

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

FINDIK TÜKETİMİNİN HİPERKOLESTEROLEMİK
ŞAHISLARIN ERİTROSİT MEMBRANI LİPİD VE PROTEİN
OKSİDASYONUNA ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
GÖKÇE OKUR

TEMMUZ-2008
TRABZON

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

FINDIK TÜKETİMİNİN HİPERKOLESTEROLEMİK
ŞAHISLARIN ERİTROSİT MEMBRANI LİPİD VE PROTEİN
OKSİDASYONUNA ETKİSİ

GÖKÇE OKUR

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 09.07.2008

Tezin Sözlü Savunma Sınavı : 23.07.2008

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Birgül KURAL

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Orhan DEĞER

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Cihan ÖREM

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Orhan DEĞER

TEMMUZ-2008

TRABZON

İÇİNDEKİLER

TABLOLAR DİZİNİ	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iv
ÖNSÖZ	v
KISALTMALAR	vi
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	
2.1. Eritrositler	3
2.1.1. Eritrosit Membranı	3
2.1.1.1. Eritrosit Membran Lipidleri	4
2.1.1.2. Eritrosit Membran Proteinleri	4
2.2. Oksidan Antioksidan Sistem	6
2.2.1. Serbest Radikaller ve Oksidan Sistemler	6
2.2.1.1. Protein Oksidasyonu	7
2.2.1.1.1. Tiyol Gruplarının Oksidasyonu	9
2.2.1.1.2. İleri Oksidasyon Ürünlerinin Oluşumu	11
2.2.1.2. Lipid Peroksidasyonu	11
2.2.2. Antioksidan Sistemler	13
2.3. Sert Kabuklu Meyveler ve Fındık	14

2.4. Hiperlipidemi ve Fındık	18
3. MATERYAL ve METOD	
3.1. Materyal	19
3.1.1. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler	19
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	20
3.2. Metod	21
3.2.1. Deneyin Planlanması ve Numunelerin Toplanması	21
3.2.2. Biyokimyasal Analizler	21
3.2.3. Osmotik Frajilite	22
3.2.4. Eritrosit Membranı (GHOST)'nın Eldesi	23
3.2.5. GHOST'un Diyalizi	23
3.2.6. GHOST'ta Protein tayini	24
3.2.7. GHOST'ta MDA Tayini	26
3.2.8. Eritrosit Membran Proteinini Tiyoil Seviyesinin Belirlenmesi	28
3.2.9. İleri Oksidasyon Protein Ürünü	29
3.2.10. Toplam Oksidan Kapasite	30
3.2.11. Toplam Antioksidan Kapasite	32
3.3. İstatiksel Analizler	34
4. BULGULAR	35
4.1. Demografik Bulgular	
4.2. Rutin Biyokimyasal Parametre Sonuçları	35
4.3. Eritrosit Membran Oksidan-Antioksidan Sistem Parametre Bulguları	37
4.4. Eritrosit Osmotik Frajilite Bulguları	40
5. TARTIŞMA	41
6. Sonuç ve Öneriler	47
7. Özet	48
8. Summary	49
9. Kaynaklar	50
Özgeçmiş	vii

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1: Serbest Radikallerin Hücredeki Başlıca Zararlı Etkileri	7
Tablo 2: Biyolojik Sistemlerdeki Antioksidan Savunma Sistemleri	14
Tablo 3: Bazı Sert Kabuklu Meyvelerin 100 Gramında Bulunan Yağ Asidi, E Vitamini, Arjinin ve Metiyonin Miktarları	15
Tablo 4: Fındığın 100 Gramında Bulunan Yağ Asitleri ve Miktarları	16
Tablo 5: NCEP ATP III Kolesterol ve Trigliserid Sınıflaması	18
Tablo 6: Çalışma Grubuna Ait Demografik	35
Tablo 7: Çalışma Grubunun Dört Döneme Ait Rutin Biyokimya Parametreleri	36
Tablo 8: Hiperkolesterolemik Şahısların Dört Döneme Ait Rutin Biyokimya Parametrelerinin Fındık Diyeti Öncesi ve Sonrası Farkları ve YüzdeDeğişimleri	36
Tablo 9: Hiperkolesterolemik Bireylerin Eritrosit Mebranı Oksidan-Antioksidan Sistem Değerleri	38
Tablo 10: Hiperkolesterolemik Bireylerin Eritrosit Membranı Oksidan-Antioksidan Denge Değerlerinin Fındık Öncesi ve Sonrası Farkları ve Yüzde Değişimleri	38
Tablo 11: Hiperkolesterolemik Bireylerin Dört Dönemdeki Eritrosit Membran MDA ve TOS Arasındaki İlişkiler	39

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Eritrosit Membran Proteinleri	5
Şekil 2: Protein Karbonil Oluşumuna Yol Açan Primer Modifikasyon Reaksiyonları	8
Şekil 3: Glikasyon, Glioksidasyon ve Poliansature Yağ Asitlerinin (PUFA) peroksidasyon Ürünleri İle Proteinlerin Reaksiyonu Sonucu, Protein Karbonil Gruplarının Oluşumu	10
Şekil 4: Lipid Peroksidasyon Mekanizması	12
Şekil 5: Serbest Radikallerin Oluşumu ve Enzimatik Detoksifikasyonu	13
Şekil 6: Protein Standart Grafiği	26
Şekil 7: Tiyol Grubu Standart Grafiği	29
Şekil 8: Toplam Oksidan Kapasite İçin Standart Grafiği	32
Şekil 9: Toplam Antioksidan Kapasite İçin Standart Grafiği	33
Şekil 10: 30.gün ve 60.gün (FÖ), 60.gün ve 90.gün (FS) MDA ve TOS yüzde değişimleri arasındaki ilişkiler	39
Şekil 11: Dört Farklı Zaman Dilimine Ait Osmotik Frajlite Değerlerinin Karşılaştırmalı Grafiği	40

ÖNSÖZ

Bu çalışmada;

Bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım tez danışmanım Sayın Doç.Dr. Birgül KURAL başta olmak üzere, diğer Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri Sayın Prof.Dr. Asım ÖREM'e, Sayın Prof.Dr. Orhan DEĞER'e, Sayın Prof.Dr. Edip KEHA'ya, Sayın Prof.Dr. Ekin ÖNDER'e, Sayın Doç.Dr. S. Caner KARAHAN'a, Sayın Doç.Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU'na ve Yrd.Doç.Dr. Ahmet ALVER'e,

Hasta grubunun oluşturulmasında ve diğer klinik değerlendirmelerde büyük katkıları olan Kardiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Doç.Dr. Cihan ÖREM'e,

Manevi desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Görevlilerine ve tüm çalışanlarına,

Klinik Biyokimya Rutin laboratuvarı personellerine,

Beni bu günlere getiren ve bütün eğitim dönemlerim süresince manevi desteğini benden esirgemeyen sevgili babama, anneme, abime ve kız kardeşime sonsuz teşekkür ederim.

Gökçe OKUR

KISALTMALAR

ApoA-I	: Apolipoprotein A
ApoB	: Apolipoprotein B
AOPP	: İleri Okside Protein Ürünü
HDL	: Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
LDL	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
MDA	: Malondialdehit
MUFA	: Monoansature Yağ Asitleri
PUFA	: Poliansature Yağ Asitleri
SFAs	: Doymuş Yağ Asidi İçeriği
T.SH	: Total Tiyol Grubu
TOS	: Total Oksidan Statü
TAS	: Total Antioksidan Statü

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Fındık, yağ asidi bileşimi (özellikle tekli doymamış yağ asitleri), vitaminleri özellikle vitamin E, esansiyel amino asitleri, antioksidan fenolikleri, fitokimyasalları ve diyet lifleri sayesinde sağlıklı besin olarak önemli bir yere sahiptir (1, 2). Bu özellikleri ile günlük diyetle fındığın alınması, aterosklerotik kardiyovasküler hastalıklardan korunmada ve tedavisinde yararlı olduğu bazı çalışmalarda rapor edilmiştir(3, 4, 5, 6). Fındıktan zenginleştirilmiş beslenmenin insanda, kan basıncı değerlerinde düşme, serum total kolesterol, LDL kolesterol ve trigliserid değerlerinde azalma gibi olumlu etkilerinin olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından gösterilmiştir (7, 8, 9). Bileşiminde yer alan poliansature yağ asitlerinin, serbest radikal oksidasyonuna yatkın olması nedeniyle aşırı fındık tüketilmesinde kaçınılması gerekmektedir (10, 11) . Oksidan stres altında serbest radikal reaksiyonları ile lipidler, proteinler, DNA ve karbohidratlar değişime uğramakta ve toksik etkilerini göstermektedirler.

Eritrosit membranı protein, lipid ve karbohidratlardan oluşur. Özellikle fosfolipid ve serbest kolesterolden oluşan lipidler membranın yaklaşık % 50'sini oluşturur. Eritrositler, membranlarında yüksek çoklu doymamış yağ asitleri bulundurduğundan ve hemoglobin vasıtasıyla oksijen taşımaktan dolayı, reaktif radikallerin primer hedefleridirler. Oksijen kaynaklı veya diğer radikallerin neden olabileceği lipid peroksidasyonu ve proteinlerin oksidatif modifikasyonu sonucu membran fonksiyonları bozular. Ayrıca hemoglobin de oksidasyona uğrar. Ancak normal eritrositler yüksek antioksidan kapasitesinden dolayı oksidasyona dirençlidirler. Revuelta ve ark (12), oksidan ajana maruz bırakıldığında, kolesterolle modifiye olmuş eritrositlerin, kolesterolü uzaklaştırılmış eritrositlere göre daha fazla peroksidasyona maruz kaldığını gözlemişlerdir.

Fındığın yapısındaki E vitamini, doymamış yağ asitlerinin % 80'ninin tekli doymamış yağ asidi olması ve insan lipid ve lipoprotein metabolizması üzerine olan hipolipidemik etkisine ait bilgilere dayanılarak; her gün düzenli fındık tüketiminin lipid peroksidasyonu sonucu oluşacak, MDA ve protein oksidasyonu sonucu oluşacak, karbonil grubu, tiyol grubu ve ileri oksidasyon radikal ürünlerin tespiti ile membran deformasyonu üzerine fındığın koruyucu etkisini incelemeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Eritrositler

Eritrositler yapısında bulunan hemoglobine O₂ bağlayarak oksijenin taşınmasında rol alan kırmızı renkli hücrelerdir. İnsan eritrositleri çekirdeksiz ve bikonkav disk şeklindedir. Çapları 6-9 µ kalınlıkları merkezde 1 µ ve kenarlarda 2-2.5 µ kadardır. Erişkinlerin kemik iliğinde yapılan eritrositlerin % 34 kadarı hemoglobindir. Ve nükleus,mitokondri,ribozom, lizozom, endoplazmik retikulum ve golgi aygıtı gibi organeller bulunmadığından protein ve nükleik asit sentezi yapılamaz, lipid metabolizması son derece kısıtlıdır. Eritrositlerde karbonik anhidraz, katalaz, peptidaz, kolin esteraz, anaerobik glikoliz yolu ve pentoz fosfat yolu enzimleri bulunur. ADP, ATP ve NADP⁺ eritrositlerin önemli yapı taşlarıdır (13, 14). İnorganik fosfat ve 2,3-difosfogliserat da eritrositlerdeki önemli fosfor bileşikleridir. Eritrositlerdeki osmotik basınç, plazmadaki gibi % 0.9 luk NaCl çözeltisinin osmotik basıncına eşittir ve bu durum izotonik olarak ifade edilir. Eritrositlerde K⁺, Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ kationları ile Cl⁻ ve HCO₃⁻ anyonları bulunur; en önemli kation, K⁺'dur. Hemoglobinin yapısındaki Fe²⁺ şeklinin korunması, düşük Na⁺ ve yüksek K⁺ düzeyinin sürdürülmesi, hemoglobin ve diğer proteinlerdeki tiyol gruplarının oksidasyonunun önlenmesi eritrosit membran ve iskeletinin korunması için enerji gerekmektedir. Yaşamlarını korumak ve sürdürebilmek için gerekli enerjiyi glukozdan sağlarlar. Glukozun anaerobik glikoliz ve pentoz fosfat yolunda yıkılımı, eritrositlerin enerji gereksinimini karşılar.

2.1.1. Eritrosit Membranı

Eritrosit membranının % 49'u protein, % 44'ü lipid ,% 7'si karbohidrattan oluşur. Eritrosit membranında iki tür protein bulunmaktadır. İntegral proteinler adı verilen proteinler, lipid tabakalarına sıkıca bağlanmışlardır; ekstrinsik proteinler adı verilen

proteinler ise integral proteinlere kovalent olmayan bağlar ile bağlanan periferik proteinlerdir. İnsan eritrosit membran lipidlerinin % 25'ini kolesterol, % 60'ını fosfoglisericid, % 5-10'unu glikolipid, geri kalanını kolesterol esterleri, serbest yağ asitleri, sülfatidler, triaçilgliseroller oluşturur. Eritrosit membranında hücre içi ile hücre dışı arasında iyon dengesini sağlayan pompa sistemleri bulunur; bu pompa sistemleri, Na^+/K^+ ATPaz ve Ca^{2+} ATPaz gibi enzimlerin etkisiyle çalışırlar (15).

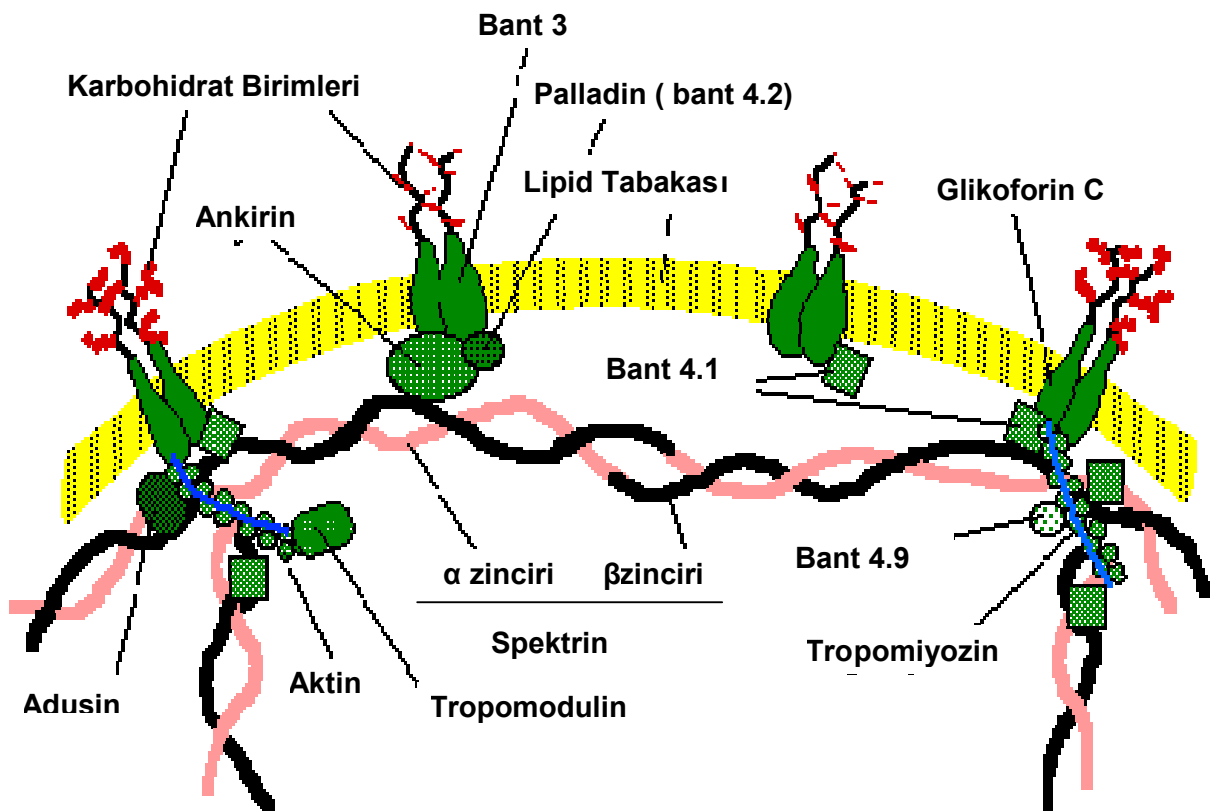
2.1.1.1. Eritrosit Membran Lipidleri

Biyolojik membranların en önemli lipid bileşenleri fosfolipidler (fosfoglisericidler ve sifingomiyelin), glikolipidler ve kolesteroldür. Eritrosit membranının % 25'i kolesterol, % 15'i glikolipid, % 60'ı fosfolipid ve bu % 60'ında % 30'u fosfotidilkolin, % 14'ü fosfotidilserin, % 28'i fosfotidiletanolamin, % 25'i sifingomiyelindir. Eritrosit membranını tekli, çoklu ve doymamış yağ asidi içeriğine sahiptir. Tekli doymamış yağ asidi (MUFA) içeriğinin (% 20) büyük kısmını oleik asit (18: 1) (% 19), çoklu doymamış yağ asidi (PUFA) içeriğinin (% 37) büyük bir kısmını linoleik asit (18:2) (% 14) ve araşidonik asit (20:4) (% 11), doymuş yağ asidi (SFAs) içeriğinde (% 43) büyük bir kısmını palmitik asit (16:0) (% 30) ve stearik asit (18:0) (% 11) oluşturmaktadır. Kolesterol lipid çift tabakaya kovalent bağlarla tutunmadığı için, plazma membranından içeriye ve dışarıya serbestçe hareket edebilirler (16). Bu özelliği nedeniyle kolesterol plazma lipoproteinlerine ya da lipoproteinlerden membrana aktarılabilmektedir. Kolesterol membran akışkanlığını düzenler; artırabilir ya da azaltabilir.

