

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**  
**YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**HAFİF DÜZEYDE HİPERKOLESTEROLEMİK KİŞİLERDE FINDIK**  
**TÜKETİMİNİN ERİTROSİTLERDEKİ ANTİOKSİDAN ENZİMLERE**  
**ETKİSİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**HANİFE KARA**

**MAYIS - 2011**  
**TRABZON**

**T.C.**  
**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**  
**YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**HAFİF DÜZEYDE HİPERKOLESTEROLEMİK KİŞİLERDE FINDIK**  
**TÜKETİMİNİN ERİTROSİTLERDEKİ ANTİOKSİDAN ENZİMLERE**  
**ETKİSİ**

**HANİFE KARA**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 20.05.2011**

**Tezin Sözlü Savunma Sınavı : 22.06.2011**

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. Asım ÖREM**

**Jüri Üyesi : Prof. Dr. Orhan DEĞER**

**Jüri Üyesi : Doç. Dr. İlknur TOSUN**

**Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Ahmet KALKAN**

**MAYIS -2011**

**TRABZON**

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmada bilgi ve deneyimlerini aktaran, her konuda bana yardımcı olan tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Asım Örem başta olmak üzere, Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Orhan Değer' e, Sayın Prof. Dr. E. Edip Keha' ya, Sayın Prof. Dr. S. Caner Karahan' a, Sayın Prof. Dr. Yüksel Aliyazıcıoğlu' na, Sayın Doç. Dr. Birgül Vanizor Kural' a, Sayın Doç. Dr. Ahmet Alver' e, ve merhum Prof. Dr. Ekin Önder'e,

Yardımlarından dolayı Dr. Fulya Balaban Yücesan, Dr. Ahmet Mentеше ve anabilim dalındaki tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma,

Beni bu günlere getiren ve her zaman destekleyen canım aileme sonsuz teşekkür ederim.

Hanife KARA

Bu çalışma K.T.Ü. B.A.P. 2007.114.001.4 kod nolu proje ile desteklenmiştir.

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
<b>ÖNSÖZ</b>	II
<b>İÇİNDEKİLER</b>	III
<b>TABLolar DİZİNİ</b>	V
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	VI
<b>KISALTMALAR</b>	VII
<b>1. GİRİŞ ve AMAÇ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	3
2.1. Ağaçta Yetişen Sert Kabuklu Meyveler	3
2.1.1. Fındık	5
2.2. Hiperkolesterolemi	6
2.3. Oksidatif Stres ve Antioksidanlar	7
2.3.1. Oksidatif Stres	7
2.3.2. Serbest Radikaller	8
2.3.3. Reaktif Oksijen Ürünlerinin Etkileri	10
2.3.4. Antioksidan Sistemler	12
2.3.4.1. Süperoksit Dismutaz	13
2.3.4.2. Katalaz	14
2.3.4.3. Glutasyon Peroksidaz	14
2.3.4.4. Glutasyon Redüktaz	14
2.3.4.5. Tioredoksin Redüktaz	15
2.4. Eritrositler	16
2.5. Eritrosit-Hiperkolesterolemi-Fındık	17
<b>3. MATERYAL ve METOD</b>	17
3.1. Materyal	17
3.1.1. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler	17

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	18
3.2. Metod	20
3.2.1. Deneyin Planlanması ve Numunelerin Toplanması	20
3.2.2. Biyokimyasal Parametreler	20
3.2.3. Antioksidan Enzimler	21
3.2.3.1. Katalaz (CAT) Aktivite Tayini	21
3.2.3.2. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivite Tayini	22
3.2.3.3. Glutasyon Redüktaz (GR) Aktivite Tayini	24
3.2.3.4. Tiyoredoksin Redüktaz (TR) Aktivite Tayini	25
3.2.4. Eritrositlerde MDA Tayini	27
3.2.5. İleri Oksidasyon Protein Ürünü Ölçümü (AOPP)	28
3.3. İstatistiksel Analizler	30
<b>4. BULGULAR</b>	31
4.1. Çalışma Grubunun Demografik Verileri ve Başlangıç, 30.Gün, 60.Gün ve 90.Güne Ait Parametrelerin Ortalama Değerleri	33
4.2. Çalışma Grubunda Eritrosit Oksidan- Antioksidan Sistem Parametre Bulguları	34
4.3. Çalışma Grubunda Eritrosit Oksidan- Antioksidan Sistem Parametrelerinin % Değişim Korelasyonları	35
<b>5. TARTIŞMA</b>	36
<b>6. SONUÇLAR</b>	44
6.1. Sonuçlar	44
6.2. Öneriler	44
<b>7. ÖZET</b>	45
<b>8. SUMMARY</b>	46
<b>9. KAYNAKLAR</b>	47
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	

**TABLolar DİZİNİ**

	<b>Sayfa</b>
<b>Tablo 1.</b> Bazı sert kabuklu meyvelerin 100 gramında bulunan yağ asidi, E vitamini, arginin ve metiyonin miktarları.	4
<b>Tablo 2.</b> Fındığın 100 gramında bulunan yağ asitleri ve miktarları.	5
<b>Tablo 3.</b> Serbest radikaller ve yol açtıkları reaksiyonlar.	9
<b>Tablo 4.</b> Biyolojik önemi olan reaktif oksijen türleri.	10
<b>Tablo 5.</b> Çalışma grubuna ait demografik veriler.	31
<b>Tablo 6.</b> Çalışma grubunun dört döneme ait serum ve lipoprotein lipit parametreleri.	32
<b>Tablo 7.</b> Çalışma grubunun dört döneme ait eritrosit oksidan- antioksidan sistem parametreleri.	33

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
<b>Şekil 1.</b> Antioksidanların Sınıflandırılması.	13
<b>Şekil 2.</b> GSH ve GSSG döngüsü.	15
<b>Şekil 3.</b> Tiyoredoksin redüktazın substratları ve tiyoredoksinin hücredeki fonksiyonları.	15
<b>Şekil 4.</b> Eritrosit MDA seviyesi için standart grafiği	28
<b>Şekil 5.</b> Fındık diyeti ve fındık diyetinden sonrasına ait yüzde değişim grafiği.	34

**KISALTMALAR**

<b>MUFA</b>	: Tekli Doymamış Yağ Asidi
<b>PUFA</b>	: Çoklu Doymamış Yağ Asidi
<b>NCEP ATP III</b>	: National Cholesterol Education Adult Treatment Programme
<b>GSH-Px</b>	: Glutasyon Peroksidaz
<b>GR</b>	: Glutasyon Redüktaz
<b>KAT</b>	: Katalaz
<b>TR</b>	: Tiyoredoksin Redüktaz
<b>SOD</b>	: Süperoksit Dismutaz
<b>MDA</b>	: Malondialdehit
<b>AOPP</b>	: İleri Protein Oksidasyon Ürünleri
<b>NO</b>	: Nitrik Oksit
<b>LDL-K</b>	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein Kolesterolü
<b>HDL-K</b>	: Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein Kolesterolü
<b>TG</b>	: Triaçil gliserol
<b>VCAM-1</b>	: Vasküler Hücre Adezyon Molekülü-1
<b>APO B</b>	: Apolipoprotein B
<b>APO AI</b>	: Apolipoprotein AI
<b>ROS</b>	: Reaktif Oksijen Ürünleri



## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

“Nut’lar” ağaçta yetişen sert kabuklu meyveler olarak adlandırılırlar ve karbohidrat, protein ve yağ içeriği bakımından değerli besin kaynaklarıdır. Yer fıstığı nut grubu içerisinde olup ağaçta yetişmediği için bunlardan farklıdır. Ağaçta yetişen sert kabuklu meyveler tekli doymamış yağ asitleri (MUFA), vitamin E, magnezyum, potasyum, arginin, folik asit, bakır ve lif yönünden oldukça zengindirler (1,2). Fındık, doymuş yağ asidi yönünden fakir, MUFA (özellikle oleik asit) yönünden zengin, PUFA miktarı yeterlidir. İçeriğinde bulunan flavonoidler, polifenoller ve tokoferoller (E vitamini) sayesinde yüksek antioksidan potansiyele sahiptir. Ayrıca çinko, selenyum, kalsiyum, fosfor gibi elementleri de ihtiva eder. Fındık, sağlıklı beslenme yönünden uygun niteliklere sahip ve yüksek enerji içeren bir besin maddesidir. Son yıllarda yapılan çalışmalarla fındıkta çok yüksek düzeylerde bulunan tekli doymamış yağ asidi oleik asidin (% 82 oleik asit, % 12 linoleik asit, % 15 palmitik asit ve % 1 stearik asit) ve düşük miktardaki doymuş yağ asidi içeriğinin kanda kolesterolün yükselmesini önlediği ve böylece kalp ve damar hastalıklarına karşı koruyucu etki gösterdiği tespit edilmiştir (3).

Oksidatif stres, oksidan moleküllerin antioksidan savunma mekanizmalarının kapasitesini aştığı durumlarda ortaya çıkmaktadır. Oksidatif stresin birçok akut ve kronik hastalığın patogeneğinde anahtar rol oynadığı bilinmektedir. Çevresel kimyasal maddelere maruz kalma, hücrelerde radikal oluşumu ve reaksiyonlarını arttırarak oksidatif strese yol açmaktadır (4, 5). Serbest radikallerin oluşumu ve meydana getirdikleri hasarı önlemek ve detoksifikasyonunu sağlamak için birçok savunma mekanizması vardır. Bu mekanizmalar “antioksidan savunma sistemleri” veya kısaca “antioksidanlar” olarak bilinirler (6, 7, 8).

Plazma kolesterol seviyesinin yükselmesi, hiperkolesterolemi (>200 mg/dL) olarak adlandırılır ve kardiyovasküler hastalıkların patogeneğinde risk faktörüdür. Plazmada

yükselmiş kolesterol seviyesi oksidan-antioksidan dengeyi oksidasyonlar yönüne değiştirir ve eritrositlerde lipid oksidasyonunda artış meydana gelir. Son yıllarda yapılan çalışmalarla fındıkta çok yüksek düzeylerde bulunan tekli doymamış yağ asidi olan oleik asidin kanda kolesterolün yükselmesini önlediği, böylece kalp ve damar hastalıklarına karşı koruyucu etki gösterdiği tespit edilmiştir (3).

Plazma lipoproteinleri ile eritrosit membran lipidleri arasında sürekli bir etkileşim vardır. Hiperkolesteroleminin, eritrosit lipid kompozisyonunda değişikliğe neden olduğu bilinmektedir (9). Kolesterol miktarı artmış eritrositler, membran akışkanlığında bozulma ve enzim aktivitelerinde azalma gibi birçok yapı ve fonksiyon bozukluğuna yol açar (9). Hiperkolesterolemide, eritrositlerin yapısının değişmesinin mekanizmalarından biri de oksidatif streştir (10). Ancak eritrositler, kendi antioksidan savunma sistemleri vasıtasıyla serbest radikallerin meydana getirdiği hasara karşı direnç gösterme eğilimindedir.

Bu çalışmada, NCEP ATP III (National Cholesterol Education Programme Adult Treatment Panel III)' e göre hafif hiperkolesterolemik ( $>200$  mg/dL,  $\leq 40$  mg/dL) gönüllü bireylerde 4 hafta süreyle her gün düzenli fındık tüketiminin eritrositlerde antioksidan enzimler üzerine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla eritrositlerde, antioksidan enzimlerden glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GR), katalaz (KAT) ve tiyoredoksin redüktaz (TR)) aktivitesini, lipid peroksidasyon (MDA) ve ileri protein oksidasyon ürünlerinin (AOPP) düzeylerini belirlemektir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Ağaçta Yetişen Sert Kabuklu Meyveler

Ağaçta yetişen sert kabuklu meyveler deyince aklımıza başlıca ülkemizde yaygın olan fındık, fıstık, ceviz, badem ve yer fıstığı gelmektedir. Uluslararası literatürde bu ürünler “nut” başlığı altında değerlendirilmektedir. Yer fıstığı ağaçta yetişmediği için, “nut” grubuna girmesine rağmen bunlardan farklıdır. Nut’ lar yapı ve biyolojik etkileri bakımından ay çekirdeği ve kabak çekirdeği ürünlerinden de farklılık göstermektedir. Ağaçta yetişen sert kabuklu meyveler; karbohidrat, protein, yağ, mineral, vitamin, lif ve antioksidan içeriği bakımından tüketilmesi gereken 5 temel gıda kaynaklarından biridir. Ağaçta yetişen sert kabuklu meyveler yüksek oranda yağ içerirler (% 65-82). Yağ içeriğinde doymamış yağ asitleri ağırlıktadır. Doymamış yağ asitlerinin büyük bir kısmını tekli doymamış yağ asidi (MUFA) oluşturur, polifenoller ve özellikler  $\alpha$  tokoferoller (vitamin E) açısından zengindirler (1,2). Tablo 1.’ de bazı sert kabuklu meyvelerin 100 gramında bulunan yağ asidi, E vitamini, fitosteroller, flavonoidler, folik asit ve lif miktarları verilmiştir (11, 12, 13). İçerdikleri yağın büyük bir bölümünü oleik asit ve alfa linoleik asit oluşturur. Ağaçta yetişen sert kabuklu meyvelerin içerdikleri alfa linoleik asidin (ALA, özellikle cevizde), antitrombotik ve antiaritmik etkileri nedeniyle kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu olduğu bulunmuştur. Ayrıca ağaçta yetişen sert kabuklu meyvelerin kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu etkilerinden biri de; yapılarındaki protein içerdiği. Yüksek arginin; endotel fonksiyonunu etkileyen, trombositlerin yapışmasını ve kümeleşmesini baskılayan, arginin-Nitrik Oksit (NO) yolundan kaynaklanabileceği açıklanmıştır (2, 14). Ağaçta yetişen sert kabuklu meyveler, vitamin E ve B grubu vitaminleri içeriği bakımından oldukça zengin besin öğeleridir. Başta badem ve fındıkta bulunan E vitamini, antioksidan sistem için önemli bir moleküldür. B grubu vitaminler ise metabolizmayı düzenleyici etkileriyle önem teşkil ederler.

Ayrıca sert kabuklu meyveler, posa ve bitkisel sterollerden zengin olması nedeniyle, barsaktan safra ve kolesterol emilimini azaltır. Buna bağlı olarak hepatik LDL-K alımını artırır ve kandaki LDL-K' ü düşürür (15, 16). Bitkisel sterollerin 2-3 gram/gün alımı, LDL-K' ü % 6-15 oranında düşürürken, HDL-K ve TG üzerinde etkili değildir (15).

**Tablo 1.** Bazı ağaçta yetişen sert kabuklu meyvelerin 100 gramında bulunan yağ asidi, E vitamini, fitosteroller, flavonoidler, folik asit ve lif miktarları (11, 12, 13).

	<b>Fındık</b>	<b>Ceviz</b>	<b>Badem</b>	<b>Yer Fıstığı</b>
<b>Doymuş Yağ asidi (g)</b>	4,46	6,13	3,73	6,83
<b>MUFA (g)</b>	45,7	8,93	30,9	24,3
<b>PUFA(g)</b>	7,92	47,1	12,7	15,6
<b><math>\alpha</math>- tokoferol (mg)</b>	15,03	0,7	26,2	8,33
<b><math>\gamma</math>- tokoferol (mg)</b>	0	20,8	0,65	0
<b>Fitosteroller (mg)</b>	96	72	141	220
<b>Flavonoidler (mg)</b>	11,7	2,71	15,2	0,66
<b>Folik asit (<math>\mu</math>g)</b>	113	98	29	145
<b>Lif (g)</b>	10,8	6,4	8,8	8,5

Yapılan pek çok çalışmada, plazma kolesterol düzeyleri üzerine sert kabuklu meyvelerin (badem, ceviz, fındık gibi) tüketiminin etkileri değerlendirilmiştir (1). Günlük 84-100 g sert kabuklu meyve tüketiminin serum total kolesterol düzeyini % 10-20 azalttığı bununla beraber sert kabuklu meyve içeriği yüksek diyetlerin total kolesterol / HDL-K oranını da düşürdüğü gösterilmiştir (2).

Koçyiğit ve arkadaşları sağlıklı normolipidemik bireylerde antep fıstığı tüketiminin plazma lipid profili ve oksidatif durumu üzerine olan etkilerini incelemiştir. Bireyler aldıkları günlük kalori miktarının % 20' sini oluşturacak şekilde 3 hafta boyunca antep fıstığı tüketmişlerdir. Üç hafta sonunda total kolesterol ve MDA düzeylerinin, total kolesterol / HDL-K ve LDL-K / HDL-K oranlarının önemli derecede azaldığını, HDL-K, toplam antioksidan potansiyel düzeylerinin ve toplam antioksidan potansiyel / MDA oranının önemli

ölçüde arttığını gözlemlemişlerdir. Ayrıca trigliserid ve LDL-K düzeylerinin de azaldığını fakat bu azalışı istatistiksel olarak anlamlı bulmadıklarını rapor etmişlerdir (17).

Ağaçta yetişen sert kabuklu meyve tüketiminin hiperkolesterolemik bireylerde de lipid profili üzerine etkili olduğu birçok çalışma ile gösterilmiştir. Ros ve arkadaşları hiperkolesterolemik bireylere günlük enerjinin % 32' sini oluşturan MUFA yerine cevizin yer aldığı "Akdeniz Diyeti" benzeri bir diyet uygulamışlar ve vazodilasyonun daha da arttığını, VCAM-1' in ise daha da azaldığını, bununla beraber kolesterol ve LDL-K düzeyinin azaldığını bulmuşlardır (18). Azalan kolesterol düzeyi ile artan alfa-linolenik asit ve  $\gamma$ - tokoferol arasında korelasyon tespit etmişlerdir. Bu bulgu, sert kabuklu meyvelerin kolesterolü düşürmelerinin yanında kalp hastalıklarından korunmada etkili olmalarının diğer bir sebebini açıklamaktadır. Zambon ve arkadaşları cevizle benzer bir çalışma yapmışlar ve total ve LDL kolesterolün daha da azaldığını gözlemişlerdir (19).

