

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI

KARALAHANANIN İNSAN HDL RESEPTÖRÜNE (SR-B1) ETKİSİ

DOKTORA TEZİ

Sevil CENGİZ

TRABZON - 2009

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI

KARALAHANANIN İNSAN HDL RESEPTÖRÜNE (SR-B1) ETKİSİ

Sevil CENGİZ

Tezin Enstitüye Veriliş Tarihi : 14.10.2009

Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 23.10.2009

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Orhan DEĞER

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Ekin ÖNDER

Jüri Üyesi : Prof. Dr. S. Caner KARAHAN

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Hasan EFE

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Orhan DEĞER

KASIM 2009

TRABZON

ÖNSÖZ

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmada ;

- Danışman hocam Prof. Dr. Ekin ÖNDER'e ve Biyokimya AbD başkanı Prof.Dr. Orhan DEĞER'e,
- Projesinde bana yer ayıran, malzemelerin tedarik edilmesinde, tezin yürütülmesi ve sorunların çözülmesinde katkıları olan, tezin düzenlenmesinde rol oynayan, tez boyunca sabırlı davranışlar sergilemeye çalışan Doç. Dr. Birgül VANİZOR KURAL'a,
- Bilgi ve tecrübeleri ile katkıları önemli bir yer teşkil eden Prof. Dr. Asım ÖREM'e, Prof.Dr.E.Edip KEHA, Prof.Dr.S.CanerKARAHAN, Doç.Dr.Yüksel ALİYAZICIOĞLU, Doç.Dr.Ahmet ALVER'e ,
- Deneysel çalışmalarda bana yardım eden Dr. Fulya BALABAN ve Nurçin KÜÇÜK başta olmak üzere ve diğer bölüm arkadaşlarıma,
- Ekstraksiyonların hazırlanmasındaki katkılarından dolayı Kimya Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Murat KÜÇÜK ve diğer öğretim elemanlarına,
- HUVEC hücre serilerini bana temin eden G.A.T.A. Hematoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ali UĞUR URAL'a,
- HUVEC çalışmalarımda bana yardımcı olan Prof.Dr.B.Serdar OMAV, Münir İNAN'a,
- Western Blotlama kısmını yapmama izin veren ve deneysel aşamalarda bilgilerinden faydalandığım Biyoloji Bölümü Öğretim Üyelerine, Doç.Dr.Yrd.Remziye NALCACIOĞLU ,Arş.Gör.Emine Demir'e, Arş.Gör Hakan KARA'ya ve diğer öğretim elemanlarına,
- Deneysel çalışmalarda tecrübelerinden yararlandığım Tıbbi Biyoloji Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Ersan KALAY ve Mikrobiyoloji Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. İlknur TOSUN ve Yrd. Doç. Dr. Kurtuluş BURUK'a,
- Tez süresinde bana katlanan ve manevi desteğini esirgemeyen eşim Ekrem CENGİZ'e ve bazen ihmal etmek zorunda kaldığım biricik kızım Fatmanur Asude'ye,
- Ve burada değinemediğim emeği geçenlere teşekkür ederim.

Sevil CENGİZ

Bu çalışma K.T.Ü. B.A.P. 2004.111.002.6 kod numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
TABLO LİSTESİ	v
ŞEKİL LİSTESİ	vi
KISALTMALAR LİSTESİ	viii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Karalahana	3
2.1.1. Karalahananın Genel Özellikleri	3
2.1.2. Karalahananın Antioksidanları ve Biyolojik Önemleri	7
2.2. Lipoproteinler ve Reseptörleri	12
2.3. HDL ve SR-B1	14
2.3.1. HDL	14
2.3.2. SR-B1:Çöpçü Reseptör Sınıf B ,Tip 1	19
3. MATERYAL VE METOD	23
3.1. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler	23
3.1.1. Cihaz ve Malzemeler	23
3.1.2. Kimyasal Malzemeler	25
3.2. Tayinlerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	27
3.2.1. Karalahana Ekstraktlarında Antioksidan Tayinlerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	27
3.2.2. Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	29
3.2.3. SR-B1/CLA-1 Protein Miktarı Tayini İçin Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	30

3.2.4. SR-B1/CLA-1 mRNA Ekspresyonu Tayini İçin Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	32
3.3. Metodlar	33
3.3.1. Karalahana Ekstraktlarının Hazırlanması	33
3.3.1.1. Örneklerin Toplanması	33
3.3.1.2. Ekstraktların Hazırlanması	34
3.3.2. Karalahana Ekstraktlarında Antioksidan Tayinler	37
3.3.2.1. Toplam Fenolik Madde (TFM) Tayini	37
3.3.2.2. DPPH• Radikali Temizleme Aktivitesi Yöntemi	39
3.3.2.3. Demir (III) İndirgeme / Antioksidan Kuvvet (FRAP) Yöntemi	39
3.3.2.4. Flavonoid Miktarının Belirlenmesi	41
3.3.2.5. Toplam Antioksidan Kapasitenin (TAS)Belirlenmesi	42
3.3.3. Hücre Kültürü	44
3.3.3.1. HUVEC Hücre Serilerinin Çoğaltılması	44
3.3.3.2. HUVEC Hücre Çoğaltımında Kültür Şartları	44
3.3.3.3. Tripsinizasyon Metodu	45
3.3.3.4. Hücre Serilerinin Sayımı ve Canlılık Kontrolü	45
3.3.3.5. Hücrelerin Dondurulması	46
3.3.3.6. Hücrelerin Ekstraktlarla Muamele Edilmesi	46
3.3.4. TRItidy G ile Protein İzolasyonu	46
3.3.5. TRItidy G ile RNA İzolasyonu	47
3.3.6. SR-B1/CLA-1 Protein Ekspresyonunun Belirlenmesi	48
3.3.6.1. Protein Miktarı Tayini	48
3.3.6.2. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)	49
3.3.6.2.1. Jellerin Hazırlanması	52
3.3.6.2.2. Numunenin Hazırlanması	53
3.3.6.2.3. Elektrofrez işlemi	53
3.3.6.3. Western-Blotlama	54
3.3.7. SR-B1/CLA-1 mRNA seviyesinin Belirlenmesi	56
3.3.7.1. RNA Miktarının Belirlenmesi	56
3.3.7.2. RT-PCR	56
3.3.7.3. Agaroz Jel Elektrofrez	58

3.4. İstatistiksel Analizler	58
4. BULGULAR	59
4.1. Karalahana Ekstraktlarında Antioksidan Tayinler	59
4.2. Hücre Kültürü	65
4.3. SDS-PAGE ve Western Blotlama Sonuçları	66
4.4. RT-PCR ve Agaroz Jel Elektroforez Sonuçları	67
5. TARTIŞMA	70
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	84
7. ÖZET	85
8. SUMMARY	86
9. KAYNAKLAR	87
ÖZGEÇMİŞ	94

TABLOLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Karalahananın Ortalama Kimyasal Bileşimi	5
Tablo 2. Lipoproteinler ve Genel Özellikleri	13
Tablo 3. Lipoproteinler Ve Reseptörleri	14
Tablo 4. HDL'nin Fonksiyonları	15
Tablo 5. HDL Reseptörleri ve Özellikleri	18
Tablo 6. Çalışma sırasında kullanılan ekstraktlar için kullanılan kısaltmalar	34
Tablo 7. Hazırlanan sulu ve etanollü ekstraktlarının ana çözeltilerinin kuru ağırlık cinsinden konsantrasyonları (mg/ mL)	37
Tablo 8. Toplam polifenolik madde tayininde yapılan pipetleme işlemleri	38
Tablo 9. DPPH• radikali temizleme aktivitesi tayininde yapılan pipetleme işlemleri	39
Tablo 10. FRAP yönteminde yapılan pipetleme işlemleri	40
Tablo 11. Flavonoid tayininde yapılan pipetleme işlemleri	42
Tablo 12. Toplam Antioksidan Kapasitenin (TAS)Belirlenmesinde Yapılan Pipetleme İşlemleri	43
Tablo 13. Tripsinasyon işlemindeki kullanılan Tripsin/EDTA ve Fetal Bovin Serum miktarları	45
Tablo 14. Protein miktarı tayininde yapılan pipetleme işlemleri	48
Tablo 15. RT Reaksiyon Tüpü Hazırlanması	57
Tablo 16. RT-PCR'da Kullanılan Primer Dizileri	57
Tablo 17. İllere Göre Karalahana Ekstraktlarının Antioksidan Aktiviteleri	63
Tablo 18. HUVEC hücrelerinin Ekstraktlarla Muamele Sonuçları(n=6)	65
Tablo 19. Karalahana Ekstraktlarının Western Blot Bant Alan ve Yüzdeleri (n=3)	67
Tablo 20. Etanolik ve sulu karalahana ekstraktlarının HUVEC SR-B1/CLA-1 mRNA ekspresyonu RT-PCR sonucunda elde edilen Bant Alan ve Yüzdeleri	69

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Karalahana	3
Şekil 2. Glikosinolatlardan Yıkım Ürünlerinin Sentezi	6
Şekil 3. Karalahana Glukosinolatların Metabolizması	7
Şekil 4. Polifenoller	10
Şekil 5. Karalahanada Bulunan Fenolik İçeriklere Örnekler	11
Şekil 6. Flavonoidlerin LDL Oksidasyonuna ve Köpük Hücre Olusumuna Etkisi	11
Şekil 7. Lipoproteinlerin Yapısı	12
Şekil 8. HDL 'nin Biyosentezi ve Dönüşümü	16
Şekil 9. Kolesterolün Pasif Desorpsiyonla Taşınması	16
Şekil 10. Reseptör Aracılıklı Kolesterol Taşınımı	17
Şekil 11. Ters Yönde Kolesterol Taşınımı	18
Şekil 12. SR-B1 Öncülü	20
Şekil 13. SR-B1'in Yapısı	20
Şekil 14. HDL ile Hücreler Arasındaki SR-B1 Aracılıklı Kolesterol Akışı	22
Şekil 15. HDL'nin NO Üretimini Düzenlemesi	22
Şekil 16. Sokhlet Düzeneği	35
Şekil 17. Clevenger Düzeneği	36
Şekil 18. Döner Vakum (Rotary) Evaporatörü	37
Şekil 19. Toplam Fenolik Madde Tayini İçin Gallik Asit Standart Grafiği	38
Şekil 20. Demir (III)'ün indirgenme reaksiyonu	40
Şekil 21. Demir İndirgeme / FRAP Miktarları İçin Askorbik Asit Standart Grafiği	41
Şekil 22. Demir İndirgeme / FRAP Miktarları İçin Troloks Standart Grafiği	41
Şekil 23. Flavonoid Miktarı İçin Kuarsetin Standart Grafiği	42
Şekil 24. Toplam Antioksidan Madde Troloks Standart Grafiği	43
Şekil 25. Protein Miktarı Tayin Grafiği	49
Şekil 26. Proteinlerin SDS ile Denatüre Edilmesi	50

Şekil 27. Poliakrilamid Jelin Oluşması	51
Şekil 28. Proteinlerin Poliakrilamid Jeldeki İlerleyişi	51
Şekil 29. SDS-PAGE Tankı	54
Şekil 30. Semi-Dry Western Blot Çalışması	55
Şekil 31. Karalahana Ekstraktlarının Toplam Fenolik Madde Miktarları	59
Şekil 32. Karalahana Ekstraktlarının FRAP(μ MToloks)Miktarları	60
Şekil 33. Karalahana Ekstraktlarının FRAP(μ MAskorbik asit) Miktarları	60
Şekil 34. Karalahana Ekstraktlarının Flavonoid(μ g Kuarsetin) Miktarları	61
Şekil 35. Etanollü Karalahana Ekstraktlarının DPPH IC ₅₀ Miktarları	61
Şekil 36. Sulu Karalahana Ekstraktlarının DPPH IC ₅₀ Miktarları	62
Şekil 37. Etanollü ve Sulu Karalahana Ekstraktlarının DPPH IC ₅₀ Miktarları	62
Şekil 38. Karalahana Ekstraktlarının TAS(μ MToloks) Miktarları	63
Şekil 39. Endotel Hücreleri	66
Şekil 40. Trabzon İline Ait Ekstraktlarındaki Sr-B1/CLA-1Western Blotlama Görüntüsü	66
Şekil 41. Etanolik ve sulu karalahana ekstraktlarının HUVEC SR-B1/CLA-1 mRNA ekspresyonuna etkilerinin nun RT-PCR ile incelenmesi	68

KISALTMALAR LİSTESİ

AcLDL	: Asetile LDL
Apo A	: Apolipoprotein A
ApoB	: Apolipoprotein B
ApoE	: Apolipoprotein E
ApoER	: Apolipoprotein E Reseptörü
ApoAI	: Apolipoprotein AI
ABCA1	: ATP bağımlı Kaset Transfer Protein 1
CETP	: Kolesterol Esteri Taşıyıcı Protein
CLA-1	: CD-36 ve LIMPII-analog-1
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
eNOS	: Endothelial Nitrik Oksit Sentetaz
EGMS	: Endothelial Growth Medium Supplement
FL (FC)	: Serbest Kolesterol
GS	: Glikosinolatlar
GP330	: Megalin
HUVEC	: İnsan Göbek Bağı Venöz Endotel Hücresi
HRP	: Horseradish Peroksidaz
HBP	: HDL bağlayıcı protein
HB2	: HDL bağlayıcı protein 2
HDL	: Yüksek Dansiteli Lipoprotein
LDL	: Düşük Dansiteli Lipoprotein
IDL	: Orta Dansiteli Lipoprotein
KE	: Kolesterol Esterleri
LDLR	: LDL Reseptörü
LRP	: LDL reseptör ilişkili protein
Lp(a)	: Lipoprotein (a)

LCAT	: Lesitin Kolesterol Ail Transferaz
LPL	: Lipoprotein Lipaz
M-BSA	: Malenlenmişsığır serum albumini
NO·	: Nitrikoksit Radikali
NO	: Nitrik Oksit
oxLDL	: Okside LDL
OH·	: Hidroksil Radikali
PGI ₂	: Prostaglandin-2
PLTP	: Fosfolipid transfer proteini
P	: Protein
PON	: Paraoksonaz
PAF-AH	: Platelet Aktivate Edici Faktör Asetil Hidrolaz
PBS	: Fosfat Tamponu
Rsu1	: Ras baskılayıcı Protein 1
SR-B1	: Çöpçü Reseptör Sınıf 1 Tip B
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
ŞM	: Şilomikronlar
TG	: Trigliserid
TMB	: 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidene
TEMED	: N,N,N,N Tetrametiletildiamin
TK	: Toplam Kolesterol
VLDL	: Çok Düşük Dansiteli Lipoprotein
VLDLR	: VLDL reseptörü
Vit E	: Vitamin E
VitC	: Vitamin C

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Turpgiller (*Brassicaceae*) ailesinde yer alan karalahana (*Brassica oleracea var acephala*) Türkiye'nin kuzey kesimlerinde özellikle kış aylarında, besin kaynağı olarak tercih edilmektedir(1). Brassica bitkileri, yapılarında bulunan polifenoller, flavonoidler, izoflavonlar, glukosinotlar, vitamin ve mineralleri ile antioksidan ve antikanserojen etki gösterirler (2). Antioksidanlar; serbest radikalleri inhibe ederek oksidatif hasara karşı hücreleri koruyabilmektedirler (3,4).

Lipoproteinlerin genel işlevi, suda çözünmeyen lipidlerin, çözünür lipid ve protein kompleksi şeklinde kanda taşınmalarını sağlamaktır. Lipidler trigliserid, kolesterol esterleri serbest kolesterol ve fosfolipidleri içerir. Çok düşük dansiteli lipoprotein (VLDL) ve düşük dansiteli lipoprotein (LDL), lipid ve lipid esterlerini karaciğerden periferik dokulara taşınmasını sağlar. Yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) ise; fazla kolesterolü periferik dokulardan karaciğere taşımaktadır. HDL' deki kolesterol esteri, karaciğerdeki SR-B1 adlı HDL reseptörü tarafından alınarak karaciğere geri taşınmaktadır (5).

İlk olarak 1994 yılında HDL, asetile LDL (AcLDL) ve okside LDL reseptörü olarak tanımlanan çöpçü reseptör sınıf B tip 1 (scavenger receptor class B type I (SR-BI)), doğal, modifiye lipoproteinler ve fosfolipidler için multiligantlı bir glikoproteindir. En önemli görevleri arasında “ters yönde kolesterol taşınımı” gelmektedir. Adrenal bezlerde, yumurtalıklarda, karaciğerde, testis, meme bezi, bağırsak, böbrekler, beyin, kaslar, plesenta, akciğer, uterus, dalak, sinir sistemi, dendrit, endotel, monosit/makrofaj, trombosit, deri, embriyonik dokular ve kalpte eksprese olmaktadır (6).

Diyetsel (flavonoidler, polifenoller), hormonal (ACTH, östrojen), lipidler (kolesterol, çoklu doymamış yağ asitleri, okside-LDL), metabolik ve farmakolojik etkenler ve diğer ajanlar (PPAR aile üyeleri, vitamin E), SR-B1 ekspresyonu etkilemektedir. *In vivo* yapılan çeşitli çalışmalarda karaciğerde SR-B1 ekspresyonunun artışı ile plazmada HDL-kolesterol seviyesinin azaldığı, kolesterolün karaciğerden safraya

atılımının arttığı ve HDL'deki ester kolesterolün daha fazla temizlendiği belirlenmiş ve dolayısıyla da ateroskleroz riskinin azaldığı rapor edilmiştir (7-9).

Bu çalışmanın amacı; özellikle Karadeniz Bölgesinde çokça tüketilen karalahana bitkisinin antioksidan kapasiteleri değerlendirilmesi ve ateroskleroz gelişiminde önemli yer tutan endotel hücrelerinde insan HDL reseptörü SR-B1/CLA-1 üzerine etkisinin incelenmesi sonucu bu bitkinin; lipoprotein metabolizması ve dolayısıyla kardiovasküler hastalıklar üzerine rolünü ortaya koymaktır. Diğer lahana türleri ile ilgili birçok çalışma mevcut iken; karalahana üzerinde fazla durulmamış olması, çalışmanın temel nedenlerinden biri olmuştur.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Karalahana

2.1.1. Karalahananın Genel özellikleri

Karalahana (*Brassica oleracea* var. *Acephala* DC.), *Brassicaceae* ailesi (*Cruciferae*) bitki türleri arasında yer almaktadır. Ülkemizde özellikle Karadeniz sahilinde sıklıkla yetiştirilmektedir. Yaz kış yenilen bu sebze adını eski Yunanca "yenilebilen sebze" anlamına gelen "lachanika" kelimesinden almaktadır (1). II. Dünya Savaşı sırasında yetişmesinin kolaylığı ve içeriğindeki zenginlikten ötürü "Sebzelerin Kralı", "Süper yiyecek" olarak isimlendirilmiştir (10).

Karalahana, geniş ve kalınca kat kat yaprakları olan, kış sebzesi olarak yetiştirilen ve yaprakları koyu yeşil olan bir lahanaya çeşididir. Çiçekleri sarı renklidir, yaprakları en koyu rengini, soğuk havalarda alır. Diğer yenilebilen lahanalardan farklı olarak, göbeklenmez (11).



Şekil 1. Karalahana

Genellikle kış aylarında karalahananın yapraklarından çorba, turşu gibi yemek çeşitlerinin tüketimi yaygındır (2). Karalahananın üretildiği aylar sonbahar sonundan

ilkbahar başlarına, dolayısıyla ekim ayından başlayarak takip eden üç veya dört aya karşılık gelmektedir (11). Ancak yaz sonrasında yapılan ekimler daha iyi mahsul vermektedir. Karalahana yapraklarının besinsel yararlarının yanında, tohumundan elde edilen yağı; ekmek, kek benzeri besinlerin yapımında kullanılmaktadır (2). Kışın soğuktan etkilenmeden yetiştiği için hava kirliliğini ölçmek için kullanılabileceği öne sürülmüştür (12).

Karalahana geniş biyolojik aktivitesini; yetiştirme koşullarına ve iklime bağlı olarak değişken zengin kimyasal içeriğine borçludur (13). Karalahananın enerji bakımından fakir, vitaminler (vitamin K, A, C, E) ve mineraller, fenolik asit ve yağ asit içeriği zengin olduğu birçok çalışmada rapor edilmiştir (2, 3, 13, 15). Tablo 1'de karalahananın ortalama kimyasal içeriği verilmiştir (2, 13). Diğer *Brassica* türleri arasında en yüksek konsantrasyonda; sodyum, magnezyum, fosfor, β - karoten, vitamin K, vitamin B₂, nikotinamid, folik asit, arginin, lösin, metiyonin, triptofan, tirozin ve sisteine sahiptir (13).

Sebzeler arasında en yüksek konsantrasyonda lutein + zeaksantin ve β -carotene içerir. Bu vitaminler kanserden korunmada rol oynayabilirler (13, 16). Karalahana mükemmel bir karotenoid kaynağıdır. Bu bileşikler diyetle alındığında başta akciğer kanseri, katarak gibi kronik göz hastalıklarına karşı koruma sağladığı rapor edilmiştir (16).

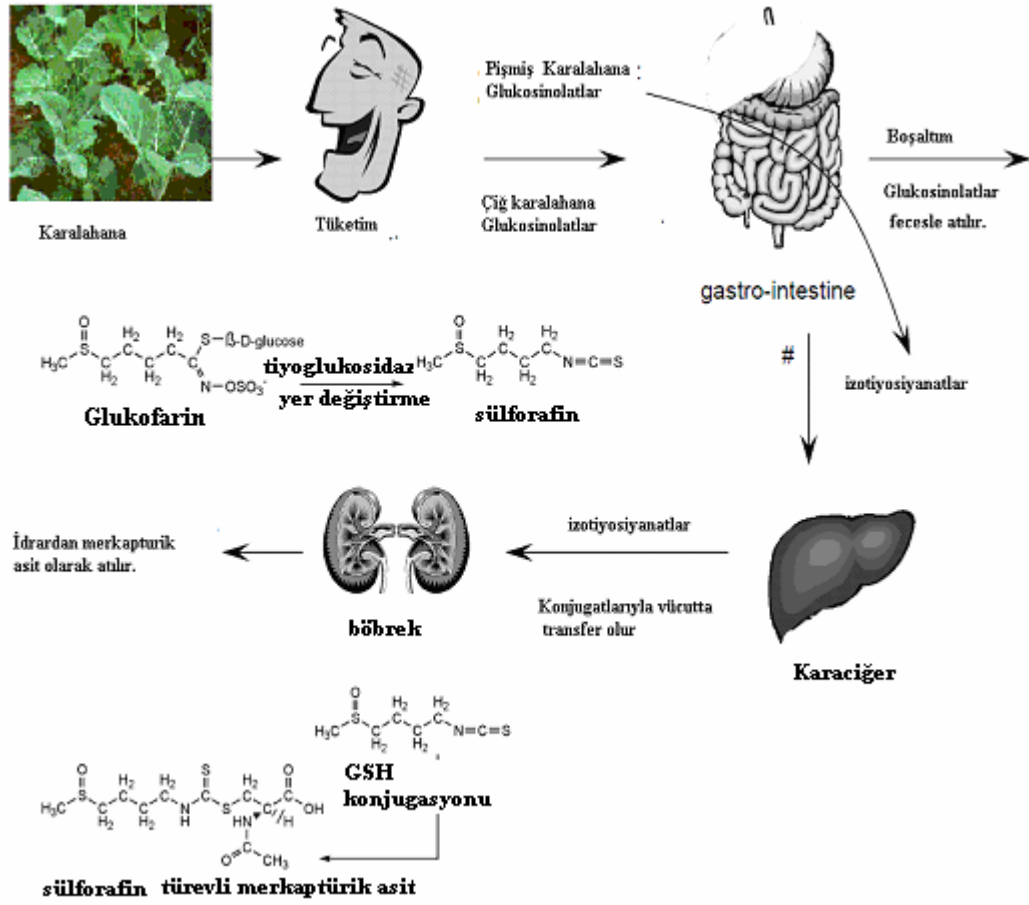
Karalahananın yeşil yapraklarında; karbohidrat olarak en çok fruktoz olmak üzere glukoz ve sükroz, serbest organik asit çeşidi olarak; sitrik asit ve malik asit olduğu belirlenmiştir. Aminoasit içeriği olarak en çok glutamik asit bulunurken; ikinci sırada aspartik asit gelmektedir. Ayrıca da stronyum da yaprakların kuru ağırlığının büyük bir kısmını oluşturmaktadır (2).

Yağ asidi bakımından ; yaprakları ile tohumu farklılık gösterir. Yapraklarında 18 farklı yağ asidi çeşidi belirlenirken, tohumunda 20 farklı yağ asidi bulunmuştur. Yapraklarında çoğunlukla bulunan yağ asitleri; 16:0 (palmitik asit), 18:2n-6 (linoleik asit) ve 18:3n-3 (α -linolenik asit), tohumlarında en çok 22:1n-9 (erusak asit) bulunur. Ayrıca essansiyel yağ asitleri 18:2n-6 (linoleik asit) ve 18:1n-9'de tohumlarında diğer yağ asitlerine göre fazla miktarda bulunmaktadır. Bu çoklu doymamış yağ asitlerinden linoleik asit ve linolenik asit insan vücudunda üretilmediğinden esansiyel olarak alınması gereken yağ asitleridir (2).

Tablo 1. Karalahananın ortalama kimyasal bileşimi (100g) (2, 13).

Muhtevası	Miktarı	Muhtevası	Miktarı	Muhtevası	Miktarı	Muhtevası	Miktarı
Enerji	36 kalori	Fosfor (mg)	87,0	B-karoten (µg)	5170,0	Glutamik Asit*	33,2
Su	% 86,30	Potasyum (mg)	490,0	Vitamin K (µg)	817,0	Aspartik Asit*	27,6
Protein (g)	4,30	Kalsiyum (mg)	212,0	Vitamin B1 (µg)	100	Arginin (mg)	300,0
Karbohidrat (g)	2,54	Magnezyum (mg)	31	Vitamin B2 (µg)	250	Histidin (mg)	69,0
Lipidler (g)	0,90	Sodyum(mg)	42,0	Nikotinamid (mg)	2,10	Lizin (mg)	240,0
Fiber (g)	4,20	Demir (mg)	1,90	Pantotenat (mg)	-	İzolösin (mg)	140,0
		Selenyum (µg)	1,37	Folik Asit (µg)	187	Lösin (mg)	250,0
		İyot (µg)	12,0	Vitamin B ₆ (µg)	250,0	Metiyonin (mg)	52,0
		Bakır(µg)	55,6	Biyotin (µg)	0,50	Fenilalanin (mg)	140,0
		Mangan (µg)	550,0	Vitamin C (µg)	105,0	Treonin (mg)	130,0
		Bor (µg)	240,0			Triptofan (mg)	64,0
		Çinko (µg)	330,0			Valin (mg)	230,0
						Tirozin (mg)	180,0
						Sistein (mg)	69,0

*, % kuru ağırlık



Şekil 3. Karalahana glukosinolatların metabolizması (11).

2.1.2. Karalahananın Antioksidanları ve Biyolojik Önemleri

Antioksidanlar, düşük konsantrasyonlarda organik bileşiklerin serbest radikal mekanizmalı oksidasyonunu engelleyen veya önleyen bileşiklerdir. Son yıllarda besin kimyası ve koruyucu tıbbın bitkisel kaynaklı doğal antioksidanlara ilgisi artmıştır. Bunun sebebi sentetik antioksidanların kanserojenik olarak düşünülmesidir. Doğal antioksidanlar ise, insan organizması için genellikle zararsız olup yan etkileri bulunmamaktadır. Doğal antioksidanların büyük çoğunluğu bitkisel kaynaklıdır.

Bitkilerin antioksidan özelliği, yapılarında bulunan; vitamin, mineral, vitamin kofaktörleri, hormonlar, fiber yapıları (kolon kanserinin önlenmesinde önemi bilinen), yanında bitkisel kimyasallardan (fitokimyasal antioksidanlardan) kaynaklanmaktadır. Bitkilerde bulunan vitaminlerden; özellikle A, C, E vitaminleri bilinen antioksidan vitamin

çeşitlerindedir. Yüksek oranda sebze ve meyve tüketimi oksidatif stresi engelleyerek buna bağlı doğabilecek kronik hastalıkları önler . Kısaca, bitkisel kaynaklı diyetle tüketilen sebze ve meyvelerdeki antioksidanlar; hastalıklara karşı savunmada, vücut direncini arttırmaktadırlar (19).

Karalahananın antioksidan özelliği; yapısında bol miktarda bulunan glukosinolatlarının yıkım ürünleri, vitamin A, vitamin C, vitamin E, selenyum, folik asit, polifenoller; flavonoidler ve karotenler, lif, lutein, zeaksantin gibi bitki fitokimyasallar bakımından zengin olmasından ileri gelmektedir (2, 12, 16, 20, 21).

A vitamini için kaynak olan sebze ve meyveler bitkilerde olduğu gibi insanları da güneşin yaptığı zararlı etkilerden korumaktadır. Beta karoten içeren başlıca sebzeler; havuç, kabak, brokoli, domates, karalahana, şeftali olarak gösterilebilir. Karatenoidlerin bir grubu insan ve hayvan vücudunda A vitaminine dönüşürler. Bu nedenle pro A vitamini olarak bilinirler. Lutein, bitkilerde bulunan sarı renkli organik bir karatenoiddir. Latince lutea (sarı) kökünden gelir. Ispanak ve karalahana gibi yeşil sebzelerin yapraklarında bulunur ve mavi ışığı emici özelliği vardır. Zeaksantin; karalahana, ısır, safran ve çoğu başka bitkiye kendilerine has rengi veren pigmenttir. Canlılar tarafından antioksidan olarak kullanılırlar. 2002 yılı USDA (Amerika Tarım Akedemisi) raporuna göre karalahana sebzeler arasında en yüksek β -karoten ve lutein + zeaksantin muhtevasına sahiptir (16, 22).

C vitamini (askorbik asit); yaşamsal olarak önemli görevlere sahip antioksidanlardandır. Hem hayvan hem de bitkilerde enzimatik ve enzimatik olmayan reaksiyonlarda, reaktif oksijen türlerini temizleyen bir antioksidan olarak görev yapar (23). Yüksek miktarda C vitamini kaynağı turuncgiller yanında; yeşil biber, brokoli, yeşil yapraklı sebzeler, çiğ lahana, domates gibi başlıca sebzeler yer almaktadır (23, 24).

E vitamini (tokoferol, tokotrienoller), yağlarda çözünür ve lipidleri koruyucu özelliğe sahiptir. Düşük konsantrasyonda vitamin E, düz kas hücreleri ve endotel hücrelerinde LDL oksidasyonunu önleyebilmektedir. Vit E'nin koruyucu etkisi, sadece endotel ve düz kas hücrelerine değil, monosit-makrofaj hücrelerinde de olmaktadır. E vitamini kaynağı olarak, ham buğday, sebze yağları, yeşil yapraklı sebzeler gösterilebilir (23).

Fitokimyasaller, bitkileri fazla miktarda oksijenin zararlı etkisine karşı koruyucu olarak fonksiyon göstermektedirler. Bitkilerde bulunan fitokimyasaller; fenolik metabolitler, terpenoidler, alkaloidler ve diğer azot ihtiva eden gruplardır. Bitkiler ilk olarak bu kimyasalları fazla miktarda oksijenin (reaktif oksijenin) bitkiye yapabileceği

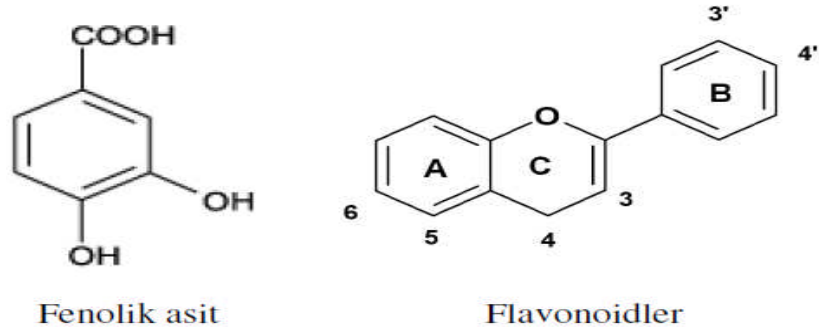
zararlı etkilere karşı korunmak için oluşturmuştur . Bu kimyasallar bitkilerin ikincil metabolizması ürünleridir. Başlıca metabolizma ürünleri gibi bitki için esansiyel ürünler değillerdir. Ancak bitkiye özgü renk, tad, koku oluşturmaları yanında; bitkileri, mantarlardan, bakteri, virüs, hücre, DNA hasarından koruyabilirler. Fitokimyasalların ikincil metabolizması tarafından genellikle sikimat ve pirüvat yolları üzerinden sentezlenirler. Bitkilerde bulunan fitokimyasal antioksidanlar, 3 büyük sınıf altında toplanılabilir:

- Fenolik metabolitler,
- Terpenoidler,
- Alkaloidler ve diğer azot içeren gruplar (25).