2.1.1.2. Eritrosit Membran Proteinleri

Eritrosit membran proteinleri integral ve periferik proteinleri olarak iki başlıkta incelenilir. Eritrosit membran proteinlerinden bant 3 ve glikoforin, integral proteinlerdir; spektrin, bant 4, aktin, ankirin ise periferik veya ekstrinsik proteinlerdir. Spektrin, α ve β spektrin adı verilen 2 ayrı polipeptid zincirinden oluşan periferik bir proteindir. Bu α ve β rezidülerinin amino ($-\text{NH}_2$) ve karboksil ($-\text{COOH}$) uçları birbirine göre antiparaleldir. Membran iskeletinin ana proteindir. İskelet kompleksinin lipid ikili tabakayla bağdaşması, spektrin ile glikoforin A veya C arasındaki bağla gerçekleşir. Spektrin molekülleri, protein 4.1, protein 4.9, adüsin ve tropomiyozin gibi kompleks aktin filamentleriyle etkileşerek iki

boyutlu bir ağ halinde bağlanmıştır. Aktin, spektrin ve protein 4.1 ile etkileşerek stabilize edilirler. Ankirin, spektrin β zinciriyle, anyon kanalının sitoplazmik kısmında N-terminal ucu arasında yer alan piramid şeklinde bir protein olup protein 4.2'yi bağlayan bir bölgeye de sahiptir. Bir veya daha fazla sayıda yağ asidinde bağlanabilir. Bant 4.1, spektrin-aktin ağ örgüsünü değişime karşı korur ve eksikliği değişken iskelet yapısının bir araya toplanmasına sebep olur. Protein 4.1, bir veya birkaç transmembran proteinide bağlayabilir. Membran ağırlığının % 1,5'ini teşkil eden ve % 60'ı karbohidrat oluşturan glikoforinin sitozole bakan yüzeyini spektrin-aktin kompleksine bağlar. Glikoforin A ve glikoforin C'nin sitoplazmik kısımlarıyla etkileşim halindedir. Glikoforin A ile etkileşimi, polifosfoinositidlerle düzenlenmektedir. Fosfotidil inositol 4,5 bisfosfat bu integral proteine takıldığında, protein 4.1 glikoforine bağlanır.



Şekil 1: Eritrosit membran Proteinleri (17)

Bant 3, en belirgin anyon değiştircilerden biridir. Klorür-bikarbonat anyon değişiminde görev alır. Kırmızı hücre membranı, CO_2 'in kanla taşınmasında ve hücre pH sının tamponlanmasında anahtar rol oynayan bir anyon kanalı olan bant 3'ü ihtiva

etmektedir. Bant 3'ün C-terminal sitoplazmik kuyruğuda karbonik anhidraz II (CAII)'yi bağlar. Bant 3 yapısına bağladığı enzimleri inhibe eder. Toplam membran proteinlerinin % 5'ini teşkil eden bant 4.2 bant 3'ün sitoplazmik bölgesiyle etkileşerek bant 3'ün anyon transportunun düzenlenmesinde rol oynar. (18).

Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (Bant 6), oksidasyondan sorumlu glikolitik bir enzimdir. Her biri birbirinin aynı olan ve yapısında bir tane SH grubu ihtiva eden dört polipeptid rezidüsüne sahiptir. Bu enzimin aktif bölgesinde bulunan tek bir SH grubu oksidasyona uğrar. Söz konusu substrat, başlangıçtaki dehidrogenaz üzerindeki bir sisteinil kısmı ile birleşerek tiyohemiasetal teşkil eder. Bu oksidasyonla ortadan kaldırılan hidrojenler, NADH teşkil etmek üzere, NAD^{+} 'e transfer olurlar. En son olarak fosforilaz yoluyla inorganik fosfat eklenir. 1,3 bisfosfo-gliserat teşekkül eder ve yinede SH gruplu serbest enzim açığa çıkar. Bu oksidasyon sırasında salıverilen enerji, bir yüksek enerjili kükürt bağı oluşturularak alıkonulur. Bu bağ fosforiliz'den sonra 1,3 bisfosfo-gliseratın 1 nolu pozisyonunda bir yüksek enerjili fosfat bağı haline gelir.

2.2. Oksidan Antioksidan Sistem

2.2.1. Serbest Radikaller ve Oksidan Sistemler

Okside ajanların başında serbest radikal gelir. Bunlar üzerinde eşlenmemiş elektron taşıyan atom veya moleküllerdir. Çok kısa ömürlü olmalarına karşın, radikal olmayan maddeler ile reaksiyona girip onları da radikal yaparak bir dizi zincir reaksiyonu başlatır. Birçok radikal oluşturmalarından dolayı oldukça tehlikelidirler. Bu tanıma en fazla reaktif oksijen türleri uymaktadır. Süperoksit (O_2^-) ve hidroksi radikali ($\cdot OH$) en kuvvetli serbest radikaller olarak bilinirler. Serbest radikaller yalnızca lipidleri okside etmekle kalmayıp aynı zamanda proteinler, karbohidratlar ve DNA üzerinde de hasara yol açarlar. Proteinlerin peptid bağlarının hidrolizi, disülfid bağı oluşumu ve çapraz bağlanma ile üç boyutlu yapısını ve dolayısı ile fonksiyonlarını değiştirirler. DNA üzerindeki hasarı ise mutasyon oluşturmak sureti ile gerçekleştirir.

Eritrositlerdeki intrasellüler reaktif oksijen türlerinin büyük kaynağı oksihemoglobinin otooksidasyonudur.

Serbest radikaller vücutta antioksidan savunma mekanizmasının kapasitesini aştıkları zaman çeşitli bozukluklara yol açarlar. Karbohidrat, lipid, protein ve DNA gibi

biyomoleküllerin tüm sınıfları ve tüm hücre komponentleri ile etkileşme özelliği göstererek hücrede yapısal ve metabolik değişikliklere neden olurlar (19-23) (Tablo 1)

Tablo 1: Serbest radikallerin hücredeki başlıca zararlı etkileri (22).

Doymamış yağlar	Kolesterol ve yağ asitlerinde oksidasyon Lipidlerde çapraz bağlanmalar Organel ve hücrelerde çapraz bağlanmalar
Karbohidratlar	Polisakkaritlerin depolimerizasyonu
Nükleik asit bazları	Hidroksilasyonlar Mutasyonlar, kimyasal modifikasyonlar Şekerlerde benzer reaksiyonlar
Kükürtlü amino asitler	Protein denatürasyonu ve çaprazlanma Enzimlerde inhibisyon
Proteinler	Petid zincirlerinde kopma Denatürasyon
Nükleik asitler	Tek ve çift iplikçik kırılmaları Proteinlerde çapraz bağlar Baz içermeyen bölgeler
Hyaluronik asit	Sinovyal sıvı akışkanlığında değişme
Doymamış yağlar	Kolesterol ve yağ asitlerinde oksidasyon Lipidlerde çapraz bağlanmalar Organel ve hücrelerde çapraz bağlanmalar

Serbest radikallerin vücutta çok geniş bir etki alanı vardır. Akciğer ve solunum sistemi (kistik fibroz), kalp ve kardiyovasküler sistem (aterosikleroz), barsaklar (Croh'n hastalığı), karaciğer (hepatit, sentez bozuklukları), pankreas (diabet), testisler (infertilite), genel vücut sistemleri (immün yetmezlik) serbest radikallerin rol aldığı patolojik olaylardır.

Serbest radikallerin koroner arter hastalığındaki başlıca etkileri lipid peroksidasyonudur. Özellikle çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) reaktif oksijen türlerinin başlıca hedefidir (24, 25).

2.2.1.1. Protein Oksidasyonu

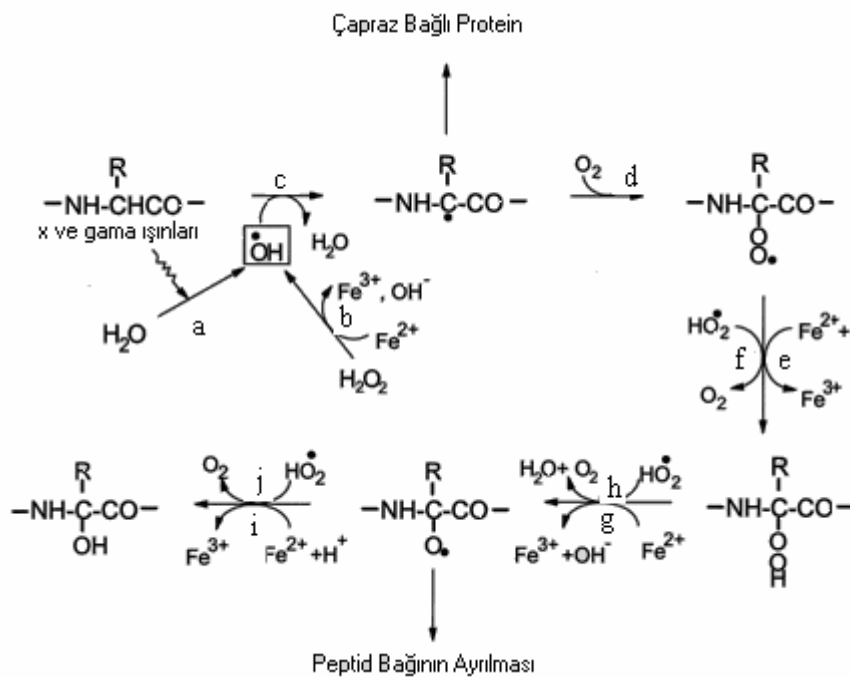
Proteinler serbest radikallere karşı lipidlerden daha az hassastır. Etkilenme dereceleri içerdikleri aminoasit bileşimine bağlıdır. Doymamış bağ ve sülfür içeren amino asitlerden (triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metiyonin, sistein gibi) meydana gelmiş proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenir.

Protein oksidasyonu, proteinlerin reaktif oksijen türevleri veya oksidatif stres ürünleri ile kovalent modifikasyonu sonucu meydana gelir. Protein oksidasyonunun biyokimyasal sonuçları enzim aktivitesindeki azalma, protein fonksiyonlarının kaybı, proteaz inhibitör aktivitenin kaybı, protein agregasyonu, proteolize artmış/azalmış yatkınlık, reseptör aracılıklı endositozun bozulması, gen transkripsiyonundaki değişimler, immünojen aktivitedeki artış olarak sıralanabilir.

Protein oksidasyonu reaksiyonları ilk defa Swallow (26), Garrison (27) ile Shuessler ve Schilling (28) adlı araştırmacıların çalışmalarıyla aydınlatılmaya başlanmıştır. Bu araştırmacılar protein oksidasyonuna yol açan ana mekanizmanın polipeptid omurgasındaki çeşitli amino asitlerin α -karbon atomlarından OH^\bullet (hidroksil) radikalinin etkisiyle hidrojen atomunun çıkarılması sonucunda başladığını saptamışlardır.

Proteinlerde yapısal değişikliğe yol açan başlıca moleküler mekanizmalar protein karbonil (PCO) oluşumu (29-32) ile karakterize edilen metal katalizli protein oksidasyonu, protein tiyol (P-SH) gruplarının kaybı (33, 34), nitrotirozin (NT) (35-37) ve ileri oksidasyon protein ürünlerinin (AOPP) (38, 39) oluşumu olarak sıralanabilir.

Reaktif türevlerin doğrudan proteinler (primer modifikasyon reaksiyonları), şekerler ve lipitlerle reaksiyona girmesi sonucunda oluşan ürünler, tekrar proteinler ile reaksiyona girerek sekonder modifikasyon reaksiyonlarına yol açmaktadır. Reaktif türevler ya peptit bağları ile ya da amino asit yan zincirleri ile reaksiyona girer (Şekil 2).



Şekil 2: Protein karbonil oluşumuna yol açan primer modifikasyon reaksiyonları (40).

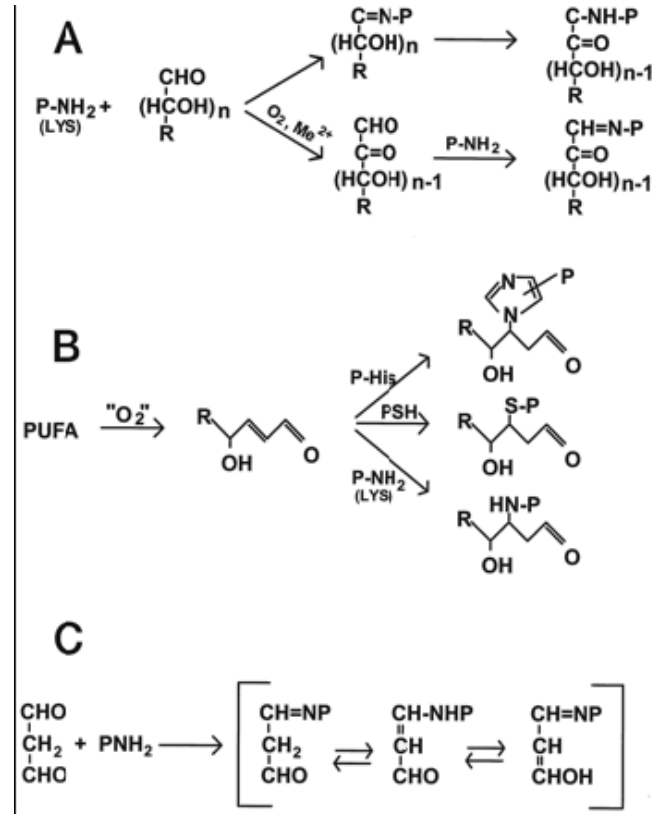
Polipeptit omurgasındaki α -karbon atomundan OH radikali ile α -hidrojen atomunun çıkarılması sonucunda amino asit bakiyesi karbon merkezli radikal haline dönüşür (Şekil 2, Reaksiyon c). Bu reaksiyona yol açan OH radikali suyun radyolizinden (x ve γ ışınlarıyla) veya H_2O_2 'in metal katalizli yıkımından açığa çıkar (reaksiyon a ve b). Oluşan karbon merkezli radikal moleküller oksijen ile hızlı bir şekilde reaksiyona girerek (reaksiyon d) daha sonra alkilperoksidi verecek olan alkilperoksil radikal ara ürününü oluşturur. Alkilperoksit, alkoksil radikali (reaksiyon h) üzerinden hidroksi protein türevini verir (reaksiyon j). Reaksiyon basamaklarının pek çoğunda Fe^{++} ve Cu^+ varlığında $HO_2\cdot$ ile etkileşim önem taşır (reaksiyon e, g, i). Bu metabolik yolda oluşan alkil, alkilperoksil, ve alkoksil radikal ara ürünleri aynı veya farklı protein molekülündeki R yan zincirleri ile, yan reaksiyonlar ile etkileşerek yeni karbon merkezli radikallerin oluşumuna yol açar. Oluşan bu yeni karbon merkezli radikaller ile yukarıdaki reaksiyonlar tekrarlanır. Oksijen yokluğunda (reaksiyon d) gerçekleşmez. Oluşan karbon merkezli radikal diğer bir karbon merkezli radikal ile etkileşerek protein-protein çapraz bağlarının oluşumuna yol açar (Şekil 2). Alkoksil radikalının oluşumu (Şekil 2, Reaksiyon h ve g) peptit bağının diamit veya α -amidasyon metabolik yolları ile ayrılmasına neden olur.

PCO (protein karbonil) oluşumuna yol açan sekonder modifikasyon reaksiyonları; proteinlerin karbonhidrat ve lipid oksidasyon ürünleri ile reaksiyonlarını içermektedir (Şekil 3). Lipid peroksidasyonu sırasında oluşan aldehitler (4-hidroksi-2-nonenal, malondialdehit), indirgen şekerler veya bu şekerlerin oksidasyon ürünlerinin proteinlerdeki lizin amino asitleri ile reaksiyonu (glikasyon ve glikoksidasyon reaksiyonları) sonucu oluşan reaktif karbonil türevleri (ketoaminler, ketoal-dehitler, deoksiozonlar) protein yapısına karbonil gruplarının katılmasına yol açar (40). Lipitlerden türevlenen aldehitler veya otooksidasyona uğramış şekerler Schiff bazı oluşumu yolu ile proteinlerdeki amino gruplarına bağlanır.

2.2.1.1.1. Tiyol Gruplarının Oksidasyonu

Serbest radikallerin proteinlerdeki tiyol (-SH) gruplarının oksidasyonuna yol açtığı gösterilmiştir (33, 34). Sisteinin -SH grubu oksidatif atağa oldukça yatkındır ve -SH gruplarından değişik mekanizmalarla oluşan tiil radikali (-S \cdot) proteinlerdeki disülfid bağlarının oluşumuna öncülük eder (29). -SH gruplarının disülfidlere ve oksiasitler gibi diğer oksitlenmiş türevlere dönüşümü, radikal aracılıklı protein oksidasyonunun en erken

gözlenebilen belirtisidir (41). Birçok araştırmacı grubu elektron paramanyetik rezonans tekniği kullanarak peroksinitritin tiyol grupları ile reaksiyonu sonucu tiil radikallerinin oluştuğunu göstermiştir. Tiyol gruplarının diğer bir oksidasyon şekli 4-Hidroksinonenal'in, proteinlerdeki –SH gruplarına Michael reaksiyonu sonucunda tioeter bağıyla bağlanmasıyla gerçekleşmektedir. Michael reaksiyonu geri dönüşümlü bir reaksiyondur (40, 41) (Şekil 3B).



Şekil 3: Glikasyon, gliksidasyon ve poliansatüre yağ asitlerinin (PUFA) peroksidasyon ürünleri ile proteinlerin reaksiyonları sonucu, protein karbonil gruplarının oluşumu (Sekonder modifikasyon reaksiyonları) (40).

