

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	iii
ŞEKİLLER LİSTESİ	vi
TABLolar LİSTESİ	vii
KISALTMALAR	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Karalahana	3
2.1.1. Crucifera Bitkileri	3
2.1.2. Karalahananın Özellikleri	4
2.2. Lipoproteinler	6
2.2.1. Çok Düşük Dansiteli Lipoproteinler (VLDL)	8
2.2.2. Düşük Dansiteli Lipoproteinler (LDL)	9
2.2.3. Yüksek Dansiteli Lipoproteinler (HDL)	10
2.3. Oksidan –Antioksidan Denge	11
2.3.1. Serbest Radikaller ve Oksidan Ajanlar	12
2.3.2. Serbest Radikallerin Biyolojik Etkileri	12
2.3.3. Antioksidan Savunma Sistemleri	13
2.4. Bitki Antioksidanları	14
2.5. Lipid Peroksidasyonu	17
2.6. Lipoproteinlerin Oksidasyonu	20
2.6.1. LDL Oksidasyonu	20
2.6.2. VLDL Oksidasyonu	23
2.6.3. Lipoproteinlerin Oksidasyonu ve Kardiyovasküler Hastalıklarla ilişkisi	23

3. MATERYAL METOD	26
3.1. Materyal	26
3.1.1. Kullanılan Cihazlar, Aletler ve Malzemeler	26
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	27
3.2. Metodlar	28
3.2.1. Karalahana Örneklerinin Toplanması ve Ekstraktların Hazırlanması	28
3.2.1.1. Karalahana Örneklerinin Toplanması	28
3.2.1.2. Karalahana Ekstraktların Hazırlanması	28
3.2.2. Karalahana Ekstraktlarında Antioksidan Tayinler	29
3.2.2.1. Toplam Fenolik Madde (TFM) Tayini	29
3.2.2.2. Flavonoid İçeriğinin Belirlenmesi	31
3.2.2.3. Toplam Antioksidan Kapasite (TAK) Tayini	33
3.2.3. Lipoprotein İzolasyonu ve Lipoproteinlerde Yapılan Tayinler	34
3.2.3.1. Lipoproteinlerin İzolasyonu	35
3.2.3.2. Lipoproteinlerde Diyaliz	36
3.2.3.3. Lipoproteinlerde Toplam Kolesterol ve Trigliserid Tayini	37
3.2.3.4. Lipoproteinlerde Protein Tayini	37
3.2.4. İzole Lipoproteinlerin Ekstraksız ve Ekstraklı Ortamlarda Oksidasyonu	39
3.2.5. Lipoproteinlerde Oksidasyon Tayini (TBARS)	40
3.3. İstatiksel Analizler	42
4. BULGULAR	43
5. TARTIŞMA	51
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	56
6.1. Sonuçlar	56
6.2. Öneriler	56
7. ÖZET	57
8. SUMMARY	58
9. KAYNAKLAR	59
ÖZGEÇMİŞ	

ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Glikosinolat Yapısı	4
Şekil 2. Karalahana (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>Acephala</i> DC.)	5
Şekil 3. Lipoproteinlerin Genel Yapısı	7
Şekil 4. Lipoproteinlerin Metabolizması	8
Şekil 5. Polifenoller	16
Şekil 6. Flavonoidlerin LDL Oksidasyonuna ve Köpük Hücre Oluşumuna Etkisi	17
Şekil 7. Lipid Peroksidasyonun Mekanizması	18
Şekil 8. Bakır ile Oksidasyon	20
Şekil 9. Lipoproteinler ve Kardiyovasküler Hastalıklar Arasındaki İlişki	25
Şekil 10. Soklet ve Rotar Evaporatör	28
Şekil 11. Toplam Fenolik Belirlenmesinde Standart Kateşin Konsantrasyon Grafiği	30
Şekil 12. Toplam Fenolik Belirlenmesinde Standart Gallik Asit Konsantrasyon Grafiği	31
Şekil 13. Flavonoidlerin Belirlenmesinde Standart Kateşin Konsantrasyon Grafiği	32
Şekil 14. TAK Deneyi Standart Troloks Konsantrasyon Grafiği	34
Şekil 15. Protein Deneyi (Lowry) Standart Albumin Konsantrasyon Grafiği	39
Şekil 16. TBARS Standart Konsantrasyon Grafiği	41
Şekil 17. İzole VLDL (VLDL), Okside VLDL (oVLDL) ve Farklı Konsantrasyonlardaki Ekstrak İlavesi ile Elde Edilen TBARS Seviyeleri	47
Şekil 18. İzole LDL (LDL), Okside LDL (oLDL) ve Farklı Konsantrasyonlardaki Ekstrak İlavesi ile Elde Edilen TBARS Seviyeleri	48
Şekil 19. Farklı Ekstrak Konsantrasyonlarının VLDL Oksidasyonunu İnhibisyonuna Etkisi	49
Şekil 20. Farklı Ekstrak Konsantrasyonlarının LDL Oksidasyonunu İnhibisyonuna Etkisi	50

TABLOLAR LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Karalahanın İçeriği	6
Tablo 2. İnsan Vücudunda Bulunan Lipoproteinlerden VLDL, LDL, HDL' nin Genel Özellikleri	11
Tablo 3. oLDL' nin Okside Ürünleri	21
Tablo 4. Sulu ve Metanollü Ekstraktların Kuru Ağırlık Cinsinden Konsantrasyonları	29
Tablo 5. Toplam Fenolik İçerik Metod Basamakları	30
Tablo 6. Flavonoidlerin Belirlenmesi Deney Basamakları	32
Tablo 7. TAK Deneyi Basamakları	34
Tablo 8. Lipoprotein İzolasyonu İçin Kullanılan Çözelti Konsantrasyonları	35
Tablo 9. Protein Tayini (Lowry) Deney Basamakları	38
Tablo 10. TBARS Deney Basamakları	41
Tablo 11. Karalahana Ekstraktlarının Antioksidan Seviyeleri	43
Tablo 12. İzole Lipoproteinlerdeki Trigliserid ve Total Kolesterol Seviyeleri	43
Tablo 13. İzole Lipoproteinlerde Oksidasyon Öncesi ve Sonrası TBARS Seviyeleri	44
Tablo 14. Farklı Konsantrasyonlardaki Sulu Ekstraktların Lipoproteinlerin TBARS Seviyelerine Etkisi	45
Tablo 15. Farklı Konsantrasyonlardaki Metanollü Ekstraktların Lipoproteinlerin TBARS Seviyelerine Etkisi	46

KISALTMALAR

LDL	Düşük Dansiteli Lipoprotein
HDL	Yüksek Dansiteli Lipoprotein
IDL	Orta Dansiteli Lipoprotein
VLDL	Çok Düşük Dansiteli Lipoprotein
GS	Glikosinolatlar
KE	Kolesterol Esterleri
TG	Trigliserid
Lp(a)	Lipoprotein (a)
Apo A	Apolipoprotein A
ApoB	Apolipoprotein B
ApoE	Apolipoprotein E
LCAT	Lesitin Kolesterol Açıl Transferaz
LPL	Lipoprotein Lipaz
CETP	Kolesterol Ester Transfer Protein
PON	Paraoksonaz
PAF-AH	Platelet Aktivate Edici Faktör Asetil Hidrolaz
SOD	Süperoksit Dismutaz
Vit E	Vitamin E
VitC	Vitamin C
O ₂	Süperoksit
OH	Hidroksil Radikali
NO·	Nitrikoksit Radikali
OO·	Peroksil Radikali
Kat	Katalaz
GSH-Px	Glutasyon Peroksidaz
PL	Fosfolipaz

1. GİRİŞ

Brassicaceae ailesinde yer alan bitki türleri yeryüzünde yaygın olarak bulunmaktadır. Türkiye’de de bu aileye giren bitki türlerinden beyaz lahana (*Brassica L. var .capitata L.*) ve karalahana (*Brassica oleracea L. var. acephala DC.*) türleri fazla miktarda tüketilmektedir. Coğrafik olarak ise; Türkiye’nin kuzey kesimlerinde; kış aylarında, karalahananın özellikle taze yaprakları besin kaynağı olarak tercih edilmektedir. (1) .

Son yıllarda doğal olarak diyetle alınan antioksidanlarla, hastalıkların önlenmesi, yapılan araştırmaların odak noktası olmaktadır. Antioksidanlar; serbest radikalleri inhibe ederek oksidatif hasara karşı hücreleri koruyabilmektedirler. Çoğu çalışma, sebze ve meyvelerde antioksidanların yüksek seviyede bulunduğunu ve bu sayede kanser ve kardiyovasküler hastalıklara karşı korunmada etkili olabileceklerini öne sürmektedir. Coa ve arkadaşları; çeşitli metodlarla, 22 çeşit meyve ve sebzenin oksidan-antioksidan kapasitelerini belirlemiş, en yüksek antioksidan kapasiteye karalahananın sahip olduğunu gözlemlemişlerdir (2).

Birçok yararlı bitkinin; faz 2 detoksifikasyon enzimlerini indüklemesiyle, hücrelerin karsinogenik ve toksik hücreleri nötralize edilmesine yardımcı olduğuna inanılmaktadır. Bu faz 2 detoksifikasyon enzimlerini indükleyen; sebze türleri arasında karalahana da yer almaktadır (3).

Brassica türlerinin, kardiyovasküler hastalıkları önleyici ve birçok kanser türüne karşı koruyucu etki gösterdiği ve bunda içeriğindeki; glukosinolatlar, flavonoidler ve diğer fenolik bileşimlerin sorumlu olduğu düşünülmektedir. Diyetle alınan monoansature yağ asitlerinin poliansature yağ asitlerine oranı ve diyetin antioksidan muhtevası, lipoproteinlerin oksitlenebilirliğinde önemli role sahiptir (4).

Lipidler suda çözünmezler, bu nedenle kanda taşınmaları proteinlere bağlanarak yani lipoprotein formu ile mümkündür. Çok düşük dansiteli lipoprotein (VLDL) ve düşük dansiteli lipoprotein (LDL), lipid ve lipid esterlerini karaciğerden periferik dokulara

taşınmamasını sağlar. Yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) ise; fazla kolesterolü periferik dokulardan karaciğere taşımaktadır. Kanda LDL'nin yüksek olması, HDL'nin düşük olması; kalp krizi, felç, ateroskleroz gibi hastalıklar için risk taşımaktadır (5).

Oksidan-antioksidan bozulduğu durumlarda vücuttaki organik bileşikler zarar görmektedir. Lipoproteinlerin (özellikle LDL'nin) oksidasyonu aterosklerozun patogeneğinde önemli role sahiptir. Diyetle alınan LDL oksidasyonunu önleyici antioksidanlar, ateroskleroza ve kansere yakalanma riskini azaltabileceği düşünülmektedir (6).

Bu çalışmanın amacı özellikle; Doğu Karadeniz Bölgesi'nde yetiştirilen ve çokça tüketilen karalahana bitkisinin, lipoproteinlerin (LDL, VLDL) oksidasyonuna etkisi ve dolayısıyla; hastalıklar üzerine rolünü ortaya koymaktır. Diğer lahana türleri ile ilgili birçok çalışma mevcut iken; karalahana üzerinde fazla durulmamış olması, çalışmanın temel nedenlerinden biri olmuştur. Karalahana ekstraktlarının oksidan ve antioksidan kapasitesi değerlendirilecek ve lipoproteinlerin oksidasyonuna etkisi araştırılacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Karalahana

Karalahana, *Crucifera* ailesi (*Brassicaceae* bitkileri) bitki türleri arasında yer almaktadır.

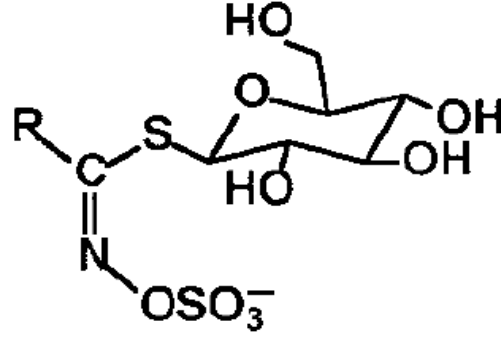
2.1.1. *Crucifera* Bitkileri

Eski adıyla *Cruciferae* yeni adıyla *Brassicaceae* ailesi, 380 genus ve 3000 den fazla bitki türünü yapısında bulundurmaktadır (7). *Brassicaceae* bitkileri dünya üzerinde oldukça geniş yayılıma sahiptir. Belirgin olarak Akdeniz'in Güney Batısı'nda ve Asya'nın merkezindeki alanlarda bulunmaktadır. Bu ailede süs bitisi özelliğindeki bitkiler yanında ekonomik olarak önemli besinsel sebzeler ve mahsuller bulunmaktadır (7).

Brassica türü *Cruciferae* ailesinin en büyük sebze grubunu oluşturmaktadır. *Brassica oleracea* alt grubunda ise *Brassica oleracea acephala* (başsız lahana)-kara lahana, *B. o. botrytis*-karnıbahar, *B. o. capitata* (başlı lahana)-lahana, *B. o. gemnifera*-brüksel lahanası, *B. o. gongylodes*-yer lahanası, *B. o. italica* (dallanmış lahana)-brokoli gibi türler yer alır. *Brassica*'lardaki acı tat içeriğindeki sülfürlü bileşiklerden kaynaklıdır (7). *Crucifera* sebzelerinin içeriğindeki glukosinolatlar ve glukoz içeriğinin artmasıyla acı tad miktarı da artar. Fruktoz ve süktroz miktarı bu acı tad oluşumu üzerine etkisi azdır (8).

Brassica türlerinden; brokoli, karnıbahar gibi sebzeler, ikincil metabolit ürünü olarak oluşan glukosinolatları yüksek miktarda içermektedirler. Glukosinolatlar (GS) kükürt içeren glikosidlerdendir ve *Brassicaceae* türlerinde bitkiyi herbisitler, peptisitler ve zararlı patojenlere karşı korumaktadırlar. Glukosinolatlar (Şekil 1), içermiş oldukları sülfür grupları güçlü asitlerdir ve potasyum tuzları şeklinde bitki vakuollerinde depo edilmektedir. GS, hayvanlarda biyolojik olarak aktif değildir (9). Ancak sebzeler

çiğnendiklerinde ya da doğrandıklarında glukosinolatlar, mirosionaz enzimi (EC 3.2.3.1) ile hidrolize olarak izosiyonatlara ve diğer ürünlere dönüşürler (10).



Şekil 1. Glukosinolat yapısı (11).

Çoğu *Crucifera* sebzeleri iyi bir C vitamini kaynağıdır. Bu ailenin içinde yer alan brokoli türünde olduğu gibi A vitamini de içerebilirler. Bu vitaminler kanserlerden korunmada rol oynayabilirler (12). Ayrıca flavonoidler (kuersetin), mineral olarak selenyum bulundurmaktadırlar (13).

Brassica türlerinin, kardiyovasküler hastalıkları önlemede ve birçok çeşit kanser türüne karşı; koruyucu etki gösterdiği ve bunda içeriğindeki; glikosinolatlar, flavonoidler ve diğer fenolik bileşimlerin sorumlu olduğu düşünülmektedir (4) .

2.1.2. Karalahananın Özellikleri

Yaklaşık 2000 yıldır bilinmekte olan karalahana (*Brassica oleracea var. acephala* DC.) (Şekil 2), Karadeniz sahilinde sıklıkla yetiştirilmektedir. Özellikle Doğu Karadeniz Bölgesi' nde besin kaynağı olarak çokça tüketilen iri kalın yapraklı bir bitkidir (14). Genellikle kış aylarında karalahananın yapraklarından çorba, turşu gibi yemek çeşitlerinin tüketimi yaygındır. Karalahananın üretildiği aylar sonbahar sonundan ilkbahar başlarına, dolayısıyla ekim ayından başlayarak takip eden üç veya dört aya karşılık gelmektedir (1). Ancak yaz sonrasında yapılan ekimler daha iyi mahsul vermektedir (14). *Brassicaceae oleracea var. acephala* çiçekleri sarı renklidir, $2n=18$ kromozomludur (15). Yaprakları en koyu rengini, soğuk havalarda alır (14).

Karalahana yapraklarının besinsel yararlarının yanında, tohumundan elde edilen yağı; ekmek, kek benzeri besinlerin yapımında kullanılmaktadır (1).



Şekil 2. Karalahana (*Brassica oleracea* var. *acephala* DC.)

Karalahananın içeriğine bakılınca ; karalahananın yeşil yapraklarında en çok fruktoz, serbest asit çeşidi ise ; sitrik asit olduğu belirlenmiştir. Yağ asidi bakımından ise; yapraklarında 18 farklı yağ asidi çeşidi belirlenirken, tohumunda 20 farklı yağ asidi bulunmuştur. Yapraklarında çoğunlukla bulunan yağ asitleri; 16:0 (palmitik asit), 18:2n-6 (linoleik asit) ve 18:3n-3 (α -linolenik asit) , tohumlarında en çok 22:1n-9 (erukik asit) bulunur. Ayrıca 18:2n-6 (linoleik asit) ve 18:1n-9 de tohumlarında diğer yağ asitlerine göre fazla miktarda bulunmaktadır. Bu çoklu doymamış yağ asitlerinden linoleik asit ve α -linolenik asit insan vücudunda üretilmediğinden esansiyel olarak alınması gereken yağ asitleridir (1). Karalahananın taze yapraklarında, amino asit içeriği olarak en çok glutamik asit bulunurken; ikinci sırada aspartik asit gelmektedir. Yapısında, makro besinlerden en çok kalsiyum (Ca), mikro besinlerden ise demir (Fe) bulunmaktadır. Ayrıca da strontiyum (Sr) da yaprakların kuru ağırlığın büyük bir kısmını oluşturmaktadır (1). Tablo 1' de karalahana yapraklarının içeriği (en çok bulunanlar) özetlenmektedir.

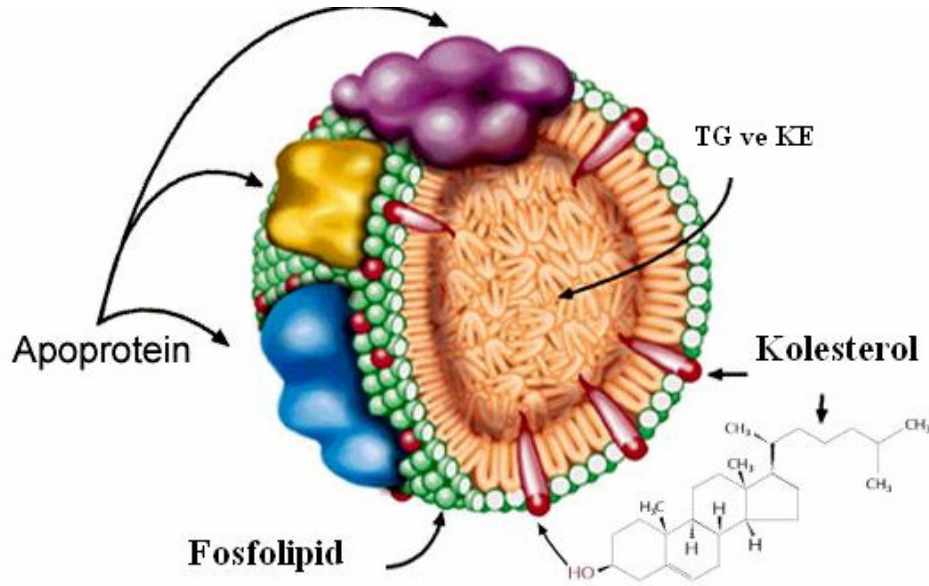
Tablo 1. Karalahananın İçeriği (1).

Şeker	(mg/100g kuru ağırlık)
Fruktoz	2011±34,9
Glukoz	1056±16,2
Sükroz	894±42,8
Organik Asit	(mg/g kuru ağırlık)
Sitrik asit	2213±94,9
Malik asit	151±14,9
Aminoasit	(% Kuru ağırlık)
Glutamik asit	33,2±1,1
Aspartik asit	27,6±0,8
Arginin	20,6±0,8
Lösin	20,3±0,6
Yağ asitleri	(mg/g kuru ağırlık)
Linolenik Asit (18:3n-3)	85,3±3,61
Palmitik asit (16:0)	18,7±0,45
Linoleik asit (18:2n-6)	18,6±0,87
Mineraller	(mg/g kuru ağırlık)
Sr	252±9,1
Fe	72,6±1,3
Mn	53,5±1,9
Zn	39,4±1,2
Ca	19,7±0,6

Yapısında; ayrıca (suda çözünen) C vitamini ve (yağda çözünen) lutein ve zeaksantin gibi fitokimyasalları içermektedir (16) .

2.2. Lipoproteinler

Sulu çözeltilerde çözünmediklerinden dolayı lipidler; dokularda membran lipidleri (fosfolipidler ve kolesterol) ve depo lipidleri ve plazmada ise; lipoproteinler adı verilen suda çözünebilen makromolekül kompleksleri şeklinde taşınır halde bulunurlar (17). Lipoproteinler, hidrofobik lipidleri (trigiserid ve ester kolesterol) kapsayan bir çekirdek ile protein, serbest kolesterol ve fosfolipidlerden oluşan tek katlı bir yüzey tabakasından meydana gelen küresel yapılardır (Şekil 3).

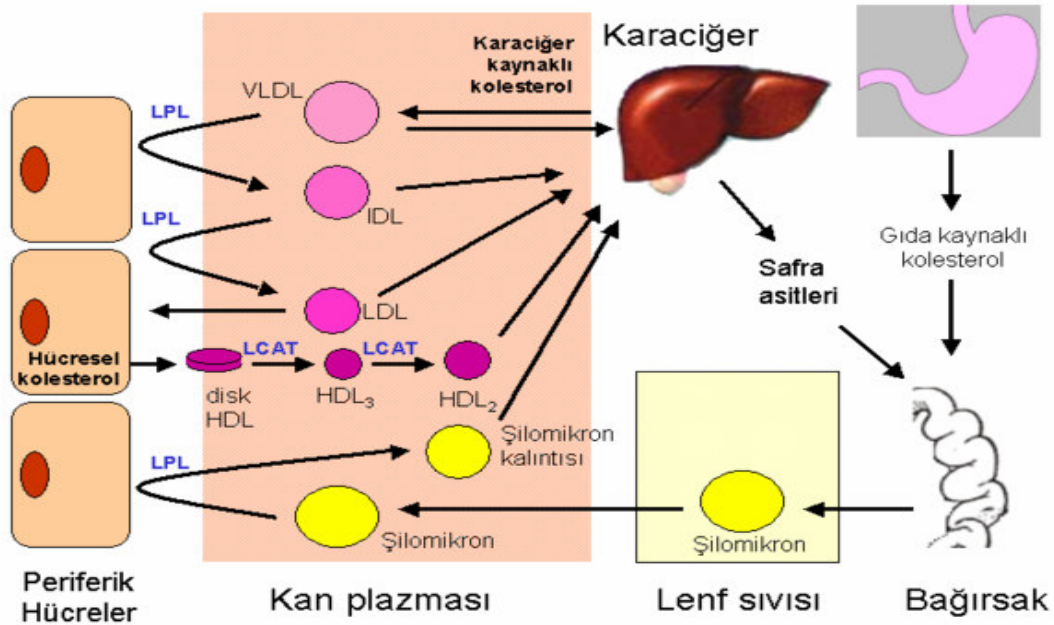


Şekil 3. Lipoproteinlerin Genel Yapısı (18).

