



The Antioxidant Effects of *Linum usitatissimum* and *Physalis peruviana* Extract in the Brain Tissues of Rats Given Toluene

Zehra GÖKÇE¹ & Ökkeş YILMAZ²

Keywords

Linum usitatissimum (flaxseed), Physalis peruviana (goldenberry) lipid peroxidation (LPO), antioxidant, MDA, toluene.

Abstract

The purpose of this study is to demonstrate anti-oxidant effects of keten tohumu and altın çilek on toluene-induced tissue damage in vivo and to study the effects of these plant on human health. Physalis peruviana (P) and Flaxseed (F) were extracted for analyses. The extracts obtained were injected intraperitoneally every other day to Sprague male rats given toluene and the animals were decapitated at the end of the study period. The brain, tissues were removed and lipid peroxidation (LPO) measurements were done in the lipid fraction generated. The fatty acids in the lipid extract were analyzed by gas chromatography after converting them into methyl esters. In addition, the amounts of glutathione, protein, and vitamins were analyzed.

Given the results achieved, it was found that the levels of fatty acids increased in the brain tissues after toluene administration ($p<0.01$, $p<0.001$). In the groups physalis peruviana and flaxseed against toluene, it was found that the glutathione (GSH) level increased and malondialdehyde (MDA) level reduced in all tissues ($p<0.05$, $p<0.01$). Lipophilic vitamin levels examined, plant ekstrakt implement groups levels in the brain tissue increased α -tocopherol compared to control and toluene groups ($p<0.05$). Experimental groups compared the control group, cholesterol levels in the brain tissues increased all experimental groups. ($p<0.05$, $p<0.001$).

Our data indicates that keten tohumu ve altın çilek extract has protective effects against LPO formation in the brain tissues.

Article History

Received
08 June, 2018
Revised
09 July, 2018
Accepted
11 July, 2018

¹ Corresponding Author. Kilis 7 Aralık University, Department of Health Management, Yusuf Şerefoğlu of Health Faculty, zhrgek23@gmail.com

² Fırat University, Department of Biology, Faculty of Science, oyilmaz@firat.edu.tr

Toluen Uygulanan Sıçanların Beyin Dokularında *Linum usitatissimum*, (keten tohumu) *Physalis peruviana* (altın çilek) ve Ekstraktının Antioksidan Etkileri

Anahtar Kelimeler

Linum usitatissimum (Keten Tohumu), *Physalis peruviana* (Altın çilek), lipit peroksidasyonu (LPO), antioksidan, malondialdehit (MDA), toluen.

Özet

Bu çalışmayla in vivo ortamda toluen ile indüklenen doku hasarları üzerine keten tohumu *Linum usitatissimum*, (Flaxseed) ve altın çilek *Physalis peruviana* (Goldenberry) örneklerinin antioksidan etkilerinin ortaya çıkarılması ve bu bitkilerin insan sağlığı üzerine olan etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Altın çilek ve keten tohumu analizler için ekstrakte edildi. Elde edilen ekstratler toluene uygulanan Sprague Dawley ırkına ait erkek sıçanlara gün aşırı intraperitoneal yolla verildikten sonra deney süreleri sonunda dekapite edildi. Beyin dokusu alındıktan sonra oluşturulan lipit fraksiyonunda lipit peroksidasyon (LPO) ölçümü yapıldı. Lipit ekstraktı içindeki yağ asitleri metil esterlerine dönüştürüldükten sonra gaz kromatografisi ile analiz edildi. Ayrıca glutatyon, protein ve vitamin miktarları da incelendi.

Elde edilen sonuçlara göre; toluen uygulaması sonucu beyin dokularında yağ asidi düzeylerinin yükseldiği saptandı ($p<0.01$, $p<0.001$). Toluen uygulamasına karşı bitki ekstraktı verilen gruplarda bütün dokularda glutatyon (GSH) düzeyinin yükseldiği ve malondialdehit (MDA) düzeyinin de azaldığı belirlendi ($p<0.05$, $p<0.01$). Beyin dokusunda lipofilik vitamin düzeyleri incelendiğinde, bitki ekstraktı verilen gruplarda α -tokoferol düzeyinin kontrol ve toluen gruplarına göre artmıştır ($p<0.05$). Deney grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında beyin dokusundaki kolesterol düzeyi tüm deney gruplarında yükseldi ($p<0.05$, $p<0.001$).

Verilerimiz keten tohumu ve altın çilek ekstraktının, beyin dokusunda LPO oluşumuna karşı koruyucu etkisi olduğunu gösterdi.

Makale Geçmişi

Alınan Tarih
08 Haziran 2018
Düzeltilme
09 Temmuz 2018
Kabul Tarihi
11 Temmuz 2018

1. Giriş

Son yıllarda bazı besinlerin “doğal” yollardan hastalıkların önlenmesi ve tedavisindeki etkinliğinin bilimsel olarak ortaya konulması, sağlığımızın korunmasında beslenme desteğinin önemini arttırmıştır. Bu nedenle fonksiyonel besinler, nutrasötikler (nutraceuticals) ve doğal sağlık ürünleri daha fazla tüketilir hale gelmiştir (Çoşkun, 2005).

Bununla beraber benzer özelliklere sahip olarak altın çileği örnek olarak verebiliriz. Altın çilek (*Physalis peruviana*), gerek meyve sanayisi gerekse sağlık açısından ihtiva ettiği yararlarından dolayı, son derece önemli olan fonksiyonel bir meyvedir. Diğer meyve ve sebzelere benzemeyen bir depolama özelliği vardır ki, bu altın çilek meyvesinin çok uzun süre saklanabilmesine ve çok farklı şekillerde tüketilebilmesine imkân tanımaktadır (Ramadan, 2011).

Bu bağlamda bir diğer fonksiyonel besin olarakta keten tohumunu söyleyebiliriz. Uzun zincirli doymamış yağ asidi içeren yağların, örneğin *Linum usitatissimum* (keten tohumu) kalp hastalıkları ve kanser riskini azalttığına dair yapılan çalışmalarda bu bileşenleri içeren özel yağların besleyici farmasötik olarak kullanımının yaygın olduğu görülmektedir. Özellikle α -linolenik asit (ALA, 18:3)'in yüksek tansiyon, trigliserit ve kolestrol düzenleyici olarak sağlık destekleyici bir bileşen şeklinde kullanılabileceğinin önerilmesinden sonra da bu bileşeni içeren bitkisel yağlara ilgi artmıştır (Simopoulos, 1990; Papas, 1998; Cunnane, 1995).