A: Şekerlerin proteinlerdeki lizin amino grupları (P-NH₂) ile reaksiyonu

B: Michael tipi katılma reaksiyonu ile 4-hidroksi-2-nonenal'in proteinlerdeki lizin P-NH₂), histidin (P-His), veya sistein (P-SH) bakiyelerine bağlanması

C: Proteinlerdeki amino grupları ile lipid peroksidasyon ürünü malondialdehitin reaksiyonu

2.2.1.1.2. İleri Oksidasyon Protein Ürünlerinin Oluşumu

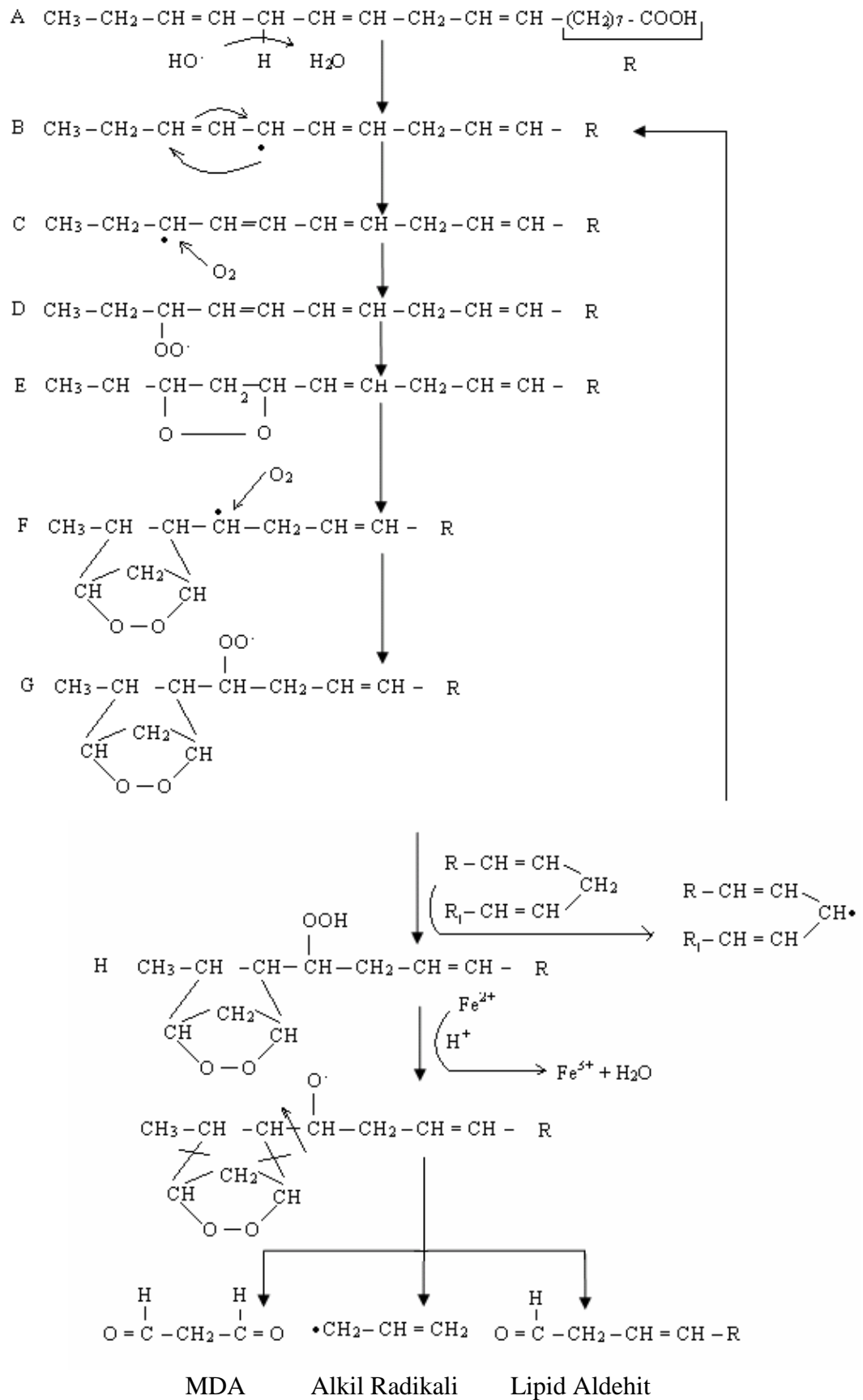
Son zamanlarda protein oksidasyonunun yeni bir belirteçi olan ileri oksidasyon protein ürünleri (Advanced Oxidation Protein Products-AOPP) çeşitli araştırmacıların dikkatini çekmeye başlamıştır (38, 39, 42). AOPP, ditirozin içeren çapraz bağlı protein ürünleri olarak tanımlanmaktadır (38). Diğer taraftan AOPP'nin yapısal olarak ileri glikasyon son ürünlerine benzediği bildirilmektedir (39).

AOPP protein oksidasyonunun derecesini belirlemede duyarlı bir belirteçtir (38, 39). Witko-Sarsat ve arkadaşları (43) tarafından yapılan çalışmada, AOPP düzeylerinin, protein oksidasyonunun göstergesi olan plazma ditirozin ve ileri glikasyon son ürünü olan pentozidin düzeyleri ile korelasyon gösterdiği, fakat lipid peroksidasyon marker'ı olan tiyobarbitirik asit ile reaksiyona giren maddelerle korelasyon göstermediği bildirilmiştir.

2.2.1.2. Lipid Peroksidasyonu

Biyolojik membranların yapısında bulunan çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) ve kolesterol, çoğunlukla biyolojik sistemlerin ürünü olarak meydana gelen oksitleyici ajanların tesirine maruz kalarak doğal yapılarını kaybederler ve lipid peroksitlerine dönüşürler. Lipid peroksidasyonu enzim gerektirmeyen ve ileri safhalarında yeni serbest radikal oluşumunu ve/veya ara lipid hidroperoksit ürünlerinin meydana gelmesi ile karakterizedir. Lipid peroksidasyonunun başlangıç aşaması bir PUFA'nın metilen karbon hidrojenine bir serbest radikalın saldırısı ile başlar (Şekil 4, A). Oluşan lipid radikali moleküler oksijenin ile reaksiyona girerek peroksil radikalini meydana getirmek üzere değişime uğrar (Şekil 4, G). Bu şekilde oksidan özellik kazanmış lipid molekülü antioksidanların durumuna göre diğer yağ asitlerine etki ederek lipid hidroperoksitlerin oluşumuna aracılık eder. Bu süreç sonunda malondialdehit (MDA), 4-hidroksinonenal (HNE) gibi son derece toksik ve proaterojenik moleküller meydana gelir (44-46).

Lipid peroksidasyonu membran içeriğinin polimerizasyonuna sebep olur (47). Membrandaki poliansature yağ asitlerinin serbest radikallerin etkisiyle oksidasyonu sonucu oluşan oksidatif ürünler malondialdehit (MDA) yada 4-hidroksi-2 nonenal (4HNE) gibi aldehitler ve diğer hidroksialkenaller meydana gelir. 4HNE ve diğer aldehitler gibi toksik habercilerde moleküler seviyede oksidatif hasara arabuluculuk ederler. Bu oksidatif ürünler proteinler ve nükleik asit gibi farklı makromoleküller ve düşük molekül ağırlıklı tiyoller ve glutatyon ile reaksiyona girerler. Membrandaki bu hasar membran akışkanlığının değişimine ve hücre deformasyonuna sebep olur.



Şekil 4: Lipid peroksidasyon mekanizması (20).

Şekil 4 üzerinden gösterilen mekanizmada;

A : Başlama

B : Dien konjugasyonu ve serbest radikal stabilizasyonu

C : Moleküler oksijen saldırısı

D : Lipid peroksi radikali

E : Lipid endoperoksi radikali

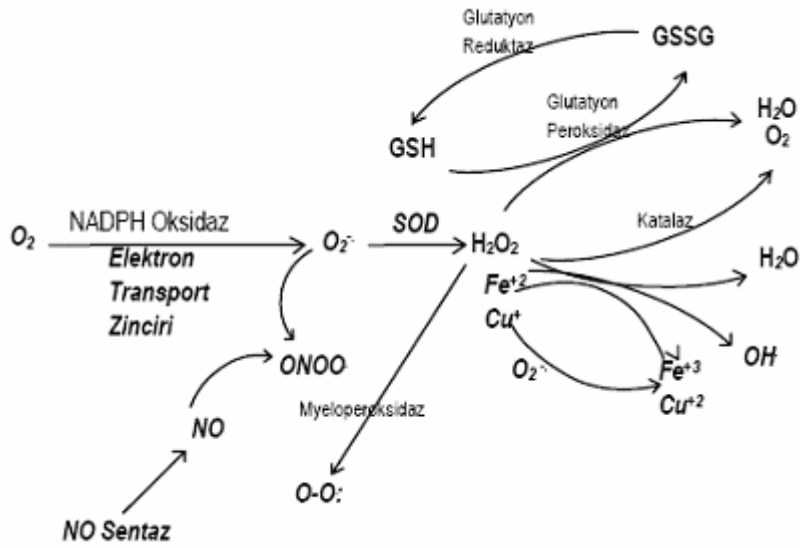
F : Molekül içi düzenleme

G: Radikal zincir reaksiyonu (Bu reaksiyonda oksidan özellik kazanan lipid molekülü, diğer yağ asitlerine etki ederek lipid peroksitlerin oluşumunu sağlarlar (48, 49).

H: Lipid hidroperoksi parçalanması reaksiyonlarını göstermektedir.

2.2.2. Antioksidan Sistem

Oksijenli solunum yapan organizmalarda metabolizmanın bir sonucu olarak serbest radikaller denen reaktif atom veya bileşikler meydana gelir. Normal metabolizmada çoğunlukla yıkıcı etkilere sahip olan bu radikallerin bertaraf edilmesi için antioksidan savunma sistemleri mevcuttur. Hücre içinde oluşan detoksifikasyon işlemleri genellikle enzimler tarafından gerçekleştirilir. Antioksidan sistemin enzimatik olmayan kısmını ise bazı vitaminler ve spesifik proteinler oluşturur (Tablo 2). Normal şartlarda antioksidan ve oksidan sistem arasında bir denge vardır (Şekil 5).



Şekil 5 : Serbest radikallerin oluşumu ve enzimatik detoksifikasyonu (50).

Bazı durumlarda oksidatif stresin artması dengenin oksidan tarafa kaymasına yol açar. Bu durum antioksidan sistemin yetersiz olması ya da oksidan özelliğın artması sebebiyle meydana gelebilir (51).

Tablo 2: Biyolojik sistemlerdeki antioksidan savunma sistemi (22, 23)

Enzimatik	Enzimatik Olmayan	
Süperoksit dismutaz (SOD)	Glutasyon (GSH)	Albumin
Katalaz (KAT)	α -Tokoferol (vit E)	Seruloplazmin
Glutasyon peroksidaz (GSH-P _x)	Askorbat (vit C)	Transferin
Fosfolipid hidroperoksit glutasyon peroksidaz (PLGSH-P _x)	β -Karoten	Ferritin
Glutasyon S-transferaz (GST)	Flavonoidler	Laktoferrin
Glutasyon redüktaz (GSSG-R)	Ürat	Melatonin
	Bilirubin	Sistein

2.3. Sert Kabuklu Meyveler ve Fındık

Sert kabuklu meyveler besin değerleri yüksek, yağlı yiyeceklerdir. Pek çok sert kabuklu meyvenin kalorisinin yaklaşık % 80' i yağdan gelir ve bu yüzde içinde doymamış yağ asitleri ağırlıktadır. Tablo 3' de bazı sert kabuklu meyvelerin 100 gramında bulunan yağ asidi, E vitamini, arginin, metiyonin ve folik asit miktarları verilmiştir (52-54). Arginin NO' in öncü molekülü, metiyonin vaskülo-toksik özellik gösteren homosisteinin öncü molekülü olması, folik asit ise homosisteinin metiyonine dönüşümü ve miktarı azaldığı

zaman tetrahidrobiopterin geri dönüşümünde yer alarak nitrik oksit sentaz disfonksiyonuna neden olması ile oldukça önemlidir.

Tablo 3: Bazı sert kabuklu meyvelerin 100 gramında bulunan yağ asidi, e vitamini, arginin ve metiyonin miktarları (52-54).

	Fındık	Ceviz	Badem	Yer Fıstığı
Doymuş Yağ asidi (g)	4,6	3,36	3,88	6,83
Oleik asit (g)	48,63	8,8	33,3	23,8
Linoleik asit (g)	5,83	38,1	10,5	15,6
α-linolenik asit (g)	0,15	9,1	0,4	0
α-tokoferol (mg)	15,03	1,8	25,87	8,33
γ-tokoferol (mg)	0	28,48	0,89	0
Arginin (mg)	2211	2278	2495	3085
Metiyonin (mg)	221	236	227	317
Folik asit (ug)	113	100	70	173

Yapılan bir çok çalışmada plazma kolesterol düzeyleri üzerine sert kabuklu meyvelerin (badem, ceviz, fındık gibi) tüketiminin etkileri değerlendirilmiştir (55). Günlük 84-100 g sert kabuklu meyve tüketiminin serum total kolesterol düzeyini % 10-20 azalttığı gözlenmiştir (56).

Sert kabuklu meyveleri haftada 1 kereden az tüketen insanlarla 1-4 kez tüketen insanlar arasında karşılaştırma yapıldığında, haftada 1-4 kez tüketme ile koroner kalp hastalıklarından ölme riskinin % 25 azaldığı görülmüştür. Tüketim sıklığı haftada 5 ya da daha fazla olduğunda ise bu riskin % 50 oranında azaldığı belirtilmiştir. Sert kabuklu meyvelerin tüketimi sadece kalp hastalıklarına karşı koruyucu değil, aynı zamanda ömür uzunluğuna da katkıda bulunmaktadır (57).

Yapılan literatür taramasına göre, badem ile yapılan 3 (50-100 g/gün), yer fıstığı ile yapılan 2 (35-68 g/gün) ceviz ile yapılan ise 4 (40-84 g/gün) çalışmada kontrol diyeti ile beslenenlere göre total kolesterolde % 2-16, LDL kolesterolde % 2-19 arasında bir düşüş görülmüştür. Buna göre günde 50-100 g olmak üzere, haftada 5 kez ya da daha fazla sert kabuklu meyve tüketimi, normolipidemik ve hiperlipidemik kişilerde total kolesterol ve LDL kolesterolün anlamlı olarak azalmasına neden olmaktadır(57).

Son yıllarda yapılan birçok araştırma sert kabuklu meyveler sınıfından olan fındık tüketiminin insan beslenmesi üzerinde olumlu etkilerinin olduğunu ortaya koymuştur (58).

Fındık bitkiler aleminde Fagales takımının Betulaceae familyasından Corylus cinsine aittir. Fındık yağ ve protein açısından değerli bir kaynaktır. Yenebilen 100 g iç

fındık, 55-66 g yağ, 11-15 g protein, 12-17 g karbonhidrat, 8-10 g lif içerir ve yaklaşık 650 kcal. enerji sağlar (59). Fındık yağı bileşimi üzerine yapılan çalışmalarda bileşimce zeytinyağına benzediği ve tüm çeşitlerde de en fazla oleik asidin (18:1) bulunduğu ve bunu sırayla linoleik (18:2), palmitik (16:0), stearik (18:0) ve linolenik (18:3) asitlerin izlediği belirlenmiştir. Tablo 4’ te fındığın 100 gramında bulunan yağ asitleri ve miktarları verilmiştir (60).

Tablo 4: Fındığın 100 gramında bulunan yağ asitleri ve miktarları (60).

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

Fındıkta bulunan protein miktarı bitkisel kaynaklı proteinler için önemli sayılmaktadır, yüksek miktarda arginin içerirler. Fındık ve fındık yağı E vitamininin en iyi doğal kaynağıdır. Her gün sadece 25-30 g fındık günlük E vitamini ihtiyacının tamamını karşılamaktadır. Fındık ve fındık yağının vücutta karbohidrat, protein ve yağ metabolizmasında düzenleyici rolü olan bazı B grubu vitaminler (B1, B2 ve özellikle B6 vitamini) için önemli bir kaynak olduğu saptanmıştır (58). Ayrıca kalsiyum, magnezyum, fosfor ve potasyum başta olmak üzere iyi bir mineral kaynağıdır. Tansiyonu dengelenmesinin yanı sıra sodyum bakımından düşük fakat mineraller bakımından zengin olan fındık ve fındık yağı, demir ve çinko için en iyi kaynaklardan biridir (58). Fındık ve fındık yağının bir önemli özelliği de fındıkta bulunan sterollerden beta-sterol’ün bağırsaktan kolesterolün emilimini azaltmasıdır (58, 60, 61). Fındıkta bulunan lif, kolesterol öncü moleküllerinin ve glukozun emilimini azaltarak kan glukozunun ve kolesterolün yükselmesinin önlenmesinde yardımcı olur. Folik asit, B2 ve B6 vitaminleri koroner kalp hastalığı ve sinir sisteminin işlevinin bozulmasında risk faktörü olan homosistein düzeyinin yükselmesini önleyici etki yapar (61). Fındığın içerdiği yüksek miktardaki E vitamininin LDL oksidasyonunu önleyerek koroner kalp hastalığı riskini azaltıcı etkisi belirlenmiştir (61). Fındığın sağlıklı beslenme açısından uygun niteliklere sahip ve yüksek enerji sağlayan bir besin maddesi olmasının yanında son yıllarda yapılan çalışmalarla fındıkta çok yüksek düzeylerde bulunan tekli doymamış yağ asidi oleik asidin (% 82 oleik asit, % 12 linoleik asit, % 15 palmitik asit ve % 1 stearik asit) kanda

kolesterolün yükselmesini önlediği ve böylece kalp ve damar hastalıklarına karşı koruyucu etki gösterdiği tespit edilmiştir (58, 60, 62).

Araştırmalar göstermiştir ki doymuş yağ oranının düşük ve MUFA oranının yüksek olduğu diyetler plazma lipid düzeylerinin kontrolünde etkili olmaktadır. Fındıkta yüksek oranda bulunan oleik asidin insanda kan şekerini düzenlediği, serum toplam kolesterol ve apo B düzeylerini azalttığı, apo AI düzeyini arttırdığı gösterilmiştir (60). Bu etkiler sonucunda düzenli fındık tüketiminin koroner kalp hastalığı riskini azaltacağı öngörülebilir (58). Türk Kardiyoloji Derneğinin 2002 yılında yayınladığı “Koroner Kalp Hastalığı-Korunma ve Tedavi Kılavuzu’nda” fındık, MUFA (oleik asit) ve PUFA (linoleik asit), B ve E vitamininden zengin bir besin kaynağı olarak sağlıklı beslenme diyetinin bir parçası olarak yer almaktadır (58). Durak ve ark.’nın yaptığı çalışmada sağlıklı bireylerin normal diyetlerine günde kilogram başına 1 g olacak şekilde 30 gün boyunca fındık ilave edilmiştir. 30. gün sonunda fındık tüketiminin toplam kolesterol, LDL kolesterol ve MDA düzeylerini düşürdüğü, HDL kolesterol, trigliserid düzeylerini ve antioksidan potansiyelini arttırdığı gözlenmiştir (7). Tavşanlar üzerinde yapılan bir çalışmada fındık yağının hiperkolesterolemik diyetle beslenen tavşanlarda plazma ve eritrosit MDA ve konjuge dien miktarlarını düşürdüğü saptanmıştır (63). Tavşanlar üzerinde yapılan başka bir çalışmada fındık yağının hiperkolesterolemik diyetle beslenen tavşanlarda aort toplam kolesterol, MDA ve konjuge dien düzeylerini düşürdüğü saptanmıştır (64).

Sözü edilen bu çalışmalar fındık ve fındık yağının kardiyovasküler hastalıklardan korunmada ve tedavisinde büyük önem taşıdığını göstermektedir. Bu durum fındık ve fındık yağında bulunan PUFA’nden linoleik asitin kolesterol düzeylerini düşürücü etkileri ile desteklenmektedir. Ancak PUFA’ nin vücutta serbest radikal oksidasyonuna yatkın olması nedeni ile aşırı tüketiminden kaçınılması gerektiği unutulmamalıdır. Özetle doymuş yağ asidi yönünden fakir, MUFA yönünden zengin, PUFA miktarı yeterli ve antioksidan potansiyeli yüksek olan fındık ve fındık yağına günlük diyetle (yağdan gelen enerjinin % 20’ sini geçmeyecek şekilde) yer verilmesi, aterosklerotik kardiyovasküler hastalıklardan korunmada ve tedavisinde yararlı olacaktır (59).

