

**T. C.
FIRAT UNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DIYETE SOY İSOFLAVON İLAVESİNİN BILDİRCİNLERDE
(*COTURNIX COTURNIX JAPONICA*) KARACİĞER VE KAS
DOKULARINDAKİ DELTA 9, 6, 5 DESATÜRAZ ÜRÜNLERİ VE
KOLESTEROL ÜZERİNE ETKİLERİ**

Buket ÇETİNTAŞ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

ELAZIĞ, 2006

**T. C.
FIRAT UNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DİYETE SOY İSOFLAVON İLAVESİNİN BILDİRCİNLERDE
(*COTURNIX COTURNIX JAPONICA*) KARACİĞER VE KAS
DOKULARINDAKİ DELTA 9, 6, 5 DESATÜRAZ ÜRÜNLERİ VE
KOLESTEROL ÜZERİNE ETKİLERİ**

Buket ÇETİNTAŞ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Bu tez 10/ 03/2006 tarihinde aşağıda belirtilen jüri tarafından oybirliği ile başarılı olarak değerlendirilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Ökkeş YILMAZ

Üye: Prof. Dr. Kazım Şahin

Üye: Doç. Dr. Eyüp Bağcı

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun .../...../..... tarih vesayılı kararıyla onaylanmıştır.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalıőmasının planlanmasında, yürütülmesinde ve çalıőmalarım süresince destek ve ilgisini esirgemeyen bilgi tecrübe ve hoşgörülerinden yararlandığım danışman hocam Sayın Doç. Dr. Ökkeş YILMAZ'a sonsuz saygı ve Őükranlarımı sunarım.

Çalışmanın, hayvanlar, hayvanların beslenmesi ve isoflavon karıőımların uygulanmasında ve dokuların alınmasında yardımlarını gördüğüm Veteriner Fakültesi Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Sayın Prof. Dr. Kazım ŞAHİN Bey'e teşekkür ederim.

Buket ÇETİNTAŞ

ŞEKİLLER LİSTESİ	II
TABLolar LİSTESİ	III
ÖZET	V
SUMMARY	VI
1. GİRİŞ	
2. MATERYAL ve METOD	9
2. 1. Kimyasal Maddeler ve Organik Çözücüler	9
2. 2. İnceleme Materyali	9
2. 3. Kullanılacak Yardımcı Aletler ve Cihazlar	9
2. 4. Deney Hayvanları	9
2. 5. Doku Örneklerinin Alınması	9
2.6. Biyolojik örneklerin lipid bileşimi içindeki kolesterol miktarının HPLC cihazı ile Analizi	10
2.7. Biyolojik örneklerdeki ADEK vitaminlerinin miktarının HPLC cihazı ile Analizi	10
2.8. Redükte ve okside glutatyon moleküllerinin izolasyonu ve HPLC cihazı ile analizi	11
2. 9. Lipidlerin Ekstraksiyonu	11
2. 10. Yağ Asidi Metil Esterlerinin Hazırlanması	11
2. 11. Yağ Asidi Metil Esterlerinin Gaz Kromatografik Analizi	12
3. BULGULAR	12
3. 1. ADEK vitaminleri, kolesterol ve glutatyon moleküllerinin değişimi	20
3. 2. Yağ asitlerinin değişimi	21
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	41
5. KAYNAKLAR	46

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 1. Kolesterol standardına HPLC kromatogramı	12
Şekil 2. Kolesterol standardı ile dokudaki kolesterol molekülünün karşılaştırıldığı HPLC kromatogramı	13
Şekil 3. Karaciğer dokusundan izole edilen kolesterol molekülüne ait HPLC kromatogramı	13
Şekil 4. Kas dokusundan izole edilen kolesterole ait pik	14
Şekil 5. Yağda çözünür vitaminler ve antioksidan vitaminlerin HPLC cihazında analizinden elde edilen kromatogram	14
Şekil 6. Dokulardaki ADEK vitaminleri	15
Şekil:7. Yağda çözünür vitaminler ve antioksidan vitaminlerin HPLC cihazında analizinden elde edilen kromatogram	15
Şekil 8. Dokulardaki retinol kromatogramı	16
Şekil 9. GSH ve GSSG standartlarına ait HPLC kromatogramı	16
Şekil 10. GSH ve GSSG standartlarının dokudan izole edilen kromatogramla karşılaştırılması	17
Şekil 11. Yağ asidi metil esteri standartlarına ait GC kromatogramı	17
Şekil 12. Kas dokusu yağ asidi metil esteri ait GC kromatogramı	18
Şekil 13. Karaciğer dokusu yağ asidi metil esteri ait GC kromatogramı	18

TABLULAR LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1.1. 25 mg'lık isoflavon karışımında bulunan bileşenler	4
Tablo 1.1. Bildircin ve tavuk yumurtalarının kimyasal kompozisyonu (%)	8
Tablo 1.2. Bildircin ve tavuk yumurtalarının içerdiği mineral ve vitaminler	8
Tablo 1.3. Gaz kromatografik analizinde elde edilen yağ asidi metil esterlerin ait değerler	19
Tablo 3.1: Karaciğer dokusundaki ADEK vitaminlerinin değişimi	22
Tablo 3.2: Karaciğer dokusundaki ADEK vitamin miktarlarının istatistiksel karşılaştırılması	23
Tablo 3.3. (Tablo 2'nin devamı) Karaciğer dokusundaki ADEK vitamin miktarlarının istatistiksel karşılaştırılması	24
Tablo 3. 4. Kas dokusundaki ADEK vitaminlerinin değişimi	25
Tablo 3.5. Kas dokusundaki ADEK vitamin miktarlarının istatistiksel karşılaştırılması	26
Tablo 3.6. (Tablo 5'in devamı) Kas dokusundaki ADEK vitamin miktarlarının istatistiksel karşılaştırılması	27
Tablo 3.7: Kas dokusundaki yağ asidi miktarının değişimi	28
Tablo 3. 8. (Tablo 7'nin devamı) Kas dokusundaki yağ asidi miktarının değişimi	29
Tablo 3. 9. Kas dokusundaki yağ asidi bileşiminin gruplar arasındaki istatistiksel karşılaştırılması	30
Tablo 3.10 (Tablo 9'un devamı) Kas dokusundaki yağ asidi bileşiminin gruplar arasındaki istatistiksel karşılaştırılması	31
Tablo 3.11: (Tablo 10'un devamı) Kas dokusundaki yağ asidi bileşiminin gruplar arasındaki istatistiksel karşılaştırılması	32
Tablo 3.12: Karaciğer dokusundaki yağ asidi miktarının değişimi	33
Tablo 3. 13: (Tablo 12'nin devamı) Karaciğer dokusundaki yağ asidi miktarının değişimi	34
Tablo 3. 14: Karaciğer dokusundaki yağ asidi bileşiminin gruplar arasındaki istatistiksel karşılaştırılması	35
Tablo 3.15 (Tablo 14'ün devamı): Karaciğer dokusundaki yağ asidi bileşiminin gruplar arasındaki istatistiksel karşılaştırılması	36
Tablo 3.16 (Tablo 15'in devamı): Karaciğer dokusundaki yağ asidi bileşiminin gruplar arasındaki istatistiksel karşılaştırılması	37

Tablo 3.17 Kas ve karaciğer dokularındaki kolesterol, GSH, GSSG miktarlarının değişimi	38
Tablo 3.18 (Tablo 17'nin devamı): Kas ve karaciğer dokularındaki kolesterol, GSH ve GSSG miktarlarının gruplar arasındaki istatistiksel karşılaştırılması	39
Tablo 3.19 Kas ve karaciğer dokularındaki kolesterol, GSH ve GSSG miktarlarının gruplar arasındaki istatistiksel karşılaştırılması	40

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DİYETE SOY ISOFLAVON İLAVESİNİN BILDIRCINLARDA (*COTURNIX COTURNIX JAPONICA*)
KARACİĞER VE KAS DOKULARINDAKİ DELTA 9, 6, 5 DESATÜRAZ ÜRÜNLERİ VE
KOLESTEROL ÜZERİNE ETKİLERİ

Buket ÇETİNTAŞ

Fırat Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
2006, Sayfa: 50

Bu çalışmada, bildircinlarda (*Coturnix coturnix japonica*) diyeteye ilave edilen iki farklı isoflavon dozunun karaciğer ve kas dokuları üzerindeki etkileri araştırıldı. Kas ve karaciğer dokularında, yağ asidi oranları, ADEK vitaminleri ve glutatyon molekülleri (GSH ve GSSG) üzerine etkileri incelendi.

Bulgularımıza göre, karaciğer dokusunda, tokoferol, D2 ve D3 vitamin miktarlarının kontrol grubuna göre, 200 mg'lı grupta azaldığı halde, 800 mg'lı grupta arttığı saptandı ($p<0,001$). δ -tokoferol miktarının kontrol grubuna göre 800 mg isoflavon verilen grupta arttığı belirlendi ($p<0,04$). Kolesterol miktarı, her iki isoflavon grubunda azaldığı saptandı ($p<0,001$). Glutatyon (GSH) miktarı kontrol grubuna göre 200 mg'lı grupta azaldığı halde ($p<0,03$), 800 mg'lı grupta arttığı saptandı ($p<0,05$). GSSG miktarının 200 mg'lı grupta arttığı halde ($p<0,02$), 800 mg'lı grupta kontrol grubuna göre değişim gözlenmedi. ($p>0,05$). Kas dokusunda, D2 vitamini miktarının 200 mg'lı grupta azaldığı halde ($p<0,002$), 800 mg'lı grupta arttığı; D3 vitamin miktarının kontrol grubuna göre her iki grupta da azaldığı belirlendi ($p<0,001$). Kolesterol miktarı, 800 mg verilen grupta kontrol grubuna göre azaldığı ($p<0,001$); GSH miktarının ise kontrol grubuna göre 200 mg'lı grupta azaldığı halde ($p<0,04$), GSSG miktarının iki isoflavon grubunda azaldığı saptandı ($p<0,002$, $p<0,02$).

Kas dokusunda palmitik, oleik, dokosatetraenoik asitlerin kontrol grubuna göre isoflavon verilen gruplarda yükseldiği belirlendi ($p<0,001$, $p<0,01$). Stearik, eikosatrienoik, araşidonik, eikosapentaenoik, dokosaheksaenoik asitlerin kontrol grubuna göre her iki isoflavon dozu uygulanan grupta azaldığı saptandı ($p<0,001$). Karaciğer dokusunda, stearik asitin 200 mg'lı grupta kontrol grubuna göre azaldığı halde ($p<0,05$), oleik asitin aynı grupta arttığı belirlendi ($p<0,001$). Linoleik, linolenik, eikosatrienoik, araşidonik ve dokosahekzaenoik asitlerin miktarları 200 mg isoflavon uygulanan gruplarda azaldığı saptandı. Deney sonunda, karaciğer ve kas dokularında uygulanan isoflavon miktarının değişik biyokimyasal parametrelerde farklı etkilere sahip olduğu belirlendi. Bazı biyokimyasal parametrelerde doza bağlı olarak etkili olduğu saptandı.

Anahtar kelimeler: İsoflavonlar, yağ asitleri, ADEK vitaminleri, glutatyon (GSH ve GSSG), kas, karaciğer, bildircinlar (*Coturnix coturnix japonica*)

SUMMARY

MASTER THESIS

EFFECTS OF SOY ISOFLAVON ON THE DELTA^{9,6,5} DESATURASE PRODUCTS AND
CHOLESTEROL LEVELS OF LIVER AND MUSCLE IN QUAIL (*COTURNIX COTURNIX JAPONICA*)

Buket ÇETİNTAŞ

Firat University
Graduate School of Natural and Applied Science
Department of Biology
2006, Page: 50

In this study the effects of two different doses of isoflavon regarding the fatty acid composition, vitamins ADEK and glutathione molecules in the liver and muscle tissue of quail (*Coturnix coturnix japonica*) were examined.

Based on our results, the level of vitamin D2 was decreased in group fed with 200 mg isoflavon whereas its level was increased with 800 mg isoflavon application however, cholesterol level was low at this doses while the level of GSH was lower with 200 mg isoflavon application compared with control. GSSG level was decreased with any applied dose.

It was also found that the oleic acid and palmitic acid level of muscle tissues of isoflavon groups were higher than that of control. But, at this group stearic acid, level was lower than control groups.

The stearic, linoleic, linolenic, and arachidonic acids application 200 mg isoflavon of liver tissues were lower than that of control, but only oleic acid was exceptional, which was higher than that of control.

Key words: Isoflavones, fatty acids, vitamins E and D, muscle, liver, glutathione (GSH and GSSG), *Coturnix coturnix japonica*.

1. GİRİŞ

Bütün canlılar, hem gelişmeyi sürdürme hem de sağlıklı dokuların bakımını ve sürekliliğini sağlamak için esansiyal amino asitler ve yağ asitlerine ihtiyaç duyar. Sadece bitkisel organizmalar ihtiyaç duydukları bu molekülleri doğal olarak kendileri sentezleyebilmektedir. Hayvanlar ve insanlar bunların sentezini gerçekleştiremediğinden hazır olarak besinlerle alarak, bunları kendi metabolizmaları içinde dönüştürmek zorundadırlar [1-3].

Bu hazır besin kaynakları diğer hayvanlar ve bitkilerdir. İnsan vücudunun günlük ihtiyacını karşılayan proteinler geleneksel olarak et, tavuk, balık, yumurta, süt gibi hayvansal kaynaklarla, pirinç, mercimek gibi bitkilerden elde edilmektedir [1-3].

Bir insanın; vücut ağırlığı açısından incelendiğinde, her kilo için günde en az 0.5 gram protein tüketmesi gerekmektedir. Protein tüketimi, tüketici için herhangi bir sonuç yaratmaksızın üçe katlanabilir, ancak kişilerin ihtiyacı yaş, enerji kullanımı, iklim özellikleri gibi birçok nedene bağlı olarak değişebilir [4].

Bir proteinin besin değeri esansiyal amino asit içeriğinin miktarıyla belirlenir. Esansiyal amino asitler insan vücudu tarafından üretilmediği için çeşitli besin kaynaklarından elde edilmek zorundadır. Bundan dolayı bir proteinin kalitesini, içerdiği amino asitlerin kompozisyonu belirlemektedir. Soya fasülyesi amino asit kompozisyonu açısından, yukarıda sayılan diğer gıda maddelerinin yanı sıra et, süt ve yumurta ile karşılaştırılabilir. Soya proteini, bu amino asitler içinde lysine açısından çok zengin olmakla birlikte yeteri kadar metionin ve sistein içermemektedir [1-4]. Bu nedenle sadece soya proteinine bağlı bir diyet uzun vadede sorunlara yol açabilir. Bunun yanısıra, buğday unundaki protein soya proteinine göre tam ters yapıya sahiptir: Buğday ununda metionin ve sistein oranları yüksek, lizin oranı düşüktür. %90 buğday unu ile %10 soya unundan oluşan bir karışım insan vücudu için gereken bütün amino asitleri dengeli bir şekilde ihtiva eden mükemmel bir protein kaynağıdır.

Soya, papilionaceus çiçek familyasına ait olan soya fasülyesi (*Glycine max*) baklagil taneleri içinde en yüksek yem değerine sahiptir. %18 -21 yağ ve %38 ham protein içerir. Soya fasülyesinin sindirilme derecesi yüksektir. Yapısında bulunan tripsin inhibitörü ve guatrojenik maddeler nedeniyle tek mideli ve kanatlı hayvanların beslenmesinde işlem görmeden kullanılması doğru değildir. Bunların dışında soya fasülyesinde bulunan diğer antinutrisyonel faktörler raşitojenik, üreaz ve vitamin B₁₂ 'dir.[5].

Fasülye taneleri 3-5 santim büyüklüğündeki keseciklerin içinde gelişir ve her keseciğin içinde yaklaşık olarak 2-3 fasülye bulunur. Bu fasülyelerin büyüklük ve şekli farklı olabilir. Bazı fasülyeler iri bazıları ise ufaktır. Uzun, yuvarlak ya da oval şekilli olabilirler [6].

Genellikle sarı ya da yeşil olan soya fasülyeleri kimi zaman cinsine göre kahverengi, mor, siyah ya da benekli olabilmektedir. Soya fasülyesi, makineler tarafından, mayıs ortasında

ekilir. Eylül ya da Ekim ayları da büyük makinelerin kullanıldığı hasat mevsimidir. Hasat mevsiminin başında soya fasülyeleri kahverengidir, çünkü fasülyeler olgunlaşmadan bitkinin yaprakları kurumuştur. Bitkinin geri kalanı dallar ve soya fasüyelerini barındıran keseciklerden ibarettir. Hasat mevsiminde toplanan soya fasülyesi hiçbir işlem yapılmadan nakliye araçlarına yüklenir ve işleme birimlerine aktarılır.

Amerika Birleşik Devletleri tüm dünyadaki soya fasülyesi üretiminin yaklaşık olarak 2/3'sini gerçekleştirmektedir. Kalan 1/3'lük pay ise Brezilya, Arjantin ve Çin tarafından paylaşılmaktadır.

Soya fasülyesi, sterol kaynaklı bileşenler (isoflavonlar) açısından (2-4 mg/gram) zengindir [8]. Soyada en yoğun olarak bulunan iki madde "daidzein" ve "genistein" maddeleridir. Bunlar doğal östrojenden yaklaşık olarak 1000 kat daha az östrojenik güce sahiptir ve bu özellikleri ile bağlantılı olarak birkaç fizyolojik etkisi bulunmaktadır [9].

Esas olarak soya fasülyesinde bulunan ve flavonoidlerin bir grubu olan isoflavonların çok yüksek biyolojik aktivitelere sahip olduğu belirlenmiştir. Soya fasülyesi başlıca isoflavonlar, saponinler, fitik asit ve fitosterollerin en zengin kaynağı olarak bilinmektedir. İsoflavonlar fenolik bileşiklerin sınıfındadır. Bu bileşik grubu içinde daidzein, glistein ve genistein yer almaktadır [10-12]. Bu bileşikler soya fasülyesinde ya glukosidler ya da serbest formda glukanlar olarak bulunur [13, 14]. Genistein soyada en fazla bulunan isoflavondur. Soyada mevcut olan bu fitokimyasalların; kanser, kalp hastalıkları ve diyabetin önlenmesinde başlıca rol oynadığını destekleyen çok önemli bulgular mevcuttur [15, 16].

Birçok epidemiyolojik çalışmalarda, isoflavon bakımından zengin diyetlerin tüketilmesi sonucu meme, prostat ve kolon kanseri gibi kanser türlerinin ortaya çıkış oranının azaldığı saptanmıştır. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda, soya posası ihtiva eden bütün bileşenlerin serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesinde ve lipid peroksidasyonunu önlemede güçlü antioksidan etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca soyada mevcut olan fitosterollerin antikolesterol özelliklere sahip olduğu belirtilmiştir [17, 18].

Et proteininin bir bölümünün soya proteini ile değiştirilmesi, özellikle yüksek kolesterol seviyesine sahip kişilerde (240 mg/dl ve üzeri) kandaki kolesterol oranını düşürdüğü ileri sürülmüştür. Kanda yüksek oranda bulunan kolesterol, kalp krizi ve felç durumu ile ilişkilendirilmektedir [19]. Bu nedenle, kandaki kolesterolü ve daha da önemlisi seyrek yoğunluğa sahip lipid oranını (LDL) düşürmek insan sağlığı için büyük önem taşımaktadır [20].

