T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KAPSÜLLENMİŞ VE KAPSÜLSÜZ ARONYA (*Aronia melanocarpa)* EKSTRAKTININ SIÇANLARIN PON1 GENİ mRNA EKSPRESYONU, KARACİĞER DOKULARINDAKİ PON1 ENZİM AKTİVİTESİ VE ATEROSKLEROZİS ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

SERİM TUNA KOÇ

DOKTORA TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Süleyman KÖK

EDİRNE-2025

Serim Tuna KOÇ'un hazırladığı **"Kapsüllenmiş ve Kapsülsüz Aronya (*Aronia melanocarpa)* Ekstraktının Sıçanların PON1 Geni mRNA Ekspresyonu, Karaciğer Dokularındaki PON1 Enzim Aktivitesi ve Aterosklerozis Üzerine Etkisinin Araştırılması"** başlıklı bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalında bir **Doktora tezi** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	İmza
Prof. Dr. Süleyman KÖK	……
Prof. Dr. Elvan BAKAR	……
Doç. Dr. Beytullah ÖZKAN	……
Dr. Öğr. Üyesi Çağlar DOĞUER	……
Dr. Öğr. Üyesi Gökçe ÇAKMAK KAFADAR	……

Tez Savunma Tarihi: 08/01/2025

Bu tezin Doktora tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

İmza

Prof. Dr. Süleyman KÖK

Tez Danışmanı ……

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

……

Doç. Dr. Filiz UMAROĞULLARI

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

T. Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI DOKTORA PROGRAMI

DOĞRULUK BEYANI

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında, tüm verilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini, kullanılan verilerde tahrifat yapılmadığını, tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını, kullanılan tüm literatür bilgilerinin bilimsel normlara uygun bir şekilde kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını ve bu tezin tamamı ya da herhangi bir bölümünün daha önceden Trakya Üniversitesi ya da farklı bir üniversitede tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

08/01/2025

Serim Tuna KOÇ
İmza

Doktora Tezi

Kapsüllenmiş ve Kapsülsüz Aronya (*Aronia melanocarpa*) Ekstraktının Sıçanların PON1 Geni mRNA Ekspresyonu, Karaciğer Dokularındaki PON1 Enzim Aktivitesi ve Aterosklerozis Üzerine Etkisinin Araştırılması

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı

ÖZET

Bu çalışmada, Aronya (*Aronia melanocarpa*) ekstraktının kapsülsüz (E) ve mikroenkapsüle (K) formlarının yüksek yağlı diyet (YYD) ile beslenen Sprague-Dawley (SD) sıçanların, serum ve karaciğer dokusu lipit profili, kan ve karaciğer dokularında PON1 enzim aktivitesi, gen ekspresyonu, aortta aterosklerotik plakların histopatolojik oluşumu ve karaciğer dokusunun histopatolojisi üzerine olan etkileri incelenmiştir.

Araştırmada 26 haftalık yaşta 42 adet erkek SD cinsi sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar, 7'şerli olarak 6 gruba ayrılmıştır. Deney diyet grupları; 1- Standart diyet kontrol (SDK) 2-Yüksek yağlı diyet (YYD), 3-YYD400E; YYD+400 mg/kg aronya E 4-YYD200E; YYD+200 mg/kg aronya E 5-YYD400K; YYD+400 mg/kg aronya K 6-YYD200K; YYD+200 mg/kg aronya K şeklinde oluşturulmuştur. Onuncu haftadan 20 haftalık yaşa ulaşıncaya kadar sıçanlar (SDK grup hariç) 10 hafta YYD ile beslenmiştir. Yirmi haftanın sonunda YYD ile beslenen sıçanların diyetlerine ek olarak 1 kg vücut ağırlığına (VA) 200 ve 400'er mg/kg dozajda E ve K aronya formlarından oral gavaj yolu ile 6 hafta süre uygulanmıştır.

Aronya uygulaması öncesi ve sonrası SD'lerin ortalama vücut ağırlıkları ölçülmüştür. Aronya YYD200E uygulamasının YYD grubundaki sıçanlara göre kilo artış hızına (g/h) negatif bir etkisi olmuştur (-4.62 g; $P<0,001$). Deneme grubu sıçanların

aronya uygulaması öncesi (20 haftalık yaşta) ve 6 haftalık aronya uygulaması sonrası (26 haftalık yaşta) Lee Obezite İndeksi ortalamaları arası farklar istatistiki olarak anlamlı değildir (P>0,05).

Sıçanların kan serumlarındaki toplam kolesterol düzeyleri YYD400E (167,7±0,57 mg/dl) grubundaki sıçanların SDK (158,9±2,05 mg/dl; P<0,0070) ve YYD (159,7±2,13 mg/dl; P<0,0166) grubundaki sıçanlara göre toplam kolesterol düzeyleri daha yüksek bulunmuştur. Sıçanların trigliserid (TG) seviyeleri, YYD400E (93,0±1,67 mg/dl) grubundakilerin YYD (172,1±23,27 mg/dl) grubundakilere göre anlamlı düzeyde (P<0,0107) düşmüştür. YYD400E (77,15 mg/dl) grubundaki sıçanların HDL düzeyleri, SDK (63,09±2,34 mg/dl; P<0,0006) ve YYD (61,08±0,97 mg/dl; P<0,0001) grubundaki sıçanlara göre daha yüksek ve anlamlıdır. YYD400E (18,60±0,33 mg/dl) grubundaki sıçanların YYD (34,43±4,65 mg/dl) grubundaki sıçanların kanlarındaki VLDL düzeyleri ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde düşük ve anlamlıdır (P<0,0107). Deneme grubu sıçanların kanlarındaki LDL/HDL oranı, en düşük YYD400E (0,95±0,07mg/dl) grubundadır.

Sıçanların kan örneklerine dayanılarak yapılan PON1 gen ekspresyonu [$2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ değerleri] YYD400E grubunda 1,15±0,06 olarak belirlenmiştir. YYD400E (64,59±0,4 ng/ml) grubundaki sıçanlar, SDK (49,65±4,68 ng/ml; P<0,0025) grubu ve YYD (45,39±1,63 ng/ml; P<0,00001) grubundaki sıçanlara göre daha yüksek PON1 enzim aktivitesine sahiptirler. Gruplar arası PON1 gen ekspresyon değerleri arası anlamlı olmasada, YYD400E grubuna 400 mg/kg aronya ekstraktının PON1 enzim aktivitesini diğer deneme gruplarına göre arttırdığı görülmüştür. Sıçanların kanlarındaki MDA değerleri; YYD400E (3,01±0,04 nmol/ml) grubundakilerin SDK grubundaki (P<0,0290) sıçanlara göre daha yüksek bulunmuş iken YYD ve diğer gruplara göre istatistiki olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir (P>0,05).

