

T.C.
İSTANBUL SABAHATTİN ZAİM ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BESLENME VE DİYETETİK ANABİLİM DALI
BESLENME VE DİYETETİK BİLİM DALI

ÇEŞİTLİ ÇİKOLATA ÖRNEKLERİNDE LİPİD
PEROKSİDASYONU SONUCU OLUŞAN
MALONDİALDEHİTİN (MDA) *İN VİTRO*
BİYOERİŞİLEBİLİRLİĞİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tuğçe AKSOY

İstanbul

Ocak-2022

T.C.

İSTANBUL SABAHATTİN ZAİM ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BESLENME VE DİYETETİK ANABİLİM DALI
BESLENME VE DİYETETİK BİLİM DALI

ÇEŞİTLİ ÇİKOLATA ÖRNEKLERİNDE LİPİD
PEROKSİDASYONU SONUCU OLUŞAN MALONDİALDEHİTİN
(MDA) *İN VİTRO* BİYOERİŞİLEBİLİRLİĞİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tuğçe AKSOY

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Jale ÇATAK

İstanbul

Ocak-2022

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürlüğüne,

Bu çalışma, jürimiz tarafından Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalı, Beslenme ve Diyetetik Bilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman Doç. Dr. Jale ÇATAK

Üye Doç. Dr. Mustafa YAMAN

Üye Doç. Dr. Zafer CEYLAN

Onay

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylım.

Prof. Dr. Metin TOPRAK

Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

Yüksek lisans tezi olarak hazırladığım “Çeşitli Çikolata Örneklerinde Lipid Peroksidasyonu Sonucu Oluşan Malondialdehitin (MDA) *İn Vitro* Biyoerişilebilirliğinin İncelenmesi”adlı çalışmanın öneri aşamasından sonuçlandığı aşamaya kadar geçen süreçte bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle uyduğumu, tez içindeki tüm bilgileri bilimsel ahlak ve gelenek çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığımı, bu çalışmamda doğrudan veya dolaylı olarak yaptığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu beyan ederim.

Tuğçe AKSOY

ÖN SÖZ

Tezimin her aşamasında bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren, yardımlarını esirgemeyen ve destek olan, saygıdeğer tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Jale ÇATAK'a,

Tez çalışmamda emekleri olan saygıdeğer hocam, Ana Bilim Dalı Başkanım Sayın Doç.Dr. Mustafa YAMAN'a,

Laboratuvar aşamasında destek olan, Ömer Faruk MIZRAK'a,

Hayatımın her döneminde olduğu gibi bu dönemde de her anlamda beni destekleyen, teşvik eden, ilham veren ve şanslı hissettiren canım aileme çok teşekkür ederim.

Tuğçe AKSOY

İstanbul-2022

ÖZET

**ÇEŞİTLİ ÇİKOLATA ÖRNEKLERİNDE LİPİD
PEROKSİDASYONU SONUCU OLUŞAN MALONDİALDEHİTİN
(MDA) *İN VİTRO* BİYOERİŞİLEBİLİRLİĞİNİN İNCELENMESİ**

Tuğçe AKSOY

Yüksek Lisans, Beslenme ve Diyetetik

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Jale ÇATAK

Ocak-2022, 87 Sayfa

Malondialdehit (MDA), bir dizi enzimatik veya enzimatik olmayan lipidperoksidasyonunun ana toksik ürünüdür. Biyoaktif olan zararlı bileşik hücrede metabolize edilir ya da hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayar. DNA ve proteinler ile reaksiyona girme yeteneği yüksektir. Bu sebeple, oksidatif stresin ilişkilendirildiği kanser türleri, Alzheimer, Parkinson, diyabet ve kardiyovasküler hastalıkların patogeneğinde yer almaktadır. Gıdalarda, saklama koşulları ve yağ asidi bileşimlerine bağlı olarak MDA miktarı değişkenlik gösterir. Çikolata geniş kitlelere hitap eden, bir üründür. Bu çalışmanın amacı, piyasada genellikle sık tercih edilen çikolata çeşitlerinin içeriğindeki MDA miktarlarının tespit edilmesi ve *in vitro* biyoerişilebilirliğinin incelenmesidir. Çalışmada 20 farklı çikolata örneği İstanbul’ daki marketlerden satın alınmıştır. Çikolata örneklerindeki MDA miktarları HPLC yöntemi ile belirlenmiştir. Yapılan analizler sonucunda, çikolata örneklerinin sindirim öncesi MDA miktarları 636 – 2392 µg/100 g aralığında bulunurken, sindirim sonrası miktarları 104–490 µg/100 g aralığında tespit edilmiştir. Çikolatalarda MDA biyoerişilebilirlik oranları %6–56 aralığında bulunmuştur. MDA’ların insanlar üzerindeki mutajenik ve kanserojen etkileri literatürde sıklıkla bildirilmiştir. Kronik hastalıklardan başta diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar ile MDA’ların ilişkisini gösteren birçok araştırma mevcuttur. Sonuç olarak, işlenmiş gıdalarda MDA miktarlarının tespit edilmesi ve biyoerişilebilirliğinin incelenmesi, sağlığın devamlılığının sağlanmasına ek olarak yaşam kalitesi için de önemlidir. MDA oluşumunu önlemek ya da azaltmak için gıdalardaki yağ asidi oranı, gıda işleme prosesleri ve saklama koşullarının uygunluğu dikkate alınmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Malondialdehit, MDA, Çikolata, *İn vitro* sindirim, HPLC

ABSTRACT

INVESTIGATION OF *IN VITRO* BIOACCESSIBILITY OF MALONDIALDEHYDE (MDA) RESULTING FROM LIPID PEROXIDATION IN VARIOUS CHOCOLATE SAMPLES

TUĞÇE AKSOY

Master, Nutrition and Dietetics

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Jale ÇATAK

January-2022, 87 Pages

Malondialdehyde (MDA) is the main toxic product of several enzymatic or non-enzymatic lipid peroxidation. The harmful bioactive compound is metabolized in the cell or spreads damage to other parts of the cell. It has a high ability to react with DNA and proteins. For this reason, it is involved in the pathogenesis of cancer types associated with oxidative stress, Alzheimer's, Parkinson's, diabetes, and cardiovascular diseases. In foods, the amount of MDA varies depending on storage conditions and fatty acid compositions. Chocolate is a product that appeals to a broad audience and has a high consumption amount. This study aims to determine the amount of MDA in chocolate varieties that are often preferred in the market and examine their *in vitro* bioaccessibility. In the study, 20 different chocolate samples were purchased from markets in Istanbul. MDA amounts in chocolate samples were determined by the HPLC method. As a result of the analysis, the MDA amounts of the chocolate samples before digestion were found to be in the range of 636 – 2392 µg/100 g, while the post-digestion amounts were found to be in the range of 104 – 490 µg/100 g. MDA bioaccessibility rates in chocolates were found in the range of 6-56%. The mutagenic and carcinogenic effects of MDAs on humans have been reported frequently in the literature. Many studies show the relationship of MDAs with chronic diseases, especially diabetes and cardiovascular diseases. As a result, determining the amount of MDA in processed foods and examining its bioaccessibility is essential for quality of life and ensuring the continuity of health. In order to prevent or reduce MDA formation, the fatty acid ratio in foods, food processing processes, and the suitability of storage conditions should be considered.

Keywords: Malondialdehyde, MDA, Chocolate, *In vitro* digestion, HPLC

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI.....	i
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ.....	ii
ÖN SÖZ.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	x
KISALTMALAR LİSTESİ.....	xi
SEMBOLLER LİSTESİ.....	xii

BİRİNCİ BÖLÜM

GİRİŞ.....	1
------------	---

İKİNCİ BÖLÜM

LİTERATÜR TARAMASI.....	3
2.1. Lipid Peroksidasyonu.....	3
2.2. Malondialdehitler.....	5
2.2.1. Lipid Peroksidasyon Metaboliti MDA Oluşum Mekanizması.....	7
2.2.2. Lipid Peroksidasyonu Metaboliti MDA'nın Proteinler ve DNA ile Etkileşimi.....	8
2.3. MDA Ölçüm Yöntemleri.....	14
2.3.1. Spektrofotometre.....	14
2.3.2. Yüksek Basınçlı Sıvı Kronmatografisi (HPLC).....	16
2.3.3. Gaz Kromatografisi (GC).....	16
2.4. Lipid Peroksidasyon Metabolitleri ve Sağlık Üzerine Etkileri.....	16
2.4.1. Nörodejeneratif Hastalıklarda MDA'ların Rolü.....	17
2.4.2. Kardiyovasküler Hastalıklarda MDA'ların Rolü.....	18

2.4.3. Kanserde MDA' ların Rolü.....	19
2.4.4. İnflamatuvar Hastalıklarda MDA' ların Rolü.....	20
2.4.5. Diyabette MDA' ların Rolü.....	21
2.4.6. Yaşlanmada MDA' ların Rolü.....	22
2.4.7. Diğer Hastalıklarda MDA' ların Rolü.....	23
2.5. Lipid Peroksidasyonu Olayının Önlenmesinde Etken Faktörler.....	24
2.5.1. E Vitamini.....	25
2.5.2. Selenyum.....	26
2.5.3. C Vitamini.....	27
2.5.4. Demir.....	28
2.5.5. Bakır, Çinko, Mangan.....	28
2.5.6. Sülfür Amino Asitler (SAA).....	28
2.5.7. Beta Karoten.....	29
2.5.8. Niasin.....	29
2.5.9. Billurubin.....	29
2.5.10. Katalaz.....	30
2.5.11. Diğerleri.....	30
2.6. Besinlerde MDA Düzeyine Etki Eden Antioksidatif Etkili Bileşenler ve Besinler	30
2.7. Çikolata.....	33

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

ARAŞTIRMA YÖNTEMİ.....	36
3.1. Araştırmanın Amacı.....	36
3.2. Araştırma Zamanı, Yeri ve Örnekler.....	36
3.3. Kullanılan Cihazlar.....	36
3.4. Analizi Yapılan Malzeme Listesi ve Miktarları.....	38
3.5. MDATayini.....	39
3.5.1. Deney Çözeltilerinin Hazırlanması.....	39
3.5.2. Örneğin Hazırlanması ve Analiz.....	40
3.5.3. Blank Hazırlanışı.....	40

3.5.4. Standart Hazırlanışı.....	40
3.5.5. HPLC koşulları.....	41
3.6. <i>İn Vitro</i> Analiz.....	41
3.7. İstatistiksel Analizler.....	42

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

BULGULAR.....	43
4.1. Çikolata Örneklerinde Sindirim Öncesi ve Sonrası MDA Miktarları ve Biyoerişebilirliği.....	43

BEŞİNCİ BÖLÜM

TARTIŞMA.....	46
5.1. İşlenmiş Gıdalarda Yağ Asidi İçeriğine Göre MDA Değerlendirilmesi.....	46
5.2. İşlenmiş Gıdalarda Antioksidan Katkısı ve Sindirimin MDA Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi.....	48
5.3.Çikolatanın Yapısındaki Antioksidan Bileşenlerin MDA Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi.....	50
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	53
KAYNAKÇA.....	56
ÖZGEÇMİŞ.....	75

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 3.1: Analizde Kullanılan Cihaz ve Malzemeler.....	37
Tablo 3.2: Analizde Kullanılan Kimyasallar.....	37
Tablo 3.3: Analizi Yapılan Örneklerin Listesi ve Miktarları.....	38
Tablo 3.4: Analizi Yapılan Örneklerin Besin Değerleri.....	39
Tablo 4.1: Çikolatalarda Sindirim Öncesi ve Sonrası MDA Miktarları ve Biyoerişilebilirliği.....	43

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1:Lipid Peroksidasyonu Oluşum Basamakları.....	4
Şekil 2.2:MDA' nın Mezomerik Yapıları.....	5
Şekil 2.3:MDA' nın Oluşum Mekanizması.....	7
Şekil 2.4:MDA'nın Oluşum Aşamaları	8
Şekil 2.5: Serbest Radikallerin Yol Açtığı Membran Hasarı.....	9
Şekil 2.6: Lizin-MDA Reaksiyonu.....	10
Şekil 2.7: Oksitleyici Ajanlarla DNA' nın Reaksiyonu.....	11
Şekil 2.8: MDA-DNA Eklentilerinin Oluşumu.....	12
Şekil 2.9: Artan Lipid Peroksidasyonu ile Hastalık İlişkisi Döngüsü.....	13
Şekil 2.10: MDA-2-Tiobarbitürik Asit Arasındaki Reaksiyon.....	15
Şekil 2.11: HPLC Sistemi.....	16
Şekil 2.12: Vitamin E, Selenyum, Kükürtlü Aminoasitler ve Niasin Gibi Maddelerin Lipid Peroksidasyonunu Önlemede Etkileri.....	27
Şekil 2.13: Çeşitli Kakao ve Çikolata Ürünlerindeki Polifenoller.....	35
Şekil 3.1: Analiz Aşamaları.....	36
Şekil 3.2: <i>In vitro</i> Analizin Sistematiği.....	42
Şekil 4.1: Örneklerin Biyoerişebilirlik Oranlarının Grafik ile Gösterimi.....	44
Şekil 4.2: HPLC Standart Kromatogramı.....	44
Şekil 4.3: HPLC Örnek Kromatogramı.....	44

KISALTMALAR LİSTESİ

MDA: Malondialdehit

PUFA: Çoklu doymamış yağ asidi

MUFA: Tekli doymamış yağ asidi

TBA: Tiobarbitürik asit

LP: Lipid peroksidasyonu

HPLC: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi

GC: Gaz Kromatografisi

ROS: Reaktif oksijen türleri

CAT: Katalaz

YPMD: Yaşa bağlı makula dejenerasyonu

DM: Diabetes mellitus

T1 DM: Tip 1 diabetes mellitus

T2 DM: Tip 2 diabetes mellitus

LDL: Düşük yoğunluklu lipoprotein

HDL: Yüksek yoğunluklu lipoprotein

NO: Nitrik oksit

BHA: Bütik hidroksianisol

BHT: Bütıl hidroksitoluen

TAC: Toplam antioksidan kapasitesi

ORAC: Serbest radikallerin emme kapasitesi

SEMBOLLER LİSTESİ

dk	:Dakika
g	:Gram
°C	:Santigrat Derece
mg	:Miligram
mL	:Mililitre
mm	:Milimetre
µm	:Mikrometre
µg	:Mikrogram
%	:Yüzde
vd	: ve diğerleri

BİRİNCİ BÖLÜM

GİRİŞ

Malondialdehit (MDA), çoklu doymamış yağ asitlerinde lipidperoksidasyonu gerçekleşmesi sonucu oluşan sekonder metabolit ürünüdür ve gıdalarda ransiditeye sebep olur. MDA, eksojen kaynaklı olarak gıdalarda meydana gelebileceği gibi endojen olarak vücut dokularında da meydana gelebilmektedir. Oluşum mekanizmasında etken birden çok faktörden söz edilebilmektedir. Bunlardan başlıcaları; yağ asidi çeşidi, yağ asidi zincirinin uzunluğu, yapıda bulunan antioksidan kapasitesi, ortam koşulları (sıcaklık, pH vb.), üretim aşamaları ve depolama şartlarıdır. Ayrıca uzun zamandır lipid peroksidasyonun biyobelirteci olarak birçok araştırmada MDA' ya yer verilmiştir (Całyniuk vd., 2016; Karabudak, 2002).

Lipid peroksidasyonu sonucunda hücre membranlarında oluşan yıkım, zincirleme reaksiyon şeklinde devam ederek zar bütünlüğü geri dönüşü olmayan şekilde bozulmaktadır (Draper, 1993; Gutteridge ve Halliwell, 1993; Niki, 1993). Öte yandan membranlara bağlı hormon ya da enzimlerin hücrelere girmelerine destek olan yüzey reseptör moleküllerinin inaktivasyonunu sağlayabilir (Mocan vd., 1999). Hücre yapısında sebebiyet verdiği hasarın yanı sıra dokulara taşınarak hasarı yaymakta ve organlarda disfonksiyona sebebiyet vermektedir. Lipid peroksidasyonun en bilinen metaboliti olan MDA, yapıdaki proteinler ile çapraz bağlanma yapmakta ve DNA ile reaksiyona girebilmektedir (Aslankoç vd., 2020). Yapılan araştırmalar sonucunda biyokatif kabiliyeti sebebiyle MDA'nın karsinojenik ve mutajenik nitelikte olduğu bildirilmektedir. Dolayısıyla nörodejenaretif hastalıklar, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar ve inflamasyon gibi birçok hastalığın patogeneğinde yer alırken yaşlanma ile de ilişkilendirilmektedir (Aslankoç vd., 2020; Marnett, 1999).

Endojen lipid peroksidasyonu sonucu oluşan serbest radikallerin mutajenik etkilerine karşın süperoksit dismutaz, katalaz, glutasyon peroksidaz, vitamin E, C ve selenyum gibi antioksidan nitelikte maddeler bulunmaktadır (Öz ve Kurtoglu, 2002). Eksojen lipid peroksidasyonunu kontrol etmek için butil hidroksitoluen (BHT), butil hidroksianisol (BHA) gibi sentetik ya da vitamin E, C ve β -karotenler gibi doğal antioksidan maddeler geçmişten günümüzde kullanılmaya devam edilmektedir. Bu

antioksidan maddeler, radikalleri buldukları substrattan temizleme, radikal üretimi gerçekleşen kimyasal reaksiyonları durdurma eylemi, reaksiyon hızını baskılama, moleküler hasarı onarmaya yönelik endojen antioksidan kapasiteyi artırma gibi mekanizmalardan birini ya da birden çoğunu kullanarak oksidan-antioksidan dengesini korumayı sağlar (Dündar & Aslan, 2000).

Vücut kompozisyonunda ve besinlerde antioksidanların varlığı, oksidatif strese bağlı yıkımları azaltmaktadır. Bu bağlamda birçok araştırma antioksidanların, lipid peroksidasyonunun ve dolayısıyla proteinlerin çapraz bağlanmasını ve DNA mutasyonuna engel olmaktadır (Memişoğulları, 2005).

Çikolatanın antioksidan niteliğinde en çok bilinen bileşenleri epikateşin, kateşin ve prosiyanidin gibi flavanollerin haricinde antosiyanin, stilbenler ve fenolik asit kakao tohumunun yapısındaki polifenollerdir (Ludovici vd., 2017). Kateşinler vücutta, plazma antioksidan aktivite, yağ oksidasyonu ve düşük dansiteli lipoprotein (LDL) oksidasyonuna dirençte görev alır. Bu anlamda bitter çikolatanın sağlık üzerine olumlu etkilerinin çoğu, zengin kateşin içeriği ile ilişkilendirilmektedir (Beckett, 2009). Başta kakaonun genetik çeşitliliği, hasatı ve işleme yöntemi gibi temel faktörlere bağlı olarak, kakao ve çikolatada bulunan kateşin ve epikateşin gibi antioksidan içeriklerin etkinlik ve miktarında oluşan kayıp oranları değişebilmektedir (Cömert & Merdol, 2018).

Besinlerde bulunan MDA miktarının işlem basamakları sırasında üretim koşulları sebebiyle ya da yapıda bulunan proteinlere bağlanabilme yeteneğinden ya da antioksidan konsantrasyonunun etkinliği sebebiyle düşebileceği bildirilmektedir (Gorelik vd., 2005; Gorelik vd., 2007; Gorelik vd., 2008b; Newburg & Concon, 1980). Eksojen olarak besinlerden alınan MDA'nın sindirim sonrasında miktarındaki düşüşün sindirim sırasında enzim aktivitesi ya da antioksidan etkinlik sonucunda yaşanabileceği varsayılmaktadır (Lo vd., 2006; Memişoğulları, 2005; Totlani & Peterson, 2006).

Bu çalışmanın amacı, sık tüketilen çikolata çeşitlerinde sindirim öncesi ve sonrasında MDA düzeylerinin saptanması ve biyoerişebilirliğinin belirlenmesidir.

İKİNCİ BÖLÜM

LİTERATÜR TARAMASI

2.1.Lipid Peroksidasyonu

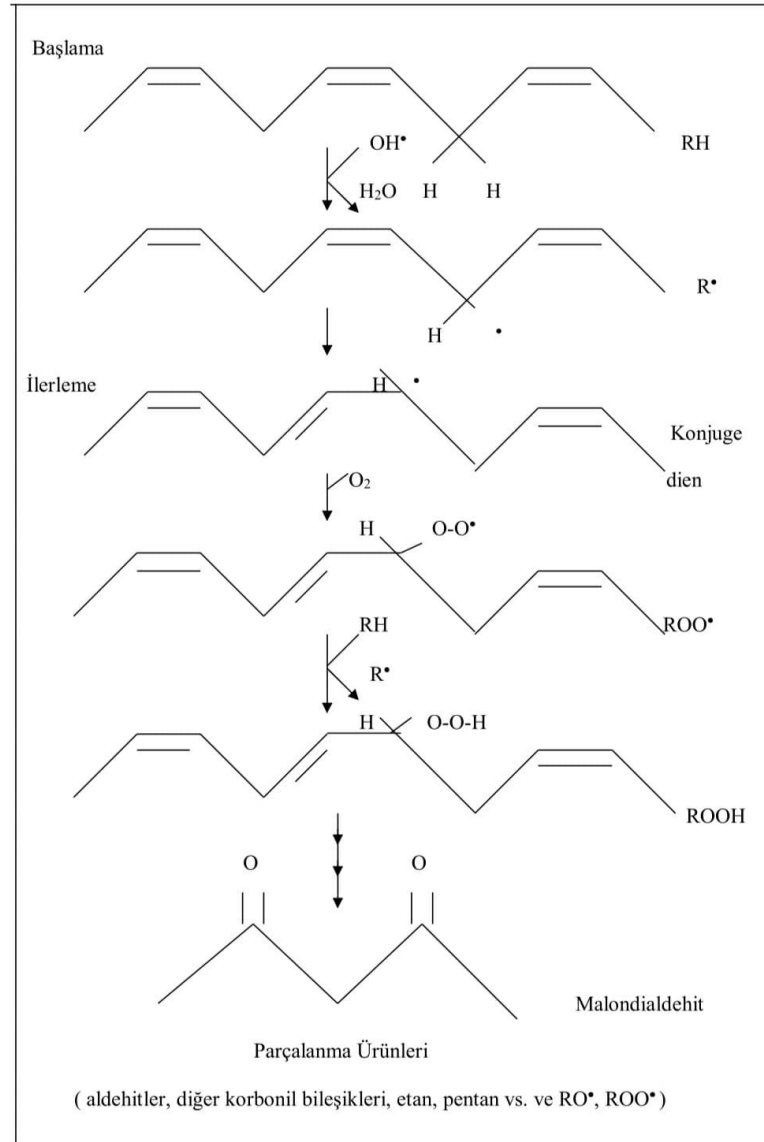
Lipidlerin iki ya da ikiden fazla karbon-karbon çift kovalent bağları taşıyan bileşenlerine doymamış yağ asitleri denir (Horton vd., 1987). Lipid peroksidasyonunda, lipidlerin doymamış yağ asitlerindeki çift bağların çeşitli dış etkenlerin (sıcaklık, ışık, su, enzimler, oksijen ve iz elementleri gibi) katalizörlüğünde zincirleme reaksiyonlara uğramasıyla lipidler, okside olur ve bozular (Aslan vd., 1995; Önenç & Açıkgöz, 2005). Lipid oksidasyonunun ilk ürünü peroksitler kokusuzdurlar. Peroksitlerin parçalanmasıyla oluşan ikincil oksidasyon ürünleri olan hidrokarbonlar, ketonlar, aldehitler ve alkoller acılaşıma ve kokuya neden olmaktadır (Całyniuk vd., 2016).

Lipid peroksidasyonu üç evrede gerçekleşmektedir. Tepkimenin ilk basamağı başlangıç evresidir. Bu evrede çok zincirli doymamış yağ asitlerine molekülden (RH) hidrojen ayrılır; molekülün yapısında karbon atomu bulunan (R.) lipid grupları meydana gelir (Draper H., 1990).

Gelişme (zincir) evresinde olarak nitelendirilen evrede ise başlangıç aşamasında meydana gelen lipid grubu, moleküler oksijen ile birleşerek peroksi (ROO) grubuna dönüşür. Oluşan peroksi grubu tepkime devamında, hidroperoksi grubunu (R-OO-H) oluşturur. Gelişme aşamasında tepkime zincirleme olarak devam ederek merkezinde karbon atomu konumlanan lipid gruplarını oluşturur. Doymamış yağ asidi miktarına bağlı olarak hidroperoksitlerin oluşumları zincirleme olarak sürer. Bu tepkimeler, peroksit gruplarının bir araya gelerek tepkimeyi oluşturması ve etkisiz nitelikte ürünler oluşturmasına kadar devam eder.