Meyve ve sebzelerde bulunan fenolik bileşikler, vitaminler ve karotenoidler antioksidan aktiviteye sahip olup oksidatif stresle ilişkili hastalıklardan korunmada etkili bileşikler olarak öne çıkmaktadırlar. Bu çalışmayla günlük hayatta sık tüketilen keten tohumu ile son zamanlarda yaygınlaşan altın çilek meyvesinin *in vivo* koşullarda antioksidan özellikleri incelendi.

2. Materyal ve Metod

2.1. Ekstraktların Hazırlanması

P. peruviana (Altın çilek) meyvesi ve *L. usitatissimum* (keten) tohumu örnekleri ticari olarak aktardan satın alındı. *P. peruviana* (Altın çilek) meyvesi ve *L. usitatissimum* (keten) tohumu iyice kurutulduktan sonra blender ile toz haline getirildi. Daha sonra altın çilek ve keten tohumundan ayrı ayrı 50 g tartılarak 250 ml % 85'lik metanol ile ekstrakte edildi. Örnekler, blender içine alındıktan sonra 1 dakika süreyle homojenize edildi. Homojenizasyondan sonra 10 dk santrifüj edildi (5000 rpm +4 °C). Santrifüj sonunda elde edilen süpernatant kısım, döner buharlaştırıcı (rotovapor) ile metanol çözücüsü 55 °C'de ve vakum altında uzaklaştırıldı. Metanolün uzaklaştırılmasından sonra ekstraktlar, 50 ml dimetil sülfoksit'de (DMSO) çözüldü. Ayrıca tekrar altın çilek ve keten tohumundan ayrı ayrı 50 g tartılarak blender ile 250 ml Hekzan izopropanol (3/2) (v/v) karışımında parçalandı ve yukarıdaki işlemler uygulandı. Hem methanol hemde hekzan izopropanol alkol karışımıyla elde edilen ekstraktlar birebir oranında karıştırıldı. Sıçanlara haftada 2 kez 1 ml/kg düzeyinde intraperitoneal yolla verildi.

2.2. Toksik Maddelerin Hazırlanması

Toluen zeytinyağı (SİGMA) ile birebir oranında karıştırılmasıyla elde edildi. Oluşan bu karışım sıçanlara haftada iki defa 0.5 ml/kg dozda intraperitoneal yolla verildi.

2.3. Deney Hayvanları

Deneysel çalışmaya, Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'ndan 22.05.2012/66 onayı alındıktan sonra yürütülmeye başlandı. Deneysel çalışmada kullanılan Sprague Dawley ırkına ait erkek sıçanlar, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Merkezi (FÜTDAM)'dan temin edildi ve aynı yerde deneysel uygulama gerçekleştirildi.

Çalışmada Sprague Dawley ırkına ait erkek sıçanlar rastgele seçilerek deney hayvanı olarak kullanıldı. Deney süresince aşağıdaki gruplar oluşturuldu:

1. Kontrol grubu (K) (n= 7)
2. Toluen (T) (n=7)
3. Toluen+ *P. peruviana* (TA) (n= 7)
4. Toluen + *L. usitatissimum* (TK) (n= 7)

1. Kontrol grubu (K) : Bu gruptaki sıçanlara, intraperitoneal yolla yalnızca haftada iki defa 0.5 mg/kg DMSO verildi. Deney süresince sıçanların standart besin maddesi ve çeşme suyu ile beslenmeleri sağlandı.

2. Toluen grubu (T) : Bu gruptaki sıçanlara, haftada iki defa 0.5 ml/kg dozda toluen intraperitoneal yolla verildi. Deney süresince sıçanların, standart besin maddesi ve çeşme suyu ile beslenmeleri sağlandı.

3. Toluen+ *P. Peruviana* (TA) : Bu gruptaki sıçanlara, haftada iki defa 0.5 ml/kg dozda toluen intraperitoneal yolla verildi. Deney süresince sıçanların içme sularına 2 g/L *P. peruviana* meyve tozu ilave edildi. Ayrıca haftada iki defa *P. peruviana* ekstraktı, 1 ml/kg düzeyinde intraperitoneal yolla verildi. Bu gruptaki sıçanlarında deney süresince standart besin maddesi ile beslenmeleri sağlandı.

4. Toluen+ *L. usitatissimum* (TK) : Bu gruptaki sıçanlara haftada iki defa 0.5 ml/kg dozda toluen intraperitoneal yolla verildi. Deney süresince sıçanların içme sularına 2 g/L *L. usitatissimum* tozu ilave edildi. Ayrıca haftada iki defa *L. usitatissimum* ekstraktı 1 ml/kg düzeyinde intraperitoneal yolla verildi. Bu gruptaki sıçanlarında deney süresince standart besin maddesi ile beslenmeleri sağlandı.

Deneyisel uygulama, 8 hafta süreyle yapıldı. Ayrıca çalışmamızda TK, TA gruplarının günlük tükettiği su miktarı da ölçüldü. Bu miktar ortalama 50 ml/sıçan olarak belirlendi.

2.4. Doku Örneklerinin Alınması

Deney hayvanları, etik kurul raporuna göre anestezi'ye alınıp, kalpten kan alma yolu ile canlılıkları sona erdirildikten sonra dekapite edildi. Dekapitasyondan hemen sonra kan ile beyin dokuları alındı. Bu doku kısımları, bekletilmeden % 0.9 serum fizyolojik ile yıkanarak, kandan temizlenmeleri sağlandı ve biyokimyasal işlemler yapılıncaya kadar -70 C'de saklandı.