Fenolik metabolitlerin (polifenollerin); bulunduğu grup bitki aleminde en geniş fitokimyasal antioksidan grubu olarak bilinmektedir. Fenolik metabolitler, en az 10 farklı alt sınıfa ayrılmaktadır ve 8000 den fazla polifenol türü içermektedir (26). Polifenoller; çeşitli sebze ve meyve, tohum, kuruyemiş, çiçek, kök ve gövde kısımlarında doğal olarak sentezlenen maddelerdir (27). Bu sınıflarda fenolik asit gibi basit yapılu bileşikler yanında, tanenler gibi kompleks yapılu bileşikler yer alabilir. Fenolik bileşikler, enzimatik mekanizmayla veya direk radikal temizleme mekanizmalarıyla antioksidan fonksiyon gösterdiklerinde tek değerlikli kendi fenoksil radikallerine yükseltgenirler ve içerdikleri hidroksil gruplarının sayısı ve konfigürasyonu antioksidan aktiviteyi önemli miktarda etkilemektedir (28,29). Karalahana yapraklarında başlıca ferrulik asit ve kafaik asit, olmak üzere dokuz çeşit fenolik asit bulunurken; tohumlarında ise en fazla sinaptik asit olmak üzere 10 çeşit fenolik bileşik bulunmaktadır (3).

Polifenol sınıfının en büyük grubu **flavonoid**lerdir. Flavonoidlerin etkili antioksidan olmaları araştırma konusudur ve görev olarak askorbata benzer etki gösterdiği gözlemlenmiştir (30). Flavonoidler genellikle çiçek, yaprak, gövde, kök, tohum ve meyve gibi bitki dokularının epidermal hücrelerinde glikozidik veya glikozidik olmayan formda birikirler (31). Flavonoid çeşitlerinin taşımış oldukları farklı hidroksil grupları ve onlara bağlı substitüenler flavonoidlerin farklı indirgenme potansiyeli kazanmasına ve bundan dolayı değişik antioksidan aktivite göstermelerine sebep olurlar (29). Flavonoidler (Şekil 4), yapısal olarak; A, B benzen halkaları ve O bağlı C halkasından oluşmaktadır. B halkasındaki hidroksil konfigürasyonu SOR ve SNR (serbest nitrojen radikalleri) temizleme aktivitesinde belirleyicidir. B halkasındaki hidroksi grupları hidroksil, peroksil ve peroksinitrit radikallerine hidrojen ve elektron vererek onları daha kararlı hale getirirler ve bu radikallere oranla daha kararlı flavonoid radikallerinin oluşmasına neden olurlar. Bu düzenlenme ayrıca hidroksil, peroksil ve

peroksinitrit radikali temizleyicilerinin en çarpıcı özelliğidir. Bu yapıdaki flavonoid radikalleri daha karardır. B halkasındaki 3'-4'- katekol yapısı lipid peroksidasyonunu inhibisyonunu arttırmaktadır. A halkasındaki substitusyon antioksidan aktiviteyle zayıf korelasyon gösterir fakat 5-OH' in antioksidan aktiviteye katkısı bulunmaktadır. Ayrıca A halkasında metoksi grubu bulunması B halkasının antioksidan aktivitesini etkilemektedir. Flavonoidler, antioksidan özellikte 13 alt sınıfa ayrılır; kalkonlar, dihidrokalkonlar, auronlar, flavonlar, flavonollar, dihidroflavonollar, flavonlar, flavanollar, flavadiollar, antosiyaninler, izoflavonoidler, proantosiyadinler, biflavonoidlerdir (32,33) .

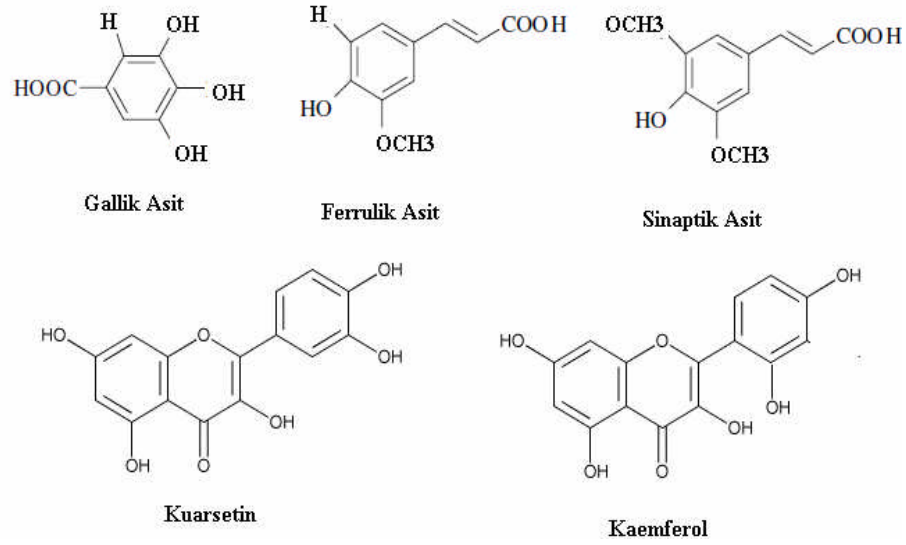


Şekil 4. Polifenoller (34).

Diyetle flavonoid içeren besinlerin tüketimi, hem in vivo hemde in vitro olarak birçok biyolojik etkiye sahiptir. Epidemiyolojik çalışmalarda, flavonoid içeriklerin tüketiminin kanser ve kardiyovasküler hastalıkları azalttığı görülmüştür. Bu yüzden flavonoidler; antioksidan, antimutajenik, çöpçü aktiviteye sahip olabilir (32) . Flavonoidlerin lipid peroksidasyonunu engellemesi;

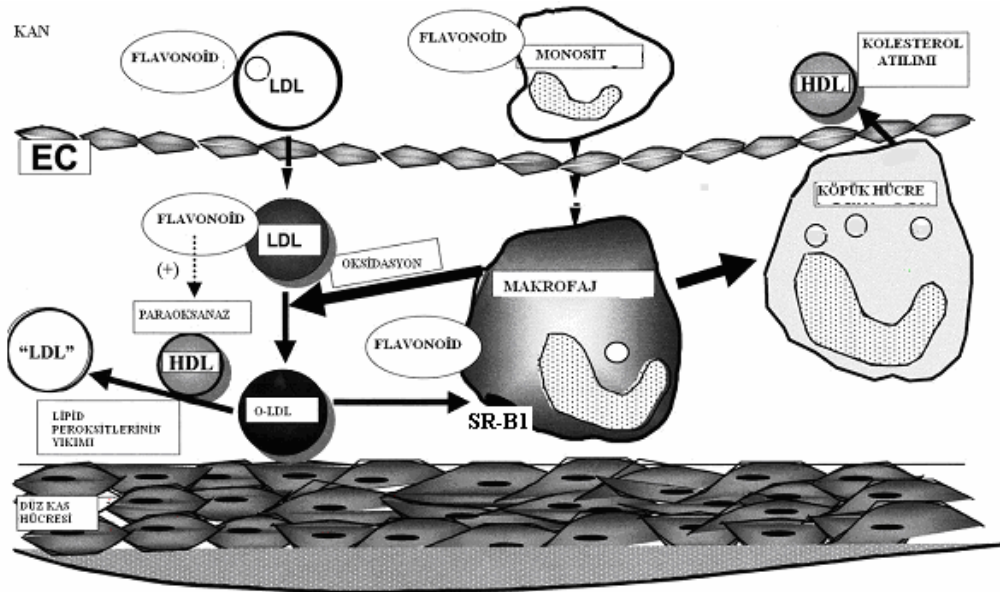
- 1) OH. ve O gibi radikallere çöpçü aktivite göstererek
 - 2) Metal iyonlarına bağlanarak,
 - 3) Lipid peroksil radikallerine çöpçü aktivite göstererek,
 - 4) Serbest radikallerden dolayı oluşmuş enzimatik reaksiyonları inhibe ederek
- saglanmaktadır (33,36) .

Karalahana flavonoidçe zengindir. Kuersetin ve kaemferol yapısında en fazla bulunan flavonoidlerdir (3, 23). Şekil 5'de karalahana yaprağında ve tohumunda bulunan gallik asit, ferrulik asit, sinaptik asit, kuersetin ve kaemferolün yapısı verilmiştir (3).



Şekil 5. Karalahanada bulunan fenolik maddelerden bazıları (2, 3).

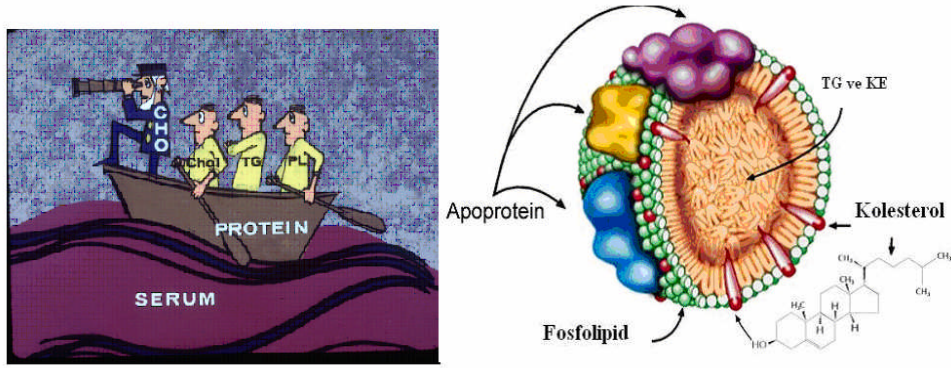
Flavonoidler, LDL ile direk etkileşebilirler ve bu şekilde LDL oksidasyonunu engelleyebilirler. Ayrıca flavonoidler, monosit/makrofaj gibi ater hücreleri ile etkileserek, makrofaj yolu LDL oksidasyonunu inhibe edebilirler. Üstelik, flavonoidler, paraoksonaz enzim aktivitesine karşı koruyucu etki göstererek lipoproteinlerin oksidasyonunu engeller. Bütün bunlar, makrofaj-köpük hücre oluşumunun azalmasına yol açar. Böylece aterosklerotik lezyon gelişimi engellenir (35) (Şekil 6).



Şekil 6. Flavonoidlerin LDL Oksidasyonuna ve Köpük Hücre Olusumuna Etkisi (35).

2.2. Lipoproteinler ve Reseptörleri

Lipoproteinler; suda çözünmeyen başta kolesterol olmak üzere; lipidlerin, çözünür lipid ve protein kompleksi şeklinde kanda taşınmalarını sağlayan makromoleküllerdir. Çekirdeği çoğunlukla hidrofobik lipidler, (trigliserid ve kolesterol esterleri) içeren protein yüzey tabakası, serbest kolesterol ve fosfolipidler (daha hidrofilik yapı taşları) taşıyan küresel parçacıklardır (Şekil 7) (8).



Şekil 7. Lipoproteinlerin yapısı (8).

Lipoproteinlerin protein içeriğini başlıca apolipoproteinler (apoprotein) ve enzimler meydana getirir. Apolipoproteinler geniş bir sınıf oluşturmaktadırlar ve reseptör ligandından enzim aktivatörlüğüne dek çeşitli görevlerden sorumludurlar. Lipoproteinler ayrıca yağda eriyen vitaminler (A, D ve E), ilaçlar (probukol gibi), bazı virüsler ve bazı antioksidan enzimleri gibi birçok maddeyi taşırlar (8).

Lipoproteinler; elektroforez, ultrasantrifüj, ultrafiltrasyon ve elektron mikroskopik yöntemlerle birbirlerinden ayrılırlar Elektrotretik hareketliliklerine, lipid ve apolipoprotein içeriklerine ve yoğunluklarına göre sınıflandırmada 6 lipoprotein tanımlanmıştır. Her bir lipoprotein sınıfı lipid taşınmasında farklı roller oynarlar.

Şilomikronlar (ŞM) ; ince bağırsak epitel hücrelerinin düz endoplazmik retikulumunda sentezlenirler. Çapı en büyük ve trigliserit içeriği en fazla olan lipoproteindir. Genel olarak uzun ömürlüdürler. Lipoprotein lipazın (LPL) trigliseritleri hidrolizine bağlı olarak meydana gelen ŞM kalıntıları kolesterol esterleri içeriği bakımından daha zengindir. Lenf dolaşımı üzerinden karaciğere gelerek katabolize edilir. Barsaklarda sentez edilen ŞM'lar 12 saatlik bir açlıktan sonra dolaşımında bulunmazlar.

Çok Düşük Yoğunluklu Lipoproteinler (VLDL) ; Karaciğerde sentezlenip dolaşıma verilir. Fonksiyonu, karaciğerde sentezlenen trigliserid ve kolesterolü ekstrahepatik dokulara taşımaktır. VLDL'nin trigliserit içeriği, dolaşımda lipoprotein lipaz, ve hepatic lipaz (HTGL) enzimlerince hidrolize edilerek kolesterol esterlerinden zengin VLDL kalıntıları oluşur. VLDL bu enzimatik reaksiyonlar sonucunda ara yoğunluklu lipoproteinlere (IDL) dönüşür.

Orta Yoğunluklu Lipoproteinler (IDL); VLDL'nin %50 veya daha fazlası lipolitik enzimlerce IDL'ye dönüştürülür. Normal koşullarda plazmada düşük konsantrasyonlarda bulunur. Lipoliz sonucu trigliserit bakımından zenginleşir.

Düşük Yoğunluklu Lipoprotein (LDL); Plazmanın başlıca kolesterol taşıyıcı molekülüdür. Plazma kolesterolünün yaklaşık %70'i LDL'de bulunmaktadır. Eser miktarda apo E dışında protein içeriğinin % 95'ni apo B100 oluşturur. LDL'nin hemen hemen tümü VLDL'nin lipolizi sonucunda oluşur. Yapısındaki fosfolipid ve çoklu doymamış yağ asidi içeriği bakımından oksidasyona duyarlıdır. En küçük ve en yoğun LDL oksidasyona karşı en hassas türüdür ve aterojenik bir molekül olarak bilinir.

Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein (HDL); Lipoproteinler içerisinde yoğunluk olarak en fazla çap olarak ise en küçük olanıdır. Birsonraki konuda ayrıntılı olarak anlatılacaktır.

Lipoprotein (a) (Lp(a)); Lipid bileşimi bakımından LDL'ye benzeyen Lp(a), apo(a) denen 514 kD ağırlığında yüksek glikolize bir protein içerir. Serum Lp(a) düzeyinin yaşa bağlı olarak değişmediği tespit edilmiştir. Lp(a), lipid içeriği bakımından LDL'ye benzemesi ve yapısındaki apoproteinler [apo (a) ve apo B]'den dolayı hem aterojenik ve hemde trombojenik özelliğe sahiptir (37).

Tablo 2. Lipoproteinler ve genel özellikleri

Sınıfı	Yoğunluğu (g/mL)	Çapı (nm)	Lipid ve protein İçeriği (%)				Apolipoproteinleri
			Protein	TK	TG	FL	
ŞM	<0,95	75-200(0)	1-2	4	85	8	B48, AI, AIV,
VLDL	0,95-1,006	30-80(preβ)	8	23	55	15	B100, E, CI, CII, CIII
IDL	1,006-1,019	25-35 (β)	10	35	28	26	B100, E
LDL	1,019-1,063	18-25 (β)	18	65	8	13	B100
HDL	1,063-1,210	5-12 (α)	50	25	5	20	AI, AII, CI, CII, CIII, E
Lp(a)	1,055-1,085						apo(a), B100

Lipoprotein reseptörleri; ligandlarına (lipoproteinlerini) bağlanarak, tanıyıp biyolojik aktivitelerini yerine getirmelerine aracılık eder (38) .

Tablo 3. Lipoproteinler ve Reseptörleri

Lipoprotein	Reseptörü
<i>Şilomikron</i>	ApoER2 (7).
<i>VLDL</i>	VLDLR (39), SR-B1 (8).
<i>IDL</i>	LDLR (40).
<i>LDL</i>	LDL Reseptör Ailesi Üyeleri: LDL reseptör ilişkili protein (LRP), megalin (GP330), VLDL reseptörü, apoE reseptörü 2 (apoER2), sorLA-1/LR11, LRP3, LRP4, RP5, LRP6, LRP1B/LRP-DIT (Tümörlerde), ve LRP9 (41).
<i>HDL</i>	SR-B1/CLA-1, HRP, HB ₂ (42), Kubilin (43).
<i>Lp(a)</i>	LDLR (44).

2.3. HDL ve SR-B1

2.3.1. HDL

HDL'nin; birçok ögesi diğer lipoproteinlerle değiş-tokuş edildiği ve enzim etkinliği sonucu değişikliğe uğradıkları için en heterojen lipoproteindir, değişik lipid ve protein içeriğine sahip alt grupları vardır. Apo A-I ve Apo A-II; HDL'deki ana apoproteinlerdir (Şekil 8). Az miktarda apoE ve C içerir. ApoE HDL alt grubunun (HDL-1) küçük bir komponentidir, fakat plazma apoE'nin yaklaşık % 50'si HDL'de bulunur. HDL'nin başlıca sınıfları apoE içermez ve böylece LDL reseptörü ile etkileşmez. HDL plazmaya girdiklerinde diğer lipoproteinlere dağıtılmak üzere apoE ve C için bir rezervuar işlevi görür. HDL alt grupları sadece apoAI veya apoAI/II içerebilir. Bunlara ek olarak apo AIV, apo J (klusterin), paraoksonaz (PON), haptoglobulin, lesitin kolesterol açıl transferaz gibi çeşitli proteinler de HDL ile ilişkilidir. HDL'nin aterosklerozla karşı koruyucu role sahip olduğu bilinmektedir ve bu proteinlerin HDL'nin fonksiyonlarında önemli rolleri vardır (45). HDL'nin fonksiyonları genel olarak Tablo 4'de gösterilmektedir.

Tablo 4. HDL'nin fonksiyonları (45).***Antiinflamatuar;***

- LDL oksitlendiğinde cevap olarak oluşan MCP-1 'in ekspresyonunu inhibe eder.
- PAF 'ın oluşumunu ve parçalanmasını inhibe eder.
- VCAM, ICAM, E selektin gibi adezyon moleküllerini inhibe eder.

Antioksidan;

- LDL'lerden hidroksiperoksitlerin Apo A-I ile uzaklaştırır
- Paraoksanaz ve ve GPx ile LDL'deki lipid hidroperoksitleri parçalandı.
- PAH açıl-hidrolaz ile LDL'den okside fosfolipidlerin uzaklaştırır.
- Yapısında bulunan likopen, vit E, gibi antioksidanlar sayesinde oksidasyona karşı koruyucu rolü vardır.

Antitrombotik;

- NO ve PGI₂ üretimini artırır.
- PAF üretimini inhibe eder.
- Protein C ve S aktivitelerini artırır.

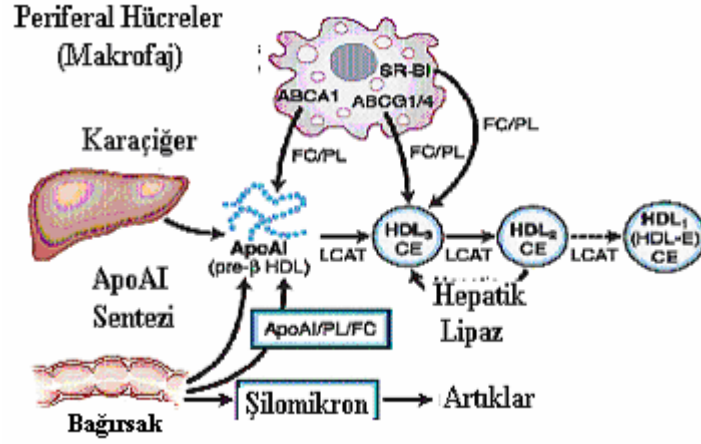
Antiaterojenik;

- eNOS aktivitesini düzenleyerek NO üretimini etkiler.
- Kolesterol alım ve atılımında görev alır.
- PAF üretimini inhibe eder.
- HDL endotelin PGI₂ sentezini düzenler.

HDL, üç ana kaynaktan sentezlenir (Şekil 8);

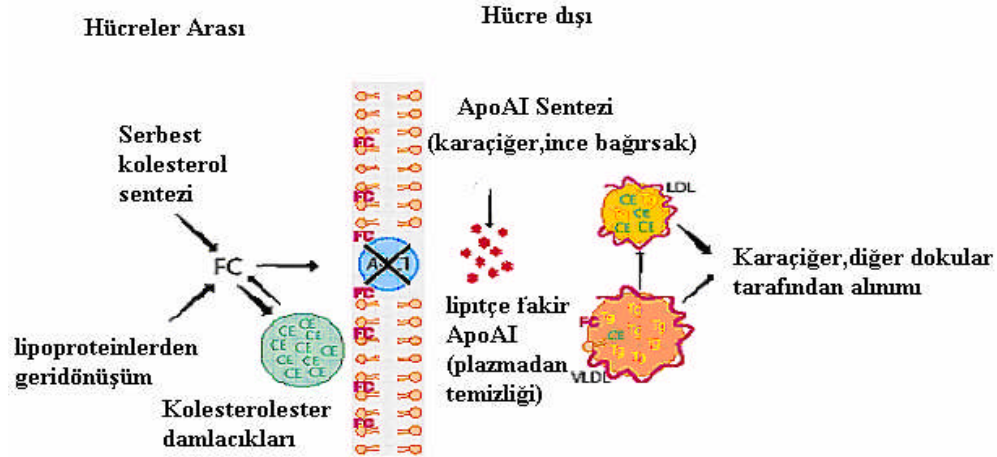
1. Karaciğer yeni "HDL" denen bir apoAI ve fosfolipid salgılar.
2. Bağırsak direkt olarak küçük bir apoAI içeren "HDL" sentez eder.
3. Lipoliz sırasında VLDL ve şilomikronlardan gelen yüzey materyalinden (başlıca apoAI ve fosfolipid) "HDL" sağlanır.

Enzimlerin etkisi ve kolesterol başta olmak üzere lipid ve protein alımını sürdürükçe diğer HDL türleri oluşur (46). HDL'nin dokulardan kolesterol toplaması için iki mekanizma önerilmiştir (47).



Şekil 8. HDL Moleküllerinin Biyosentezi ve Dönüşümü (48).

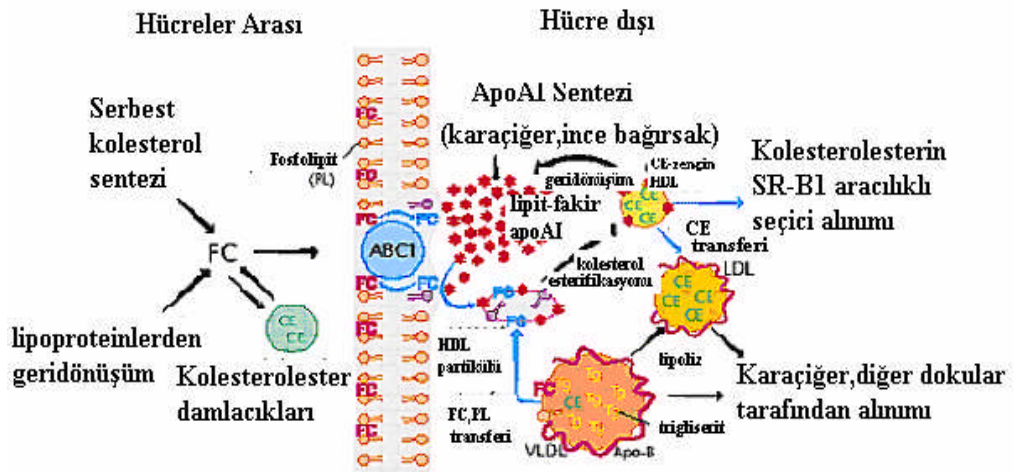
Pasif Desorpsiyon: Hücrelerde kolesterol fazla iken HDL’de azdır. Kolesterol yoğunluk farklılığından dolayı hücreyi geçer. Hücrelerden sulu transfer; serbest kolesterol hücreden HDL partikülüne doğru bir fizikokimyasal konsantrasyon gradyanı izler, bu olaya pasif desorpsiyon denir. Lipid akışı serbest kolesterolün lipidten fakir apoA-1’e sıvı difüzyonu yoluyla gerçekleşir. Bu olay özellikle kolesterol içeriği artmış hücreler için geçerlidir (47, 48).



Şekil 9. Kolesterolün Pasif Desorpsiyonla Taşınması (47)

Reseptör Aracılıklı Kolesterol Taşınması: HDL’nin ekstra hepatik dokularda lipid alışverişini sağlayan iki önemli reseptör vardır. Bunlar ABCA1 (ATP binding cassette transporter protein 1) ve çöpçü reseptörü sınıf B tip I (SR-BI)’ dir.

HDL, ABCA1 vasıtası ile ekstrahepatik hücrelerden serbest kolesterol, fosfolipid ve hatta sfingolipid alır. ABCA1 reseptörüne bağlanmasında apoA1 rol oynar. ABCA1 hücresel kolesterol çıkışının majör düzenleyicisidir ve esterlenmemiş kolesterolü hücreden ATP bağımlı tasıma mekanizmaları yoluyla uzaklaştırır. Fosfolipid transfer proteini (PLTP) de yüzey bileşenlerini (fosfolipidler ve esterlenmemiş kolesterol) apoB içeren partiküllerden apoA-1 içeren partiküllere transfer ederek HDL'nin lipidlenmesine katkıda bulunur (47).

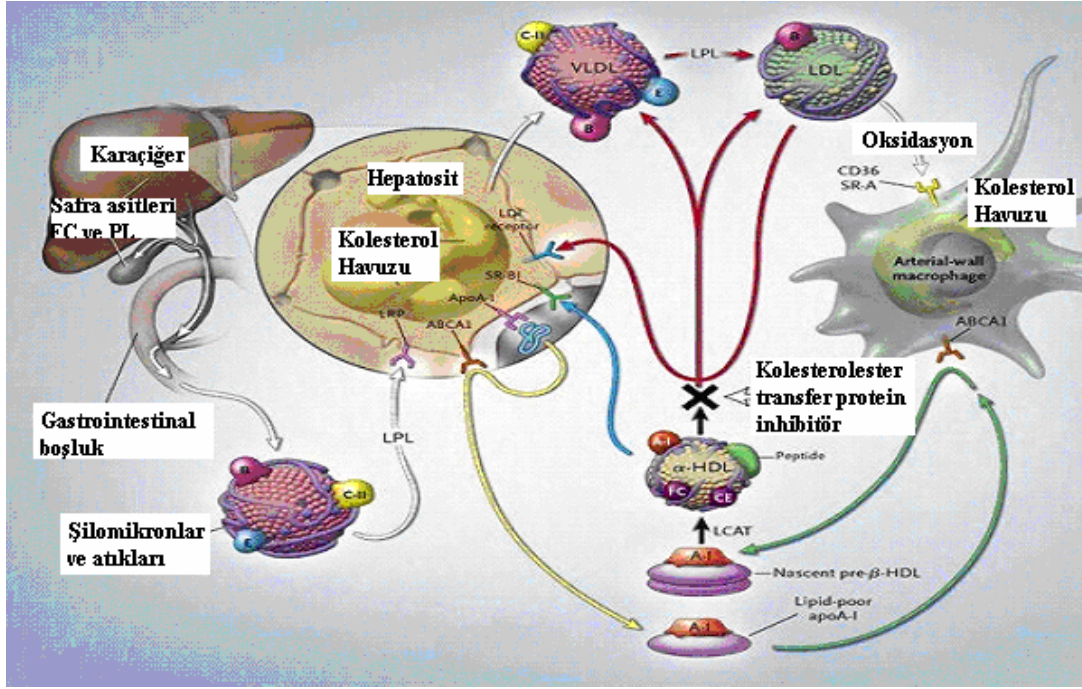


Şekil 10. Reseptör Aracılıklı Kolesterol Taşınımı (47).

Ters Yönde Kolesterol Taşınımı: Karaciğerde ve ince bağırsak duvarında sentezlenen HDL (preβ HDL), diskoidal şekillidir; ApoA-I, lesitin ve serbest kolesterol içerir. Yeni sentezlenen ve kan dolaşımına salınan HDL, dolaşımdaki şilomikron ve VLDL'den kolesterol esterlerini toplar ve enzimlerin etkisi ve lipid ve protein alışverişi ile küre şekilli HDL (HDL₃) şekline dönüşür. HDL₃ olarak tanımlanan ilk olgun HDL'nin yüzeyindeki lesitin: kolesterol açil transferaz (LCAT), serbest kolesterol ile lesitinden, kolesterol esteri ve lizolesitin oluşturur.

HDL₃'ün yapısında artan kolesterol esterleri, kolesterol esteri taşıyıcı protein (CETP) yardımıyla diğer lipoproteinlerdeki trigliseridlerle değiştirilir; böylece HDL₂ oluşur. Trigliseridi zengin HDL₂, hepatik kapiller endotelde yerleşmiş durumdaki hepatik trigliserid lipazın etkisiyle trigliseridi azaltılarak yeniden HDL₃'e dönüştürülür. Bir kısım HDL₂ ise karaciğer tarafından Apo A-I'i tanıyan reseptörleri sayesinde dolaşımdan alınır. Kolesterolden zenginleşen HDL, karaciğere dönünce kolesterolü bırakır. Böylece HDL, kolesterolü dokulardan karaciğere taşımış olur (Şekil 10) (47, 48).

HDL bağlayıcı protein (HBP), HDL bağlayıcı protein 2 (HB2), kübilin ve SR-B1 ; HDL reseptörü olarak belirlenmişlerdir. Tablo 5’de HDL reseptörleri ve özellikleri verilmiştir.



Şekil 11. Ters yönde kolesterol taşınımı (48).

Tablo 5. HDL reseptörleri ve özellikleri (42,43)

Reseptör	Homoloğu	Yapısı	Dağılımı	Ligandları	Fonksiyon/özellikleri
<i>HBP</i>	Vigilin	Glikozillenmemiş, transmembranı yok, 110 - 150 kDa	Sitoplazmik, endotel hücrelerinde, makrofajlarda	HDL, apoA-I	Bilinmiyor, östrojen tarafından uyarılıyor, kolesterole hassasiyeti var.
<i>SR-B1</i>	CD36, CLA-I	Glikozillenmiş, acilenmiş, Kaveolede yerleşmiş, İki transmembran domaini var, 82 kDa	Plazma membranında, sterol üreten dokularda, karaciğerde,	HDL, LDL, modifiye LDL, apoA-I, apoA-II, apoC	Docking protein, Kolesterol esterinin akışında rol alıyor.
<i>HB2</i>	ALCAM, BEN	Glikozillenmiş, bir transmembran domaini var, 100 kDa,	Plazma membranında, karaciğerde, beyin, ince bağırsak, akciğer, makrofajlarda	HDL, apoA-I, apoA-II	Bilinmiyor, Kolesterol - statin hassasiyeti, adezyon, Sinyalleşme?
<i>Kubilin</i>	rsu1	Kısa N-terminal domain, 460 kDa	Böbreklerde,	HDL, apoAI	Böbreklerde HDL metabolizmasında, Vitamin B12 'in endositozda

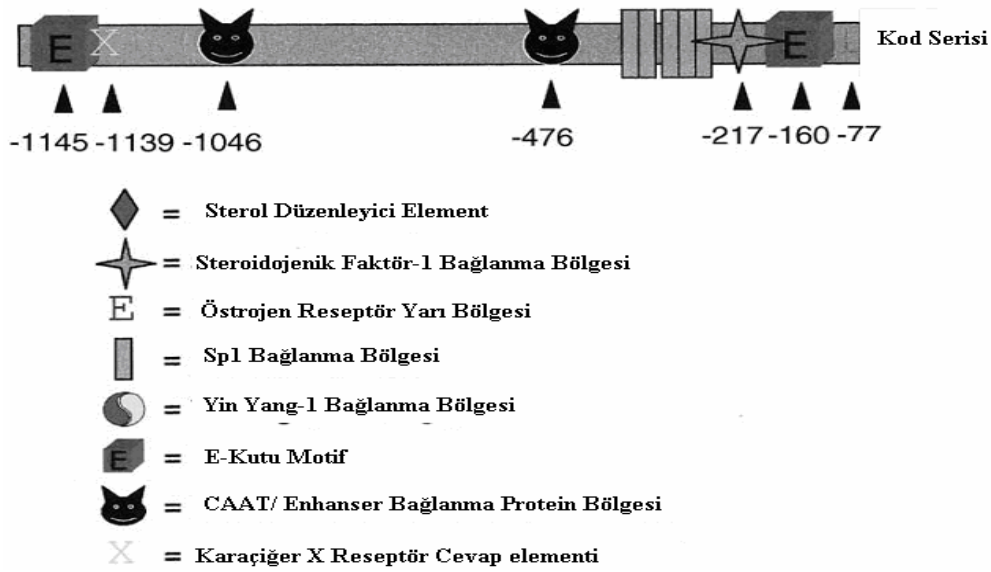
2.3.2. SR-B1: Çöpçü Reseptör Sınıf B, Tip B

Çöpçü (scavenger) reseptör (SR)'ler makrofajların fagositoz fonksiyonuna katkıda bulunurlar. Bilindiği gibi, makrofajlar dokuların civarında bulunan; apoptotik hücreleri, yabancı hücreleri ve molekülleri tanıyabilen ve fagosite edebilen hücrelerdir. SR'de ilk olarak makrofajlarda tanımlanmıştır ve bu hücrelerde yaygın olarak bulunurlar. Bu reseptörler yabancı ve endojen bazı moleküllere bağlanırlar, doğal bağışıklıkta ve apoptotik hücrelerin temizlenmesinde rolleri vardır. Ayrıca, makrofajlar modifiye lipoproteinlerin endositozunu da yapabilirler ve SR'ler bu fagositozda rol alırlar (38).