SD sıçanların YYD400E (12,80±0,24 g) grubundakilerin karaciğer ağırlıkları SDK (17,43±0,79 g; P<0,0001) ve YYD (18,26±0,81 g; P<0,0001) grubundakilere göre anlamlı düşmüştür. YYD gurubuna göre 400 mg/kg ekstrakt veya enkapsüle aronyanın karaciğer ağırlıkları üzerine düşürücü etkisi saptanmıştır. YYD400E grubundaki sıçanların karaciğer ağırlığının/vücut ağırlığına oranı, SDK (P<0,0001) ve YYD (P<0,0001) grubu sıçanlarına göre daha düşüktür. 400 mg/kg aronya ekstraktı vücut

ağırlığına göre karaciğer oranını (%3,20±0,18) en düşük düzeyde tutmuştur. Denemedeki sıçanların ALT ve AST sonuçları SD'ler için belirlenen normal standart aralıkta olup en düşük ALT (35,10±1,98 U/L) ve AST (26,68±2,58 U/L) değeri ise YYD400E grubunda belirlenmiştir. ALT değerleri gruplar arası farklar istatistiki olarak anlamsız iken AST değerleri bakımından SDK (P<0,0001) ve YYD (P<0,0001) gruplarındaki sıçanlara göre YYD400E değeri daha düşük ve anlamlıdır. Sıçanların karaciğer dokularında PON1 enzim aktivitesi, 62,18±7,60 ng/ml (SDK) ile 81,00±1,11 ng/ml (YYD400E) arasında değişmektedir. YYD ile beslenen sıçan gruplarında en yüksek enzim aktivitesi diyetleri 400 mg/kg aronya ekstraktı ile desteklenen YYD400E grubunda görülmüş, ancak fark anlamsızdır (P>0,05).

Sıçanların PON1 gen ekspresyonu [$2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ değeri] bakımından da YYD400E grubunda (0,48±0,17) diyetin olumlu etkisi gözlensede, $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ değerleri bakımından da gruplar arası farklar anlamsızdır. Karaciğer MDA değerleri bakımından da gruplar arası anlamlı bir fark yoktur (P>0,005). YYD400E (67,99±0,98 mg/dl) grubundakilerin karaciğer dokularındaki HDL düzeyleri, YYD (52,62±2,35) grubuna göre yüksek ve anlamlı bulunmuştur (P<0,0001). Karaciğer doku örneklerinin histopatolojik olarak incelemesinde; SDK grubundaki sıçanların karaciğer dokuları normal histolojik yapısındadır. YYD grubundaki sıçanların karaciğer dokularında portal alanda az oranda inflamasyon bulgularına rastlanmıştır. Dolayısıyla, YYD etkisine bağlı olarak karaciğerde yüksek oranda mikrosteatoz ve orta düzeyde makrosteatoz bulguları tespit edilmiştir. SDK grubu ile karşılaştırıldığında karaciğer hasar skoru bu grupta yüksek bulunmuştur (P<0,001). YYD200K ve YYD400K aronya ekstraktı verilmiş sıçanların karaciğer bulguların da YYD grubuna benzer bulgular elde edilmiştir (sırasıyla P>0,988, P>0,953). YYD200E ve YYD400E grupların karaciğer skorları YYD grubuyla karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır (P<0,001). Fakat sadece intragastrik olarak YYD400E grupta, SDK grubuna benzer morfoloji tespit edilmiştir. YYD400E grubun karaciğer skorunda, mikro ve makrosteatoz bulguları azalmıştır. Aort dokuları değerlendirildiğinde, tüm deney gruplarında normal doku morfolojisi olduğu ve hiçbir deney grubunda torasik aorta veya aort arkı dokularında ateroskleroz plaklarına rastlanmamıştır. Hiyalin veya mukoid değişiklikler ya da endotelyal anomaliler tespit edilmemiştir. Sıçanların ateroskleroz ve koroner risk indeksi YYD200E grubunda SDK grubundaki sıçanlara göre daha yüksek ve anlamlı hesaplanmıştır (P<0,05).

Sonuç olarak antosiyaninler ve diğer polifenolik bileşikler açısından zengin olan aronyanın lipit oksidasyonunun önlenmesine yardımcı olan ve aterosklerozun ilk adımı olan PON1 enzim aktivitesini artırarak aterosklerozun önlenmesinde ve yavaşlatılmasında kullanılabileceğini göstermektedir. Özellikle YYD400E uygulanmasının, PON1 gen ekspresyonunu olumlu yönde etkilediği, PON1 enzim aktivitesini ve HDL düzeylerini artırdığı ve karaciğer dokularında MDA seviyesindeki azalma (2,38 nmol/g) nedeniyle oksidatif strese karşı uzun vadeli koruma sağladığı düşünülmektedir.

Yıl : 2025

Sayfa Sayısı : 182

Anahtar Kelimeler : Aronya (*Aronia melanocarpa*), Sprague-Dawley, Enkapsülasyon, PON1 mRNA Ekspresyonu, PON1 Enzim Aktivitesi, Aterosklerozis

PhD Thesis

Investigation of the Effect of Encapsulated and Unencapsulated Aronia (*Aronia melanocarpa*) Extract on PON1 Gene mRNA Expression, PON1 Enzyme Activity in Liver Tissues and Atherosclerosis in Rats

Trakya University Institute of Natural and Applied Sciences
Department of Biotechnology and Genetic

ABSTRACT

In this study, the effects of unencapsulated (E) and microencapsulated (C) forms of Aronia (*Aronia melanocarpa*) extract on serum and liver tissue lipit profile, PON1 enzyme activity and gene expression in blood and liver tissues, histopathologic formation of atherosclerotic plaques in aorta and histopathology of liver tissue of Sprague-Dawley (SD) rats fed high fat diet (HFD) were investigated.

In the study, 42 male SD rats at 26 weeks of age were used. The rats were divided into 6 groups of 7. Experimental diet groups; 1- Standard diet control (SDC) 2-High fat diet (HFD) 3-HFD400E; HFD+400 mg/kg aronia E 4-HFD200E; HFD+200 mg/kg aronia E 5-HFD400C; HFD+400 mg/kg aronia C 6-YYD200C; HFD+200 mg/kg aronia C. From the tenth week until 20 weeks of age, rats (except SDC group) were fed with HFD for 10 weeks. At the end of 20 weeks, in addition to the diets of the rats fed with HFD, 200 and 400 mg/kg dosages of aronia E and K per 1 kg SD body weight (BW) were administered to the SDs by oral gavage for 6 weeks.

The average body weights of SDs were measured before and after aronia application. As a result of the study, a slowdown was observed in the rate of body weight gain of adult rats with increasing age. Aronia HFD200E administration had a negative effect on the rate of weight gain (g/h) compared to the rats in the HFD group (-4.62 g; P<0,001). The differences between the mean Lee Obesity Index of the experimental group

SD rats before (20 weeks of age) and after 6 weeks of aronia administration (26 weeks of age) were not statistically significant (P>0,05).