2.4. Hiperlipidemi ve Fındık

Dislipidemi lipoproteininin aşırı üretimini yada eksikliğini içine alan lipoprotein metabolizma hastalığıdır. Bu tür hastaların toplam kolesterol LDL-kolesterol ve trigliserid seviyelerinde artış yada HDL-kolesterol seviyesinde azalış gözlenmektedir. Ancak LDL-kolesterol yüksekliği majör lipid anormallığıdır (65). LDL' nin yüksek konsantrasyonu eritrosit şekil bozukluğu ile ilişkilidir (66, 67). Ulusal kolesterol eğitim programının (NCEP) belirlediği kolesterol ve trigliserid değerleri verilmiştir (Tablo 5). Birkaç çalışmada sert kabuklu meyvelerin, serum lipid seviyeleri ve sonradan gelişecek olan koroner arter hastalığı üzerine yararlı etkiye sahip olduğu gözlenmiştir (68, 69). Schick ve ark ve Vaya ve ark'larının yaptığı çalışmalarda hiperkolesterolemik şahıslarda membran kolesterol konsantrasyonunun arttığı gözlenmiştir (70, 71). Kolesterol oranı artmış membranlarda hücre deformasyonu artar ve bu durum aterosklerozun ilerlemesine neden olabilir (72, 73).

Tablo 5: NCEP ATP III kolesterol ve trigliserid sınıflaması (74).

	mg/dL	mmol/L
LDL-kolesterol		
Optimum	<100	< 2.6
Optimuma yakın	100-129	2.6-3.3
Sınırdaki yüksek	130-159	3.4-4.11
Yüksek	160-189	4.12-4.89
Çok yüksek	≥ 190	≥ 4.9
Toplam kolesterol		
Normal	<200	< 5.2
Sınırdaki yüksek	200-239	5.2-6.18
Yüksek	≥ 240	≥ 6.2
HDL-kolesterol		
Düşük	< 40	<1.0
Yüksek	≥ 60	≥1.6
TG		
Normal	<150	<1.7
Sınırdaki yüksek	150-199	1.7-2.2
Yüksek	200-499	2.3-5.63
Çok yüksek	≥ 500	≥ 5.64

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

Otoanalizör	(ROCHE/HITACHI Modüler Sistem, DPP)
Nefolometre	(DADE BEHRING, BN II)
Santrifüj	(EPPENDORF 5810)
Mikrosantrifüj	(BECKMAN COULTER, Microfuge 18 Centrifuge)
Spektrofotometre	(SHIMADZU, UV-1601 UV/Visible Spectrophotometer)
Sıcaklık ayarlayıcısı	(SHIMADZU)
Mikroplate okuyucusu	(VERSAmax)
HPLC	(AGILENT 1100)
HPLC Kolonu	(ZORBAX ECLIPSE XDB-C18)
Diyaliz Torbası	(SIGMA, D 9777)

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Albümin (Sığır serumundan, AppliChem, F-9252)
Hidroklorik asit (HCl) (Carlo Erba,%37,d = 1.186,7647-01-0)
Etilendiamin Tetra Asetik Asit (Disodyum tuzu, CARLO ERBA)
Folin-Ciocalteu's Fenol rektifi (2N,SIGMA)
Fosforik Asit (%85, MERCK)
Metanol (HPLC saflığında, MERCK)
Sodyum Di Hidrojen Fosfat (MERCK)
Sodyum Hidroksit (MERCK)
Sodyum bikarbonat (MERCK)
Sodyum Karbonat (MERCK)
Sodyum potasyum tartarat (MERCK)
2-tiobarbütirik asit (SIGMA)
Tris (hidroksimetil)-aminometan (MERCK)
Trolöks (56510, FLUKA)
Sodyum bi Fosfat (MERCK)
Sodyum Klorür (MERCK)
Sülfürik asit (CARLO ERBA)
Bakır sülfat (SIGMA)
Bütillenmiş hidroksi tolien (SIGMA)
Asetik asit (MERCK)
Potasyum di hidrojen fosfat (MERCK)
Potasyum bi hidrojen fosfat (MERCK)
DTNB (SIGMA)
N-asetil sistein (SIGMA)
Potasyum klorür (MERCK)
Potasyum iyodür (TEKNİK KİMYA)
Ksilenol oranj (MERCK)
Gliserol (BİRKA)
Demir 2 amonyum sülfat (MERCK)
O-dianizidin dihidroklorür (SIGMA)
Hidrojen peroksit (MERCK)

3.2. Metod

3.2.1. Deneyin Planlanması ve Numunelerin Toplanması

Bu çalışma NCEP ATP III kriterlerine göre ilaç tedavisi gerektirmeyen hiperkolesterolemik gönüllü şahıslar üzerinde yapılmıştır. Çalışmada yaşları 27 ile 59 arasında değişen 13 bay, 2 bayan toplam 15 kişi yer almıştır. Çalışma grubunu oluşturacak kişilerin çalışmaya başlanmadan önce lipid profilleri tespit edilerek hiperlipidemik olup olmadıkları belirlenmiştir. Koroner arter hastalığı, hipertansiyon, diabet, obezite ve başka sistemik hastalıkları olanlar ve düzenli ilaç kullananlar çalışma grubuna dahil edilmemiştir. Şahıslara, ölçülen vücut kitle indeksi, vücut ağırlığı ve yağ yüzdelerine göre, ideal sınırlara gelebilmeleri için başlangıçtan itibaren bir ay boyunca kontrol diyeti uygulanmıştır (II.dönem). Takip eden ikinci bir aylık periyotta diyetlerine enerji ihtiyacının % 20' sini karşılayacak şekilde fındık eklenmiştir (III.dönem). Yenmesi gereken günlük fındık miktarının yarısı sabah saat 10.00-11.00 arasında, diğer yarısı da öğleden sonra saat 15.00-16.00 arasında olmak üzere ikiye bölünerek tüketilmiştir. Son periyotta ise fındıksız kontrol diyeti uygulanmıştır (IV.dönem). Bireylerden çalışmanın başlangıcında (I.dönem), 30.günde, 60.günde ve 90. günde kan alınmıştır.

Bir gecelik (12 saatlik) açlık dönemini takiben bireylerden antikoagülsüz ve 1mg/mL EDTA içeren antikoagülanlı vakumlu tüplere yaklaşık 20 mL venöz kan alınmıştır. Tüpler 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek serum ve plazmalar elde edilmiş, günlük analizler dışında kullanılacak örnekler – 80 °C'de saklanmıştır.

3.2.2. Biyokimyasal Analizler

Serum total kolesterol (TK), trigliserid (TG), HDL-kolesterol (HDL-K), LDL-kolesterol (LDL-K) tayinleri ROCHE/HITACHI Modüler Sistem otoanalizöründe orijinal kitleri kullanılarak gerçekleştirildi. Apolipoprotein AI (ApoAI) ve apolipoprotein B (ApoB) tayinleri nefolometre (DADE BEHRING, BN II) cihazı ile monoklonal immünopresipitasyon prensibine dayanılarak yapılmıştır.

Otoanalizörlerde tayin edilen tüm parametreler günlük kalite kontrol uygulamalarının ardından yapılmıştır.

3.2.3.Osmotik Frajilite

Bu test izoosmotik sodyum klorür konsantrasyonundan başlanarak (% 0,9), giderek azalan osmolaritedeki tuz konsantrasyonuna sahip ortama konan eritrositlerin hemoliz olma oranının ölçümüne dayalıdır. Normalde hemoliz yaklaşık % 0,7 lik NaCl konsantrasyonunda başlar ve % 0,4 lük NaCl'de hemoliz % 100 dür (75).

Kullanılan Çözeltiler

10 mM Sodyum Fosfat Tamponu: 0,5199 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 1,7848 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ tartılıp 750 mL de çözüldü ve pH'sı 7,4'e ayarlandı. Daha sonra son hacim 1L'ye tamamlandı.

% 0,1 , 0,2 , 0,3 , 0,35 , 0,4 , 0,45 , 0,5 , 0,55 , 0,6 , 0,7 , 0,9 luk NaCl çözeltileri bu tampon ile hazırlandı.

Deneyin Yapılışı

Osmotik Frajilite Dacie ve Lewis (75) tarafından tanımlanan yöntemle yapıldı. Eritrosit paketinin hacmi ile 10 mM sodyum fosfat tamponunda hazırlanmış farklı konsantrasyonlardaki NaCl (% 0 , 0,1 , 0,2 , 0,3 , 0,35 , 0,4 , 0,45 , 0,5 , 0,55 , 0,6 , 0,7 , 0,9) çözeltilisinin hacmi 1:200 olacak şekilde koyuldu. Daha sonra tüpler kibarca ters düz edilerek karıştırıldı. 25°C'da 30 dk. bekletildikten sonra 1500 x g de 10 dk santrifüj edildi ve 540 nm deki absorbansları kaydedildi. Aynı işlemler suya göre yapıldı ve bulunan değere göre % hemoliz olma oranları hesaplandı.

3.2.4. Eritrosit Membran (GHOST)'ının Elde Edilmesi

Eritrosit membranlarının elde edilmesi H.Hamaguchi ve H. Cleve'in eritrosit ghostu elde etme yöntemi modifiye edildi (76). 120 mL kan 3000 rpm'de 10 dk. ve 4°C'de yüksek devirli soğutmalı santrifüjle santrifüjlendi. Üst kısmında kalan plazma ve lökosit tabakası su trompu ile alındı. Daha sonra eritrositler, % 0,9 NaCl-5 mM Tris-SO₄ (pH = 7,4) tamponu kullanılarak üç kez süspansiyon yapıldı. Her süspansiyon 3000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi. Bu yıkama işlemi sonucunda yaklaşık 30-40 mL eritrosit paketi elde edildi. Eritrosit paketleri yaklaşık 5 hacim 10 mM Tris-0,1 mM EDTA-SO₄ (pH = 7,4) ile süspansiyon edildi. İlk süspansiyon 13000 rpm'de 20 dk. santrifüjlendi. Bu şekilde eritrositler hemoliz edilmiş oldu. Daha sonra yine aynı tampon kullanılarak yapılan süspansiyonlar 20000 rpm'de 10'ar dakika santrifüjlendi. Bu şekilde 5-7 kez yıkama işlemi yapılarak hemoglobin uzaklaştırılmış oldu.

Kullanılan Çözeltiler

1.% 0,9 NaCl-5mM Tris-H₂SO₄ (pH = 7,4)

9 g NaCl, 1000 mL deiyonize suda çözüldü. Böylece izotonik çözelti hazırlanmış oldu. 0,606 g Tris, 750 mL izotonik çözeltide çözüldü. 0,5 M H₂SO₄ ile pH 7,4'e ayarlandı. Son hacim yine izotonik çözeltiyle 1000 mL'ye tamamlandı.

2.10 mM Tris-0.1 mM EDTA-H₂SO₄ (pH = 7,4)

1,211 g Tris ve 0,037 g EDTA 750 mL'ye kadar deiyonize suda çözüldü. 0,5 M H₂SO₄ ile pH 7,4'e ayarlandı. Daha sonra son hacim 1000 mL tamamlandı.

3.2.5.GHOST'un Diyalizi

Eritrosit membranında diyaliz EDTA'yı ve diğer safsızlıkları uzaklaştırmak amacıyla yapıldı. Diyaliz işlemi selüloz membrandan yapılmış diyaliz torbası (Sigma, D 9777) kullanıldı. Yarı geçirgen bir zar olan diyaliz torbası EDTA ve küçük moleküllerin dışarı çıkmasına izin verirken tamponun da içeri girmesini sağlar. Bunun sonucu olarak ta

diyализ sırasında membran yüzey alanı artar. Denge konsantrasyonuna erişildiğinde, çözünenlerin dağılımı her iki yönde de aynı olmaktadır (77).

Kullanılan Çözeltiler

- 1. 10 mM EDTA-10 mM PBS, pH 7,4:** 4,36 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,86 g NaH_2PO_4 , 0,148 g Na_2EDTA bir miktar % 0,9'luk NaCl çözeltisinde çözüldü. pH'sı kontrol edildi ve son hacim % 0,9'luk NaCl çözeltisi ile 4 L'ye tamamlandı.
- 2. 10 mM PBS,pH 7,4:** EDTA hariç çözelti 1'deki gibi hazırlandı.
- 3. 100 mM NaHCO_3 -10 mM Na_2EDTA , pH 7,4:** 8,4 g NaHCO_3 ve 3,722 g Na_2EDTA bir miktar deiyonize suda çözüldü. pH'sı HCl ile 7,0'a ayarlandı. Deiyonize su ile hacim 1 L'ye tamamlandı.

Diyaliz Torbalarının Hazırlanışı ve Diyализin Yapılışı

Diyaliz torbaları yaklaşık 10-15 cm ebatlarda kesildi, 100 mM NaHCO_3 -10 mM Na_2EDTA (pH 7,4) çözeltisi içerisinde, 60°C'de 2 saat boyunca sürekli ve yavaşça karıştırılarak açılması sağlandı. 10 mM EDTA-10 mM PBS (pH 7,4) çözeltisi ile yıkandı aynı çözelti içinde 4°C'de saklandı.

Elde edilen GHOST'lar (SDS ile bir gece 4°C de bekletildi) 1,5 mL'lik ephendoflara yerleştirildikten sonra kapaklar kopartıldı ve ağızları küçük lastikler yardımıyla diyaliz torbalarıyla kapatıldı ve kapak kısmı aşağı yönde olacak şekilde 10 mM EDTA-10 mM PBS (pH 7,4) tamponu ile 12 saat, daha sonra 10 mM PBS (pH 7,4) tamponu ile yine 12 saat her 3-4 saatte bir tamponlar değiştirilerek, 4°C'de, karanlıkta ve sürekli karıştırılarak diyaliz edildi. İlk aşamada EDTA'lı tampon kullanılmasının nedeni diyaliz sırasında geçen uzun sürede meydana gelebilecek oksidasyona engel olmaktır.

3.2.6. GHOST'ta Protein Tayini

İzole edilen GHOST'ta protein tayini Lowry metodu (78) ile yapıldı. Bu metodun prensibi proteinin ilk önce alkali ortamda bakır iyonları ile muamele edilmesine ve daha sonra Folin-Ciocalteu's fenol reaktifinin (Fosfotungstik-fosfomolibdik asit) bakır ile

muamele edilmiş proteinlerde yer alan tirozin ve triptofan amino asitleri tarafından indirgenmesi esasına dayanır. Folin-Ciocalteu's fenol reaktifinin protein ile reaksiyonu sonucu oluşan mavi rengin optik dansitesi spektrofotometrede 660 nm' de ölçülür.

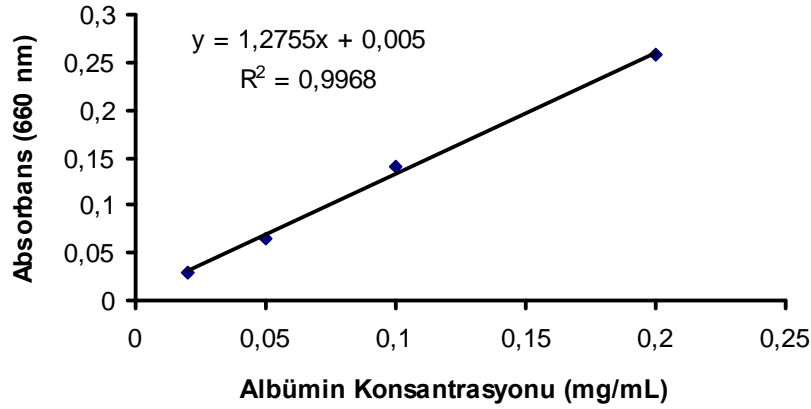
Kullanılan Çözeltiler

- 1. Reaktif I :** %2 $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 2 g $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ bir miktar distile suda çözülüp hacmi distile su ile 100mL'ye tamamlandı.
- 2. Reaktif II:** %2 Sodyum Potasyum Tartarat: 2 g Sodyum potasyum tartarat bir miktar distile suda çözülüp hacmi distile su ile 100mL'ye tamamlandı.
- 3. Reaktif A:** 0,1 N NaOH çözeltisinde %2 Na_2CO_3 : 2 g Na_2CO_3 , 100mL 0,1 N NaOH çözeltisinde hazırlandı.
- 4. Reaktif B: Alkali Bakır Reaktifi:** Reaktif I, Reaktif II, Reaktif A sırası ile 1:1:100 oranında karıştırıldı, taze hazırlandı.
- 5. Folin-Ciocalteu's Fenol Reaktifi:** 2 N Folin reaktifi 1:1 oranında distile su ile seyreltildi, taze hazırlandı.
- 6. Standartlar: Sığır Serum Albümini:** 0,02 mg/mL, 0,05 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,15 mg/mL, 0,2 mg/mL konsantrasyonlarında albümin standartları hazırlandı.

Deneyin Yapılışı

Lowry metodunun hassasiyeti 2-100 μg arasındadır. Bu nedenle GHOST 20 kat distile su ile seyreltilmiştir. Arkadaki tabloya göre pipetlemeler yapıp 660 nm' de absorbanları okunarak standart grafik yardımıyla sonuçlar bulunmuştur (Şekil 6).

	Kör (µL)	Standart (µL)	Numune (µL)
Distile Su	200	-	180
Standart	-	200	-
Numune	-	-	20
Reaktif B	1000	1000	1000
Vorteksle karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 10 dk. bekletildi.			
Folin reaktifi (1N)	100	100	100
Vorteksle karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 30 dk. bekletildi.			
660 nm' de absorbanları okundu.			



Şekil 6: Protein Standart Grafiği

3.2.7. GHOST'ta MDA tayini

Young ve Trimble'in (79) metoduna göre, lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehit (MDA)' in tiyobarbitürik asitle ısıtılmasıyla oluşan kompleksin 536 nm de uyarılması ve 555 nm yaydığı ışığın HPLC de floresan detektörle ölçülmesi esasına dayanır.

Kullanılan Çözeltiler

- 1. % 0,2'lik Bütillenmiş Hidroksi Toluen (BHT) :** 0,02 g BHT 10 mL saf alkolde çözülür.
- 2. 0,46 M Fosforik asit:** % 85'lik fosforik asitten 1,551 mL alınıp 50 mL'ye tamamlanır.
- 3. % 0,6'lık Tiyobarbitürik asit:** 0,3 g TBA 50 mL deiyonize suda ısıtılarak çözülür. 50 mL glasiyel asetik asit eklenir.
- 4. 1 M NaOH:** 4 g NaOH 100 mL deiyonize suda çözülür.
- 5. 25 mM fosfat tamponu, (pH = 6,4):** 2,9368 g KH_2PO_4 ve 0,5958 g K_2HPO_4 1 L HPLC saflığında suda çözülür. pH'sı 6,4'e ayarlanır.

Deneyin yapılışı:

100 μL standart ve numune tüplere pipetlenir. Ve üzerlerine 10 μL % 0,2 lik BHT ve 600 μL 0,46 M fosforik asit pipetlenir. Vortekslenip oda sıcaklığında 10 dk. bekletilir. Tüplere 200 μL % 0,6 lık TBA eklendikten sonra tekrar vortekslenir ve 90 °C'de su banyosunda 30 dk. ısıtılır ve 30 dk.'nın sonunda tüpler soğutulur. Ependorflara 400 μL numune ve standart konulduktan sonra üzerine 720 μL metanol pipetlenir. Ardından 80 μL 1 M NaOH eklenerek asidin nötralleşmesi ve proteinlerin çökmesi sağlanır.