### 2.1.1. Fındık

Fındık ülkemiz için önemli ekonomik değeri olan, sıklıkla kullanılan ve insan beslenmesi üzerine olumlu etkileri olan sert kabuklu meyvelerden biridir.

Fındık bitkiler aleminde Fagales takımının Betulaceae familyasından Corylus cinsine aittir. Fındık yağ ve protein açısından zengin bir besindir. 100 g iç fındık, 55 - 66 g yağ, 11 - 15 g protein, 12 - 17 g karbohidrat, 8 - 10 g lif içerir ve yaklaşık 650 kcal. enerji sağlar. Fındık yağı bileşimi üzerine yapılan çalışmalarda içerik olarak zeytinyağına benzediği ve tüm çeşitlerde en fazla oleik asidin (18:1) bulunduğu belirlenmiştir. Ayrıca, sırasıyla linoleik (18:2), palmitik (16:0), stearik (18:0) ve linolenik (18:3) asitlerin de bulunduğu belirtilmiştir. Fındığın 100 gramında bulunan yağ asitleri ve miktarları Tablo 2.' de verilmiştir (20).

**Tablo 2.** Fındığın 100 gramında bulunan yağ asitleri ve miktarları.

Doymuş yağ asitleri miktarı (g)				Doymamış yağ asitleri miktarı (g)						
				MUFA				PUFA		
14:0	16:0	18:0	toplam	16:1	18:1	20:1	toplam	18:2	18:3	toplam
0,12	3,12	1,27	4,6	0,21	48,63	0,1	49	5,83	0,15	6

Fındığın sağladığı enerjinin yaklaşık % 60-70' i yağdan gelir. Protein içeriği de zengin (12,6-19,6 g / 100 g) olan fındık, bitkisel kaynaklı diğer besinlerle kıyaslandığında, protein kalitesi yüksek bir besin olarak değerlendirilir. Bitkisel kaynaklı besinler içinde E vitamini ve B<sub>6</sub> vitaminin önemli bir kısmını karşılar (21).

Fındık, sağlıklı beslenme yönünden uygun niteliklere sahip ve yüksek enerji içeren bir besin maddesidir. Son yıllarda yapılan çalışmalarla fındıkta çok yüksek düzeylerde bulunan tekli doymamış yağ asidi oleik asidin (% 82 oleik asit, % 12 linoleik asit, % 15 palmitik asit ve % 1 stearik asit) kanda kolesterolün yükselmesini önlediği ve böylece kalp ve damar hastalıklarına karşı koruyucu etki gösterdiği tespit edilmiştir (3). Ayrıca kalsiyum, magnezyum, fosfor ve potasyum başta olmak üzere iyi bir mineral kaynağıdır. Sodyum bakımından düşüktür ve tansiyonu dengeler. Fındık ve fındık yağı mineraller bakımından zengin olduğu için demir ve çinko bakımından en iyi kaynaklardan biridir (20). Bununla beraber içerdiği fenolik bileşikler sayesinde doğal bir antioksidandır (22). Bu fenolik bileşiklerin, özellikle fındığın zarında yoğun olarak bulunduğu ve insan sağlığı üzerinde olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir (23,24,25,26)

NCEP ATP III' ün birinci basamak diyetinde, günlük diyetten gelen enerjinin % 30' unun yağlardan karşılanması, bunun da % 6-8' inin doymuş yağ asitlerinden ve % 14-16' dan düşük miktarının tekli doymamış yağ asitlerinden ve %8-10' unun çoklu doymamış yağ asitlerinden gelmesi önerilir. Bu diyetle LDL-K' ünün % 3-10 oranında düşürülmesi hedeflenir (27). Fındık, sert kabuklu meyveler içerisinde değerlendirildiğinde, tekli doymamış yağ asitlerinden en zengin olanıdır. Bu açıdan değerlendirildiğinde fındık günlük diyete destek olarak kullanılabilir.

E vitamininden zengin bir besin olduğu için sağlıklı beslenme diyetinin bir parçası olarak yer almaktadır. Durak ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada sağlıklı bireylerin normal diyetlerine günde kilogram başına 1 g olacak şekilde 30 gün boyunca fındık ilave edilmiştir. 30. gün sonunda fındık tüketiminin toplam kolesterol, LDL kolesterol ve MDA düzeylerini düşürdüğü, HDL kolesterol, trigliserid düzeylerini ve antioksidan potansiyelini arttırdığı belirlenmiştir (28).

Fındığın normolipidemik bireylerde serum total kolesterol ve Apo B düzeylerini önemli ölçüde düşürdüğü, Apo A-I düzeyini ise anlamlı olarak arttırdığı bulunmuştur (29, 30).

## 2.2. Hiperkolesterolemi

Kolesterol, insan vücudunda hücrelerde ve vücut sıvılarında doğal olarak bulunan 27 karbonlu bir steroldür. Kolesterol, kanda yağ ve proteinlerden oluşan lipoproteinlerle taşınır. Sağlıklı kişilerin günlük ihtiyacı olan kolesterol miktarı 1000 mg' dır. Günde harcanan kolesterol miktarı ise 300 mg' dır. Kanda olması gereken miktar 150-200 mg' dır. Kolesterol sentezinin dengesi ve regülasyonunda diyetle alınan kolesterol miktarının önemi büyüktür. Diyetle alınan kolesterol ince bağırsaklarda oluşan şilomikronlar aracılığı ile sistemik dolaşıma ve oradan da karaciğere taşınır. Diyetle alınan kolesterol karaciğerin ihtiyacını karşılamaya yeterli değil ise karaciğerde kolesterol sentezi yapılır (31).

Diyetteki kolesterol değişimi ile endojen kolesterol sentezini inceleyen bir çalışmada, diyetle % 0,05 oranında kolesterol bulunduğunda karaciğerde, ince bağırsaklarda ve adrenal bezlerde total kolesterolün % 70-80' inin sentezlendiği görülmüştür. Diğer taraftan diyetle alınan kolesterol miktarı % 0,05' den % 2' ye çıkarıldığında endojen kolesterol üretiminin % 70-80' in altına düştüğü görülmüştür. Özellikle karaciğerde sentezlenen kolesterolün diyetle alınan kolesterolden etkilendiği de bildirilmiştir (31). Yapılan bir başka çalışmada genellikle diyetle alınan kolesterolün 100 mg azalması ile serum kolesterol düzeyinin 0,13mmol/L düştüğü gösterilmiştir (31).

Kolesterol tüm hücre membranlarının yapısal bir bileşenidir ve membranların akışkanlığını sağlar, aynı zamanda safra asitlerinin, steroid hormonların ve D vitaminin öncül maddesidir. Dolayısıyla vücuttaki tüm hücrelere sürekli olarak kolesterol sağlanması kritik önem taşır. Bu gereksinimi bir seri kompleks taşıma, biyosentetik ve düzenleyici mekanizmalar geliştirmiştir. Kolesterol plazmada, hemen hepsi karaciğerde sentezlenen lipoproteinler aracılığıyla taşınır.

Plazma kolesterol seviyesinin yükselmesine hiperkolesterolemi (>200 mg/dL) denir. Primer ve sekonder olmak üzere ikiye ayrılır. Primer hiperkolesterolemi genetik temelli, hatalı apoprotein sentezi, reseptör eksikliği veya reseptör fonksiyonundaki hatalardan kaynaklanır. Sekonder hiperkolesterolemi ise obezite, yüksek kalori alımı, diabetes mellitus, inaktivite ve sigara ile ilişkili görülmekte, yaşa ve cinsiyete bağlı olarak değişim göstermektedir (32, 33).

Gelişmiş ya da gelişmekte olan çoğu toplumlarda kalp hastalıklarına yakalanma ve bu hastalıklardan ölüm riski çok yüksektir. Ateroskleroz ve koroner kalp hastalıkları yüksek

plazma kolesterol seviyesi ile başka bir deyişle plazma LDL kolesterol seviyesi ile yakından ilişkilidir (34).

## **2.3. Oksidatif Stres ve Antioksidanlar**

### **2.3.1. Oksidatif Stres**

Oksidatif stres, oksidan hasarın antioksidan defans mekanizmalarının kapasitesini aştığı durumlarda ortaya çıkmaktadır. Oksidatif stresin birçok akut ve kronik hastalığın patogenezinde anahtar rol oynadığı bilinmektedir. Reaktif oksijen ve nitrojen ürünleri inme, spinal kord hasarı, Parkinson, Alzheimer, Huntigton ve amiyotrofik lateral skleroz gibi birçok nörolojik hastalığın patolojisinde yer aldığı bilinmektedir (35).

Reaktif karakterli ürünler aslında mitokondrial oksidasyon, sitokrom P-450 aktivitesi, prostaglandin sentezi ve akışı ile inflamatuvar süreç, oksijenin hemoglobinlerce taşınımı, gibi aerobik yaşamın vazgeçilmez fizyolojik olaylarında, hücrel homeostazisin sağlanmasının doğal bir sonucudur (36, 37).

Çevresel kimyasal maddelere maruz kalma, hücrelerde radikal oluşumu ve reaksiyonlarını arttırarak oksidatif strese yol açmaktadır (4, 5). Hava kirliliği, kimyasallara maruz kalma, organik yanık madde alımı (yanmış gıdalar, sigara dumanı gibi) ve iyonize edici radyasyon başlıca ekzojen radikal kaynaklarıdır (4, 5).

Prooksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengenin bozulmasından endojen faktör olarak mitokondrial oksijen hareketleri sorumludur (36). Organizmaya ani ve aşırı miktarda oksijen girişi; yoğun stres, sigara ve alkol kullanımı, diyetle doymamış ve kolay peroksitlenebilen yağların fazla miktarda bulunması; kreatin fosfokinaz gibi litik enzim aktivitelerinin yükselmesi; epinefrin ve diğer katekolaminlerin artışı; egzersiz, gebelik, yaşlılık gibi fizyolojik haller; antioksidan savunma sistemi yetmezlikleri veya savunma duvarının aşılması gibi durumlarda hassas olan oksidan-antioksidan denge, oksidanlar lehinde bozulabilir. Bu olgu serbest radikallerin oluşumunun artışından ya da antioksidan aktivitesinin yetersizliğinden ileri gelebilir (37, 38).

Yaşadığımız atmosferdeki elektromanyetik alanlar, ozon ve kısmi oksijen basıncı, UV, X ve güneş ışınları gibi faktörlerle de oksidan-antioksidan dengenin radikaller lehine bozulabileceği gösterilmiştir (36, 39). Birçok hastalık ve patolojik olgular da oksidan antioksidan dengeyi olumsuz etkilemektedir (36, 40). Ancak tüm araştırmacıların birleştikleri konu herhangi bir nedenle oksidan-antioksidan dengenin, oksidanlar yönünde bozulmasıyla



öncelikle membran lipidleri olmak üzere proteinler ve DNA gibi tüm biyomoleküller için bir risk faktörü oluşturduğudur (4).

### 2.3.2. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron içeren atom ya da moleküllerdir. Bu atom ya da moleküller ortaklanmamış elektronlarını başka bir moleküle vererek ya da başka bir molekülden elektron alarak daha kararlı hale gelme eğilimindedirler. Serbest radikaller çok kısa ömürlü olmalarına rağmen, radikal olmayan maddelerle reaksiyona girer ve onları da radikal yapacak bir dizi zincir reaksiyonunu başlatırlar. Bu nedenle serbest radikaller son derece tehlikeli bileşiklerdir (41, 42). Serbest radikaller, eşleşmemiş elektronun belirtilmesi amacıyla üst kısımlarına yazılan bir nokta (X<sup>·</sup>) ile gösterilirler (43). Tablo 3' de serbest radikaller ve etkileri verilmiştir.

**Tablo 3.** Serbest radikaller ve yol açtıkları reaksiyonlar (6).

Radikaller		Etkileri
<b>Süperoksit</b>	$\cdot\text{O}-\text{O}^-$	$\text{Fe}^{+2}$ ve $\text{Cu}^+$ iyonlarını geri kazanma yoluyla Haber-Weiss reaksiyonunu katalizleme, hidrojen peroksit veya peroksinitrit oluşumu
<b>Hidrojen peroksit</b>	$\text{HO}-\text{OH}$	Hidroksil radikali oluşumu, enzim inaktivasyonu, biyomoleküllerin oksidasyonu
<b>Hidroksil radikali</b>	$\text{OH}^\cdot$	Hidrojen çıkarılması, serbest radikallerin ve lipid peroksitlerin üretimi, tiyol oksidasyonu
<b>Ozon</b>	$\text{O}=\text{O}^+-\text{O}^-$	Bütün biyomoleküllerin özellikle çift bağ içerenlerin oksidasyonu, sitotoksik aldehyd ve ozonit oluşumu
<b>Oksijen</b>	$\text{O}=\text{O}$	Çifte bağlarla reaksiyon, peroksitlerin oluşumu, aminoasitlerin ve nükleotidlerin oluşumu
<b>Nitrik oksit</b>	$\cdot\text{N}=\text{O}$	Peroksinitrit oluşumu, diğer radikallerle reaksiyon
<b>Peroksinitrit</b>	$\text{O}=\text{N}-\text{O}-\text{O}^-$	Hidroksil radikali oluşumu, tiyollerin ve aromatik grupların oksidasyonu, ksantin dehidrogenazın ksantin oksidaza dönüşümü, biyomoleküllerin oksidasyonu
<b>Hipoklorit</b>	$\text{ClO}^-$	Amino ve kükürt içeren grupların oksidasyonu, klorin oluşması
<b>Radikal</b>	$\text{R}^\cdot$	Hidrojen çıkarılması; peroksil radikalleri ve diğer radikallerin oluşumu, lipidlerin ve diğer biyomoleküllerin bozunması
<b>Peroksil radikali</b>	$\text{R}-\text{O}-\text{O}^\cdot$	Hidrojen çıkarılması, radikallerin oluşumu; lipidlerin ve diğer biyomoleküllerin bozunması
<b>Hidroperoksit</b>	$\text{R}-\text{O}-\text{OH}$	Biyomoleküllerin oksidasyonu, biyolojik membranların bozulması
<b>Bakır ve Demir iyonları</b>	$\text{Cu}^{+2}, \text{Fe}^{+3}$	Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonlarıyla hidroksil radikali oluşumu

Radikaller; radikal olmayan bileşiklerle birkaç yoldan reaksiyona girerler. Bir radikal ortaklanmamış elektronunu, radikal olmayan bir bileşiğe verebilir (redükte edici radikal) veya bir çift oluşturmak için diğer bir molekülden elektron alabilir (okside edici radikal) ya da radikal olmayan bir bileşikle birleşebilir. Bu üç reaksiyon tipinden hangisi ile olursa olsun radikal olmayan bileşik sonunda bir radikale dönüşür (44).

Oksijen bütün canlılar için vazgeçilmez bir element olup; hidrojen, karbon, azot ve kükürt ile birlikte organik moleküllerin temel yapısal atomlarını oluşturur. Aerobik canlılardaki oksidasyon reaksiyonları, besin kaynağı konumundaki maddelerde temel element olması, solunumda rol alması, canlı organizmaları oluşturan moleküllerin yapısına girmesi oksijeni yapısal ve fonksiyonel açıdan önemli yapmaktadır (45). Bununla beraber canlılar doğal olarak oksijenin toksik metabolitleriyle yaşamak zorundadırlar.

Moleküler oksijen, taşıdığı iki ortaklanmamış elektron (O-O) nedeniyle bir biradikal (diradikal) olarak değerlendirilir. Biradikal oksijen, radikal olmayan maddelerle yavaş reaksiyona girdiği halde diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girebilme özelliğine sahiptir. Moleküler oksijen biradikal doğasının bir sonucu olarak yüksek derecede reaktif oksijen ürünleri (ROS) oluşturma eğilimindedir (46, 47). Tablo 4' de bazı reaktif oksijen türleri verilmiştir.

**Tablo 4.** Biyolojik önemi olan reaktif oksijen türleri (6).

<b>Radikaller</b>	<b>Radikal olmayanlar</b>
Süperoksit, $O_2^{\cdot -}$	Hidrojen peroksit, $H_2O_2$
Hidroksil, $OH^{\cdot}$	Hipokloröz asit, $HOCl$
Peroksil, $RO^{\cdot}_2$	Ozon, $O_3$
Alkoksil, $RO^{\cdot}$	Singlet oksijen, $O^{\cdot}$
Hidroperoksil, $HO^{\cdot}_2$	Peroksinitrit, $ONOO^-$
Nitrik oksit, $NO^{\cdot}$	Hidroperoksit, $L(R)OOH$

Normal seyreden metabolik olaylarda oksijen toplam dört elektron almaktadır. Oksijenin bir elektron alarak indirgenmesiyle süperoksit anyonu ( $O_2^{\cdot -}$ ), iki elektron alarak indirgenmesiyle hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), üç elektron alarak indirgenmesiyle hidroksil radikali ( $OH^{\cdot}$ ) ve dört elektron alarak indirgenmesiyle su ( $H_2O$ ) molekülü oluşmaktadır (48, 49).

### 2.3.3. Reaktif Oksijen Ürünlerinin Etkileri

Reaktif oksijen ürünlerinin (ROS) oluşumu enflamasyon, radyasyon, yaşlanma, normalden yüksek parsiyel oksijen basıncı ( $pO_2$ ), ozon ( $O_3$ ) ve azot dioksit ( $NO_2$ ), kimyasal maddeler ve ilaçlar gibi bazı uyarıların etkisiyle artar. Serbest radikaller hücrelerin lipid, protein, DNA, karbohidrat ve enzim gibi birçok bileşiklerine etki edebilir. ROS' nin etkilerinin sonucunda hücre hasarı meydana gelir. Hücrede ROS' nin ve serbest radikallerin artışı hücre hasarının önemli bir nedenidir.