İsoflavon ve soya proteinleri osteoporoz (yaşın ilerlemesiyle birlikte kemiklerde meydana gelen erime) riskini azaltmaktadır. Kemik içinde yer alan kalsiyum sürekli bir dönüşüm halindedir, yani kemik matriksinden çıkıp yenilenmektedir. İlerleyen yaşla birlikte bu yenilenme yavaşlar ve etkinliğini yitirir. Bu da yaşlılarda genellikle kalça kırıkları ile

sonuçlanan kemik erimesine neden olur. Yaşlılarda da görülen kalça kırığı vakalarına, et tüketiminin yoğun olduğu bölgelerde, soyanın temel protein kaynaklarından biri olarak kullanıldığı ülkelere göre çok daha sık rastlanmaktadır. Yapılan çalışmalar, soya proteini tüketen gruplardaki deneklerin, beslenme düzenlerinde soyaya yer vermeyen kontrol grubuna göre kemik yoğunluğunun daha fazla (kemik erimesinin daha az) olduğunu göstermektedir [21].

Ayrıca, soya proteininin menapoz dönemindeki kadınlar üzerinde de olumlu etkileri olduğu gözlenmiştir. Her gün çeşitli soya ürünlerinden en az 30 gram soya proteini alan deneklerin, menapozda sık olarak görülen ateş basması gibi şikayetlerinde kayda değer bir azalma görülmüştür. Bu kadınlarda soya proteini tüketmeyen kontrol grubundaki deneklere göre, göğüs kanserine yakalanma risklerinin de daha düşük olduğu gözlenmiştir. Göğüs kanserinin yanısıra, diğer kanser çeşitleri de incelenmiştir. Bu çerçevede yapılan deneyler, isoflovanların test tüpü içinde kanser hücrelerinin büyümesini engellediğini göstermiştir [22].

Epidemiolojik araştırmalar, düzenli olarak soya proteini tüketen toplumlarda prostat ve mide kanserine, protein ihtiyacının büyük bir kısmını hayvansal ürünlerden karşılayan toplumlara oranla daha seyrek rastlandığını göstermektedir [23]. Esansiyel amino asitler bakımından çok zengin olan ve tüm dünyada çok çeşitli şekillerde diyetle, ve sağlıklı beslenmede yaygın olarak kullanılan soya fasülyesi dünyada 47 ülkede üretilmekte, bu ülkeler arasında Latin Amerika ülkeleri ve Çin çok önemli bir yer tutmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri, dünyada en fazla soya üreten ülkedir [24].

Soya proteini çok kaliteli olduğundan hem çocuklar hem yetişkinler için çok gereklidir. Aynı zamanda inek sütüne karşı allerjisi olanlar için de önemli bir protein kaynağıdır. Soya proteini kolayca sindirilebilir. Kolesterol içermemektedir. Bu yüzden diyetle de soya ürünleri kullanılabilir.

Soya yağı, bitkisel kökenli bir yağ olması nedeniyle kolesterol içermez. Bilindiği gibi yalnız hayvani kökenli yağlar kolesterol içerir. Bunun için özellikle, diyetle ve dengeli beslenmede soyanın yeri çok önemlidir. Ayrıca soya yağı linoleic ve linolenic isimli çok önemli iki yağ asidini içerir. Bu yağ asitlerinin gıdalarla mutlaka alınması gerekmektedir. Çok miktarda doymuş yağ içeren gıdaları tüketenlerde, kandaki LDL (düşük dansiteli lipoprotein) seviyesi artacağından kalp hastalığı riski artmaktadır [25]. Doymamış yağ asidi yüksek olan soya yağı ile beslenme durumunda ise, LDL oranının azaldığı belirlenmiştir. Soya lifi kandaki kolesterol seviyesinin azalmasında kan şekerinin düşmesine yardımcı olmaktadır. Araştırmalar soya lifi (fiber) kullanan kimselerde kolon kanserine yakalanma riskinin azalmakta olduğunu tespit etmektedir. Soya fasülyesi aynı zamanda zengin bir vitamin ve mineral madde kaynağıdır [26].

Kalsiyum, demir, çinko, fosfor, magnezyum ve B vitaminleri en fazla bulunan vitamin ve mineral maddelerdir. Bu nedenle sağlıklı bir yaşam ve dengeli beslenme için soya ve

soyadan yapılan ürünlerin kullanılması önerilmektedir. Soya hakkında yapılan çalışmalar, sahip olduğu özellikler bakımından bu gıdanın kalbi koruduğunu ortaya çıkarmıştır. Araştırmacılar soyada kalp hastalığını direkt olarak önleyen bileşimleri ayırmışlardır. Soya bazlı bir beslenme, hayvansal gıdalara oranla daha az yağ içerdiğinden kalbi korumaktadır. Bazı besinler, kandaki kolesterolü artırırken diğerleri kolesterol seviyesini düşürmektedir. Farklı soya çeşitlerinin kan lipid seviyeleri üzerindeki etkisi insanlar ve hayvanlar üzerinde yapılan araştırmalarla gözlenmiştir. Araştırmalar, soyanın kolesterol seviyesi düşüşünde önemli bir yere sahip olduğunu göstermiştir.

Yapılan bir araştırmada, üç ay boyunca düşük yağ ve düşük kolesterol diyeti uygulanan, yüksek kolesterol hastalarının diyetlerindeki hayvansal proteinler, soya proteinleri ile değiştirilmiştir. 3 hafta sonra bu hastaların kolesterolünde ortalama %21'lik bir düşüş olmuştur.

Benzer bir deney de, yüksek kolestrollü hastalarda soya proteini ile birlikte hergün 500 mg.'lık kolesterol de verilmiştir. Buna rağmen kolesterol seviyelerinde azalma görülmüştür. Dolayısıyla diyete kolesterolün eklenmesi, soyanın kolesterol seviyesini düşürmesine engel olmamıştır.

Tablo 1.1. 25 mg'lık isoflavon karışımında bulunan bileşenler.

		mg
Genistin	3.61	mg
Genistein	0.14	mg
Glycitin	7.35	mg
Glycitein	0.714	mg
Daidzin	12.15	mg
Daidzein	0.391	mg
Total Isoflavones	25	mg

Soyanın önemli ek besin (dietary supplement) gereksinimlerimizden isoflavonlar'ı en zengin ve istenilen yapıda içeren tek kaynak olması sebebiyle pek çok kronik hastalık riskini azaltıcı yöndeki etkisi bu ilginin gelişmesindeki en büyük nedendir.

Araştırmacılar tarafından, 50 yıl öncesinden beri varlığı bilinen ve bir tür "phytochemicals" yani "bitki kimyasalları" olarak adlandırılan isoflavonlar hakkında ancak 90'lı yıllarda bilimsel yazılar kaleme alınmıştır. Pek çok pytochemicals gibi bitki bünyesinde üretilen isoflavonlar, diğer bitki kimyasallarına kıyasla, doğada, gıda olarak tüketilebilen bitki türlerinin çok azında bulunmaktadır [27].

Soya; isoflovanların, diğerk gıdalarda bulunan bitkisel kimyasallardan daha yüksek konsantrasyonda bulunduğu tek bitkisel besin maddesidir. İsoflavonlara duyulan ilgi pek çok araştırmanın başlamasına neden olmuştur; şüphesiz ki bunların en önemlisi 1990 senesinde Ulusal Kanser Enstitüsü'nün isoflovanların kanseri önleyici potansiyel etkilerini ortaya çıkarmak için başlattığı çalışmalarıdır.

Araştırmacılar sadece bu etkilerle yetinmeyip, isoflovanların osteoporoziz, kalp hastalıkları ve yüksek tansiyon gibi diğerk hastalıklara olan etkilerini de bulmaya yönelmişlerdir. Soyanın bünyesinde bulunan iki ana isoflavon çeşidi genistein ve daidzein olarak adlandırılırlar. Yapısı itibari ile "bitkisel östrojen" (phytoestrogens) olarak isimlendirilen isoflovanlar, aynı östrojen gibi davranırlar ve östrojen reseptörlerine bağlanarak östrojenik etkiyi uygularlar [28].

Bununla beraber etkileri, normal östrojen aktivitesinin binde biri ile onbinde biri kadar olup, son derece düşüktür. Fakat soyalı besinleri tüketen insanlarda kandaki isoflavon düzeyi, endojen östrojen düzeyinin 10,000 katından daha yüksek seviyelere ulaşabilir. İsoflavonların kandaki bu yüksek konsantrasyonu, başta belirtilen ve göreceli bir kavram olarak betimleyebileceğimiz zayıf aktivite durumunu ortadan kaldırır. İsoflavonların sahip olduğu bu eşsiz güç yani östrojenik aktiviteleri benzersiz ve tamamen doğal olan bu maddelerin, menopoz sonrası kadınlara tatbik edilen östrojen hormonu tedavisine potansiyel bir alternatif olarak değerlendirilebileceğı yorumunu doğurmuştur. Araştırmalar, ayrıca isoflavonların, kalp hastalıkları ve osteoporoziz (kemik erimesi) gibi rahatsızlıklarda, yaşla beraber oluşan riskleri azaltıcı yönde rol oynadıklarını ve menopoz sonrası ateş basması gibi semptomların giderilmesinde etkili olduklarını ortaya koymuştur [29].

İsoflavonların bu hastalıklara karşı insan vücudunda ne tür bir mekanizma oluşturdukları ile ilgili araştırmalar devam etmektedir. Bunlarla birlikte, diğerk bir durum da isoflavonların endojen östrojen fazlalığına karşı uyguladıkları anti-östrojenik etkileridir. Böylece, isoflavonların göğüs ve endometriyal kanserler gibi hormonlarla ilişkili kanser risklerini azaltıcı yöndeki etkileri de açıklanmış olur. Burada önemle belirtmeliyiz ki, isoflavonların insan sağlığına faydaları sadece östrojenik veya antiöstrojenik etkileri ile sınırlı kalmaz. Yapılan yüzlerce çalışma, genistein isimli isoflavonun, hormon ilişkili olsun olmasın pek çok tipteki kanserli hücrenin (örneğin deri, prostat, akciğer, ve kolon kanseri gibi) oluşmasını engellediğini ortaya koymuştur [30, 31].

Genistein anormal hücre oluşmasına neden olan enzimlerin aktivitesini ortadan kaldırarak bu etkiyi sağlar. Bu durumu basit bir örnekle netleştirmek gerekirse, 1998 yılında A.B.D.'de her 15 dakikada bir prostat kanserli bir erkeğin ölümünün aksine, soyalı gıdaların tüketimine dayanan diyet alışkanlığı olan Japonya'da bu oranın Amerika'dakinin beşte biri olmasıdır. Zengin bir genistein kaynağı olan soyanın, bu derece düşük kanser oranını

yakalamadaki etkisi açıktır. Isoflavonlar soyanın protein içeriği ile birleşir ve gıda sanayiinde geniş kullanım imkanı bulan proteinlerinin faydalarını bir kat daha güçlendirirler. Diyetlerde et proteinin bir bölümünü soya proteini ile değiştirilmesi, özellikle yüksek kolesterol seviyesine sahip kişilerde (240 mg/dl) kandaki kolesterol oranını düşürürken, hem de birey başına günlük alınması gereken 50 mg'lık izoflavonun bir kısmının karşılanmasını sağlar [32].

Bütün bitkisel yağlar gibi, soya yağı kolestrolsüzdür. Doymuş yağlar açısından da fakirdir. Soya yağında omega-3 ve omega-6 adlarıyla bilinen iki tür yağ asidinin kendine özgü bir karışımı bulunmaktadır. Soya yağındaki omega-3 yağ asitleri kalp hastalığı riskini azalttığı kanıtlanan balık yağının içeriğindeki yağ cinsine benzer özelliktedir. Amerikalılar şu anda aldıkları kalorinin %37'sini yağdan elde etmektedirler [33].

Sülüngiller (Phasianidae) familyasına ait olan Bildircin (*Coturnix coturnix*) Avrupa, Asya, Afrika, Avustralya, Amerika, Yeni Gine'nin ekin, çayırılık ve fundalık alanlarında yaşamaktadır. 18-20 cm boyunda, küçük başlı, narin ve sert gagalı, eti için avlanılan göçmen bir kuştur. Ömürleri 15-20 yıl sürmektedir Boyalı, dağ, mavi, tepeli, bataklık ve Japon bildircinleri olmak üzere çeşitli türleri vardır. Tombul vücutlu, sırtı pas sarısı çizgili, kirli beyaz karınlı bir kuştur. Başu koyu kahverengi ve gözlerinin çevresi beyaz halkalıdır. Otlar, tahıl tarlaları ve bodur ağaçlıklı alanlarda gezinerek tohum, kurtçuk ve böceklerle beslenir. Yılda 2-3 defa kuluçkaya yatar ve 3 haftalık kuluçka süresi sonunda yavrular yumurtadan çıkar. Avrupa bildircinleri eylül-ekim aylarında Afrika'ya göç ederek kışı geçirir. Mayıs, haziranda tekrar Avrupa'ya dönerler. Gece alçaktan uçarak göç ettiklerinden ağ kurularak rahatlıkla yakalanırlar. Eti çok lezzetlidir [34].

Bildircinin zoolojik sınıflandırmadaki yeri aşağıdaki gibidir:

Sınıf	Aves (Kuşlar)
Takım	Galli
Alt takım	Galliformes (Kuş biçimliler)
Familiya	Phasionidae (Sülünler)
Cins	Coturnix
Tür	Coturnix coturnix (Bildircin) a) Coturnix coturnix coturnix (Bildircin) b) Coturnix coturnix japonica (Asya veya Japon bildircini)

Bildircinler, yaklaşık 6 haftada 160-200 gram ağırlığa ulaşırlar ve bu düzeyde 400-500 gram yem tüketirler. 5-6 haftalık yaşta kesim olgunluğuna erişirler. Karkas randımanı tavuğa benzer olarak yüzde 70'in üzerindedir. Küçük bir işletmede çok sayıda bildircin yetiştirmek mümkündür. Bir tavuğun ihtiyaç duyduğu yaşam alanında 8-10 bildircin yetiştirilir. Bildircin eti

tavuk etine göre daha lezzetlidir. Düşük oranda yağ içerir, fosfolipit yönünden zengindir. Diğer kanatlı etlerine göre karkasta kemik ve deri oranı daha az, et oranı daha fazladır. Tavuk yumurtasıyla karşılaştırıldığında protein miktarının daha fazla, mineral maddelerce daha zengin olduğu, kalori miktarı eşit olmasına karşı karbonhidratlarca daha zengin olduğu bilinmektedir.[35]

Bıldırcınların küçük yapılı olmaları, az yer kaplamaları, az yem tüketmeleri, hızlı büyümeleri, erken cinsel olgunluğa ulaşmaları ve kısa jenerasyon aralığı nedeni ile araştırmalarda başarı ile deney hayvanı olarak kullanılmaktadır. Çok kısa sürede yumurtlama ağırlığına ulaşmaları, çabuk kesim ağırlığına gelmeleri, üretim masraflarının düşüklüğü ve yapılan masraflara hızlı cevap vermeleri nedeniyle küçük işletmelerde de ekonomik üretimleri mümkündür. Bıldırcınlarda öne çıkan özellikler şunlardır:

- Bıldırcınların barındırılması için ihtiyaç duyulan alan son derece küçüktür. Ergin bir çift bıldırcın için 200 cm²'lik alan yeterlidir. Kullanılan kafeslerin çok katlı olabileceği de dikkate alınarak küçük bir odada yüzlerce bıldırcın besleme imkanı sağlanabilir.

- Bıldırcınların üretim giderleri düşüktür. Yumurtlama dönemindeki bir bıldırcın günde 25-40 gr yem tüketir. Bıldırcın eti üretimi için beslenen bıldırcınlar ise kesim yaşı olan 5-6. haftaya kadar 400-500 gr kadar yem tüketirler.

- Bıldırcınların gelişme hızı oldukça yüksektir. Erkekler 35-40, dişiler 40-45 günde cinsel olgunluğa ulaşmaktadırlar.

- Bıldırcınlar, hastalıklara karşı tavuk ve diğer kanatlılara göre daha dayanıklıdırlar. Yetiştirilicikte aşılama yapmadan üretim yapmak mümkün olabilmektedir.

- Bıldırcınlar civciv döneminde, piliç döneminde ve yumurtlama döneminde farklı rasyonlarla beslenirler.

- Dişi bıldırcınlar (175-225g) erkeklerden (125-175g) daha ağırdırlar. Cinsiyet tayini 3. haftadan itibaren göğüs tüylerinin pigmentasyonuna bakarak rahatlıkla yapılabilir.

Tablo 1.1. Bildircin ve Tavuk Yumurtalarının Kimyasal Kompozisyonu (%)

	Bildircin Yumurtası			Tavuk Yumurtası		
	Sarı	Albumin	Bütün	Sarı	Albumin	Bütün
Su	48.90	87.36	74.25	49.18	88.20	73.98
Protein	15.70	11.19	13.17	16.21	10.09	12.65
Yağ	32.61	Eseri	1.02	32.95	0.03	11.32
Karbonhidrat	0.83	0.79	1.02	0.80	0.80	0.92
Toplam Kül	1.25	0.65	1.11	1.39	0.67	0.93

Tablo 1.2. Bildircin ve tavuk yumurtalarının içerdiği mineral ve vitaminler.

Mineraller	Bildircin Yumurtası	Tavuk Yumurtası
	Kalsiyum (mg)	59.0
Fosfor (mg)	220	181
Demir (mg)	3.8	2.4
Vitaminler		
Thiamine (mg)	0.12	0.08
Riboflavin (mg)	0.85	0.30
Niacin (mg)	0.10	0.07
Vitamin A (IU)	300	370

Araştırmamızda kullanılacak olan bildircin türü (*Coturnix coturnix japonica*) hem eti hem de yumurtası insan beslenmesinde kullanılan en değerli besin kaynaklarından biridir. Özellikle bildircin eti, balık etinden sonra en fazla monoenoik (tek çift bağlı) ve polienoik (ikiden fazla çift bağlı) yağ asitleri içeren bir besin kaynağıdır. Bir besin kaynağının değeri lipidler açısından, yapısındaki monoenoik ve polienoik yağ asitlerinin miktarı ile ölçülür.

Hayvansal organizmalarda tek çift bağlı yağ asitleri Delta 9 desaturaz enzimi (Steroil CoA desaturaz Δ^9) tarafından palmitik (16:0) ve stearik (18:0) asitlerin substrat olarak kullanılmasıyla palmitoleik (16:1, n 9, n 7) ve oleik asitler (18:1, n 9, n7) sentezlenir. Δ^9 desaturaz enzim aktivitesiyle gerçekleştirilen bu olay hücredeki dengenin korunmasında çok önemlidir. $\Delta^{6,5}$ desaturaz enzimleri tarafından linoleik asit (18:2, n6) ve linolenik asitlerin (18:3 n3) substrat olarak kullanılmasıyla uzun zincirli aşırı doymamış yağ asitleri sentezlenir. Bu enzimlerin aktivitesi ile sentezlenen eikosatrienoik (20:3, n6), araşidonik (20:4 n6), eikosapentaenoik (20:5 n3), dokosapentaenoik (22:5 n6 ve n3) ve dokosaheksaenoik asitler (22:6 n3) hücre membranında en fazla bulunan yağ asitleridir. Bu yağ asitleri oksidan ajanlara karşı çok duyarlıdır ve hücredeki antioksidan sistemler tarafından korunur [36-40].