Mikrofüjde 5 dakika santrifüj edilir. Süpernatant viallere konular ve HPLC ye verilir.

Akış hızı: 1 mL/dak

Kolon: C18 kolon

Enjeksiyon : 40 μL

Mobil Faz: tampon:metanol (65:35)

Sıcaklık :45 0C

Detektör: floresan detektör (Ex:536, Em:555)

Hazırlanan standartlara göre yapılan standart grafiğinden numunelerin konsantrasyonları hesaplandı.

3.2.8. Eritrosit Membran Proteini Tiyol Seviyesinin Belirlenmesi

Tiyol seviyesini belirlemek için Sedlak ve arkadaşlarının kullandığı method (80) uygulandı. Bu yöntem 412 nm'de spektrofotometrik okumaya dayalıdır.

Kullanılan Çözeltiler

- 1. 0,2 M Tris Tamponu, (pH = 8,2) :** 24,228 g Tris tartıldı ve 750 mL distile suda çözüldü. pH'sı 0,2 M NaOH ile 8,2 ye getirildi ve son hacim 1L ye tamamlandı.
- 2. 0,01 M 5,5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit):** 0,1982 g 5,5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit) tartıldı ve metanolde çözümlenip son hacim 50 mL ye tamamlandı.
- 3. Metanol:** Saf metanol kullanıldı.
- 4. Standartlar:** 1 mM , 0,5 mM, 0,250 mM ve 0,125 mM konsantrasyonlarına sahip N-asetil sistein standartları hazırlandı.

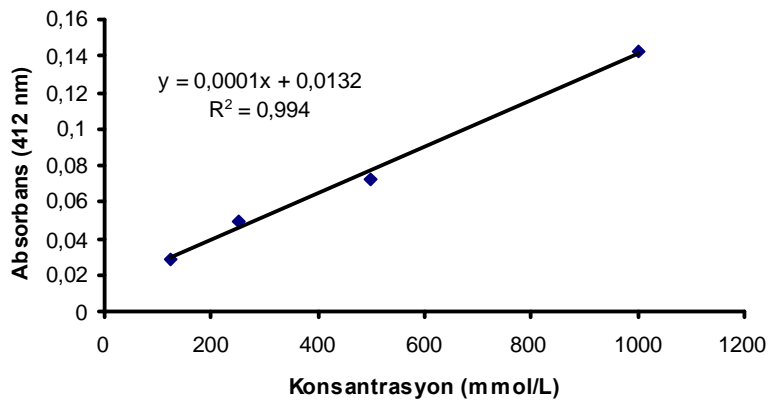
Deneyin Yapılışı

Arkadaki tabloya göre tüplere pipetlemeler yapıp 412 nm'de absorbansları okunarak elde edilen standart grafiğine göre hesaplamalar yapıldı (şekil 7).

	Numune K�r� (�L)	Standart (�L)	Numune (�L)
Tris tamponu	800	750	750
Standart	-	250	-
Numune	250	-	250
DTNB	-	50	50
Metanol	3950	3950	3950

15 dk. içinde renk gelişti ve tüpler oda sıcaklığında 3000xg'de 15 dk. santrifüj edildi.

412 nm'de absorbansları okundu.



Şekil 7: Tiyol grubu standart grafiği

3.2.9. İleri Okside Protein  r n 

İleri oksidasyon protein ürün seviyesini belirlemek için Witko ve arkadaşlarının kullandığı method (81) bazı değişikliklere uğatılarak uygulandı. Bu yöntem 340 nm'de spektrofotometrik okumaya dayalıdır.

Kullanılan Çözeltiler

1.PBS, (pH = 7,4): 16 g NaCl , 0,4 g KCl , 0,4 g KH₂PO₄, 4,338 g Na₂HPO₄ . 7H₂O tartılıp 1750 mL distile suda çözüldü ve pH sı 7.4'e getirildikten sonra son hacim 2 L ye tamamlandı.

2.1,16 M KI: 9,628 g KI tartıldı ve distile suda çözülüp hacmi 50 mL ye tamamlandı.

3.Asetik asit: Saf olarak kullanıldı.

Deneyin Yapılışı

ELISA kuyucuklarına aşağıdaki tabloya göre pipetlemeler yapıp 340 nm' de absorbansları okunarak 261 mM⁻¹ molar absorbtivite katsayısı değerine göre hesaplama yapılmıştır.

	Kör (µL)	Numune (µL)
PBS	2000	1600
Numune	-	400
KI	100	100
2 dk. bekletildi.		
Asetik asit	200	200
340 nm'de absorbansları okundu.		

3.2.10. Toplam Oksidan Kapasite

Toplam oksidan kapasiteyi belirlemek için Özcan EREL'in oluşturduğu kolorimetrik bir method (82) kullanıldı. Bu method asidik ortamda farklı oksidan türleriyle Fe⁺² 'nin Fe⁺³,e yükseltgenmesi ve Fe⁺³,ün ksilenol oranj ile meydana getirdiği renk değişiminin 590 nm'de okunmasına dayalıdır.

Kullanılan Çözeltiler

1. Reaktif 1

25 mM H₂SO₄: 1,3873 mL % 96'lık (d= 1,84 g/cm³) H₂SO₄ distile suda çözülüp hacmi 1L tamamlandı.

0,114 g ksilenol oranj, 8,19 g NaCl, 98,9 mL gliserol 25 mM H₂SO₄ ile çözülüp hacmi 1 L tamamlandı.

2.Reaktif II

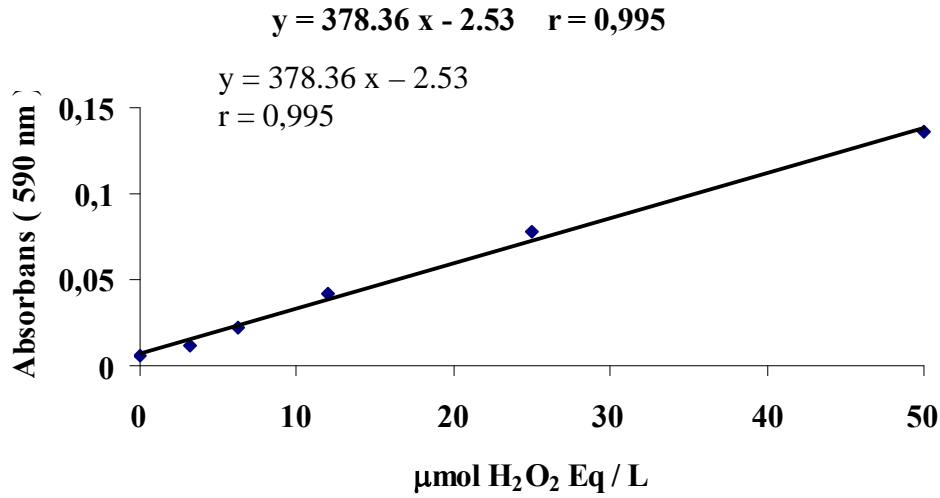
0,098 g (NH₄)₂Fe(SO₄)₂ , 0,1586 g o-dianizidin dihidroklorür tartıldı ve 25 mM H₂SO₄ile çözüldü ve son hacim 50 mL ye tamamlandı.

3.Standartlar: 3,125 , 6,25 , 12,5 , 25 , 50 ve 100 µmol H₂O₂ Eq/L olacak şekilde hazırlandı.

Deneyin Yapılışı

ELISA kuyucuklarına aşağıdaki tabloya göre pipetlemeler yapıp 590 nm'de absorbanları okundu ve elde edilen A1 değeri A2 değerinden çıkarıldı. Bu absorban değerine karşılık gelen konsantrasyon miktarı elde edilen standart grafiğinden hesaplandı. (şekil 8).

	Kör (µL)	Standart (µL)	Numune (µL)
Reaktif I	225	225	225
Distile su	35	-	-
Standart	-	35	-
Numune	-	-	35
A1: 590 nm'de ilk okuma yapıldı.			
Reaktif II	11	11	11
A2: 590 nm dalga boyunda 3. ve 4. dk.'lardaki ikinci okuma yapıldı.			



Şekil 8 : Toplam oksidan kapasite için standart grafiği

3.2.11. Toplam Antioksidan Kapasite

Fenton reaksiyonunun sonucu hidroksil (OH \cdot) radikalinin üretimi ile başlatılan etkili serbest radikal reaksiyonlarında oluşan renkli dianizidil radikalinin 444 nm'de spektrofotometrik ölçümüne dayalı bir yöntemdir (83).

Kullanılan Çözeltiler

1.Reaktif I

75 mM HCl asit: 6,41 mL HCl asit alınıp son hacim distile su ile 1000 mL ye tamamlandı.

75 mM KCl: 5,591 g KCl tartıldı ve distile su ile çözülüp son hacim 1000 mL ye tamamlandı.

800 mL KCl ve 200 mL HCl çözeltisi karıştırıldı.(pH 1,8).

10 mM o-dianizidin dihidroklorür: 3,17 g o-dianizidin dihidroklorür yukarıda oluşturulan karışım ile çözüldü ve son hacmi 1000 mL ye tamamlandı.

45 μM Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ . 6H₂O: 0,01764 g Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ . 6H₂O tartıldı ve içine o-dianizidin dihidroklorür eklenmiş olan karışım çözetmesine eklenip çözüldü ve son hacim 1000 mL ye tamamlandı.

2.Reaktif II

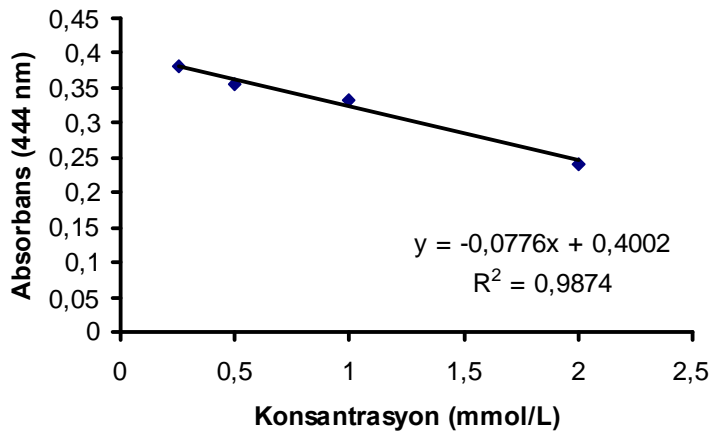
7,5 mM H₂O₂: 0,641 mL H₂O₂ yukarıda oluşturulan KCl + HCl (800 mL + 200 mL) karışımında çözülüp son hacmi 1000 mL ye tamamlandı.

3.Standartlar: 2 mM, 1 mM, 0,5 mM ve 0,25 mM konsantrasyonlara sahip troloks standartları hazırlandı.

Deneyin Yapılışı

ELISA kuyucuklarına aşağıdaki tabloya göre pipetlemeler yapıldı. Reaktif I eklendikten sonra 444 nm de yapılan okuma reaktif II eklendikten sonra 444 nm de yapılan okumadan çıkarılarak elde edilen absorbans değerine karşılık gelen konsantrasyon değeri aşağıdaki standart grafiğinden hesaplandı (Şekil 9).

	Kör	Standart	Numune
Distile su	5 µL	-	-
Standart	-	5 µL	-
Numune	-	-	5 µL
Reaktif I	200 µL	200 µL	200 µL
R1: 444 nm de ilk okuma yapıldı.			
Reaktif II	10 µL	10 µL	10 µL
R2: 444 nm de 3 yada 4. dk'larda ikinci okuma yapıldı.			



Şekil 9: Toplam antioksidan kapasite için standart grafiği

3.3. İstatistiksel Analizler

Her dört döneme ait değerler aritmetik ortalama ve standart sapma ($X \pm SD$) olarak ifade edildi. Parametrelerin normal dağılıma uygunluğu “Kolmogorov-Smirnov” testi yapılarak belirlendi. Normal dağılıma uyan parametreler “Tekrarlı ölçümlerde tek yönlü varyans analizi” yapılarak değerlendirildi. Normal dağılıma uymayan parametrelere önce “Friedman” testi uygulandı. Grup içi parametreler arasındaki ilişki ve yüzde değişimler arasındaki ilişki “Pearson” veya “Spearman” korelasyon testi kullanılarak incelendi. $p < 0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. “Tekrarlı ölçümlerde tek yönlü varyans analizi” yapılarak değerlendirilen parametreler için “F” değerleri, “Friedman” testi uygulanan parametreler için “ χ^2 ” değerleri verilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Demografik Bulgular

Çalışma grubuna ait demografik veriler tablo 6' te sunulmuştur. Çalışmada yer alan bireylerin vücut kitle indeksleri ve vücut ağırlıkları 60. ve 90. günde 30. güne göre anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi ($F_{kg} = 25,467$, $P_{kg} = 0,001$) ($F_{BMI} = 22,946$, $P_{BMI} = 0,001$).

Tablo 6: Çalışma grubuna ait demografik veriler.

	Yaş (yıl)	Cinsiyet (E/K)	Vücut Ağırlıkları (kg)			
			0. gün	30.gün	60.gün	90.gün
			82 ± 14	79,5 ± 13,7	77,9 ± 13,4	77,5 ± 13,4
Vücut Kitle İndeksi (kg/m ²)						
n = 15	43 ± 9	13/2	0. gün	30.gün	60.gün	90.gün
			27,87 ± 3,4	27,01 ± 3,1	26,43 ± 2,9	26,30 ± 2,8

4.2. Rutin Biyokimyasal Parametre Bulguları

Çalışma grubuna ait rutin biyokimya parametreleri tablo 7'te görülmektedir. Kolesterol, LDL-K ve ApoB-1 değerlerinde başlangıca göre diğer zaman dilimlerinde meydana gelen azalış istatistiksel olarak anlamlı iken trigliserid ve ApoA-1 değerlerinde başlangıç, 30.gün, 60.gün ve 90.gün numunelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlenmedi. HDL-K değerleri, 60. günde, başlangıç ve 30. gün'lere göre anlamlı yüksek bulundu.

Tablo 7: Çalışma grubunun dört döneme ait rutin biyokimya parametreleri.

	0. gün	30.gün	60.gün	90.gün	P	F*	X^{2**}
Kolesterol (mg/dL)	239 ± 18	216 ± 23 ^a	198 ± 25 ^a	214 ± 22 ^a	0,001	25,350	
Trigliserid (mg/dL)	205 ± 137	165 ± 116	145 ± 102 ^{a,b}	152 ± 90	0,106		6,120
HDL-K (mg/dL)	41 ± 6,9	42,4 ± 7	44,1 ± 8,5 ^{a,b}	43,2 ± 7,6	0,041	4,084	
LDL-K(mg/dL)	165 ± 25	150 ± 28 ^a	137 ± 25 ^a	148 ± 21 ^a	0,001	36,428	
Apo A-I (mg/dL)	135 ± 14,3	128 ± 17	133 ± 19,3	137 ± 13,7 ^b	0,107	3,029	
Apo B (mg/dL)	132 ± 18,5	113 ± 14,4 ^a	112 ± 20,3 ^a	118 ± 19 ^a	0,001	18,949	

p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi, a; I.dönem değerine göre anlamlıdır. b; II. dönem değerine göre anlamlıdır.
* “Tekrarlı ölçümlerde varyans analizi” ne göre “p” ve “F” değerleri. ** “Friedman analizi” ne göre “p” ve “χ²” değerleri.

Tablo 8: Hiperkolesterolemik şahısların dört döneme ait rutin biyokimya parametrelerinin fındık diyeti öncesi ve sonrası farkları ve yüzde değişimleri

	Δ Değişim (mg/dL)		P	% Değişim		P
	FÖ	FS		FÖ	FS	
Kolesterol	- 17,3 ± 13	15,3 ± 21,3	0,003	-8,03 ± 6,1	8,6 ± 12,1	0,003
Trigliserid	- 19,3 ± 28,8	6,9 ± 49,5	0,012	- 11,6 ± 13,9	9,1 ± 33,3	0,009
HDL-K	1,7 ± 3,1	- 0,93 ± 4,3	0,060	3,9 ± 7,8	- 1,3 ± 10,6	0,065
LDL-K	- 12,9 ± 11,1	10,9 ± 18	0,005	- 8,2 ± 6,9	9,3 ± 13,5	0,005
Apo A-I	4,9 ± 17,1	5,1 ± 15	0,814	4,7 ± 15,3	5,3 ± 13	0,861
Apo B	- 1,8 ± 14,3	6,1 ± 15,8	0,289	- 1,5 ± 13,1	7,3 ± 16,3	0,311

P < 0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Fındık tüketiminin etkisini gözlemek amacıyla 60. gün ile 30 gün (Fındık öncesi=FÖ) ve 60. gün ile 90. gün (Fındık sonrası=FS) değerlerin farkları ve yüzde değişimleri hesaplandı (Tablo 8). Kolesterol, Trigliserid ve LDL-K değişimleri, FÖ ve FS dönemlerde anlamlı fark gösterdi.

Değişimler arasındaki ilişkide incelendi. Fındık öncesi dönemde yüzde değişimleri yönünden, HDL-K ile trigliserid arasında anlamlı negatif ($r = -0,622$; $P = 0,013$), LDL-K ile kolesterol ($r = 0,746$, $P = 0,001$), Apo A-I ile HDL-K ($r = 0,746$; $P = 0,001$), Apo B ile kolesterol ($r = 0,693$; $P = 0,04$) ve Apo B ile LDL-K ($r = 0,546$; $P = 0,002$) arasında anlamlı pozitif ilişki olduğu tespit edildi. Fındık sonrası dönemde ise HDL-K ile trigliserid arasında anlamlı negatif ($r = -0,534$; $P = 0,04$) bir ilişki görülürken, kolesterol ile LDL-K ($r = 0,751$; $P = 0,001$) ve apo B ($r = 0,922$; $P = 0,001$), LDL-K ile HDL-K ($r = 0,581$; $P = 0,023$) ve Apo B ($r = 0,819$; $P = 0,001$) arasında anlamlı pozitif ilişkiler bulundu.

4.3. Eritrosit Membran Oksidan-Antioksidan Sistem Parametre Bulguları

Fındık yedirildikten sonra yani 60. gündeki değerler ilk geliş (0. gün) değerleri ile karşılaştırıldığında; eritrosit membranlarında, lipid peroksidasyonunu gösteren MDA değerlerinde anlamlı artma, protein oksidasyonu göstergesi olan ileri protein oksidasyon ürünlerinde (AOPP) ise anlamlı bir azalma belirlendi. Tiyol grubu (-SH) seviyelerinde ise anlamlı bir değişme gözlenemedi ($p>0,05$). Ayrıca hem oksidasyon kapasitesi göstergesi olan toplam oksidan statü (TOS) ve hem de antioksidan kapasite göstergesi olan toplam antioksidan statü (TAS) anlamlı bir şekilde artış gösterdi ($p<0,05$). TAS/TOS oranlarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamadı (Tablo 9).