Elektroforetik hareketliliklerine, yoğunluklarına ve içerdikleri apoproteinlere göre başlıca altı farklı lipoprotein sınıfı bulunmaktadır. Bunlar şilomikronlar (ŞM), çok düşük dansiteli lipoproteinler (VLDL), orta dansiteli lipoproteinler (IDL), düşük dansiteli lipoproteinler (LDL), yüksek dansiteli lipoproteinler (HDL) ve lipoprotein (a) [Lp(a)]'dır (19). Plazma lipoproteinleri barsak ve karaciğerde sentez edilir. Yapılarında, 10 değişik apolipoprotein (apo) bulundurulur. Bu apoproteinler, fosfolipidlerle reaksiyona girerek ester kolesterolleri ve trigliseridlerin çözünmesine yardım ederler, lipoproteinlerin enzimlerle olan reaksiyonlarını düzenlerler ve hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak kolesterol ve trigliseridlerin doku ve plazma arasındaki değişiminde etkili olurlar (17-19).

Diyetle alındıktan sonra, barsaklardan kısmen hidroliz olarak yağ asitleri, monoasilgliseroleller, fosfolipid ve kolesterol şeklinde barsak mukoza hücrelerinden absorbe edilen lipidler, şilomikronlar şeklinde lenfatik sistem aracılığı ile kana verilir ve metabolize olurlar (Şekil 4). Karaciğerde sentezlenen VLDL, dolaşım esnasında hidrolizlenme sonucu sırasıyla IDL ve LDL'ye dönüşür ve başlıca ekstrahepatik dokular tarafından katabolize edilir (20). Plazmadaki kolesterolün yaklaşık % 70'i sadece apo B₁₀₀'ü bulunduran LDL tarafından taşınır. Bu nedenle LDL aterojenik lipoprotein olarak bilinir (21). HDL ise; barsaklarda ve karaciğerde sentezlenmektedir. HDL'nin yapısındaki proteinin % 90'ından fazlası apo A'dır. HDL, perifer dokulardan karaciğere kolesterolün taşınması ve metal şelasyonu ya da peroksidaz aktivitesi ile LDL oksidasyonunu önlemesi

nedeniyle antiaterojenik lipoprotein olarak bilinir (22). Lp(a), lipid içeriği bakımından LDL'ye benzemesi ve yapısındaki apoproteinler [apo (a) ve apo B]'den dolayı hem aterojenik ve hemde trombojenik özelliğe sahiptir (23).



Şekil 4. Lipoproteinlerin Metabolizması (24).

2.2.1. Çok Düşük Dansiteli Lipoprotein (VLDL)

Çok düşük dansiteli lipoprotein (VLDL), plazması santrifüj edildiğinde; $d < 1.006$ g/mL olarak yüzen, 300-700 Å^o çapında partiküllerdir. VLDL'nin yapısı genel olarak karaciğerde sentezlenen trigliseritten oluşmaktadır ve bu trigliseritler, yaklaşık VLDL'in % 55-56'sını oluşturur. VLDL, endojen olarak sentezlenen trigliseritlerin periferik dokulara taşınımında görev yapmaktadır (25-29). Karaciğer, kolesterol ve trigliseritlerin sentezlendiği başlıca organdır, bu organın ihtiyacını aşan kolesterol ve trigliseritler VLDL içinde kana salınırlar. Böylelikle VLDL, karaciğerde sentezlenmiş kolesterolü, trigliseritleri, fosfolipidleri ve kolesterol esterlerini periferik dokulara taşır. Suda çözünemeyen bu lipidler, bu sayede VLDL'nin bünyesi içinde paketlenince kanda taşınabilir hale gelmiş olur. Bu taneciklerde bulunan apo B ve apo E, hem yapıyı sağlamlaştırır hem de metabolik yaşamlarının sonunda hücreler tarafından tanınıp endositoz yoluyla dolaşımdan çıkartılmalarını sağlarlar. VLDL, kanda dolaşırken yüksek

dansiteli lipoproteinlerden apolipoprotein CII (apo CII) ve apolipoprotein E (apo E)' yi alır. Bu durumda VLDL olgunlaşmış sayılır. VLDL, dolaşım sırasında vücuttaki kılcal damarlı bölgelerden (yağ, kalp, kas) geçerken lipoprotein lipaz (LPL) ile etkileşir. Apo C-II, LPL'nin aktivasyonu için gereklidir. LPL, VLDL'nin taşıdığı trigliseridleri yağ asitlerine dönüştürür, bunlarda hücrelerin içine alınıp ya depolanır ya da enerji üretimi için kullanılırlar. VLDL, dolaşım sırasında tekrar HDL ile karşılaştığında apo CII, HDL'e geri döner ama apoE kalır. Ayrıca kolesterol ester transfer proteini (CETP) HDL'den aldığı kolesterol esterleri, VLDL'deki trigliserid ile takas eder. VLDL' deki trigliseridler azaldıkça bu lipoproteinin yoğunluğu yükselir, orta dansiteli lipoproteinler (IDL)'e dönüşürler. IDL'nin bir kısmı karaciğer hücre reseptörleri tarafından tanınır, hücre içine alınırken diğer kısmı ise; trigliseridlerin yerini kolesterol esterleri alması ve Apo B dışındaki diğer proteinlerin kaybolması sonucu LDL'e dönüşürler (30-31).

2.2.2. Düşük Dansiteli Lipoprotein (LDL)

Yaklaşık olarak 200 Å çapında olan LDL, boyut olarak öncülerine (VLDL ve IDL) nazaran daha küçüktür, fakat yoğunluğu artmış durumdadır ($d = 1,019- 1,063 \text{ g/mL}$). . LDL, % 75 oranında lipid içerir. Kolesterol baskın olan lipid grubudur ve yaklaşık LDL'in % 50'sini oluşturur. Başlıca görevi; kolesterolü karaciğerden periferik dokulara taşımaktır. Plazmadaki LDL'in büyük çoğunluğunun VLDL'in bir katabolizma ürünü olduğu düşünülmektedir. ApoB₁₀₀ LDL'deki yegane apoproteindir. Plazmadan LDL'in uzaklaştırılması büyük oranda hepatositlerce gerçekleştirilir. Plazmadaki LDL'nin LDL reseptörü aracılığıyla özellikle karaciğerden uzaklaştırılmasında, yapısındaki ApoB₁₀₀ ve hücre yüzeyindeki reseptör sayısı etkilidir.

Kandaki, LDL konsantrasyonunun yükselmesi insanlarda aterosklerozisin bir habercisi olarak kabul edilmektedir (25-28,32). LDL'nin kolesterol esteri yapısında; yağ asidi çeşidi olarak en çok, 18:0 ve ardından 18:2n-6 yağ asitleri gelmektedir. Trigliserid içeriğinde; sırasıyla 18:n-9, 18:2n-6, fosfolipid içeriğinde ise; 16:0, 18:0, 18:1 yağ asitleri bulunur. LDL partikülleri VLDL' e göre daha az miktarda trigliserid ve daha yüksek miktarda kolesterol ve kolesterol esterleri taşır.

LDL' nin başlıca görevi olan kolesterol taşınımının hücrelere olabilmesi için hücre yüzeyindeki membranda yer alan LDL reseptörüyle etkileşmesi gerekir. Böylelikle hücrelerdeki kolesterol düzeyi kontrol altına alınmış olur. Bu etkileşimde LDL' nin

yapısındaki apoB₁₀₀ , LDL reseptörüyle etkileşerek; reseptörün LDL' i tanımasını sağlar. Ayrıca apo E ' de LDL reseptörüne bağlanabilir. Bir başka LDL kolesterol taşınımına oldukça spesifik olan çöpçü resptör sınıfı SR-A reseptör aktivitesi verilebilir. Böylelikle çöpçü görevinde olan makrofajlar okside formdaki LDL 'nin yapısında birikmesine neden olmaktadır (33).

2.2.3. Yüksek Dansiteli Lipoprotein (HDL)

Yüksek dansiteli lipoprotein (HDL), lipoproteinler içerisinde yoğunluk olarak en fazla ($d = 1,063-1,21$ g/mL), çap olarak ise en küçük olan ($70-120$ Å) partiküllerdir. Apo A-I ve Apo A-II HDL'deki ana apoproteinler olup, bir HDL partikülünün % 50'sini oluştururlar. HDL, yoğunlukları dikkate alınarak HDL₁ ($1,050-1,063$ g/mL), HDL₂ ($1,063-1,12$ g/mL) ve HDL₃ ($1,12-1,21$ g/mL) olmak üzere üç sınıfa ayrılır. HDL grupları içerisinde Apo E'yi yapısında bulunduran tek fraksiyon HDL₁ olup yaklaşık toplam plazma Apo E'sinin % 50'sine sahiptir (25-27).

HDL'nin başlıca görevi kolesterolün ters taşınımını sağlamaktır (perifer hücrelerinden karaciğere). ABCA1 taşıyıcı proteinin kontrolünde hücreden alınan kolesterol, lektin açıl transferaz (LCAT) yardımıyla esterleşmiş formda HDL içinde paketlenerek taşınmaktadır.

HDL, LDL'i oksidasyona karşı korur. Bu positif ilişki plazmadaki HDL'nin yapısındaki paraoksanaz veya platelet aktive edici faktör asetil hidrolaz (PAF-AH) gibi enzimleriyle ilişkilidir. Paraoksanaz, kalsiyum bağımlı bir enzim olup; HDL, paraoksanaz aktivitesi ile hücrel veya bakırla oksitlenmiş HDL'nin indirgenmesine sağlamaktadır. Paraoksanaz aktivitesi için paraoksanazın, lipoprotein yüzeyine bağlanması gerekir ve eğer HDL glikolizlenmiş durumda ise PL ve apolipoproteinler paraoksanaz aktivitesini değiştirerek, paraoksanaz aktivitesi kaybına ve LDL oksidasyonun da bu şekilde önlenmesinin engellenmesine neden olabilir (34).

Tablo 2' de VLDL, LDL, HDL' nin genel özellikleri özetlenmektedir.

Tablo 2. İnsan Vücudunda Bulunan Lipoproteinlerden VLD, LDL, HDL’ nin Genel Özellikleri (35-37) .

	VLDL	LDL	HDL
Fizyolojik oluşumu			
Kaynağı	Karaciğer	VLDL/IDL	Karaciğer, barsak
Çapı (nm)	30-80	18-25	5-12
Yoğunluğu (g/mL)	0,95-1,006	1,019-1,063	1,063-1,210
İçeriği (%)			
Lipid	90	75	50
Protein	10	25	50
Lipid içeriği (%)			
TG	50	9	8
CE	22	45	30
Serbest kolesterol	11,9	21,0	10,2
Fosfolipid	18	21	29
Yağ asidi içeriği (% ağırlık olarak)			
16:0 (palmitik asit)	25,7	19,7	33,7
18:0 (sterik asit)	6,3	7,7	13,0
18:1 (oleik asit)	29,5	16,0	12,8
18:2n-6 (linoleik asit)	25,4	36,9	26,1
20:4n-6 (araşidonik asit)	3,1	8,5	6,1
Apolipoprotein içeriği			
Apo	B ₁₀₀ , C1, C2, C3, E	B ₁₀₀	A1, A2, A4, C1,C2, C3, E

2.3. Oksidan Antioksidan

Biyolojik sistemlerde, aerobik metabolizmanın normal ürünü olarak serbest radikaller ve diğer güçlü oksidanlar açığa çıkar. Bu reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve bunların meydana getireceği hasarı önlemek için antioksidan savunma sistemleri devreye girmektedir (38) .

Sağlıklı organizmalarda, aktif oksijen ürünleri ve geçiş metalleri oksidan olarak rol alırken, SOD, Kat, vitamin E ve vitamin C gibi yapılar da antioksidan olarak rol alır. Oksidan-antioksidan dengede oksidan tarafa eğilimin olduğu artmış oksidan stres durumlarında, bu moleküllerde hasarlar meydana gelir. Bu durum, birçok patolojik olayın temelini oluşturur (39).

2.3.1. Serbest Radikaller ve Oksidan Ajanlar

Üzerinde bir ya da daha fazla ortaklaşmamış elektron bulunan ve serbest hareket edebilen atom ya da moleküller, serbest radikaller olarak ifade edilmektedir. Normal şartlarda hücreler tarafından tüketilen moleküler oksijenin %95-98' i dört elektron ilavesi ile suya, geri kalan % 2-5' i ise; günlük homeostatik oksidan stres esnasında reaktif serbest radikallere dönüşür (39) . Biyolojik sistemlerde en fazla ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri; süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil ($\cdot OH$), nitrikoksit ($NO^{\cdot}$), peroksil ($OO^{\cdot}$), alkolsil ($RO^{\cdot}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), lipid peroksit, hipoklorikasit ($HOCl$), ozon (O_3), aldehit ($HCO^{\cdot}$)'dir (40) .

Fizyolojik metabolizma ve patolojik değişiklikler, serbest radikal oluşumuna katkıda bulunmaktadır. İyonize radyasyon gibi dış faktörler hariç tutulursa hücrelerde serbest radikallerin üretimi genelde elektron transfer reaksiyonları sonucu olmaktadır. Bu reaksiyonlar enzim katalizli olabileceği gibi geçiş metal iyonlarının redoks reaksiyonu sonucu, nonenzimatik olarak da gerçekleşebilir (41).

2.3.2. Serbest Radikallerin Biyolojik Etkileri

Serbest oksijen radikalleri, mitokondriyal solunum, trombosit aktivasyonu, lökosit fagositozu ve prostagladin sentezi gibi yaşamsal işlevlerde rol almasına rağmen hücrede lipidler başta olmak üzere, proteinler, DNA karbonhidratlar üzerine toksik etkiye sahiptir. Serbest radikallerin protein üzerine etkileri, aminoasit bileşimlerine bağlıdır. Yapılarında sistein, sistin, metiyonin, histidin, triptofan, tirozin gibi aminoasitleri fazlaca bulunduran proteinler radikallerin oksitleyici etkisine daha fazla duyarlıdır. Doymamış çift bağ ihtiva eden ve kükürt içeren moleküllerin de serbest radikallere duyarlılığı çok fazladır. Oksijen radikalleri, peptit bağlarının hidrolizi, disülfid baği teşekkülü ve çapraz bağlanmalara yol açabilir. Bazı aminoasit kalıntıları, karbonil türevlerine dönüşür. Bu oksidatif

değişikliklerden sonra proteinler, proteolitik parçalanmaya karşı daha hassas olurlar. Protein yapısında olan enzimler, aktivite kaybına uğrayabilir veya daha az aktif olurlar. Na-ATPaz enziminin tiyol gruplarının oksidasyonu sonucu aktivite kaybı, hücre içi ve dışı iyon dağılımını bozulabilir (42, 43).

Hidroksil radikali özellikle DNA'da deoksiriboz ve bazlarla reaksiyona girerek bazların modifikasyonuna ve zincir kısılmasına yol açar. DNA polimerazı inhibe eder, bu yüzden hücre ölümüne kadar giden süreçleri başlatır, hücre yaşlanmasını hızlandırır ve karsinogeneze yol açabilir (44, 45).

Serbest radikaller hücrede enerji metabolizmasını da etkiler. Gliseraldehit -3-fosfat dehidrogenaz enzimini inhibe ederek, $\text{NADH} + \text{H}^+$ azalmasına ve glikolizle ATP sentezinde azalmaya sebep olurlar. Mitokondrilerde ise; radikallerin etkisi ile hem iç membran bütünlüğünün bozulması hem de ATP sentetaz aktivitesinde azalma sonucu ATP seviyesinde bir düşüş olur. Süperoksit radikali hiyaluronik asit parçalanmasına yol açarak inflamatuvar eklem hastalıklarının patolojik sürecinde de görev alabilir (44, 46) .

2.3.3. Antioksidan Savunma Sistemleri

Canlı sistemlerde reaktif oksijen türlerinin seviyelerini düzenleyecek ve bunların oluşturduğu hasarı önleyecek birçok savunma mekanizmaları mevcuttur. Antioksidan savunma sistemi veya kısaca antioksidanlar olarak da bilinen bu mekanizmalar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engeller ve/veya reaktif oksijen türlerini nontoksik bileşiklere döndürürler. Başlıca, hücrenin sitoplazmasında ve membranında bulunurlar (38).

Hücrede oluşan radikallerin, detoksifikasyon işlemi genellikle enzimlerle gerçekleştirilir. Bunlar; SOD, Kat ve GSH-Px gibi; $\text{O}_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 'i temizleyen enzimlerdir. GSH-Px düşük H_2O_2 konsantrasyonlarında aktif iken, katalaz daha çok yüksek H_2O_2 konsantrasyonlarında aktiftir (47).

Antioksidan savunma sisteminin nonenzimatik bölümü, bazı bileşikler ve vitaminlerden oluşur. Bunlar lipid fazda bulunanlar ve sıvı fazda bulunanlar olarak iki gruba ayrılır ve oksidasyon basamaklarının çeşitli safhalarında etkili olurlar. Antioksidanlar; bastırıcı, onarıcı toplayıcı ve zincir kırıcı olmak üzere dört ayrı şekilde etki gösterirler. Bastırıcı etki; serbest oksijen radikallerinin hidrojen aktararak aktivitelerini azaltan veya yok eden, toplayıcı etki; serbest oksijen radikallerini tutma veya onları daha

zayıf yeni moleküllere çevirme ve zincir kırıcı; serbest oksijen radikalleri ile etkileşerek zincir reaksiyonlarını sonlandırma işlemidir (44).

2.4. Bitki Antioksidanları

Bitkilerin antioksidan özelliği, yapılarında bulunan; vitamin, mineral, vitamin kofaktörleri, hormonlar, fiber yapıları (kolon kanserinin önlenmesinde önemi bilinen), yanında bitkisel kimyasallardan (fitokimyasal antioksidanlardan) kaynaklanmaktadır.

Bitkilerde bulunan vitaminlerden; özellikle A, C, E vitaminleri bilinen antioksidan vitamin çeşitlerindendir. A vitamini (beta karatenden vücudumuzda sentezlenerek) için kaynak olan sebze ve meyveler bitkilerde olduğu gibi insanları da güneşin yaptığı zararlı etkilerden korumaktadır. Beta karoten içeren başlıca sebzeler; havuç, kabak, brokoli, domates, karalahana, şeftali olarak gösterilebilir. C vitamini (askorbik asit); yaşamsal olarak önemli görevlere sahip antioksidanlardandır. Hem hayvan hem de bitkilerde enzimatik ve enzimatik olmayan reaksiyonlarda, reaktif oksijen türlerini temizleyen bir antioksidan olarak görev yapar (48). Yüksek miktarda C vitamini kaynağı turuncgiller yanında; yeşil biber, brokoli, yeşil yapraklı sebzeler, çiğ lahana, domates gibi başlıca sebzeler yer almaktadır. E vitamini (tokoferol, tokotrienoller), yağlarda çözünür ve lipidleri koruyucu özelliğe sahiptir. E vitamini kaynağı olarak, ham buğday, sebze yağları, yeşil yapraklı sebzeler gösterilebilir (49).

Yüksek oranda sebze ve meyve tüketimi oksidatif stresi engelleyerek buna bağlı doğabilecek kronik hastalıkları önler (50). Kısaca, bitkisel kaynaklı diyetle tüketilen sebze ve meyvelerdeki antioksidanlar; hastalıklara karşı savunmada, vücut direncini arttırmaktadırlar (51).

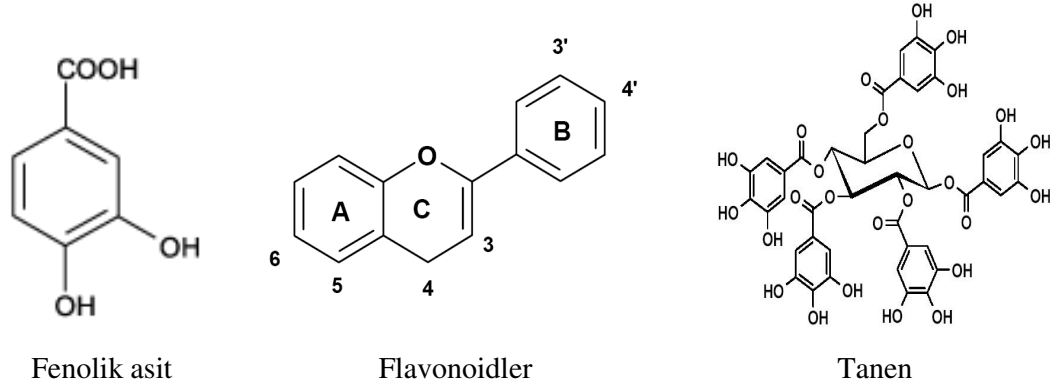
Fitokimyasal antioksidanlar grubu ise; bitkiler tarafından üretilen bitki kimyasallarıdır. Bitkiler ilk olarak bu kimyasalları fazla miktarda oksijenin (reaktif oksijenin) bitkiye yapabileceği zararlı etkilere karşı korunmak için oluşturmuştur (52). Bu kimyasallar bitkilerin ikincil metabolizması ürünleridir. Başlıca metabolizma ürünleri gibi bitki için esansiyel ürünler değildirler. Ancak bitkiye özgü renk, tad, koku oluşturmaları yanında; bitkileri, mantarlardan, bakteri, virüs, hücre, DNA hasarından koruyabilirler (53). Fitokimyasalların ikincil metabolizması tarafından genellikle sikimat ve pirüvat yolları üzerinden sentezlenirler. Bitkilerde bulunan fitokimyasal antioksidanlar, 3 büyük sınıf altında toplanılabilir:

- Fenolik metabolitler,
- Terpenoidler,
- Alkaloidler ve diğer azot içeren gruplar (50).

Fenolik metabolitlerin (polifenollerin); bulunduğu grup bitki aleminde en geniş fitokimyasal antioksidan grubu olarak bilinmektedir. Fenolik metabolitler, en az 10 farklı alt sınıfa ayrılmaktadır ve 8000 den fazla polifenol türü içermektedir (54). Polifenoller; çeşitli sebze ve meyve, tohum, kuruyemiş, çiçek, kök ve gövde kısımlarında doğal olarak sentezlenen maddelerdir (55). Bu sınıflarda fenolik asit gibi basit yapıli bileşikler yanında, tanenler gibi kompleks yapıli bileşikler yer alabilir (Şekill 5). Fenolik bileşikler, enzimatik mekanizmayla veya direk radikal temizleme mekanizmalarıyla antioksidan fonksiyon gösterdiklerinde tek değerlikli kendi fenoksil radikallerine yükseltgenirler ve içerdikleri hidroksil gruplarının sayısı ve konfigürasyonu antioksidan aktiviteyi önemli miktarda etkilemektedir (56).