ROS' nin neden olduğu hücre hasarının birçok kronik hastalığın patogeneğinde ve komplikasyonların gelişmesine katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Aterogenez, amfizem/bronşit, parkinson hastalığı, gebelik preeklampsis, serviks kanseri, alkolik karaciğer hastalığı, hemodiyaliz hastaları, diabetes mellitus, akut renal yetmezlik, Down sendromu, yaşlanma, retrolental fibroplazi, serebrovasküler bozukluklar, iskemi/reperfüzyon injürisi gibi durumlarda ROS' nin neden olduğu hücre hasarı söz konusudur.

Lipidler serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas biyomoleküllerdir. Hücre membranlarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar.

Poliansatüre yağ asitlerinin ROS ile etkileşimi sonucu lipid peroksidasyonu oluşur ve hücre için oldukça zararlıdır. Çünkü, kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve lipid peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı belli bir düzeyden sonra geri dönüşümsüzdür (50).

Lipid peroksitleri yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşur. Bu bileşikler ya hücre yüzeyinde metabolize edilir veya başlangıçtaki etki alanlarından difüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu ürünü olarak malondialdehit (MDA) meydana gelir. TBARS ile renk oluşturan MDA, lipid peroksit seviyelerinin ölçülmesinde sıklıkla kullanılır. MDA, yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü değildir. Fakat lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir (51).

Proteinler serbest radikallerin etkisine karşı, PUFA' dan daha hassastırlar. Ancak zincir reaksiyonlarının ilerleme ihtimali daha azdır. Proteinlerin serbest radikal harabiyetinden etkilenme dereceleri amino asit kompozisyonlarına bağlı olarak değişir.

Doymamış bağ ve kükürt içeren triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi amino asitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler (52). Bu etki sonucunda özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli organik radikaller oluşur. Bu reaksiyonlar sonucu immünglobulin G ve albumin gibi fazla sayıda disülfid bağı bulunduran proteinlerin üç boyutlu yapıları bozular ve böylece normal fonksiyonlarını yerine getiremezler (53, 54).

İleri protein oksidasyon ürünleri (AOPP), protein oksidasyonunun derecesini belirlemede duyarlı bir belirteçtir (55). Witko - Sarsat ve ark. tarafından yapılan çalışmada, AOPP düzeylerinin, protein oksidasyonunun göstergesi olan plazma ditirozin ve ileri glikasyon son ürünü olan pentozidin düzeyleri ile korelasyon gösterdiği, fakat lipid peroksidasyon belirleyicisi olan tiyobarbütirik asit ile reaksiyonlaşan maddelerle korelasyon göstermediği bildirilmiştir (56).

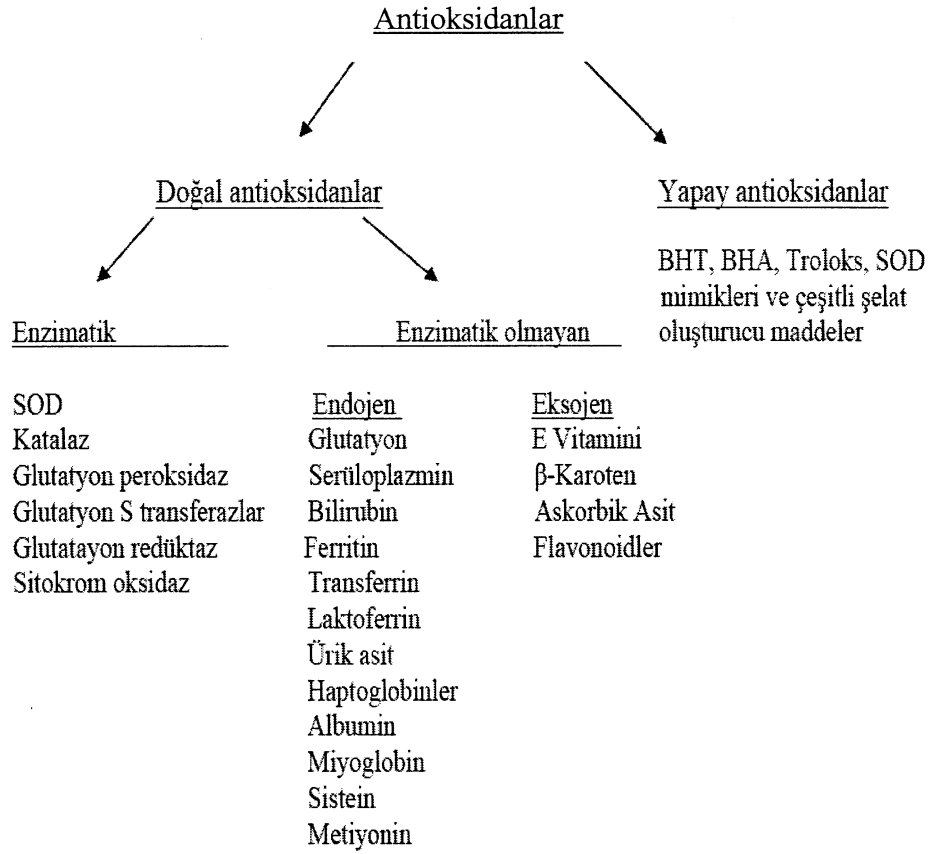
Serbest radikallerin karbohidratlar üzerine de önemli etkileri vardır. Monosakkaridlerin otooksidasyonu sonucu; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peroksit ve okzoaldehit yapısında ürünler meydana gelir. Okzoaldehitler, DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturma özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterirler. Bu yüzden kanser ve yaşlanma olaylarında rolü olduğu düşünülmektedir (57).

#### **2.3.4. Antioksidan Sistemler**

Serbest radikallerin oluşumu ve meydana getirdikleri hasarı önlemek ve detoksifikasyonunu sağlamak için birçok savunma mekanizması vardır. Bu mekanizmalar “antioksidan savunma sistemleri” veya kısaca “antioksidanlar” olarak bilinirler (6, 7, 8). Şekil 1.’ de antioksidanların sınıflandırılması gösterilmiştir (6,7).

Antioksidanalar dört ayrı şekilde etki ederler;

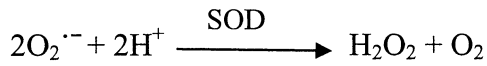
- Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya daha zayıf yeni moleküle çevirme (toplayıcı etki),
- Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürme (bastırıcı etki),
- Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleme (zincir kırıcı etki),
- Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması (onarıcı etki) (58).



**Şekil 1.** Antioksidanların Sınıflandırılması.

#### 2.3.4.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

İlk olarak 1968 yılında McCord ve Fridovich tarafından tanımlanan süperoksit dismutaz (EC 1.15.1.1, SOD) enzimi süperoksitin, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler (59).



Normal metabolizma esnasında hücreler tarafından yüksek oranda  $\text{O}_2^{\cdot-}$  anyonu üretilmesine rağmen intrasellüler düzeyi SOD sayesinde düşük tutulur. Yukarıdaki denklemde görüldüğü gibi bu reaksiyon sonucunda membranları geçemeyen süperoksit anyonu, membranları kolayca geçebilen  $\text{H}_2\text{O}_2$ ' e dönüşmektedir. Hidrojen peroksit ise geçiş metal iyonlarının varlığında Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonu ile oldukça reaktif olan  $\text{OH}\cdot$  radikaline dönüşmektedir (60). Oluşan hidrojen peroksit de glutasyon peroksidaz ve katalaz enzimleri katalizörlüğünde su ve oksijene dönüştürülür (61, 62).

### 2.3.4.2. Katalaz (KAT)

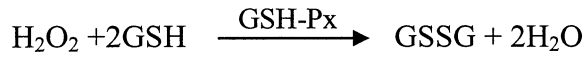
Katalaz (EC 1.11.1.6, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oksidoredüktaz), 1937 yılında Sumner ve Dounce tarafından sığır karaciğerinden elde edilmiştir. Molekül ağırlığı yaklaşık 240.000 civarındadır. KAT'lar, aktif kısmına hem grubu (Fe<sup>+3</sup>- protoporfirin) bağlı dört protein alt ünitesinden oluşur. Her alt ünite aynı zamanda enzimi kendi substratı H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' e karşı koruyan bir molekül indirgenmiş NADPH içerir (6, 63).



Bu reaksiyon H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarının yüksek olduğu durumlarda gerçekleşmektedir. Peroksidazlar ise hidrojen peroksitin düşük seviyelerde bulunduğu durumlarda bu molekülleri alkol ve suya çevirmektedirler (64).

### 2.3.4.3. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px)

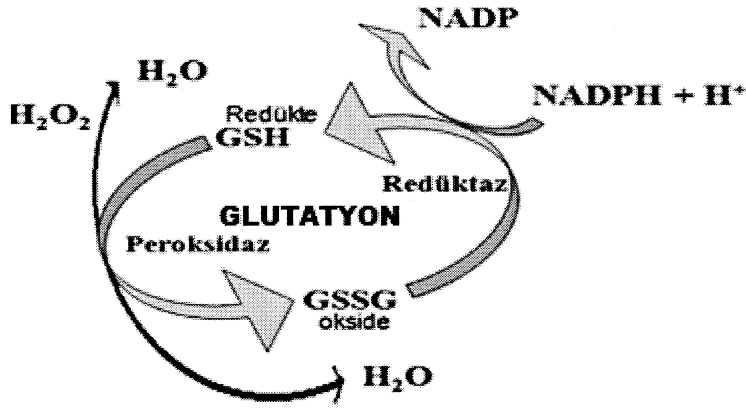
GSH-Px enzimi (EC 1.11.1.9, glutatyon: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oksidoredüktaz), ilk kez 1957 yılında Mills tarafından hayvan dokusunda keşfedilmiştir. Genellikle yüksek bitkilerde ve bakterilerde bulunmamasına rağmen, bazı alg ve mantarlarda bulunduğu bildirilmiştir (6, 65).



GSH-Px' in fagositik hücrelerde de önemli fonksiyonları vardır. Diğer antioksidanlarla birlikte GSH-Px, solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmesini önler.

### 2.3.4.4. Glutatyon Redüktaz (GR)

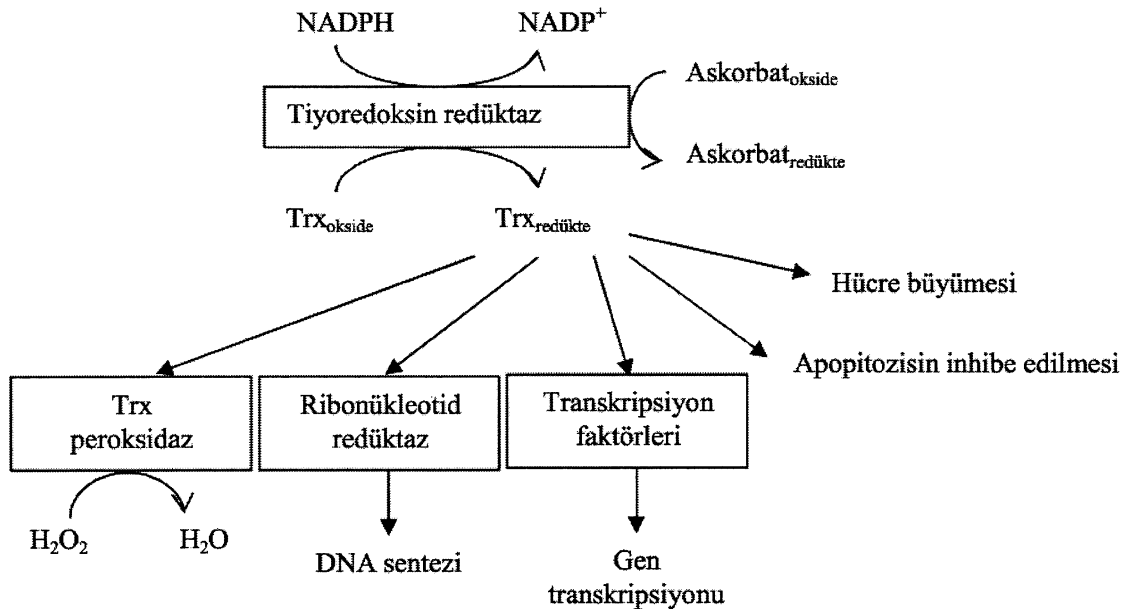
Glutatyon redüktaz (EC 1.6.4.2, NADPH: okside glutatyon oksidoredüktaz), GSH-Px vasıtasıyla hidroperoksitlerin indirgenmesi sonucu oluşan okside glutatyonun (GSSG) tekrar indirgenmiş glutatyona (GSH) dönüşümünü katalizler (Şekil 2.) (64). GSH, oksidazlar tarafından protein sülfidlerine tercih edilen bir substrat olup protein sülfidril oksidasyonunu önler. GSH, protein sülfidrillerinin oksidasyonunu geriye de çevirir (64).



Şekil 2. GSH ve GSSG döngüsü.

### 2.3.4.5. Tioredoksin Redüktaz (TR)

Tioredoksin redüktaz (TR, EC 1.6.4.5), tioredoksinin indirgenmesini katalizleyen homodimerik bir flavoenzimdir (66). Her bir monomer prostetik grup olarak FAD, NADPH bağlanma bölgesi ve aktif disülfid yapısı içerir (67). Elektronlar NADPH' dan, FAD aracılığıyla tioredoksin redüktazın aktif merkezindeki disülfidlere aktarılırlar ve substratın redüksiyonunda kullanılırlar. İnsanda mitokondriyal ve sitozolik olmak üzere iki izoenzimi bulunmaktadır. Şekil 3.' de tioredoksin redüktazın etkileri özetlenmiştir.



Şekil 3. Tioredoksin redüktazın substratları ve tioredoksinin hücredeki fonksiyonları.

## 2.4. Eritrositler

Kan, ekstrasellüler bir sıvı ve bu sıvı içerisinde özelleşmiş hücrelerden meydana gelmektedir. Erişkin bir insanda hücreler arası sıvının 1/3'ünü kan oluşturmaktadır. Kanın % 55' i plazma, % 45 'i de hücrelerden oluşmuştur. Kan hücreleri eritrositler, lökositler ve trombositlerdir. Plazma ve hücrelerin özgül ağırlıkları farklıdır. Bu özelliğinden dolayı kan hücreleri ve plazma santrifügasyon ile birbirinden kolaylıkla ayrılabilir. Santrifüj işlemi sonunda eritrositler en altta kalın bir tabaka oluşturur.

Eritrositler, insan kanında ilk defa 1874' de Hollandalı Leeuwenhoek tarafından tanımlanmışlardır (68). Fonksiyonel önemleri ise, Hoppe Seyler hemoglobinin oksijen bağlayıp-bırakma özelliğini gösterince ortaya konulmuştur.

İnsan eritrositleri, çekirdeksiz ve bikonkav disk şeklindedirler; çapları 6-9 µm, kalınlıkları merkezde 1 µm ve kenarlarda 2-2,5 µm kadardır. Eritrositler erişkinlerin kemik iliğinde yapılırlar; toplam vücut ağırlığının % 3-6 kadarını oluşturan kemik iliğinin yaklaşık yarısı eritrosit yapımında görev yapan eritropoietik hücrelerdir.

Olgun insan eritrositi en fazla özelleşmiş hücrelerden biridir. Nukleus, mitokondri gibi organelleri olmadığından bu hücreler, transkripsiyon işlemi ve mitokondriyle ilişkili oksidatif reaksiyonları gerçekleştiremezler. Sitoplazmik proteinin % 95' ten fazlası hemoglobin (Hb)' dir. Geriye kalanlar, üretimi için gerekli olanlar ile Hb' in fonksiyonel, indirgenmiş durumda kalmasını sağlayan enzimleri içerirler (68).

Eritrosit membranı, 6 nm kalınlığındadır; % 49 protein, % 44 lipid, % 7 karbohidrat içerir. Eritrosit membranındaki lipidler, diğer memeli plazma hücrelerinde olduğu gibi, hücre etrafında dayanıklı bir yapı oluşturmak üzere iki tabakalı bir yapı meydana getirmektedirler. İnsan eritrosit membran lipidlerinin % 25'ini kolesterol, % 60'ını fosfogliserid, % 5-10'unu glikolipid, geri kalanını kolesterol esterleri, serbest yağ asitleri, sülfatidler, triaçilgliseroller oluşturur. Fosfatidil kolinin 2/3'ü ve sfingomiyelinin % 80-85'i membranın dış yüzeyinde yer alır; fosfatidil serin ve fosfatidil etanolaminin % 80-90'ı membranın iç yüzeyinde yer alır; kolesterol ve glikolipidler membranın dış yüzeyinde bulunurlar (69).

Eritrositler, yaşamlarını korumak ve sürdürmek için gerekli enerjiyi glukozdan sağlarlar. Glukozun anaerobik glikoliz ve pentoz fosfat yolunda yıkılımı, eritrositlerin enerji gereksinimini karşılar. Glukozun pentoz fosfat yolunda yıkılımı sırasında NADPH oluşur. Hemoglobine oksijen bağlanması sırasında güçlü bir oksidan olan süperoksit anyonu oluşur. Son derece toksik olan süperoksit anyonu, süperoksit dismutaz (SOD) etkisiyle hidrojen perokside dönüşür. Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) de toksiktir; katalaz ve glutatyon peroksidaz



aktivitesiyle etkisiz hale getirilir. Hidrojen peroksidin glutatyon peroksidaz sayesinde etkisiz hale getirilmesi sırasında glutatyon (GSH) yükseltgenir ve yükseltgenmiş glutatyon (GSSG) haline dönüşür. Yükseltgenmiş glutatyonun indirgenerek yeniden kullanılabilir hale dönüşmesi için, pentoz fosfat yolunda elde edilen NADPH kullanılmaktadır. NADPH, methemoglobin yapısındaki üç değerlikli demirin yeniden kullanılmak üzere iki değerlikli demire indirgenmesinde de kullanılır (70).