Bu çalışmada rasyona ilave edilen iki farklı dozdaki isoflavonla beslenen bıldırcınların kas ve karaciğer dokularındaki Δ^9 ile $\Delta^{6,5}$ desaturaz enzimlerinin ürünleri üzerinde antioksidan ve biyolojik etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca yağda çözünür vitaminler ile kolesterol miktarının belirlenmesi çalışmanın amaçları arasında yer almaktadır.

2.MATERYAL VE METOT

2.1. Kimyasal Maddeler ve Organik Çözücüler

Asetonitril, metanol, n-hekzan, izopropanol, yağ asidi metil esteri standartları (doymuş ve doymamış türleri), kolesterol standartı, orto-fosforik asit, sülfürik asit, metafosforik asit (MPA) (Sigma Chemical Company).

2.2.Kullanılan Yardımcı Aletler ve Cihazlar

Santrifuj, gaz kromatografi, HPLC cihazı, vorteks, etüv, otomatik pipetler, derin dondurucu, vida kapaklı deney tüpleri ve santrifüj tüpleri.

2.3. Araştırma Materyali

Deneyel uygulama; ağırlıkları yaklaşık 200gr olan 5 aylık Japon bıldırcınları (*Coturnix coturnix japonica*) üzerinde yapıldı.

2.4. Deneme Düzeni

Deneyel çalışmada kullanılan bıldırcınlar (*Coturnix coturnix japonica*), İnsanay Ay Firmasından sağlandı. Firmadan alınan bıldırcınlar deneyel uygulamanın yapılacağı yere getirildikten sonra bir hafta süreyle ortama adapte olmaları sağlandı. Bunun için penceresinde havalandırma tertibatı bulunan odada ve özel olarak hazırlanmış kafeslerde bakıma alınan bıldırcınların, deneyel uygulamanın yapılacağı tarihe kadar bakımlarına devam edildi.

Bıldırcınlar her grupta 10 adet olmak üzere gruplara ayrıldı ve bunlardan birinci grup kontrol grubu (K), İkinci grup, 200 mg isoflavon uygulanan grup ve üçüncü grup, 800 mg isoflavon uygulanan grup olarak belirlendi. Kontrol grubu standart bıldırcın yemi ile libitum olarak beslendi. Uygulama esnasında 17 saat aydınlatma yapıldı. Deney sonunda hayvanlar kesildi; kas ve karaciğer dokuları alınıp analize kadar – 85 °C’de bekletildi.

2. 5. Doku Örneklerinin Alınması

Hayvanlar kesildikten hemen sonra kas ve karaciğer dokuları alındı. Bu doku kısımları, bekletilmeden % 0.9 serum fizyolojik ile yıkanarak, kandan temizlenmeleri sağlandı ve biyokimyasal işlemler yapıncaya kadar –85- 25 °C’de saklandı.

2.6. Biyolojik Örneklerin Lipid Bileşmi İçindeki Kolesterol Miktarının HPLC Cihazı ile Analizi

- 1- 0.3 g doku örneği tartıldı ve 2 ml Asetonitril/İzopropanol/Kloroform (40/40/20 v/v/v) karışımı ile 1 dakika süreyle homojenize edildi [41].
- 2- Doku homojenizatı 2 ml'lik ependorf tüpler içerisine alınarak 36000xg'de santrifüj edilerek doku pelletinden ayrıldı. Süpernatant kısımdan 1 ml otosampler viallerine alınarak HPLC cihazında analiz edildi.
- 3- Kolesterol analizinde mobil faz olarak % 70 Asetonitril ve % 30 İzopropanol karışımı kullanıldı. Mobil fazın 1 dakikada akış miktarı 1ml/dakika olarak belirlendi [42].
- 4- Kolesterol analizi için Supelcosil LC 18 DB (250 x 4.6 mm, 5 µm) veya Wakosil II 5C18 HG (250 x 4.6 mm, 5 µm) kolonlar kullanıldı. Analiz UV dedektörde yapıldı ve dedeksiyon dalga boyu 202 nm olarak belirlendi [43].
- 5- Supelcosil LC 18 DB marka kolonla yapılan analizde, kolesterolün kolondan çıkış süresinin (alınma süresi) 10 dakika içinde gerçekleştiği gözlemlendi. Kolesterol analizi ile ilgili veriler ve bilgiler Tablo 2, Şekil 5, 6, 7, 8'de görülmektedir.

2.7. Biyolojik Örneklerdeki ADEK Vitaminlerinin Miktarının HPLC Cihazı ile Analizi

- 6- 0.3 g doku örneği tartıldı ve 2 ml Asetonitril/metanol/izopropanol (60/20/20 v/v/v) karışımı ile 1 dakika süreyle homojenize edildi.
- 7- Doku homojenizatı 2 ml'lik ependorf tüpler içerisine alınarak 36000xg'de santrifüj edilerek doku pelletinden ayrıldı. Süpernatant kısımdan 1 ml otosampler viallerine alınarak HPLC cihazında analiz edildi.
- 8- HPLC analizinde mobil faz olarak % 75 Asetonitril ve % 25 metanol karışımı kullanıldı. Mobil fazın 1 dakikada akış miktarı 1ml/dakika olarak belirlendi.
- 9- ADEK vitaminlerinin analizi için Supelcosil LC 18 DB (250 x 4.6 mm, 5 µm) veya Wakosil II 5C18 HG (250 x 4.6 mm, 5 µm) kolonlar kullanıldı. Analiz UV dedektörde yapıldı ve dedeksiyon dalga boyu retinol (vitamin A) için 326 nm, vitamin E, D2 ve D3 vitaminleri için K1 vitamini için 215 nm olarak belirlendi.

2.8. Redükte ve Okside Glutasyon Moleküllerinin İzolasyonu ve HPLC Cihazı İle Analizi

Doku örneklerinden glutasyon moleküllerinin izolasyonu 50 mM NaClO₄ çözeltisi ve 4 mM ETDA çözeltisi ile yapıldı ve % 5'lik MPA çözeltisi ile proteinlerden ayrıldı. Bu işlem için aşağıdaki basamaklar uygulandı.

- 1- 300 mg doku örneği 2.5 ml NaClO₄ çözeltisi içinde homojenize edildi, santrifüj tüplerine aktarıldı ve 400 uL % 5'lik MPA çözeltisi ilave edilerek -25C'de 30 bekletildi.
- 2- Daha sonra 7000 x g'de 10 dk santrifüj edilerek, proteinler çöktürüldü ve süpernatant kısım, filtreden geçirilerek, otosampler viallerine alındı ve analize hazır hale getirildi.
- 3- Örneklerin HPLC analizi, Discovery RP Aminde C 16 (150x4.6, 5 µm) kolonuyla yapıldı. Mobil faz olarak NaClO₄ çözeltisi kullanıldı. Mobil faz akış hızı 1ml/dk olarak belirlendi. GSH ve GSSG'nin ayrılması 215 nm'de gerçekleştirildi [44].

2.9. Lipidlerin Ekstraksiyonu

Doku örneklerinden lipidlerin ekstraksiyonu 3:2 (v/v) hekzan izopropanol karışımının kullanıldığı Hara ve Radin [45] metoduyla yapıldı. Bunun için:

1g karaciğer ve kas dokusu Micra–D.8 homojenizatöründe 11000 rpm'de 1 dk. süre ile 3:2 (v/v) oranında 5 ml hekzan-izopropanol karışımı ile parçalandı. Doku homojenatı 15 ml'lik santrifüj tüplerine alınarak 15000xg'de santrifüj edilerek doku pelletinden ayrıldı. Süpernatant kısım ağzı kapaklı tüplere alınarak ikinci bir analize kadar – 25 C'de bekletildi. Dokuların parçalandığı organik çözücü karışımı içine % 0.01 Bütillenmiş hidroksi toluen ilave edildi (BHT).

2.10. Yağ Asidi Metil Esterlerinin Hazırlanması

Lipitler içinde bulunan yağ asitlerinin gaz kromatografik analizinin yapılabilmesi için polar olmayan uçucu ve kararlı yapıya sahip olan *metil esterleri* gibi türevlerine dönüştürülmesi gerekir. Christie [46, 47]. Metilasyon yönteme göre:

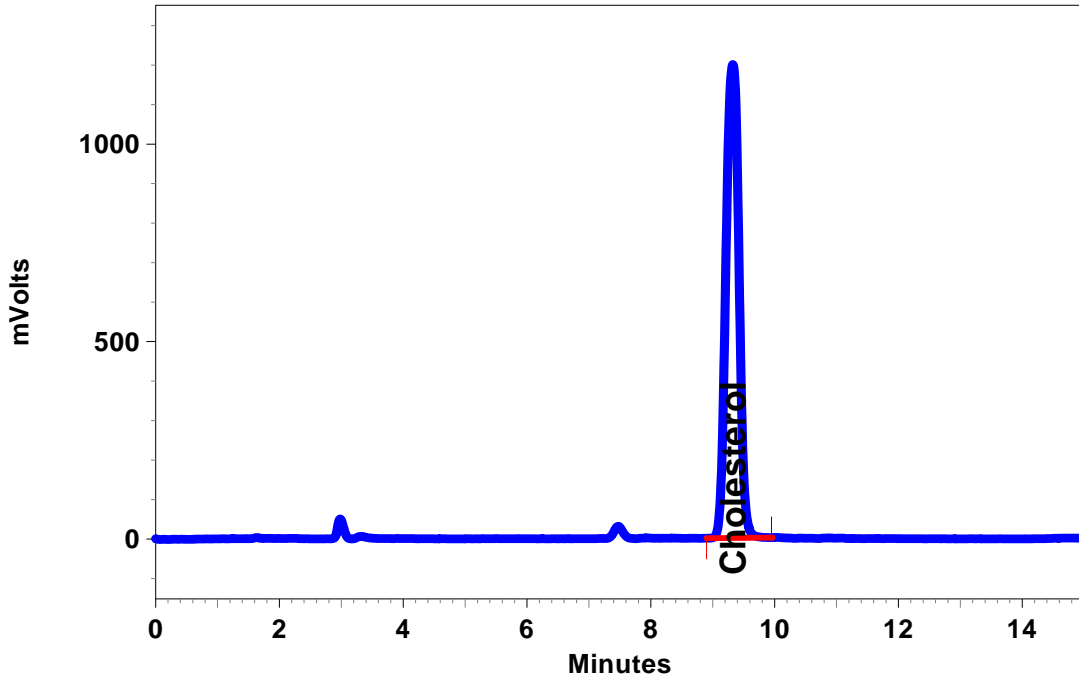
Metil esteri hazırlamak için hekzan/izopropanol fazı içindeki lipit ekstraktı 30 ml'lik sızdırma yapmayan deney tüplerine alındı. Üzerine % 2 'lik metanolik sülfürik asitten 5 ml ilave edildi, vorteks ile iyice karışmaları sağlandı. Bu karışım 50° C lik etüvde 15 saat süre ile metilleşmeye bırakıldı.12 saatlik süre sonunda, tüpler etüvden çıkarıldı oda sıcaklığına kadar soğutuldu ve 5 ml % 5 lik sodyum klorür ilave edilerek iyice karıştırıldı. Tüpler içinde oluşan yağ asidi metil esterleri 5 ml hekzan ile ekstrakte edildi ve hekzan fazı pipetle alınarak, 5 ml % 2 lik KHCO₃ ile muamele edildi ve fazların ayrılması için 4 saat bekletildi. Daha sonra metil esterlerini içeren karışım, 45 °C de ve azot akımı altında çözücüsü uçuruldu, 1 ml hekzan ile

çözülerek 2 ml'lik ağzı kapaklı otosampler vialleri içine alınarak gaz kromatografisinde analiz edildi.

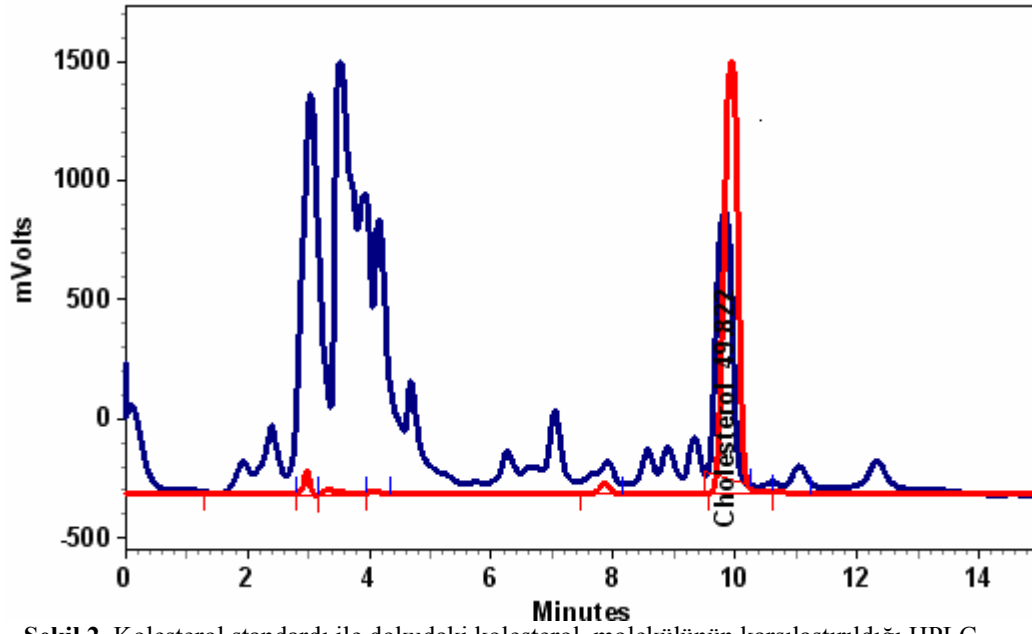
2.11. Yağ Asidi Metil Esterlerinin Gaz Kromatografik Analizi

Lipid ekstraktı içindeki yağ asitleri metil esterlerine dönüştürüldükten sonra SHIMADZU GC 17 ver. 3 gaz kromatografisi ile analiz edildi. Bu analiz için 25 m uzunluğunda, 0,25 µm iç çapında ve PERMABOND 25 mikron film kalınlığına sahip MACHERY-NAGEL (Germany) kapiller kolon kullanıldı. Analiz sırasında kolon sıcaklığı 120 - 220 °C, enjeksiyon sıcaklığı 240 °C ve dedektör sıcaklığı 280 °C olarak tutuldu. Taşıyıcı gaz olarak azot gazı kullanıldı. Analiz sırasında örneklere ait yağ asidi metil esterlerinin analizinden önce, standart yağ asidi metil esterlerine ait karışımlar enjekte edilerek (0.4 µl) her bir yağ asidinin alıkonma süreleri belirlendi. Bu işlemden sonra gerekli programlama yapılarak örneklere ait yağ asidi metil esterleri karışımlarının analizi yapıldı.

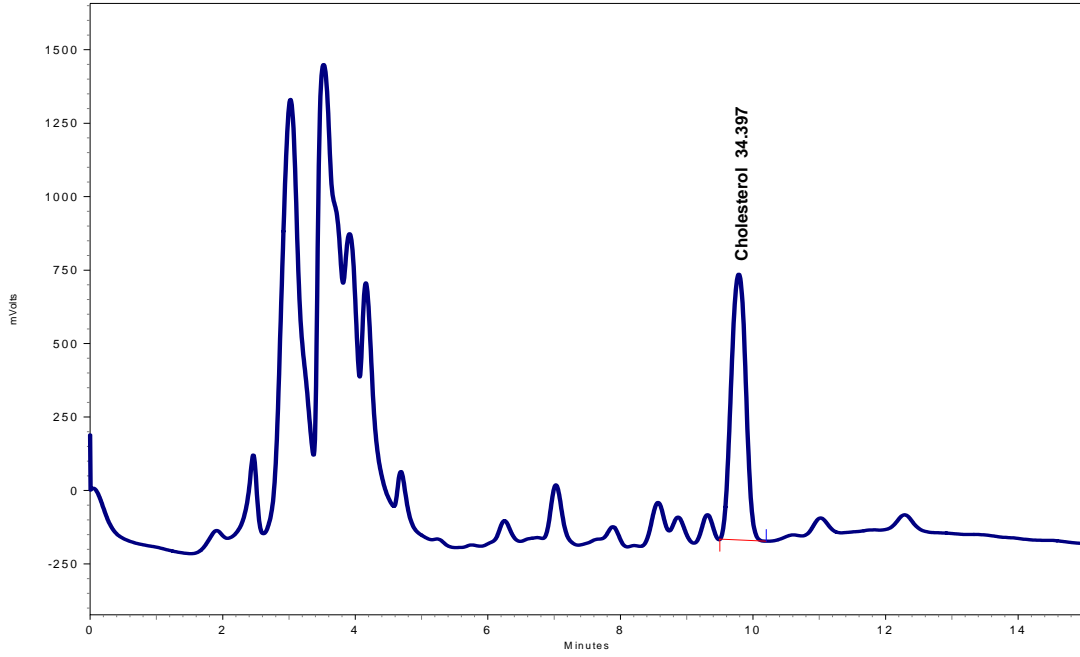
3.BULGULAR



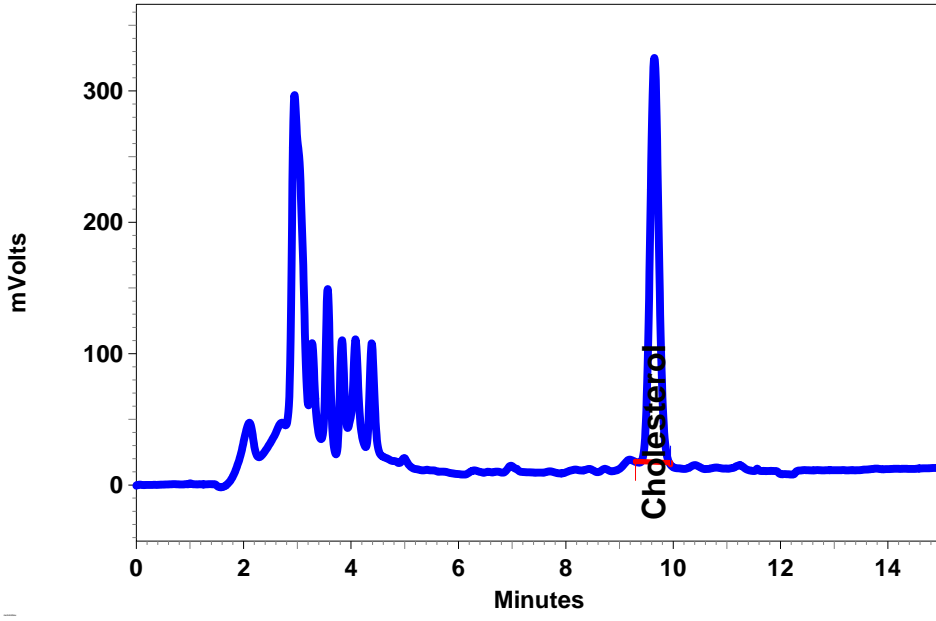
Şekil 1. Kolesterol standardına ait HPLC kromatogramı.