Üçüncü evre, yıkımlamanın gerçekleştiği aşama olarak nitelendirilmektedir. Yıkımlama aşaması iki şekilde olur; meydana gelen gruplar birbirleriyle tepkimeye girerek etkisiz ürünlere dönüşmekte ya da antioksidan maddeler ile tepkimeye girerek son bulmaktadır (Yarsan, 1998).

Lipid peroksidasyon olayının zincir aşamasında ortaya çıkan lipidhidroperoksitler son derece dayanıksız ürünler olup; yapısal bozulmalara uğrayarak aldehitler, ketonlar, alkanlar, aklenler, karbosilik asitler ve polimerizasyon ürünler gibi çeşitli metabolitlerioluşturur (Şanlı & Kaya, 1991). Lipid peroksitler yıkımıyla açığa çıkan metebolitleri (malondialdehit,acrolein, 4-hidroksinonenal) biyolojik olarak aktiftir (Şekil 2.1). Oluşan metabolitlerden başlıcası MDA; aynı zamanda peroksidasyonun şiddetini belirler (Kanner vd., 1987; Yarsan, 1998).

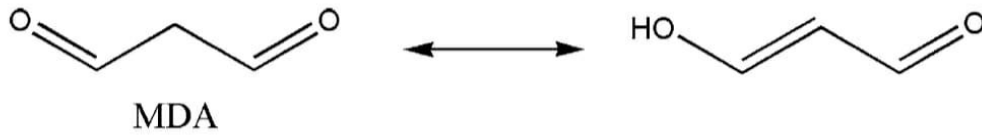


Şekil 2.1.Lipid Peroksidasyonu Oluşum Basamakları

Kaynak: Acar, 2004.

2.2. Malondialdehitler

Malondialdehit, üç veya daha fazla çift bağılı yağ asitlerinin yıkımlanması sonucu oluşan, yağ oksidasyonunun mutajenik etkili ve üzerinde en fazla çalışma yürütülen metabolitidir (Şekil 2.2). Serbest radikal reaksiyonlarının son evresinde oluşan bir dialdehid olan MDA'nın kapalı formülü $C_3H_4O_2$; molekül ağırlığı ise 72'dir (Guillen-Sans & Guzman-Chozas, 1998). Yapılan çalışmalar MDA'nın yağ asidi oksidasyonunun kantitatif yada spesifik bir göstergesi olmamakla birlikte lipid peroksidasyonunun derecesinin belirlenmesinde iyi bir korelasyon gösterir. Bu sebeple 1960' lı yıllar itibariyle; *in vivo* ve *in vitro* analizlerde oksidatif stres seviyesini ölçmek için biyobelirteç niteliğinde MDA molekülünden yararlanılmış ve yeni yöntemler geliştirilmiştir (Frankel & Neff, 1983).



Şekil 2.2.MDA'nın Mezomerik Yapıları

Kaynak: Giera vd., 2012

Yapısında lipid fraksiyonu bulunan gıdalarda (eksojen) ya da fosfolipid, kolesterol gibi dokuların ana bileşenlerinde (endojen) meydana gelen otooksidasyon metaboliti MDA düzeyini öğrenmede yaygın olarak tiobarbitürik asit (TBA) testi yapılmaktadır (Karabudak, 2002). MDA'nın, TBA ile kolay reaksiyona girmesi, hızlı bir yöntem olması ve hassaslığı nedeniyle omega-3 ve omega-6 yağ asitlerinin lipid peroksidasyonu için uygun bir biyobelirteç olarak uzun yıllardan bu yana kullanılmaktadır (Aslankoç vd., 2020).

Serbest radikallerin ve lipid peroksidlerin yarılanma ömrü oldukça kısadır. Ancak serbest olarak dolaşıma katılabilen veya lipoproteinlere bağlanan lipid peroksidler çeşitli yakın ve uzak dokularda hasara sebebiyet vererek zincirleme peroksidasyon olayının devamına sebep olmaktadır. Bu nedenle yapılan çalışmalarda peroksidasyon metaboliti olan MDA'nın hücre zarlarından kolaylıkla geçebildiği bildirilmektedir

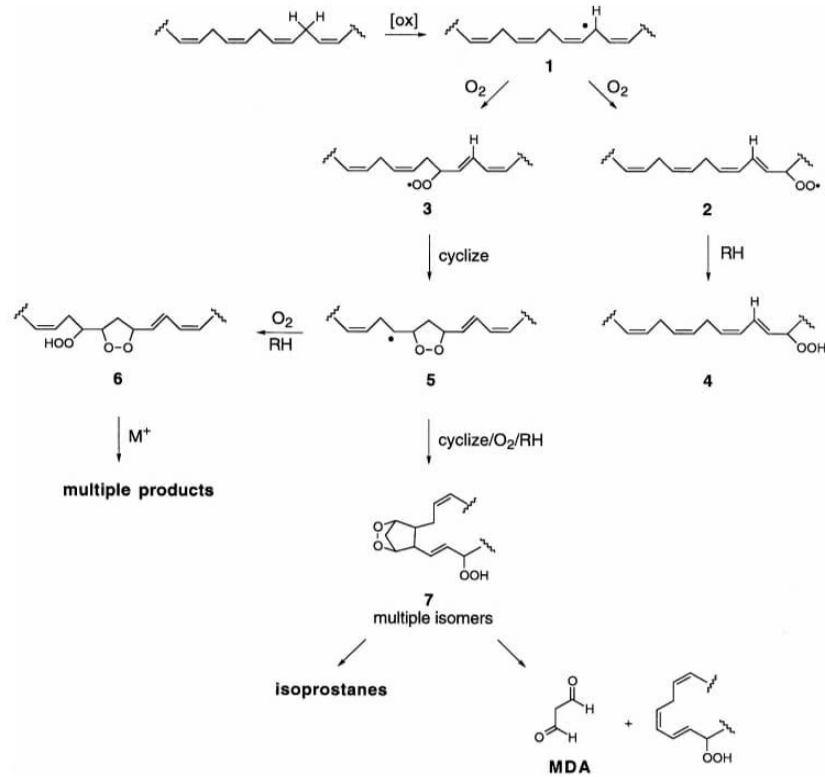
(Ayala vd., 2014; Zampelas & Micha, 2015). Bu metabolit lizin, serin, guanin, etelonamin vb. aminoasitlerle bileşik oluşturabilmektedir. Hücre içinde gerçekleşen protein sentezini, enzimatik olayları ve dolayısıyla DNA yapısını da (mutajen, karsinojen) olumsuz yönde etkiler. Zincirleme gelişen olaylar sonucunda MDA sistemik disfonksiyon gelişmesine sebep olur (Całyniuk vd., 2016; De Bont & van Larebeke, 2004; Luo vd., 2013).

Literatürde olan bazı çalışmalar MDA'nın gen ekspresyonunu düzenleyici ve haberci olarak çalıştığı kanısını destekler. MDA'nın çoklu biyomoleküller (DNA) ile reaksiyona girme kabiliyeti oldukça yüksek olması beraberinde DNA sarmalında çeşitli reaksiyonlar sonucunda hasara ve açılmalara sebep olur (Blair, 2008; García-Ruiz vd., 2002; Wang vd., 2014). Dolayısıyla yapılan çalışmalarda yüksek düzeyde MDA üretimi oksidatif stresin de bir belirteci olarak nörodejenaratif hastalıklar (Alzheimer hastalığı, Parkinson vb.), kanser çeşitleri, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, karaciğer hastalıkları ve inflamatuvar hastalıkların patolojisiyle ilişkilendirilmiştir (Ayala vd., 2014; Del Rio vd., 2005; Sanyal vd., 2009).

Ortamda oluşan MDA miktarını yağ asidinin doymamışlık derecesi, zincir uzunluğu, antioksidanlar, oksijen çeşitleri, geçiş metalleri, sıcaklık ve ortam pH'sı etkilemektedir. Yapılan çalışmalarda hayvansal kaynaklı besinlerde (sığır kıyması, tütülenmiş balık, tavuk ve sosis vb.) toplam MDA'nın çok az bir kısmı serbest formda bulunmakta olduğu bildirilmiştir. Sindirim sırasında besinlerdeki lizin proteininin serbest e-amino grubu ile reaksiyonu sonucunda insanlarda emilen baskın form olan, N-e-(2-propenal) lizin oluşturmaktadır. Bu form ise, dokulardaki serbest MDA'nın temel kaynağı değildir ve diyetdeki MDA'nın (eksojen kaynaklı) mutajenik etkisini azaltmaktadır (Draper & Hadley, 1990). Yapılan başka bir çalışmada pişirme ve çeşitli depolama yöntemleri (dondurarak) sonrasında MDA düzeyinde azalma olduğunu bildirmektedir. Bu olay iki mekanizmayla açıklanmaya çalışılmıştır. İlk mekanizma; kızartma yönteminde ısıtılan etlerde MDA'nın buharlaştığı sanılmaktadır. Diğer mekanizma ise; MDA'nın ortamdaki proteinlere bağlanması sonucunda miktarında azalma olabileceği bildirilmektedir (Salih vd., 1987; Lyon vd., 1988; Karabudak, 2002).

2.2.1. Lipid Peroksidasyonu Metaboliti MDA Oluşum Mekanizması

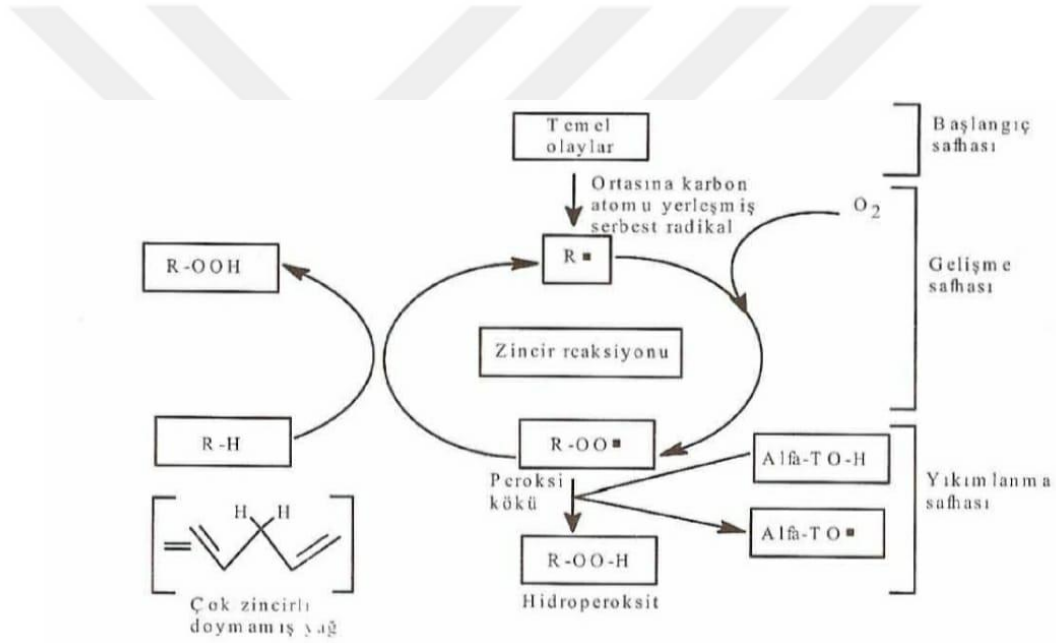
Lipid peroksidasyonu (LP), çoklu doymamış yağların (PUFA) oksidatif bozulması olarak nitelendirilir. Peroksidasyon olayı yağ asidi zincirlerinde bulunan hidrojen atomlarının koparılması ile zincirin lipid radikali (L*) özelliği kazanması ile başlar. Oluşan lipid radikali ise daha sonra bir dizi reaksiyon sonucunda değişikliğe uğrar. Lipid radikallerinin moleküler oksijenle reaksiyona girmesi ile lipid peroksit radikalleri (LOO*) meydana gelir. Lipit peroksid radikalleri membran yapısındaki diğer yağ asitleri ile etkileşime girerek yeni lipid radikalleri oluşturur. Reaksiyon sonucunda açığa çıkan hidrojen, lipid peroksitlerle bağ oluşturarak lipitperoksitlerine (LOOH) dönüştür ve zincirleme reaksiyon başlamış olur (Şekil 2.3). Lipid peroksitlerin yıkımıyla açığa çıkan metabolitleri (acrolein, malondialdehit, 4-hidroksinonenal) biyolojik olarak aktif yapıdadır. Bu metabolitler hücrede metabolize edilir ya da hücrenin diğer kısımlarına hasarı yayar (Ayala vd., 2014; Park vd., 2013).



Şekil 2.3.MDA'nın Oluşum Mekanizması

Kaynak: Marnett, 1999.

LP normal koşullarda tüm hücre ve dokularda düşük miktarlarda oluşan ve oksijen kaynaklı serbest radikaller tarafından indüklenen oksidatif bir olaydır. Doymamış yağ asidlerinin oksidasyonu sonucu lipid peroksid olarak isimlendirilen ürünler (aldehid, keton, alkol, eter) ve bunların metabolitleri ortaya çıkmaktadır. Lipid peroksi radikallerinin, doymamış yağ asidleri ile reaksiyona girmesi sonucu da lipid hidroperoksidler (lipid peroksid) açığa çıkmaktadır (Şekil 2.4). Lipid peroksidasyonu ve açığa çıkan lipid peroksidasyon ürünleri hücre membranlarındaki doymamış yağ asidi disülfid ve protein bağlarının yapısının bozarak hücre membran fluditesinde kayba neden olmaktadır (Sağol & Özkınay, 2000; Wisdom vd., 1991).Yağ asidlerinin peroksidasyonu sonucu ortaya çıkan MDA hücre membranının deformasyonuna, iyon geçişinin ve enzimatik disfonksiyona neden olmaktadır.



Şekil 2.4.MDA'nın Oluşum Aşamaları

Kaynak: Yarsan, 1998.

2.2.2.Lipid Peroksidasyonu Metaboliti MDA'nın Proteinler ve DNA ile Etkileşimi

LP, serbest radikallerinde önemli rol aldığı ve çeşitli hücre fonksiyonlarda değişikliklere sebep veren reaksiyonlar zinciridir. Organizmada yer alan protein, enzim, lipid, DNA gibi birçok yapı ve fonksiyonlarda LP ara ve son ürünleri

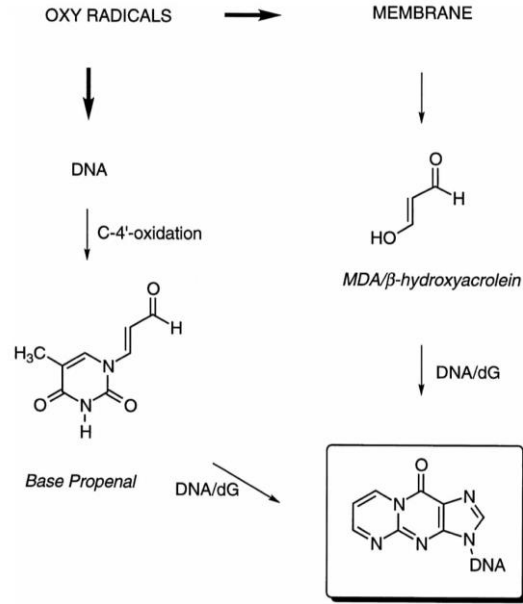
kaynaklı hasar görmekte ve günümüzde birçok hastalıkta LP' nin rolü olduğu ileri sürülmektedir (Yogi, 1999).

Serbest radikal reaksiyonu sonucu oluşan MDA, mutajenik ve karsinojenik etkisinden dolayı oldukça ilgi çekmiş; araştırmalara konu olmuştur. Yapılan çalışmalarda, MDA'nın DNA ile reaksiyona girerek mutajenik etkide bulunduğu kanısı desteklenmiştir (Siu&Draper, 1978). *In vivo* ortamda endojen MDA oluşumunu; lipid peroksidasyonunu stimüle eden ozon, nitrojen oksitler, hiperoksia ve bazı xenobiotikler gibi çevresel faktörler de arttırmaktadır. PUFA'nın bozulması sonucu oluşan ekzojen MDA' nın metabolizması endojen MDA'dan önemli ölçüde farklıdır (Draper & Hadley, 1990). Hücre membran yapısında yer alan doymuş ve doymamış yağ asitlerinden doymuş olanlar düz zincirli iken, genellikle doymuş olanlara göre daha çok bulunan doymamış yağ asitlerinin zincirleri kıvrımlıdır. Bu nedenle yapıdaki doymamış yağ asidi miktarı arttıkça membranlar daha gevşek bir yapılanma gösterirler ve neticede daha akışkan olurlar. PUFA'larda meydana gelecek herhangi bir hasar membran akışkanlığını azaltacak ve membranın fonksiyon görmesini engelleyebilecektir. PUFA yapısında bulunan çifte bağlar C-H bağlarını zayıflatır; normal şartlarda membrandan geçmeyen maddelere (Ca⁺² iyonları gibi) karşı membranın geçirgenliğini artırır. Allilik hidrojenler (iki çifte bağ arasındaki karbon atomuna bağlı bulunan hidrojenler) serbest radikaller ile kolayca reaksiyona girebilmektedir ve bu sebeple PUFA'lar oksidatif atığa karşı daha dayanıksızdırlar (Halliwell & Gutteridge, 1985, 2015; Horton vd., 1987; Slater, 1988). Genel olarak LP membran akışkanlığını azaltır, normal şartlarda membrandan geçmeyen maddelere (Ca⁺² iyonları gibi) karşı membranın geçirgenliğini artırır ve membrana bağlı enzimleri inaktive eder (Şekil 2.5). Yağ asidi yan zincirlerinin devam eden parçalanması, aldehitleri ve pentan gibi hidrokarbonları oluşturur ve sonuç olarak membran bütünlüğünün tamamen kaybolmasına neden olur (Horton vd., 1987).

MDA, lizinin yanı sıra (Şekil 2.6), serin, guanin, etanolamin gibi amino asitlerle de bileşik oluşturmaktadır (Comporti, 1987; Draper & Hadley, 1990; Gower & Wills, 1987).

-NH₂ ve -SH gruplarına aktive olmaları için ihtiyacı olan enzimler LP esnasında genellikle inhibe edilmektedir. Örneğin; karaciğer endoplazmik retikulum membranında yer alan glukoz 6-fosfotaz (-SH gruplarına saldırarak) ve sitokrom P-450 bu enzimler arasındadır. Ayrıca hücrelerin hormonlara cevabına imkan veren yüzey reseptör molekülleri LP sırasında inaktive edilebilirler (Benedetti vd., 1979; Halliwell & Gutteridge, 2015).

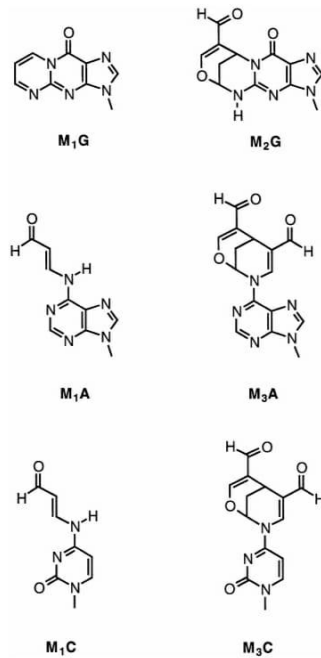
Eritrosit membranlarının yapısında yüksek miktarda PUFA bulunmaktadır. Sürekli yüksek miktarlarda oksijene maruz kalırlar ve oksidasyonu katalizleyebilecek hemoglobini içerirler. Bu nedenle eritrositlerin peroksidasyona oldukça uygun olduğu bildirilmektedir (Yamamoto vd., 1985; Simon vd., 2000). Dolayısıyla eritrosit membranları LP sonucu yapı değişikliği ve kapillerler boyunca deformabilite özelliklerini kaybederler; sonuç olarak hemoliz gerçekleşmektedir (Benedetti vd., 1979; Halliwell & Gutteridge, 1985). Yapılan çalışmalarda LP ürünleri çekirdekte de etkilerini gösterebilmektedir. Yağ asidi hidroperoksitleri, dihidroperoksitler vb. Ames testinde mutajenik olduğu bildirilmiştir. Gerek reaktif oksijen bileşikleri, gerekse LP sırasında oluşan lipid radikalleri ya da radikal olmayan ürünler DNA ile etkileşerek, DNA eklentileri, DNA-protein çapraz bağları oluşturabilir ve DNA sarmalında kırılımlara neden olabilecekleri rapor edilmiştir (Horton vd., 1987; Vaca vd., 1988).



Şekil 2.7. Oksitleyici Ajanlarla DNA'nın Reaksiyonu

Kaynak: Marnett, 1999.

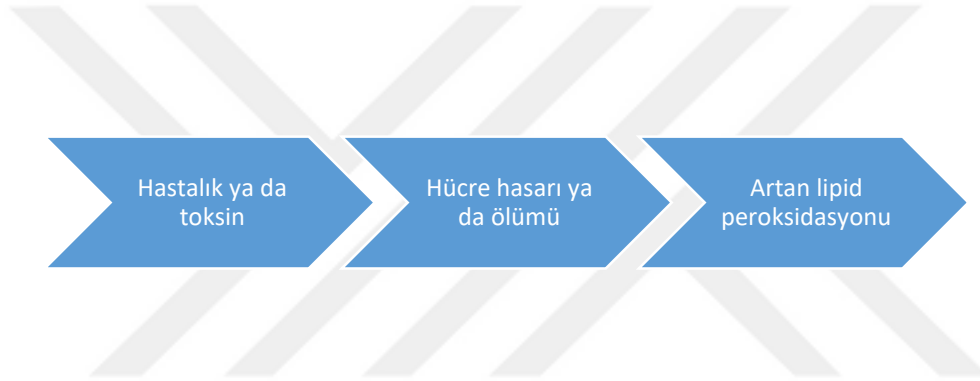
MDA, çoklu eklentiler oluşturmak için nükleik asit bazları ile reaksiyona girer (Şekil 2.7 ve Şekil 2.8).



Şekil 2.8. MDA-DNA Eklentilerinin Oluşumu

Kaynak: Marnett, 1999.

Günümüzde tartışma konusu olan LP'nin hücre hasarı ve ölümünün sebebi niteliğinde mi; ya da sonucu mu olduğu sorusudur. Hasar görmüş dokuların sağlıklı dokulara göre daha hızlı peroksidasyona maruz kaldıkları bildirilmektedir. Örneğin lipid peroksitler, sağlıklı bir beyin dokusuna göre bir beyin homojenatında çok daha hızlı bir şekilde birikirler. Bazı antioksidanların hasara uğramış dokularda inaktive olması ve ayrıca; metal iyonlarının, depolandıkları bölgelerden ve hasarlı lizozomlardan sızan proteolitik enzimlerce hidrolize edilip metaloproteinlerden salınmaları sebepleri arasında olabileceği ilgili araştırmada bildirilmiştir. Bu araştırma sonucunda LP' nin dolaylı yoldan hastalıklar ve toksikolojideki yerinin Şekil 2.9'daki biçimde olduğu varsayılmaktadır (Halliwell & Gutteridge, 1984; Halliwell & Gutteridge, 1985, 2015).



Şekil 2.9. Artan Lipid Peroksidasyonu ile Hastalık İlişki Döngüsü

Kaynak: (Gürer, 1994).

LP, hasarın birincil sebebi olmasa bile, hasar sonucunda oluşması da doku hasanını ilerletmesi ve bazı son ürünlerinin sitotoksik özelliğe sahip olması açısından biyolojik olarak önemlidir. İnsanlarda birçok hastalık ta meydana gelen bazı organ ve dokulardaki membran hasan, membranda LP' nu kışkırtmakta ve membranın yapı ve fonksiyon bozukluklarını hızlandırmaktadır. Lipid peroksitler belli bir miktara kadar oluşup biriktiğinde organ ya da dokudan kan dolaşımına sızarlar ve serum/plazma içerisindeki lipidperoksit seviyeleri artar. Böylece artan seviyeler bazı organ ya da doku hücrelerinde hastalıklarca kışkırtılmış membran hasarı olduğunu gösterir. Buna bağlı olarak bazen kan lipid peroksit düzeyleri hastalığın şiddetinin bir göstergesi olmaktadır (Yogi, 1999).

