmeye tabi tutulmuşlardır. Deney süresince farelerin beslenmesi (*ad libitum*) izlenerek tüketilen yem miktarları kaydedilmiştir. Hayvanların tükettiği çeşme suyu (*ad libitum*) miktarı da belirlenmiştir. Ayrıca hayvanlarda çalışma süresince vücut ağırlığı düzenli olarak izlenmiş ve kaydedilmiştir. Araştırmaya alınan hayvanların bir kısmına (MNU) n-methyl n-uresurea enjeksiyon ile uygulanmıştır. Keten bitkisi tohumu ise hayvanların besinlerine katılarak, sindirim sistemi yolu ile verilmiştir. Uygulamanın 1., 2., 4., 8., 10. ve 12. haftalarında kan örnekleri alınan fareler, 12. hafta sonunda eter anestezisi altında servikal dislokasyon ile öldürülmüş ve karaciğer, bağırsak, mide dokuları histopatolojik değerlendirmeler ve/veya seçilmiş enzimatik biyobelirteç (EROD, AST, ALT, LDH, GST, GR, GP_x, CAT, CaE) değerlendirmeleri için alınmıştır. Yapılan histopatolojik değerlendirme sonuçlarına göre, kontrol grubundaki farelerin karaciğer dokuları normal histolojik yapıda gözlenirken, hayvanlara sadece MNU uygulaması yapılan grupta karaciğer parankiminde hemoraji ve nekroz alanları izlenmiştir. MNU uygulaması yanı sıra deney süresince keten tohumlu diyetle beslenen farelerde karaciğer kesitleri genellikle normal histolojik yapıda izlenirken, yer yer fokal nekroz alanları da dikkat çekmiştir. Bu durum MNU uygulaması ile birlikte olduğunda keten tohumunun kısmen toksik etkinin azaltılmasında olumlu rolü olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, dokularda hasarı saptama bakımından biyobelirteçler olarak kullanılan enzim aktivite değerleri de önem taşımaktadır. Buna göre sadece keten tohumu tüketen ve MNU uygulamasına tabi tutulmayan hayvanlarda tespit edilen düşük enzim aktivite değerlerine karşın, diğer gruplarda enzim aktivitesinde belirgin olarak bir artış tespit edilmiştir. Çalışmamızda elde edilen veriler, keten tohumu bitkisinin, MNU tarafından oluşturulan oksidatif stresi baskılayıcı rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte elde edilen araştırma bulgularına bağlı olarak, bu konuda daha detaylı ve

başkaca biyobelirteçler de kullanılarak keten bitkisi tohumunun güvenilirliğinin test edilmesi gerektiği sonucuna ulaşılmıştır.

ANAHTAR KELİMELER: Keten Tohumu, Oksidatif Stres, Biyobelirteç

ABSTRACT

PhD. Thesis

THE EFFECTS OF FLAXSEED ON SOME BIOMARKERS OF MICE EXPOSED TO OXIDATIVE STRESS

Incilay GOKBULUT

Inonu University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

105 + ix page

2009

Supervisor: Prof. Dr. Murat ÖZMEN (Ph. D.)

In this study, our aim was to investigate the antioxidative and anticarcinogenic effects of flaxseed, a popular functional food additive. Eight-weeks old 60 female mice (*Mus musculus, Bulb-C*), averaging 20 (± 2 gr) grams in weight, were used. Mice were fed *ad libitum* and had free access to tap water. The consumption of food and water were monitored during the course of experiments. Body weight of the animals was observed and recorded. Some animals were exposed to n-methyl n-nitrosurea (MNU) intraperitoneally at 50 mg/kg. Flaxseed were given to animals by mixing its grounded powder in commercial mice chow and animals consumed these mixture *ad libitum*. Blood was sampled at the 1, 2, 4, 8, 10 and 12th week of the experiments, from retroorbital sinusoids by microcapillary tubes for collecting the plasma samples. Animals were sacrificed by cervical dislocation under ether anaesthesiae at the end of 12th week after the last blood collection. Liver, intestine and stomach were removed immediately by surgical technics to use in histopathological examinations and/or for selected biomarker enzyme activity assays. For this aim, ethoxyresorufin O-deethylase (EROD), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), lactate dehydrogenase (LDH), glutathion S-transferase (GST), glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GP_X), catalase (CAT) and carboxylestarase (CaE) activities were determined from the plasma and/or liver tissue samples.

According to the results obtained from histopathological tests, only MNU exposed group found to have some necroses and hemorages on liver parenchymas though liver tissue of control group was observed as normal. Group exposed to MNU along with flaxseed diet was found to have normal liver histopathology except for some rare necroses. This finding may probably due to the protective effect of flaxseed against toxic potential of

MNU. The activity of respective enzymes of the groups consuming only flaxseed (grup 4) on normal diet (control group) found to be lower, whereas the rest showed elevated enzyme activities, suggesting a contribution of MNU. Some natural compounds in the food are assumed to be protective against common stress factors. Flaxseed is an example of such kind of foods and is consumed widely. However, there is a need for further studies to consider the flaxseed as a safe food for a healthy life.

KEY WORDS: Flaxseed, Oxidative Stress, Biomarker

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın her aşamasında yardım, öneri ve desteğini esirgmeden beni yönlendiren, çalışma süresince karşılaşılan sorunların çözümünde büyük emeği olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Murat ÖZMEN'e;

Tez çalışması boyunca uyarı ve önerileri ile beni yönlendiren Tez İzleme Komitesi Üyeleri değerli hocalarım Sayın Doç. Dr. Özen ÖZBOY ÖZBAŞ'a ve Sayın Doç. Dr. Dilek ASMA'ya,

Çalışma süresince karşılaştığım her türlü problemin çözümünde maddi ve manevi büyük emeği olan ve çalışmanın her aşamasında yardım, öneri ve desteğini gördüğüm Sayın Dr. Abbas GÜNGÖRDÜ'ye,

Tez boyunca karşılaştığım sorunlar karşısında bana büyük destek ve yardımcı olan Sayın Dr. Gökhan DURMAZ'a, Sayın Dr. Burhan ATES'e ve Araş. Grv. Tuğçe BİLENLER'e,

Tüm bu süreçte istemeden de olsa ihmal ettiğim, fakat her şeye rağmen sevgi ve desteğini hep hissettiğim sevgili eşim SERHAN ve canım çocuklarım UMUT ve EGE'ye teşekkür ederim.

Ayrıca bu çalışmayı (Proje No: 2007/43) maddi olarak destekleyen İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkürlerimi sunarım.

İncilay GÖKBULUT

İÇİNDEKİLER

ONUR SÖZÜ	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
1 GİRİŞ	1
1.1. Keten Tohumu	1
1.1.1. Keten tohumunun tarihteki yeri	4
1.1.2. Keten tohumunun yetiştirilme koşulları	5
1.1.3. Keten tohumunun Türkiye ve Dünyadaki durumu	7
1.1.4. Keten tohumunun bileşenleri	7
1.1.4.1 Keten tohumu yağı	7
1.1.4.2. Keten tohumunda bulunan proteinler	8
1.1.4.3. Keten tohumunda bulunan fitokimyasallar	9
1.1.4.3.1. Lignanlar	9
1.1.4.3.2. Fenolik asitler	10
1.1.4.3.3. Flavonoidler	10
1.1.4.3.4. Tokoferoller	11
1.1.5. Keten tohumunun sağlık açısından olumsuz etkileri	11
1.2. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres	12
1.2.1. Oksijen ve canlılar için önemi	12
1.2.2. Serbest radikaller	13
1.2.2.1. Biyolojik sistemlerde bulunan serbest radikaller	13
1.2.2.2. Serbest radikallerin oluşumu	14
1.2.3. Serbest oksijen radikalleri	15
1.2.4. Serbest radikallerin etkileri	15
1.2.5. Antioksidan savunma mekanizmaları	18
1.2.5.1. Antioksidan sistemler	20
1.2.5.1.1. Süperoksid dismutaz (SOD) enzimi	21
1.2.5.1.2. Katalaz (CAT) enzimi	21
1.2.5.1.3. Glutasyon peroksidaz (GPx) enzimi	22
1.2.5.1.4. Glutasyon S-Transferaz enzimi	23
1.2.5.1.5. Glutasyon redüktaz (GR) enzimi	23
1.2.6. Toksikolojide serbest radikallerin önemi	23
1.3. Kanser Mekanizması	24
1.3.1. Kanser biyolojisi	25
1.3.2. Kanser hücrelerinin özellikleri	27
2. KAYNAK ÖZETİ	29
3. MATERYAL VE METOD	34
3.1. Keten Tohumunda Yapılan Bazı Kimyasal Analizler	34
3.1.1. Toplam kurumadde analizi	34
3.1.2. Kül tayini	34

3.1.3.	Protein tayini.....	34
3.1.4.	Yağ analizi	34
3.1.5.	Besinsel lif tayini	35
3.1.6.	Radikal süpürme gücü (RSG)	35
3.2.	Deney Gruplarının Oluşturulması.....	35
3.2.1.	Hayvanlar üzerinde yapılan işlemler	37
3.2.2.	Doku homojenatlarının hazırlanması.....	37
3.2.3.	Enzim aktivitelerinin belirlenmesi.....	38
3.2.4.	Plazma enzimleri aktivite tayinleri	39
3.2.4.1.	Plazma LDH aktivitesi	39
3.2.4.2.	Plazma AST aktivitesi.....	39
3.2.4.3.	Plazma ALT aktivitesi	39
3.2.4.4.	Plazma kreatinin miktarı tayini.....	39
3.3.	Dokularda Enzim Aktivitelerinin Saptanması	40
3.3.1.	Glutasyon S-Transferaz (GST) aktivitesi	40
3.3.2.	Glutasyon redüktaz (GR) aktivitesi.....	40
3.3.3.	Karboksil esteraz (CaE) aktivitesi	40
3.3.4.	Glutasyon peroksidaz (GP _x) aktivitesi.....	41
3.3.5.	Katalaz (CAT) aktivitesi	41
3.3.6.	Laktat dehidrogenaz (LDH) aktivitesi	41
3.3.7.	Aspartat amino transferaz (AST) aktivitesi	41
3.3.8.	Alanin amino transferaz (ALT) aktivitesi.....	42
3.4.	EROD Aktivitesi İçin Karaciğer Dokusu Homojenatlarının Hazırlanması.....	42
3.4.1.	Karaciğer mikrozomal EROD aktivitesi.....	42
3.4.2.	Biyotransformasyon indeksinin hesaplanması.....	43
3.5.	Karaciğer Mikrozomal, Sitozol ve diğer Doku Örneklerinin Toplam	43
	Protein Tayini.....	43
3.6.	Histoloji Çalışmaları	43
3.7.	İstatistiksel Analiz.....	44
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI.....	45
4.1.	Kullanılan Keten Tohumunun Kimyasal Analiz Sonuçları	45
4.2.	Hayvan Ağırlıkları İle İlgili Bulgular	46
4.3.	Hayvanların Haftalık Yem Tüketimleri İle İlgili Bulgular	46
4.4.	Hayvanların Su Tüketimleri İle İlgili Bulgular.....	46
4.5.	Plazma AST, LDH Enzim Aktiviteleri ve Kreatinin Konsantrasyonu	51
4.5.1.	Kan plazması biyokimyasal analiz bulguları	51
4.6.	Dokularda (Karaciğer, Mide ve Bağırsak) Elde Edilen Bulgular	54
4.6.1.	Seçilmiş dokularda saptanan enzim aktiviteleri.....	54
4.6.1.1.	Karaciğer dokusu örneklerinde saptanan enzim aktiviteleri	54
4.6.1.2.	Mide dokusu örneklerinde saptanan enzim aktiviteleri	58
4.6.1.3.	İnce barsak dokusu örneklerinde saptanan enzim aktiviteleri	59
4.7.	Histolojik Bulgular.....	60
4.7.1.	Mide dokusu.....	60
4.7.2.	İnce bağırsak dokusu.....	66
4.7.3.	Karaciğer dokusu	70
5.	TARTIŞMA	78
6.	KAYNAKLAR	86

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Keten tohumunun boyutları	2
Şekil 1.2.	Keten bitkisinin görüntüsü.....	5
Şekil 1.3.	Oksidatif Stres.....	19
Şekil 1.4.	Kanserin poligenik nedenleri.....	25
Şekil 1.5.	DNA hasarı, serbest radikaller ve gen mutasyonları, spontan mutasyon, hücrel yaşlanma gibi yaşlanmanın genetik temelleri ve buna etki eden faktörler	26
Şekil 1.6.	Kanser hücrelerinin temel özellikleri	28
Şekil 4.1.	Normal histolojik yapıda mide tabakaları (Kontrol Grubu)	61
Şekil 4.2.	Normal histolojik görünümde mide yüzey epiteli ve bez yapıları (Kontrol grubu)	61
Şekil 4.3.	Mide yüzey epitelinde dejenerasyon (Grup 1).....	62
Şekil 4.4.	Normal histolojik yapıda mide tabakaları (Grup 1).....	62
Şekil 4.5.	Mide yüzey epiteli ve bezlerin apikalinde dejenerasyon (Grup 2)	63
Şekil 4.6.	Mide yüzey epitelinde dejenerasyon (Grup 2).....	63
Şekil 4.7.	Mide yüzey epitelinde dejenerasyon (Grup 3).....	64
Şekil 4.8.	Mide yüzey epitelinde dejenerasyon (Grup 3).....	64
Şekil 4.9.	Normal histolojik yapıda mide yüzey epiteli ve bezler (Grup 4).....	65
Şekil 4.10.	Mide yüzey epitel hücrelerinde yassılaşıma (Grup 5)	65
Şekil 4.11.	Normal histolojik yapıda ince bağırsak kesiti (Kontrol Grubu)	66
Şekil 4.12.	Normal histolojik yapıda villus ve Liberkühn kriptaları (Kontrol Grubu)	67
Şekil 4.13.	Normal histolojik yapıda villus ve Liberkühn kriptaları (Grup 1).....	67
Şekil 4.14.	Normal histolojik yapıda ince bağırsak kesiti (Grup 2).....	68
Şekil 4.15.	Normal histolojik yapıda ince bağırsak kesiti (Grup 3).....	68
Şekil 4.16.	Normal histolojik yapıda villuslar ve Liberkühn kriptaları (Grup 3)	69
Şekil 4.17.	Normal histolojik yapıda villuslar ve Liberkühn kriptaları (Grup 4)	69
Şekil 4.18.	Normal histolojik yapıda ince bağırsak kesiti (Grup 5).....	70
Şekil 4.19.	Normal histolojik yapıda karaciğer kesiti (Kontrol Grubu).....	70
Şekil 4.20.	Karaciğer parankimasında hemoraji ve nekroz (Grup 1).....	71
Şekil 4.21.	Merkezi damarlar çevresindeki hepatositlerde intrasitoplazmik vakuoller ve hidropik dejenerasyon (Grup 1).....	72
Şekil 4.22.	Normal histolojik görünümde hepatositler (Grup 2)	72
Şekil 4.23.	Karaciğer parankimasında fokal nekroz alanı (Grup 2).....	72
Şekil 4.24.	Merkezi damarlar çevresinde ve parankima içinde kordonlar şeklinde hepatosit dejenerasyonu (Grup 3)	73

Şekil 4.25. Perivasküler alanlarda inflamatuvar infiltrasyon (Grup 3)	74
Şekil 4.26. Eozinofilik sitoplazmalı, piknotik nukleuslu hepatositler (Grup 3).....	74
Şekil 4.27. Karaciğer parankimasında nekroz (Grup 4).....	75
Şekil 4.28. Hemoraji ve hepatosit nukleuslarında piknoz (Grup 4).....	75
Şekil 4.29. Portal alanda inflamatuvar infiltrasyon (Grup 4).....	76
Şekil 4.30. Merkezi damarlar çevresinde hepatositlerde hidropik dejenerasyon (Grup 4).....	76
Şekil 4.31. Vasküler konjesyon, parankimal nekroz ve hemoraji (Grup 4).....	77
Şekil 4.32. Portal alanlarda inflamatuvar infiltrasyon ve perivasküler ödem	77

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Reaktif oksijen türler	14
Çizelge 1.2. Serbest radikallerin hücredeki başlıca zararlı etkileri	18
Çizelge 3.1. Uygulama grupları.....	37
Çizelge 4.1. Keten tohumu içeriğinin kimyasal analiz sonuçları	45
Çizelge 4.2. Gruplara göre haftalık hayvan vücut ağırlıklarının ort ± standart hata değerleri	48
Çizelge 4.3. Hayvanların haftalık ortalama yem tüketim miktarları	49
Çizelge 4.4. Hayvanların haftalık su tüketimleri.....	50
Çizelge 4.5. Beş farklı dönemde hayvanlardan alınan kan örneklerinde plazma AST ve LDH aktivitesi (U/ml) ve KREATİNİN konsantrasyonu (mg/dl).....	52
Çizelge 4.6. 12 haftalık uygulama süreci sonunda hayvanlardan elde edilen karaciğer, mide ve ince barsak dokularında saptanan AST, ALT, LDH, GST, GR, GP _x , CaE, CAT aktivitesi ile hepatic mikrozomal EROD aktivite değerleri.....	55

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AACC	American Association of Cereal Chemists
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
ALT	Alanin Aminotransferaz
AST	Aspartat Aminotransferaz
ASTM	Amerikan Standartları Enstitüsü
BI	Biyotransformasyon İndeksi
CaE	Karboksilesteraz
CAT	Katalaz
CDNB	1-kloro- 2,4-dinitrobenzen
CYP	Sitokrom P450
ÇÖ	Çözünmüş Oksijen
DPPH	Diphenyl Picryl Hydrazyl
DTNB	5, 5'-dithiobis (2-nitrobenzoik asit)
E ₂	17β-östradiol
EBK	Endokrin Bozucu Kimyasal
EROD	7-Etoksirezorufin- <i>O</i> -deetilaz
FDA	Food and Drug Administration
GSH-P _x	Glutatyon Peroksidaz
GSSG-R	Glutatyon Redüktaz
GRAS	Generally Recognized as Safe
GSH	Redükte Glutatyon
GST	Glutatyon S-transferaz
GSSG	Okside Glutatyon
LDH	Laktat Dehidrogenaz
LPO	Lipid Peroksidasyonu
MNU	N-Methyl N-Uresurea
NAD ⁺	Nikotinamid Adenin Dinükleotid (Okside)
NADH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid (redükte)
PNPA	p-nitrofenolasetat
RSG	Radikal Süpürme Gücü
SH	Standart Hata

SDG
U/L
OD
mOD

Sekoisolarisiresinol Diglukozid
Unite/litre
Optik Densite
Miliptik Densite

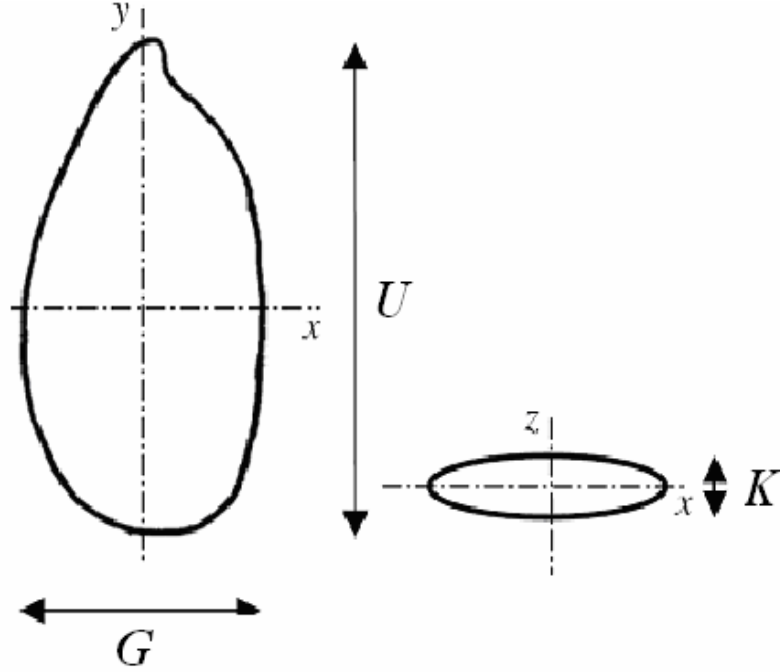
1. GİRİŞ

Besinlerin temel işlevi, organizmanın metabolik gereksinimleri için gerekli maddeleri sağlamaktır. Besinler, metabolik aktivitemiz için gerekli makro- ve mikro besleyicilerden başka sağlığımız üzerinde olumlu etkileri olan bileşenleri de içerirler. Son yıllardaki bilimsel çalışmalar diyet ve hastalıklar arasındaki ilişkiyi açık bir şekilde ortaya koymuş olup, epidemiyolojik çalışmalar diyetin kronik hastalıkların önlenmesindeki rolüne işaret etmektedir. Beslenme alışkanlıklarının daha fazla meyve, sebze ve tahıl tüketecek şekilde değiştirilmesi kronik hastalıkların önlenmesinde etkin ve pratik bir yaklaşımdır [1]. Bazı besinlerin “doğal” yollardan hastalıkların önlenmesi ve tedavisindeki etkinliğinin bilimsel olarak ortaya konulması, sağlığımızın korunmasında beslenme desteğinin önemini arttırmıştır. Bu bilgiler ışığında, sağlık açısından pek çok yararı olduğu bilinen ve dünyada tarımı yapılan ilk ürünlerden biri olan keten bitkisinin önemi giderek artmaktadır. Hastalık riskinin azaltılması, sağlıklı bir yaşam sürdürme isteğinin artması ve sağlıklı beslenme bilincinin gelişmesi gibi nedenlerle tüketiciler gıdalardan, beslenmenin yanında sağlık açısından faydalar sağlamayı da beklemektedirler.

Bu tez çalışması ile son yıllarda halk arasında popüler bir besin maddesi olan ve tüketimi artış gösteren keten bitkisi tohumunun, antioksidatif ve antikarsinojen etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu doğrultuda sindirim sistemi üzerinde etkili bir ajan olan n-methyl n-uresurea (MNU) uygulaması sonucu farelerde oksidatif stres oluşturulmuş ve beraberinde keten bitkisi tohumu tüketiminin, hayvanlar üzerindeki antioksidatif ve antikarsinojen etkileri araştırılmıştır.

1.1. Keten Tohumu

Keten bitkisi (ing. Flaxseed) *Geraniales* takımı, *Linaceae* familyasının *Linum* cinsinin *L. usitatissimum* türüne ait bir bitkidir [2]. *Linum usitatissimum* aynı zamanda Latince çok faydalı anlamında kullanılmaktadır [3]. Türe ve yetiştirilme koşullarına bağlı olarak 40- 90 cm. bitki boy uzunluğuna sahip keten, mavi çiçekli ve tek yıllık bir kültür bitkisidir. Küre şeklindeki meyve kapsülleri, her biri 5 katmandan oluşan 2 tohuma sahiptir. Tohumun kendisi düz ve oval olup Şekil 1.1’de gösterilmiştir.



U uzunluk, mm; **G** genişlik, mm; **K** kalınlık, mm

Şekil 1.1. Keten tohumunun boyutları

Taneler susam tanesinden daha iri olup, pürüzsüz ve parlak olan sert bir kabuğa sahiptir. Renk değişimi kabuktaki renk pigmentlerinin içeriğine göre kırmızımsı kahverengiden açık sarıya doğru değişiklik gösterebilir. Boyutları çeşitlere göre değişiklik gösterse de, yaklaşık olarak 3.0-6.4 mm uzunlukta, 1.8-3.4 mm genişlikte ve 0.5-1.6 mm kalınlıktadır [2, 4]. Tane halindeki keten tohumu yumuşak bir kırılmalığa sahiptir. Keten bitkisi tohumu yağ, protein ve besinsel lif bakımından oldukça zengindir. Bileşiminde %38- 42 yağ, %17- 32 protein, %23-40 besinsel lif, %2-6 karbonhidrat (lif hariç), %5-7 su, ve %4-6 kül bulunur [5-8]. Ayrıca yağında A, B, D ve E vitaminleri, çeşitli mineraller ve aminoasitler bulunmaktadır [9].

Besleyici özellikleri dışında vücudumuza fizyolojik yararlar sağlayan ve/veya kronik hastalık riskini azaltabilen besinlere fonksiyonel gıdalar adı verilir. Fonksiyonel gıdalar terimi yerine sağlık besinleri, tıbbi besinler, düzenleyici besinler, özel beslenme amaçlı besinler ve farmakolojik besinler gibi adlar da kullanılmaktadır [10]. Giderek artan sayıda bilimsel çalışma besin bileşenlerinin sağlık üzerinde olumlu etkilerinin olduğuna, kardiyovasküler hastalıklar, kanser ve osteoporoz gibi hastalıkların önlenmesine katkıda

bulduğuna ilişkin sonuçlar vermektedir. Keten tohumu bileşiminde yer alan Omega-3 yağ asitleri, α -linolenik asit (ALA) ve lignan olarak bilinen fenolik bileşenlerden dolayı, son yıllardaki fonksiyonel gıda olarak tüketimi giderek büyük bir artış göstermiştir. Keten tohumu ile ilgili çok sayıda araştırma bulunmaktadır [11]. Tüketiminin artışıyla, beraberinde çok faydalı sağlık etkileri olacağı iddia edilmektedir. Keten tohumu ile ilgili yapılan araştırma sonuçlarına göre; meme ve kolon kanserini önleyici etkileri [12], kan glukoz seviyesini düşürücü etkisi [5], hipokolesterolemik/hipotrigliseridemik etkileri [13-16], lupus nefritis hastalığına karşı anti-inflamator ajan etkisi [17] araştırılmıştır. Hiperlipemik kişilerde keten tohumu kullanımının total kolesterol, LDL kolesterol ve trigliserid değerlerini düşürerek, antiaterojenik etki oluşturduğu rapor edilmektedir [15]. α -linolenik asit (ALA) beyin gelişimi ve görsel fonksiyonlar için elzem iken, linoleik asit (LA) neonatal büyüme ve ovulasyon için esansiyeldir [9]. Eksikliğinde yavaş büyüme, görme zayıflığı, öğrenme yeteneğinde zayıflık, kol ve bacaklarda uyuşukluk hissi ve davranış değişiklikleri görülür. Ayrıca, ALA'nın tümör inhibisyonunda rol oynadığı ve kardiyovasküler hastalıklara karşı koruma sağladığı iddia edilmektedir. Keten tohumunda bulunan α -linolenik asitlerin (ALA) kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu olduğu rapor edilmiştir. Özellikle kemik kırılma riskinin azaltılması ve kan pıhtılaşma süresinin uzaması gibi kalp damar hastalıkları ile ilgili pek çok riskli durumun giderilmesinde büyük rol oynadığı rapor edilmiştir [18-21]. α -linolenik asit (ALA) ve linoleik asit (LA) esansiyel yağ asitleri olup, dışarıdan diyetle alınmaları gerekmektedir. Keten tohumunun içerdiği yağ asitleri vücut sıcaklığının korunması, miyelin kılıflarının yapılması, dokuların korunması ve enerji üretimi için hayati önem taşımaktadır. Ayrıca keten tohumu yağı, laksatif özelliği nedeniyle kronik kabızlığa karşı da kullanılmaktadır [22].

Keten tohumunun bileşiminde %23-40 oranında besinsel lif bulunmaktadır. Bunun %20'si çözünebilir formdadır. Çözünebilir liflerin kolesterol düşürücü etkisi ve buna bağlı olarak kalp-damar hastalıklarını önlemede etkili olduğu bilinmektedir. Çözünebilir lifin %7-10'unu teşkil eden müsilajın laksatif etkisi vardır. Ayrıca, kan glukoz düzeyini sabit tutmada yardımcı oldukları da rapor edilmiştir [23]. Sağlık açısından pek çok faydası rapor edilen ve keten tohumu kuru ağırlığının % 28'ini oluşturan besinsel lifler lignan şeklinde bulunmaktadır. Doğal laksatif bileşenler olarak adlandırılan bu bileşenler bağırsaklardaki suyu bağlayarak, dışkı ağırlığının miktarını ve dolayısıyla bağırsak hareketlerini artırırlar.

Fitoöstrojen bakımından çok zengin olan lignanlar menopoz döneminde ortaya çıkan rahatsızlıkların giderilmesine yardımcı olurlar [24]. Ayrıca keten tohumunun pek çok hormonal kanserlerin (prostat, göğüs, rahim, yumurtalık v.s) oluşumunu engellediği ve antikanserojen olarak görev yaptığı da rapor edilmiştir. Amerika Ulusal Kanser Enstitüsü, kanser önleyici gıdalar arasına aldığı ve üzerinde çalışılmasını öngördüğü 6 bitkisel materyalden birisi olarak keten tohumunu belirlemiştir [25].

1.1.1. Keten tohumunun tarihteki yeri

Keten Mısırlılardan beri tarımı yapılan ve çok değişik amaçlarla kullanılan bir bitkidir. Liflerinin dokumacılıkta kullanılmasının yanında, gıda bileşeni olarak ve tıbbi özellikleri nedeniyle tüketimi M.Ö. 3000 yıllarına kadar dayanmaktadır [26]. Dünyada kültüre alınış zamanı kesin olarak bilinmemekle beraber, ilk olarak M.Ö. 3000 yıllarında Babil kayıtlarında karşımıza çıkmaktadır. Bu döneme ait mezar odalarında ketenin kültüvasyonu ve giysi olarak kullanımına dair figürler resmedilmiştir. Daha sonra M.Ö. 4000-3500 yıllarında Mezopotamya ve Mısır'da tarımının yapıldığı belirtilmektedir. Eski Mısır piramitlerinde keten kapsülü ve lifleri bulunmuştur ve mumyaların keten bezleri ile sarılı oldukları rapor edilmektedir. M.Ö. 6500'de Hipokrat, keteni karın ağrılarını dindirmek üzere kullandıklarını belirtmektedir. Aynı döneme ait bulunan kayıtlarda Theophrastus ketenin “öksürük tedavisinde bir musilaj” olarak kullanıldığını belirtmektedir [27]. Tarihsel kayıtlar M.Ö. 9000-8000 yıllarında Türkiye'de de yetiştirildiğini göstermektedir. Özellikle ekmek yapımına katkı maddesi olarak [29] ve laksatif etkisi sebebiyle tıbbi amaçlı kullanılmıştır [30]. M.S. I. Yüzyılda Tacitus, ketenin hem bitki olarak hem de besin maddesi olarak kullanıldığını bildirmekte ve sağlık açısından faydalarını da uzun cümlelerle övmektedir. M.S. 8. yüzyılda Charlemagne, keten bitkisi tohumunun yetiştirilmesi ve tüketilmesi ile ilgili kanuni düzenlemeler yapmış ve keten tohumunun tüm Avrupa'da kullanımını yaygınlaştırmıştır. 15. yüzyılda Hildegard von Binden keteni tüm vücut ağrılarında sıcak kompres malzemesi olarak kullanmıştır [31].

Günümüzde ise 17. yüzyıldan bu yana Kanada'da yetiştirilmeye başlanan keten tohumunun bugün dünyadaki en büyük üreticisi de Kanada'dır. Keten tohumu tıbbi kullanımı dışında en fazla gıda alanında karşımıza çıkmaktadır. 1990'lardan bu yana ise

keten tohumunun besin olarak tüketimi artış göstermiştir. Keten tohumu hayvanların beslenmesinde hayvan yemi ve insan besini olarak tüketilmektedir. Özellikle ekme, bisküvi, pizza gibi fırıncılık ürünlerinin yapımında, şekerleme endüstrisinde ve organik insan tüketim ürünlerinin yapımında sıklıkla kullanılmaktadır [5, 32]. Ayrıca kümes hayvanlarına, bileşimlerinde bulunan omega-3 yağ asitlerinden dolayı yemlerine belli oranlarda ilave edilerek, omega-3'ce zenginleştirilmiş yumurtalar elde edilmesinde kullanılmaktadır [33]. Keten tohumu yağı atlar ve koyunlarda müshil ilacı olarak da kullanılmaktadır [34]. Geleneksel olarak yağı için yetiştirilen keten tohumu hava ve güneş ışığı teması ile kolaylıkla kuruyarak donma özelliği nedeniyle boya üretiminde ve ahşap taklidi, bir tür yer kaplaması olan Linoleum'un yapımında da önemli bir hammaddedir [2]. Cam parçalarını tahta yapılarla tutturmak amacıyla kullanılan macun, keten tohumu yağının ve kireç taşının belli oranlarda karıştırılmasıyla elde edilir. İzolasyon maddesi olarak da kullanıldığı bilinmektedir. Tohumundaki lifler nedeniyle tekstil alanında da keten tohumu önemli bir materyaldir.

1.1.2. Keten bitkisinin yetiştirilme koşulları



Şekil 1.2. Keten bitkisinin görüntüsü [35].

Keten, *Linum* cinsine ait ılıman ve subtropikal iklim bölgelerinde yetişen 200 kadar türü olan ve yaygın olarak kültürü yapılmış tek yıllık bir bitkidir. Kromozom sayıları aynı

olan yabancı bitkiler melezlenerek, kısa boylu köken olarak sıcak koşullara adapte olabilen *Linum angustifolium* türünün kültür varyeteleri geliştirilmiştir. Keten bitkisinin 90–100 cm. derinlere inebilen, 15cm. yanlara yayılabilen bir kazık kökü vardır. Kök sistemi fazla kuvvetli olmadığından aşırı yağış ve rüzgârdan etkilenecek yan yatma eğilimi gösterir. Yağ ketenlerinden 40–80 cm., lif ketenlerinden 60-120 cm kadar uzayabilen sap kısımları bulunur ve lif ketenleri uçlara doğru, yağ ketenleri ise ortalara doğru dallanma gösterir. Her ana sap ve yan dalların ucunda çiçek ve kapsül oluşur. Yağ ketenlerinde lif ketenlerine nazaran daha fazla yaprak bulunur. Yaprak fazlalığı lif kalitesine olumsuz etki yapar. Keten bitkisinin çiçeği dağınık ve bileşik salkımdır. Önce ana sap, daha sonra sırayla ikinci ve üçüncü dallar çiçek açar. Çiçekleri beşlidir. Beş adet açık yeşil renkteki çanak yaprakları meyveyi sarmıştır ve olgunlukla beraber dökülür. Menekşe, beyaz pembe veya mavi renkte beş adet taç yaprağı vardır. Kapsül adı verilen meyvelerin uçları sivri, yuvarlak, oval, uzun, konik veya fıçı şeklindedir. Kapsül beş gözlü olup, her göz iki bölmeye ayrılmıştır. Her bölmede normal olarak tohum oluşur. Keten tohumları susam tohumuna benzer. Parlak renkte ve kaygan özelliği ile ayrılır. Tohum renkleri sarı, yeşil ve kahverengi tonlardadır. 1000 tane ağırlığı lif ketenlerinde 3-5 g, yağ ketenlerinde ise 5-15 g arasındadır [35].