Eritrositler endojen olarak lipid sentezi yapamadıkları için membran lipid kompozisyonları, plazma lipid kompozisyonundan direkt olarak etkilenir. Eritrosit membranı ile plazma arasında kolesterol ve dış tabakada yer alan fosfolipidlerin değiştirilmesi söz konusudur (71, 72).

### **2.5. Eritrosit-Hiperkolesterolemi-Fındık**

Plazma lipoproteinleri ile eritrosit membran lipidleri arasında sürekli lipid değişimi olmaktadır. Hiperkolesteroleminin eritrosit lipid kompozisyonunda değişikliğine neden olduğu bilinmektedir (9). Kolesterol miktarı artmış eritrositler, artmış hemoliz, nonelektrolit ve elektrolit geçirgenliğinde azalma, membran akışkanlığında ve enzim aktivitelerinde azalma gibi birçok anormal özellikler kazanır (9). Bilindiği gibi serbest radikaller ve oksidatif stres, eritrosit zarının yapısının ve fonksiyonunun bozulmasına neden olabilir (73). Nitekim hiperkolesterolemide eritrositlerin yapısının değişmesinin mekanizmalarından biri oksidatif streştir (10).

Normal erişkin eritrositleri çeşitli antioksidan savunma sistemleri sayesinde oksidatif strese dirençlidirler. Ancak plazmada yükselmiş kolesterol seviyesi prooksidan-antioksidan dengeyi prooksidasyon yönüne değiştirir ve eritrositlerde lipid peroksidasyonunda artış meydana gelir. Son yıllarda yapılan çalışmalarla fındıkta çok yüksek düzeylerde bulunan tekli doymamış yağ asidi oleik asidin kanda kolesterolün yükselmesini önlediği ve böylece kalp ve damar hastalıklarına karşı koruyucu etki gösterdiği tespit edilmiştir (3). Ayrıca fındıkta bulunan Vitamin E ve flavonoidler sayesinde plazmada antioksidan potansiyelin artabileceği gösterilmiştir (74). İnsanlarda günlük fındık tüketiminin eritrositlerdeki antioksidan sistemler üzerine etkisini inceleyen her hangi bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda fındığın eritrositlerde, antioksidan enzimlere etkisini araştırmayı amaçladık.

### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

Santrifüj	(EPPENDORF 5810)
Spektrofotometre	(SHIMADZU,UV-1601 UV/VİSİBLE SPECTROPHOTOMETER)
Etüv	(GALLENKAMP)
pH-metre	(HANNA INSTRUMENTS, HI 9321)
Vorteks	(IKA, GENIUS 3)
Manyetik Karıştırıcı	(IKAMAG RH)
Mikroplate Okuyucusu	(VERSAmax)
Hassas Terazı	(OERTLING NA164)
Dondurucu	(THERMA ELECTRON CORPARATION FORMA- 86C ULT FREEZER, VESTEL -20C FT280)
Soğutucu	(VESTEL RT 140B, ARÇELİK)
Kuartz Küvetler	(SİGMA)

### 3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kimyasalın Adı	Firma	Özelliği
Asetik Asit (%100)	Merck	60,05 g/mol
Di Sodyum Hidrojen Fosfat (+2H <sub>2</sub> O)	Merck	177,99 g/mol
Ditiyo Nitro Benzen (DTNB)	Sigma	396,3 g/mol
Etilendiamin Tetra Asetik Asit (disodyum tuzu) (EDTA)	Carlo-Erba	372,24 g/mol
Flavin Adenin Dinükleotid (FAD)	Sigma	829,51 g/mol
Glutasyon (GSSG) (okside form)	Sigma	612,63 g/mol
Glutasyon (GSH) (redükte form)	Sigma-Aldrich	307,32 g/mol
Glutasyon Redüktaz	Sigma	300 U
Hidrojen Peroksit (%50)	Sigma-Aldrich	34,01 g/mol
Hidroklorik Asit (%37)	Carlo-Erba	36,46 g/mol
Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat (NADPH) Roche		833,4 g/mol
Sodyum Arsenit	Sigma	129,9 g/mol
Sodyum Azit	Merck	65,01 g/mol
Sodyum Hidrojen Karbonat	Merck	84,01 g/mol
Sodyum Hidroksit	Riedel-deHaën	40,0 g/mol
Sodyum Klorür	Riedel-deHaën	58,44 g/mol
Potasyum Hekzasiyano Ferrat	Merck	329,26 g/mol
Potasyum Hidroksit	Merck	56,11 g/mol
Potasyum İyodür	Merck	166,0 g/mol
Potasyum Dihidrojen Fosfat	Merck	136,09 g/mol
Tiyobarbitürik Asit (TBA)	Sigma-Aldrich	144,15 g/mol
Trikloroasetik asit (TCA)	ABCR GmbH&Co.KG	163,39 g/mol

### 3.2. Metod

#### 3.2.1. Deneyin Planlanması ve Numunelerin Toplanması

Bu çalışma NCEP ATP III (National Cholesterol Education Programme Adult Treatment Panel III) kriterlerine göre ilaç tedavisi gerektirmeyen hafif hiperkolesterolemik (plazma kolesterol seviyesi  $>200$  mg/dL,  $\leq 240$  mg/dL) gönüllü bireyler üzerinde yapıldı. Çalışmada yaşları 27 ile 59 arasında değişen 17 erkek, 3 kadın toplam 20 kişi yer aldı. Çalışma grubunu oluşturacak kişilerin çalışmaya başlanmadan önce lipit profilleri belirlenerek, hiperlipidemik olup olmadıkları tespit edildi. Diyabet, obezite, hipertansiyon, koroner arter hastalığı ve başka sistemik hastalıkları olanlar ve düzenli ilaç kullananlar çalışma grubuna dahil edilmedi. Bireylere, vücut ağırlığı, belirlenen yağ yüzdeleri ve vücut kitle indeksine göre ideal kilolarına gelebilmeleri için başlangıçtan itibaren bir ay boyunca diyet uygulandı. Bu sürede enerji kısıtlaması yapılarak günlük alınması gereken kalori miktarlarına göre tüm besin gruplarıyla beslenmelerine dikkat edilip bu dönem adaptasyon diyeti dönemi olarak belirlendi. Takip eden ikinci bir aylık dönemde, mevcut kilo seviyeleri temel alınarak diyetlerine günlük enerji ihtiyaçlarının % 18- 20' sini fındıktan karşılayacakları şekilde diyet içeriği düzenlendi ve fındık ilave edilerek fındık diyeti uygulandı. Tüketilmesi gereken günlük fındık miktarının yarısı sabah saat 10.<sup>00</sup>-11.<sup>00</sup> arasında, diğer yarısı da öğleden sonra saat 15.<sup>00</sup>-16.<sup>00</sup> arasında olmak üzere ikiye bölündü. Çalışmanın üçüncü aylık dönemde ise eşdeğer kaloriye karşılık gelen fındıksız kontrol diyeti uygulandı. Bu dönemde bireylerin günlük diyetlerinden fındık çıkarılarak yerine enerji ihtiyaçlarını karşılayabilecekleri standart gıda ile yapıldı. Bireylerden çalışmanın başlangıcında, 30. günde, 60.günde ve 90. günde kan alındı.

Bir gecelik (12 saatlik) açlık dönemini takiben bireylerden antikoagülsüz ve 1 mg/mL EDTA içeren antikoagülanlı vakumlu tüplere yaklaşık 8 mL venöz kan alındı. Tüpler 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek serum ve plazmalar ayrılmıştır. Kalan hücreler eritrositlerde antioksidan enzimler ve lipid peroksidasyon ürünleri tayininde kullanılmak üzere 3 kez 10 mM PBS (pH 7,4) ile yıkanarak eritrosit paketleri elde edildi. Günlük analizler dışında kullanılacak örnekler – 80 °C'de saklandı.

#### 3.2.2. Biyokimyasal Parametreler

Serum toplam kolesterol (TK), trigliserid (TG), HDL-kolesterol (HDL-K), LDL-kolesterol (LDL-K) ölçümü ROCHE / HITACHI Modüler Sistem otoanalizöründe orijinal

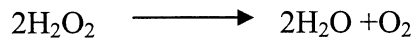
reaktifler kullanılarak gerçekleştirildi. Apolipoprotein AI (ApoAI), apolipoprotein B (ApoB) tayinleri nefolometre (DADE BEHRING, BN II) cihazı ile orijinal reaktifler kullanılarak monoklonal immünopresipitasyon prensibine dayanılarak yapıldı.

Otoanalizörlerde tayin edilen tüm parametreler günlük kalite kontrol uygulamalarının ardından yapıldı (75).

### 3.2.3. Antioksidan Enzimler

#### 3.2.3.1. Katalaz (KAT) Aktivite Tayini

Katalaz ( $H_2O_2$ :  $H_2O_2$  oksidoredüktaz, EC 1.11.1.6) aşağıdaki reaksiyonu katalizleyerek  $H_2O_2$ ' in oksijen ve suya parçalanması sağlar.



Katalaz aktivitesinin tayininde Aebi' nin metodu kullanıldı (76) ve 240 nm' de  $H_2O_2$ ' nin bozulmasından dolayı absorbansdaki düşme takip edilerek ölçüm yapıldı.

#### Çözeltilerin hazırlanması

1. Fosfat tamponu (pH 7,0), 50 mM;
  - a) 6,81 g  $KH_2PO_4$  deiyonize suda çözüldü hacmi 1 L' ye tamamlandı.
  - b) 8,90 g  $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ , deiyonize suda çözüldü hacmi 1 L' ye tamamlandı. a ve b çözeltileri 1: 1,5 oranında birbiri ile karıştırılarak fosfat tamponu hazırlandı.

2. Hidrojen peroksit, 30 mmol/L;

0,34 mL % 30' luk  $H_2O_2$  alınarak hacim fosfat tamponu ile 100 mL' ye tamamlandı (günlük hazırlandı).

#### Deneyin yapılışı

Paket eritrositler hemoglobin konsantrasyonu 5 g/dL olacak şekilde fosfat tamponuyla seyreltilerek hemolizatlar hazırlandı. Aşağıdaki tabloya göre pipetlemeler yapıldı.

Reaktifler	Kör (mL)	Numune (mL)
Fosfat tamponu	1	-
Numune	2	2
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	1

Hidrojen peroksit ilave edilir edilmez küvetler altüst edildi ve 30 sn süreyle her 10 sn' de bir kaydedilmek suretiyle 240 nm' de absorbansdaki düşüş izlendi. Başlangıç absorbans değeri yaklaşık 0,500 olması gerekir. Eğer absorbans bu değerin altında ya da üstünde ise H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' in konsantrasyonu yeniden ayarlanır. Deneyde kuartz küvet kullanıldı ve küvet içerisinde kabarcıklar oluşmamasına dikkat edildi.

#### Sonuçların hesaplanması

Katalaz aktivitesini belirtmede birinci derece reaksiyon hız sabiti (k) kullanılmaktadır. Buna göre 15 sn' lik zaman aralığı için aşağıdaki eşitlikten yararlanılarak aktivite hesaplaması yapıldı.

$$k = (2,3/15) \times \log(A_1/A_2) = 0,153 \times \log(A_1/A_2) \text{ (sn}^{-1}\text{)}$$

Burada;

A<sub>1</sub>: Başlangıç absorbansı

A<sub>2</sub>: 15 sn sonraki absorbans

Eritrositlerde hemoglobin başına aktivite hesabı (k/g Hb) yapıldı seyreltme faktörü ile çarpıldı. Yapılan çalışmalar ile (n=5) deney içi (within-run) hassasiyeti (%CV) 3,2 olarak bulundu.

#### **3.2.3.2. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivite Tayini**

Glutasyon peroksidaz (glutasyon: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oksidoredüktaz, EC 1.11.1.9), hidrojen peroksit tarafından redükte glutasyonun (GSH), okside glutatona (GSSG) yükseltgenmesini katalizler (reaksiyon 1). GSH-Px reaksiyonunda oluşan GSSG, glutasyon redüktaz (GR) ve NADPH yardımıyla GSH' a indirgenir (reaksiyon 2). GSH-Px aktivitesi, Beutler' ın metoduna göre (77) NADPH' ın NADP<sup>+</sup> ye yükseltgenmesi sırasında absorbans farkının 340 nm' de okunmasıyla ölçüldü.



### Cözeltilerin hazırlanması

1. Fosfat tamponu (pH 7,0), 1 M;  
6,8045 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  tartıldı yaklaşık 200 mL deiyonize suda çözülerek pH' sı 1 N KOH ile 7,0' a ayarlandı son hacim deiyonize suyla 500 mL' ye tamamlandı.
2. Glutasyon (redükte form) (GSH), 0,1 M;  
0,1537 g GSH 5 mL deiyonize suda çözüldü.
3. EDTA, 0,2 M;  
0,3722 g EDTA 5 mL deiyonize suda çözüldü.
4. Glutasyon redüktaz, 10 U/L;  
416,67  $\mu\text{L}$  orijinal şişeden alınarak hacim 10 mL' ye tamamlandı.
5. Na-azit, 0,4 M;  
0,13 g Na-azit 5 mL deiyonize suda çözüldü.
6. NADPH, 2 mM;  
16,67 mg NADPH 10 mL deiyonize suda çözüldü.
7.  $\text{H}_2\text{O}_2$ , % 50 (w/w), 10 mM;  
3,1  $\mu\text{L}$  orijinal şişeden alınarak deiyonize suyla 5 mL' ye fosfat tamponuyla tamamlandı.
8. Ferrisiyanür-Siyanür çözeltisi:  
100 mg NaCN ve 300 mg  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  1 L deiyonize suda çözüldü. Bu çözelti eritrosit hemolizati hazırlanmasında, 1 hacim eritrosit paketi, 19 hacim ferrisiyanür-siyanür olacak şekilde kullanıldı. Glutasyon, glutasyon redüktaz, NADPH ve  $\text{H}_2\text{O}_2$  çözeltileri günlük hazırlandı. Çalışma süresince tüm reaktifler  $+4^\circ\text{C}$ ' de saklandı.

Deneyin yapılışı

Aşağıdaki tabloya göre pipetlemeler yapıldı.

Reaktifler	Kör (µL)	Numune (µL)
Fosfat tamponu	100	100
GSH	10	10
EDTA	20	20
Glutasyon redüktaz	100	100
Na-azit	10	10
NADPH	100	100
Numune	-	20
Deiyonize su	660	640
37° C' de 10 dk. inkübasyon		
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10	10

Bir dakikalık bir gecikme fazından sonra 37°C' de 6 dk.' lık süreyle absorbandsdaki değişim takip edildi.

Sonuçların hesaplanması

$$\text{Enzim aktivitesi (U/L)} = \frac{\Delta A}{\text{dk}} \times \frac{V_t \times 10^6}{\epsilon \times \ell \times V_s}$$

Burada  $V_t$  : Toplam reaksiyon hacmi (mL)

$V_s$  : Numune hacmi (mL)

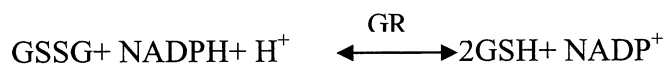
$\epsilon$  : Molar absorbtivite katsayısı ( $\epsilon_{\text{NADPH}} = 6300 \text{ L/mol/cm}$ )

$\ell$ : Işık yolunun uzunluğu (cm )

Eritrositlerde U/g Hb olarak aktivite belirlendi. Yapılan çalışmalar ile (n=5) deney içi (within-run) hassasiyeti (%CV) 6,1 olarak bulundu.

**3.2.3.3. Glutasyon Redüktaz (GR) Aktivite Tayini**

Glutasyon redüktaz (GR) (NADPH: okside glutasyon oksidoredüktaz, EC 1.6.4.2); okside glutasyonun NADPH varlığında redükte glutatyona dönüşümünü katalizler.





Reaksiyon çift yönlü olmasına rağmen daha çok sağa doğrudur. Goldberg ve Spooner'ın metoduna (78) göre, katalitik aktivite oksidasyondan dolayı NADPH' daki azalma 340 nm' de takip edilerek kinetik olarak ölçüldü.

#### Cözeltilerin hazırlanması

1. Fosfat tamponu (pH 7,2), 0,12 M;

4,083 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 100 mL deiyonize suda çözüldü ve pH 1 N KOH ile 7,2 ye ayarlandı. Son hacim deiyoniz suyla 250 mL' ye tamamlandı.

2. EDTA, 15 mM;

55,8 mg EDTA tartıldı ve 10 mL deiyonize suda çözüldü.

3. Flavin adenin dinükleotid, 0,15 mM;

1,7 mg FAD (disodyum tuzu) 10 mL deiyonize suda çözüldü.

4. Glutasyon (okside form)(GSSG), 65,3 mM;

240,2 mg GSSG tartıldı ve 6 mL deiyonize suda çözüldü.

5. NADPH, 9,6 mM;

24,2 mg NADPH, % 1' lik 3 mL  $\text{NaHCO}_3$  çözeltisinde çözüldü.

FAD çözeltisi  $+4^\circ\text{C}$ ' de 2 hafta kadar saklanabilir. NADPH ve GSSG çözeltileri çalışmadan hemen önce hazırlandı.

Eritrosit hemolizati, 1 hacim eritrosit paketi, 19 hacim fosfat tamponu olacak şekilde hazırlandı.

#### Deneyin yapılışı

Aşağıdaki tabloya göre pipetlemeler yapıldı.