SR-B1 proteini; ilk olarak 1994 yılında Brown, Goldstein tarafından acLDL reseptörü olarak tanımlanmasına rağmen ; daha sonra Krieger ve arkadaşları tarafından LDL ve modifiye LDL' ler (okside LDL, asetile LDL) için reseptörü olarak tanımlandı. Daha sonra ise sadece bu ligantlara değil; ayrıca HDL, VLDL olmak üzere diğer birçok ligandı eklenerek multiligant bir reseptörü olduğu belirlendi (49).

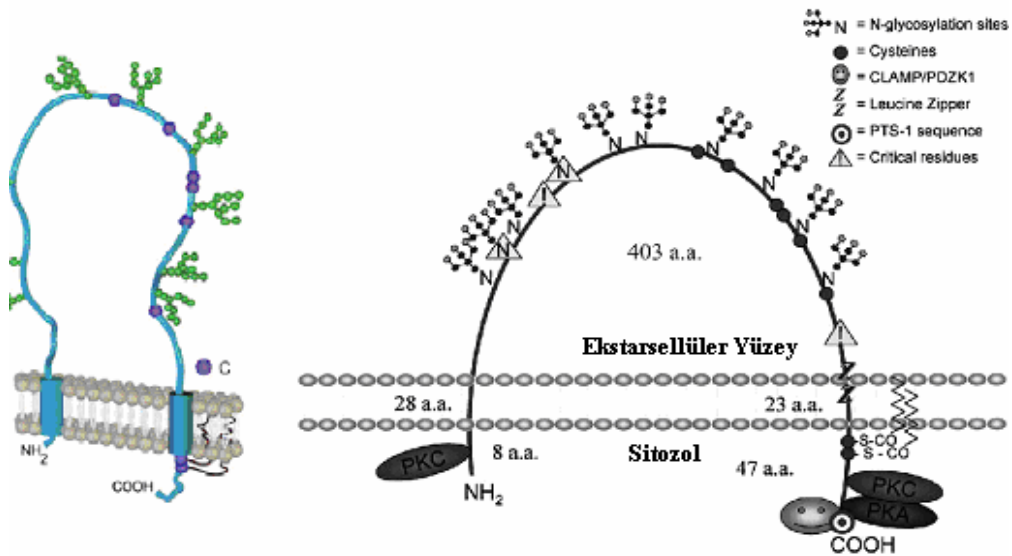
SR-B1 protein insanda, 12. kromozomda 12q24.2 veya 12q24.31–32 konumunda bulunun CD36L1 geni tarafından kodlanır. CD-36 ailesi üyesidir. İnsan homoloğu olan CLA-1 (CD-36 ve LIMPII-analog-1) sıçan (hamster) homoloğuyla % 80 homoloji gösterir.

SR-BI, 509 aa uzunluğunda bir membran proteinidir. SR-B1 öncülü, hücrel kolesterol seviyesi ve hormonların düzenlenmesini içeren bölümler içerir (Şekil 12). Dokuz N-glikosyan bölgesi içerir. 57 kDa'luk olarak eksprese edildikten hemen sonra ekstrasellüler N-domaininden glikozillenerek molekül ağırlığı 82-85 kDa'a ulaşır. At nalı şeklindedir. Proteinin hem N- hem C- uçları membrana bağlıdır, bu iki membran aşan bölge arasındaki kısım sitoplazmaya doğru uzanır. Yani iki transmembran domaini iki sitoplazmik kuyruğu vardır. İki transmembran domain geniş bir ekstrasellüler domainle birbirinden ayrılır (37- 439 aa). Ekstrasellüler domainin yapısı tam olarak açıklanmasada yapısında beşi CD36 ve LIMPII 'de de bulunan; ekstrasellüler disülfür köprüsü oluşturma potansiyeline sahip altı sisteini olduğu bulunmuştur (Şekil 13). C terminal sistein domainden palmitoylenerek modifiye olur. Kolesterol ve sfingolipidçe zengin mikrodoman, kaveollerde bulunur. Membranın kaveollerce zengin kısımlarında buldukları gibi fakir kısımlarda bulunurlar (6, 50).



Şekil 12. SR-B1 Öncülü (6).

SR-BI; en fazla HDL'nin lipid alınımını yaptığı karaciğer ve steroid üreten dokularda ve diyet kolesterol emiliminin yapıldığı ince bağırsağın fırçamsı membranında olmak üzere kolesterol metabolizmasında rol alan dokularda eksprese edilir. Adrenal bezlerde ve yumurtalıkta en yüksek olmak üzere; karaciğerde, yüksek, testis, meme bezi, bağırsak, böbrekler, beyin, kaslar, plesenta, akciğer, uterus, dalak, sinir sistemi, dendrit, endotel, monosit/makrofaj, trombosit, deri, embriyonik dokular ve kalpte az miktarda eksprese olduğuna dair raporlar mevcuttur (6, 50).



Şekil 13. SR-B1'in Yapısı (6).

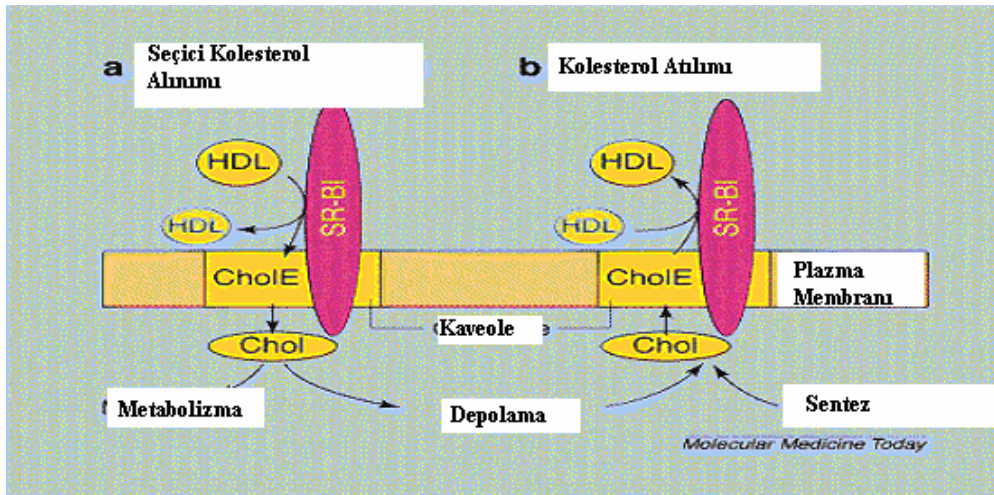
SR-B1; multiligandlı bir reseptördür. Ligantları arasında; LDL, oksideLDL, asetile LDL, HDL, VLDL, malenlenmiş sığır serum albumini (M-BSA) (6), ileri glikasyon son ürünleri (51), okside HDL (52), anyonik fosfolipidlerden fofoditilserin ve fosfoditilinositol (53, 54) bulunmaktadır.

SR-B1; lipidlerin iki yönlü değişiminde rol alır. HDL ile LDL arasında kolesterol esteri (CE) ile serbest kolesterolün (FC) seçici alımından, lipoproteinlere ve lipoprotein olmayanlara serbest kolesterol akışında rol alır (6, 54). HDL ve LDL'deki polar lipidlerin, TG gibi apolar lipidlerin ve α -takoferolün transferinden de sorumludur (55, 56).

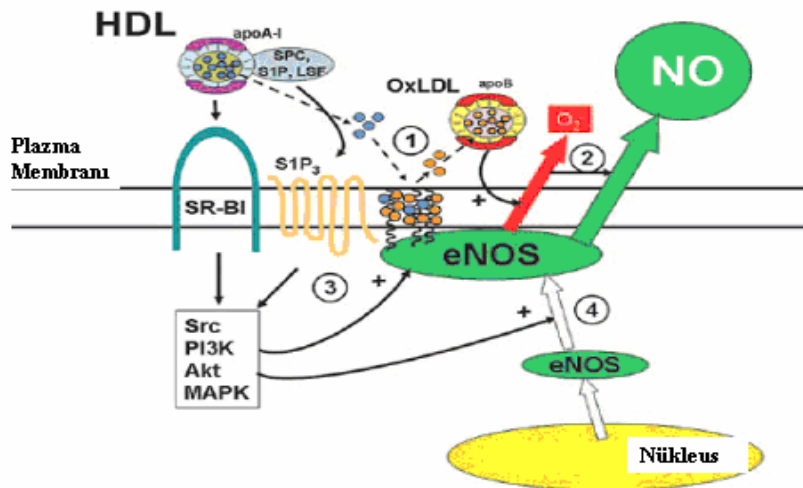
SR-B1; LDL, VLDL gibi diğer lipoproteinlere de bağlanarak LDL'den kolesterolün seçici alınımına aracılık ederek onların metabolizmasına katıldığı düşünülerek birçok çalışma yapılmış olsa da mekanizması tam anlaşılammıştır (6).

SR-B1 antiateroaterojenik aktivitesini çeşitli mekanizmalarla gösterir. HDL ile hücreler arasındaki kolesterol akışına aracılık eder. HDL kolesterolünün karaciğerden alınımını ve safraya atılımına aracılık eder, bu sayede SR-B1 ters yönde kolesterol taşınımını baskılar. HDL bağımlı NO sentetazı aktivite ederek NO aracılıklı antiaterojenik aktiviteye aracılık eder. HDL'den vitamin E alınıp hücrelere aktarılmasına aracılık ederek, vitamin E aracılıklı vasküler korumaya katılır. Vasküler endotel hücrelerde arteriyal oksijen kaynağını etkileyerek eritrositlerin olgunlaşmasını kontrol eder, anemiyi önler. Apoptotik hücrelere bağlanarak temizliklerinde görev yapar (57, 58).

SR-B1, makrofaj ve makrofaj olmayan periferel hücrelerden HDL'ye serbest kolesterol transferini sağlar (Ters Yönde Kolesterol Taşınımı). Kaveola gibi bazı özelleşmiş membran yapılarının bu reseptörler bakımından zengin olduğu gösterilmiştir (6). Plazma membran kaveollerinde SR-B1'in yerleşmesi kolesterol alım ve atımı için önemlidir. SR-B1 ve HDL ile hücreler arasındaki kolesterol akışına aracılık eder. HDL ile hücreler arasındaki kolesterol transferine aracılık ederken, dönüşümlü bir şekilde HDL'ye bağlanır. HDL'nin yapısındaki kolesterol oranı SR-B1'in aktivitesini etkiler. SR-B1; kolesterolce zengin HDL ile etkileştiğinde seçici kolesterol ester alınımına ve kaveollerde; sterojenik dokularda steroid hormon sentezi ve kolesterol depolanması için kolesterol alınımına aracılık eder depolanmasına sebep olurken (Şekil 14, a), SR-B1 kolesterolce fakir HDL'ye bağlandığında ise kaveollerdeki fazla serbest kolesterolü HDL içine gönderir (Şekil 14, b) (58) .



Şekil 14. HDL ile Hücreler Arasındaki SR-B1 Aracılıklı Kolesterol Akışı (58).



Şekil 15. HDL'nin NO üretimini düzenlemesi (57).

SR-B1'in mekanizması tam olarak açıklanmasa da, ApoAI bağlandığı bir mekanizma ile endotel kaynaklı nitrik oksit sentazı (eNOS'u) aktive ederek nitrik oksit (NO) üretimini düzenler. HDL, SR-B1 ile etkileşerek kolesterol dağılımını ve morfolojisini modifiye ederek eNOS aktivitesini etkiler. HDL eNOS'un hücreler arası dağılımını düzenler. HDL ayrıca endotel hücrelerinde eNOS ekspresyonunu artırır. HDL zengin antioksidan içeriği ile ajanların endotele etkilerini sınırlar, eNOS'un uyarımını artırarak NO miktarını artırır (49, 57) (Şekil 15).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

3.1.1. Cihaz ve Malzemeler

CİHAZ ADI	FİRMASI
Buzdolapları	+ 4 ⁰ C , -20 ⁰ C , -80 ⁰ C
Cam Şişe	Sigma, Z364827
Cam malzemeler	Tüp, Pipet, Beher, Erlen, Balon Joje,
CO ₂ İnkübatörü	Thermo Scientific Forma Steri-Cycle
Çalkalayıcı İnkübatör	Shelleb/Sheldon Mod: 514,USA
Çalkalayıcı	Nüve, SL 350
Etüv	Gallenkamp
Elisa Pleyt Yıkayıcı	Diagnostic Pasteur
Elisa Okuyucu	Tunable VERSAmak microplate reader,US
Floresans Mikroskobu	Olympus BH-2
Güç Kaynağı	Titan Plus
Güç Kaynağı	EC250-90, E-c Apparatus Corporation
Hücre Kültür Flaskları	Grenier Bio One T-25, T-75, T-150 cm ²
Hassas Terazi	Oertling NA 164
Hematositometre Camı	Neubauer
Hood	Polaraid
Invert Mikroskop	Olympus CK-2
Jel Görüntüleme Sistemi	BioDoc Analyze
Laminer Hava Akış Kabini	Powtech, Class II Safety Cabinet
Mağnetik Karıştırıcı	IKA-Labortechnik
Mikropleyt Spectrofotometresi	Spectra Mak Plus 384

Mikrosantrifüj	Sigma Lobarzentrifugen CE 1-15
Mikrosantrifüj Tüpü	Grenier 200 , 500, 1500 µL'lik
Naylon Membran Filtreleri	Sigma, Z290807, 0.22 µm, diam. 47 mm
Naylon Membran Filtreleri	Sigma, Z290793, 0.45 µm, diam. 47 mm
Otoklav	BES, BK-75TS-5626,Türkiye
Ögütücü	Retsch ZM 200, Germany
Pastör Pipetleri	Steril disposable pipetler
pH Metre	Hanna Instruments 8416
PVDF Membran	Immobilon P Milipore , Billerica, MA, USA
RT-PCR Kit	Qiagen , One step RT-PCR 210210
hSR-B1/CLA-1, Beta Aktin	Integrated DNA Technologies, Inc.
RT-PCR primerleri	
Rotar Evaporator	Bibby R100
Santrifuj	Eppendorf 5804
Soğutmalı Santrifuj	Eppendorf 5810
Spektrofotometre	LKB Ultrospec K
Sokhlet	Ekstraksiyonda kullanıldı.
Steril Falcon Tüpler	Grenier 15mL'lik ve 50 mL'lik
Steril Pipet Uçları	Steril ,Otoklavlanmış
Steril Enjektörler	1, 20, 50 mL'lik
SDS-PAGE Takımı	Laemli Kesiki Tampon sistemi
Semi-Dry Western Blot Tankı	BIO-RAD
Semi-Dry Blot	BIO-RAD Trans-Blot® SD,
Saf Su cihazı	Akuatron 4AD
Spektrofotometre Küveti	Sigma, C5416
Steril PCR Ependorf Tüp	Grenier 200 µl'lik
Semiotomatik pipetler	0.5-10 µl, 10-100µl, 100-1000µl
Transilluminatör	Vilber Lourmant
Thermalcyler cihazı	GeneAmp PCR System 9700Applied Biosystems
UVette® Disposable Cuvettes	Sigma, Z637847
Vorteks	Nüve, NM 110
Whatman Jel Blot Kağıdı	Sigma , Z613916

3.1.2. Kimyasal Malzemeler

Madde Adı	Alınan Firma	Katalog No:
Alüminyum Klorür, $AlCl_3$	Sigma	563919
L-Askorbik asit	Sigma	A5960
Agaroz	Sigma	A9414
Amonyumpersülfat, APS	Sigma	A3678
Akrilamid	Sigma	A3553
Asetik Asit	Merck	K27574156
Bakır Sülfat, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$,	Merk	A894987
Betamerkaptoetanol	Sigma	M 7522
Bisakrilamid	Sigma	A10960100
Bromfenol Mavisi	Sigma	32H3626
Coomassie Brilliant Blue G-250	Sigma	201391
Dipotasyum Hidrojen Fosfat, K_2HPO_4	Sigma	P3786
Demir (III) Klorür, $FeCl_3$	Sigma	F7134
2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil, DPPH	Sigma	D211400
Di metil Sülfolsit, DMSO	Sigma	D4540
Disodyummonohidrojenfosfat, $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$	Merck	A547474
$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6 H_2O$	Cameo	10045-89-3
o-dianizidin dihidroklorür	Biochemica	33435
DPEC, Diethyl pyrocarbonate	Sigma	D5758
Etilen Diaminetetraasetik asit, EDTA	Carlo Erba	303227
Endothelial Growth Medium Supplement, EGMS	Sigma	E2759
Etanol	Sigma	E7023
Folin ve Ciocalteu Fenol Reaktifi	Sigma	F9252
Fetal Bovine Serum, FBS	Sigma	F2442
Gliserol	Sigma	54H00723
Glisin	Sigma	52H03131
Goat Anti Rabbit IgG HRP	Santa Cruz	sc2004
Hidroklorik Asit, HCl	Carlo Erba	7647-01-0
Hidrojen Peroksit, H_2O_2 % 30, d=1,11	Merck	1.08597
Hidrojen Peroksit, H_2O_2	Sigma	H3410

İzopropil Alkol	Sigma	I9516
Jelatin	Fluka	48723
Kateşin	Sigma	C1788
Kloroform	Sigma	C7559
Kuanidin Hidroklorür	Sigma	177253
Kuarsetin	Sigma	Q4951
Metanol	Sigma	M3641
Orange G	Sigma	Q3756
Potasyum Dihidrojen Fosfat, KH_2PO_4	Merk	A153371
Potasyum Hekzasiyona Ferrat(III), $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	Sigma	702587
Potasyum Klorür, KCl	Merck	711 TA299855
Penisilin + Streptomisin	Sigma	P7539
RPMI- 1640	Sigma	R8758
Rabbit Poliklonal SR-B1 Antikor	Santa Cruz	H180- sc67098
Sodyum Karbonat, Na_2CO_3	Sigma	S7795
Sodyum Nitrit, NaNO_2	Sigma	237213
Sodyum Hidroksit, NaOH	Merck	6462
Sodyum Klorür, NaCl	Merck	1.06400.1000
Sodyum Dihidrojen Fosfat, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Merck	6345
Sığır Serum Albumini , BSA	Sigma	P6529
Sodyum Potasyum Tartarat	Merk	A100285
Sodyum Dodesil Sülfat, SDS	Merck	9263888
Süt Tozu	Pınar	Ticari
Tris/HCl	Sigma	93287
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine Solüsyonu, TMB	Sigma	T0565
Trikloraasetikasit, TCA	Sigma	T9159
N,N,N,N Tetrametiletildiamin, TEMED	Sigma	T9281
Tris (Hidroksimetil Aminometan)	Sigma	252859
Tripan Mavisi	Sigma	T6146
TRItidyG	Appllichem	A4051
Troloks	Sigma	238813
Tripsin	Sigma	T5266

3.2. Tayinlerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

3.2.1. Karalahana Ekstraktlarında Antioksidan Tayinlerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

A. Total Fenolik Madde (TFM) Tayininde Kullanılan Çözeltiler

% 2'lik Na₂CO₃	2 g Na ₂ CO ₃ tartılarak hacmi distile su (DS) ile 100 mL' e DS ile tamamlandı.
Bitki Standartları	Önceden ekstrakttaki kuru ağırlığına göre hesaplanmış sulu ve etanollü ekstraktların ana çözeltilerden seyreltildi. Çalışma üç kez tekrarlandı.
Fenolik Standartlar	0,001 gram gallik asit tartılarak hacmi 1 mL'e DS ile tamamlandı (1000 µg/ mL). 1000, 500, 250, 125, 62,5 (µg/mL)'lik standartları elde etmek için seri seyreltmeler yapıldı.
0,2 N Folin Reaktif	2 N 'lik Folin reaktifi 1/10 oranında distile suyla seyreltildi.

B. DPPH• Radikali Temizleme Aktivitesi Tayininde Kullanılan Çözeltiler

0,1 mM DPPH	0,061975 g DPPH tartılarak hacmi 100 mL' e metanol ile tamamlandı.
Bitki Standartları	Sulu ve etanollü ekstraktlar ana çözeltilerden seyreltilerek hazırlandı. Çalışma üç kez tekrarlandı.

C. Demir (III) İndirgeme / Antioksidan Kuvvet (FRAP) Yönteminde Kullanılan Çözeltiler

Bitki Standartları	Sulu ve etanollü ekstraktlar ana çözeltilerden seyreltilerek hazırlandı. Çalışma üç kez tekrarlandı.
Standartlar	0,001 g Askorbik asit veya troluks 1 mL'e DS ile tamamlandı (1000 µg/ mL). Seri seyreltmeler yapıldı.

0,2 M Fosfat Tamponu (pH 6,6)	10,67 g KH_2PO_4 ve 17,25 g Na_2HPO_4 distile suda çözülerek pH 6,6 seyreltik asit veya baz ile pH ile ayarlandı ve 1 L'ye DS ile tamamlandı.
% 1 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	1 g $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ distile su ile 100 mL'ye DS ile tamamlandı.
% 10 TCA	10 g TCA 100 mL'ye DS ile tamamlandı
% 1 FeCl_3	1 g FeCl_3 distile su ile 100 mL'ye DS ile tamamlandı.

D. Flavonoid Miktarı Tayininde Kullanılan Çözeltiler

% 5'lik NaNO_2	5 g NaNO_2 tartılarak hacmi 100 mL' e DS ile tamamlandı.
Bitki Standartları	Önceden ekstrakttaki kuru ağırlığına göre hesaplanmış sulu ve etanollü ekstraktların ana çözeltilerden seyreltilerek hacmi 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olacak şekilde su veya etanolla seyreltildi. Çalışma üç kez tekrarlandı.
Kuarsetin Standartları	0,001 g kuarsetin tartılarak hacmi 1 mL' e DS ile tamamlandı (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Seri seyreltmeler ile 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ lik standartlar hazırlandı.
% 10' luk $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	10 g $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ tartılarak ultra saf su ile (hızlı yapılmamalı) hacmi 100 mL' ye DS ile tamamlandı.
1 M NaOH	2 g NaOH tartılarak ultra saf su ile hacmi 50 mL'ye DS ile tamamlandı.

E. TAS (Toplam Antoksidan Seviye) Tayininde Kullanılan Çözeltiler

Bitki Ekstraktları	Önceden ekstrakttaki kuru ağırlığına göre hesaplanmış sulu ve etanollü ekstraktların ana çözeltilerden seyreltilerek hacmi 1000, 500, 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olacak şekilde su veya etanolla seyreltildi. Çalışma üç kez tekrarlandı.
---------------------------	--

Standartların Hazırlanışı	TAS için; 2, 1, 0,5, 0,25 mmol/L konsantrasyonlara sahip troloks standartları hazırlandı.
TAS Reaktif 1: R1 (pH :1,8)	75 mM HCl ; 6,41 mL HCl alınıp hacim deiyonize su ile 1L'ye tamamlandı. 75 mM KCl ; 5,59 g KCl tartılıp, 1 L deiyonize suda çözüldü. 800 mL KCl ile 200 mL HCl pH 1,8 olacak şekilde karışım elde edildi. 10 mM o-dianizidin dihidroklorür ; 0,31 g o-dianizidin dihidroklorür 100 mL karışımda çözüldü. 45 µM Fe(NH₄)₂(SO₄)₂. 6 H₂O ; 0,0017 g Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ .6H ₂ O tartıldı, o-dianizidin dihidroklorürlü karışıma eklendi.
TAS Reaktif 2: R2	7,5 mM H₂O₂ ; 32,05 µL H ₂ O ₂ alınıp hacim HCl/KCl (1/4) karışımıyla 50 mL' ye DS ile tamamlandı

3.2.2. Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Bitki Ekstraktları	Önceden ekstrakttaki kuru ağırlığına göre hesaplanmış sulu ve etanollü ekstraktların ana ana çözeltilerinden seyreltilerek hacmi 50, 20, 10, 5, 2,5, 0 µg/mL olacak şekilde su veya etanol (etanol oranı % 1'in altında olacak şekilde) seyreltildi. Çalışma üç kez tekrarlandı.
Besleme Çözeltisi	İçinde % 20 FCS, % 1 Penisilin-Streptomisin, % 1 glutamin, 200 µg/ mL EGMS olacak şekilde RPMI 1640.
Tripsin-EDTA	200 mg Tripsin 50 mg EDTA ile karıştırılıp distile su ile 100 mL'ye DS ile tamamlandı. 0,22 µm'lik filtreden geçirilip 15 mL'lik falkonlarda aktarılıp, kullanıncaya kadar -20 °Cde saklandı.
PBS (pH: 7.4)	0,14 M (0,8 g) NaCl, 2,7 mM (0,02 g) KCl, 1,5 mM (0,02 g) KH ₂ PO ₄ ve 8,1 mM (0,2169 g) Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O tartılıp bir miktar distile suda pH: 7,4'e NaOH ile ayarlandı. Hacmi distile su ile 100 mL'ye DS ile tamamlandı. Otoklavlanıp +4°C'de saklandı.

3.2.3. SR-B1/CLA-1 Protein Miktarı Tayini İçin Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

A. TRItidy G ile proteinlerin İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler

TRItidyG, Etanol,

Kloroform, Ana çözeltilerden kullanıldı.
İzopropanol

300 mM Guanidin Hidroklörür 2,8659 g guanidin hidroklörür 100 mL'e DS ile tamamlandı.

% 1 SDS 1 g SDS 100 mL'e DS ile tamamlandı

B. SDS-PAGE VE Western Blotlamada Kullanılan Çözeltiler

1 M NaOH 10 g NaOH saf suda çözülerek 250 mL'ye DS ile tamamlandı. Tampon çözeltilerin pH'larının ayarlanmasında kullanıldı.

1 M HCl Tampon çözeltilerin pH'larının ayarlanmasında kullanıldı

2x Lowry Reaktifi 20 g Na₂CO₃ 260 mL suda, 0,4 g CuSO₄.5H₂O 20 mL suda , 0,2 g Na-K-Tartarat 20 mL deiyonize suda çözüldü ve daha sonra bu üç çözelti karıştırılarak bakır reaktifi elde edildi. 10 g SDS 100 mL'e DS ile tamamlandı, 4 g NaOH yine 100 mL mL'e DS ile tamamlandı.Kullanmadan hemen önce 3:1:1 oranında karıştırıldı. 2- 3 hafta boyunca saklanabilir.

0,2 N Folin Reaktifi 2 mL 2 N Folin reaktifi 20 mL mL'e DS ile tamamlandı .

Albumin Standartları 10 mg albumin 100 mL mL'e DS ile tamamlandı .0,1 mg/ mL'lik albumin standardı hazırlandı. Bu ana çözeltiden 0,05, 0,025, 0,0125, 0 mg/ mL'lik standartlar hazırlandı.

1,5 M Tris-HCl, (pH 8,8)	Ayırma jeli tamponu; 36,3 g Tris bir miktar deiyonize suda çözüldü. HCl ile pH'sı 8,8 ayarlandı. Son hacim 100 mL'ye tamamlanıp süzme kağıdı ile süzüldü. + 4 °C'de muhafaza edildi.
0,5 M Tris-HCl, (pH 6,8)	Yığıma jeli tamponu; 6,0 g Tris bir miktar deiyonize suda çözüldü. HCl ile pH'sı 6,8 ayarlandı. Son hacim 100 mL'ye tamamlanıp süzme kağıdı ile süzüldü. + 4 °C'de saklandı.
Akrilamid- Bisakrilamid Çözeltisi	% 30 akrilamid + % 0,8 metilenbisakrilamid deiyonize suda çözüldü ve süzüldü.
Tank Tamponu (pH: 8.3)	0,025M Tris (3 g Tris), 0,152M Glisin (14,4 g), % 0,1 SDS (1 g) karıştırılıp, bir miktar deiyonize suda çözüldü. HCl ile pH'sı 8,3 ayarlandı. Son hacim 1000 mL'ye tamamlanıp süzme kağıdı ile süzüldü. + 4°C'de saklandı.
Boyama Çözeltisi	% 25 İzopropil alkol (75 mL), % 10 asetik asit (30 mL) ve % 0,05 Coomassie Brilliant Blue G-250 (0,015g) karıştırılarak hacim deiyonize suyla 300 mL'ye DS ile tamamlandı.
Boya Giderme Çözeltisi	% 10 asetik asit; 100 mL asetik asit deiyonize suyla 1000 mL'ye DS ile tamamlandı.
Western Blot Transfer Tamponu	48 mM (5,8 g Tris), 39 mM (2,9 g) Glisin, % 0,0375 (w/v, 0,375 g) SDS, 800 mL distile su ile çözümlenip, kullanmadan önce % 20 metanol (200 mL) eklendi.
Ana Çözelti 20xTBS (pH: 7.5)	1 M Tris/HCl (15,760 g), 4 M NaCl (23,376 g) karıştırılıp bir miktar suda çözümlenip pH'sı 7,5 getirildi. Hacim 100 mL'ye DS ile tamamlandı.

Bloklama Tamponu	% 2 süt tozu çözeltisi: 2 g pınar süt tozu alınıp 100 mL'de 1x TBS'de çözüldü.
Birincil Antikor Çözeltisi	Rabbit Poliklonal SR-B1 Antikoru 1:200 oranında 1* TBS ile seyreltildi.
İkincil Antikor Çözeltisi	Goat anti rabbit horse radish peroksidaz antikoru 1:2000 oranında 1x TBS ile seyreltildi.
İnkübasyon Çözeltisi	% 0,2 süt tozu çözeltisi: 0,2 g pınar süt tozu alınıp 100 mL'de 1x TBS'de çözüldü.
TMB	Kullanıma hazırды.

3.2.4. SR-B1/CLA-1 mRNA Ekspresyonu Tayini İçin Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

A. TRItidy G ile RNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler

TRItidyG, Etanol,

Kloroform, Ana çözeltilerden kullanıldı.
İzopropanol

%1 DPEC 1 mL DPEC otoklavlanmış su le 100 mL 'e DS ile tamamlandı.

% 70-80 Etanol % 98-99 'luk etanolden seyreltildi.

B. RT-PCR VE Agaroz Jel Elektrofrezinde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

RT-PCR Primerleri Önce 100 pmol/mL olacak şekilde hazırlandı. Daha sonra 10 pmol /mL'e dilüe edildi.

1 N NaOH	4 g NaOH 100 ml deiyonize suda çözüldü. pH ayarlanmasında kullanıldı.
Stok TAE :	242 g Tris, 37,2g Na ₂ EDTA.2H ₂ O bir miktar deiyonize suda çözüldü ve üzerine 57,1 mL asetik asit ilave edildi. pH 8,5'e ayarlandı. Son hacim 1 L' ye DS ile tamamlandı. Bu çözelti 50 kat seyreltilerek, hem elektroforez tamponu olarak, hem de agaroz jelin hazırlanmasında kullanıldı.
Etidium Bromür	100 mg etidiyum bromür 10ml deiyonize suda çözüldü. (10 mg/mL). Işıktan korunarak buzdolabında saklandı.
% 2' lik Agaroz Jel	0,8 g agaroz TAE tamponunda çözüldü ve 30 saniye mikrodalgada kaynatıldı. İldıktan sonra etidiyum bromür eklenerek tarak yerleştirildi. Soğumaya bırakıldı.
Orange G	Ana çözültiden kullanıldı.
DNA Belirteçi	Ana çözültiden kullanıldı.

3.3. Metodlar

3.3.1. Karalahana Ekstraktlarının Hazırlanması

3.3.1.1. Örneklerin Toplanması

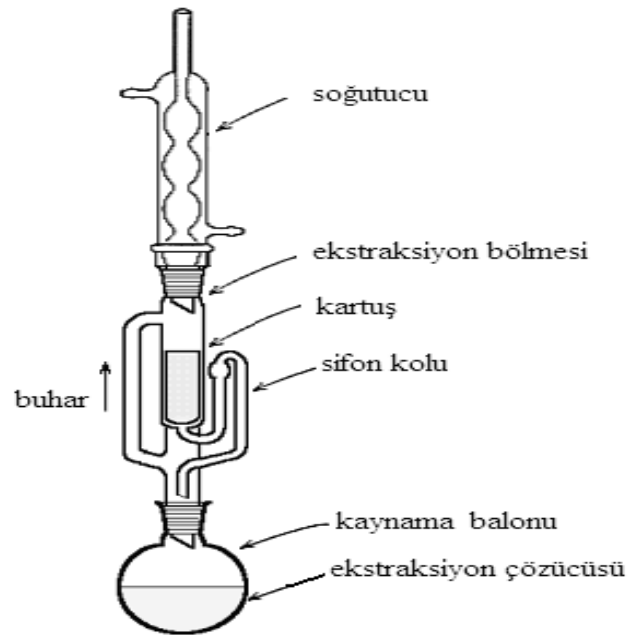
Karadeniz Bölgesi kıyı kesimi çeşitli il ve ilçelerden (Trabzon merkez, Rize, Giresun, Artvin (Hopa), Samsun) karalahananın taze ve yeşil yaprakları toplanarak, saf su ile defalarca yıkandı. Serin ve karanlık ortamda kurutuldu, öğütücüde küçük parçalara ayrıldı ve ekstrakt hazırlanana kadar 4 °C' de muhafaza edildi. Etanollü ve sulu ekstraktları hazırlandı (2).