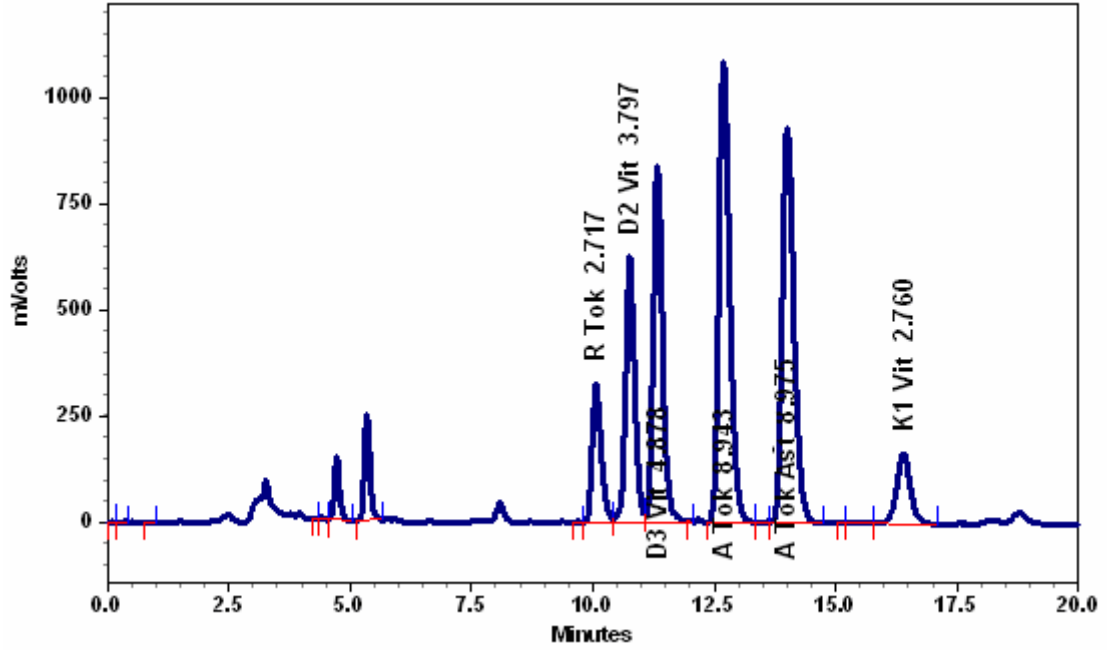
Şekil 2. Kolesterol standardı ile dokudaki kolesterol molekülünün karşılaştırıldığı HPLC kromatogramı.



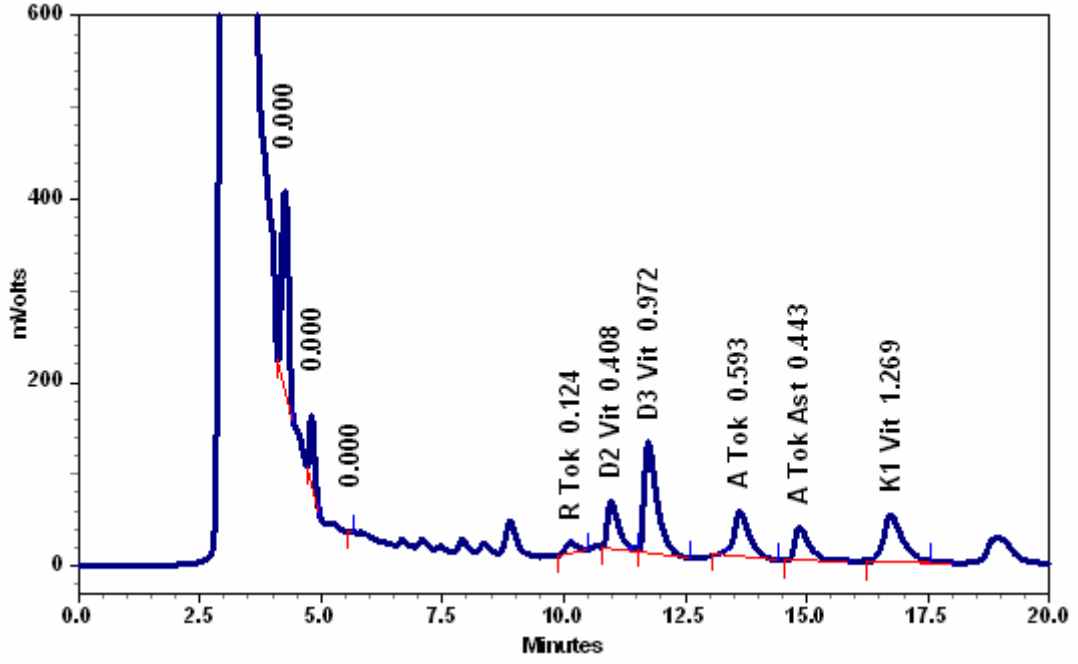
Şekil 3. Karaciğer dokusundan izole edilen kolesterol molekülüne ait HPLC kromatogramı.



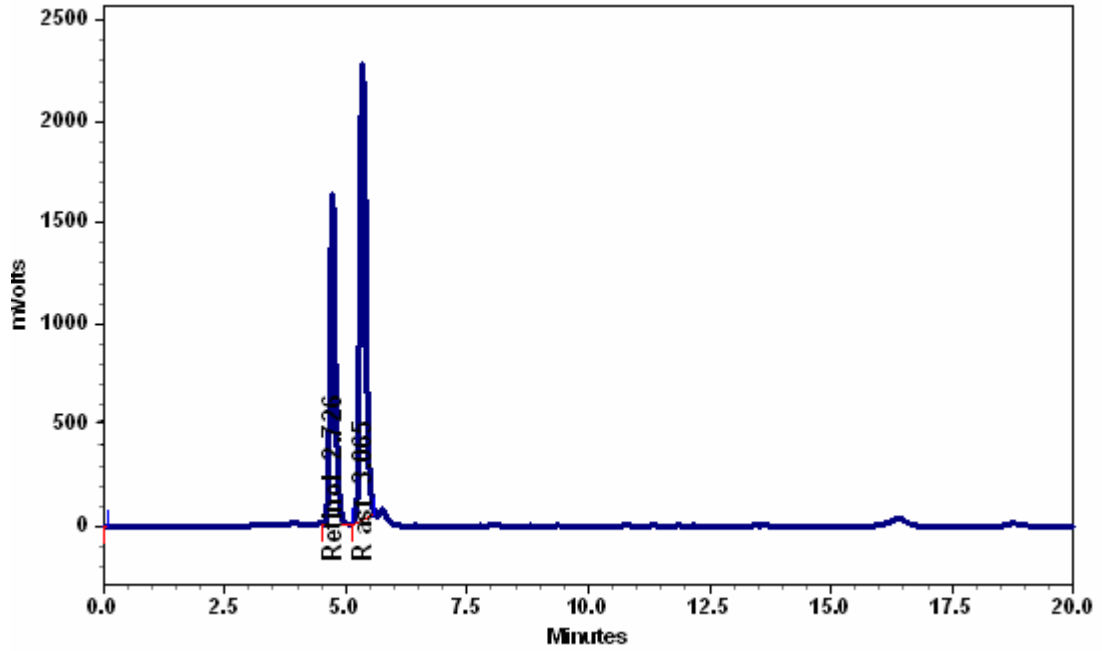
Şekil 4. Kas dokusundan izole edilen kolesterol molekülüne ait HPLC kromatogramı.



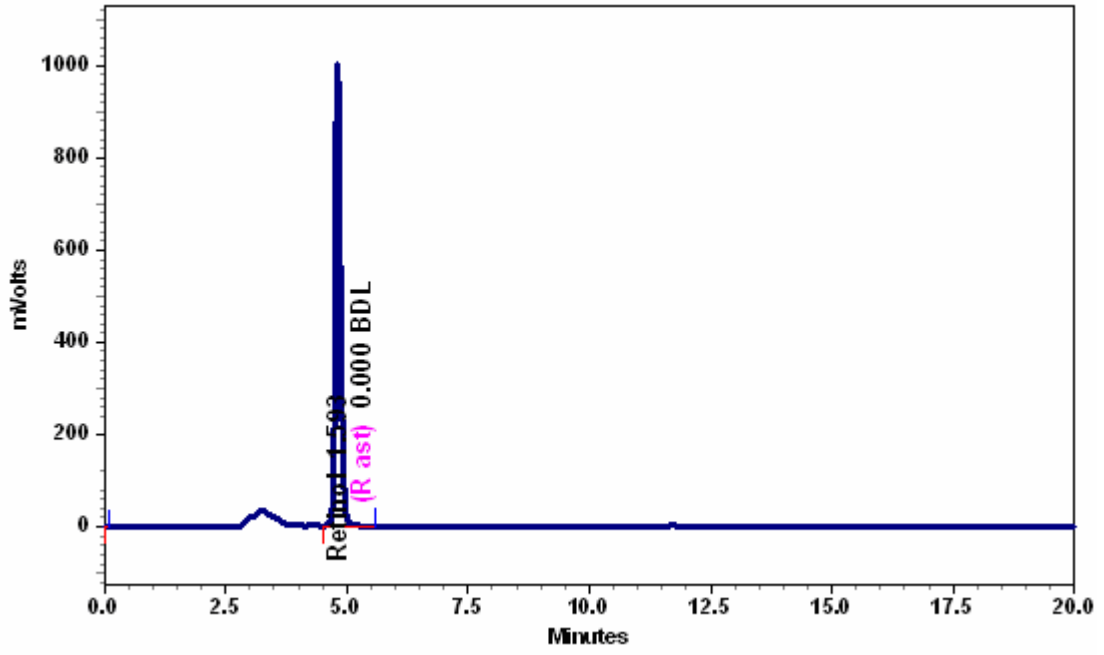
Şekil 5. Yağda çözünür vitaminler ve antioksidan vitaminlerin HPLC cihazında analizinden elde edilen kromatogram. Kolon: Supelcosil LC 18 DB (250x4.6, 5 µm), Mobil faz: Asetonitril (ACN) + Metanol (% 75 + % 25). Flow oranı: 1 ml / dakika.



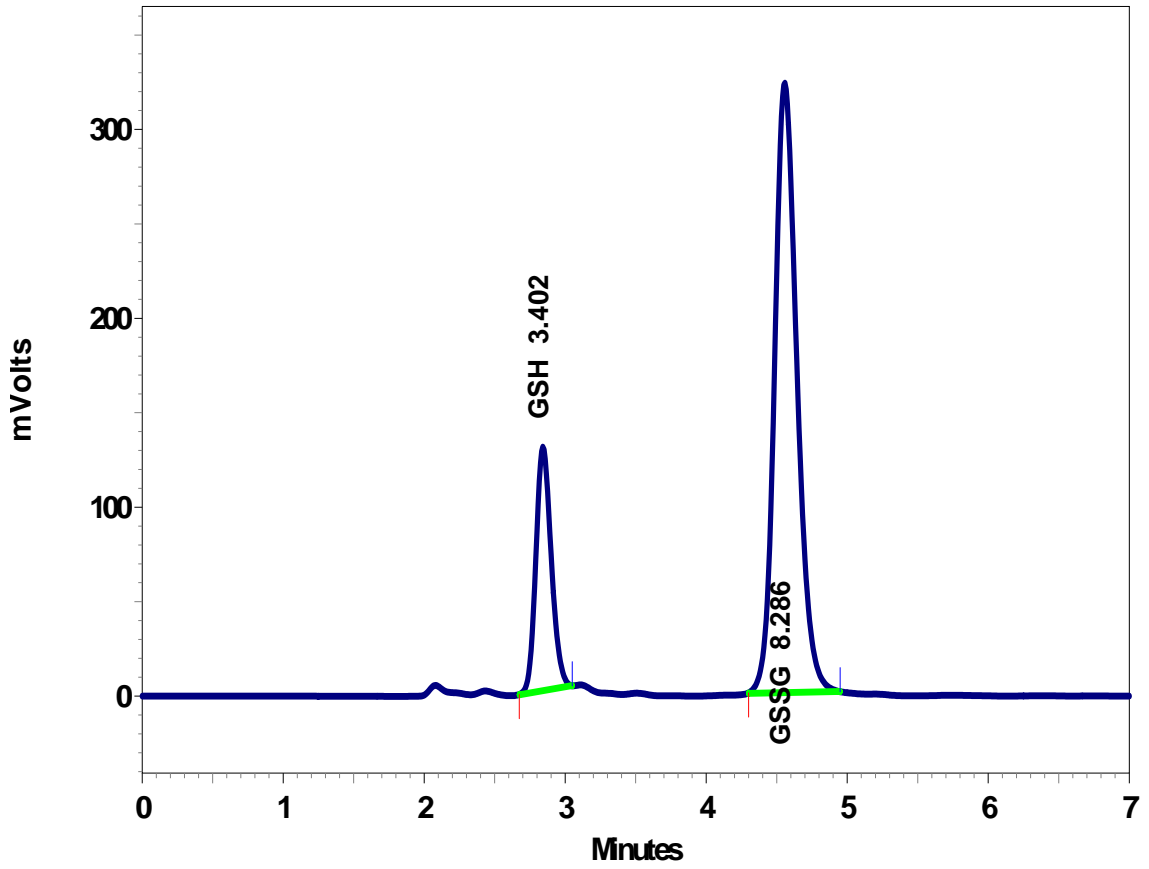
Şekil 6. Dokudaki ADEK vitaminlerine ait HPLC kromatogramı.



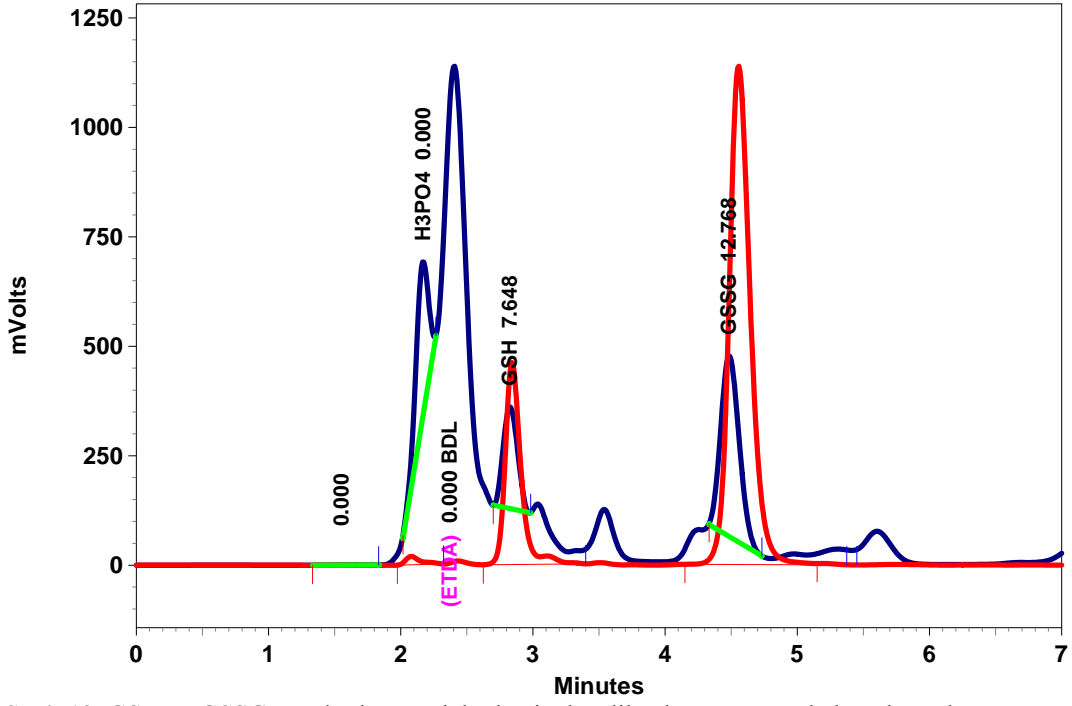
Şekil:7. A vitamini ve retinol asetatın HPLC cihazında analizinden elde edilen kromatogram. Kolon: Supelcosil LC 18 DB (250x4.6, 5 µm), Mobil faz: Asetonitril (ACN) + Metanol (% 75 + % 25). Flow oranı: 1 ml / dakika.



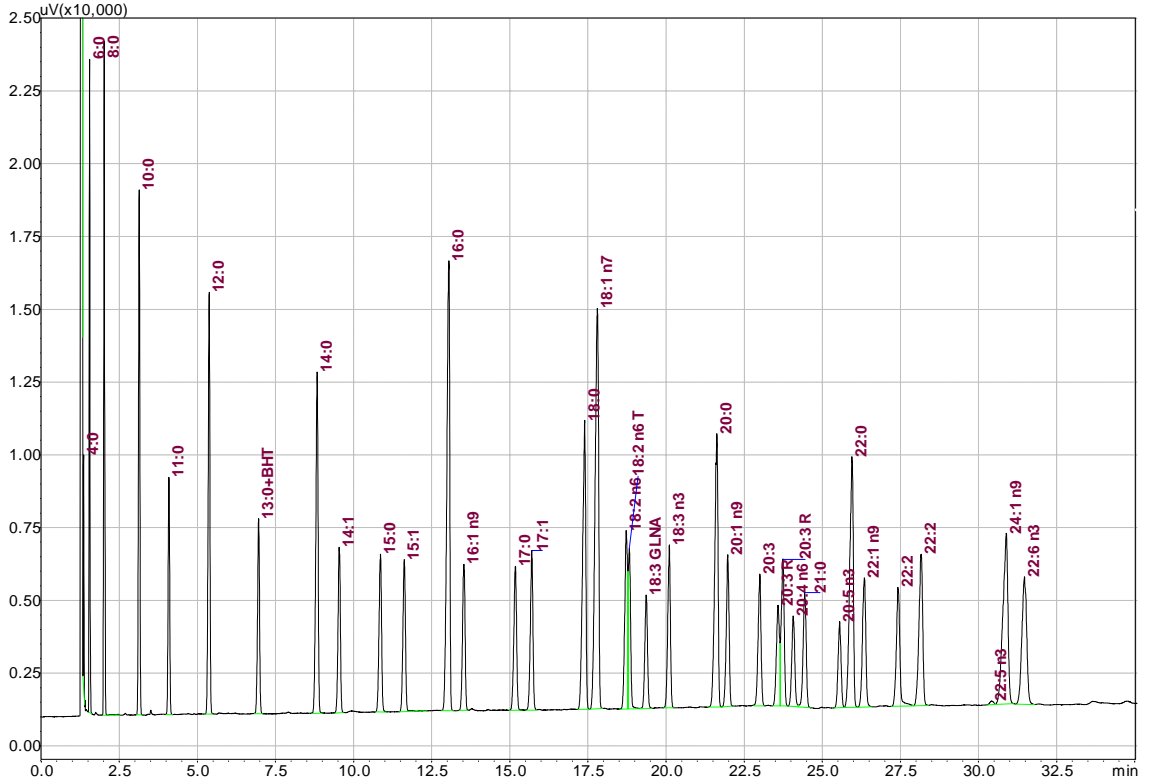
Şekil 8. Dokulardan izole edilen retinol (A vitamini)2a it HPLC kromatogramı.