Total cholesterol levels in the blood serum of SD rats were found to be higher in the HFD400E (167,7±0,57 mg/dl) group than in the SDC (158,9±2,05 mg/dl; P<0,0070) and HFD (159,7±2,13 mg/dl; P<0,0166) groups. Triglyceride (TG) levels of rats were significantly (P<0,0107) lower in the HFD400E (93,0±1,67 mg/dl) group than in the HFD (172,1±23,27 mg/dl) group. HDL levels of rats in the HF400E (77,15 mg/dl) group were higher and significantly higher than those in the SDC (63,09±2,34 mg/dl; P<0,0006) and HFC (61,08±0,97 mg/dl; P<0,0001) groups. The VLDL levels in the blood of rats in the HFD400E (18,60±0,33 mg/dl) group were significantly lower and significant (P<0,0107) compared to those in the HFD (34,43±4,65 mg/dl) group. The LDL/HDL ratio in the blood of the experimental group SD rats was lowest in the HFD400E (0,95±0,07 mg/dl) group.

PON1 gene expression [$2^{-(\Delta\Delta Ct)}$) values] based on blood samples of rats was determined as 1,15±0,06 in HFD400E group. Rats in HFD400E (64,59±0,4 ng/ml) group had higher PON1 enzyme activity than rats in SDC (49,65±4,68 ng/ml; P<0,0025) and HFD (45,39±1,63 ng/ml; P<0,00001) groups. Although the PON1 gene expression values between the groups were not significant, it was observed that 400 mg/kg aronia extract increased PON1 enzyme activity in the HFD400E group compared to the other experimental groups. MDA values in the blood of rats were higher in the HFD400E group (3,01±0,04 nmol/ml) than in the SDC group (P<0,0290), but no statistically significant difference was observed between the HFD and other groups (P>0,05).

The liver weights of SD rats in the HFD400E (12,80±0,24 g) group were significantly decreased compared to those in the SDC (17,43±0,79 g; P<0,0001) and HFD (18,26±0,81 g; P<0,0001) groups. There was a decreasing effect of 400 mg/kg extract or encapsulated aronia on liver weights compared to HFD group. The ratio of liver weight/body weight of rats in the HFD400E group was lower than that of rats in the SDC (P<0,0001) and HFDC (P<0,0001) groups. 400 mg/kg aronia extract kept the liver weight to body weight ratio (3,20±0,18%) at the lowest level. ALT and AST results of SD rats in the experiment were within the normal standard range determined for SDs and the lowest ALT (35,10±1,98 U/L) and AST (26,68±2,58 U/L) values were determined in the

HFD400E group. While the differences between the groups in ALT values were statistically insignificant, in terms of AST values, HFD400E value was lower and significant compared to rats in SDC (P<0,0001) and HFDC (P<0,0001) groups. PON1 enzyme activity in liver tissues of rats ranged between 62,18±7,60 ng/ml (SDC) and 81,00±1,11 ng/ml (HFD400E). The highest enzyme activity was observed in the HFD400E group whose diets were supplemented with 400 mg/kg aronia extract, but the difference was not significant (P>0,05).

In terms of PON1 gene expression [$2^{-(\Delta\Delta Ct)}$) value] of rats, although a positive effect of diet was observed in the HFD400E group (0,48±0,17), the differences between the groups in terms of $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$) values were not significant. There was no significant difference between the groups in liver MDA values (P>0,005). HDL levels in the liver tissues of the HFD400E (67,99±0,98 mg/dl) group were found to be higher and significant (P<0,0001) compared to the HFD (52,62±2,35) group. Histopathological examination of the liver tissue samples revealed that the liver tissues of the rats in the SDC group had normal histological structure. In the liver tissues of the rats in the HFD group, a small amount of inflammation findings were found in the portal area. Therefore, high level of microsteatosis and moderate level of macrosteatosis findings were detected in the liver due to the effect of HFD. When compared with the SDC group, liver damage score was found to be higher in this group (P<0,001). In the liver findings of rats given HFD200C and HFD400C aronia extract, similar findings were obtained in the HFD group (P>0,988, P>0,953, respectively).

The liver scores of the HFD200E and HFD400E groups decreased statistically significantly when compared with the SDC group (P<0,001). However, only intragastrically in the HFD400E group, a morphology similar to the SDC group was detected. Micro and macrosteatosis findings decreased in the liver score of the HFD400E group. When aortic tissues were evaluated, normal tissue morphology was observed in all experimental groups and no atherosclerosis plaques were found in the thoracic aorta or aortic arch tissues in any experimental group. Hyaline or mucoid changes or endothelial abnormalities were not detected. The atherosclerosis index of rats was slightly decreased in the HFD400E (2,19±0,08) group compared to the SDC (2,54±0,10) and HFD (2,62±0,05) groups, but not significantly (P>0,05).

In conclusion, aronia, which is rich in anthocyanins and other polyphenolic compounds, can be used to prevent and slow down atherosclerosis by increasing PON1 enzyme activity, which helps prevent lipit oxidation and is the first step in atherosclerosis. In particular, administration of HFD400E is thought to positively affect PON1 gene expression, increase PON1 enzyme activity and HDL levels, and provide long-term protection against oxidative stress due to a decrease in MDA level (2,38 nmol/g) in liver tissues.

Year 2025

Number of Pages : 182

Keywords : Aronia (*Aronia melanocarpa*), Sprague-Dawley, Encapsulation, PON1 mRNA Expression, PON1 Enzyme Activity, Atherosclerosis

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince değerli bilgi birikimlerini ve tecrübelerini benimle paylaşan, çalışmamın her aşamasında çözüm odaklı yaklaşımlarıyla bana yol gösteren Mühendislik Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü öğretim üyesi çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Süleyman KÖK'e teşekkürlerimi sunarım. Tez izleme komitelerinde değerli ve önemli katkılarıyla tezimin gelişmesinde büyük destekleri olan saygıdeğer hocalarım Eczacılık Fakültesi Dekanı Prof. Dr. Elvan BAKAR ve Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Beytullah ÖZKAN'a çok teşekkür ederim. Tez çalışmamın hayvan denemesinin yürütülmesi aşamasında Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları biriminden sorumlu olan Veteriner Hekim Kenan SELVİ'ye, deney hayvanlarında gavaj uygulamasında yardımcı olan sağlık teknikeri İbrahim BOZKURT'a sakrifikasyon kısmında yardımlarından ötürü Doç Dr. Nilay SEYİDOĞLU ve sağlık teknikeri Miray UŞAR'a çok teşekkür ederim. Ayrıca sıçanların beslenmesi, bakımı ve gavaj uygulanması esnasında yardımcı olan Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları laboratuvarı çalışanlarına,