Tablo 6. Çalışma sırasında kullanılan ekstraktlar için kullanılan kısaltmalar

İl	Etanol	Su
Trabzon	TE	TS
Rize	RE	RS
Giresun	GE	GS
Samsun	SE	SS
Artvin	AE	AS

3.3.1.2. Ekstraktların Hazırlanması

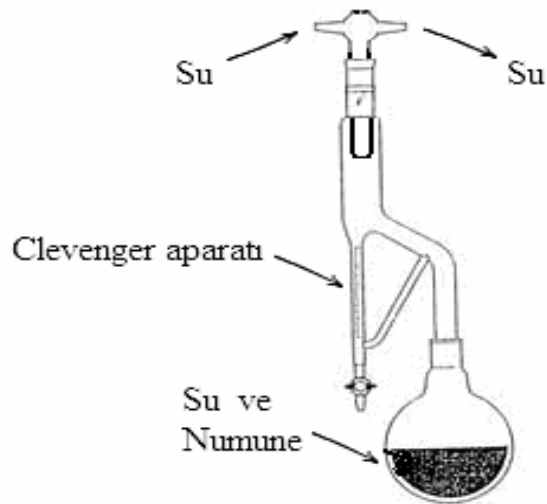
Ekstraksiyon, çözeltilerden veya katı karışımlardan bir maddeyi ayırmak, çözücüyü ve istenmeyen safsızlıkları karışımlardan uzaklaştırmak için yapılan işlemdir. Katı maddelerin bir çözücüyle sürekli ekstraksiyonunun sağlanması için en uygun düzenek 1879'da Franz von Soxhlet tarafından icat edilen **Sokhlet** düzeneğidir. Orijinalde katı materyallerden sıvıların ekstraksiyonu için tasarlandı fakat katı numunelerden bileşiklerin ekstraksiyonlarının zor olduğu zamanlarda da kullanılabilir. Bir sokhlet ekstraksiyon sistemi bir karıştırıcı mağnetik çubuk ile kaynama balonu, bir sokhlet aparatı, bir geri soğutucu ve bir ısıtıcıdan ibarettir (Şekil 16). Katı numune içeren kartuş sokhlet aparatının bölmesine yerleştirilir. Kaynama balonundaki çözücü karıştırılarak ısıtılır. Çözücü buharları soğutucuya doğru çıkarlar ve orada soğutularak numunenin üzerine damlarlar. Numune materyali içeren sokhlet aparatının bölmesi, yoğunlaştırılan çözücü ile yavaşça dolar, ardından sifon hareketiyle balona geri boşalır. Bu döngü, numune bileşiklerinin ayrıntılı ekstraksiyonu için pek çok kez tekrarlanmasına müsaade eder.



Şekil 16. Sokhlet Düzeneği

Etanol polar bir molekül olduğu için bitki bünyesindeki polar molekülleri ekstrakte eder. Etanollü karalahana ekstraktı için; soklet aparatına 10 gram kurutulmuş ve öğütülmüş karalahana içeren ekstrakt kartuşu koyularak, yaklaşık 300 mL etanol ilave edilerek gömlekli ısıtıcıda 60°C'de yavaşça kaynatılarak ekstraksiyona tabi tutuldu. Sokhlet aparatında çözelti renksiz oluncaya kadar yaklaşık 24 saat ekstraksiyon işlemi sürdürüldü. Önce filtre kağıdı ardından, Whatman 0,2 µm filtrelerden süzüldü.

Sulu ekstraktlar ve uçucu yağlar Clevenger tipi su buharı destilasyon düzeneği kullanılarak elde edilmiştir. Su buharı destilasyonu, az uçucu ve suda çözünmeyen ya da çok az çözünen maddelerin uçucu olmayan maddelerden ayrılmasında veya saflaştırılmasında kullanılan bir tekniktir. Bu teknikle kaynama noktası yüksek olan bir bileşik, vakum uygulanmaksızın, normal şartlardaki kaynama noktasının çok altında destillenebilir. Su buharı destilasyonu, basit destilasyon ve diğer tekniklerin uygulanmasıyla ayrılmayan az miktardaki maddelerin ayrılmasında özellikle faydalı olup doğal ürünlerin izolasyonunda ve büyük miktarda reçinemi yan ürünlerin oluştuğu kimyasal reaksiyonlarda ara ürünlerin ayrılmasında geniş ölçüde kullanılmaktadır. Clevenger tipi su buharı destilasyonu ise, sulu ekstraktların yanı sıra uçucu yağların (esansiyel yağ) da elde edilmesini sağlamaktadır.



Şekil 17. Clevenger Düzeneği

Bitkilerin toz halindeki yaprak kısımlarına su ilave edilip, oluşan karışım destilasyon balonlarına döküldü. Balonlar, gömlekli ısıtıcılara yerleştirildi ve Clevenger aparatları takılarak destilasyon düzeneği oluşturuldu. Sulu numune karışımları yaklaşık 6 saat kaynamaya tabi tutuldu. Sulu ekstraktlar çeşitli işlemlerden geçirilerek berraklaştırıldı ve suları, liyofilizatörde uçurularak konsantrasyonları belirlendi.

Etanol ekstraksiyonlarının çözücüleri döner vakum evaporatörüyle uçuruldu. Bir döner vakum evaporatörüyle tek basamaklı destilasyonlar hızlıca yapılabilir. Bu yöntemin esası, su banyosunda dönen buharlaştırıcı bir balon kullanılarak vakum altında çözücülerin buharlaştırılması ve yoğunlaştırılmasıdır. Vakum, kaynama sıcaklığını düşürür ve böylece destilasyonun performansını artırarak ürünleri korumaya yardım eder (Şekil 18).

Ekstraktların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde konsantrasyonları belirli numuneler kullanılmalıdır. Bu amaçla; belli hacimde alınan etanol ekstraktlarının çözücüleri, döner buharlaştırma düzeneği kullanılarak tamamen uçuruldu ve belli bir hacimde alınan ekstraktların artarda ikişer kez evaporasyonu sonucu balon cidarında kalan maddenin ağırlığı ile boş balonun ağırlığının farkı kullanılarak ekstraktların konsantrasyonları belirlendi ve ana çözelti çözeltiler hazırlandı. Tablo 7’de hazırlanan ana çözeltilerin konsantrasyonları ve illere göre kullanılacak kısaltmalar verildi.



Şekil 18. Döner Vakum (Rotary) Evaporatörü

Tablo 7. Hazırlanan Sulu ve Etanollü Ekstraktlarının Ana Çözeltilerinin Kuru Ağırlık Cinsinden Konsantrasyonları (mg/ mL)

İl	Etanol	Su
Trabzon	TE: 5 mg /mL	TS: 5 mg/mL
Rize	RE: 2,28 mg /mL	RS: 10 mg/mL
Samsun	SE: 5 mg /mL	SS: 10 mg/mL
Artvin/Hopa	AE: 5 mg /mL	AS: 10 mg/mL
Giresun	GE: 5 mg /mL	GS: 10 mg/mL

3.3.2. Karalahana Ekstraktlarında Antioksidan Tayinler

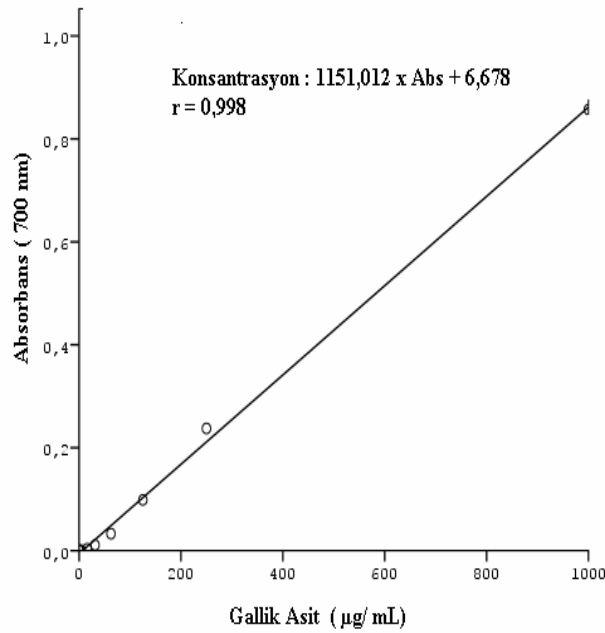
3.3.2.1. Toplam Fenolik Madde (TFM) Tayini

Metot; suda ve diğer organik çözücülerde çözülmüş olan fenolik bileşiklerin folin reaktifi ile alkali ortamda renkli kompleks oluşturması esasına dayanır. Oluşan mor-menekşe renkli kompleks 700 nm'de maksimum absorbanans oluşturur (59). Tablo 8 'de belirtildiği gibi pipetlemeler yapıldı.

Tablo 8. Toplam Polifenolik Madde Tayininde Yapılan Pipetleme İşlemleri

	Kör	Standart	Test
Standart		0,1 mL	
Lahana Numunesi			0,1 mL
Distile Su	5,1 mL	5 mL	5 mL
0,2 N Folin Reaktifi	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL
Tüpler vorteks ile karıştırıldı ve 3 dakika bekletildi.			
% 2' lik Na ₂ CO ₃	1,5 mL	1,5 mL	1,5 mL
1 saat inkübasyonda bekletildi.			
700 nm'de köre karşı absorbans okundu.			

Gallik asidin 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 0 µg /mL'lik standart konsantrasyonları kullanılarak hazırlanan grafik (Şekil 19) kullanılarak, TFM miktarı belirlendi.

**Şekil 19.** Toplam Fenolik Madde Tayini İçin Gallik Asit Standart Grafiği

3.3.2.2. DPPH• Radikali Temizleme Aktivitesi Yöntemi

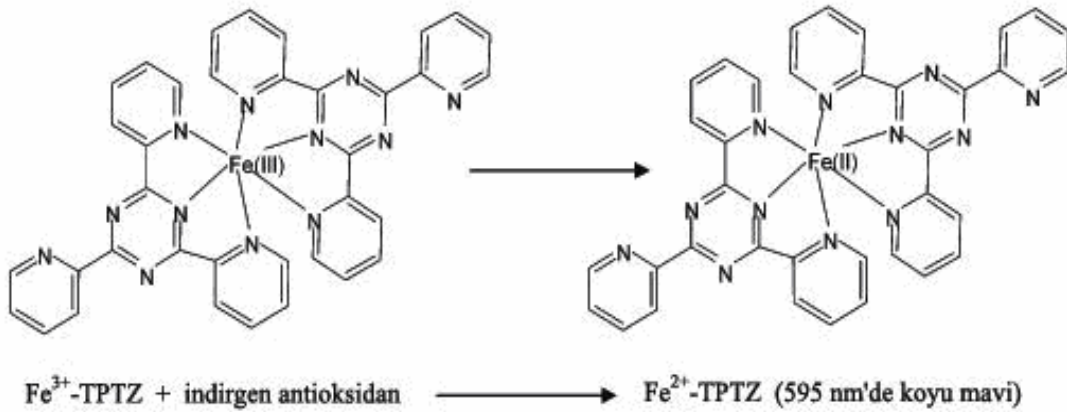
DPPH radikali (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ticari olarak satın alınabilen bir radikal olup denemelerde Hatano (60) metodu kullanılmıştır. Antioksidanlarla muamele, DPPH•'tan kaynaklanan mor rengin şiddeti azalarak absorbansın düşüşüne sebep olacaktır. Farklı numune konsantrasyonlarıyla muamele edilen DPPH•'ın absorbansındaki değişim ölçülerek, absorbanslara karşılık gelen konsantrasyonlarla grafik çizilmekte; grafikteki $y=ak+b$ denkleminde DPPH• konsantrasyonunu yarıya düşüren numune miktarı $\mu\text{g} / \text{mL}$ cinsinden belirlenmekte ve IC50 değeri olarak ifade edilmektedir. Bu yöntemin önemli bir dezavantajı, büyük antioksidan moleküllerin sterik engellenmeye maruz kalmaları nedeniyle inaktif olarak test edilmeleridir. Bu yöntemde, antioksidan molekülün yapısı ve boyutu test sonucunu etkilemektedir. Tablo 9 'da belirtildiği gibi pipetlemeler yapıldı.

Tablo 9. DPPH• Radikali Temizleme Aktivitesi Tayininde Yapılan Pipetleme İşlemleri

	Kör	Numune körü	Standart	Test
0,1 mM DPPH	150 μL	150 μL	150 μL	150 μL
Distile Su	150 μL			
Numune Çözücüsü		150 μL		
Standart			150 μL	
Lahana Numunesi				150 μL
Oda sıcaklığında 50 dakika inkübasyona bırakıldı.				
517 nm'de köre karşı absorbans okundu.				

3.3.2.3. Demir (III) İndirgeme / Antioksidan Kuvvet (FRAP) Yöntemi

Oyaizu tarafından geliştirilen metoda göre indirgeme kuvveti numunelerin dolaylı olarak toplam indirgeme potansiyelini göstermekte olup $\text{Fe}^{+3} \rightarrow \text{Fe}^{+2}$ indirgenmesi ile meydana gelen Fe^{+2} , $\text{K}_3(\text{Fe})\text{CN}_6$ 700 nm'de absorbans veren renkli kompleks oluşturur . Güncel olarak kullanılan FRAP yönteminde 2,4,6- tripiridil-s-triazin (TPTZ)'in Fe(III) tuzu kullanılmaktadır (61). Tablo 10 'da belirtildiği gibi pipetlemeler yapıldı.

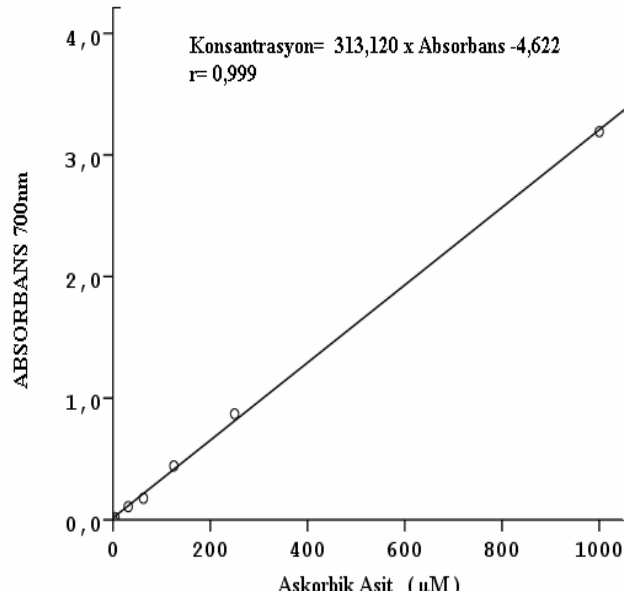


Şekil 20. Demir (III)'ün indirgenme reaksiyonu (61)

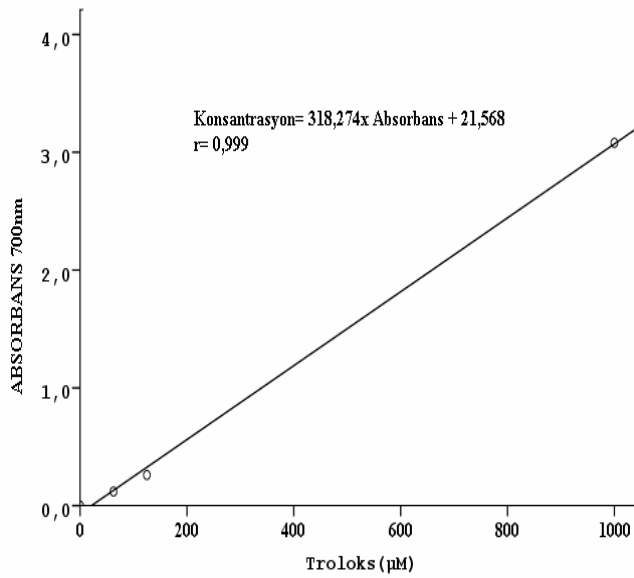
Tablo 10. FRAP Yönteminde Yapılan Pipetleme İşlemleri

	Kör	Standart	Test
Distile Su	1 mL		
Standart		1 mL	
Lahana Numunesi			1 mL
0,2 M KH₂PO₄-K₂HPO₄ Tamponu (pH 6,6)	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL
% 1 K₃Fe(CN)₆	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL
50 °C 20 Dakika inkübe edildi.			
% 10 TCA	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL
3000 g'de 10 dakika santrifüj edildi ve üst fazdan 2.5 ml alındı.			
Distile Su	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL
% 1 FeCl₃	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL
4 dakika sonra 700 nm 'de köre karşı absorbans okundu.			

Tayine başlamadan önce askorbik asidin ve troloksun 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 0 μM 'lik konsantrasyonları hazırlandı. Konsantrasyona karşı absorbans grafiği çizilir. Bu metotta artan absorbans artan indirgeme kuvvetini gösterir. Sonuçlar, indirgeme potansiyeli yüksek ve aynı zamanda standart bir antioksidan madde olan askorbik asit ve troloks ile karşılaştırılmak suretiyle yorumlanır (Şekil 21-22).



Şekil 21. Demir İndirgeme / FRAP Miktarları İçin Askorbik Asit Standart Grafiği



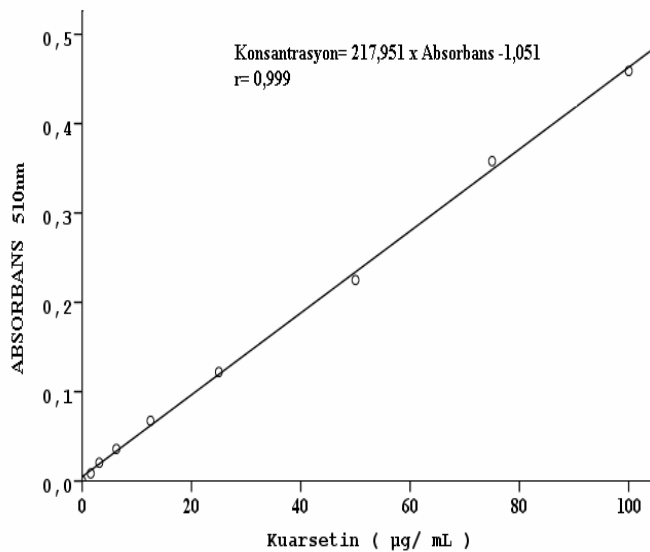
Şekil 22. Demir indirgeme / FRAP Miktarları İçin Troloks Standart Grafiği

3.3.2.4. Flavonoid Miktarının Belirlenmesi

Flavonoidlerin alimünyum ile yapmış oldukları kompleksler reaksiyon sonunda, pembe renk oluşturmaktadır (62). Bu pembe renk oluşumu, standart ve köre karşı spektrofotometrede okutuldu. Tablo 11 'de belirtildiği gibi pipetlemeler yapıldı. Standart grafiği (Şekil 23) kullanılarak flavonoid içeriği belirlendi.

Tablo 11. Flavonoid tayininde yapılan pipetleme işlemleri

	Kör	Standart	Test
Distile Su	1 mL		
Standart		1 mL	
Lahana Numunesi			1 mL
% 5 NaNO₂	0,3 mL	0,3 mL	0,3 mL
Vorteklendi			
5 Dakika inkübasyonda bekletildi.			
% 10 AlCl₃	0,6 mL	0,6 mL	0,6 mL
1 M NaOH	2 mL	2 mL	2 mL
5 dakika inkübe edildi.			
Hacim 10 mL'ye DS ile tamamlandı.			
Hemen 510 nm' de spektrofotometrede absorbansları okundu.			

**Şekil 23.** Flavonoid Miktarı İçin Kuarsetin Standart Grafiği

3.3.2.5. Toplam Antioksidan Kapasitenin (TAS) Belirlenmesi

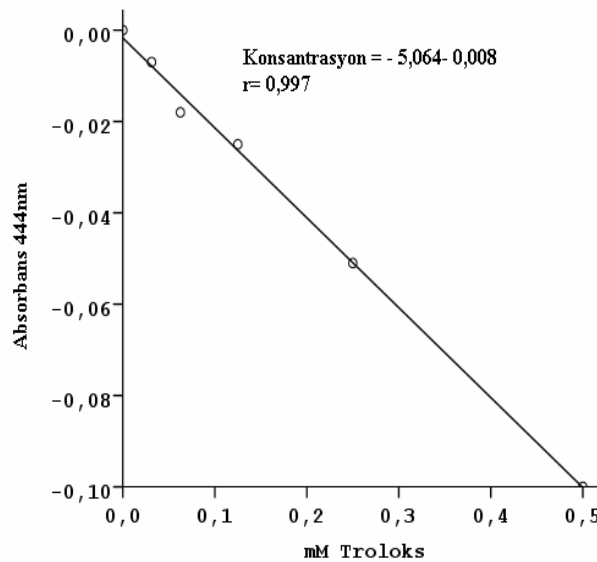
Toplam antioksidan kapasiteyi belirlemek için Erel, Ö.'in oluşturduğu kolorimetrik metod uygulandı (63). Bu metodun prensibi Fenton reaksiyonu sonucu hidroksil (OH·) radikalinin üretimi ile başlatılan etkili serbest radikal reaksiyonlarında oluşan renkli

dianizidil radikalinin 444 nm de ölçülmesi esasına dayanır. Tablo 12 'de belirtildiği gibi pipetlemeler yapıldı.

Tablo 12. Toplam Antioksidan Kapasitenin (TAS) Belirlenmesinde Yapılan Pipetleme İşlemleri

	Kör	Numune Körü	Standart	Test
Distile su	5µL			
Numune çözücüsü		5µL		
Standart			5µL	
Lahana numunesi				5µL
Reaktif 1	200µL	200µL	200µL	200µL
A1: 444 nm de ilk okuma yapıldı.				
Reaktif 2	10µL	10µL	10µL	10µL
A2: 444 nm de 3. ve 4. dakikalarda ikinci okuma yapıldı.				

A1 değerleri A2 değerlerinden çıkarılarak bu absorbans değerlerine karşılık gelen konsantrasyon miktarı elde edilen standart grafik (Şekil 24) yardımıyla sonuçlar hesaplandı.



Şekil 24. Toplam Antioksidan Madde Troloks Standart Grafiği

3.3.3. Hücre Kültürü

HDL reseptörü SR-B1'in ekspresyonunun en fazla olduğu hücreler arasında endotel hücreleri yer almaktadır . Bu yüzden çalışmamızda karalahananın SR-B1 üzerine etkisini gözlemek için insan göbek bağı veninden elde edilen endotel hücreleri (HUVEC), hücre kültüründe tercih edildi. Bütün hücre kültür çalışmaları hücre kültür kabini (air flow kabin) steril ortamda gerçekleştirilmiştir.

3.3.3.1. HUVEC Hücre Serilerinin Çoğaltılması

HUVEC hücre serileri GATA Tıp Fakültesi Hematoloji Anabilim Dalından temin edildi. Donmuş haldeki hücrelerin üstüne oldukça yavaş bir şekilde PBS eklendi. 15 mL'lik alkona aktarılıp hacim 5 mL ' ye DS ile tamamlandı. 400 g'de 7 dakika santrifuj edildi. Hematositometre ile hücre sayımı yapıldı.

1×10^6 HUVEC hücreleri L-Glutaminli, % 20'lik 200 g/mL endotel büyüme faktörü (Endothelial growth medium supplement EGMS), % 1'lik penisilin + streptomisin içeren RPMI 1640 içeren beslenme tamponu ile % CO₂ ortamında 37°C'de T-25 flasklarda inkübatörde çoğaltıldı.

3.3.3.2. HUVEC Hücre Çoğaltımında Kültür Şartları

Primer kültür: 1×10^6 HUVEC hücreleri L-Glutaminli, % 20 FBS, 200 µg/ mL Endotel büyüme faktörü (Endothelial growth medium supplement EGMS), % 1 penisilin + streptomisin içeren RPMI 1640 besiyerinde % 5 CO₂ ortamında 37 °C de T-25 flasklarda inkübatörde çoğaltıldı.. Kültürün üçüncü gününden itibaren flaskta yapışan hücrelerin beslenmesine haftada ikişer kez olmak üzere devam edildi. Hücreler kültür kabının tabanının tamamını kapladıktan sonra primer kültür tamamlanarak tripsinizasyon yapıldı. Tripsinizasyondan sonra birinci pasaj kültür işlemlerine geçildi.

İkinci Pasaj Kültür: Birinci pasaj kültür işleminden sonra tripsinizasyonla hücrelerin plastik flasklardan ayrıştırılmasından sonra ikinci pasaj kültür işlemlerine başlandı. İkinci pasaj kültür için T-150 plastik flaska fetal bovine serumla beslenmek üzere 1×10^6 HUVEC kondu ve hücreler yine haftada ikişer kez beslenerek flask tabanını kaplayıncaya kadar çoğalmaları beklendi. Hücreler flask tabanının tamamını kapladıktan

sonra ikinci pasaj sonlandırıldı. Tripsinizasyondan sonra elde edilen hücreler FCS ile seyreltilip 20 µL'si sayım için ayrılıp geri kalanı ekstraktların ekleme aşamasına kadar donduruldu.

3.3.3.3. Tripsinizasyon Metodu

Tripsinizasyon işlemi aşağıda maddeler halinde sıralandığı üzere gerçekleştirildi.

200 mg tripsin ile 50 mg EDTA karıştırılarak 100 mL steril distile suda çözüldü.

Otoklav edilerek 15-50 mL steril falkonlarda -20°C 'de kullanılabilece kadar saklandı.

1. Plastik kaplardaki (flask) yapışmayan hücreler ve besiyeri atılarak yapışan hücre tabakası PBS ile iki kez yıkandı.
2. Her 25 cm² flask alanı için 5 mL Tripsin-EDTA ilave edilerek 37 °C'de 1 dakika inkübe edildi.
3. Bir- iki dakikalık süre sonunda yapışan hücrelerin çoğu ayrılır, fakat hala kalabilecek yapışık hücre olasılığına karşı flasklar pipetle nazikçe karıştırıldı. Daha sonra tripsini inaktive etmek için ortama fetal bovin serumu ilave edildi.
4. Elde edilen mezenkimal kök hücre süspansiyonu 400 g'de 7 dakika süreyle santrifüj edilerek ve kültür medyumunu ile iki kez yıkanarak analizler ve/veya bir sonraki pasaj kültür işlemi için hazır hale getirildi.

Tablo 13. Tripsinasyon işlemindeki kullanılan Tripsin/EDTA ve Fetal Bovin Serum miktarları

Flask	Tripsin-EDTA	Fetal Bovin Serumu
25 cm ² flask	5 mL	1 mL
75 cm ² flask	10 mL	2 mL
150 cm ² flask	20 mL	4 mL

3.3.3.4. Hücre Serilerinin Sayımı ve Canlılık Kontrolü

Tripsinizasyon sonrası falkon tüplere toplanan hücrelerin 20 µL'si 20 µL tripan mavisi ile karıştırılarak hematositometre camına aktarıldı. Işık mikroskobu altında canlı ve cansız hücreler sayıldı. Hücre sayılarına göre uygun konsantrasyonlar belirlendi.

3.3.3.5. Hücrelerin Dondurulması

Tripsinizasyondan sonra elde edilen hücelere % 10 oranında DMSO oldukça yavaş bir şekilde eklendi. Ekstraktlarla muamele edilinceye kadar -80 °C’de saklandı.

3.3.3.6. Hücrelerin Ekstraktlarla Muamele Edilmesi

1×10^6 HUVEC hücresi T-25 flasklara ekildi, değişik konsantrasyonlarda Trabzon iline ait sulu ve etanollü lahana ekstraktları (40, 20, 10, 5, 2,5, 0 $\mu\text{g/mL}$) eklenerek 24 saat % 5 CO_2 37 °C inkübasyona bırakıldı. Her örnek için üçer çalışma yapıldı. Tripsinizasyondan sonra sayımları yapıldı.

3.3.4. TRİtidy G ile Protein İzolasyonu

TRİtidy G, Chomczynski, P.ve Sacchi, N. tarafından geliştirilen protokolün kısaltılmış, modifiye formudur metoda göre RNA/DNA/protein ekstraksiyonu için kullanılan bir kimyasal çözüldür (64). Protein izolasyonu için;

1. Ependorfdaki hücelere yavaş yavaş steril PBS eklendi. 15 mL’lik falkon tüpe aktarılarak 5 mL PBS ile hücreler yıkandı. DMSO’nun yıpratıcı etkisi azaltıldı. 400 g’de 7 dakika santrifuj edildi.
2. RPMI uzaklaştırılıp içine $1 - 5 \times 10^6$ hücre için 1 mL tritidy G konuldu. Hücreler iyice pipetajla liz edildi.
3. 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
4. 0,2 mL kloroform eklenek bir daha pipetaj edildi.
5. 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
6. 12000 g’de 4 °C’de 15 dakika santrifuj edildi .
7. Üst faz RNA izolasyonu için ayrılırken alt faz DNA/Protein izolasyonunda kullanıldı.
8. Alt fazın üstüne 0,3 mL etanol eklendi.
9. DNA çökü. 5 dakika bekletildi.
10. 2000 g’de 5 dakika santrifuj edildi.
11. Süpernatant protein tayini için kullanıldı.
12. Süpernatana eşit hacimde izoproponal eklendi.

13. 10 dakika inkübe edildi.
14. 12000 g'de 4 °C 10 dakika santrifüj edildi.
15. Çökelek 2 mL 300 mM guanidin hidroklorür eklendi.
16. 20 dakika inkübe edildi.
17. 750 g'de 4 °C 5 dakika santrifüj edildi.
18. Çökelek 2 mL 300 mM guanidin hidroklorür eklendi.
19. 20 dakika inkübe edildi.
20. 7500 g'de ve 4 °C' de 5 dakika santrifüj edildi.
21. Kurutmadan sonra 200 µL % 1 SDS'de çözüldü.
22. Yeni bir santrifüj tüpüne aktarılıp Western blotlama çalışması için -20°C derecede muhafaza edildi.

3.3.5. TRIİdy G ile RNA İzolasyonu

Yöntem doku ya da hücrelerin lizis solüsyonu ile parçalanıp fenol yardımıyla RNA'nın ekstrakte edilmesine dayanır. Yöntem kısaltılmış olsa da günümüzde var olan kolon yardımıyla izolasyon yapan kitlere göre RNA'nın saflığı daha düşüktür.

1. Ependorfdaki hücrelere yavaşça steril PBS eklendi. 15 mL'lik falkon tüpe aktarılarak 5 mL PBS ile hücreler yıkandı. DMSO'nun yıpratıcı etkisi azaltıldı. 400 g'de 7 dakika santrifüj edildi.
2. RPMI uzaklaştırılıp içine 1- 5x10⁶ hücre için 1 mL TRIİdy G konuldu. Hücreler pipetajla parçalandı.
3. 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
4. 0,2 mL kloroform eklenerek, bir daha pipetaj edildi.
5. 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
6. 12000 g'de ve 4 °C 15 dakika santrifüj edildi.
7. Üst faz RNA izolasyonu için ayrılırken alt faz DNA/Protein izolasyonunda kullanıldı.
8. Üst faz ayrı buz üzerinde bir tüpe alındıktan sonra eşit hacimde izopropanol eklendi.
9. En az 15 dakika soğukta beklendi.
10. 12000 g 'de ve 4 °C 15 dakika santrifüj edildi .
11. RNA önce % 70-80 lik alkolle daha sonrada % 100 lük etanolle yıkandı.

12. 7500g 'de 5 dakika santrifüj edildi (yada 15 000 rpm de kısa devir).
13. Etanol hava ile uçurulduktan sonra 20 µL DPEC muamele edilmiş su eklenerek. RT- PCR çalışmasında kullanılabilece kadar –80 °C derecede saklandı.