2.5. Dokulardaki Lipid peroksidasyon Miktarının Ölçülmesi

Beyin dokularından uygun miktarda tartılarak, falkon tüplerine alındı. Üzerine Tris tamponu pH: 7.4 (Tris baz + Tris hidroklorit + EDTA) ilave edildi. Homojenizatör adı verilen parçalayıcıda homojenizasyon yapıldı ve 20 dk santifüj edildi. LPO düzeyinin ölçümü, Ohkawa vd., (1979) 'nin metoduna göre bazı modifikasyonlar yapılarak spektrofotometre ile ölçüldü. Elde edilen süpernatant kısımdan 1ml alınarak üzerine sırasıyla: 0,5 ml % 8,1'lik SDS, 0,5 ml % 0,8'lik TBA, 1ml % 10'luk TCA, 1ml % 20'lik asetik asit ve 50 µl % 4'lük BHT eklendi ve bu karışım votreklendi. Karışım, 85°C'de kaynar su banyosunda 1 saat bekletildi. Bu süre sonunda örnekler çıkarılıp soğutulularak bütanol-pridin karışımı (3/2) (v/v) eklenip, vortekslendikten sonra 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda üstteki kısımdan 2 ml alınarak, oluşan pembe renk spektrofotometrede 532 nm'de köre karşı okundu.

2.6. Dokulardaki Glutasyon Miktarının Ölçülmesi

Deney hayvanlarından alınan uygun miktardaki doku örnekleri, Tris-HCl ve EDTA (pH:7) tamponu ile homojenizasyondan sonra +4 °C'de 9000 rpm 10 dk süre ile santrifüj edilerek doku pelletinden ayrıldı. Santrifüj sonunda üstteki süpernatant kısımdan 1 ml alınarak, Süpernatant kısım üzerine: 1 ml DTNB, 1 ml sodyum sitrat ve 0.3 M Na₂HPO₄ çözeltisinden 3 ml ilave edildi ve oluşan sarı renk 412 nm'de köre karşı okundu (Elman, 1959).

2.7. Dokularda Total Protein Miktarının Ölçülmesi

Deney hayvanlarından alınan uygun miktardaki doku örnekleri, Tris-HCl ve EDTA (pH:7) tamponu ile homojenizasyondan sonra +4 °C'de 9000 rpm 10 dk süre ile santrifüj edilerek doku pelletinden ayrıldı. Santrifüj sonunda üstteki süpernatant kısımdan alınan 1 ml örnek üzerine, Lowry (1951) metodu uygulandı. Bu amaçla aşağıdaki çözeltiler hazırlandı:

A= % 1 (w/v) Bakır sulfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) çözeltisi

B= % 2 (w/v) Sodyum potasyum tartarat

C= 0.2 M Sodyum hidroksit

D= % 4 (w/v) Sodyum karbonat

Toplam protein miktarı tayin edileceği zaman 49 ml C reaktifi üzerine sırasıyla: 49 ml D reaktifi, 1 ml A ve 1 ml B reaktifinden ilave edildi. Bu çözeltilerin karışımından hazırlanan reaktife, E solüsyonu adı verildi. Daha sonra protein çözeltisinden deney tüpüne 5µl alındı ve örnek üzerine 4 ml E reaktifinden ilave edildi. Bu çözelti bir süre karıştırıldı ve 10 dk oda sıcaklığında bekletildi. Bekleme süresi sonunda 500 µl Folin (10 ml Folin-Ciocalteau reaktifi üzerine 10 ml saf su ilave edilerek hazırlanır) karışımından eklenerek, 30 dk tekrar oda sıcaklığında bekletildi. Bekleme süresinden sonra 750 nm'de köre karşı spektrofotometrede okundu.

2.8. Dokulardan Lipidlerin Ekstraksiyonu

Doku örneklerinden lipitlerin ekstraksiyonu, 3:2 (v/v) hekzan izopropanol karışımının kullanıldığı Hara ve Radin (1978) metoduyla yapıldı. Bunun için dokular, homojenizatörde 11000 rpm'de 30 sn ile 3:2 (v/v) oranında 10 mL hekzan izopropanol ile parçalandı. Daha sonra 6000 rpm'de 10 dk süre ile santrifüj edilen doku örneklerinden üstteki süpernatant kısım alınarak ağzı kapaklı deney tüplerine konuldu.

2.9. Dokulardan Yağ Asidi Metil Esterlerinin Hazırlanması

Lipitler içinde bulunan yağ asitlerinin gaz kromatografik analizinin yapılabilmesi için Christie (1990) tarafından ifade edildiği gibi uygulaması pratik ve verimi yüksek olan asit katalizli esterleştirme yöntemi kullanıldı.

Bu yöntemle göre: Metil esteri hazırlamak için hekzan izopropanol fazı içindeki lipit ekstraktı 30 ml'lik sızdırma yapmayan vida kapaklı 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. 15 saatlik süre sonunda, tüpler etüvden çıkarıldı oda sıcaklığına kadar soğutuldu ve 5 mL % 5'lik NaCl ilave edilerek iyice karıştırıldı. Tüpler içinde oluşan yağ asidi metil esterleri, 5 ml hekzan ile ekstre edildi ve hekzan fazı üstten pipetle alınarak 5 ml % 2'lik KHCO_3 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 ve deney tüplerinin altındaki yağ asitleri 1 ml hekzan ile çözülerek 2 ml'lik ağzı kapaklı otosampler vialleri içine alınarak gaz kromatografi cihazında analiz edildi.

2.10. Yağ Asidi Metil Esterlerinin Gaz Kromatografik Analizi

Lipit ekstraktı içindeki yağ asitleri, metil esterlerine dönüştürüldükten sonra SHIMADZU GC 17 gaz kromatografisi ile analiz edildi. Bu analiz için 25 m uzunluğunda, 0,25µm. 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. Kolon sıcaklık programı 120 °C'den 220 °C'ye kadar ayarlandı. Sıcaklık artışı 200 °C'ye kadar 5 °C /dk ve 200 °C'den 220 °C'ye kadar 4 °C /dk olarak belirlendi. 220 °C'de 8 dk tutuldu ve toplam süre 35 dk olarak belirlendi. Taşıyıcı gaz olarak azot gazı kullanıldı. Analiz sırasında örnekler için yağ asidi metil esterlerinin analizinden önce, standart yağ asidi metil esterlerine ait karışımlar enjekte edilerek, her bir yağ asidinin alıkonma süreleri belirlendi. Bu işlemden sonra gerekli programlama yapılarak, örnekler için yağ asidi metil esterleri karışımlarının analizi yapıldı (Tvrzicka vd., 2002).