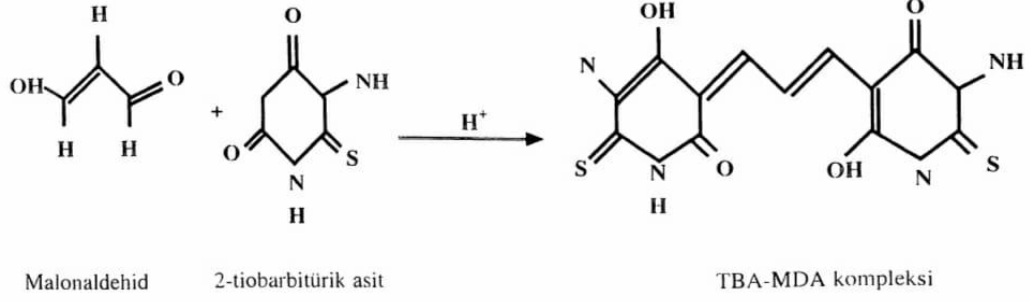
2.3. MDA Ölçüm Yöntemleri

İkincil oksidasyon metabolitlerinden olan MDA'nın ölçüm yöntemleri, meydana gelen değişikliklerin şekline göre belirlenir. Eğer; oksijen alımı, çoklu doymamış yağ asitlerinin kaybı, hidroperoksitlerin oluşumu (peroksit değeri) gibi birincil değişiklikler mevcut ise buna göre değerlendirmeye alınır. İkincil değişiklikler oluştu ise; karbonillerin oluşumu (dinitrofenil hidrazonelar veya gaz kromatografik ölçümleri), malonaldehid oluşumu (TBA testi), hidrokarbonların oluşumu (pentan vb. gibi) ölçülebilir (Gray vd., 1996). Hidroperoksit yıkımının gerçekleştiği durumda, peroksit değerinin ölçülmesi, yağın oksidasyon derecesinin saptanmasında yararlıdır. Ancak uçucu bileşiklerin (karbonil) miktarı artış gösterdiğinde, bu bileşiklerin konsantrasyonunu yansıtan TBA sayısı gibi değerlerin saptanıyor olması, analitikaçından çok daha doğru verileri sunar. TBA testi, Kreis testi ve peroksit değerinden çok daha hassas bir yöntemdir (Draper, 1990). İkincil oksidasyon metaboliti olan MDA spektrototometrede, yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde (HPLC) ve gaz kromatografisinde (GC) tespit edilerek miktarı belirlenebilir (Kubow, 1992; (Guillen-Sans & Guzman-Chozas, 1998; Paquette vd., 1985).

2.3.1. Spektrofotometre

Biyolojik sistemlerde besinlerde TBA ile reaksiyona giren MDA'nın değerlendirilmesinde, spektrofotometre sıklıkla kullanılan yöntemlerden birisidir. Testin; spektrofotometrede kullanılmasındaki en büyük dezavantaj ise, TBA reaksiyonunun sadece MDA'ya özgün olmaması, MDA'ya yapı olarak benzeyen bileşiklerle de reaksiyon oluşturarak bu bileşiklerin de ölçüm sonucuna yansımalarıdır. Bu sebeple testte TBARS terimi MDA'nın yerine daha çok kullanılmaktadır (Paquette vd., 1985).

TBA sayısı, yağ ve yağlı gıdalarda otooksidasyon sonucu oluşan ransiditenin (acılaşmanın) ölçüsünü saptamak amacıyla kullanılan hızlı, basit ve hassas bir yöntemdir. Bir molekül MDA ile iki molekül TBA reaksiyona girerek 532 nm'de en yüksek absorbanı veren kırmızı renkli MDA-TBA kompleksini meydana getirir (Şekil 2.10).



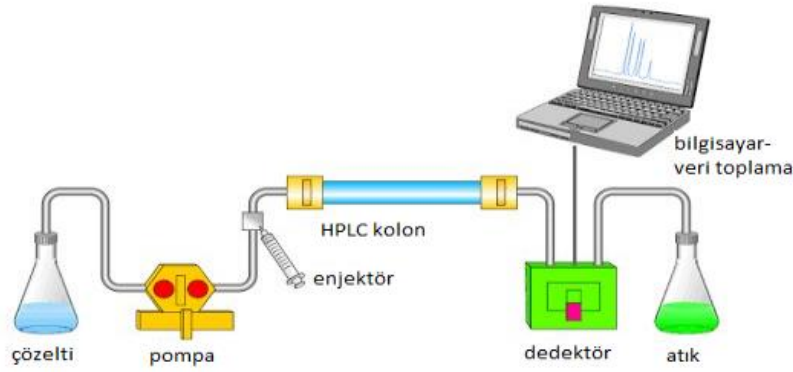
Şekil 2.10.MDA ile 2-Tiobarbitürik Asit Arasındaki Reaksiyon

Kaynak: (Karabudak, 2002).

TBA analizinin sonucunda elde edilen değer TBA sayısı olarak bilinir ve birimi ise mg MDA/kg' dir (Raharjo & Sofos, 1993; Shahıdı & Hong, 1991). TBA testinde MDA, besinlerde çoklu doymamışlık içeriği ve oksidatif acılaşmanın miktarı vb. etkenlere bağlı olarak 0-10 ppm aralığında bulunur (Paquette vd., 1985).

2.3.2. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

MDA tayinininde daha duyarlı ve spesifik sonuçların ortaya koyulması için yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi geliştirilmiştir (Şekil 2.11). HPLC yöntemi, spektrofotometrik TBA testinden çok daha hassas bir yöntem olup her bir distilatı değerlendirmek için 5 dakika gibi kısa bir süre içinde gerçekleşmektedir. MDA oldukça hidrofilik bir bileşik olduğu için türevlendirilmesi gerekmektedir ve yine örnek distile edilmesi gerekeceğinden yapılan analiz sırasında MDA oluşumu gerçekleşebilmektedir (Kishida vd., 1990; Tarladgis vd., 1960). HPLC yöntemi, serbest ve bağlı MDA aynı zamanda distilasyon sürecinde oluşan MDA 'nın tamamını ölçebilmektedir (Raharjo & Sofos, 1993; Salih vd., 1987). Bu yöntemin en büyük avantajı ise, analizlerde solvent ekstraksiyonu kullanımına ihtiyaç duyulmaması ve yeterince aynı zamanda yöntemin hassas olmasıdır. Bu yöntemin avantajları olmasına karşın, analiz için fazla örnek ile çalışılmalı; örnek miktarı azaldıkça kayıplar artmaktadır (Karatas vd., 2002). HPLC yönteminin kullanımını sınırlayan bir diğer en büyük dezavantaj ise kolon ömrünün az olması vepahalı bir yöntem olmasıdır. Duyarlılığı 1 ng'dır ve besinlerdeki TBA-MDA kompleksi için spesifiktir (Bird vd., 1983; Hong vd., 2000; Raharjo & Sofos, 1993; Salih vd., 1987).



Şekil 2.11: HPLC Sistemi

Kaynak: Wei, Liu& Sun, 2018.

2.3.3. Gaz Kromatografisi (GC)

MDA tayininde gaz kromatografisinin avantajları HPLC yöntemiyle karşılaştırıldığında çok daha fazladır. Yapısında bulunan kapiller kolondan dolayı MDA'nın diğer bileşiklerle etkileşimi ve reaksiyonu daha az olur. Gaz kromatografisinde dezavantaj niteliğindeki konu süredir. Örnek hazırlanması çoklu solvent ekstraksiyonu ve evaporasyonu gerektirdiğinden analiz için uzun bir zamana ihtiyaç vardır. MDA tayini için mutlaka türevlendirme çalışması yapılmalı ve türevlendirmeye bağlı olarak da hem serbest hem de bağlı MDA tayini yapılabilmektedir (Raharjo & Sofos, 1993).

2.4.Lipid Peroksidasyon Metabolitleri ve Sağlık Üzerine Etkileri

Lipid peroksidasyonu ürünleri, özellikle MDA, sitotoksik, mutajenik ve kanserojen özellikler sergilemektedir. Eylemlerinin biyolojik sonuçlarına örnek vermek gerekirse; hücrelerin proliferasyon potansiyelinin kaybı, değişen gen ekspresyonu, mutasyonlar, moleküler heterojenite, hücreler arası iletişimin bozulması ve sonucunda organ disfonksiyonudur (Blair, 2008; Całyniuk vd., 2016; Marnett, 2002). Beraberinde hücreleri oksidatif strese karşı savunmakla ilişkili olan enzimleri de inhibe edebilmektedir. Dolayısıyla, hücrelerde daha fazla oksidatif hasara sebebiyet

verir. Hasarın birikmesi hücrenin metabolizmasını değişikliklere yol açarak; bütünlüğünü kaybetmesine neden olabilmektedir. Lipid iç kısmının hidrofobik yapısı etkilenir; zarların çift katmanlı yapısı bozulur. Membran fosfolipidlerinde bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu sürecinde üretilen MDA, proteinlere ve nükleik asitlere karşı reaktivite göstermeye yüksek oranda meyillidir. Oluştugu bölgelerden uzak dokulara kolayca ulaşabilir ve bu bileşiklerle de kovalent bağlar oluşturma yeteneğine sahiptir. Dolayısıyla taşındığı yerin yapılarını ve özel bağlarını değiştirebilmektedir. Hücre zarlarının yapısında ve özelliklerindemeydana gelen değişiklik bütünlüğün kaybına sebep olur. Zincirleme olaylar neticesinde hücre bütünlüğünün değişmesi; düzgün işleyişinde bozulması organların işleyişinde de disfonksiyona neden olur (Całyniuk vd., 2016; De Bont & van Larebeke, 2004).

Meydana gelen doğrudan ya da dolaylı süreçler bütünü birçok hastalığın gelişimine katkıda bulunmakla kalmaz, aynı zamanda yaşlanma sürecinin bir parçasıdır (Casado vd., 2008; Raghavan vd., 2012; Siu & Draper, 1982).İlişkilendirildiği hastalıklar; siroz benzeri karaciğer hasarı, nörojeneratif hastalıklar, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar (miyokart enfaktüsü gibi), romatoid artrit, karaciğer hastalıkları, böbrek hastalıkları, Duchenne kas distrofisi, kanser ve çeşitli inflamasyonlardır (Aznar vd., 1983; Halliwellvd., 1987; B. Halliwell & Gutteridge, 1984, 1985, 1990; Latron vd., 1991; Suryakar vd., 1985; Yogi, 1999).

2.4.1.Nörodejeneratif Hastalıklarda MDA'ların Rolü

Nörodejeneratif hastalıkların karakteristiği, nöronların ilerleyen hasarı ve sonucunda ölümüdür. Nörodejeneratif hastalıklar kategorisinde en yaygın görüleni Alzheimer hastalığı ve Parkinson hastalığıdır. Alzheimer hastalığı hafızada problemlerin olması, konsantrasyon bozukluğu ve öğrenmede güçlük ile karakterize nörodejeneratif bir hastalıktır. Hastalığın görülme riski yaş ile orantılı olarak artmaktadır (Baysal, 2007).

Parkinson hastalığı ise bilişsel bozukluklardan ziyade daha çok kas sistemini etkileyen bir hastalıktır. Hastalık ilerledikçe hastalar yürümede ve konuşmada zorluk yaşayabilirler (Çakmur, 2003).

Lipoperoksidasyon sonucu membran fosfolipitlerinin miktarının azalması Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıkların majör sebeplerinden olabilir. Zincirleme tepkimeler

sonucunda azalmış antioksidan enzim aktiviteleri lipit oluşumu ve Alzheimer hastalarının beyinde plak oluşumu meydana getirmektedir. Yapılan araştırmalarda, oksidatif stres belirteçleri (malondialdehit, akrolein, hidrosinonenal vb.) Alzheimer hastalarının beyin omurilik sıvılarında ve beyin dokusunda tespit edilmiştir. Hücrede ROS üretimi sonucu nöronal glikoz taşıyıcısı GLUT3' ün, glutamat taşıyıcılarının, Na⁺/K⁺ ATPaz pompasının, membran proteinlerinin fonksiyonlarının, iyon transportunun ve kinazların aktivitesinin bozulmasına sebep olarak nörodejeneratif hastalıkların oluşumuna sebep olur (Halliwell vd., 1987). Parkinson ise, oksidatif stres kaynaklı oluşan diğer bir nörodejeneratif hastalıktır. MDA ve diğer lipit peroksidasyon metabolitlerinin beyinde bulunan substantia nigra yapısında yoğunluğunun artması Parkinson hastalığının meydana gelmesi önemli rol oynamaktadır. Serbest radikallerin metabolizmada oluşturduğu dengesizlik Down sendromu fizyopatolojisinde önemli rol oynar (Halliwell vd., 1987; Gutteridge vd., 1985).

Sonuç olarak, Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı ve amyotrofik lateral skleroz (ALS) dahil olmak üzere nörodejeneratif hastalık özelliklerinin patogeneğinde oksidatif stresin rolü hakkında çok sayıda rapor bulunmaktadır. Demanslı hastalar üzerinde yapılan otopsi raporları, korteks ve hipokampusta (Alzheimer hastalığı olan hastalarda), substantia nigra'da (Parkinson hastaları) ve ALS' li hastaların omurilik sıvısında, MDA ve 4-hidrosinonenal (4-HNE) gibi lipid peroksidasyon belirteçleri bulunmuştur (Andersen, 2004; Bulut vd., 2007; Gutowicz, 2011; Hensley vd., 1998).

Nöroloji bozukluklarında oksidatif stres yalnızca dejenerasyon bozukluklarında önemli rol oynamaz. Bulut vd., yaptıkları çalışmada, dikkat eksikliği, hiperaktivite bozukluğu olan hastalarda MDA serum düzeylerinin anlamlı olarak çok daha yüksek olduğu saptanmıştır (Bulut vd., 2007).

2.4.2.Kardiyovasküler Hastalıklarda MDA'ların Rolü

Kardiyovasküler sistem, kalpten ve damarlardan oluşan kanın, oksijenin ve besinlerin vücutta dolaşmasını sağlayan sistemdir. Kardiyovasküler hastalıklar ise kalbi ve kan damarlarını etkileyen hastalıkları kapsamaktadır (Akbulut, 2018).

Kardiyovasküler hastalıkların meydana gelmesi ve gelişiminin ilerlemesi, çevresel ve genetik faktörler ve bu faktörler arasındaki etkileşimlerden etkilenebilmektedir. Dünya çapında ölüm nedenlerinde en önde gelen nedelerinden biri kardiyovasküler hastalıklardır. Oksidatif stres aterosklerozun fizyopatolojisinde önemli bir yere sahiptir(Halliwell, 1978). Oksidasyon, LDL' nin makrofajlar tarafından taşınmasını başlatır. Bunun yanı sıra oksidasyon zinciri inflamatuvar etkileri söz konusu olan lipitlere okside olabilir. Yapılan çalışmalar sonucunda LDL' nin dışında damarların duvarında bulunan diğer lipidler ve lipoproteinler inflamasyon ve ateroskleroza neden olabilmektedir (Halliwell vd., 1987).

Çeşitli klinik ve deneysel çalışma sonuçları oksidatif stres ve ROS' un kalbin elektriksel ritminin patogenezinde ve atriyal fibrilasyon patogenezinde rol aldığını bildirmiştir (Aslankoç vd., 2020). Ayrıca damar endotel hücrelerinde bulunan NADPH oksidazlar, nitrik oksit sentaz metabolizmasının önemli enzimlerindedir. Nitrik oksit (NO) sentezinin artmasının toksik etkileri olduğu bilinmektedir. NO'nun önemli reaksiyonlarından birisi oksijen radikallerinden süperoksit anyonu ile reaksiyona girmesidir. Böylece fazla reaktif olmayan NO daha reaktif olan peroksinitriti oluşturur. Peroksinitrit özellikle proteinlerdeki tirozil, sisteinil ve triptofan halkalarının nitritlenmesine neden olmaktadır. NO ekspresyonunda artış makro ve mikro vasküler hastalıklarla ilişkilendirilmektedir (Davies, 1993).

Yapılan çalışmalar, hastalığın ilk zamanlarında yakın geçmişte miyokard enfaktüsü geçirmiş kişilerde MDA'nın plazmatik konsantrasyonlarının yükseldiğini; sonraki zaman diliminde MDA seviyesinin artış gösterdiğini bildirmiştir. Aynı zamanda oluşan değişiklikler, kreatin fosfokinazın MB fraksiyonunun seviyeleri ile koreledir. Oluşan MDA metabolitinin, LDL lipoproteinleri ile taşınabileceği varsayılmaktadır. Lipoproteinlere bağlı olan MDA, kolesterol esterlerinin kan damarı duvarı ile bağ kurmasını ve bir aterosklerotik plak oluşumunu kolaylaştırır (Antoniades vd., 2009; Aznar vd., 1983; Lee vd., 2012; Walter vd., 2008).

2.4.3. Kanserde MDA'ların Rolü

Oksidan ve antioksidan dengesinin bozulması, başta bütün temel biyolojik bileşiklerin (DNA gibi)zarar görmesini, membran lipitleri ve hücre ölümlerinin

oluşmasına sebebiyet verebilmektedir. Kanser hücrelerinin sağlıklı hücrelerden çok daha fazla miktarda reaktif oksijen türü ile reaksiyona girebildiği ve reaktif oksijenli türlerin (ROS) ise kanser fenotipinin korunmasından sorumlu olduğu yapılan çalışmalar ile kanıtlanmıştır. Diğer bir yandan ROS onkogenler için uyarıcı olarak tanımlanmaktadır (Machlin & Bendich, 1987). ROS; hücre membran proteinlerine, lipit, lipoproetin ve DNA'ya önemli derecede zarar verir. Oksidatif hasar sonucu oluşan MDA; DNA yapısındaki bazlarla aktif olarak reaksiyona girerek mutajenik etki gösterdiği bildirilmiştir. Oluşan hidroksil radikalleri DNA bazlarının oksidatif hasarına veya direkt olarak zincirlerin kopmasına neden olur. Dolayısıyla zincirleme reaksiyonlar sırasında ortaya çıkan hidroksilin DNA ile etkileşimi kanser oluşumunda önemli rol oynamaktadır (Halliwell vd., 1987).

Yapılan çalışmalarda vücut sıvısı peroksidasyonu ürünlerinin, DNA'ya zarar verebilecek potansiyel mutajenik ve kanserojen bileşiklerden oluşan bir grup oluşturduğuna dair kanıtlar sunulmaktadır. Prostaglandinlerin lipid peroksidasyonu ve biyosentezinin bir sonucu olarak oluşan endojen genotoksik bir faktör olarak, bu bileşikler tümörlerinde büyümesine katkı sağladığı bildirilmektedir (Halliwell, 1978). MDA'nın DNA yapısındaki bazlarla reaksiyonundan, eklentiler olarak bilinen bileşiklerin oluşumu meydana gelir. Bu eklentilerin DNA'daki varlıklarının mutajen oluşumu ve karsinogenez süreçlerinin başlamasına oldukça büyük bir katkı sağladığı bildirilmektedir. Örneğin yapılan çalışmalar sonucunda; kolorektal kanserin gelişiminde yağ asitlerinin peroksidasyonunun patojenik rolü doğrulanmıştır (Aslankoç vd., 2020; Davies, 1993). Öte yandan benzer gözlemler meme ve akciğer kanseri için de geçerlidir. Başka bir çalışmada ise, meme ve akciğer kanserli hastalarda kontrol grubuna göre yüksek serum MDA seviyeleri gözlenmiştir. Bu çalışma sonuçları, karsinogenezde oksidatif stresin rolü hakkındaki hipotezi doğrulamaktadır (Machlin & Bendich, 1987).

2.4.4. İnflamatuar Hastalıklarda MDA'ların Rolü

Yapılan çalışmalar sonucunda, astım ve alerjik rinit dahil kronik inflamasyon ile oksidatif stres arasında aynı zamanda oksidatif türler ve antioksidanlar arasında da bir korelasyon olduğu bildirilmektedir. Hidroksil radikallerinin, peroksitlerin, süperoksit radikal anyonlarının artması hava yolu mukozasında zincirleme bir

değişikliği başlatabilmektedir. Lipit peroksidasyonu sonucunda, hava yollarında mukozal duyarlılık oluşması ve sekresyonda aynı zamanda vasküler permeabilitede artışa sebep olduğu ortaya koyulmuştur. Diğer bir yandan, temelde oksidatif stres araşidonik asit metabolizmasını bozarak hava yolu inflamasyonunun yanı sıra sistemik inflamasyon oluşumunu arttırmaktadır. Yapılan epidemiyolojik çalışmalar oksidatif stres oluşumunun, astım riskini arttırdığını bildirmektedir (Saari, 1991).

Öte yandan, Ostałowska vd., yaptığı çalışmada, romatoid artrit (RA) hastalarında, artan lipid peroksidasyonunun, tüm antioksidan sistemdeki değişikliklere yönelik bir eğilim ile ilişkili olduğu sonucuna varmıştır. Bu, RA hastalarının kanında ve eklem sıvısında artan ROS ile potansiyel hasarı ile ilgili kanıt oluşturmaktadır (Ostałowska vd., 2016).

2.4.5. Diyabette MDA'ların Rolü

Diyabetik hastalarında sağlıklı bireylere göre genelde yaşam süresinin daha kısa olma beklentisi, esasen ateroskleroz komplikasyonlardan kaynaklanmaktadır (Gallou vd., 1993; Panzram, 1987). Ateroskleroz lezyonların gelişiminde rol oynayan mekanizmalar arasında, plazmadaki lipoproteinlerin kalitatif modifikasyonları yer alabilmektedir. Yapılan bazı çalışmalarda, oksitlenmiş LDL'nin, Watanabe tavşanlarında ve insanda ateroskleroz plaktan izole edildiği bildirilmektedir. Dolayısıyla serbest radikaller tarafından indüklenen bir peroksidasyon sürecinin sonucu oldukları düşünülmektedir (Haberland vd., 1988; Steinbrecher vd., 1990; Yia-Herttuala vd., 1989).

Öte yandan, MDA'nın ayrıca, ApoB100'deki lizin kalıntılarını da değiştirebildiği saptanmıştır (Halliwell vd., 1987; Siu & Draper, 1982; Steinbrecher vd., 1990). Sonuç olarak, LDL artık B/E'ye özgü membran reseptörü tarafından değil, bunun yerine ateroskleroz plağı oluşturan kolesterolden zengin hücrelerin oluşumunu indükleyebilen bir makrofaj reseptörü tarafından tanınabilmektedir. Bu sebeplerinde desteklediği çalışmada, diyabetik hastalarda anormal LP saptanabileceği bildirilmektedir (Fogelman vd., 1980; Luo vd., 2013; Steinberg vd., 1989).

Bununla birlikte, uzun vadeli vasküler komplikasyonlarda oksijenli serbest radikallerin rolü hala varsayımsaldır. Yapılan diğer bir çalışmada, iki diyabetik hasta

grubundan (Tip 1 ve Tip 2) plazmada tiyobarbitürük asit reaktif maddeler (TBARS) olarak MDA konsantrasyonları ölçüldü; bunları bir kontrol grubu ile karşılaştırmıştır. TBARS olarak ölçülen MDA, diyabette lipid peroksidasyonunun en çok çalışılan belirteci olduğu vurgulanmıştır (Kaji vd., 1985; Lyons, 1991; Noberasco vd., 1991). Bu parametrenin diyabetik hastalarda kontrollere göre anlamlı derecede yüksek olduğunu gösterilmiştir. Benzer sonuçlar, Noberasco vd.'nin yaptığı çalışmada da bildirilmiştir. Ancak, bu iki çalışmada da sınırlayıcı olarak diyabetin türü belgelenmemiştir (Kaji vd., 1985; Noberasco vd., 1991). Tip 2 diyabetli kadın hastaları inceleyen Kaji vd., MDA konsantrasyonunda bir artış olduğunu bildirmiştir. Bu çalışma, Tip 1 ve Tip 2 diyabetik hastalarda plazma TBARS konsantrasyonlarının kontrollere göre daha yüksek olduğunu raporlamıştır. Ancak, iki diyabet türü arasında TBARS konsantrasyonlarında anlamlı bir fark bulamadıklarını aynı çalışmada bildirmişlerdir (Warso & Lands, 1983).

2.4.6.Yaşlanmada MDA'ların Rolü

Diyabette olduğu gibi doğal yaşlanma sürecinde, organizmada MDA'ların birikmesive serbest radikaller ile etkileşim göstermeleri, hücre ve birçok dokuda hasarmeydana getiren en önemli faktörlerdenbiri olarak kabul edilmektedir. Doğal yaşlanma sürecinde glikasyon yoluyla yapıları değişen proteinler ve lipidler, başta kardiyovasküler sistemde olmak üzere birçok dokuya zarar vermektedir. MDA, birçok hastalığın gelişim sürecinde lipidlerin oksidatif hasarını araştırmak için kullanılan oldukça köklü bir belirteçtir. Gil vd., 18 ila 84 yaşları arasındaki 194 sağlıklı erkek ve kadını kapsayan çalışmada, plazma MDA düzeylerinin yaşla orantılı olarak arttığı ve yaşlanma sırasında oksidasyonun hız kazandığını rapor etmiştir (Gil vd., 2006; Rani & Singh Yadav, 2015).