Polifenol sınıfının en büyük grubu flavonoidlerdir. Flavonoidlerin etkili antioksidan olmaları araştırma konusudur ve görev olarak askorbata benzer etki gösterdiği gözlemlenmiştir (48). Flavonoidler (Şekil 5) genellikle çiçek, yaprak, gövde, kök, tohum ve meyve gibi bitki dokularının epidermal hücrelerinde glikozidik veya glikozidik olmayan formda birikirler (57). Flavonoid çeşitlerinin taşımış oldukları farklı hidroksil grupları ve onlara bağlı substituenler flavonoidlerin farklı indirgenme potansiyeli kazanmasına ve bundan dolayı değişik antioksidan aktivite göstermelerine sebep olurlar (58). Flavonoidler (Şekil5), yapısal olarak; A, B benzen halkaları ve O bağlı C halkasından oluşmaktadır (59). B halkasındaki hidroksil konfigürasyonu SOR ve SNR (serbest nitrojen radikalleri) temizleme aktivitesinde belirleyicidir. B halkasındaki hidroksi grupları hidroksil, peroksil ve peroksinitrit radikallerine hidrojen ve elektron vererek onları daha kararlı hale getirirler ve bu radikallere oranla daha kararlı flavonoid radikallerinin oluşmasına neden olurlar. Bu düzenlenme ayrıca hidroksil, peroksil ve peroksinitrit radikali temizleyicilerinin en çarpıcı özelliğidir. Bu yapıdaki flavonoid radikalleri daha kararlıdır. B halkasındaki 3'-4'- katekol yapısı lipid peroksidasyonunu inhibisyonunu arttırmaktadır. A halkasındaki substitusyon antioksidan aktiviteyle zayıf korelasyon gösterir fakat 5-OH' ın antioksidan aktiviteye katkısı bulunmaktadır. Ayrıca A halkasında metoksi grubu bulunması B halkasının antioksidan aktivitesini etkilemektedir (60).

Flavonoidler, antioksidan özellikte 13 alt sınıfa ayrılır; kalkonlar, dihidrokalkonlar, auronlar, flavonlar, flavonollar, dihidroflavonollar, flanonlar, flavanollar, flavadiollar, antosiyaninler, izoflavonoidler, proantosiyadinler, biflavonoidlerdir (61) .



Şekil 5. Polifenoller (62).

Terpenoidler, yağ asidi benzeri asetat birimlerinden sentezlenirler. Fakat yağ asitlerinden, dallanmadan dolayı farklılık gösterirler. Bakterilere, virüslere, mantarlara, protozoalara karşı etkilidirler.

Alkaloidler, heterosiklik azotlu bileşikler de denir. Tıbbi olarak ilk kullanılan alkaloid morfin olup 1805 yılında bulunmuştur.

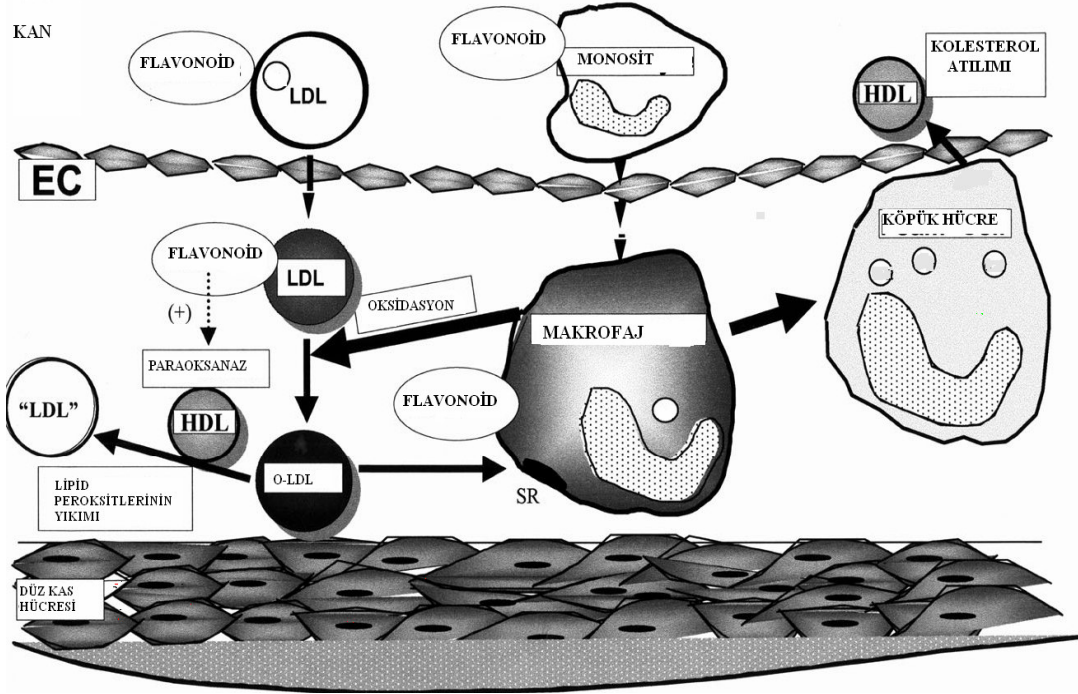
Diyetle flavonoid içeren besinlerin tüketimi, hem in vivo hemde in vitro olarak birçok biyolojik etkiye sahiptir. Epidemiyolojik çalışmalarda, flavonoid içeriklerin tüketiminin kanser ve kardiyovasküler hastalıkları azalttığı görülmüştür. Bu yüzden flavonoidler; antioksidan, antimutajenik, çöpçü aktiviteye sahip olabilir (12,59) .

Flavonoidlerin lipid peroksidasyonunu engellemesi;

- 1) OH[•] ve O[•] gibi radikallere çöpçü aktivite göstererek
- 2) Metal iyonlarına bağlanarak,
- 3) Lipid peroksil radikallerine çöpçü aktivite göstererek,
- 4) Serbest radikallerden dolayı oluşmuş enzimatik reaksiyonları inhibe ederek sağlanmaktadır (60) .

Flavonoidler, LDL ile direk etkileşebilirler ve bu şekilde LDL oksidasyonunu engelleyebilirler. Ayrıca flavonoidler, monosit/makrofaj gibi ater hücreleri ile etkileşerek, makrofaj yoluyla LDL oksidasyonunu inhibe edebilirler. Üstelik, flavonoidler, paraoksonaz

enzim aktivitesine karşı koruyucu etki göstererek lipoproteinlerin oksidasyonunu engellerler. Bütün bunlar, makrofaj-köpük hücre oluşumunun azalmasına yol açar. Böylece aterosklerotik lezyon gelişimi engellenir (63) (Şekil 6).

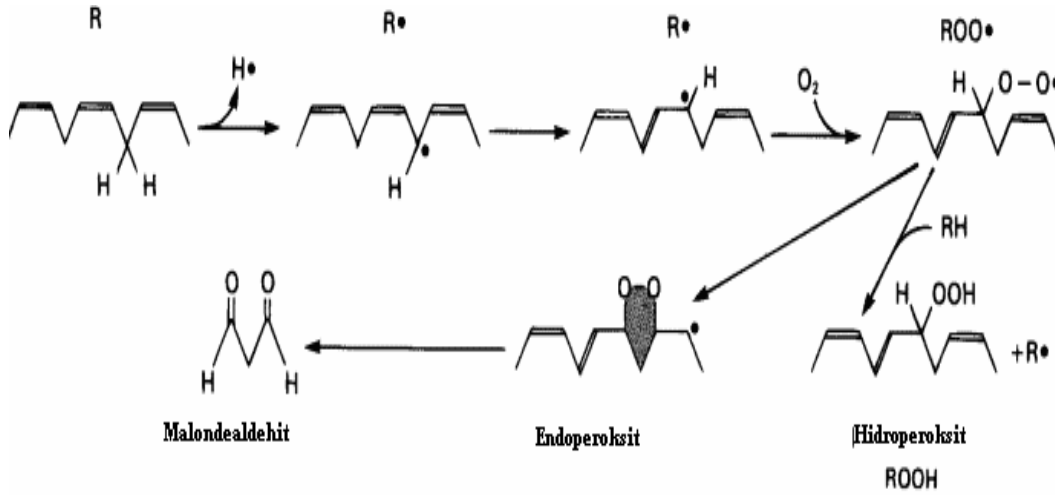


Şekil 6. Flavonoidlerin LDL Oksidasyonuna ve Köpük Hücre Oluşumuna Etkisi (63) .

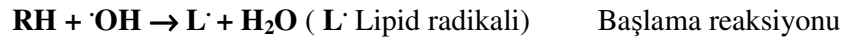
2.5. Lipid Peroksidasyonu

Lipoproteinlerin ve biyolojik membranların yapısında bulunan çoklu doymamış yağ asitleri ve kolesterol, çoğunlukla biyolojik sistemlerin ürünü olarak meydana gelen oksitleyici ajanların tesirine maruz kalarak doğal (biyolojik olarak fonksiyonel) yapılarını kaybederler ve lipid peroksitlerine dönüşürler. Lipid peroksidasyonu enzim gerektirmeyen ve ileri safhalarında yeni serbest radikal oluşumunu ve/veya ara lipid hidroperoksit ürünlerinin meydana gelmesi ile karakterizedir.

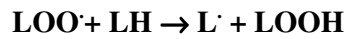
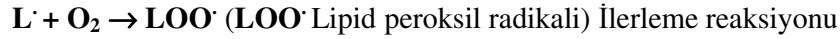
Lipid peroksidasyonunun başlangıç aşaması bir PUFA'nın metilen karbon hidrojeninin bir serbest radikalın saldırısı ile başlar (Şekil 7) .



Şekil 7. Lipid Peroksidasyonu Mekanizması (64) .



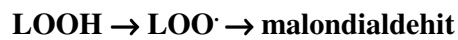
Bu aşamadan sonra lipid radikalinde oksijen molekülünün de etkisi ile yapı farklılaşması olur ve bir moleküler düzenleme gerçekleşir (konjuge dien oluşumu). Bu reaksiyonun ilerleme fazına karşılık gelir.



Bu haliyle oksidan özellik kazanan lipid molekülü, diğer yağ asitlerine etki ederek lipid peroksitlerin oluşumunu sağlar (65,66) .

Monohidroperoksitlerden şekillenen zincirlerin kesimi sonucunda başlıca iki grup molekül meydana gelir: Hidrokarbonlar ve kısa zincirli aldehitler.

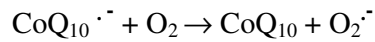
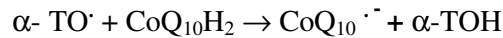
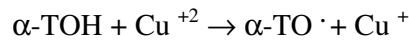
Daha az karakterize olmakla beraber epoksi ürünler, alkoller ve keton grupları oluşur. Yine ara ürün olarak hidroksialdehitler, dikarboksilik asitler meydana gelir.



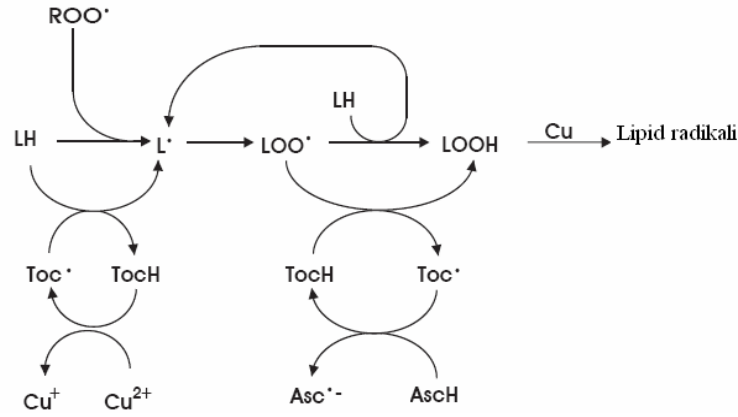
Lipid peroksidasyonun sonunda yan ürün olarak malondialdehit (MDA), 4-hidroksinonenal (4 HNE) gibi son derece toksik moleküller meydana gelir. MDA, sitotoksisite, mutajenite, membran yıkımı ve enzim modifikasyonuna yol açar. Son derece reaktif bir aldehit olup proteinlerin serbest amino grupları, özellikle fosfolipidler ve nükleik asitler ile reaksiyona girerek bu etkilerini gösterir. Doku hasarının iyi bir belirtici olmasından dolayı lipid peroksidasyonunun ölçümünde yaygın olarak kullanılır (66,67). Yoğun lipid peroksidasyonunun etkileri şu şekilde sıralanabilir:

- Membran akışkanlığında azalma,
- Membran potansiyelinde azalma,
- Membran hasarlarından dolayı hücre bileşenlerinin salınımı gerçekleşir,
- Toksik peroksit son ürünleri meydana gelir,
- Doku hasarından dolayı antioksidanlar hücre dışına sızar (68) .

Doğal LDL ile karşılaştırılınca α -tokoferol (TOH) ile zenginleştirilmiş LDL, F-10 ortamıyla başlatılmış oksidasyonu daha duyarlıdır (Şekil 8). α -tokoferol'ün Cu^{+2} indirgemesiyle meydana gelen Cu^+ , Cu^{+2} 'den daha güçlü oksidandır. Bu indirgenme esnasında meydana gelen $\alpha\text{-TO}^\bullet$ (tokofeoksi radikali) hidrofobik olduğundan LDL 'den uzaklaşamaz. Diğer antioksidanların bulunmadığı durumlarda LDL oksidasyonu etkinleşir. Güçlü bir radikal toplayıcı olan koenzimQ ($\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$), $\alpha\text{-TO}^\bullet$ 'a etki ederek onu uzaklaştırmaktadır.



$\alpha\text{-TO}^\bullet$, lipid peroksidasyonunu ilerletirken, her bir $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ molekülü 1-2 serbest radikal zincirini sonlandırdığı ileri sürülmüştür. LDL' nin $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ içeriği lipoproteinin bakırla oksidasyonunu ilk basamağına hasasiyeti ile ters orantılı olduğu yani $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ 'nin, sadece vitamin E' nin prooksidan aktivitesini önlemekle kalmadığı aynı zamanda lipoproteinin oksidasyona direncini de arttırdığı bildirilmiştir (69,70).



Şekil 8. Bakır ile Oksidasyon (71) .

2.6. Lipoproteinlerin Oksidasyonu

2.6.1. LDL Oksidasyonu

LDL'nin subendotelyal alanda endotel hücreleri, monositler, makrofajlar, lenfositler ve düz kas hücrelerinden salgılanan radikallerin etkisiyle yapısının oksitlenmesi sonucu okside LDL (oLDL) meydana gelir. Plazmanın yüksek antioksidan kapasitesinden dolayı LDL oksidasyonu genellikle subendotelyal alanda olur. Kan dolaşımındaki oLDL miktarı çok düşüktür. Dolayısıyla oLDL'ler retikuloendotelyal sistem hücrelerince hızlı bir şekilde ortamdan uzaklaştırılır (72,73). LDL'nin oksidasyon mekanizması; antioksidanların kaybolmasıyla başlar. Daha sonra LDL lipidlerindeki PUFA'ların peroksidasyonu sonucu dien konjugatlar, ardında da lipid peroksitlerin parçalanması sonucu aldehytler, alkenler ve hidroperoksitler meydana gelir. LDL yapısında bulunan ApoB₁₀₀ ya direk oksidasyona ya da bu aldehytlerin bir bölümünün, serbest ε-amino lizin grubu ile daha çok kovalent bağlarla etkileşmesi sonucu daha küçük peptidlere parçalanır ve agrege olurlar (74-76). oLDL'de bulunan oksidasyon ürünleri Tablo 2 özetlenmiştir:

Tablo 3.oLDL’ nin Okside Ürünleri (77).

Hedef	Oksidasyon ürünleri	Örnekler
Kolesterol (Serbest ve EK)	Oksisterol	7-hidroperoksi kolesterol 7-ketokolesterol 7-hidroksikolesterol
Yağ asitleri	Hidroksiperoksitler Hidroksitler Keton F ₂ -izoprostan Aldehitler	Linoleil hidroksiperoksit Linoleil hidroksit okzo-detadekadienonat 8-Epi-prostagladin F _{2α} 9-okzononanoat
Apo B	Parçalanma Çapraz bağlanma Amino asit oksidasyonu Amino asit türevlendirilmesi	3-klorotirozin Ditirozin Hidroksilösün

Oksidasyon sonucunda meydana gelen okside oLDL, farklı moleküler yapıya ve fizyolojik özelliklere sahiptir.

Normal LDL den farklı olarak oLDL kimyasal ve fizikokimyasal olarak, yoğunluğu artar, konjugedien içeriği artar, aldehit içeriği artar, elektroforetik mobilitesi artar, LDL reseptörünü tanınması azalır, apoB’ deki protein fragmentleri artar, 360nm’ de eksitasyon, 430 nm’ de güçlü floresans verir, içeriğindeki antioksidanlar azalır, fosfotidil kolin ve kolesterol ester içeriği azalmış, lizofosfotidilkolin ve oksisterol içeriği artar, PUFA’ ların bir kısmı veya çoğu kaybolmuş, hidroksi ve hidroperoksi-PUFA içeriği artmıştır. Agregasyon meyili ve heterojenitesi artar (78-81) .

oLDL biyolojik olarak ise; çöpçü reseptörler ve diğer reseptörler yoluyla makrofajlarca alımı ve parçalanması artmıştır, birçok hücreye karşı sitotoksiktir, monosit ve düz kas hücreleri için kemotaksisi artmıştır, guanilat siklazin NO aktivasyonunu inhibe eder, asetilkolin, NO ve nitrogliserinle indüklenmiş izole düz kasların gevşemesini engeller, tromborezistans aktivitesini arttıran protein kinaz C’i baskılar, endotel hücre kültüründe hücrelerin doku faktörü aktivitesini arttırır, monosit-makrofajlarca PDGF salınımı ve PDGF-mRNA üretimini baskılar, makrofaj glutasyon içeriği yaklaşık iki kat artar, antijenik yapı kazanır (80-82).

oLDL şekilleri; oksidasyon derecesine bağlı olarak tiplendirme yapılmıştır.

Doğal LDL, yapısında lipid peroksit ve aldehit içermez. LDL reseptörleri aracılığıyla temizlenir.

Hafif modifiye LDL, (MM, LDL) biyolojik olarak fonksiyoneldir; ancak PUFA ve antioksidan içeriği azalmıştır. Lipid peroksit oluşumunun başlangıç evresindedir.

Orta derecede okside LDL, PUFA ve antioksidan miktarları iyice azalmış, apoB₁₀₀ parçalanmış ve lizolesitinler oluşmaya başlamıştır.

İleri derecede okside LDL, antioksidanlar tükenmiş aldehit ve ketonlar oluşmuştur. LDL reseptörü yerine makrofajlar tarafından çöpçü reseptörlerce tanınır ve dahil edilir. (83).

Farklı LDL tiplerinin (LDL alt gruplarının) oksidasyona yatkınlıkları farklıdır. Bu farklılıkta, LDL'nin lipid içeriği ve antioksidan kapasitesi başlıca etkenlerdir (58,84). Bunlar içinde küçük yoğun olan LDL alt sınıfı oksidatif modifikasyona en yatkın olanıdır (85).

LDL'nin antioksidan miktarının yüksek olması oksidasyona direncini artırır. Düşük konsantrasyonda vitamin E, düz kas hücreleri ve endotel hücrelerinde LDL oksidasyonunu önleyebilmektedir. Vit E 'nin koruyucu etkisi, sadece endotel ve düz kas hücrelerine değil, monosit-makrofaj hücrelerinde de olmaktadır (86). Vit E ve β -karoteni düşük olan LDL 'de otooksidasyon meydana gelir; PUFA' lar azalır ve aldehitler artar (87). Oksidasyonda ilk önce α ve γ - tokoferol daha sonra da karotenoidler azalır. LDL antioksidanları tamamen kaybettikten sonra hızlı peroksidasyon başlar. LDL' nin oksidasyona direnci esasen antioksidan içeriği ile belirlenir. Suda çözünür antioksidanlar Vit C ve glutatyon konsantrasyona bağımlı olarak LDL direncini arttırmaktadırlar (88). HDL, LDL oksidasyonun azaltıcı yönde etki gösterir. Ancak LDL ile aynı konsantrasyonda kolesterol içermesinde oksidasyona karşı LDL'den daha duyarlıdır (89). Glukozaminoglikanlar da LDL oksidasyonunda etkili olmaktadır. LDL-glikasyonu oksidasyonunu artırır (90) Plazma ve hücre dışı sıvılarda selenyum, bakır, demir gibi metallerin ve bu metalleri bağlayan proteinlerin varlığı, hücrelerin oksidanları salınım hızını etkileyerek LDL oksidasyonunda rol oynamaktadırlar (91).

2.6.2. VLDL Oksidasyonu

VLDL oksidasyonunda; LDL oksidasyonuna benzer mekanizma ile gerçekleştiği rapor edilmiştir (92). Ancak LDL ile karşılaştırıldığında, VLDL oksidasyona daha fazla dirençlidir. Büyük VLDL'ler, oksidasyona karşı küçük VLDL'lerden daha fazla direnç gösterirler. Doğal haliyle VLDL, hücre yüzeyi lipoprotein lipazı ile etkileşerek triaçil gliserollerini hidrolizler ve yağ asitlerini açığa çıkarır. Geri kalan VLDL, LDL reseptörlerince alınabilir. Okside VLDL ise; lipazlarla hidrolize ihtiyaç duymadan çöpçü reseptörler tarafından alınabilirler. Büyük ve triaçilgliserolce zengin VLDL, okside olduğunda, hücrelerde fazla miktarda lipid birikimine neden olur (93). Okside VLDL, doğal VLDL'ye göre iki kat daha hızlı bir şekilde makrofajlar tarafından parçalanmaktadır. Ayrıca okside VLDL, okside LDL'ye göre makrofajlarda daha fazla kolesterol esteri birikimine neden olmaktadır (94). Bakırlı VLDL oksidasyonunda, yapısında bulunan önemli bir apoprotein olan apo E'nin arginin ve lizin amino asitleri çapraz bağlanma gösterdiği ve bu şekilde yapısal değişime uğrayabileceği belirlenmiştir (92). Bu durumda LDL reseptörleri ve heparin sülfat (proteoglikan) yapılarına okside olmuş apoE'nin bağlanma aktivitesi azaldığından hücrelerin lipid alımı azalmasına neden olmaktadır. Yüksek konsantrasyonda glikoaminoglikanlar, bakırla meydana gelen VLDL modifikasyonunu baskılayabilirler. Bunu da glikoaminoglikanlar Cu^{+2} ve onun sülfat ve ligandın karboksil ucuyla ile kompleks oluşturarak gerçekleştirirler. Böylelikle heparin sülfat gibi proteoglikanlar sadece lipid metabolizmasını kontrol etmekle kalmaz ayrıca lipoprotein oksidasyonunu da kontrol altında tutarlar (92).