2.11. Dokularda ADEK Vitaminleri ile Kolesterol Miktarının HPLC Cihazı ile Analizi

Dokuların 10 ml 3/2 hekzan izopropanol karışımında parçalanıp santrifuj edilmesiyle elde edilen süpernatant kısımdan, 5 ml süpernatant 25 ml 'lik ağız kapaklı tüpler içerisine alınarak üzerine % 5'lik KOH çözeltisi ilave edildi. Vortekslenildikten sonra 85 C'de 15 dk bekletildi. Tüpler çıkartılarak oda sıcaklığına kadar soğutuldu ve üzerine 5ml saf su ilave edildi ve karıştırıldı. Sabunlaşmayan lipofilik moleküller, 10 ml hekzan ile ekstrakte edildi. Hekzan fazı, azot akımı ile uçuruldu. 1 ml (% 50+% 50, v/v) asetonitril/metanol karışımında çözülerek otosampler viallerine alındı ve analiz edildi.

Analiz, Shimadzu marka HPLC cihazı ile yapıldı. Cihazda: pompa olarak LC-10 ADVP UV-visible, detectör olarak SPD-10AVP, kolon fırını olarak CTO-10ASVP, otosampler olarak SIL-10ADVP, degasser ünitesi olarak DGU-14A ve Class VP software (Shimadzu, Kyoto Japan). Mobil faz olarak asetonitril/metanol (% 60+% 40, v/v) karışımı kullanıldı. Mobil faz akış hızı 1ml olarak belirlendi. Analiz için UV dedektör kullanıldı. Kolon olarak da Süpelcosil LCTM. 18 (15×4.6 cm, 5 µm; Sigma, USA) kolonu kullanıldı. A vitamini dedeksiyon dalga boyu 326 nm, E vitamini 202 nm, D ve K vitaminleri de 265 nm'de ölçüldü (Sánchez-Machado vd., 2002; Lopez-Cervantes vd., 2006).

2.12. İstatistik Analizi

İstatistik analizi için, SPSS 15.0 software programı kullanıldı. Kontrol grubu ile deneysel gruplar arasındaki karşılaştırma varyans analizi (ANOVA) ve LSD testleri kullanılarak yapıldı. Sonuçlar mean±SEM olarak verildi. Gruplar arasındaki farklılıklarda p<0.05, p<0.01 ve p<0.001 değerleri kullanıldı.

Bu çalışma, Fırat Üniversitesi, FÜBAP (Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi) tarafından FF.12.11 nolu proje ile desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı Fırat Üniversitesine teşekkürlerimizi sunarız.

3. Bulgular

Bu çalışmada toluen, uygulanarak oksidatif stres oluşturulan sıçanlarda altın çilek meyvesi ile keten tohumu ekstraktlarının beyin dokularındaki yağ asidi, ADEK vitaminleri, kolesterol, indirgenmiş glutatyon (GSH), total protein ile malondialdehit (MDA) değerleri üzerine olan etkileri araştırıldı. Ayrıca çalışma boyunca her hafta sıçanların ağırlıkları ölçüldü. Elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilip, sonuçlar Mean±SEM olarak tablolar halinde verildi.

Gruplardaki sıçanların haftalara göre vücut ağırlık değişimleri Tablo 4'te verildi. Çalışma süresince sıçanların ağırlık ölçümlerinde, kontrol grubunda istatistiksel olarak düzenli bir artış gözlemlendi ($p<0,01$). Çalışma süresince T grubundaki ağırlık değişimi kontrol grubuna göre oldukça belirgin bir düzeyde azalma saptandı ($p<0,001$). Bütün haftalarda ölçülen ağırlık değerlerinde altın çilek ekstraktı uygulanan grupların kontrol grubuna yaklaştığı; ancak bu yakınlığın istatistiksel olarak kısmi düzeyde olduğu belirlendi. ($p<0,05$). Keten tohumu ekstraktı uygulanan gruplar kontrol grubuyla kıyaslandığında, istatistiksel olarak belirgin düzeyde farklılık olduğu tespit edildi ($p<0,01$) (Tablo 1).

Tablo 1. Gruplardaki sıçanların haftalara göre vücut ağırlık değerleri (gram).

Gruplar	K	T	TK	TA
1.Hafta	221±9,50	219±5,65	227±9,50^c	220±9,54 ^b
2. Hafta	227±4,87	237±3,79	223±6,98^c	247±4,69 ^b
3. Hafta	249±5,65	243±5,12	230±4,76^c	252±7,34 ^b
4. Hafta	260±8,45	240±3,78	241±1,12^c	239±5,05 ^b
5. Hafta	269±9,87	235±6,78	245±5,65^c	234±9,53 ^b
6. Hafta	270±4,76	236±6,54	243±7,80^c	240±2,45 ^b
7. Hafta	281±4,31	220±7,56	249±8,12^c	243±5,65 ^b
8. Hafta	288±9,21	214±4,76^d	252±4,12^c	241±3,17 ^b

d: $p<0,001$; c: $p<0,01$; b: $p<0,05$; a: $p>0,05$

T: Toluen K: Kontrol TK: Toluen + Keten tohumu TA: Toluen + Altın çilek

3.1. Toluen Uygulanan Sıçanların Beyin Dokusundaki Yağ Asidi Bileşimi Üzerine Etkileri

T, TK ve TA grupları yağ asidi bileşimine göre kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, 16:0 düzeyinin T grubunda belirgin düzeyde azalma gösterdiği halde TK ve TA gruplarında artış gösterdiği saptandı ($p<0,01$; $p<0,05$; $p<0,01$). 18:0 düzeyinin kontrol grubuna göre TA grubunda kısmen artış gösterdiği gözlemlendi ($p<0,05$). 18:1 n9t düzeyinin ise TK ve TA gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak farklılık göstermedikleri saptandı ($p>0,05$). 18:1 n9c düzeyinin TK ve TA gruplarında kontrole kıyasla istatistiksel olarak kısmi düzeyde artış gösterirken T grubunda ise istatistiksel olarak kısmi düzeyde azalma gösterdiği belirlendi ($p<0,05$). Kontrole göre 18:2 n6t düzeyinin TK ve TA gruplarında istatistiksel olarak farklılık göstermediği; T grubunda ise belirgin düzeyde azaldığı saptandı ($p>0,05$; $p<0,01$). 18:2 n6c düzeyi TK grubunda kontrole göre istatistiksel olarak belirgin düzeyde artış gösterirken, TA grubunda ise kontrol grubuna göre farklılık belirlenmedi ($p<0,01$; $p>0,05$). TA grubu 20:4 n6 ve 22:6 n3 düzeylerine göre kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak farklılık göstermediği tespit edildi ($p>0,05$). Diğer yağ asitlerinin düzeyinin kontrole göre TK ve TA

grubunda kısmi düzeyde yüksek olduğu; T grubunda ise belirgin düzeyde azalma olduğu gözlemlendi ($p<0.05$; $p<0.01$) (Tablo 2).