Fındık öncesi ve fındık sonrası dönemler arasında eritrosit membranı oksidan-antioksidan sistem parametrelerinin değişimleri, istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermedi (Tablo 10).

Tablo 9: Hiperkolesterolemik bireylerin eritrosit membranı oksidan-antioksidan sistem değerleri.

	0. gün	30.gün	60.gün	90.gün	F*	P
MDA (nmol/mg protein)	181 ± 26	191 ± 34	203 ± 43 ^a	188 ± 36	6,998	0,019
TOS (nmol/mg protein)	62 ± 19	76 ± 22	84 ± 39 ^a	72 ± 24	8,110	0,013
TAS (µmol/mg protein)	0,44 ± 0,12	0,47 ± 0,10	0,55 ± 0,21 ^a	0,47 ± 0,09	9,594	0,008
T. SH (nmol/mg protein)	89 ± 16	79 ± 20	83 ± 24	81 ± 21	2,331	0,149
AOPP (nmol/mg protein)	6,67 ± 0,64	5,51 ± 1,53 ^a	5,56 ± 1,47 ^a	5,72 ± 1,53 ^a	6,227	0,026
TAS/TOS	7,54 ± 2,04	6,45 ± 1,62	6,74 ± 1,19	7,07 ± 1,97	4,99	0,042

P <0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi, a; I.dönem değerine göre anlamlıdır.

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

Tablo10: Hiperkolesterolemik bireylerin eritrosit membranı oksidan-antioksidan denge değerlerinin fındık diyeti öncesi ve sonrası farkları ve yüzde değişimleri.

	Δ Değişim		P	% Değişim		P
	FÖ	FS		FÖ	FS	
MDA (nmol/mg)	12 ± 58	-15 ± 44	0,191	9,22 ± 30,4	-5,28 ± 19,2	0,191
TOS (nmol/mg)	7,25 ± 47,2	11,79 ± 45,2	0,570	17,11 ± 57,6	-4,25 ± 42,8	0,394
TAS (µmol/mg)	0,078 ± 0,23	-0,076 ± 0,16	0,233	21,56 ± 48,8	- 6,28 ± 29,3	0,211
T. SH (nmol/mg)	3,15 ± 20,2	-1,88 ± 18,4	0,570	6,58 ± 30,9	0,92 ± 22,4	0,650
AOPP (nmol/mg)	0,054 ± 2,4	0,16 ± 1,7	0,394	14,57 ± 68,8	7,22 ± 31,8	0,394
TAS/TOS	0,29 ± 1,8	0,32 ± 2,1	0,910	11 ± 36	6,7 ± 34	0,776

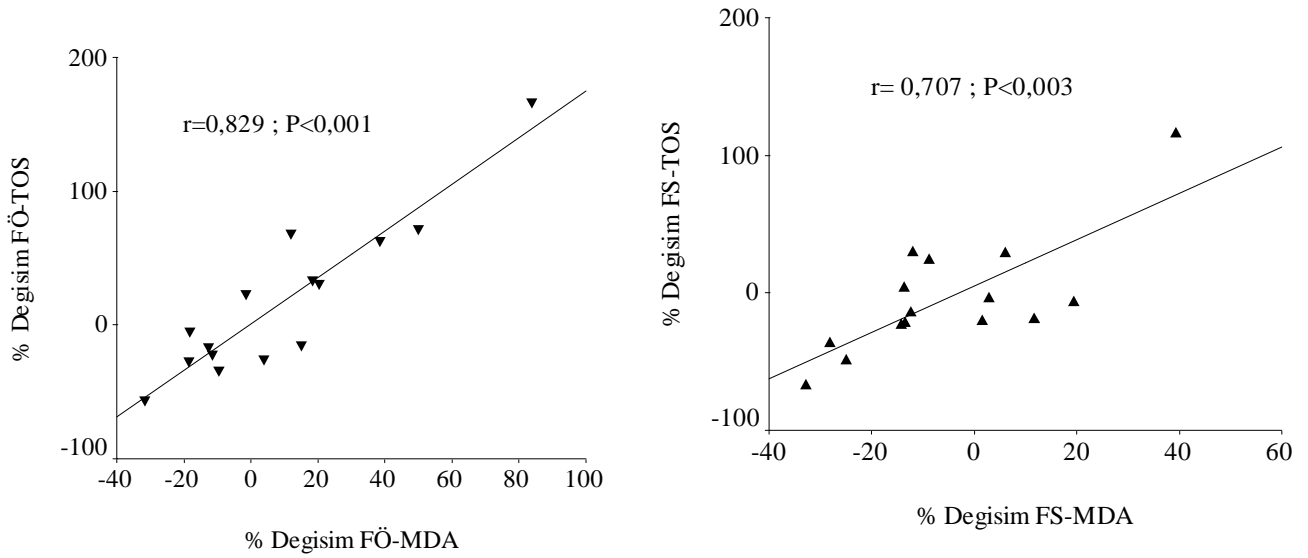
P <0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Eritrosit membranında incelenen parametreler arasındaki ilişki 0., 30., 60. ve 90. günde sadece MDA ile TOS arasında pozitif yönde anlamlı olup tablo 11 gösterilmektedir.

Tablo 11: Hiperkolesterolemik şahıslarda dört dönemdeki eritrosit membran MDA ve TOS arasındaki ilişkiler.

MDA	TOS		
		<i>r</i>	<i>P</i>
	Başlangıç	0,735	0,002
	30.gün	0,865	0,001
	60.gün	0,900	0,001
	90.gün	0,739	0,002

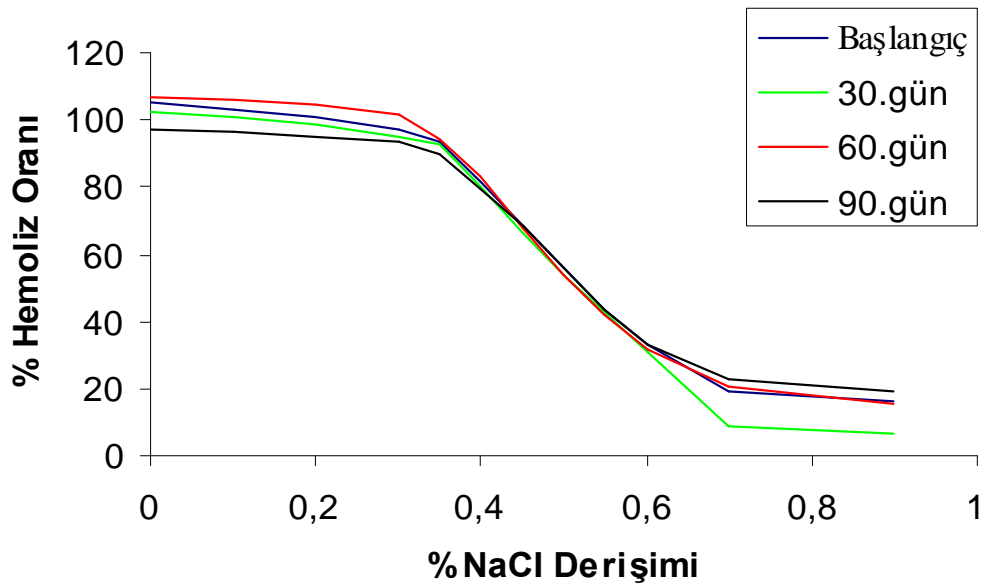
Fındık öncesi ve fındık sonrası dönemlerdeki % değişimlerde de yine MDA ve TOS arasında anlamlı pozitif ilişki görüldü (Şekil 10).



Şekil 10: 30.gün ve 60.gün (FÖ), 60.gün ve 90.gün (FS) MDA ve TOS yüzde değişimleri arasındaki ilişkiler.

4.4. Eritrosit Osmotik Frajilite Bulguları

Şekil 11'de görüldüğü gibi eritrosit yapısında meydana gelen hemolizin başladığı ve bittiği değerler (% 0,4-0,7 NaCl derişimi) arasında osmotik frajilite değerlerinde zaman dilimleri arasında istatistiksel bir farklılık bulunamadı ($P<0,05$).



Şekil 11: Dört farklı zaman dilimine ait osmotik frajilite değerlerinin karşılaştırmalı grafiği

5.TARTIŞMA

Sert kabuklu meyveler sınıfından olan fındık (*Corylus avellana L.*), yağ asidi, protein, karbohidrat, vitaminler, mineraller, diyet lifi, fitosteroller, tokoferoller, sikualenler, antioksidanlar, fenolikler ve fitokimyasal bileşimlerinden dolayı sağlıklı beslenmede önemli yer teşkil eder. Fındığın besleyici ve doyumsal özellikleri, onu gıda ürünleri için benzersiz ve ideal bir gıda haline getirmektedir. Çeşidine göre değişmekle birlikte 100 g fındık başına yaklaşık olarak 47-65 g yağ, 16-28 g karbohidrat ve 13-25 g protein (glutamat, arginin, aspartat ve lösince zengin) ihtiva etmektedir (1, 2). Özellikle yüksek miktardaki monoansature yağ asidi (oleik asit) ve E vitamini içeriği sayesinde kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu etkiye sahiptir. Yapısında bulunan özellikle α -tokoferoller ve polifenoller, fındığın antioksidan kapasitesinden sorumludurlar.

Bu çalışmaya, 15 hiperkolesterolemik birey dahil edilerek **0. günde** yani şahısların ilk gelişlerinde, **30. günde** yani ideal kilolarına göre günlük kalori kısıtlaması yapılarak hipokolesterolemik diyet uygulandıktan sonra, **60.günde** yani günlük kalori ihtiyaçlarının % 20 si fındık olacak şekilde (saat 10:⁰⁰-11:⁰⁰ arası ve saat 15:⁰⁰-16:⁰⁰ arası olmak üzere iki kere) diyet uygulandıktan sonra ve son olarak **90.günde** yani günlük ihtiyaçları kadar fındıksız hipokolesterolemik diyet uygulandıktan sonra olmak üzere dört kez kanları alındı ve bu kanlarda serum lipid parametreleri, eritrosit ozmotik frajilitesi ve eritrosit membranı lipid ve protein oksidasyonu incelendi. Fındığın normal öğünlerle alınan besinlerle etkileşimini azaltmak için günlük fındık alınımı ikiye bölündü, su dışında ilave içecek ve gıda alınımına müsaade edilmedi.

Çalışmada yer alan bireylerin vücut kitle indeksleri ve vücut ağırlıkları 60. ve 90. günde 30. güne göre anlamlı olarak azalmıştır. Durak ve ark. (7), sağlıklı bireylerin normal diyetlerine günde kilogram başına 1 g olacak şekilde 30 gün boyunca fındık ilave ederek yaptığı çalışmada vücut ağırlıklarının değişmediği gözlemlemiştir. Koçyiğit ve ark'ları (53) günlük kalori miktarının % 20' sini oluşturacak şekilde 3 hafta boyunca çam fıstığı tüketmiş sağlıklı normolipidemik bireylerde vücut kitle indekslerinin değişmediğini

saptamışlardır. Hiperkolesterolemik bireylerde de vücut ağırlığı ve vücut kitle indeksinin sert kabuklu meyve tüketimi ile değişmediği gözlenmiştir. Yapılan çalışmalar badem (84) ve cevizin (85, 86) hiperkolesterolemik bireylerin vücut ağırlıklarını etkilemediğini ortaya koymuştur. Bunlara ilaveten epidemiyolojik çalışmalar sert kabuklu meyve tüketim sıklığı ile vücut kitle indeksi arasında ters ilişki olduğunu göstermektedir. “Adventist Health Study” ve “Nurses’ Health Study” gibi on binlerce kişinin katıldığı çok geniş kohort çalışmalarında sert kabuklu meyve tüketimi ile vücut kitle indeksi arasında negatif ilişki olduğu rapor edilmiştir (87). 6.080 kişinin yer aldığı bir başka çalışmada ise (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis, MESA) sert kabuklu meyve ve tohum tüketim sıklığı ile vücut kitle indeksi arasında ters ilişki olduğu gösterilmiştir (88). Sert kabuklu meyvelerin sık tüketiminin tokluk hissini arttırması, yüksek miktardaki protein ve doymamış yağ asidi içeriği nedeni ile dinlenme halinde metabolik hızı arttırması ve yetersiz sindirilmeleri nedeni ile fekal yağ kaybının artıp kullanılabilir enerjinin azalması kilo kaybının sebepleri olarak düşünülmektedir (87, 89).

Hipokolesterolemik diyet sonrası, şahısların total kolesterol, trigliserid, LDL-kolesterol ve apo B seviyeleri düşüş, HDL-kolesterol ve apo A-I seviyeleri yükseliş gösterdi. Ancak bu değişimlerden sadece total kolesterol, LDL-kolesterol ve apo B anlamlı idi ($p<0.05$). Diyetlerine fındık katıldıktan sonra ise, kolesterol (% 8,03), trigliserid (% 11,6), LDL-kolesterol (% 8,2) ve apo B (% 1,5) seviyeleri düşmeye, HDL-kolesterol (% 3,9) ve apo A-I (% 4,7) seviyeleri yükselmeye devam etti. Bu değişiklikler, başlangıç ile anlamlı iken, sadece trigliserid ve HDL-K 30.gün (fındık öncesi dönem) ile istatistiksel olarak anlamlı idi. 90.günde ise total kolesterol (% 8,6), trigliserid (% 9,1), LDL-kolesterol (%9,3) ve apo B (% 7,3) seviyelerinin yükselişe, HDL-kolesterol (% 1,3) seviyesinin düşüşe geçtiği görüldü. Ancak bu değişiklik fındık yedirildikten sonra gözlenen istatistiksel olarak farklı değildi.

Diyetle alınan yağların plazma lipid düzeyleri ve lipoproteinlerin yağ asidi bileşimi üzerinde etkili olması ateroskleroz ve koroner arter hastalığı gelişiminde oldukça önemlidir. Doymuş yağ oranının düşük ve monoansature yağ asitleri (MUFA) oranının yüksek olduğu diyetler plazma lipid düzeylerinin kontrolünde etkili olmaktadır. Fındıkta yüksek oranda bulunan MUFA ile zenginleştirilmiş beslenmenin plazma toplam kolesterol, trigliserid, LDL kolesterol ve HDL kolesterol düzeyleri üzerindeki olumlu etkilerini gösteren çalışmalar mevcuttur (90, 8, 9). Ortalama trigliserid ve apo A değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişme gözlenmemiştir. Durak ve ark.(7) sağlıklı bireylerde fındığın

toplam kolesterolü % 6, LDL kolesterolü % 19 düşürdüğü, HDL kolesterolü % 7, trigliseridi % 25 ve toplam antioksidan potansiyeli % 20 yükselttiğini gözlemişlerdir Sert kabuklu meyve tüketiminin hiperkolesterolemik bireylerde de lipid profili üzerine etkili olduğu birçok çalışma ile gösterilmiştir. Ros ve ark. (91) hiperkolesterolemik bireylere enerjinin % 32' sini oluşturan MUFA yerine cevizin yer aldığı "Akdeniz Diyeti" benzeri bir diyet uygulamışlar ve toplam kolesterol ve LDL kolesterol düzeylerinin azaldığını bulmuşlardır. Azalan kolesterol düzeyi ile artan alfa-linolenik asit ve γ - tokoferol arasında korelasyon tespit etmişlerdir. Bu bulgu sert kabuklu meyvelerin kolesterolü düşürmelerinin yanında kalp hastalıklarından korunmada etkili olmalarının diğer bir sebebini açıklamaktadır. Zambon ve ark. (92) cevizle benzer bir çalışma yapmışlar ve toplam kolesterol, LDL kolesterol, VLDL kolesterol, trigliserid, apo B, apo AI ve Lp (a) düzeylerinin daha da azaldığını gözlemişlerdir. Hiperlipidemik bireyler üzerinde badem ile yapılan başka bir çalışmada toplam kolesterol ve LDL kolesterol miktarlarının düştüğü tespit edilmiştir (84). Garg ML ve ark'larının hiperkolesterolemik şahıslar üzerinde yaptığı çalışmada, 17 kişiye (erkek) 1 ay boyunca sert kabuklu meyve yedirilmiş ve LDL kolesterol konsantrasyonunun anlamlı bir şekilde azaldığı ve HDL kolesterolün trigliserid üzerinden anlamlı bir değişim olmadan arttığı gözlenmiştir (90). Sabate ve ark. 18 normolipidemik şahsın yarısına bir ay boyunca günlük enerji ihtiyaçlarının % 20 sini karşılayacak şekilde fındık yedirmiş ve çalışma sonunda fındık diyeti uygulanan şahıslarda toplam kolesterol değerlerinde düşme gözlemişlerdir (8). Iwamoto ve ark'larının yaptığı bir çalışmada 55 hiperkolesterolemik bireye (yaşları ortalama 56) günlük alınan tekli doymamış yağ miktarının % 35 i çıkarılarak bunun yerine fındık diyeti verilmiştir. Fındık diyeti sonunda toplam kolesterol seviyelerinin bayanlarda ve erkeklerde anlamlı bir şekilde azaldığı bulunmuştur (9).

Diyetin serum lipoprotein içeriğini değiştirdiği ve bundan dolayı sürekli değişim halinde olan eritrosit membran içeriğininide değiştirdiği yapılan çalışmalarla ortaya koyulmuştur. Bazı araştırmacılar, membran kolesterolünün bir antioksidan olarak görev alabileceğini (93) ve eritrosit membranını oksidan strese karşı koruyabileceğini önermişlerdir (94). Ayrıca kolesterolün hemoglobinle etkileştiği ve hemoglobinin yeni bir kolesterol taşıyıcısı olabileceği ileri sürülmüştür (95). Kolesterol lipid çift tabakaya kovalent bağlarla tutunmadığı için, plazma membranından içeriye ve dışarıya serbestçe hareket edebilirler. Bu özelliği nedeniyle kolesterol plazma lipoproteinlerine yada lipoproteinlerden membrana aktarılabilmektedir. Membran kolesterol içeriğinin

değişmesiyle, hücre deformasyonunda meydana gelen değişimleri gözlemek için eritrosit hücrelerinde osmotik frajilite taylorleri yapılmaktadır. Osmotik frajilitenin ölçümü , in vitro olarak hücre membranı ve yağ asitlerinin etkileşiminin göstergesi olduğu için yararlı bir indikatör yöntemdir. Osmotik frajilitedeki değişimin nedeni; (% 0.2-0.9' lık) NaCl 'ün konsantrasyon artışıyla oluşan osmotik basınç değişimi sonucu oluşan hemoliz olayıdır. Osmotik frajilite, kısa zincirli yağ asitlerinin konsantrasyonlarına ve hidrokarbon zincirlerinin miktarlarına bağlı olarak etkilenmektedir. İzo-C4 ve izo-C5' in her ikisinde dallanmış karbon zincirleri oldukları için normal karbonlulara göre osmotik frajiliteyi zayıflatıcı etki gösterirken düz karbonlular osmotik frajiliteyi arttırmaktadır. Monoansature yağ asitlerinin içeriğindeki monokarboksilik asitler eritrosit membranındaki fosfolipid alanı etkileyerek osmotik basıncı zayıflatır. Etkilenme derecesi hücre membranındaki hidrofobik hidrokarbon zincirlerinin uzunluğu, boyutu, biçimine bağlı olarak değişir (96).