Bakırlı VLDL oksidasyonda gecikme süresi, LDL'e göre iki kat daha uzundur. Buna göre küçük lipoproteinler, daha kolay okside olurlar. Lipoproteinlerdeki oksitlenebilirlik, antioksidanları ve yağ asidi bileşimine bağlıdır (93). Lipid peroksidasyonunda zincir kırıcı olarak fonksiyon gören tokoferol (vitamin E), LDL'de olduğu gibi VLDL'de de lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu etki göstermektedir (95).

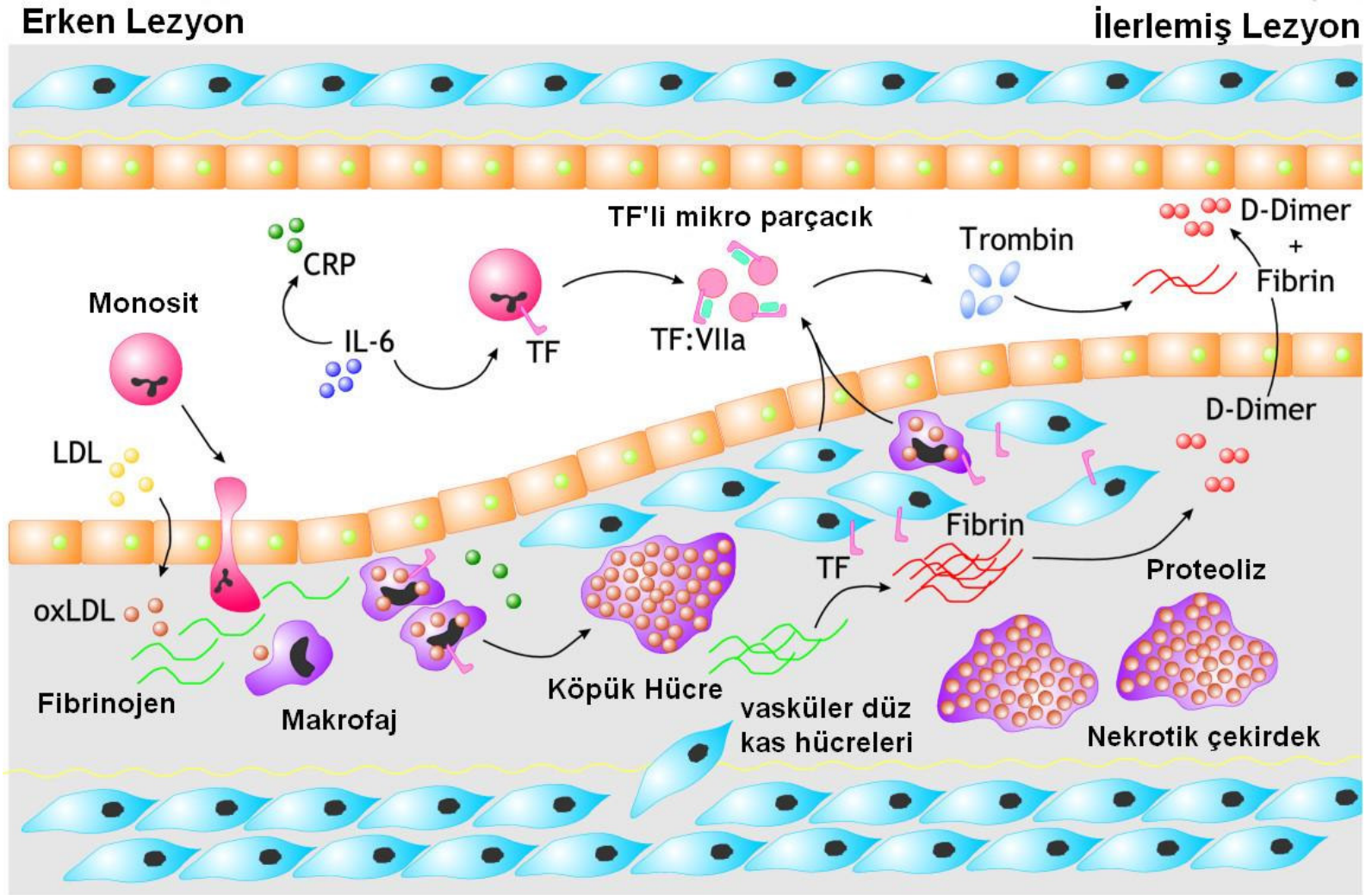
2.6.3. Lipoproteinlerin Oksidasyonu ve Kardiyovasküler Hastalıklarla İlişkisi

Aterosklerotik işlevin başlangıcında ve gelişiminde endotel fonksiyon bozukluğu önemli rol oynamaktadır. Arter duvarına giren LDL, endotel hücreleri, düz kas hücreleri ve makrofajlar tarafından salgılanan serbest radikaller tarafından okside edilirler. Endotelaltı

alandaki LDL 'nin oksidasyonu endotel hücrelerinde kemotaktik faktörlerin salınımını artırır. Monosit ve T lenfositler subendotelial yüzeye geçerler. MM-LDL'nin uyarımı ile endotel hücrelerinden salınan koloni uyarıcı faktörler, monositlerin makrofajlara dönüşmesini uyarır. Artan endotelaltı makrofajların etkisiyle LDL'nin oksidasyonu devam eder ve köpük hücre oluşumuna yol açar (Şekil 9) (82).

Modifiye LDL'nin glikasyonu ve agregasyonu ve LDL'nin fosfolipazlar ve proteoglikanlarla etkileşimi, arter duvarı hücrelerince LDL alınımını artırır. Köpük hücrelerde bol miktarda kolesterol esterleri birikir. Okside LDL 'nin makrofajlarca alınımı çöpçü reseptörler üzerinden gerçekleşir. Makrofajların göçü yani arter duvarından çıkışı okside LDL tarafından engellenir. Sonuçta arter duvarında patolojik seviyede kolesterol birikir. Oluşan aterom plağı, köpük hücrelerinin parçalanması sonucu açığa çıkan hidrolitik enzimler etkisiyle yırtılır. Yırtılmış aterom plağı üzerinde, koagülasyon sisteminin devreye girmesi ile tromboz gelişir. Bu da damar tıkanıklığı ile sonuçlanabilir (96,97). İnsan ateroklerotik plaklarda, bulunan serbest metal iyonları LDL oksidasyonuna neden olabilir (33) .

Yüksek düzeyde VLDL, aterosklerozun hızlanmasına yol açabilir. Bu durumun nedeni köpük hücre oluşumunun VLDL peroksidasyonu ile artmasından kaynaklı olabilir (98). Düşük insülin ve yüksek glukagon seviyelerinde lipoprotein lipaz baskılandığından dolayı şeker hastalığında VLDL seviyesi artar. HDL, perifer dokulardan karaciğere kolesterolün taşınması ve metal şelasyonu ya da peroksidaz benzeri aktivite ile LDL oksidasyonunu önlemesi nedeniyle antiaterojenik olarak bilinir (99). Bu peroksidaz benzeri aktiviteyi lipoprotein peroksidlerini hidrolizleyen paraoksonaz ile gösterir. Ancak paraoksonaz, reaktif oksijen ürünleri varlığında aktivitesini kaybetmektedir (100). MMP'ler HDL'nin aterosklerotik koruyucu etkisini azaltarak aterotik plak oluşumunu artırabileceği savunulmaktadır. Tip 2 diyabet hastalarındaki HDL kolesterol azalışı, kardiyovasküler hastalık riski ile ilişkili olduğuna inanılmaktadır. Tip 1'lerde ise; HDL normal veya yüksek seviyede olabilir (33).



Şekil 9. Lipoproteinler ve Kardiyovasküler Hastalıklar Arasındaki İlişki (101).

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Cihazlar, Aletler ve Malzemeler

Spektrofotometre	(UV-1601, UV Visible Spectrophotometer, SHIMADZU)
Rotary Evaporatör	(Buchi 461 Water Bath)
Plastik Küvet, Cam malzeme	(SIGMA, ILDAM)
Santrifüj	(EPENDORF, AG 5810)
Ultra santrifüj	(BECKMAN,Optima LE80K Ultracentrifuge)
Ultra santrifüj tüpleri	(BECKMAN,Lot No:9.30-99, Polikarbonat,10,4 mL)
Otoanalizör	(ROCH,Hitachi, Modular)
Plate Okutucu	(Anthos Reader, 2001)
Plate Yıkayıcı	(DIOGNASTIC PASTEUR, LP 35)
İnkübatör	(SHELLAB)
Fırın	(Galen Kamp Plus Oven)
Hasas Terazı	(MP-300,Elektronik Balance, CHYO, OHAUS-Explorer Pro)
Maynetik Karıştırıcı ve Isıtıcı	(IKA Labortechnik)
Saf Su Arıtma Cihazı	(ELGA , Pure Lab UHQ)
Buzdolabı	(AYGAZ)
Derin Dondurucu (-20 ⁰ C)	(ARÇELİK)
Derin Dondurucu (-80 ⁰ C)	(Bio Freezer, Forma Scientific)
PHmetre	(Hana Instrument pH 211)
Vorteks	(NÜVE, NM 110)
Su banyosu	(BIBY RE 100B)
Rotary evaporatör	(BIBBY RE 100)

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Albumin	(SERVA)
AlCl_3	(RIEDEL-DE HAEN)
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	(MERK)
FeCl_2	(MERK)
Folin Ciocalteau	(SIGMA)
Na_2EDTA	(CARLO ERBA REAGENT)
NaOH	(LABKIM)
HCl	(MERCK)
Metanol	(MERCK)
Etanol	(MERCK)
Na_2HPO_4	(MERCK)
NaH_2PO_4	(MERCK)
NaCl	(CARLO ERBA REAGENT)
NaOH	(LABKIM)
Na_2CO_3	(SIGMA)
NaHCO_3	(MERCK)
SDS	(AMBRESCO)
TCA	(MERCK)
TBA	(SIGMA)
Trolox	(SG510, FLUKA)
$\pm$ Kateşin	(SIGMA)
Gallik asit	(SIGMA)
1, 1, 3, 3 tetrametoksipropan	(ALDRICH)

3.2. Metodlar

3.2.1. Karalahana Örneklerinin Toplanması ve Ekstrakların Hazırlanması

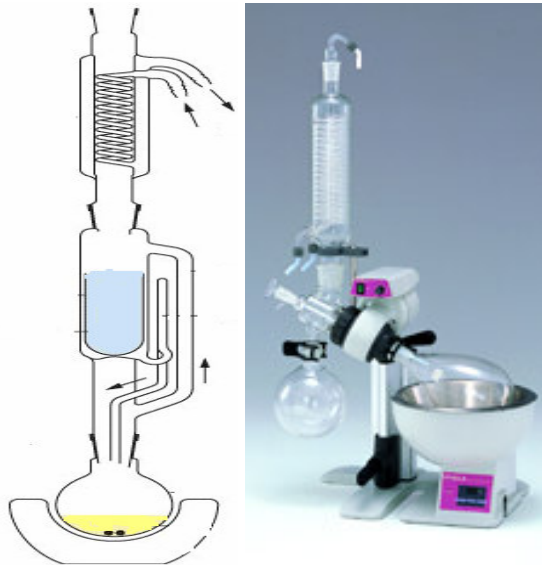
3.2.1.1. Karalahana Örneklerinin Toplanması

Yöremizdeki çeşitli il ve ilçelerden (Trabzon merkez, Rize, Giresun, Hopa, Vakfıkebir) karalahananın taze ve yeşil yaprakları toplanarak, serin ve karanlık ortamda kurutuldu. Kurutulan karalahana örnekleri, öğütücüde küçük parçalara ayrıldı ve harmanlanarak, ekstrak hazırlanana kadar 4°C’ de saklandı (1).

3.2.1.2. Karalahana Ekstraklarının Hazırlanması

Karalahanadan Metanollü Ekstrakın Hazırlanması

Metanollü karalahana ekstraktı için; soklet aparatına 8 gram kurutulmuş ve öğütülmüş karalahana içeren ekstrak kartuşu koyularak, ekstrake edildi. Soklet aparatında (Şekil 10) çözelti renksiz oluncaya kadar yaklaşık 24 saat ekstraksiyon işlemi sürdürüldü. Önce filitre kağıdı ardından, Whatman 0,2 µm filtrelerden süzüldü. Karalahananın metanollü ekstraktlarının (ME) konsantrasyonu; belli hacimde ekstrak evaporatörü ile uçurulup, kuru ağırlığına göre hesaplandı.



Şekil 10. Soklet Aparatı ve Rotar Evaporatör

Karalahanadan Sulu Ekstrakın Hazırlanması

Karalahanaya ait sulu ekstrak (SE), destilasyon balonlarına karalahanaların yapraklarından hazırlanmış kurutup, öğütülmüş örneklerden; 56 gram tartılarak suyla geri soğutucu alanda yaklaşık 6 saat kaynatılarak ardından süzülerek elde edildi.

Tablo 4. Sulu ve Metanollü Ekstrakların Kuru Ağırlık Cinsinde Konsantrasyonları

	Konsantrasyon (mg/mL)
LSE	35,550
LME	4,306

3.2.2. Karalahana Ekstraklarında Antioksidan Tayinler

3.2.2.1. Toplam Fenolik Madde (TFM) Tayini

Toplam fenolik içeriğin belirlenmesi Folin reaktifi kullanılarak (Silinkard ve Rossi, 1965) yapıldı. Metot, suda ve diğer organik çözücülerde çözünmüş olan fenolik bileşiklerin folin reaktifi ile alkali ortamda renkli kompleks oluşturması esasına dayanmaktadır. Oluşan mor renkli kompleks 650 nm’ de maksimum absorbans oluşturur (102).

Çözeltilerin Hazırlanması

1. %20 ‘ lik Na_2CO_3 , 20 gram Na_2CO_3 tartılarak hacmi 100 mL’ e tamamlandı.
2. Bitki standartlarının hazırlanışı: Önceden ekstraktaki kuru ağırlığına göre hesaplanmış sulu ve metanollü ekstrakların ana stoklarından (sulu 35.550 $\mu\text{g/mL}$, metanollü 4306 $\mu\text{g/mL}$) seyreltilerek hacmi 1000 $\mu\text{g/mL}$ olacak şekilde su veya metanolle seyreltildi. Çalışma üç kez tekrarlandı.
3. Fenolik standartların hazırlanışı, 0,001 gram gallik asit ve kateşin tartılarak hacmi 1 mL ‘ e tamamlandı. Böylelikle 1000 $\mu\text{g/mL}$ standart çözeltiler elde edildi. 500, 250, 125, 62,5 $\mu\text{g/mL}$ ‘ lik standartları elde etmek için seri seyreltmeler yapıldı.

Deneyin yapılışı

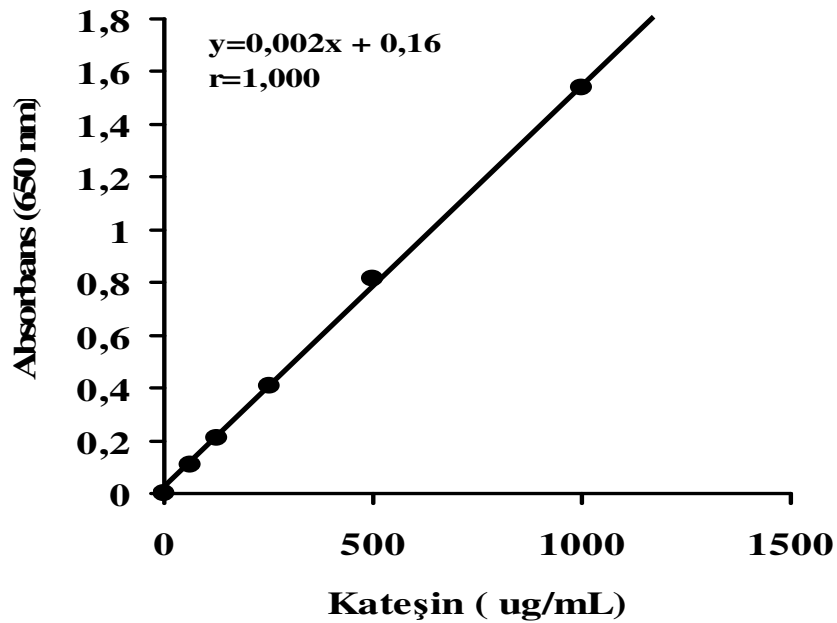
Sonuçların karşılaştırılması amacıyla fenolik bileşik olarak kateşin ve gallik asit kullanıldı.

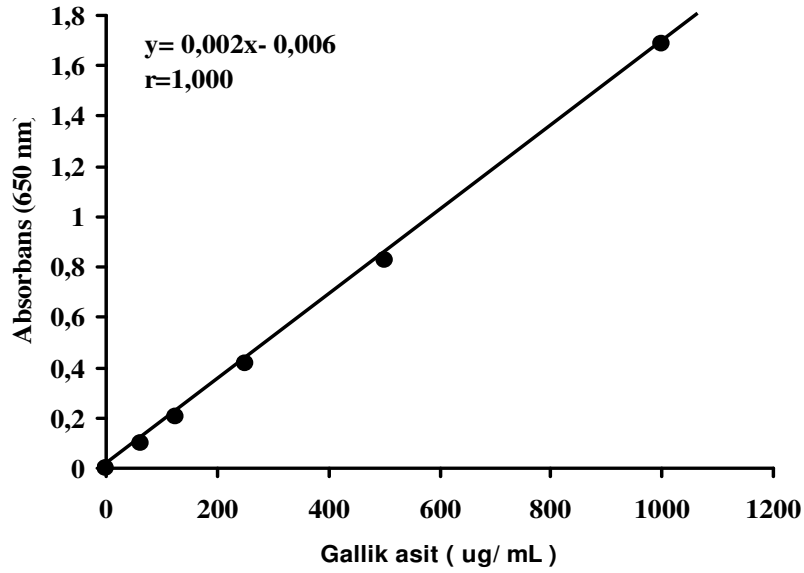
Deney basamakları ve yapılan pipetlemeler aşağıdaki grafikte özetlenmektedir.

Tablo 5. Toplam Fenolik İçerik Metod Basamakları

	Kör (Distile Su veya Metanol)	Bitki Ekstraktı SE veya ME (1000 µg/mL)	Standart Gallik Asit ve Kateşin (1000 µg/mL)
Nümune	100 µL	100 µL	100 µL
Distile su	3 mL	3 mL	3 mL
Folin-Ciocalteu reaktifi	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL
3 dakika inkübasyonda bekletildi.			
% 20'lik NaCO ₃	2 mL	2 mL	2 mL
1 saat inkübasyonda bekletildi.			
650 nm'de absorbansları spektrofotometrik olarak okundu.			

Kateşine gallik asite ait konsantrasyon grafikleri çizilerek her bir ekstraktın konsantrasyon miktarı belirlendi. Standart grafikleri şekil 11 ve şekil 12 olarak gösterilmektedir.

**Şekil 11.** Toplam Fenolik İçerik İçin Standart Kateşin Konsantrasyon Grafiği



Şekil 12. Toplam Fenolik İçerik için Standart Gallik Asit Konsantrasyon Grafiği

3.2.2.2. Flavonoid İçeriğinin Belirlenmesi

Flavonoidlerin belirlenmesi deneyi, Zhishen-1999, (103) Dawento-2002 (104) ve ark. kullandığı metodu biraz farklılaştırarak yapıldı (105). Flavonoidlerin alimünyum ile yapmış oldukları kompleksler reaksiyon sonunda, pembe renk oluşturmaktadır. Bu pembe renk oluşumu, standart ve köre karşı spektrofotometrede okutularak flavonoid içerik belirlendi (51).

Çözeltilerin hazırlanması:

1. % 5 'lik NaNO_2 , 5 gram NaNO_2 tartılarak ultra saf su ile hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
2. % 10' luk $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 gram AlCl_3 tartılarak ultra saf su ile (hızlı yapılmamalı) hacmi 100 mL' ye tamamlandı.
3. 1 M NaOH, 2 gram NaOH tartılarak ultra saf su ile hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
4. Bitki standartları; total fenolik içeriğinin belirlenmesinde olduğu gibi hazırlandı.

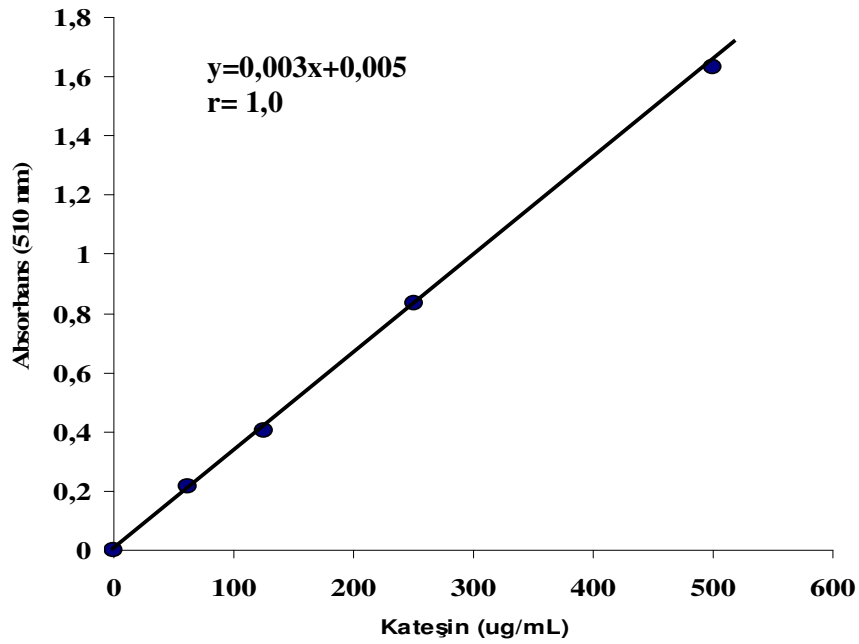
Deneyin yapılışı:

Sonuçların karşılaştırılması amacıyla bir flavonoid olan kateşin standartları kullanıldı. Deney basamakları ve yapılan pipetlemeler aşağıdaki grafikte özetlenmektedir. Deney üç kez çalışıldı.

Tablo 6. Flavonoidlerin Belirlenmesi Deney Basamakları

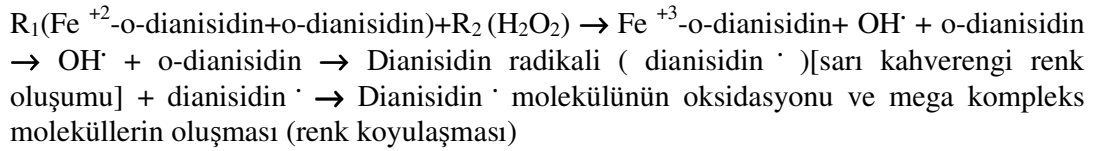
	Kör Distile Su veya Metanol	Bitki Ekstraktı SE, ME (1 µg/mL)	Standart Kateşin (500, 250, 125, 62,5 µg/mL)
Nümune	1mL	1mL	1 mL
Distile su	5 mL	5 mL	5 mL
%5 NaNO ₂	0.3 mL	0.3 mL	0.3 mL
Vortekslendi.			
5 dakika inkübasyonda bekletildi.			
%10 AlCl ₃	0.6 mL	0.6 mL	0.6 mL
1 M NaOH	2 mL	2 mL	2 mL
5 dakika inkübasyonda bekletildi.			
Hacim 10 mL'e tamamlandı.			
Hemen 510 nm' de spektrofotometrede absorbansları okundu.			