T, TA ve TK grupları Σ SFA düzeyine göre kıyaslandıklarında, T grubunun kontrole göre kısmi düzeyde azalma gösterdiği; TA grubunun kontrol grubuna göre belirgin düzeyde artış gösterdiği ve TK grubunun kontrol grubuna göre istatistiksel olarak farklılık göstermediği saptandı ($p<0.05$; $p<0.01$; $p>0.05$). Σ MUFA düzeyinin TK ve TA gruplarında kontrol grubuna göre çok daha anlamlı düzeyde artış gösterdiği; T grubunun ise kısmi düzeyde azalma gösterdiği tespit edildi ($p<0.001$; $p<0.05$). Σ PUFA ve toplam yağ asidi düzeyinin TK ve TA gruplarında kontrol grubuna göre belirgin düzeyde artış gösterdiği; T grubunda ise istatistiksel olarak kısmi düzeyde azalma gösterdiği saptandı ($p<0.01$; $p<0.05$) (Tablo 2).

Tablo 2: Toluen uygulanan sıçanların beyin dokusundaki yağ asidi bileşimi üzerine etkileri (mg/g).

Yağ Asitleri	K	T	TK	TA
16:0	4,30±0,73	3,28±0,55^c	4,54±0,16 ^b	5,11±0,22^c
16:1	0,36±0,03	0,23±0,02	0,31±0,02	0,30±0,01
18:0	5,46±0,16	4,35±0,19	4,85±0,27	5,74±0,20 ^b
18:1 n-9t	0,12±0,02	0,09±0,01	0,13±0,01 ^a	0,14±0,02 ^a
18:1 n-9c	5,34±0,09	4,18±0,17 ^b	5,82±0,29 ^b	5,70±0,23 ^b
18:2 n-6t	0,33±0,02	0,16±0,07^c	0,39±0,02 ^a	0,38±0,02 ^a
18:2 n-6c	0,18±0,01	0,12±0,01	0,73±0,11^c	0,17±0,02 ^a
20:4 n-6	2,55±0,11	2,00±0,04^c	2,23±0,12	2,58±0,05 ^a
22:6 n-3	3,25±0,07	2,46±0,06^c	2,94±0,10 ^b	3,29±0,09 ^a
Diğerleri	0,42±0,03	0,11±0,31^c	0,75±0,07 ^b	0,60±0,04 ^b
Σ SFA	9,76±0,89	7,63±0,74 ^b	9,39±0,43 ^a	10,85±0,42^c
Σ MUFA	7,14±1,21	6,27±0,32 ^b	8,80±0,43^d	8,73±0,32^d
Σ PUFA	5,50±0,93	4,13±0,70 ^b	6,44±0,22^c	6,67±0,15^c
Σ Yağ asidi	22,82±3,77	18,14±2,07 ^b	25,38±1,15^c	26,85±0,93^c

d: $p<0.001$; c: $p<0.01$; b: $p<0.05$; a: $p>0.05$

3.2. Toluen Uygulanan Sıçanların Beyin Dokusundaki ADEK Vitaminleri ve Kolesterol Değerleri

Beyin dokusundaki ADEK vitaminleri ve kolesterol düzeyine göre T, TK ve TA grupları kontrol grubuyla kıyaslandığında, K1 vitamininin T grubunda belirgin düzeyde azaldığı gözlemlendi ($p<0.01$). TK grubunda K2 düzeyinin kontrol grubuna göre belirgin düzeyde artış gösterdiği saptanmıştır ($p<0.01$). TA grubunda D2 düzeyinin kontrole kıyasla kısmi düzeyde arttığı; α tokoferol asetat düzeyinin ise kısmi düzeyde azaldığı tespit edildi ($p<0.05$). α tokoferol ve retinol düzeylerinin kontrol grubuna göre T grubunda istatistiksel olarak azaldığı saptandı ($p<0.01$; $p<0.001$). Kolesterol seviyesinin TK grubunda kontrole göre istatistiksel olarak bir farklılık göstermediği; TA grubunda ise kısmi düzeyde artış gösterdiği gözlemlendi ($p>0.05$; $p<0.05$) (Tablo 3).

Tablo 3: Toluen uygulanan sıçanların beyin dokusundaki ADEK vitaminleri ve kolesterol değerleri ($\mu\text{g/g}$).

Vitaminler ve Kolesterol	K	T	TK	TA
K1	6,69 \pm 0,23	4,29\pm0,17^c	6,13 \pm 0,34	5,60 \pm 0,21
K2	7,20 \pm 0,25	5,40 \pm 0,19	10,0\pm0,30^c	6,06 \pm 0,44
D2	4,00 \pm 0,19	3,43 \pm 0,20 ^b	4,32 \pm 0,24	5,91 \pm 0,25 ^b
D3	3,63 \pm 0,20	3,49 \pm 0,21	4,26 \pm 0,48 ^b	3,57 \pm 0,11
α - Tokoferol	22,94 \pm 1,35	10,84\pm0,73^c	17,27 \pm 0,37	15,97 \pm 0,47
α -Tokoferol asetat	31,43 \pm 0,45	25,31 \pm 4,64	32,67 \pm 0,36	31,97 \pm 0,72 ^b
Retinol	2,23 \pm 0,03	0,42\pm0,92^d	1,80 \pm 0,82	1,83 \pm 0,15
Kolesterol ($\mu\text{mol/g}$)	14,15 \pm 0,16	17,62\pm0,34^c	14,07 \pm 0,24 ^a	15,26 \pm 0,11 ^b

d: $p < 0.001$; c: $p < 0.01$; b: $p < 0.05$; a: $p > 0.05$

3.3. Toluen Uygulanan Sıçanların Beyin Dokusundaki İndirgenmiş Glutasyon (GSH), Total Protein ve MDA Düzeyleri

Beyin dokusundaki indirgenmiş glutasyon (GSH), total protein ve MDA düzeyleri Tablo 4'da gösterildi. GSH düzeyi bakımından kontrol grubuna göre toluen uygulanan gruplarda bir azalma olduğu belirlendi. Bu azalmanın, K grubuna göre T grubunda istatistiksel olarak oldukça anlamlı; TK grubunda kısmi; TA grubunda ise belirgin olduğu saptandı ($p < 0,001$; $p < 0,05$; $p < 0,01$).