Reaktifler	Kör ( $\mu\text{L}$ )	Numune ( $\mu\text{L}$ )
Fosfat tamponu	1350	1300
EDTA	50	50
FAD	50	50
GSSG	50	50
Numune	-	50
	37° C' de 5 dk. İnkübasyon	
NADPH	25	25

NADPH ilavesiyle 1 dk.' lık bir gecikme fazından sonra  $37^\circ\text{C}$ ' de 6 dk. boyunca 340 nm' de absorbans değerleri okundu.

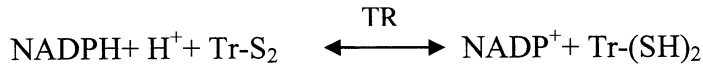
### Sonuçların hesaplanması

Glutasyon redüktaz aktivitesi (U/L)=  $F_1 \times \Delta A/dk. = 4,37 \times 10^3 \times \Delta A/dk.$

Eritrositlerde U/g Hb olarak aktivite belirlendi. Yapılan çalışmalar ile (n=5) deney içi (within-run) hassasiyeti (%CV) 1,9 olarak bulundu.

### **3.2.3.4. Tiyoredoksin Redüktaz (TR) Aktivite Tayini**

Tiyoredoksin redüktaz, tiyoredoksinin NADPH bağımlı indirgenmesini katalizler.



Aktivite tayini Holmgren ve Bjornstedt metodu (79) modifiye edilerek ölçüldü.

### Çözeltilerin hazırlanması

1. Fosfat tamponu(pH7,5), 100 mM;

1,361 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 50 mL deiyonize suda çözüldü ve 1 N KOH ile pH 7,5'e ayarlandı, son hacim deiyonize suyla 100 mL' ye tamamlandı.

2. EDTA, 2 mM;

37,3 mg EDTA 50 mL hazırlanan fosfat tamponunda çözüldü.

3. NADPH, 0,2 mM;

83,4 mg NADPH 50 mL hazırlanan fosfat tamponunda çözüldü.

4. Ditiyo nitro benzen (DTNB), 3 mM;

59,4 mg DTNB 50 mL hazırlanan fosfat tamponunda çözüldü.

Tartılan 2.,3., ve 4. kimyasalların tümü 50 mL fosfat tamponunda çözüldü ve bir reaksiyon karışımı elde edildi. Eritrosit hemolizati, 1 hacim eritrosit paketi, 19 hacim fosfat tamponu olacak şekilde hazırlandı.

### Deneyin yapılışı

Aşağıdaki tabloya göre mikropleyte pipetleme yapıldı.

<b>Reaktifler</b>	<b>Kör(μL)</b>	<b>Numune(μL)</b>
dHO	15	-
Numune	-	15
Reaktif karışımı	285	285

412 nm' de oda sıcaklığında 4 dk. okuma yapıldı.

### Sonuçların hesaplanması

$$\text{Enzim aktivitesi (U/L)} = \frac{\Delta A}{dk} \times \frac{V_t \times 10^6}{\epsilon \times \ell \times V_s}$$

Burada  $V_t$  : Toplam reaksiyon hacmi (mL)

$V_s$  : Numune hacmi (mL)

$\epsilon$  : Molar absorbtivite katsayısı ( $\epsilon_{\text{DTNB}} = 6350 \text{ L/mol/cm}$ )

$\ell$  : Işık yolunun uzunluğu (cm )

Eritrositlerde U/g Hb olarak aktivite belirlendi. Yapılan çalışmalar ile (n=5) deney içi (within-run) hassasiyeti (%CV) 6,9 olarak bulundu.

### **3.2.4. Eritrositlerde MDA Tayini**

Eritrositlerde MDA tayini, Stocks ve Dormandy' nin metoduna (80) göre yapıldı. Numunelerde bulunan bir peroksidasyon ürünü olan malondialdehit (MDA)' in tiyobarbitürik asit (TBA) ile asidik ortamda ısıtılması sonucu oluşan pembe renkli kompleksin optik dansitesi ölçüldü. Bu nedenle MDA, TBARS (Tiobarbituric Acid Reactive Substance) olarak belirlendi.

### Çözeltilerin hazırlanması

1. Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS tamponu);

1,76 mL 0,5 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ve 6,08 mL 0,5 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  karıştırılarak 100 mL' ye deiyonize suyla seyreltildi. Bu çözelti % 0,9' luk NaCl çözeltisiyle 500 mL' ye tamamlandı, 1 N KOH ile pH 7,4' e ayarlandı ve % 0,9' luk NaCl çözeltisiyle tampon 1 L' ye tamamlandı.

2. Azit ( $\text{N}_3$ )' li PBS tamponu, (0,4 M  $\text{NaN}_3$ );

2,60 g  $\text{NaN}_3$  100 mL PBS tamponuyla çözüldü.

3. TBA çözeltisi;

500  $\mu\text{l}$  1 N NaOH çözeltisine 0,1 g TBA ilave edildi, 4 mL deiyonize su eklendi. Önce ısıtıldı ve sonra soğutulularak son hacim deiyonize suyla 10 mL' ye tamamlandı.

4. TCA çözeltisi;

14 g TCA tartıldı 50 mL deiyonize suda çözüldü.

5. TCA-Arsenit çözeltisi

0,52 g Na-arsenit 20 mL TCA çözeltisinde çözüldü.

#### 6. Standart Çözeltileri;

Standartlar 10, 5, 2,5, 1,25, 0 nmol/ mL olacak şekilde hazırlandı.

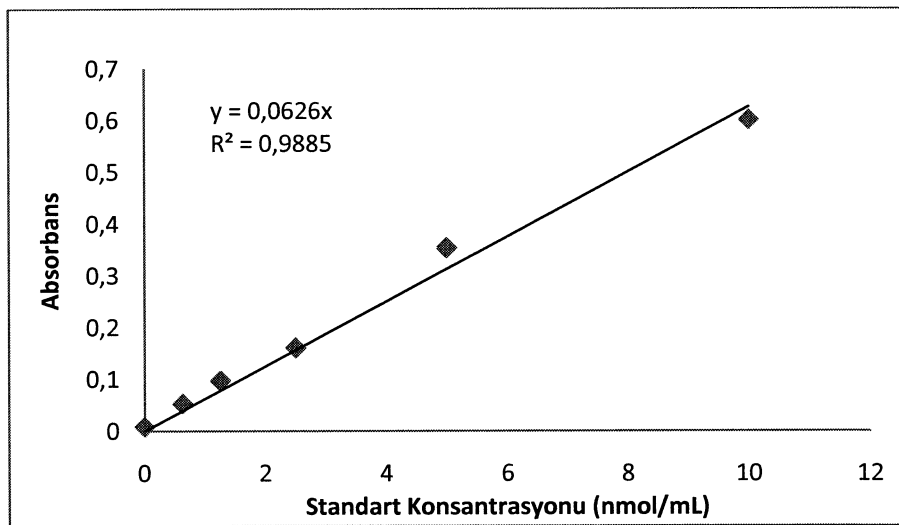
164,7 µL TMP (1,1,3,3- tetrametoksipropan) alınıp, 0,01 M HCl ile çözülerek hacmi 100 mL ye tamamlandı, 50 °C de 1 saat inkübe edildi. Bu stok çözeltiden deiyonize su ile seri dilisyonlar yapılarak standartlar hazırlandı.

#### Deneyin yapılışı

Eritrosit paketleri 3 g/dL olacak şekilde azitli PBS tamponuyla seyreltildi (yaklaşık olarak 1 hacim eritrosit paketine karşılık 9 hacim azitli PBS tamponu ile dilue edildi). 37°C' de 10 dk. karıştırıldı. 1 mL hemolizat üzerine 500 µL PBS tamponu eklendi ve 2 saat 37°C' de inkübasyona bırakıldı. 300 µL hücre süspansiyonuna 200 µL TCA-arsenit çözeltisi eklenerek 10 dk. 3000 rpm de santrifüj edildi. 300 µL süpernatant başka bir tüpe alındı, numuneler ve standartlar üzerine 100 µL TCA ve 100 µL TBA eklendi. 15 dk. kaynar su banyosunda bekletildi. Soğutulduktan sonra kabarcıklar oluşturmadan mikropipetle aktarıldı ve 532 ve 600 nm' de absorbanları okundu.

#### Sonuçların hesaplanması

ΔA değerleri bulundu, standart grafiği çizildikten sonra numunelerin konsantrasyonları nmol TBARS/g Hb cinsinden hesaplandı. Yapılan çalışmalar ile (n=5) deney içi (within-run) hassasiyeti (%CV) 6,6 olarak bulundu.



Şekil 4. Eritrosit MDA seviyesi için standart grafiği

### 3.2.5. İleri Oksidasyon Protein Ürünü Ölçümü (AOPP)

İleri oksidasyon protein ürünü seviyesini belirlemek için Witko ve ark. kullandığı metod uygulandı (81). Bu metod 340 nm' de spektrofotometrik okuma esasına dayanır.

#### Cözeltilerin hazırlanması

1. PBS tamponu (pH 7,4);

0,8 g NaCl, 0,02 g KCl, 0,02 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve 0,139 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 50 mL deiyonize suda çözüldü, pH 7,4' e ayarlandıktan sonra hacim 100 mL' ye tamamlandı.

2. KI;

4,81 g KI 25 mL deiyonize suda çözüldü.

3. Asetik asit;

Asetik asit saf olarak kullanıldı.

#### Deneyin yapılışı

Aşağıdaki tabloya göre pipetlemeler yapıp 340 nm' de absorbansları okundu.

Reaktifler	Kör ( µL)	Numune ( µL)
PBS	750	600
Numune	-	150
KI	37,5	37,5
2 dakika bekletildi.		
Asetik Asit	75	75

340 nm' de absorbansları okundu.

#### Hesaplamalar

İleri oksidasyon protein ürünü aktivitesi µmol/g Hb olarak belirlendi. Yapılan çalışmalar ile (n=5) deney içi (within-run) hassasiyeti (%CV) 7,2 olarak bulundu.

$$\text{İleri Oksidasyon Protein Ürünü Aktivitesi}(\mu\text{mol/ L}) = \Delta A \times \frac{V_t \times 10^6}{\epsilon \times b \times V_s}$$

Burada, V<sub>t</sub>: Toplam reaksiyon hacmi (mL)

V<sub>s</sub>: Numune hacmi (mL)

ε: molar absorbtivite katsayısı (ε = 26,1 mM<sup>-1</sup>)

b: Işık yolunun uzunluğu (cm)

### 3.3. İstatistiksel Analizler

Her dört döneme ait değerler aritmetik ortalama ve standart sapma ( $X \pm SD$ ) olarak ifade edildi. Parametrelerin normal dağılıma uygunluğu “Kolmogorov-Simirnov” testi yapılarak belirlendi. Normal dağılıma uyan parametreler “Tekrarlı ölçümlerde tek yönlü varyans analizi” yapılarak değerlendirildi. Grup içi parametreler arasındaki ilişki ve yüzde değişimler arasındaki ilişki “Pearson” veya “Spearman” korelasyon testi kullanılarak incelendi.  $p < 0,05$  değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. “Tekrarlı ölçümlerde tek yönlü varyans analizi” yapılarak değerlendirilen parametreler için “F” değerleri verilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Çalışma Grubunun Demografik Verileri ve Başlangıç, 30.Gün, 60.Gün ve 90.Güne Ait Parametrelerin Ortalama Değerleri

Çalışma grubuna ait demografik veriler “Dislipidemik Bireylerde Fındık Tüketiminin Plazma Lipidleri, Lipoproteinleri Ve Bunların Alt Birimleri, LDL Oksidasyon Kapasitesi, Plazma Oksidan- Antioksidan Kapasiteleri Üzerine Etkileri” başlıklı projenin kapsamında yer alan “Fındık Tüketen Hiperkolesterolemik Bireylerden Elde Edilen HDL’ nin LDL Oksidasyonu Üzerine Etkisinin İncelenmesi” isimli yüksek lisans tezinden bu çalışmanın ön bulguları niteliğinde yararlanılmıştır (75).

Parametreler tablo 5.’ de belirtilmiştir. Çalışmada yer alan bireylerin vücut kitle indeksleri 60. gün ve 90. günde 30. güne göre anlamlı olarak azaldı (  $F_{kg} = 37,831$ ,  $P_{kg} = 0,000$ )(  $F_{BMI} = 34,552$ ,  $P_{BMI} = 0,000$ ).

**Tablo 5.** Çalışma Grubuna Ait Demografik Veriler.

Yaş (yıl)	Cinsiyet (E/K)	Başlangıç	30.gün	60. gün	90. gün
Vücut Ağırlıkları (kg)					
43±9	17/3	83,2 ± 14,79	81,5 ± 14,3	79,5 ± 13,7*	79,8 ± 14,1*
Vücut Kitle İndeksi (kg/m <sup>2</sup> )					
		28,2 ± 3,29	27,5 ± 3,17	26,9 ± 3,10*	26,9 ± 3,10*

\*30. Gün değerine göre 60. ve 90. günlerde istatistiksel olarak anlamlı azalış vardır.

Çalışma grubuna ait rutin biyokimya parametreleri tablo 6.' da görülmektedir. Toplam TG, kolesterol ve LDL-K düzeylerinde 60. günde anlamlı bir azalış görüldü. HDL-K aktivitesinde 60. günde gözlenen artış ve 90. günde gözlenen azalış anlamlı bulunmadı. Apo B düzeyinde 60. günde bir azalma görüldü ama istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Apo AI düzeylerinde 60. ve 90. günlerde, Apo B düzeyinde ise 90. günde anlamlı bir artış görüldü.



**Tablo 6.** Çalışma Grubunun Dört Döneme Ait Serum Lipid Ve Lipoprotein Parametreleri.

	Başlangıç	30. gün	60. gün	90. gün	F*	P*	Fırdık diyeti % değişim	Kontrol diyeti % değişim	P
<b>TK</b> (mg/dL)	239 ± 18	216 ± 23	199 ± 25 <sup>a,b</sup>	214 ± 22	15,245	0,002	-8,03 ± 6	8,6 ± 12	0,001
<b>TG</b> (mg/dL)	205 ± 136	164 ± 116	145 ± 102 <sup>a</sup>	152 ± 90	5,182	0,039	-12,7 ± 15	8,6 ± 33	0,034
<b>HDL-K</b> (mg/dL)	40 ± 6	42 ± 7	44 ± 9	43 ± 8	2,63	0,127	3,84 ± 7	-1,3 ± 10	0,143
<b>LDL-K</b> (mg/dL)	165 ± 25	150 ± 28	137 ± 28 <sup>a,b</sup>	148 ± 22	13,31	0,003	-8,2 ± 7	9,3 ± 13	0,001
<b>Apo AI</b> (mg/dL)	135 ± 14	128 ± 17	133 ± 19 <sup>a</sup>	140 ± 15 <sup>a</sup>	6,178	0,026	4,7 ± 15	6,9 ± 13	0,669
<b>Apo B</b> (mg/dL)	132 ± 18	113 ± 14	111 ± 20	122 ± 20 <sup>a</sup>	4,984	0,042	-1,5 ± 13	11 ± 18	0,039

p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi, a; 30. gün değerine göre anlamlıdır, b; 90. gün değerlerine göre anlamlıdır. \*“Tekrarlı ölçümlerde varyans analizi” ne göre “p” ve “F” değerleri

**Tablo 7.:** Çalışma Grubunun Dört Döneme Ait Eritrosit Oksidan- Antioksidan Sistem Parametreleri.

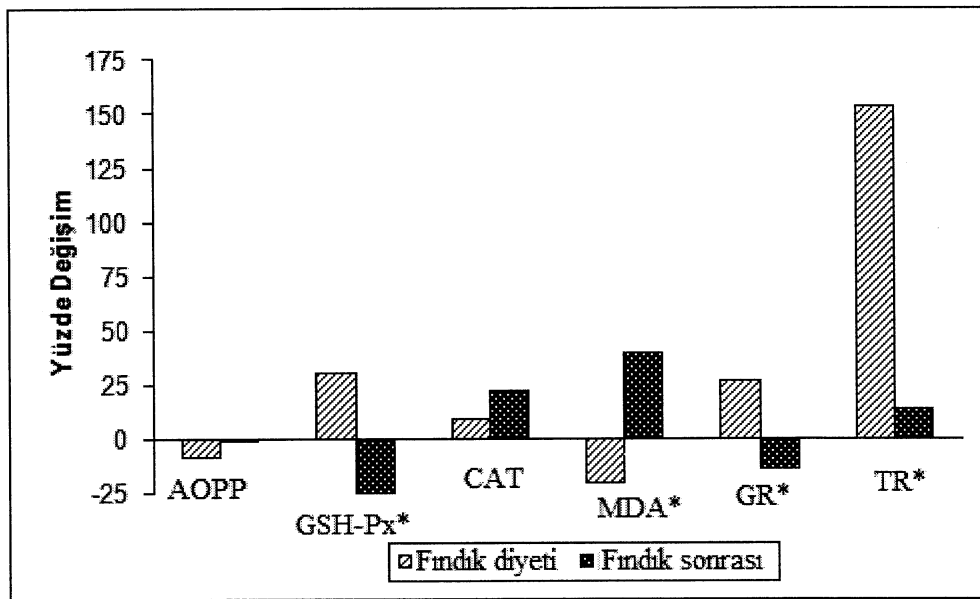
	Başlangıç	30. Gün	60. Gün	90. Gün	P*	F*	$\chi^2$ *	Fındık diyeti % değişim	Fındık sonrası % değişim	P*
AOPP ( $\mu\text{mol/g Hb}$ )	14±1,4	16±3,6	14±1,2	14±1,2	0,301	1,133	-	-8,6±18,3	-0,2±13	0,167
MDA (nmol TBARS/g Hb)	31±8,0	27±6,7	21±6,3 <sup>a,b</sup>	29±10 <sup>c</sup>	0,001	13,802	-	-21±17	39±47	0,000
GSH-Px (U/g Hb)	8,8±2,4	10±1,9 <sup>a</sup>	13±1,8 <sup>a</sup>	9,7±1,7 <sup>c</sup>	0,003	11,664	-	30±22	-24±14	0,000
GR (U/g Hb)	4,3±0,9	4,4±1,1	5,3±1,0 <sup>a,b</sup>	4,5±0,9 <sup>c</sup>	0,005	9,9	-	27±33	-15±18	0,001
TR (U/g Hb)	0,5±0,2	0,8±0,4 <sup>a</sup>	1,5±0,5 <sup>a,b</sup>	1,6±0,4 <sup>a,b</sup>	0,011	7,891	-	153±142	13±39	0,001
Katalaz (k/g Hb)	132±19	119±14 <sup>a</sup>	128±29	152±34 <sup>b,c</sup>	0,021	-	9,72	9,0±27	21±31	0,277

p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi, a; başlangıç değerine göre anlamlıdır, b; 30. gün değerlerine göre anlamlıdır, c; 60. gün değerlerine göre anlamlıdır.