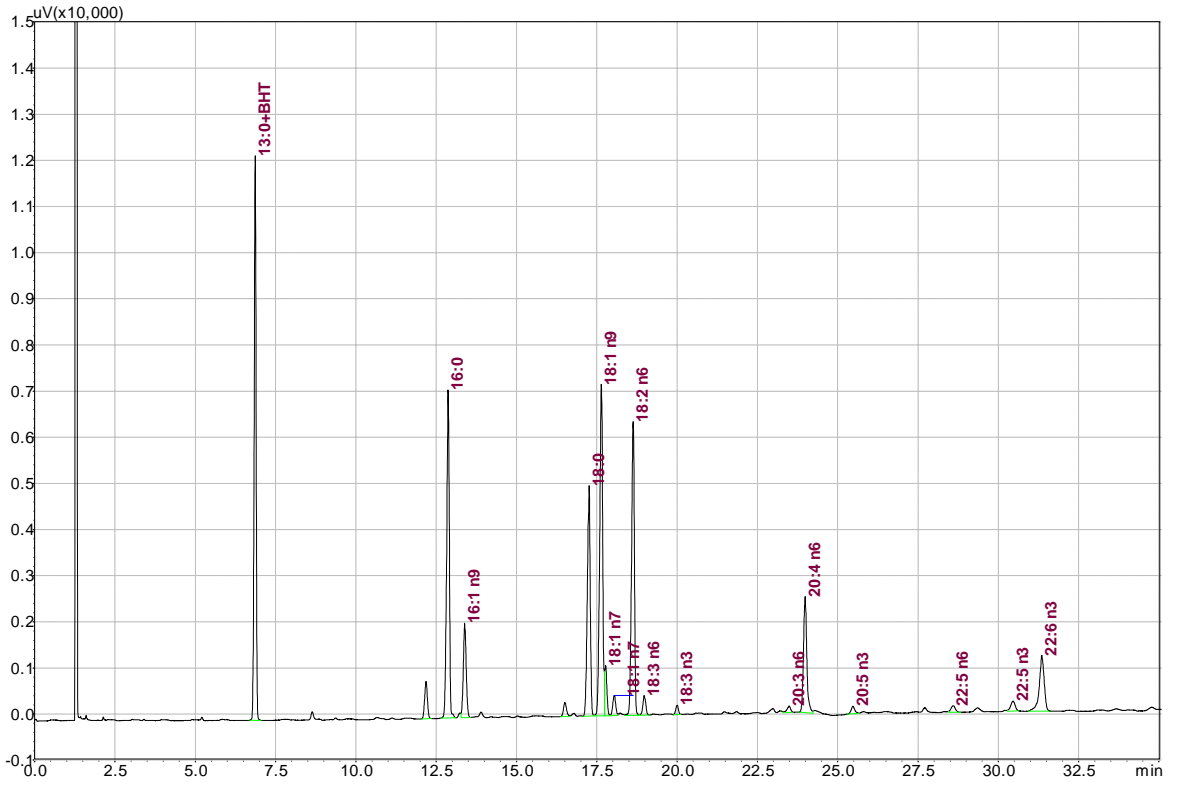
Şekil 9. GSH ve GSSG standartlarına ait HPLC kromatogramı.



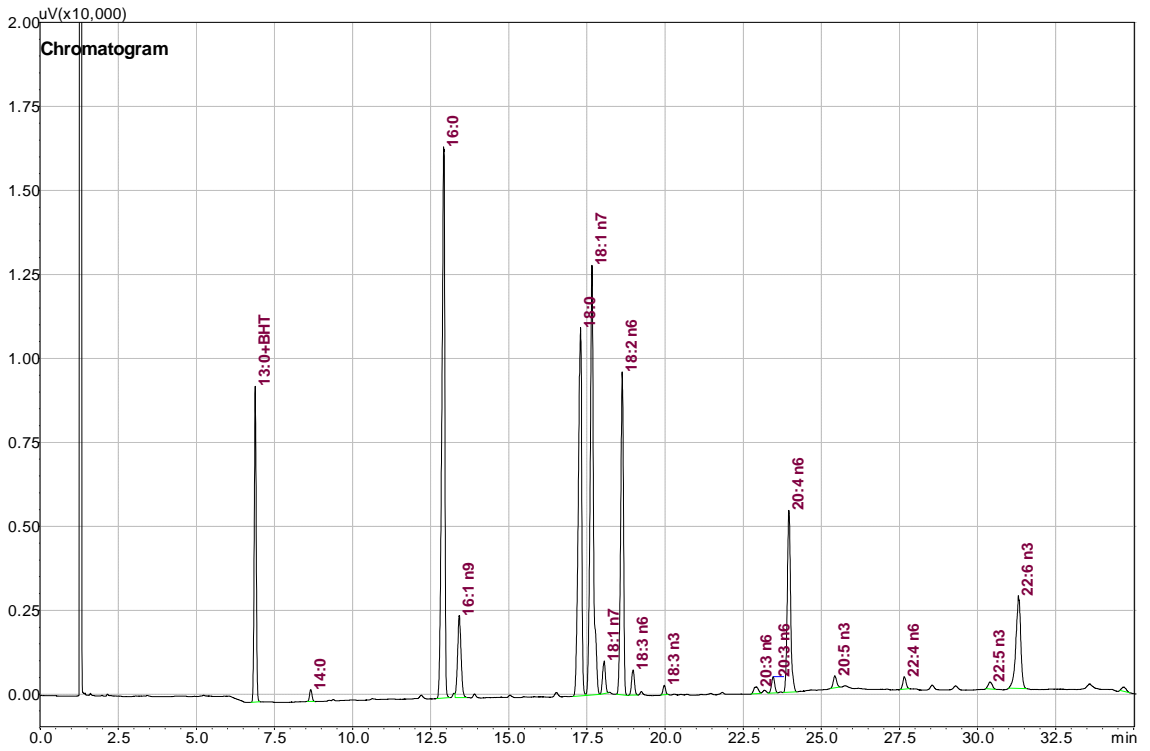
Şekil 10. GSH ve GSSG standartlarının dokudan izole edilen kromatogramla karşılaştırılması.



Şekil 11. Yağ asidi metil esteri standartlarına ait GC kromatogramı.



Şekil 12. Kas dokusu yağ asidi metil esterine ait GC kromatogramı.



Şekil 13. Karaciğer dokusu yağ asidi metil esterine ait GC kromatogramı.

Tablo 1.3. Gaz kromatografik analizinde elde edilen yağ asidi metil esterlerine ait değerler (*).

Yağ asitleri	RT (Mean) (dk)	SD	SEM	Min RT (dk)	Max RT (dk)
BHT	6.77	0.05	0.02	7.04	7.00
Miristik asit (14:0)	8.65	0.06	0.03	9.02	9.05
Pentadekanoik asit (15:0)	10.69	0.18	0.10	11.03	11.08
Palmitik asit (16:0)	11.46	0.04	0.01	13.44	13.50
Palmitoleik asit (16:1, n 9)	12.90	0.04	0.02	13.88	13.90
Palmitoleik asit (16:1, n 9)	13.38	0.03	0.01	14.04	14.07
Stearik asit (18:0)	17.28	0.04	0.01	18.02	18.09
Oleik asit (18:1, n 9)	17.71	0.01	0.01	18.37	18.50
Oleik asit (18:1, n 7)	17.81	0.02	0.01	18.44	18.60
Linoleik asit (18:2, n 6)	18.62	0.03	0.04	19.36	19.50
Eikosenoik asit (20:1, n 9)	21.8	0.04	0.02	22.77	22.80
Eikosadienoik asit (20:2, n 6)	22.7	0.07	0.02	23.86	23.90
Eikosatrienoik asit (20:3, n 6)	23.00	0.04	0.03	24.46	24.60
Araşidonik asit (20:4, n 6)	23.5	0.05	0.02	25.00	25.02
Araşidonik asit (20:4, n 3)	23.8	0.06	0.03	25.13	25.16
Eikosapentaenoik asit (20:5, n 3)	25.9	0.18	0.10	26.50	26.60
Behenik asit (22:0)	26.00	0.04	0.01	27.00	27.06
Dokosenoik asit (22:1)	26.30	0.04	0.02	27.17	27.25
Dokosadienoik asit (22:2, n 6)	27.00	0.03	0.01	29.15	29.30
Dokosatetraenoik asit (22:4, n 6)	27.8	0.04	0.01	30.08	30.10
Dokosapentaenoik asit (22:5, n 6)	29.00	0.01	0.01	30.97	31.00
Dokosapentaenoik asit (22:5, n 3)	30.00	0.02	0.01	32.28	32.50
Dokosaheksaenoikasit (22:6, n 3)	32.00	0.03	0.04	33.36	33.40
Lignoserik asit (24:0)	31.50	0.04	0.02	32.84	32.90
Nervonik asit (24:1, n 9)	32.40	0.04	0.02	33.62	33.70

RT. Retensiyom time (Alıkönma süresi).

Mean : Ortalama değér, **SD :** Standart sapma, **SEM :** Standart error mean, **Min RT.** Minimum retensiyon time, **Max RT :** Maksimum retensiyon time.

(*): Yukarıdaki değérler 120 – 220 ° C arasında yapılan sıcaklık programına göre geçérlidir. Bu değérler farklı sıcaklık programına göre nispi alıkönma süreleri değışir, fakat kolondan çıkış süreleri değışmez.

3.1. ADEK Vitaminleri, Kolesterol ve Glutatyon Moleküllerinin Değişimi

Bu çalışmada. Standart besin maddesiyle beslenen bıldırcınların diyetlerine ilave edilen iki farklı isoflavon dozunun etkileri, karaciğer ve kas dokuları üzerinde araştırıldı. Her iki doku örneği üzerinde, yağ asidi oranlarının ve ADEK (Vitamin A, D, E, K) vitaminlerinin değişimi incelendi. Ayrıca indirgenmiş (GSH) ve okside (GSSG) glutatyon moleküllerinin değişimi de incelendi.

Bulgularımıza göre, Karaciğer dokusunda A vitamini (Retinol) miktarının gruplar arasında değişmediği halde ($p>0,05$), Retinol asetatın 200 mg isoflavon katkılı grupta, kontrol grubuna göre arttığı saptandı ($p<0,001$). 800 mg isoflavon ilave yapılan grupta ise değişim gözlenmedi ($p>0,05$) f.tokoferol miktarının kontrol grubuna göre, 200 mg'lı grupta azaldığı halde, 800 mg'lı grupta arttığı saptandı ($p<0,001$).

D₂ ve D₃ vitaminlerinin miktarları kontrol grubuna göre 200 mg'lı grupta azaldığı halde, 800 mg'lı grupta arttığı saptandı ($p<0,001$) σ tokoferol miktarının kontrol grubuna göre 800 mg isoflavon verilen grupta arttığı belirlendi ($p<0,04$). 200 mg'lı grup ile kontrol gruplar arasında farklılık bulunmadı ($p>0,05$).

Kas dokusunda, Retinol ve Retinol asetat miktarlarının her iki grupta da azaldığı saptandı ($p<0,001$). D₂ vitamini miktarı 200 mg'lı grupta azaldığı halde ($p<0,002$), 800 mg'lı grupta arttığı saptandı ($p<0,001$). D₃ vitamin miktarının kontrol grubuna göre her iki grupta da azaldığı belirlendi ($p<0,001$ σ tokoferol asetatın ise kontrol grubuna göre her iki grupta azaldığı halde ($p<0,001$), σ tokoferol miktarının kontrol grubuna göre hem 200 mg'lı hem de 800 mg'lı grupta arttığı saptandı ($p<0,001$).

Kas dokusundaki kolesterol miktarı, 200 mg verilen grup ile kontrol grubu arasında farklılık bulunmadığı halde, 800 mg verilen grupta kontrol grubuna göre azaldığı saptandı ($p<0,001$). Karaciğer dokusunda ise her iki isoflavon grubunun kolesterol miktarını düşürdüğü saptandı ($p<0,001$).

Kas dokusundaki GSH miktarının kontrol grubuna göre 200 mg'lı grupta azaldığı halde ($p<0,04$), 800 mg'lı grup ile kontrol grubu arasında farklılık gözlenmedi ($p>0,05$). Aynı dokudaki GSSG miktarının 200 ve 800 mg'lı grupta kontrol grubuna göre azaldığı saptandı ($p<0,002$, $p<0,02$).

Karaciğer dokusundaki GSH miktarı kontrol grubuna göre 200 mg'lı grupta azaldığı halde ($p<0,03$), 800 mg'lı grupta arttığı saptandı ($p<0,05$).

GSSG miktarının 200 mg'lı grupta arttığı halde ($p<0,02$), 800 mg'lı grupta kontrol grubuna göre değişim gözlenmediği saptandı ($p>0,05$).

3.2. Yağ Asitlerinin Değişimi:

Gaz kromatografisi cihazıyla yapılan analiz sonunda, kas dokusunda palmitik (18:0), palmitoleik asit (16:1, n-9), stearik asit (18:0), oleik asit (18:1, n-9), linoleik asit (18:2, n-6), linoleik asit (18:3, n-3), eikosatrienoik asit (20:3, n-6), araşidonik asit (20:5, n-3), eikosopentaenoik asit (20:5, n-3), dokosatetraenoik asit (22:4, n-6), dokosapentaenoik asit (22:5, n-3) ve dokosaheksaenoik asitlerin (22:6, n-3) bulunduğu saptandı. Bu yağ asitlerinin değişimleri kontrol grubu ile isoflavon verilen gruplar arasında incelendiğinde kas dokusunda, palmitik asitin kontrol grubuna göre isoflavon verilen gruplarda yükseldiği belirlendi ($p < 0,001$, $p < 0,01$). Palmitoleik asit miktarı 200 mg'lı grupta arttığı halde ($p < 0,03$), 800 mg'lı grupta kontrol grubuna göre değişim göstermediği belirlendi ($p > 0,05$).

Stearik asitin kontrol grubuna göre her iki isoflavon dozu uygulanan grupta azaldığı halde, oleik asit miktarının arttığı saptandı ($p < 0,001$). Linoleik asit miktarı 200 mg'lı grupta kontrol grubuna göre değişmediği halde ($p > 0,05$), 800 mg'lı grup arttığı saptandı ($p < 0,01$). Linoleik asit miktarlarında da benzer sonuç gözlemlendi ve 800 mg'lı grupta linoleik asitin kontrol grubuna göre yükseldiği belirlendi ($p < 0,005$). Eikosatrienoik asit, araşidonik asit ve eikosopentaenoik asitlerin kontrol grubuna göre isoflavon verilen gruplarda azaldığı saptandı ($p < 0,001$).

Dokosatetraenoik asit miktarının kontrol grubuna göre isoflavon verilen gruplarda arttığı halde ($p < 0,003$, $p < 0,03$), dokosapentaenoik (22:5, n-6) asitin gruplar arasında değişim göstermediği saptandı ($p > 0,05$). Dokosapentaenoik asit (22:5, n-3) 200 mg'lı isoflavon gruplarında kontrol grubuna göre değişim göstermediği halde ($p > 0,05$), 800 mg'lı grupta azaldığı belirlendi ($p < 0,002$). Dokosaheksaenoik asit miktarının kontrol grubuna göre isoflavon verilen gruplarda azaldığı saptandı ($p < 0,001$).

Karaciğer dokusunda, miristik, palmitik ve palmitoleik asitlerin gruplar arasında değişim göstermediği belirlendi ($p > 0,05$). Stearik asitin 200 mg'lı grupta kontrol grubuna göre azaldığı halde ($p < 0,05$), 800 mg'lı grupta değişim göstermediği belirlendi ($p > 0,05$). Oleik asitin 200 mg isoflavon verilen grupta, kontrol grubuna göre arttığı halde ($p < 0,001$), 800 mg'lı grupta değişmediği belirlendi ($p > 0,05$).

Linoleik, linolenik, eikosatrienoik, araşidonik ve dokosaheksaenoik asitlerin miktarları, 200 mg isoflavon uygulanan gruplarda azaldığı halde ($p < 0,001$, $p < 0,05$, $p < 0,02$, $p < 0,001$, $p < 0,01$), 800 mg'lı isoflavon grubunda değişim göstermediği belirlendi ($p > 0,05$).

Eikosadienoik asit, eikosapentaenoik, dokosatetraenoik, dokosapentaenoik (22:5, n-6 ve n-3) asitlerin miktarlarında, kontrol grubu ile isoflavon verilen gruplar arasında değişim gözlemlenmedi ($p > 0,05$).

Table 3. 1: Karaciğer dokusundaki ADEK vitaminlerinin değışimi.

Analizi yapılan parametre isimi	Gruplar	Ortalama değer	Std. Hata
Retinol (Vitamin A) ($\mu\text{g/g}$ doku)	Kontrol	36.32	1.62
	200 mg isoflavon	36.72	3.60
	800 mg isoflavon	36.73	2.08
Retinol asetat (ng/g doku)	Kontrol	72.00	3.59
	200 mg isoflavon	137.77	4.00
	800 mg isoflavon	76.25	4.19
δ -Tokoferol (ng/g doku)	Kontrol	72.00	3.59
	200 mg isoflavon	100.00	8.66
	800 mg isoflavon	328.75	19.67
Vitamin D2 (ng/g doku)	Kontrol	221.11	13.06
	200 mg isoflavon	65.55	7.65
	800 mg isoflavon	411.25	28.05
Vitamin D3 (ng/g doku)	Kontrol	293.75	20.69
	200 mg isoflavon	93.75	5.95
	800 mg isoflavon	498.57	10.78
α -Tokoferol (VE) ($\mu\text{g/g}$ doku)	Kontrol	2.05	0.095
	200 mg isoflavon	2.04	0.03
	800 mg isoflavon	2.24	0.03

Tablo 3.2: Karaciğer dokusundaki ADEK vitamin miktarlarının istatistiksel karşılaştırılması.

Parametreler	(I) Gruplar	(J) Gruplar	Gruplar arası farklılık (I-J)	İstatistik anlamlılık
Retinol	Kontrol	200 mg isoflavon	-0.39	.884
		800 mg isoflavon	-0.41	.885
	200 mg isoflavon	Kontrol	0.39	.884
		800 mg isoflavon	-0.011	.997
	800 mg isoflavon	Kontrol	0.41	.885
		200 mg isoflavon	0.012	.997
R Asetat	Kontrol	200 mg isoflavon	-65.78	.000
		800 mg isoflavon	-4.25	.452
	200 mg isoflavon	Kontrol	65.78	.000
		800 mg isoflavon	61.53	.000
	800 mg isoflavon	Kontrol	4.25	.452
		200 mg isoflavon	-61.53	.000
δ Tokoferol	Kontrol	200 mg isoflavon	110.00	.000
		800 mg isoflavon	-118.75	.000
	200 mg isoflavon	Kontrol	-110.00	.000
		800 mg isoflavon	-228.75	.000
	800 mg isoflavon	Kontrol	118.75	.000
		200 mg isoflavon	228.75	.000
D2 Vitamini	Kontrol	200 mg isoflavon	155.55	.000
		800 mg isoflavon	-190.14	.000
	200 mg isoflavon	Kontrol	-155.56	.000
		800 mg isoflavon	-345.69	.000
	800 mg isoflavon	Kontrol	190.14	.000
		200 mg isoflavon	345.69	.000

Tablo 3.3: (Tablo 2'nin devamı) Karaciğer dokusundaki ADEK vitamin miktarlarının istatistiksel karşılaştırılması.

Parametreler	(I) Gruplar	(J) Gruplar	Gruplar arası farklılık (I-J)	İstatistik anlamlılık
D3 Vitamini	Kontrol	200 mg isoflavon	200.00	.000
		800 mg isoflavon	-204.82	.000
	200 mg isoflavon	Kontrol	-200.00	.000
		800 mg isoflavon	-404.82	.000
	800 mg isoflavon	Kontrol	204.82	.000
		200 mg isoflavon	404.82	.000
α - Tokoferol	Kontrol	200 mg isoflavon	0.011	.990
		800 mg isoflavon	-.1987	.036
	200 mg isoflavon	Kontrol	-0.011	.990
		800 mg isoflavon	-.1999	.035
	800 mg isoflavon	Kontrol	.1987	.036
		200 mg isoflavon	.1999	.035

Tablo 3. 4: Kas dokusundaki ADEK vitaminlerinin değişimi.