Bu çalışmada, dört farklı zaman diliminde alınan kanlarda eritrositlerin osmotik frajilitesi değerlendirildi. Ancak farklı zamanlara ait osmotik frajilite değerleri arasında farklılık görülmedi. Kempaiah ve ark'ları (97), osmotik frajilite değerlerinin kontrol grubuna göre hiperkolesterolemik şahıslarda artmış olduğunu ifade etmişlerdir. Muller ve ark'ları (98) hiperlipidemiye bağlı olarak eritrosit membran yapısında bazı önemli farkların olduğunu bulmuşlar, fakat hiperkolesterolemik şahıslar ve sağlıklı şahısların membran akışkanlığı arasında herhangi bir anlamlı fark bulamamışlardır.

Eritrosit membranının % 40 ı lipid (fosfolipid ve kolesterol), % 52 si protein, ve % 8 i karbohidrattır. Eritrosit mebranında yağ asitlerinin miktarsal dizilimi şöyledir : doymuş yağ asitleri > çoklu doymamış yağ asitlerinden (PUFA) > tekli doymamış yağ asitleri (MUFA). Bunlardan özellikle, doymuş yağ asitlerinden palmitik asit ve stearik asit, PUFA'lerden linoleik asit ve araşidonik asit, ve MUFA'lerden oleik asit yüksek miktardadır (16). Eritrosit membranları yüksek çoklu doymamış yağ asitlerinin içeriği ve yüksek oksijen içeriğinden dolayı oksidatif hasara maruz kalmaktadırlar. Lipid peroksil radikalleri membran lipidlerini lipid hidroperoksidlere dönüştürerek membranın yapısını ve fonksiyonunu değiştirmektedir. Lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden birisi de malondialdehit (MDA)'dır. Serbest radikallerin etkisiyle membran lipidlerinin peroksidasyonu sonucu oluşan MDA, membran sertliğinin artmasına sebep olur (62, 7).

Bu çalışmada, eritrosit membranı MDA değerleri fındık yedirilen zaman diliminde(60. günde) hipokolesterolemik diyet öncesi zaman dilimine (0. güne) göre yüksek olmasına rağmen fındık öncesi zaman dilimine (30. güne) göre anlamlı yükseklik

bulunamadı. Balkan ve ark'ları (99) fındık yağı içeren diyetle beslenen tavşanlarda plazma MDA değerlerinin artmış olduğu gözlenmiştir. Ancak hiperkolesterolemik tavşanlarda fındık sonrası plazma MDA değerlerinin düşük olduğunu rapor etmişlerdir. Özdemirler ve ark'ları (100) MDA değeri hiperkolesterolemik şahıslarda daha yüksek bulunmuşlardır.

Bu çalışmada, eritrosit membranı toplam oksidan statü (TOS) fındık diyetinin etkisiyle % 7,25 artmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. Sadece 60. gün ile 0. gün arasında anlamlı bir fark vardı. Tüm kan toplanma dönemlerinde eritrosit membranı MDA seviyeleri ile TOS seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulundu ($P<0.002$). Ayrıca bunların fındık zaman dilimi ($r=0,829$; $P<0.001$) ve fındık sonrası ($r=0,707$; $P<0.003$) zaman dilimindeki % değişimleri arasında da oldukça anlamlı bir ilişki görüldü. Toplam antioksidan statü (TAS), hipokolesterolemik diyet, ve fındık ilaveli diyetle artış gösterdi. Fındık sonrası TAS, 60.günde başlangıça göre anlamlı yüksek iken, TAS'daki artış, fındık öncesine (30.gün) göre istatistiksel olarak anlamlı değildi. TAS/TOS oranında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadığı için fındığın eritrosit membranlarındaki toplam oksidan-antioksidan dengeyi değiştirmediği görüldü.

Eritrosit membran iskeleti, eritrosit şeklini muhafaza etmede fonksiyon gören bir protein ağı ile çevrelenmiştir. Eritrosit iskeletinin en önemli proteinleri, spectin, aktin, bant 3 bant 4.1 ve ankirindir. Eritrosit membran proteinlerindeki herhangi bir hasar, eritrositlerin anormal şekil almasına, yapısal bozukluklara ve sonuçta anemiye neden olabilir (100). Oksidanlar, β -spektrin ve protein 4.1'e hasar vererek spektrin-4.1-aktin kompleksi oluşumunu engellerler. Protein 4.1'de 7 tane sistein kalıntısı mevcuttur (101).

Proteinlerin oksidasyonu sonucu, protein tiyol gruplarının kaybı, ileri oksidasyon protein ürünleri (AOPP) oluşur. Reaktif ürünler ya peptid bağları ile ya da doğrudan amino asit yan zincirleri ile reaksiyona girerler. Oksidatif değişikliğe uğramış proteinler ya düşük molekül ağırlıklı ürünlere ayrılırlar ya da yüksek molekül ağırlıklı ürünleri oluştururlar. Reaktif oksijen türevlerinin proteinlerle etkileşimi sonucunda, histidin, prolin, arjinin ve lizin gibi çok sayıda amino asit yan zincirinde veya proteinlerin peptid omurgasında oluşan oksidatif hasara bağlı olarak protein karbonil ürünleri meydana gelir. Serbest radikaller, proteinlerin tiyol (-SH) gruplarına etki ederek tiil radikali (-S \cdot) proteinlerdeki disülfid bağlarının oluşumuna yol açarlar (102, 103). Tiyoller ve diğer sülfür bileşikleri, oksidasyon ürünlerini yakalayarak veya oksidasyona maruz kalmış molekülleri tamir ederek antioksidan etkilerini gösterirler (104). Proteinlerin oksidatif stres belirteci olarak

son zamanlarda ileri oksidasyon protein ürünleri (AOPP) kullanılmaktadır (105). AOPP, ditirozin içeren çapraz bağlı protein ürünleridir (105).

Bu çalışmada eritrosit membranı AOPP değerleri fındık sonrasında ilk geliş değerlerine göre düşük bulunmasına rağmen fındık öncesine göre anlamlı bir değişiklik görülemedi. Diğer taraftan tiyol grubu değerlerinde de tüm zaman dilimleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. Koter ve ark., tip-2 hiperkolesterolemik şahıslarda eritrosit membran SH grubu seviyesini düşük bulmuşlardır (106). Özdemir ve ark. Hiperkolesterolemik şahısların eritrosit membranında MDA ve karbonil grubu seviyesini yüksek, sülfidril grubu seviyesini düşük bulmuşlar ve hiperkolesterolemik bireylerin eritrosit membranlarının oksidatif strese maruz kaldıklarını ifade etmişlerdir (100).

Sonuç olarak, hiperkolesterolemik şahısların diyetlerine fındık eklenmesi, plazma lipid parametrelerine etki etmesine ilaveten eritrosit membranı lipid ve protein oksidasyonunu da etkilemiş ancak oksidan-antioksidan dengeyi bozmamıştır. Bu konuya aydınlık kazandırılabilmesi için bu hastalarda eritrosit membranı ile daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç vardır. Çalışmalar tez kapsamı dışında olup proje çerçevesinde devam edecektir.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

6.1. Sonuçlar

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

1. Vücut kitle indeksleri ve vucut ağırlıkları, hem diyetin etkisi ile ve hem de fındık tüketimi ile azalma gösterdi.
2. Aterojenik lipid parametrelerin seviyeleri hem diyetin etkisi ile ve hem de fındık tüketimi ile azaldı.
3. MDA değerlerinde başlangıç değerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ancak fındık öncesi 30.güne göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişim bulunamadı. TOS değerlerinde başlangıç değerine göre meydana gelen artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ancak fındık diyeti öncesi döneme göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu. Yapılan korelasyonlarda TOS ile MDA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon bulundu ($r = 0,900$; $P < 0,05$).
4. TAS değerlerinde başlangıç değerine göre meydana gelen artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ancak fındık öncesi 30.güne göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu.
5. TAS/TOS değerlerinde, zaman dilimine bağlı olarak anlamlı bir değişim gözlenmedi.
6. AOPP değerlerinde başlangıç değerine göre meydana gelen azalış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ancak fındık öncesi 30.güne göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişim yoktu. T.SH değerlerinde zaman dilimleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($P > 0,05$).

6.2. Öneriler:

1. Numune sayısı artırılarak daha geniş bir çalışma yapılabilir.
2. Eritrosit membran proteinlerindeki muhtemel değişiklikleri gözlemleyebilmek amacıyla poliakrilamid jel elektroforezi yapılabilir.
3. Yapısal değişiklikleri incelemek amacı ile Na^+ - K^+ ATPaz ve diğer membran proteinlerinin aktiviteleri bakılabilir.

7. ÖZET

FINDIK TÜKETİMİNİN HİPERKOLESTEROLEMİK ŞAHISLARIN ERİTROSİT MEMBRANI LİPİD VE PROTEİN OKSİDASYONUNA ETKİSİ

Fındık (*Corylus avellana L.*), yüksek miktardaki tekli doymamış yağ asidi (oleik asit) ve E vitamini içeriği nedeni ile kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu etkiye sahiptir.

Eritrosit membranı lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonunu belirlemek amacıyla 15 hiperkolesterolemik birey çalışmaya dahil edildi ve dört kez kanları alındı; hipokolesterolemik diyet öncesi (0. gün), hipokolesterolemik diyet sonrası (30.gün), 60.gün hipokolesterolemik diyet + Fındık tüketimi sonrası (60. gün) ve son olarak hipokolesterolemik diyet sonrası (90). İşlenmemiş fındık tüketimi, günlük enerji ihtiyaçlarının % 20'sine karşılık gelmekte idi.

Diyetin etkisi ile serumda aterojenik lipid parametreleri anlamlı düşük bulundu. Eritrosit membranlarında, 60. günde 0. güne göre, lipid peroksidasyon göstergesi olan malondiadehit (MDA) seviyesinde anlamlı artma ($P<0,05$), protein oksidasyonu göstergesi olan ileri protein oksidasyon ürünlerinde (AOPP) ise anlamlı bir azalma ($P<0,05$) gözlemlendi. Tiyol grubu seviyelerinde ise anlamlı bir değişim elde edilmedi. Diğer taraftan hem toplam oksidan statü (TOS) ve hem de toplam antioksidan statü (TAS) seviyelerinde anlamlı bir şekilde artış bulundu ($P<0,05$). Ancak oksidan-antioksidan denge göstergesi olan TAS/TOS oranında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilemedi. Son olarak, eritrosit ozmotik fragilite değerlerinde dönemler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmedi.

Sonuç olarak, fındık tüketimi hiperkolesterolemik bireylerin eritrosit membranı lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonu seviyelerini etkilediği ancak toplam oksidan antioksidan dengesini etkilemediği kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: Fındık, Hiperkolesterolemi, Eritrosit Membranı, Lipid Peroksidasyonu, Protein Oksidasyonu

8. SUMMARY

THE EFFECTS OF HAZELNUT CONSUMPTION ON ERYTHROCYTE MEMBRANE LIPID AND PROTEIN OXIDATION IN HYPERCHOLESTEROLEMIC INDIVIDUALS

Hazelnut (*Corylus avellana L.*) has a protective effect on cardiovascular disease because of its high content of monounsaturated fatty acid (oleic acid) and vitamin E.

In the present study, 15 hypercholesterolemic individuals were included to determine erythrocyte membrane lipid peroxidation and protein oxidation and their bloods were taken four times; before hypocholesterolemic diet (0th day), after hypocholesterolemic diet (30th day), after hypocholesterolemic diet with hazelnut consumption (60th day), and finally after hypocholesterolemic diet (90th day). Natural hazelnut diet corresponded to 20 % of their dairy energy.

The atherogenic lipid parameters were found significantly decreased as a result of diet. In erythrocyte membranes, a significant increased in the levels of the malondialdehyde (MDA) as the lipid peroxidation product but a significant decreased in the levels of the advanced protein oxidation products (AOPP) as protein oxidation indicator were observed in the day 60 when compared the day 0 ($P<0.05$). No significant change was obtained in the thiol levels. On the other hand, the significant increases ($P<0.05$) were found in the levels of either total oxidant status (TOS) or total antioxidant status (TAS). But no significant difference was not obtained in the propotion of TAS/TOS as an indicator of oxidant-antioxidant balance. Finally, no sitatistically significant change was observed in the levels of erythrocyte osmotic fragility.

It was concluded that hazelnut consumption in hypercholesterolemic individuals affected lipid peroxidation and protein oxidation of erythrocyte membranes but did no change total oxidant-antioxidant balance.

Keywords: Hazelnut, Hypercholesterolemia, Erythrocyte Membrane, Lipid Peroxidation, Protein Oxidation.

9. KAYNAKLAR

1. Seyhan, F., Ozay, G., Saklar, S., Ertaş, E., Satır, G., Alasalvar, C., “Chemical changes of three native Turkish hazelnut varieties (*Corylus avellana* L.) during fruit development”, *Food Chemistry*, 105:590-596, 2007.
2. Köksal, A.İ., Artık N., Şimşek A., Güneş, N., “Nutrient composition of hazelnut (*Corylus avellana* L.) varieties cultivated in Turkey”, *Food Chemistry*, 99:509-515, 2006.
3. Baysal, A., “Fındığın beslenme ve sağlık yönünden nemi”, 3. Milli Fındık Şurası Tebliğler Kitabı, Uğur Eğitim Hizmetleri ve Yayımcılık, Ocak., 587-588, 2006.
4. Pehlivanoğlu, S., “Kalp ve Damar Hastalıklarından Korunmada Fındığın Etkisi”, 3. Milli Fındık Şurası Tebliğler Kitabı, Uğur Eğitim Hizmetleri ve Yayımcılık, Ocak., p.584-586, 2006.
5. Yağmur, C. ve zer, A., “Fındığın insan beslenmesi ve sağlığındaki nemi”, 3. Milli Fındık Şurası Tebliğler Kitabı, Uğur Eğitim Hizmetleri ve Yayımcılık, Ocak., p.602-607,2006.
6. Akurt, F., “Fındığın beslenme ve sağlık açısından değerlendirilmesi”, 3. Milli Fındık Şurası Tebliğler Kitabı, Uğur Eğitim Hizmetleri ve Yayımcılık, Ocak, 2006, p.596-601.
7. Durak, İ., Köksal, İ., Kaçmaz, M., Bykkoak, S., imen, B.M.Y., ztrk, H.S., “Hazelnut supplementation enhances plasma antioxidant potential and lowers plasma cholesterol levels”, *Clinica Chimica Acta*, 284:113-115, 1999.

8. Sabate, J., Fraser, G., Burke, K., Knutsen, S.F., Bennett, H., Lindsted, K.D., “Effects of walnuts on serum lipid levels and blood pressure in normal men”, *N. Engl. J. Med.*, 382:603– 607, 1993.
9. Iwamoto, M., Imaizumi, K., Sato, M., Hirooka, Y., Sakai, K., Takeshita, A., Kono, M., “Serum lipid profiles in Japanese women and men during consumption of Walnuts”, *Eur. J. Clin. Nutr.*, 56:629–637, 2002.
10. Köksal, A.İ., Artik, N., Şimşek, A., Güneş, N., “Nutrient composition of hazelnut (*Corylus avellana* L.) varieties cultivated in Turkey”, *Food Chemistry*, 99: 509–515, 2006.
11. KURATA, M., SUZUKI, M., AGAR, N.S., “Antioxidant systems and erythrocyte life-span in mammals”, *Comp. Biochem. Physiol. B.*, 106: 477-487, 1993.
12. López-Revuelta, A., Sánchez-Gallego, J.I., García-Montero, A.C., Hernández-Hernández, A., Sánchez-Yagüe, J., Llanillo, M., “Membrane cholesterol in the regulation of aminophospholipid asymmetry and phagocytosis in oxidized erythrocytes”, *Free Radical Biology & Medicine*, 42:1106–1118, 2007.
13. Naylor, C.E., Rowland, P., Basak, A.K. et al., “Glucose 6-phosphate dehydrogenase mutations causing enzyme deficiency in a model of the tertiary structure of the human enzyme”, *Blood*, 87:2974-2982, 1996.
14. Martinez Cayuela M., “Oxygen free radicals and human disease”, *Biochimie*, 77:147-161, 1995.
15. www.mustafaaltinisik.org.uk/89-1-14.pdf, “Eritrositler ve hemoglobin metabolizması”.
16. Krachler, B., Norberg, M., Eriksson, J.W., Hallmans, G., Johansson, I., Vessby, B., Weinehall, L. and Lindahl, B., “Fatty acid profile of the erythrocyte membrane preceding development of Type 2 diabetes mellitus”, *Metabolism & Cardiovascular Diseases*, 1-8, 2007.

17. www.ibp.org.by/bsc/volot.ppt

18. Malik, S., Sami, M. and Watts, A., “A role for band 4.2 in human erythrocyte band 3 mediated anion transport”, *Biochemistry*, 32:10078-10084, 1993.

19. CHEESEMAN, K.H., SLATER, T.F., “An introduction to free radical biochemistry” *Br Med Bull.*, 49(3):481-93, 1993.

20. AKKUŞ, İ., “Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri”, Mimoza yayınları, Kuzucular ofset, Konya, 34-35, 1995.

21. GUTTERIDGE, J.M., “Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage”, *Clin. Chem.*, 41(12 Pt 2):1819-28, 1995.

22. YANBEYİ, S., “Aspirin ve antioksidant buthylated hydroxyanisole’ün tavşanlarda eritrosit total katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri üzerine etkileri” Ondokuz Mayıs Üni. Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Samsun, 88s (yayınlanmamış), 1999.

23. DİKİCİ, İ., “Akut viral hepatitlerle interferon tedavisi görmüş kronik viral hepatitlerde oksidatif stresin araştırılması”, Selçuk Üni. Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Konya, 73s (yayınlanmamış), 1999.

24. Gate, M., Paul, J., Nguye, B.G., Tew, K. D., Tagiero,H., “Oxidative stres induced in pathologies: The role of antioxidants”, *Biomed&Pharmacother*, 53:169-180,1999.

25. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., “The importance of free radicals and cataytic metal ions in human diseases”, *Molec. Aspects Med.*, 8:89-93, 1985.