Tablo 4: Toluen uygulanan sıçanların beyin dokusundaki GSH, Total protein ve MDA düzeylerinin değişimi.

Gruplar	GSH ($\mu\text{mol/g}$)	Total protein (mg/g)	MDA (nmol/g)
K	1,79 \pm 0,08	88,51 \pm 5,74	22,07 \pm 1,82
T	0,63\pm0,05^d	87,97 \pm 4,11	37,07 \pm 5,65 ^b
TK	1,56 \pm 0,09 ^b	87,52 \pm 3,83	23,51 \pm 1,25
TA	1,38\pm0,03^c	122,33\pm14,09^d	28,36 \pm 1,43

d: $p < 0.001$; c: $p < 0.01$; b: $p < 0.05$; a: $p > 0.05$

Beyin dokusu, toplam protein düzeyi bakımından incelendiğinde kontrol grubu ile T ve TK gruplarının istatistiksel bir farklılık göstermediği, TA grubunun ise kontrole göre oldukça belirgin bir artış gösterdiği saptanmıştır ($p > 0,05$, $p < 0,001$). Beyin dokusunda MDA düzeyi kontrol grubuna göre, T grubunda kısmi düzeylerde arttığı; TK ile TA grubunda ise istatistiksel bir farklılığın olmadığı tespit edildi ($p < 0,05$).

4. Tartışma ve Sonuç

Çalışma süresince sıçanların vücut ağırlığı değeri kontrol grubunda düzenli bir artış göstermiştir. Bununla birlikte TA, gruplarındaki artışın düzenli olduğu; fakat bu artışın sebebini hayvanların normal gelişim periyodunda kazandıkları biyokütle artışının bir sonucu olduğunu düşünmekteyiz. Deneysel çalışmaların başlangıç aşamasından itibaren T grubundaki vücut ağırlığı değerlerinde belirgin bir düzeyde azalma görülmüştür. Çalışma süresince vücut ağırlığı, özellikle keten ekstraktı verilen gruplarda; T grubuna göre belirgin düzeyde yükseldiği; ancak keten ekstraktı verilen gruplarda kontrol grubuna göre önemli bir artış görülmemiştir (Tablo 1).

Yapılan bir çalışmada erkek sıçanlara toksik bir metal olan kurşun asetat (20 mg/kg) uygulanmış ve böbrek sitotoksitesi üzerine keten tohumu yağının etkileri

(1000 mg/kg) araştırılmıştır. Kurşun asetat sıçanın vücut ağırlığında önemli bir azalmaya neden olmuştur. Keten tohumu yağı, uygulamasından 5 gün sonra kilo kaybında herhangi bir değişim gözlenmemiştir (Abdel-Moneim vd., 2011b). Bu açıdan bakıldığında elde ettiğimiz bulguların benzer çalışma bulgularıyla uyumlu olduğu görülmektedir.

Toluen ve metabolitlerinin eritrositler, karaciğer, ince bağırsak, böbrek, beyin gibi dokularda reaktif oksijen radikallerine (ROS) üretimine ve oksidan strese yol açmaktadır (Halifeoğlu vd., 2000; Cara vd., 1991; Cara vd., 1993). Yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda, intraperitoneal olarak uygulanan toluenin etkisiyle beyin, karaciğer, böbrek ve akciğer dokularında ROS oluşumunun hızlandığı ve lipid peroksidasyonlarının arttığı bildirilmiştir. Yapılan bir başka çalışmada uzun süre toluene maruz kalan ayakkabı ve basım atölyesi işçileri, kronik toksisitenin etkisi altında kaldığını, artan MDA ve protein karbonil miktarları ile işçilerin eritrositlerinin ciddi bir oksidan hasara maruz kaldıkları sonucuna varılmıştır. İşçilerin artan protein karbonil ve MDA seviyelerinin yanında anlamlı olarak azalan GSH-Px aktivitesi bizi artan ROS'a karşı koymaya çalışan bir antioksidan mekanizmanın yetersiz kalması sonucuna götürmektedir (Karabulut, 2007).

Çalışmamızda toluen uygulanan sıçan gruplarındaki MDA seviyesinin, beyin dokusunda kısmen anlamlı düzeyde artış bulunmuştur (Tablo 4). Çalışmamızda beyin dokusunda MDA düzeyinin artması; toluene bağlı olarak oluşan oksidatif stres sonucu başlayan lipid peroksidasyonunun göstergesi olduğunu düşünmekteyiz.

Bulgularımızda: kontrol grubu, kimyasal uygulanan gruplar ve altın çilek ekstraktı uygulanan gruplar MDA düzeyi bakımından kıyaslandığında, altın çilek ekstraktı uygulanan gruplardaki MDA artışının kimyasal uygulanan gruplara göre belirli seviyelerde olduğu saptanmıştır. İndirgenmiş glutatyon seviyesinde ise T grubunda kontrol grubuna göre oldukça belirgin bir azalma bulunmuştur. Kontrol grubu ile altın çilek verilen gruplar arasında indirgenmiş glutatyon seviyesi bakımından istatistiksel bir farklılık olmadığı saptanmıştır (Tablo 4). Altın çilek meyvesinin bu olumlu etkisini bileşimindeki fitokimyasallara ve fenolik bileşenlere bağlı olduğunu düşünmekteyiz.