Keten ılıman iklim bitkisidir. Gelişme periyodundaki değişiklikler lif kalitesini etkiler. Yağ ketenleri yıllık 500 m³ civarında bir yağış altında yetişirse de, lif ketenleri daha fazla yağışa gereksinim duyarlar. Nispi nemi yüksek olan serin kıyı bölgelerinde daha kaliteli lif elde edilir. Yeterli miktarda su depolayabilen topraklarda yetişebilirler. Genellikle ilkbaharda yazlık olarak ekildiği gibi, yağlık ketenler kışlık olarak ekilebilir. Keten bitkisi genellikle sulanmadan yetiştirilir. Ancak lif ketenini kurak bölgelerde sulamak gerekir. Eğer keten sapsarı alttan üste doğru sararmış veya meyve kapsülleri esmer bir renk almaya başlamışsa hasat zamanının geldiği anlaşılır. Ekimden itibaren yaklaşık 100 gün sonrası hasat zamanıdır. Keten makine ile biçilerek, sökülerek hasat edilir. Yağlık ketenler biçerdöver ile hasat edilebilir. Lif ketenlerinden alınan sap verimi 300-400 kg/da, tohum verimi ise 50-80 kg/da. iken, yağ ketenlerinde sap verimi 200-300 kg/da, tohum verimi ise 100-200 kg/da'dır. Keten 4 olgunluk devresinde hasat edilir.

1.Yeşil Olgunluk Devresi: Lif verimi oldukça düşüktür. En ince kaliteli lif bu evrede elde edilir.

2.Yeşil- Sarı Olgunluk Devresi: İyi verimli kaliteli lifle birlikte yağ oranı düşük tohumlar elde edilir.

3.Sarı (tam) Olgunluk Devresi: Fazla miktarda tohum ve lif verimi elde edilirse de lif kalitesi düşüktür.

4. Ölü Olgunluk Devresi: En kaliteli tohumluk eldesi olmasına rağmen, lifler tamamıyla sert ve kaba bir yapı gösterdiğinden lif eldesi ekonomik olmamaktadır [35].

1.1.3. Keten bitkisinin Türkiye ve Dünyadaki tarımı

Dünya keten tarımında Türkiye önemli bir yere sahip değildir, fakat tohum verimi bakımından önemli ülkeler arasında sayılabilir. Dünyada keten lifi üretimi yaklaşık, 700 bin ton ve verimi 65 kg/da'dır. Tohum üretimi amacıyla keten ekim alanı ise yaklaşık 4 milyon ha., tohum üretimi 2.8 milyon ton ve verimi 68 kg/da'dır. Ülkemizde keten üretim alanı 1990 yılında 4900 ha olup, lif üretimi yıllık 600 ton ve tohum üretimi yıllık 3350 ton kadardır [36].

Ülkemizde en fazla tarımı Marmara ve Batı Karadeniz bölgesinde yapılmaktadır. Sinop iline bağlı Ayancık, Kocaeli' ne bağlı Kandıra ilçelerinde Kastamonu, Zonguldak ve Tokat illerinde yani Karadeniz Bölgesinde keten tarımı yapılmaktadır. Dünyada ise en fazla Rusya, Çin, Romanya, ABD ve Arjantin' de ekim alanı bulunmaktadır. Ketenin lif üretimi için en iyi yetiştirildiği bölgeler Belçika, Hollanda, Almanya ve İrlanda kabul edilmektedir. Arjantin, Uruguay ve ABD önemli keten tohumu üreten ülkeler arasında yer almaktadır [35].

1.1.4. Keten tohumu bileşenleri

1.1.4.1. Keten tohumu yağı

Keten tohumunun yağ içeriği ve kalitesi, türe ve kalıtsal özelliklere bağlı olarak % 32-45 arasında değişmektedir. Keten tohumu yağı, yağ asitlerinin % 40-60'ını oluşturan Omega 3 (ω -3) yağ asitlerinden α -linolenik asitin (ALA) en zengin kaynaklarından biridir. 1 gr keten tohumu yağı, 550 mg α -linolenik asit (ALA), 170 mg linoleik asit (LA), 60 mg

palmitik asit, 40 mg stearik asit ve 180 mg oleik asit içermektedir [37]. Yağ bileşimi, çevresel koşullardan etkilenen yağ asidi dağılımına göre, değişiklik gösterir [28]. Çevresel faktörlerden sıcaklık, toprak koşulları, kültürel uygulamalar ve bitki hastalıkları da yağ içeriği ve kalitesini etkiler. Yağ asidi kompozisyonunda en fazla değişkenlik oleik asit (% 14-60), linoleik asit (% 3-21) ve linolenik asit (% 31-72)'de gözlenmiştir [38].

Keten tohumuna gösterilen ilgi soğuk presleme ile elde edilen keten tohumu yağında % 50 oranında omega-3 yağ asidi bulunduğunun anlaşılmasından sonra başlamıştır. Omega (ω)-3 yağ asitleri, çoklu doymamış uzun zincirli (18-22 C uzunlukta) yağ asitleridir ve çok sayıdaki çift bağlardan ilki molekülün metil ucundan başlayarak 3. karbon atomunda yerleşiktir. Omega-3 serisinin en önemli temel yağ asitleri alfa-linolenik asitten (ALA) türetilir. Bu da en bol olarak keten tohumu yağında bulunur. Vücudumuz temel yağ asitlerini kendisi üretememektedir ve bu yüzden dışardan besinlerle veya ek gıdalarla alınması gerekir [39]. Linolenik asit (omega-3) sağlık açısından faydalı etkileri olan ve kronik hastalıkların kontrolünde etkin çalışan aynı formdaki eikosapentaenoik asit (EPA) ve dokosahekzaenoik asit (DHA) gibi uzun zincirli doymamış yağ asitlerine dönüşmektedir [37, 33]. ALA'nın dönüşüm dereceleri EPA % 5-10 ve DHA % 2-5 olarak belirtilmiştir [40]. ALA, EPA ve DHA beyin ve retinanın ilk gelişiminde elzemdir [9].

1.1.4.2. Keten tohumunda bulunan proteinler

Keten tohumu genetik ve çevresel faktörlere bağlı olarak % 10.5-31.0 aralığında değişen protein içeriğine sahiptir [28]. Soğukta gelişme koşulları düşük protein içeriği, sıcakta gelişme koşulları ise yüksek protein içeriğine neden olmaktadır [25]. Yapılan çalışmalar keten tohumunun albumin ve globulinler olmak üzere iki ana depo protein grubunu içerdiğini göstermektedir. Madusudhan and Singh (1983)'e göre toplam proteinin % 20'sini albumin oluşturur [41]. Marcone et al. (1998)'a göre ise toplam proteinin % 73.4'ü globulin ve % 26.6'sı ise albuminden ibarettir [42].

Varyasyonlar arasında çeşitli farklılıklar olmasına rağmen tüm keten tohumu çeşitleri benzer aminoasit içeriğine sahiptir. Protein fraksiyonu uygun oranlarda aminoasitler içermesine karşın lizin, treonin, metionin, sistin ve trozin açısından fakir, arjinin, aspartik asit ve glutamik asitçe oldukça yüksek bir içeriğe sahiptir. Sammour et al.

(1994) ve Madhusudhan and Singh (1985) glutamik asit ve lizin içeriğinin albuminde globulinden daha fazla olmasına karşın, metionin'in globulinde çok daha fazla olduğunu rapor etmişlerdir [43,44]. Yapılan çalışmalar sonucunda keten tohumu proteininin, plazma trigliserid konsantrasyonunu azalttığı ve hipotrigliseridemik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca keten tohumu, serum ürik asit miktarında belirgin bir düşüşe sebep olmaktadır. Keten tohumu proteini kan glukozunu iki farklı yolla etkileyebilmektedir:

- İnsülin salgısını teşvik ederek, glisemik indekste azalmaya neden olabilir.
- Polisakkaritlerle interaksiyona girerek, gıdaların glisemik indeksinde etkili olabilir.

Keten tohumu proteinlerinin antifungal özelliğe sahip oldukları da belirlenmiştir. Bu nedenle bazı gıda sistemlerinde küf gelişimini engellemek amacıyla kullanım olanağına sahiptirler [45] .

1.1.4.3. Keten tohumunda bulunan fitokimyasallar

1.1.4.3.1. Lignanlar

Keten tohumu bitkisel kökenli bir kimyasal olan lignan bakımından diğer gıdalar içerisinde en zengin kaynaklardandır. Lignanlar, iki sinnamik asit kalıntısının birleşmesi ile 2,3-dibenzibutan çekirdeğinden oluşan fenolik bileşiklerdir. Karbonhidratlarla konjuge halde bulunan bitki lignanları, bağırsakta bakteriler tarafından memeli lignanları olan enterodiol ve enterolaktona dönüştürülür. Keten tohumu memeli lignan ön maddesi olan sekoisolarisiresinol diglukozid (SDG) açısından en zengin kaynaktır (0.2 -3.7 mg/g tohum) [38]. Keten tohumunda bulunan SDG, vücuda alındığında bağırsakta bulunan fakültatif aerobik mikroorganizmaların (*Clostridia sp.*) aktivitesi sonucu enterodiol [ED; 2,3-bis[(3-hydroxyphenyl) methyl]-1,4-butanediol; MW: 302] ve enterolakton [EL; trans-dihydro-3,4-bis[(3-hydroxyphenyl) methyl]-2 (3H)-furanone; MW: 298] 'a dönüşür. Bu dönüşüm esnasında, SDG önce bitki lignan aglikonu secoisolarisiresinol (SECO); [R-(R*¹,R*)-2,3-bis[(4-hydroxy-3-methoxy phenyl) methyl]-1,4-butanediol; MW: 362]'e dönüşür hemen ardından dehidroksilasyona ve ardından da demetilasyona uğrayarak, ED'i oluşturur. ED, EL'e okside olabilmektedir. Keten tohumu lignan ve metabolitlerinin, fitoöstrojenik ve

antioksidan etkilere sahip çeşitli metabolizmalar vasıtasıyla diyete bağlı kronik hastalıklara karşı koruyucu etkileri olduğu çeşitli *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla kanıtlanmıştır [46,10]

1.1.4.3.2. Fenolik asitler

Yağlı tohumlarda fenolik asitler, benzoik ve sinnamik asitlerin hidroksile edilmiş türevleri olarak oluşurlar. Keten bitkisi tohumunda 8-10 g/kg toplam fenolik asit, 5 g/kg esterleşmiş fenolik asit ve 3-5 g/kg eterleşmiş fenolik asit bulunmaktadır. Toplam ve esterleşmiş fenolik asitlerin düzeyi kabuksuz ve yağsız keten tohumunda sırasıyla 81 ve 73.9 mg/100 g'dır. Bu ürünlerde bulunan başlıca fenolik asitler trans-ferulik (% 46), trans-sinapik (% 36), p-kumarik (% 7.5) ve trans-kaffeik (% 6.5) asittir. Fenolik asit içeriğindeki çeşitlilik mevsimsel etkilerden kaynaklanmaktadır [25].

1.1.4.3.3. Flavonoidler

Flavonoidler, doğal benzo- γ -piran türevlerinin bir grubudurlar ve fotosentez yapan hücrelerde yer alırlar [47]. Flavonoidler alerjilere, iltihaba, serbest radikallere, hepatotoksinlere, küflere, virüslere, ülserlere ve trombosit kümeleşmesine karşı biyolojik aktiviteye sahiptirler. Ayrıca flavonoidler lipit peroksidasyonunda, kapiller geçirgenlik ve kırılabilirliği azaltmada rol oynarlar [48-49]. Bazı bitki flavonoidleri gastrointestinal sistemde karsinojenlerle ilişkiye girebilmekte ve böylece bunların adsorpsiyonunu azaltabilmektedirler [47]. Ayrıca, flavonoidler hücrelerden belirli karsinojenlerin pompalanmasını artırarak veya detoksifikasyon enzimlerini uyararak hücreleri karsinojenlere karşı koruyabilmektedirler [38]. Yüksek miktarda flavonoid alımı (yaklaşık 30 mg/gün) ile düşük miktarda alım (<19 mg/gün) karşılaştırıldığında koroner kalp hastalıklarında yaklaşık %50 oranında bir azalma görülmüştür. Bu etkinin varsayılan mekanizması, LDL oksidasyonu ile platelet agregasyonunun inhibisyonunu içermektedir [50]. Keten tohumunda bulunan başlıca flavonoidler flavan C- ve O-glikositlerdir [38]. Keten tohumunda flavonoidlerin içeriği 35 mg/100g ile 71 mg/100g arasında değişmektedir. Bu düzeye kültür çeşitliliği ve çevresel faktörler etki etmektedir [49].

1.1.4.3.4. Tokoferoller

Tokoferoller, yağda çözünebilen en güçlü doğal antioksidanlardır. Keten tohumu yağı α , β ve γ tokoferolleri içermekte ve toplam tokoferol içeriği 40-50 mg/100 g arasında değişmektedir [38]. Keten tohumu yağında bulunan γ -tokoferol (toplam tokoferolün % 80'den fazlasını oluşturur) *in vitro* koşullarda α -tokoferolden çok daha fazla antioksidan etkiye sahip olmasına karşın α -tokoferol, biyolojik E vitamini etkisinin sadece %10-20 kadarını göstermektedir [51]. Keten tohumunda tokoferol düzeyi kültürel ve çevresel koşullardan etkilenmektedir. Toplam tokoferolün % 26'sı tohum kabuğunda bulunmaktadır. Tokoferoller hücre membranındaki çoklu doymamış yağ asitlerini oksidasyona karşı korumakta ve selenyumu indirgen formda tutarak antioksidan kapasitesine katkıda bulunmaktadırlar. Ayrıca E vitamininin, nitrozaminlerin oluşumunu da azalttığı tespit edilmiştir [38].

1.1.5. Keten tohumunun sağlık açısından olumsuz etkileri

Keten tohumu ve soğuk preslenmiş keten tohumu yağı henüz “Güvenilirliği Genel Olarak Onaylanmış Madde” (GRAS) (Generally Recognized as Safe) statüsüne girememiştir [52]. Amerika İlaç ve Gıda Dairesi (FDA; Food and Drug Administration) gıdalarda %12'ye kadar keten tohumu ilavesine izin vermektedir. Keten tohumundaki besinsel bileşenlerin olumsuz etkilerinin yüksek miktardaki çoklu doymamış yağ asidi miktarı ile ilgili olduğu rapor edilmiştir. Çok sayıdaki çift bağlar, çoklu doymamış yağ asitlerini oksidasyon ve serbest yağ asidi oluşumuna uygun hale getirmektedir. Bu nedenle, uzun süre diyetle alınan yüksek miktarda keten tohumunun oksidatif stresi artırabileceği ve antioksidan bileşiklerin azalmasına neden olabileceğine ilişkin bilgiler mevcuttur [25]. Yapılan çalışmalarda %20 keten tohumu içeren diyet ile beslenen farelerde plazma ve karaciğerde E vitamininin azaldığı kanıtlanmıştır [52, 47].

Keten bitkisi tohumunda bulunan fitik asit, çinko ve kalsiyum gibi pozitif yüklü minerallere bağlanarak bu minerallerin yetersizliğine neden olabilmekte ve kemik gelişimini etkileyebilmektedir [52]. Keten tohumunda, besin alımını zorlaştırıcı bileşiklerden biri olan ve B₆ vitaminine bağlandığı bilinen *linatinin* sağlık üzerine olumsuz

etkileri rapor edilmiştir [53,54]. Keten tohumunun diyetle fazla miktarda alınması B₆ vitamini eksikliğine ve sonuçta da homosistein ve böbrek yetmezliğinin artmasına neden olmaktadır. Keten tohumunun pişirilmeden tüketimi, hayvan ve insanlar için fazla miktarda alındığında toksik olabilecek bir bileşik olan siyanojenik glukosidlerin (HCN) üretimine neden olabilir. Yüksek miktarlarda pişirilmemiş keten tohumu tüketimi (>10 yemek kaşığı/gün) HCN miktarını 50-60 mg inorganik siyanite kadar çıkarabilir ve bu değer de yetişkinler için potansiyel olarak toksik kabul edilir. Yapılan çalışmalar sonucunda günlük 50 g'a kadar pişmiş keten tohumu tüketiminin idrar tiyosiyonat miktarını artırmadığı bulunmuştur [25].

1.2. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

1.2.1. Oksijen ve canlılar için önemi

Oksijen bütün canlılar için vazgeçilmez bir element olup, hidrojen, karbon, azot ve kükürt ile birlikte organik moleküllerin temel yapısına katılır. Atmosferde en bol bulunan elementlerden biri olan oksijen, yaklaşık iki milyar yıl kadar önce fotosentetik canlıların faaliyeti sonucu oluşmaya başlamıştır [55]. Atmosferdeki oksijen birikimini takiben oluşan ozon tabakası, özellikle karasal ortamda, daha yüksek yapılı canlıların oluşumu ve evrimine de olanak sağlamıştır [55]. Organik moleküllerdeki yapısal görevinin yanısıra, aerobik canlıların enerji metabolizmasındaki rolü nedeniyle oksijen hayati bir role sahiptir. Çok sayıdaki hidroksilaz ve oksidaz enzimleri oksijeni substrat olarak kullanıp organik moleküllerin yapılarına katılımını katalizlemektedir. Bilinen bütün canlı türleri, organik moleküllerin içindeki şekli ile oksijene gereksinim duysalar da, serbest formdaki moleküler oksijen her canlı türü için aynı anlamı ifade etmez. Örneğin aerobik canlılar yaşamları için mutlaka moleküler oksijene gereksinim duyarlar. Anaerobik canlılar ise büyüme ve çoğalmaları için oksijene bağımlı değildirler. Fakültatif anaeroblar oksijenin varlığını tolere edebilirler, oysa zorunlu anaerobik canlılar sadece oksijensiz ortamda yaşayabilirler. Anaerobik canlılardaki oksijenin toksik etkisinin sebebi, oksijenden kaynaklanan bazı reaktif türlerin biyolojik molekülleri oksitlemeleri ve bu reaktif türlere karşı anaerobik türlerde savunma sisteminin bulunmamasıdır [55].

1.2.2. Serbest radikaller

Radikaller, dış orbitallerinde paylaşılmamış elektron içeren kimyasal türlerdir. Böyle bir kimyasal tür basit bir atom ya da kompleks yapılu bir organik molekül olabilir. Her türlü kimyasal ve biyokimyasal tepkime daima atomların dış orbitallerindeki elektronlar seviyesinde gerçekleşir. Dış orbitallerde paylaşılmamış elektron bulunması reaktiviteye yol açar. Dış orbitallerinde eşlenmemiş elektron bulunduran kısa ömürlü reaktif atom ve moleküller *serbest radikal* olarak tanımlanır [56]. Bir başka tanımda; *serbest radikaller* bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molükül ağırlığı düşük ve çok etkin moleküller olarak belirtilmektedir [57]. Serbest radikaller için birçok tanım yapılmasına rağmen araştırmacıların üzerinde birleştiği tanım; bir serbest radikalın moleküler ya da atomik yörüngesinde bulunan ve genelde çok reaktif olan çiftleşmemiş elektron bulunduran bir kimyasal ürün olduğu şeklindedir [58].

Dış orbitallerinde paylaşılmamış elektron bulunması söz konusu kimyasal türün reaktivitesini olağanüstü arttırdığı için, radikaller reaktivitesi çok yüksek olan kimyasal türlerdir [55]. Serbest radikaller, pozitif yüklü, negatif yüklü ya da nötral olabilirler. Her ne kadar serbest radikal reaksiyonları, bağışıklık sistemi hücrelerinden nötrofil, makrofaj gibi hücrelerin savunma mekanizması için gerekli olsa da, serbest radikallerin fazla üretimi doku hasarı ve hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır. Serbest radikaller hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidratlar gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler ve de yapılarının bozulmalarına neden olurlar [59].

1.2.2.1. Biyolojik sistemlerde bulunan serbest radikaller

Serbest radikaller, zigot döneminden itibaren organizmanın canlılığı devam ettiği sürece doğal olarak normal biyolojik işlevler sonucunda üretilirler [60]. Oksijenin reaktif türleri biyolojik sistemlerde, yüksek enerji radyasyonları ya da fotooksidasyon gibi fiziksel ajanların yanı sıra, oksijenin biyolojik aktivasyonunu gerçekleştiren pek çok protein ve enzim ilişkisi ile üretilebilirler. Aktif oksijen türevleri, geçiş metalleriyle katalizlenen biyolojik olaylar vasıtasıyla birbirleriyle ve diğer moleküllerle reaksiyona girmeye hazır

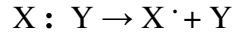
oldukları için biyolojik sistemlere zararlıdır [61]. Çizelge 1.1.' de başlıca reaktif oksijen türleri gösterilmiştir [62].

1.2.2.2. Serbest radikallerin oluşumu

İçinde bulunduğumuz çevrede çeşitli fiziksel etkenler ve kimyasal olaylar nedeniyle sürekli bir radikal yapımı vardır. Bir serbest radikal 3 yolla ortaya çıkabilir [63].

1. Kovalent bağ taşıyan normal bir molekülün homolitik yıkımı sonucu oluşurlar.

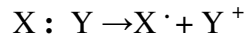
Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcaklık (500-600°C) kimyasal bağların kırılmasına neden olur. Kırılma sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her bir parçası ayrı ayrı atomlar üzerinde kalıyorsa, bu tür kırılmaya homolitik kırılma denir ve her iki atom üzerinde de paylaşılmamış elektron kalır. Organik moleküllerdeki bağların heterolitik kırılması durumunda zıt yüklü iyon çiftleri oluşur ve bu türler de reaktiftirler.



Reaksiyon 1: Moleküllerin homolitik kırılması

2. Normal bir molekülün elektron kaybetmesi sonucu oluşurlar.

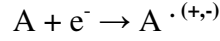
Radikal özelliği bulunmayan, normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı ya da bir molekülün heterolitik olarak bölünmesi ile oluşurlar. Heterolitik bölünmede kovalent bağı oluşturan her iki elektron, atomlardan birisinde kalırlar. Böylece serbest radikaller değil, iyonlar meydana gelir. Örneğin; askorbik asit, glutatyon ve tokoferoller gibi hücrel antioksidanlar, radikal türlere tek elektron verip radikalleri indirgerken, kendilerinin radikal formu oluşur.



Reaksiyon 2: Moleküllerin heterolitik kırılması

3. Normal bir moleküle elektron transferi ile oluşurlar.

Radikal özelliği taşımayan, normal bir moleküle tek bir elektron transferi ile oluşurlar. Örneğin, moleküler oksijenin tek elektron ile indirgenmesi, radikal formu olan süperoksidin oluşumuna neden olur.



Reaksiyon 3: Moleküle elektron transferi

Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en fazla elektron transferi ile oluşurlar. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü veya elektriksel olarak nötral olabilirler. Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} ve Mo^{5+} gibi geçiş metallere de ortaklanmamış elektronları olduğu halde serbest radikal olarak kabul edilmezler. Fakat bu iyonlar reaksiyonları katalize ettiklerinden dolayı serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar [64].

1.2.3. Serbest oksijen radikalleri

Serbest radikaller, fiziksel ve kimyasal özellikleri, hücresel kaynakları, rol oynadıkları tepkimeler ve etkileri ile çeşitli doku ve hücre hasarlarına neden olabilirler [65]. Biyolojik sistemlerdeki en önemlileri oksijenden oluşmuş radikallerdir [66]. Serbest oksijen radikalleri, oksijenin belirli koşullarda kısmen indirgenmesi sonucu çok kısa ömürlü ve güçlü oksidan nitelikli oksijen metabolitleridir. Bunlar şu şekilde sıralanabilir:

1. Süperoksit radikali
2. Hidroksil radikali
3. Singlet oksijen
4. Hidroperoksi radikali
5. H_2O_2

Bu reaktif maddeler bazı biyolojik molekülleri hasara uğratabilirler. Etraflarındaki moleküller ile reaksiyona girerek onlardan elektron alıp kararlı hale gelirler [67].

1.2.4. Serbest radikallerin etkileri

Serbest radikaller, hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler. Karbonhidrat, lipid, protein ve DNA gibi biyomoleküllerin tüm sınıfları ve tüm hücre komponentleri ile etkileşme özelliği göstererek hücrede yapısal ve metabolik değişikliklere neden olurlar [64, 66]. Mitokondrideki aerobik solunumu ve kapiler geçirgenliği bozar, hücrenin potasyum kaybını ve trombosit agregasyonunu

arttırırlar. Serbest radikallerin hücredeki başlıca zararlı etkileri Çizelge 1.2 de gösterilmiştir [62].

Çizelge 1.2. Serbest radikallerin hücredeki başlıca zararlı etkileri

Doymamış yağlar	Kolesterol ve yağ asitlerinde oksidasyon Lipidlerde çapraz bağlanmalar Organel ve hücrelerde çapraz bağlanmalar
Karbonhidratlar	Polisakkaritlerin depolimerizasyonu
Nükleik asit bazları	Hidroksilasyonlar Mutasyonlar, kimyasal modifikasyonlar Şekerlerde benzer reaksiyonlar
Kükürtlü amino asitler	Protein denatürasyonu ve çaprazlanma Enzimlerde inhibisyon
Proteinler	Peptid zincirlerinde kopma Denatürasyon
Nükleik asitler	Tek ve çift iplikçik kırılmaları Proteinlerde çapraz bağlar Baz içermeyen bölgeler
Hyaluronik asit	Sinovyal sıvı akışkanlığında değişme

Serbest oksijen radikallerinin karbonhidratlar üzerine etkileri önemli düzeydedir. Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu H_2O_2 , peroksitler ve okzoaldehitler meydana gelirler. Bunlar diabet ve sigara içimi ile ilgili kronik hastalıklar gibi patolojik oluşumlarda önemli rol oynarlar. Okzoaldehitler, DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve çapraz bağlar oluşturabilme özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterirler. Böylece kanser ve yaşlanma olaylarında rol oynarlar. Çoklu doymamış yağ asitleri ve karbonhidrat oksidasyonunun bir ürünü olan glioksal'ın hücre bölünmesini inhibe ettiği kaydedilmiştir. Gözün vitreus humorunda da bol miktarda hyaluronik asit bulunur. Bunun da oksidatif hasarı katarakt oluşumuna katkıda bulunur [64].

Proteinler serbest radikal etkisine karşın, çoklu doymamış yağ asitlerine karşı daha az hassastırlar ve başlayan zarar verici zincir reaksiyonlarının hızla ilerleme ihtimali daha

azdır. Proteinlerin serbest radikal zararından etkilenme dereceleri içerdikleri aminoasit kompozisyonuna bağlıdır. Doymamış bağ ve sülfür içeren aminoasitlerden (triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metionin, sistein gibi) meydana gelmiş proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenir. Özellikle fazla sayıda disülfid bağı bulunduran proteinlerin üç boyutlu yapıları bozulur.

Hücre membranı çoklu doymamış yağ asitlerince oldukça zengin olduğundan, kolayca bu etkiye maruz kalır ve çok zararlı olan bu reaksiyon zincirleme olarak devam eder. Membrandaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikaller ile kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünlerini oluşturabilirler. Doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipid peroksidasyonu olarak adlandırılır. Lipid peroksidasyonu (LPO), çoklu doymamış yağ asitlerinin radikaller ile oksidasyonu sonucu başlayan ve otokatalitik zincir reaksiyonları şeklinde uzayan, lipid peroksitlerinin aldehit türevleri, hidrokarbon radikalleri ve uçucu bazı ürünlere çevrilmesi şeklinde sonlanan süreçtir [62, 68- 70]. LPO, membranlara yakın bölgelerde ortaya çıkan $\cdot\text{OH}$ radikalinin membran fosfolipidlerinin yağ asidi yan zincirlerine saldırmasıyla oluşur [62, 64, 71]. Lipid peroksidasyonu ile oluşan membran zararı geri dönüşümsüzdür. Biyomoleküllerin tüm büyük sınıfları serbest radikaller tarafından etkilenirler, fakat lipidler en hassas olanlarıdır.

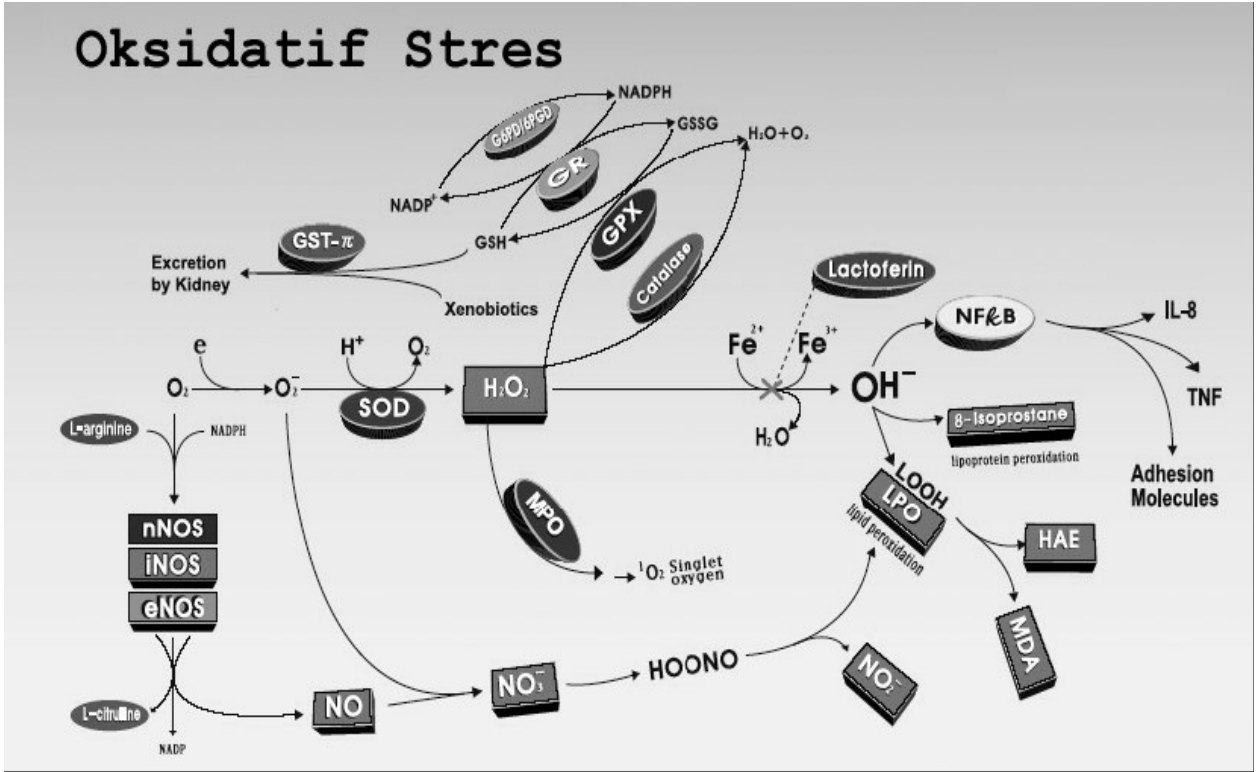
DNA, serbest radikaller için önemli bir hedeftir. Hem $\text{HO}\cdot$ hem de O_2 , nükleik asitler ile pürin ya da pirimidin arasında ayırım yapmaksızın tepkimeye girerler. İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller, DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona, kanserleşmeye ve ölüme yol açabilir. İyonize edici radyasyona bağlı hücre ölümünün başlıca nedeni nükleik asitlerin reaktif oksijen türleri ile reaksiyonudur. Reaktif oksijen türleri DNA çift sarmalının ayrılmasına veya nükleik asit baz değişimlerine neden olabilir. Bu da kromozal mutasyonlar ve sitotoksisite ile sonuçlanır [72-75]. Hidroksil radikali, deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar. Eğer hidroksil radikali DNA'nın yakınında meydana gelirse pürin ve primidin bazlarına saldırabilir ve mutasyonlara neden olabilir.

Hidroksil radikali, nükleik asitlerde doymuş karbon atomlarından hidrojen çıkarır veya çift bağlara katma tepkimeleri ile sonuçlanan tepkimelere girer. Singlet oksijenin nükleik asitlerle tepkimeye girme yeteneği daha sınırlıdır. Süperoksit anyonu güçlü bir

oksitleyici olduğundan, guanin gibi yüksek elektron yoğunluklu bölgeler içeren moleküllerle daha kolay tepkimeye girer [74]. Aktive olmuş nütrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hatta hücre ölümüne yol açabilir [75-77]. Reaktif oksijen türleri, DNA'nın oksidatif hasarı sonucu karsinogenez, hastalıklar ve yaşlanmada önemlidir [73,78] .

1.2.5. Antioksidan savunma mekanizmaları

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta bazı savunma mekanizmaları geliştirilmiştir. Canlı hücrelerde bulunan lipidler, proteinler, nükleik asitler ve karbonhidratlar gibi hedef moleküllerdeki oksidan hasarı, serbest radikalleri nötralize ederek engelleyen veya geciktiren maddelere antioksidan ve bu olaya da antioksidan savunma adı verilir [79]. Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde ve bu durum oksidatif denge olarak adlandırılır. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında bir düşme bu dengenin bozulmasına neden olur. “*Oksidatif stres*” olarak adlandırılan bu durum özetle; serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizliği göstermekte olup, sonuçta doku hasarına yol açmaktadır (Şekil 1.3.).



Şekil 1.3. Oksidatif stresin şematik gösterimi [80].

Serbest radikaller ve antioksidanlar arasında çok hassas bir denge vardır. Bu dengedeki düzensizlikler veya hücreye zarar veren reaktif oksijen türlerinin birikimi yukarıda da belirtildiği gibi oksidatif stres olarak tanımlanır. Hücre içi reaktif oksijen türleri üreten çok sayıda bileşik ve çevresel ajanlar, aktif oksijen konsantrasyonunun hücrenin savunma kapasitesini aşan bir seviyeye ulaştığı durumlarda ortaya çıkan oksidatif strese neden olurlar. Hücreler reaktif oksijen türlerinin yüksek seviyelerine maruz bırakıldıklarında da oksidatif stres meydana gelmektedir. En belirgin özellikleri okside olan substratlara oranla çok daha az konsantrasyonlarda bile, substratın oksidasyonunu geciktirmeleri ve inhibe etmeleridir [81]. Antioksidanların bir kısmı serbest radikal oluşumunu, bir kısmı ise oluşmuş serbest radikallerin zararlı etkilerini önler. Antioksidanlar etkilerini, şimdiye kadar tesbit edilebilen altı değişik mekanizma ile gösterirler [72, 81-83]. Bu mekanizmalar, birbirinden bağımsız veya bir arada işleyebilmektedirler.