Kateşine ait konsantrasyon grafikleri çizilerek her bir ekstraktın konsantrasyon miktarı belirlendi. Standart grafiği şekil 13 olarak gösterilmektedir.

**Şekil 13.** Flavonoid Belirlenmesi Standart Kateşin Konsantrasyon Grafiği

3.2.2.3. Toplam Antioksidan Kapasite (TAK) Tayini

Karalahana ekstraktlarındaki; antioksidan gücün belirlenmesinde, Erel (106) metodu (antioksidan kiti) kullanıldı. Fe^{+2} -o-dianisidin çözeltisi ve H_2O_2 çözeltisi, Fenton tipi reaksiyon vererek $\text{OH}^\cdot$ radikalini oluşturmaktadır. Oluşan bu radikal düşük pH' larda renksiz o-dianisidin moleküllerini, sarı kahverengi rengindeki dianisidil radikallerini oksitlemektedir. Dianisidil radikalleri üzerinden başlayan bu oksidasyon sonucu dianisidil radikalleri de kendi aralarında reaksiyona girerek büyük kompleksler oluşturmakta, diğer oksidasyonlara neden olmakta ve zincirleme oksidasyon reaksiyonları gerçekleşmekte ve oluşan renk giderek koyulaşmaktadır. Fakat ortama katılan ve antioksidan özellik gösteren bir madde bu oksidasyon reaksiyonlarını durdurmakta ve dolayısıyla rengin koyulaşmasını da engellemektedir.



Deneyde Kullanılan özeleler:

1. Standart olarak Troloks çözeltisi, etanolle 1 mmol/L olacak şekilde hazırlandı. Seri seyreltmelerle 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625 standart Trolox çözeltileri elde edildi.
2. Reaktif 1:Clark ve Lubs çözeltisi (75 mM ve pH:1,8) içinde; 10 mM o-dianisidin ve 45µM demir iyonlarından oluşmaktadır.
3. Reaktif 2: Clark ve Lubs çözeltisi içinde ;7,5 mM H_2O_2 ' den oluşmaktadır.
4. Bitki standartları, ; total fenolik içeriğin belirlenmesinde olduğu gibi hazırlandı.

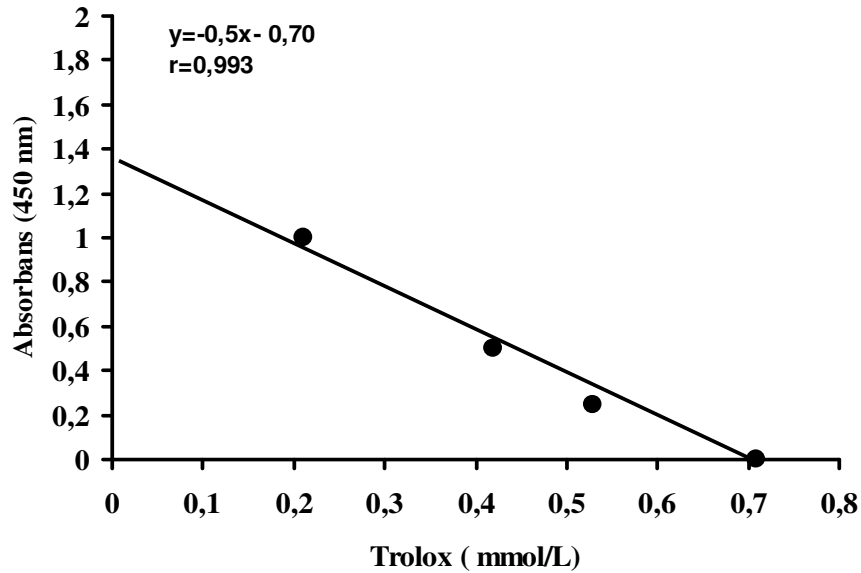
Deneyin yapılışı:

Deney basamakları ve yapılan pipetlemeler aşağıdaki grafikte özetlenmektedir. Deney üç kez tekrarlandı.

Tablo 7. TAK Deneyi Basamakları

	Hacim (µL)
Reaktif 1	200
Bitki ekstraktları	5
Reaktif 2	10
450 nm' de absorbensleri okundu.	

Troloks standart grafiği çizilerek karalahana ekstraktlarındaki antioksidan kapasitesi belirlendi.(Deneyde maksimum absorbens 6. dakikada elde edildi.)

**Şekil 14.** TAK Deneyi Troloks Konsantrasyon Grafiği.

Troloks standartı konsantrasyon grafiğine göre karalahana ekstraktların konsantrasyonu hesaplandı (Şekil 14).

3.2.3. Lipoproteinlerin İzolasyonu ve Lipoproteinlerde Yapılan Tayinler

Sağlıklı 15 kişiden alınan kan örnekleri kan hücre sayımı, lipoprotein izolasyonu ve serum biyokimyasal parametreleri için antikoagülanlı vakumlu tüplere alındı. 20 dakika

oda sıcaklığında inkübasyonu ardından 3000 rpm ‘ de 15 dakika santrifüj edilerek serum ve plazmalar elde edildi.

3.2.3.1. Lipoprotein İzolasyonu

Lipoproteinlerin izolasyonu kesikli dansite gradient ultra santrifügasyonu ile Scavens ve ark. (107) metodu ile 10,4 mL’lik polikarbonat ultrasantrifüj tüpleri kullanarak yapıldı. NaBr ile dansite gradienti oluşturularak VLDL, LDL ve HDL izole edildi.

Çözeltilerin Hazırlanması : (108)

(A) : (d =1,006 g/mL) 11,46 g NaCl + 0,372 g EDTA + 0,13 g NaN₃
deiyonize su ile 1 L ‘e tamamlandı.

(B) : (d = 1,24 g/mL) 34,11 g NaBr, çözelti (A) ile 100 mL’ e tamamlandı.

(C) : (d = 1,063 g/mL) 7,60 g NaBr, çözelti (A) ile 100 mL’ e tamamlandı.

(D) : (d = 1,019 g/ mL) 1,66 g NaBr, çözelti (A) ile 100 mL’ e tamamlandı.

Deneyin Yapılışı

20 dk, 4 °C’ de ve 4000 rpm’ de santrifüj edilerek elde edilen plazmanın yoğunluğu, katı NaBr ile 1,30 g/mL’ e ayarlandı. Bu işlem için hassas terazi kullanıldı. 3,5 mL plazma tartıldı, NaBr ilave edilerek ağırlığı 4,55 g’a (3,5 mL x 1,3 g/ mL) getirildi ve üzerine tabaka olacak şekilde insulin iğnesi ile sırasıyla değişik yoğunlukta aşağıdaki çözeltiler ilave edildi (107).

Tablo 8. Lipoprotein İzolasyonu İçin Kullanılan Çözelti Konsantrasyonları

	mL
Plazma (1,3 g/mL)	3,5
B (1,24 g/mL)	1,4
C (1,063 g/ mL)	1,4
D (1,019 g/mL)	1,4
A (1,006 g/ mL)	1,9
Deiyonize su	0,3

Hazırlanan santrifüj tüpleri, tabakaların bozulmamasına özen göstererek Beckman 90 Ti sabit açılı ultrasantrifüj rotarına yerleştirildi. 50 000 rpm (155 000 g) ve 4 ° C ‘ de 3 saat santrifüj edilerek VLDL, LDL ve HDL tabakaları elde edildi.

Bu tabakalar, pastör pipetle dikkatle alındı ve tüm ayrılan lipoproteinler aligotlanarak – 80° C ‘de saklandı. Her lipoprotein için, TBARS deneyi yapılmadan önce diyaliz edildi. Diyaliz sonrası ise; protein tayinleri ve toplam kolesterol (TK) ve toplam trigliserid TG seviyelerinin ölçümü enzimatik yöntemlerle yapıldı.

3.2.3.2. Lipoproteinlerin Diyalizi

EDTA ve diğer safsızlıkları uzaklaştırmak amacıyla lipoproteinlerde ayrı ayrı diyaliz yapıldı. Diyaliz işleminde, selüloz membrandan yapılmış diyaliz torbası kullanıldı. Bu torba yarı geçirgen bir zar olduğundan EDTA ve küçük moleküller dışarı çıkarken tampon içeri girmektedir. Bu yüzden diyaliz esnasında membran yüzey alanı artmaktadır. Denge konsantrasyonuna erişildiğinde, çözünenlerin dağılımı her iki yönde de aynı olmaktadır (109).

Çözeltilerin Hazırlanması:

1. 10mM EDTA-10 mM PBS, pH 7,4 ;
Bir miktar % 0,9 ‘luk NaCl içerisinde 4,36 g Na₂HPO₄.2H₂O ve 1,86 g NaH₂PO₄ ilave edilerek çözüldü. Bu çözeltiye 0,148 g Na₂EDTA ilave edildi. pH’ sı kontrol edildi. Son hacim % 0,9’luk NaCl ile 4 L’ ye tamamlandı.
2. PBS (pH 7,4), 10 mM;
EDTA hariç çözelti (1)’ deki gibi hazırlandı.
3. 100 mM NaHCO₃-10 mM Na₂EDTA, pH 7,4;
8,4 g NaHCO₃ ve 3,722 g Na₂EDTA bir miktar deiyonize suda çözüldü. pH’ sı HCl ile 7,0’ye ayarlandı. Deiyonize su ile hacim 1 L’ ye tamamlandı.

DiyalizTorbasının Hazırlanması:

1. Diyaliz torbaları, istenilen ebatlarda kesildi (LDL miktarlarına göre, yaklaşık 10-15 cm) ve 1 L’lik beherlere koyuldu.
2. 100 mM NaHCO₃-10mM Na₂EDTA (7,0) tamponu ile 2 saat 60° C ‘ de sürekli olarak ve yavaşça karıştırıldı.
3. Yavaşça 4 ° C’ de soğutuldu ve kullanılabilecek kadar saklandı.

Diyaliz işlemi:

İzole edilen lipoproteinler'den EDTA'yı uzaklaştırmak için ilk önce 10 mM EDTA-10 mM PBS ile 12 saat ve ardından 10 mM PBS ile yine 12 saat her 3-4 saatte bir tamponlar tazelenerek 4 °C' de ve karanlıkta manyetik karıştırıcıda diyaliz işlemi yapıldı. İlk aşamada EDTA'lı tampon kullanmada amaç diyaliz işlemi esnasında geçen uzun sürede meydana gelebilecek oksidasyona engel olmaktır.

3.2.3.3. Lipoproteinlerde Total Kolesterol ve Trigliserid Tayini

İzole edilen lipoproteinlerde toplam kolesterol ve trigliserid tayini, Hithachi 917 otoanalizöründe Roche kitleri kullanılarak enzimatik kolorometrik yöntemlerle yapıldı.

3.2.3.4. Lipoproteinlerde Protein Tayini

İzole edilen HDL, LDL ve VLDL protein tayini Lowry metodu (110) ile yapıldı. Bu metotta, protein önce alkali bakır çözeltisi ile muamele edildi. Alkali ortamdaki Cu^{+2} , proteinlerin peptid bağları ile kompleks oluşturarak Cu^{+2} ' e indirgendi. Daha sonra Folin ve Ciocolteu 'nun fenol reaktifi ilave edildi. Fosfotungstik asit ve fosfomolibdik asitlerin indirgenmesiyle molibdenyum mavisi ve tungsten mavisi renkleri meydana geldi.

Bu metodun hassasiyeti 2-100 µg arasındadır. Bu nedenle tayine geçmeden önce HDL 40 kat, LDL 20 kat ve VLDL 10 kat % 0,9 ' luk NaCl ile seyreltilti.

Çözeltilerin Hazırlanması:

1. 2xLowry Reaktifi;

A. 20 g Na_2CO_3 260 mL, 0,4 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 20 mL ve 0,2 g Na-K tartarat 20 mL deiyonize suda çözüldükten sonra üçü karıştırıldı ve böylece bakır reaktifi elde edildi.

B. 10 g SDS 100 mL deiyonize suda çözüldü.

C. 4 g NaOH 100 mL deiyonize suda çözüldü

Kullanmadan hemen önce 3:1:1 oranında hacimlerde A: B: C karıştırılarak Lowry reaktifi elde edildi. Bu çözelti 2-3 hafta saklanabilir. Eğer çözeltide, beyaz çökelek oluşursa 37 °C' de ısıtılır. Fakat siyah çökelek gözlenirse çözelti atılır.

2. Folin reaktifi, 0,2 N;

2 N' lik Folin reaktifi 1:10 oranında deiyonize su ile seyreltildi. Bu çözelti, karanlıkta ve oda sıcaklığında birkaç ay saklanabilir.

3. Albümin standartları

10 mg albumin 100 mL deiyonize suda çözülerek 100 µg/mL' lik albümin standardı ve bu standarttan da 75 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL ve 12,5 µg/mL' lik standartlar hazırlandı.

Deneyin Yapılışı:

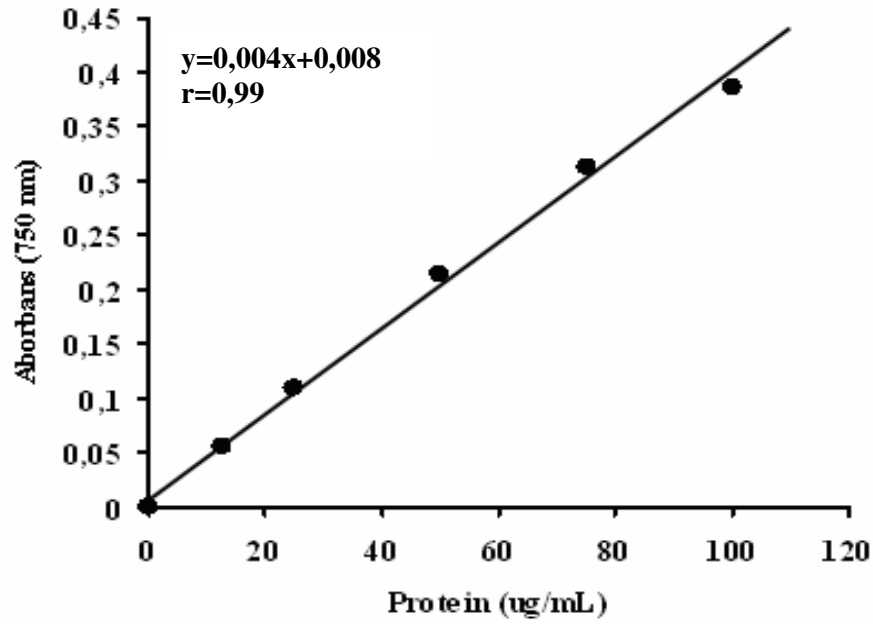
Tablo 9'da protein tayini basamakları özetlenmektedir.

Tablo 9. Protein Tayini (Lowry) Deney Basamakları

	Kör (µL)	Numune (µL)	Standart (µL)
NaCl (% 0,9)	400	-	-
Numune	-	400	-
Standart	-	-	400
2xLowry	400	400	400
Oda sıcaklığında 10 dk bekletildi.			
Folin reaktifi (0,2 N)	200	200	200
Oda sıcaklığında 30 dk bekletildi			
750 nm ' de absorbansları okundu.			

Folin reaktifi asidik pH' da kararlıdır. Oysa indirgenme asidik pH'da yapılmaktadır. Bu nedenle Folin reaktifi alkali bakır-protein çözeltisine ilave edilir edilmez iyice karıştırıldı. Böylece fosfomolibdik-fosfotungstat reaktifleri parçalanmadan indirgenmesi sağlanmış oldu.

Standart grafik yoluyla sonuçlar bulundu (Şekil15)



Şekil 15. Protein Deneyi, Albumin Konsantrasyon Standart Grafiği

3.2.4. İzole Lipoproteinlerin Ekstraksız ve Ekstraklı Ortamlarda Oksidasyonu

Çözeltilerin Hazırlanışı :

A. Lipoproteinlerin oksidasyonu için; 10 mM PBS, pH 7,4 ;

1. Bir miktar % 0,9 'luk NaCl içerisine 4,36 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 1,86 g NaH_2PO_4 ilave edilerek çözüldü. pH' sı kontrol edildi. Son hacim % 0,9' luk NaCl ile 4 L' ye tamamlandı.

2.100 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi,

0,026 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ tartılarak PBS tamponu ile 10 mL' ye tamamlandı. Böylelikle 10mM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi elde edilmiş oldu. Bu çözeltiden 100 μL alınarak hacmi PBS tamponu ile 10 mL' yee tamamlandı.(Taze olarak hazırlanmalı.)

3.Bitki standartlarının hazırlanması,

Bitki ana stoklarından (sulu veya metanollü ekstraktlardan) 100 μL ' lik oksidasyon ortamında konsantrasyonları sırasıyla, 100, 50, 25,10,5 $\mu\text{g/mL}$ olacak şekilde seyreltmeler yapılarak hazırlandı.

4.1mM'lık Na_2EDTA ,

1 mM konsantrasyonda olacak şekilde hazırlandı. Bu çözelti oksidasyon durdurucu olarak kullanıldı.

Deneyin Yapılışı:

A.Oksidasyon Deneyi

Lipoproteinlerin oksidasyonları, için öncelikle karalahanaya ait sulu ve metanollü ekstraktlar son konsantrasyonları sırasıyla; 100, 50, 25, 10, 5 $\mu\text{g/mL}$ olacak şekilde seyreltildiler. Oksidasyon ortamı için lipoproteinlerin protein konsantrasyonu $50\mu\text{g/mL}$: okside edici ajan olarak $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonu; $1,67 \mu\text{M}$ olacak şekilde hazırlandı. Buna göre deneyde oksidasyona maruz bırakılmayan lipoproteinler, sadece okside edilen lipoproteinler, farklı konsantrasyonlardaki ekstrakt ilave edilip okside edilen lipoproteinden oluşturuldu.

Deney aşamalarında öncelikle lipoproteinler pH: 7,4 olan fosfat tamponuyla seyreltildi (111). Farklı konsantrasyonlardaki ekstraktlar ilave edilecek gruplar ilave edildikten sonra vortekslenip, santrifüjlenip 37°C ' de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası okside edilecek ve ekstrakt ilave edilip okside edilecek gruplar $1,67 \mu\text{M}$ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ kullanılarak 24 saat 37°C 'de tekrar inkübe edildiler (112). İnkübasyon sonrası oksidasyonu durdurmak için gruplara 1 mM EDTA ilave edildi ve 532 nm' de TBARS değerlerine bakıldı.

3.2.5. Lipoproteinlerde Oksidasyon Tayini (TBARS)

Lipoproteinlerde lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehit (MDA) nın asidik ortamda tiyobarbitik asitle ısıtılması sonucu meydana gelen pembe renkli kompleksin dansitometrisi ölçülerek değerlendirildi (113).

B. TBARS deneyi için,

1.TCA, %1;

1g TCA, deiyonize su ile çözülerek 100 mL' ye tamamlandı.

2. TBA, %1 ;

1 g TBA bir miktar deiyonize suda ısıtılarak çözüldü.

3. MDA standartları;

1 mmol 1,1,3,3 tetrametoksipropan 100 mL 0,01 M'lık HCl içerisinde 50°C ' de 1 saat bekletilerek bu bileşiğin hidroksi sonucu MDA çözeltisi elde edildi. Bu konsantre çözelti kullanılarak 10, 5, 2,5 ve $1,25 \text{ nmol/mL}$ ' lik standartlar hazırlandı.

B. TBARS deneyi

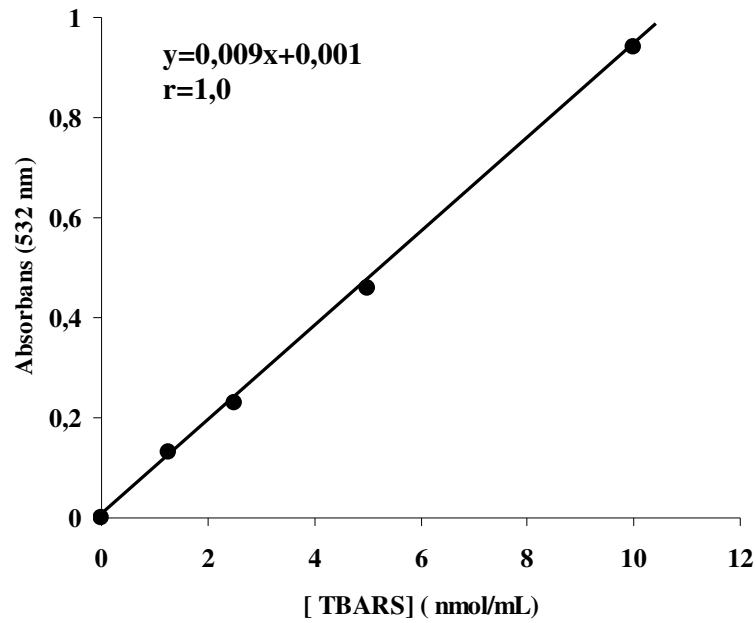
Tablo 10’ da TBARS deney basamakları özetlenmektedir.

Tablo.10 TBARS Deney Basamakları

	Kör (mL)	Standart (mL)	Numune (mL)
Deiyonize su	0,1	-	-
Standart	-	0,1	-
Lipoproteinler*	-	-	1
LDL/VLDL (50µg/mL)			
TCA	1	1	1
Vorteks			
TBA	1	1	1

* Normal /okside veya farklı konsantrasyonlarda karalahana ekstraktı ilave edilmiş ve okside edilmiş lipoproteinler

95 °C ‘de 45 dk ısıtılıp soğutulduktan sonra 20 dk 3000 rpm’ de santrifüj edilerek süpernatantlar 532 nm ‘de okundu. Standart grafik çizilerek LDL-TBARS ve oLDL-TBARS seviyeleri belirlendi (Şekil 16).



Şekil 16. TBARS Standart Konsantrasyon Grafiği

3.3. İstatistiksel Analizler

Elde edilen değerler, aritmetik ortalama ve standart sapması olarak ifade edildi. Okside edilmiş lipoproteinler ile karalahana ekstraktları arasındaki anlamlı farklılığın olup olmadığını belirlemede, parametreler normal dağılıma uygunluk göstermediğinden; Kruskal Wallis Varyans analizi yapıldı ve $p < 0,05$ olanlar anlamlı olarak kabul edildi. Kruskal Wallis Varyans analizinin sonuçlarının doğruluğunu belirlemek ve gruplar içinde hangi konsantrasyon aralığında anlamlı farklılığın olduğunu saptamak için; Mann Whitney U testi uygulandı ve $p < 0,01$ olanlar anlamlı olarak kabul edildi. Sulu ve metanollü bitki ekstrakt grupları arasındaki farklılığı belirlemede ise; Mann Whitney U testi uygulandı ve $p < 0,05$ olanlar anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Karalahananın sulu ve metanollü ekstraktlarının toplam fenolik madde (TFM), flavonoid ve toplam antioksidan kapasite (TAK) düzeyleri Tablo 11’de gösterilmiştir. Toplam fenolik madde ve flavonoid içeriğinin metanolik ekstraktlarda, toplam antioksidan kapasitenin ise sulu ekstraktlarda yüksek bulundu ($p<0,05$).