\*“Tekrarlı ölçümlerde varyans analizi” ne göre “p” ve “F” değerleri.

\*\*“Friedman Testi” ne göre  $\chi^2$  değerleri.

Tablodaki verilere göre AOPP değerlerinde anlamlı değişimler bulunmamaktadır. MDA sonuçlarında; 60.gün değerleri başlangıca göre anlamlı düşüş gösterirken 90.gün değerleri 60.güne göre anlamlı derecede artmıştır. Glutasyon peroksidaz ve glutasyon redüktaz değerleri başlangıca göre 60.gün değerleri anlamlı artış gösterirken 90.gün değerleri 60.güne karşılık azalma göstermektedir. Tiyoredoksin redüktazda ise hem başlangıca göre 60.gün değerleri hem de 60.güne karşılık 90.gün değerleri anlamlı artış göstermektedir. Katalaz sonuçlarında başlangıca karşılık 60.gün değerlerinde ve 60.güne karşılık 90.gün değerlerinde artış görülmektedir. Şekil 4.'te Kontrol diyeti ve fındık diyetine ait yüzde değişim grafiği verilmiştir.



Şekil 5. Fındık diyeti ve fındık diyetinden sonrasına ait yüzde değişim grafiği.

\*P<0,05

AOPP: İleri protein oksidasyon ürünleri, GSH-Px: Glutasyon peroksidaz, CAT: Katalaz, MDA: Malondialdehit, GR: Glutasyon redüktaz, TR: Tiyoredoksin redüktaz.

#### 4.3. Çalışma Grubunda Eritrosit Oksidan- Antioksidan Sistem Parametrelerinin % Değişim Korelasyonları

Kontrol diyetindeki % değişimlerde; glutasyon redüktaz ve katalaz arasında ( $r = 0,58$ ;  $P = 0,008$ ), tiyoredoksin redüktaz ile glutasyon peroksidaz arasında ( $r = 0,50$ ;  $P = 0,025$ ) ve pozitif korelasyon olduğu bulunmuştur.

## 5. TARTIŞMA

Ağaçta yetişen sert kabuklu meyveler (yer fıstığı hariç) genel olarak “nut” başlığı altında toplanmışlardır. Bu meyveler besin içeriği olarak benzer özelliklere sahiptirler. Sert kabuklu meyveler, karbohidrat, protein ve yağ içeriği bakımından değerli besin kaynaklarıdır. Yapılan pek çok çalışmada plazma kolesterol düzeyleri üzerine sert kabuklu meyvelerin (badem, ceviz, fındık gibi) tüketiminin etkileri değerlendirilmiştir (1). Günlük 84-100 g sert kabuklu meyve tüketiminin serum total kolesterol düzeyini % 10-20 azalttığı bununla beraber sert kabuklu meyve içeriği yüksek diyetlerin total kolesterol / HDL-K oranını da düşürdüğü gösterilmiştir (2).

Fındık ülkemiz için ekonomik değeri olan ve sıklıkla kullanılan ve insan beslenmesi üzerine olumlu etkileri olan sert kabuklu meyvelerden biridir. Fındık bitkiler aleminde Fagales takımının Betulaceae familyasından Corylus cinsine aittir. Fındık yağ ve protein açısından zengin bir besindir. 100 g iç fındık, 55 - 66 g yağ, 11 - 15 g protein, 12 - 17 g karbohidrat, 8 - 10 g lif içerir ve yaklaşık 650 kcal. enerji sağlar. Fındık yağı bileşimi üzerine yapılan çalışmalarda içerik olarak zeytinyağına benzediği ve tüm çeşitlerde en fazla oleik asidin (18:1) bulunduğu belirlenmiştir. Ayrıca, sırasıyla linoleik (18:2), palmitik (16:0), stearik (18:0) ve linolenik (18:3) asitlerin de bulunduğu belirtilmiştir (20).

Fındığın sağladığı enerjinin % 62' si yağdır. Proteinden de zengin (12,6-19,6 g / 100 g) olan fındık, bitkisel kaynaklı diğer besinlerle kıyaslandığında, protein kalitesi yüksek bir besin olarak değerlendirilir. Bitkisel kaynaklı besinler içinde en fazla demir (% 3,4-4,99) içeren ve E vitamini gereksinmesinin % 100' ünü ve B<sub>6</sub> vitaminin % 25' ini karşılar (21).

NCEP ATP III (National Cholesterol Education Programme Adult Treatment Panel III) kriterlerine göre ilaç tedavisi gerektirmeyen hiperkolesterolemik gönüllü bireylerde her

gün düzenli fındık tüketiminin serum ve plazmada oksidan–antioksidan denge üzerine etkisini incelemeyi amaçladığımız bu çalışma gönüllü şahıslar üzerinde yapılmıştır. Çalışmaya yaşları 27 ile 59 arasında değişen 17 erkek, 3 kadın toplam 20 kişi katılmıştır. Kişilerin anamnezlerinde fındık alerjilerinin olmamasına dikkat edilmiş ve çalışmaya katılımlarında gönüllülük esas alınmıştır. Şahıslara, ölçülen vücut kitle indeksi ve vücut ağırlığına göre, ideal sınırlara gelebilmeleri için başlangıçtan itibaren bir ay boyunca adaptasyon diyeti uygulanmıştır. Takip eden ikinci bir aylık dönemde diyetlerine enerji ihtiyacının % 18-20' sini karşılayacak şekilde fındık eklenmiştir. Son dönemde ise eşdeğer kalorigen fındıksız kontrol diyeti uygulanmıştır. Fındığın normal öğünlerle alınan besinlerle etkileşimini azaltmak için günlük fındık alımını ikiye bölünmüş, birinci doz sabah ile öğle saatleri arasında, ikinci doz ise öğle ve akşam saatleri arasında alınmış, su dışında ilave içecek ve gıda alımına müsaade edilmemiştir. Bu uygulamayla literatürde ağaçta yetişen sert kabuklu meyvelerle yapılan çalışmalarda uygulanmış olan çalışma süresi, fındığın tüketim miktarı ve tüketim şeklinin standardize edilmesi amaçlanmıştır. Fındığın yağlı bir yiyecek olması sebebiyle düzenli tüketiminin vücut ağırlığında artışa neden olabileceği düşünülebilir. Lipid profili, plazma LDL oksidasyonu, HDL oksidasyonu ve fındık tüketen hiperlipidemik bireylerden elde edilen HDL' nin LDL oksidasyonu üzerine etkisinin incelendiği çalışma dahilinde olup tez kapsamı dışında olan çalışmamız tamamlandığında vücut ağırlığı ve vücut kitle indeksinde anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Çalışmada yer alan bireylerin vücut kitle indeksleri ve vücut ağırlıkları fındık diyeti sonrasında anlamlı olarak azalmıştır (75). Literatürdeki çalışmalara bakıldığında, normolipidemik bireylerde yapılan bir çalışmada fındığın günlük diyetlerine kalori ihtiyaçlarının yaklaşık % 10-20 kadarı bir ek kalori sağlamasına rağmen bireylerde kilo artışı yapmadığı, çalışma tamamlandığında vücut kitle indekslerinin değişmediği gözlenmiştir (29). Durak ve ark (28), sağlıklı bireylerin normal diyetlerine günde kilogram başına 1 g olacak şekilde 30 gün boyunca fındık eklenerek gerçekleştirdikleri çalışmada vücut ağırlığının değişmediği gözlemlenmiştir. Koçyiğit ve ark. sağlıklı normolipidemik bireylerde antep fıstığı tüketiminin plazma lipid profili ve oksidatif durumu üzerine olan etkilerini incelemişlerdir. Bireyler aldıkları günlük kalori miktarının %20' sini oluşturacak şekilde 3 hafta boyunca antep fıstığı tüketmiş ve sonuçta vücut kitle indekslerinin değişmediği saptanmıştır (17). Ağaçta yetişen sert kabuklu meyvelerin sık tüketiminin tokluk hissini arttırması, yüksek miktardaki protein ve doymamış yağ asidi içeriği nedeni ile dinlenme halinde metabolik hızı arttırması ve yetersiz sindirilmeleri nedeni ile fekal

yağ kaybının artıp kullanılabilir enerjinin azalması kilo kaybının sebepleri olarak düşünülmektedir (82, 83, 84).

Minnesota Kalp Çalışmasından (85) elde edilen sonuçlara göre, günlük diyetten gelen yağın (total enerjinin % 39' u) % 5-15' i çoklu doymamış yağ asitlerinden, % 9-18' i doymuş yağ asitlerinden gelecek şekilde düzenlenen diyet ile total kolesterol seviyesinin % 14 oranında azaldığı gösterilmiştir. Bir başka çalışmada da (86), doymuş yağlardan gelen kalorinin ağaçta yetişen sert kabuklu meyvelerden sağlanmasının TK ve LDL-K düşürdüğü açıklanmıştır.

Ağaçta yetişen sert kabuklu meyveler bitkisel yağlardan sonra en zengin yağ içeriğine sahip doğal bitkisel yiyeceklerden biridir. Yağ asidi kompozisyonları açısından olumlu yanları doymuş yağ asidi içeriğinin 0,5' ten düşük olmasıdır. Bunun yanında toplam yağ asidi içeriğine bakıldığında neredeyse yarısını doymamış yağ asitleri oluşturur ve bu da tekli doymamış yağ asitlerini (oleik asit) gösterir. Ağaçta yetişen sert kabuklu meyvelerden özellikle cevizde çoklu doymamış yağ asitleri de (linoleik asit ve  $\alpha$ -linolenik asit) bulunur (87). Yapılan çalışmalarla fındıkta çok yüksek düzeylerde bulunan tekli doymamış yağ asidi oleik asidin (% 82 oleik asit, % 12 linoleik asit, % 15 palmitik asit ve %1 stearik asit) kanda kolesterolün yükselmesini önlediği ve böylece kalp ve damar hastalıklarına karşı koruyucu etki gösterebileceği ileri sürülmektedir (3). Sert kabuklu meyvelerin tüm yiyecekler arasında kardiyovasküler açıdan faydalı etkileri olduğu desteklenmektedir. Epidemiyolojik çalışmaların büyük bir çoğunluğu sık olarak sert kabuklu meyve tüketiminin koroner kalp hastalıklarını azalttığını belirtmektedir (88, 89). Beslenme üzerine yapılan çalışmalar açıkça gösterir ki, sağlıklı beslenmenin bir parçası olarak her türlü sert kabuklu meyve tüketiminin kolesterol düşürücü etkisi vardır (87). Bu çalışmada serum toplam kolesterol düzeylerinde fındık diyeti sonrasında önemli ölçüde azalma, (% 8,03,  $p<0,05$ ) LDL-K (%8,1) ve TG (%12,7) düzeylerinde serum total kolesterol düzeyleri gibi önemli ölçüde azalma belirlenmiştir. Fındıkta MUFA miktarının yüksek olması özellikle oleik asit içermesi nedeniyle kandaki lipid parametreleri üzerine olumlu etki yapması beklenen bir sonuçtu. Yine Alper ve Mattes sağlıklı yetişkinler üzerinde yaptıkları çalışmada düzenli yer fıstığı tüketiminin serum trigliserid düzeyini düşürdüğünü, bunun yanı sıra toplam kolesterol, LDL kolesterol ve HDL kolesterol düzeylerini değiştirmedeğini bulmuşlardır (14). E vitamini plazmada esas olarak LDL ile taşınır ve diğer dokularda olduğu gibi plazma E vitaminininin % 90 gibi büyük bir kısmını  $\alpha$ -tokoferol oluşturur. Fındık ve fındık yağı E vitamininin en iyi

doğal kaynaklarından biridir. Her gün sadece 25-30 g fındık, günlük E vitamini ihtiyacının önemli bir kısmını karşılamaktadır (20). Fındık içeriğindeki yüksek E vitamini sebebiyle güçlü antioksidan özellik gösterir. E vitamini aterosklerotik ve diğer patolojik durumlar açısından hasarların oluşumunu engelleyici ya da hasarlara karşı koruyucu etki gösterir. Oksidatif stres sonucu oluşabilecek monositlerdeki serbest oksijen türlerine karşı mücadelesinde öncü rol oynarlar (82). Vitamin E çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna sebep olan zincir reaksiyonlarının sonlanmasında peroksil radikalının yakalanmasında antioksidan olarak fonksiyon görür (90, 91). Bu özelliğiyle lipid peroksidasyonunda MDA (malondialdehit) üzerinde etkilidir. Malondialdehit (lipid oksidasyonu ürünü, MDA), lipid peroksidasyonunun son ürünlerindedir. Serbest radikallerin etkisiyle membran lipidlerinin peroksidasyonu sonucu oluşan MDA, membran yapı ve fonksiyonunun bozulmasına neden olabilir (28).

Hatipoğlu ve arkadaşlarının tavşanlar üzerinde fındık yağının etkilerini gözlemek amacıyla yaptıkları çalışmada (92); plazma, karaciğer ve aortada MDA seviyeleri değerlendirildi. Kolesterol ve kolesterol ile birlikte fındık yağı verilen gruplar karşılaştırıldığında her üç dokuda da, fındık yağı yedirilen grupların MDA değerleri anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Yapılan başka bir çalışmada fındık ve bademin beyin dokusunda lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği ve MDA değerlerini düşürdüğü gösterilmiştir (93).

Fıstık üzerine yapılan bir çalışmada ise, 44 sağlıklı kişiye fıstık diyeti uygulanmıştır. Diyet öncesi ve diyet sonrası kişilerin serum lipid parametreleri ve serum antioksidan potansiyelleri ile MDA değerlerine bakılmıştır. Sonuçta serum MDA değerlerinde düşüş, antioksidan potansiyel değerlerinde artış gözlenmiştir. Fıstık tüketicilerinin yüksek antioksidan potansiyel değerlerinin, fıstığın bazı antioksidan vitaminler ve biyoaktif maddeler bakımından zengin olması nedeniyle olabileceğini belirtmektedirler (17).

Tez çalışmamızda eritrosit MDA değerleri fındık diyetinden sonra % 21,1 oranında anlamlı düşüş göstermiştir ( $P<0,005$ ). Buna karşılık fındık diyetinden sonra MDA değerlerinde % 39,4 oranında bir artış gözlenmiştir. Bulgulardaki bu değişiklik literatürle uyumluluk göstermektedir. Fındıkta bulunan vitamin E ve biyoaktif maddelerin lipid peroksidasyonunu engelleyici etkisinden dolayı MDA değerlerinin düşmesi olası bir sonuç olarak beklenmektedir. Bununla beraber fındık diyeti kesildiğinde antioksidan moleküllerin de takviyesi kesileceğinden MDA değerlerinde artış beklenmektedir. Balkan ve arkadaşlarının çalışmasında (74), fındık yağının, eritrositlerde endojen konjuge dienlerin ve MDA değerlerinin

düşmesine neden olduğunu göstermişlerdir. Bu değişimin fındık yağının yüksek oranda vitamin E ve flavonoid içermesinden kaynaklı olabileceğini bildirmişlerdir.

Proteinlerin oksidasyonu sonucu ve protein tiyol gruplarının kaybıyla ileri protein oksidasyon ürünleri (AOPP) oluşur. Reaktif oksijen türlerinin proteinlerle etkileşimleri sonucu, histidin, arginin, prolin ve lizin gibi amino asit yan zincirlerinde oluşan oksidatif hasar sonucunda protein karbonil ürünleri oluşur. Proteinlerin oksidatif stres göstergesi olarak ileri protein oksidasyon ürünleri (AOPP) kullanılır. AOPP, ditirozin içeren çapraz bağlı protein ürünleridir (56). Glutatyon redüktaz ise okside olmuş tiyol gruplarını indirger ve oksidasyonu engeller (94, 43).

Sahng Xi Liu ve arkadaşlarının çalışmasında AOPP'nin hiperkolesterolemide spontan olarak üretildiği sonucuna varılmıştır. Yapılan çalışmalarda tesbit edilen ilişki hiperglisemi ve hiperkolesterolemi durumunda AOPP'nin arttığını göstermektedir (95). Diğer bir çalışmada ise rat modellerinde, yüksek miktarda melatonin içeren cevizin antioksidan etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (96). Fındıkta bulunan tokoferoller ve fonolik bileşikler sayesinde artmış antioksidan enzim aktiviteleriyle beraber AOPP seviyelerinde düşüş beklenmektedir. Ancak eritrositlerde yaptığımız çalışmada fındık öncesi ve fındık sonrası AOPP değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik bulunamadı ( $P>0,05$ ). Çeşitli sebeplerle oksidasyona maruz kalma sonucunda ileri oksidasyon ürünlerinin ölçümü yapılmış olmasına rağmen, fındık diyeti ile ileri oksidasyon ürünleri arasındaki ilişkiyi gösteren çalışmalara rastlanmamıştır. Ancak patolojik durumlarda ileri oksidasyon ürünlerinin arttığını belirten çalışmalar vardır (97).