- ✓ Oksijen ile reaksiyona girerek ya da onun yerini alarak lokal oksijen konsantrasyonunu azaltabilirler.

- ✓ Hidroksil ($\dot{\text{O}}\text{H}$) radikali yapısında yer alan hidrojen atomları bağ oluşturabilecek yapıdaki ürünleri temizleyerek, peroksidasyonun başlamasını önleyebilirler.
- ✓ Membran lipidlerine direkt etkileyerek peroksit oluşturabilen singlet oksijeni baskılayabilir ya da temizleyebilirler.
- ✓ Metal iyonlarını bağlamak yoluyla reaktif grupların ($\dot{\text{O}}\text{H}$, ferril ya da $\text{Fe}^{+2}/\text{Fe}^{+3}/\text{O}_2$ kompleksleri gibi) ve /veya lipid peroksitlerden peroksil ve alkoksil radikallerinin oluşumunu önleyebilirler.
- ✓ Peroksitleri, alkol gibi radikal olmayan ürünlere çevirebilirler. Örneğin; GSH-Px, peroksitleri bu yolla temizleyen bir antioksidan enzimdir.
- ✓ Zinciri kırabilirler yani, zincir oluşumuna neden olabilen serbest radikallerle reaksiyona girebilirler ve yağ asidi zincirlerinden sürekli hidrojen iyonu salınımını önleyebilirler.

Antioksidan moleküller endojen ve eksojen kaynaklı yapılar olup, oluşan oksidan moleküllerin neden olduğu hasarı hem hücre içi hem de hücre dışı savunma ile etkisiz hale getirilirler. Hücre dışı savunma, albümin, bilirubin, transferin, seruloplazmin, ürik asit gibi çeşitli molekülleri içermektedir. Hücre içi serbest radikal toplayıcı enzimler asıl antioksidan savunmayı sağlamaktadır. Bu enzimler süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon- S-transferaz (GST), glutatyon peroksidaz (GP_x), glutatyon redüktaz (GR), katalaz (CAT) ve sitokrom oksidazdır. Bakır, çinko ve selenyum gibi eser elementler ise bu enzimlerin fonksiyonları için gereklidir.

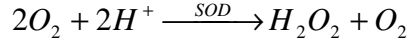
1.2.5.1. Antioksidan sistemler

Primer antioksidan enzimlerden en önemlileri; katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon-S-transferaz ve glutatyon redüktazdır.

Antioksidan savunma sisteminde direkt etkili olmayan fakat dolaylı olarak ilişkili olan diğer enzimler ise; NADPH-kinon oksidoredüktaz, epoksit hidrolaz, UDP-glukronil transferaz, sulfonil transferaz, glukoz-6 fosfat dehidrojenaz ve δ - fosfoglukonat dehidrojenaz sayılabilir.

1.2.5.1.1. Süperoksit dismutaz (SOD, Superoksit oksidoredüktaz; EC 1.15.1.1)

İlk defa 1968 yılında McCord ve Fridovich tarafından tanımlanmıştır. Reaktif oksijen türlerinden kaynaklanan çeşitli streslere ve süperoksit radikallerine karşı hücrel savunmada gerekli enzimdir. Kesin bir özgülüğe sahip olan SOD, antioksidan savunmanın ilk basamağı süperoksitin H_2O_2 'e dismutasyonunu katalizler.

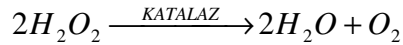


Kofaktör olarak içerdiği metal iyonu tipine göre 3 farklı şekilde kategorize edilebilir:

- Bakır ve Çinko içeren (Cu/Zn) dismutazlar; ökaryotların stozolünde, kloroplastlarda ve bazı bakteri türlerinde bulunurlar. Cu ve Zn içerirler.
- Mangan içeren dismutazlar; prokaryotlar ve ökaryotların mitokondrilerinde bulunurlar. Mn içerirler. Aynı tepkimeyi katalizlemeleri dışında hiçbir yapısal benzerlikleri yoktur [55].
- Demir içeren dismutazlar; prokaryotlarda bulunurlar. Mn-dismutaza benzerler. SOD enzimi aerobik hücrelerde süperoksit radikalinin zararına karşı hücre içi savunmada büyük rol oynarlar. SOD'un aktivitesinde yaşlanmaya bağlı olarak bir azalma olmaktadır [84].

1.2.5.1.2. Katalaz (CAT; H_2O_2 : Oksidoredüktaz; E.C.1.11.1.6)

Katalaz, peroksizomlarda lokalize olan ve yapısında 4 adet "hem" grubu bulunduran bir hemoproteindir. Karaciğer ve eritrositlerde en yüksek aktiviteye sahiptir. H_2O_2 'i su ve moleküler oksijene parçalar.



Ayrıca katalaz, bir molekül H_2O_2 'i elektron verici bir substrat olarak, diğerini de oksidan veya elektron alıcısı olarak kullanabilir. Katalazın indirgeyici etkisi hidrojen peroksitin

yanısıra metil-, etil- hidroksiperoksitler gibi küçük moleküllü lipid peroksidasyonlarını da içine alır [64].

1.2.5.1.3. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px; glutathione:H₂O₂ oksidoredüktaz, EC 1.11.1.9)

Glutasyon peroksidaz, hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir. Enzimin % 60-75'i ökaryot hücrelerin sitoplazmasında bulunur. % 25-40'ı ise mitokondridedir. Enzim aktivitesinin en fazla olduğu dokular ise eritrositler ve karaciğerdir. GSH-Px, intrasellüler mesafede lipidleri peroksidasyondan koruyan en önemli enzimdir. Bu nedenle hücrenin özellikle sitozolik kompartmanında yer alan bu enzim hücrenin yapısını ve fonksiyonunu korur [64,85].

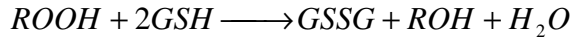
GSH-Px, aşağıdaki reaksiyonları katalizler [64].



Glutasyon peroksidaz enziminin selenyum (Se) bağımlı ve bağımsız iki formu vardır. Se bağımlı glutasyon peroksidaz enzimi aktif merkezinde enzime kovalent bağlı selenosistein formunda bir selenyum atomu bulundurmaktadır. Hidrojen peroksit ve diğer organik hidroperoksitler, genellikle sitozolde ve mitokondriyal bölgelerde fazla miktarda bulunan GPx tarafından redüklenir. Se bağımlı glutasyon peroksidaz, bitki hücrelerinde bulunmaz burada hidrojen peroksit askorbat peroksidaz tarafından yıkılır. Se bağımsız glutasyon peroksidaz ise sadece organik hidroperoksitlerin yıkılmasında görev alır. Hidroperoksitlerin redükte olması ile meydana gelen GSSG, glutasyon redüktazın (GSSG-R) katalizlediği reaksiyon ile tekrar GSH'a dönüşür [86].

1.2.5.1.4 Glutasyon S-Transferaz (GST, EC.2.5.1.18)

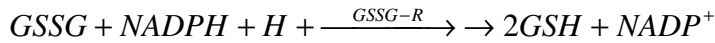
“Selenyuma bağılı olmayan GSH-Px” olarak ta adlandırılır. İki protein alt biriminden oluşan bir enzim ailesidir. Genel olarak 3 sitozolik ve bir de mikrozomal olmak üzere 4 ana gruba ayrılırlar. Organizmaya giren ksenobiotiklerin biyotransformasyonunda önemli rol oynarlar. Başta araşidonik asit ve linoleat hidroperoksitleri olmak üzere lipid hidroperoksitlere karşı GST’ler Se-bağımsız glutasyon peroksidaz aktivitesi gösterirler [87]



Öncelikle araşidonik asit ve lineolat hidroperoksitleri olmak üzere lipid peroksitlerine karşı Se bağımsız GSH peroksidaz gibi aktivite göstererek antioksidan etki gösterir [66, 88].

1.2.5.1.5. Glutasyon redüktaz (GSSG-R, EC. 1.6.4.2)

Hidroperoksitlerin redükte olması esnasında meydana gelen okside glutasyon (GSSG), GSSG-R’ın katalizlediği reaksiyonla tekrar redükte hale (GSH) dönüşür. Reaksiyonun gerçekleşmesi için NADPH’a ihtiyaç vardır [66, 83] .



1.2.6. Toksikolojide serbest radikallerin önemi

Serbest radikaller, hücrelerde ekzojen ve endojen kaynaklı etmenlere bağılı olarak oluşurlar. Ekzojen kaynaklı etmenler; çeşitli kimyasallar (parakuat, alloksan, CCl₄, parasetamol gibi), iyonize ve ultraviyole radyasyon, hava kirliliği oluşturan kimyasal maddeler, sigara dumanı, solventler gibi çevresel faktörler, bazı antineoplastik ajanlar (nitrofurantoin, bleomisin, doksorubisin ve adriamisin vs.), alkol ve uyuşturucular gibi maddeler olarak sıralanabilir [59]. Oksidatif stresin artması büyük biyomoleküllere

(proteinler, DNA ve lipidler gibi) zarar verebilir. Oksidatif zedelenme değişik mekanizmalar ile tümör oluşumuna yol açabilir. DNA hasarına, onarılamazsa mutasyonlara neden olabilir [90]. Serbest radikallerin yarattığı oksidatif stresin önlenmesi ve etkisinin en aza indirilmesi için yeterli miktarda antioksidan tüketilmelidir. Antioksidanlar, hem direk hem de dolaylı olarak ksenobiotiklerin, ilaçların, karsinojenlerin ve toksik radikal reaksiyonların istenmeyen etkilerine karşı hücreleri koruyan maddelerdir. Vitamin A, C, E, beta-karoten, metallothionein, poliaminler, melatonin, NADPH, adenosin, koenzim Q-10, ürat, ubiquinol, polifenoller, flavonoidler, fitoöstrojenler, sistein, homosistein, taurin, metionin, s-adenozil-L-metionin, resveratrol, nitroksidler, GSH, glutatyon peroksidaz, katalaz, süperoksit dismutaz, tioredoksin redüktaz, nitrik oksit sentaz, hem oksijenaz-L ve eozinofil peroksidaz bu gruba girer [66, 91-92]. Antioksidanlar, lipid peroksidasyonu, proteinlerin çapraz bağlanması ve DNA mutasyonu ile etkileşip, doku hasarı etkilerini önlerler. Serbest radikaller kansere de neden olduklarından, çoğu antioksidanlar kanseri başlangıçta durdurup tümör gelişimini önlemede etkin olabilir [93, 94].

1.3. Kansere Mekanizması

Oksidatif stresin artması büyük biyomoleküllere (proteinler, karbonhidratlar, DNA ve lipidler gibi) zarar verip, kalp hastalığı ve kanser riskinin artmasına neden olmaktadır. Oksidatif hasar değişik mekanizmalar ile tümör oluşumunda rol oynar. DNA zedelenmesine, onarılamazsa mutasyonlara neden olur [95]. Oksidatif strese yol açarak hücrel dejenerasyona neden olan serbest radikaller birçok kanser oluşumunu da tetikleyebilir. Çeşitli karsinojenik ve mutajenik ajanlar da hayvanlarda ve insanda oksidatif stres ve mutasyonlara bağlı olarak kanser oluşumunu indükleyebilir.

1.3.1. Kanser biyolojisi

Kanser, tek bir hücrede oluşan genetik değişikliklerin hücrenin anormal çoğalma yeteneği kazanması ve farklılaşması ile ortaya çıkan, toplumda en fazla ölüm nedenleri içinde yer alan bir hastalık grubudur [96]. Hızla çoğalan hücrelerin oluşturduğu tümöral yapı öncelikle yakın çevreye yayılır. Daha sonra daha uzak organlara kan veya lenfotik yol ile yayılır. Tümör çoğalırken çevre dokular ile uyuma dikkat etmez ve hızla içinde bulunduğu organizmaya ait besinleri kullanarak büyür [97, 98].

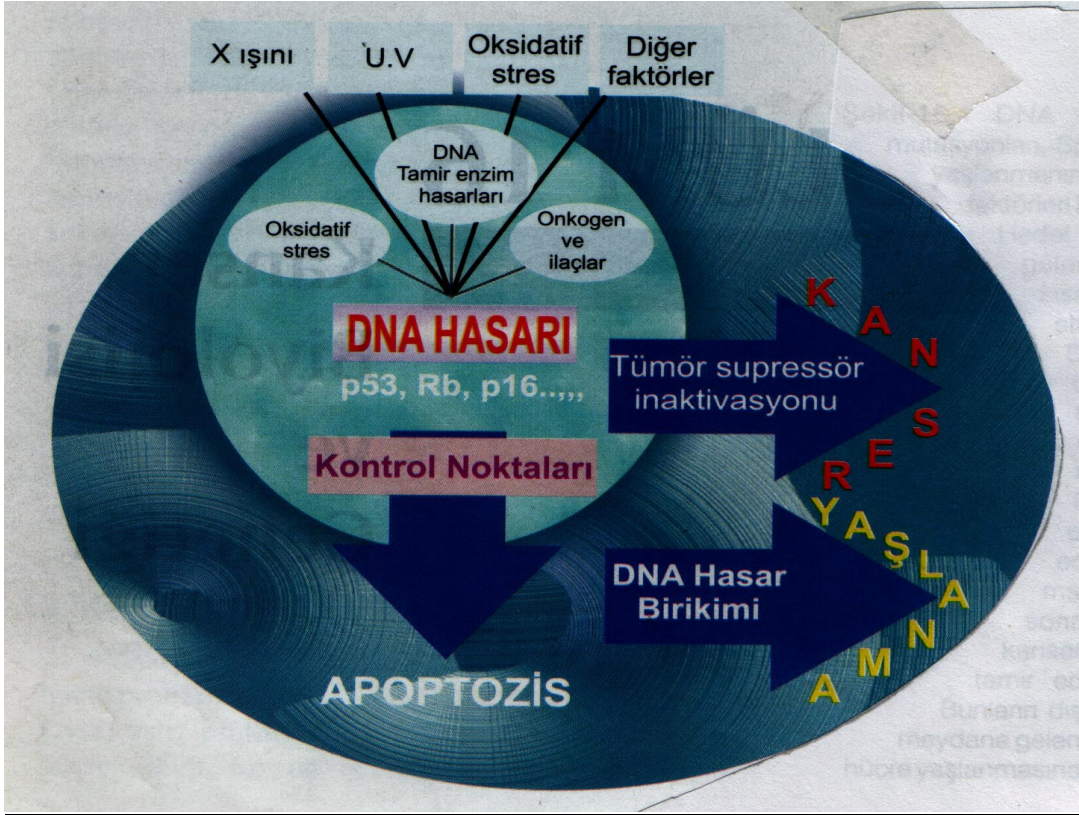
Yaşamın ve canlılığın en temel birimi olan hücrenin, iç ve dış çevresiyle haberleşmesini sağlayan sinyalleşmeler, normal hücrelerde sınırlı ve kontrollü bölünmeyi sağlarken, kanser hücrelerinde kontrolsüz bölünme ve büyüme olarak algılanır. Kanserleşme yolunda tetiği çeken kimyasalların çoğu mutajeniktir. Bu nedenle DNA, kimyasal karsinojenler için ana hedeftir. DNA yapısında oluşan hasarlar eğer tamir enzimleriyle onarılsa veya onarılmadığı durumlarda tümör baskılayıcı genler ile apoptotik genlerin işbirliğiyle hücre apoptoza sürüklenirse, organizma kanser hücrelerinden temizlenir. Tersisi durumlarda ise kanser denilen birden fazla gen ve çevrenin etkileşimiyle hastalık ortaya çıkar.



Şekil 1.4. Kanser poligenik nedenleri [99]

Şekil 1.4 de kanserin poligenik nedenleri verilmiştir. Kanser nedenleri olarak, hücre döngüsü kontrol genleri, onkogenler, baskılayıcı genler, DNA tamir genleri, detoksifikasyon ve apoptozisin kontrolünü sağlayan genlerin yapısında oluşacak mutasyonlar, gösterilmektedir [99].

Kendileri direkt karsinojen olmayan bazı ilaçlar ve hormonlar, mutasyona neden olmadan, sadece hücre bölünmesini uyardıkları nedeniyle tümör promotörü olarak tanımlanırlar. Hormonlar özellikle de östrojen hormonu bazı insan kanserlerinin gelişiminde tümör promotörü olarak çok önemli bir rol oynar [100]. Kimyasal maddelere ve radyasyona ek olarak bazı virüslerin de %10-20 arasında değişen oranlarda insanlarda kanser oluşumunu tetiklediği saptanmıştır [101]. Şekil 1.5 te DNA hasarı, serbest radikaller ve gen mutasyonları, spontan mutasyon, hücresel yaşlanma gibi yaşlanmanın genetik temelleri ve buna etki eden faktörleri gösterilmiştir.



Şekil 1.5. DNA hasarı, serbest radikaller ve gen mutasyonları, spontan mutasyon, hücrel yaşlanma gibi yaşlanmanın genetik temelleri ve buna etki eden faktörler [99].

1.3.2. Kanser hücrelerinin özellikleri

İnsan vücudu çok çeşitli hücrelerin oluşturduğu bir ekosistemdir. Bu ekosistem içerisinde belirli bir işbirliği içerisinde biraraya gelen hücrelerin herhangi birisinde diğerinin aleyhine sebep olacak bir mutasyon tüm işbirliğinin geleceğini tehlikeye sokar.

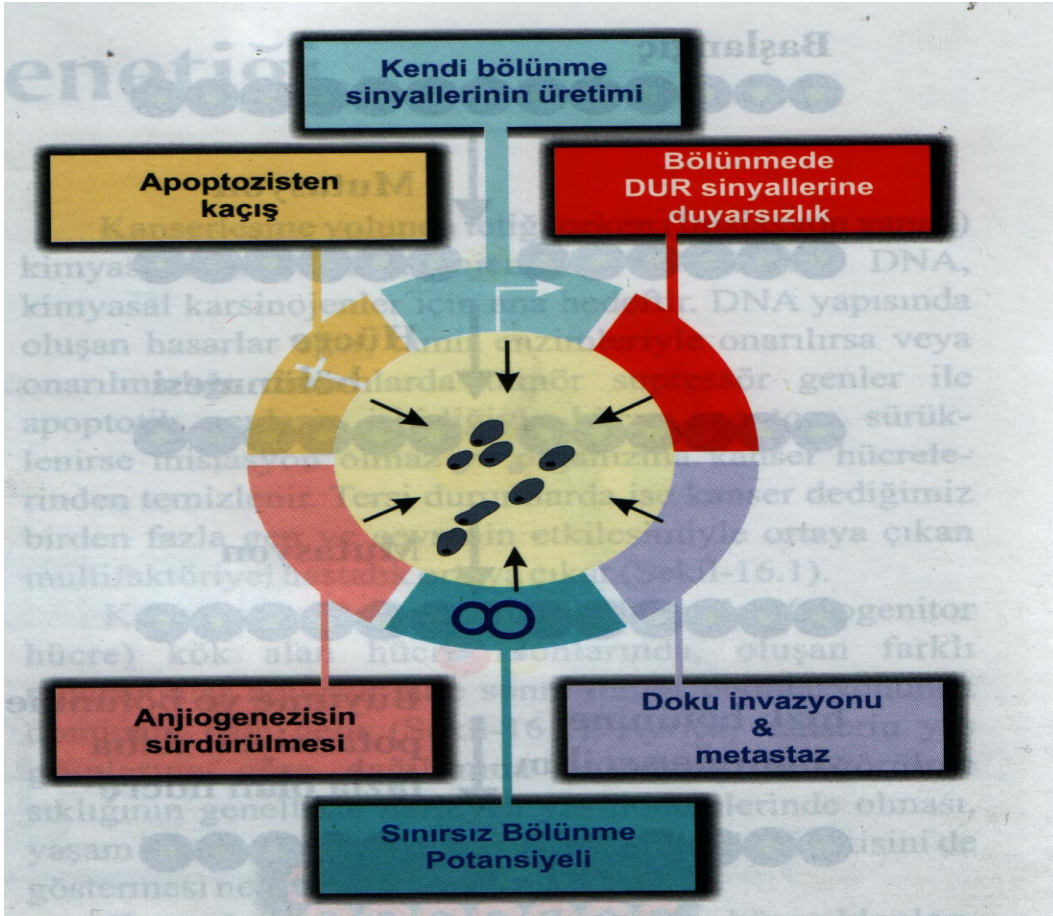
Kanser hücrelerinin bazı genel özellikleri:

Sınırsız Bölünme Potansiyeli: Kanser hücreleri hızla çoğalan fakat farklılaşmalarını tamamlayamamış hücrelerdir. Sınırsız bölünme potansiyeline sahiptirler.

Kontak İnhibisyon Yokluğu: Kanser hücrelerinde hücre yüzey adezyon genlerinin normal hücrelere nazaran daha az ifade edilmesinden kaynaklanan daha az hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimi bulunur. Kanser hücrelerinin adezyon yapısındaki bu farklılıklar, morfolojik ve hücre iskeleti yapısının da bozulmasına neden olarak temas kaybıyla sonuçlanır. Kültürü yapılan normal hücreler, kültür plağı üzerinde komşu hücrelere temas edinceye kadar yayılırken, tersine tümör hücreleri komşularına temas ettikten sonra da yayılmaya devam ederek diğer hücrelerin üzerine yayılır ve kontrolsüz biçimde çok tabakalı olarak çoğalırlar.

Apoptozdan Kaçış: Programlı hücre ölümü (apoptozis) kan hücreleri de dahil olmak üzere çoğu hücre tipinin farklılaşma programının tamamlayıcı parçasıdır. Kanser hücrelerinin apoptoza karşı dirençli olmalarından dolayı da normal hücrelere göre artmış yaşam uzunluğu sözkonusudur. Örneğin, çoğu normal hücrenin ömür uzunluğu apoptozu önleyen büyüme faktörlerinden veya hücre dışından gelen sinyallere bağlıdır. Normal hücreler DNA tamir ve tümör baskılayıcı gen aktivitelere sahip olduklarından tamiri mümkün olmayan DNA hasarlarının varlığında apoptoza uğrarlar (Şekil 1.6).

Sonuç olarak kanserleşme olarak tanımlayabileceğimiz onkogenез sürecinde tetişin çekilmesi anlamında, çok farklı alternatif yollar ve bu yollarda etkili olan değişik gen ve çevre kombinasyonları bulunmaktadır [99].



Şekil.1.6. Kanser hücrelerinin temel özellikleri [99].

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Keten bitkisi tohumu tüketiminin, kalp hastalıkları, kanser ve diabet riskini azaltan olumlu etkileri rapor edilmektedir. Bu konuda yapılan çalışmalar keten tohumunun hastalıkları önleyici rollerini ortaya koymaya yöneliktir.

Senaino and Thompson (1992) beş grup Sprague-Dawley ırkı erkek sıçana azoksimetan enjekte ettikten sonra yüksek yağlı bir bazal diyet ve %5-10 oranında keten tohumu ilaveli diyetlerle dört hafta beslemişlerdir. Sonuçta keten tohumu ile beslenmenin kolon kanseri riskini azaltabileceğini tespit etmişlerdir [102].

Kolon kanserine yol açan maddeler ve β -glikoronidaz aktivitesi üzerine keten tohumu ve lignanlarının etkisini belirlemeye yönelik yapılan bir çalışmada, 6 grup Sprague-Dawley ırkı erkek sıçan yüz gün boyunca yüksek yağlı bazal diyet, %2.5-5 oranında keten tohumu ve %5 yağı alınmış keten tohumu ilave edilmiş bazal diyet ve 1.5 mg secoisolariciresinol diglikozidinin (SD) içeren diyet ile beslenmişlerdir. Beslenme uygulanmasına başlanmadan önce tüm farelere 15 mg/kg vücut ağırlığı düzeyinde azoksimetan (kolon kanseri maddesi) enjekte etmişlerdir. Sonuçta (SD) secoisolariciresinol diglikozidinin varlığı ve artan β -glikoronidaz aktivitesi sebebiyle kolon kanserini önleyici etkiye sahip olduğu sonucuna varmışlardır [12].

Bir başka çalışmada diyete keten tohumu ilavesinin serum kolesterolünü düşürmeksizin hiperkolesterolemik aterosklerozisin azaltılmasında etkili olduğu tespit edilmiştir [103].

Yapılan bir başka çalışmada ise *cyclical mastalgia* rahatsızlığı olan kadınlarda keten tohumu tüketiminin klinik ve biyolojik etkileri tespit edilmiş ve bu hastalıkta keten tohumu lignanlarının alternatif bir tedavi olarak düşünülebileceği belirtilmiştir [104].

Thompson et al. (2000) meme kanserli hastaların bir kısmının kontrol muffinleri, diğer bir kısmının da 25 g keten tohumu içeren muffinleri üç ay süresince tüketmelerini sağlamışlardır. Sonuç olarak keten tohumu lignanlarının meme kanserli hastalarda tümör gelişimini azalttığını tespit etmişlerdir [105].

Keten bitkisi tohumunun linolenik asit (ω -3 yağ asiti) ve lignanlar açısından zengin bir kaynak olmasıyla prostat kanserine engel olabileceğinden yola çıkılarak yapılan bir çalışmada kanserli prostatlarının alınmasını bekleyen yirmi beş hastaya, otuz dört gün

boyunca günde 30 g keten tohumu ilave edilmiş düşük yağlı diyet uygulanmıştır. Keten tohumu verilen hastalarda hiçbir cinsel zayıflama olmazken, kanserli hücrelerin hızla yok olduğu gözlenmiştir [106].

Kadınlar üzerinde yapılan çalışmalar, keten tohumu tüketiminin kemik sağlığı ile fitoösterojenik ve teropotik etkilerinin hormonlara bağlı kanser riskini azaltıcı etkileri olduğunu göstermektedir [107-115].

Bunların dışında antiviral ve antibakteriyal aktivite [111], anti inflamatuvar aktivite [112-116], laksatif etki [16] ve menopoz semptomlarını azaltıcı ve osteoporosizi önleyici etkilere sahip olduğu da literatürde verilmektedir.

Yine bir başka çalışmada, dört hafta boyunca keten tohumu tüketen kadınların serum ve LDL kolesterol düzeylerinde ve postprandial glukoz cevabında önemli düşüşler gözlenmiştir [117].

Diyetlerine keten tohumu yağı ilave edilen hastalar üzerinde yapılan çalışmada, hastaların toplam plazma kolesterol düzeylerinde ve HDL kolesterol düzeylerinde önemli düşüşler olduğu gözlenmiştir [118].

Tello et al. (2008) ısırgan otunun, meme kanseri oluşturulmuş sıçanlarda total antioksidan durumuna olan etkisini araştırmışlardır. Bu amaçla dişi Wistar albino sıçanlara i.p olarak 50 mg/kg MNU enjeksiyonu yapılarak meme kanseri oluşturulmuştur. Plazma MDA (Malondialdehit) ve TAS (Toplam Antioksidan) düzeylerinin ölçüldüğü çalışmada sonuç olarak, ısırgan otunun artan MDA düzeyini azalttığı ve TAS düzeyini de yükselterek koruyucu etki gösterdiği belirlenmiştir [119]. Güçlü antioksidan etkileri bilinen flavonoidlerin serbest radikallerin oluşturduğu hücre hasarlarında ve özellikle de karsinojenlerin etkilerinden korunmada kullanılabileceği fikrinden yola çıkılarak yapılan bir başka çalışmada, hayvanlara i.p olarak 50 mg/kg MNU ve kateşin verilmiş ve kateşinin hayvanları MNU'nun karsinojen etkilerinden koruyup korumadığı araştırılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda kateşinin MNU 'nun oluşturduğu deneysel tümör gelişimine karşı koruyucu olduğu sonucuna varılmıştır [120].

Yapılan bir başka araştırmada, MNU enjeksiyonu ile meme tümörü oluşturulan dişi Sprague-Dawley sıçanların karaciğer glutatyon düzeylerinde önemli bir etkiye rastlanmadığı rapor edilmiştir [121].

Doğal olarak bulunan kaffeik ve gallik asit gibi fenolik asit ve analogların karsinojenin modülasyonu ile bağlantılı çok çeşitli biyolojik fonksiyonlar gösterdikleri bilinmektedir. Kaffeik asit fenetil ve benzil esterleri gibi sinnamik asit esterleri kanser hücrelerinin bazı tiplerine karşı çoğalmayı önleyici etki göstermektedir. Gallik asit ve esterleri hidroksibenzoik türevleri olup hem gıda hem de ilaç endüstrisinde antioksidant olarak kullanılmaktadırlar. Keten tohumunun biyoaktif fonksiyonlardan antioksidant, antimikrobiyal ve antikanserojen etkileri, yapısında bulunan fenolik asitlerden kaynaklanmaktadır. Bunlara ilaveten fenolik ve fitik asitler hipokolestrolemik etkiye sahip olduğu gibi meme ve kolon kanser riskinde de azalmaya neden olmaktadır [38, 49].

ALA' dan türeyen DHA beyin gelişimi ve görsel fonksiyonlar için elzem iken LA' dan türeyen araşidonik asit (AA) neonatal büyüme ve ovulasyon için esansiyeldir [9] Omega-3 yağ asitleri vücutta nabız dahil kan basıncı, bağışıklık sistemi ve yağların yıkılması gibi çeşitli düzenleyici fonksiyonları yerine getirir. Eksikliğinde yavaş büyüme, görme zayıflığı, öğrenme yeteneğinde zayıflık, kol ve bacaklarda uyuşukluk hissi ve davranış değişiklikleri görülür. ALA' dan oluşan EPA'nın, prostaglandinleri ve lökotrienleri azaltmasıyla tümör inhibisyonunda önemli rolü olduğu rapor edilmiştir [38]. ALA ve diğer Omega-3 yağ asitleri üzerine yapılan araştırmalarda, eikosanoidlerin kardiyovasküler hastalıklara karşı koruma sağladıkları saptanmıştır. ALA'nın kardiyovasküler hastalığı önleme mekanizmaları, enflammatuar yanıtı düşürmeleri, platelet agregasyonu ve thrombosis'i inhibe etmeleri, kan basıncını düşürmeleri, serum lipidlerini geliştirmeleri ve kardiak anhythmias'ı önlemelerini içermektedir [40].

Fareler üzerine yapılan bir çalışmada, fareler %10-20 keten tohumu içeren yüksek yağ-kolesterol diyetleri ile beslenmiş ve sonuçta HDL ile trigliserid miktarları değişmezken, serum kolesterolünün yükseldiği görülmüştür [9].

Keten tohumu ve ayçiçeği tohumları ile yapılan bir çalışmada sadece keten tohumu ile yapılan diyetle (%14.7) LDL kolesterolünün belirgin ölçüde azaldığı, serum HDL kolesterolü ve trigliserid konsantrasyonunun her iki tohumla yapılan diyetten etkilenmediği bulunmuştur [24].

ω -3 yağ asitleri, interlökin-1 (IL1), tümör nekroz faktörü, lökotrin B4, polimorfonükleer lökositler ve monositlerin serbest oksijen radikallerinin oluşumunu

baskılamaktadır. Keten tohumu serbest oksijen radikallerinin miktarını azaltarak hiperkolesterolemik atherosiklerosis gelişimini önlemektedir [103].

Omega-3 yağ asitleriyle zenginleştirilen dokuda eikosanoid sentezi, glukoz sentezi için substrat kullanımı, insülin reseptörüne karşı insulinin afinitesi fonksiyonu artabilmektedir. Bu amaçla yapılan çalışmada günde 3 g keten tohumu yağı ile beslenen yetişkinlerde kan glukoz düzeyinin artmadığı bildirilmektedir [122].

Çoklu doymamış yağ asitlerinin gelişme çağındaki canlılarda büyümenin uyarılması, derinin canlılığının sürdürülmesi ve bazı deri hastalıklarının önlenmesinde etkili oldukları bildirilmiştir. AIDS'li hastaların tedavisinde olumlu etkilerinin olduğu da rapor edilmiştir [33]. Araşidonik asitten oluşan eikosanoidlerin tersine eikosapentaenoik asit (EPA) ve dokosaheksaenoik asit (DHA)' den oluşan eikosanoidler platelet agregasyonu, vasokonstriksiyon ve thrombosis'i azaltmada önemli rol oynamaktadır. Diyetle alınan ALA, EPA ve DHA'nın artışı n-6/n-3 oranını düşürmekte ve böylece daha az enflamatuvar olan eikosanoidlerin biyosentezini artırmaktadır [52].

Keten tohumunun içerdiği yağ asitleri (omega 3-6-9) vücut sıcaklığının korunması, miyelin kılıflarının yapılması, dokuların korunması ve enerji üretimi için hayati önem taşımaktadır. Keten tohumu yağı, kronik kabızlığa karşı da kullanılmaktadır. Çok etkili müshil ilaçlarının sürekli kullanımının barsak mukozasını tahriş etmesi sonucu, organizma için gerekli olan özellikle potasyum gibi minerallerin kaybının, keten tohumu yağı kullanımında söz konusu olmadığı saptanmıştır [23, 38, 52].

Fito-östrojenleri içeren çevresel endokrin aktif bileşiklerin üreme ve verimlilik üzerine etkilerini inceleyen araştırmalarda fazla miktarda fito-östrojen tüketen Japon kadınlarının diğer kadınlardan daha uzun menstrual döngüye sahip oldukları belirlenmiştir [123].

Menopoz sonrası kadınlarda östrojenin lipoprotein miktarını düşürdüğü, ayrıca serum lipoprotein konsantrasyonunda benzer bir etki gösterdiği belirlenmiştir [23].

Keten tohumunun güçlü bir antioksidan olduğu ve farklı hastalıklara karşı bağışıklık sistemini güçlendirici etkisi bulunduğu rapor edilmektedir. Keten tohumu ekstraktları ve özellikle saflaştırılmış lignanlar, cilt kanserine karşı koruyucu olma ve promotajenler ve prokarsinojenlerin aktivasyonunun inhibisyonu şeklinde antioksidan etki gösterebilmektedir. Keten tohumunda bulunan SDG (Sekoisolarisiresinol diglukozid)

lignan sadece anti-kanser ve anti-oksidan özelliğe sahip olmayıp beraberinde anti-bakteriyel ve anti-fungal etkiye de sahip olduğu bildirilmiştir [38].