26. Swallow A.J., “Radiation chemistry of organic compounds”, *New York, John Wiley & Sons*, 211-224, 1960.

27. Garrison, W.M., Jayko, M.E., Bennett W., "Radiation-induced oxidation of protein in aqueous solution", *Rad Research*, 16: 483-502, 1962.
28. Schuessler, H., Schilling, K., "Oxygen effect in radiolysis of proteins", Part 2. Bovine serum albumin. *Int. J. Radiat Biol.*, 45: 267-281 1984.
29. Shacter, E., "Protein oxidative damage", *Methods Enzymol.*, 319: 428-436, 2000.
30. Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Colombo, R., Rossi, R., Milzani, A., "Protein carbonylation in human diseases", *Trends Mol. Med.*, 9: 169-176, 2003.
31. Levine, R.L., "Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease", *Free Radic. Biol. Med.*, 32: 790-796, 2002.
32. Stadtman, E.R., Levine, R.L., "Protein oxidation", *Ann N. Y. Acad. Sci.*, 899: 191-208, 2000.
33. Bindoli, A., Rigobello, M.P., "Mitochondrial thioredoxin reductase and thiol status", *Methods Enzymol.*, 347: 307-316, 2002.
34. Netto, L.E.S., Kowaltowski, A.J., Castilho, R.F., Vercesi, A.E., "Thiol enzymes protecting mitochondria against oxidative damage", *Methods Enzymol.*, 348:260-270, 2002.
35. Gow, A.J., Duran, D., Malcolm, S., Ischiropoulos, H., "Effect of peroxynitrite-induced protein modifications on tyrosine phosphorylation and degradation", *FEBS Lett*, 385:63-66, 1996.
36. Halliwell, B., "What nitrates tyrosine? Is nitrotyrosine specific as a biomarker of peroxynitrite formation in vivo", *FEBS Lett*, 411: 157-160, 1997.

37. Ter Steege, J.C.A., Koster-Kamphuis, L., van Straaten, E.A., Forget, P.P., Burman, W.A., "Nitrotyrosine in plasma of celiac disease patients as detected by a new sandwich ELISA", *Free Radic. Biol. Med.*, 25: 953-963, 1998.
38. Alderman, C.J.J., Shah, S., Foreman, J.C., Chain, B.M., Katz, D.R., "The role of advanced oxidation protein products in regulation of dendritic cell function", *Free Radic. Biol. Med.*, 32: 377-385, 2002.
39. Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Nguyen Khoa, T., Capeillere-Blandin, C., Nguyen, A.T., Canteloup, S., Dayer, J.M., Jungers, P., Drüeke, T., Descamps-Latscha, B., "Advanced oxidation protein products as a novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure", *J. Immunol.*, 161: 2524-2532, 1998.
40. Berlett, B.S., Stadtman, E.R., "Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress", *J. Biol. Chem.*, 272: 20313-20316, 1997.
41. Dean, R.T., Fu, S., Stocker, R., Davies, M.J., "Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation", *Biochem. J.*, 324: 1-18, 1997.
42. Kayalı, R., Telci, A., Çakatay, U., Karaca, Ç., Akçay, T., Sivas, A., Altuğ, T., "Oxidative protein damage parameters in plasma in chronic experimental diabetes in rats", *Eur. J. Med. Res.*, 8: 307-312, 2003.
43. Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Capeillere-Blandin, C., Nguyen-Khoa, T., Nguyen, A.T., Zingraff, J., Jungers, P., Descamps-Latscha, B., "Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia", *Kidney Int.*, 49: 1304-1313, 1996.
44. Hoff, H.F., O'Neil, J., "Structural and functional Changes in LDL after modification with both 4-hydroxynonenal and malondialdehyde", *J. Lipid Res.*, 34:1209-1217, 1993.
45. Jialal, I., Devaraj, S., "Low-density lipoprotein oxidation, antioxidants and atherosclerosis: a clinical biochemistry perspective", *Clin. Chem.*, 42:498-506, 1996.

46. Aviram, M., “Malondialdehit affects the physico-chemical and biological characteristics of oxidized low density lipoprotein”, *Atherosclerosis*, 34:141-143, 1990.
47. Korytár, P., Molnárová, M., Sivoðová, M., Šitòanová, I., Ulièná, O., Liptáková, A., Èársky, J. and Ľuraèková, Z., “Effects of Aminoguanidine Schiff's Base on Biomarkers of the Oxidative Stress, 4-hydroxy-2-nonenal and Conjugated Dienes, in the Model Diabetes Mellitus”, *Gen. Physiol. Biophys*, 21:337-344, 2002.
48. Sevanian, A., Ursini, F., “Lipid peroxidation in membrane and low density lipoproteins: similarities and differences”, *Free Rad. Biol. Med.*, 29:306-311, 2000.
49. Estebauer, H., Wa, G., Puhl, H., “Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis”, *Br. Med. Bul.*, 49:566-576, 1993.
50. Vincent, A.M., Russell, J.W., Low, P., Feldman, E.L., “Oxidative Stress in the Pathogenesis of Diabetic Neuropathy”, *Endocrine Reviews*, 25: 612–628, 2004.
51. Aviram, M., “Malondialdehit affects the physico-chemical and biological characteristics of oxidized low density lipoprotein”, *Atherosclerosis*, 34:141-143, 1990.
52. Lørgen, M. and Salen, P., “Alpha-linolenic acid and coronary heart disease”, *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, 14: 162-169, 2004.
53. Koçyiğit, A., Koylu, A.A., Keleş, H., “Effects of pistachio nuts consumption on plasma lipid profile and oxidative status in healthy volunteers”, *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 16: 202-209, 2006.
54. Jenkins, D.J.A., Kendall, C.W.C., Marchie, A., Parker, T.L., Connelly, P.W., Qian, W., Haight, J.S., Faulkner, D., Vidgen, E., Lapsley, K.G., Spiller, G.A., “Dose Response of Almonds on Coronary Heart Disease Risk Factors: Blood Lipids, Oxidized Low-Density Lipoproteins, Lipoprotein (a), Homocysteine, and Pulmonary Nitric Oxide”, *Circulation*, 106: 1327-1332, 2002.

55. Fraser, G.E., “Nut Consumption, Lipids and Risk of a Coronary Event”, *Clin. Cardiol.*, 22 (Suppl. III): III-11-III15, 1999.
56. Jenkins, D.J.A., Kendall, C.W.C., Popovich, D.G., Vidgen, E., Mehling, C.C., Vuksan, V., Ransom, T.P.P., Rao, A.V., Rosenberg-Zand, R., Tariq, N., Corey, P., Jones, P.J.H., Raeini, M., Story, J.A., Furumoto, E.J., Illingworth, D.R., Pappu, A.S., Connelly, P.W., “Effect of a Very-High-Fiber Vegetable, Fruit and Nut Diet on Serum Lipids and Colonic Function”, *Metabolism*, vol. 50, no. 4, April, 494-503, 2001.
57. Mukudem-Petersen, J., Oosthuizen, W. and Jerling, J.C., “A systematic review of the effects of nuts on blood lipid profiles in humans”, *The Journal of Nutrition*, 8 June, 2005.
58. Pehlivanoglu, S., “Kalp ve Damar Hastalıklarından Korunmada Fındığın Etkisi”, 3. Milli Fındık Şurası Tebliğler Kitabı, Uğur Eğitim Hizmetleri ve Yayımcılık, Ocak, 2006, p.584-586.
59. Bayram, F., Şahan, S., Kurtoğlu, S., Karadeniz, T., “Sağlık ve beslenme gözüyle fındık”, 3. Milli Fındık Şurası Tebliğler Kitabı, Uğur Eğitim Hizmetleri ve Yayımcılık, Ocak, 2006, p.590-595.
60. Yağmur, C. ve Özer, A., “Fındığın insan beslenmesi ve sağlığındaki önemi”, 3. Milli Fındık Şurası Tebliğler Kitabı, Uğur Eğitim Hizmetleri ve Yayımcılık, Ocak, 2006, p.602-607.
61. Baysal, A., “Fındığın beslenme ve sağlık yönünden önemi”, 3. Milli Fındık Şurası Tebliğler Kitabı, Uğur Eğitim Hizmetleri ve Yayımcılık, Ocak, 2006, p.587-588.
62. Açıktur, F., “Fındığın beslenme ve sağlık açısından değerlendirilmesi”, 3. Milli Fındık Şurası Tebliğler Kitabı, Uğur Eğitim Hizmetleri ve Yayımcılık, Ocak, 2006, p.596-601.
63. Balkan, J., Hatipoğlu, A., Aykaç-Toker, G., Uysal, M., “Influence on Hazelnut Oil Administration on Peroxidation Status of Erythrocytes and Apolipoprotein B 100-

Containing Lipoproteins in Rabbits Fed on a High Cholesterol Diet”, *J. Agric. Food Chem.*, 51: 3905-3909, 2003.

64. Hatipoğlu, A., Kanbağlı, Ö., Balkan, J., Küçük, M., Çevikbaş, U., Aykaç-Toker, G., Berkkan, H., Uysal, M., “Hazelnut Oil Administration Reduces Aortic Cholesterol Accumulation and Lipid Peroxides in the Plasma, Liver, and Aorta of Rabbits Fed a High-cholesterol Diet”, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68 (10): 2050-2057, 2004.

65. Thabet, M.A., Salcedo, J.R., Chan, J.C., “Hyperlipidemia in childhood nephrotic syndrome”, *Pediatric Nephrology*, 7 (5): 559-66, 1993.

66. Atkinson, J.B., Stacpoole, P.W., Swift, L.L. “Morphologic abnormalities of erythrocytes from patients with homozygous familial hypercholesterolemia” *Biochim. Biophys Acta*, 712:211-216, 1982.

67. Huy, D.Y., Harmony, J.A.K., “Interaction of plasma lipoproteins with erythrocytes. I. Alteration of erythrocyte morphology”, *Biochim. Biophys Acta*, 550:407-424, 1978.

68. Fraser, G.E., Sabate, J., Besson, W.L., Strahan, T.M., “A possible protective effect of nut consumption on risk of coronary heart disease: the Adventist health study”, *Arch. Intern. Med.*, 152:1416–24, 1992.

69. Spiller, G.A., Jenkins, D.J.A., Cragen, L.N., Gates, J.E., Bosello, O., Bera, K., Rudd, C., Stevenson, M., Superko, R., “Effect of a diet high in monounsaturated fat from almonds on plasma cholesterol and lipoproteins”, *Am. J. Clin. Nutr.*, 11:126–30, 1992.

70. Schick, B. P., & Schick, P. K., “Cholesterol Exchange in platelets, erythrocytes and megakaryocytes”, *Biochimica et Biophysica Acta*, 833, 281–290, 1985.

71. Vaya, A., Martinez, M., Guillen, M., Dalmau, J., & Aznar, J., “Erythrocyte deformability in young familial hypercholesterolemics”, *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 19:43–48, 1998.

72. Chabanel, A., Flamm, M., Sung, K. L. P., Lee, M. M., Schachter, D., & Chien, S., "Influence of cholesterol content on red cell membrane viscoelasticity and fluidity" *Biophysics Journal*, 44, 171–176, 1983.
73. Kanakaraj, P., & Singh, M. "Influence of hypercholesterolemia on morphological and rheological characteristics of erythrocytes", *Atherosclerosis*, 76, 209–218, 1989.
74. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, "Evaluation and Treatment High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) Circulation", 106: 3143-3421, 2002.
75. Dacie, J.V., Lewis, J.M., Practical haematology. 6th ed. London: Churchill Livingstone, p. 152– 6, 1984.
76. Hamaguchi, H., Cleve, H., "Solubilization of Human Erythrocyte Membrane Glycoproteins and separation of the MN Glycoprotein from a Glycoprotein with I,S, and an Activity", *Biochimica et Biophysical Acta*, 278: 271-280, 1972.
77. Stoscheck, C. M. Quantitation of protein. In Duetscher, M. P.(Ed.), Guide to protein purification. In Alberson, J. N. and Simon, M. I.(Eds.), *Methods in Enzymology*, Vol. 192, Academic Press, California, 1990, pp.72-74.
78. Lowry, O. H., Rosebrough, N. L., Farr, A. L., Randel, R. I., "Protein measurement with folin phenol reagent", *J. Biol. Chem.*, 193:265-275, 1951.
79. Young, I.S. and Trimble, E.R.: Measurement of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography with fluorimetric Detection. *Ann. Clin. Biochem.*, 28:pp.504-508,1991.
80. Sedlak, J., Lindsay, R.H., "Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent", *Anal. Biochem.*, 25,192-205, 1968.

- 81.** Witko,V., Nguyen, A.T., Decamps-Latscha, B., “Microtiter plate assay for phagocyte derived taurinechloramines”, *J. Clin. Lab. Anal.* 6, 47-53,1992.
- 82.** Erel Ö., “A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status”, *Clinical Biochemistry*, 38:1103-1111, 2005.
- 83.** Erel, Ö., “A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions, *Clinical Biochemistry*, 112-119, 2004.
- 84.** Spiller, G.A., Jenkins, D.A.J., Bosello, O., Gates, J.E., Cragen, L.N., Bruce, B., “Nuts and Plasma Lipids: An Almond-Based Diet Lowers LDL-C while Preserving HDL-C”, *Journal of the American College of Nutrition*, vol. 17, no. 3, 285-290, 1998.
- 85.** Ros, E., Nunez, I., Perez-Heras, A., Serra, M., Gilabert, R., Casals, E., Deulofeu, R., “A Walnut Diet Improves Endothelial Function in Hypercholesterolemic Subjects”, *Circulation*, 109: 1609-1614, 2004.
- 86.** Zambon, D., Sabate, J., Munoz, S., Campero, B., Casals, E., Merios, M., Laguna, J.C., Ros, E., “Substituting Walnuts for Monounsaturated Fat Improves the Serum Lipid Profile of Hypercholesterolemic Men and Women”, *Ann. Intern. Med.*, 132: 538-546, 2000.
- 87.** Sabate, J., “Nut consumption and body weight”, *Am. J. Clin. Nutr.*, 78 (suppl.): 647S-650S, 2003.
- 88.** Salas-Salvado, J., Bullo, M., Perez-Heras, A. and Ros, E., “Dietary fibre, nuts and cardiovascular diseases”, *British Journal of Nutrition*, 96:45-51, 2006.
- 89.** Jiang, R., Jacobs, D.R., Mayer-Davis, E., Szklo, M., Herrington, D., Jenny, N.S., Kronmal, R., Barr, R.G., “Nut and Seed Consumption and Inflammatory Markers in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis”, *American Journal of Epidemiology*, 163: 222-231, 2006.

90. Garg, M.L., Blake, R.J., Wills, R.B., “Macadamia nut consumption lowers plasma total and LDL cholesterol levels in hypercholesterolemic”, *J. Nutr.*, 133:1060–1063, 2003.
91. Ros, E., Nunez, I., Perez-Heras, A., Serra, M., Gilabert, R., Casals, E., Deulofeu, R., “A Walnut Diet Improves Endothelial Function in Hypercholesterolemic Subjects”, *Circulation*, 109: 1609-1614, 2004.
92. Zambon, D., Sabate, J., Munoz, S., Campero, B., Casals, E., Merios, M., Laguna, J.C., Ros, E., “Substituting Walnuts for Monounsaturated Fat Improves the Serum Lipid Profile of Hypercholesterolemic Men and Women”, *Ann. Intern. Med.*, 132: 538-546, 2000.
93. Smith, L. L., “Another cholesterol hypothesis: Cholesterol as antioxidant”, *Free Radical Biol. Med.*, 11, 47-61, 1991.
94. Breza, U. L.; Brewer, G. J.; Hill, G. M., “Effect of dietary cholesterol on erythrocyte peroxidant stress in vitro and in vivo”, *Biochim. Biophys. Acta*, 885, 434-440, 1985.
95. Nikolic, M., Stanic, D., Antonijevic, N. and Niketic, V., “Cholesterol bound to hemoglobin in normal human erythrocytes: a new form of cholesterol in circulation”, *Clinical Biochemistry*, 37:22-26, 2004.
96. Mineo, H., Hara, H., “Chemical specificity in short-chain fatty acids and their analogues in increasing osmotic fragility in rat erythrocytes in vitro”, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1768:1448-1453, 2007.
97. Kempaiah, R.K. and Sirinivasan, K., “Integrity of erythrocytes of hypercholesterolemic rats during spices treatment”, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 236: 155-161, 2002.
98. Muller, S., Ziegler, O., & Donner, M. et al., “Rheological properties and membrane fluidity of red blood cells and platelets in primary hyperlipoproteinemia”, *Atherosclerosis*, 83:231–237, 1990.

99. Balkan, J., Hatipoğlu, A., Aykaç-Toker, G., Uysal, M., “Influence on Hazelnut Oil Administration on Peroxidation Status of Erythrocytes and Apolipoprotein B 100-Containing Lipoproteins in Rabbits Fed on a High Cholesterol Diet”, *J. Agric. Food Chem.*, 51: 3905-3909, 2003.
100. Özdemirler, G., Küçük, S., Orhan, Y., Aykaç-Toker, G., Uysal, M., “Lipid and protein oxidation in erythrocyte membranes of hypercholesterolemic subjects”, *Clinical Biochemistry*, 34:335-339, 2001.
101. Johnson, R.M., Ravindranath, Y., El-Alfy, M. and Goyrtte Jr, G., “Oxidation Damage to Erythrocyte Membrane in Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency: Correlation With In Vivo Reduced Glutathione Concentration and Membrane Protein Oxidation”, *Blood*, 83: 1117-1123, 1994.
102. Cecarini, V., Gee, J., Fioretti, E., Amici, M., Angeletti, M., Elauteri, A.M., Keller, J.N., *Biochimica et Biophysica Acta*, 1773:93-104, 2007.
103. Dean, R.T., Fu, S., Stocker, R. And Davies, M.J., “Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation”, *Biochem. J.*, 324:1-18, 1997.
104. Tweeddale, H.J., Kondo, M., Gebicki, J.M., “Proteins protect lipid membranes from oxidation by thiyl radicals”, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 459:151-158, 2007.
105. Anderstam, B., Ann-Christin, B.-H., Vali, A., Stenvinkel, P., Lindholm, B., Suliman, M.E., “Modification of the oxidative stress biomarker AOPP assay: Application in uremic samples”, *Clinica Chimica Acta*, 393:114-118, 2008.
106. Koter, M., Franiak, I., Strychalska, K., Broncel, M., Chojnowska-Jeziarska, J., “Damage to the structure of erythrocyte plasma membranes in patients with type-2 hypercholesterolemia”, *The International journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36:205-215, 2004.

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Trabzon'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini burada tamamladıktan sonra 2000 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde öğrenime başladı ve 2004 yılında mezun oldu. Aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı. "Fındık Tüketiminin Hiperkolesterolemik Şahısların Eritrosit Membran Lipid ve Protein Oksidasyonuna Etkisi" adlı yüksek lisans tezi ile yüksek öğrenimini tamamlamaktadır.