Analizi yapılan parametre isimi	Gruplar	Ortalama değer	Std. Hata
Retinol	Kontrol	0.22	0.02
	200 mg isoflavon	0.16	0.01
	800 mg isoflavon	0.14	0.01
R Asetat (ng/g tissue)	Kontrol	101.42	6.33
	200 mg isoflavon	11.42	1.42
	800 mg isoflavon	32.22	2.77
Vitamin D2	Kontrol	0.69	0.04
	200 mg isoflavon	0.24	0.03
	800 mg isoflavon	2.20	0.12
Vitamin D3	Kontrol	0.96	0.04
	200 mg isoflavon	0.45	0.04
	800 mg isoflavon	0.55	0.043
A Tokoferol	Kontrol	2.63	0.05
	200 mg isoflavon	3.82	0.19
	800 mg isoflavon	4.12	0.16
A Tokoferol Asetat	Kontrol	2.00	0.10
	200 mg isoflavon	0.58	0.05
	800 mg isoflavon	1.14	0.06

Tablo 3..5: Kas dokusundaki ADEK vitamin miktarlarının istatistiksel karşılaştırılması.

Parametreler	(I) Gruplar	(J) Gruplar	Gruplar arası farklılık (I-J)	İstatistik anlamlılık
Retinol	Kontrol	200 mg isoflavon	0.06	.002
		800 mg isoflavon	0.079	.000
	200 mg isoflavon	Kontrol	-0.06	.002
		800 mg isoflavon	0.018	.262
	800 mg isoflavon	Kontrol	-0.078	.000
		200 mg isoflavon	-0.018	.262
R Asetat	Kontrol	200 mg isoflavon	90.00	.000
		800 mg isoflavon	69.20	.000
	200 mg isoflavon	Kontrol	-90.00	.000
		800 mg isoflavon	-20.79	.001
	800 mg isoflavon	Kontrol	-69.20	.000
		200 mg isoflavon	20.79	.001
Vitamin D2	Kontrol	200 mg isoflavon	0.45	.002
		800 mg isoflavon	-1.51	.000
	200 mg isoflavon	Kontrol	-0.45	.002
		800 mg isoflavon	-1.96	.000
	800 mg isoflavon	Kontrol	1.51	.000
		200 mg isoflavon	1.96	.000
Vitamin D3	Kontrol	200 mg isoflavon	0.50	.000
		800 mg isoflavon	0.40	.000
	200 mg isoflavon	Kontrol	-0.50	.000
		800 mg isoflavon	-0.10	.107
	800 mg isoflavon	Kontrol	-0.40	.000
		200 mg isoflavon	0.10	.107

Tablo 3. 6: (Tablo 5'in devamı) Kas dokusundaki ADEK vitamin miktarlarının istatistiksel karşılaştırılması.

Parametreler	(I) Gruplar	(J) Gruplar	Gruplar arası farklılık (I-J)	İstatistik anlamlılık
A Tokoferol	Kontrol	200 mg isoflavon	-1.19	.000
		800 mg isoflavon	-1.49	.000
	200 mg isoflavon	Kontrol	1.19	.000
		800 mg isoflavon	-0.29	.182
	800 mg isoflavon	Kontrol	1.49	.000
		200 mg isoflavon	0.29	.182
A Tokoferol Asetat	Kontrol	200 mg isoflavon	1.42	.000
		800 mg isoflavon	0.86	.000
	200 mg isoflavon	Kontrol	-1.42	.000
		800 mg isoflavon	-0.56	.000
	800 mg isoflavon	Kontrol	-0.86	.000
		200 mg isoflavon	0.56	.000

Tablo 3. 7: Kas dokusundaki yağ asidi miktarının değişimi.

Analizi yapılan parametre isimi	Gruplar	Ortalama değer	Std. Hata
Miristik asit (14:0)	Kontrol	0.25	1.550E-02
	200 mg isoflavon	0.51	3.334E-02
	800 mg isoflavon	0.43	1.978E-02
Palmitik asit (16:0)	Kontrol	17.50	0.62
	200 mg isoflavon	21.07	0.31
	800 mg isoflavon	19.78	0.64
Palmitoleik asit (16:1, n9)	Kontrol	3.96	0.38
	200 mg isoflavon	5.16	0.32
	800 mg isoflavon	4.97	0.32
Stearik asit (18:0)	Kontrol	17.31	0.60
	200 mg isoflavon	11.42	0.48
	800 mg isoflavon	12.13	1.02
Oleik asit (18:1, n9)	Kontrol	15.50	1.23
	200 mg isoflavon	28.44	1.09
	800 mg isoflavon	26.68	1.41
Linoleik asit (18:2, n6)	Kontrol	20.33	0.34
	200 mg isoflavon	20.45	0.377
	800 mg isoflavon	22.21	0.64
Linolenik asit (18:3, n3)	Kontrol	0.65	5.777E-02
	200 mg isoflavon	0.82	4.946E-02
	800 mg isoflavon	0.92	6.943E-02
Eikosatrienoik asit (20:3, n6)	Kontrol	0.41	2.447E-02
	200 mg isoflavon	0.18	2.657E-02
	800 mg isoflavon	0.12	7.377E-03

Tablo 3..8: (Tablo 7'nin devamı) Kas dokusundaki yağ asidi miktarının değişimi.

Analizi yapılan parametre isimi	Gruplar	Ortalama değer	Std. Hata
Araşidonik asit (20:4, n6)	Kontrol	11.04	0.64
	200 mg isoflavon	6.38	0.36
	800 mg isoflavon	6.19	0.59
Eikosapentaenoik asit (20:5, n3)	Kontrol	0.56	3.225E-02
	200 mg isoflavon	0.26	3.148E-02
	800 mg isoflavon	0.28	2.768E-02
Dokosatetraenoik asit (22:4, n6)	Kontrol	0.47	6.023E-02
	200 mg isoflavon	0.77	6.527E-02
	800 mg isoflavon	0.68	6.827E-02
Dokosapentaenoik asit (22:5, n6)	Kontrol	0.58	9.910E-02
	200 mg isoflavon	0.40	2.209E-02
	800 mg isoflavon	0.38	2.577E-02
Dokosapentaenoik asit (22:5, n3)	Kontrol	0.76	7.130E-02
	200 mg isoflavon	0.49	5.959E-02
	800 mg isoflavon	0.43	4.214E-02
Dokosaheksaenoik asit (22:6, n3)	Kontrol	8.36	0.77
	200 mg isoflavon	4.89	0.30
	800 mg isoflavon	4.80	0.56

Tablo 3.9: Kas dokusundaki yağ asidi bileşiminin gruplar arasındaki istatistiksel karşılaştırılması.

Parametreler	(I) Gruplar	(J) Gruplar	Gruplar arası farklılık (I-J)	İstatistik anlamlılık
Palmitik asit (16:0)	Kontrol	200 mg isoflavon	-3.5714	.000
		800 mg isoflavon	-2.2743	.009
	200 mg isoflavon	Kontrol	3.5714	.000
		800 mg isoflavon	1.2971	.112
	800 mg isoflavon	Kontrol	2.2743	.009
		200 mg isoflavon	-1.2971	.112
Palmitoleik asit (16:1. n 9)	Kontrol	200 mg isoflavon	-1.1986	.025
		800 mg isoflavon	-1.0114	.055
	200 mg isoflavon	Kontrol	1.1986	.025
		800 mg isoflavon	.1871	.708
	800 mg isoflavon	Kontrol	1.0114	.055
		200 mg isoflavon	-.1871	.708
Stearik asit (18:0)	Kontrol	200 mg isoflavon	5.8886	.000
		800 mg isoflavon	5.1800	.000
	200 mg isoflavon	Kontrol	-5.8886	.000
		800 mg isoflavon	-.7086	.508
	800 mg isoflavon	Kontrol	-5.1800	.000
		200 mg isoflavon	.7086	.508
Oleik asit (18:1. n 9)	Kontrol	200 mg isoflavon	-12.9486	.000
		800 mg isoflavon	-11.1843	.000
	200 mg isoflavon	Kontrol	12.9486	.000
		800 mg isoflavon	1.7643	.335
	800 mg isoflavon	Kontrol	11.1843	.000
		200 mg isoflavon	-1.7643	.335
Linoleik asit (18:2. n 6)	Kontrol	200 mg isoflavon	-.1129	.869
		800 mg isoflavon	-1.8800	.012
	200 mg isoflavon	Kontrol	.1129	.869
		800 mg isoflavon	-1.7671	.017
	800 mg isoflavon	Kontrol	1.8800	.012
		200 mg isoflavon	1.7671	.017

Tablo 3.10: (Tablo 9'un devamı) Kas dokusundaki yağ asidi bileşiminin gruplar arasındaki istatistiksel karşılaştırılması.

Parametreler	(I) Gruplar	(J) Gruplar	Gruplar arası farklılık (I-J)	İstatistik anlamlılık
Linolenik asit (18:3. n 3)	Kontrol	200 mg isoflavon	-.1714	.056
		800 mg isoflavon	-.2657	.005
	200 mg isoflavon	Kontrol	.1714	.056
		800 mg isoflavon	-9.4286E-02	.277
	800 mg isoflavon	Kontrol	.2657	.005
		200 mg isoflavon	9.429E-02	.277
Eikosatrienoik asit (20:3. n 6)	Kontrol	200 mg isoflavon	.2211	.000
		800 mg isoflavon	.2857	.000
	200 mg isoflavon	Kontrol	-.2211	.000
		800 mg isoflavon	6.457E-02	.046
	800 mg isoflavon	Kontrol	-.2857	.000
		200 mg isoflavon	-6.4571E-02	.046
Araşidonik asit (20:4. n 6)	Kontrol	200 mg isoflavon	4.6557	.000
		800 mg isoflavon	4.8457	.000
	200 mg isoflavon	Kontrol	-4.6557	.000
		800 mg isoflavon	.1900	.809
	800 mg isoflavon	Kontrol	-4.8457	.000
		200 mg isoflavon	-.1900	.809
Eikosapentaenoik asit (20:5. n 3)	Kontrol	200 mg isoflavon	.3019	.000
		800 mg isoflavon	.2746	.000
	200 mg isoflavon	Kontrol	-.3019	.000
		800 mg isoflavon	-2.7333E-02	.566
	800 mg isoflavon	Kontrol	-.2746	.000
		200 mg isoflavon	2.733E-02	.566

Tablo 3.11: (Tablo 10'un devamı) Kas dokusundaki yağ asidi bileşiminin gruplar arasındaki istatistiksel karşılaştırılması.

Parametreler	(I) Gruplar	(J) Gruplar	Gruplar arası farklılık (I-J)	İstatistik anlamlılık
Dokosatetraenoik Asit (22:4. n 6)	Kontrol	200 mg isoflavon	-.3100	.003
		800 mg isoflavon	-.2171	.029
	200 mg isoflavon	Kontrol	.3100	.003
		800 mg isoflavon	9.286E-02	.323
	800 mg isoflavon	Kontrol	.2171	.029
		200 mg isoflavon	-9.2857E-02	.323
Dokosapentaenoik Asit (22:5. n 6)	Kontrol	200 mg isoflavon	.1800	.061
		800 mg isoflavon	.1994	.058
	200 mg isoflavon	Kontrol	-.1800	.061
		800 mg isoflavon	1.943E-02	.845
	800 mg isoflavon	Kontrol	-.1994	.058
		200 mg isoflavon	-1.9429E-02	.845
Dokosapentaenoik asit (22:5. n 3)	Kontrol	200 mg isoflavon	.2686	.005
		800 mg isoflavon	.3231	.002
	200 mg isoflavon	Kontrol	-.2686	.005
		800 mg isoflavon	5.452E-02	.539
	800 mg isoflavon	Kontrol	-.3231	.002
		200 mg isoflavon	-5.4524E-02	.539
Ddokosaheksaenoik asit (22:6. n 3)	Kontrol	200 mg isoflavon	3.4743	.000
		800 mg isoflavon	3.5638	.001
	200 mg isoflavon	Kontrol	-3.4743	.000
		800 mg isoflavon	8.952E-02	.916
	800 mg isoflavon	Kontrol	-3.5638	.001
		200 mg isoflavon	-8.9524E-02	.916

Tablo 3.12: Karaciğer dokusundaki yağ asidi miktarının değişimi.

Analizi yapılan parametre isimi	Gruplar	Ortalama değer	Std. Hata
Miristik asit (14:0)	Kontrol	0.59	3.808E-02
	200 mg isoflavon	0.61	4.885E-02
	800 mg isoflavon	0.48	2.097E-02
Palmitik asit (16:0)	Kontrol	26.60	0.63
	200 mg isoflavon	27.13	.032
	800 mg isoflavon	25.22	0.67
Palmitoleik asit (16:1. n9)	Kontrol	4.09	0.16
	200 mg isoflavon	4.38	0.13
	800 mg isoflavon	3.73	9.699E-02
Stearik asit (18:0)	Kontrol	18.47	0.54
	200 mg isoflavon	16.89	0.57
	800 mg isoflavon	18.62	0.28
Oleik asit (18:1. n9)	Kontrol	19.07	0.43
	200 mg isoflavon	27.08	0.72
	800 mg isoflavon	19.97	0.24
Linoleik asit (18:2. n6)	Kontrol	14.40	0.34
	200 mg isoflavon	10.90	0.34
	800 mg isoflavon	14.72	0.67
Linolenik asit (18:3. n3)	Kontrol	0.65	5.431E-02
	200 mg isoflavon	0.41	0.11
	800 mg isoflavon	.4975	5.452E-02
Eikosadienoik asit (20:2. n6)	Kontrol	0.36	2.550E-02
	200 mg isoflavon	0.32	8.622E-02
	800 mg isoflavon	0.32	2.646E-02
Eikosatrienoik asit (20:3. n6)	Kontrol	0.52	3.945E-02
	200 mg isoflavon	0.36	4.021E-02
	800 mg isoflavon	0.49	2.906E-02

Tablo 3.13. (Tablo 12'nin devamı) Karaciğer dokusundaki yağ asidi miktarının değişimi.

Analizi yapılan parametre isimi	Gruplar	Ortalama değer	Std. Hata
Araşidonik asit (20:4. n6)	Kontrol	7.22	0.24
	200 mg isoflavon	5.31	0.39
	800 mg isoflavon	7.33	0.29
Eikosapentaenoik asit (20:5. n3)	Kontrol	0.51	3.130E-02
	200 mg isoflavon	0.36	6.801E-02
	800 mg isoflavon	0.60	0.12
Dokosatetraenoik asit (22:4. n6)	Kontrol	0.58	6.053E-02
	200 mg isoflavon	.6400	0.11
	800 mg isoflavon	.6867	6.692E-02
Dokosapentaenoik asit (22:5. n6)	Kontrol	.2140	3.043E-02
	200 mg isoflavon	.2300	1.732E-02
	800 mg isoflavon	.2600	8.010E-02
Dokosapentaenoik asit (22:5. n3)	Kontrol	.4260	6.030E-02
	200 mg isoflavon	.2960	6.539E-02
	800 mg isoflavon	.4225	4.151E-02
Dokosaheksaenoik asit (22:6. n3)	Kontrol	5.8920	0.28
	200 mg isoflavon	4.6700	0.31
	800 mg isoflavon	6.7375	0.22

Tablo 3.14: Karaciğer dokusundaki yağ asidi bileşiminin gruplar arasındaki istatistiksel karşılaştırılması.

Parametreler	(I) Gruplar	(J) Gruplar	Gruplar arası farklılık (I-J)	İstatistik anlamlılık
Miristik asit (14:0)	Kontrol	200 mg isoflavon	-2.4000E-02	.669
		800 mg isoflavon	.1025	.104
	200 mg isoflavon	Kontrol	2.400E-02	.669
		800 mg isoflavon	.1265	.051
	800 mg isoflavon	Kontrol	-.1025	.104
		200 mg isoflavon	-.1265	.051
Palmitik asit (16:0)	Kontrol	200 mg isoflavon	-.5360	.489
		800 mg isoflavon	1.3725	.112
	200 mg isoflavon	Kontrol	.5360	.489
		800 mg isoflavon	1.9085	.035
	800 mg isoflavon	Kontrol	-1.3725	.112
		200 mg isoflavon	-1.9085	.035
Palmitoleik asit (16:1. n9)	Kontrol	200 mg isoflavon	-.2880	.161
		800 mg isoflavon	.3545	.109
	200 mg isoflavon	Kontrol	.2880	.161
		800 mg isoflavon	.6425	.009
	800 mg isoflavon	Kontrol	-.3545	.109
		200 mg isoflavon	-.6425	.009
Stearik asit (18:0)	Kontrol	200 mg isoflavon	1.5840	.045
		800 mg isoflavon	-.1465	.847
	200 mg isoflavon	Kontrol	-1.5840	.045
		800 mg isoflavon	-1.7305	.040
	800 mg isoflavon	Kontrol	.1465	.847
		200 mg isoflavon	1.7305	.040
Oleik asit (18:1. n9)	Kontrol	200 mg isoflavon	-8.0180	.000
		800 mg isoflavon	-.9000	.275
	200 mg isoflavon	Kontrol	8.0180	.000
		800 mg isoflavon	7.1180	.000
	800 mg isoflavon	Kontrol	.9000	.275
		200 mg isoflavon	-7.1180	.000

Tablo 3.15: (Tablo 14'ün devamı): Karaciğer dokusundaki yağ asidi bileşiminin gruplar arasındaki istatistiksel karşılaştırılması.

Parametreler	(I) Gruplar	(J) Gruplar	Gruplar arası farklılık (I-J)	İstatistik anlamlılık
Linoleik asit (18:3. n6)	Kontrol	200 mg isoflavon	3.4960	.000
		800 mg isoflavon	-.3250	.625
	200 mg isoflavon	Kontrol	-3.4960	.000
		800 mg isoflavon	-3.8210	.000
	800 mg isoflavon	Kontrol	.3250	.625
		200 mg isoflavon	3.8210	.000
Linolenik asit (18:3. n3)	Kontrol	200 mg isoflavon	.2350	.046
		800 mg isoflavon	.1525	.171
	200 mg isoflavon	Kontrol	-.2350	.046
		800 mg isoflavon	-8.2500E-02	.467
	800 mg isoflavon	Kontrol	-.1525	.171
		200 mg isoflavon	8.250E-02	.467
Eikosadienoik asit (20:3. n 6)	Kontrol	200 mg isoflavon	4.000E-02	.551
		800 mg isoflavon	4.000E-02	.551
	200 mg isoflavon	Kontrol	-4.0000E-02	.551
		800 mg isoflavon	.0000	1.000
	800 mg isoflavon	Kontrol	-4.0000E-02	.551
		200 mg isoflavon	.0000	1.000
Eikosatrienoik asit (20:3. n 6)	Kontrol	200 mg isoflavon	.1560	.016
		800 mg isoflavon	2.933E-02	.622
	200 mg isoflavon	Kontrol	-.1560	.016
		800 mg isoflavon	-.1267	.064
	800 mg isoflavon	Kontrol	-2.9333E-02	.622
		200 mg isoflavon	.1267	.064
Araşidonik asit (20:4. n 6)	Kontrol	200 mg isoflavon	1.9080	.001
		800 mg isoflavon	-.1145	.813
	200 mg isoflavon	Kontrol	-1.9080	.001
		800 mg isoflavon	-2.0225	.001
	800 mg isoflavon	Kontrol	.1145	.813
		200 mg isoflavon	2.0225	.001

Tablo 3.16: (Tablo 15'in devamı): Karaciğer dokusundaki yağ asidi bileşiminin gruplar arasındaki istatistiksel karşılaştırılması.