3.3.6. SR-B1 Protein Ekspresyonunun Belirlenmesi

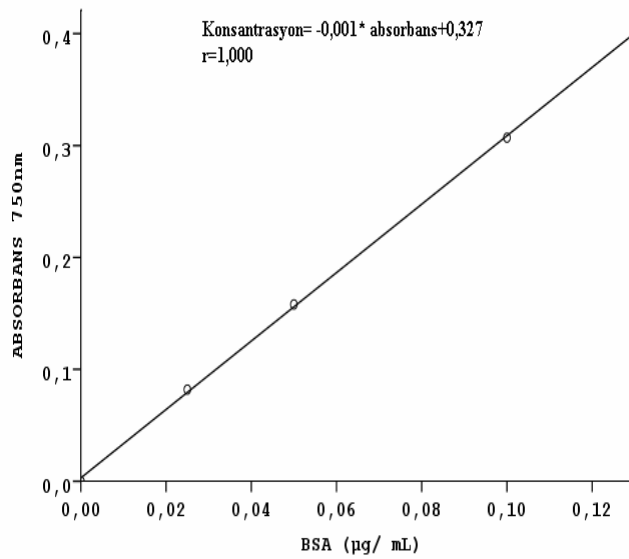
3.3.6.1. Protein Miktarı Tayini

Deneyleerde kullanılacak protein miktarını sabitlemek için Lowry yöntemiyle protein tayini yapıldı. Bu yöntemde protein, önce, alkali bakır çözeltilisiyle reaksiyona sokuldu. Alkali ortamdaki Cu^{+2} , proteinin peptit bağlarıyla kompleks oluşturarak Cu^{+1} 'e indirgendi. Daha sonra, Folin ve Ciocolteu'nun fenol reaktifi ilave edildi. Fosfotungstik ve fosfomolibdik asitlerin indirgenmesiyle molibdenyum mavisi ve tungsten mavisi renkleri meydana geldi (65).

Tablo 14. Protein miktarı tayininde yapılan pipetleme işlemleri

	Kör	Standart	Test
Distile su	400 µL		
Standart		400 µL	
Lahana numunesi			400 µL
Lowry reaktifi	400 µL	400 µL	400 µL
Karıştırılarak 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi.			
0,2 N Folin reaktifi	200 µL	200 µL	200 µL
30 Dakika oda sıcaklığında bekletildi.			
750 nm'de köre karşı absorpsiyon okundu.			

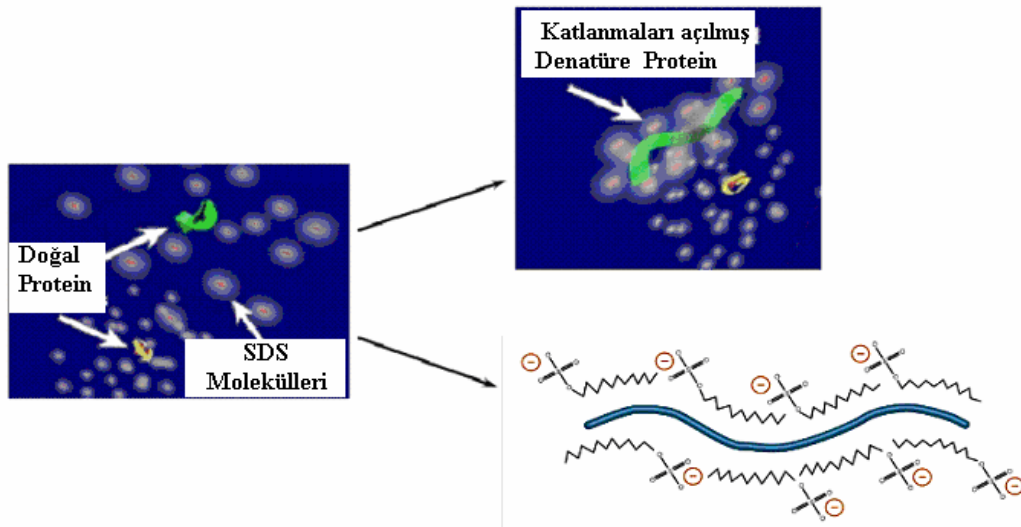
Standart olarak değişik konsantrasyonlarda sığır bovin serum albumini kullanılarak çizilen standart grafiğinden numunelerin protein konsantrasyonu µg/ mL olarak belirlendi.



Şekil 25. Protein Miktarı Tayin Grafiği

3.3.6.2. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE)

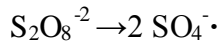
Yüklü bir molekülün elektrik alanda göçünü ifade eden elektroforetik yöntemlerde molekülün göç hızı; elektrik alan şiddetine, molekülün üzerindeki net yüke, molekülün boyutuna, şekline, ortamın iyonik şiddetine, viskozitesine ve sıcaklığa bağlıdır. SDS-PAGE proteinlerin sadece molekül büyüklüklerine bağlı olarak ayrılmasını sağlayan bir yöntemdir. Proteinlerin diğer fiziksel özelliklerinden etkilenmez. Bu nedenle proteinlerin öncelikle denature edilmesi; sekonder, tersiyer ve kuarterner yapılarına bağlı özelliklerinden arındırılması gerekmektedir. Denatüre edici ajan olarak kullanılan SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) ile inkübe edilen proteinler; çözünürlük kazanmakta (özellikle membran proteinleri gibi hidrofobik proteinler), primer yapıları dışında tüm üç boyutlu yapılarını kaybetmektedirler (Şekil 26). SDS'in negatif yüklü sülfat iyonları ile sarılan proteinler molekül büyüklükleri ile orantılı olan bir negatif yüke sahip olmaktadır. Negatif yüklü moleküllerin tümü bir elektrik alana koyulduğunda pozitif yüke doğru negatif yük büyüklüklerine/molekül büyüklüklerine bağlı olarak göç edeceklerdir.



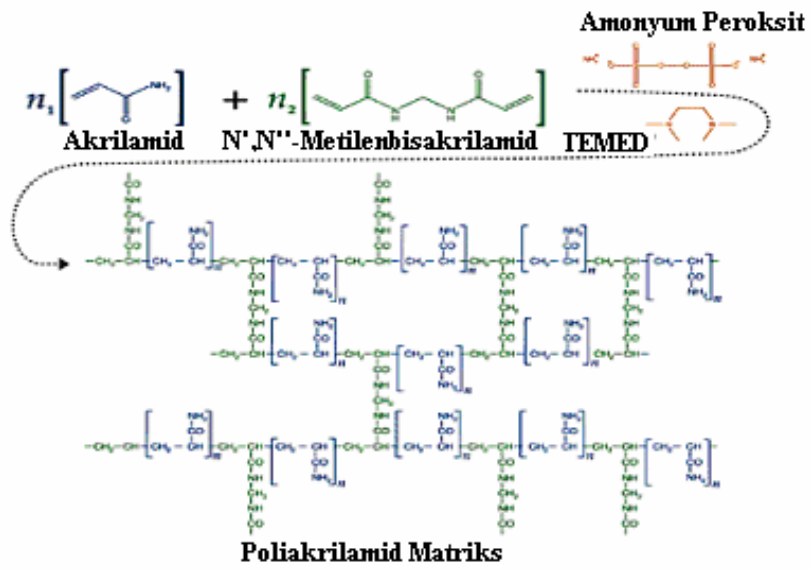
Şekil 26. Proteinlerin SDS ile Denatüre Edilmesi (66)

Başarılı bir elektroforez yapılabilmesi için analizi yapılacak örnek onunla reaksiyon vermeyen ve örneğin elektrik alanda ilerlemesini engellemeyen bir zemin kullanmakla mümkün olur. Böyle bir kimyasal zemin polimerlerin özellikleri çalışılırken keşfedilmiş ve poliakrilamid olarak nitelendirilmiştir. Poliakrilamid jellerinde numune bileşenlerinin çözünürlüğü artmaktadır .Jelin meydana gelme mekanizması şöyledir (67) :

Amonyum persülfat suda çözüldüğünde serbest radikalleri meydana getirir.

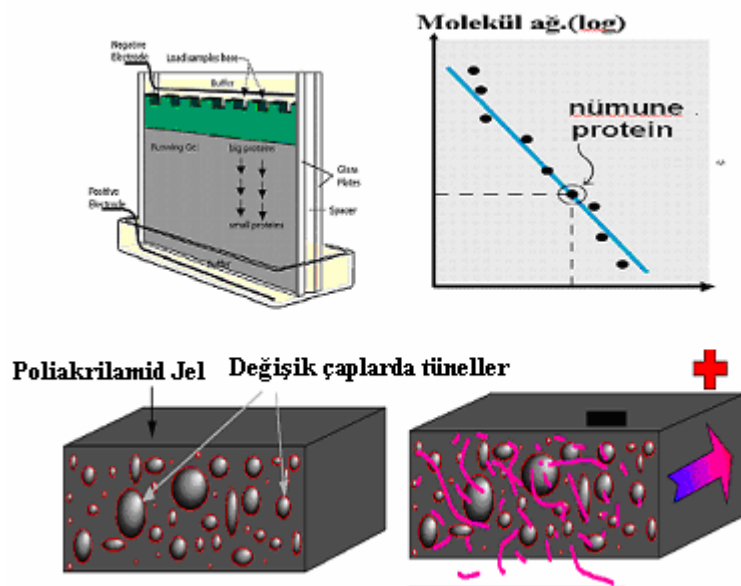


Bu radikaller akrilamid ile reaksiyon meydana getirirler. Serbest radikal akrilamid molekülü üzerine taşınır. Aktive edilmiş bu akrilamid molekülü çevresindeki diğer akrilamid molekülü ile etkileşerek uzunca bir polimer oluşturur. Bu polimerlerin oluşturduğu çözelti hali hazırda her ne kadar yoğunca ise de jeli oluşturmaz. Jel oluşumu bu polimer parçalarının çapraz bağlanmasını gerektirir. Bu işlem N,N'-metilen-bis akrilamid tarafından sağlanır. Bu madde iki akrilamid molekülünün reaktif olmayan uçlarının kafa kafaya verdiği bir molekül olarak düşünülebilir. Toplam akrilamid miktarına ve bis akrilamid miktarına bağlı olarak jel üzerindeki boşlukların büyüklüğü ayarlanabilir. TEMED'in (N,N,N',N'-Tetramethyl-1-,2-diaminomethane) jel karışımına eklenir, katalizör görevi görerek, polimerleşme reaksiyonunu hızlandırır (Şekil 27).



Şekil 27. Poliakrilamid Jelin Oluşması (67).

Poliakrilamid jeli küçük kanallardan oluşan bir moleküler elek olarak görev görmektedir. Küçük molekül ağırlığına sahip olan moleküller uygulanan elektrik alanda poliakrilamidin oluşturduğu moleküler elek içinde daha hızlı hareket edebilirken, büyük moleküllerin hareketi daha yavaş olacaktır (Şekil 28).



Şekil 28. Proteinlerin Poliakrilamid Jeldeki İlerleyişi (67).

Çalışmamızda, Laemli kesikli tampon sistemi uygulandı (68 -69). Buna göre % 10'luk SDS-PAGE yapıldı. Elektroforez cam plakaları önce saf suyla yıkandı. Fırında ısıtılıp daha sonra izopropil alkol ile iyice yıkanıp durulandı. İki cam plaka birbiri üstüne konularak kısıkaçlarla iyice tutturuldu ve jel hazırlama cihazına konuldu.

3.3.6.2.1. Jellerin Hazırlanması

Bu yöntemde üstte daha kısa, akrilamid oranı daha düşük ve protein örneklerinin jele yüklenmesi için tarak kullanılarak kuyucuklar oluşturulmuş bir yığıma “stacking” jeli, altta ise daha uzun olan ayırma “resolving” jeli yer alır. Yığıma jelinde yer alan kuyucuklara yüklenen protein örnekleri yürütme tamponunda bulunan gliserinin de yardımıyla hızlı bir biçimde ayırma jelinin hemen üstünde ince bir hat oluşturacak şekilde sıralanırlar. Taze hazırlanan ayırma jeli plakalar arasına enjektörle döküldü ve üst kısma 2-3 mm yükseklikte n-bütanol ilave edilerek polimerizasyon için 2 saat oda sıcaklığında bekletildi. Bu jelden bir miktar da tüp içinde ortamda bırakılarak cam levhalar arasındaki jelin polimerleşmesi kontrol edildi. Ayırma jelinin üzeri n-bütanol ile kaplanır, böylece jelin üst yüzeyinin havayla teması sonucu hızlı polimerleşmesi engellendi. Polimerleşme 20-30 dakika sürdü.

Ayırma jeli katılaştıktan sonra uygun tarak yerleştirilerek yığıma jeli ilave edildi. Hazırlanan enjektör ile hava kabarcığı kalmayacak şekilde döküldü. Tarağın üzerine nemli süzgeç kağıdı örtülerek bir gece bekletildi. Polimerizasyon için bir gece beklendikten sonra ertesi gün tarak dikkatlice çıkartılarak jelin üstü, önce saf su, sonra yığıma tamponuyla yıkandı.

A. Ayırma Jelinin Hazırlanması (% 10'luk)

Çözelti	Katılan Miktar
Ayırma jeli tamponu (pH: 8,8)	3,75 mL
Akrilamid–bisakrilamid (30: 0,8)	10 mL
% 10 SDS	0,3 mL
Deiyonize su	14,5 mL
% 1,5 'luk APS (Taze hazırlanmış)	1,5 mL
TEMED	15 µL
Toplam	30 mL

B. Yıgma Jelinin Hazırlanması

Çözelti	Katılan Miktar
Yıgma Jeli Tamponu (pH: 6,8)	5 mL
Akrilamid–bisakrilamid (30: 0,8)	2,5 mL
% 10 SDS	0,2 mL
Deiyonize su	11,3 mL
% 1,5 'luk APS (Taze hazırlanmış)	1 mL
TEMED	15µL
Toplam	20 mL

C. Yürütme (Numune) Tamponunun Hazırlanması

Çözelti	Katılan Miktar
% 10 SDS	60 µL
β- merkaptotanol	15 µL
Yıgma Jeli Tamponu (pH: 6,8)	37,5 µL
Gliserol	30 µL
Bromfenol Mavisı	5 µL
Toplam	150 µL

3.3.6.2.2. Numunenin Hazırlanması

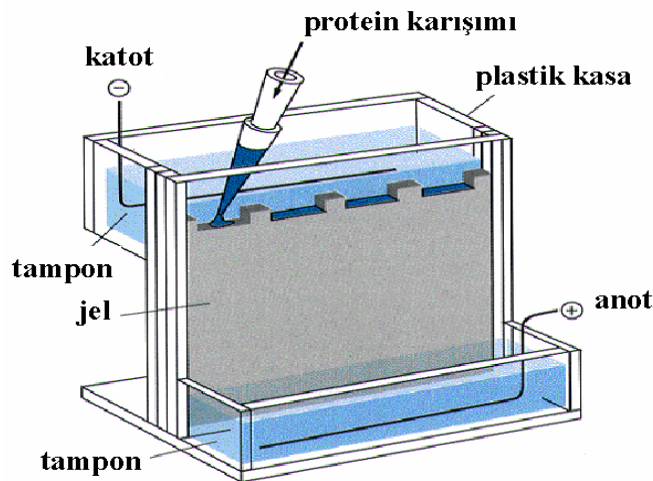
Protein numunesi 100 µg/ mL olacak şekilde hazırlandı. Numunelere (150 µL) yürütme tamponundaki SDS ve betamerkapto etanol ilave edilerek proteinlerin denatürasyonu ve disülfür bağlarının indirgenmesi sağlandı. 5 dakika kaynar su banyosunda bekletildi. Daha sonra yürütme tamponunun geri kalanı eklendi.

Western blot renkli markırı (BIO-RAD Precision Plus Protein WesternC standarts) numune tamponu ile seyreltildi, kaynatılmadı. Numuneler insülin enjektörü ile dikkatli bir şekilde uygulandı. Jel görüntüleme sistemi (BioDoc Analyze) kullanılarak görün alan yoğunluğu diğer ekstraktların alan yoğunluklarıyla karşılaştırıldı.

3.3.6.2.3. SDS-PSGE İşlemi

Tankın alt ve üst kısmına tank tamponu (350mL) konularak elektroforeze hazır hale getirildi. Tank kapağı kapatılarak alt tarafı anod (+), üst tarafı katod (-) olacak şekilde

bağlantı kuruldu. Örnekler yığıma jelini geçene kadar 80 V, daha sonra akım 150 V doğru akım ile elektroforeze tabi tutuldu. İşaret boyası (bromphenol mavisi) jelin alt kısmına ulaştığında; uygulanan elektrik akımının kesilerek proteinlerin elektrik alanda göçü sonlandırıldı. Jel çıkarılıp western blot tankında membrana aktarılmak üzere western blot transfer tamponu içeren geniş bir kaba aktarıldı. Sonuç olarak SDS-PAGE, moleküllerin sadece molekül ağırlıklarına bağımlı olarak ayrımlanmasını sağlayan bir yöntemdir.



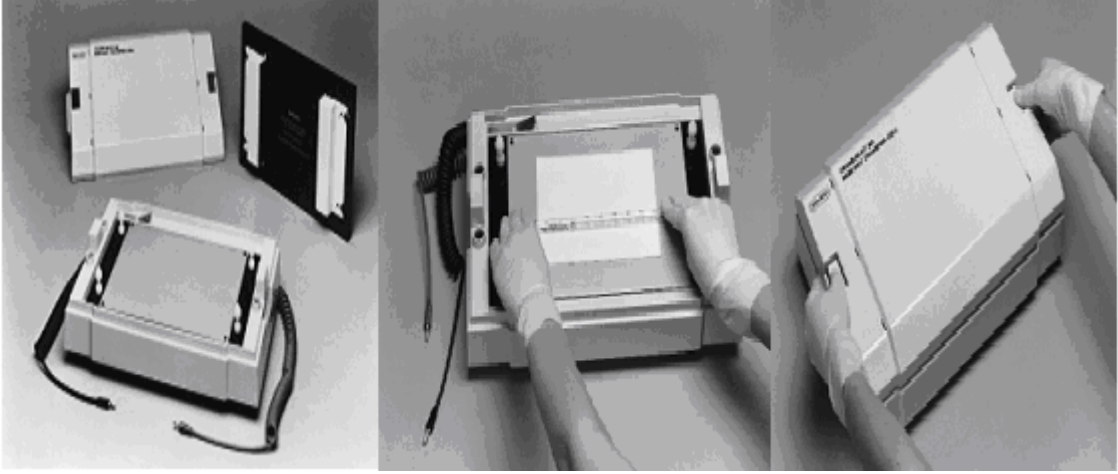
Şekil 29. SDS-PAGE Tankı

3.3.6.3. Western-Blotlama

SDS-PAGE heterojen bir protein karışımını ayırma ve tanımlama sağlamasıyla birlikte, bu karışımdaki proteinlerden hedeflenen bir tanesini de çalışmak mümkündür. Bu amaçla proteinler istenilen amaca ve yöntemine uygun şekilde jelde elektroforez edildikten sonra membrana transfer edilir. Western blot analizi, bir protein karışımı içerisinde bulunan hedeflenen belirli bir proteinin varlığının saptanmasında kullanılmaktadır. Membranlara transferde en çok kullanılan yöntem ise elektroblotlama'dır. Elektroblotlama, elektroforetik olarak ayrılmış örneklerin elektrik alan altında mekanik olarak kararlı bir membrana aktarılmasını sağlar (70).

SDS-PAGE'e tabi tutulan jel transfer tamponu içinde 10 dakika yavaşça çalkalanarak dengelendi. Blotlama esnasında kullanılacak whatman filtreleri transfer tamponu içine konularak 5 dakika ıslatıldı. PVDF membran (Immobilon P blotting membrane (Millipore, Billerica, MA, USA) önce 10 saniye metanolle yıkanıp daha sonra transfer tamponu ile dengelendi.

1. Sırasıyla 4 adet whatman kağıdı, 1 adet nitroselüloz membran, jel ve 4 adet whatman kağıdı transfer tamponu içinden alınarak üst üste BIO-RAD yarı kuru (semi-dry) tankına yerleştirildi. Tabakalar arasında hava kabarcıkları olmamasına dikkat edildi.



Şekil 30. Semi-Dry Western Blot Çalışması

2. Tank güç tankına takılıp, 1 saat boyunca 25 Volt, 160 mA 'de elektrik akımında blotlama işlemi gerçekleştirildi.
3. PVDF membranı tanktan alınıp blotlama tamponunda bir gece boyunca (veya 37°C'de 2 saat) 4 °C'de inkübasyona bırakılarak protein olmayan bölgeler süt tozu ile kapatıldı.
4. Jeldeki proteinlerin membrana geçip geçmediğinin kontrolü için jel boyama çözeltisinde (Coomasie Brilliant Blue) 2 saat bekletildikten sonra boya çıkarma çözeltisine aktarıldı.
5. 1xTBS ile membran bir dakika kadar çalkalandı.
6. Membran 1:200 oranında hazırlanmış hSR-B1 ile 1 saat boyunca 37 °C''de çalkalayıcı inkübatörde inkübe edildi.
7. 1x TBS ile membran 10'ar dakika 3 kez hassas bir şekilde yıkandı.
8. Membran 1:2000 oranında hazırlanmış goat anti rabbit horseradish peroksidaz ile bir saat boyunca 37°C''de çalkalayıcı inkübatörde inkübe edildi.
9. 1x TBS ile membran 10'ar dakika üç kez hassas bir şekilde yıkandı.

10. Yaklaşık 20 mL TMB eklenek karanlıkta 20-30 dakika 37°C''de çalkalayıcı inkübatörde inkübe edilerek proteinler görülebilir hale getirildi.
11. Bantlar görülünce reaksiyon steril deiyonize su ile durduruldu ve resimleri çekildi.
12. Jel görüntüleme sistemi kullanılarak, bantların hacimleri ölçüldü. Körün bant yoğunluk yüzdesi 100 kabul edilerek diğer ekstraktların bant yoğunluk yüzdeleri hesaplandı.

3.3.7. SR-B1/CLA-1 mRNA seviyesinin Belirlenmesi

3.3.7.1. RNA Miktarının Belirlenmesi:

RT-PCR'da kullanacağımız RNA miktarını sabitlemek için; TRIİtyd G kullanılarak elde edilen RNA'lar 1:25 oranında seyreltilerek, köre karşı (DPEC'li su) özel UVette kuvet kullanılarak 260 ve 280nm 'de spektrofotometrede okundu. A280 / A260 oranı ölçüldü. (oran >1,5 olmalıdır). 280 nm'deki absorbans önce 40 ile, sonra dilüsyon faktörü (25) ile çarpılarak RNA konsantrasyonuna ulaşıldı.

3.3.7.2. RT-PCR

Ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonunun temeli PCR'a dayanır. Daha önemlisi, ilk olarak retrovirüslerden elde edilen ve RNA'yı DNA'ya transkribe eden ters transkripsiyonun işleyişine bağlıdır. RT-PCR teknikleri, RNA dizilerini (mRNA gibi) DNA nükleik asidinden daha kararlı halde tutarak RNA' dan cDNA (komplementer veya kopya DNA) oluşumuna izin verir. Ters transkripsiyonla RNA'dan onun ters komplementeri DNA (cDNA)'nın oluşması iki aşamalı RT-PCR'ın ilk aşamasıdır. Bunun yanında RNA'nın DNA'ya kopyalanmasından sonra, cDNA dizileri, DNA dizisine özgün primerler kullanılarak çoğaltılabilir. Bu çoğaltılma iki aşamalı RT-PCR işleyişindeki ikinci ve sonuncu önemli aşamadır. hSR-B1 / CLA-1'nın mRNA düzeyinin belirlenmesi için Reverse Transcriptase-PCR için, Qiagen 'den One Step RT-PCR kiti kullanıldı.

RT için numune reaksiyon tüpleri Tablo 15 'deki gibi hazırlandı.

Tablo 15: RT Reaksiyon Tüpü Hazırlanması

	Eklenecek Miktar	Reaksiyon Konsantrasyonu
5X QIAGEN OneStep RT-PCR tamponu (12,5 mM MgCl₂ içeriyor)	10 µL	1X
dNTP Karışımı, 10 mM	2 µL	400 µM her bir dNTP
SR-B1/ CLA-1 veya β Aktin Sense	3 µL	0,6 µM
SR-B1/ CLA-1 veya β Aktin Anti sense	3 µL	0,6 µM
QIAGEN OneStep RT-PCR Emzim Karışımı (ters yönde transkriptaz içeriyor)	2 µL	
Template RNA		2 µg /reaksiyon
RNAaz –bulunmayan su		
Toplam	50 µL	

Her numune için bu reaksiyon ortamı hazırlandı. Reaksiyon karışımı 'thermocyle'a konuldu ve 30 dakika 50 °C'de inkübe edildi. Daha sonra reaksiyon karışımının 95 °C'de 15 dakika bekletilmesi ile revers transcriptase reaksiyonuna son verildi. Herbir numuneden elde edilen cDNA'lar aynı reaksiyon ortamında RT'de kullanılan primerler (Tablo 16) kullanılarak PCR ile çoğaltıldı. PCR şartları;

94⁰C'de 30 saniye,

56⁰C'de 30 saniye,

72⁰C'de 90 saniye olacak şekilde 35 döngü (30 döngü beta aktin için), son olarak ta; 72⁰C'de 7 dakika 1 cycle olacak şekilde programlandı.

Tablo 16. RT-PCR'da Kullanılan Primer Dizileri

	Primre Sırası	Ürün
hSR-B1/ CLA-1 sense	5'-ATGATCGTGATGGTGCCGTC-3'	930 bç
hSR-B1/ CLA-1 antisense	5'-ACTGAACCTGCAGGTGCTGA-3'	
β-Aktin sense	5'-ATCATGTTTGAGACCTTCAA-3'	318 bç
β-Aktin antisense	5'-CATCTCTTGCTCGAAGTCCA-3'	

3.3.7.3. Agaroz Jel Elektrofözezi

200-50000 baz çifti (bç) boyutları arasındaki DNA ve RNA moleküllerini tanımlamakta kullanılan standart yöntem destek ortam olarak agarozun kullanıldığı elektrofözezdür. % 0,5'den daha düşük agaroz içeren jeller çok kırılğan olduğundan yatay sistem tercih edilir. Nükleik asitlerin agaroz jeldeki hareketleri agaroz konsantrasyonu ile nükleik asit moleküllerinin boyutları ve şekliinden etkilenir. Nükleik asitlerin ayırımı için en etkin agaroz konsantrasyonları % 0,3-2,0'dir.

RT-PCR ürünlerinin değerlendirilmesinde % 2'lik agaroz jel elektrofözezi kullanıldı. 0,8 g agaroz 40 mL TAE tamponunda kaynatılarak çözüldü. Elde edilen jel biraz soğuduktan sonra 10 µl etidiyum bromür eklendi ve tarak yerleştirilmiş jel kalıbına döküldü. Jel tamamen donduktan sonra jel kabı elektroföze tankına yerleştirildi.

Numunelerin Jele Yüklenmesi ve Değerlendirilmesi: 15 µl numune 2,5 µl yükleme tamponu ile karıştırıldı ve elektroföze tankındaki jele kuyucuklara zarar vermeden yüklendi. Jelin ilk kuyruğuna elde edilen ürünlerin baz büyüklüğünü görmek için 20 µL 100 bç'lik markır yüklendi. Numuneler jele yüklendikten sonra 100 voltta 1 saat yürütüldü. Jel Transimüminatöre alınarak bantlar incelendi. Hood ile fotoğrafları çekildi. Jel görüntüleme sistemi kullanılarak, bantların hacimleri ölçüldü. Körün hacim bant yoğunluk yüzdesi 100 kabul edilerek diğer ekstraktların bant yoğunluk yüzdeleri hesaplandı.

3.4. İstatistiksel Analizler

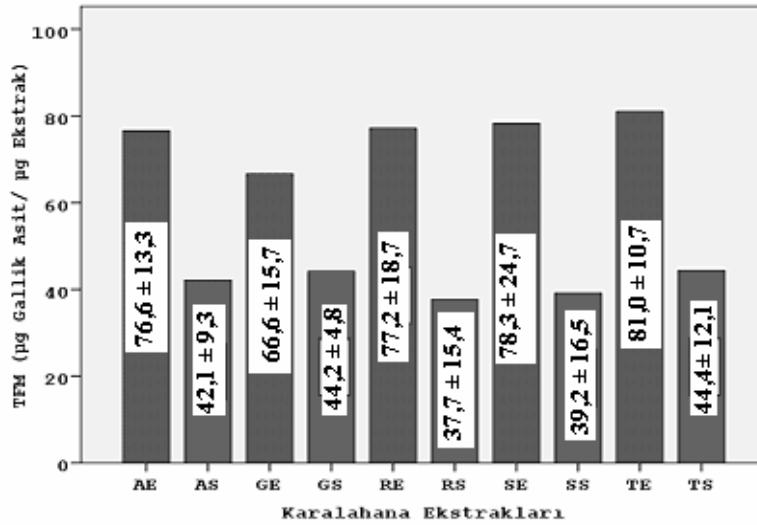
Elde edilen değerler, aritmetik ortalama ve standart sapması olarak ifade edildi. Ölçümle elde edilen verilerin normal dağılıma uygunluğu her bir grupta Kolmogorov Smirnov testi ile incelendi. Karalahana ekstraktları arasındaki anlamlı farklılığın olup olmadığını belirlemede, parametreler normal dağılıma uygunluk göstermediğinden; Mann Witney U Testi yapıldı ve $p < 0,05$ olanlar anlamlı olarak kabul edildi. Antioksidan aktiveteler arasındaki korelasyon analizleri Pearson bivariate korelasyon analizi ile yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. Karalahana Ekstraktlarında Antioksidan Tayinler

Artvin-Hopa, Giresun, Rize, Samsun ve Trabzon sahil kesimlerinden toplanarak elde edilen karalahana yaprakları kurutulularak elde edilen etanolik ve sulu ekstraktlarda antioksidan aktiviteler incelendi (n=3).

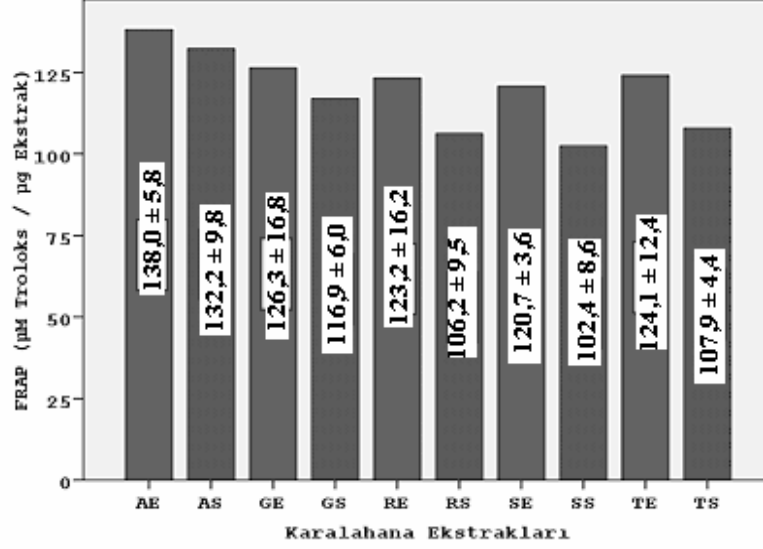
Çalışmaya dahil edilen tüm iller için toplam fenolik madde miktarı; etanolik ekstraktlarda sulu ekstraktlara göre daha yüksek bulundu ($P < 0,05$) (Şekil 30).



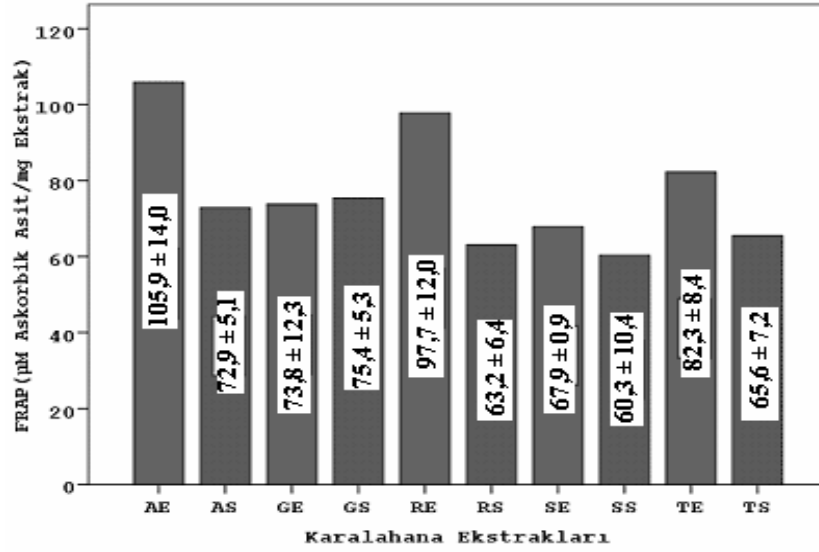
Şekil 31. Karalahana ekstraktlarının TFM (µg Gallik Asit) miktarları (n=3).

Demir indirgeme / FRAP miktarları askorbik asit ve troloks standardına göre µM askorbik asit / mg ekstrakt ve µM troloks / µg ekstrakt cinsinden hesaplandı. Etanolik ekstraktlar sulu ekstraktlara göre biraz yüksek bulunmasına rağmen aralarında FRAP (Askorbik Asit) değerleri bakımından Artvin ve Rize iline ait ekstraktlar hariç etanolü

ekstraktlarla sulu örnekler arasında anlamlı farklılık olmadığı gözlemlendi ($P > 0,05$) (Şekil 32, 33).