Çalışmamın histolojik değerlendirme sürecinde desteklerini ve bilgisini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Onur ERSOY'a, grafiklendirme ile ilgili yardımlarından dolayı Dr. Selim ESEN'e, tezin formatında yardımcı olan Arş. Gör. Dr. Ayşe ŞEN'e, biyokimyasal analizler için Doç. Dr. Deniz KARAKÇI'ya,

Çalışmamın biyoteknoloji analizlerinde bilgisini ve yardımlarını büyük bir içtenlikle benden esirgemeyen ve beraber çalışma şansı yakaladığım Doç. Dr. Sertaç ATALAY'a, fenolik bileşik analizini yapan öğretim görevlisi Özgür KARADAŞ'a, Trakya Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik bölümünden Dr. Öğr. Üyesi Nihan Bilge KAMER'e ve yardımını esirgemeyen tüm bölüm hocalarıma ve araştırma görevlilerine,

Doktora tezime maddi destek sağlayan Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine (TUBAP No 2022/190);

Eğitim hayatım boyunca daima yanımda ve en büyük destekçim olan annem Fisun KOÇ'a ve babam Mesut KOÇ'a, bu yolculuktaki anlayış, sabır ve destekleri için hayatım ve çalışmalarımı kolaylaştıran ve güzelleştiren isimlerini buraya sığdıramayacağım sevgili arkadaşlarım dostlarım sizlere de çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET iv
ABSTRACT viii
TEŞEKKÜR xii
İÇİNDEKİLER xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ xx
ŞEKİLLER DİZİNİ xxiii
ÇİZELGELER DİZİNİ xxvi
BÖLÜM 1 1
GİRİŞ VE AMAÇ 1
BÖLÜM 2 4
GENEL BİLGİLER 4
2.1. Hiperlipidemi ve Ateroskleroz 4
2.2. Ateroskleroz Patolojisi 5
2.2.1. Aterosklerozda Lipoprotein Metabolizması 5
2.2.2. LDL Kolesterol 6
2.2.3. HDL Kolesterol 7
2.2.4. Lipoprotein (a) 7
2.2.5. Trigliserit 8
2.3. Ateroskleroz ve Oksidatif Stres 9
2.4. Ateroskleroz ve Malondialdehid 10
2.5. Serbest Radikaller ve Polifenoller 10

2.5.1. Reaktif Oksijen Türleri (ROS) 12
2.5.1.1. Reaktif Oksijen Türlerinin Fiziko-Kimyasal Özellikleri 14
2.5.1.2. ROS Toksitesi 14
2.6. Antioksidanların İnsanlar İçin Önemi 15
2.6.1. Polifenollerin Antioksidan Özelliklerinin Moleküler Temeli 17
2.6.1.1. Fenolik Bileşiklerin Antioksidan Özellikleri 19
2.7. Paraoksonaz /Arilesteraz (PON 1) 20
2.7.1 PON1 Genetik Polimorfizm ve Fenotipik Dağılım 22
2.7.1.1. PON1 Aktivitesini Etkileyen Etmenler 22
2.7.1.2. PON1 ve Hastalıklarla İlişkisi 23
2.8. Aronya (*Aronia melanocarpa*) 24
2.8.1. Aronya Meyvesinin Başlıca Biyoaktif Bileşikleri 25
2.8.1.1. Polifenolik Bileşikler 25
2.8.1.2. Flavonoidler 26
2.8.1.3. Fenolik Asitler 27
2.8.1.4. Aronyanın Sağlık Üzerine Etkileri 28
2.9. Enkapsülasyon 32
2.9.1. Mikrokapsüller 32
2.9.2. Biyoaktif Bileşenlerin Enkapsülasyonu 33
2.9.2.1. Sprey Kurutma 33
2.9.2.2. Dondurarak Kurutma veya Liyofilizasyon 34
2.9.2.2.1. Enkapsülasyonu Etkileyen Faktörler 35
2.9.2.2.1.1.Sıcaklık 35
2.9.2.2.1.2.Döngü Modu 35
2.9.2.2.1. Duvar Malzemeleri 35
BÖLÜM 3 37
MATERYAL VE METOT 37

3.1. Materyal 37
3.1.1. Hayvan Materyali 37
3.1.2. Aronya Meyvesinin Temini 38
3.1.3. Yem Materyalinin Temini 39
3.2. Metot 40
3.2.1. Aronya Meyvelerinin Liyofilizasyon (Dondurarak Kurutma) İşlemi 40
3.2.2. Aronya Meyvesinin Ekstraksiyon İşlemi 40
3.2.3. Aronya Meyvesinin Mikroenkapsülasyon İşlemi 41
3.2.4. Aronya Meyvesinin Fenolik Bileşik Analizi 41
3.2.5. Toplam Fenolik Madde Analizi 43
3.2.6. Antioksidan Kapasitesinin Belirlenmesi 44
3.2.7. Renk Analizi 44
3.3. Deney Hayvanları Çalışma Gruplarının Oluşturulması 45
3.3.1. Anestezi, Kan Alma ve Ötanazi 47
3.3.1.1. Anestezi 47
3.3.1.2. Kan ve Doku Alma ve Ötanazi 47
3.4. Vücut Kitle İndeksinin Hesaplanması 48
3.5. Obezite Durumu Değerlendirilmesi (Lee İndeksi) 48
3.6. Ateroskleroz ve Koroner Risk İndeksinin Hesaplanması 49
3.7. Biyokimyasal Analizler 49
3.7.1. Yüksek Dansiteli Lipoprotein Kolesterol (HDL) Analizi 49
3.7.2. Toplam Kolesterol ve Trigliserid Analizi 51
3.7.3. Düşük Dansiteli Lipoprotein Kolesterol Analizi, Çok Düşük Dansiteli Lipoprotein Kolesterol Hesaplanması 52
3.7.4. Malondialdehit (MDA) Analizi 52
3.7.5. Aspartat Aminotransferaz Tayini (AST) 52
3.7.6. Alanin Aminotransferaz Tayini (ALT) 52

3.8. Kan ve Doku Örneklerinde Total RNA İzolasyonu 55
3.9. RNA Miktarı Belirleme ve Kalite Tayini 56
3.10. DNAse I ve RNAse FRee Uygulaması 58
3.11. cDNA Sentezi 59
3.12. Genomik DNA (gDNA) İzolasyonu 60
3.13. Gradient PCR Analizi 61
3.14. qPCR Uygulaması 65
3.14.1. Delta Ct Yöntemi ile Gen Ekspresyonlarının Hesaplanması 67
3.15. ELISA Kitleri ile Dokudan Enzimlerin Belirlenmesi 68
3.15.1. PBS Çözeltisi Hazırlanması 68
3.15.2. Doku Örneklerinin Homojenizasyonu 68
3.16. PON1 Enzim Düzeyinin ELISA Yöntemi ile Belirlenmesi 69
3.17. Aortta Aterosklerotik Plakların ve Yağlı Karaciğer Dokusunun Histopatolojik İncelenmesi 71
3.17.1. Işık Mikroskobik İncelemeler 71
3.17.2. Hematoksilen-Eosin (H-E) Boyama Metodu 72
3.17.3. Hücre Sayımı 72
3.18. İstatistiksel Analiz 73
BÖLÜM 4 74
SONUÇLAR 74
4.1 Aronya Meyvesinin Fenolik Madde ve Antioksidan Kapasitesi 74
4.2. Aronya Ekstraktının Fenolik Madde Bileşik Analizleri 75
4.3. Mikroenkapsüle Aronya Ekstraktının Mikroskop Görüntüleri 75
4.4. Renk Analizleri 76
4.5. Sıçan Vücut Ağırlıkları 77
4.6. Sıçan Vücut Kitle İndeksi 78
4.7. Lee Obezite İndeksi 79
4.8. Kan Yağlarına İlişkin Bulgular 80