Parametreler	(I) Gruplar	(J) Gruplar	Gruplar arası farklılık (I-J)	İstatistik anlamlılık
Eikosapentaenoik asit (20:5. n3)	Kontrol	200 mg isoflavon	.1540	.158
		800 mg isoflavon	-9.2500E-02	.409
	200 mg isoflavon	Kontrol	-.1540	.158
		800 mg isoflavon	-.2465	.043
	800 mg isoflavon	Kontrol	9.250E-02	.409
		200 mg isoflavon	.2465	.043
Dokosatetraenoik asit (22:4. n6)	Kontrol	200 mg isoflavon	-6.2000E-02	.601
		800 mg isoflavon	-.1087	.432
	200 mg isoflavon	Kontrol	6.200E-02	.601
		800 mg isoflavon	-4.6667E-02	.732
	800 mg isoflavon	Kontrol	.1087	.432
		200 mg isoflavon	4.667E-02	.732
Dokosapentaenoik asit (22:5. n6)	Kontrol	200 mg isoflavon	-1.6000E-02	.816
		800 mg isoflavon	-4.6000E-02	.507
	200 mg isoflavon	Kontrol	1.600E-02	.816
		800 mg isoflavon	-3.0000E-02	.679
	800 mg isoflavon	Kontrol	4.600E-02	.507
		200 mg isoflavon	3.000E-02	.679
Dokosapentaenoik asit (22:5. n3)	Kontrol	200 mg isoflavon	.1300	.135
		800 mg isoflavon	3.500E-03	.968
	200 mg isoflavon	Kontrol	-.1300	.135
		800 mg isoflavon	-.1265	.167
	800 mg isoflavon	Kontrol	-3.5000E-03	.968
		200 mg isoflavon	.1265	.167
Dokosaheksaenoik asit (22:6. n3)	Kontrol	200 mg isoflavon	1.2220	.010
		800 mg isoflavon	-.8455	.066
	200 mg isoflavon	Kontrol	-1.2220	.010
		800 mg isoflavon	-2.0675	.000
	800 mg isoflavon	Kontrol	.8455	.066
		200 mg isoflavon	2.0675	.000

Tablo 3.17: Kas ve karaciğer dokularındaki kolesterol, GSH ve GSSG miktarlarının değişimi.

Analizi yapılan parametre isimi	Gruplar	Ortalama değer	Std. Hata
Kas dokusu Kolesterol	Kontrol	184,97	6,74
	200 mg isoflavon	197,18	5,11
	800 mg isoflavon	121,84	9,95
Karaciğer dokusu Kolesterol	Kontrol	431,31	15,07
	200 mg isoflavon	318,61	7,27
	800 mg isoflavon	359,08	20,80
Kas dokusu GSH (umol/g)	Kontrol	3,94	0,23
	200 mg isoflavon	4,20	0,16
	800 mg isoflavon	3,34	0,01
Kas dokusu GSSG	Kontrol	2,49	0,13
	200 mg isoflavon	2,39	0,01
	800 mg isoflavon	1,71	0,15
Karaciğer GSH	Kontrol	,7686	3,595E-02
	200 mg isoflavon	,6671	4,844E-02
	800 mg isoflavon	,9914	5,578E-02
Karaciğer GSSG	Kontrol	0,14	1,672E-02
	200 mg isoflavon	0,14	3,129E-02
	800 mg isoflavon	0,12	2,482E-02

Tablo 3.18: (Tablo 17'nin devamı):Kas ve karaciğer dokularındaki kolesterol, GSH ve GSSG miktarlarının gruplar arasındaki ruplaristatistiksel karşılaştırılması.

Parametreler	(I) Gruplar	(J) Gruplar	Gruplar arası farklılık (I-J)	İstatistik anlamlılık
Kas doku kolesterol	Kontrol	200 mg isoflavon	-12,2078	,237
		800 mg isoflavon	63,1275	,000
	200 mg isoflavon	Kontrol	12,2078	,237
		800 mg isoflavon	75,3353	,000
	800 mg isoflavon	Kontrol	-63,1275	,000
		200 mg isoflavon	-75,3353	,000
Karaciğer doku kolesterol	Kontrol	200 mg isoflavon	112,6937	,000
		800 mg isoflavon	72,2245	,002
	200 mg isoflavon	Kontrol	-112,6937	,000
		800 mg isoflavon	-40,4692	,076
	800 mg isoflavon	Kontrol	-72,2245	,002
		200 mg isoflavon	40,4692	,076
Kas GSH	Kontrol	200 mg isoflavon	-,2567	,299
		800 mg isoflavon	,6050	,023
	200 mg isoflavon	Kontrol	,2567	,299
		800 mg isoflavon	,8617	,003
	800 mg isoflavon	Kontrol	-,6050	,023
		200 mg isoflavon	-,8617	,003
Kas GSSG	Kontrol	200 mg isoflavon	0.01	,593
		800 mg isoflavon	,7800	,000
	200 mg isoflavon	Kontrol	0.01	,593
		800 mg isoflavon	,6814	,002
	800 mg isoflavon	Kontrol	-,7800	,000
		200 mg isoflavon	-,6814	,002

Tablo 3.19: (Tablo 18'in devamı): Kas ve karaciğer dokularındaki kolesterol, GSH ve GSSG miktarlarının gruplar arasındaki istatistiksel karşılaştırılması.

Parametreler	(I) Gruplar	(J) Gruplar	Gruplar arası farklılık (I-J)	İstatistik anlamlılık
Karaciğer GSH	Kontrol	200 mg isoflavon	,1014	,148
		800 mg isoflavon	-,2229	,004
	200 mg isoflavon	Kontrol	-,1014	,148
		800 mg isoflavon	-,3243	,000
	800 mg isoflavon	Kontrol	,2229	,004
		200 mg isoflavon	,3243	,000
Karaciğer GSSG	Kontrol	200 mg isoflavon	-3,7500E-03	,733
		800 mg isoflavon	1,339E-02	,232
	200 mg isoflavon	Kontrol	3,750E-03	,733
		800 mg isoflavon	1,714E-02	,142
	800 mg isoflavon	Kontrol	-1,3393E-02	,232
		200 mg isoflavon	-1,7143E-02	,142

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, uzun süre isoflavonların iki farklı dozu ile beslenen bıldırcınların kas ve karaciğer dokularında farklı biyokimyasal değişimler çalışıldı. İsoflavonlar, flavonoidler adı verilen bileşikler grubu altında yer almaktadır. Flavonoidler çeşitli bitkisel organizmalar tarafından üretilen ayrı bir fitokimyasallar grubudur. Bu grup içinde flavanlar, flavanonlar, isoflavanonlar, flavonlar, isoflavonlar, antosiyaninler, kalkonlar ve flavanolignanlar olmak üzere sekiz farklı grup yer almaktadır [48] İsoflavonlar kimyasal olarak dişi bireylerde yüksek oranda bulunan östrojen hormonuna benzerlik gösterir. Birçok protein molekülüne sıkıca bağlanarak aktivitesinin azalmasına neden olabilir [49]. İsoflavonlar, hidrojen peroksitin bozulmasıyla oluşan radikaller ve reaktif oksijen türlerinin oluşumunu engeller ve bu şekilde hücredeki DNA, proteinler, lipidler ve karbohidrat birimlerinin zarar görmesini önlemiş olur [50].

Düzenlenen bir panel çalışmasında, uzmanlar tarafından, günlük olarak 100 – 160 mg isoflavon alınmasının bazı kanser türlerinin ortaya çıkışını azaltacağı ileri sürülmüştür [51].

Bulgularımızda, özellikle karaciğer dokusunda δ -Tokoferol, D2, D3 ve α -tokoferol miktarlarının 800 mg uygulanan isoflavon grubunda kontrol grubuna göre arttığı belirlenmiştir (Tablo 1). Aynı şekilde kas dokusunda α -Tokoferol miktarının isoflavon verilen gruplarda arttığı gözlenmiştir. Bu sonuçlar, isoflavonların serbest radikallere karşı etkili olduğunu belirten çalışmaların sonuçlarını desteklemektedir. Özellikle hem karaciğer hem de kas dokusunda α -Tokoferol miktarının artması, diyetle ilave edilen isoflavonların dokulardaki antioksidan kapasitesini arttırdığı ve bu antioksidanlarla birlikte çalıştığının bir delili olabilir.

Bulgularımızda, canlı sistemdeki antioksidan kapasitesinin önemli kriterlerinden biri olan glutatyon molekülünün (GSH) karaciğer ve kas dokusunun her ikisinde de isoflavon verilen gruplarda arttığı gözlendi (Tablo 17). Bu sonuçlarda, isoflavonların canlı sistemdeki antioksidan savunmanın güçlenmesinde önemli moleküller olduğunu desteklemektedir.

Flavonoidler yaygın olarak tanınan ve biyolojik membranlardaki lipid peroksidasyonu inhibe edici doğal antioksidan yapılardır. Oksidatif stres sonucu açığa çıkan serbest oksijen radikallerine bağlı olarak oluşan lipid peroksidasyonunun; kanser, aterosklerotik kalp hastalıkları, karaciğer hastalıkları ve toksik hücre hasarlarında patogeneze sorumlu olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda CCl₄ uygulanmış ratlarda oksidatif stres ve karaciğer kupfer hücrelerinin inaktivasyonunun karaciğer fibrozisinde önemli bir rol oynadığı görülmektedir[52 53]. Melatonin uygulaması ile CCl₄ uygulanmış ratlarda, karaciğerde fibrozisin gerilediğini ve antioksidan enzimler olan superoksid dismutaz (SOD) ile Glutatyon peroksidaz (GSH-P_X) düzeylerinde artış olduğunu rapor etmektedirler[54]. Bir başka çalışmada akut CCl₄ uygulamasında bakteri hücre duvarlarında ve bitki duvarlarındaki kitin yapısındaki katyonik

polisakkarit yapılı Chitosanın lipid peroksidasyonu azalttığı antioksidan enzimlerden SOD ve katalaz (CAT) aktivitelerini ise arttırdığı bildirilmektedir[55].Başka bir çalışmada yüksek kolesterol diyeti uygulanan ratlarda bir soy isoflavonu olan Naringenin uygulaması ile plazma ve karaciğer dokusunda artmış MDA düzeylerinin düşüş gösterdiği rapor edilmiştir[56]. Ayrıca antioksidan olarak flavonoidlerin özellikle karaciğer homojenatlarında mikrozoim, mitokondri ve lipozomlarda öncü oksidant yapıların neden olduğu lipid peroksidasyonunu da inhibe ettiği rapor edilmektedir[57].

Yine bir çalışmada CCl₄ uygulanmış ratlarda artmış olan lipid peroksidasyonuna bağlı karaciğer hasarı sonucunda karaciğer enzimlerinden AST ve ALT düzeyleri anlamlı olarak artarken bu artışların soy isoflavon uygulaması ile düştüğü gözlenmiştir. Ayrıca CCl₄ uygulanmış ratlarda karaciğer dokusunda artmış olan inflamasyon ve nekrozun da soy isoflavonla gerilediği görülmektedir[58]. İnflamasyon, toksik maddeler ve ilaçlara bağlı olarak ortaya çıkan süreç, karaciğer hasarında oldukça önemli bir rol oynamaktadır. Bu süreçte özellikle serbest oksijen radikalleri ve artmış hidrojen peroksit gibi prooksidan yapılar ile birlikte profibrojenik yapılı bazı mediatörlerde hasarı arttırmaktadır. Bu açıdan bakıldığında hücrel oksijenazları, NADPH oksidaz veya hücrel antioksidantları aktive etmek yoluyla veya antioksidan enzimlerin aktivasyonu ile oksidatif hasarın engellenmesinde antioksidan özelliklere sahip soy isoflavonlar gibi bileşiklerin kullanılması oldukça önemlidir[59].

Fitoöstrojenlerden olan genistein ve daidzein uygulaması sonucunda CCl₄ 'e bağlı karaciğer hasarından hepatik glutatyon-S transferaz ve antioksidan hepatik glutatyon aracılığı ile koruduğu ve lipid peroksidasyonunu önlediği rapor edilmektedir[60].

Glutatyon (GSH) molekülü, dışarıdan diyetle alınan vitamin E, vitamin C ve bazı antioksidanların tersine, hücrede endojen olarak sentezlenen antioksidan molekülüdür [61, 62]. Glutatyon molekülünün redükte formu olan GSH, radikallere karşı etkilidir. Radikal reaksiyonu sonucu GSH molekülü okside forma dönüşür. Okside form GSSG olarak ifade edilir. Okside form radikallere karşı etkili değildir. GSSG'nin doku veya hücrede yükselmesi, radikallerin veya serbest oksijen radikallerinin artışı gösterir.

Bulgularımızda özellikle kas dokusunda GSSG miktarının isoflavon verilen gruplarda azaldığı belirlenmiştir (Tablo 17). GSSG nin azalışı ya da artmaması iki biyokimyasal mekanizma ile gerçekleşebilir. Birincisi GSSG'nin artması sonucu glutatyon redüktaz enzimi aktive edilerek NADPH'in varlığında okside glutatyon molekülünün redükte forma dönüşümüyle gerçekleşir.

İkincisi ise, diyete ilave edilen isoflavonların radikal reaksiyonlarını engelleyerek GSH in GSSG ye dönüşümünün engellenmesiyle gerçekleşir. Bu çalışmada ikinci yolun daha ağır bastığını söyleyebiliriz [63]. H₂O₂ ve buna bağlı olarak oluşan radikallerin hücredeki

moleküllere zarar vermeden isoflavonlar tarafından önlendiğini belirtmişlerdir [64]. İsoflavonların canlı sistemde lipid peroksidasyonu azaltarak DNA, proteinler ve lipidleri hasardan koruduğunu göstermişlerdir.

Bu araştırmacılar, isoflavonların reaktif oksijen türlerine karşı bir antioksidan gibi davrandığını ileri sürmüşlerdir. Bu araştırmacıların sonucuna göre; isoflavonların radikalleri temizleyerek GSH miktarını koruduğu ya da GSSG oluşumunu azalttığı söylenebilir. Çünkü redükte glutatyon (GSH) bazı antioksidan enzimlerin yapısına katılabildiği gibi, tek başına da özellikle hidrojen peroksit ve hidrojen peroksitin yıkılımlından ileri gelen OH • radikaline karşı etkili olmaktadır. Bu sonuçlara göre glutatyon ve isoflavonların bu radikallere karşı birlikte etkili olduğu da söylenebilir.

Bulgularımızda kolesterol miktarının kas dokusunda 800 mg isoflavon verilen grupta, karaciğerde ise her iki grupta azaldığı saptanmıştır (Tablo 17). İnsanlar tarafından hem etinden hem de yumurtasından faydalanılan bildircinlerde kolesterol miktarının azaltılması halk sağlığı açısından önemli bir sonuçtur. İsoflavonların kolesterol sentezini nasıl etkileyerek azalttığı ise başka bir bilimsel gerçektir.

Yapılan klinik çalışmalar da isoflavon içeren soya proteinlerinin hipokolesterolemik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir [65]. Ayrıca 40 yılı aşkın süredir hiperkolesterolemik bireylerde isoflavon içerikli soya proteinlerinin kolesterol düşürücü etkiye sahip olduğu bilinmektedir [66, 67]. Japonlar tarafından yapılan bir çalışmada günlük olarak alınan soya proteinleri ile serum kolesterol seviyesi arasında ters bir ilişkinin olduğu ileri sürülmüştür [68].

Diyette bulunan flavon ve flavonol türevlerinin makrofajlar aracılığı ile meydana gelen LDL oksidasyonunu önemli ölçüde inhibe ettiğini bildirmektedir[69].

İsoflavonların kolesterol düşürücü etkisi üzerine yapılan çalışmalarda, kolesterol safra asitlerine dönüştürülerek dışkıyla ya da başka atılım şekilleriyle vucuttan atıldığı belirtilmiştir [69]. Safra asitlerinin karaciğer dolaşımına katılmasının engellenmesi sonucu kolesterol 7 α -hidroksilaz ve HMG Co A (3 -hidroksi -3-metil-qlutaril koenzim A) redüktaz enziminin düzenlenmesine yol açmaktadır. Özellikle HMG Co A enzimi kolesterol biyosentezinde hız sınırlayıcı enzimdir [70, 71]. Aynı araştırmacılar legumanların (soya familyası) genelde LDL kolesterolü düşürücü etkiye sahip olduğu ileri sürülmüştür.

Bütün bu çalışmalara bakıldığında; soy isoflavonların oksidatif hasarı geriletmesi yanında LDL oksidasyonunuda önlediği ancak bunun tam olarak hangi mekanizmalar ile olduğu konusunun net olmadığı görülmektedir. Bu açıdan ele alındığında; kalsiyum bağımlı, HDL kolesterol içeren bir enzim olan ve başta LDL kolesterol olmak üzere plazma lipoproteinlerini serbest oksijen radikallerine bağlı oksidasyondan koruyan antioksidan bir enzim olan paraoksonaz enzimi üzerinde durmak gerekir. Paraoksonaz, lipid peroksitleri ve hidrojen

peroksit (H_2O_2) gibi potent oksidant yapıları enzimatik reaksiyonlarda substrat olarak kullanılabilir. H_2O_2 özellikle aterogenesis sırasında arter duvarı endotelde oluşan major bir oksijen bileşikleri (ROS) türüdür ve LDL oksidasyonuna yol açarak daha potent oksidatif ürünler oluşumuna yol açabilmektedir. Bu nedenle paraoksanaz enziminin H_2O_2 hidrolize edebilme yeteneği özellikle potent antioksidan yapıların ortadan kaldırılmasında önemli bir rol oynamaktadır[72].

Gaz kromatografisi ile yapılan analizlerde kas ve karaciğer dokularında, miristik (14:0), palmitik (16:0) , palmitoleik (16:1 n 9), stearik (18:0) , oleik (18.1 n 9) , linoleik (18:2 n 6) , linolenik (18:3 n 3) , eikosatrienoik (20:3 n 6) , araşidonik (20:4 n 6) , eikosapentaenoik (20:5 n-3) , dokosatetraenoik (22:4 n 6), dokosapentaenoik (22:5 n 6 ve n3) ve dokosaheksaenoik (22:6 , n3) asitlerin bulunduğu saptandı.

Bu yağ asitlerinden, 14:0, 16:0, 16:1 n-9, 18:0, 18:1 n-9 gibi yağ asitleri hayvansal dokularda endojen olarak sentezlenen yağ asitleridir. Bunlardan 16:0, lipogenez olarak bilinen (lipid biyosentezi) biyokimyasal olayın son ürünüdür. Bu yağ asidi, yağ asidi sentetaz enzimi tarafından sentezlenir ve değişik enzimatik reaksiyonlarla serbest hale getirilir.16:0 dan Δ^9 desaturaz (Steroil Co A) enzimi tarafından 9. ve 10.C 'lar arasında bir adet çift bağ girişi yapılarak 16:1' in sentezi gerçekleştirilir. Hem yağ asidi sentetaz hem de Δ^9 desaturaz enzimlerinin aktiviteleri farklı diyetlerle beslenme, değişik hormonlar ve diyetle ilave edilen maddeler tarafından etkilenmektedir [36-40]

Δ^9 desaturaz enzimi, aynı zamanda 18:0' dan 18:1 n 9 yağ asidinin oluşumunu katalize etmektedir [40]. Stearik asit ise, 16:0' dan zincir uzatılma reaksiyonu ile sentezlenir. Bu yağ asitlerinin miktarı ve bu sentezde görev alan enzimler farklı diyetler ve maddeler tarafından etkilenmektedir.