Fındığın antioksidan sistem üzerine etkisini inceleyen birçok çalışmasına rağmen, antioksidan enzimler üzerine olan etkisini inceleyen araştırmalar kısıtlıdır. Bizde çalışmamızda fındığın, eritrositlerde katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz ve tiyoredoksin redüktaz enzimlerinin aktivitelerine etkisini araştırdık.

Eritrositler taşıdıkları oksijen nedeniyle serbest radikal etkisine açıktırlar. Ancak kendi antioksidan savunma sistemleri vasıtasıyla serbest radikallerin meydana getirdiği hasara karşı dirençlidirler. Eritrositleri oksidatif hasardan korumada hayati bir öneme sahip bir antioksidan olan glutatyonla ilgili çalışmalar olmasına rağmen, fındığın glutatyon üzerine etkisini inceleyen çalışmalar yeterli değildir.



Cominetti ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (98), obez kadınlara Brezilya sert kabuklu meyvesi yedirilmiş ve sonra eritrosit selenyum seviyesine ve glutatyon peroksidaz aktivitesine bakılmıştır. 8 haftalık sert kabuklu meyve diyetinin sonucunda eritrosit selenyum düzeyinde ve glutatyon peroksidaz aktivitesinde anlamlı artış gözlemlenmiştir. Bir başka çalışmada, diyaliz hastalarına brezilya sert kabuklu meyveleri yedirilmiş ve hem plazmada hem de eritrositlerde selenyum düzeyleriyle glutatyon peroksidaz aktivitesine bakılmıştır (99). Diyaliz hastalarında, azalmış selenyum miktarında ve glutatyon peroksidaz aktivitesinde, sert kabuklu meyve diyetinden sonra anlamlı artış olduğunu bulmuşlardır.

Glutatyon peroksidaz selenyum içeren ve membran lipidleriyle hücre ve hücre dışı bileşenleri oksidatif strese karşı korumada önemli bir enzimdir. Uzun süreli selenyum eksikliğinde aktivitesinde azalma meydana gelmektedir (100). Çalışmamızda fındık diyetinin, glutatyon peroksidaz ativitesini istatistiksel olarak anlamlı derecede ( $p<0,005$ ) % 30,4 artırdığını ancak diyet kesildiğinde aktivitenin % 24,3 azaldığını gözlemledik. Bunun nedeni, fındığın içerdiği tokoferoller, fenolik bileşikler ve kısmen de selenyum, glutatyon peroksidaz aktivitesini artırmış olabilir.

Glutatyon redüktaz, GSH-Px vasıtasıyla hidroperoksitlerin indirgenmesi sonucu oluşan okside glutatyonun (GSSG) tekrar indirgenmiş glutatyon (GSH) dönüşümünü katalizler. Glutatyon redüktaz enzimi de selenyum içeren bir enzimdir (64) ve selenyum seviyesi azaldığında aktivitesinde azalma meydana gelmektedir. Literatürde glutatyon redüktaz ile ilgili birçok çalışma olmasına rağmen fındığın eritrositlerdeki glutatyon redüktaz üzerine etkisini inceleyen bir çalışma henüz yapılmamıştır. Tez çalışmamızda fındık diyeti ile fındık diyetinden sonra glutatyon redüktaz aktivitesi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark ( $P<0,005$ ) bulunmuştur. Fındık diyetinde glutatyon redüktaz aktivitesi % 26,6 artarken, fındık diyeti sonrası aktivite % 14,6 azalmıştır. Fındıkta bulunan vitamin E, biyoaktif maddeler ve selenyumun glutatyon redüktazın aktivitesini artırdığı düşünülebilir. Daha sonra fındık diyetinin kesilmesi ile bu aktivitedeki düşüş açıklanabilir.

Tiyoredoksin redüktaz, tiyoredoksinin indirgenmesini katalizleyen homodimerik bir flavoenzimdir (66). Tiyoredoksin redüktaz, yapısında selenosistein içerir ve selenyum metabolizması ile yakın ilişkilidir (101). Venardos ve arkadaşlarının iskemi-repefüzyonlu ratlar üzerinde yaptığı çalışmada; günlük selenyum takviyesinin tiyoredoksin redüktaz ve glutatyon peroksidaz aktivitesini artırdığı görülmüştür (102). Başka bir çalışmada ise Alzheimer hastalığında tiyoredoksin redüktaz aktivitesinde anlamlı bir azalış olduğu

bulunmuştur (103). Yapılan çalışmalarda tiyoredoksin redüktaz aktivitesinin kanser hastalığında arttığı gösterilmiştir

Çalışmamızda fındık diyetinde ve diyet sonrasında tiyoredoksin redüktaz aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı ( $P < 0,005$ ) değişiklikler bulunmuştur. Fındık diyetinde tiyoredoksin redüktaz aktivitesinde % 152,8 oranında bir artış meydana gelmiştir. Bunun nedeni, fındık diyetinde selenyum miktarının artması ve tiyoredoksin redüktazın selenyum metabolizması ile yakından ilişkili olması ile ilişkili olabilir. Ancak aktivitedeki bu artış diyet sonrasında da devam etmektedir (% 13,0).

Literatürde fındığın, glutatyon redüktaz ve tiyoredoksin redüktaz ile ilgili çalışmalar bulunmamakla beraber, glutatyon peroksidaz üzerine etkisini inceleyen çalışmalar yapılmıştır (98, 99). Bu çalışmalara göre; fındık içerdiği selenyum ve vitamin E sayesinde glutatyon peroksidaz aktivitesini ve selenyum konsantrasyonunu artırmaktadır (98, 99). Bizim çalışmamızda fındık diyeti sayesinde artan selenyum miktarına bağlı olarak tiyoredoksin redüktaz ve glutatyon redüktaz aktivitesinin de artmış olabileceği düşünülebilir.

Katalaz esas olarak peroksizomlarda bulunan ve hidrojen peroksidi ( $H_2O_2$ ) suya ve oksijene parçalayan bir enzimdir. Hücrede oluşan hidrojen peroksidi ( $H_2O_2$ ) hidroksil serbest radikali ( $OH\cdot$ ) oluşumunu önlemek için ortadan kaldırır (64). Çalışmamızda katalaz aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ( $P > 0,05$ ). Ancak kuru meyveler (ceviz, badem, kaju fıstığı, kuru üzüm ve chironji) üzerine yapılan bir çalışmada (93), kuru meyvelerin katalaz aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Cevizde katalaz aktivitesinin yüksek çıktığı gözlenmiştir. Aktivitenin yüksek olmasını, cevizin içerdiği fenolik asitler, polifenoller ve flavonoidlere bağlamışlardır. Yapılan çalışmalar fenolik madde içeriği ile antioksidan aktivite arasında doğrudan bir ilişki olduğunu göstermiştir. Fenolik bileşiklerin indirgeyici ajan olarak redoks özellikleri, metallerle şelat oluşturmaları, lipoksigenazı inhibe etmeleri ve serbest radikalleri temizleme özellikleri vardır (106).

Yapılan bütün bu çalışmalar, fındığın ve yağ asitleri içeriği bakımından zeytinyağına benzer olduğunu ve lipid parametreleri üzerine benzer etki ederek kardiyovasküler hastalıklardan korunmada önem taşıdığını göstermektedir. Ayrıca fındık içerdiği MUFA' lar ile oksidasyona karşı direnç göstermektedirler. Bununla beraber fındığın yapısındaki yüksek miktarlardaki vitamin E, fenolik bileşikler, flavonoidler ile güçlü antioksidan etki göstermesi muhtemeldir. Bu çalışmada gösterildiği gibi fındık, yukarıda

bahsedilen sahip olduğu değerli bileşenleri vasıtasıyla, eritrosit antioksidan sistemini güçlendirmesi, oksidan sistemi ise azaltması sonucu insanlardaki biyolojik sistemler üzerinde olumlu etkiye sahip olabildiğini söyleyebiliriz.

## 6. SONUÇLAR

### 6.1. Sonuçlar

Hiperkolesterolemik bireylerin diyetin 0., 30., 60. ve 90. gündeki değerleri karşılaştırıldığında;

1. Vücut kitle indeksleri ve vücut ağırlıkları, hem diyetin etkisi ile ve hem de fındık tüketimi ile azalma gösterdi.

2. Serum aterosjenik lipid parametrelerin seviyelerinde fındık tüketimi ile olumlu etkiler göstermektedir.

Eritrositlerde fındık tüketimiyle;

3. Malondialdehit (MDA) seviyelerinde azalma,

4. Antioksidan enzimlerin aktivitelerinde artma olduğu bulunmuştur.

5. Katalaz aktivitesinde,

6. İleri protein oksidasyon ürünlerinin (AOPP) seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlenmemiştir.

7. Glutasyon redüktaz ile katalaz ve tiyoredoksin redüktaz ile glutasyon peroksidaz arasında pozitif korelasyon bulunmuştur (sırasıyla  $r = 0,58$ ,  $P = 0,008$ ;  $r = 0,50$ ,  $P = 0,025$ ).

### 6.2. Öneriler

1. Fındığın, eritrositler üzerine gösterdiği olumlu etkilerinden dolayı günlük diyetimizin bir parçası olarak belli oranda tüketilmesi tavsiye edilmelidir.

2. Fındığın eritrositler üzerine gösterdiği bu olumlu etkiyi daha geniş, yapı-fonksiyon ilişkisi altında inceleyecek ileri çalışmalara gereksinim vardır.

## 7. ÖZET

### HAFİF DÜZEYDE HİPERKOLESTEROLEMİK KİŞİLERDE FINDIK TÜKETİMİNİN ERİTROSİTLERDEKİ ANTIOKSİDAN ENZİMLERE ETKİSİ

Hiperkolesterolemi kardiyovasküler hastalıklar için risk oluşturmaktadır. Fındık sahip olduğu tekli doymamış yağ asitleri (MUFA), vitamin E miktarı, antioksidan fenolik bileşikleri, fitokimyasalları, diyet lifleri ve esansiyel amino asitleriyle kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu etkiye sahiptir.

Bu çalışmanın amacı fındık tüketiminin eritrosit oksidan-antioksidan sisteme etkisini hafif hiperkolesterolemik bireylerde incelemektir. Çalışma grubu 20 hafif hiperkolesterolemik bireyden (17E/3K, yaş; 27-59) oluşmaktadır. Bireylerden hipokolesterolemik diyet öncesi (0. gün), hipokolesterolemik diyet sonrası (30. gün), hipokolesterolemik diyet ile beraber fındık tüketimi sonrası (60. gün) ve son olarak hipokolesterolemik diyet sonrası (90.gün) kan örneği alındı.

Fındık diyetiyle kolesterolün düşüşüne ilaveten; eritrosit hemolizatlarında, lipit peroksidasyonunun göstergesi olan malondialdehit (MDA) seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenirken antioksidan enzimlerinden glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GR) ve tiyoredoksin redüktaz (TR) aktivitelerinde anlamlı bir artış gözlemlendi ( $P<0,05$ ). Ancak protein oksidasyonunun göstergesi olan ileri protein oksidasyon ürünlerinin seviyesinde (AOPP) ve katalaz enzim aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim bulunamadı ( $P>0,05$ ). Bunlara ilaveten glutatyon redüktaz ile katalaz ve tiyoredoksin redüktaz ile glutatyon peroksidaz arasında pozitif korelasyon bulundu (Sırasıyla  $r=0,58$ ,  $P=0,008$ ;  $r=0,50$ ,  $P=0,025$ ).

Sonuç olarak; fındık tüketiminin hiperkolesterolemik bireylerin eritrositlerinde oksidan-antioksidan dengeyi, antioksidanlar lehine kaydıracağı gözlemlendi.

**Anahtar Kelimeler:** Fındık, Hiperkolesterolemi, Eritrositler, Antioksidan Enzimler.

## 8. SUMMARY

### THE EFFECT OF HAZELNUT CONSUMPTION ON THE ERYTHROCYTE ANTIOXIDANT ENZYMES IN MILD HYPERCHOLESTEROLEMIC INDIVIDUALS

Hypercholesterolemia is a risk factor for cardiovascular diseases. Hazelnut has protective effects against cardiovascular diseases because of its monounsaturated fatty acids (MUFA), vitamin E, antioxidant phenolic compounds, phytochemicals, dietary fibers and essential amino acid content.

The aim of the study is to investigate the effects of hazelnut consumption on the erythrocyte oxidant-antioxidant system in patients with mild hypercholesterolemia. The study group consists of 20 hypercholesterolemic individuals (17M/3F, age; 27-59 ages). Blood samples collected at the time before hypocholesterolemic diet (0. day), at the time after hypocholesterolemic diet (30. day), at the time after hypocholesterolemic diet plus hazelnut consumption (60. day) and finally at the time after hypocholesterolemic diet (90. day).

Beside cholesterol lowering effect it has been observed that hazelnut decreased malondialdehyde (MDA) levels as a lipid peroxidation product but increased the activities of antioxidant enzymes; glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione reductase (GR) and thioredoxin reductase (TR) in erythrocyte hemolysates ( $P < 0,05$ ). On the other hand; statistically significant changes were not found in advanced oxidation protein products (AOPP) levels as an indicator of protein oxidation and in the activity of catalase ( $P > 0,05$ ). Moreover positive correlations were found between glutathione reductase and catalase, thioredoxin reductase and glutathione peroxidase activities ( $r = 0,58$ ,  $P = 0,008$ ;  $r = 0,50$ ,  $P = 0,025$ , respectively).

In conclusion, it was observed that the consumption of hazelnut shifts the oxidant-antioxidant balance in favor of antioxidants.

**Key Words:** Hazelnut, Hypercholesterolemia, Erythrocytes, Antioxidant Enzymes.

## 9. KAYNAKLAR

1. Fraser, G.E.: Nut consumption, lipids and risk of a coronary event. *Clin. Cardiol.*, 22 (III): 11-15, 1999.
2. Hu, F.B.: Plant-based foods and prevention of cardiovascular disease: an overview. *Am. J. Clin. Nutr.*, 78: 544-551, 2003.
3. Yağmur, C. ve Özer, A. : Fındığın İnsan Beslenmesi Ve Sağlığındaki Önemi. 3. Milli Fındık Şurası Tebliğler Kitabı, Uğur Eğitim Hizmetleri ve Yayıncılık, 602-607, Ocak, 2006.
4. Valko, M., Leibfritz, D., Monocol, J., Cornin, M., Mazur, M.: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J. Biochem. & Cell Biol.*, 39: 44-84, 2007.
5. Aslan, R., Şekeroğlu, MR., Gültekin, F., Bayıroğlu, F.: Blood lipoperoxidation and antioxidant enzymes in healthy individuals relation to age, sex, habits, life style and environment. *J Environmental Sci And Health A*, 32 (8): 2101-2109, 1997.
6. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C.: Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. New York: Oxford, 1999.
7. Gutteridge, J.M., Halliwell, B.: Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N.Y. Acad Sci*, 899: 136-147, 2000.
8. Urso, M.L., Clarkson, P.M.: Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*, 189: 41-54, 2003.

9. Cooper, R.A.: Abnormalities of cell-membrane fluidity in the pathogenesis of disease. *N. Engl. J. Med.*, 297: 371-378, 1977.
10. Özdemirler, G., Küçük, S., Orhan, Y., Aykaç-Toker, G., Uysal, M.: Lipid and protein oxidation in erythrocyte membranes of hypercholesterolemic subjects. *Clin. Biochem.* 34: 335-339, 2001.
11. Salas-Salvadó, J.; Bulló, M.; Pérez-Heras, A.; Ros, E.: Dietary fibre, nuts and cardiovascular disease. *Br. J. Nutr.* 96: 45-51, 2006.
12. Iwamoto, M., Imaizumi, K., Sato, M., et al.: Serum lipid profiles in Japanese women and men during consumption of walnuts. *Eur J Clin Nutr.* 56: 629–637, 2002.
13. US Department of Agriculture. Agricultural Research Service 2008. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 21. Available at: <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>. Accessed 18 February 2009.
14. Alper C.M. and Matters R.D.: Peanut consumption improves indices of cardiovascular disease risk in healthy adults. *J. Am. Col. Nutr.*, 22(2): 133-141, 2003.
15. Alphan M.E.: Sert kabuklu meyvelerin sağlığa etkileri. *Folia Hipertansiyon, Diyabet, Ateroskleroz Dergisi*, 6: 22-27, 2006.
16. Baysal A., Keçecioğlu S., Arslan P., Yücecan S., Pekcan G., Güneyli U., Birer S., Sağlam F., Yurttagül M., Çehrelı R.: *Besinlerin bileşimleri*. 3. baskı, Ankara, 1991.
17. Koçyiğit, A., Koylu, A.A., Keleş, H.: Effects of pistachio nuts consumption on plasma lipid profile and oxidative status in healthy volunteers. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, 16: 202-209, 2006.
18. Ros, E., Nunez, I., Perez-Heras, A., Serra, M., Gilabert, R., Casals, E., Deulofeu, R.: A walnut diet improves endothelial function in hypercholesterolemic subjects. *Circulation*, 109: 1609-1614, 2004.
19. Zambon, D., Sabate, J., Munoz, S., Campero, B., Casals, E., Merios, M., Laguna, J.C., Ros, E.: Substituting walnuts for monounsaturated fat improves the serum lipid profile of hypercholesterolemic men and women. *Ann. Intern. Med.*, 132: 538-546, 2006.