Tablo 11. Karalahana Ekstraktlarının Antioksidan Seviyeleri

Antioksidan parametre		SE (n=3)	ME (n=3)
TFM	(mg kateşin/g ekstrak)	28,9 ± 2,1	53,5 ± 4,1
	(mg gallik asit/g ekstrak)	34,3 ± 1,6	55,2 ± 4,7
Flavonoid (mg/g ekstrak)		6,64 ± 0,6	12,9 ± 0,9
TAK (mmol/g ekstrak)		0,24 ± 0,02	0,15 ± 0,02

Tablo 12’de sağlıklı kişilerden izole edilen lipoproteinlerdeki toplam kolesterol (TG) ve trigliserid (TG) seviyeleri mg lipoprotein başına ifade edilmektedir. Buna göre VLDL’de trigliserid, LDL’de ise toplam kolesterol değerleri yüksek bulundu.

Tablo 12. İzole Lipoproteinlerdeki Trigliserid ve Toplam Kolesterol Seviyeleri

	VLDL (n=15)	LDL (n=15)	HDL (n=15)
TG (mg/mg protein)	2,0 ± 0,085	0,28 ± 0,07	0,005 ± 0,004
TK (mg/mg protein)	0,48 ± 0,14	1,51 ± 0,31	0,015 ± 0,004

Tablo 13’de izole edilen VLDL ve LDL’nin, Cu^{+2} (50 $\mu\text{g/ml}$ lipoprotein: 1,67 μM Cu^{+2}) ile 24 saat 37 °C’de oksidasyonu öncesi (OÖ) ve sonrası (OS) TBARS seviyeleri, mg protein ve lipoprotein kolesterol başına ifade edilmiştir. Oksidasyon öncesinde LDL ve VLDL TBARS seviyeleri, hem protein ve hem de kolesterol başına ifade edildiğinde anlamlı bir farklılık göstermemiştir. Oksidasyon sonrasında, protein başına ifade edildiğinde okside LDL’de TBARS seviyelerinin daha yüksek oksidasyon gözlenirken; ($p<0,05$), kolesterol başına ifade edildiğinde okside LDL ve okside VLDL TBARS seviyeleri arasında anlamlı bir farklılık görülmedi. Protein başına ifade edildiğinde en fazla oksitlenebilirliğin LDL’de (8,2 kat), VLDL’de ise (2,33 kat), kolesterol başına ifade edildiğinde en yüksek VLDL’de (11,79 kat), LDL’de ise (8,23 kat) olduğu görüldü.

Tablo 13. İzole lipoproteinlerde oksidasyon öncesi ve sonrası TBARS seviyeleri

		OÖ	OS
VLDL-TBARS	(nmol/mg protein)	2,92 $\pm$ 1,74	6,83 $\pm$ 3,69
	(nmol/mg kolesterol)	1,27 $\pm$ 0,68	14,98 $\pm$ 7,95
LDL-TBARS	(nmol/mg protein)	2,60 $\pm$ 1,06	21,33 $\pm$ 8,39 *
	(nmol/mg kolesterol)	1,72 $\pm$ 0,67	14,16 $\pm$ 5,31

* Okside lipoproteinlerin TBARS’a göre istatistiksel olarak anlamlı $p<0,05$

Tablo 14 ve Tablo 15’de son konsantrasyonları 100 $\mu\text{g/mL}$ (A,A’), 50 $\mu\text{g/mL}$ (B,B’), 25 $\mu\text{g/mL}$ (C,C’), 10 $\mu\text{g/mL}$ (D,D’) ve 5 $\mu\text{g/mL}$ (E,E’) olacak şekilde ekstraktlar ilave edildiğinde elde edilen oksidasyon sonuçları nmol TBARS şeklinde protein ve kolesterol başına ifade edilmiştir. Sulu ekstraktlarda, ekstrak konsantrasyonunun artışı ile tüm lipoproteinlerde TBARS seviyeleri azalmasına rağmen VLDL’de konsantrasyon farklılığının istatistiksel olarak anlamlı bir TBARS seviyesi farklılığına neden olmadığı görüldü. Sulu ekstraktlarda 100 $\mu\text{g/mL}$ ’lik ekstrak konsantrasyonu, diğer konsantrasyonlara göre daha düşük LDL-TBARS sonucuna neden oldu ($p<0,01$). Metanollü ekstraktlarda ekstrakt konsantrasyonlarına göre TBARS seviyeleri arasında anlamlı bir farklılık bulunamadı ($p>0,01$).

Tablo 14. Farklı Konsantrasyonlarki Sulu Ekstrakların Lipoproteinlerin TBARS Seviyelerine Etkisi

LİPOPROTEİNLER	OKSİDE LİPOPROTEİNLER	A 100 µg/mL	B 50 µg/mL	C 25 µg/mL	D 10 µg/mL	E 5 µg/mL
VLDL						
nmol/mg protein	6,83 ±3,69	3,41 ±2,17	3,86 ± 2,52	4,48 ± 2,49	4,43 ± 2,66	4,59 ± 2,90
% İnhibisyon		46,67±19,63	42,24±18,92	31,55±15,12	31,37±20,6	30,85±21,15
nmol/mg kolesterol	14,98 ± 7,95	7,37 ±4,14	8,36 ± 4,78	9,80 ± 4,96	9,44 ± 4,93	9,92 ± 5,50
% İnhibisyon		46,67±19,63	42,24±18,92	31,55±15,12	31,37±20,60	30,85±21,15
LDL						
nmol/mg protein	21,33 ±8,39	5,41 ±1,76	7,75 ± 2,27*	7,93 ± 2,82*	8,6 ± 2,17*	8,54 ± 2,23*
% İnhibisyon		71,72±12,16	60,14±13,48	59,21±13,40	54,88±16,14	55,32±15,65
nmol/mg kolesterol	14,16 ±5,31	3,62 ± 1,18	5,14 ± 1,21*	5,28 ± 1,34*	5,72 ± 1,16*	5,72 ± 1,51*
% İnhibisyon		71,72±12,16	60,14±13,48	59,21±13,40	54,88±16,14	55,32±15,65

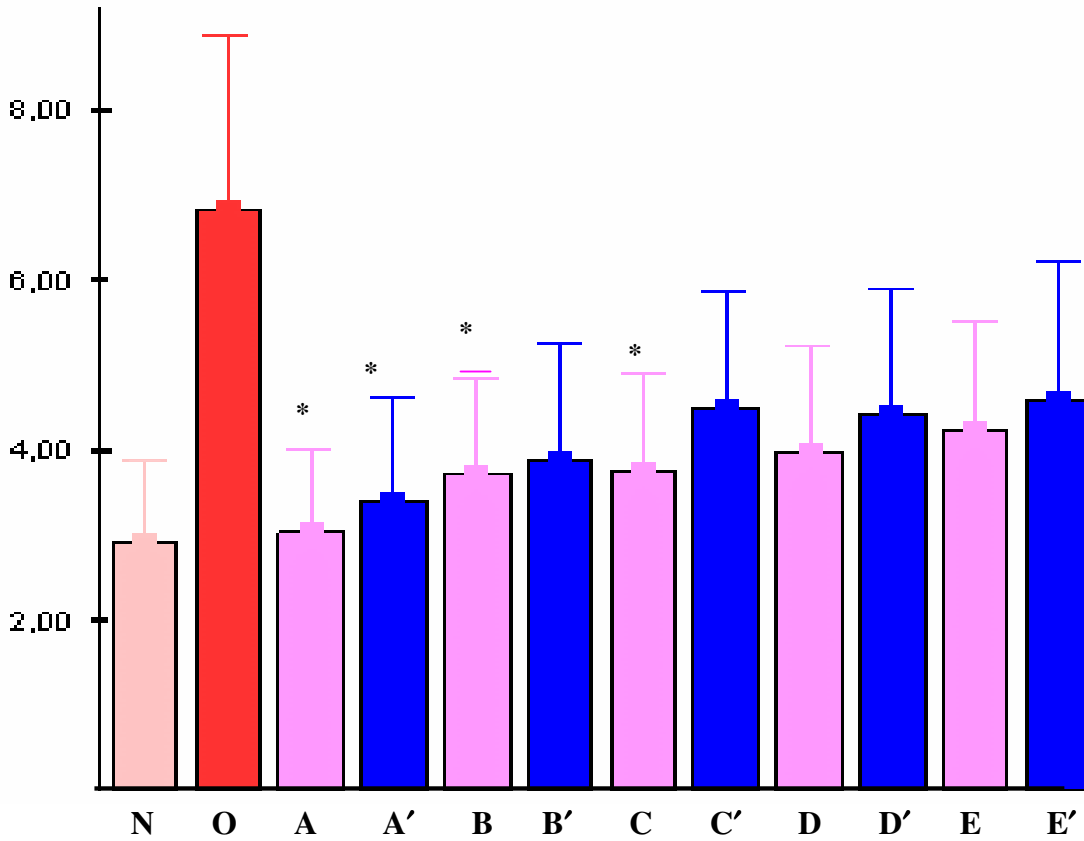
* ; A'ya göre istatistiksel olarak anlamlı farklı (p<0,01),.

Tablo 15. Farklı Konsantrasyonlardaki Metanollü Ekstrakların Lipoproteinlerin TBARS seviyelerine etkisi.

LİPOPROTEİNLER	OKSİDE LİPOPROTEİNLER	A´ 100 µg/mL	B´ 50 µg/mL	C´ 25 µg/mL	D´ 10 µg/mL	E´ 5 µg/mL
VLDL						
nmol/mg protein	6,83 ±3,69	3,03 ±1,76	3,72 ± 2,0	3,76 ± 2,04	3,98 ± 2,22	4,22 ±2,34
% İnhibisyon		52,71 ±15,67	43,49 ±13,73	42,86 ±18,03	38,67 ±16,73	36,88 ±13,91
nmol/mg kolesterol	14,98 ± 7,95	6,64 ± 3,45	8,23 ± 4,20	8,49 ± 4,70	8,72 ± 4,25	9,24 ± 4,91
% İnhibisyon		52,71 ±15,67	43,49 ±13,73	42,86 ±18,03	38,67 ±16,73	36,88 ±13,91
LDL						
nmol/mg protein	21,33 ±8,39	4,68 ± 2,14	4,77 ± 1,75*	5,15 ± 1,76*	5,61 ± 1,79*	5,44 ± 2,46*
% İnhibisyon		76,20±10,16	73,91±13,65	72,44±12,49	69,17±14,95	71,16±13,37
nmol/mg kolesterol	14,16 ±5,31	3,19 ± 1,53	3,22 ± 1,10*	3,51 ± 1,16*	3,87 ± 1,35*	3,79 ± 1,94*
% İnhibisyon		76,20±10,16	73,91±13,65	72,44±12,49	69,17±14,95	71,16±13,37

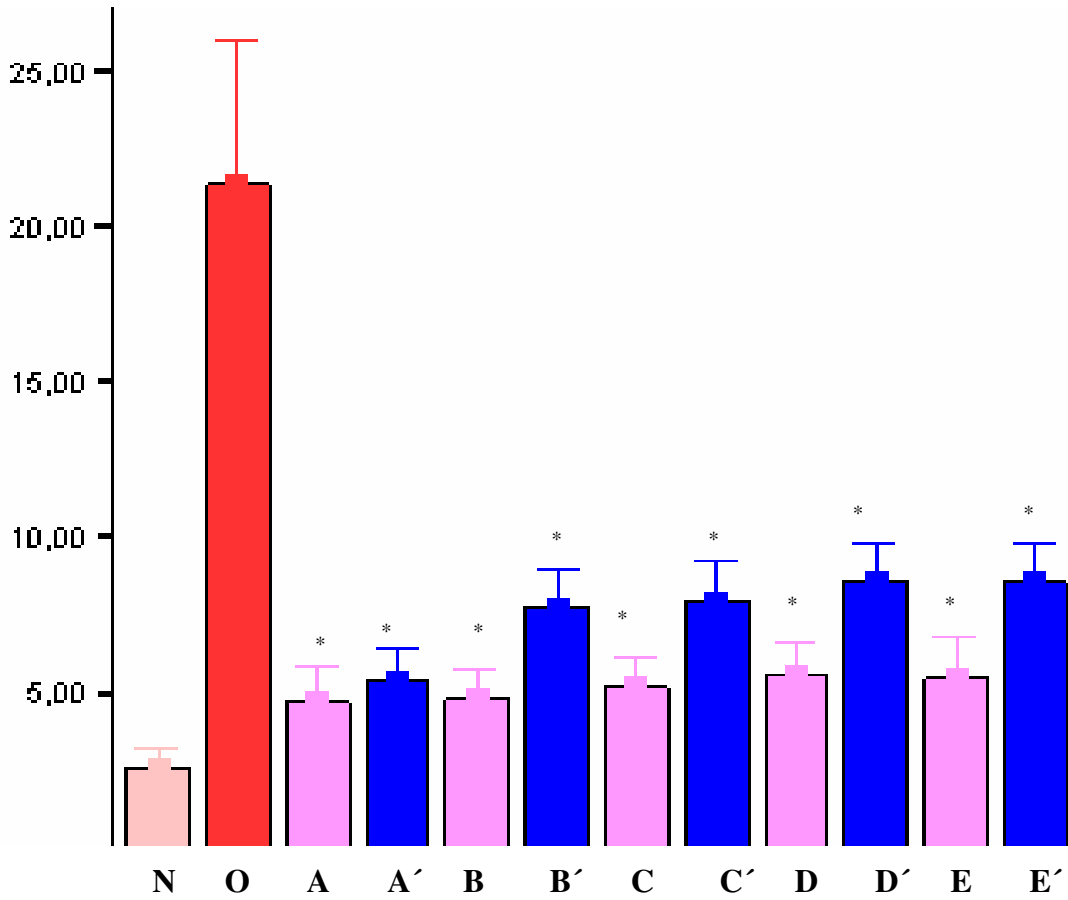
* ; A´ya göre istatistiksel olarak anlamlı farklı (p<0,01)..

Şekil 17’da normal VLDL’deki, bakırla okside VLDL’deki (50 µg/mL VLDL protein : 1,67 µM Cu²⁺) ve ekstraktlı okside VLDL’deki (50 µg/mL VLDL protein : farklı konsantrasyonlarda ekstrakt) TBARS seviyeleri gösterilmiştir. Buna göre sulu ve metanollü ekstraktların, okside VLDL TBARS seviyelerini azalttığı yani VLDL oksidasyonunu engelleyici yönde etki gösterdiği ve bu etkinin ise metanollü ekstraktlarda daha yüksek olduğu görüldü. Ancak sulu ekstraktların sadece 100 µg/mL’liğinin metanollü ekstraktların ise; 100, 50 ve 25 µg/mL’liğinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (p<0,01).



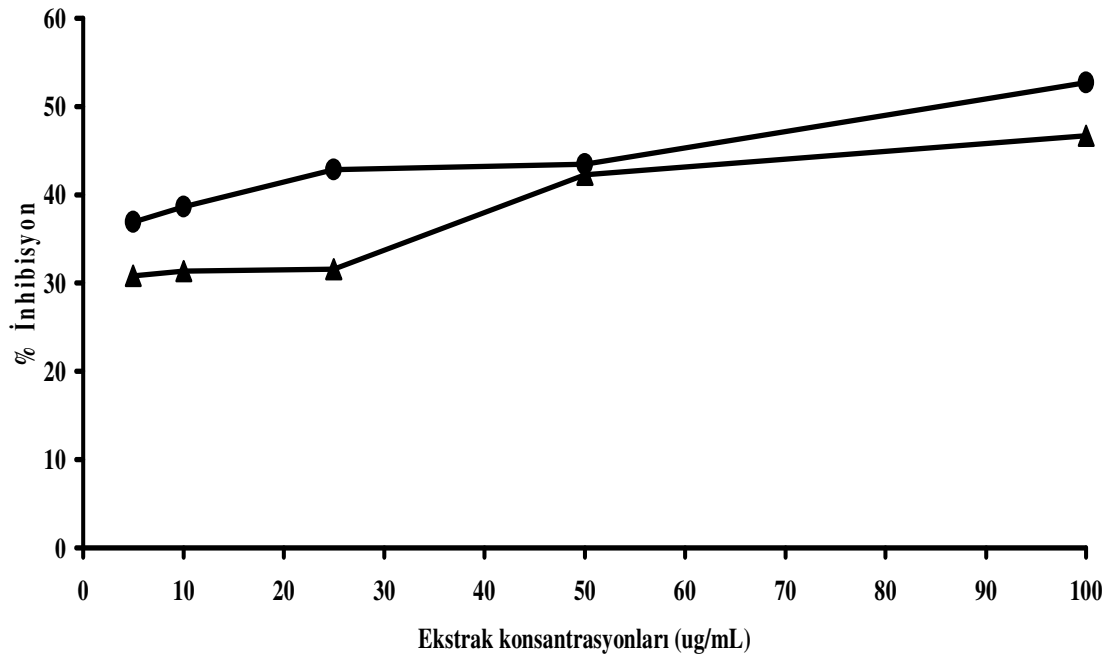
Şekil 17. İzole VLDL (N) , okside VLDL (O) ve farklı konsantrasyonlardaki ekstrakt ilavesi ile elde edilen TBARS seviyeleri. sulu ekstraktları ve metanollü ekstraktları ifade etmektedir. A, A': 100 µg/mL, B, B': 50 µg/mL, C, C': 25 µg/mL, D, D' : 10 µg/mL ve E, E': 5 µg/mL ekstraktlı ortamlarda okside edilen VLDL TBARS seviyeleridir. * Okside VLDL-TBARS seviyelerine göre istatistiksel olarak anlamlı.

Şekil 18’de normal LDL’deki, bakırla okside LDL’deki (50 µg/mL LDL protein : 1,67 µM Cu⁺²) ve ekstraklı okside LDL’deki (50 µg/mL LDL protein : farklı konsantrasyonlarda ekstrak) TBARS seviyeleri gösterilmektedir. Hem sulu ve hem de metanollü ekstraktların tüm konsantrasyonlarda, LDL oksidasyonunu istatistiksel olarak anlamlı seviyede engellediği görüldü. Ekstrak ilavesi ile okside LDL’de TBARS seviyeleri azaldı.



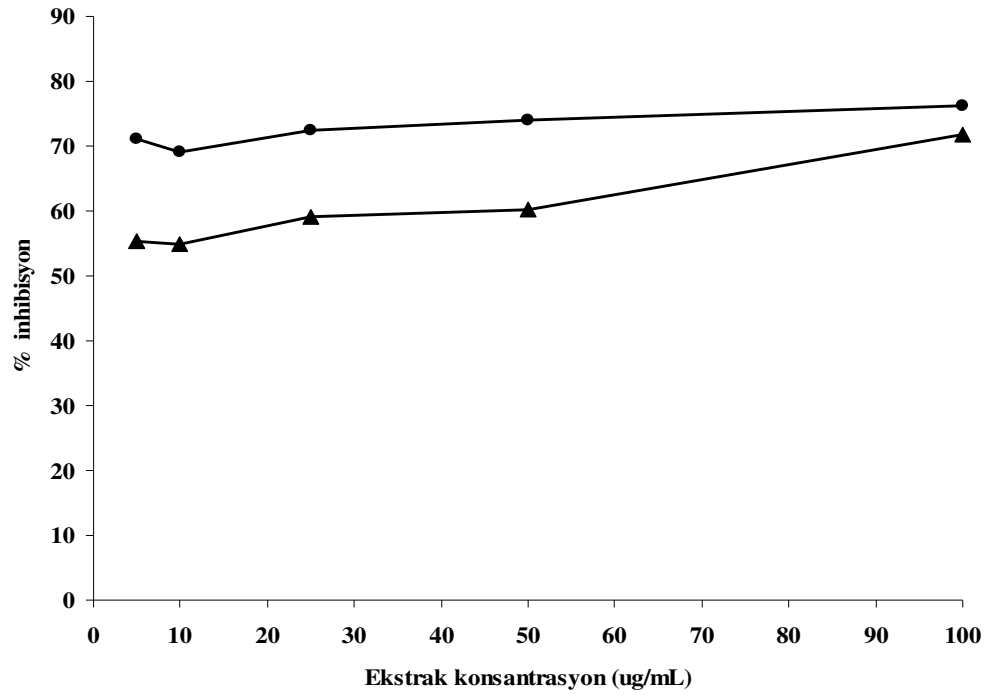
Şekil 18. İzole LDL (N) ■, okside VLDL (O) ■ ve farklı konsantrasyonlardaki ekstrak ilavesi ile elde edilen TBARS seviyeleri. ■ sulu ekstraktları ve ■ metanollü ekstraktları ifade etmektedir. A, A': 100 µg/mL, B, B': 50 µg/mL, C, C': 25 µg/mL, D, D': 10 µg/mL ve E, E': 5 µg/mL ekstraklı ortamlarda okside edilen VLDL TBARS seviyeleridir. * Okside VLDL-TBARS seviyelerine göre istatistiksel olarak anlamlı.

Şekil 19’de ekstrak konsantrasyonlarının VLDL oksidasyonunu inhibisyona etkisi gösterilmektedir. Sulu ve metanollü ekstrak miktarı arttıkça inhibisyon arttı. Bu inhibisyon etkisi metanollü ekstraktlarda sulu ekstraktlara göre anlamlı olmasa da daha fazla idi ($p>0,05$).



Şekil 19. Farklı Ekstrak Konsantrasyonlarının VLDL Oksidasyonunu İnhibisyonuna Etkisi. ●: metanollü ekstraklar, ▲ : sulu ekstraklar.

Şekil 20’de ekstrak konsantrasyonlarının LDL oksidasyonunu inhibisyona etkisi gösterilmektedir. Burada da VLDL oksidasyonu inhibisyonunda olduğu gibi sulu ve metanollü ekstrak miktarı attıkça inhibisyonun arttığı gözlemlendi. 100 µg/ml’lik ekstrak konsantrasyonu hariç diğer konsantrasyonlarda metanollü ekstraktların inhibisyon etkisi, sulu ekstraktlara göre daha yüksek bulundu ($p<0,01$).



Şekil 20. Farklı Ekstrak Konsantrasyonlarının LDL Oksidasyonunu İnhibisyonuna Etkisi. ●: metanollü ekstraklar, ▲ : sulu ekstraklar.

5. TARTIŞMA

Karalahana özellikle Doğu Karadeniz Bölgesi'nde yetiştirilen ve yemek olarak çokça tüketilen bir geniş yapaklı bir bitkidir. Ailesi olduğu Brassica türlerinin bileşimi, antioksidan tayinleri ve lipid peroksidasyonu üzerine etkileri incelenmiş olmasına rağmen karalahana hakkında literatür bir kaç çalışma ile sınırlıdır. Vitamin C ve fenolikler, suda çözünen antioksidanlar, vitamin E ve β -karoten ise yağda çözünen antioksidanlar olup, *Brassica* türlerinde toplam aktivitelerin % 20'sinden fazlasında yağda çözünen antioksidanlar sorumludur (16).