Bu tez çalışması ile, sağlık açısından sayısız faydaları yukarıda belirtilen ve son yıllarda tüketimi giderek artan keten bitkisi tohumunun, antioksidatif ve antikarsinojen etkilerinin araştırılması planlanmıştır. Buraya kadar olan kısımda çalışma ile ilgili literatür bilgileri verilmiştir.

3. MATERYAL VE METOD

Çalışmada kullanılacak olan Sarı- 85 çeşiti keten bitkisi tohumu aktardan temin edilmiştir. Keten bitkisi tohumunda nem, kül, protein, yağ ve besinsel lif tayinleri yapıp, materyalin kimyasal kompozisyonu belirlenmiştir.

3.1. Keten Tohumunda Yapılan Kimyasal Analizler

3.1.1. Toplam kurumadde tayini

Toplam kurumadde tayini AOAC'de önerilen yöntemle göre yapılmıştır [124]. Belirli ağırlıktaki öğütülmüş ve homojenize edilmiş keten tohumu örnekleri (yaklaşık 5 g), önceden kurutularak sabit tartıma getirilmiş ve darası alınmış kurutma kapları içerisinde tartılmıştır. Örnekler etüvde (103 ± 2 °C) sabit tartıma gelene kadar kurutulmuştur. Etüvden alınan örnekler desikatörde soğutulup, tartılmıştır. Analizler dört tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir [124].

3.1.2. Kül tayini

Keten tohumu örneklerinin kül miktarı, örneklerin 550 °C'de kül fırınında (Nüve, Ankara) 8 saat yakılması ile belirlenmiştir [124].

3.1.3. Protein tayini (Kjeldahl Metodu)

Keten tohumunda protein miktarı, Kjeldahl metoduyla, proteinlerin yapısında bulunan azotun amonyağa dönüştürülmesi ve oluşan amonyağın bir asitle titrasyonu esasına dayanarak saptanmıştır [124].

3.1.4. Yağ tayini

Keten tohumunda yağ tayini Soxhlet cihazında petrol eteri kullanılarak ve 6-8 saat ekstraksiyon yapılarak belirlenmiştir. Örnekler kahve değirmeninde üç defa çekilerek, Soxhlet ekstraksiyon düzeneğinin kartuşlarına 10'ar gram olacak şekilde konulmuştur [124].

3.1.5. Besinsel lif tayini

Besinsel lif miktarı, AACC toplam besinsel lif metodu kullanılarak belirlenmiştir. Bu yöntemde, 1gr keten tohumu ısıya dirençli α -amilaz enzimi, proteaz enzimi ve amiloglukozidaz enzimleri ile birbirini takip eden bir enzimatik parçalanmaya uğratılmıştır. Elde edilen filtrat solüsyonu, 4 hacim etilalkol ile çöktürülmüştür. Bu kalıntı çözünür besinsel lif olarak tanımlanmıştır. Toplam besinsel lif miktarının tespiti için bir önceki aşamada elde edilen çözünür besinsel lif, etilalkol ile çöktürülmüş ve kalıntı filtre edildikten sonra tartılmıştır. Toplam besinsel lif değeri, protein ve kül içeriğine göre hesaplanmıştır.

3.1.6. Radikal süpürme gücü (RSG)

Difenil Pikril Hidrazil (DPPH-Sigma) sentetik radikali kullanılarak ekstraktların RSG değerinin ölçümü, Yen et al. (2000)'e göre bazı modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirilmiştir [125]. DPPH çözeltisi günlük olarak hazırlanmıştır. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan örnek ekstraktları 30 dakika inkübe edilmiş ve 517 nm'deki absorbans değerleri saf alkole karşı okunarak saptanmıştır. RSG değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır;

$$RSG = 1 - \left[\frac{A_{\text{ö30}}}{A_{\text{s30}}} \right] \times 100$$

A_{s30} : Örneğin 30. dakikadaki absorbansı

A_{k30} : Kontrolün 30. dakikadaki absorbansı

3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması

Çalışmada kullanılan fareler (*Mus musculus*, *Balb-C*) İnönü Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezinden etik kuruldan onay alındıktan sonra temin edilmiştir. Bu çalışmada ağırlıkları ortalama 20 (± 2 gr) gram olan 8 haftalık 60 adet dişi fare kullanılmıştır. Hayvanlar $22 \pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklık ve 12:12 saat aydınlık/karanlık ortamda ayrı ayrı kafeslerde etik kurallara uygun olarak muhafaza edilmiştir. Hayvanların beslenmesinde,

kontrol grubu hayvanlar standart pellet fare yemi ile beslenmiştir. Diğer grupların beslenmesi standart pellet yeme % 10 oranında keten bitkisi tohumu karıştırılarak yapılmıştır. Bazı gruplardaki hayvanlara n-methyl n-nitrosurea (MNU) periton içi (i.p.) 50 mg/kg uygulama ile enjekte edilmiştir. Deneysel çalışmalar için kullanılacak fareler rastgele seçilerek, 6 deneysel grup oluşturulmuştur. Oluşturulan deney grupları aşağıda belirtildiği gibidir:

- Kontrol** : 12 hafta boyunca normal diyetle beslenen grup.
- 1. Grup** : Başlangıçta tek doz 50 mg/kg i.p. MNU verilip, normal diyetle beslenen grup.
- 2. Grup** : Başlangıçta tek doz 50 mg/kg i.p. MNU verilip, %10 keten tohumu içeren diyetle beslenen grup
- 3. Grup** : İlk 6 hafta normal diyetle beslenmeyi takiben 6. haftada 50 mg/kg i.p. MNU verilip, 6 hafta sonunda %10 keten tohumu içeren diyetle beslenmesine devam eden grup.
- 4. Grup** : 12 hafta boyunca normal diyete, günlük %10 oranında keten bitkisi tohumu karıştırılarak hazırlanmış diyetle beslenen grup.
- 5. Grup** : 12 hafta boyunca normal diyete, günlük %10 oranında keten bitkisi tohumu karıştırılarak hazırlanmış diyetle beslenen ve 6. hafta sonunda tek doz 50 mg/kg i.p MNU uygulanmış grup.

Uygulama grupları Çizelge 3.1 de gösterilmiştir.

3.2.1. Hayvanlar üzerinde yapılan işlemler

GRUPLAR	Kanserojen başlangıçta (MNU)	Kanserojen 6.haftada (MNU)	Normal diet (12 hafta)	Keten tohumu (son 6 hafta)	Keten tohumu (12 hafta)
Kontrol	-	-	+	-	-
Grup 1	+	-	+	-	-
Grup 2	+	-	-	-	+
Grup 3	-	+	-	+	-
Grup 4	-	-	-	-	+
Grup 5	-	+	-	-	+

Çizelge 3.1. Uygulama grupları

Deney süresince fareler *ad libitum* beslenmiştir ve tüketilen yem miktarı kaydedilmiştir. Ayrıca hayvanlara *ad libitum* çeşme suyu verilerek tüketilen su miktarı da rapor edilmiştir. Farelerin vücut ağırlıkları yine düzenli olarak izlenmiş ve kaydedilmiştir. Deney başlamadan önce bir hafta süre ile ortama adaptasyonları sağlanan hayvanlar, uygulamanın başlamasından önce oniki saat aç bırakılmıştır. MNU i.p. enjeksiyon ile uygulanmıştır. Keten tohumu ise hayvanların besinlerine katılarak sindirim sistemi yolu ile verilmiştir. Uygulamanın 1., 2., 4., 8., 10. haftalarında hayvanların gözlerinden mikrokapiller heparinize tüpler ile kan örnekleri alınmış, onikinci hafta sonunda aynı yöntemle kan örnekleri alınan hayvanlar, eter anestezisi altında servikal dislokasyon ile öldürülmüş ve karaciğer, bağırsak, böbrek ve mide dokuları alınmıştır. Çalışmanın sonuçlarının inceleneceği parametreler için doku örnekleri ve toplanan plazma örnekleri gerekli işlemler uygulandıktan sonra biyokimyasal çalışmaları yapıncaya kadar -80°C 'da saklanmıştır.

3.2.2. Doku homojenatlarının hazırlanması

Dondurucudan alınan dokuların (mide, bağırsak ve karaciğer) buz üzerinde çözünmesi sağlanmıştır. Doku örneklerinin homojenizasyonu amacıyla tartılan dokular, politron homojenizatörde (Ika Instruments, Germany) 18000 rpm devirde 2 kez 15'er saniye süre ile parçalanmıştır. Parçalama, doku ağırlığının 4 katı hacimde (w/v) +4°C'ye

soğutulmuş homojenizasyon tamponu (pH 7.4, 0.1 M potasyum fosfat tamponu içinde: 0.15 M KCl; 1 mM EDTA; 0.05 mM DTT bulunmaktadır) ile bir buz kabında yapılmıştır. Çalışmaların tüm aşamalarında örnekler buz içerisinde korunmuştur. Homojenizasyon işlemi sonrasında homojenatların 1/10'u sitozolik supernatant eldesi amacı ile eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Homojenat +4 °C'de 16000 xg devirde 20 dakika süre ile santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası supernatant kısmı alınarak, beklemezsizin sitozolik enzim aktiviteleri spektrofotometrik yöntem ile ölçülmüştür.

3.2.3. Enzim aktivitelerinin belirlenmesi

Çalışmamızda 12 haftalık uygulama sürecinin sonunda hayvanlardan elde edilen plazma ve doku örneklerinde enzim aktiviteleri belirlenmiştir. Plazmalarda AST (Aspartat aminotransferaz), ALT (Alanin aminotransferaz), LDH (Laktat dehidrogenaz) enzim aktivite değerleri ile kreatinin miktarları belirlenmiştir. Dokularda (karaciğer, mide, bağırsak) ise AST (Aspartat aminotransferaz), ALT (Alanin aminotransferaz), LDH (Laktat dehidrogenaz), GST (Glutatyon S-transferaz), GR (Glutatyon redüktaz), GP_x (Glutatyon peroksidaz), CAT (Katalaz) ve karaciğerde EROD (7-Etoksirezorufin-*O*-deetilaz) enzim aktivite değerleri tespit edilmiştir. Sitozolik ve mikrozomal enzim aktivitesi ve toplam protein miktarı ölçüm işlemleri santrifüj işleminden hemen sonra, örnekler bekletilmeksizin, mikropilaka okuyucu sistemleri (Versamax Mikroplate Reader veya Gemini XS Floresans Mikroplate Reader; Molecular Devices Corp., USA) kullanılarak yapılmıştır. Enzim aktivitesi ve toplam protein miktarı ölçümlerinde, her bir örnek için dört tekrarlı absorbans okuması yapılmıştır. Aynı örnek için elde edilen değerler arasında % 10'dan daha büyük korelasyon farkı bulunduğunda, okuma işlemi yinelenmiştir. mOD (milioptik densite) cinsinden alınan absorbans değerleri OD'ye (optik densite) çevrilerek hesaplamalar yapılmıştır. Karaciğer, bağırsak ve mide dokularında çalışılan bütün enzimlerin aktiviteleri, örneklerdeki toplam protein düzeyleri ölçüldükten sonra spesifik aktivite cinsinden ifade edilmiştir.

3.2.4. Plazma enzimlerinin aktivite tayinleri

3.2.4.1. Plazma LDH (Laktat dehidrogenaz) aktivitesi

Plazma LDH enzim aktivitesi LDH diagnostik kiti (Biolabo: 92111, BIOLABO, Fransa) substrat olarak kullanılarak, üretici firmanın belirttiği protokole göre yapılmıştır. Bu amaçla plazma örnekleri toplam reaksiyon karışımında 5 µl olacak şekilde mikrolaka çukurlarına pipetlenmiştir. İçerisinde LDH substratı bulunan çözelti hazırlanmıştır. Bu çözülden 200 µl, örneklerin üzerine seri olarak çok kanallı mikropipet ile pipetlenmiştir. Karışım 15 saniye süreyle mikrolaka okuyucuda çalkalanmış ve 25°C'de 2 dakika süre ile 340 nm'de absorbans değişimi kaydedilmiştir.

3.2.4.2. Plazma AST (Aspartat aminotransferaz) aktivitesi

Plazma örneklerinde AST aktivitesi ölçülürken, diagnostik kitler (Biolabo: 80025, BIOLABO, Fransa) kullanarak üretici firmanın belirttiği protokole göre yapılmıştır. Bu amaçla 20 µl plazma örneği mikrolaka çukurlarına pipetlendi ve hazır kite 10 ml distile su eklenerek içerisinde AST substratı bulunan çözelti hazırlanmıştır. Bu çözülden örneklerin üzerine 200 µl eklenerek reaksiyon başlatılmıştır. Absorbans değişimi, 25°C'de, 340 nm'de 2 dakika süre ile takip edilmiştir.

3.2.4.3. Plazma ALT (Alanin aminotransferaz) aktivitesi

Plazma örneklerinde ALT aktivitesi ölçülürken, diagnostik kitler (Biolabo: 80027, BIOLABO, Fransa) kullanılarak üretici firmanın belirttiği protokole göre yapılmıştır. Öncelikli olarak 20 µl örnek mikrolaka çukurlarına pipetlenmiş ve hazır kite 10 ml distile su eklenerek içerisinde ALT substratı bulunan çözelti hazırlanmıştır. Bu çözülden örneklerin üzerine 200 µl eklenerek reaksiyon karışımı 1 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası 25°C'de, 340 nm'de 2 dakika süre ile absorbans değişimi belirlenmiştir.

3.2.4.4. Plazma kreatinin miktarı tayini

Plazma örneklerinde kreatinin miktarı ölçülürken, diagnostik kitler (Biolabo: 80107 BIOLABO, Fransa) kullanılarak, üretici firmanın belirttiği protokole göre ölçümler

yapılmıştır. Öncelikli olarak 15 µl örnek mikrolaka çukurlarına pipetlenmiştir. İnkübasyon sonrası 25 °C’de, 340 nm’de 2 dakika süre ile absorbans değişimi belirlenmiştir.

3.3. Dokularda Enzim Aktivitesinin Saptanması

3.3.1. Glutasyon S-transferaz (GST)aktivitesi

GST aktivitesi karaciğer, mide, bağırsak dokularında Habig et. al. (1974) yöntemine göre saptanmıştır [126]. Yöntemde mikrolaka okuyucu sisteme uygun modifikasyonlar yapılmış ve enzim aktivitesi sitozolik fraksiyonlarda saptanmıştır. Substrat olarak 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) kullanılmıştır. Buna göre 1/10 oranında dilüe edilmiş örnekten 10 µl mikrolaka çukurlarına pipetlenmiştir. Potasyum fosfat tamponu (0.1 M, 100 µl pH 6.5), redükte glutasyon (2 mM, 100 µl GSH) ve CDNB (20mM,10µl) pipetlendikten sonra reaksiyon başlatılmış ve 2 dakika süreyle 344 nm dalga boyunda okuma yapılmıştır.

3.3.2. Glutasyon redüktaz (GR) aktivitesi

Karaciğer, mide, bağırsak dokularındaki GR aktivitesi Cribb et. al. (1989) tarafından kullanılan mikrolaka okuyucu sistemi ile ölçüm yöntemine uygun olarak ölçülmüştür [127]. Reaksiyon solüsyonu 150 µl 5, 5'-dithiobis (2-nitrobenzoik asit; DTNB, 0.1 mM), 20 µl NADPH (12 mM) ve 20 µl örnek içermektedir. 20 µl GSSG (3.25 mM) ilavesi ile reaksiyon başlatılmıştır. Bütün çözeltiler 1mM EDTA içeren potasyum fosfat tamponunda (0.1 M, pH 7.5) hazırlanmıştır. Reaksiyon esnasında GSSG'den GSH oluşumu nedeniyle DTNB miktarı azalmıştır. DTNB azalışı oda sıcaklığında 405 nm’de izlenmiş ve elde edilen absorbans değerlerinden GR aktivitesi hesaplanmıştır (DTNB için $\epsilon=14,151 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

3.3.3. Karboksil esteraz (CaE) aktivitesi

Karaciğer, mide, bağırsak dokularındaki CaE aktivitesi belirlenirken, Nousiainen and Torronen (1984) tarafından geliştirilen yöntem, Santhoshkumar et. al. (1999) tarafından belirtilen spektrofotometrik uygulamadan mikrolaka okuyucu sisteme uyarlanmıştır [128, 129]. Enzim aktivitesi ölçümünde p-nitrofenolasetat (PNPA) substrat olarak kullanılmıştır. Buna göre mikrolakalara 5 µl örnek pipetlendikten sonra ortama 250 µl, 0.05 M. Trizma

7.4 eklenmiştir. 3 dakikalık inkübasyon sonrasında ortama 5 µl PNPA (karışımdaki konsantrasyonu 0.5 mM olacak şekilde) eklenerek reaksiyon başlatılmıştır. 405 nm dalga boyunda 2 dakika boyunca okuma yapılmıştır.

3.3.4. Glutasyon peroksidaz (GP_X) aktivitesi

Dokularda GP_X aktivitesi E. Stephensen, (2000) tarafından geliştirilen mikropilaka okuyucu sistemi ile ölçüm yöntemine uygun olarak ölçülmüştür [130]. Reaksiyon solüsyonu 3.5 µM GSH, 1mM NaN₃, 2 U Glutatron Redüktaz ve 0.2 mM NADPH ve 10 µl örnek içermektedir. Mikropilakalara reaksiyon solüsyonu pipetlendikten sonra ortama, 10 µl H₂O₂ ilave edilerek reaksiyon başlatılmıştır. Bütün çözeltiler 1mM NaN₃ içeren potasyum fosfat tamponunda (50m M, pH 7.4) hazırlanmıştır. 340 nm dalga boyunda 1 dakika boyunca okuma yapılmıştır.

3.3.5. Katalaz (CAT) aktivitesi

Katalaz aktivitesinin aktivite tayini Luck, (1963) yöntemine göre yapılmıştır [131]. Na-K-fosfat tampon çözeltisinin (Na₂HPO₄-KH₂PO₄ pH: 7.0, 1/15 M) 100ml'ine 160 µl H₂O₂ (derişik) çözeltisi eklenerek hazırlanan bu çözeltilerden 1000 µl alınıp, kör olarak kullanılmıştır. Numunelerin katalaz içeriğini belirlemek için hazırlanan bu karışımdan 1000 µl alınıp spektrofotometre küvetine konmuş ve üzerine çalışma aralığına bağlı olarak 30 µl'den başlayarak artan miktarlarda süpernatant eklenmiş ve bir kez karıştırılıp 240 nm dalga boyunda 30 sn süreyle okuma yapılmıştır.

3.3.6. Laktat dehidrogenaz (LDH) aktivitesi

Dokularda LDH aktivitesi tayini plazma örnekleri için kullanılan yöntem ile yapılmıştır. Ancak dokularda enzim aktivitesi yüksek olduğundan daha ölçülebilir aralıkta sonuç elde edebilmek için doku homojenatlarından elde edilen süpernatant örnekleri 1/10 oranında sulandırıldıktan sonra ölçüm yapılmıştır.

3.3.7. Aspartat aminotransferaz (AST) aktivitesi

Dokularda AST aktivitesi tayini plazma örnekleri için kullanılan yöntem ile yapılmıştır.

3.3.8. Alanin aminotransferaz (ALT) aktivitesi

Dokularda ALT aktivitesi tayini plazma örnekleri için kullanılan yöntem ile yapılmıştır.

3.4. EROD Aktivitesi İçin Karaciğer Doku Homojenatlarının Hazırlanması

Dondurucudan alınan karaciğer dokusunun buz üzerinde çözünmesi sağlandıktan sonra Özmen vd. (2008) tarafından açıklanan şekilde örnekler homojenizasyon amacıyla tartılmıştır [132]. Homojenatların seri santrifugasyon işlemi sonucunda mikrozom örnekleri elde edilmiştir. Homojenatlar ultrasantrifüj tüplerine alınarak yeterince tampon eklendikten sonra, ilk olarak 10000 rpm'de 4 °C'de 20 dakika süre ile santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası supernatant alınarak ikinci kez 30000 rpm'de 4 °C'de 60 dakika santrifüj edilmiştir. Bu santrifüj işleminin sonunda ise supernatant kısmı atılarak pellet cam-teflon homojenizatörde 8-10 vuruş ile yeniden süspanse edilmiş ve 30000 rpm'de 4 °C'de ikinci kez 60 dakika süre ile santrifüj edilmiştir. Elde edilen pellet kısmı 1/1 (w/v) oranında saklama tamponu (20 ml gliserol + 80 ml homojenizasyon tamponu) kullanılarak cam-teflon homojenizatörde 8-10 vuruş ile süspanse hale getirilmiş ve bekletilmeden florespektrofotometrik yöntem ile mikrozomal EROD aktivitesi ölçümünde kullanılmıştır.

3.4.1. Karaciğer mikrozomal EROD aktivitesi

Karaciğer mikrozomal EROD aktivitesi ölçülürken, Whyte et. al. [2000] tarafından açıklanan şekilde örneklerden 20 µl mikroplakalara (Grainer, black flat-bottom) pipetlenmiştir (kör olarak fosfat tamponu kullanılmıştır.) [133]. Daha sonra ortama sırasıyla 220 µl potasyum fosfat tamponu (0.1 M, pH 7.7) ve 20 µl etoksirezorufin (50 µM) eklenmiştir. Son olarak 10 µl, NADPH (10 mM; 0.00833 g/ml fosfat tamponu) eklenmiştir. Enzim aktivitesi mikropilaka ölçer spektrofluorometre (Gemini XS, Molecular Devices, USA) ile ölçülmüştür. Bunun için cihaz Ex (excitation): 530, Em (emission): 586 nm dalga boylarına ayarlanmıştır. 30 °C'de 10 dakika süreyle spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır [125]. EROD aktivitesinin belirlenmesi için rezorufin standardı oluşturulmuştur. Bu amaçla 80 µM stok rezorufin, 0.1 M NaCl içerisinde hazırlanmış ve derişik NaOH çözeltisi ile pH 10'a ayarlanmıştır. Bu stok solüsyondan, 50 mM Tris-Base (pH 7.8; 0.1 M NaCl içeren)

kullanılarak mikropkaka içerikleri 270-0.27 pmol, olacak Şekilde bir seri dilüsyon yapılmıştır. Elde edilen absorbans değerleri ile rezorufin standart eğrisi oluşturulmuş ve bu eğriye göre mikropkaka çukurlarında bulunan mikrozm örneklerindeki enzim aktivitesine bağlı olarak oluşan rezorufin miktarı pmol/çukur cinsinden hesaplanmıştır. Çukurdaki protein miktarı da mg protein cinsinden hesaplandıktan sonra, spesifik mikrozmol EROD aktivitesi pmol/dakika/mg protein cinsinden hesaplanmıştır.

3.4.2. Biyotransformasyon indeksinin hesaplanması

Karaciğer mikrozmol EROD ve GST enzimlerinin spesifik aktiviteleri hesaplandıktan sonra, ‘‘Biyotransformasyon İndeksi (Bİ): spesifik EROD aktivitesi (pmol/dakika/mg protein)/spesifik GST aktivitesi (nmol/dakika/mg protein)’’ formülü kullanılarak hesaplanmıştır.

3.5. Karaciğer Mikrozm, Sitol ve Diğer Doku rneklerinde Toplam Protein Tayini

Karaciğer hücrelerinde toplam protein miktarları Bradford [1976] tarafından geliştirilen yönteme göre, mikropkaka okuyucu sistemi kullanılarak tespit edilmiştir [134]. Supernatant rnekleri 1/20, mikrozm örnekleri ise 1/10 oranında sulandırıldıktan sonra, sulandırılmıŐ örneklerden 5 µl mikropkaka çukurlarına pipetlenmiş ve üzerine 250 µl Bradford zltisi (Sigma B6916) eklenmiştir. Reaksiyon karışımı oda sıcaklığında karanlıkta 15 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Renk deęiŐimine bağlı olarak, 595 nm dalga boyunda absorbans değeri llmüŐtir. Elde edilen değerler BSA (Bovine Serum Albumin) standart eğrisi değerleri ile karŐılaŐtırılarak, örnekteki toplam protein miktarları saptanmıştır. Tüm örneklerden elde edilen toplam protein değerleri, elde edilen enzim aktivite değerleri ile birlikte, spesifik enzim aktivitesi değerlerinin hesaplanmasında kullanılmıştır.

3.6. Histolojik alıŐmalar

Üç aylık uygulamalar sonucunda dissekte edilmiş olan hayvanlardan alınan bağırsak, karaciğer ve mide dokusu örnekleri %10’luk nötral tamponlanmış formaline (NTF) konulmuştur. Parçalar 24 saat süre ile tespit edildikten sonra 3-4 mm’lik daha kk parçalara ayrılıp plastik doku takip kasetleri içerisine konulmuştur. Fiksasyon işleminin

bitmesini takiben NTF'deki parçalar 24 saat boyunca akan çeşme suyunda yıkandıktan sonra, %70'den absölye kadar dereceli etil alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edilmiştir. Tüm örnekler dehidratasyonu takiben, toplam 2 saat süre ile ksilolde şeffaflandırılarak 60 °C de erimiş olan parafine konulmuştur. Dört saat süre ile erimiş haldeki parafinde bekletilen dokular parafin içerisine gömülerek bloklanmıştır. Parafin bloklardan mikrotom yardımı ile 5-6 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Alınan kesitler genel histolojik yapıyı gözlemlemek amacıyla Hematoksilen-Eosin (H-E) ile boyanmıştır. Hazırlanan preparatlar Leica DFC 280 ışık mikroskobu ve Leica Q Win Plus görüntü analiz sisteminde (Leica Micros Imaging Solutions Ltd.; Cambridge, U.K.) incelenerek fotoğrafları çekilmiştir.

3.7. İstatistiksel Analiz

Her bir deney en az 3 tekrarlı olarak yapılmış ve elde edilen sonuçlar “SPSS 9.0” paket programıyla değerlendirilmiştir. Farklı gruplardan elde edilen sonuçların kontrol grubu ile arasındaki farkların istatistiksel önem düzeyleri “One way ANOVA (Analysis of variances)” testi ve “DUNCAN” post testiyle belirlenmiştir. Gruplar arası farklılığın önemli olup olmadığı $p < 0.05$ düzeyinde önemlilik derecesine göre saptandı. Gruplar arası farklılığın önemli olduğu saptandığında, örnekler ikili karşılaştırma ile Mann Whitney-U testine göre karşılaştırıldı. Buna bağlı olarak, grup içi farklılığın $p < 0.05$ düzeyinde önemli bulunduğu gruplar saptandı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Kullanılan Keten Tohumunda Yapılan Kimyasal Analizlerin Sonuçları

Tez çalışmasında kullanılan keten bitkisi tohumunun kimyasal analiz sonuçları Çizelge 4.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Keten tohumu içeriğinin kimyasal analiz sonuçları

Kül miktarı	% 3.37 ± 0.06
Kurumadde (%) miktarı	% 94.4 ± 0.03
Protein (%) miktarı	% 21.7 ± 1.13
Yağ miktarı	% 39.7 ± 1.15
Besinsel Lif miktarı	% 25.2 ± 1.44
Toplam Fenolik Madde (mg gallic acid)	1.060 ± 0.01

Buna göre, keten bitkisi tohumlarının kurumadde içeriğinin % 94.4 ± 0.03 olduğu saptanmıştır. Yağ bileşimi açısından çok zengin olduğu bilinen keten tohumunun çalışmamızda kullanılan örneğinde ise yağ içeriğinin % 39.7 ± 1.15 oranında olduğu belirlenmiştir. Kjeldahl yöntemine göre yapılan protein analizi sonucunda keten tohumunun % 21.7 ± 1.13 oranında protein içerdiği tespit edilmiştir.

Toplam fenolik madde içeriği ise gallik asit cinsinden 1.060 ± 0.01 mg olarak saptanmıştır. Keten tohumu örneğinde kül içeriğinin % 3.37 ± 0.06 olduğu bulunmuştur. Besinsel lif miktarı ise yapılan analiz sonucunda % 25.16 ± 1.44 bulunmuştur.

4.2. Hayvan Ağırlıkları ile İlgili Bulgular

Gruplara göre haftalık hayvan vücut ağırlıklarına ait ort. \pm st. hata değerleri Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Deneylein başlangıcında vücut ağırlıkları bakımından homojen bir dağılım ile oluşturulan ve gruplar için rastgele seçilen hayvanların vücut ağırlığı değişiminde önemli bir farklılığın olmadığı görülmüştür. Bununla birlikte yemlerine keten tohumu ilavesi yapılan 2., 3., 4. ve 5. gruplarda bulunan hayvanların ağırlıklarında ilk haftalara göre zamanla bir artış olduğu gözlenmiştir. En fazla artış, deney başlangıcında MNU enjekte edilmiş olan ve deney süresince keten tohumu ile beslenen 2. gruptaki hayvanlarda görülmüştür. Hayvanların başlangıç ortalama ağırlıkları 24.70 ± 1.75 gram iken deney sonundaki ağırlıkları 29.93 ± 0.93 gram olarak kaydedilmiştir. Deney süresince keten tohumu ile beslenen ve toplam 12 haftalık deney sürecinin 6. haftasında MNU uygulanan hayvanların ağırlıkları ise başlangıçta 26.61 ± 0.70 gram iken, deney sonunda 28.34 ± 0.53 gram olarak saptanmıştır. Sadece keten tohumu tüketen gruplardaki hayvanların başlangıç vücut ağırlıkları ile 12 hafta sonra saptanan ağırlıkları arasında istatistiksel olarak önemli bir artış tespit edilmemiştir ($p > 0.05$). Bununla beraber vücut ağırlıklarında başlangıca göre bir artış olduğu kaydedilmiştir. Tüm uygulama gruplarının kontrol grubu hayvanlar ile karşılaştırılması sonucunda ise hayvan ağırlıklarının haftalık değişimi bakımından istatistiksel olarak önemli düzeyde bir fark olmadığı saptanmıştır ($p > 0.05$).

4.3. Hayvanların Haftalık Yem Tüketimleri İlgili Bulgular

Hayvanların haftalık ortalama yem tüketim miktarları Çizelge 4.3. te verilmiştir. Hayvanların haftalık ortalama tükettikleri yem miktarı ile ilgili olarak yapılan istatistiksel analizler sonucunda farklı uygulama grupları ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak önemli düzeyde bir farklılık saptanmamıştır ($p > 0.05$).

4.4. Hayvanların Su Tüketimleri İle İlgili Bulgular

Hayvanların haftalık ortalama su tüketim miktarları Çizelge 4.4.te verilmiştir.

Hayvanların haftalık tükettikleri su miktarı ile ilgili olarak yapılan istatistiksel analizler sonucunda gruplar arasında kontrol grubuna göre önemli düzeyde bir fark olmadığı saptanmıştır ($p > 0.05$). Hayvanların ortalama su tüketim miktarlarına göre günlük su tüketim değerlerinin literatür bilgileri ile uyuşan normal bir dağılım sergilediği gözlenmiştir.

Çizelge 4.2. Gruplara Göre Haftalık Hayvan Vücut Ağırlıklarının ort ± S.H. Değerleri

Gruplar	1. Hafta	2.Hafta	3.Hafta	4. Hafta	5. Hafta	6. Hafta	7. Hafta	8. Hafta	9. Hafta	10. Hafta	11.Hafta	12. Hafta
Kontrol	28.9 ± 1.3	28.5 ± 1.0	28.2 ± 1.1	28.2 ± 1.0	28.1 ± 1.0	28.6 ± 0.9	28.4 ± 0.9	28.6 ± 1.4	28.9 ± 1.3	29.3 ± 1.2	28.8 ± 1.2	28.4 ± 1.2
1. Grup	26.0 ± 0.8	26.2 ± 1.0	26.4 ± 1.2	27.7 ± 0.9	26.7 ± 1.0	27.0 ± 0.9	27.1 ± 0.9	26.2 ± 1.0	26.9 ± 0.9	27.3 ± 0.9	26.5 ± 0.8	26.1 ± 0.8
2. Grup	24.7 ± 1.75	26.5 ± 1.5	26.5 ± 1.2	28.5 ± 1.6	26.9 ± 1.0	28.0 ± 1.1	28.7 ± 1.1	27.8 ± 1.0	29.5 ± 1.0	29.6 ± 1.2	29.7 ± 0.9	29.2 ± 0.9
3. Grup	26.6 ± 0.7	26.8 ± 0.7	27.7 ± 0.8	28.3 ± 0.6	28.3 ± 0.6	28.2 ± 0.7	28.2 ± 0.7	28.0 ± 0.6	29.0 ± 0.7	29.1 ± 0.9	29.6 ± 0.7	28.3 ± 0.7
4. Grup	28.8 ± 1.0	28.2 ± 1.2	29.5 ± 1.1	29.4 ± 1.0	30.7 ± 0.6	30.0 ± 0.5	31.0 ± 0.5	31.1 ± 0.7	31.6 ± 0.6	31.2 ± 0.8	32.0 ± 0.6	31.2 ± 0.6
5. Grup	27.7 ± 1.8	27.5 ± 1.6	28.4 ± 1.6	29.1 ± 1.4	27.8 ± 1.3	31.0 ± 1.2	27.6 ± 1.2	29.4 ± 1.7	28.6 ± 1.5	30.0 ± 1.5	29.8 ± 1.3	29.7 ± 1.3

Çizelge 4.3. Hayvanların Haftalık Ortalama Yem Tüketim Miktarlarının ort ± S.H. Değerleri

Gruplar	İlk 2 hafta	3. Hafta	4. Hafta	5.Hafta	6. Hafta	7. Hafta	8. Hafta	9. Hafta	10.hafta	11. hafta	12.hafta
Kontrol	34.3 ± 0.97	33.8 ± 1.86	35.24 ± 2.32	34.1 ± 1.30	30.8 ± 1.57	32.6 ± 1.28	28.5 ± 3.99	28.6 ± 3.84	29.9 ± 3.92	28.6 ± 3.88	32.2 ± 4.0
1. Grup	33.4 ± 1.30	33.2 ± 1.00	33.38 ± 1.12	31.6 ± 1.29	28.4 ± 0.94	31.4 ± 1.18	27.7 ± 0.99	31.6 ± 1.10	34.3 ± 1.37	26.3 ± 3.45	32.0 ± 4.3
2. Grup	33.3 ± 1.31	37.4 ± 1.71	35.74 ± 1.67	39.5 ± 1.74	35.5 ± 2.35	33.2 ± 0.90	32.4 ± 1.26	36.1 ± 1.44	42.3 ± 3.26	37.2 ± 2.70	38.2 ± 3.8
3. Grup	36.2 ± 2.02	40.0 ± 1.05	35.49 ± 1.16	40.6 ± 1.47	35.7 ± 1.57	33.3 ± 1.43	28.2 ± 3.42	31.4 ± 3.60	32.2 ± 3.78	29.1 ± 3.37	34.0 ± 4.4
4. Grup	35.7 ± 1.96	39.0 ± 1.67	31.52 ± 4.11	32.6 ± 4.87	31.0 ± 4.97	32.4 ± 4.57	29.2 ± 4.33	33.7 ± 4.85	34.6 ± 4.93	32.9 ± 4.73	35.5 ± 5.0
5. Grup	32.1 ± 1.07	33.2 ± 1.31	34.41 ± 0.77	31.5 ± 2.50	30.1 ± 0.97	34.3 ± 1.02	30.8 ± 1.77	34.3 ± 1.25	35.4 ± 1.03	32.3 ± 1.81	27.5 ± 7.0

Çizelge 4.4. Hayvanların Haftalık Su Tüketimlerinin ort ± S.H. Değerleri

Gruplar	İlk 2 . Hafta	3. Hafta	4. Hafta	5. Hafta	6. Hafta	7. Hafta	8. Hafta	9. Hafta	10. hafta	11. hafta	12.hafta
Kont.	103.3 ± 5.5	52. ± 4.1	53.8 ± 3.2	59. ± 1.8	49.6 ± 4.2	48.1 ± 4.3	47.6 ± 2.1	47.6 ± 2.4	42.3 ± 2.3	52.8 ± 3.0	63.2 ± 3.3
1.Grup	111.1 ± 3.0	43. ± 2.6	50.1 ± 3.0	45.5 ± 1.6	49.6 ± 2.5	49.7 ± 2.1	49.0 ± 3.1	42.0 ± 3.3	43.1 ± 3.1	49.2 ± 2.8	55.7 ± 7.3
2.Grup	108.9 ± 6.5	50.2 ± 5.9	62.0 ± 4.2	57.8 ± 6.4	61.1 ± 4.5	56.9 ± 4.6	51.6 ± 4.3	58.1 ± 3.4	64.2 ± 6.2	63.4 ± 6.2	87.5 ± 7.4
3.Grup	117.7 ± 2.7	47.1 ± 1.8	55.8 ± 3.2	57. ± 3.4	57.2 ± 2.0	47.4 ± 2.2	45.8 ± 1.4	40.5 ± 2.3	43.0 ± 2.0	58.6 ± 4.2	59.2 ± 1.6
4.Grup	107.8 ± 3.6	50. ± 2.8	59.5 ± 3.3	51. ± 4.6	57.1 ± 4.9	52.2 ± 3.4	52.3 ± 3.3	55.4 ± 4.0	51.4 ± 2.6	60.5 ± 3.4	73.7 ± 5.0
5.Grup	100.0 ± 6.2	52. ± 3.9	55.0 ± 2.5	49. ± 2.8	52.6 ± 2.5	52.3 ± 3.9	45.3 ± 3.3	52.8 ± 2.7	47.3 ± 2.4	58.1 ± 2.5	66.8 ± 3.3

4.5. Plazmada AST, LDH, Enzim Aktiviteleri ve Kreatinin Konsantrasyonları

4.5.1. Kan plazması biyokimyasal analiz bulguları

Deneysel çalışmalar süresince hayvanlardan 1., 4, 7., 10. ve 12. haftalarda alınan kan örneklerinden elde edilen plazmalarda AST, LDH aktiviteleri ile kreatinin konsantrasyonu değerleri Çizelge 4.5'te gösterilmiştir.