Başka bir çalışmada, 100 sağlıklı erkeği (kronik hastalığı olmayan, sigara içmeyen ve alkol kullanmayan) inceleyen ve MDA/toplam antioksidan kapasite (TAC) oranını ölçen Hintli araştırmacıların, son gözlemleri dikkat çekici olmuştur. Bu çalışmada, MDA/TAC oranının yaşla birlikte arttığı ve diğer bir yandan oksidatif stres göstergelerinin vücut ağırlığı ile de ilişkili olduğu raporlanmıştır. Bu sonuç, idealin dışında bir vücut kütle indeksi ile yaşlanma oranı arasındaki yakın ilişkiyi gösteren başka bir çalışma niteliği kazanmıştır (Suresh vd., 2009).

Ayrıca Jha ve Rizvi, yaşın RCO birikimi için en güçlü risk faktörü olduğunu kanıtlayan çalışmayı ortaya koymuştur (Jha & Rizvi, 2011). Yaşlanma, birçok organın kademeli olarak fizyolojik nitelikte bozulmasının ötesinde, çoğu zaman birçok hastalığın ortaya çıkmasıyla ilişkili bir süreçtir. Postmenopozal yaşta en sık rastlanan sağlık sorunları kanser, kalp yetmezliği ve nörodejeneratif bozukluklardır (Całyniuk vd., 2016; Casado vd., 2008; Jha & Rizvi, 2011; Ogunro vd., 2014). Bu bozuklukların nedenleri tam olarak netlik kazanmamıştır, ancak birçok durumla ilişkili olarak oksidatif stresin önemli bir rol oynadığı kanısına varılmıştır. Öte yandan özellikle vücudun antioksidan potansiyeli, yaş ilerleyişi ile birlikte azalmaktadır. Yapılan çalışmalarda, yaşla birlikte süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi antioksidan enzimlerin aktivitesinde azalma oluşurken, reaktif oksijen türlerinin birikimi söz konusudur (Gorelik vd., 2007).

2.4.7. Diğer Hastalıklarda MDA'ların Rolü

Özellikle, yaşlı popülasyonda daha sık görülen hastalıklardan bazıları, giderek artan ambliyopi ve merkezi görme kaybı ile ilişkili yaşa bağlı makula dejenerasyonudur (YBMD). YBMD'nin patogenezi net olarak açıklanamamakla birlikte, Türkiye'de yapılan kesitsel bir çalışmada, YBMD hastalarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında plazma MDA düzeyinin anlamlı olarak çok daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Całyniuk vd., 2016; Pauer vd., 2010; Wiktorowska-Owczarek & Nowak, 2010). Bu araştırma sonucu, YBMD'nin patogenezinde retinadaki oksidatif stresin rolü hakkında varsayımları doğrular niteliktedir. Retina, çoklu doymamış yağ asitleri (oksitlenebilen) içeriği zengin olduğu için reaktif oksijen türlerinin zarar görmesine karşı çok hassastır. Öte yandan beyin de yüksek miktarda çoklu doymamış yağ asidi içeriğine sahip bir organdır. Beyin vücudun geri kalan bölgelerine karşın %20 kadar daha fazla oksijen tüketir ve düşük antioksidan aktivitesi gösterir. Dolayısıyla, oksidatif strese karşı daha savunmasız yargısı bildirilmiştir.

Böbrekler, karın bölgesinin arka tarafında bulunan yumruk büyüklüğünde; fasülye şekline benzer organlardır. Normal şartlarda vücutta iki adet böbrek bulunmaktadır.

Böbreklerin birçok görevi olmakla beraber; başta üre olmak üzere toksik maddeleri süzme görevini üstlenerek idrar yoluyla vücuttan atmaktır. Bir diğer önemli görevi, vücutta sodyum ve potasyum konsantrasyonunu dengesini korumasıdır (Akbulut, 2018).

Böbreklerin işleyişinde herhangi bir bozulma olduğu durumlarda başta üre olmak üzere diğer artık maddeler ve su, vücuttan atılamadığında kan dolaşımında kalırlar; bu durumun sonucunda vücut işleyişinde önemli problemleri beraberinde getirir. Böbrek hastalıklarının patogeneğinde bilinen en sık sebebi diyabet ve yüksek tansiyon hastalıklarıdır (Merçanlıgil, 2015).

Li vd.' göre, plazma MDA tarafından belirtilen oksidatif strese ilişkili olarak böbrek fonksiyonundaki düşüşle bağlantılı önemli bir faktördür. Li vd., yaptıkları çalışmada, plazma MDA'nın yalnızca kronik böbrek hastalığı prevalansı ile değil; aynı zamanda hafif böbrek fonksiyon yetmezliği prevalansı ile de önemli bir ilişkisi olduğunu bildirmiştir (Li vd., 2012).

2.5.Lipid Peroksidasyonu Olayının Önlenmesinde Etken Faktörler

Peroksidasyon olayının önlenmesinde çeşitli savunma mekanizmaları bulunmaktadır. Oksidasyonu önleyici sistemler olarak nitelendirilebilecek üç grup mevcuttur (Duthie, 1993). Bu önleyici sistemler;

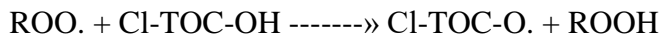
a. Serbest oksijen gruplarının etkinliğini azaltmaya yönelik veya hidrojen peroksit ya da hidroperoksitler gibi yapıların tepkimelerini azaltan; antioksidanlar adı verilen yapılar (GSH-Px, katalaz, glutasyon-s-transferaz, SOD2, karotinoidler ile apoferritin, transferin, laktoferrin ve seruplazmin gibi metal iyonları).

b. Meydana gelen grupları ve metabolitleri temizleyen antioksidanlar (vitamin E, vitamin C, karotinoidler, ubiquinol, ürik asit ve bilirubin). Bu maddeler zincir oluşumunu engellemeye yönelik faaliyet gösterir ya da bu aşamayı durdurmaya yönelik mekanizmada rol oynar.

c. Onarıcı (tamir edici) mekanizmaların etkisi (FLA:2 proteaz gibi).

2.5.1. E Vitamini

E vitamininin alfa, beta, gama ve delta tokoferol olmak üzere biyolojik olarak etkili 4 farklı şekli mevcuttur. Lipid peroksidasyon olayının önlenmesine yönelik etkinliği bakımından da yine en etkili olan çeşidi; alfa-tokoferoldür (Burton ve Traber, 1990; Padmaja vd., 1993; Fraga, 1988; Wilson, 1988; Squires vd., 1990). Vitamin E yağda eriyen bir vitamindir ve yağda eriyen vitaminler grubundakarşılaştırıldığında hücre zarları üzerinde en etkili olan (özellikle peroksidasyonun önlenmesi) vitamin E' dir. Bahsedilen antioksidatif etkisi aşamalı lipid peroksidasyon olayının zincir tepkimesi evresinde gerçekleşir. Tepkime sırasında en önemli rolü serbest oksijen gruplarının reaktifliğine karşı hücre zarı lipidlerindeki doymamış yağ asitlerini korumaya almasıdır. Vitamin E'nin antioksidan etkisi yüksek oksijen yoğunluğu olduğu durumlarda daha fazladır. Bu sebeple, yüksek oksijen kısmi basıncına maruz kalan lipid yapılarında (eritrosit zarı, solunum sistemi zarları gibi) etkisi yoğunlaşmıştır (Burton ve Traber, 1990; Draper, 1990; Tarladgis vd., 1962). Vitamin E' nin en etkin şekli olan α -tokoferol fenolik hidroksil grubundaki hidrojen atomunu lipid türevli peroksi grubuna yönlendirerek yağ asidi oksidasyonunu baskılamaya yönelik çalışmalarda bulunur. Öte yandan bu etki, yakındaki zar lipidlerinin de doymamış yağ asitlerini peroksi grubundan koruyarak lipid peroksidasyon olayını önlemek şeklinde de gerçekleşebilmektedir. Neticede, α -tokoferol'ün lipid peroksi grubuyla tepkimeye girmesi beraberinde, α -tokoferoksil grubunu meydana getirmektedir (Burton ve Traber, 1990; Kaneko vd., 1997).



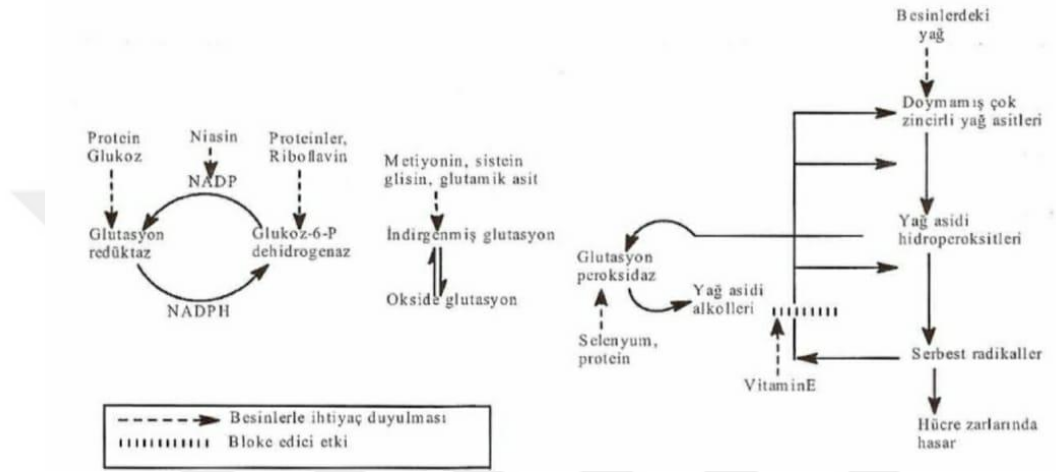
Oluşan grubun yüksek oranda dayanıklı bir yapıya sahip olması, oksijeni tutarak zincir tepkimesinin durması sonucuna varır. Oluşan alfatokoferoksil grubunu daha sonra glukuronik asitle tepkimeye girerek safra ile atılımı gerçekleşir. Vitamin E ve sonraki kısımda verilecek olan selenyumun, kükürtlü amino asitlerinin vb. yapıların lipid peroksidasyon olayındaki etkinliği Şekil 2.12' de verilmiştir (Konukoğlu ve Akçay, 1995). Bu konuda yapılan araştırmalarda Vitamin E'nin lipid peroksidasyon olayını önleyici etkileri çalışmalarla da desteklenmektedir. Yapılan bir çalışmada atların, yemlerine yüksek oranda doymamış yağ asidi ilave edilmesine karşın vitamin E, BHT ve vitamin C koruyucu dozlarda bir arada verilmiş; sonuçta MDA

oluşumunun %35 oranında baskılandığı bildirilmiştir (Draper, 1990). Diğer bir çalışmada, erişkin insanlarda, 10 gün boyunca 1000 IU d-a-tokoferol verilmesinin lipid peroksidasyonun belirteçlerinden olan pentan atılımını %35 oranında azalttığı rapor edilmiştir. Lipid peroksidasyon olayının gelişmesinde teşvik edici olarak nitelendirilen bir madde olan monensinin bu yöndeki etkilerinin önlenmesine yönelik olarak yapılan bir araştırmada etlik piliçlerde vitamin E ve selenyumun koruyucu yöndeki etkileri birlikte ve ayrı ayrı verilerek değerlendirilmeye alınmıştır. Çalışmanın sonucunda, özellikle vitamin E ve selenyumun bir arada kompleks olarak verilmesinin peroksidasyon olayının en köklü belirteçlerinden olan MDA 'nın karaciğerdeki miktarında ciddi oranda azalmalara sebebiyet verdiği bildirilmiştir (Ostałowska vd., 2016).

2.5.2. Selenyum

Selenyum, genellikle bitkilerde selenometiyonin ve selenosistein formunda bulunan bir elementtir. Vücut için esansiyel bir element olması beraberinde bu özelliğin temel sebeplerinden biri GSH-Px' in yapısına girme eylemidir. Selenyum organik ve inorganik bileşikleri halinde bulunur; vücuttaki birçok metabolik süreçte ve biyokimyasal tepkimelerde rol aldığı bilinmektedir. Görevlerinden büyük önem arz eden biri de GSH-Px' in yapısına girerek antioksidan bir maddeye dönüşerek görev yapmasıdır. Bahsedilen GSH-Px enzimi böbrek, akciğer, alyuvarlar, damar endotel ve gözün lens kısmında önem taşımaktadır. Enzim; peroksitlerinin alkollere dönüşümüne aracılık etme mekanizmasında görev alarak hücre ve hücre içi zarları yıkımlayıcı etkiden korumayı hedefler. Lipid peroksidasyonunda koruyucu rolü açısından iki tip GSH-Px vardır. Bunlardan birincisi, selenyum bağımlı GSH-Px ve ikincisi de selenyum bağımsız GSH-Px' dir (Draper, 1990; Konukoğlu ve Akçay, 1995). Selenyum bağımlı olan çeşidi GSH-Px çevresel baskı içerisinde ve selenyum eksikliğinde etkinliği azalmaktadır. Bu enzimlerin bulunma oranları birbirlerine göre farklılık gösterir. Örneğin yapılan bir çalışmada, ratların karaciğer hücrelerinde toplam GSH-Px' in % 14' ü kadarı selenyum bağımlıdır, selenyum bağımsız GSH-Px ise eriyebilir formunda bulunur. Selenyum bağımlı GSH-Px *in vivo* olarak etkinlik göstermekte ve bu etkiyi glutasyonla birlikte H₂O₂' in indirgenmesi şeklinde gerçekleştirir. Öte yandan, Fenton tepkimesinde hidroksil

grubunun etkisine karşıdoymamış yağ asitlerini korumaya yönelik eylem gerçekleştirir. Etkinlik yönünden karşılaştırıldığında selenyum bağımlı GSH-Px, selenyum bağımsız olan formundan çok daha etkilidir. Selenyum bağımlı olmayan GSH-Px organik hidroperoksitleri indirgemesine karşın H_2O_2 ' i parçalayamadığı bildirilmektedir (Draper, 1990; Wilson, 1988; Shaukat vd., 2018; Orhan, 2011; Ohkawa vd., 1979).



Şekil 2.12. Vitamin E, Selenyum, Kükürtlü Aminoasitler ve Niasin gibi Maddelerin Lipid Peroksidasyonunu Önlemedeki Etkileri

Kaynak: (Yarsan, 1998).

2.5.3.C Vitamini

C vitamini bir antioksidan olarak değerlendirilmesine rağmen, bu yöndeki etki mekanizması tam olarak açığa kavuşturulamamıştır. Ancak spesifik olarak lipid peroksidasyon olayındaki bilinen etkisi, metal iyonlarının indirgenmesi reaksiyonu ile ilgilidir. Bu mekanizma, besinlerdeki demirin de emiliminin artırılması ve emilen demirin de sonuçta Fe^{++} şeklinde indirgenmesi olayı açıklanmıştır. Beraberinde, Fe^{++} molekülü H_2O_2 'nin indirgenerek HO^{\cdot} grubunu oluşturması tepkimesine katılmaktadır. Ayrıca, C vitamini, O_2 grubu ile etkileşerek HO^{\cdot} ve O_2 gruplarının etkisiz duruma getirilmesi durumunu meydana getirir (Pandey vd., 1990). Dolayısıyla vitamin C'nin antioksidan etkinliğinin nedenini ortaya koymaktadır. Lens gibi ya da akciğer dokusu gibi SOD etkinliği düşük olan dokularda, C vitamininin bu özelliği önem arz etmektedir. Bu vitamin ile ilgili olarak yukarıda belirtilen birbirinin

karşıtı iki teori ortaya atılmıştır; C vitamini O_2 grubu ile etkileşerek HO^\cdot ve O_2 gruplarının özellikle bazı dokulardan uzaklaştırılmasını sağlarken, öte yandan da Fe^{++} ve Fe^{+++} metalleriyle reaksiyona H_2O_2 ' den HO grubunun oluşumunu teşvik etmektedir (Fenton tepkimesi) (Draper, 1990; Kaneko vd., 1997).

2.5.4.Demir

Demirin lipid peroksidasyon ile ilgili bilinen en kritik özelliği Fe^{++} ve Fe^{+++} moleküllerinin H_2O_2 ile reaksiyona girmesi (Fenton tepkimesi) ve sonucunda HO grubunu oluşturma eylemidir. Ancak, bu reaksiyonda demirin çeşitli formlarının (ferritin, transferritin ve laktoferrin) bir etkinliği söz konusu değilidir. Demirin lipid peroksidasyonunu teşvik etmeye yönelik etkilerinin yanı sıra antioksidan özelliği ise, bazı bakteri ve bitkilerde katalaz ve demir içeren SOD enzimlerinin yapısına girmesi ile mümkündür (Draper, 1990).

2.5.5.Bakır, inko ve Mangan

Metal içeren enzimler (dismutazlar) oksijen ile dolaylı ya da dolaysız olarak reaksiyona girerek hücrenel hasarı engellemektedir. Bu gruptaki enzimlerden birincisi, bakır ve çinkoyu bir arada bulundurmaktadır, hücre içinde ve hücre dışı sıvıda yer almaktadır. Diğeri bir enzim ise, mangan içeriğine sahiptir ve mitokondriyada yerleşmiştir. Dismutazların hepsibirbirleriyle yarışmalı olarak aynı dismutasyon reaksiyonunu katalize ederler. Bu reaksiyonlarda bakır, oksidasyon ve indirgenme olaylarındaki değişiklikleri kontrol ederken, çinko ise reaksiyonda direkt olarak katalizör olmamakla birlikte, enzimin yapısal bütünlüğünün korunmasında etkilidir. Bu enzimler SOD zerine etkinlik göstererek bu grubu H_2O_2 'e dönüştürürler (Draper, 1990; Kaneko vd., 1997; Mocan vd., 1999; Pandey vd., 1990).

2.5.6. Sülfür amino asitler (SAA)

Sülfür amino asitler (SAA) hayvanlarda E vitamininin vücutta kullanımında ve tkutilmesinde düzenleyici olarak görev yapmaktadır. Yapılan deneysel çalışmalar gösteriyor ki; kas distrofisi oluşturulan tavuklarda vitamin E ve selenyum kadar SAA 'ya da ihtiyaç duyulduğu tespit edilmiştir. Antioksidatif mekanizmada SAA,

indirgenmiş glutasyonun oluşumunda rol alarak lipid peroksidasyonun önüne geçebilmek için katılırlar (Draper, 1990).

2.5.7. Beta Karoten

Beta karoten zincir tepkimesi aşamasında etkin görev alan yağda çözünen bir antioksidandır. Özellikle singlet oksijen grubu üzerinde etkinlik gösterir; bu gruba başlayan reaksiyonları önleme konusunda rol alır. Bu olayda B-karotenin meyve ve sebzelerde bulunan 9-cis izomerinin, all-trans izomerinden daha etkili olduğu yapılan araştırmalar sonucunda bildirilmiştir. B-karoten, vitamin E ile karşılaştırıldığında, E vitamininin aksine düşük basınçlarda daha etkindir; yüksek basınçlarda ise etkinliği azalmaktadır (Donaldson & Knowles, 1993; Draper, 1990; Yarsan, 1998).

2.5.8. Niasin

Niasin NADP' in yapısına giren bir koenzim olmakla birlikte taşıdığı bu özellik sebebiyle serbest oksijen gruplarının patolojik etkilerine karşın besinsel kaynaklı bir koruyucu faktör olarak etkin rol alır. Ayrıca indirgenmiş glutasyonun etkinliğine katılmaktadır. Niasinin etkisi ile ilgili olaylar da Şekil 2.12' de gösterilmiştir (Donaldson & Knowles, 1993; Draper, 1990).

2.5.9. Billurubin

Billurubin hemoglobinin yağda eriyebilen katabolizma ürünüdür. Düşük yoğunluklarında singlet oksijen grubunun yıkılmasında aynı zamanda peroksi gruplarının uzaklaştırılması etki gösterir. Aynı şekilde, biliverdin de mide-barsak kanalında oksidatif yıkılmama sürecine karşın bir etkinlik göstermektedir (Draper, 1990; Kaneko vd., 1997).

2.5.10.Katalaz

Katalaz enzimi spesifik olarak kemik iliği, kan, böbrek ve karaciğerde bulunmaktadır. Bu enzim özellikle peroksizomlarda yerleşimi bulunan; dört adet hem grubu içeren bir hemoproteindir. Katalaz serbest grup olarak etkinlik gösteren H₂O₂ 'nin yıkılmasında rol alır (Draper, 1990; Kaneko vd., 1997; Mocan vd., 1999).

2.5.11.Diğerleri

Antioksidatif mekanizmada doğrudan ya da dolaylı yollardan görev alan tüm bahsi geçen mekanizmaların yanı sıra, diğerleri ise: bazı hormonlar (östrojenik hormonlar vb.), ürik asit, seruloplazimin, antioksidan bazı maddeler (BHA, promezatin, deferoksamin, N-asetilsistein, dietilditiyokarbamat, ve ubiquinol gibi), yangı gidericimaddeler (glukokortikoidler vb.) ve antinekrotiklerdir (Donaldson & Knowles, 1993; Draper, 1990; Kaneko vd., 1997; Mocan vd., 1999).

2.6.Besinlerde MDA Düzeyine Etki Eden Antioksidatif Etkili Bileşenler ve Besinler

Çoklu doymamış yağ asitlerinin zincirleme reaksiyonu sonucu meydana gelen peroksidasyonun sekonder metaboliti MDA miktarını besinin antioksidan içeriği, mevcut yağ asidinin doymamışlık derecesi ve zincir uzunluğu, oksijen çeşitleri, geçiş metalleri, sıcaklık, ortam pH'sı etkilemektedir (Karabudak, 2002).

Antioksidanların sağlık üzerine en temel etkisi serbest radikallerin ortamdan uzaklaştırılmasında rol oynamasıdır. Oksijenin çeşitli olaylar zinciri sonucu, oksidatif stres belirteci reaktif oksijen türleri (hidrojen peroksit, süperoksit vb.) dönüşebilmesi canlı sistemler üzerinde toksik etki oluşturmasına katkı oluşturmaktadır. Gerek biyolojik sistemlerde gerek besinlerde antioksidanların varlığı, oksidatif strese bağlı yıkımları azaltmaktadır. Bu bağlamda birçok araştırmaya gösteriyor ki; antioksidanlar, lipid peroksidasyonun ve dolayısıyla proteinlerin çapraz bağlanmasına, DNA mutasyonuna engel olur (Memişoğulları, 2005).

Vitamin E ve vitamin C yanı sıra yemlere katılan karotenoidler, çoklu doymamış yağ asidi içeriği yüksek olan balıkların dokularında oksidasyon sonucu oluşan lipid peroksidasyonun önlenmesinde; ayrıca renk maddesi olarakta destek sağlayan önem arz eden katkı maddesi olarak bildirilmiştir (Olson, 1989). Yapılan bir çalışmada, rasyonlarafarklı oranlara sahip ikisentetik β karoten ilavesi yapılmıştır. Daha sonra alabalıkların depolama sürecinde kas karotenoid stabilitesi ve lipid peroksidasyonu üzerine incelemesi yapılmıştır. Sonuçlarda, MDA düzeyleri karşılaştırıldığında 1. ve 2. ayda 70 mg/kg beta karoten içeriğine sahip rasyonla beslenen balık filetolarında diğer gruplara göre istatistiksel açıdan ciddi oranda düşük düzeye sahip olduğu rapor edilmiştir. Benzer şekilde yumurta tavuğu yemlerine lipitlerin peroksidasyonunu önlemek için α -tokoferollerin katılması önerildiği bildirilmiştir (Çoban & Keleştemur, 2010; Bhuyan vd., 1986).

Besinlere, lipid oksidasyonu etkileriniönlemek için genellikle yapay antioksidanlar katılmaktadır. Çoklu doymamış yağ içeriğine sahip besinlerde oksidasyonun daha yüksek oranda gerçekleşmesi ransidite beraberinde besin yapısındaki E vitamininin de zarar gördüğü araştırmalarda ortaya konulmuştur. Bu sebeple yüksek düzeyde çoklu doymamış yağ asidi içeriğine sahip balık yağı veya unu katılmış yemler antioksidan maddeler ilave edilmez ise E vitamini eksikliği görülebilmektedir (Van Elswyk, 1997). Ayrıca, oksidatif bozulmaya karşın C vitamini, oksidayona uğramış E vitaminini indirgeme görevini üstlenerek hücre içerisinde tekrar antioksidan özellik kazanmasında görev aldığı için yemlere eklenmesinde yararlı olacağı bildirilmiştir. Yapılan bir çalışma, %4 düzeyinde ayçiçeği ve balık yağı olmak üzere iki yağ kaynağı içeriğine sahip yumurta tavuğu yemlerine E ve C vitaminleri ilavesinin yumurta sarısı yağ asitleri bileşimine ve MDA miktarına etkilerinin belirlenmesi amacıyla bir araştırmayı ortaya koymuştur. Denemenin 1. ayında ayçiçek ve balık yağlı yemlere E ve C vitaminlerinin ilave edilmesiyle tüm gruplarda yumurta sarılarında belirlenen MDA düzeyinin azaldığı bildirilmiştir. Araştırmanın 2. haftasında her iki yağ kaynaklı ve özellikle de balık yağlı gruplarda, E ve C vitaminleri ilavesi ile de yumurta sarısı MDA düzeylerinin yükseldiği izlenmiştir. Gerçekleşen olay, E ve C vitaminlerinin yemlerdeki miktarının azalması beraberinde antioksidan etkisini bu sebeple aktif olarak gösteremediği olarak yorumlanmıştır (Eseceli & Kahraman 2004).