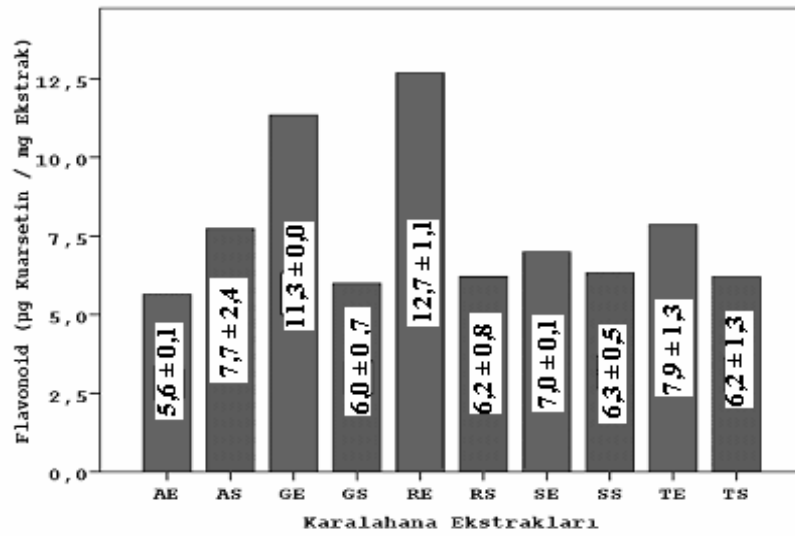


Şekil 32. Karalahana ekstraktlarının FRAP (µM Trolox) miktarları (n=3).



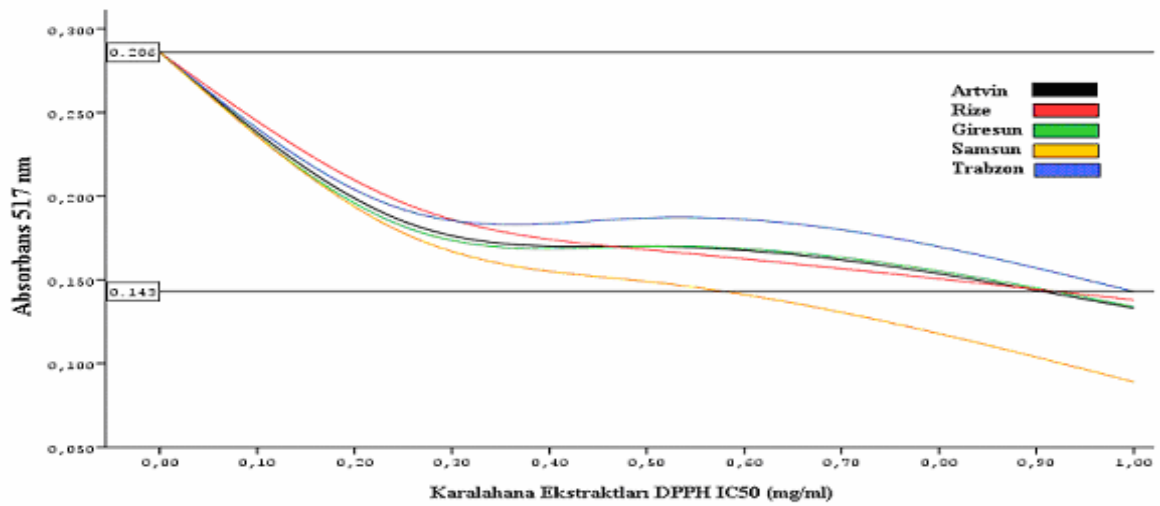
Şekil 33. Karalahana ekstraktlarının FRAP (µM Askorbik asit) miktarları (n=3).

Flavonoid içeriği bakımından, etanolik ekstraktlar sulu ekstraktlara göre biraz yüksek bulunmasına rağmen Giresun ve Rize illerindeki hariç aralarında anlamlı farklılık olmadığı gözlemlendi ($P > 0,05$) (Şekil 34).

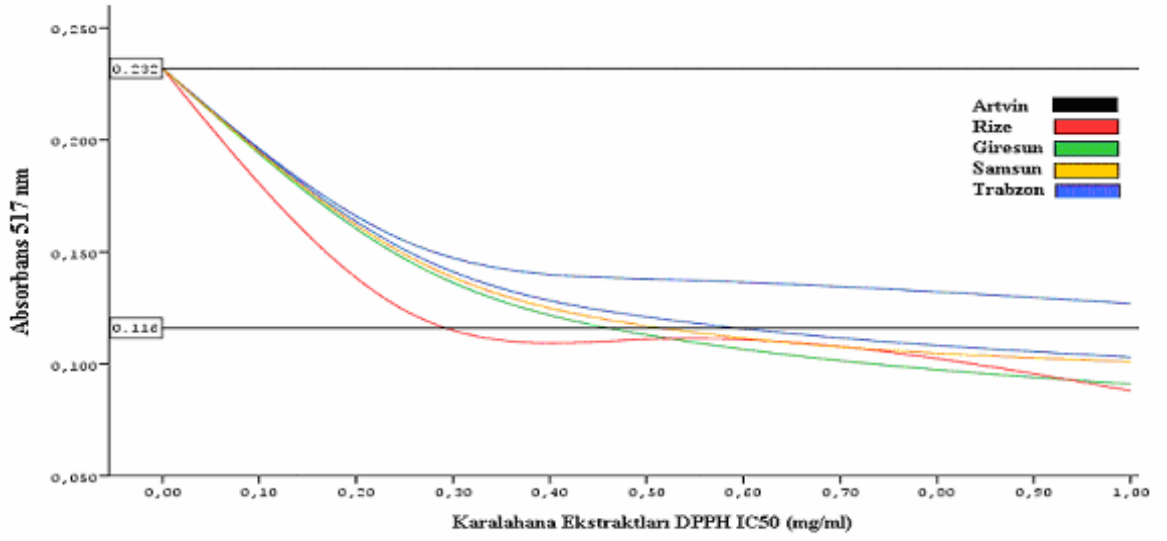


Şekil 34. Karalahana ekstraktlarının flavonoid (μg Kuarsetin) miktarları($n=3$).

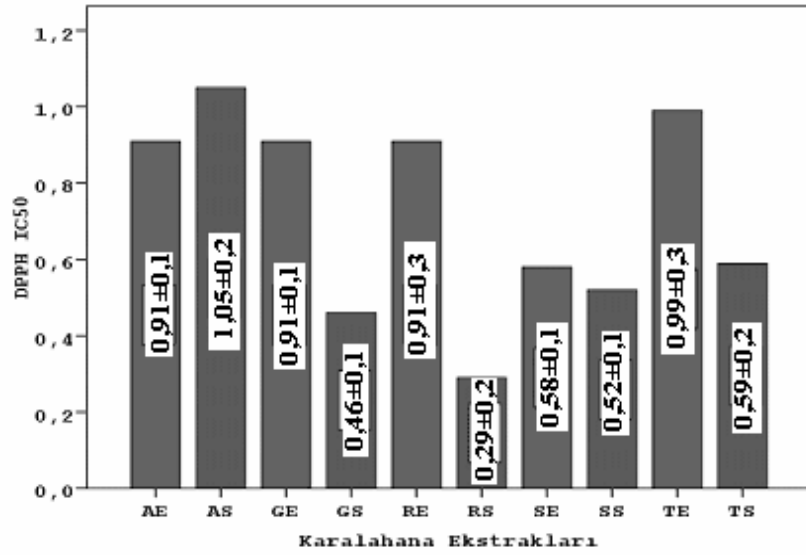
En düşük DPPH aktivitesine sahip olan ekstrakt en iyi aktiviteye sahipti. Etanollü ekstraktlar arasında Samsun iline ait etanollü ekstrakt, sulu ekstraktlar arasında ise Rize iline ait sulu ekstrakt en yüksek aktiviteye sahipti (Şekil 35, 36). Sulu ekstraktlar etanollü ekstraktlara göre daha yüksek aktiviteye sahip olmalarına rağmen aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi ($P > 0,05$) (Şekil 37).



Şekil 35. Etanollü karalahana ekstraktlarının DPPH yakalama kapasitesi.

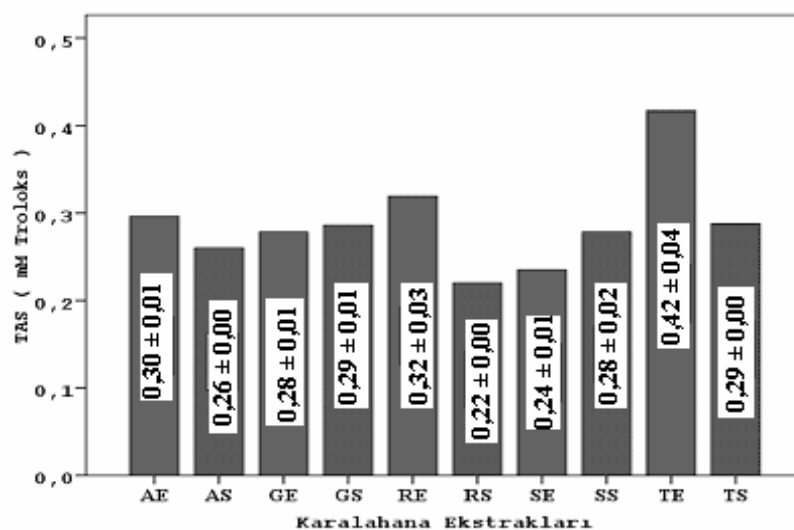


Şekil 36. Sulu karalahana ekstraktlarının DPPH yakalama kapasitesi.



Şekil 37. Etanollü ve sulu karalahana ekstraktlarının DPPH (IC₅₀) seviyeleri (n=3).

Etanollü ve sulu ekstraktlar arasında Trabzon iline ait etanollü ve sulu ekstraktlar en yüksek TAS içeriğine sahiptir. Etanollü ekstraktlar sulu ekstraktlara göre yüksek olsalar da; aralarında TAS içeriği bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi ($P > 0,05$) (Şekil 38).



Şekil 38. Karalahana ekstraktlarının TAS (µM Toloks) miktarları (n=3).

Tablo 15 'de tüm iller için sulu ve etanolik karalahana ekstraktlarında antioksidan parametlerin sonuçları gösterilmektedir. Buna göre etanolik ekstraktlar; sulu ekstraktlara göre daha yüksek TFM, FRAP, flavonoid ve TAS miktarına sahip olduğu gözlemlendi.

Tablo 17. Etanolik (E) ve sulu (S) karalahana ekstraktlarında illere göre antioksidan seviyeleri (n=3)

Ekstraktlar	TFM µg gallik asit / mg ekstrakt	FRAP		Flavonoid µg Kuarsetin/ mg ekstrakt	DPPH IC 50 µg/mg ekstrakt	TAS mM Trolox
		µM trolox / mg ekstrakt	µM askorbik asit / mg ekstrakt			
AE	76,6 ± 13,3	138,0 ± 5,8	105,9 ± 14,0	5,6 ± 0,1	0,91±0,1	0,30 ± 0,01
AS	42,1 ± 9,3	132,2 ± 9,8	72,9 ± 5,1	7,7 ± 2,4	1,05±0,2	0,26 ± 0,00
GE	66,6 ± 15,7	126,3 ± 16,8	73,8 ± 12,3	11,3 ± 0,0	0,91±0,1	0,28 ± 0,01
GS	44,2 ± 4,8	116,9 ± 6,0	75,4 ± 5,3	6,0 ± 0,7	0,46±0,1	0,29 ± 0,01
TE	81,0 ± 10,7	124,1 ± 12,4	82,3 ± 8,4	7,9 ± 1,3	0,99±0,3	0,42 ± 0,04
TS	44,4 ± 12,1	107,9 ± 4,4	65,6 ± 7,2	6,2 ± 1,3	0,59±0,2	0,29 ± 0,00
RE	77,2 ± 18,7	123,2 ± 16,2	97,7 ± 12,0	12,7 ± 1,1	0,91±0,3	0,32 ± 0,03
RS	37,7 ± 15,4	106,2 ± 9,5	63,2 ± 6,4	6,2 ± 0,8	0,29±0,2	0,22 ± 0,00
SE	78,3 ± 24,7	120,7 ± 3,6	67,9 ± 0,9	7,0 ± 0,1	0,58±0,1	0,24 ± 0,01
SS	39,2 ± 16,5	102,4 ± 8,6	60,3 ± 10,4	6,3 ± 0,5	0,52±0,1	0,28 ± 0,02
E	75,9 ± 5,4	126,4 ± 6,7	85,5 ± 16,0	8,7 ± 2,6	0,9±0,1	0,31 ± 0,06
S	41,5 ± 2,9	113,1 ± 11,9	67,5 ± 6,4	6,5 ± 0,7	0,6±0,2	0,27 ± 0,02
P	0,008	0,095	0,056	0,222	0,222	0,222

Ekstraktlar arasında karşılaştırma yapıldığında etanolik ekstraktlarda ortalamalara göre sıralamalar şu şekildedir;

TFM	: Trabzon > Samsun > Rize > Artvin > Giresun
FRAB (troloks)	: Artvin > Giresun > Trabzon > Rize > Samsun
FRAB (askorbik asit)	: Artvin > Rize > Trabzon > Giresun > Samsun
Flavonoid	: Rize > Giresun > Trabzon > Samsun > Artvin
DPPH	: Trabzon > Artvin = Rize = Giresun > Samsun
TAS	: Trabzon > Rize > Artvin > Giresun > Samsun

Sulu ekstraktlarda ise sıralama şöyledir;

TFM	: Trabzon > Giresun > Artvin > Samsun > Rize
FRAB (troloks)	: Artvin > Giresun > Trabzon > Rize > Samsun
FRAB (askorbik asit)	: Giresun > Artvin > Trabzon > Rize > Samsun
Flavonoid	: Artvin > Samsun > Rize > Trabzon > Giresun
DPPH	: Artvin > Trabzon > Samsun > Giresun > Rize
TAS	: Trabzon > Giresun > Samsun > Artvin > Rize

Sulu ekstraktlarda ise; FRAP (tro) ile FRAP (AA) değerleri arasında ($r= 0,814$; $P=0,049$), FRAP (tro) ile flavonoid değerleri arasında ($r= 0,813$; $P=0,049$) ve DPPH ile FRAP (tro) değerleri arasında ($r=0,820$; $P= 0,046$) istatistiksel olarak 0,05 önemlilik düzeyinde pozitif yönde yüksek seviyede doğrusal bir ilişki gözlemlendi. Flavonoid miktarı ile DPPH değerleri arasında istatistiksel olarak 0,01 önemlilik düzeyinde pozitif yönde yüksek seviyede ($r=0,917$) doğrusal bir korelasyon gözlemlendi ($P=0,01$).

Ayrıca ortalama etanolik (E) ve sulu (S) seviyeleri göz önüne alındığında etanolik ekstraktların antioksidan seviyeleri sulu ekstraktlara göre daha yüksek olmasına rağmen sadece toplam fenolik madde bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu gözlemlendi ($P<0,05$).

4.2. Hücre Kültürü

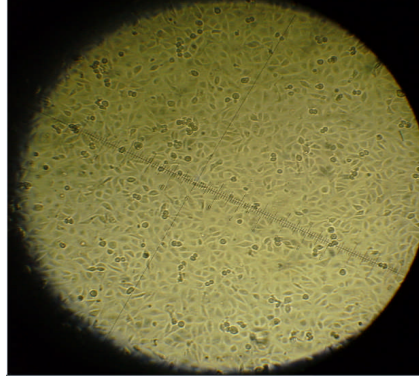
Yapılan antioksidan çalışmalarda Karadeniz Bölgesindeki beş ilden alınan karalahana numunelerinin her birinin farklı bir antioksidan aktivitesinin yüksek olduğu gözlemlendi. (Tablo 15). Trabzon iline ait ekstraktların TFM ve TAS değerleri yüksek olduğundan bu ekstraktlarla çalışılmaya karar verildi.

Tablo 18. HUVEC hücrelerinde Trabzon iline ait karalahananın etanolik ve sulu ekstraktlarıyla yapılan çalışma sonuçları (n=6).

	Karalahana Ekstraktları ($\mu\text{g/mL}$)	% Canlılık
Etanollü	40	$38,83 \pm 3,89$
	20	$66,20 \pm 5,70$
	10	$98,58 \pm 1,00$
	5	$97,32 \pm 4,20$
	2,5	$96,78 \pm 2,95$
Sulu	40	$31,70 \pm 4,77$
	20	$61,45 \pm 2,91$
	10	$96,92 \pm 1,59$
	5	$97,50 \pm 1,24$
Kör	2,5	$97,26 \pm 2,40$
	0	$96,63 \pm 3,31$

Bunun üzerine HUVEC hücre kültürü ortamına son konsantrasyonları 40, 20, 10, 5, ve 2,5 $\mu\text{g/mL}$ hücre olacak şekilde Trabzon iline ait etanolik ve sulu ekstraktları eklendi. 5 mg/mL 'lik ana çözeltiler kullanılarak, seyreltmeler RPMI 1640 hücre besiyerleri ile yapıldı ve etanollü örneklerde son % etanol oranı hücrelere toksik olmaması için % 1'in altına indirildi. Her bir konsantrasyonda kör ve örnekler okumaları 6'şar kere tekrarlanarak ortalamaları alındı. Endotel hücre kültürleri invert mikroskopla incelendi. Canlılıklarına bakıldı. Canlılık yüzdeleri Tablo 16'da gösterilmektedir.

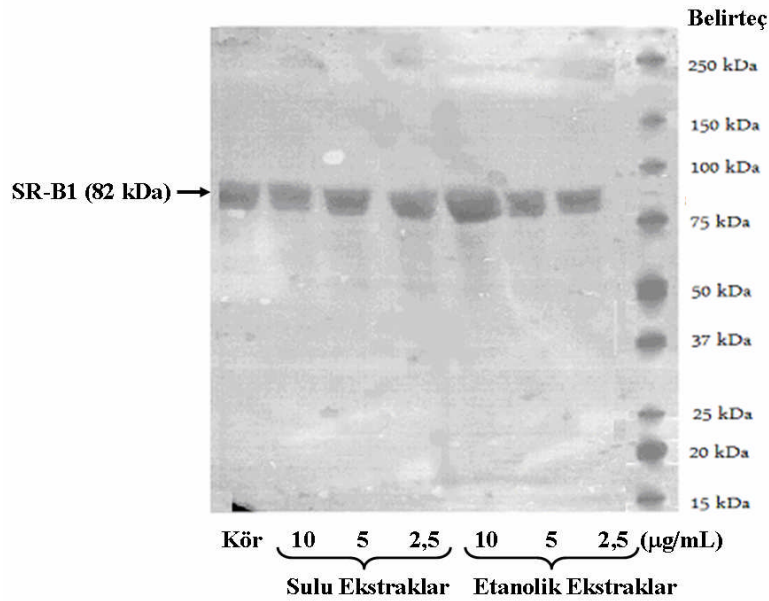
40 ve 20 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 'lık numunelerde canlılık oranı çok düşük olduğundan 10, 5, 2,5 $\mu\text{g/mL}$ ' lik ekstrakt miktarları ile çalışılmasına karar verildi.



Şekil 39. Endotel Hücresi

4.3. SDS-PAGE ve Western Blotlama Sonuçları

Karalahana ekstraktlarının SR-B1/CLA-1 proteini seviyesine etkisi western blotlama Şekil 40'da gösterilmiştir. Kör dahil bütün karalahana ekstraktlarında SR-B1/CLA-1 proteini pozitif gözlenmektedir. Karalahananın etanolik ekstraktlarındaki protein miktarı ile sulu ekstraktları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemesine rağmen; Trabzon iline ait 10 $\mu\text{g/mL}$ 'lik etanolik ekstraktında alan yoğunluğunda köre göre belirgin artış gözlenirken 5 ve 2,5 $\mu\text{g/mL}$ 'lik ekstraktlı olanlarda azalış gözlemlendi. Sulu ekstraktlarda ise 5 $\mu\text{g/mL}$ 'likte artış, diğerlerinde azalış gözlemlendi (Tablo 17).



Şekil 40. Karalahana ekstraktlarının HUVEC SR-B1/CLA-1 üzerine etkisinin Western Blot ile incelenmesi

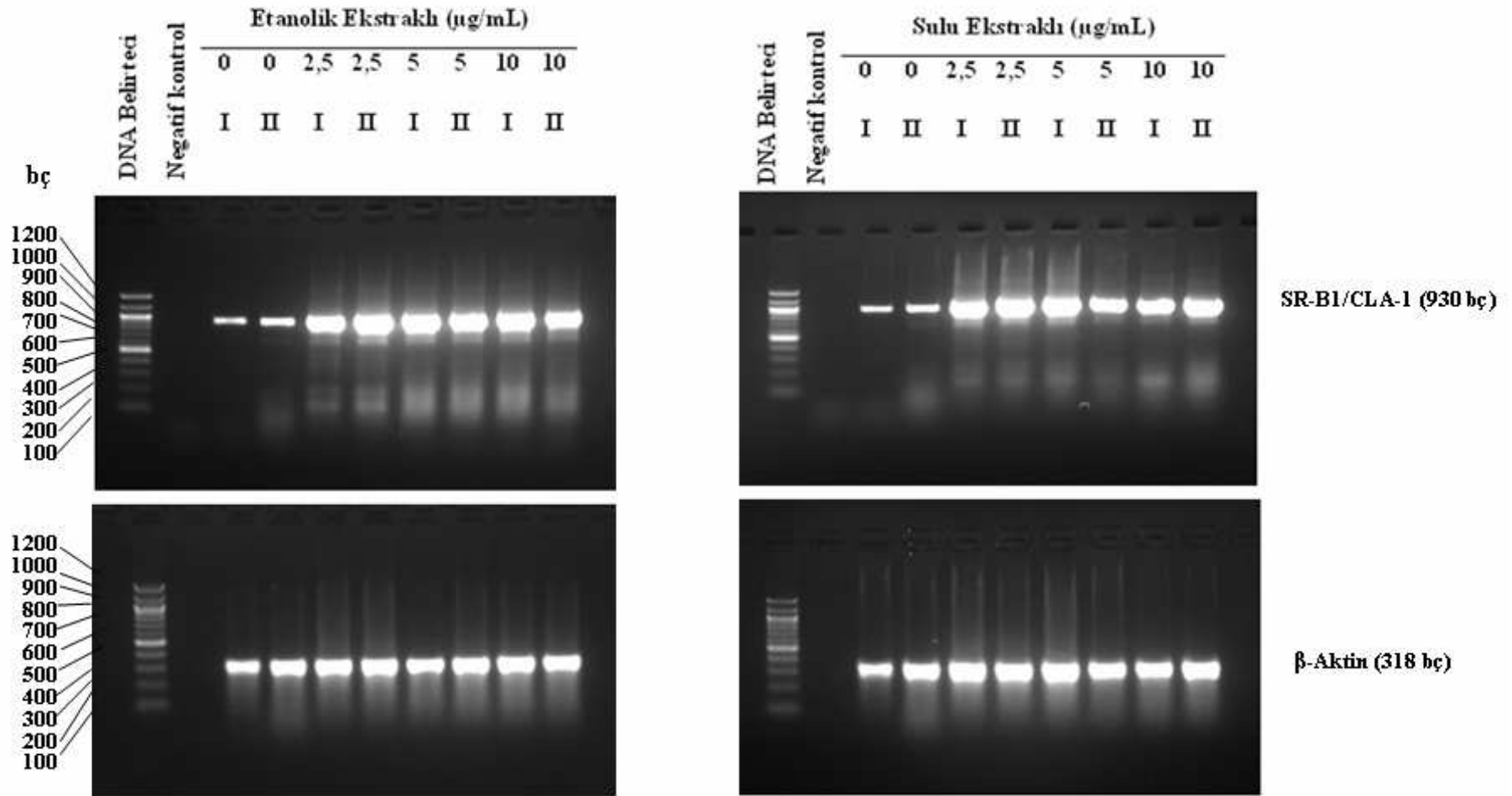
Tablo 19. Karalahana Ekstraktlarının Western Blot Bant Alan ve Yüzdeleri (n=3)

Karalahana Ekstraktları (µg/mL)	Alan	%	
Etanolik	10	21655 ± 267,9	120,0 ± 1,5
	5	15046 ± 108,1	83,06 ± 0,6
	2,5	15889 ± 67,8	87,72 ± 0,4
	Ortalama	17530 ± 3597,1	96,78 ± 19,8
Sulu	10	15215 ± 808,2	83,99 ± 4,4
	5	19751 ± 75,6	109,49 ± 0,4
	2,5	17462 ± 50,2	96,40 ± 0,3
	Ortalama	17476 ± 2268,0	96,48 ± 12,5
Kör	0	18113 ± 194,4	100,00 ± 1,1*

*Kör % 100 alınarak diğer oranlar hesaplanmıştır.

4.4. RT-PCR ve Agaroz Jel Elektrofrezisi Sonuçları

Karalahana ekstraktlarının SR-B1/CLA-1 mRNA ekspresyonuna etkisini incelemek için RT-PCR çalışması yapıldı. RT-PCR kitinin çalışıp çalışmadığını ve ekstraktlarda mRNA olup olmadığını belirlemek için kontrol olarak beta aktin primerleri kullanıldı. RT-PCR sonuçlarının değerlendirilmesinde, elde edilen cDNA'lar agaroz jel elektrofrezinde yürütüldü. Transilluminatöre konulan jelin fotoğrafı çekildi, görüntüldü (Şekil 41) Karalahana ekstraktlarında; mRNA varlığı belirlendikten sonra, ekstraktlardaki hSR-B1/CLA-1 mRNA ekspresyonları uygun primerler (hSR-B1/CLA-1 primerleri) kullanılarak RT-PCR yöntemi ile cDNA'lar elde edildi. RT-PCR sonuçlarının değerlendirilmesinde, elde edilen cDNA'lar agaroz jel elektrofrezinde yürütüldü. Transilluminatöre konulan jelin fotoğrafı çekildi, görüntüldü. Bantların yoğunlukları jel görüntüleme sistemi ile bant yoğunlukları ölçüldü, karalahana ekstraktı içermeyen kör 100 olarak kabul edildi. Karalahana ekstraktlarının bant alan yoğunlukları; köre oranlanarak; köre karşı % oranları belirlendi.



Şekil 41. Etanolik ve sulu karalahana ekstraktlarının HUVEC SR-B1/CLA-1 mRNA ekspresyonuna etkilerinin nun RT-PCR ile incelenmesi

Kontrol olarak kullanılan beta aktin bandı tüm ekstraktlarda gözlemlendi. Karalahana ekstraktı içermeyen kör dahil bütün karalahana ekstraktlarında hSR-B1/CLA-1 mRNA ekspresyonu pozitif gözlemlendi. Karalahana ekstraktlarındaki, hSR-B1/CLA-1 mRNA ekspresyonları bant alan yoğunlukları karşılaştırarak değerlendirildiğinde; karalahananın hem etanolik ekstraktlarında, hemde sulu ekstraktlarındaki hSR-B1/CLA-1 mRNA ekspresyonlarında (bant alan yoğunluklarında); köre göre belirgin artış gözlemlendi; köre göre istatistiksel olarak farklılık gözlemlendi ($P < 0,05$). Karalahananın etanolik ekstraktlarının bant alan yoğunluklarında; sulu ekstraktlara göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlemlenmedi ($P > 0,05$) (Tablo 20).

Tablo 20. Etanolik ve sulu karalahana ekstraktlarının HUVEC SR-B1/CLA-1 mRNA ekspresyonu RT-PCR sonucunda elde edilen bant alanları ve yüzdeleri (n=3)

Karalahana Ekstraktları ($\mu\text{g/mL}$)	Alan	%
Etanolik	10	$84660 \pm 583,7$
	5	$85354 \pm 291,0$
	2,5	$89155 \pm 424,1$
	Ortalama	$78934 \pm 599,4$
Sulu	10	$90812 \pm 126,4$
	5	$82023 \pm 899,1$
	2,5	$86645 \pm 371,7$
	Ortalama	$79440 \pm 589,7$
Kör	0	$34347 \pm 267,9$
		$100,00 \pm 0,8^*$

*Kör % 100 alınarak diğer oranlar hesaplanmıştır.

5. TARTIŞMA

Karalahana, ismini eski yunanca yenilebilen sebze “lachanika” sözcüğünden almaktadır (1). Özellikle Doğu Karadeniz Bölgesiyle bütünleşen bir sebzedir. Çorbası, sarması, değişik birçok yemeği yapılır. Türkiye’de 2001 yılında 100.000 ton karalahana tüketildiği, üretimde ise Samsun’un en büyük paya (% 40’lık) sahip olduğu rapor edilmiştir (11). Yetiştigi coğrafik alana ve iklime, toprak yapısına, suya bağlı olarak içeriği değişen karalahananın kimyasal yapısı ve özellikleri hakkında pek çok araştırma yapılmıştır.

Günümüze kadar karalahanada bulunan yüzlerce kimyasal bileşik tanımlanmıştır (2, 13). Genel olarak pek çok standart insan yiyeceği ile karalahana karşılaştırıldığı zaman; kalori bakımından fakir, protein, vitamin ve mineraller yönünden zengindir. Karalahananın; insanlar için gerekli olan suda çözünen antioksidanlar olan fenolik bileşikler ve vitamin C ve yağda çözünen vitamin E ve β -karoten bakımından zengin olduğu rapor edilmiştir. Brassica türlerinde toplam aktivitelerinden % 20’sinden fazlasından yağda çözünen antioksidanların sorumlu olduğu belirlenmiştir (71). Karetenoidlerin diyetle alınımı ile çeşitli kanser türleri ve kronik göz hastalıkları riskini düşürür. Karalahananın antioksidan özelliği; yapısında bol miktarda bulunan glukosinolatlarının yıkım ürünleri, vitamin A, vitamin C, vitamin E, selenyum, folik asit, polifenoller; flavonoidler ve karotenler, lif, lutein, zeaksantin gibi bitki fitokimyasallar bakımından zengin olmasından ileri gelmektedir (2, 13, 16, 20, 21). Posedek ve ark. yaptıkları derlemede literatür bilgilerini göz önüne alarak antioksidan kapasite miktar sıralamasının karalahana > brüksel lahanası > brokoli > karnıbahar > beyaz lahanası şeklinde olduğunu rapor etmişlerdir (23). Karalahananın yapısındaki bileşenlerin antioksidan kapasitesinin yanı sıra antibakteriyal, antifungal, antimikrobiyal (2, 13), lipoprotein oksidasyonunu önleyici (72) aktiviteleri rapor edilmiştir.

Sebzeler arasında karalahana; en yüksek miktarda karetenoid, lutein ve zeaksantin içermektedir (13, 15, 73). Ailesi olduğu Brassica türlerinin bileşimi, antioksidan tayinleri,

antikanser etkisi, lipid peroksidasyonu üzerine etkileri incelenmiş olmasına rağmen karalahana hakkında sınırlı sayıda çalışma mevcuttur.

Bu çalışmada yöremiz için önemli olan karalahananın antioksidan düzeylerini belirleyerek, insan endotel hücrelerinde (HUVEC) HDL reseptörü olan SR-B1/CLA-1 proteini ve mRNA ekspresyonu üzerine etkisinin incelenmesi amaçlandı. Bu amaçla yöremizdeki çeşitli il ve ilçelerden (Trabzon, Giresun-Merkez, Rize-Merkez, Samsun Merkez ve Artvin-Hopa) toplanan karalahananın taze ve yeşil yaprakları, serin ve karanlık ortamda kurutuldu. Kurutulduktan sonra, öğütücüde küçük parçalara ayrıldı. Numuneler önce, karıştırıcı, manyetik çubuklu kaynama balonu ve geri soğutucudan oluşan sokhlet sisteminden geçirildi. Ardından, çözücü (su ve etanol) kısmı, çözücülerin buharlaştırılması ve yoğunlaştırılması esasına dayanan, döner vakumlu evaporatörle (rotar evaporatör) uçurularak uzaklaştırılarak sulu ve etanolik ekstraktlar elde edildi ve 0,2 µm'lik Whatman ile filtre edildi.

Sulu ve etanolik ekstraktlarda toplam fenolik madde miktarı, fenolik bileşiklerin folin reaktifi ile alkali ortamda renkli kompleks oluşturması esasına dayanılarak, gallik standartları kullanılarak belirlendi (59). DPPH radikali (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) yakalama kapasitesi Hatano (60) metodu kullanılarak IC50 değerleriyle belirlendi. Antioksidanlarla muamele, DPPH•'tan kaynaklanan mor rengin şiddeti azalarak absorbansın düşüşüne sebep olacaktır. Oyaizu tarafından geliştirilen metoda göre (61) indirgeme kuvveti (FRAP), askorbik asit ve troloks standart olarak kullanılarak tayin edildi. Flavonoid içeriği, flavonoidlerin alimünyum ile yapmış oldukları komplekslerin ölçümü esasına dayanılarak kuarsetin standartları kullanılarak tayin edildi (62). Toplam antioksidan kapasite, Fe⁺²-o-dianisidin çözeltisi ve H₂O₂ çözeltisi Fenton tipi reaksiyon vererek OH• radikalini oluşturması ve oluşan bu radikalın düşük pH'larda renksiz o-dianisidin moleküllerini, dianisidil radikallerini oksitlemesi esasına dayanılarak troloks standartları kullanılarak yapıldı (63). Bu metodun prensibi asidik ortamda farklı oksidan türleriyle Fe⁺² 'nin Fe⁺³ 'e yükseltgenmesi ve Fe⁺³ 'ün ksilenol oranj ile meydana getirdiği renk değişimini esasına dayanılarak H₂O₂ standartları kullanılarak yapıldı.