Buna göre, deneysel çalışmalarda farelerden alınan kan örneklerinde birinci hafta sonunda saptanan AST enzim aktivite değerleri tüm gruplarda kontrole kıyaslandığında istatistiksel olarak önemli bir farklılık göstermiştir ($p<0.05$). Tüm gruplarda plazma AST aktivitesinin kontrole göre inhibisyon gösterdiği saptanmıştır. 1. grupta (başlangıçta MNU enjeksiyonu yapılan ve normal pelletle beslenen) yer alan hayvanların plazma örneklerinde saptanan enzim aktivite değeri $17.08 (\pm 1.75)$ U/ml iken, aynı grupta en düşük enzim aktivite değeri $12.66 (\pm 1.75)$ U /ml olarak bulunmuştur. LDH aktivitesi tüm gruplarda kontrole göre azalış göstermiş ve bu azalış istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.05$). MNU enjeksiyonu yapılan ve keten tohumu ilaveli diyetle beslenen 3. ve 5. grupların LDH aktivite değerleri birbirine yakın sonuçlar göstermiş olup, tespit edilen en düşük enzim aktivite değerleridir. Plazma kreatinin konsantrasyonu bakımından tüm grupların kontrole göre istatistiksel olarak önemli olduğu saptanmıştır ($p<0.05$). Tüm gruplardan elde edilen kreatin konsantrasyonlarının kontrolden daha düşük değerlerde olduğu bulunmuştur.

Uygulamanın dördüncü haftasında elde edilen kan plazması örneklerinde ise AST enzim aktivite değerlerinin tüm gruplarda kontrole kıyaslandığında istatistiksel olarak önemli düzeyde bir farklılık gösterdiği görülmüştür ($p<0.05$). AST enzim aktivitesinin kontrol grubundan daha yüksek olduğu, buna karşın diğer uygulama gruplarında enzim aktivitesinin kontrol grubuna göre daha düşük olduğu görülmüştür. Madde uygulamasının 4. haftasında elde edilen kan örneklerinde plazma LDH enzim aktivite değerleri için kontrol grubu ile uygulama grupları karşılaştırıldığında LDH aktivitesinin kontrol örneklerinden önemli düzeyde farklılık gösterdiği saptanmıştır ($p<0.05$). Uygulama gruplarından elde edilen LDH değerlerinin kontrolden düşük değerler verdiği, özellikle (MNU enjeksiyonu yapılan ve keten tohumu ilaveli diyetle beslenen) 2. grup, 4.grup ile 5. gruptan elde edilen LDH aktivitesi değerlerinin oldukça düşük olduğu saptanmıştır

Çizelge 4.5. Beş farklı dönemde hayvanlardan alınan kan örneklerinde plazma AST ve LDH aktivitesi ve Kreatinin konsantrasyonu

	N	AST (U/ml)	N	LDH (U/ml)	N	Kreatinin (mg/dl)	
	K	10	20.5 ± 2.7	10	287 ± 10	8	0.87 ± 0.08
	1	10	17.0 ± 1.7	10	258 ± 13	8	0.75 ± 0.13
1.KAN	2	10	12.8 ± 1.5*	10	218 ± 11*	9	0.66 ± 0.16
ALMA	3	10	12.6 ± 1.7*	10	167 ± 12*	10	0.38 ± 0.30*
1. hafta	4	10	15.4 ± 1.8	10	201 ± 12*	10	0.40 ± 0.04*
	5	10	13.9 ± 2.1*	10	165 ± 17*	10	0.35 ± 0.30*
	K	7	15.4 ± 2.0	8	186 ± 13	5	0.26 ± 0.04
	1	8	20.1 ± 3.3*	9	164 ± 9*	8	0.20 ± 0.02
2.KAN	2	6	10.7 ± 1.4*	9	147 ± 9*	7	0.19 ± 0.02
ALMA	3	9	13.7 ± 1.9	10	159 ± 10*	7	0.19 ± 0.20
4. hafta	4	8	12.5 ± 1.7*	8	136 ± 9*	9	0.30 ± 0.10
	5	7	10.8 ± 1.0*	9	145 ± 8*	9	0.54 ± 0.10*
	K	9	14.4 ± 1.69	9	135 ± 12	9	1.08 ± 0.14
	1	9	13.5 ± 0.64	9	132 ± 8.9	8	1.08 ± 0.12
3.KAN	2	9	8.34 ± 1.08*	9	128 ± 12	9	1.03 ± 0.05
ALMA	3	10	13.1 ± 1.26	10	136 ± 10	9	0.83 ± 0.12
7. hafta	4	8	12.9 ± 1.58	8	124 ± 16	6	0.83 ± 0.16
	5	9	7.85 ± 1.09*	9	115 ± 15	3	0.16 ± 0*
	K	8	13.1 ± 1.1	8	104 ± 5	9	0.31 ± 0.03
	1	9	14.3 ± 0.7	9	107 ± 11	9	0.38 ± 0.08
4.KAN	2	9	13.2 ± 2.7	9	101 ± 11	8	0.23 ± 0.02*
ALMA	3	9	14.7 ± 3.8	9	102 ± 13	9	0.28 ± 0.06
10. hafta	4	8	10.0 ± 0.8	8	95.4 ± 14	7	0.36 ± 0.04
	5	9	13.2 ± 1.7	9	77.1 ± 5.9	5	0.52 ± 0.13*
	K	8	21.8 ± 1.9	8	143 ± 9	8	1.02 ± 0.07
	1	8	22.2 ± 1.3	8	141 ± 12	9	1.00 ± 0.03
5.KAN	2	9	27.5 ± 6.9	9	118 ± 9	9	1.02 ± 0.06
ALMA	3	9	19.5 ± 1.1	9	114 ± 9	9	1.04 ± 0.09
12. hafta	4	8	18.5 ± 2.3	7	81.6 ± 6.9*	7	1.02 ± 0.06
	5	9	27.6 ± 3.1	9	135 ± 6.2	5	1.12 ± 0.10

Kreatinin konsantrasyonu bakımından istatistiksel olarak gruplar arasında kontrole göre önemli farklılık görülmüştür (p<0.05). 1.grup (MNU enjeksiyonu yapılan

ve normal diyetle beslenen grup), 2. grup (MNU enjeksiyonu yapılan ve keten tohumu ilaveli diyetle beslenen grup) ve 3.grup (başlangıçta normal diyetle beslenen, altıncı haftada MNU enjeksiyonu yapılan ve beslenmesine keten tohumu ilaveli diyetle devam eden grup) için plazma kreatinin konsantrasyon değerlerinin kontrolden düşük, 4. grup (sadece keten tohumu diyetle beslenen) ve 5. grup (keten tohumu diyetle beslenen ve altıncı haftada MNU enjeksiyonu yapılan) için ise kontrole göre önemli düzeyde artış gösterdiği saptanmıştır ($p<0.05$).

Çalışmanın yedinci haftasında hayvanlardan alınan kan örneklerinde tüm gruplar arasında istatistiksel değerlendirme sonuçlarına göre plazma AST aktivitesi bakımından kontrole göre önemli farklılık olduğu bulunmuştur ($p<0.05$). Aynı dönem plazma örnekleri için LDH enzim aktivitesinin kontrole göre azaldığı saptanmış olsa da istatistiksel olarak gruplar arasında önemli farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$). Plazma kreatinin konsantrasyonu ile ilgili olarak yapılan istatistiksel analiz sonuçlarına göre kontrol ile uygulama grupları arasında önemli farklılık olduğu saptanmıştır ($p<0.05$). Tüm gruplardan elde edilen kreatinin konsantrasyonu değerlerinin kontrole göre daha düşük düzeyde olduğu görülmüştür.

Uygulamanın onuncu haftasında plazma AST ve LDH enzim aktivite değerleri bakımından uygulama gruplarının değerleri kontrol grubu değerleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$). Plazma kreatinin konsantrasyonu bakımından uygulama grupları ile kontrol grubu hayvanları arasında istatistiksel olarak farklılığın önemli olduğu gözlenmiştir ($p<0.05$). Sadece keten tohumu diyetiyle beslenen ve herhangi bir işlem uygulanmamış olan 4. gruptaki hayvanların kreatinin konsantrasyonları kontrolden daha yüksek bulunmuştur. Yine keten tohumu diyetiyle beslenen fakat deneyin altıncı haftasında MNU enjekte edilmiş olan 5. gruptaki hayvanların kreatinin konsantrasyon değerleri de kontrolden yüksek bulunmuştur.

Hayvanlardan deneysel çalışmaların onikinci haftasında alınan kan örneklerinden elde edilen plazma AST enzim aktivitesi değerleri için kontrol grubu ile uygulama grupları arasında istatistiksel olarak farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$). Buna karşın plazma LDH enzim aktivitesi için kontrol grubu ile karşılaştırıldığında belirgin bir azalış gösterdiği ve gruplar arasında istatistiksel farklılığın önemli olduğu saptanmıştır ($p<0.05$). Bu dönemde alınan kan örneklerinde ölçülen kreatinin konsantrasyonu bakımından ise gruplar arasında önemli bir farklılık olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$).

4.6. Dokulardan (Karaciğer, Mide ve Bağırsak) Elde Edilen Bulgular

Çizelge 4.6. Hayvanların oniki haftalık uygulama süreci sonunda elde edilmesini takiben alınan karaciğer, mide ve ince bağırsak dokularında saptanan AST, ALT, LDH, GST, GR, GP_x, CaE, CAT aktivitesi ile hepatik mikrozomal EROD aktivite değerleri

4.6.1. Seçilmiş dokularda saptanan enzim aktiviteleri

Çizelge 4.6 da hayvanların oniki haftalık uygulama süreci sonunda elde edilmesini takiben alınan karaciğer, mide ve ince bağırsak dokularında saptanan AST, ALT, LDH, GST, GR, GP_x, CaE, CAT aktivitesi ile hepatik mikrozomal EROD aktivite değerleri verilmiştir.

4.6.1.1. Karaciğer dokusu örneklerinde saptanan enzim aktiviteleri

AST enzim aktivite ortalama değerleri dikkate alındığında, en yüksek aktivite değerinin sadece keten tohumu diyetiyle beslenen ve herhangi bir işlem uygulanmamış olan 4. grupta 1.588 (± 0.335) Umol/dakika/mg protein olduğu belirlenmiştir. En düşük aktivite ise tüm deney süresince keten tohumu ilaveli diyetle beslenen ve 6. haftada MNU enjeksiyonu yapılan 5. grupta 1.237 (± 0.141) Umol/dakika/mg protein olarak saptanmıştır. 5. grup dışındaki tüm gruplarda kontrole göre enzim aktivitesinde bir artış gözlenirse de bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0.05).

ALT enzim aktivite değerlerine bakıldığında, başlangıçta normal pelletle beslenen ve altıncı haftada MNU enjeksiyonu yapılarak, beslenmesine keten tohumu ilaveli diyetle devam eden 3. grubun 0.551 (±0.029) Umol/dakika/mg protein değeri ile kontrolden (0.520 ± 0.140 Umol/dakika/mg protein) daha yüksek sonuç verdiği gözlenmiştir. 4. ve 5. gruplar

		N	KARACİĞER	N	MİDE	N	BAĞIRSAK
AST umol/dak/m	K	8	1.29 ± 0.11	7	301 ± 50	8	148 ± 9
	1	8	1.51 ± 0.12	8	260 ± 34	8	139 ± 10
	2	9	1.41 ± 0.09	9	244 ± 33	9	149 ± 10

		3	8	1.46 ± 0.08	9	263 ± 17	10	120 ± 9
		4	5	1.58 ± 0.33	8	235 ± 26	7	130 ± 12
		5	5	1.23 ± 0.14	9	255 ± 33	8	136 ± 10
ALT	K	7	0.52 ± 0.14	7	105 ± 20	8	161 ± 11	
	1	8	0.49 ± 0.03	8	98.7 ± 11.5	8	158 ± 12	
	2	9	0.48 ± 0.02	9	105 ± 14	9	154 ± 13	
	3	8	0.55 ± 0.02*	9	112 ± 10	10	178 ± 15	
	4	5	0.42 ± 0.03*	8	98.7 ± 11.4	7	156 ± 22	
	5	5	0.40 ± 0.01*	9	112 ± 16	8	158 ± 7	
LDH	K	8	1.11 ± 0.06	7	0.99 ± 0.08	8	1.76 ± 0.09	
	1	8	0.91 ± 0.05*	8	1.01 ± 0.07	8	1.49 ± 0.09	
	2	9	1.05 ± 0.03*	9	1.01 ± 0.09	9	1.52 ± 0.10*	
	3	8	0.75 ± 0.03*	9	1.01 ± 0.07	10	1.32 ± 0.42*	
	4	5	0.72 ± 0.03*	8	1.05 ± 0.10	7	1.26 ± 0.16*	
	5	5	0.81 ± 0.05*	9	1.04 ± 0.10	8	1.39 ± 0.09*	
GST	K	8	0.67 ± 0.07	7	183 ± 19	8	0.11 ± 0.02	
	1	8	0.68 ± 0.03	8	153 ± 18*	8	0.10 ± 0.02	
	2	9	0.68 ± 0.03	9	125 ± 16*	9	0.09 ± 0.01	
	3	8	0.59 ± 0.02	9	145 ± 14*	10	0.10 ± 0.01	
	4	5	0.56 ± 0.06	8	125 ± 18*	7	0.11 ± 0.02	
	5	5	0.57 ± 0.02	9	127 ± 15*	8	0.10 ± 0.00	
GR nmol/dak/m	K	8	65.9 ± 11.8	7	40.1 ± 5.8	8	62.9 ± 3.0	
	1	8	58.3 ± 7.3	8	45.1 ± 6.5	8	64.7 ± 3.9	
	2	9	63.5 ± 4.9	9	47.3 ± 4.5		63.6 ± 2.9	
	3	8	50.2 ± 6.4	9	48.9 ± 4.2	10	64.0 ± 4.8	
	4	5	36.8 ± 4.7	8	46.4 ± 6.3	7	60.4 ± 5.6	
	5	5	45.6 ± 4.7	9	45.9 ± 5.0	8	58.4 ± 3.3	
GPx	K	7	0.79 ± 0.07	7	0.06 ± 0.01	8	0.12 ± 0.01	
	1	8	0.86 ± 0.08	8	0.08 ± 0.01	8	0.10 ± 0.01	
	2	9	1.01 ± 0.07	9	0.09 ± 0.01	9	0.10 ± 0.08	
	3	8	0.87 ± 0.05	9	0.07 ± 0.01	10	0.11 ± 0.07	
	4	5	0.78 ± 0.03	8	0.09 ± 0.01	7	0.11 ± 0.07	
	5	5	0.85 ± 0.05	8	0.10 ± 0.01	8	0.10 ± 0.01	
CAE	K	8	5.04 ± 0.46	7	1.18 ± 0.18	8	5.39 ± 0.39	
	1	8	6.00 ± 0.42*	8	1.22 ± 0.17	8	4.50 ± 0.34*	
	2	9	5.53 ± 0.34*	9	1.08 ± 0.12	9	4.24 ± 0.35*	
	3	8	5.09 ± 0.30	9	1.14 ± 0.14	10	3.47 ± 0.47*	
	4	5	6.37 ± 0.48*	8	1.65 ± 0.36*	7	3.84 ± 0.49*	
	5	5	5.03 ± 0.26	9	1.00 ± 0.09*	8	4.04 ± 0.33*	
CAT	K	7	5600 ± 494	7	1193 ± 610	8	265 ± 93.0	
	1	8	5952 ± 588	8	417.8 ± 63*	8	120 ± 14.4*	
	2	8	6340 ± 490	9	339.7 ± 40*	9	92.4 ± 9.7*	
	3	8	6103 ± 628	9	380.9 ± 33*	10	70.7 ± 7.1*	
	4	5	5091 ± 207	8	480.2 ± 102*	7	92.5 ± 10.6*	
	5	5	4753 ± 470	9	375.1 ± 52*	8	60.7 ± 5.0*	
EROD	K	7	97.1 ± 22.9					
	1	8	98.9 ± 13.5					
	2	9	83.3 ± 6.8					
	3	8	118 ± 17.0 ±					

4	5	129 ± 13.0
5	5	88.85 ± 13.8

GR dışındaki enzimlerin aktiviteleri umol/dakika/mg protein ± standart hata cinsinden ifade edildi. GR ise nmol/dakika/mg protein± standart hata cinsinden ifade edildi. * Kontrolde farkın önemli olduğunu göstermektedir (p<0.05)

sırasıyla 0.427 ± 0.030 Umol/dakika/mg protein ve 0.408 ± 0.015 Umol/dakika/mg protein değerleriyle kontrole göre belirgin bir düşüş göstermiştir. Bu gruplardan elde edilen değerlerin kontrol örnekleri ile karşılaştırılması sonucunda istatistiksel olarak önemli düzeyde farklılık olduğu saptanmıştır (p<0.05).

Karaciğer LDH değerleri incelendiğinde, tüm gruplarda enzim aktivitesi bakımından kontrole göre bir azalış gözlenmiştir. En fazla azalışın 0.728 ± 0.032 Umol/dakika/mg protein değeri ile sadece keten tohumu diyetiyle beslenen 4. grup hayvan dokularında olduğu saptandı. Gruplarda gözlenen kontrolden düşük LDH aktivitesi değerleri bakımından istatistiksel olarak farklılığın önemli düzeyde olduğu da belirlenmiştir (p<0.05).

Karaciğer GST aktivitesi başlangıçta MNU enjeksiyonu yapılan ve keten tohumu ilaveli diyetle beslenen 2. grup ve başlangıçta normal pelletle beslenen ve oniki haftada MNU enjeksiyonu yapılarak beslenmesine keten tohumu ilaveli diyetle devam eden 3. gruplarda kontrole göre bir artış göstermesine karşın, diğer gruplarda bir azalış olduğu gözlenmiştir. 2. grup 0.681 ± 0.030 Umol/dakika/mg protein değeri ile kontrole göre en fazla artışı gösterirken, 4. grup 0.68 ± 0.067 Umol/dakika/mg protein değeri ile en fazla azalışı göstermiştir. Aktivitede gözlenen bu artış ve azalışlar istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p>0.05$).

GR enzim aktivite değerlerine bakıldığında tüm grupların kontrolden düşük aktivite gösterdiği belirlenmiştir. GST aktivitesinde olduğu gibi en fazla azalış 36.87 ± 4.07 nmol/dakika/mg protein değeri ile 4. grupta olduğu gözlenmiştir. Diğer gruplarda da elde edilen değerlerin, kontrol için elde edilenlerde düşük olduğu şeklindedir. Fakat bu azalışlar istatistiksel olarak önemli olarak bulunmamıştır ($p>0.05$).

Karaciğer GPx aktivite değerleri tüm gruplarda kontrol grubuna göre bir artış göstermiştir. En fazla artışın 1.018 ± 0.075 nmol/dakika/mg değeri ile 2. grupta olduğu belirlenmiştir. Uygulama gruplarına ilişkin sonuçlar ile kontrol grubu için elde edilen bulguların karşılaştırılması sonucu istatistiksel olarak önemli bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir ($p>0.05$).

Karaciğer CaE aktivitesi değerlerinin 5. grup dışında kalan tüm uygulama gruplarında kontrole göre arttığı gözlenmiştir. Fakat 5. gruptan elde edilen aktivite değerinin kontrolden düşük olduğu saptanmıştır. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda 1., 2. ve 4. gruplardaki aktivite artışının kontrole göre istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur ($p<0.05$).

Karaciğer katalaz aktivite değerleri 2. ve 3. gruplarda kontrole göre artış göstermesine rağmen, diğer gruplardaki aktivite değerleri azalmıştır. En fazla düşüş 5. grupta 4752 ± 470.2 Umol/dakika/mg protein değeri ile gözlenmiştir. Katalaz aktivitesi bulguları ile ilgili yapılan istatistiksel analiz çalışmalarına göre kontrol ve uygulama grupları arasındaki farklılığın önemli olmadığı görülmüştür ($p>0.05$).

Karaciğer mikrozomal EROD aktivite değerlerinin kontrol ve uygulama grupları arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık olmadığı saptanmıştır ($p>0.05$).

4.6.1.2. Mide dokusu örneklerinde saptanan enzim aktiviteleri

Mide dokusu örnekleri için yapılan enzimatik çalışma sonuçlarına göre AST, ALT, LDH, GR, GP_x enzim aktivite değerleri bakımından yapılan analiz sonuçlarına göre kontrol grubu ile uygulama grupları arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılığın olmadığı saptanmıştır (p>0.05). Bununla beraber ALT aktivitesi deney sürecinin 6. haftasında MNU enjekte edilen ve bu andan itibaren keten tohumu ile beslenmeye devam eden 3. ve 5. gruplarda artış göstermesine rağmen diğer gruplarda kontrole göre azalış göstermiştir. Bu azalış deney süresince sadece keten tohumu diyetiyle beslenen 4. grup ile ilk hafta MNU enjekte edilen ve keten tohumu ile beslenen 2. gruplarda gözlenmiştir.

Mide LDH değerleri incelendiğinde, tüm uygulama gruplarında enzim aktivitesi bakımından kontrole göre bir artış gözlenmiştir. En fazla artışın 1.05 ± 0.105 Umol/dakika/mg protein değeri ile sadece keten tohumu diyetiyle beslenen 4. grupta olduğu saptanmıştır.

Mide GR aktivite değerlerinin kontrole göre artış gösterdiği gözlenmiştir Fakat bu artış istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır (p>0.05).

GP_x enzim aktivite değerleri de kontrole göre bir artış göstermiştir. Özellikle keten tohumu ile beslenen 2. ve 4. gruplardaki artışın diğer gruplara göre daha fazla olduğu saptanmıştır.

GR enzim aktivite değerleri kontrolden yüksek bulunmuştur. En fazla artış 48.91 ± 4.277 nmol/dakika/mg değeri ile başlangıçta normal pelletle beslenen ve 6. haftada MNU enjeksiyonu yapılarak beslenmesine keten tohumu ilaveli diyetle devam eden 3. grupta saptanmıştır. Başlangıçta MNU enjeksiyonu yapılan ve normal pelletle beslenen 1.grup ve tüm deney süresince keten tohumu ilaveli diyetle beslenen ve 6. haftada MNU enjeksiyonu yapılan 5. gruplardan elde edilen aktivite değerleri birbirine yakın bulunmuştur. Tüm bu farklılıklara rağmen kontrolden yüksek bulunan enzim aktivite değerleri istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır (p>0.05).

Mide dokusu GST aktivitesinin tüm gruplarda kontrol grubundan düşük değerler gösterdiği saptanmıştır. Kontrol grubu ile uygulama grupları arasında gözlenen enzim aktivitesindeki bu azalışın istatistiksel açıdan önemli olduğu bulunmuştur (p<0.05).

Mide dokusu CaE enzim aktivite değerlerine baktığımızda sadece keten tohumu ile beslenen 4. grubun kontrolden oldukça yüksek bir aktivite gösterdiği gözlenmiştir. 1.185 ± 0.1842 Umol/dakika/mg olarak belirlenen kontrol grubunun CaE enzim aktivite değeri, bu uygulama sonucunda 1.650 ± 0.3600 Umol/dakika/mg olarak belirlenmiştir. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda da artış istatistiksel olarak önemli bulunmuştur

($p<0.05$). Buna karşın 6. haftada MNU enjekte edilen ve keten tohumu tüketimine devam eden 5. grupta CaE aktivitesinde önemli düzeyde bir azalış kaydedilmiştir ($p<0.05$).

Katalaz enzim ativite değerleri tüm gruplarda kontrolden daha düşük aktivite değeri göstermiştir. En düşük aktivite 480 ± 102 Umol/dakika/mg protein değeri ile sadece keten tohumu tüketen 4. grupta gözlenmiştir. Yapılan istatistiksel analizlere göre katalaz aktivitesinde kontrole göre diğer gruplar için belirlenen değerlerin istatistiksel olarak önemli farklılık sergilediği görülmüştür ($p<0.05$).

4.6.1.3. İnce bağırsak dokusu örneklerinde saptanan enzim aktiviteleri

İnce bağırsak dokusu örnekleri için elde edilen AST, ALT, GST, GR, GP_X aktivite değerleri bakımından da mide dokusu için elde edilen bulgulara benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu enzimler için elde edilen sonuçların kontrol grubu değerleri ile karşılaştırılması sonucunda gruplar arasında önemli bir farklılık bulunmadığı saptanmıştır ($p>0.05$). Buna karşın CaE ve CAT sonuçları bakımından kontrol ve uygulama grupları arasında bir farklılık olduğu ve bu farklılığın da istatistiksel olarak önemli düzeyde olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$).

LDH aktivite değerlerinin, tüm gruplarda kontrolden daha düşük olduğu görülmüştür. Özellikle; ilk hafta MNU enjekte edilen ve deney süresince sadece keten tohumu ile beslenen 2. grup, ilk altı hafta boyunca normal diyetle beslenen, altıncı haftada MNU enjekte edilen ve beslenmesine keten tohumu diyetle devam eden 3. grup, sadece keten tohumu ilaveli diyetle beslenen 4. grup ile tüm deney süresince keten tohumu ilaveli diyetle beslenen ve altıncı haftada MNU enjekte edilen 5. gruplardan elde edilen aktivite değerlerindeki azalış istatistiksel açıdan incelendiğinde önemli düzeyde bulunmuştur ($p<0.05$).

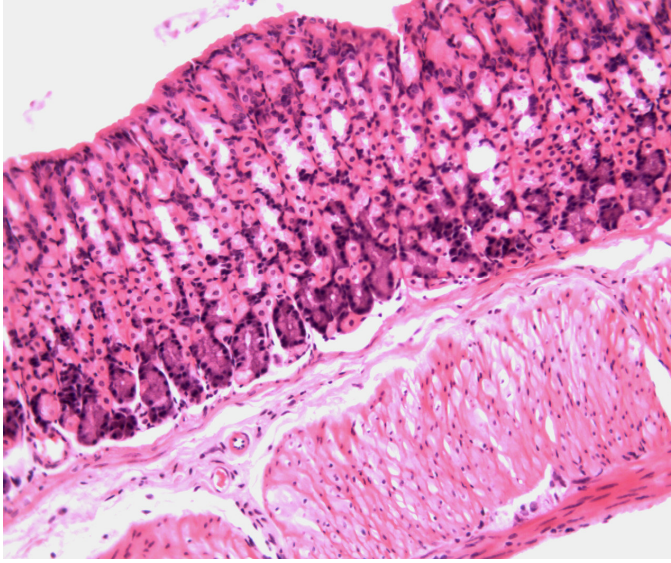
CaE enzim aktivite değerlerinin de tüm gruplarda kontrol grubu değerlerinden daha düşük olduğu saptanmıştır. En düşük değerler başlangıçta normal diyetle beslenen fakat altıncı haftada MNU enjeksiyonundan sonra keten tohumu ilaveli diyeti alan 3. grup ile tüm deney süresince keten tohumu ile beslenen fakat 6. haftada MNU enjekte edilen 5. gruplarda saptanan aktivite değerleri aynı bulunmuştur. Yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonucunda elde edilen değerlerin önemli olduğu görülmüştür ($p<0.05$).

4.7. Histoloji Bulguları

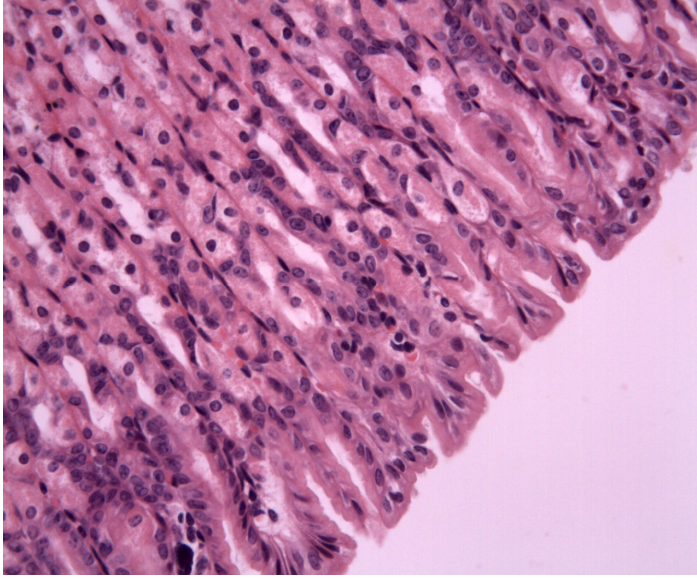
4.7.1. Mide dokusu

Oniki haftalık uygulama sonunda, hayvanlardan elde edilen mide dokusunda gözlenen histolojik bulgular Şekil 1-10'da gösterilmiştir.

Kontrol grubu; Mide kesitleri normal histolojik yapıda izlenmiştir. Tek katlı prizmatik yüzey epiteli altında, lamina propria içinde tubuler mide bezlerinin uzanmakta olduğu görülmüştür. Lamina propria altında muskularis mukoza ve submukoza izlenmiştir. Tunika muskularis düz kas liflerinden oluşmaktadır (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2.).

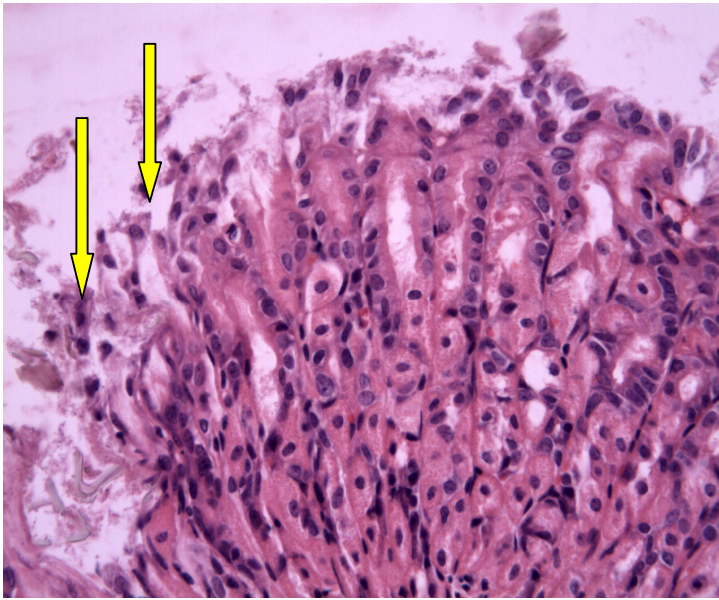


Şekil 4.1. Normal histolojik yapıda mide tabakaları (H-E. X20).