Keten tohumu, lipid bozuklukları önlemede potansiyel rolüyle giderek artan bir öneme sahiptir (Abdel-Moneim vd., 2011a; Abdel-Moneim vd., 2011b). Kronik hastalıklara, göğüs ve kolan kanseri risk faktörlerine karşı da oldukça etkilidir (Pool vd., 2000). Yapılan bir çalışmada, kimyasal bir mutasyon ajanı olarak bilinen metil nitrozürea (MNU) uygulamasına maruz kalmış olan farelerde toksik etkilere karşı koruyuculuğu olup olmadığının belirlenmesi için keten tohumu kullanılmıştır. Bu durum MNU uygulaması ile birlikte olduğunda keten tohumunun kısmen toksik etkinin azaltılmasında olumlu rolü olabileceğini düşündürmüştür (Gökbulut, 2009).

Dokulardaki GSH seviyesinin genel olarak kimyasal uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre bir azalma; ekstrakt verilen gruplarda da kimyasal uygulanan gruplara göre bir artış saptanmıştır. GSH seviyelerindeki bu artmanın ya da koruyucu etkinin bitki ekstraktlarının antioksidan özelliğine bağlanabileceği gibi toksik maddelere karşı bir adaptasyon mekanizması olduğu söylenebilir. Çünkü

GSH, oksidatif strese karşı savunma sisteminin en önemli basamağını oluşturmaktadır (Ahmed vd., 2000). Çalışmamızda da dokularda GSH azalmasının nedeni: sıçanlara toluen, uygulanmasıyla buradaki antioksidan savunma sistemini yavaşlattığı kanaatindeyiz.

Bitki ekstraktı verilen TK, TA gruplarında bazı yağ asidi düzeylerinde toksik madde uygulanan gruplara göre artış gözlemlendi. Bu durum sıçanlara verilen kimyasalların ve bitki ekstraktların yağ asitleri metabolizmasını etkilemesinden kaynaklanabilir. Bu çalışmada, palmitik (16:0) düzeyinin karaciğer, beyin ve kas dokularında toluen verilen gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı belirlenmiştir (Tablo 2). Bu durumda toluen gibi kimyasalların lipid biyosentezinde görevli olan asetil CoA karboksilaz ve yağ asidi sentetaz gibi enzimlerin aktivitesini etkilemesinden kaynaklandığını söyleyebiliriz. Çünkü palmitik asit, yağ asidi sentezinde son ürün olup, yağ asidi sentetaz enzimi tarafından sentezlenir ve bazı enzimatik reaksiyonlarla serbest hale gelir. Buna bağlı olarak palmitik asit miktarının azalması ise yağ asidi sentezinin azalmasıyla açıklanabilir. Bizim çalışmamızda palmitoleik asit miktarının kontrol grubuyla karşılaştırıldığında kimyasal verilen T gruplarının azaldığı gözlemlenmiştir (Tablo 2). Bu azalmanın SCD enziminin aktivitesinin engellenmesinden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Bu çalışmada toluen uygulanan sıçanların beyin dokularında oleik asit (18-1 n9) miktarının kontrol grubuna göre azaldığı saptanmıştır (Tablo 2). Dokularda oleik asit miktarının azalması, SCD enzim aktivitesinin azalmış olması ile açıklanabilir. Çünkü; SCD enzimi stearik asidi substrat olarak kullanmakta ve oleik aside dönüştürmektedir.

Ayrıca bu çalışmada araşidonik asit düzeyi (20:4 n6) toluen kimyasalı uygulanan sıçanların beyin dokularında kontrole göre belirgin düzeyde bir azalma saptanmıştır (Tablo 2). Bununla beraber beyin dokusunda ekstrakt uygulanan bütün gruplarda toplam SFA, MUFA, PUFA ve toplam yağ asidi düzeyleri kontrol grubuna göre bir artış gözlemlenmiştir.

Çalışmamızda toksik madde verilerek oksidatif stres oluşturulmuş sıçanların beyin dokularında ADEK vitaminler, kolesterol ve sterol düzeyinde anlamlı değişikliklerin olduğu belirlendi.

Bulgularımızda beyin dokularında kontrol grubuna göre sadece toksik madde verilen gruplarda (T) vitamin ve sterol değerlerinde önemli düşüşler saptanmıştır (Tablo 3). Beyin, dokularında bazı vitamin düzeylerinde, ekstrakt uygulanan TK, TA grupları toksik madde uygulanan gruplara göre önemli seviyelerde bir artış gözlemlenmiştir (Tablo 3). Bununla beraber ekstrakt uygulanan TK, TA, gruplarında çoğu vitamin değerinin kontrol grubuna yaklaştığı, ayrıca bazı vitamin değerlerinin kontrol grubuna göre yükseldiği belirlenmiştir.

Altın çilek ile keten tohumu ekstraktı ilave edilen gruplardaki vitamin miktarlarının kontrol grubuna yaklaşmış, toksik gruplara göre artması bu meyvenin içeriğinin vitamin ve mineral açısından zengin olduğunu düşündürmektedir. Yapılan bir çalışmada altın çilek meyvesinin 100 gramında: 8 mg kalsiyum, 55,3 mg fosfor, 1,2 mg demir, 1,6 mg A vitamini, 2,08 mg B vitamini kompleksi (B₁, B₂, B₃), 0,2 g yağ ve 43 mg C vitamini yer almaktadır. (Puente vd., 2010; Ramadan ve Mörsel, 2009). Başka bir çalışmada altın çilekte provitamin A, C vitamini, vitamin B

kompleksi ve temel elementlerin yoğun olarak bulunduğu gösterilmiştir (Ramadan, 2011a). Keten tohumu yağında da A, B, D ve E vitaminlerinin yoğun olarak bulunması bu düşüncemizi desteklemektedir.

Bulgularımızda, bitki ekstrelerinin sıçanların vitamin değerleri üzerindeki etkileri incelendiğinde, bazı vitaminlerin hem miktarları hem de değişimlerinin farklı değerlerde olduğu tespit edildi. D2 vitamini miktarının beyin dokusunda bitki ekstresi verilen gruplarda artmış olması, bu vitaminin bitkisel kaynaklı olup ratlara bitki ekstreleri yoluyla geçmiş olmasıyla açıklanabilir. Ayrıca çalışmamızda α -tokoferol miktarının beyin dokusunda özellikle TA grubunun, kontrol grubuna yaklaştığı ayrıca beyin dokusunda bu miktarın kontrole göre yükseldiği gözlenmiştir. α -tokoferol asetat düzeyinin ise beyin dokusunda bitki ekstraktı verilen tüm gruplarda kontrole göre arttığı saptanmıştır.