Bu çalışmada yöremiz için önemli olan karalahananın antioksidan düzeylerini belirleyerek lipoproteinlerin oksidasyona karşı koruyucu etkilerinin olup olmasının incelenmesi amaçlandı. Bu amaçla yöremizdeki çeşitli il ve ilçelerden (Trabzon Vakfikebir, Giresun-merkez, Rize-merkez ve Artvin-Hopa) karalahananın taze ve yeşil yaprakları toplanarak, serin ve karanlık ortamda kurutuldu. Farklı yerlerden toplanmanın amacı, toprak ve iklim özelliklerinden kaynaklanabilecek farklılıkları ortadan kaldırmaktır. Kurutulduktan sonra, tüm bölgeler için eşit ağırlıkta alınarak harman oluşturuldu ve öğütücüde küçük parçalara ayrıldı. Numuneler önce, karıştırıcı, manyetik çubuklu kaynama balonu ve geri soğutucudan oluşan soklet sisteminden geçirildi. Ardından, çözücü (su ve metanol) kısmı, çözücülerin buharlaştırılması ve yoğunlaştırılması esasına dayanan, döner vakumlu evaporatörle (rotar evaporatör) uçurularak uzaklaştırılarak sulu ve metanolik ekstraktlar elde edildi ve 0,2 μ M Whatman ile filtre edildi.

Sulu ve metanolik ekstraktlarda toplam fenolik madde miktarı, fenolik bileşiklerin folin reaktifi ile alkali ortamda renkli kompleks oluşturması esasına dayanılarak, kateşin ve gallik standartları kullanılarak belirlendi (102). Flavonoid içeriği, flavonoidlerin alimünyum ile yapmış oldukları komplekslerin ölçümü esasına dayanılarak kateşin standartları kullanılarak tayin edildi (105). Toplam antioksidan kapasite, Fe^{+2} -o-dianisidin çözeltisi ve H_2O_2 çözeltisi Fenton tipi reaksiyon vererek $OH^{\cdot}$ radikalini oluşturturması ve oluşan bu radikalın düşük pH' larda renksiz o-dianisidin moleküllerini, dianisidil

radikallerini oksitlemesi esasına dayananılarak troloks standartları kullanılarak yapıldı (106).

Sulu ekstraktlarda toplam fenolik madde miktarı $28,9 \pm 2,1$ mg kateşin/g ekstrak veya $34,3 \pm 1,6$ mg gallik asit/g ekstrak, flavonoid miktarı $6,64 \pm 0,6$ mg/mg ekstrak; ve toplam antioksidan kapasite $0,24 \pm 0,02$ mmol/g ekstrak olarak, metanollü ekstraktlarda ise $53,5 \pm 4,1$ mg kateşin/g ekstrak veya $55,2 \pm 4,7$ mg gallik asit/mg ekstrak, flavonoid miktarı $12,9 \pm 0,9$ mg/g ekstrak; ve toplam antioksidan kapasite $0,15 \pm 0,02$ mmol/g ekstrak olarak bulundu (Tablo 11). Yani, toplam fenolik madde ve flavonoid içeriğinin metanolik ekstraktlarda, toplam antioksidan kapasitenin ise sulu ekstraktlarda yüksek olduğu görüldü. Bu çalışmada flavonoid miktarı toplam fenolik madde miktarının yaklaşık 1/4'ü kadarına karşılık geldiği tespit edildi. İsmail ve ark. (114) etanolik karalahana ekstraktlarında toplam fenolik miktarı 3689 ± 66 mg ferulik asit /100 g bulmuşlardır. Bu değer $36,89$ mg/g'a karşılık gelmektedir ki bu değer bizim toplam fenolik madde değerlerimize yakındır. Ayrıca araştırmacılar, karalahananın toplam fenolik miktarının beyaz lahanadan daha yüksek olduğunu ancak antioksidan aktivitenin daha düşük olduğunu tespit etmişlerdir. Chu ve ark. (115), brokolide toplam fenolik madde miktarını $80,76 \pm 1,17$ mg/100 g olarak tespit etmişlerdir. Singh ve ark.(116) beyaz lahana üzerinde çalışmışlar ve etanolik ekstraktlarda toplam fenolik madde miktarını $18,74$ mg/100g, β -karoten miktarını $0,05$ mg/100 g, α -tokoferol miktarını $0,107$ mg/100 g ve lutein miktarını $0,137$ mg/100 g olarak, fosforik asitli ekstraktlarda ise vitamin C miktarını $9,65$ mg/100 g olarak belirlemişlerdir. Podsdek ve ark.(2006) beyaz lahana, kırmızı lahana, kıvırcık lahana ve brüksel lahanasında metanolik ekstraktlarda toplam fenolik miktarının $21-171$ mg/100 g , vitamin C miktarının $18-129$ mg/100 g olduğunu rapor etmişlerdir (117). Podsdek ve ark. (2007) yaptıkları derlemede literatür bilgilerini göz önüne alarak antioksidan kapasite miktar sıralamasını karalahana > brüksel lahanası > brokoli > karnabahar > beyaz lahana şeklinde olduğunu rapor etmişlerdir (16). Chun ve ark.(118) flavonoid miktarlarını beyaz lahanada $1,20 \pm 0,18$ mg/100 g, brokolide $2,35 \pm 0,08$ mg/100 g, karnabaharda ise $1,54 \pm 0,05$ mg kateşin/100g olarak belirlemişlerdir. Holversen (3), karalahananın toplam antioksidan değerinin $2,3$ mmol/100 g olduğunu rapor etmiştir.

Antioksidan miktarları, deneysel şartların yanında coğrafik, iklim ve toprak özellikleri, yetiştirme şartları ve besinlerdeki renk koyulaştıkça antioksidanların arttığı fikri

göz önüne alınırsa, literatürlerde ve bu çalışmada antioksidan değerleri arasında farklılık olması normaldir denilebilir.

Antioksidan özelliği tespit edilen karalahananın lipoproteinlerin oksidasyona etkisini incelemek maksadıyla sağlıklı 15 gönüllüden EDTA'lı kan alınarak lipoproteinler (VLDL, LDL ve HDL) dansite kesikli dansite gradient ultra santrifügasyonu ile ayrıldı. EDTA'yı uzaklaştırmak için yapılan diyaliz işleminden sonra lipoproteinlerde protein tayini yapıldı, toplam kolesterol ve trigliserid miktarı tayin edildi. Kolesterol ve trigliserid miktarları protein başına ifade edildi. Buna göre VLDL'de trigliserid, LDL'de ise toplam kolesterol literatür bilgileri ile uyumlu olarak yüksek bulundu (Tablo 12) Bu lipoproteinlerde ve 24 saat 37°C'da Cu^{+2} ile muamele edilmiş lipoproteinlerde (50 µg/ml lipoprotein: 1,67 µM Cu^{+2}) lipid peroksidasyonun son ürünlerinden biri olan malondialdehit göstergesi olarak TBARS ölçüldü. Sonuçlar hem lipoproteinlerin protein ve hem de kolesterol miktarı başına ifade edildi.

Oksidasyon öncesinde LDL ve VLDL-TBARS seviyeleri, hem protein ve hem de kolesterol başına ifade edildiğinde anlamlı bir farklılık göstermedi (Tablo 13). Ancak Rayssiguiner ve ark. ratlarla yaptığı çalışmada en yüksek protein başına en yüksek TBARS seviyesini VLDL'de daha sonra LDL'de ve en az olarak da HDL'de bulmuşlardır (119).

Oksidasyon sonrasında, protein başına ifade edildiğinde okside LDL'de TBARS seviyelerinin daha yüksek oksidasyon gözlenirken ($p < 0,05$), kolesterol başına ifade edildiğinde okside LDL ve okside VLDL- TBARS seviyeleri arasında anlamlı bir farklılık görülmedi. Protein başına ifade edildiğinde en fazla oksitlenebilirliğin LDL'de (8,2 kat), daha sonra VLDL'de (2,33 kat), kolesterol başına ifade edildiğinde en yüksek VLDL'de (11,79 kat), daha sonra LDL'de (8,23 kat) olduğu görüldü (Tablo 13).

LDL'nin oksidasyon mekanizması; antioksidanların kaybolmasıyla başlar. Daha sonra LDL lipidlerindeki PUFA 'ların peroksidasyonu sonucu dien konjugatlar, ardında da lipid peroksitlerin parçalanması sonucu aldehitler, alkenler ve hidroperoksitler meydana gelir. LDL yapısında bulunan apoB₁₀₀ ya direk oksidasyona ya da aldehitlerin bir bölümünün serbest ε-amino lizin grubu ile daha çok kovalent bağlarla etkileşmesi sonucu daha küçük peptidlere parçalanırlar ve agrege olurlar. Lipoproteinlerin oksidasyona yatkınlığına lipid muhtevası ve antioksidan kapasitesi önemli bir faktördür. Poliansatüre yağ asitlerinin monoansatüre yağ asitlerine oranı oksitlenebilirlikte etkili bir faktördür. Poliansatüre yağ asitleri oksidasyona karşı çok duyarlıdır. Lipoproteinlerin antioksidan miktarının yüksek olması oksidasyona direnci artırır. Mohr ve Stoker (120) LDL ve

VLDL'i peroksidasyon için uyardıklarında ikisinin benzer bir mekanizmayla okside olduğunu belirtmişlerdir. LDL ile karşılaştırıldığında VLDL'nin oksidasyona daha fazla dirençli, HDL'nin ise daha az dirençli olduğu rapor edilmiştir. Zeman ve ark. (121) oksidasyona direnci gösteren t_{lag} (gecikme süresi)'in, VLDL'de LDL'e göre iki kat daha uzun olduğunu gözlemlemişlerdir. Myara ve ark. (122) ise yaklaşık 3 kat daha uzun olduğunu gözlemlemişlerdir.

Farklı konsantrasyonlarda (son konsantrasyonları 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 10 µg/mL ve 5 µg/mL) karalahana ekstraktlarının lipoproteinlerin oksidasyonuna etkisini incelemek maksadıyla oksidasyon işlemi sulu ve metanol ekstraktlı ortamlarda yapıldı. Ekstrak ilave edildiğinde elde edilen oksidasyon sonuçları nmol TBARS şeklinde protein ve kolesterol başına ifade edildi (Tablo14 ve 15). Sulu ekstraktlarda, ekstrak konsantrasyonunun artışı ile tüm lipoproteinlerde TBARS seviyeleri azaldı. Ancak VLDL'de konsantrasyon farklılığının istatistiksel olarak anlamlı bir TBARS seviyesi farklılığına neden olmadığı görüldü. Sulu ekstraktlarda 100 µg/mL'lik ekstrak konsantrasyonu, diğer konsantrasyonlara göre daha düşük LDL-TBARS sonucuna neden oldu ($p<0,01$). Metanollü ekstraktlarda ekstrak konsantrasyonları ile TBARS seviyeleri arasında anlamlı bir farklılık bulunamadı ($p>0,01$). Ekstraktlı okside lipoproteinler ile ekstraksız okside lipoproteinler karşılaştırıldığında, sulu ve metanollü ekstraktların okside VLDL TBARS seviyelerini azalttığı yani VLDL oksidasyonunu engelleyici yönde etki gösterdiği ve bu etkinin ise metanollü ekstraktlarda daha yüksek olduğu görüldü. Ancak sulu ekstraktların sadece 100 µg/mL'liğinin metanollü ekstraktların ise 100, 50 ve 25 µg/mL'liğinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0,01$) (Şekil 19). Ayrıca hem sulu ve hem de metanollü ekstraktların tüm konsantrasyonlarda, LDL oksidasyonunu istatistiksel olarak anlamlı seviyede azalttığı tespit edildi (Şekil 20). Sulu ve metanollü ekstraktları lipoproteinlerin oksidasyonunu hangi oranda azalttığı % inhibisyon şeklinde belirtildi (Şekil 19 ve 20). Ekstrak konsantrasyonları atıkça inhibisyonun arttığı gözlemlendi. VLDL oksidasyonu üzerine, bu inhibisyon etkisi metanollü ekstraktlarda sulu ekstraktlara göre anlamlı olmasa da daha fazla idi ($p>0,05$). LDL oksidasyonunda ise, 100 µg/mL'lik ekstrak konsantrasyonu hariç diğer konsantrasyonlarda metanollü ekstraktların inhibisyon etkisi, sulu ekstraktlara göre daha yüksek bulundu ($p<0,05$). Ekstraktların, LDL oksidasyonunu, VLDL oksidasyonundan daha yüksek oranda inhibe ettiği görüldü.

Literatürlerde karalahananın lipoproteinlerin oksidasyonuna etkisine dair herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. *Brassica* ailesi bitkileri; antioksidan özellikte olan vitamin

C, vitamin E ve bitki fitokimyasalları (polifenoller; flavonoidler, karotenler, glikosinolatlar, lutein, zeaksantin) içeriği açısından oldukça zengindir. Bu antioksidanları ihtive eden bazı besinlerin LDL'nin oksidasyonunu inhibe ettiğine dair çalışmalar mevcuttur (63,123). Flavonoidler, hidroksil ve süperoksit gibi radikalleri toplayarak, metal iyonlarına bağlanarak, lipid peroksil radikallerini toplayarak ve serbest radikallerden dolayı oluşmuş enzimatik reaksiyonları engelleyerek lipid peroksidasyonunu inhibe ederler. Vitamin E'nin radikal halinin radikal olmayan haline dönüşümünü sağlarlar. Vitamin E, lipid peroksidasyon zincirini kırıcı etkisi ile LDL'yi oksidasyona kaşı korur. Vitamin C, süperoksit ve hidroksil radikalleri ile reaksiyona girerek onları temizleyen güçlü indirgeyici aktiviteye sahip suda çözünen güçlü bir antioksidandır.

Bu çalışmada, sulu ve metanollü karalahana ekstraktlarının antioksidan kapasiteye sahip olduğu ve bu antioksidan özelliği ile lipoproteinleri oksidasyona karşı koruyabildiği görüldü. Oksidan-antioksidan dengenin oksidanlar lehine kaydığı durumlarda tetiklenen birçok hastalığa karşı korunmada, karalahananın bu antioksidan ve lipid peroksidasyonunu engelleyici özelliği ile katkıda bulunabileceği kanaatına varıldı.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

6.1. Sonuçlar

1. Sulu ekstraktlarda toplam antioksidan aktivite yüksek bulunmasına rağmen toplam fenolik madde ve flavonoid miktarı metanolik ekstraktlarda yüksek idi.
2. Ekstrak konsantrasyonlarının artışı ile VLDL ve LDL'de lipid peroksidasyonun azaldığı belirlendi.
3. Ekstraktların lipoproteinlerde lipid peroksidasyonu inhibe etmede, LDL üzerinde daha etkili olduğu görüldü.
4. Lipid peroksidasyonun inhibisyonunda metanolik ekstraktların daha etkili olduğu tespit edildi.
5. Karalahananın lipoproteinlerin oksidasyonunu engellediği sonucuna varıldı.

6.2. Öneriler

1. Karalahananın lipoprotein oksidasyonuna etkisini; hayvan çalışması veya insan çalışmaları ile in vitro etkilerin gözlenmesi ve karşılaştırılması yapılabilir.
2. Karalahana ekstraktlarının oksidan antioksidan sistemde yer alan bileşenleri ; (vitaminleri, elementleri, yağ asitleri) ölçülerek bu bileşenlerle lipoprotein oksidasyonu arasında ilişki değerlendirilebilir.
3. Karalahananın HDL oksidasyonu üzerine etkisi de incelenebilir.
4. Karalahananın lipoproteinlerin alt gruplarının oksidasyonuna etkileri incelenebilir.
5. Karalahananın lipoproteinlerin apoprotein oksidasyonuna etkisi de incelenebilir.

7. ÖZET

KARALAHANANIN LİPOPROTEİNLERİN OKSİDASYONUNA ETKİSİ

Karalahana (*Brassica oleraceae* L. var. *acephala* DC), genellikle Karadeniz bölgesinde tüm sezon yetiştirilebilen ve yiyecek olarak kullanılabilen Brassica ailesinden bir bitkidir. Brassica bitkileri, polifenoller, flavonoidler, izoflavonlar ve glikosinolatları ihtiva ederler ve bu bileşenleri ile antioksidan ve antikarsinogenik özellikler taşırlar. Antioksidanlar serbest radikal reaksiyonlarını önlerler ve böylelikle hücreleri oksidatif hasara karşı korurlar. Lipoproteinlerin oksidasyonu, ateroskleroz gelişiminde anahtar basamaktır.

Bu çalışmada, karalahananın metanolik ve sulu ekstraktlarının; toplam fenolik madde, flavonoid ve toplam antioksidan kapasite seviyeleri belirlendi. Ayrıca farklı konsantrasyonlardaki metanolik ve sulu ekstraktların, 15 sağlıklı gönüllü kanından elde edilen izole lipoproteinlerin (VLDL ve LDL) bakırla tetiklenmiş oksidasyonuna karşı inhibisyon etkileri değerlendirildi. Lipid peroksidasyonunu göstergesi olan malondialdehid seviyeleri, ekstraktlı ve ekstraksız ortamda TBARS olarak tayin edildi.

Sulu ekstraktlarda toplam antioksidan aktivite yüksek bulunmasına rağmen toplam fenolik madde ve flavonoid miktarı metanolik ekstraktlarda yüksek idi. Hem metanolik ve hem de sulu ekstraktlar lipid peroksidasyonunu engelledi ancak bu etki LDL’de daha anlamlı idi. Metanolik ekstraktlar, daha yüksek lipoprotein inhibisyonu sergiledi. Ayrıca inhibisyonlar, ekstrakt konsantrasyonlarının artışı ile artmakta idi.

Yüksek antioksidan kapasite ve fenolik içeriğinden dolayı karalahananın lipoproteinlerin oksidasyona karşı koruyucu etki sahip olduğu kanaatine varıldı. Karalahananın, kardiyovasküler hastalıklara ve diğer antioksidan dengenin bozulduğu durumlarda oluşan birçok hastalığa karşı korunmada önemli role sahip olabileceğini gösteren ilave çalışmalar gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler : Karalahana, antioksidanlar, lipid peroksidasyonu, lipoprotein oksidasyonu

8. SUMMARY

THE EFFECTS OF KALE ON OXIDATION OF LIPOPROTEINS

Kale (*Brassica oleraceae* L. var. *acephala* DC) is a eatable Brassica vegetables growing usually in Karadeniz Region in Turkey. Brassicaceous plants contain polyphenols, flavonoids, isoflavones and glucosinolates, and so have antioxidant and anticarcinogenic properties. Antioxidants inhibit free radical reactions, and may therefore protect cells against oxidative damage. Oxidation of lipoproteins is a key early stage in the development of atherosclerosis.

In the current study, the levels of total phenolic content, flavonoid and total antioxidant capacity of metanolic and aqueous extracts of kale were determined. In addition, various concentrations of metanolic and aqueous extracts were evaluated for their inhibition effects against copper induced oxidation of isolated lipoproteins (VLDL and LDL) obtained from 15 healthy volunteers. The levels of malondialdehyde (MDA) as a marker of lipid peroxidation were determined as TBARS, with and without extracts.

Although aqueous extract has higher total antioxidant capacity, total phenolic content and flavonoid levels were higher in metanolic extract. It was observed that metanolic extracts had a higher antioxidant content than aqueous extract. Both metanolic and aqueous extracts inhibit lipid peroxidation but more significantly in LDL. Metanolic extract shows higher inhibition of lipid peroxidations of lipoproteins. Moreover, inhibitions increased with increasing concentrations of extracts.

It was concluded because of high antioxidant capacity and phenolic content of kale, it has a protective effect on the oxidation of lipoproteins. Further studies need to show kale may play an important role of cardiovascular diseases and other diseases resulting from imbalance of oxidant and antioxidant status.

Key Words : Kale, antioxidants, lipid peroxidation, lipoprotein oxidation

9. KAYNAKLAR

1. Ayaz FA, Glew RH, Millson M, Huang HS, Chuang L T, Sanz C, H-Ayaz S; Nutrient Contents of Kale (*Brassica oleraceae* L. var. *acephala* DC.); *Food Chem.*; 2006; 96:572–579.
2. Kurilich AC, Jeffery EH, Juvik JA, Wallig MA, Klein BP; Antioxidant Capacity Of Different Broccoli (*Brassica oleracea*) Genotypes Using The Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Assay; *J Agric Food Chem.*; 2002; 50:5053-5057.
3. Halvorsen BL, Holte K, Myhrstad MCW, Barikmo I, Hvattum E, Remberg ESF, Anne-Brit W, Haffner K, Baugerød H, Andersen LF, Moskaug Ø, Jacobs DR, Blomhoff JR – R; A Systematic Screening Of Total Antioxidants In Dietary Plants; *J. Nutr.*; 2002; 132:461-471.
4. Lorach R; Espin JC; Tomas-Barbera FA; Ferreres F; Valorization Of Cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) By-Products As A Source Of Antioxidant Phenolics; *J. Agric. Food Chem*; 2003; 51:2181-2187.
5. Ankara Eczacı Odası; Klinikte Kullanılan Laboratuvar Teknikleri; 2005; 12:20-21.
6. Bub A, Watzl B, Abrahamse L, Delincée H, Adam S, Wever J, Müller H, Rechkemmer G; Moderate Intervention With Carotenoid-Rich Vegetable Products Reduces Lipid Peroxidation In Men; *J. Nutr.* 2000; 130:2200-2206
7. Cruz S; Asian Greens Offer Tasty, Easy-To-Grow Source Of Nutrition; Center For Agroecology & Sustainable Food Systems University Of California;1998.
8. Wennberg M, Ekvall J, Olsson K, Nyman M; Changes In Carbohydrate And Glucosinolate Composition In White Cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) During Blanching And Treatment With Acetic Acid; *Food Chem.*; 2006; 95:226-236.
9. Heim KE, Tagliaferro AR; Bobilya, DJ; Flavonoid Antioxidant: Chemistry, Metabolism and Structure- Activity Relationships; *J. Nutr. Biochem.*; 2002; 13:572-584.
10. Misiewicz I, Skupińska K, Kowalska E, Lubiński J, Guttman-Kasprzycka T; Sulforaphane-Mediated Induction Of A Phase 2 Detoxifying Enzyme NAD(P)H: Quinone Reductase And Apoptosis In Human Lymphoblastoid Cells; *Acta Biochim Pol*; 2004; 51: 711–721.