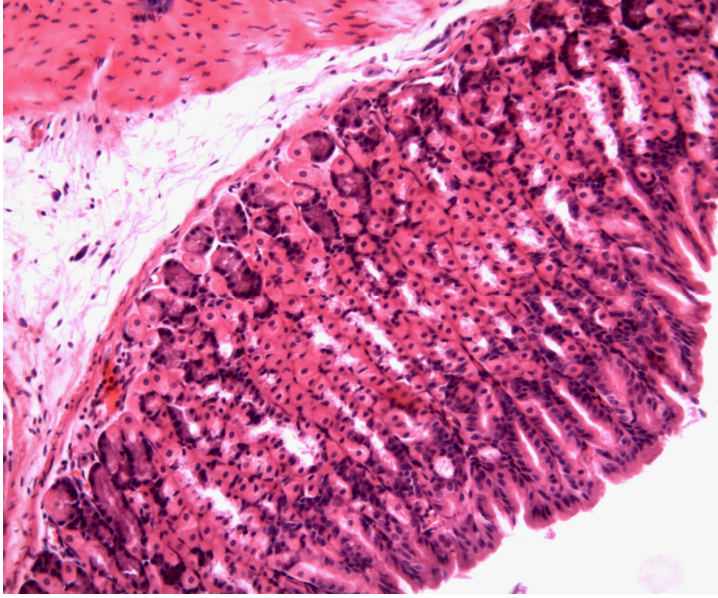


Şekil 4.2. Normal histolojik görünümde mide yüzey epiteli ve bez yapıları (H-E. 40).

Grup 1; Mide dokularının bazı alanlarda yüzey epitelinde izlenen dejenerasyon (Şekil 4.3) dışında mide kesitleri normal histolojik yapıda (Şekil 4.4) gözlenmiştir.

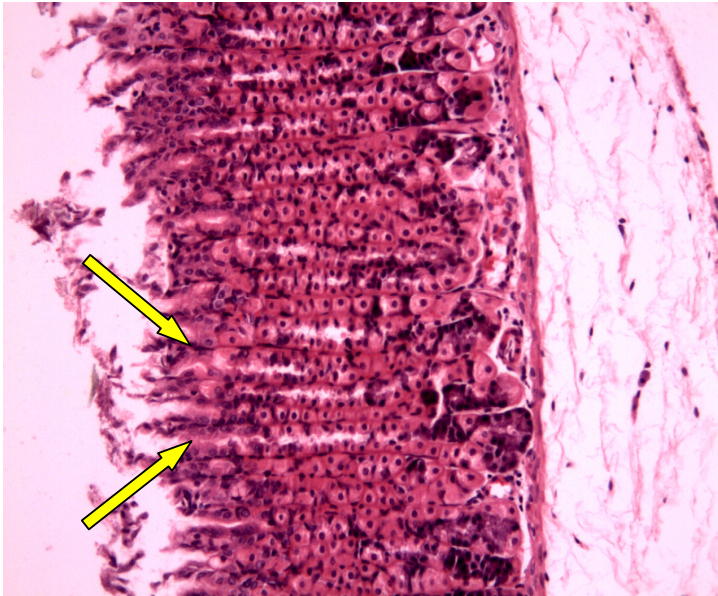


Şekil 4.3. Mide yüzey epitelinde dejenerasyon (H-E. X20).

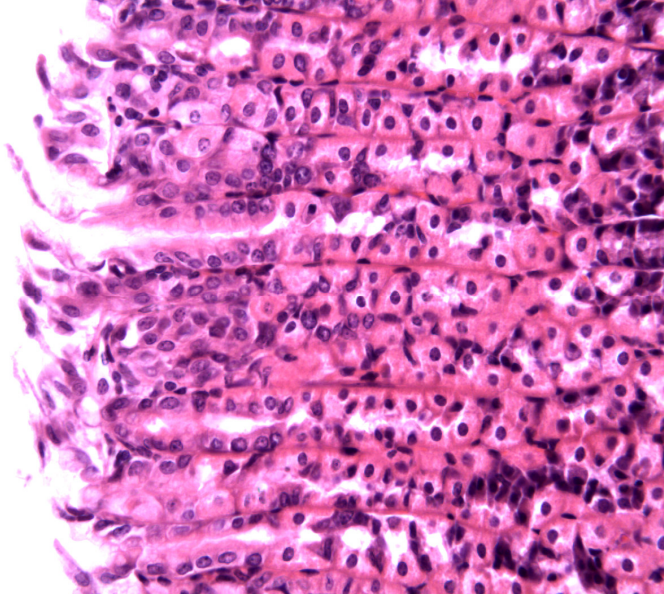


Şekil 4.4. Normal histolojik yapıda mide tabakaları (H-E. X20).

Grup 2; Yer yer mide yüzey epitelinde ve bezlerin apikal bölümlerinde dejenerasyon (Şekil 4.5. ve Şekil 4.6.) izlenmiştir, diğer tabakalar normal histolojik yapıda değerlendirilmiştir.

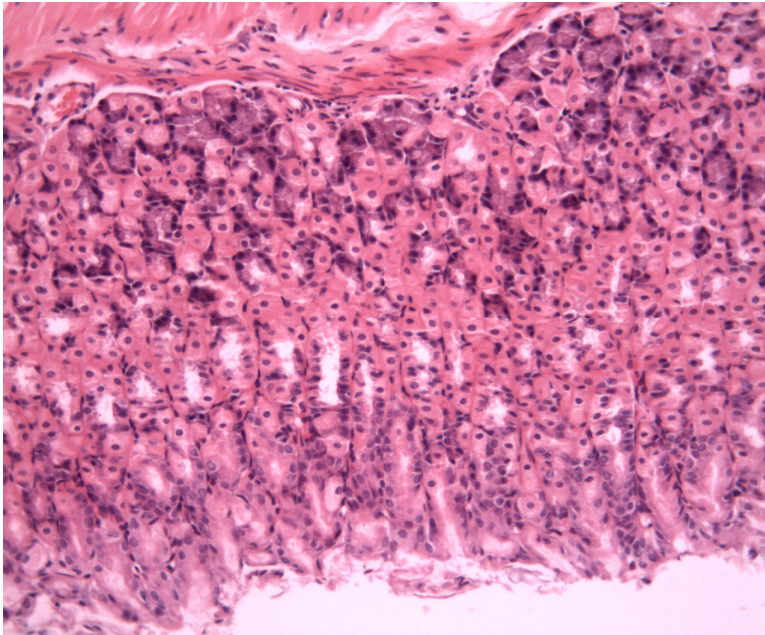


Şekil 4.5. Mide yüzey epitelinde ve bezlerin apikalinde dejenerasyon (H-E. X20).

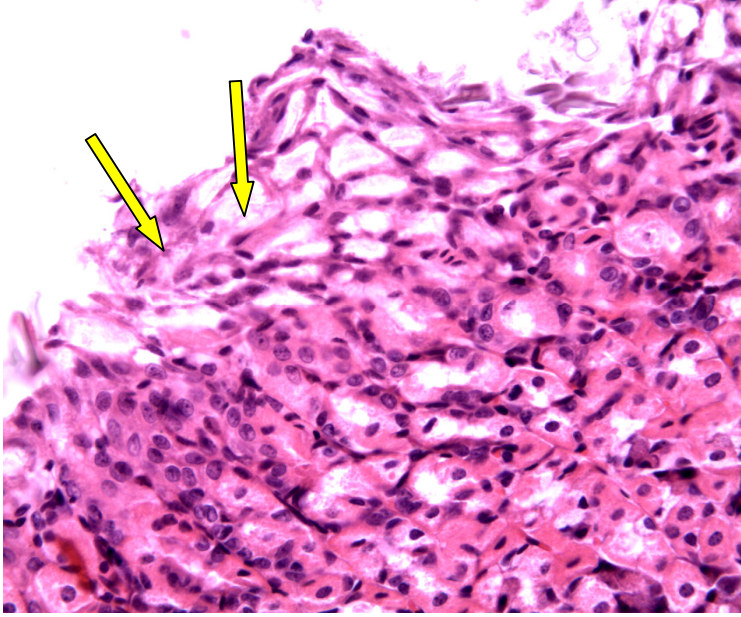


Şekil 4.6. Mide yüzey epitelinde dejenerasyon (H-E. X40).

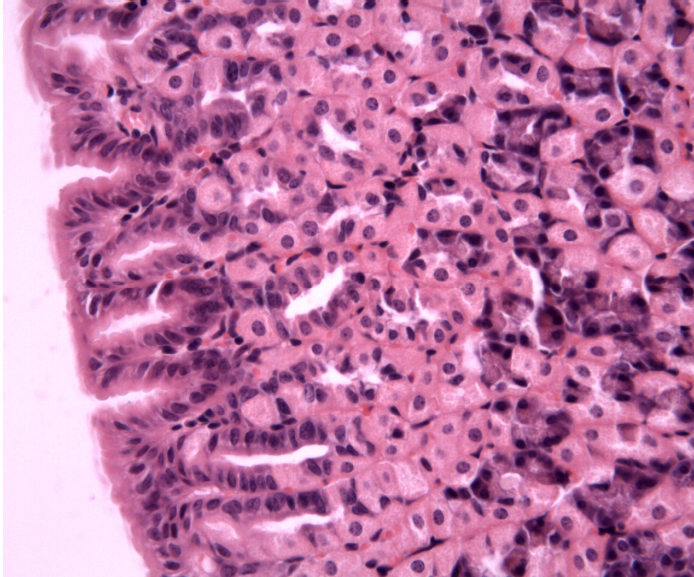
Grup 3; Mide yüzey epitelinde bezlerin apikal kısımlarında dejenerasyon (Şekil 4.7. ve Şekil 4.8) izlenmiştir.



Şekil 4.7. Mide yüzey epitelinde dejenerasyon (H-E. X20).

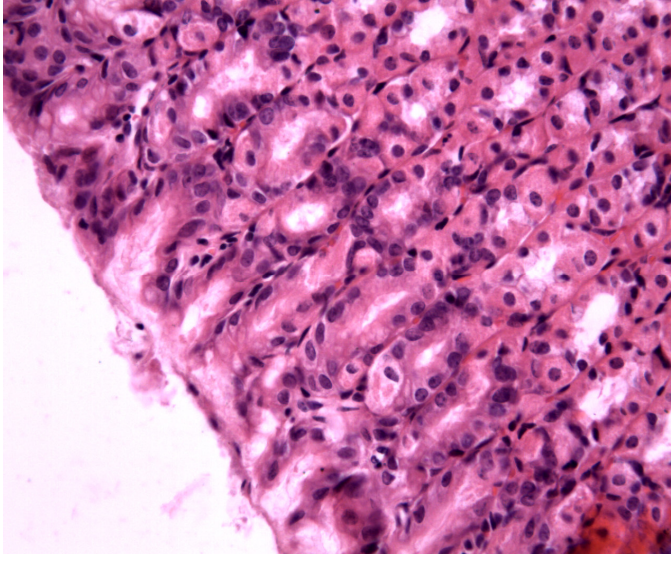


Şekil 4.8. Mide yüzey epitelinde bezlerin apikal kısımlarında dejenerasyon (H-E. X40).
Grup 4; Mide kesitlerinde tüm tabakalar normal histolojik yapıda izlenmiştir (Şekil 4.9.).



Şekil 4.9. Normal histolojik yapıda mide yüzey epiteli ve bezler (H-E. X40).

Grup 5; Normalde tek katlı prizmatik şekilli olan mide yüzey epitel hücrelerinde yassılaşıma saptanmıştır (Şekil 4.10).

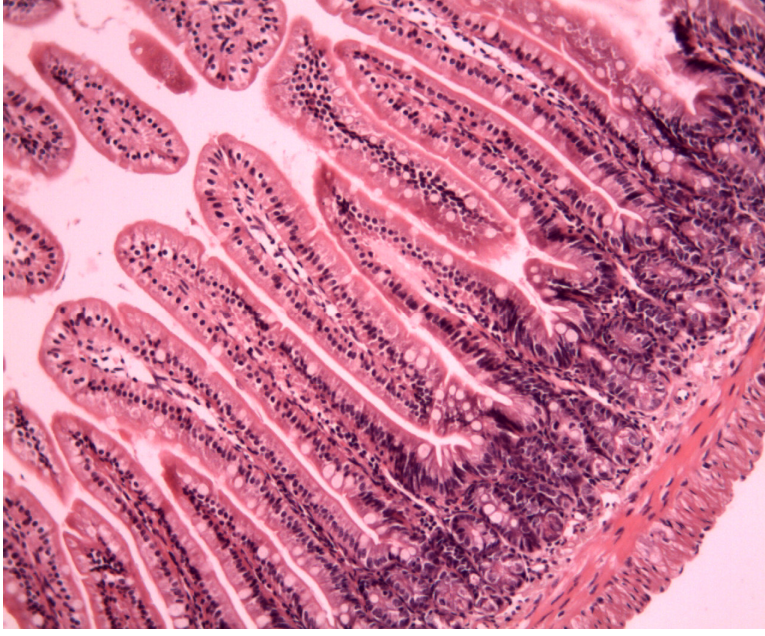


şekil 4.10. Mide yzey epitel hcrelerinde yassılaşma (H-E. X40).

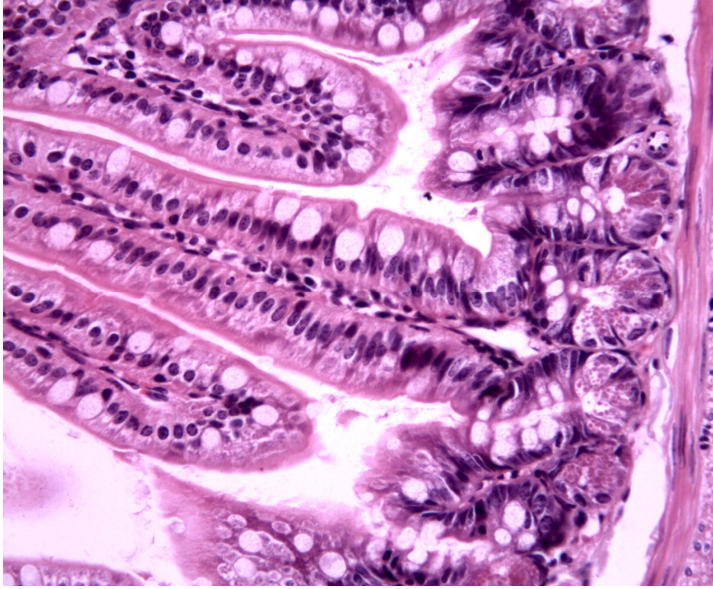
4.7.2. İnce bağırsak dokusu

Oniki haftalık uygulama sonunda, hayvanlardan elde edilen ince bağırsak dokusunda gözlenen histolojik bulgular şekil 11-18'de gösterilmiştir.

Kontrol grubu; İnce bağırsak kesitlerinin normal histolojik görünümde olduğu belirlenmiştir. Mukoza parmak şeklinde viluslar içermektedir. Villus yüzeyi, goblet hücreleri içeren tek katlı çizgili kenarlı prizmatik epitel ile dōřeli olduğu görölmüştür. Lamina propria içinde Liberkuhn kriptaları yer almaktadır. Kriptaların bazal kısımlarında Paneth hücrelerinin granülleri kırmızı renkte boyalı olduğu görölmüştür. Submukoza gevşek bağ dokusu özelliğinde olduğu saptanmıştır. Tunika muskularis içte sirküler dışta longitudinal seyirli olarak normal histolojik yapıda izlenmiştir (şekil 4.11 ve şekil 4.12).

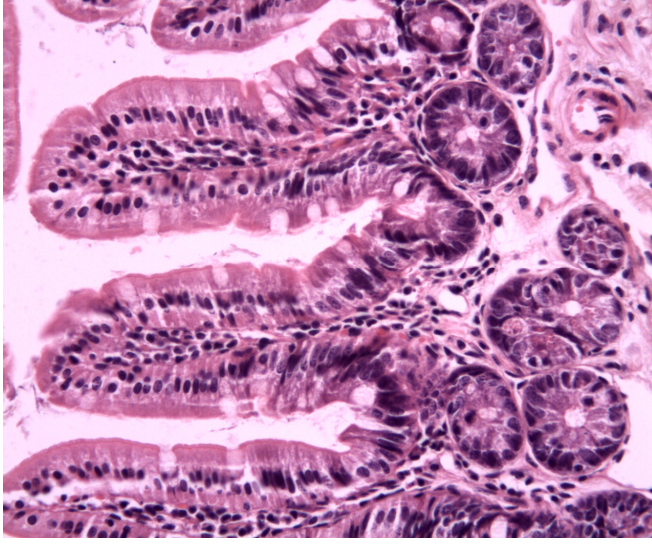


Şekil 4.11. Normal histolojik yapıda ince bağırsak kesiti (H-E. X20).



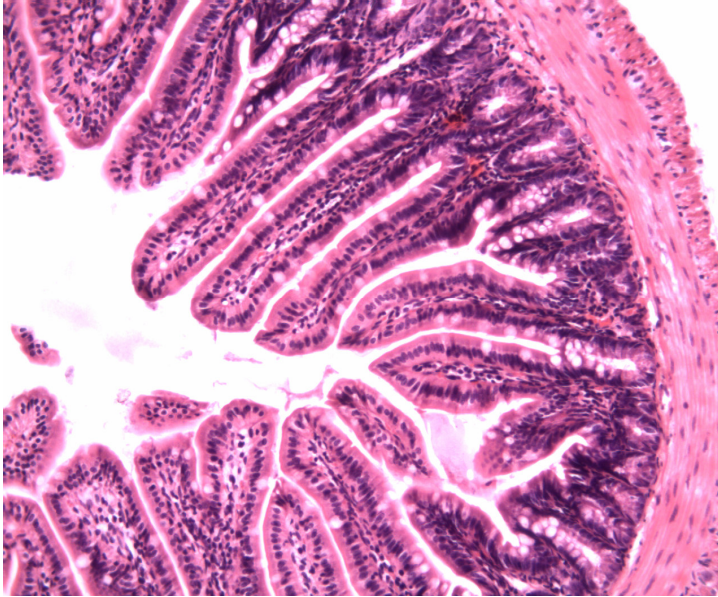
Şekil 4.12. Normal histolojik yapıda villuslar ve Lieberkühn kriptaları (H-E. X20).

Grup 1; İnce bağırsak mukozal yapıları, submukoza ve muskuler tabakaları normal histolojik görünümde izlenmiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Normal histolojik yapıda villus ve Liberkühn kriptaları (H-E. X40).

Grup 2; İnce bağırsağa ait tüm histolojik yapılar yapılar normal yapılarında izlenmiştir (Şekil 4.14).



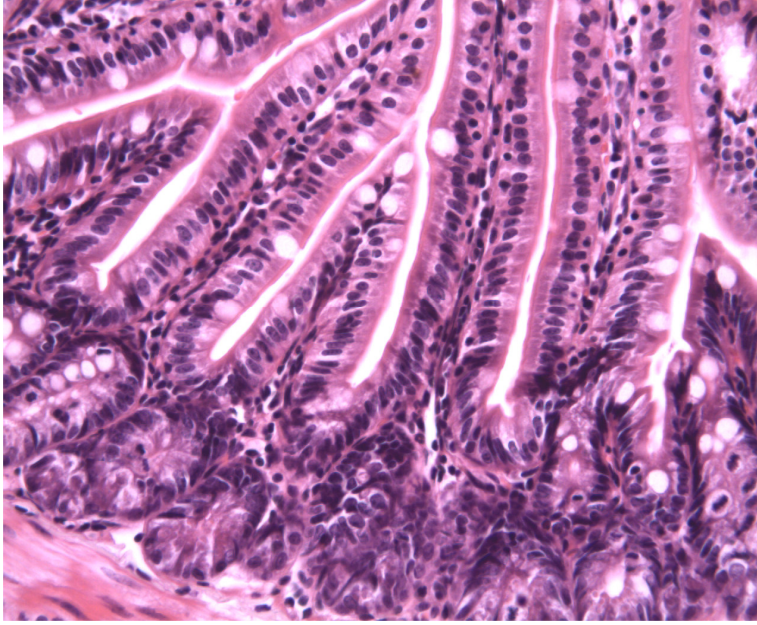
Şekil 4.14. Normal histolojik yapıda ince bağırsak kesiti. (H-E. X20).

Grup 3; İncelenen kesitlerde normal histoloji yapıda izlenen alanların (Şekil 4.15) yanında, yer yer villusların apikal kısımlarında dejenerasyon saptanmıştır (Şekil 4.16).



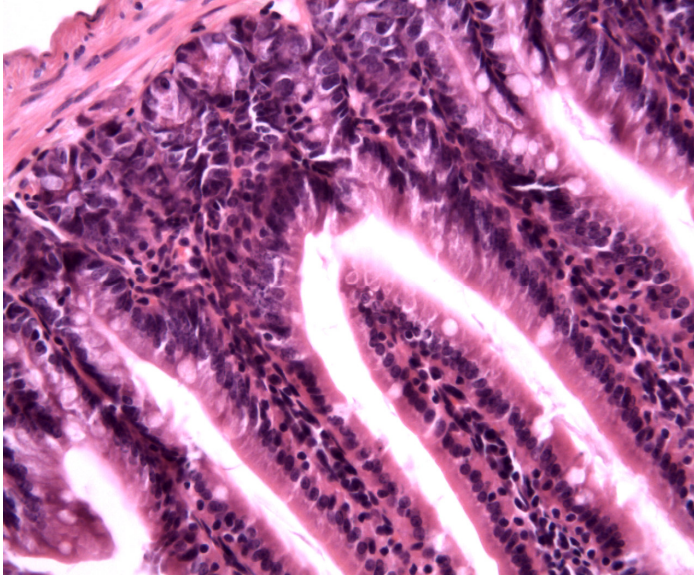


Şekil 4.15. Normal histolojik yapıda ince bağırsak kesiti (H-E. X20).

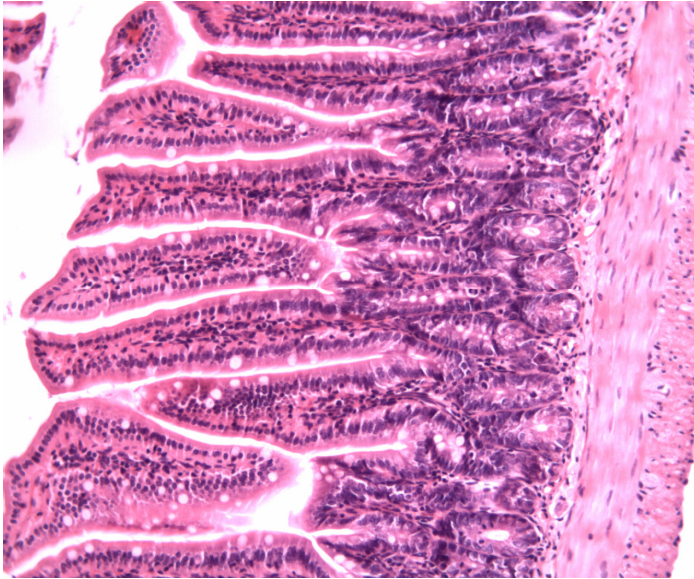


Şekil 4.16. Normal histolojik yapıda villuslar ve Lieberkühn kriptaları (H-E. X40).

Grup 4; Tüm ince bağırsak kesitleri normal histolojik yapıda izlenmiştir (Şekil 4.17)



Şekil 4.17. Normal histolojik yapıda villuslar ve Liberkühn kriptaları (H-E. X40).
Grup 5; İnce bağırsak kesitlerinde mukoza, submukoza ve muskuler tabakalar normal histolojik yapıda izlenmiştir (Şekil 4.18).

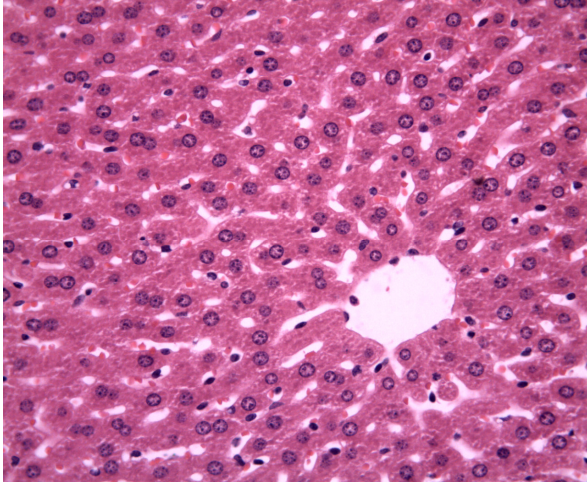


Şekil 4.18. Normal histolojik yapıda ince barsak kesiti (H-E. X20).

4.7.3. Karaciğer dokusu

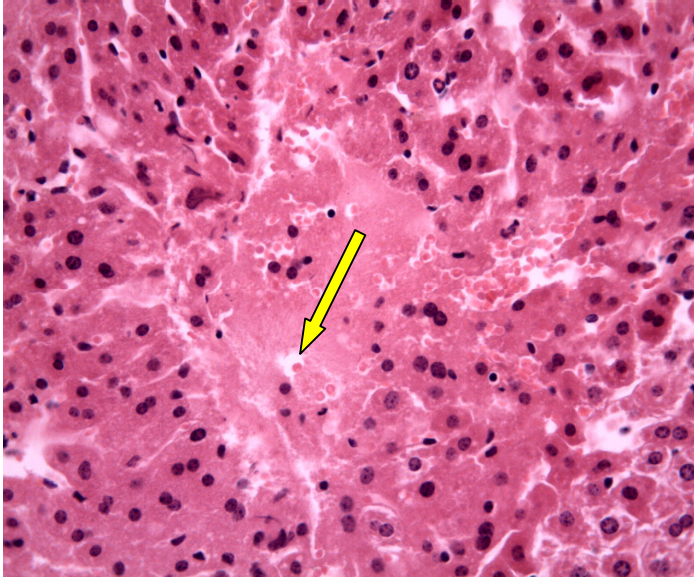
Oniki haftalık uygulama sonunda, hayvanlardan elde edilen karaciğer dokusunda gözlenen histolojik bulgular Şekil 19-32’de gösterilmiştir

Kontrol grubu; Bu grupta yer alan farelerin karaciğer dokuları normal histolojik yapıda gözlenmiştir (Şekil 4.19).

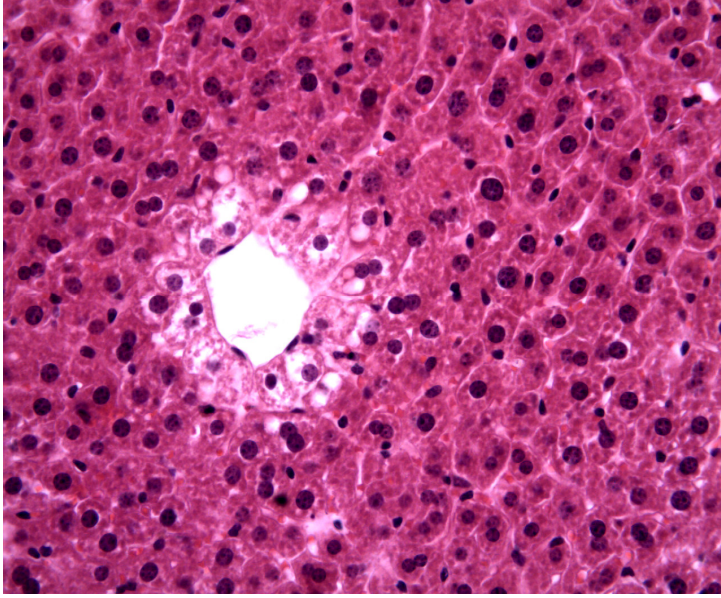


Şekil 4.19. Normal histolojik yapıda karaciğer kesiti (H-E.X 40).

Grup 1; Karaciğer parankimasında hemoraji ve nekroz alanları izlenmiştir, ayrıca bu alanlar çevresindeki hepatosit nukleuslarının heterokromatik ve piknotik görünümü dikkat çekmektedir (Şekil 4.20). Merkezi damarlar çevresindeki hepatositlerde intrasitoplazmik vakuoller ve hidropik dejenerasyon olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.21)

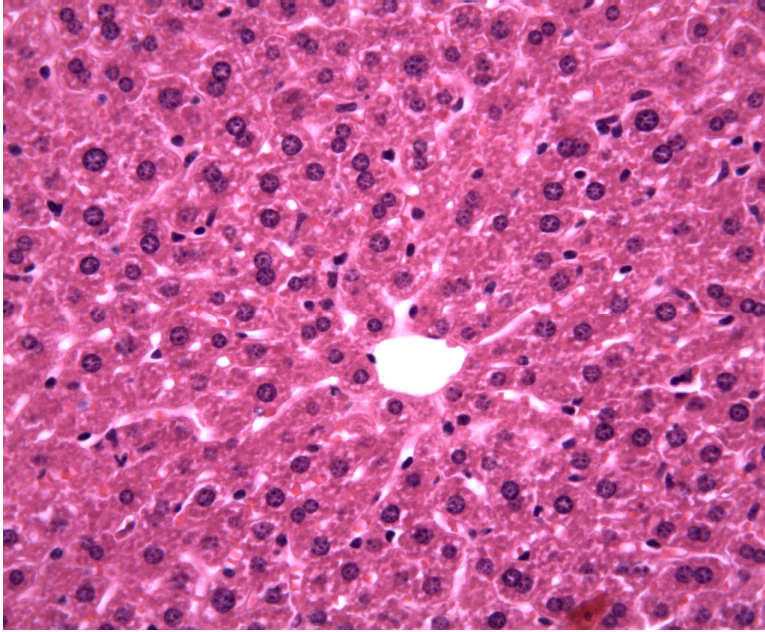


Şekil 4.20. Karaciğer parankimasında hemoraji ve nekroz (H-E. X40).

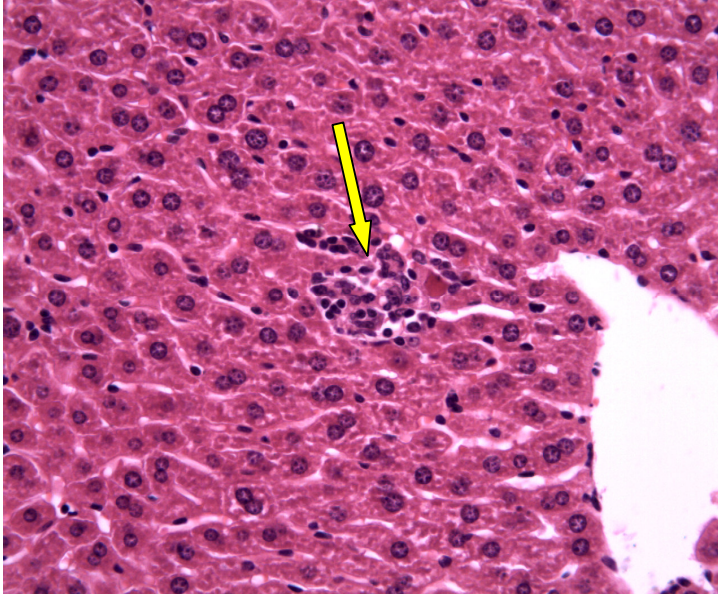


Şekil 4.21 Merkezi damarlar çevresindeki hepatositlerde intrasitoplazmik vakuoller ve hidropik dejenerasyon (H-E. X40).

Grup 2; Karaciğer kesitleri genellikle normal histolojik yapıda izlenmekle birlikte (Şekil 4.22), yer yer fokal nekroz alanları göze çarpmaktadır (Şekil 4.23).

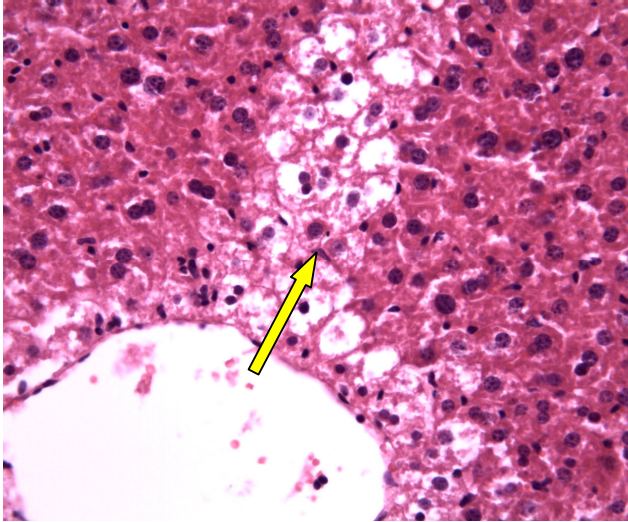


Şekil 4.22. Normal histolojik görünümde hepatositler (H-E. X40).

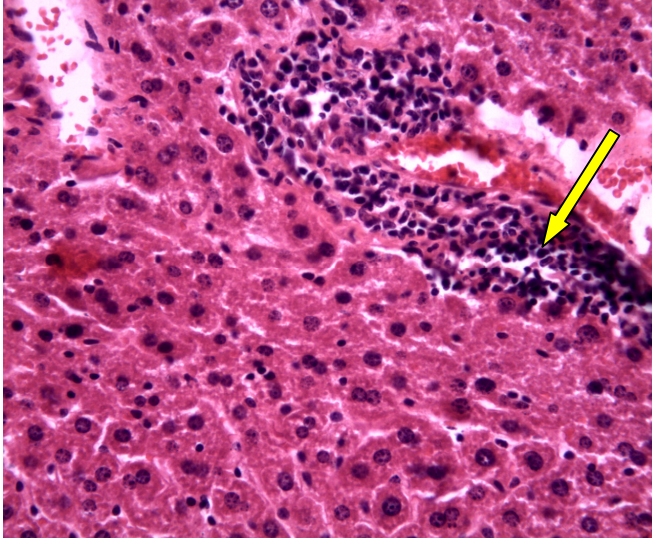


Şekil 4.23. Karaciğer parankimasında fokal nekroz alanı (H-E. X40).

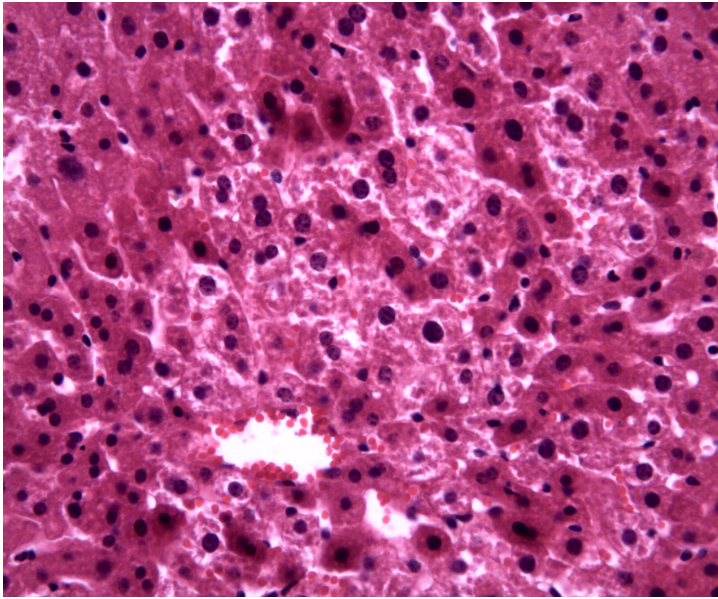
Grup 3; Karaciğer dokularında santral ven çevresinde ve parankima içinde kordonlar şeklinde hepatosit dejenerasyonu (Şekil 4.24), perivasküler alanlarda inflamatuvar infiltrasyon (Şekil 4.25) ve bazı alanlarda eozinofilik sitoplazmalı, piknotik nukleuslu hepatositler izlenmiştir (Şekil 4.26).