4.9. Kan Örneklerinde PON1 Gen Ekspresyonu, PON1 Enzimi ve MDA Analizlerine İlişkin Bulgular 83
4.10. Karaciğer Dokusuna İlişkin Bulgular 84
4.11. Karaciğer Dokusu Örneklerinde PON1 Gen Ekspresyonu, PON1 Enzimi, MDA ve HDL Analizlerine İlişkin Bulgular 86
4.12. Aortta Aterosklerotik Plakların ve Yağlı Karaciğer Dokusunun Histopatalojik İncelenmesine İlişkin Bulgular 88
BÖLÜM 5 91
TARTIŞMA 91
5.1. Aronyanın Fenolik İçeriği ve Antioksidan Kapasitesi Arasındaki İlişki 91
5.2. Aronyanın Renk Özellikleri Üzerindeki Değişimler Arasındaki İlişki 94
5.3. Aronya ve Antropometrik Ölçümler Arasındaki İlişki 97
5.4. Aronya ve Serum Kan Yağları Arasındaki İlişki 100
5.4.1 Aronya Toplam Kolesterol ve HDL Kolesterol Arasındaki İlişki 100
5.4.2 Aronya Trigliserit Düzeyleri Arasındaki İlişki 101
5.4.3 Aronya LDL Kolesterol Düzeyleri Arasındaki İlişki 102
5.4.4 Aronya VLDL Kolesterol Düzeyleri Arasındaki İlişki 103
5.4.5 Aronya LDL/HDL Kolesterol Düzeyleri Arasındaki İlişki 103
5.5. Aronya ve Serum PON1 Enzimi, PON1 Gen Ekspresyonu Arasındaki İlişki .. 104
5.6. Aronya ve Serum Malondialdehit Düzeyleri Arasındaki İlişki 106
5.7. Aronya Karaciğer Ağırlığı ve Karaciğer Ağırlığının/Vücut Ağırlığı Oranı Arasındaki İlişki 108
5.8. Aronya Karaciğer Enzimleri Arasındaki İlişki 110
5.8.1. Aronya ve Alanin Aminotransferaz (ALT) Enzim Düzeyleri Arasındaki İlişki 110
5.8.2. Aronya ve Aspartat Aminotransferaz (AST) Enzim Düzeyleri Arasındaki İlişki 111
5.9. Aronya Karaciğer Dokusu PON1 Enzim Aktivitesi, PON1 Gen Ekspresyonu Arasındaki İlişki 112
5.10. Aronya Arteroskleroz ve Koroner Risk İndeksi Arasındaki İlişki 114
5.11. Aronya Karaciğer Dokusu Malondialdehit Seviyeleri Arasındaki İlişki 116
5.12. Aronya Karaciğer HDL Seviyeleri Arasındaki İlişki 118

5.13. Aortta Aterosklerotik Plakların Histopatolojik İncelenmesine İlişkin Bulgular 119
5.14. Aronya Karaciğer Dokusunun Histopatolojik İncelenmesine İlişkin Bulgular 120
KAYNAKLAR 124
ÖZGEÇMİŞ 155

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ΔE:	Renk Değişimi
a*:	Kırmızılık
ABTS:	2′-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid
AKS:	Akut Koroner Sendrom
ALT:	Alanin Aminotransferaz
AST:	Aspartat Aminotransferaz
Aİ:	Ateroskleroz İndeksi
b*:	Yeşil
CAT:	Katalaz
CUPRAC:	Bakır Azaltıcı Antioksidan Kapasite
DNA:	Deoksiribonükleik Asit
DPPH:	1,1-difenil 2-pikrilhidrazil
DSÖ:	Dünya Sağlık Örgütü
GPx:	Glutatyon Peroksidaz
GR:	Glutatyon redüktaz
GSH:	İndirgenmiş Glutatyon
GSSG:	Glutatyon Disülfid veya Oksitlenmiş Glutatyon
H_2O_2:	Hidrojen Peroksit
HDL:	Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
HPLC:	Yüksek Performanslı Likit Kromotografi

İKH:	İskemik Kalp Hastalığı
KDHS:	Karaciğer Dokusu Hasar Skoru
KRİ:	Koroner Risk İndeksi
KVH:	Koroner Vasküler Hastalık
L*:	Parlaklık
LDL:	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
Lp(a):	Lipoprotein a
LPL:	Lipoprotein Lipaz
MAO:	Monoamin Oksidaz
MDA:	Malondialdehit
MI:	Miyokard İnfarktüsü
MUFA:	Tekli Doymamış Yağ Asitleri
NABİLTEM:	Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı
PON1:	Paraoksonaz 1
PON2:	Paraoksonaz 2
PON3:	Paraoksonaz 3
PUFA:	Çoklu Doymamış Yağ Asitleri
RCT:	Ters Kolesterol Taşınması
ROS:	Reaktif Oksijen Türleri
SD:	Sprague Dawley
SDK.	Standart Diyet Kontrol
SEM:	Taramalı Elektron Mikroskobu
SOD:	Süperoksit Dismutaz
TE:	Trolox Eşdeğeri
TÜİK:	Türkiye İstatistik Kurumu

TUTAGEM:	Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Merkezi
TÜTFDHB:	Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Birimi
VA:	Vücut Ağırlığı
VKİ:	Vücut Kitle İndeksi
VLDL:	Çok Düşük Yoğunluklu Lipoproteinler
YYD200E:	YYD aronya ekstrakt 200 mg/kg VA/gün
YYD200K	YYD ve aronya enkapsüle form 200 mg/kg VA/gün
YYD400E:	YYD aronya ekstrakt 400 mg/kg VA/gün
YYD400K:	YYD ve aronya enkapsüle form 400 mg/kg VA/gün
YYD:	Yüksek Yağlı Diyet