Lipid oksidasyonunu kontrol altına almak için yapay bileşikler yaygın olarak kullanılmaktadır. Fakat, yapılan bazı toksikolojik çalışmalar kullanılan sentetik bileşiklerin kanserli hücre gelişimini teşvik ettiği bildirilmiştir. Bu sebeple, özellikle son zamanlarda güvenilir gıda üretimi gündemde geniş bir yer kaplamasıyla beraber doğal katkı maddeleri arayışı ön plandadır. Bu amaçla yapılan bir başka çalışma, yapısında bulunan uçucu yağlardan kaynaklanan antioksidan etkiye sahip olan biberiye ve adaçayı gibi aromatik bitki ekstraktlarının kullanımı üzerine bir araştırma yapmıştır (Önenç & Açıkgöz, 2005).

Yapılan bir çalışmada, etlik piliç yemine 500 mg/kg adaçayı veya biberiye ekstraktı katılması, 4 ay muhafaza edilen göğüs ve but etlerinde lipid oksidasyonunu önemli düzeyde azaltmıştır (Lopez-Bote vd., 1998). Başka bir çalışmada kolza yağının 80 ° C'deki peroksit değeri baz alınarak, antioksidasyon etkisi bakımından adaçayı ekstresi; BHT ile karşılaştırıldığında daha güçlü bir antioksidan etkisi gösterdiği rapor edilmiştir (Bandoniene vd., 2002). Kekik uçucu yağı katılan yemlerle beslenen piliçlerin göğüs ve but etlerindeki MDA miktarı kontrol grubuna göre kekik uçucu yağı artışı ile doğru orantılı olarak azaldığı bildirilmiştir (Önenç & Açıkgöz, 2005).

Kefirin laktik asit içeriğine sahip olması antioksidan etki gösterdiği bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada E vitamini ve kefirden yoksun beslenen gruptaki farelerde oksidatif stres arttığı zicirleme olarak lipid peroksidasyonuna sebep olduğu ve dolayısıyla MDA düzeyinin yükseldiği bildirilmiştir. Aynı zamanda kefir ve E vitamini verilen farelerde GSH-Px seviyelerinin yükseldiği ve lipid peroksidasyonunda düşüşün gözlenmesi kefir ve vitamin E destekli beslenmenin lipid peroksidasyonu yanı sıra antioksidan enzim sistemini etkilediği rapor edilmiştir (Güven vd., 2004).

Öte yandan, başka bir çalışmada, fasulyede MDA üzerine farklı miktarlarda tuz ve silisyum uygulamaları ile iki faktörün etkileri karşılaştırılmıştır. Bitkide tuz stres artmasıyla doğru orantılı olarak MDA seviyesinin de paralel artış gösterdiği bildirilmiştir. Tuzun ilavesine karşın silisyumun stres koşullarında hücre zarında MDA düzeyinde kayda değer bir azalmaya sebep olduğu tespit edilmiştir (Aydın vd., 2012). Ek olarak silisyumun, membran fonksiyonunu ve bütünlüğünü koruyarak; bitki gelişimini ve verimini iyileştirmekte olduğu bildirilmiştir (Oral vd., 2020).

Mantarlar üzerinde yapılan bir çalışmada, saptanan MDA ve doymamış yağ asitleri/doymuş yağ asitleri oranları değerlendirilmeye alınmıştır. Çalışma sonucunda *Cantharellus cibarius* türü mantar düşük doymamış/doymuş yağ asitleri oranı ve dolayısıyla beklenildiği gibi düşük MDA miktarına sahiptir. Çünkü MDA doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonun son ürünüdür (Çetin, F., 2010).

2.7.Çikolata

Kakao, Amerika ekvatorial yağmur ormanları menşeli *Theobroma cacao* bitkisinin yağlı tohumudur. Arkeolojik çalışmalarneticesinde kakaonun ilk kez M.Ö. 400'lü yıllarda Orta Amerika'da Mayalar tarafından içecek niteliğinde tüketilmeye başlandığı bildirilmiştir. Avrupada ilk olarak kakao içeceğini 16. yy.'da İspanyolların tükettiği bildirilmiştir (Beg vd., 2017). Günümüzde sıkça tüketilen çikolata ise, temel olarak kakao likörünün, kakao yağı, şeker ve süt gibi bileşenlerle bir araya getirilerek yapılması ile meydana getirilen yiyecektir (Fernández-Murga vd., 2011).

Çikolata içeriğinde bulunan bileşenlerin tür ve miktarına göre (sütlü çikolata, bitter çikolata, beyaz çikolata) isimlendirilmektedir. Çikolatanın yapım aşaması 5 temel basamaktan oluşmaktadır. Bunlar; karıştırma, inceltme, konçlama, temperleme ve paketlenmedir. Çikolatanın kalitesini belirleyen en temel bileşen kakao yağı miktarıdır. Kakao yağı oranı artması beraberinde doğru orantılı olarak çikolatanın kalitesinin arttığı bildirilmektedir (Bruinsma & Taren, 1999). Çalışmalara sıklıkla konu olan bitter çikolata, kakao likörü ve kakao yağından oluşmaktadır. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi'nin 2016 raporuna göre, bitter çikolatadaki kakao likörü miktarı ağırlığının %35'inden az olmaması gerekmektedir. Kakao tohumlarının %50-57'si yağdır. Kakao tohumları kavrulduktan sonra toz haline getirilmeden önce bu yağ ayrılır. Sütlü çikolatadaki kakao likörü miktarı, bitter çikolataya göre daha az olmakla birlikte, sütlü çikolatanın bileşiminde kakao yağına ek olarak süt yağı da bulunmaktadır (Bruinsma & Taren, 1999). Kakao çekirdeklerinin kavrulup çekilmesi sırasında ısı sebebiyle kakao yağının erimesi sonucu kakao likörü elde edilir. Kakao likörü; polifenoller, vitamin ve mineral içeriği yüksektir. Kakao çekirdeğinin kuru ağırlığının %50-57'sini oluşturup ve çikolataya erime özelliği yani yumuşak yapı özelliğini kazandırır. Kakao yağıkonsantrasyonundaki yağ asitleri ise; doymuş yağ

yağ asitleri (stearik; 18:0, %35 ve palmitik; 16:0, %25) ve tekli doymamış yağ asitleri (oleik; 18:1, %35) ve çoklu doymamış yağ asitleri (linoleik, %3) dir (Bruinsma & Taren, 1999; Keen, 2001).

Genel olarak çikolata çeşitleri arasında kakao miktarı karşılaştırmasında; bitter çikolatadaki toplam kakao miktarı %50-85 arasında, sütlü çikolatada ise bu değer %20 -30 arasında yer almaktadır. Polifenoller kakao tohumlarının kuru ağırlığı baz alındığında %6-8 civarını oluşturmaktadır. Çikolatalarda antioksidan niteliğinde bileşenlerden en çok bilinen epikateşin, kateşin ve prosiyanidin gibi flavanollerin haricinde antosiyanin, stilbenler vefenolik asit kakao tohumunun yapısındaki polifenollerdir (Ludovici vd., 2017). 10 gram bitter çikolata içeriğinde polifenol düzeyi yaklaşık olarak 120-150 mg; kakao tozunda ise bu miktar yaklaşık olarak 5 katı yüksek düzeyine çıkabilmektedir. Sütlü çikolatanın bitter çikolataya göre kakao miktarı daha az olması sebebiyle polifenol içeriği daha düşüktür. Yapılan bir araştırma sonucunda; bitter çikolatada kateşin içeriği 12 mg/100 g, epikateşin içeriği 41,4 mg/100 g olarak bildirilmiştir (Beckett, 2009; Fernández-Murga vd., 2011).Epikateşin ve kateşin içeriği bitter çikolata seviyeleri; çaydan yaklaşık 20 kat, sütlü çikolatadan ise yaklaşık 4 kat daha fazladır. Bitter çikolata sütlü çikolatadan daha yüksek oranda kakao çekirdeği likörü ile hazırlanır ve bu yüzden daha fazla flavonoid içerir. Bu önemli bir ayrımdır çünkü bütün çikolatalar aynı miktarda flavonoid içermez (Lotito vd., 2000). Kakaodan elde edilen epikateşin bileşikleri; oksidasyon tepkimelerinden korudukları çeşitli *in vitro* çalışmalarında rapor edilmiştir (Lotito vd., 2000; Martín vd., 2009).

Ürün Çeşidi	Kateşinler (mg/g)	Prosiyanidinler (mg/g)	Toplam Flavanoller (µg/g)	Toplam Polifenoller (mg/g)	Kateşin ve Epikateşin (mg/g)	Polifenoller (mgGAE/g)	Prosiyanidinler (mg/g)
Sütlü Çikolata	0,23-0,32	2,16-3,14	-	15,0	0,15-0,16	3,25-5,38	0,43-0,90
Bitter Çikolata	0,77-1,58	8,52-19,85	-	36,5	0,48-1,37	11,73-14,88	2,78-4,10
Fırınlanmış cips (1)/Fırınlanmış çikolata(2)	1,01-1,33	8,71-15,57	-	-	-	26,91-27,18(2) 11,76-12,88(3)	12,57-15,84(2) 3,70-6,29(3)
Tatlandırılmamış çikolata	1,47-3,17	18,76-25,20	-	-	-	-	-
Doğal toz	2,90-3,48	32,19-48,70	2109,00-3058,52	-	-	-	-
Alkalize kakao tozu	0,41-0,73	7,02-10,82	848,81-1148,32	-	-	-	-
Kakao tozu	-	-	-	65,0	2,96-3,27	45,30-60,20	19,28-23,71
Çikolata şurubu	-	-	-	-	-	3,66-4,79	0,37-0,91

Şekil 2.13.Çeşitli Kakao ve Çikolata Ürünlerindeki Polifenoller

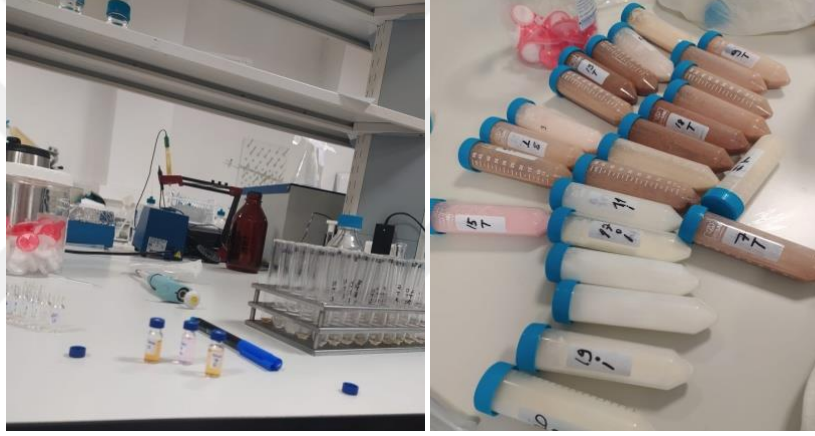
Kaynak: Esra vd., 2017.

ÜÇÜNCÜBÖLÜM

ARAŞTIRMA YÖNTEMİ

3.1.Araştırmanın Amacı

Bu çalışmada farklı çikolata ürünlerindeki MDA içeriğinin *in vitro* sindirim öncesi ve sindirim sonrası miktarları ile biyoerişebilirliğinin tespit edilmesi ve karşılaştırma yapılması amaçlanmıştır. Laboratuvar deney aşaması Şekil 3.1’ de gösterilmiştir.



Şekil 3.1: Analiz Aşamaları

3.2.Araştırma Zamanı, Yeri ve Örnekler

Bu araştırma, Mart 2021’ de İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi AR-GE laboratuvarında yapılmıştır. Bu çalışmada, sık tüketilen 20 farklı çeşit çikolata İstanbul’ daki yerel marketlerden temin edilmiştir.

3.3.Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan ekipmanlar Tablo 3.1’de, kullanılan kimyasallar Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.1: Analizde Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

HPLC	UFLC-Shimadzu
Analitik Ters Fazlı Kolon	Lichospher 60 RP-select B 5µmLiChroCART 250-4 HPLC cartridge
Analitik terazi	(0,0001 g hassasiyetle) Radwag – AS 220.R2
0,45µm filtre	Chromafil CA-45/25
Adi filtre kağıdı	Chromafil CA-45/25
Karıştırıcı	IsolabLaborgeröteGmbH
Çalkalamalı su banyosu	Memmert
pH metre	HANNA HI/2211PH/ORP Meter
Ultrasonik su banyosu	Selectaultrasons H-D
Otoklav	SelectaPresoclave – II
Otomatik pipet (100/1000µl-5/50µl- 2/200µl)	Axypet- autoclavable
Santrifüj	Hitachi CR22N
Buzdolabı	Uğur
Su destilasyon cihazı	Direct-Q 3 UV ultrapure (type1)
Cam tüpler ve Analiz şişeleri(50 mL'lik ağzı kapaklı)	

Tablo 3.2: Analizde Kullanılan Kimyasallar

Açık Adı, Kısaltması, Kapalı Formülü	CAS Numarası (Chemical Abstracts Service)	Diğer Ayrıntılar
Metanol, MeOH,CH ₃ OH	67-56-1	HPLC kalite
Hidroklorik asit,HCl	7647-01-0	HPLC kalite
Asetonitril, ACN,CH ₃ CN	75-05-8	HPLC kalite

Triklorasetik asit (TCAA), Tiyobartirük asit (TBA), Tetraetoksipropan standardı, Etanol, Distile su, Metanol.

HPLC sistemi karışımlardaki bileşenlerin, ayrıştırılmasında, nitelik ve niceliklerinin belirlenmesinde kullanılan bir analiz tekniğidir. HPLC sistemi çalışma prensibi Şekil 2.11'de gösterilmiştir (Wei,Liu&Sun, 2018).

3.4. Analizi Yapılan Malzeme Listesi ve Miktarları

Analizi yapılan örnekler Tablo 3.3' te, örneklerin beyan edilen besin değerleri ise Tablo 3.4'de verilmiştir.

Tablo 3.3: Analizi Yapılan Örneklerin Listesi ve Miktarları

Örnek	Örneğin çeşidi	Miktarı
1	Sütlü Çikolata (1)	5 g
2	Sütlü Çikolata (2)	5 g
3	Fındıklı ve Üzümlü Çikolata	5 g
4	Kan Portakallı ve Fındıklı Sütlü Çikolata	5 g
5	Fındıklı Çikolata (1)	5 g
6	Fındıklı Çikolata (2)	5 g
7	Antep Fıstıklı Çikolata (1)	5 g
8	Antep Fıstıklı Çikolata (2)	5 g
9	Fındıklı Çikolata (3)	5 g
10	Beyaz Çikolata	5 g
11	Portakallı Bademli Beyaz Çikolata	5 g
12	Antep Fıstıklı Beyaz Çikolata	5 g
13	Çilekli Beyaz Çikolata	5 g
14	Karamelli Altın Çikolata (Altın)	5 g
15	Frambuazlı Beyaz Çikolata	5 g
16	Antep Fıstıklı Bitter Çikolata	5 g
17	Bitter Çikolata (1)	5 g
18	Bitter Karadutlu Çikolata (%60)	5 g
19	Bitter Çikolata (2)	5 g
20	Bitter Çikolata (3)	5 g

Tablo 3.4: Çikolata Örneklerinin İçerik Tablosu

Örnek (100 g)	Enerji (kcal)	Yağ (g)	Doymuş Yağ (g)	Karbon hidrat (g)	Lif (g)	Protein (g)	Kakao Kuru Maddesi (%)
Sütlü Çikolata (1)	554	33,9	20	52,4	2,4	8,5	36
Sütlü Çikolata (2)	543	32,2	18,6	53,5	2,4	0,7	30
Fındıklı ve Üzümlü Çikolata	545	32	14	53	3,3	8,2	30
Kan Portakallı ve Fındıklı Sütlü Çikolata	543	31	14	55	3,4	8,2	30
Fındıklı Çikolata (1)	537	33	18,2	44,4	8,2	11,5	30
Fındıklı Çikolata (2)	557	34	14	52	3,5	8,9	29
Antep Fıstıklı Çikolata (1)	541	31	17	55,8	2,5	8,5	30
Antep Fıstıklı Çikolata (2)							25
Fındıklı Çikolata (3)	613	46	12,2	36,7	5,3	10,3	25
Beyaz Çikolata	552	32	21	57	0	8	0
Portakallı Bademli Beyaz Çikolata	519	30	18	54	0,6	9	0
Antep Fıstıklı Beyaz Çikolata	577	37	18	51	0	9,4	0
Çilekli Beyaz Çikolata	565	35	19	54	0	8,3	0
Karamelli Altın Çikolata (Altın)	583	39	22	53	0	6,2	0
Frambuazlı Beyaz Çikolata	535	30	19	57	0	8,8	0
Antep Fıstıklı Bitter Çikolata	525	33	21	44	12	8,5	54
Bitter Çikolata (1)	548	37	23	41	9,5	7,4	60
Bitter Karadutlu Çikolata (%60)	548	36,4	22,4	42,4	10	7,6	60
Bitter Çikolata (2)	541	36,8	16,8	42,8	6	7,9	60
Bitter Çikolata (3)	562	35,5	20,8	50,6	6,3	6,6	53

3.5.MDA Tayini

3.5.1. Deney Çözeltilerinin Hazırlanması

Triklorasetik asit (TCAA) Çözeltisi (%10): 100g triklorasetik asit (TCAA) deiyonize suda çözülerek 1000 ml ye tamamlanmıştır.

Tiyobartirük asit (TBA) Çözeltisi (%0,67): 1,675 g tiyobartirük asit distile suda çözünerek 250 ml ye tamamlanmıştır.

Tetraotoksipropan Standardı: Tetraotoksipropan standardından 0.5 ml alınarak 100 ml etanol ile tamamlanmıştır. Bu çözeltiden 0.1 ml alınarak 100 ml'ye deiyonize su ile tamamlanmıştır. Standart çözeltisinin konsantrasyonu 20 µl/L dir.

3.5.2. Örneğin Hazırlanması ve Analiz

Çalışmamızda sıklıkla tüketilen 20 adet farklı çikolata kullanılmıştır. Kullanılan örneklerin tipi ve miktarı Tablo 3.3' de verilmiştir. Homojenize edilmiş 5 gram katı kıvamdaki örnekler, 50 mL'lik olan falkon tüplerinin içine konuldu ve üzerlerine 25 mL %10'luk TCA ilave edildi. Örnekler, parçalama cihazında 1 dakika boyunca tutularak homojen bir duruma getirildi ve hacmine tamamlandı. Sonra santrifüj cihazında örnekler, 8000 rpm'de 5 dakika kadar santrifüj edildi. Santrifüj edilmesinden sonra süpernatandan 1 mL alındı ve türevlendirme işlemi için 1 mL tiobarbituricasit çözeltisinden (1,675 g/250 mL TCA) ilave edildi. 90°C'de 30 dakika kadar su banyosunda örnekler bekletildi. Örnekler 0,45 mikronluk selüloz asetat filtreden geçirildikten sonra HPLC cihazına verildi.

3.5.3. Blank Hazırlanışı

10 ml lik test tüpü içerisine 1 ml TCAA ve 1 ml TBA çözeltisi ilave edilir. 10 dakika 90 °C'de su banyosunda inkübasyon yapıldıktan sonra soğutulur. Daha sonra 0,45 mikronluk selüloz asetat filtreden geçirilir ve HPLC'ye verilir.

3.5.4. Standart Hazırlanışı

0,1 ml Tetraotoksipropan standart çözeltisi alınarak deney tüpü içine eklenir. Üzerine 1 ml TCAA eklenir ve 10 dakida 90 °C'de su banyosunda inkübasyon yapıldıktan sonra soğutulur. 0,45 mikronluk selüloz asetat filtreden geçirilir ve HPLC'ye verilir.

3.5.5. HPLC Koşulları

Mobil faz: 0,05M KH₂PO₄ tampon çözeltisi/Metanol/Asetonitril (72/17/11) karışımından oluşur

Kolon: İncercil ODS-3 (4.6 mm × 150mm)

Dedektör: HPLC-UV

Dalga Boyu: 530-550 nm

Akış Hızı: 1 mL/dakika

Enjeksiyonun Hacmi: 10 µl

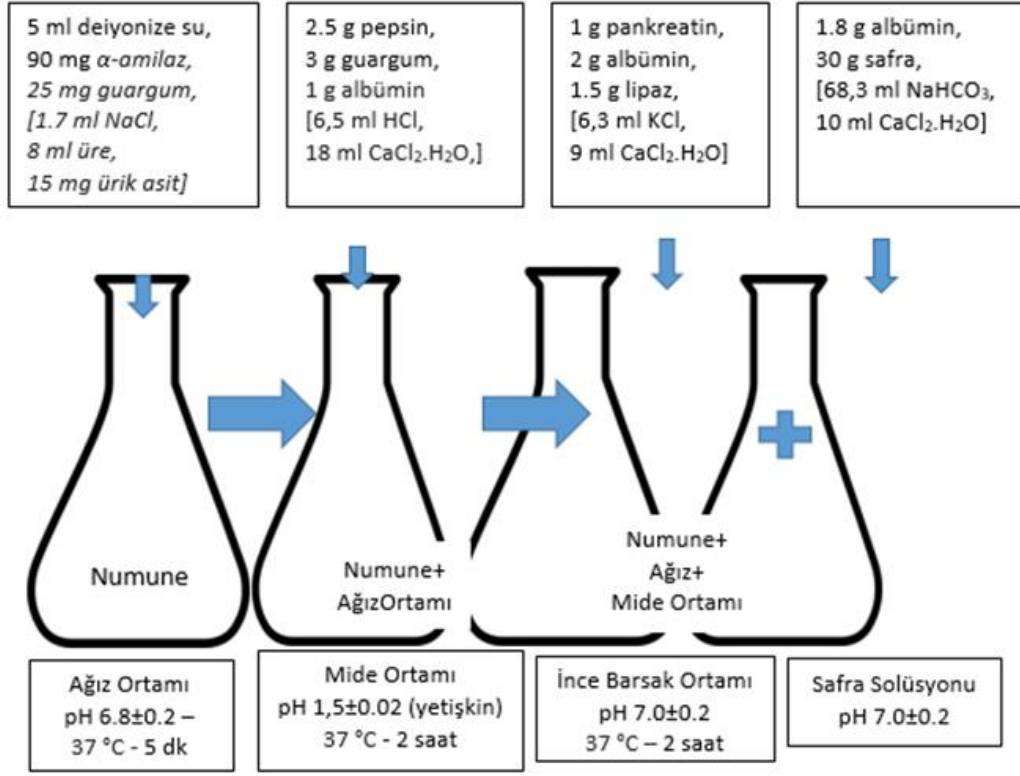
3.6. *In vitro* Analizi

In vitro gastrointestinal sindirim sistemi metodu Şekil 3.2' de gösterilmiştir. 100 mL'lik erlenlere çikolata örneklerinden 5'er gram tartıldı ve sıra ile ağız, mide ve ince bağırsak ortamı solüsyonları ilave edilerek *in vitro* ortamda sindirim gerçekleştirildi.

Ağız ortamında; 100 mL'lik bir beher içerisinde 5 gram tartılan örneklerin üzerine, hazırladığımız ağız solüsyonundan 5 mL eklenerek karıştırıldı ve daha sonra 30 saniye boyunca vorteks ile karıştırıldı ve homojen hale getirildi. Daha sonra bu karışım 5 dakika boyunca 37 °C'de çalkalamalı su banyosunda inkübe edildi.

Mide ortamında; ağız ortamından gelen karışıma 12 mL mide solüsyonu ilave edildi. Bu karışım, 30 saniye boyunca bir vorteks ile karıştırıldı ve 2 saat boyunca 37 °C'de çalkalamalı su banyosunda tekrar inkübe edildi.

İnce bağırsak ortamında; mide ortamından sonra elde edilen karışıma 10 mL ince bağırsak solüsyonu ve 5 mL safra solüsyonu eklendi. Bu karışım, 2 saat süre ile 37°C'de tekrar çalkalamalı su banyosunda inkübe edildi. Sindirim işlemi tamamlandıktan sonra, son hacim, 50 mL'ye deiyonize su ile tamamlanarak seyreltildi. Daha sonra numuneler 8000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi ve 0,22 mikron CA filtreden süzülde ve analiz edilene kadar -80 °C'de dondurucuda saklandı.