Çalışmaya dahil edilen tüm iller için toplam fenolik madde içeriği; etanolik ekstraktlarda sulu ekstraktlara göre daha yüksek bulundu. Demir indirgeme / FRAP miktarları askorbik asit ve troloks standardına göre µM askorbik asit / mg ekstrakt ve µM troloks / mg ekstrakt cinsinden hesaplandı. Etanolik ekstraktlar sulu ekstraktlara göre biraz yüksek bulunmasına rağmen aralarında FRAP (Askorbik Asit) değerleri bakımından

Artvin ve Rize iline ait ekstraktlar hariç etanollü ekstraktlarla sulu örnekler arasında anlamlı farklılık olmadığı gözlemlendi ($P > 0,05$). Etanolik ekstraktlar sulu ekstraktlara göre biraz yüksek bulunmasına rağmen aralarında Giresun ve Rize illerindeki hariç flavonoid içeriği bakımından anlamlı farklılık olmadığı gözlemlendi ($P > 0,05$). En düşük DPPH aktivitesine sahip olan ekstrakt en iyi aktiviteye sahipti. Etanollü ekstraktlar arasında Samsun iline ait etanollü ekstrakt, sulu ekstraktlar arasında ise Rize iline ait sulu ekstrakt en yüksek aktiviteye sahipti. Sulu ekstraktlar etanollü ekstraktlara göre daha yüksek aktiviteye sahip olmalarına rağmen aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlemlenmedi ($P > 0,05$). Etanollü ve sulu ekstraktlar arasında Trabzon iline ait etanollü ve sulu ekstraktlar en yüksek TAS içeriğine sahipti. Etanollü ekstraktlar sulu ekstraktlara göre yüksek olsalar da, aralarında TAS içeriği bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlemlenmedi ($P > 0,05$). Ayrıca ortalama etanolik (E) ve sulu (S) seviyeleri göz önüne alındığında etanolik ekstraktların antioksidan seviyeleri sulu ekstraktlara göre daha yüksek olmasına rağmen sadece toplam fenolik madde bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu gözlemlendi ($P < 0,05$). Sulu ekstraktlarda ise; FRAP (tro) ile FRAP (AA) değerleri arasında ($r = 0,814$; $P = 0,049$), FRAP (tro) ile flavonoid değerleri arasında ($r = 0,813$; $P = 0,049$) ve DPPH ile FRAP (tro) değerleri arasında ($r = 0,820$; $P = 0,046$) istatistiksel olarak pozitif yönde bir ilişki gözlemlendi.

Ayaz ve ark. (3) yaptığı bir çalışmada; karalahananın yapraklarında en fazla ferrulik asit ve kafeik olmak üzere dokuz çeşit (gallik, proto-katehuik, p-hidroksibenzoik, vanillik, salisilik, p-kumarik, kafeik, ferrulik ve sinaptik asit), tohumunda ise sinringik asit ile, en fazlası sinaptik asit olmak üzere on çeşit fenolik asit belirlemişlerdir. Yapraklarındaki fenolik bileşimleri; serbest, esterifiye (metanolde çözünen) ve glikosid ve ester bağlı olmalarına göre tiplerine göre 487, 532, 4989 ve 6402 ng/g taze ağırlık olarak, tohumlarında ise 1993, 1477, 1231 and 4909 ng/g kuru ağırlık olarak belirlemişlerdir. Ferrulik asit ve kafeik asit yapraklarda en fazla bulunan fenolik asit iken (4269 ve 4887 ng/g), tohumlarda ise sinaptik asit (5037 ng/g kuru ağırlık) olduğunu rapor etmişlerdir. Yapraklardaki toplam fenolik içeriğini 1366 ng/g kuru ağırlık, tohumlardakini ise 6057 ng/g kuru ağırlık olarak bulmuşlardır. Karalahananın yapısında bulunan toplam fenolik içerikle DPPH yakalama kapasitesi arasında yüksek oranda korelasyon olduğunu öne sürmüşlerdir. DPPH radikali yakalama kapasitelerini: tohumlarda IC50 değerini 3,86-7,70 $\mu\text{g/mL}$ arasında değişkenlik gösterirken, yapraklarında ise 2,14-400 $\mu\text{g/mL}$ olduğunu rapor etmişlerdir.

Sharique ve Beigh (24) kurutulmuş karalahana yapraklarında toplam fenolik madde miktarını 145-284 mg katekol /100g (2,85 µg katekol/mg ekstrakt) olarak bulmuşlardır. Ayrıca FRAP değerini de demir (III) indirgeme kapasitesini 780-840 µmol/g kuru ağırlık olarak rapor etmişlerdir. Karalahananın vitamin C ve vitamin E bakımından zengin olduğunu ve antioksidan aktivitesinin büyük bir kısmından daha çok yapısındaki fenolik asitlerin sorumlu olduğunu öne sürmüşlerdir.

İsmail ve ark. (74) yaptıkları bir çalışmada karalahananında aralarında olduğu beş çeşit sebze seçerek ısının antioksidan aktiviteleri üzerine etkisini incelemişlerdir. Taze karalahana ekstraktlarının etanolik ekstraktları yüksek fenolik içeriğe (3689 ± 66 mg ferulik asit/100 g) ve yüksek toplam antioksidan aktiviteye (50,2 ± %1,3) sahip olmasına rağmen, sadece bir dakika kaynar suda bekletilmesiyle önemli oranda hem fenolik içeriğinde (% 12 oranında 3251±123 mg/100 g), hem de toplam antioksidan aktivitesinde (45,9 ± 1,3%) azalma gözlemlendiğini rapor etmişlerdir. Ayrıca az miktar su ile 6 dakika mikrodalgada tutulması ile karetenoidini % 15 oranında kaybettiği gözlemlenmiştir. Sebzelerin antioksidan kapasitesinin ayrıca; ekstrakte edildiği çözücünün tipine ve polaritesine bağlı olduğunu öne sürmüşlerdir. Daha az polar çözücülerde hazırlanan ekstraktların, metanollü veya etanollü ekstraktlara göre daha aktif antioksidan maddelere sahip olduğunu öne sürmüşlerdir. Beyaz lahanaya; kara lahanaya göre daha az fenolik madde içermesine rağmen daha fazla antioksidan kapasitesine sahip olduğunu belirlediklerinden dolayı; toplam fenolik içerik ile antioksidan kapasite arasında bir ilişki olamayacağını öne sürmüşlerdir. Diğer bazı araştırmalarda ise toplam fenolik madde ile antioksidan kapasite arasında güçlü bir ilişkinin olacağını öne sürmüşlerdir (75).

Sikora ve ark. (76), yaptıkları bir çalışmada turpgiller ailesi üyelerinin vitamin C, karetenoid ve toplam polifenol içeriğini ve ısının bu aktivitelere etkisini incelemişlerdir. Karalahananın biberden sonra en fazla vitamin C içeriğine 48-150 (107±3,1 mg/100 g) sahip olduğunu, karetenoid bakımından ise brassica türleri arasında en zengin içeriğe (2,7 ± 0,20 mg / 100 g) sahip olduğunu, toplam polifenol içeriğinin diğerlerine göre neredeyse iki kat oranda (773 ± 46,88 mg / 100 g kuru ağırlık) olduğunu ve toplam antioksidan kapasitesinin ise diğerlerinden fazla (36,2 ± 1,05 µM trolox/g ekstrakt) olduğunu rapor etmişlerdir.

Zhou ve ark. (77), Koloroda'da yetişen 38 bitki üzerine yaptıkları bir çalışmada; karalahananın 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonik asid) radikal (ABTS^{•+}) yakalama aktivitesinin aralarında patates, ıspanak, domates, kabağında bulunan diğer

sebzeler arasında en yüksek miktarda (58,7 μ mol TE/g), toplam fenolik içeriğe (16,3–18,8 mg GE/g), en fazla karalahananın sahip olduğu olduğunu rapor etmişlerdir. Ortama eklenen DPPH radikalinin 10 dakika sonra kalan miktarını belirleyerek yaptıkları çalışmada da en fazla azalmanın yine karalahanada (% 75–77) olduğunu belirlemişlerdir. Karalahananın süperoksit yakalama kapasitesinin yerel bir kökün arkasından (rhubarb) ikinci sırada olduğunu rapor etmişlerdir. Bütün bu verilerin ışığında yüksek oranda ilişkili olduğunu öne sürmüşlerdir.

Olsen ve ark. (78) yaptıkları çalışmada metanolik karalahana ekstraktlarında toplam fenolik madde miktarını, kuersein ve kaemferol ve flavonol miktarlarını sırasıyla ortalama 384 ± 62 mg gallik asit/100g kuru ağırlık, 58 ± 4 mg/100g kuru ağırlık, 44 ± 8 mg /100g, 646 ± 123 mg/100g olarak rapor etmişlerdir. Holversen (4), karalahananın toplam antioksidan değerinin 2,3 mmol/100 g olduğunu rapor etmiştir.

Küçük ve ark. (79) yaptıkları çalışmada Karadeniz Bölgesinden çeşitli illerden karalahana örneklerini toplayıp, kurutup, karıştırarak; metanolik ve sulu ekstraktlarını hazırlamışlar, sulu ekstraktlarda toplam fenolik içeriğini $28,9 \pm 2,1$ mg/kateşin/g ekstrakt, $34,3 \pm 1,6$ mg gallikasit/g ekstrakt, flavonoid miktarını $6,64 \pm 0,6$ mg/g ekstrakt, toplam antioksidan aktiviteyi de $0,24 \pm 0,02$ mmol/g ekstrakt, metanolik ekstraktlarda ise; toplam fenolik içeriği $53,5 \pm 4,1$ mg kateşin/g ekstrakt, $55,2 \pm 4,7$ mg gallikasit/g ekstrakt, flavonoid miktarını $12,9 \pm 0,9$ mg/g ekstrakt, toplam antioksidan aktiviteyi de $0,15 \pm 0,02$ mmol/g ekstrakt olarak rapor edilmiştir .

Wachtel-Galor ve ark. (80) çiğ ve pişirilmiş sebzelerin antioksidan kapasiteleri arasındaki farklılığı belirlemeye, dolayısıyla pişirmenin aktiviteleri üzerine etkisini incelemişler ve pişirme tipine bağlı olarak antioksidan içeriğinin; en fazla buharda pişmiş □ kaynamış □ mikrodalga şeklinde olduğunu, pişirme zamanı ile ters orantılı azaldığını rapor etmişlerdir.

Bu çalışmada Karadeniz Bölgesindeki beş ilden alınan karalahana numunelerinin her birinin farklı bir antioksidan aktivitesinin yüksek olduğu gözlemlendi (Tablo 17). Antioksidan miktarları, deneysel şartların yanında coğrafik, iklim ve toprak özellikleri, yetiştirme şartları ve besinlerdeki renk koyulaştıkça antioksidanların arttığı fikri göz önüne alınırsa, literatürlerde ve bu çalışmada antioksidan değerleri arasında farklılık olması muhtemel bir sonuçtur.

Trabzon iline ait ekstraktların TFM ve TAS değerleri yüksek bulunduğundan bu ile ait etanolik ve sulu ekstraktlarla çalışılmaya devam edilmesine karar verildi.

Lipoproteinler; suda çözünmeyen başta kolesterol olmak üzere; lipidlerin, çözünür lipid ve protein kompleksi şeklinde kanda taşınmalarını sağlayan makromoleküllerdir. Lipoprotein reseptörleri; ligandlarına (lipoproteinlerini) bağlanarak, tanıyıp biyolojik aktivitelerini yerine getirmelerine aracılık eder (38). HDL'nin; birçok ögesi diğer lipoproteinlerle değiş-tokuş edildiği ve enzim etkinliği sonucu değişikliğe uğradıkları için en heterojen lipoproteindir, değişik lipid ve protein içeriğine sahip alt grupları vardır. HDL'nin yapısında bulunan apolipoproteinler ve paraoksonaz (PON), haptoglobulin, lesitin kolesterol açıl transferaz gibi proteinlerin HDL'nin antiinflamatuvar, antioksidan, antitrombotik, fonksiyonlarında önemli rolleri vardır (45). HDL bağlayıcı protein (HBP), HDL bağlayıcı protein 2 (HB2), kübilin ve SR-B1; HDL reseptörü olarak belirlenmişlerdir (42, 43).

SR-B1 (scavenger receptor-B1) proteini; ilk olarak 1994 yılında Brown, Goldstein tarafından acLDL reseptörü olarak tanımlanmasına rağmen; daha sonra Krieger ve arkadaşları tarafından LDL ve modifiye LDL'ler (okside LDL, asetile LDL) için reseptörü olarak tanımlandı. Daha sonra ise sadece bu ligantlara değil; ayrıca HDL, VLDL olmak üzere diğer birçok ligandı tanıyan multiligant bir reseptör olduğu belirlendi (43). CD-36 ailesi üyesidir. İnsan homoloğu olan CLA-1 (CD-36 ve LIMPII-analog-1) sıçan (hamster) homoloğuyla % 80 homoloji gösterir. SR-B1; en fazla HDL'nin lipid alınımını yaptığı karaciğer ve steroid üreten dokularda ve diyet kolesterol emiliminin yapıldığı ince bağırsağın fırçasmsı membranında olmak üzere kolesterol metabolizmasında rol alan dokularda eksprese edilir. Adrenal bezlerde ve yumurtalıkta en yüksek olmak üzere; karaciğerde, yüksek, testis, meme bezi, bağırsak, böbrekler, beyin, kaslar, plenta, akciğer, uterus, dalak, sinir sistemi, dendirit, endotel, monosit/makrofaj, trombosit, deri, embriyonik dokular ve kalpte az miktarda eksprese olduğuna dair raporlar mevcuttur (6, 50).

HDL'lerin en önemli işlevi; kullanılmayan kolesterolü karaciğere geri taşımaktır (kolesterolün tersine nakli, reverse transportation). Bu işlevi ile aterom plağı gelişmesini engelleyici (antiaterojenik) yönde eylem gösterir. HDL kolesterolünü karaciğer ve steroid hormon üreten organlardaki hücrelerde mevcut SR-B1 reseptörleri aracılığı ile bu organlara verebilir (45).

Plazma membran kaveollerinde SR-B1'in yerleşmesi kolesterol alım ve atımı için önemlidir. SR-B1 ve HDL ile hücreler arasındaki kolesterol akışına aracılık eder. HDL ile hücreler arasındaki kolesterol transferine aracılık ederken, dönüşümlü bir şekilde HDL'ye

bağlanır. HDL'nin yapısındaki kolesterol oranı SR-B1'in aktivitesini etkiler. SR-B1, kolesterolce zengin HDL ile etkileştiğinde seçici kolesterol ester alınımına ve kaveollerde, steroid dokularda steroid hormon sentezi ve kolesterol depolanması için kolesterol alınımına aracılık eder ve depolanmasına sebep olur (Şekil 14, a). Diğer taraftan SR-B1, kolesterolce fakir HDL'ye bağlandığında ise kaveollerdeki fazla serbest kolesterolü HDL içine gönderir (Şekil 14, b) (58).

SR-B1; antiaterojenik aktivitesini çeşitli mekanizmalarla gösterir. HDL ile hücreler arasındaki kolesterol akışına aracılık eder. HDL kolesterolünün karaciğerden alınımını ve safraya atılımına aracılık eder, bu sayede SR-B1 ters kolesterol taşınımını baskılar. HDL bağımlı NO sentetazı aktivite ederek NO aracılıklı antiaterojenik aktiviteye aracılık eder. HDL'den vitamin E alınıp hücrelere aktarılmasına aracılık ederek, vitamin E aracılıklı vasküler korumaya katılır. Vasküler endotel hücrelerde arteriyal oksijen kaynağını etkileyerek eritrositlerin olgunlaşmasını kontrol eder, anemiye önler. Apoptotik hücrelere bağlanarak temizliklerinde görev yapar (57,58).

Karalahananın SR-B1 üzerine etkisini incelemek için bu proteinin en fazla eksprese olduğu hücrelerden endotel hücrelerini seçildi. Bu amaçla; çalışmanın başında, insan umbilikal ven endotel hücrelerini HUVEC (human umbilical cord endothelial cell), doğumlardan alınan göbek bağından elde edilmeye çalışıldı. Hem normal hem de sezeryan doğumlara girilip taze olarak alınan 20-30 santimlik kordlar alınarak çeşitli yöntemler kullanılarak denemeler yapıldı. Normal doğumlarda; kontaminasyon riski (özellikle mantar) fazla olduğundan bir süre sonra sezeryan doğumlarına karar verildi. Yeterli hücre sayısına bir türlü ulaşamadığından, hazır HUVEC hücre serileri kullanılmasına karar verildi. HUVEC, Ankara GATA Tıp Fakültesi Hematoloji Anabilim Dalından temin edildi. Çalışmamız için kullanılacak olan HUVEC hücrelerinin yeterli sayıya ulaşması ve transfer sırasındaki kaybın azalması için GATA'da azot tankında dondurulmuş olan HUVEC hücrelerinin çoğaltılması gerekiyordu. Azot tankından çıkarılan hücreler dondurma sırasında kullanılan yıpratıcı ve öldürücü özellikteki DMSO'nun etkisinin azaltılması için yaklaşık 1-2 mL PBS ile yıkandı. Hücreler 15 mL'lik falkona aktarılıp alan 5 mL' ye tamamlandı. 400 g'de 7 dakika santrifuj edildi. Süpernatant kısmı atılarak 1 mL RPMI ile hücreler çözüldü. Hematositometre ile hücre sayımı yapıldı. İki adet % 2 oranında jelatinle kaplanmış flaska 1×10^6 HUVEC hücreleri L-Glutaminli, % 20 FBS, 200 µg/ mL endotel büyüme faktörü (Endothelial growth medium supplement EGMS), % 1 penisilin + streptomisin içeren RPMI 1640 besiyerinde % 5 CO₂ ortamında 37°C de T-25 flaklarda

inkübatörde çoğaltıldı. Kültürün üçüncü gününden itibaren flaskta yapışan hücrelerin beslenmesine haftada ikişer kez olmak üzere devam edildi. Hücreler kültür kabının tabanının tamamını kapladıktan sonra primer kültür tamamlanarak tripsinizasyon yapıldı. Tripsinizasyondan sonra birinci pasaj kültür işlemlerine geçildi. Birinci pasaj kültür işleminden sonra tripsinizasyonla hücrelerin plastik flasklardan ayrıştırılmasından sonra ikinci pasaj kültür işlemlerine başlandı. İkinci pasaj kültür için T-150 plastik flaska fetal bovine serumla beslenmek üzere 1×10^6 HUVEC kondu ve hücreler yine haftada ikişer kez beslenerek flask tabanını kaplayıncaya kadar çoğalmaları beklendi. Hücreler flask tabanının tamamını kapladıktan sonra ikinci pasaj bir flaskta sonlandırıldı. Bu flaska ağzına kadar RPMI + % 20 FCS ile dolduruldu. Diğer flaskta ise tripsinizasyondan sonra elde edilen hücreler FCS ile seyreltilip $20 \mu\text{L}$ 'si sayım için ayrılıp geri kalanı ekstraktların ekleme aşamasına kadar donduruldu. Bu işlemler yaklaşık bir hafta sürdü. Kyroviallerde saklandı. Dondurulan hücreler kuru buz ile, flasktakiler ise 37°C 'de (vücudumuza bağlanarak) Trabzon'a uçakla transfer edildi. Havaalanındaki kontrol noktalarında bulunan ve hücrelerin ölümüne neden olan X-ray ışınından korunması amacıyla gerekli izinler alındı.

Dondurulmuş hücreler; çalışmalar yapıncaya kadar -80°C 'e kaldırıldı. Flasktaki hücreler ise zaman kaybetmeden $400 \text{ g}'de$ 7 dakika santrifuj edilerek hücreler yeni bir jelatinle kaplı flaska aktarıldı ve beslendi. Üç gün hiçbir şekilde yerinden hareket ettirilmedi, hücreler rahatsız ettirilmedi. Flaskın yaklaşık % 80-90'u hücreyle kaplandıktan sonra tripsinasyon ile hücreler kaldırıldı. İkinci pasajdan sonra tripsinizasyon sonrası falkon tüplere toplanan hücrelerin $20 \mu\text{L}$ 'si $20 \mu\text{L}$ tripan mavisi ile karıştırılarak hematositometre camına aktarıldı. Işık mikroskobu altında canlı ve cansız hücreler sayıldı. Hücreler belli bir sayıya gelinceye kadar bu işlem devam ettirildi. Yaklaşık 20×10^6 hücre elde edildiğinde hücreler değişik konsantrasyondaki karalahana ekstraktlarıyla (40, 20, 10, 5, 2,5, 0 $\mu\text{g}/10^6$ hücre) 24 saat muamele edilerek çalışmada kullanılacak ekstrakt konsantrasyonu belirlenmeye çalışıldı. Canlılık oranı % 50'nin altına düşen ve ekstrakt içermeyen kontrolden az canlılığa sahip olan ekstraktlar elendi. 40-20 $\mu\text{g}/10^6$ hücre'lik konsantrasyonlarındaki sulu ve etanolik ekstraktlar, hücrelerde canlılığı azalttığı ve/ veya ekstrak ilavesi olmayan flasklara yani köre göre daha az hücre oluşumuna neden olduğundan, 10, 5, 2,5 $\mu\text{g}/10^6$ 'lik ekstraktların kullanılmasına karar verildi. Belirlenen konsantrasyonlardaki etanolik ve sulu ekstraktlar; 24 saat boyunca HUVEC hücreleriyle muamele edildikten sonra, yapışan endotel hücreleri tripsinasyonla kaldırıldı. Kontrol

olarak ekstraksız HUVEC hücreleri kullanıldı. TRItidy G reaktifi ile protein ve RNA izolasyonu yapıldı.

TRItidy G reaktifi ile protein ve RNA izolasyonu yapıldı. TRItidy G, Chomczynski ve Sacchi tarafından geliştirilen protokolün kısaltılmış, modifiye formudur metoda göre RNA/DNA/protein ekstraksiyonu için kullanılan bir kimyasal çözüldür (59). İzole edilen proteinler çalışma yapıncaya kadar -20°C 'de, RNA'lar ise -80°C 'de saklandı. Elde edilen protein karalahananın SR-B1/CLA-1 proteini üzerine etkisini incelenmesi için SDS-PAGE ve takibinde western blotlamada, RNA ise SR-B1/CLA-1 mRNA ekspresyonu üzerine etkisinin incelenmesi için RT-PCR'da kullanıldı.

TRItidy G reaktifi ile protein izolasyonu yapıldıktan sonra, SDS-PAGE'de kullanılacak protein miktarının belirlenmesi ve standardize edilmesi için protein tayini Lowry metodu ile yapıldı. SDS-PAGE, proteinlerin sadece moleköl büyüklüklerine bağı olarak ayrılmasını sağlayan bir yöntemdir. Değişik konsantrasyonlarda karalahana ekstraktları ile denemeler yapıldı. Molekül ağırlığı 82-85 kDa olan SR-B1 / CLA-1'e uygun olan % 10'luk SDS-PAGE'de proteinler yürütüldü. Laemli kesikli tampon sistemi uygulandı. Numuneler, numune tamponu ile değişik konsantrasyonlarda (50, 100, 150 μg /150 μL) seyreltilip, kaynatılarak, Western blot renkli belirteci (BIO-RAD Precision Plus Protein WesternC standartları) numune tamponu ile seyreltilerek, kaynatılmadan numuneler ile birlikte insülin enjektörü ile dikkatli bir şekilde uygulandı. Numuneler SDS-PAGE tankında, yığı tamponundan geçinceye kadar 80 voltta (yaklaşık 1,5 saat), numune tamponunda bulunan brom fenol mavisi, tankın altına kadar gelinceye kadar 150 voltta , toplam yaklaşık 6 saat kadar yürütüldü. Western blot renkli markırının yürüyüşü SDS-PAGE işlemi sırasında gözlenebildi. SDS-PAGE'de ayrımın olduğunun teyit etmek için ilk denemelerde jel Commassie Blue G-250 ile boyandı. Western blotlamada bantların görülebilme miktarı 100 μg protein olarak belirlendi. 100 μg / 150 μL ' lik konsantrasyondaki numuneler ve 20 μL western blot belirteci % 10' luk SDS-PAGE Laemli kesiki tampon sisteminde yürütülerek, sürenin sonunda tanktan alınan jel, dikkatli bir şekilde alınarak, boyanmadan direk western blot tamponuna aktarıldı.

Western blot analizi, bir protein karışımı içerisinde bulunan hedeflenen belirli bir proteinin varlığının saptanmasında kullanılmaktadır. SDS-PAGE'de ayrılan proteinler arasında SR-B1/CLA-1 proteinin varlığını belirlemek ve değişik konsantrasyonlardaki karalahana ekstraktlarının köre karşı etkisini değerlendirmek için Western Blotlama tekniği uygulandı. Western blotlama tekniği olarak ilk denemeler ıslak (wet) yöntemi ile oldu. Bu

yöntemde blotlama oldukça uzun (2 saat jelin yıkanması + 18 saat blotlama + antikorlarla bekleme + 1 saat yıkamalar + boyama = yaklaşık 2,5 gün), kullanılan kimyasalların fazlalığı (her bir çalışmada yaklaşık 1 L metanol, asetik asit, çok sayıda miktarda tampon kullanılması gibi), süre artımıyla ısınıp, bir türlü sabitlenemeyen güç kaynakları ve bütün bu uğraşa rağmen, boyama sonrası bir türlü gözlenemeyen bantlar gibi problemlerden dolayı başka bir western blotlama yöntemi kullanılmasına karar verildi. Blotlama sürenin sadece 3,5 saat olması, kimyasalların oldukça az kullanılması ve bantların rahatlıkla gözlenebilmesinden dolayı semi-dry (yarı kuru) western blotlama yöntemi kullanıldı.

Kullanılacak antikorların (hSR-B1/CLA-1, HRP) birbiri için uygun olup olmadığı, seyreltilme oranları, aktarılabilecek membran türü, indikatör olarak kullanılacak boyanın türü için denemeler yapıldı. Çalışmamızda aktarılabilecek membran olarak, nitroselüloz membran mı ve yoksa PVDF (Immobilon P blotting membrane) membranını kullanılabileceği ile ilgili denemeler sonucu, PVDF membranında bantların rahatlıkla gözlenmesinden dolayı PVDF membranı seçildi. Membran kullanılmadan önce sadece 10 saniye metanolle (membranın sertleşmesi için), sonra 10 saniyede tampon ile yıkanarak, (ıslak western blotlamada yarım saat yıkaniyordu) hazırlandı. Whatman kağıtları da sadece ıslatılarak çalışmaya hazırlandı. Whatman kağıtları ve PVDF membranı jel ile aynı boyutta olacak şekilde kesildi. Western blot tamponuna konan jel sadece 10 dakika yıkandı. Western Blot tankına önce ıslatılan whatman kağıtları, sonra hazırlanan PVDF membranı ve jel ardından whatman kağıtları konularak 1 saat boyunca 160 mA'de yürütülerek proteinlerin jelden membrana aktarılması sağlandı. Membranın protein olmayan kısımlarının kapatılması için 2 saat 37°C 'de (yada bir gece 4°C'de) süt tozu içeren inkübasyon tamponunda bekletildi. Bu sırada tanktan alınan jel proteinlerin aktarılıp aktarılmadığının anlaşılması için Commasie blue G250 ile boyanmaya bırakıldı. Boya çıkarma işleminden sonra bantların oluşmadığı gözlemlendiğinde (proteinler aktarıldı) blotlama işlemine devam edildi. İnternette önceden yapılan çalışmalar incelenip, değişik seyreltilme oranlarıyla denemeler yapılarak birincil (1/200, 1/500, 1/1000, 1/2000) ve ikincil (1/1000, 1/2000, 1/5000, 1/10000) antikorlarının birbirleriyle etkileşebilecekleri seyreltilme miktarları belirlenmesine çalışıldı. Denemeler sonucunda, birincil antikor olan rabbit poliklonal SR-B1 antikorunun 1/200; ikincil antikorun (goat anti rabbit horse raddish peroxidase) ise 1/2000 oranlarında seyreltilerek kullanılmasına karar verildi. SR-B1-HRP kompleksine bağlanan indikatör boya olarakta TMB (tetrametil benzidin) kullanılmasına yine değişik bu amaçla kullanılan boyalar (4-kloro naftol, TMB) denenerek karar verildi.

Bantlar elde edildikten sonra, jel görüntüleme sistemi kullanılarak, bantların alan yoğunlukları ölçüldü. Görün bant yoğunluk yüzdesi 100 kabul edilerek diğer ekstraktların bant yoğunluk yüzdeleri hesaplandı. Sonuç olarak karalahana ekstraktı içermeyen kör dahil, bütün ekstraktlarda protein varlığı gözlenirken, 10 µg/mL'lik etanolik ekstraktında alan yoğunluğunda köre göre artış gözlenirken 5 ve 2,5 µg/mL'lik ekstraktı olanlarda azalış gözlemlendi. Sulu ekstraktlarda ise 5 µg/mL'likte artış, diğerlerinde azalış gözlemlendi.

Karalahananın SR-B1/CLA-1 mRNA ekspresyonu etkisini incelemek için RT (revers transcriptase)-PCR yöntemi uygulandı. Qiagen Onestep RT-PCR kiti kullanıldı. RNA'nın TRIitydG ile izole edilen RNA'ların miktarları spektrofotometrik olarak UVette küvet kullanılarak belirlendi. RT-PCR koşullarının belirlenmesi; reaksiyon tüpünde yer alan reaktif ve primerlerin miktarları, kullanılacak RNA miktarının belirlenmesi, PCR basamaklarının (denatürasyon, uzama ve bağlanma) sıcaklık ve zamanlarının ve döngü (cycle) sayısının belirlenmesi için ön denemeler yapıldı. Bantların uygun şekilde görülebildiği şartlarda optimizasyon sağlandı. RNA'nın kararsız yapısı ve elimizde ve çevremizde bol miktarda bulunan RNAaz maddelerin varlığı ve PCR ile çoğaltılabilmesi için cDNA'ya çevrilmesi (RT) gereklidir. Denemeler sonucunda, RT reaksiyon tüpleri ; izole edilen kalıp RNA miktarı 2 µg/reaksiyon, primerlerin son konsantrasyonları 0,6 µM olacak şekilde, 1X Qiagen OneStep RT-PCR tamponu (12,5 mM MgCl₂ içeriyor), her bir dNTP 400 µM olacak şekilde, Qiagen OneStep RT-PCR Emzim Karışımı (taq Polimeraz içeren) ile RNAaz free su ile toplam alan 50 µL olacak şekilde tamamlandı. Reaksiyon karışımını 'thermocycle'a konuldu ve 30 dakika 50 °C'de inkübe edildi. Daha sonra reaksiyon karışımının 95 °C'de 15 dakika bekletilmesi ile revers transkriptaz reaksiyonuna son verildi. Her bir numunedan elde edilen cDNA'lar aynı reaksiyon ortamında RT'de kullanılan primerler kullanılarak PCR ile çoğaltıldı. Denemeler sonucu PCR şartlarının; denatürasyon için, bağlanma 94 °C'de 30 saniye, için 56 °C'de 30 saniye ve uzama için 72 °C'de 90 saniye olacak şekilde 35 döngü (30 döngü beta aktin için), son olarak ta; 72 °C'de 7 dakika 1 döngü olacak şekilde programlandı.

Karalahana ekstraktlarının hSR-B1/ CLA-1 mRNA ekspresyonu üzerine etkisini incelemek için, RNA RT-PCR kitinin çalışıp çalışmadığı ve ekstraktlarda mRNA var olup olmadığının belirlenmesi için kontrol olarak beta aktin primerleri kullanıldı. RT-PCR sonuçlarının değerlendirilmesinde, elde edilen cDNA'lar agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Transilluminatöre konulan jelin fotoğrafı çekildi, görüntülendi. Karalahana ekstraktlarının tümünde beta aktin bandı gözlenerek; kitin çalıştığı ve mRNA varlığı

belirlendi. Karalahana ekstraktlardaki hSR-B1/CLA-1 mRNA ekspresyon tayini için; uygun primerler (hSR-B1/CLA-1 primerleri) kullanılarak RT-PCR yöntemi ile cDNA'lar elde edildi. RT-PCR sonuçlarının değerlendirilmesinde, elde edilen cDNA'lar agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Transilluminatöre konulan jelin fotoğrafı çekildi, görüntüleri Bantların yoğunlukları jel görüntüleme sistemi ile bant yoğunlukları ölçüldü, karalahana ekstraktı içermeyen kör 100 olarak kabul edildi. Karalahana ekstraktlarının bant alan yoğunlukları; köre oranlanarak; köre karşı % oranları belirlendi. Kör dahil bütün karalahana ekstraktlarında SR-B1/CLA-1 mRNA ekspresyonu pozitif gözlemlendi. Karalahana ekstraktlarındaki, hSR-B1/CLA-1 mRNA ekspresyonları bant alan yoğunlukları karşılaştırarak değerlendirildiğinde; karalahananın hem etanolik ekstraktlarında, hemde sulu ekstraktlarındaki, alan yoğunluklarında köre göre belirgin artış gözlemlendi; köre göre belirgin farklılık gözlemlendi Karalahananın etanolik ekstraktlarının alan yoğunluklarında; sulu ekstraktlara göre anlamlı farklılık gözlemlenmedi.