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. ROS oluşumu ve kaybına ilişkin reaksiyonların gösterimi, GPx; Glutatyon peroksidaz, GR: Glutatyon redüktaz, GSH: İndirgenmiş glutatyon, GSSG: Glutatyon disülfid veya oksitlenmiş glutatyon, SOD: Süperoksit dismutaz, CAT: Katalaz, MAO: Monoamin oksidaz, RH: Lipit (Halliwell ve Gutteridge, 2015) 13
Şekil 2.2. Polifenollerin sınıflandırılması ve polifenolik antioksidanların kimyasal yapısı (Manach vd., 2004) 19
Şekil 2.3. Farklı patolojik süreçlerin PON1 bozulması, yani HDL işlevsizliği üzerindeki etkisi (farklı hastalıklarda PON 1 aktivitesinin/konsantrasyonunun azalmasına neden olan olası mekanizmalar) (Kotur-Stevuljević vd., 2020) 24
Şekil 2.4. Aronya (*Aronia melanocarpa*) meyvesi 25
Şekil 2.5. (a) En yaygın antosiyanidinler. (b) Siyanidin 3-O-galaktozidin kimyasal yapısı (Liang, vd., 2021) 27
Şekil 2.6. Klorojenik asidin kimyasal yapısı (Dudonné vd., 2015) 28
Şekil 2.7. Aronyanın sağlık üzerine etkileri 29
Şekil 2.8. Sprey kurutmada yer alan adımları gösteren akış şeması 34
Şekil 3.1. Araştırmanın yürütüldüğü deneme ünitesi 38
Şekil 3.2. Araştırma materyali Nero çeşidi aronya meyvesi ve kesiti 39
Şekil 3.3. Liyofilizasyon işlemi 40
Şekil 3.4. Aronya meyvesinin ekstrakt ve mikroenkapsüle formu 41
Şekil 3.5. Fenolik bileşen analizlerinin yapıldığı HPLC cihazı 42
Şekil 3.6. Aronya ekstraktının fenolik bileşikleri 43
Şekil 3.7. Renk ölçüm cihazı 45
Şekil 3.8. Deneme grupları ve araştırmanın çalışma süreleri 46
Şekil 3.9. Vücut ağırlık, yem tartımları ve gavaj uygulamasına ilişkin uygulamalar ile ilgili görseller 46
Şekil 3.10. Sıçanların sakrifiye edilmesi, kan ve doku örneklerinin alınması 48
Şekil 3.11. Sıçanların boy ve bel çevresi ölçümleri 49

Şekil 3.12. HDL standart çözeltilerin seyreltilme aşamaları 51
Şekil 3.13. Accutrend Plus trigliserid ve kolesterol ölçüm cihazı 51
Şekil 3.14. MDA ELISA standartları 54
Şekil 3.15. DPEC'li suyun hazırlanması 57
Şekil 3.16. Total RNA kan izolasyonu örneklerinin jel elektroforezinde yürütülmesi ... 58
Şekil 3.17. Gradient PCR bağlanma sıcaklıkları 62
Şekil 3.18. Gredient PCR sonuçlarının Agaroz jel elektroforezinde görüntülemesi 64
Şekil 3.19. DNR marka Biolmaging Systems Minibis pro jel görüntüleme cihazı 65
Şekil 3.20. Dokuların sıvı azotta -196 °C'de bilyalı parçalayıcılar kullanılarak yapılan parçalama işlemi 69
Şekil 3.21. PON1 enzimi ELISA standartları 71
Şekil 4.1. Mikroenkapsüle aronya ekstraktının taramalı elektron mikroskop (SEM) görüntüleri 76
Şekil 4.2. Aronya meyvesinin renk analiz değerleri 77
Şekil 4.3. a) Sıçanların deneme süresince haftalık ortalama vücut ağırlık değişimleri b) Sıçanların deneme süresince vücut ağırlığı artış hızı (g/h). 78
Şekil 4.4. a) Sıçanların aronya uygulama öncesi VKİ1 b) Sıçanların aronya uygulama sonrası VKİ2 79
Şekil 4.5. a) Sıçanların aronya uygulama öncesi Lee obezite indeksi 1 b) Sıçanların aronya uygulama sonrası Lee obezite indeksi 2 80
Şekil 4.6. a) Sıçanların toplam kolesterol düzeyi (mg/dl) b) Sıçanların trigliserit düzeyi (mg/dl) c) Sıçanların LDL düzeyi (mg/dl) d) Sıçanların HDL düzeyi (mg/dl) e) Sıçanların VLDL düzeyi (mg/dl) f) Sıçanların LDL/HDL düzeyi (mg/dl) 81
Şekil 4.7. a) Sıçanların kan PON1 enzim (ng/ml) değerleri b) Sıçanların kan PON1-mRNA değerleri c) Sıçanların kan MDA (nmol/g) değerleri 84
Şekil 4.8. a) Sıçanların karaciğer ağırlığı (g) b) Sıçanların karaciğer ağırlığı/vücut ağırlığına oranı (%) c) Sıçanların ALT değeri (U/L) d) Sıçanların AST değeri (U/L) ... 85
Şekil 4.9. a) Sıçanların karaciğer dokularında PON1 enzim (ng/ml) değerleri b) Sıçanların karaciğer dokularında PON1-gen ekspresyonu değerleri c) Sıçanların karaciğer dokularında MDA (nmol/g) değerleri) d) Sıçanların karaciğer dokularında HDL (mg/dl) değerleri 87

Şekil 4.10. Sıçan aort duvarı H-E boyalı mikrografları, A- YYD400E, B- YYD200E, C- YYD400K, D- 200 YYD200K, E- YYD, F- SDK, (i) – Tunika intima tabakası, (m) – Tunika media tabakası, (a) – Tunica adventisya tabakası, X200 büyütme.) 89
Şekil 4.11. Karaciğer H-E boyalı mikrografları. A- YYD400E B- YYD200E C- YYD400K D- 200 YYD200K E- YYD F- SDK. (*)- mikrostetosis bulguları, (→) – makrosteatosis bulguları. X200 büyütme..... 90

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Aronyanın sağlık üzerine etkileri üzerine yapılan çalışmalar 31
Çizelge 3.1. Yüksek yağlı diyete uygun formda hazırlanan pelet yemin içeriği 39
Çizelge 3.2. MDA standart çözeltilerin seyreltilme aşamaları 53
Çizelge 3.3. DNAse 1 RNAse FRee uygulaması aşamaları 58
Çizelge 3.4. cDNA PCR protokolü 59
Çizelge 3.5. PCR mix içeriği 61
Çizelge 3.6. Gradient PCR cihaz yükleme protokolü 62
Çizelge 3.7. PON1 geni ve β-aktin geni primerleri 66
Çizelge 3.8. qPCR sentez reaksiyonu 66
Çizelge 3.9. qPCR cihazına yükleme protokolü 67
Çizelge 3.10. Karaciğer morfolojisi hasar değerlendirme kriterleri (Brunt ve Tiniakos 2010; Brown ve Kleiner, 2016) 72
Çizelge 4.1. Aronya meyvesinin fenolik madde ve antioksidan kapasitesi değerleri 74
Çizelge 4.2. Aronya ekstaktının fenolik bileşikleri 75
Çizelge 4.3. Aronya meyvesinin renk analiz değerleri 77
Çizelge 4.4. Ateroskleroz ve koroner risk indeksi değerleri 83