11. Shapiro TA, Fahey JW, Wade KL, Stephenson KK, Talalay P; Chemoprotective Glucosinolates And Isothiocyanates Of Broccoli Sprouts: Metabolism And Excretion In Humans; *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*; 2001; 10:501–508.
12. Brown JL, Parker RDL, Volansky RDM; *Cruciferous Vegetables*; The Pennsylvania State University; 1995.
13. Brandi G, Schiavano G F, Zaffaroni N, De Marco C, Paiardini M, Cervasi B, Magnani M; Mechanisms Of Action And Antiproliferative Properties Of *Brassica oleracea juice* In Human Breast Cancer Cell; *J. Nutr.*; 2006; 135:1503–1509.
14. Andersen CR; Kale: Gardening Series; University Of Arkansas, United States Department Of Agriculture And County Governments Cooperating ;2005.
15. Hua Ke SZ; *Brassicaceae (Cruciferae)*; Flora Of China; 2001; 8:1–193.
16. Podsdek A; Natural Antioxidants And Antioxidant Capacity Of Brassica Vegetables; *LWT*; 2007; 40:1-11.
17. Thomson GR; Hiperlipidemi el kitabı (Çev. Enis Tamuğur) Uycan Yay. A.Ş., 1989, s:23-41.
18. Peprotec; Focus article: Lipoproteins and Apoproteins; 2005.
19. Mahley RW; Aterogenezin Hücresel Ve Moleküler Biyolojisi, Kolesterol taşınması Ve Lipoprotein Metabolizması; O Gökdemir, K. E. Raloğlu (Editörler). Amerikan Hastanesi Lipid Kliniği; İstanbul; 1995; s;146-150.
20. Stein EA, Myers IG; Lipids, Lipoproteins And Apolipoproteins; In Burtis CA, Ashwood ER (Eds), Tietz Textbook Of Clinical Chemistry, WB. Suounders Company Philedelphia; 1994; pp:1002-1093.
21. Esterbauer H, Puhl H, Dieber-Rotheneder M, Waeg G, Rabl H; Effect Of Antioxidants On Oxidative Modification Of LDL; *Ann Med*;1991; 23:573-581.
22. Yoshikava M, Sakuma N, Hibino T, Sato T, Fujinami T; HDL₃ Exerts More Powerful Antioxidative Protective Effects Against Copper-Catalyzed LDL Oxidation Than HDL₂; *Clin Chem* ;1997; 30:221-225.
23. Çimşit G, Örem A, Değer O, Alpay K, Kıran E, Örem C; The Variation Of Serum Lipoprotein (a) Level With Disease Activity In Psoriasis; *Br J Dermatol*; 1998; 138:917-919.
24. Lipoproteins; Wikipedia, The Free Enclclopedia: Text Of The GNU Free Documention; 2006.
25. YALÇIN A, ÇETİN M; Plazma Lipoproteinleri Ve Klinik Önemi; *J. Fac.Vet. Med*; 2001; 20:123-129.

26. Mahley WR, Weisgraber KH, Farese RV: Williams; Textbook Of Endocrinology, Lipid Metabolizması Bozuklukları, Bölüm 23 Çeviri: Teikkurt C, Dokuzuncu Baskı, W.B. Saunders, Philadelphia, 1998.
27. Champe PC, Harvey RA: Biyokimya, Çeviri: Tokullugil A, Dirican M, Ulukaya E; İkinci Baskı; Nobel Tıp Kitabevi; İstanbul; 1994; pp:213-222.
28. Zubay, G: Biochemistry, Third Edition, Wm C Brown Publishers, Oxford, Melbourne, 1993, Pp:641-651.
29. Laker, Mf: Clinical Chemistry For Medical Students, Çeviri: Ulukaya E, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul; 1997; Pp:23-43.
30. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L; Freeman Wit, Co: Newyork: Biochemistry, 5 th. Ed.; 2002.
31. Dean L; McEntyre JR, Bethesda MD; The Genetic Landscape Of Diabetes; National Library Of Medicine (US), 2004.
32. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM: Principles Of Biochemistry, Second Edition, Worth Publishers, New York; 1993; 674-678.
33. Chambe PC, Harvey RA, Ferrier DRF; Lipincott's Illustrated Reviews: Biochemistry; Lipincott Williams &Wilkins; Baltimore MD; 2005.
34. Norata GD, Pirillo A, Catapano AL; Modified HDL: Biological And Phyopathological; *Nutrient, Metabolism & Cardiovascular Dieases (NMCD)*; 2006; 16:371-386.
35. Tvrzická E, Vecka M, Stanková B, Žák A; Analysis Of Fatty Acids In Plasma Lipoproteins By Gas Chromatography–Flame Ionization Detection Quantitative Aspects; *Analytica Chimica Acta*; 2002; 465:337–350.
36. Eduardo N, Zubay MVA, Geoffrey L; *Biochemistry*, 4th ed., Brown Wm C: Dubuque KIA; Lipid And Fatty Acid Composition Of Canine Lipoproteins, Comperative Biochemistry And Physiology; 2001; 128; pp:179-729.
37. Onat T, Emek K, Sözmén EY.; İnsan Biyokimyası;2002; Palme Yayıncılık; s:331.
38. Cord Mc JM; Human Disease, Free Radicals And The Oxidant/Antioxidant Balance; *Clin. Biochem.*; 1993; 26:351-357.
39. Gate L, Paul J, Nguye BG, Tew KD, Tagiero H; Oxidative Stres Induced In Pathologies: The Role Of Antioxidants; *Biomed & Pharmacother*; 1999; 53:169-80.
40. Kohen R; Skin Antioxidants: Their Role In Aging And In Oxidative Stres-New Approaches For Their Evaluation; *Biomed & Pharmacother*; 2002; 53:181-92.

41. Sinatra ST, De Marco J; Free Radicals, Oxidative Stres, Oxidized Low Density Lipoprotein (LDL) And The Heart: Antioxidant And Other Stragies To Limit Cardiovascular Damage; 1995; 59: 579-587.
42. Halliwell B, Gutteridge JMC; The Importance Of Free Radicals And Catalytic Metal Ions In Human Diseases; *Molec. Aspects Med.*; 1985; 8: 89-93.
43. Knight JA; Free Radicals, Antioxidants Aging And Disease. AACC Pres, Washington DC; 1999; pp:1-61.
44. Akkuş İ; Serbest Radikaller Ve Fizyolojik Etkileri; Mimoza Yayınları, Konya; 1995; s:1-128.
45. Farber JL, Kyle ME, Coleman JB; Biology Of Diease. Mechanism Of Cell Injury By Activated Oxygen Species; *Lab. Invest.*; 1990; 62:670-679.
46. Knight JA; Free Radicals, Antioxidants And The Immune System; *Ann. Clin. Lab. Sci.*; 2000; 30:145-158.
47. Gaetani FG, Galiano S, L Canepa, Ferraris MA, Kirkman NH; Catalase And Glutathione Peroxidase Are Equally Active In Detoxification Of Hydrogen Peroxide In Human Erythrocytes; *Blood*; 1985; 73:334-339.
48. Bensath A, Rusznyak S, Szent-Györgi A, Vitamin, *PnNature*; 1937; 139:326-327.
49. Antioxidants; Wikipedia, The Free Enclclopedia: Text Of The GNU Free Documentation; 2006.
50. Iwalewa EO, Adewunmi CO, Omisore NOA, Adebajji OA, Azike CK, Adigun AO, Adesina OA, Olowoyo OG; Pro- And Antioxidant Effects And Cytoprotective Potentials Of Nine Edible Vegetables In Southwest Nigeria; *J Med Food*; 2005; 8:539–544.
51. Rong Tsao; Disease Fighting Phytochemical Antioxidants; Agrofood Industry Hi-Tech 2006; 17:4.
52. Phytochemicals; How Stuffworks. Inc:2006.
53. Davidson MW, Florida State University; The phytochemical Collection; 2000.
54. Dicko MH, Gruppen H, Traoré AS, Voragen AGJ, Willem J, Berkel HV; Phenolic Compounds And Related Enzymes As Determinants Of Sorghum For Food Use; *Biotechnology and Molecular Biology*:Review; 2006; 1:1-38.
55. Wolgast J, Anklam E, Polyphenols In Theobroma Cacao; Change In Composition During The Manufacture Of Chocolate and Methodology For Identification And Quantification, *Food Res. Int.*; 2000; 33:423-347.

56. Bülgener ŞK; Fındık (*Coryllus avellana* L.) Ve Kestane (*Castanea sativa* Mill.) Yaprak ve Sürgünlerinde Fenolik Madde İçeriklerinin Mevsimsel Değişimleri; *Tr. J. Of Agriculture and Forestry*; 1999; 5:1215-1221.
57. Clure JWM; Physiology And Functions Of Flavonoids: The Flavonoids; *Academic Press*, Newyork; 1975.
58. Sakihama Y, Cohen MF, Grace SC, Yamasaki H; Plant Phenolic Antioxidant And Prooxidant Activities: Phenolics-Induced Oxidative Damage Mediated By Metals In Plants; *Toxicology*; 2002; 177:67-80.
59. Hosseinian F; Doctoral Thesis, Antioxidant Properties Of Flaxseed Lignans Using *In Vitro* Model Systems; College Of Pharmacy And Nutrition Of The University Of Saskatchewan Saskatoon, Saskatchewan Canada; 2006.
60. Blessington T; Master Thesis; The Effects Of Cooking, Storage, And Ionizing Irradiation On Carotenoids, Antioxidant Activity, And Phenolics In Potato (*Solanum Tuberosum* L.); Texas A&M University; 2005.
61. Bravo L; Polyphenol Chemistry, Dietary Sources, Metabolism And Nutritional Significance; *Nutr. Rev.*, 1998; 56:317-333.
62. Oteiza PI, Etlerman G, Verstraeten SV, Keen CL, Frage CG; Flavonoid Membrane Interactions: A Protective Role Of Flavonoids At The Membrane Surface; *Clinical Developmental Immunology*; 2005; 12:19-25.
63. Aviram M, Fuhrman B; Wine Flavonoids Protect Against LDL oxidation And Atherosclerosis; *Ann. N. Y. Acad. Sci.*; 2002; 957:146-161.
64. Best B; Mechanism of Aging: Lipid Peroxidation Forming MDA.
65. Sevanian AWG, Puhl H; Lipid Peroxidation In Membrane And Low Density Lipoproteins: Similarities And Differences; *Free Rad. Biol Med.*; 2000; 29:306-311.
66. Estabauer H, Puhl WGH; Lipid Peroxidation And Its Role In Atherosclerosis. *Br Med Bul*; 1993; 49,:566-576.
67. Aviram, M; Malondialdehyde Affects The Physico-Chemical And Biological Characteristics Of Oxidized Low Density Lipoprotein; *Atherosclerosis*; 1990; 34:141-143.
68. Hoff HF, O'Neil J; Structural And Functional Changes In LDL After Modification With Both 4-Hydroxynonenal And Malondialdehyde; *J Lipid Res*; 1993; 34:1209-1217.
69. Thomas SR, Neuzil J, Stocker R; Cosupplementation With Coenzyme Q Prevents The Prooxidant Effect Of α -Tocopherol And Increases The Resistance Of LDL To Transition Metal-Dependent Oxidation Initiation; *Arterioscler. Tromb. Vasc. Biol.*; 1996; 16:687-696.

70. Leray C, Andriamampandry MD, Freund M, Gachet C, Cazenave JP: Simultaneous Determination Of Homologues Of Vitamin E And Coenzyme Q And Products Of α -Tocopherol Oxidation; *J. Lipids Res.*; 1998; 39:2099-2105.
71. Yanarojana S, Chantharaksri U; Kinetic Modeling Of Lipoprotein Peroxidation Initiated By Copper And Azo Compounds; *ScienceAsia*; 2005;31:369-381.
72. Lynch S, M, Frei B; Reduction Of Copper, But Not iron By Human Low Density Lipoprotein (LDL). Implications For Metal ion Dependent Oxidative Modification Of LDL; *J. Biol. Chem.*; 1995; 270:5158-5163.
73. Jialal I, Devaraj S; Low-Density Lipoprotein Oxidation, Antioxidants And Atherosclerosis; A Clinical Biochemistry Perspective; *Clin. Chem.*; 1996; 42:498-506.
74. Witztum JL, Steinberg D; Role Of Oxidized Low Density Lipoprotein In Atherogenesis; *J. Clin. Invest.*; 1991; 88:1785-1792.
75. Sevanian A, Ursini F; Lipid Peroxidation In Membrane And Low Density Lipoproteins: Similarities And Differences; *Free Rad. Biol. Med.*; 2000; 29:306-311.
76. Esterbauer HWG, Puhl H; Lipid Peroxidation And Its Role In Atherosclerosis; *Br. Med. Bul.*; 1993; 49:566-576.
77. Jessup W, Kritharides L; Metabolism Of Oxidized LDL By Macrophages; *Curr. Opin. Lipidol.*; 2000; 11:473-481.
78. Myers CL; Master Thesis; Detection Of Oxidation In Human Serum Lipoproteins; Texas A&M University; 2004
79. Esterbauer H, Jürgens G, Quehenberger O, Koller E; Antioxidant Of Human Low Density Lipoprotein; Loss Of Polyunsaturated Fatty Acids And Vitamin E And Generation Of Aldehydes; *J. Lipid Res.*; 1987; 28:495-509.
80. Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jürgens G; The Role Of Lipid Peroxidation And Antioxidants In Oxidative Modification Of LDL; *Free Rad. Biol. Med.*; 1992; 13:341-390.
81. Harduin P, Tailleux A, Lestavel S, Clavey V, Fruchart JC, Frievet C; Immunological And Functional Properties Of In Vitro Oxidized Low Density Lipoprotein; *J. Lipid Res.*; 1995; 36:919-930.
82. Simons LA, Konigsmark MV, Balasubramaniam S; What Does Vitamin E Is Required To Reduce Susceptibility Of LDL To Oxidation; *Aust. NZ J. Med*, 1996; 26:496-503.
83. Kılınç, K; Serum Paraoksonaz (PON) Aktivitesinin PON1 Polimorfizmi, Okside LDL Antikoru Ve HDL-K Düzeyleri İle İlişkisi Adlı Biyokimya Anabilim Dalı Doktora Tezi; 2005.

84. Wen Y, Killalea S, Mcgettigan P, Feely J; Lipid Peroxidation And Antioxidant Vitamins C And E In Hypertensive Patients; Lipid Peroxidation And Hypertension; *I.J.M.S.*; 1996; 165:210-212.
85. Chait A., Devaraj S; Low Density Lipoprotein Oxidation, Antioxidants And Atherosclerosis: A Clinical Biochemistry Perspective; *Clin. Chem.*; 1996;42: 498-506.
86. Restky KL, Chen K, Zeind J, Frei B; Inhibition Of Copper Induced LDL Oxidation By Vitamin C Is Associated With Decreased Copper Binding To LDL And 2-Oxo-Histidine Formation; *Free Rad. Biol. Med.*; 1998; 26:90-98.
87. Halliwell B; Oxidation Of Low-Density Lipoproteins: Questions Of Initiation, Propagation And The Effect Of Antioxidants.; *Am. J. Clin. Nutr.*; 1995; 61, 670-677.
88. Ohta Y, Shiraishi N, Nishikawa T, Nishikimi M; Copper- Catalyzed Autoxidations Of GSH And Ascorbic Acid; Mutual Inhibition Of The Respective Oxidations By Their Coexistence; *Biochem. Biophys. Acta*; 2000; 1474: 378-382.
89. Raveh O, Pinhuck I, Schnitzer E, Fainaru M, Schaffer Z, Lichtenbergd; Kinetics Analysis Of Copper-Induced Peroxidation Of HDL, Autoaccelerated And Tocopherol-Mediated Peroxidation; *Free Rad. Biol. Med.*; 2000; 29:131-146.
90. Napoli C, Triggiani M, Palumba G, Condorelli M, Chiarello M, Ambrossi G; Glycosylation Enhances Oxygen Radical-Induced Modifications And Decreases Acetylcholinesterase Activity Of Human Low Density Lipoprotein; *Basic Res. Cardiol.*; 1997; 92:96-105.
91. Parthasarathy S, Santaman N, TamachandranS, Meilhac O; Oxidants And Antioxidant In Atherogenesis: An Appraisal; *J. Lipid Res.*; 1999; 40:2143-2157.
92. Arai H, Kashiwagi S, Uchida YNK, Hoshii Y, Nakamura K; Oxidative Modification Of Apolipoprotein E In Human Very-Low-Density Lipoprotein and Its Inhibition By Glycosaminoglycans; *Archives Of Biochemistry and Biophysics*; 1999; 367: 1-8
93. Mceneny J, Loughrey CM, Mcnamee PT, Trimble ER, Young IS; Susceptibility Of Vldl To Oxidation In Patients On Regular Haemodialysis; *Atherosclerosis*; 1997; 129:215-220.
94. Mohr D, Stocker R; Radical-Mediated Oxidation Of Isolated Human Very-Low-Density Lipoprotein; *Arteriosclerosis and Thrombosis*; 1994; 14:1186-1192.
95. Myara I, Alamowitch O, Heudes D, Bariety J, Guy-Grand B, Chevalier J; Lipoprotein Oxidation and Plasma Vitamin E In Nondiabetic Normotensive Obese Patients; *Obesity Research*; 2003; 11:112-120.
96. Liu SW, Zhou M, Chen Y, Wen WY, Sun MJ; Lipoperoxidative Injury To Macrophages By Oxidatively Modified Low Density Lipoprotein May Play An Important Role In Foam Cell Formation; *Atherosclerosis*; 1996; 121; 55-61.

97. Hamilton CA; Low Density Lipoprotein And Oxidized Low Density Lipoprotein Their Role In The Development Of Atherosclerosis; *Pharmacol. Ther.*, 1997; 74:55-72.
98. Bensath A., Rusznyak S, Szent-Györgi A., Vitamin; *Pnnature*; 1937; 139:326-327.
99. Yoshikawa M, Sakuma N, Hibino T, Satot FT; HDL₃ Exerts More Powerful Anti-Oxidative, Provective Effects Against Copper-Catalyzed LDL Oxidation Than HDL₂; *Clin. Chim.*; 1997; 30:221-225.
100. Mackness MI, Arrol S, Abbott C, Durrington, PN; Protection Of Low-Density Lipoprotein Against Oxidative Modification By High Density Lipoprotein Associated Paraoxanase; *Atherosclerosis*; 1993; 104:129-135.
101. Ateroskleroz: Wikipedia, The Free Enclclopedia: Text Of The GNU Free Documentation; 2006
102. Singh J, Upadhyay AK, . Bahadur A, Singh B, Singh KP, Rai M; Antioxidant Phytochemicals In Cabbage (*Brassica oleracea L. var. capitata*); *Scientia Horticulturae*; 2006; 108:233–237
103. Zhishen Z, Memngcheng T, Jianming W; The Determination Of Falavonoid Content In Mullberry And Their Scavenging Effects On Superoxide Radicals; *Food Chemistry*; 1999; 64:555-559.
104. Dewanto VWX, Adom KK, Liu RH; Thermal Processing Enhances The Nutritional Value Of Tomatoes By Increasing Total Antioxidant Activity; *J. Agric. Food Chem.*; 2002; 50:3010-301.
105. Karadeniz F, Burdurlu HS, Koca N, SoyerY; Antioxidant Activity Of Selected Fruits And Vegetables Grown IN Turkey; *Turk J Agric For.*; 2005; 29:297-303.
106. Erel O, A Novel Automated Direct Measurement Method For Total Antioxidant Capacity Using A New Generation, More Stable ABTS Radical Cation; *Clinical Biochemistry*; 2004; 37:277– 285
107. Sclavons MM, Cordonnier CM, Mailleux PM, Heller FR, Dessager JP, Harvent CM; Fast Separation Of Tree Main Plama Lipoprotein Classes Y Ultracentrifugation Using Vertical Rotor and Multiple Discontinues Density Gradient; 1985; *Clin. Chim. Acta*; 153:125-135.
108. Mills GL., Lane PA., Weech PK.; A Guide To Lipoprotein Technique. In Burton, R. H. and Knipphenberg, P. H. (Eds), Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology; Elsevier, Netherlands; 1989; p:73.
109. Stoscheck CM; Quantification Of Protein. In Duetscher, MP. (Ed.); Guide To Protein Purcification; In Alberson, J. N. and Simon, M. I. (Eds.), Methods In, Enzymology; *Academic Press*; 1990; 192: Pp. 72-74.

110. Lowry OH, Rosebrough NL, Farr AL, Randel RI.; Protein Measurement With Folin Phenol Reagent; *J. Biol. Chem.*; 1951; 193: 265-275.
111. Menendez R, Fraga V, Amor AM, Gonzlaez RMA, Mas R.; Oral Administration Of Policosanol Inhibits In Vitro Copper Ion- Induced Rat Lipoprotein Peroxidation; *Physiology & Behavior*; 1999; 67:1-7.
112. Puhl H, Waeg G, Esterbauer H; Methods To Determine Oxiditon Of Density Lipoproteins: Method In Enzymology; 1995; 233:425-440.
113. Yagi K; Lipid Peroxides and Related Radicals In Clinical Medicine: Free Radicals In Diognastic Medicine; *Pleneum Press, Newyork*; 1994; Pp. 1-15.
114. İsmail A, Marjan ZM, Foong CW; Total Antioxidant Activity And Phenolic Content In Selected Vegetables; *Food Chem.*; 2004; 87:581-586.
115. Chu YF, Sun J, Wu X, Liu RH; Antioxidant And Antiproliferative Activities Of Common Vegetables; *J. Agric. Food. Chem.*; 2002; 50:6910-6916.
116. Singh J, Upadyay AK, Bahadur A, Singh B, Singh KP, Rai M; Antioxidant Phytochemical In Cabbage (*Brassica oleracea L. var. capitata*); *Scientia Horticulturae*; 2006; 108:233-237.
117. Podsedek A, Sosowska D, Redzymia M, Andes B; Antioxidant Capacity And Content Of *Brassica oleracea* Dietary Antioxidants; *Journal of Science & Tecnology*; 2006; 41:49-58.
118. Chun OK, Kim DK, Smith N, Schroeder D, Han JT, Lee CY; Daily Consumption Of Phenolic And Total Antioxidant Capacity From Fruit And Vegetables In American Diet; *J. Sci. Food Agric.*; 2005; 85:1715-1724.
119. Rayssiguier Y, Gueux E, Bussi re L, Durlach J, Mazur; A. Dietary Magnesium Affects Susceptibility of Lipoproteins and Tissues to Peroxidation in Rats.; *Journal of the American College of Nutrition*, 1993; 12: 133-137 .
120. Mohr D, Stockher R; Radical Mediated Oxidation Of Isolated Human Very Low Density Lipoprotein; *Atherosclerosis And Thrombosis*; 1994; 14:1186-1192.
121. Zeman M, Zak A, Vecka M, Tvrzicka E, Romaniv A, Konarkova M; *Ann. NY. Acad. Sci*; 2002; 967:336-341.
122. Myara I, Alamowitch O, Heudes D, Bariety J, Guy-Grand B, Chevalier J. Lipoprotein Oxidation And Plasma Vitamin E In Nondiabetic Normotensive Obese Patients; *Obesity Research*; 2003; 11:112-120.
123. Wilson T, Porcari JP, Harbin D; Canberry Exract Inhibits Low Density Lipoprotein Oxidation; *Life Science*; 1998; 62:381-386.

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Trabzonda doğdu. İlk, orta, lise öğrenimini Trabzon'da tamamladı. 1999 yılında Erzurum Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü kazandı. 2. sınıftan sonra ise yatay geçiş yaptığı Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde lisans programına devam ederek 2003 yılında lisans programından mezun oldu.