Literatürde karalahananın SR-B1 proteini ve/veya mRNA ekspresyonu üzerine etkisini inceleyen herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu yüzden elde edilen sonuçlar direkt olarak herhangi bir literatürle karşılaştırılmadı. Diğer taraftan karalahananın kolesterol seviyesine etkisi çeşitli araştırmalarla incelenmiştir.

Diyetsel, hormonal, metabolik ve farmakolojik etkenler, Hepatik SR-B1 ekspresyonu etkilemektedir. İn vivo yapılan çeşitli çalışmalarda karaciğerde SR-B1 ekspresyonunun artışı ile plazmada HDL-kolesterol seviyesinin azaldığı, kolesterolün karaciğerden safraya atılımının arttığı ve HDL'deki ester kolesterolün daha fazla temizlendiği belirlenmiş ve dolayısıyla da ateroskleroz riskinin azaldığı rapor edilmiştir. (81,82).

Kim ve arkadaşları (7), otuz iki hiperkolesterolemik hastaya üç ay boyunca 150 ml karalahana suyu içirip, HDL kolesterol ve HDL/ LDL kolesterol oranlarının ölçülüp, % 27 ve % 52 oranında artışı rapor etmişlerdir.

Hamsterlarla yapılan bir çalışmada; bitki kaynaklı çoklu doymamış yağ asitlerinin; hepatik SR-BI ekspresyonunu ve HDL kolesterol ester alınımını stimule etmelerine rağmen, diyetle alınan mistirik asitin ise; karaciğerde SR-B1 seviyesini ve dolayısıyla plazmada HDL seviyesini azalttığı rapor edilmiştir (83, 84). Diğer bir çalışmada SR-BI ekspresyonunun HepG2 insan hepatik hücre serilerinde hücre alfa tokoferol konsantrasyonu ile ters orantı olarak düzenlendiği gözlemlenmiştir (85). Ratlarla yapılan çeşitli çalışmalarda; farmakolojik seviyede östrojen alınımı ile hepatik SR-BI ekspresyonu

baskılandığı gözlenmiştir (86,87). Langer ve ark. (88), testosteronun, monositten makrofaja geçiş yapmış hücrelerde SR-B1'in ekspresyonunu arttırdığını ve böylece hücreden HDL'ye bağımlı kolesterol çıkışını sağladığını ifade etmişlerdir.

Huang ve ark. (89) Afrika asıllı Amerikalıların kullandığı on iki sebze üzerinde yaptıkları bir çalışmada karalahananın, en fazla izorhamnetin ($23,6 \pm 3,4$), kuersetin ($31,8 \pm 5,7$) ve kaemferol ($90,5 \pm 12,5$) olmak üzere flavonoidlerce zengin olduğunu rapor etmişlerdir.

Pin-Der ve ark (9), soğanın yeşil yapraklarında bulunan kuersetin ve kaemferol gibi flavonoidlerin macrophage RAW 264.7 hücrelerinde SR-B1'in mRNA ekspresyonunu arttırarak, ateroskleroza karşı koruma sağladığını öne sürmüşlerdir.

Malerod ve ark. (90) yaptıkları bir çalışmada ; PPAR.'nın PPAR.'ya göre SR-B1'in transkripsiyonunu daha etkili bir şekilde etkilediğini belirterek, PPAR. aktivatörlerinin ters yönde kolesterol taşınımını düzenleyerek, ateroskleroza karşı koruyucu etki gösterebileceğini öne sürmüşlerdir. Çoklu doymamış yağ asitleri PPAR γ 'ı aktive ederek hepatik kolesterol alınımını arttırdığı rapor edilmiştir. PPAR γ rat hepatositlerde, karaciğer endotel hücrelerinde ve kupffer hücrelerinde SR-B1 ekspresyonuna neden olduğu rapor edilmiştir. PPAR α ise sadece, hepatositlerde ve karaciğer endotel hücrelerinde ise SR-B1 ekspresyonunda artışa neden olduğu rapor edilmiştir. Thiazolidinedione (TZD)-aktive edilen PPAR γ /RXR hepatik SR-BI seviyesini arttırarak, hepatik kolesterol alınımını arttırıp, çevre dokularda daha az birikme olmasına neden olduğu rapor etmişlerdir.

Spady ve ark. (91) yaptıkları bir çalışmada ; hamsterlarda, çoklu doymamış yağ asidince zengin diyet, SR-BI ekspresyonunu artırırken plazma HDL kolesterol ester konsantrasyonunu azalttığını ama ters yönde kolesterol taşınımına etki göstermediğini ve bu mekanizmanın aydınlatılmadığını rapor etmişlerdir.

Vogel (92) çoklu doymamış yağ asitlerinin SR-B1 ekspresyonunun arttırıcı etkisinden dolayı ateroskleroz riskini azalttığını vurgulamış. Ayrıca diyetle alınan üç çift bağlı yağ asitlerinin (alfa linolenik asit) alınımı ile karotenoid arter intiması kalınlığı azaldığını bu sayede uzun dönemde kardiyovasküler hastalık riskini azaltacağını rapor etmiştir.

Kahlon ve ark. (9) karalahananın yapısında bol miktarda bulunan fiber ve düşük karbohidrat içeriği ve yüksek safra asidi bağlama kapasitesi nedeni ile dolaşımdaki yağ emilimindeki azalmadan dolayı, kansere neden olan toksik metaboliklerin boşaltıma

gönderilmesi, kolesterolün daha fazla safra asidi sentezi için kullanılmasından, kolesterolü azalttığını, kanseri önlediğini öne sürmüşlerdir.

Velasco ve ark. (93) karalahananın yapısında bulunan glukosinolatlardan türeyen izotiyosiyanatların, kolesterolü azalttığını öne sürmüşlerdir.

Karalahana (*Brassica oleracea L. var. acephala DC.*), doğu Karadeniz bölgesinde çokça yetiştirilen ve tüketilen bir bitki olmasına rağmen Türkiye çapında fazla bilinmemekte ve tüketilmemektedir. Oysa bu çalışma göstermiştir ki karalahana, yüksek antioksidan kapasiteye sahiptir ve, önemli bir lipoprotein reseptörü olan SR-B1/CLA-1 ekspresyonunu arttırıcı yönde etki göstermiştir. Bu da karalahananın lipoprotein metabolizmasının düzenlenmesinde rolü olduğunu ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak; antioksidan özellikleri ve SR-B1 ekspresyonun arttırıcı özellikleri göz önüne alındığında karalahananın kardiyovasküler hastalıkların önlenmesinde önemli bir yer teşkil edebileceği kanaatine varıldı. Ancak lipoprotein reseptörleri ve dolayısıyla metabolizması üzerine etkilerinin hangi bileşeni ile sağlandığının belirlenmesi için ilave çalışmalar gerekmektedir. Kardiyovasküler hastalıkların önlenmesinde önemli yer teşkil edebileceği ortaya konulan bu çalışma ile karalahananın faydalı bir besin olarak daha yaygın kullanılması gerektiği düşünülmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1- Türkiye'nin denize kıyısı olan çeşitli illerinden Trabzon, Artvin (Hopa), Giresun, Samsun ve Rize'den toplanan karalahana örneklerinin etanollu ekstraktları sulu ekstraktlara göre daha yüksek TFM, FRAP, flavonoid ve TAS miktarına sahipti.

2- Trabzon iline ait ekstraktların TFM ve TAS değerleri; diğer illerinkine göre yüksek olduğundan, hücre kültürü çalışmalarında kullanılmasına karar verildi.

3- İnsan endotel hücreleri (HUVEC: Human umbilical ven endothelial cell), değişik konsantrasyonlarda Trabzon iline ait karalahana ekstraktları (40, 20, 10, 5, 2,5 µg / 10⁶ hücre) ile muamele sonucunda 10, 5, 2,5 µg / 10⁶ konsantrasyonların hücre canlılığını % 50'nin altına indirmedeği gözlemlendi.

4- Karalahana ekstraktı ilave edilmemiş olan kontrol dahil bütün karalahana ekstraktlarında HUVEC SR-B1/CLA-1 proteini pozitif gözlenmektedir. 10 µg/mL'lik etanolik ekstraktında alan yoğunluğunda köre göre artış gözlenirken 5 ve 2,5 µg / mL'lik ekstraktlı olanlarda azalış gözlemlendi. Sulu ekstraktlarda ise 5 µg/mL'likte artış, diğerlerinde azalış gözlemlendi. Bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı değildi.

5- HUVEC hSR-B1/CLA-1 mRNA ekspresyonlarında, karalahanın hem etanolik hemde sulu ekstraktlı hücrelerinde ekstrakt ilavesiz hücrelerdekine göre belirgin artış gözlemlendi. Ancak ekstrakt konsantrasyonlarına göre ve sulu veya etanolik olmasına göre çok belirgin farklılıklar gözlenmedi.

6- Elde ettiğimiz sonuçlara karalahanın hangi bileşenlerinin etki ettiğinin belirlenmesi için ilave çalışmalar yapılması gerekmektedir.

8- Karalahananın diğer lipoprotein reseptörleri üzerine etkisi incelenebilir.

9- Karalahananın besinsel kullanımının lipoprotein metabolizması üzerine etkilerinin incelenmesi için insan ve hayvan üzerinde çalışmalar yapılabilir.

7. ÖZET

Karalahananın İnsan HDL Reseptörüne (SR-B1) Etkisi

Karalahana (*Brassica oleraceae L. var. acephala DC*), genellikle Karadeniz bölgesinde tüm sezon yetiştirilebilen bir bitki olup, polifenoller, flavonoidler, izoflavonlar, glikosinolatları gibi bileşenleri ile antioksidan ve antikarsinogenik özelliklere sahiptir. Çöpçü reseptör sınıf B tip 1, SR-B1'in dokularda en önemli görevi, kolesterol alımını ve ters yönde kolesterol taşınımını ile kolesterol akışının düzenlenmesidir. CLA-1, SR-B1' in insanlarda bulunan homologudur. Bu çalışmanın amacı özellikle; karalahana bitkisinin, HDL reseptörü olan SR-B1 üzerine ve dolayısıyla; özellikle kardiyovasküler hastalıklar üzerine rolünü ortaya koymaktır.

Bu çalışmada, karalahana yapraklarının etanolik ve sulu ekstraktların da toplam fenolik madde (TFM), flavonoid, FRAP, DPPH, ve toplam antioksidan kapasitesi belirlendi. Etanolik ekstraktlar; sulu ekstraktlara göre daha yüksek TFM, FRAP, flavonoid, TAS miktarına, sulu ekstraktlar ise etanolik ekstraktlara göre daha fazla DPPH yakalama kapasitesine sahip olduğu gözlemlendi. 10, 5 ve 2,5 µg / mL'lik ekstrakt konsantrasyonu olacak şekilde muamele edilen HUVEC serilerinde SR-B1/CLA-1 protein seviyesinin çok fazla etkilenmediği ancak mRNA ekspresyon seviyelerinin önemli ölçüde arttırdığı gözlemlendi. Sulu veya etanollü ekstrakt kullanılmasının ve konsantrasyon farklılığının sonuç üzerine çok belirgin bir etkisi yoktu.

Sonuç olarak antioksidan aktivitelere sahip olduğu gözlenen karalahananın; SR-B1 ekspresyonu üzerine etkili olduğu ve dolayısıyla lipoprotein metabolizmasını düzenlenleyerek kardiyovasküler hastalıklar önlenmesinde önemli yer teşkil edeceği kanaatine varıldı.

Key Words: Karalahana, Antioksidanlar, SR-B1, CLA-1, HUVEC

8. SUMMARY

The Effects of Kale on Human HDL Receptor SR-B1

Kale (*Brassica oleraceae L. var. acephala DC*) is a vegetable growing usually in Karadeniz Region in Turkey in all seasons. In addition, it has antioxidant and anticarcinogenic properties with its contents of polyphenols, flavonoids, isoflavones and glucosinolates. The prime role of the scavenger receptor class B type I, SR-BI, in tissue is to regulate the cholesterol flux by cholesterol uptake and reverse cholesterol transport. CLA-1 is the homolog of SR-B1 found in human. The aim of the current study was to investigate the role of kale vegetable on high density lipoprotein (HDL) receptor SR-B1 and thereby on cardiovascular diseases.

In the current study, the levels of total phenolic content, flavonoid content, FRAP assay (ferric reducing ability of plasma), DPPH radical scavenging activity and total antioxidant capacity of ethanolic and aqueous extracts of kale were determined. Ethanolic extracts have higher total antioxidant capacity, total phenolic content, FRAP and flavonoid levels than aqueous extracts, but aqueous extracts have higher DPPH radical scavenging activity than ethanolic extracts. Although human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) incubated with 10, 5 ve 2,5 µg/mL of concentrations of ethanolic and aqueous extracts were not any significant effect on SR-B1/CLA-1 protein level, the significant increases in mRNA expression levels were observed. These effects were independent on solvents types and the concentration of extracts.

Consequently, it was concluded that kale which has antioxidant activities affected on SR-B1 and so it has an important place in preventing cardiovascular diseases by regulating lipoprotein metabolism.

Key Words : Kale, antioxidants, SR-B1, CLA-1, HUVEC, Western Blotting

9. KAYNAKLAR

1. <http://www.karalahana.com/makaleler/Ozhan/index.html> Karadeniz Ansiklopedik Sözlük.
2. Ayaz, F.A., Glew, R.H., Millson, M., Huang, H.S., Chuang, L.T., Sanz, C., Ayaz, S.H.: Nutrient contents of kale (*Brassica oleraceae* L. var. *acephala* DC.). *Food Chem*, 2006; 96: 572–79.
3. Ayaz, F.A., Ayaz, S. H., Karaoglu, Ş.A., Gruz, J., Valentová, K., Ulrichová, J., Strnad, M.: Phenolic acid contents of kale (*Brassica oleraceae* L. var. *Acephala* DC.) extracts and their antioxidant and antibacterial activities. *Food Chem*, 2008; 107: 19-25.
4. Kurilich, A.C., Jeffery, E.H., Juvik, J.A., Wallig, M.A., Klein B.P.: Antioxidant Capacity Of Different Broccoli (*Brassica oleracea*) Genotypes Using The Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Assay. *J Agr Food Chem*, 2002; 50: 5053-57.
5. Deric, M., Stokic, E., Vuckovic, B., Damjanov, S.K., Cabarkapa, V.: Lipids and atherosclerosis. *Jugoslav Med Biochem*, 2006; 25: 325–33.
6. Rhoads D, Brissette L, The role of scavenger receptor class B type I (SR-BI) in lipid trafficking Defining the rules for lipid traders. *The Int J Biochem Cell Biol*, 2004; 36: 39–77.
7. Kim, Y., Yoon, S., Kwon, SM., Park, S., Lee-Kim, YC.: Kale Juice Improves Coronary Artery Disease Risk Factors in Hypercholesterolemic Men. *Biomed Environ Sci*, 2008; 21: 91-97.
8. Kahlon, TS., Chapman, MH., Smith, GE.: In vitro binding of bile acids by spinach, kale, brussels sprouts, broccoli, mustard greens, green bell pepper, cabbage and collards . *Food Chem*, 2007; 100: 1531–1536
9. Pin-Der, D., Wen-Chuan, H., ⁽²⁾ ; Bor-Sen, W.: An aqueous extract of Welsh onion green leaves increase ABCA1 and SR-BI expression in macrophage RAW 264.7 cells. *Food Chem* ,2008; 107: 1029-1038
10. Cartea, M.E., Velasco, P.: Glucosinolates in Brassica foods: bioavailability in food and significance for human health. *Phytochemistry Rev*, 2008; 7: 213-29.
11. Balkaya, A., Yanmaz, R.: Promising kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) populations from Black Sea region, Turkey. *New Zealand J Crop and Horti Sci*, 2005; 33: 1-7.

12. Zelano, V., Gulmini, M., Grisello, S., Torazzo, A.: Use of Brassica Oleraceavar. Acephala as a vegetal monitor for metals in the atmosphere. *Toxicol Environ Chem*, 2000; 78: 41- 53.
13. Campo G., Biology of Brassica Coenospecies. 1999; 350-375.
14. Singh, J., Upadhyay, A.K., Prasad, K., Bahadur, A., Rai, M.: Variability of carotenes, vitamin C, E and phenolics in Brassica vegetables. *J Food Compos Anal*, 2007; 20: 106-112.
15. Clure, J.W.M.: Physiology and functions of flavonoids: The flavonoids. *Academic Press, Newyork*, 1975.
16. Lefsrud, M., Kopsell, D., Wenzel, A., Sheehan, J.: Changes in kale (Brassica oleracea L. var. acephala) carotenoid and chlorophyll pigment concentrations during leaf ontogeny. *Sci Hortic-Amsterda*, 2007; 112: 136-141.
17. Bones, A.M., Rossiter, J.T.: The enzymic and chemically induced decomposition of glucosinolates. *Phytochemistry*, 2006; 67: 1053-1067.
18. Kwiatkowska, E., Bawa, S.: The role of glucosinolates in the prevention of cancer mechanisms of actions. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, 2007; 58 : 7-13.
19. Keck, A.S., Finley, J.W.: Cruciferous vegetables: Cancer protective mechanisms of glucosinolate hydrolysis products and selenium. *Integrative Cancer Therapies*, 2004; 3: 5-12.
20. Vig A.P., Rampal, G., Thind T. S., Arora, S.: Bio-protective effects of glucosinolates- A review. *Food Sci Technol*, 2009; 42: 1561-1572.
21. Zhang, J., Satterfield, M.B., Brodbelt, J.S., Britz, S.J., Clevidence, B., Novotny, J.A.: Structural characterization and detection of kale flavonoids by electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem*, 2003; 75: 6401-6407.
22. U.S. Department of Agriculture, 2002. National nutrient database for Standard reference, release. 15. NDB No: 11457. U.S. Dept. Agric., Washington, D.C., USA.
23. Podsedek, A.: Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT*, 2007; 40: 1-11.
24. Sharique, A., Beigh, S.H.: Ascorbic acid, carotenoids, total phenolic content and antioxidant activity of various genotypes of Brassica Oleracea encephala. *Journal of Medical and Biological Sciences*, 2009; 3: 1-8.
25. Phytochemicals; How Stuffworks. Inc:2006
26. Dicko, M.H., Gruppen, H., Traoré, A.S., Voragen, A.G.J., Willem, J., Berkel, H.V.: Phenolic compounds and related enzymes as determinants of sorghum for food use. *Biotechnology and Molecular Biology*, 2006; 1: 1-38.

27. Wolgast, J., Anklam, E.: Polyphenols in theobroma cacao; change in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Res. Int.*; 2000; 33: 423-347.
28. Bülgener, S.K.: Fındık (*Coryllus avellana* L.) ve Kestane (*Castanea sativa* Mill.) Yaprak ve Sürgünlerinde Fenolik Madde İçeriklerinin Mevsimsel Değişimleri; *Turk.J. Agric For*, 1999; 5: 1215-1221.
29. Sakihama, Y., Cohen, M.F., Grace, S.C., Yamasaki, H.: Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: Phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*, 2002; 177: 67-80.
30. Bensath, A., Rusznyak, S., Szent-Györgi, A.: *Vitamin, PnNature*, 1937; 139: 326-327.
31. Clure, J.W.M.: Physiology and functions of flavonoids: The flavonoids. *Academic Press, Newyork*, 1975.
32. Bravo, L.: Polyphenol Chemistry, Dietary Sources, Metabolism And Nutritional Significance. *Nutr. Rev.*, 1998; 56:317-333.
33. Blessington, T.: Master Thesis; The Effects Of Cooking, Storage, And Ionizing Irradiation On Carotenoids, Antioxidant Activity, And Phenolics In Potato (*Solanum Tuberosum* L.); Texas A&M University; 2005
34. Oteiza PI, Etlerman G, Verstraeten SV, Keen CL, Frage CG; Flavonoid Membrane Inretactions: A Protective Role Of Flavonoids At The Membrane Surface; *Clinical Develpemental Immunology*; 2005; 12:19-25.
35. Aviram, M., Fuhrman, B.: Wine Flavonoids Protect Against LDL oxidation And Atherosclerosis; *Ann. N. Y. Acad. Sci.*; 2002; 957:146-161.
36. Sakihama, Y., Cohen, M.F., Grace, S.C., Yamasaki, H.: Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: Phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*, 2002; 177: 67-80.
37. Peprotec; Focus article: Lipoproteins and Apoproteins. 2005.
38. İlhan, F., Gödekmerdan A.: Scavenger Reseptörler ve Fonksiyonları. *T Klin İmmünol Romatol*, 2003; 3: 100-106.
39. Takahashi, S., Sakai, J., Fujino, T., Miyamori, I., Yamamoto, T. T.: The very low density lipoprotein (VLDL) receptor – a peripheral lipoprotein receptor for remnant lipoproteins into fatty acid active tissues. *Mol Cell Biochem*, 2003; 248: 121-127.
40. Brown, M.S., Goldstein, J.L.: A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Sci*, 1986; 232: 34-47.

41. Li, Y., Lu, W., Marzolo M.P., Bu G.: Differential functions of members of the low density lipoprotein receptor family suggested by their distinct endocytosis rates. *J Biol Chem*, 2001; 276: 18000-18006.
42. Fidge, N.H.: High density lipoprotein receptors, binding proteins, and ligands. *J Lipid Res*, 1999; 40: 187-201.
43. Moestrup, Søren K.; Kozyraki, Renata.: Cubilin, a high-density lipoprotein receptor. *Curr Opin in Lipidol*, 2000; 11: 133-140.
44. Berglund, L., Ramakrishnan R.: Lipoprotein(a): An elusive cardiovascular risk factor. *Arterioscl Throm Vas*, 2004; 24: 2219-2226.
45. Cianflone, K., Paglialunga, S., Roy, C.: Intestinally derived lipids: Metabolic regulation and consequences—An overview. *Atherosclerosis Supp*, 9 : 63–68, 2008
46. Pownall, H.J., Ehnholm, C.: HDL remodelenmesi ve metabolizmasında apolipoprotein A-I'in özgül rolü. *Curr Opin Lipidol*, 2006; 17: 209-213.
47. Yokoyama, S.: Release of cellular cholesterol: molecular mechanism for cholesterol homeostasis in cells and in the body. *BBA-Bioenergenetics*, 2000; 1529: 231-244.
48. Kronenberg.: Williams Textbook of Endocrinology, 11th ed. 2008.
49. Acton, S., Rigotti, A., Landschulz, K.T., Xu, S., Hobbs H.H., Krieger, M.: Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Sci*, 1996; 271: 518-520.
50. Landschulz, R.K., Pathak, R.K., Rigotti, A., Krieger, M., Hobbs, H.H.: Regulation of scavenger receptor, class B, type I, a high density lipoprotein receptor, in liver and steroidogenic tissues of the rat. *J Clin Invest*, 1996; 98: 984-995.
51. Ohgami, N., Nogais, R., Miyazaki, A., Ikemoto, M., Arai, H., Horiuchi, S., Nakayama, H.: Scavenger receptor class B type I-mediated reverse cholesterol transport is inhibited by advanced glycation end products. *J Biol Chem*, 2001; 276: 13348-13355.
52. Nieland, T.J.F., Penman, M., Dori, L., Krieger, M., Kirchhausen, T.: Discovery of chemical inhibitors of the selective transfer of lipids mediated by the HDL receptor SR-BI. *Cell Biol*, 2002; 99: 15422-15427.
53. Rigotti, A., Acton, S.L., Krieger, M.: The class B scavenger receptors SR-BI and CD36 are receptors for anionic phospholipids. *J Biol Chem*, 1995; 270: 16221-16224.
54. Krieger, M.: Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems. *J Clinl Invest*, 2001; 108: 793-797.
55. Nilsson, A., Duan, R.D.: Absorption and lipoprotein transport of sphingomyelin. *Journal of Lipid Researchs*, 2006; 47: 154-171.

56. Rhainds, D., Brodeur, M., Lapointe, J., Charpentier, D., Falstraalt, L., Brissette, L.: The Role of Human and Mouse Hepatic Scavenger Receptor Class B Type I (SR-BI) in the Selective Uptake of Low-Density Lipoprotein-Cholesteryl Esters. *Biochemistry*, 2003; 42: 7527-7538.
57. Calabresi, L., Gomaschi, M., Franceschini, G.: Endothelial protection by high-density lipoproteins: From bench to bedside. *Arterioscl Thromb Vas*, 2003; 23:1724-1731.
58. Trigatti, B.L., Krieger, M., Rigotti, A.: Influence of the HDL receptor SR-BI on lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Arterioscl Thromb Vas*, 2003; 23: 1732-1738.
59. Singh, J., Upadhyay, A.K., Bahadur, A., Singh, B., Singh, K.P., Rai, M.: Antioxidant phytochemicals in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. capitata). *Sci Horti Asterdam*, 2006; 108: 233–237.
60. Winston, G.W.: Oxidant and Antioxidants, in Aquatic Animals, Comparative biochemistry and physiology. *Comp Biochem C*, 1991; 100: 173-176.
61. Oyaizu, M.: Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Jap. J Nutr*, 1986; 44: 307-315.
62. Karadeniz, F., Burdurlu, HS., Koca, N., Soyer, Y.: Antioxidant Activity Of Selected Fruits And Vegetables Grown in Turkey. *Turk J Agric For*, 2005; 29: 297-303.
63. Erel, O.: A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem*, 2004; 37: 277– 285.
64. Chomczynski, P., Sacchi, N.: The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on. *Natur Protoc*, 2006; 1: 581 – 585.
65. Waterborg, J.H., Larson, E., Howle M., Matthews, H.R.: The Lowry method for protein quantitation. *Methods Mol Biol*, 1994; 32: 1-4.
66. Scopes, R.K.: Protein purification principles and practice. *Second Ed., New York*, 17-1982; 19: 39-54.
67. Boyer, RF.: Modern Experimental Biochemistry. Second Ed. *The Benjamin /Cummings Publishing Company Inc., Redwood City*, 1990; 42-44, 75-82, 115-145.
68. Cooper TG.: The Tools of Biochemistry. *John Wiley and Sons, New York*, 1997; 194-211, 368-374.
69. Smith BJ.: SDS Polyacrylamid Gel Electrophoresis. In methods in Molecular Biology. *J M Walker (Ed), Human Pres Inc., New Jersey*, 1984; 41-55.

70. Bulut, H., Doymaz, MZ.: Blotlama Teknikleri ve Mikrobiyolojide Kullanım Alanları; Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji , 2001; 132-135.
71. Nilsson, J., Olsson, K., Engqvist, G., Ekvall, J., Olsson, M., Nyman, M.; Variation in the content of glucosinolates, hydroxycinnamic acids, carotenoids, total antioxidant capacity and low-molecular-weight carbohydrates in Brassica vegetables, *J Sci Food Agric*, 2006; 86: 528–538.
72. Podsedek, A., Sosnowska, D., Redzynia, M., Anders, B.: Antioxidant capacity and content of Brassica oleracea dietary antioxidants, *Int J Food Sci and Tech*, 2006; 41: 49–58.
73. Hodges, L.: NF91-51 Kale: The “New” Old Vegetable. *University of Nebraska - Lincoln*, <http://digitalcommons.unl.edu/extensionhist/> 1991; 789.
74. Ismail, A., Marjan, ZM., Foong, CW.: Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. *Food Chem* , 2004; 87: 581–586.
75. Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L. and Oomah, B.D.: Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agr Food Chem*, 1998; 46: 4113–4117.
76. Sikora, E., Leszczynska, E., Filipiak-Florkiewicz, TA., Pisulewski, PM.: The antioxidant activity of selected cruciferous vegetables subjected to aquathermal processing, *Food Chem*, 2008; 107: 55–59.
77. Zhou, K, Yu, L.: Total phenolic contents and antioxidant properties of commonly consumed vegetables grown in Colorado, *Food Sci and Technol*, 2006; 39: 1155-1162.
78. Olsen, H., Aaby, K., Borge, I.: Characterization and Quantification of Flavonoids and Hydroxycinnamic Acids in Curly Kale (*Brassica oleracea* L. Convar. *acephala* Var. *sabellica*) by HPLC-DAD-ESI-MS, *J. Agric. Food Chem*, 2009; 57 (7): 2816- 2825.
79. Küçük , N.: Karalahananın lipoproteinlerin oksidasyonuna etkisi, K.T.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Trabzon, 2007.
80. Wachtel-Galor, S, Wong, K., Benzie, IFF.: The effect of cooking on Brassica vegetables. *Food Chem*, 2008; 110: 706–710.
81. Rigotti, A., Miettinen, H., Krieger, M.: The role of the high density lipoprotein receptor SR-BI in the lipid metabolism of endocrine and other tissues. *Endocr Rev*, 2003; 24: 357-387.
82. Covey, SD., Krieger, M., Wang, W., Penman, M., Trigatti BL.: Scavenger receptor class B type I-mediated protection against atherosclerosis in LDL receptor-negative mice involves its expression in bone marrow derived cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003; 23: 1589–1594

83. Spady, DK., Keamey, DM., Hobbs, HH.: Polyunsaturated fatty acids up-regulate hepatic scavenger receptor B1 (SR-BI) expression and HDL cholesteryl ester uptake in the hamster. *J Lipid Res*, 1999; 40: 1384–1394.
84. Loison, C., Mendy, F., Serougne, C., Lutton, C.: Dietary myristic acid modifies the HDL-cholesterol concentration and liver scavenger receptor BI expression in the hamster. *Br J Nutr*, 2002; 87: 199–210.
85. Witt, W., Kolley, I., Fechner, H., Sinha, P., Rustow, B.: Regulation by vitamin E of the scavenger receptor BI in rat liver and HepG2 cells. *J Lipid Res*, 2000; 41: 2009–2016.
86. Fluiter, K., Van der Westhuijzen, DR., Van Berkel, TJ.: In vivo regulation of scavenger receptor BI and the selective uptake of high density lipoprotein cholesteryl esters in rat liver parenchymal and Kupffer cells. *J Biol Chem*, 1998; 273: 8434–8438.
87. Stangl, H., Graf, GA., Yu, L., Cao, G., Wyne, K.: Effect of estrogen on scavenger receptor BI expression in the rat. *J Endocrinol*, 2002; 175: 663–666.
88. Langer, C., Gansz, B., Goepfert, C., Engel, T., Uehara, Y., Von Dehn, G., Jansen, H., Assmann, G., Von Eckardstein, A.: Testosterone up-regulates scavenger receptor BI and stimulates cholesterol efflux from macrophages. *Biochem Bioph Res Co*, 2002; 296: 1051–1057.
89. Huang, Z., Wang, B., Eaves, D., Shikany, J., Pace, R.: Phenolic compound profile of selected vegetables frequently consumed by African Americans in the southeast United States. *Food Chem*, 2007; 103: 1395–1402.
90. Malerod, L., Sporstol, M., Juvet, LK., Mousavi, A., Gjoen, T., Berg, T.: Hepatic scavenger receptor class B, type I is stimulated by peroxisome proliferator-activated receptor γ and hepatocyte nuclear factor 4 α . *Biochem Bioph Res Co*, 2003; 305: 557–565.
91. Spady, DK., Kearney, DM., Hobbs, H.: Polyunsaturated fatty acids up-regulate hepatic scavenger receptor B1 (SR-BI) expression and HDL cholesteryl ester uptake in the hamster. *J. Lipid Res*, 1999; 40: 1384–1394.
92. Vogel, R.: Eating, vascular biology, and atherosclerosis: a lot to chew on. *Eur Heart J*, 2006; 27: 13–14.
93. Velasco, P., Carrea, ME., González, C., Vilar, M., Ordás A.: Factors Affecting the Glucosinolate Content of Kale (*Brassica oleracea acephala* Group). *J. Agric. Food Chem.*, 2007; 55: (3): 955–962.

ÖZGEÇMİŞ

Sevil CENGİZ, 02.11.1974 Ankara'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Samsun Kocatepe İlkokulu, Atatürk Ortaokulu, Namık Kemal Lisesinde tamamladı. Yüksek öğrenimi için 1991-1997 yılları arasında Orta Doğu Teknik Üniversitesi Eğitim Fakültesi Kimya Öğretmenliği Bölümü'nü okudu. Çeşitli okul ve dersanelerde öğretmenlik yaptıktan sonra 2000 yılında K.T.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı ve 2003 yılında mezun oldu. Aynı yıl K.T.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda doktora öğrencisi olarak halen sürmekte olan çalışmalarına başladı. Evli ve bir çocuk annesidir.