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Dünyanın en yaygın ve en fazla ölüme neden olan hastalık grubu kalp-damar hastalıklarıdır. Dünya Sağlık Örgütü'ne (DSÖ, 2023)'e göre, 2021 yılında dünyada ölen kişilerin yaklaşık üçte biri dolaşım sistemi hastalıklarına bağlı olarak, yaklaşık 7,4 milyonu koroner kalp hastalığı nedeniyle ve 6,7 milyonu inmeye bağlı olarak hayatını kaybetmiştir. 2022 yılında ülkemizde hayatını kaybeden 504 bin kişinin %35,4'ü dolaşım sistemi hastalıkları sebebiyle hayatını kaybetmiştir ve bu hastalıkların ölenlerin %42,3'ünün iskemik kalp hastalıklarından, %23,5'inin diğer kalp hastalıklarından ve %19,2'sinin serebro-vasküler hastalıklardan kaynaklandığı belirlenmiştir (TÜİK, 2022).

Başta ateroskleroz olmak üzere, yüksek kan basıncı, yüksek kan glikozu, artmış inflamatuvar belirteçler, oksidatif stres ve protrombotik durum, kardiyovasküler hastalıkların nedenleri arasında yer almaktadır (Ritchie ve Connell, 2007). Kardiyovasküler hastalık faktörleri arasında en çok araştırılanı aterosklerozdur.

Ateroskleroz, kolesterol metabolizmasındaki düzensizlik ve damar duvarında düz kas hücreleri ile makrofajların birikmesiyle ortaya çıkan bir vasküler hastalıktır (Mestas ve Ley, 2008). Oksidatif stresin, ateroskleroz patogenezinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Arteriyel makrofajlar ve lipoproteinler, ateroskleroz gelişimi sırasında lipit peroksidasyonuna uğramaktadır (McCord, 1989). Lipit peroksidasyon ürünlerinin düzeyinin yüksek kolesterol seviyelerine sahip deney hayvanlarında da arttığı bildirilmiştir (McCord, 1989, Miller ve Miller, 1975).

Koroner kalp hastalığı için en önemli risk faktörlerinden biri yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) düşüklüğüdür (Miller ve Miller, 1975). HDL'nin koroner kalp hastalığı gelişimine karşı koruyucu etkisi oldukça karmaşık olsada, son zamanlarda düşük

yoğunluklu lipoprotein (LDL) ve hücre membranlarını lipit peroksidleri tarafından zarar görmekten koruyabileceği ve böylece ateromatöz lezyonların gelişimini ve başlamasını önleyebileceği keşfedilmiştir. HDL'nin bu etkisi, yapısında bulunan enzimlerden kaynaklanmaktadır. HDL yapısında bulunan paraoksonaz 1 (PON1), HDL'nin lipit peroksitlerini metabolize etme ve LDL birikmelerini önleme yeteneği ile bağlantılıdır. PON1 hem fosfolipit hidroperoksitlerin hem de trombosit aktive edici faktörün parçalanmasını hızlandırabilir (Cochrane, 1991; Stocker ve Keaney, 2004).

HDL, lipit peroksidleri metabolize edebildiği için LDL ve tüm membranları oksidatif değişikliklerden koruyabilir (Cochrane, 1991). Paraoksonaz enzimleri, oksidatif hasarı önleyebilecek çok güçlü bir ateroprotektif etkiye sahiptir. Ateroskleroz, yani damar içi yağlanma, lipit hidroperoksitlerini hidrolize ederek ve LDL'yi oksidatif modifikasyondan koruyarak engeller (Carey vd., 2005). Genetik ve çevresel koşullar, PON1 aktivitesini ve PON1 enzimini kodlayan genin ekspresyon seviyesini etkiler. Diyetin içeriği, PON1 ekspresyonunu değiştirebileceğinden, PON1 enziminin aktivasyonunu etkileyen çevresel faktörlerden biri olarak kabul edilmektedir (Kumar ve Rizv, 2014; Ponce-Ruiz vd., 2020).

Radikal parçalayan antioksidan sistemler, vücut tarafından doğal metabolik yollarla üretilen serbest radikalleri ortadan kaldırır. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) artması ve antioksidan mekanizmaların yetersiz kalması, oksidatif stres olarak bilinen çeşitli patolojik olayların nedenidir (Atmaca ve Aksoy, 2009). Yüksek antioksidan kapasitesi nedeniyle meyveler oksidatif stresi azaltmak için kullanılır. Epidemiyolojik araştırmalar, yüksek miktarda meyve ve sebze içeren bir diyeti benimsemenin, kalp hastalıkları, nörodejeneratif hastalıklar, Tip II diyabet (T2D) ve kanser gibi hastalıkların gelişme riskinin azalmasıyla ilişkili olduğunu göstermektedir. Diyetin bir parçası olan meyve ve sebzelerde bulunan polifenoller gibi biyoaktifler, bahsi geçen sağlığı teşvik edici faydalarla bağlantılıdır.

Polifenoller, meyve ve sebzelerin duyusal ve besleyici özelliklerini belirleyen ikincil metabolitlerdir. Bununla birlikte, polifenoller tüketildikten sonra insan vücudu tarafından ksenobiyotik olarak işlendiğinden, meyve sebzelerde doğal olarak bulunan polifenollerin biyoyararlılığı çok düşüktür. Çoğunlukla monomerik ve dimerik yapıya sahip olan polifenollerin sadece yüzde 5-10'unun doğrudan ince bağırsakta emildiği

tahmin edilmiştir. Polifenoller kolona girdikten sonra, kolonik bakterilerin enzimatik aktivitesiyle çeşitli fizyolojik öneme sahip moleküllere dönüştürülür. Mikrobiyal katabolizma yoluyla oluşturulan bu fenolik bileşikler, gıdalardaki orijinal moleküllerden daha kolay emilebilirler ve sağlığa daha faydalıdırlar. Polifenoller ayrıca kolona ulaşır ulaşmaz prebiyotik etkileriyle bağırsak mikrobiyotasını modüle ederek hem iyi bakterilerin gelişmesini artırır hem de kötü bakterilerin gelişmesini engeller. Siyah aronya (*Aronia melanocarpa*), antosiyaninler ve fenolik bileşikler açısından diğer üzümsü meyve türleri arasında en zengin kaynaklardan biridir (Tolic vd., 2017; Denev, vd., 2018; Jurendic ve Ščetar, 2021). Antosiyaninlere ek olarak, yüksek polimerizasyona sahip zengin bir proantosiyanidin kaynağıdır. Antosiyaninler, sağlığı geliştirebilecek özelliklere sahip doğal gıda renklendiricileri kabul edilmektedirler. Bununla birlikte, yapıları, zayıf biyoyararlılıkları ve sıcaklık, ışık, oksijen ve pH değişimi gibi çevresel faktörlere karşı hassaslıkları nedeniyle gıda sektöründe tercih edilmemektedir. Bu maddelerin kapsüllenmesi, gastrointestinal sistemde bulunan biyoaktif antosiyanin seviyelerini artırarak faydalı etkilerini artırabilir. Enkapsülasyon, kapsüller içine çeşitli biyoaktif maddelerin hapsedilmesini ve belirli koşullar altında içeriğindeki maddelerin ortama salınmasını sağlayan bir teknolojidir. Aynı zamanda çevresel etkenlerden korunur (Saifullah vd., 2019). Enkapsülasyonda kullanılan kaplama malzemeleri, bazik çözeltilerde çözünebilen polisakkaritler olduğundan, asidik mide koşullarında bütünlüğünü korur, ancak ince bağırsak koşullarında tamamen çözünür. Bu faydalı sistemde antosiyaninler bozulmaya karşı korunur ve istenmeyen renk değişiklikleri önlenir.