Şekil 3.2: *In vitro* Analizin Sistematığı

3.7. İstatistiksel Analizler

Her bir örnek üç kez analiz edildi. İstatistiksel analiz, tek yönlü varyans analizi (ANOVA, $p < 0,05$, Tukey testi) kullanılarak yapıldı. Gruplar arasındaki önemli farklılıklar istatistiksel olarak değerlendirildi. Tablolarda sunulan verilerin hepsi ortalama \pm standart sapmadır (SS).

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

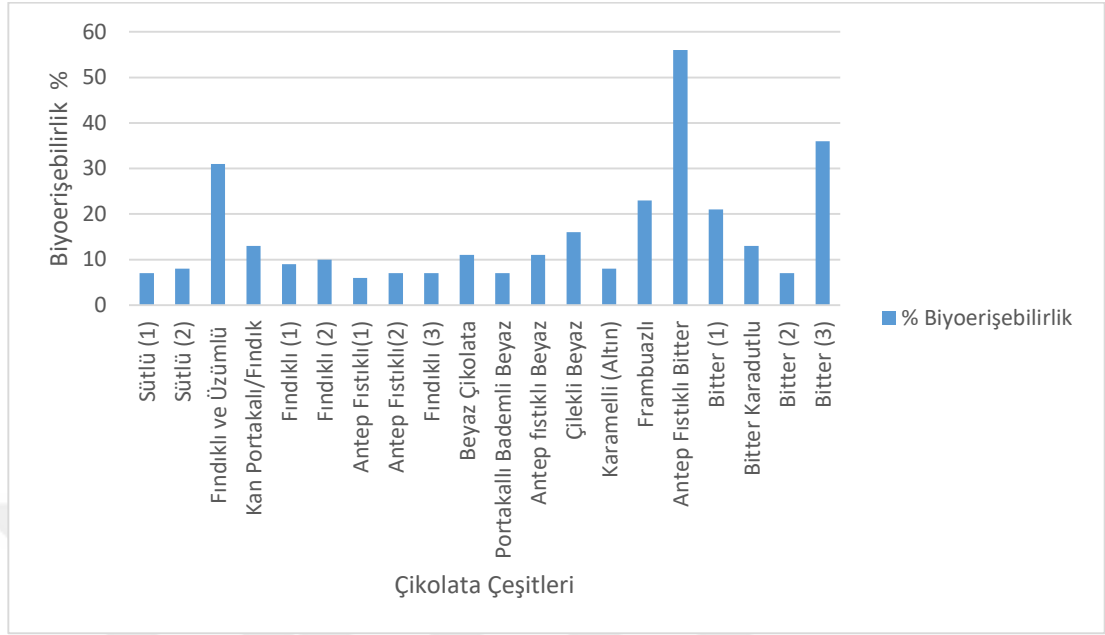
ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1.Çikolata Örneklerinde Sindirim Öncesi ve Sonrası MDA Miktarları ve Biyoerişebilirliği

20 adet çikolata (farklı markalara ait sütlü çikolatalar, fındıklı üzümlü çikolata, kan portakallı ve fındıklı sütlü çikolata, farklı markalara ait fındıklı çikolatalar, farklı markalara ait Antep fıstıklı çikolatalar, beyaz çikolata, portakallı bademli beyaz çikolata, Antep fıstıklı beyaz çikolata, çilekli beyaz çikolata, karamelli çikolata, frambuazlı beyaz çikolata, Antep fıstıklı bitter çikolata, farklı markalara ait bitter çikolatalar, bitter karadutlu çikolata) araştırılmıştır. *In vitro* ve HPLC yöntemiyle çikolata örneklerinin sindirim öncesi düzeyi, sindirim sonrası düzeyi ve biyoerişebilirlik oranı tespit edildi ve Tablo 4.1’ de belirtilmiştir.

Tablo 4.1: Çikolatalarda Sindirim Öncesi ve Sonrası MDA Miktarları ve Biyoerişilebilirliği

Örnek	Başlangıç (µg/100 g)	Sindirim Sonrası (µg/100 g)	Biyoerişebilirlik (%)
Sütlü Çikolata (1)	1993±90 ^a	148±7 ^b	7
Sütlü Çikolata (2)	1674±76 ^a	140±6 ^b	8
Fındıklı ve Üzümlü Çikolata	1395±63 ^a	427±19 ^b	31
Kan Portakallı ve Fındıklı Sütlü Çikolata	1993±90 ^a	267±12 ^b	13
Fındıklı Çikolata (1)	1595±72 ^a	148±7 ^b	9
Fındıklı Çikolata (2)	1953±88 ^a	199±9 ^b	10
Antep Fıstıklı Çikolata (1)	1900±86 ^a	120±5 ^b	6
Antep Fıstıklı Çikolata (2)	1732±78 ^a	120±5 ^b	7
Fındıklı Çikolata (3)	1549±70 ^a	104±5 ^b	7
Beyaz Çikolata	1188±54 ^a	128±6 ^b	11
Portakallı Bademli Beyaz Çikolata	1692±77 ^a	120±5 ^b	7
Antep Fıstıklı Beyaz Çikolata	1481±67 ^a	159±7 ^b	11
Çilekli Beyaz Çikolata	1453±66 ^a	227±10 ^b	16
Karamelli Altın Çikolata (Altın)	1318±60 ^a	108±5 ^b	8
Frambuazlı Beyaz Çikolata	1551±70 ^a	355±16 ^b	23
Antep Fıstıklı Bitter Çikolata	636±29 ^a	355±16 ^b	56
Bitter Çikolata (1)	2392±108 ^a	490±22 ^b	21
Bitter Karadutlu Çikolata (%60)	2292±104 ^a	299±14 ^b	13
Bitter Çikolata (2)	1993±90 ^a	144±6 ^b	7
Bitter Çikolata (3)	1232±56 ^a	443±20 ^b	36

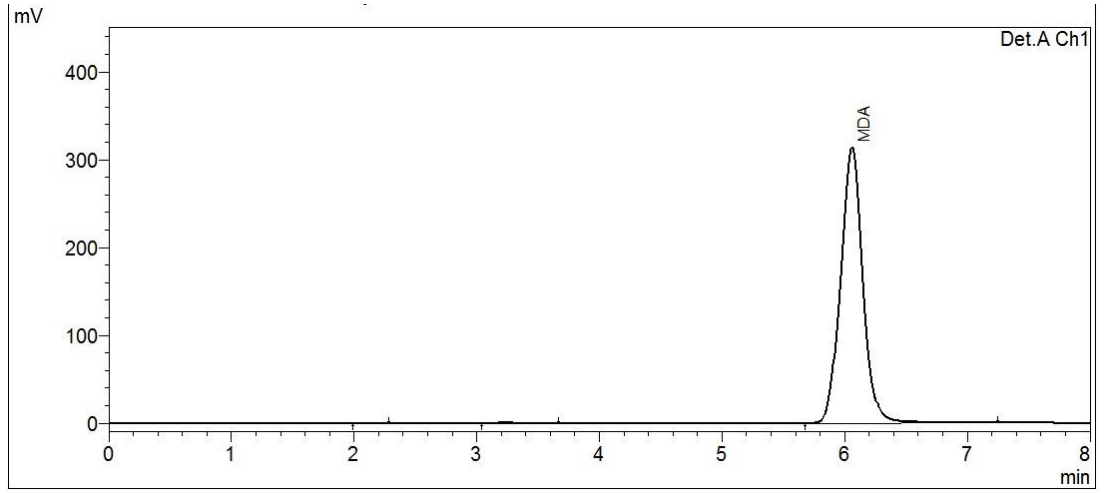


Şekil 4.1: Örneklerin Biyoerişebilirlik Oranlarının Grafik ile Gösterimi

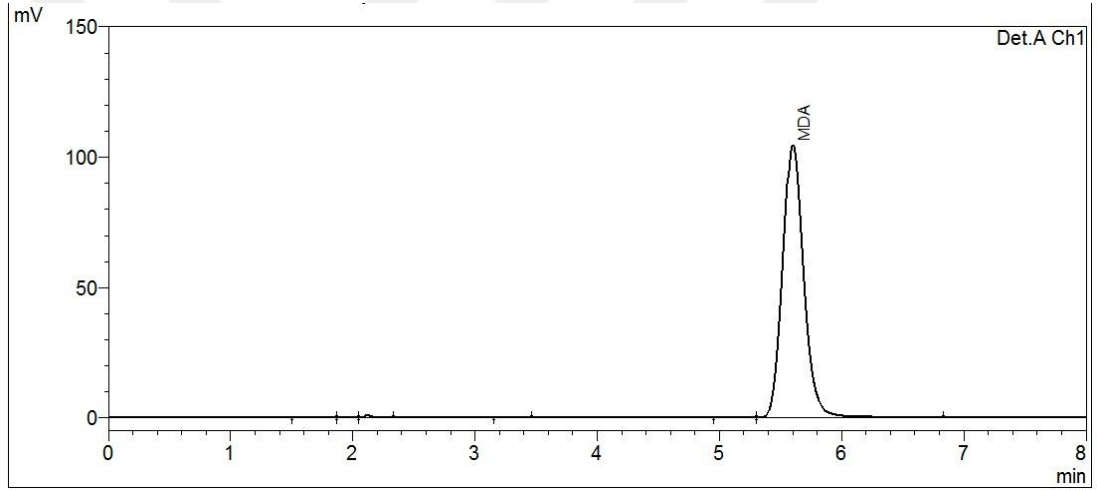
Elde edilen sonuçlara göre, incelenen örneklerde sindirim öncesi MDA miktarı 636-2392 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ aralığında bulunmuştur. Sindirim öncesi MDA miktarı en fazla olan çikolata, bitter çikolata 1 (2392 $\mu\text{g}/100\text{ g}$)' dir. Buna karşın sindirim öncesi en düşük MDA miktarı Antep fıstıklı bitter çikolatada (636 $\mu\text{g}/100\text{ g}$) bulunmuştur. Sindirim sonrası MDA miktarı aralığı 104- 490 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ' dir. Sindirim sonrası MDA miktarı en fazla olan bitter çikolata 1 (490 $\mu\text{g}/100\text{ g}$) iken, en düşük sindirim sonrası MDA miktarına sahip olan örnek fındıklı çikolata 3 (104 $\mu\text{g}/100\text{ g}$)' tür.

Çikolataların MDA biyoerişebilirlikleri %6-56 aralığındadır. En yüksek biyoerişebilirlik oranı Antep fıstıklı bitter çikolatada (%56) iken, en düşük biyoerişebilirlik oranı %6 ile Antep fıstıklı çikolatadadır.

HPLC standart kromatogramı Şekil 4.2' de; HPLC örnek kromatogramı Şekil 4.3' de verilmiştir.



Şekil 4.2: HPLC Standart Kromatogramı



Şekil 4.3: HPLC Örnek Kromatogramı

BEŞİNCİ BÖLÜM

TARTIŞMA

5.1. İşlenmiş Gıdalarda Yağ Asidi İçeriğine Göre MDA Değerlendirilmesi

MDA, çoklu doymamış yağlar da hidrojenin indirgenmesi ile başlayan zincirleme oksidasyonunun sekonder metabolitlerinden olan bir dialdehittir. Eksojen MDA (besin kaynaklı); endojen MDA metabolizmasından farklıdır. Lipid peroksidasyonunun bir ürünü olan MDA biyolojik olarak aktif bir bileşen olup organizmada yer alan enzim, lipid, protein ve DNA ile reaksiyona girip yapı ve fonksiyon hasarlarını meydana getirmektedir. Bu sebeple, mutajenik ve karsinojenik bileşik olarak nitelendirilmektedir. Dolayısıyla, birçok hastalığın (kanser, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar vb.) patogeneğinde araştırma konusu olmuştur.

Besinlerdeki MDA miktarını; yağ asidi çeşitleri ve bulunan miktarlarına göre oranları, zincir uzunluğu, yapısında bulunan antioksidanlar, geçiş metalleri, oksijen çeşitleri, sıcaklık ve ortam pH'sı etkilemektedir. Paketli gıdalarda üretimden tüketime birçok aşama MDA miktarını etkileyebilmektedir.

Gökçe vd., yaptığı bir çalışmada tereyağı (doymuş yağ asidi oranı yüksek), margarin, ayçiçek yağı (n-6 PUFA oranı yüksek), zeytinyağı (MUFA oranı yüksek) ve mısır yağının (n-6 PUFA oranı yüksek) piliçlerdeki lipid peroksidasyonu üzerine olan etkilerini araştırmışlardır. Yaptıkları çalışmanın sonuçlarına göre, lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA'yı en yüksek mısır yağı daha sonra sırasıyla yüksekten düşüğe ayçiçeği yağı, zeytinyağ ve margarin olarak belirlenmiştir. Çalışmanın sonuçları piliç yemlerine ilave edilen doymamış yağların doymuş yağlara göre daha yüksek oranda peroksidasyona uğradığı verisini ortaya koymuştur. Öte yandan araştırmacılar, çoklu doymamış yağ asitleri içeriği zengin olan ayçiçeği ve mısır yağları; tekli doymamış yağ asitlerince zengin zeytinyağınagöre lipid peroksidasyonuna daha fazla duyarlı olduğunu bildirilmektedir. Sunulan araştırmada tekli doymamış yağ asit oranı fazla olan fındık yağı grubunda; çoklu doymamış yağ asit oranınca zengin olan ayçiçek yağı verilen gruplara göre plazma MDA değerleri daha düşük ($p<0,05$) olarak saptanmıştır (Gökçe vd., 2000).

Yaptığımız çalışmada, kullandığımız çikolata çeşitlerinin besin değeri tablolarında beyan edilen verilere göre çoğunlukla çikolatalarda doymuş yağ oranı doymamış yağ oranına göre daha yüksektir. Beyan edilen besin değerlerinde yağ ve doymuş yağ sütunu göz önüne alındığında fındıklı çikolata (1) 100 gramında 33 g yağ bulunmakta; bu yağ miktarının 18 g'ı doymuş 15 g'ı doymamış yağ içermektedir. Doymamış yağ konsantrasyonunda çoklu doymamış yağa nispeten fındıktan kaynaklı tekli doymamış yağ oranı yüksek olduğu tahmin edilmektedir. Öte yandan, Antep fıstıklı bitter çikolatada beyan edilen yağ miktarı 33 g doymuş yağ miktarı ise 21 g olarak bildirilmiştir. Doymamış yağ miktarı 12 g olarak bildirilmesine karşın içeriğinde bulunan Antep fıstığı tekli doymamış yağ içeriği yüksek bir besin olduğu bilinmektedir. Sindirim öncesi ve sindirim sonrası MDA düzeyleri diğer örneklerle karşılaştırıldığında ortalama olarak daha düşük sonuçlar elde edildiği gözlemlenmektedir. Bu sebeple çalışmamız Gökçe vd., yaptığı doymuş ve doymamış yağ miktarlarının MDA düzeyine etkilerini içeren çalışmayı destekler niteliktedir.

Escudero vd. (1998) yaptığı bir çalışmada rat rasyonlarına zeytinyağı (MUFA oranı yüksek), ayçiçek yağı (n-6 PUFA oranı yüksek) ve balık yağı (n-3 PUFA oranı yüksek) katmışlardır. Araştırmalarında; plazma ve eritrosit membranlarında zeytinyağı ile beslenenlerde tekli doymamış yağ asitlerini, ayçiçek yağı ile beslenenlerde n-6 çoklu doymamış yağ asitlerini, balık yağı ile beslenenlerde ise n-3 çoklu doymamış yağ asitlerini yüksek oranda tespit etmişlerdir (Escudero vd., 1998). Benzer şekilde diğer birçok çalışmada diyetle alınan yağların membran ve doku lipid bileşimlerinde değişikliklere neden olduğu belirtilmektedir (Nardini vd., 1993, Sanchez ve Lutz 1998, Rey vd., 2003, Quiles vd., 2003). Membran ve doku yağ asit bileşimlerinin değişmesinin, aynı zamanda dokularda yapısal değişikliklere neden olduğu ve çoklu doymamış yağ asitlerinin konsantrasyonunun artmasının da lipid peroksidasyonunu arttırdığı belirtilmektedir (Rey vd., 2003).

Benzer bir başka çalışmada;ratların yemlerinezeytinyağı (MUFA oranı %81.6, PUFA oranı %6.1), soya yağı (MUFA oranı %23.2, PUFA oranı %22.0), susam yağı (MUFA oranı %43.6, PUFA oranı %2.6), kanola yağı (MUFA oranı %62.24; PUFA oranı %31.2)katmışlardır. Çalışma sonucunda plazma MDA düzeyi en yüksek kanola yağı ilave edilen grupta bulunmuşken; en düşük ise tekli ve çoklu doymamış yağ asitlerinin oranı çok yakın olan susam yağı verilen grupta bulmuşlardır (Acar, 2004).

5.2. İşlenmiş Gıdalarda Antioksidan Katkısı ve Sindirimin MDA Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi

Antioksidanlar oksidasyona uğrayan substrat konsantrasyonu ile karşılaştırıldığında daha düşük miktarlarda bulunduğu koşullarda, oksidasyonu inhibe edebilen ya da belirgin biçimde geciktirebilen maddelere denmektedir. Sahin vd., tavuklar üzerinde yaptıkları çalışmada, tek olarak ve kombine olarak vitamin E (250 mg/kg yem) ve vitamin C ilave edilmesinin serum MDA miktarını azalttığı bildirilmiştir (Sahin vd., 2002). Piliç yemlerine ayçiçek yağı ve α - tokoferol ve plazma TBARS α - tokoferol asetat ilave edilen bir çalışmada da, konsantrasyonları arasında anlamlı bir korelasyon olduğu ($p < 0,001$) bildirilmiştir (Acar, 2004).

Yapılan diğer bir benzer çalışmada, rat karaciğerindeki lipid peroksidasyonu üzerinde, vitamin E ve mısır yağı ilave edilmesinin oksidasyona etkisi araştırılması amaçlanmıştır. Vitamin E ilavesinin (30 mg/kg vücut ağırlığı/gün) yüksek miktarda mısır yağı verilen (57,77g/l) deney grubunda ve yine az miktarda mısır yağı verilen (8,6g/l) kontrol grubunda TBARS değerlerini azalttığı rapor edilmiştir (Valls vd., 2003).

Soya yağı ve vitamin E ilavesinin (400 IU/kg), yaşlı ratlarda aktif ve inaktif makrofaj hücrelerinin metabolizması üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmada, vitamin E'nin aktif ve inaktif makrofaj hücrelerindeki TBARS içeriğini azalttığı bulunmuştur (Karabudak, 2002).

Besinlerin üretim aşamaları, pişirme teknikleri (örneğin kızartma) ve antioksidanlar MDA miktarında azalmalara sebebiyet verdiği bildirilmiştir. MDA'nın az bir bölümü serbest formda bulunmakla birlikte sindirim esnasında besinlerdeki lizin proteininin serbest amino grubu ile reaksiyon oluşturarak insanlarda emilen baskın form olan, N-e-(2-propenal) lizin meydana gelmektedir. Bu form, diyetteki MDA'nın oluşturabileceği toksik etkisini düşürmektedir (Draper & Hadley, 1990). Pişirme yöntemiyle ve dondurarak depolamadan sonra besinlerin MDA içeriğinde bir azalma görüldüğü bildirilmiştir (Newburg & Concon, 1980; Shamberger vd., 1977). Gerçekleşen durumu şekle açıklanmaya çalışılmıştır. Bunlardan ilki; kızartma ile etlerde bulunan MDA'nın kolayca buharlaştığı ve lizinden ayrıldığı sanılmaktadır. Diğerisi ise MDA'nın biyolojik olarak aktif bir molekül olarak düşünülerek ortamdaki

proteinlerle bağ kurarak miktarında azalma olduğu görüşüdür(Boyd & McGuire, 1990; Shamberger vd., 1977; Siu & Draper, 1978).

Çalışmamızda, tüm çikolata örneklerinde MDA düzeyi sindirim öncesi konsantrasyon sindirim sonrası konsantrasyondan daha yüksektir. Sindirim sonrası düzeyin daha düşük olmasının sebebi MDA' nın reaksiyon sonucu proteinlerle bağ yapması, ortam koşulları ya da sindirim sırasında yapısında olan antioksidanlar etkisiyle MDA konsantrasyonunda kayıplar yaşandığı düşünülmektedir. Örneğin çikolata örnekleri arasında en yüksek protein oranına sahip olan fındıklı çikolata 1 (protein: 11,5 g/100g) diğer örneklerle karşılaştırıldığında, sindirim öncesi MDA miktarı 1595µg/100 g iken; sindirim sonrası MDA miktarı 148µg/100 g'a düşmüştür. MDA'nın sindirim sonrası azalmasını üretim aşamaları ve antioksidan kapasitesinin yanı sıra örneğin yapısında bulunan proteine bağlanabileceği ve dolayısıyla protein miktarıyla da ilişkisinin olabileceğini düşündürmüştür.

Yapılan bir araştırmada, hamburger etinin pişirilmesi ve sindirim sonrası plazma ve idrarda MDA konsantrasyonunda azalmasının olası sebepleri; pişirilme sırasında antioksidan oluşumu ile MDA inhibisyonu, gastrointestinal sistemde absorpsiyonu olarak tahmin edilmektedir. Ayrıca, lipid peroksidasyonu ve DNA eklenti oluşumu süreçlerinin MDA konsantrasyonunu azaltılabileceğini düşündürdüğü bildirilmiştir (Gorelik vd., 2005; Gorelik vd., 2007, 2008a, 2008b).

Gorelik vd., yaptığı çalışmada hindi etine kırmızı şarap polifenollerinin eklenmesi ve hindi eti ile kırmızı şarap tüketiminin insanlarda pişmiş hindi etinden MDA emilimini engelleyebileceğini gözlemlemişlerdir (Gorelik vd., 2008a).

Halliwell vd., diyet antioksidanlarının gastrointestinal sistemdeki oksidasyon ürünlerinin zararlı etkilerine karşı koruma sağlayabileceğini öne sürmüştür (Barry Halliwell vd., 2000). Çalışmalar gastrointestinal sistemde bulunan diyet polifenollerini ve oksidasyon ürünlerinin etkileşimlerini göstermiştir (Lo vd., 2006; Piche vd., 1988; Totlani & Peterson, 2006). Bu nedenle, et ürünlerinin yendiği bir öğünün ayrılmaz bir parçası olarak bitki polifenollerini tüketmenin faydaları, MDA ve diğer lipid oksidasyon ürünlerinin oluşumunu ve emilimini inhibe etmesinden kaynaklanabilir (Gorelik vd., 2007; Kanner & Lapidot, 2001; Memişoğulları, 2005).

Yapılan bir başka çalışmanın sonuçları, 14 gün düşük doz (30 mg/kg) ve toksik olmayan yüksek doz (100 mg/kg) kafein uygulamasının, karaciğerde lipit

peroksidasyon seviyesini azalttığını bildirmektedir. Kafein alımıyla beraber rat karaciğer dokusunda; GPx, GST, SOD ve katalaz gibi antioksidan enzim aktivitelerinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmıştır. Kafeinin bu dozlarda; lipit peroksidasyonunu azaltması, antioksidan enzim aktivitelerini artırması ile oksidatif stresi iyileştirmesi, yapılan araştırmaların da ışığında antioksidan olabileceği görüşünü desteklemektedir (Demirtaş vd., 2012).

5.3. Çikolatanın Yapısındaki Antioksidan Bileşenlerin MDA Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi

Kakao tohumlarının kuru miktarının nerdeyse %6-8'i polifenollerden oluşmaktadır. Polifenollerin başlıcaları epikateşin, kateşin, prosiyanidin flavonelleri olmakla birlikte fenolik asit, antosiyanin stilbenler temel polifenollerdir (Ried vd., 2017). On gram bitter çikolata baz alındığında toplam polifenol miktarı yaklaşık 120-150 mg kadar iken, kakao tozundaki miktar 5 katına kadar çıkabilmekte olduğu vurgulanmıştır. Toplam kakao miktarı azalması sebebiyle sütlü çikolatanın polifenol içeriği daha düşük olduğu bildirilmiştir (Fernández-Murga vd., 2011). Kateşin ve epikateşin birbirlerine göre oranları değişmekle birlikte; bitter çikolatadaki kateşin içeriği 12 mg/100 g, epikateşin içeriği ise 41,4 mg/100 g olarak rapor edilmiştir (Beckett, 2009). Bitter çikolatadaki miktarları ve oranları sütlü çikolata ile karşılaştırıldığında 4 kat, çay ile karşılaştırıldığında 20 kat daha fazla olduğu saptanmıştır (Keen, 2001; Ried vd., 2017). Çikolata yapısındaki yüksek şeker konsantrasyonu, yüksek yağ ve kafein içeriği hızla emilen uyarılmış ve sürekli bir enerji kaynağı olmasını sağlamaktadır. Çikolatadaki bahsi geçen flavonoid fenolikler, dışarıdan ilave koruyucu madde ihtiyacını azaltmakta ve dolayısıyla çikolatada potansiyel olarak yağın acılaşmasını önlemede görev almaktadır (Cömert & Merdol, 2018).