Bulgularımızda, palmitik asitin kas dokusunda her iki isoflavon grubunda arttığı halde, karaciğer dokusunda değişim gözlenmedi. Aynı şekilde kas dokusunda stearik asit miktarı kontrol grubuna göre azalırken oleik asit miktarının isoflavon gruplarında arttığı saptandı (Tablo 7). Karaciğer dokusunda stearik asit te, isoflavon verilen gruplarda farklılıklar gözlenmiştir.(Tablo 12). Yağ asitleri bakımından karaciğer ve kas dokusunda birbirine paralel olmayan sonuçlar elde edilmiştir. Bunun nedeni iki dokunun farklı özelliklere sahip olmasından kaynaklanmaktadır. Karaciğer dokusu yağ asidi sentezi yapan dokulardan biri olmasına rağmen, kas dokusunun yağ asidi sentezi yapamadığı bilinmektedir. Karaciğer dokusu endojen olarak sentezlediği yağ asitlerinden yağ asidi bileşimi etkilendiği halde, kas dokusunun dolaşımdan aldığı yağ asitlerinden etkilendiği söylenebilir.

Bulgularımızda elde edilen sonuçlara göre; isoflavonların karaciğerdeki yağ asidi sentezi üzerinde etkili olduğu söylenemez. Ancak dolaşımında taşınan yağ asitlerinin kas dokusuna girişini arttırdığını ve kolaylaştırdığını söyleyebiliriz.

Karaciğer dokusunda, 200 mg isoflavon verilen grupta, stearik asidin azalması ve oleik asidin artması Δ^9 desaturaz enziminin aktivitesinin artmasının bir sonucu olabilir. Çünkü bu enzim aktivitesi çeşitli diyet, hormon ve değişik faktörler tarafından etkilenmektedir [38, 40].

Palmitik, palmitoleik, stearik ve oleik asitler, genellikle trigliseroller gibi depo lipidlerinde yer almasına rağmen, hücre membranının yapısında yer alan fosfolipidler ve sfingolipidlerin de yapısına katılmaktadır [40]. Bu yağ asitlerinin sentezi hücredeki homeostaziye sağlamada önemli bir biyokimyasal ve fizyolojik olaydır [36, 38, 40]. Dolayısıyla yağ asidi sentetaz ve Δ^9 desaturaz enzimlerinin de aktivitelerinin düzenlenmesi biyokimyasal açıdan çok önemlidir.

Dokuda endojen olarak sentezlenen yağ asitlerinin dışında, esansiyel yağ asitleri olarak bilinen bir yağ asidi metabolizması mevcuttur. Bu yağ asidi metabolizması linoleik (18:2 n 6) ve linolenik (18:3 n 3) asitlerle başlar [37]. Zincir uzatılması ve desaturasyon işlemi sonucunda 18:4, 20:2, 20:3, 20:4, 20:5, 22:4, 22:5, ve 22:6 gibi yağ asitlerinin sentezi gerçekleşir [37]. Bu yağ asitleri içinde en yüksek oranda bulunan yağ asidi araşidonik (22:6 n 3) asitlerdir. Bu yağ asitleri hayvansal dokularda Δ^6 ve Δ^5 desaturaz enzimleri adı verilen Δ^6 desaturasyon yoluyla sentezlenir [37, 39]. Δ^6 ve Δ^5 desaturaz enzimleri de Δ^9 desaturaz enzimi gibi bazı faktörler tarafından etkilenmektedir.

Bulgularımızda, kas dokusunda aşırı doymamış yağ asidi miktarlarında, kontrol grubuna göre her iki isoflavon grubunda azalma gözlenirken karaciğer dokusunda yalnızca 200 mg isoflavon verilen grupta azalma saptanmıştır. Dokulara göre bu farklı sonuçların elde edilmesi, dokuların farklı metabolik özelliklere sahip olmasından kaynaklanabilir. Buna rağmen Δ^9 desaturaz aktivitesinin tersine Δ^6 ve Δ^5 desaturazların aktivitesinin isoflavonlar tarafından azaltıldığı söylenebilir, fakat bu konuda daha ileri düzeyde araştırmalara ihtiyaç vardır. Buna rağmen, isoflavon uygulamasının doza bağlı olarak kas ve karaciğer dokularında antioksidan kapasiteyi arttırdığı ve yağ asidi metabolizmasını etkilediği saptanmıştır.

5. KAYNAKLAR

1. Nelson, D. L., Cox, M. M., 2000, Lehninger Principles of Biochemistry. Worth publishers, Third Edition, p. 1152, New York.
2. P, C Chomge, R-A. Harvey Biyokimya, Nobel Tıp Kitabevleri 1997 İstanbul.
3. Mantgomery Conway, Spector Chappel, Biyokimya. Palme Yayıncılık 2000 Ankara.
4. Robert, K., Murray, Dorly K-Granner, Peter A-Mayes, Victor, W, Roolwell. Harper Biyokimya Nobel Tıp Kitabevleri 2004.
5. Ergün, A., Çolpan, İ., Yıldız, G., Küçükersan, S., Tuncer, Ş.D., Yalçın, S., Küçükersan, M.K., Şehu, A., 2004, Yemler Yem Hijyeni ve Teknolojisi, ANKARA.
6. Messina, M.J., 1999, Legumes and soybeans: Overview of their nutritional profiles and health effects, Am. J. Clin. Nutr., 70, 439-450.
7. Wang, H.J., Murphy, P.A., 1982, Isoflavan content of processed soybean products, Food Technol, 43, 60-64.
8. Faraj A and Vasanthan T., 2004, Soybean isoflavones: Effects of processing and health benefist, (20) ,51-75.
9. Barnes, S., Kim, H., 1998, Soy İsoflavones, estrogens and growth factor signaling. The Soy Connection Newsletter, 6:2 .
10. Murphy, P.A., Barua, K., Hauck, C.C., 2002, Solvent extraction selection in the determination of isoflavones in soy foods, J. Chromatog. B, 777, 129-138.
11. Wang, H.J and Murphy, P.A., 1996, Mass balance study of isoflavones during soybean processing, Agric. Food Chem., 44, 2377-2383.
12. Sone, M., Sum, T., Wang, C., Mukherjee, S., 2004, The soy isoflavone; genistein, protects human cortical neuronal cell, from oxidative stres, NeuroToxicology, 25, 885 – 891.
- 13 Xu, X., Wang, H.J., Murphy, P.A., Hendrich S., 2000, Neither background diet nor type of soy food affects short-term isoflavone bioavailability in women, J. Nutr., 130 (4), 798-801.
14. Coward, L., Smith, M., Kirk, M., Barnes, S., 1998, Chemical modification of isoflavones in soy foods during coduing and processing, Am. J. Clin. Nutr., 68, 1486-1491.
15. Wang, C., Wixon, R., 1988, Phytochemicals in soybeans and their potential health benefits, Agric Exp. Station J. Article, 3086, İNFORM 10, 315-21.

16. Hintz, K.K., Ren, J., 2004, Phytoestrogenic isoflavones daidzein and genistein reduce glucose –toxicity-induced cardiac contractile dysfunction in ventricular myocytes, *Endocrine Research*, 30(2), 215-223.
17. Birt, D.F., Hendrich, S., Wang, W., 2001, Dietary agents in cancer prevention : flavonoids and isoflavanoids, *Pharmacology & Therapeutics*, 90, 157-177.
18. Santiago, L.A., Hiramatsu, M., Mori, M., 1992, (Tokyo). Japanese soybean paste miso scavenges free radicals and inhibits lipid peroxidation. *J. Nutr. Sci. Vitaminol*, 38, 297-304.
19. Arora, A., Valcic, S., Cornejo, S., Muralee, G.N., Timmermann, B.N., Liebler, D.C., 2000, Reactions of genistein with alkylperoxyl radicals, *Chem. Res. Toxicol* 13, 638 – 45.
20. Anderson, J.J., Ambrose, W.W., Garner, S.C., (1995b), Orally dosed genistein from soy and prevention of cancerous bone loss in two ovariectomized rat models., *J. Nutr.*, 125, 799.
21. Blair, H.C., Jordan, S.E., Peterson, T.G., Barnes, S., 1996, Variable effects of tyrosine kinase inhibitors on avian osteoclastic activity and reduction of bone loss in ovariectomized rats, *J. Cellular Biochem.*, 61, 629-637.
22. Messina, J.H., Cawood, E., Kirniburgh, D., Provan, A., Collins, A.R., Iruine, D.S., 2000, Effects of a phytoestrogen food supplement on reproductive health of normal males, *Clin. Sci*, 100, 613-618.
23. Krekt, P., Jarvinen, R., Seppanen R., Heliovaara M., Teppo L., Pukkala E., Aromaa A., 1997, Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms, *Am. Epidemiol* , 146, 223 – 230.
24. Hu, J., Zhang, S., Jia, E., Wang, Q., Liu, Y., Wu, Y., Cheng, Y., 1988, Diet and cancer of the stomach case control study in China., *Int. J. Cancer*, 41, 331 – 335.
25. Anderson, J.W., Johnstone, B.M., Cook-Newell, M.L., (1995a) Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids, *N. Engl. J. Med*, 333, 276-282.
26. Steintmetz, K.A., Kushi, L.H., Bostick, R.M., Folsom, A.R., Potter, J.D., 1994, Vegetables fruit, and colon cancer in the low a womens health study, *Am. J. Epidemiol.*, 139, 1–15.
27. Zhou, J.R., 2004, Soy and the prevention of lifestyle- related diseases, *Clin. & Exp. Pharm. & Physiol*, 31, 14-19.

28. Miksicek, R.J., 1993, Commonly occurring plant-flavonoids have estrogenic activity, *Mol. Pharmacol*, 44, 37-43.
29. Adlercreutz, H., Hamalainen, E., Gorbach, S., Goldin, B., 1992, Dietary phytoestrogens and the menopause in Japan, *Lancet*, 339, 1233.
30. Hertog, M.G.L., Kromhout, D., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Fidanza, F., Giampoli, S., Jansen, A., Menotti, A., Nedeljkovic, S., Pekkarinen, M., Simic, B.S., Toshima, H., Feskens, E.J.M., Hollman, P.C.H., Katan, M.B., 1995, Flavonoids intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the Seven Countries Study, *Arch. Intern. Med*, 155, 381-386.
31. Zheng, W., Dai, Q., Custer, L.J., Shu, X.O., Wen, W.Q., Jin, F., Franke, A.A., 1999, Urinary excretion of isoflavonoids and the risk of breast cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention*, 8, 35-40.
32. Hodges, R.E., Krehl, W.A., Stone, D.B., Lopez, A., 1967, Dietary carbohydrates and low cholesterol diets; effects on serum lipids of man, *Am. Clin. Nutr*, 20, 198-203.
33. Kurowaska, E.M., Jordan, J., Spence, J.D., Wetmure, S., Piche, L., Radzikowski, M., Carroll, K.K., 1996, Role of the main components of whole soybean products, soy protein and soyoil in reducing hypercholesterolemia, In: *The Abstracts of the 2nd International Symposium on the Role of Soy in Preventing and Treating Chronic Disease*. Brussels, Belgium, Sept 15-18, 22.
34. Nakane, Y and Tsudzuki, m., 1999, Development of the skeleton in Japanese quail embryos, *Develop. Growth Differ*, 41, 523-534.
35. Ergün, A., Tuncer, Ş.D., Çolpan, İ., Yıldız, G., Küçükersan, M.K., Küçükersan, S., Şehu, A., 2002, *Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları*, ANKARA.
36. Legrand, P., Bensadoun, A., 1991, Stearoyl-CoA desaturase activity in cultured rat hepatocytes, *Biochim. Biophys. Acta*, 1086, 89-94.
37. Leonarda, A.E., Pereiraa, S.L., Sprecherb, H., Huangam, Y.S., 2004, Elongation of long-chain fatty acids. *Progress in Lipid Research*, 43, 36-54.
38. Cheul Kim, Y., Nitambi M., 1999, Regulation of Stearoyl-CoA desaturase genes; role in cellular metabolism and preadipocyte differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 266, 1-4.

39. Rimoldi, O.J., Finarelli, G.S., Brenner, R.R., 2001, Effectes of diabetes and insulin on hepatic Delta 6 desaturese gene expression, *Biochemical and biophysical research communications*, (283) 2, 323-326.
40. Ntambi, J.M., 1999, Regulations of Stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol, *Journal of Lipid Research*, (409), 1549-1558.
41. Bragagnolo, N., Rodriguez-Amaya, D.B., 2003, Comparison of the cholesterol content of Brazilian chicken and quail eggs, *J. Food Comp. &Analysis*, 16 (2), 147-153.
42. Rupérez, J.F., Barbas, C., Castro, M., Emilio, H., 1999, Determination of α -Tocopheryl acetate in diets of experimental animals. Study of stability in the diets. *J. Chromatography A*, 839, 93-99.
43. Katsanidis, E., Addis, P.B., 1999, Novel HPLC analysis of tocopherols, and cholesterol in tissue. *Free. Radic. Biol. & Med.* 27 (11-12), 1137-1140.
44. Serada, T.J., Mant, C.T., Hodges, R.S., 1997, Use of sodium perchlorate at low pH for peptide separations by reversed-phase liquid chromatography. Influence of perchlorate ion on apparent hydrophilicity of positively charged amino acid side-chains. *J. Chromatog*, 776, 153-165.
45. Hara, A., Radin N.S., 1978, Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent, *Analytical Biochemistry*, (90 1), 420-426.
46. Christie, WW., 1990, *Gas Chromatography and Lipids*. pp. 302, The Oil Press, Glaskow.
47. Christie, WW., 1992, *Gas Chromatography and Lipids*. pp. 302, The Oil Press, Glaskow.
48. Hodek, P., Trefil, P., Stiborova, M., 2002, Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450, *Chemico-Biological Interactions*, 139, 1-21.
49. Yousef, M.I., Esmail, M.A., Baghdadi, H.H., 2004, Effects of isoflavones on reproductive performance, testosterone levels, lipid peroxidation, and seminal plasma biochemistry of male rabbits, *J. Environ. Scie. & Health*, B39, 5-6, 819-833.
50. Fran, K., Donald E., James, G., 2000, Research trends in healthful foods, *Food Tec.*, 54(10), 45-52.
51. Anderson, J.J.B., Adlercreutz, H., Barnes, S., Bennink, M.R., Kurzer, M.S., Muphy, P., Setchell, K., Weaver, CM., Hasler, C.M., 2000, Appropriate isoflavone food fortification levels: results of a consensus conference, *Experimental Biology 2000*, San Diego, CA April ,15-18.

52. Muriel, P., Escobar, Y., 2003, Kupffer cells are responsible for liver cirrhosis induced by carbon tetrachloride, *Journal of Applied Toxicology*, 23 (2), 103-108.
53. Luckey, S.W., Peterson D.R., 2001, Activation of kupffer cells during the course of carbon tetrachloride induced liver injury and fibrosis in rats, *Experimental and Molecular Pathology*, 71 (3): 226-240.
54. Wang, H., Wei, W., Wang, N.P., et al., 2005, Melatonin ameliorates carbontetrachloride-induced hepatic fibrogenesis in rats via inhibition of oxidative stres, *Life Sci.*, 77, 1902-1915.
55. Jeon Tae I.L, Hwang, S.G., Park, N.G., et al., 2003, Antioxidative effect of Chitosan on chronic carbon tetrachloride induced hepatic injury in rats, *Toxicology*, 187, 67-73.
56. Me Kyung Lee, Hae Bok S, Jeong TS, et al., 2002, Supplemnetation of Naringenin and its synthetic derivative alters antioxidant enzyme activites of erythrocyte and liver in high Cholesterol fed rats. *Biorganic and Medicinal Chemistry*, 10, 2239-2244.
57. Rodriguez, R.J., Miranda, C.L., Stevens, J.F., Deinzer, M.L., Buhler, D.R., 2002, İnfluence of prenylated and nonprenylated flavonoids on liver microsomal lipid peroxidation and oxidative injury in rat hepatocytes, 2001, *Food and Chemical Toxicology*, 39, 437-445.
58. Üstündağ, B., Bahçecioğlu, İ.H., Şahin, K., Gülcü, F., Düzgün, S., Özercan, İ.H., Gürsu, M.F., 2005, Soy İsoflavonların Karbon Tetraklorüre (CCl₄) Bağlı Karaciğer Hasarı ve Plazma Paraoksanaz ile Arilesteraz Aktivite Düzeylerine Olan Etkileri, *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 19(4): 263-271.
59. Fhurman, B and Aviram, M, 2001, Flavonoids protect LDL from oxidation and attenuate atherosclerosis, *Current Opinion in Lipidology*, 12(1), 41-48.
60. Aneja R and Upadhyaya G., Ameliorating effect of Phytoestrogens on CCL₄-induced oxidative stres in the livers of male wistar rats, 2005, *Artificial Cells, Blood Substitues and Biotechnology*, 201-203.
61. Lu, S.C., 1999, Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB J*, 13, 1169-1183.
62. Sies, H., 1999, Glutathione and its role in cellular functions, *Free Rad. Bio and Med.*, 127(9-10), 916 – 921.
63. Fran, K., Donald E., James, G., 2000, Research trends in healthful foods, *Food Tec.*, 54(10), 45-52.
64. Sierens, J., Hartley, J.A., Cappbell, M.J., Leathem, A.J., Woodside, J.V., 2001, Effects of phytoestrogen and antioxidant supplementation on oxidative DNA damage assessed using the comet assay, *J. Agric. Food Chem.*, 49 (1), 308-314.

65. Anderson, J.W., Jhonstone, B.M., Cook-Newell, M.E., 1995, Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids (see comments), *N. Engl J. Med*, 333, 276-282.
66. Carroll, K.K., 1991, Review of clinical studies on cholesterol-lowering response to soy protein, *J. Am. Diet Assoc*, 91, 820-827.
67. Carroll, K.K., Kurowska, E.M., Soy consumption and human studies, *J. Nutr.*, 125, 594-597.
68. Nagata, C., Takatsuka, N., Kurisi, Y., Shimizu, H, 1998, Decreased serum total cholesterol concentration is associated with high intake of soy products in japanese men and women, *J. Nutr.* 128, 209-213.
69. Setchell, K., Radd, S, 2000, Soy and other legumes: ‘ Bean’ around a long time but are they the ‘superfoods’ of the millenium and what are the safety issues for their constituent phytoestrogens? *Asia Pasific J. Clin. Nutr*, 9, 13-22.
- 70 Duane, W.C., 1997, Effects of legume consumption on Serum cholesterol, biliary lipids, and sterol metabolism in humans, *J. Lipid Res.*, 38, 1120-1128.
71. Nevri, F., Covarrubias C., Bravo, P., Velasco, N., Ulloa, N., Cruz, F., Fava, M., Severin, C., Del Pozo, R., Antezana, C *et al.*,1989, Influence of legume intake on biliary lipids and cholesterol saturation in young Chilean Men. Identification of a dietary risk faktör for cholesterol gallstone formation in a highly prevalent area (see comments), *Gastroentology*, 96, 825-830.
72. Me Kyung Lee, Hae Bok S, Jeong TS, et al., 2002, Supplemnetation of Naringenin and its synthetic derivative alters antioxidant enzyme activites of erythrocyte and liver in high Cholesterol fed rats. *Biorganic and Medicinal Chemistry*, 10, 2239-2244.