Şekil 4.24. Merkezi damarlar çevresinde ve parankima içinde kordonlar şeklinde hepatosit dejenerasyonu (H-E. X40).

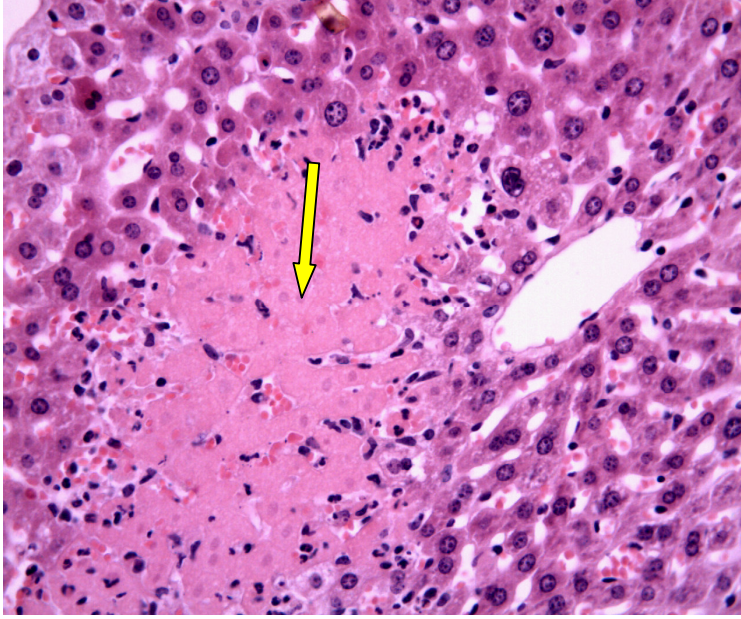


Şekil 4.25. Perivasküler alanlarda inflamatuvar infiltrasyon (H-E. X40)

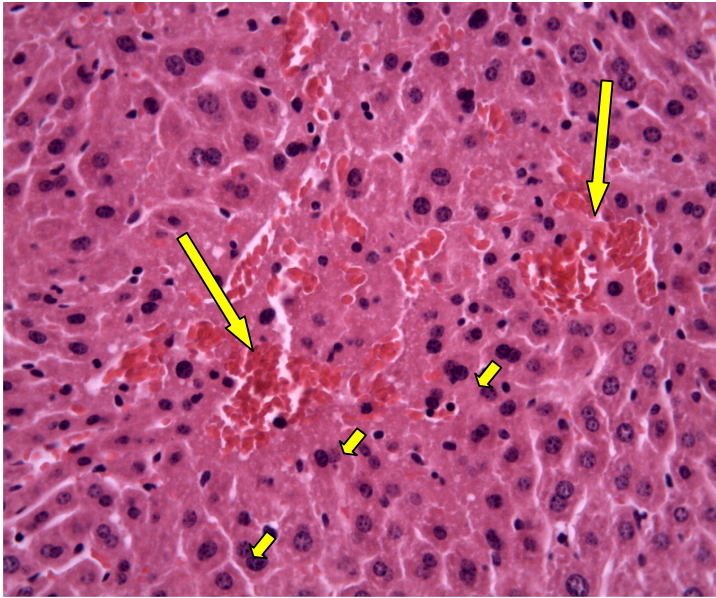


Şekil 4.26. Eozinofilik sitoplazmalı, piknotik nukleuslu hepatositler (H-E. X40).

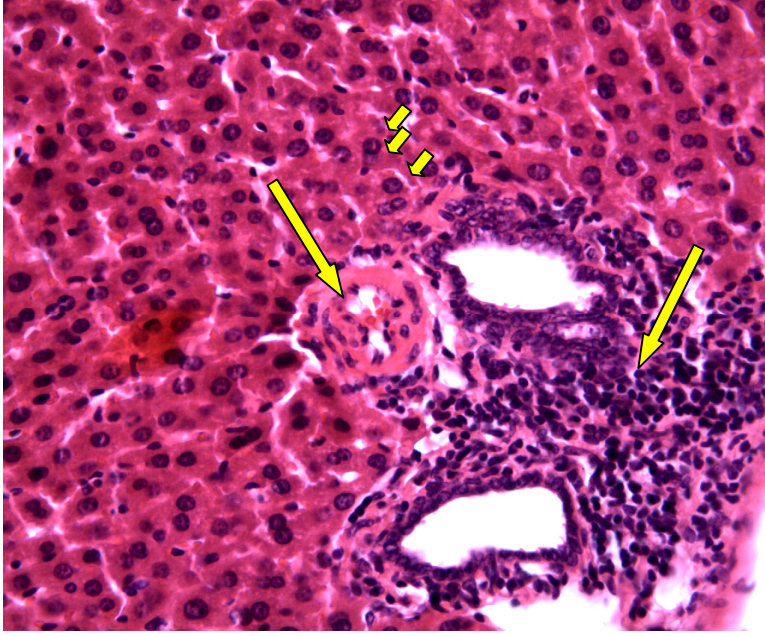
Grup 4; Karaciğer parankimasında nekroz alanları (Şekil 4.27), hemoraji (Şekil 4.28), periportal alanlarda inflamatuvar infiltrasyon (Şekil 4.29) ve merkezi damarlar çevresinde hepatositlerde hidropik dejenerasyon (Şekil 4.30) izlenmiştir.



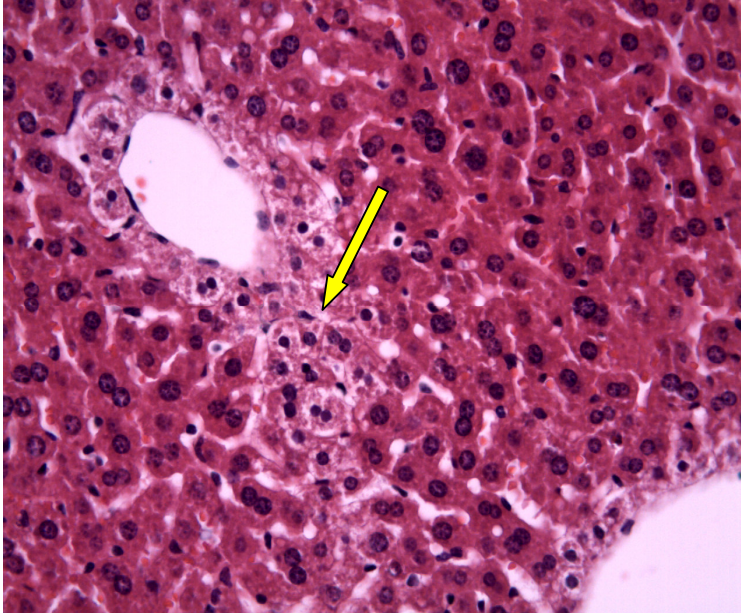
Şekil 4.27. Karaciğer parankimasında nekroz (H-E. X40).



Şekil 4.28. Hemoraji ve hepatosit nukleuslarında piknoz (H-E. X40).

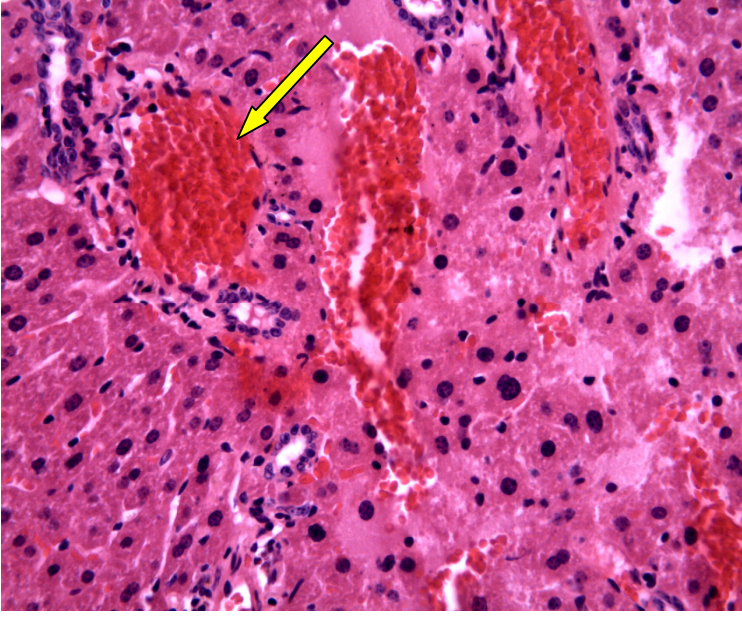


Şekil 4.29. Portal alanda inflamatuvar infiltrasyon (H-E. X40).

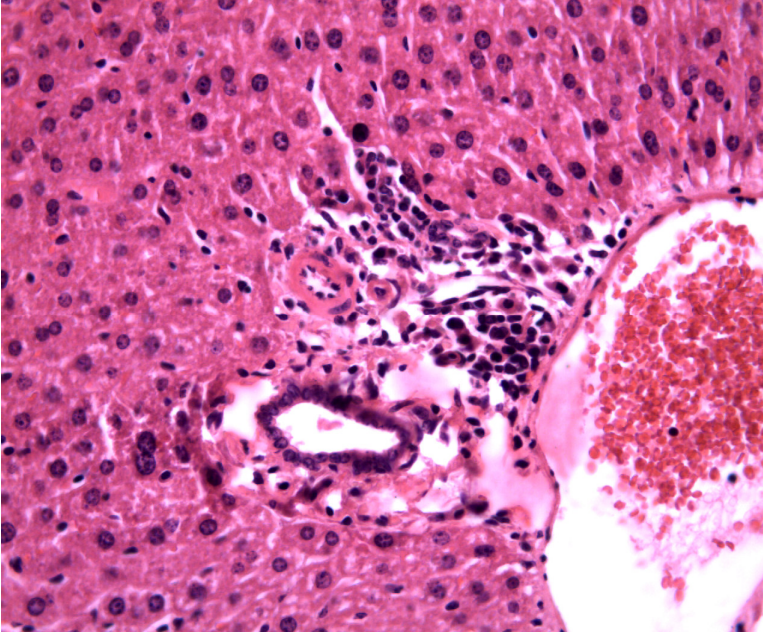


Şekil 4.30. Merkezi damarlar çevresinde hepatositlerde hidropik dejenerasyon (H-E. X40).

Grup 5; Vasküler konjesyon, parankimal nekroz ve hemoraji (Şekil 4.31) ile birlikte portal alanlarda inflamatuvar infiltrasyon ve perivasküler ödem (Şekil 4.32) olduğu görülmüştür.



Şekil 4.31. Vasküler konjesyon, parankimal nekroz ve hemoraji (H-E. X40).



Şekil 4.32. Portal alanlarda inflamatuvar infiltrasyon ve perivasküler ödem (H-E. X40).

5. TARTIŞMA

Son yıllardaki bilimsel çalışmalar beslenme alışkanlıkları ve bazı hastalıklar arasında bir ilişki bulunduğunu ortaya koymuş olup, epidemiyolojik çalışmalar diyetin kanser ve sindirim sistemi hastalıkları gibi bazı kronik hastalıkların önlenmesindeki rolüne işaret etmektedir. Beslenme alışkanlıklarının daha fazla meyve, sebze ve tahıl tüketecek şekilde değiştirilmesi, kronik hastalıkların önlenmesinde etkin ve pratik bir yaklaşımdır. Hastalık riskinin azaltılması, sağlıklı bir yaşam sürdürme isteğinin artması ve sağlıklı beslenme bilincinin gelişmesi gibi nedenlerle tüketiciler, gıdalardan beslenme gereksinimlerini karşılamanın yanında, sağlık açısından da yarar sağlamayı beklemektedirler. Son yıllarda fazla miktarda tüketilen, çeşitli besinler (bisküvi, yoğurt vb) içinde katkı maddesi olarak kullanılmaya başlanan ve sağlık açısından faydaları olduğu iddia edilen keten bitkisi tohumunun, kimyasal bir mutasyon ajanı olarak bilinen metil nitrozurea (MNU) uygulamasına maruz kalmış olan farelerde toksik etkilere karşı koruyuculuğu olup olmadığının belirlenmesi bu çalışmanın amacını oluşturmaktadır. Buna bağlı olarak, bu çalışma ile son yıllarda halk arasında popüler bir besin maddesi olarak kullanılan keten bitkisi tohumunun antioksidatif ve antikarsinojen etkileri araştırılmıştır.

Çalışmalarda, oniki haftalık deney süresince hayvanların vücut ağırlıkları, haftalık yem ve günlük su tüketimleri belirlenmiştir. Deneysel çalışmaların başlangıç aşamasında vücut ağırlıkları bakımından homojen bir dağılım gösterecek şekilde oluşturulan gruplardaki hayvanların vücut ağırlığı değişiminde, deneysel çalışmalar süresince gruplar arasında önemli bir farklılığın meydana gelmediği saptanmıştır. Bununla birlikte, tüm gruplardaki hayvanların vücut ağırlıklarında deneyin başlangıç aşamasına göre bir artış kaydedilmiştir. İstatistiksel olarak önemli bulunmayan bu artışın sebebi hayvanların normal gelişim periyodunda kazandıkları biyokütle artışının bir sonucudur. Çünkü hem deneysel çalışma gruplarında hem de kontrol grubu hayvanlarda sağlanan vücut ağırlığı artışı birbirine benzer düzeydedir. Yuan et. al. (1999) tarafından keten tohumunun antikarsinojenik ve antiteratojenik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada 50 gün boyunca keten tohumu ile beslenen sıçanların vücut ağırlıklarında ortaya çıkan değişim ile, çalışmalarımızda elde ettiğimiz bulguların benzerliği, keten tohumunun bireylerde vücut ağırlığı artışına önemli bir etkisinin bulunmadığını göstermektedir [135].

Hayvanların su tüketiminin keten tohumu ile beslenme ve/veya MNU etkisine maruz kalma durumunda, önemli düzeyde bir değişim göstermediği görülmüştür. Buna göre, yapılan istatistiksel analizler sonucunda gruplar arasında su tüketimi bakımından önemli düzeyde bir fark saptanamamıştır ($p>0.05$). Hayvanların ortalama su ve yem tüketim miktarlarına göre belirlenen ortalama tüketim değerlerinin, literatür bilgileri ile uyuşan normal bir dağılım sergilediği gözlenmiştir [136].

Bu araştırmada kullanılan keten bitkisi tohumunun kimyasal özellikleri literatürde belirtilen birçok çalışma bulguları ile benzerlik göstermiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda, kullanılan keten tohumunun %26-41 arasında yağ içerdiği bildirilmiş olup [137], çalışmamızda kullanılan keten bitkisi tohumundaki yağ içeriği de 39.66 ± 1.15 olarak tespit edilmiştir. Özellikle lignanlar gibi fenolik bileşiklerce zengin olan keten tohumunda 1.06 ± 0.01 mg/g çözünür fenolik bileşik tespit edilmiştir. Bir başka çalışmada keten bitkisi tohumunun protein içeriği %20-28 arasında rapor edilmiş olup, yapılan bu çalışmada protein içeriği 21.65 ± 1.13 düzeyinde bulunmuştur. Araştırmamızda kullanılan keten tohumunun 3.37 ± 0.06 oranında kül içerdiği saptanmış olup, bu bulgular daha önce yapılan çalışmalarda elde edilen veriler ile (%2.9-6.1) uyuşmaktadır. Lifce zengin olduğu bildirilen [137] keten tohumunun besinsel lif miktarı ise 25.2 ± 1.44 bulunmuştur.

Hayvanların dokularında yapılan histolojik incelemeler sonucunda, mide dokusunda normal fare diyeti ile beslenen hayvanlardakine benzer olarak, sadece keten tohumu ile beslenen grupta herhangi bir doku hasarı gözlenmezken, uygulamanın başında MNU etkisine maruz kalan ve oniki hafta süreyle keten bitkisi tohumu ilaveli diyet ile beslenen hayvanlarda ve MNU uygulamasını takiben sadece altı hafta boyunca keten tohumlu besin alan farelerde dokuların normal görünümünde bazı dejenerasyonlar gözlenmiştir. Ayrıca hayvanlara oniki hafta boyunca keten tohumlu besin verilen, ancak uygulamanın altıncı haftasından sonra MNU etkisine maruz kalan hayvanlarda da mide yüzey epitel hücrelerinde yassılaşıma saptanmıştır. Buna karşın, diğer uygulama gruplarında doku hasarları tespit edilmemiştir. Mide dokusunda gözlenen hasarlar genellikle mide dokusu yüzey epitelinde ve bezlerin apikal bölümlerinde gözlenen dejenerasyonlar şeklindedir. Bu bulgular MNU uygulanan hayvanlarda beklenen olası etkilerin yemlerine keten bitkisi tohumu ilave edilerek beslenen hayvanlar için MNU'nun toksik etkilerini azaltıcı yönde bir etkiye sahip olmadığını göstermektedir. Ayrıca, oniki hafta boyunca keten tohumu katılmış bir diyet ile beslenen, ancak hiçbir toksik madde etkisine maruz kalmayan hayvanlarda mide

dokusunda bir hasar gözlenmemesi, ortaya çıkan etkinin daha çok MNU kaynaklı olduğunu düşündürmektedir. Her ne kadar hayvanlara uygulanan MNU intraperitoneal enjeksiyon yoluyla farelere verilmiş olsa da, mide dokusu üzerinde toksik bir etkiye neden olduğu ve bu olumsuz etkinin yem ile alınan keten tohumu tarafından ortadan kaldırılamadığını ifade edilebilir. Bununla birlikte hayvanlara keten bitkisi tohumunun MNU ile birlikte verilmiş olması etkiyi arttırıcı bir rol de oynayabilir.

Mide dokusu örneklerine benzer olarak, ince barsak dokusu örneklerinde de benzer doku hasarlarının kısmen saptanmış olması, MNU'nun toksik etkisini göstermektedir. Özellikle MNU uygulaması ile birlikte altı hafta süreyle hayvanların keten tohumu içeren diyetle beslenmeleri ince bağırsak dokusunda yer yer villusların apikal kısımlarında dejenerasyon gözlenmesine neden olmuştur (Şekil 4.15). Bununla birlikte genel olarak ince bağırsakta başkaca önemli bir dejeneratif etkinin saptanamamış olması, hem MNU uygulamasının, hem de keten tohumunun bu doku üzerine önemli bir toksik etkiye yol açmadığını düşündürmektedir. Çalışmamızda kullanılan kontrol grubu hayvanlarda incelenen ince bağırsak kesitleri normal histolojik görünüm sergilemektedir. Mukoza parmak şeklinde villuslar içermektedir. Villus yüzeyi, Goblet hücreleri içeren tek katlı çizgili kenarlı prizmatik epitel ile döşelidir. Lamina propria içinde Liberkühn kriptaları yer almaktadır. Kriptaların bazal kısımlarında Paneth hücrelerinin granülleri kırmızı renkte boyanmış olarak gözlenmiştir. Submukoza gevşek bağ dokusu özelliğindedir. Tunika muskularis içte sirküler dışta longitudinal seyirli olarak normal histolojik yapıda izlenmiştir (Şekil 4.11).

Yapılan histopatolojik değerlendirme sonuçları, mide ve ince barsakta gözlenen ve genelde olumlu olarak kabul edilebilecek durumların aksine, karaciğer dokusunda bazı hasarların varlığını göstermiştir. Buna göre kontrol grubundaki farelerin karaciğer dokuları normal histolojik yapıda gözlenirken, hayvanlara sadece MNU uygulaması yapılan grupta karaciğer parankimasında hemoraji ve nekroz alanları izlenmektedir. Ayrıca bu alanlar çevresindeki hepatosit nukleuslarının heterokromatik ve piknotik görünümü dikkati çekmektedir (Şekil 4.19). Merkezi damarların çevresindeki hepatositlerde intrasitoplazmik vakuoller ve hidropik dejenerasyonun varlığı, maddenin kan yolu ile karaciğere ulaşarak, burada hasarlara neden olduğunu akla getirmektedir (Şekil 4.20). Benzer bir sonuç Manal et. al. (2009) yapmış olduğu bir çalışmada gözlenmiştir. Araştırmacılar keten tohumu ve kurutulmuş sarımsak ile beslenen

hiperlipidemik sıçanların karaciğer hepatositlerinde belirgin dejenerasyonlar ve safra kanallarının duvarlarında incelmeye olduğunu rapor etmişlerdir [138].

MNU uygulaması yanı sıra, deney süresince keten tohumlu diyetle beslenen farelerde karaciğer kesitleri genellikle normal histolojik yapıda izlenmiş (Şekil 4.21), ancak yer yer fokal nekroz alanları da dikkat çekmiştir. Bu durum MNU uygulaması ile birlikte olduğunda keten tohumunun kısmen toksik etkinin azaltılmasında olumlu rolü olabileceğini düşündürmektedir. Ancak keten tohumunun uzun süreli olarak yem katkısı olarak hayvanlara verilmesinin (oniki hafta boyunca) de bir toksik etkiye yol açabileceğini göstermektedir. Bu durumda özellikle karaciğer dokusunda parankimada nekroz alanlarının gözlenmesi (Şekil 4.26), hemoraji (Şekil 4.27), periportal alanlarda inflamatuvar infiltrasyon (Şekil 4.28) ve merkezi damarlar çevresinde hepatositlerde hidropik dejenerasyon (Şekil 4.29) gibi histopatolojik bulgular dikkat çekicidir.

Histopatolojik değerlendirmelere ek olarak, doku hasarını saptama bakımından biyobelirteçler olarak kullanılan enzim aktivite değerleri de önem taşımaktadır. Buna göre farelerde mide dokusu AST ve ALT enzim aktivitesi bulgularının histolojik inceleme bulguları ile paralellik göstermediği saptanmıştır. Buna göre, sadece keten tohumu tüketen ve başka hiçbir uygulamaya tabi tutulmayan hayvanlarda mide dokusunda enzim en düşük aktivite değeri göstermiş iken, oniki hafta süre ile keten bitkisi tohumu eklenmiş diyetle beslenen (4. grup) hayvanlar ve kontrol grubu hayvanları (normal diyetle beslenenler) dışındaki diğer gruplarda enzim aktivitesindeki artış, farelere MNU uygulaması ile ilişkili olabilir. Bilindiği gibi, aminotransferazlar (ALT ve AST) plazmada normalde az miktarlarda bulunan sitozolik enzimlerdir [139]. Ancak hücre hasarları sonucunda, bu enzimler plazmaya sızarlar ve aktivite değerlerinde bir artış gösterirler. Burada sadece keten tohumu ile beslenen 4. grup dışında kalan ve MNU uygulamasına maruz bırakılan diğer gruplarda enzim değerlerinin yüksek olması, dokularda MNU etkisine bağlı bir doku hasarı oluşabileceğini düşündürmektedir. Ancak hayvanlara MNU dışında farklı zaman süreleri için MNU ile birlikte keten tohumu verilmesi de enzim aktivitesinin indüklenmesinde etkili olabilir.

Mide dokusunda MNU uygulanmış grupta GST ve CAT aktivitesinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli bir azalış görülürken, GR, GPx ve CaE aktivitesinde ise artış saptanmıştır. MNU indüksiyonu sonrası oniki hafta boyunca keten tohumu ile beslenen grupta özellikle GR ve GPx aktivitesinde önemli artışlar gözlenmiştir. Sadece keten tohumu ile beslenen grupta ise özellikle CaE ve GPx

aktivitesinde belirgin artışlar tespit edilmiştir. Ayrıca MNU ile birlikte uygulamanın ilk altı haftasında keten tohumu ile beslenmiş farelerde GR ve GPx aktivitesinde de önemli artışlar tespit edilmiştir. Bu bulgular mide dokusunda gözlenen histopatolojik düzeyde saptanmış hasarlarla uyumludur. Dolayısı ile hem MNU uygulamasının hem de bu madde ile birlikte verildiğinde keten bitkisi tohumunun toksik etkiyi arttırıcı bir rolü olduğu düşünülmektedir. Keten tohumunun yüksek yağ içeriği, özellikle yağda çözünebilir metabolitlerin dokulara alımını arttırarak böyle bir toksik etkiye yol açabilir.

Organizmalarda, radikal oksijen türlerinin oluşumu ile hücrel bileşenlerin oksidatif hasarı sonucu gerçekleşen oksidatif strese engel olmak için, antioksidant enzimlerin aktiviteleri (GST, GR, GPx, CAT vb.) artarak, antioksidant savunmanın arttırılması amaçlanır [140-141]. Ksenobiotik metabolizmasında II. basamak biyotransformasyon olaylarında yer alan GST'nin, ksenobiotiklere maruz kalmanın bir biyobelirteci olarak kullanılabilmesi birçok laboratuvar ve arazi çalışmasında gösterilmiştir [142-143]. GST aktivitesinin artışı, kirleticilerin yarattığı strese organizmanın gösterdiği adaptasyon olarak değerlendirilmektedir [132]. Çeşitli organik bileşiklere maruz kalma sonrası hepatik GST aktivitesinin böbrek, bağırsak gibi diğer organlardan daha fazla indüklendiği bildirilmiştir. Çalışmamızda MNU'ya maruz kalmayan ancak keten bitkisi tohumu diyeti ile beslenen farelerde GST enzimi için en düşük aktivite değeri belirlenmiştir. Karaciğer GST aktivitesi ksenobiyotik metabolizması için önemli bir göstergedir. Bulgularımıza göre karaciğer GST aktivitesi MNU enjekte edilen grup ile karşılaştırıldığında grup 3, 4, ve 5'de önemli düzeyde düşük aktivite değerleri tespit edilmiştir. Bu MNU'nun oluşturduğu toksik etkiyi ortadan kaldırmada keten tohumunun olumlu katkılar sağlayabileceğini ifade edebilir. Benzer şekilde, Rickard et. al. [144] yaptığı bir çalışmada, keten tohumu ile beslenmenin, tümör gelişimi üzerinde etkili olmadığı, fakat MNU indüksiyonu ile oluşturulan meme tümöründeki ilerlemeyi durdurduğu gözlenmiştir. Yine bir başka çalışmada CCl₄ enjeksiyonu yapılan albino sıçanlarda, keten tohumu ilaveli diyetle beslenmenin karaciğer enzimlerini (CAT, SOD) iyileştirici etkileri gözlenmiştir [145]. Benzer şekilde karaciğer hasarının tamirinde keten tohumunun koruyucu rolünün belirlenmesi ile ilgili olarak sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada da keten tohumunun iyileştirici etkisi olduğu belirtilmektedir. [146]. Çevresel kirleticilerin olumsuz etkilerini değerlendirmek için farklı dokulardaki CaE düzeyleri belirlenmiştir. Farklı dokularda aynı enzimin çalışması hem etkilenen organ veya dokunun belirlenmesi açısından, hem de doku veya organların ksenobiyotiklere verdikleri tepkinin belirlenmesi

açısından önemli ipuçları sağlamaktadır. Bu enzimler (SOD, CAT, GPx v.s) antioksidan savunma mekanizmasına katkı sağlarlar. CaE aktivitesi sadece keten tohumu uygulanmış grupta önemli düzeyde artış göstermiştir. Yine CAT ve GPx aktivitesinin MNU uygulanan grupta (Grup 1) ve MNU ile birlikte keten tohumu uygulanmış gruplarla (Grup 2, 3 ve 5) karşılaştırıldığında önemli düzeyde arttığı tespit edilmiştir. Çalışmamızda belirlenen bu artışların aksine Lee et. al. (2002), Mary et. al. (2002), Visavadiya and Narasimhacharya (2007) ve Makni et. al. (2008) yaptıkları çalışmalarda karaciğer dokularında enzim aktivitesinde belirgin bir düşüş belirlenmiştir. [147-150].

Aktivitelerde belirlenen bu düşüşler, lipid peroksidasyonu esnasında oluşan α ve β doymamış aldehitlerin varlığıyla ilişkilendirilmiştir. Bu bileşenler, Se bağımlı glutatyon peroksidaz enziminin inaktive olmasıyla ve hücrese glutatyon tüketimi ile oluşan oksidatif stres durumlarında artış gösterirler. Son yıllarda çevresel kirleticilerle ilişkili olarak organizmada sağlık durumunun ve toksik ajanlara yanıtın belirlenmesinde özellikle PAH türü çevresel kirleticilere karşı EROD anahtar belirteç enzim olarak kabul edilmektedir [151]. Hepatik EROD aktivitesinin ksenobiyotikler, sıcaklık, hormonlar, beslenme ve sağlık durumu gibi çok sayıda faktörden etkilendiği de bildirilmiştir [151]. Çeşitli stres durumlarına (kirleticiler, kimyasallar vb.) maruz kalma sonrası karaciğer tahribatı nedeniyle bu enzimlerin karaciğerdeki mikrozomal aktivitesinin arttığı bilinmektedir [152]. Stres koşullarında ya enerji ihtiyacı nedeniyle enzim aktiviteleri artmakta ya da ksenobiyotik madde enzim inhibisyonuna neden olmaktadır. Ayrıca stres koşullarına maruz kalan organizmalarda karaciğer tahribatı nedeniyle karaciğer dokusundaki enzim aktiviteleri azalırken, plazmada aynı enzimlerin aktiviteleri artabilmektedir.

Çalışmamızda MNU uygulamasına maruz kalan farelerin diyetlerine eklenen keten tohumunun EROD aktivitesi üzerine olan etkileri de test edilmiştir. Mikrozomal EROD aktivitesinin gruplar arasında istatistiksel olarak önemli düzeyde bir farklılık göstermediği saptanmış olmakla birlikte, EROD 12 hafta boyunca keten bitkisi tohumu ilave edilmiş diyetle beslenen hayvanlarda ve MNU uygulamasına maruz kalıp altı hafta boyunca keten tohumu ilaveli diyet alan hayvanlarda göreceli bir artış sergilemiştir. Bu sonucun MNU kökenli olmaktan çok, keten tohumu eklenmiş diyet ile beslenmeye bağlı olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, bu konuda daha detaylı ve aydınlatıcı çalışmalara da gerek bulunmaktadır.

Oniki haftalık deney süresince, beş farklı dönemde alınan kan plazma örneklerinin incelenmesinde; deney başlangıcında MNU uygulamasına maruz kalan ve normal fare diyeti ile beslenen 2. grup hayvanlardan elde edilen plazma AST ve LDH enzim aktivite değerleri ile kreatinin konsantrasyonu, hayvanlara başlangıçta MNU enjeksiyonu yapılan fakat keten tohumu ilaveli diyetle beslenen 3. grup hayvanlardan elde edilen enzim değerlerinden yüksek bulunmuştur. Stres koşullarına maruz kalan organizmalarda doku tahribatı nedeniyle plazmada enzimlerin aktivitelerinde artış olduğu bilinmektedir. Bu bilgi ışığında 3. grupta tespit edilen düşük aktivite değerleri, keten tohumunun, MNU'nun oluşturduğu stresi azaltıcı bir etkiye sahip olabileceğini düşündürmektedir. Benzer bir karşılaştırma, normal fare yemiyle beslenen kontrol grubu hayvanları ile sadece keten tohum ilaveli diyetle beslenen 4. grup arasında yapılmıştır. Sadece keten tohumu tüketen 4. grupta yer alan hayvanlardan elde edilen AST ve LDH enzim aktivite değerleri kontrol grubundan daha düşük bulunmuştur. Bu durum keten tohumunun yüksek antioksidan içeriği ile ilişkilendirilebilir.

Başlangıçta ve deneysel çalışmaların altıncı haftasında intraperitoneal yolla MNU etkisine maruz bırakılan ve oniki hafta boyunca keten tohumu ilaveli diyetle beslenen 2. grup ile 5. gruplarda belirlenen AST enzim aktivite değerleri birbirine yakın bulunmuştur. Yine keten tohumu ilaveli diyetle beslenen 4. grup ile MNU enjeksiyonu yapıp aynı diyetle beslenen 2. grup arasında yapılan karşılaştırmada, 4. gruptan elde edilen enzim aktivite değerlerinin 2. gruptan elde edilenden daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlara bağlı olarak elde edilen bulgular keten tohumu tüketiminin MNU tarafından oluşturulan bir toksik etkiye karşı, organizmada koruyucu bir etki yapabileceğini düşündürmektedir.



Sonuç olarak, diyetlerimizle çeşitli maddeleri ve besin katkılarını günlük yaşantımızın bir parçası olarak tüketmekteyiz. Ayrıca, günlük yaşamın bir parçası olarak çevresel kirleticilerin, sanayileşme sonucunda açığa çıkan kimyasalların ve çok çeşitli pestisitlerin etkisine maruz kalmaktayız. Diyetle alınan bazı doğal kaynaklı ürünlerin bizi çevrede yoğun olarak bulunan çevresel stres faktörlerine karşı koruyabileceği iddia edilmektedir. Keten bitkisi tohumu da bunlar arasında yer almakta ve insanlar tarafından giderek artan bir ilgiyle tüketilmektedir. Bununla birlikte elde edilen araştırma bulgularına bağlı olarak, keten tohumunun bu çalışmada kullanılmış mutajenik bir ajan olan MNU'ya karşı koruyucu bir etkisinin olmadığı, sürekli ve uzun süreli olarak diyetle birlikte tüketilen keten tohumunun bazı olumsuz etkilerinin de bulunabileceği, bu nedenle keten tohumunun tüketiminde dikkatli davranılması

gerektiđi dűşűnűlmektedir. Ayrıca bu konuda daha detaylı ilave arařtırmalara gereksinim olduđu ve bařkaca biyobelirteçlerin de kullanılarak keten bitkisi tohumunun tűketiciminin gűvenirliđinin test edilmesi gerektiđi sonucuna ulařılmıřtır.