Deney sonuçlarımızda, kolesterol miktarı toksik madde içeren T gruplarında kontrol gruplarına göre önemli artışlar göstermiştir. Kolesterol miktarı dokuların TK, TA, gruplarında, T gruplarına göre kolesterol seviyesinde azalma gösterip kontrol grubuna yaklaşmıştır (Tablo 2). Çalışmada kullanılan bitki ekstrelerinin *in vivo* ortam şartlarında LPO'yu önlemede etkili olduğunu ortaya koymuştur. Kullandığımız bitkilerin Sprague Dawley cinsi sıçanlarda yağ asidi ile vitamin profilleri ve GSH ile total protein miktarları araştırmamızda belirlenmiştir.

Kaynakça

- Abdel-Moneim, A.E., Dkhil, M.A. and Al-Quraishy, S., (2011a). The protective effect of flaxseed oil on lead acetate-induced renal toxicity in rats. *Journal of Hazardous Materials*, 194, 250–255.
- Abdel-Moneim, A.E., Dkhil, M.A. and Al-Quraishy, S., (2011b). The redox status in rats treated with flaxseed oil and lead-induced hepatotoxicity. *Biol. Trace Elem. Res.*, 143(1), 457-67.
- Ahmed, R.S. Seth, V. Pasha, S.T. and Banerjee, B.D., (2000). Influence of dietary ginger (*Zingiber officinales*) on oxidative stress induced by malathion in rats, *Food and Chem. Toxicol.*, 38, 443-450.
- Cara, J.M., Carl, P.L. and Stephen, C.B., (1991). Effects of toluene and its metabolites on cerebral reactive oxygen species generation. *Biochemical Pharmacology*, 42(4), 879-882.
- Cara, J.M., James, D.A. and Stephen, C.B., (1993). Free radical induction in the brain and liver by products of toluene catabolism. *Biochemical Pharmacology*, 46(1), 103-110.
- Christie, W.W., (1990). *Gas chromatography and lipids*, The Oil Pres, Glaskow.
- Coşkun, O., Kanter, M., Korkmaz, A. and Oter, S., (2005). Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin induced oxidative stress and β -cell damage in rat pancreas. *Pharmacological Research*, 51, 117–123.

- Cunnane, S.C. (1995). Flaxseed ALA Function in Human Metabolism and Function of α - Linolenic Acid in Human Nutrition, in Flaxseed in Human Nutrition, Ed: S.C. Cunnane S.C. ve Thompson, L.U., AOCS Press, Champaign.
- Çoşkun T., (2005). Fonksiyonel besinlerin sağlığımız üzerine etkileri. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi., 48, 69-84.
- Elman, G.I., (1959). Tissue sulfhydryl groups. Archives of Biochemistry and Biophysics, 82, 70-77.
- Gökbulut, İ., (2009). Oksidatif strese maruz kalmış farelerin keten tohumu ile beslenmesinin çeşitli biyobelirteçler üzerine etkisi, Doktora Tezi, İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Malatya.
- Hara, A. and Radin, N.S., (1978). Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. Analytical Biochemistry, 90, 420–426.
- Karabulut, İ., (2007). Toluenin in vitro ve in vivo olarak eritrosit zar stabilitesine etkisi, Doktora Tezi, H.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji Programı, Ankara.
- Lopez-Cervantes, J., Sanchez-Machado, D.I. and Rios-Vazquez, N.J., (2006). High performance liquid chromatography method for the simultaneous quantification of retinol, alpha-tocopherol, and cholesterol in shrimp waste hydrolysate. Journal of Chromatography A, 1105, 135–139.
- Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K., (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Analytical Biochemistry, 95, 351-358.
- Papas, A.M. (1998). Antioxidant Status, Diet, Nutrition, and Health, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Pool-Zobel, B.L., Adlercreutz, H., Gleib, M., Liegibel, U.M., Sittlington, J., Rowland, Pryor, W.A., (2000). Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials. Free Rad. Biol. Med., 28, 141-164.
- Puente, L.A., Pinto-Muñoz, C.A., Castro, E.S. and Cortés, M., (2010). Physalis peruviana Linnaeus, the multiple properties of a highly functional fruit: A review. Food Research International, 44(7), 1-8.
- Ramadan, M.F. and Moersel, J.T., (2009). Oil extractability from enzymatically-treated goldenberry (Physalis peruviana L.) pomace: Range of operational variables. Int. J. Food Science and Technology, 44, 435–444.
- Ramadan, M.F., (2011). Bioactive phytochemicals, nutritional value, and functional properties of cape gooseberry (Physalis peruviana): An overview. Food Research International, 44, 1830–1836.
- Ramadan, M.F., (2011a). Physalis peruviana: A rich source of bioactive phytochemicals for functional foods and pharmaceuticals. Food Reviews International, 27, 259–273.

- Sánchez-Machado, D.I., López-Hernández, J. and Paseiro-Losada, P., (2002). High performance liquid chromatographic determination of alpha-tocopherol in macro algae. *Journal of Chromatography A*, 976, 277–284.
- Simopoulos, A.P. (1990). Omega-3 Fatty Acids in Growth and Development, in *Omega-3 Fatty Acids in Health and Disease*, Ed: Lees, R.S., Karel, M., Dekker, M., New York.
- Tvrzicka, E., Vecka, M., Stankova, B., Zak, A., (2002). Analysis of fatty acids in plasma lipoproteins by gas chromatography flame ionisation detection Quantative aspects. *Anal. Chimica. Acta*, 465, 337-350.



Strategic Research Academy ©

© Copyright of Journal of Current Researches on Engineering, Science and Technology (JoCREST) is the property of Strategic Research Academy and its content may not be copied or emailed to multiple sites or posted to a listserv without the copyright holder's express written permission. However, users may print, download, or email articles for individual use.