Yapılan bir çalışmada, lipid oksidasyona karşın epikateşinin etkisi araştırılmak amacıyla plazma TBARS ölçümü yapılmıştır. Epikateşinin eklenmesi ile deneklerin toplam lipid seviyelerinde ve artan plazma seviyeleri ile TBARS bağımsız olarak hızla azalma eylemi gösterdiği bildirilmiştir (Lima vd., 2011). Epikateşin ve kateşin alımını inceleyen çalışmalara dayanarak nerdeyse 60 denegin plazmasında, kateşinin

yanı sıra epikateşinin daha hızlı emildiği sonucuna varılabildiği rapor edilmiştir. Kakao/çikolatada epikateşin kateşinden yaklaşık 6-7 kat daha fazla bulunmaktadır, dolayısıyla çoğu çalışma epikateşini ön planda tutmuştur. İnsan çalışmaları ve *in vitro* gerçekleştirilen çalışmalar; epikateşinin küçük dozlarının dahietkili olduğunu göstermektedir (Bonanome ve Grundy, 1988; Ludovici vd., 2017).

Öte yandan bir başka çalışmada kakao ve çikolata tüketimi sonrasında lipid peroksitlerde azalmanın yanı sıra plazma antioksidan kapasitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. Çalışmada araştırmacılar, kakao çikolata alımisonucunda plazmanın kendisini oksidatif hasara karşı koruma görevini üstlenmesive lipid peroksidasyonunu engellemesi konusunda gözlemlenen iyileşmenin, başta epikateşin gibi flavonoidlerin rolü olduğunu, rapor etmiştir (Waterhouse vd., 1996).

Deneysel verilerde görüldüğü üzere, flavonoidlerin olası bir antioksidan rolü olduğunu desteklemektedir. Wang vd., yaptığı bir araştırmada, sağlıklı gönüllü insanlara 27, 53 veya 80 g çikolata (bir gram çikolata başına 5.3 mg prosiyanidin içeren) verilmiştir. Sonuçlarda, plazmanın antioksidan kapasitesindeki artışın yanı sıra plazma lipid oksidasyonunda düşüş olduğu gözlemlenmiştir (Wang vd., 2001). Benzer bir başka çalışma olan, sağlıklı gönüllülerin diyetini flavonoid açısından zengin çikolata (105 g çikolatada; 168 mg flavonoid içeren) ile desteklenmiş; bulguları Wang vd., yaptığı çalışma ile tutarlı olduğu bildirilmiştir. Başka bir randomize çapraz geçişli bir çalışmada, 28 günlük klinik çalışmada, 22 g kakao tozu ve 16 g bitter çikolata (yaklaşık 466 mg prosiyanidin/gün içerir) kombinasyonu ile desteklenen denekler serumun toplam antioksidan kapasitesi araştırılmıştır. Sonuçlara göre kakao tozu ve çikolata ile diyeti desteklenen denekler ortalama bir Amerikan diyeti ile beslenenlere göre antioksidan kapasitesi önemli ölçüde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda bu gözlem LDL oksidasyon gecikme süresi ile de pozitif ilişki göstermiştir (Nanetti vd., 2012; Wang vd., 2001).

Sonuç olarak özellikle kakao oranı yüksek olan bitter çikolatanın oksidasyonu önleme, antioksidan kapasitesini yükseltme gibi sağlık açısından olumlu etkilerinin birçoğu, içeriğindeki zengin kateşin oranı ile bağdaştırılmaktadır (Cömert & Merdol, 2018). Yine bir çalışmada bitter çikolatanın antioksidan kapasitesinin değerlendirilmiştir. Bitter çikolatanın serbest radikalleri emme kapasitesi (ORAC)

13,1 µmol troloks eşdeğeri (TE)/100g olarak bulunduğu rapor edilmiştir (Beckett, 2009). Fakat antioksidan aktivitenin bağlı olduğu birçok etkin faktörü olduğu bildirilmektedir. Bunlar; başta kakao tohumlarının yetiştirildiği bölge ve hasat özelliklerine göre değişebildiği bildirilmektedir. Öte yandan, son polifenol içeriğini etkileyen en önemli faktörlerden biri; kakao çekirdeğinin işleme yönteminin olduğu eklenmektedir. İşleme düzeyine bağlı olarak aynı kakao içeriğine sahip olsa dahi iki çikolatanın flavonol içeriğinin farklı olabileceği araştırmalar sonucu ortaya koyulmuştur. Üretim aşamasında pH ve yüksek sıcaklık gibi koşulların özellikle epikateşin ve kateşin olmak üzere bazı flavonol kayıplarına sebep olabileceği bildirilmektedir (Lima vd., 2011; Rimbach vd., 2009). Diğer bir yandan 1400'ün üzerinde kakao çeşidinin var olduğu göz önünde bulundurularak kakaonun geniş bir genetik çeşitliliğe sahip olduğu çeşitli çalışmalarda vurgulanmaktadır. Dolayısıyla araştırmalar ışığında çikolatanın antioksidan kapasite ve etkinliğine ilişkin net bir veri ortaya koyulması doğru olmayacaktır (Turnbull vd., 2010).

Yaptığımız çalışmada, çeşitli markalara ait aynı ya da farklı tür çikolatalar örnek olarak seçilmiştir. Antioksidan içerik olarak beyan edilen kakao oranları karşılaştırmaya alındığında Antep fıstıklı bitter çikolata %54 kakao içeriğine sahip ve sindirim öncesi MDA düzeyi 636 µg/100 g olmasına karşın; beyaz çikolata (1) örneğinde kakao bulunmuyor (kakao yağı içeriyor) ve sindirim öncesi MDA düzeyi 1188 µg/100 g olduğu tespit edildi. Bu karşılaştırma, yapıda bulunan kakao miktarı ile antioksidan kapasitesinin arttığı ve oksidasyona karşı koruyucu nitelik taşıdığı tezine katkı sağlamaktadır. Ancak bitter çikolata 1 örneği ile (kakao oranı: %60, sindirim öncesi MDA: 2392 µg/100 g), sütlü çikolata 2 örneği (kakao oranı: %30, sindirim öncesi MDA: 1674 µg/100 g) karşılaştırıldığında içeriğindeki kakao oranının (dolaylı olarak antioksidan etki gösteren flavonoidleri) başlangıçtaki MDA düzeyine etkisi olmadığı gözlemlendi. Bu konuda çikolataların hammaddesi olan kakaonun çeşidi, hasatı, işleme ve üretim aşamaları kakao oranı göz ardı edilerek içeriğindeki antioksidan kapasitede kayıplara sebebiyet verebileceğine dair düşünceleri kanıtlar nitelikte olduğunu düşündürmektedir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Sık tüketilen, aynı ya da farklı markalara ve türlere ait, yağ miktarları fazla olduğu bilinen 20 çeşit çikolata örneklerinde sindirim öncesi MDA miktarı, sindirim sonrası MDA miktarı ve biyoerişebilirliğini inceledik. Besinlerin yapısında bulunan doymamış yağ asidi miktarı, ortam koşulları (sıcaklıkları, pH vb.), yapısında bulunan antioksidan kapasitesi ve üretim aşamaları gibi birçok faktör sindirim öncesi MDA miktarını etkilemektedir. *In vitro* sindirim sonrası MDA miktarları sindirim öncesine göre düşmüştür. Sebebi sindirim sırasında MDA' nın biyolojik aktif bileşik olmasından kaynaklı olarak proteinlerle bağ oluşturabileceği ve antioksidanların lipid oksidasyonunu önlemeye yönelik aktiviteleri olduğu düşünülmektedir.

Sütlü çikolata çeşitleri, fındıklı üzümlü çikolata, kan portakallı ve fındıklı sütlü çikolata, fındıklı çikolata çeşitleri, Antep fıstıklı çikolatalar, beyaz çikolata, portakallı bademli beyaz çikolata, Antep fıstıklı beyaz çikolata, çilekli beyaz çikolata, karamelli çikolata, frambuazlı beyaz çikolata, Antep fıstıklı bitter çikolata, bitter çikolata çeşitleri, bitter karadutlu çikolata olmak üzere 20 çikolata örneğinde sindirim öncesinde en yüksek MDA miktarı bitter çikolata 1 örneğinde en düşük ise antep fıstıklı bitter çikolata da tespit edilmiştir. MDA oluşumu çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu ile meydana gelen bir metabolit olup; çoklu doymamış yağ asidi oranı MDA seviyesini etkilemektedir. Örneklerin besin değeri tablosunda beyan edilen yağ ve doymuş yağ değerlerine göre değerlendirildiğinde MDA oranı daha düşük çıkan Antep fıstıklı bitter çikolatanın 100 gramında 19 g doymamış yağ olduğu tespit edilmiştir. Antep fıstığında tekli doymamış yağ oranı daha yüksek olmasından kaynaklı olarak başlangıçtaki MDA miktarının daha düşük olduğu tahmin edilmektedir. Bir diğer etken faktör olan antioksidan etkinliği bakımından çikolata çeşitleri arasında kakao miktarı daha yüksek olarak bilinen bitter çikolata epikateşin ve kateşin gibi birçok flavonidi yapısında diğer çeşitlere (beyaz çikolata ve sütlü çikolata) göre çok daha fazla miktarda barındırmaktadır. Fakat en yüksek MDA düzeyine sahip olan örneğin bitter çikolata çeşitlerinden birinde çıkıyor olmasını; hammaddesi olan kakaonun çeşidi, hasatı ve üretim şartlarına göre antioksidan madde (kateşin, epikateşin ve diğer flavonoidler) kayıplarına uğrayabileceği tezi göz önünde bulundurarak değerlendirmeye alınmıştır. Sindirim sonrası örneklerin hepsinde MDA miktarlarında düşüş yaşanmış; en düşük MDA

düzeyine sahip olan örnek fındıklı sütlü çikolata olarak saptanmıştır. Sindirim sırasında MDA'nın protein yapısına bağlanabileceği ve çeşitli diğer sebeplerden dolayı kayıplara uğrayabileceği çeşitli çalışmalarda değinilmiştir. Beyan edilen besin tablolarında; en yüksek protein miktarına sahip olan fındıklı çikolatanın, en düşük sindirim sonrası MDA düzeyine sahip olması MDA'nın proteine bağlanması ve miktarının düşmesi öngörüsünü desteklemektedir.

MDA, doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu sonucunda meydana gelen ikincil metabolit ürünüdür. Besinlerde ransiditeye sebep olurken vücuda besinlerle alınabilir ya da dokularda endojen olarak da gerçekleşebilmektedir. Her iki koşulda da hücrede çeşitli hasarlar meydana getirmekle kalmayıp, diğer hücre ve dokulara taşınıp hasarı yayabilmektedir. Ayrıca proteinler ve DNA ile reaksiyona girebildikleri için biyolojik olarak aktif olarak nitelendirilebilir. Bu sebeplerden dolayı kanser, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet gibi birçok önemli hastalığın patogenezinde yer almaktadır. MDA'nın oluşumunun en aza indirilmesi veya önlenmesi için birçok mekanizma öne sürülmüştür. Antioksidan olarak nitelendirilen bileşik, enzim ya da potansiyel besinlerin olumlu etkilerine dair kanıtlara bazı çalışmalarda yer verilmiştir. Çikolata neredeyse her yaş grubuna hitabeden ve çok sık tüketilen bir gıdadır. Genel anlamda içeriğinde bulunan yüksek şeker, glikoz şurubu ve yüksek yağ oranı sebebiyle obezite, diyabet vb. hastalıklarda olumsuz etkileri olduğu bildirilmektedir. Bunların yanı sıra özellikle bitter çikolata (yüksek kakao oranına sahip) içeriğinde yüksek miktarda bulunan flavoneller, kateşin ve epikateşin gibi antioksidanların varlığı lipid oksidasyonunu azaltarak kardiyovasküler hastalıklardaolumlu sonuçlar alındığına dair birçok araştırma yapılmıştır. Fakat kakao miktarından ziyade, kakaonun genetik faktörü ve işlem basamaklarında yapısında bulunan antioksidanlarda kayıplar oluşabileceğinden ve dolayısıyla antioksidan miktarı ile ilgili net bir bilgiye sahip olunamayacağı göz önünde bulundurulmalıdır.

Tüketicilerin besin seçimi yaparken yağ miktarının yanı sıra yağ asidi çeşidi yoğunluğunu da dikkate alarak seçim yapmaları MDA oluşumunun azaltılması bakımından önem arz etmektedir. Yağ tercihlerini; çoklu doymamış yağ asitlerince zengin olan kanola ya da ayçiçek yağı yerine daha çok tekli doymamış yağ asitleri içeren zeytinyağından yana kullanmaları sağlık açısından daha yararlı olacaktır. Tüketicilerin beslenme rutininde potansiyel antioksidan kapasitesi yüksek olan taze

meyve-sebze, adaçayı, biberiye gibi besinleri diyetlerinde bulundurmaları diyetle alınan MDA düzeyini azaltmakla kalmayıp dolaylı yoldan kronik hastalıklarından önlenmesine katkı sağlamaktadır. Çoklu doymamış yağ asitleri yüksek olan besinler tercih edilecekse de mutlaka yanında doğal antioksidan nitelikte besinler ile desteklenmelidir. Başta çocuklar olmak üzere her yaş grubundan bireylerde; işlenmiş, besleyici değeri düşük, şeker ve yağ oranı oldukça yüksek paketli ürünler yerine sağlıklı yağ grubu içeriğine sahip besleyici nitelikte besinlerin tüketimi sağlığa katkı sağlamaktadır. Gıda üreticileri ise, hammaddeden işleme, paketleme gibi zincirleme üretim aşamaları sırasında oksidasyon ile meydana gelebilecek MDA oluşumunu azaltıcı ve engelleyici yönde modern işleme teknikleri konusunda bilgilendirilmelidir.



KAYNAKÇA

- Acar, N. (2004). *Doymamış yağ asiti içeren sıvı yağlarla beslenen ratlarda rasyona vitamin E ilavesinin lipid peroksidasyonuna etkileri* (Master's thesis, Sağlık Bilimleri Enstitüsü).
- Akbulut, G. (2018). *Tıbbi Beslenme Tedavisinde Güncel Uygulamalar*, Ankara.Nobel Tıp Kitapevi.
- Andersen, J. K. (2004). Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence?. *Nature medicine*, *10*(7): S18-S25.
- Antoniades, C., Antonopoulos, A., Bendall, J., & Channon, K. (2009). Targeting Redox Signaling in the Vascular Wall: From Basic Science to Clinical Practice. *Current Pharmaceutical Design*, *15*(3): 329–342.
- Aslan, R., Şekeroğlu, M. R., & Bayıroğlu, F. (1995). Serbest radikal türlerinin membran lipid peroksidasyonuna etkileri ve hücrel antioksidan savunma. *Van Sağlık Bilimleri Dergisi*, *1*(2): 137-142.
- Aslankoç, R., Demirci, D., İnan, Ü., Ümmahan, Yıldız, M., Öztürk, A., Çetin, M., ... & Yılmaz, B. (2019). Oksidatif stres durumunda antioksidan enzimlerin rolü-Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPX). *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, *26*(3): 362-369.
- Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2014; 2014: 360438.
- Aydın, A., Kant, C., & Turan, M. (2012). Humic acid application alleviate salinity stress of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants decreasing membrane leakage. *African Journal of Agricultural Research*, *7*(7): 1073-1086.
- Aznar, J. U. S. T. O., Santos, M. T., Valles, J., & Sala, J. (1983). Serum malondialdehyde-like material (MDA-LM) in acute myocardial infarction. *Journal of clinical pathology*, *36*(6): 712-715.

- Bandonienė, D., Venskutonis, P. R., Gruzdienė, D., & Murkovic, M. (2002). Antioxidative activity of sage (*Salvia officinalis* L.), savory (*Satureja hortensis* L.) and borage (*Borago officinalis* L.) extracts in rapeseed oil. *European Journal of lipid science and technology*, 104(5): 286-292.
- Baysal, A. (2007). Beslenme,(11. Baskı) Ankara: Hatiboğlu Yayınevi.
- Beckett, S. (2009). Chocolate manufacture. In *Science and technology of enrobed and filled chocolate, confectionery and bakery products* (pp. 11-28). Woodhead Publishing.
- Beg, M. S., Ahmad, S., Jan, K., & Bashir, K. (2017). Status, supply chain and processing of cocoa-A review. *Trends in food science & technology*, 66: 108-116.
- Benedetti, A., Casini, A. F., Ferrali, M., & Comporti, M. (1979). Effects of diffusible products of peroxidation of rat liver microsomal lipids. *Biochemical Journal*, 180(2): 303-312.
- Bhuyan, K. C., Bhuyan, D. K., & Podos, S. M. (1986). Lipid peroxidation in cataract of the human. *Life sciences*, 38(16): 1463-1471.
- Bird, R. P., Hung, S. S., Hadley, M., & Draper, H. H. (1983). Determination of malonaldehyde in biological materials by high-pressure liquid chromatography. *Analytical biochemistry*, 128(1): 240-244.
- Blair, I. A. (2008). DNA adducts with lipid peroxidation products. *Journal of Biological Chemistry*, 283(23): 15545-15549.
- Bonanome, A., & Grundy, S. M. (1988). Effect of dietary stearic acid on plasma cholesterol and lipoprotein levels. *New England Journal of Medicine*, 318(19):1244-1248.
- Boyd, N. F., & McGuire, V. (1990). Evidence of lipid peroxidation in premenopausal women with mammographic dysplasia. *Cancer letters*, 50(1): 31-37.
- Bruinsma, K., & Taren, D. L. (1999). Chocolate: food or drug?. *Journal of the American Dietetic Association*, 99(10): 1249-1256.

- Bulut, M., Selek, S., Gergerlioglu, H. S., Savas, H. A., Yilmaz, H. R., Yuce, M., & Ekici, G. (2007). Malondialdehyde levels in adult attention-deficit hyperactivity disorder. *Journal of psychiatry & neuroscience: JPN*, 32(6): 435.
- Burton, G. W., & Traber, M. G. (1990). Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability. *Annual review of nutrition*, 10(1): 357-382.
- Całyniuk, B., Grochowska-Niedworok, E., Walkiewicz, K. W., Kawecka, S., Popiołek, E., & Fatyga, E. (2016). Malondialdehyde (MDA)–product of lipid peroxidation as marker of homeostasis disorders and aging. In *Annales Academiae Medicae Silesiensis* (Vol. 70).
- Casado, Á., López-Fernández, M. E., Casado, M. C., & de La Torre, R. (2008). Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in vascular and Alzheimer dementias. *Neurochemical Research*, 33(3): 450-458.
- Comporti, M. (1987). Glutathione depleting agents and lipid peroxidation. *Chemistry and physics of lipids*, 45(2-4): 143-169.
- Cömert, T. K., & Merdol, T. K. (2018). Çikolata ve Sağlık Beyanları. *Beslenme ve Diyet Dergisi*, 46(1): 56-65.
- Çakmur, R. (2003). Parkinson Hastalığının Epidemiyolojisi ve Klinik Özellikleri. *Türkiye Klinikleri J Neur.*, 1(3): 160-163.
- Çetin, F. (2010). Tokat bölgesinde yetişen bazı yenebilen yabancı mantar türlerinde yağ asidi kompozisyonları ve antioksidan kapasitelerinin araştırılması (Master's thesis, Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Çoban, Ö. E., & Keleştemur, G. T. (2010). Farklı oranlardaki sentetik β -karotenin alabalık (*Oncorhynchus mykiss*, W. 1792) filetolarında kas karotenoid stabilitesi ve lipid peroksidasyon düzeyine etkileri. *FÜ Sağ. Bil. Vet. Derg*, 25(1): 17-21.
- Davies, K. J. (1993). Protein modification by oxidants and the role of proteolytic enzymes. *Biochemical Society Transactions*, 21(2): 346-353.

- De Bont, R., & Van Larebeke, N. (2004). Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis*, 19(3): 169-185.
- Del Rio, D., Stewart, A. J., & Pellegrini, N. (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, metabolism and cardiovascular diseases*, 15(4): 316-328.
- Demirtaş, C., Ofluoğlu, E., Hussein, A., & Paşaoğlu, H. (2012). Kafeinin Rat Karaciğerinde Oksidan Antioksidan Mekanizmalara Etkisi. *Gazi Medical Journal*, 23(1).
- Donaldson, W. E., & Knowles, S. O. (1993). Is lead toxicosis a reflection of altered fatty acid composition of membranes?. *Comparative biochemistry and physiology. C, Comparative pharmacology and toxicology*, 104(3): 377-379.
- Draper, H. H., McGirr, L. G., & Hadley, M. (1986). The metabolism of malondialdehyde. *Lipids*, 21(4): 305-307.
- Draper, H. H. (1990). Nutritional modulation of oxygen radical pathology. *Advances in nutritional research*: 119-145.
- Draper, H. H., & Hadley, M. (1990). A review of recent studies on the metabolism of exogenous and endogenous malondialdehyde. *Xenobiotica*, 20(9), 901-907.
- Draper, H. H. (1993). Antioxidant role of vitamin E. *Atmospheric oxidation and antioxidants*, 3: 271.
- Dünder, Y., & Aslan, R. (2000). Antioxidative stress. *Eastern Journal of Medicine*, 5(2): 45-47.
- Duthie, G. G. (1993). Lipid peroxidation. *European Journal of Clinical Nutrition*, 47(11): 759-764.
- Oral, E., TUNÇTÜRK, R., TUNÇTÜRK, M., & KULAZ, H. (2020). Silisyumun Fasulyede (*Phaseolus vulgaris* L.) Tuz (NaCl) Stresini Azaltmadaki Etkisi. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 23(6): 1616-1625.

- Eseceli, H., & Kahraman, R. (2004). Ayçiçek ve balık yağı katılan yumurta tavuğu rasyonlarına E ve C vitamini ilavesinin yumurta sarısı yağ asitleri kompozisyonu ile malondialdehit düzeyine etkisi. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 30 (2): 1-20.
- Escudero, A., Montilla, J. C., Garcia, J. M., Sanchez-Quevedo, M. C., Periago, J. L., Hortelano, P., & Suarez, M. D. (1998). Effect of dietary (n-9),(n-6) and (n-3) fatty acids on membrane lipid composition and morphology of rat erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1394(1): 65-73.
- Fernández-Murga, L., Tarín, J. J., García-Perez, M. A., & Cano, A. (2011). The impact of chocolate on cardiovascular health. *Maturitas*, 69(4): 312-321.
- Fogelman, A. M., Shechter, I., Seager, J., Hokom, M., Child, J. S., & Edwards, P. A. (1980). Malondialdehyde alteration of low density lipoproteins leads to cholesteryl ester accumulation in human monocyte-macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(4): 2214-2218.
- Fraga, C. G., Zamora, R., & Tappel, A. L. (1989). Damage to protein synthesis concurrent with lipid peroxidation in rat liver slices: Effect of halogenated compounds, peroxides, and vitamin E. *Archives of biochemistry and biophysics*, 270(1): 84-91.
- Frankel, E. N., & Neff, W. E. (1983). Formation of malonaldehyde from lipid oxidation products. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 754(3): 264-270.
- Gallou, G., Ruelland, A., Legras, B., Maugendra, D., Allannic, H., & Cloarec, L. (1993). Plasma malondialdehyde in types 1 and 2 diabetic patients. *Clin. Chim. Acta*, 214: 227-234.
- García-Ruiz, I., de la Torre, P., Díaz, T., Esteban, E., Fernández, I., Muñoz-Yagüe, T., & Solís-Herruzo, J. A. (2002). Sp1 and Sp3 transcription factors mediate malondialdehyde-induced collagen $\alpha 1$ (I) gene expression in cultured hepatic stellate cells. *Journal of Biological Chemistry*, 277(34): 30551-

30558.

- Giera, M., Lingeman, H., & Niessen, W. M. (2012). Recent advancements in the LC- and GC-based analysis of malondialdehyde (MDA): a brief overview. *Chromatographia*, 75(9-10): 433-440.
- Gil, L., Siems, W., Mazurek, B., Gross, J., Schroeder, P., Voss, P., & Grune, T. (2006). Age-associated analysis of oxidative stress parameters in human plasma and erythrocytes. *Free radical research*, 40(5): 495-505.
- Gorelik, S., Lapidot, T., Shaham, I., Granit, R., Ligumsky, M., Kohen, R., & Kanner, J. (2005). Lipid peroxidation and coupled vitamin oxidation in simulated and human gastric fluid inhibited by dietary polyphenols: health implications. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(9): 3397-3402.
- Gorelik, S., Kohen, R., Ligumsky, M., & Kanner, J. (2007). Saliva plays a dual role in oxidation process in stomach medium. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 458(2): 236-243.
- Gorelik, S., Ligumsky, M., Kohen, R., & Kanner, J. (2008a). A novel function of red wine polyphenols in humans: prevention of absorption of cytotoxic lipid peroxidation products. *The FASEB Journal*, 22(1): 41-46.
- Gorelik, S., Ligumsky, M., Kohen, R., & Kanner, J. (2008b). The stomach as a "bioreactor": when red meat meets red wine. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(13): 5002-5007.
- Gower, J. D., & Wills, E. D. (1987). The oxidation of benzo [a] pyrene-7, 8-dihydrodiol mediated by lipid peroxidation in the rat intestine and the effect of dietary lipids. *Chemico-biological interactions*, 63(1), 63-74.
- Gökçe, R., Akkuş, İ. M., Yöntem, M., Ay, M., Gürel, A., Çağlayan, O., ... & Ergün, S. (2000). Effects of Dietary Oils on Lipoproteins, Lipid Peroxidation and Thromboxane A₂ Production in Chicks. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 24(5): 473-478.
- Gray, J. I., Gomaa, E. A., & Buckley, D. J. (1996). Oxidative quality and shelf life of

meats. *Meat science*, 43: 111-123.