6. KAYNAKLAR

- [1]. F. Haschke, A. Firmansyah, M. Meng, P. Steenhout and A.L. Carrie, *Functional food for infants and children*. **Monatsschr Kinderheilkd.**, 149 (2001) 66-70.
- [2]. Y. Coşkuner and E. Karababa, *Some physical properties of flaxseed (Linum usitatissimum L.)*, **J. Food Eng.**, 78 (2007) 1067-1073.
- [3]. www.whfoods.org.
- [4]. T. P. Freeman, *Structure of flaxseed*. In: S.C. Cunnane and L.U. Thompson, Editors, *Flaxseed in human nutrition*, AOCS Press, Champaign, IL, (1995) 11–21.
- [5]. J. F. Carter, *Potential of FS oil in baked goods and other products in human nutrition*, **Cereals Foods World**, 38:10 (1993) 753- 759.
- [6]. B. D. Oomah and G. Mazza, *Processing of flaxseed meal: effect of solvent extraction on physicochemical characteristics*, **Lebensm. Wiss.u.- Technol.**, 26 (1993) 312-317.
- [7]. B. D. Oomah, G. Mazza and E.O. Kenaschuk, *Dehulling characteristics of flaxseed*, **Lebesm-Wiss.u- Technol.**, 29 (1996) 245-250.
- [8]. T. J. Payne, *Promoting beter health with flaxseed in bread*, **Cereal Foods World**, 45:3 (2000) 102-104.
- [9]. P. W. Wiesenfeld, U.S. Babu, T.F.X. Collins, R. Sprando, M.W. O'Donnel, T.J. Flynn, T.Black and N. Olejnik, *Flaxseed increased A-Linolenic and eicosapentaenoik acid and decreased arachidonic acid in serum and tissues of rat dams and offspring*, **Food Chem. Toxic.**, 41 (2003) 841-855.
- [10]. C. M. Hasler, *Functional foods: benefits, concerns and challenges – a position paper from the American Council on Science and Health*, **J Nutr**, 132 (2002) 3772-3781.

- [11]. B. D. Oomah and G. Mazza, "Functional foods", in F. J. Francis (Ed) Wiley Encyclopedia of Science and Technology, Vol 2. 2nd edn, Wiley, New York, (2000) 1176-1182.
- [12]. M Jenab and L.U. Thompson., *The influence of flaxseed and lignans on colon carcinogenesis and β -glucuronidase activity*, **Carcinogenesis**, 17:6 (1996) 1343- 1348.
- [13]. P. Singer, W. Jaeger, I. Berger, H. Barlaben, M. Wirth, E. Richter-Heinrich, S. Voigt and W. Godicke, *Effects of dietary oleic, linoleic and α -linolenic acids on blood pressure, plasma lipids, lipoproteins and the formation of eicosanoid precursors in patients with mild hypertension*, **J. Hum. Hypertens**, 4 (1990) 227-233
- [14]. M. N. Walisundera, W.A. Ratnayake, P.W.F.Fischer, M.R. L'Abbe, R. Mongeau & J.L Beare-Rogers, *Chemical and nutritional studies of FS (variety Linott) in rats*. **J. Nutr. Biochem.**, 3 (1992) 232-240
- [15]. M. L. Bierenbaum, R. Reichstein and T.R. Watkins, *Reducing atherogenic risk in hyperlipemic humans with FS supplementation 'a preliminary report'*. **J. Am. Coll. Nutr.**, 12:5 (1993) 501- 504.
- [16]. S. C. Cunnane, M.J. Hamadeh, A.C. Liede, L.U. Thompson, T.M.S. Wolever and D.J.A. Jenkins, *Nutritional attributes of traditional FS in healthy young adults*. **Am. J. Clin. Nutr.**, 61 (1995) 62-68.
- [17]. W.F. Clark, A. Parbtani, M.W. Huff, E. Spanner, H.D. Salis, I. Chin Yee, D.J. Philbrick & B.J. Holub, *Flaxseed: a potential treatment for lupus nephritis*, **Kidney Int.**, 48 (1995) 475-480.
- [18]. M.J. Mantzioris, R.A James., L.G. Gibson and L.G Cleland, *Dietary substitution with an α -linolenic acid rich vegetables oil increases eicosapentanoic acid concentrations in tissues*. **Am. J. Clin. Nutr.**, 59: 6 (1994) 1304-1309.

- [19]. E. Mantzioris, M.J. James, R.A. Gibson and L.G. Cleland, *Differences exist in the relationship between dietary linolenic and alpha-linolenic acids and their respective long-chain metabolites*, **Am J Clin Nutr.**, 61 (1995) 320-324
- [20]. M.A. Alman, M.M Pena & D. Pang, *Supplementation with FS oil versus sunflower seed oil in healthy young men consuming a low fat diet: effects on platelet composition and function*, **Eur. J. Clin. Nutr.**, 49 (1995) 69- 178
- [21]. A. Ferretti and V.P. Flanagan, *Antithromboxane activity of dietary alpha-linolenic acid: a pilot study*, **Prostagland. Leu. Es. Fatty Acids**, 54 (1996) 451-455
- [22]. R. Zhang, A.F. Mustafa   and X. Zhao, *Effects of flaxseed supplementation to lactating ewes on milk composition, cheese yield, and fatty acid composition of milk and cheese*. **Small Rum. Res.** 63 (2006) 233–241
- [23]. K.Klotzabach-Shimomura, *Functional Foods: The Role of Physiologically Active Compounds in Relation to Disease*. **Topics in Chin.Nutr.**, Mar (2001).
- [24]. B.H Arjmandi ,D.A. Khan, S. Juma, M.L. Drum, S.Venkatesh, E.Sohn, L.Wei and R. Derman, *Whole Flaxseed Consumption Lowers Serum LDL-Cholesterol and Lipoprotein (A) Concentrations in Postmenopausal Women*. **Nutr. Research**, 18, (1998) 1203-1214.
- [25]. H. İşleroğlu, Z. Yıldırım ve M. Yıldırım, *Fonksiyonel bir gıda olarak keten tohumu*, **GOÜ. Zir. Fak. Der.**, 22:2 (2005) 23- 30.
- [26]. B.D. Oomah and G. Mazza ,“Flaxseed products for disease prevention,” in G. Mazza (Ed.), *Functional Foods Biochemical and Processing Aspects*, Technomic Publishing, Lancaster, PA, (1998) 91- 138.
- [27]. S. Ötleş ve R. Pire, *Günümüzde ketenin gıda olarak önemi*. **Dünya Gıda**, 6 (5) (2000) 79-82.

- [28]. H. Clifford, M.C. Tulbek and Y. Xu, *Flaxseed. Adv. in Food and Nutr. Res.* (2006) 51, 2-3.
- [29]. P.A Stit, *History of flax: 9000 years ago to (1986)*. In “55th Flax Institute of the United States” (1994) 152-153, Fargo, ND
- [30]. A. Judd , *Flax-some historical considerations*. In “ Flaxseed in Human Nutrition” (L.U. Thompson and S.Cunnane,eds.), 2nd Ed., (1995) 1-10, AOCS Press, Champaign, IL.
- [31]. U. Erasmus, *Fats and Oils*, Vancouver, Canada, Alive Books, 1986, pp. 260-61)
- [32]. Z.Y. Chen, W.M.N. Ratnayake and S.C. Cunnane., *Oxidative stability of flaxseed lipids during baking*, **J. Am. Oil and Chem. Soc.**, 71 (1994) 629- 632.
- [33]. Ş. Sarıca, *Omega-3 Yağ Asitlerinin İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri ve Tavuk Etinin Omega-3 Yağ Asitlerince Zenginleştirilmesi.*, **Hayv. Üret.** 44(2) (2003) 1-9.
- [34]. A.Rebole', M.L. Rodríguez, L.T. Ortiz, C.Alzueta, C. Centeno and C.Treviño, *Mucilage in linseed: effects on the intestinal viscosity and nutrient digestion in broiler chicks*, **J. Sci. Food and Agric.**, 82 (10) (2002) 1171–1176.
- [35]. Ş. Elçi, *Tarla Bitkileri*, Ankara Üniversitesi Yayını, (1994) 89-93.
- [36]. Anonim., Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler, 29-31 Mayıs 2002, Eskişehir, Eds. K.H.C.Başer ve N.Kırimer Web’de yayın tarihi: Haziran 2004 ISBN 975-94077-2-8
- [37]. K. Vijaimohan, M.Jainu, K.E. Sabitha, S. Subramaniyam, C. Anandhan and C.S Shyamala Devi, "*Beneficial effects of alpha linolenic acid rich flaxseed oil on growth performance and hepatic cholesterol metabolism in high fat diyet fed rats.*" **Life Sciences.** 79 (2006) 448–454.

- [38]. G. Mazza, *Flaxseed Products For Disease Prevention*. In: *Functional Foods, Biochemical and Processing Aspects*, Lancaster, Pennsylvania: Technomic Publishing Company, (1998) 9-127.
- [39]. M. De Lorgeril, S. Renaud, N. Mealle, *Mediterranean alpha-linolenic acid-rich diet in secondary prevention of coronary heart disease*. **Lancet** 343 (1994) 1454–9.
- [40]. B.C. Davis and P.M. Kris-Etherton, *Achieving optimal essential fatty acids status in vegetarians: current knowledge and practical implications*. **Am. J. Clin. Nutr.** 78 (Suppl.3) (2003) 640-646.
- [41]. K.T. Madusudhan and N. Singh, *Studies on linseed proteins*. **J. Agric. Food Chem.** 31 (1983) 959-963.
- [42]. M.F. Marcone, Y. Kakuda and R.Y. Yada, *Salt-soluble seed globulins of dicotyledonous and monocotyledonous plants*. II. Structural characterization. **Food Chem.** 63 (1998) 265-274.
- [43]. R.H. Sammour, M.N. El-Shourbagy, A.M. Abo-Shady, and A.M. Abasary, *The seed proteins of linseed (Linum UsitatissimumL.)*, **Bot. Bull. Acad. Sin.** 35 (1994) 171-177.
- [44]. K.T. Madusudhan and N. Singh, *Isolation and characterization of the major fraction (I2S) of linseed proteins*. **J. Agric. Food Chem.** 31 (1985b) 959-963.
- [45]. J. R Borgmeyer, C. E. Smith, and O. K. Huynh.. *Isolation and Characterization Of A 25 kDa Antifungal Protein From Flaxseed*. **Biochemical and Biophysical Research Com.** 187 (1992), 480-487.
- [46]. A.F. Kardinal, D.H. Waalkens-Berendsen and C.J. Arts, *Pseudo-estrogens in the diet: health benefits and safety concerns*. **Trends Food Sci Technol.** 8 (1997) 327-333

- [47]. M. Skerget, P. Kotnik, M. Hadolin, A.R. Hras, Marjana Sinomic and Z Knez, *Phenols, Proanthoyanidins, Flavones in Some Plant Materials and Their Antioxidant Activities*, **Food Chem.** (2004).
- [48]. L.A. Berner and J.A. O'Donnell, *Functional Foods and Health Claims Legislation: Application To Dairy Foods*, **Int. Dairy J.** 8 (1998) 355-362.
- [49]. N.C. Cook and S.Saman., *Flavonoids-Chemistry, Metabolism, Cardioprotective Effects and Diyetary Sources*, **J. Nutr. Biochem.**, 7 (1996) 66-76.
- [50]. P.M. Kris-Etherton, K.D. Hecker, A. Bonanome, M.S. Coval, A.E. Binkoski, K.F. Hilpert, A.E. Griel and T.D. Etherton, *Bioactive Compounds in Foods: Their Role in The Prevention of Cardiovascular Disease and Cancer*. **The Am. J. Med.**, 113 (2002) 71-88.
- [51]. D.P. Allen, H.D Danforth. and P.C. Augustine, *Dietary Modulation of Avaiian Coccidiosis*, **Int. J. Parasitol.** 28 (1998) 1131-1140.
- [52]. L.T. Bloedon and O.P Szapary, *Flaxseed and cardiovascular risk*, **Nutr. Rev.** 62 (2004) 18-27.
- [53]. A.G. Van Kesel, M.D. Drew, J.F. Patience and R. T. Zijlstra. 2006. *Effect of dietary flaxseed, flux hulls or linseed oil on intestinal microbiota and growth performance in weaned pigs*. Abstr. 291. Midwestern Section ASAS and Midwest Branch ADSA 2006 Meeting, Des Moines, IA
- [54]. M. L. Rodríguez, C. Alzueta, A. Rebolè, L. T. Ortiz, C. Centeno, and J. Treviño. *Effect of inclusion level of linseed on the nutrient utilization of diets for growing broiler chickens*. **Br. Poult. Sci.** 42 (2002) 368–375.
- [55]. K Kılınç and A. Kılınç, *Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri*. **Temel Tiptan Kliniğe**, 33 (2) (2002) 110-118.

- [56]. Y. Dündar ve R. Aslan, *Hekimlikte Oksidatif Stres Ve Antioksidanlar*. Afyon Kocatepe Üniversitesi Yayınları, (2000) Ankara 3-15
- [57]. U. Mercan, *Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi*, **YYU Vet. Fak. Dergisi**, 15 (1-2) (2004) 91-96.
- [58]. N. Altan, A.S. Dinçeli ve C. Koca, *Diabetes Mellitus and Oxidative Stress*, *Türk Biyokimya Dergisi Turkish Journal of Biochemistry - Turk J Biochem* 31(2) (2006) 51-56.
- [59]. B.M. Babior, *Phagocytes and oxidative stress*. **The Am. J. Med.** 109(1) (2000) 33-44.
- [60]. S.Ö. Aslantürk ve T. Çelik, *Serbest radikaller , Antioksidanlar ve Kanser Arasındaki İlişki.*, Klinik Biyokimya ve Kanser Sempozyumu özet kitabı, www.klinikbiyobursa.org/page60.htm.
- [61]. A. Breccia, C.I. Greenstock and M. Tamba., *Advances on oxigen radicals and radioprotectors*. (Eds), p.83. Lo Scarabeo, Bologna (1984) 190.
- [62]. S. Yanbeyi, *Aspirin ve antioksidant buthylated hydroxyanisole'ün tavşanlarda eritrosit total katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri üzerine etkileri*, (1999) Ondokuz Mayıs Üni. Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Samsun, 88s (yayınlanmamış)
- [63]. B. Halliwell and J.M.C Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, Third Edition, Oxford Science Publications, (2001) 22- 24
- [64]. İ. Akkuş, *Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri*, 1.Baskı, Mimoza Yayınları, Konya (1996).
- [65]. K. Kaynak, *Akciğer kanserinde oksidatif stresin rolü*, **Solunum**, 4 (2002) 468-473.

- [66]. K.H Cheeseman and T.F. Slater, *An introduction to free radical biochemistry*, **Br Med Bull. Jul.** 49(3) (1993) 481-93.
- [67]. P.H. Proctor and E.S. Reynolds, *Free radicals and disease in man*, **Psio. Chem. and Phys and Med. NMR**; 16 (1984) 175-195.
- [68]. J.M. Gutteridge, *Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage*. **Clin Chem. Dec**; 41(12 Pt 2) (1995) 1819-1828.
- [69]. R.K. Murray, D.K. Granner, R.A. Mayes and V.W. Rodwell, *Fizyolojik öneme sahip lipidler*, **Harper'ın Biyokimyası**. (1996), 171-186.
- [70]. PA. Mayes, *Lipidlerin Taşınması ve Depolanması*. **Harper'ın Biyokimyası** (24.Baskı) Ed: N Dikmen, T Özgünen, Barış Kitabevi, İstanbul (1996), 292-311.
- [71]. E.T. Craig and S.D. Aust, *Free radicals and environmental toxins*, **Annals of Emergency Medicine**, (1986) 15-9.
- [72]. B.N. Ames, M.K. Shigenaga and T.M. Hagen, *Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging*, **Proc Natl Acad Sci U S A** Sep 1;90 (17) (1993) 7915-22.
- [73]. B. Frei, *Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: Mechanisms of Action*, **The Am. J. Med.**, 97(Suppl 3A), (1994) 26 3A-5S-3A-12S.
- [74]. B.Halliwel and J.M. Gutteridge, *Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy*. **Lancet**. Jun 23; 1 (8391) (1984) 1396-7.
- [75]. B. Halliwel, *Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence?* **Lancet**. Sep 10; 344 (8924) (1994) 721-4.
- [76]. B. Halliwel, *Free radicals and metal ions in health and disease*. **Proc Nutr Soc**. Feb; 46(1) (1987) 13-26.

- [77]. M. Oğuz, *Oksijen radikalleri*. **C.Ü.Tıp Fak.Der.**, (1990) 12-2 .
- [78]. V.R. Winrow, P.G. Winyard, C.J. Morris and D.R Blake, *Free radicals in Inflammation. Second messengers and mediators of tissue destruction*. **British Medical Bulletin**, 49 3 (1993) 506-522 .
- [79]. C. Çavdar, A. Sifil ve T. Çamsarı, *Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma.*, **Türk Nefr. Diy. ve Transpl. Der.**, 3-4 (1997) 92-95.
- [80]. www.woongbee.com.
- [81]. B. Halliwell and J.M. Gutteridge, *The antioxidants of human extracellular fluids*. **Arch Biochem Biophys**. Jul; 280 (1) (1990) 1-8.
- [82]. C.E. Cross, B.Halliwell, E.T. Borish, W.A. Pryor, B.N. Ames, R.L. Saul, J.M. Mccord and D. Harman, *Oxygen radicals and human disease*. **Ann Intern Med**. Oct. 107 (4) (1987) 526-45.
- [83]. L Guemouri, Y. Artur, B. Herbeth, C. Jeandel, G. Cuny and G. Siest, *Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in blood*. **Clin Chem**. Nov; 37 (11) (1991) 1932-7.
- [84]. M.R. Criolo, K. Fişkın, A.D. Martino, M.T. Corasaniti., *Age-Related Changes Cu-ZnSOD. Se-Dependent And-Independent Glutathione Peroxidase And Catalase Activities in Specific Areas of Rat Brain*. **Mech. of Ageing and Develop**. 61 (1991) 287-197.
- [85]. C. Michiels, M. Raes, O.Toussaint and J. Remacle, *Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress*. **Free Radic Biol Med**. Sep; 17 (3) (1994) 235-48.
- [86]. B. Diaz Lopez, E. Diaz Rodriguez, C. Urquijo and C. Fernandez Alvarez, *Melatonin influences on the neuroendocrine-reproductive axis*. **Ann N Y Acad Sci**., 1057 (2005) 337-364.

- [87]. P.I. Ceballos, J.M. Trivier and A.Nicole, *Age-corelated modifications of copper zinc superoxidedismutase and glutathione-related enzyme activities in human erythrocytes. ClinChem.*, 38 (1) (1992) 66-70.
- [88]. B. Mannervik, *Glutathione peroxidase. Methods Enzymol*, 113 (1985) 490-5.
- [89]. C.A. Rice-Evans, AT. Diplock and M.C.R. Symons, *Techniques in free radicals research. Elsevier*, Amsterdam, (1991) vol 22.
- [90]. M.D. Evans and M.S. Cooke, *Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. BioEssays.*, 26 (2004) 533-542.
- [91]. F. Gültekin, N. Delibaş, S. Yaşar and İ. Kılınç, *In vivo changes in antioxidant systems and protective role of melatonin and a combination of vitamin C and vitamin E on oxidative damage in erythrocytes induced by chlorpyrifos-ethyl in rats. Arch. Toxicol.*, 75 (2001) 88-96.
- [92]. J.M. Matés, *Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. Toxicology*, 153 (2000) 83-104.
- [93]. J.P. Rauha, P. Tammela, J. Summanen, P. Vuorela, M. Kahkönen, M. Heinonen, A. Hopia, T. Kujala, K. Pihlaja, K. Törnquist and H. Vuorela, *Action of some plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds on calcium fluxes in clonal rat pituitary GH_4C_1 cells. Pharm. Pharmacol Lett*, 9 (1999) 66-69.
- [94]. J. Summanen, P.Vuorela, J.P Rauha, P. Tammela, K. Marjamaki, M. Pasternack, K. Törnquist and H. Vuorela, *Effects of simple aromatic compounds and flavonoids on Ca^{+2} fluxes in rat pituitary GH_4C_1 cells. Eur. J. Pharmacol.*, 414 (2001) 125-13.
- [95]. R.L. Prior, *Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage, Am J Clin Nutr.*, 78 (2003) 570S-578S.

- [96]. Ş. Güran, *Kanserden Korunma*, **Gülhane Tıp Dergisi.**, 47 (2005) 324-326.
- [97] B.Alberts, A. Jhonson, J. Lewis, M. Raff, R.Roberts and P. Walter (eds), *Moleculer Biology of the Cell*. 4th ed. New York: Garland Science, (2002) 1313-1362.
- [98]. S. Preston-Martin, M.C. Pike, R.K. Ross, P.A Jones and B.E. Henderson, *Increasead cell division as a cause of human cancer*. **Cancer Res.** 50 (1990) 7415-7421.
- [99]. H. Lüleyap, *Moleküler Genetiğin Esasları*. **Nobel Kitabevi.** (2008) 292-300.
- [100]. Ş. İlvan, *Meme Kanseri Patolojisi*, İ.Ü. Cerrahpaşla Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Meme Kanseri Sempozyum Dizisi No: 54 (2006) 65 – 71.
- [101]. S.E. Akhan, *Ülkemizde servikal kanser ve epidemiyolojisi ve HPV serotipleri*, ANKEM Dergisi 21 (2007) 96-98.
- [102]. M. Serraino and L.U. Thompson, *Flaxseed Supplementation and Early Markers of Colon Carcinogenesis*. **Cancer Letters**, 63 (1992) 159-165.
- [103]. K. Prasad, *Dietary Flaxseed in Prevention of Hypercholesterolemic Atherosclerosis*. **Atherosclerosis**, 132 (1997) 69-76.
- [104]. P.E. Goss, T. Li, M.Theriault, S. Pinto and L. Thompson, *Effects of Diyetary Flaxseed in Woman with Cyclical Mastalgia*. **Breast Cancer Res. And Treat.**, 64(1) (2000) 49.
- [105]. L.U. Thompson, T.Li, J. Chen and P.E. Goss, *Biological of Diyetary Flaxseed in Patients with Breast Cancer*. **Breast Cancer Res. And Treat.**, 64(1) (2000) 50.
- [106]. W. Denmark-Wanhnefried , D.T. Price, T.J. Polascik, C.N. Robertson, E.E. Anderson D.F. Paulson., P.J. Walther, M. Gannon and R.T. Vollmer , *Pilot Study of Diyetary Fat Restriction and Flaxseed Supplementation in Men with Prostate Cancer*

Before Surgery: Exploring the Effects on Hormonal Levels, Prostate –Specific Antigen and Histopathologic Features. Urology, 58(1) (2001) 47-52.

[107]. B.H. Arjmandi, S. Juma, E.A. Lucas, L. Wei, S. Venkatesh and D.A. Kahn, *Flaxseed supplementation positively influences bone metabolism in postmenopausal women. JANA* 1 (1998) 27- 32.

[108]. M.S. Kurzer, J.W. Lampe, M.C. Martini and H. Adlercreutz, *Fecal lignan and isoflavonoid excretion in premenopausal women consuming flaxseed powder, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 4 (1995) 353-358.

[109]. P.D. Nesbitt, Y. Lam and L.U. Thompson, *Human metabolism of mammalian lignan precursors in raw and processed flaxseed. Am J Clin Nutr.*, 69 (1995) 549-555.

[110]. J.M. Lampe, M.C. Martini, M.S. Kurzer, H. Adlercreutz and J.L. Slavin, *Urinary lignan and isoflavonoid excretion in premenopausal women consuming flaxseed powder, Am J Clin Nutr.*, 60 (1994) 122-128.

[111]. H. Adlercreutz, T. Fotsis, C. Bannwart, K. Wahala, T. Makaela, G. Brunow and T. Hase, *Determination of urinary lignans and phytoestrogen metabolites, potential antiestrogens and anticarcinogenes in urine of women of various habitual diets. Journal of Steroid Biochemistry*, 25:B (1998) 791- 797.

[112]. A.J. Ingram, A. Parbtani, W.F. Clark, E. Spanner, M.W. Huff, D.J. Philbrick and B.J. Holub, *Effects of flaxseed and flax oil diets in a rat 5/6 renal ablation model. American Journal of Kidney Disease* , 25:2 (1995) 320-329.

[113]. W.F. Clark, A.D. Muir, N.D. Westcott and A. Parbtani, *A novel treatment for Lupus nephritis: lignan derived precursor from flax, Lupus*, 9:6 (2000) 429- 436.

[114]. W.F. Clark, C. Kortas, A.P. Heidenheim, J. Garland, E. Spanner and A. Parbtani, *Flaxseed in Lupus nephritis: a two year non-placebo- controlled crossover study, J. Am. Coll. Nutr.*, 20: 2 (2001) 143- 148.

- [115]. M.R. Ogborn, E. Nitschmann, H. Weiler, D. Leswick and N. Bankovic-Calic, *Flaxseed ameliorates interstitial nephritis in rat polycystic kidney disease*, **Kidney Intern.**, 55:2 (1999) 417-423.
- [116]. T. Ranich, S.J. Bhathena and M.T. Velasques, *Protective effects of dietary phytoestrogens in chronic renal disease*, **Journal of Renal Nutrition**, 11:4 (2001) 183- 193.
- [117]. S.C. Cunnane, S. Ganguli, C. Menard, A.C. Liede, M.J. Hamadeh, Z.Y. Chen and T. Wolever, *High alpha-linolenic acid flaxseed (Linum Ussitatimum): some nutritional properties in humans*. **Br. J. Nutr.**, 69 (1993) 443-453.
- [118]. P. Wilkenson, C. Leach, E.E. Ah-Sing, N. Hussain, G.J. Miller, D.J. Millward and B.A. Griffin, *Influence of alpha-linolenic acid and fish-oil on markers of cardiovascular risk in subjects with an atherogenic lipoprotein phenotype*. **Atherosclerosis**. 181 (2005) 115-124.
- [119]. S. Tello, İ. Halifeoğlu, M. Bozkurt and Ö. Bulmuş, *Meme Kanseri Oluşturulmuş Ratlarda Isırgan Otunun Total Antioksidan Durumu Üzerine Etkisi*, **Fırat University Journal of Health Sciences Medicine**, 22 (4) (2008) 179-183.
- [120]. T. Altuğ, U. Girgin, İ. Bayrak ve E. İkitimur, *MNU Verilen Sıçanlarda Catechinin Koruyucu Etkileri*, **5. Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi 21-24 Eylül 1998 İzmir]**
- [121]. M. Aksoy, E. Frei and M. R. Berger, *Influence of experimental diets on hepatic glutathione levels in rats with methylnitrosourea-induced mammary carcinoma*, **Cancer Res. Clin Oncol.**, 110 (3) (1985) 244-6.
- [122]. R.Curan, L. Hildebrandt and S. Schoemer, *Influence of Flaxseed Oil Administration On Glycemic Responce In Active, Healty Adults*, **Topics in Clinical Nutrition**(2002).

- [123]. T.F.X. Collins, R.L. Sprando, T.N. Black, N. Olejnik, P.W. Wiesefeld., U.S. Babu M. Bryant., T.J. Flynn and D.I. Ruggles, *Effects of Flaxseed and Defatted Flaxseed Meal on Reproduction and Development in Rats*. **Food and Chemical Toxicology.**, 41 (2003) 819-834.
- [124]. AOAC. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**, (1990) 15 th. Edition, (Ed) Williams, S., Arlington, Virginia.
- [125]. G.C. Yen and H. Chien-Ya, *Effects of alkaline and heat treatment on antioxidative activity and total phenolics of extracts from Hsian-tiao (Mesona procumbens Hemsl.)*, **Food Res. Int.**, 33, (2000) 487-492.
- [126]. W.H. Habig, M.J. Pabst and W.B.Jacoby, *Glutathione S-Transferases, The first enzymatic step in mercapturic acid formation.*, **J. Biol. Chem.**, 249 (1974) 7130-7135.
- [127]. A.E. Cribb, J.S. Leeder and S.P. Spielberg, *Use of a microplate reader in an assay of glutathione reductase using 5-5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)*, **Anal.Biochem.** 183 (1989) 195-196.]
- [128]. U. Nousiainen and R.Torronen, *Differentiation of microsomal and cytosolic carboxylesterases in rat liver by in vivo and in vitro inhibition*, **Gen. Pharmacol.**, 15 (1984) 223-227.;
- [129]. P. Santhoshkumar and T. Shivanantappa, *In vitro sequestration of two organophosphorus homologs by the rat liver*, **Chem. Biol. Interact.**, 119-120 (1999) 277-282.
- [130]. E. Stephensen, **Aquatic Toxicology**, 48 4 (2000) 431-442
- [131]. H.S. Luck, Catalase., In: H.U. Bergmeyer (Ed.) *Methods in Analysis*, Academic Press, London, (1965) 855-884.
- [132]. M. Ozmen, Z. Ayas, A. Güngördü, G. F. Ekmekci and S. Yerli, *Ecotoxicological assessment of water pollution in Sariyar Dam Lake, Turkey*. **Ecotox. Environ. Safety**, 70:163-173 (2008) 163.

- [133]. J.J. Whyte, R.E. Jung, C.J. Schmitt and D.E. Tillitt, *Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure*, **Crit. Rev. Toxicol.**, 30:4 (2000) 347-570.
- [134]. M.M. Bradford, *A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*, **Anal. Biochem.**, 72, (1976) 248-254.
- [135]. V.Y. Yuan, S.E. Rickard and L.U. Thompson, *Short-term feeding of its lignan has minor influence on in vivo hepatic antioxidant status in young rats.*, **Nutrition Research**, 19(8) (1999) 1233-1243
- [136]. U. S. Babu, G.W. Mitchell, P. Wiesenfeld, M. Y. Jenkins and H. Gowda., *Nutritional and hematological impact of dietary flaxseed and defatted flaxseed meal in rats.*, **Intern. J. Food Sci. and Nutr.**, 51 (2000) 109-117
- [137]. A.L. Schorno, M.C. Tulbek, C. Hall and F. Manthey, *Evaluation of physical and chemical properties of roasted flaxseed. IFT annual meeting book of abstracts*. Chicago, III.: Institute of Food Technologists. Abstract (2003) 14B-6, p 26.
- [138]. K.A. Manal – Rahman, M.M. Elham, R.A.M. Aly and G.A.R Omnia, *Re-Evaluation of Individual and Combined Garlic and Flaxseed Diets on Hyperlipidemic Rats*, **Pakistan J. Nutr.** 8 (1) (2009) 1-8.
- [139]. E.Ö. Oruç and N. Üner, *Effects of 2,4-Diamin on some parameters of protein and carbohydrate metabolism in the serum, muscle and liver of Cyprinus carpio*, **Environ. Pollut.**, 105:2 (1999) 267-272.
- [140]. S. Pandey, S. Parvez, I. Sayeed, R. Haque, B. Bin-Hafez and S. Raisuddin, *Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish Wallago attu (Bl & Schn.)*, **Sci. Total Environ.**, 309 (2003) 105-115.

- [141]. E. Stephenson, J. Sturve and L. Förlin, *Effects of redox cycling compounds on glutathione content and activity of glutathione- related enzymes in rainbow trout liver*, **Comp. Biochem. Physiol. C, Toxicol. Pharmacol.**, 133:3 (2002) 435-442.
- [142]. A. Ferrari, A. Venturino and A.M.P. D'Angelo, *Effects of carbaryl and azinphos methyl on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) detoxifying enzymes*. **Pestic. Biochem. Physiol.**, 88:2 (2007)134-142.
- [143]. A. Skouras, T. Lang, M. Vobach, D. Danischewski, W. Wosniok, J.P. Scharsack and D. Steinhagen., *Assessment of some innate immune responses in dab (*Limanda limanda L.*) from the North Sea as part of an integrated biological effects monitoring*, **Helgoland Mar. Res.**, 57: 3-4 (2003) 181-189.
- [144]. S.E. Rickard, V.Y Yuan, J. Chen and L.U. Thompson, *Dose effects of flaxseed and its lignan on N-methyl- N-nitrosourea induced mammary tumorigenesis*, **Nutr. Cancer**, 35 (1) (1999) 50-57
- [145]. J. Rajesha, N. Kotamballi, M. Chidambara Murthy, M. K. Kumar, B. Madhusudhan and G.A. Ravishankar, *Antioxidant potentials of flaxseed by in vivo model*, **J. Agric., Food Chem.**, 54 (11) (2006) 3794-3799.
- [146]. S.J. Hemmings and X. Song, *The effects of dietary flaxseed on the Fisher 344 rat. III. Protection against CCl₄- induced liver injury*, **Cell Biochem. and Funct.**, 23 (2006) 389-398.
- [147]. Mi-K Lee, S.H. Bok, T.S. Jeong, S.S. Moon, S.E. Lee, B.P. Yong and M.S. Choi, *Supplementation of naringenin and its synthetic derivative alters antioxidant enzyme activities of erythrocyte and liver in high cholesterol-fed rats*, **Bioorganic and Med. Chem.** 10 (2002) 2239–224.
- [148]. N.K. Mary, B.S. Shylesh and J. Padikkala, *Antioxidant and hypolipidemic activity of a herbal formulation-liposem*, **Indian J. Exp. Biology** 40 (2002) 901–904.

- [149]. NP Visavadiya, AV.R.L. Narasimhacharya, *Hypolipidemic and antioxidant activities of Asparagus racemosus in hypercholesteremic*, **Research Paper**, 37 6 (2005) 376-380.
- [150]. M. Makni, H. Fetoui, N.K. Gargouri, El M. Garoui, H. Jaber, J. Makni, T. Boudawara, N. Zeghal, *Hypolipidemic and hepatoprotective effects of flax and pumpkin seed mixture rich in α -3 and α -6 fatty acids in hypercholesterolemic rats*, **Food and Chem. Toxicol.** 46 (2008) 3714–3720.
- [151]. J.J. Whyte, R.E. Jung, C.J. Schmitt and D.E. Tillit, *Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure*, **Crit. Rev. Toxicol.**, 30 4 (2000) 347-570.
- [152]. J.V. Rao, *Biochemical alterations in euryhaline fish, Oreochromis mossambicus exposed to sub-lethal concentrations of an organophosphorus insecticide*, **Chemosphere**, 65 10 (2006) 1814- 1820.

ÖZGEÇMİŞ

İncilay GÖKBULUT, 1974 yılında Milas'ta (Muğla) doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Milas'ta tamamladı.

1992-1996 yılları arasında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümünde lisans eğitimini tamamladı ve Gıda Mühendisi olarak mezun oldu.

1997-2000 yılları arasında İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya A.B.D'da yüksek lisansını tamamladı ve "Bilim Uzmanı" ünvanını aldı.

08.10.2002 tarihinde İnönü Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde araştırma görevlisi olarak çalışmaya başladı.

09.2003 tarihinde başladığı doktora öğrenimine İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji A.B.D 'da halen devam etmektedir.

Evli ve iki çocuk annesidir.