20. Pehlivanođlu, S.: Kalp ve damar hastalıklarından korunmada findığın etkisi. 3. Milli Fındık Şurası Tebliğler Kitabı, Uğur Eğitim Hizmetleri ve Yayımcılık, 584-586, Ocak, 2006.
21. Masson, L.F., Mcneill, G., Avenell, A.: Genetic variation and the lipid response to dietary intervention: a systematic review. *Am. J. Clin. Nutr.*, 77: 1098-1111, 2003.
22. Shahidi, F., Alasalvar, C., Liyana-Pathirana, C. M.: Antioxidant phytochemicals in hazelnut kernel (*Corylus avellana* L.) and in hazelnut byproducts. *J. of Agric. Food Chem.*, 55: 1212–1220, 2007.
23. Bignami, C., Cristofori, V., Troso, D.: Kernel quality and composition of hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars. *Acta Horticulturae. Proceedings of the VIth International Congress on Hazelnut*, 686: 477–484, 2005.
24. Senter, S.Y.D., Horvat, R. J., Forbes, W. R.: Comparative GC–MS analysis of phenolic acids of selected tree nuts. *J. Food. Sci.*, 48: 798–799, 1983.
25. Yurttas, H. C., Schafer, H. W., & Warthesen, J. J.: Antioxidant activity of nontocopherol hazelnut (*Corylus* spp.) phenolics. *J. Food Sci.*, 65: 276–280, 2000.
26. Alasalvar, C., Karamac, M., Amarowicz, R., Shahidi, F.: Antioxidant and antiradical activity in extracts of hazelnut kernel (*Corylus avellana* L.) and in hazelnut green leafy cover. *J. Agric. Food Chem.*, 54: 4826–4832, 2006.
27. Maki, K.C., Davidson, M.H., Umporowicz, D.M.: Lipid responses to plant-sterol-enriched reduced-fat spreads incorporated into a national cholesterol education program step 1 diet. *Am. J. Clin. Nutr.*, 74: 33-43, 2001.
28. Durak, İ., Köksal, İ., Kaçmaz, M., Büyükkoçak S., Çimen, B., Öztürk, S.: Hazelnut supplementation enhances plasma antioxidant potential and lowers plasma cholesterol levels. *Clin. Chim. Acta*, 284: 113–115, 1999.
29. Balaban Yücesan, F., Örem, A., Vanizor Kural, B., Örem, C., Turan, İ.: Hazelnut consumption decreases the susceptibility of LDL to oxidation, plasma oxidized LDL level and increases the ratio of large/small LDL in normolipidemic healthy subjects. *Anadolu Kardiyol. Derg.*, 10: 28-35, 2010.
30. Bayram, F., Şahan, S., Kurtođlu, S., Karadeniz, T.: Sağlık ve beslenme gözüyle fındık. 3. Milli Fındık Şurası Tebliğler Kitabı, Uğur Eğitim Hizmetleri ve Yayımcılık, 590-595, Ocak, 2006.
31. Emekli, N.: Yağlar, temel ve uygulamalı Biyokimya. Cem Ofset Matbaacılık San. Ltd. Şti., İstanbul, 459-544, Haziran, 2004.

32. Kreisberg, R.A., Oberman, A.: Medical management of hyperlipidemia/dyslipidemia. *J. Clin. Endoc. Metab.*, 88: 2445-2461, 2003.
33. National Institute of Health Expert Panel. Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). (NIH Publication No. 01. 3670). Bethesda, MD: National Institutes of Health, 2001.
34. Goldstein, J.L., Kita, T., Brown, M.S.: Defective lipoprotein receptors and atherosclerosis. *N. Engl. J. Med.*, 309: 288-296, 1983.
35. Beal, M.F.: Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1366: 211-223, 1998.
36. Gutteridge, J.M.C.: Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin. Chem.*, 41/12: 1819-1828, 1995.
37. Karlsson, J., Ronneberg, R., Semb, B.: Vitamins Q and E, extracorporeal circulation and hemolysis. *Mol Cell Biochem* 173 (1-2): 33-41, 1997.
38. Augustin, W., Wiswedel, I., Noac, H., Reinheckel, T., Reichel, O.: Role of endogenous and exogenous antioxidants in the defence against functional damage and lipid peroxidation in rat liver mitochondria. *Mol Cell Biochem*, 174 (1-2): 199-205, 1997.
39. Aalt, B., Haenen, R.M., Doelman, J.A.: Oxidants and antioxidants: State of the art. *Am. J. Med.*, 91 (3): 3-13, 1991.
40. Mecoci, P., Beal, M.F., Polidori, M.C., Cherubini, A., Chiosne, F.: Mitochondrial membrane fluidity and oxidative damage to mitochondrial DNA in aged human brain. *Mol Chem Neuropathol*, 31 (1): 53-64, 1997.
41. Şenses, S.V., Özyazgan, S., Akkan, A.G.: Serbest oksijen radikalleri-I: vücuttaki antioksidan sistemler. *Türk Aile Hek. Derg*, 3: 5-11, 1999.

- 42.** Halliwell, B.: Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev*, 52: 253-265, 1994.
- 43.** Akkuş, İ.: Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. MIMOZA Yay. ,s. 34-35, Konya, 1995.
- 44.** McCord J.M.: Human disease, free radicals and oxidant balance. *Clin Biochem*, 26: 351-357, 1992.
- 45.** Lehninger, A.: Principles of biochemistry. Worth Publishers Inc., New York, 46-220, 1982.
- 46.** Busaia, Fis. : Biochemical aspects of free radicals. *Biochem. Cell Biol*, 68: 989-998, 1990.
- 47.** Bulkley, I.B.: The role of oxygen free radicals in human disease processes. *Surgery* 1983; 94: 407-11.
- 48.** Özdem, S. , Şadan, G.: Serbest oksijen radikallerinin oluşum ve klinik açıdan önemi. *A Ü, Tıp Fak. Derg.*, 11 (1): 63-71, 1994.
- 49.** Wickens, A.P.: Ageing and free radical theory. *Respiration Physiology*, 128: 379-391, 2001.
- 50.** Niwa, Y., Kanoh, T., Sakane, T., et al.: The ratio of lipidperoxides to superoxide dismutase by tumor necrosis factor: possible protective mechanism. *Science*, 242: 941-943, 1988.
- 51.** Valenzuela, A.: The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress. *Life Sci.*, 43: 301-309, 1990.
- 52.** Rangan, U., Bulkey, G. B.: Prospects for treatment of free radical-mediated tissue injury. *Br Med Bull.*, 49 (3): 700-718, 1993.

- 53.** Gate, L., Paul, J., Ba Nguyen, G., Tew, K.D., Tapiero, H.: Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomed Pharmacother*, 53: 169-180, 1999.
- 54.** Domigan, N.M., Charlton, W., Duncan, C.C., Winterbourn, C.C., Kettle, A.J.: Chlorination of tyrosyl residues in peptides by myeloperoxidase and human neutrophils. *J Biol Chem*, 270: 16542-16548, 1995.
- 55.** Chatgililoglu, C. and Ferreri, C. : Lipidomics and free radical modifications of lipids. *Chimia*, 62, 713-720, 2008.
- 56.** Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Capeillere-Blandin, C., Nguyen-Khoa, T., Nguyen, A.T., Zingraff, J., Jungers, P., Descamps-Latscha, B. : Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.*, 49: 1304-1313, 1996.
- 57.** Thornalley PJ.: Monosaccharide Autoxidation in health and disease. *Environ Health Persp* 1985; 64: 297-309.
- 58.** Halliwell, B.: Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutr Rev*, 55: 44-49, 1997.
- 59.** McCord, J.M., Fridovich, I.: Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte. *J. Biol. Chem.*, 25: 6949-6055, 1969.
- 60.** Rigo, A., Stevanato, R., Finazzi-Agro, A., Rotilio, G.: An attempt to evaluate the rate of the Haber-Weiss reaction by using OH radical scavengers. *FEBS Lett*, 80: 130-132, 1977.
- 61.** Halliwell, B., Borish, E.T., Pryor, W.A., Ames, B.N., Saul, R.L., McCord, J.M., Harman, D.: Oxygen radicals and human disease. *Ann. Intern. Med.*, 107:526-545.
- 62.** Freeman, B.A., Crapo, J.D.: Biology of disease, free radicals and tissue injury. *Lab Invest*, 47: 412-426, 1982.
- 63.** Aydın, A., Sayal, A., İşimer, A.: Serbest radikaller ve antioksidan savunma sistemi. *Gülhane Askeri Tıp Akademisi Ayın Kitabı*, 2001.

64. Wheeler, C.R., Salzman, J.A., Elsayed, N.Mç et al.: Automated assays for superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione reductase activity. *Anal Biochem.*, 184(2):193–199, Feb. 1, 1990.
65. Mills, G.C.: Hemoglobin catabolism, Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J Biol Chem.*, 229: 189, 1957.
66. Williams, Jr. C.H.: Mechanism and structure of thioredoxin reductase from *Escherichia coli*. *FASEB J.*, 9(13): 1267-76, Oct., 1995.
67. Mustatcich, D., Powis, G.: Thioredoxin reductase. *Biochem J.*, 346:1-8, 2000.
68. Lee, G.R., Birthall, T.C., et al: Wintrobe' s clinical hematology. Talen M. J.: The mature erythrocyte, Vol 1: 101-132, 1993.
69. Yenerel, M.N.: Herediter eritrosit membran anomalileri. *Hematoloji*, 2:125-130, 2004.
70. Lankowsky, P.: Hemolytic anemia. *Manuel of Pediatric Hematology and Oncology*, Ed. San Diego, Churchill Livingstone, 137-201, 2000.
71. Jonas, A.: Lecithin cholesterol acyltransferase. *Biochimica. Biophysica. Acta.*, 1529: 245-256, 2000.
72. Hui, S.W., Stewart, C., Carpenter, M.P., Stewart, T.P.: Effects of cholesterol on lipid organization in human erythrocyte membrane. *J. Cell Biology*, 85: 283-291, 1980.
73. Clemens, M.R.; Waller, H.D.: Lipid peroxidation in erythrocytes. *Chem. Phys. Lipids* , 45: 251-268, 1987.
74. Balkan, J., Hatipoğlu, A., Aykaç-Toker, G., Uysal, M.: Influence on hazelnut oil administration on peroxidation status of erythrocytes and apolipoprotein B 100-containing lipoproteins in rabbits fed on a high cholesterol diet. *J. Agric. Food Chem.*, 51: 3905-3909, 2003.
75. Akcan, B.: Fındık Tüketen Hiperkolesterolemik Bireylerden Elde Edilen HDL' nin LDL Oksidasyonu Üzerine Etkisinin İncelenmesi. *KTÜ Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tez Çalışması*, 2008.

76. Aebi, H.E.: Catalase. in bergmeyer, H.U., methods of enzymatic analysis, 3:273-285, 1987.
77. Beutler E.A.: Manual of biochemical methods. 2nd ed. New York. Grunef Strotton, 1975.
78. Goldberg, D.M. and Spooner, R.J.: In methods of enzymatic analysis (Bergmeyer HV. Ed.) 3rd Edn. Vol 3, 1983; pp. 258-265. Verlag Chemie, Deerfield Beach, Fl.
79. Holmgren, A., Bjornstedt, M.: Thioredoxin and thioredoxin reductase. Methods Enzymol 1995; 252: 199-208.
80. Stock, J., Dormandy, T. L. : The autoxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide. Br. J. Hamatol., 20: 95- 111, 1971.
81. Witko, V., Nguyen, A.T. and Decamps-Latscha, B. : Microtiter plate assay for phagocyte derived taurinechloramines, J. Clin. Lab. Anal., 6, 47-53, 1992.
82. Blomhoff, R. : Dietary Antioxidants And Cardiovascular Disease, Curr. Opin. Lipidol., 16,47-54,2005.
83. Sabaté, J.: Nut Consumption And Body Weight, Am. J. Clin. Nutr., 78: 647-650, 2003.
84. Jiang, R., Jacobs, DR., Mayer-Davis, E., Szklo, M., Herrington, D., Jenny, N., Kronmal, R. and Barr, RG.: Nut and Seed Consumption And Inflammatory Markers In The Mlti- Ethnic Study Of Atherosclerosis, Am. J. Epid., 163,222-231,2006.
85. Taner, M., Link, N.: Hyperlipidemia: part1. Evaluation and dietary management. West. J. Med., 175: 246-250, 2001.
86. Kris-Etherton, P.M., Yu-Poth, S., Sabaté, J., Ratcliffe, H.E., Zhao, G., Etherton, T.D.: Nuts and their bioactive constituents: effects on serum lipids and other factors that effect disease risk. Am. J. Clin. Nutr., 70: 504-511, 1999.
87. Kelly, J.H. and Sabate, J.: Nuts and coronary heart disease: an Epidemiological perspective. Br. J. Nutr., 96: 61-67,2006.

- 88.** Mukuddem-Petersen, J., Oosthuizen, W., Jerling, J.C.: A systematic review of the effects of nuts on blood lipid profiles in humans. *J. Nutr.*, 135: 2082–2089, 2005.
- 89.** Ros, E. and Mataix, J.: Fatty acid composition of nuts, implications for cardiovascular health. *Br. J. Nutr.*, 96,29-35,2006.
- 90.** Singh, U., Devaraj, S., Jialal, I.: Vitamin E, oxidative stress, and inflammation. *Annu. Rev. Nutr.*, 25: 151–74, 2005.
- 91.** Traber, M.G.: Vitamin E regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Nutr.*, 27: 347–62, 2007.
- 92.** Hatipoğlu, A., Kanbağlı, Ö., Balkan, J., Küçük, M., Çevikbaş, U., Aykaç-Toker, G., Berkkan, H., Uysal, M.: Hazelnut oil administration reduces aortic cholesterol accumulation and lipid peroxides in the plasma, liver, and aorta of rabbits fed a highcholesterol diet. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68 (10): 2050-2057, 2004.
- 93.** Mishra, N., Dubey, A., Mishra, R., Barik, N.: Study on antioxidant activity of common dry fruits. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 3316–3320, 2010.
- 94.** Carlberg I., Mannervik B.: Glutathione reductase. *Methods Enzymol*, 113: 484-490, 1985.
- 95.** Xi Liu S., Hou Fan., Guo Zi., Nagai R., Zhang W., Nagai R.: Advanced oxidation protein products accelerate atherosclerosis through promoting oxidative stress and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 26: 1156-1162, 2006.
- 96.** Reiter, R.J., Manchester, L.C., Tan, D.X.: Melatonin in walnuts: influence on levels of melatonin and total antioxidant capacity of blood. *Nutrition*, 21: 920–4, 2005.
- 97.** Yazıcı, C. ve Köse, K.: Kronik böbrek yetmezliğinde oksidatif stres ve biyomarkırları. *Nefroloji Dergisi*, 13 (3): 117-124, 2004.
- 98.** Cominetti, C., Carla de Bortoli, M., Purgatto, E., Ong, T.P., Moreno, F.S., Garrido, A.B. Jr., Cozzolino, S.M.F.: Associations between glutathione peroxidase-1 Pro198Leu polymorphism, selenium status, and DNA damage levels in obese women after consumption of Brazil nuts. *Nutrition*, 1-6, 2011.
- 99.** Stockler-Pinto, M.B., Mafra, D., Farage, N.E., Boaventura, G.T., Cozzolino, S.M.F.: Effect of Brazil nut supplementation on the blood levels of selenium and glutathione peroxidase in hemodialysis patients. *Nutrition*, 26: 1065-1069, 2010.
- 100.** Zachara, B.A., Gromadzinska, J., Wasowicz, W., Zbro' z, Z.: Red blood cell and plasma glutathione peroxidase activities and selenium concentration in patients with chronic kidney disease: a review. *Acta. Biochim. Pol.*, 53: 663–77, 2006.

- 101.** Anestal, K., Arner, E.S.: Rapid induction of cell death by selenium-compromised thioredoxin reductase-1 but not by the fully active enzyme containing selenocysteine. *J. Biol. Chem.*, 278: 15966-15972, 2003.
- 102.** Venardos, K., Harrison, G., Headrick, J., Perkins, A.: Effects of dietary selenium on glutathione peroxidase and thioredoxin reductase activity and recovery from cardiac ischemia-reperfusion. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 18: 81-88, 2004.
- 103.** Lovell, M. A., Xie, C., Gabbita, P. S., Markesbery, W. R.: Decreased thioredoxin and increased thioredoxin reductase levels in alzheimer's disease brain. *F. Rad. Biol. Med.*, 28: 418-427, 2000.
- 104.** Powis, G., Kirkpatrick, D. L., Angulo, M., Baker, A.: Thioredoxin redox control of cell growth and death and the effects of inhibitors. *Chem. Biol. Interact.*, 111-112: 23-34, 1998.
- 105.** Fujii, S., Nanbu, Y., Nonogaki, H., Konishi, I., Mori, T., Masutani, H., Yodoi, J.: Coexpression of adult T-cell leukaemia-derived factor, a human thioredoxin homologue, and human papillomavirus DNA in neoplastic cervical squamous epithelium. *Cancer*, 68 :1583-91, 1991.
- 106.** Decker, E.A.: Phenolics: prooxidants or antioxidants? *Nutr. Rev.*, 55: 396-407, 1997.



## ÖZGEÇMİŞ

Hanife KARA 28.01.1982 tarihinde Kahramanmaraş'ta doğdu. 1993'de Cevdet Sunay İlkokulunu, 1996'da Yavuz Selim İlköğretim okulunu, 2000'de Trabzon Lisesi'ni bitirdi. 2001 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Rize Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nü kazandı ve 2005 yılında bu bölümden mezun oldu. Aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Öğretmenliği Bölümü'nde Tezsiz Yüksek Lisans'a başladı, 2007'de buradaki eğitimimi tamamladı. 2008 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimine başladı ve halen aynı bölümde eğitime devam etmektedir.