Guillen-Sans, R., & Guzman-Chozas, M. (1998). The thiobarbituric acid (TBA) reaction in foods: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 38(4): 315-350.

Gutowicz, M. (2011). Wpływ reaktywnych form tlenu na ośrodkowy układ nerwowy
The influence of reactive oxygen species on the central nervous system. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 65: 104-113.

Gutteridge, J. M., Rowley, D. A., Griffiths, E., & Halliwell, B. (1985). Low-molecular-weight iron complexes and oxygen radical reactions in idiopathic haemochromatosis. *Clinical science (London, England: 1979)*, 68(4): 463-467.

Gutteridge, J. M., & Halliwell, B. (1993). Transition metal ions and antioxidant proteins in extracellular fluids. *Atmos Oxid Antiox*, 3: 71-99.

Gürer, E. H. (1994). Biyolojik Sıvılarda Lipit Peroksitlerin Tayini ve Klinik Öneminin Değerlendirilmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

Güven, A., Güven, A., & Kamiloğlu, N. N. (2004). Kefirin lipid peroksidasyonuna etkilerinin araştırılması. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 10(2): 165-169.

Haberland, M. E., Fong, D., & Cheng, L. (1988). Malondialdehyde-altered protein occurs in atheroma of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Science*, 241(4862): 215-218.

Halliwell, B. (1978). Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron chelates: Is it a mechanism for hydroxyl radical production in biochemical systems?. *FEBS letters*, 92(2): 321-326.

Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1985). The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Molecular aspects of medicine*, 8(2): 89-193.

- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1990). [1] Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in enzymology*, 186: 1-85.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (2015). Free Radicals in Biology and Medicine. Fifth Edition.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1984). Free radicals, lipid peroxidation, and cell damage. *The Lancet*, 324(8411): 1095.
- Halliwell, B., Borish, T., Pryor, W. A., Ames, B. N., Saul, R. L., McCORD, J. M., & Harman, D. (1987). Oxygen radicals and human disease-Davis conference. *Annals of Internal Medicine*, 107: 526-545.
- Halliwell, B., Zhao, K., & Whiteman, M. (2000). The gastrointestinal tract: a major site of antioxidant action?. *Free radical research*, 33(6): 819-830.
- Harper, D. B., & Harvey, B. M. R. (1978). Mechanism of paraquat tolerance in perennial ryegrass: II. Role of superoxide dismutase, catalase and peroxidase. *Plant, Cell & Environment*, 1(3): 211-215.
- Hensley, K., Maitt, M. L., Yu, Z., Sang, H., Markesbery, W. R., & Floyd, R. A. (1998). Electrochemical analysis of protein nitrotyrosine and dityrosine in the Alzheimer brain indicates region-specific accumulation. *Journal of Neuroscience*, 18(20): 8126-8132.
- Hong, Y. L., Yeh, S. L., Chang, C. Y., & Hu, M. L. (2000). Total plasma malondialdehyde levels in 16 Taiwanese college students determined by various thiobarbituric acid tests and an improved high-performance liquid chromatography-based method. *Clinical biochemistry*, 33(8): 619-625.
- Horton, A. A., Fairhurst, S., & Bus, J. S. (1987). Lipid peroxidation and mechanisms of toxicity. *CRC Critical Reviews in Toxicology*, 18(1): 27-79.
- Jha, R., & Rizvi, S. I. (2011). Carbonyl formation in erythrocyte membrane proteins during aging in humans. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 155(1): 39-42.
- Kaji, H., Kurasaki, M., Ito, K., Saito, T., Saito, K., Niioka, T., ... & Kawakami, Y.

- (1985). Increased lipoperoxide value and glutathione peroxidase activity in blood plasma of type 2 (non-insulin-dependent) diabetic women. *Klinische Wochenschrift*, 63(16): 765-768.
- Kaneko, J. J., Harvey, J. W., & Bruss, M. L. (1997). Preface to the 5th Edition. In *Clinical Biochemistry of Domestic Animals* (p. xiii). Academic Press.
- Kanner, J., & Lapidot, T. (2001). The stomach as a bioreactor: dietary lipid peroxidation in the gastric fluid and the effects of plant-derived antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(11): 1388-1395.
- Kanner, J., German, J. B., Kinsella, J. E., & Hultin, H. O. (1987). Initiation of lipid peroxidation in biological systems. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 25(4): 317-364.
- Karabudak, E. (2002). Etlerdeki Lipid Peroksidasyonunun Bir Ürünü Olarak Malonaldehid ve Ölçüm Yöntemleri. *Beslenme ve Diyet Dergisi*, 31(1): 43-48.
- Karatas, F., Karatepe, M., & Baysar, A. H. M. E. T. (2002). Determination of free malondialdehyde in human serum by high-performance liquid chromatography. *Analytical biochemistry*, 311(1): 76-79.
- Kargın, D., & Güneş, F. E. (2017). Çikolatanın Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkileri. *Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 6(4): 234-246.
- Keen, C. L. (2001). Chocolate: food as medicine/medicine as food. *Journal of the American College of Nutrition*, 20(sup5), 436S-439S.
- Kishida, E., Oribe, M., Mochizuki, K., Kojo, S., & Iguchi, H. (1990). Determination of malondialdehyde with chemical derivatization into the pyrimidine compound and HPLC. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1045(2): 187-188.
- Konukoğlu, D., & Akçay, T. (1995). Glutasyon metabolizması ve klinik önemi. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, 15(4): 214-218.
- Kubow, S. (1992). Routes of formation and toxic consequences of lipid oxidation

products in foods. *Free radical biology and medicine*, 12(1): 63-81.

Latron, Y., Chautan, M., Anfosso, F., Alessi, M. C., Nalbone, G., Lafont, H., & Juhan-Vague, I. (1991). Stimulating effect of oxidized low density lipoproteins on plasminogen activator inhibitor-1 synthesis by endothelial cells. *Arteriosclerosis and thrombosis: a journal of vascular biology*, 11(6): 1821-1829.

Lee, R., Margaritis, M., M Channon, K., & Antoniades, C. (2012). Evaluating oxidative stress in human cardiovascular disease: methodological aspects and considerations. *Current medicinal chemistry*, 19(16): 2504-2520.

Li, G., Chen, Y., Hu, H., Liu, L., Hu, X., Wang, J., ... & Yin, D. (2012). Association between age-related decline of kidney function and plasma malondialdehyde. *Rejuvenation research*, 15(3): 257-264.

Lima, L. J., Almeida, M. H., Nout, M. R., & Zwietering, M. H. (2011). Theobroma cacao L., "The food of the Gods": quality determinants of commercial cocoa beans, with particular reference to the impact of fermentation. *Critical reviews in food science and nutrition*, 51(8): 731-761.

Lo, C. Y., Li, S., Tan, D., Pan, M. H., Sang, S., & Ho, C. T. (2006). Trapping reactions of reactive carbonyl species with tea polyphenols in simulated physiological conditions. *Molecular nutrition & food research*, 50(12): 1118-1128.

Lopez-Bote, C. J., Gray, J. I., Goma, E. A., & Flegal, C. J. (1998). Effect of dietary administration of oil extracts from rosemary and sage on lipid oxidation in broiler meat. *British poultry science*, 39(2): 235-240.

Lotito, S. B., Actis-Goretta, L., Renart, M. L., Caligiuri, M., Rein, D., Schmitz, H. H., ... & Fraga, C. G. (2000). Influence of oligomer chain length on the antioxidant activity of procyanidins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 276(3): 945-951.

Ludovici, V., Barthelmes, J., Nägele, M. P., Enseleit, F., Ferri, C., Flammer, A. J., ... & Sudano, I. (2017). Cocoa, blood pressure, and vascular

function. *Frontiers in nutrition*, 4: 36.

Luo, H., Yount, C., Lang, H., Yang, A., Riemer, E. C., Lyons, K., ... & Wang, G. Y. (2013). Activation of p53 with Nutlin-3a radiosensitizes lung cancer cells via enhancing radiation-induced premature senescence. *Lung cancer*, 81(2): 167-173.

Lyon, B. G., Lyon, C. E., Ang, C. Y. W., & Young, L. L. (1988). Sensory analysis and thiobarbituric acid values of precooked chicken patties stored up to three days and reheated by two methods. *Poultry Science*, 67(5): 736-742.

Lyons, T. J. (1991). Oxidized low density lipoproteins: a role in the pathogenesis of atherosclerosis in diabetes?. *Diabetic medicine*, 8(5): 411-419.

Machlin, L. J., & Bendich, A. (1987). Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients 1. *The FASEB journal*, 1(6): 441-445.

Marnett, L. J. (1999). Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 424(1-2): 83-95.

Marnett, L. J. (2002). Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology*, 181: 219-222.

Martín, M. A., Ramos, S., Mateos, R., Rufián-Henares, J. A., Morales, F. J., Bravo, L., & Goya, L. (2009). Biscuit melanoidins of different molecular masses protect human HepG2 cells against oxidative stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(16): 7250-7258.

Memişoğulları, R. (2005). Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi. *Duzce medical journal*, 7(3): 30-39.

Mercanlıgil, S. M. (2015). Böbrek Hastalıklarında Beslenme. Baysal, A. vd., Diyet El Kitabı., Ankara: Hatiboğlu Yayınevi. 215-257.

Mocan, H., Saruhan, H., Arslan, M. K., Erduran, E., Sarpkaya, A. Ö., Efe, H. & Yenilmez, E. (1999). The Effect of ATP-MgCl₂ on Lipid Peroxidation in Ischemic and Reperfused Rabbit Kidney. *European journal of pediatric*

surgery, 9(01): 42-46.

- Nanetti, L., Raffaelli, F., Tranquilli, A. L., Fiorini, R., Mazzanti, L., & Vignini, A. (2012). Effect of consumption of dark chocolate on oxidative stress in lipoproteins and platelets in women and in men. *Appetite*, 58(1): 400-405.
- Newburg, D. S., & Concon, J. M. (1980). Malonaldehyde concentrations in food are affected by cooking conditions. *Journal of Food Science*, 45(6): 1681-1683.
- Niki, E. (1993). Lipid Peroxidation and its inhibition in "Atmospheric Oxidation and Antioxidants". Ed G Scott, 1-26.
- Noberasco, G., Odetti, P., Boeri, D., Maiello, M., & Adezati, L. (1991). Malondialdehyde (MDA) level in diabetic subjects. Relationship with blood glucose and glycosylated hemoglobin. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 45(4-5): 193-196.
- Ogunro, P. S. (2014). Antioxidant status and reproductive hormones in women during reproductive, perimenopausal and postmenopausal phase of life. *African journal of medicine and medical sciences*, 43(1): 49-57.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry*, 95(2): 351-358.
- Olson, J. A. (1989). Biological actions of carotenoids: introduction. *The Journal of Nutrition*, 119(1): 94-95.
- Orhan, O. (2011). Glutathyon S-transferaz gen polimorfizmi ve gestasyonel diabetes mellitus ile ilişkisi.
- Ostałowska, A., Koczy, B., Słowińska, L., Kasperczyk, A., Dobrakowski, M., & Błaszczak, U. (2016). Oxidative stress and enzymatic antioxidant status of blood and synovial fluid in rheumatoid arthritis patients. In *Annales Academiae Medicae Silesiensis* (Vol. 70).
- Lotito, S. B., Actis-Goretti, L., Renart, M. L., Caligiuri, M., Rein, D., Schmitz, H. H., ... & Fraga, C. G. (2000). Influence of oligomer chain length on the

- antioxidant activity of procyanidins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 276(3): 945-951.
- Önenç, S. S., & Açıkgöz, Z. (2005). Aromatik bitkilerin hayvansal ürünlerde antioksidan etkileri. *Hayvansal Üretim*, 46(1).
- Öz, N., & Kurtoğlu, F. (2002). Serbest radikaller ile antioksidan sistemler ve hastalıklarla ilişkileri. *Veterinarium*, 13: 21-31.
- Padmaja, K., Somasekharaiah, B. V., & Prasad, A. R. (1993). Selenium induced lipid peroxidation in heart tissues of chick embryos. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology;(United States)*, 51(3).
- Pandey, M., Raizada, R. B., & Dikshith, T. S. S. (1990). 90-day oral toxicity of ziram: a thyrostatic and hepatotoxic study. *Environmental pollution*, 65(4): 311-322.
- Panzram, G. (1987). Mortality and survival in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*, 30(3): 123-131.
- Paquette, G., Kupranycz, D. B., & Van de Voort, F. R. (1985). The Mechanisms of Lipid Autoxidation II. Non Volatile Secondary Oxidation Products. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 18(3): 197-206.
- Park, H. Y., Ha, S. K., Eom, H., & Choi, I. (2013). Narirutin fraction from citrus peels attenuates alcoholic liver disease in mice. *Food and chemical toxicology*, 55: 637-644.
- Pauer, G. J., Sturgill, G. M., Peachey, N. S., Hagstrom, S. A., & Proteomic AMD Study Group. (2010). Protective effect of paraoxonase 1 gene variant Gln192Arg in age-related macular degeneration. *American journal of ophthalmology*, 149(3): 513-522.
- Piche, L. A., Cole, P. D., Hadley, M., Van den Bergh, R., & Draper, H. H. (1988). Identification of N-ε-(2-propenal) lysine as the main form of malondialdehyde in food digesta. *Carcinogenesis*, 9(3): 473-477.

- Raghavan, S., Subramaniam, G., & Shanmugam, N. (2012). Proinflammatory effects of malondialdehyde in lymphocytes. *Journal of leukocyte biology*, 92(5): 1055-1067.
- Raharjo, S., & Sofos, J. N. (1993). Methodology for measuring malonaldehyde as a product of lipid peroxidation in muscle tissues: A review. *Meat science*, 35(2): 145-169.
- Rani, V., & Yadav, U. C. S. (2015). *Free Radicals in Human Health and*. New Delhi: Springer.
- Rey, A. I., Lopez-Bote, C. J., Kerry, J. P., Lynch, P. B., Buckley, D. J., & Morrissey, P. A. (2004). Modification of lipid composition and oxidation in porcine muscle and muscle microsomes as affected by dietary supplementation of n-3 with either n-9 or n-6 fatty acids and α -tocopheryl acetate. *Animal Feed Science and Technology*, 113(1-4): 223-238.
- Ried, K., Sullivan, T. R., Fakler, P., Frank, O. R., & Stocks, N. P. (2012). Effect of cocoa on blood pressure. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (8).
- Rimbach, G., Melchin, M., Moehring, J., & Wagner, A. E. (2009). Polyphenols from cocoa and vascular health—A critical review. *International journal of molecular sciences*, 10(10): 4290-4309.
- Saari, H. (1991). Oxygen derived free radicals and synovial fluid hyaluronate. *Annals of the rheumatic diseases*, 50(6): 389-392.
- Sağol, S., & Özkınay, E. (2000). Preeklampsi etyopatogenezinde lipid peroksidasyonu. *Journal of Clinical Obstetrics & Gynecology*, 10(1), 7-15.
- Sahin, K., Sahin, N., & Yaralioglu, S. (2002). Effects of vitamin C and vitamin E on lipid peroxidation, blood serum metabolites, and mineral concentrations of laying hens reared at high ambient temperature. *Biological trace element research*, 85(1): 35-45.
- Salih, A. M., Smith, D. M., Price, J. F., & Dawson, L. E. (1987). Modified extraction 2-thiobarbituric acid method for measuring lipid oxidation in

poultry. *Poultry Science*, 66(9): 1483-1488.

Sanchez V and Lutz M (1998) Fatty acid composition of microsomal phospholipids in rats fed different oils and antioxidant vitamins supplement, *Nutritional Biochemistry*, 9: 155-163.

Sanyal, J., Bandyopadhyay, S. K., Banerjee, T. K., Mukherjee, S. C., Chakraborty, D. P., Ray, B. C., & Rao, V. R. (2009). Plasma levels of lipid peroxides in patients with Parkinson's disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 13(2): 129-132.

Shahidi, F., & Hong, C. (1991). Evaluation of malonaldehyde as a marker of oxidative rancidity in meat products. *Journal of Food Biochemistry*, 15(2): 97-105.

Shamberger, R. J., Shamberger, B. A., & Willis, C. E. (1977). Malonaldehyde content of food. *The Journal of nutrition*, 107(8): 1404-1409.

Shaukat, S., Khan, A. S., Makhdoom Hussain, M. K., & Ahmad, N. (2018). Evaluation of spring wheat genotypes for heat tolerance using cell membrane thermostability. *Int. J. Biosci*, 12: 291-296.

Simon, M., Horovská, L., Greksak, M., Dušinský, R., & Nakano, M. (2000). on Red Blood Cells of Japanese Quails. *Gen. Physiol. Biophys*, 19: 365-371.

Siu, G. M., & Draper, H. H. (1978). A survey of the malonaldehyde content of retail meats and fish. *Journal of Food Science*, 43(4): 1147-1149.

Siu, G. M., & Draper, H. H. (1982). Metabolism of malonaldehyde in vivo and in vitro. *Lipids*, 17(5): 349.

Slater, T. F. (1988). Free radical mechanisms in tissue injury. *Cell Function and Disease*, 209-218.

Squires, E. J., Valdes, E. V., Wu, J., & Leeson, S. (1991). Research note: utility of the thiobarbituric acid test in the determination of the quality of fats and oils in feeds. *Poultry science*, 70(1): 180-183.

- Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T., Khoo, J., & Liberson, J. (1989). Modifications of low-density lipoprotein. *The New England Journal of Medicine*, 320(14): 915–924.
- Steinbrecher, U. P., Zhang, H., & Loughney, M. (1990). Role of oxidatively modified LDL in atherosclerosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 9(2): 155-168.
- Suresh, D. R., Annam, V., Pratibha, K., & Prasad, B. M. (2009). Total antioxidant capacity—a novel early bio-chemical marker of oxidative stress in HIV infected individuals. *Journal of biomedical science*, 16(1): 1-4.
- Suryakar, A. N., Tiwaskar, H. V., Ambekar, J. G., & Makhija, S. J. (1985). Serum lipid peroxide in liver diseases in children. *The Indian Journal of Pediatrics*, 52(2): 155-157.
- Şanlı, Y., & Kaya, S. (1991). Veteriner Farmakoloji ve ilaçla sağaltım seçenekleri. *Feryal Mat. San. Tic. Ltd. Şti, Ankara*.
- Tarladgis, B. G., Pearson, A. M., & Dugan Jr, L. R. (1962). The chemistry of the 2-thiobarbituric acid test for the determination of oxidative rancidity in foods. I. Some important side reactions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 39(1): 34-39.
- Tarladgis, B. G., Watts, B. M., Younathan, M. T., & Dugan Jr, L. (1960). A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 37(1): 44-48.
- Totlani, V. M., & Peterson, D. G. (2006). Epicatechin carbonyl-trapping reactions in aqueous Maillard systems: identification and structural elucidation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(19): 7311-7318.
- Turnbull, C. J., Daymond, A. J., Lake, H., Main, B. E., Radha, K., Cryer, N. C., ... & Hadley, P. (2010). The role of the international cocoa germplasm database and the international cocoa quarantine centre in information management and distribution of cocoa genetic resources.

- Vaca, C. E., Wilhelm, J., & Harms-Ringdahl, M. (1988). Interaction of lipid peroxidation products with DNA. A review. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 195(2): 137-149.
- Valls, V., Goicoechea, M., Muniz, P., Saez, G. T., & Cabo, J. R. (2003). Effect of corn oil and vitamin E on the oxidative status of adipose tissues and liver in rat. *Food Chemistry*, 81(2): 281-286.
- Van Elswyk, M. E. (1997). Comparison of n-3 fatty acid sources in laying hen rations for improvement of whole egg nutritional quality: a review. *British journal of Nutrition*, 78(1): S61-S69.
- Walter, M. F., Jacob, R. F., Bjork, R. E., Jeffers, B., Buch, J., Mizuno, Y., ... & Prevent Investigators. (2008). Circulating lipid hydroperoxides predict cardiovascular events in patients with stable coronary artery disease: the Prevent study. *Journal of the American College of Cardiology*, 51(12): 1196-1202.
- Wan, Y., Vinson, J. A., Etherton, T. D., Proch, J., Lazarus, S. A., & Kris-Etherton, P. M. (2001). Effects of cocoa powder and dark chocolate on LDL oxidative susceptibility and prostaglandin concentrations in humans. *The American journal of clinical nutrition*, 74(5): 596-602.
- Wang, X., Lei, X. G., & Wang, J. (2014). Malondialdehyde regulates glucose-stimulated insulin secretion in murine islets via TCF7L2-dependent Wnt signaling pathway. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 382(1): 8-16.
- Warso, M. A., & Lands, W. E. (1983). Lipid peroxidation in relation to prostacyclin and thromboxane physiology and pathophysiology. *British medical bulletin*, 39(3): 277-280.
- Waterhouse, A. L., Shirley, J. R., & Donovan, J. L. (1996). Antioxidants in chocolate. *The Lancet*, 348(9030): 834.
- Wei, Q., Liu, T., & Sun, D. W. (2018). Advanced glycation end-products (AGEs) in foods and their detecting techniques and methods: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 82: 32-45.

- Wiktorowska-Owczarek, A., & Nowak, J. Z. (2010). Pathogenesis and prophylaxis of AMD: focus on oxidative stress and antioxidants. *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej (Online)*, 64: 333-343.
- Wilson, J. L. (1988). *Biochemistry*; (Stryer, Lubert).
- Wisdom, S. J., Wilson, R., McKillop, J. H., & Walker, J. J. (1991). Antioxidant systems in normal pregnancy and in pregnancy-induced hypertension. *American journal of obstetrics and gynecology*, 165(6): 1701-1704.
- Yamamoto, Y., Niki, E., Eguchi, J., Kamiya, Y., & Shimasaki, H. (1985). Oxidation of biological membranes and its inhibition. Free radical chain oxidation of erythrocyte ghost membranes by oxygen. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 819(1): 29-36.
- Yarsan, E. (1998). Lipid peroksidasyon olayı ve önlenmesine yönelik uygulamalar. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 9(1): 89-95-95.
- Yarsan, E. (2014). Lipid peroksidasyon olayı ve önlenmesine yönelik uygulamalar. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 9(1): 89-95.
- Ylä-Herttuala, S., Palinski, W., Rosenfeld, M. E., Parthasarathy, S., Carew, T. E., Butler, S., Witztum, J. L., & Steinberg, D. (1989). Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *Journal of Clinical Investigation*, 84(4): 1086-1095. <https://doi.org/10.1172/jci114271>
- Ylä-Herttuala, S., Palinski, W., Rosenfeld, M. E., Parthasarathy, S., Carew, T. E., Butler, S., ... & Steinberg, D. (1989). Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *The Journal of clinical investigation*, 84(4): 1086-1095.
- Yogi, K. (1999). Lipid peroxide and human diseases. *Chemistry and Physics of Lipid*, 45: 337-351.

Zampelas, A., & Micha, R. (2015). *Antioxidants in health and disease* (p. 341). Taylor & Francis.

Quiles, J. L., Huertas, J. R., Ochoa, J. J., Battino, M., Mataix, J., & Mañas, M. (2003). Dietary fat (virgin olive oil or sunflower oil) and physical training interactions on blood lipids in the rat. *Nutrition*, 19(4): 363-368.



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

AD SOYAD: TUĞÇE AKSOY

EĞİTİM BİLGİLERİ

DERECE	ÜNİVERSİTE	YIL
Yüksek Lisans	İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi	2019-2021
Lisans	İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi	2016-2020
Lisans	İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi	2015-2019

Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Yayınlanan Bildiriler

1.Aksoy, T., Çatak, J., Yaman, M., Uğur, H., Servi Yıldırım, E., Mızrak, Ö.F. (2021) Determination of Malondialdehyde (MDA) Bioaccessibility in Chocolates by In Vitro Digestion. 5. International 19 May Innovative Scientific Approaches Congress. Samsun/Turkey, May 19, 2021- Sözlü Sunum.