Bu çalışmada, aronya (*Aronia melanocarpa*) ekstraktının kapsülsüz (E) ve mikroenkapsüle (K) formlarının yüksek yağlı diyet (YYD) ile beslenen Sprague-Dawley (SD) sıçanların, serum ve karaciğer dokusu lipit profili, kan ve karaciğer dokularında PON1 enzim aktivitesi, gen ekspresyonu, aortta aterosklerotik plakların histopatolojik oluşumu ve karaciğer dokusunun histopatolojisi üzerine olan etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1. Hiperlipidemi ve Ateroskleroz

Ateroskleroz, özellikle endüstrileşmiş ülkelerde en yaygın morbidite ve mortalite nedenidir. İnme ve kardiyovasküler hastalıklar aterosklerozdan kaynaklanabilir. Kalp krizlerinin en yaygın nedenleri, koroner arter hastalığı, periferik arter hastalığı, miyokardiyel enfeksiyon, inmeler, atar damar duvarlarının kalınlaşması ve sertleşmesidir (Mercanoğlu, 1999). Doğuştan gelen bağışıklık ve adaptif bağışıklık, ateroskleroz gelişiminde çok önemlidir. Sürekli ağrı, aterosklerotik lezyonu tanımlar. Bu süreçte damar endoteli, lipitler, fibroblastlar, monositler veya makrofajlar, düz kas hücreleri, hücre dışı materyaller ve sitokinler çeşitli oranlarda bulunur (Morrow, 2000). Arteroskleroz, intimal plakalar nedeniyle gelişen arteryel darlıklar ve tıkanmalar nedeniyle ortaya çıkar. Bu nedenle arterlerin antitrombotik özellikleri ve esnekliği azalır (Berliner vd, 1995). Yunanca "atero-", "yulaf lapası" ve "–sclerosis" terimleri, içi yumuşacık ve dışı sert ateromların yapısından gelir. Yumuşak lipitler ve sert kollajenler ateroskleroz plakasını oluşur. Epidemiyolojik araştırmalar, diğer bilinen risk faktörlerinin yokluğunda bile, çeşitli genetik ve çevresel faktörler nedeniyle artmış serum kolesterol düzeylerinin ateroskleroz gelişiminde yeterli olduğunu göstermektedir. Intima ve altında fokal kalınlaşmalar, aterosklerotik lezyonlara işaret edebilir. Genişleyen bölge, vasküler endotelyal hücreler, düz kas hücreleri, bağ dokusu, lipit depolama hücreleri ve kandan gelen enflamatuvar ve immün hücrelerden oluşur. Günümüzde ateroskleroz, başlangıçtan progresyona kadar kronik enflamasyonun her basamağında meydana gelir ve tüm risk faktörleri patogeneze katkıda bulunarak altta yatan enflamatuar süreci hızlandırır (Mallika vd., 2007).

Metabolik risk faktörleri ve bağışıklık mekanizmaları hastalığa yol açar ve ilerletir. Plak yırtılması ve trombüs oluşumu, hastalığın başlangıcı ve ilerlemesi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir (Falk vd, 1995; Libby, 1995).

2.2. Ateroskleroz Patolojisi

Genetik ve çevresel faktörler ateroskleroz riskini artırabilir (Musunuru ve Kathiresan, 2016). Bunlar arasında yüksek miktarda aterojenik lipoprotein bulunmuştur, bu da hiperlipitemi ateroskleroz gelişiminde çok önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Ateroskleroz, ApoB içeren LDL'nin artması ve arteriyel intimada birikmesi sonucunda ortaya çıkar (Khalil vd., 2004). LDL'ye yanıt veren hücreler arasında aterogenez, makrofajlar ve monositler yer alır. Sigara, hipertansiyon ve diyabet gibi risk faktörleri, hiperkolesterolemi ve aterogenezi hızlandırabilir (McIntyre ve Hazen, 2010). Bu işlem sırasında damar duvarı değişir. Türbülanslı kan akışı veya okside LDL (oxLDL) nedeniyle endotel hücreler zarar gördüğünde, kandan üretilen inflamatuar monositler ve diğer doğuştan gelen bağışıklık hücreleri yaralı bölgelere yerleşir ve endotel hücrelerine yapışır.

Vasküler düz kas hücreleri, köpük hücreleri tarafından lipitleri fagosite eder (Davidson ve Rotondo, 2003). Morfolojik olarak, bir aterosklerotik plak, hücre içi lipit birikiminin bir yağlı çizgisinin yanı sıra bol köpük hücreleriyle dolu hücre dışı bir lipit çekirdeğinin bir sonucu olarak aterom oluşumuna kadar sürekli aşamalar geçirir. Lipit ilavesi bu aşamaları tamamlar (Subbotin., 2016). Daha sonra bir fibroaterom, fibrotik bir başlık, artmış vasküler düz kas hücreleri ve kolajen ile bir veya daha fazla lipit çekirdeği içerebilir. Hematom ve kanama, karmaşık lezyonların bozulmasından kaynaklanan tromboz gelişiminin son aşamasıdır (Usman vd, 2015).

Aterosklerotik plaklar, yapılarına göre iki kategoriye ayrılabilir: Yırtılma ve komplikasyonlara daha duyarlı hassas plaklar veya trombotik komplikasyonlara daha az duyarlı stabil plaklar (Finn vd., 2010).

2.2.1. Aterosklerozda Lipoprotein Metabolizması

Plazma lipoproteinlerinin beş ana kategorisi vardır. Yüksek yoğunluklu lipoproteinler (HDL), orta yoğunluklu lipoproteinler (IDL), çok düşük yoğunluklu

lipoproteinler (VLDL), düşük yoğunluklu lipoproteinler (LDL) ve şilomikronlar. Apolipoproteinler bu lipoprotein parçacıklarını oluşturur. Apolipoproteinler, lipit taşınmasında hücre yüzeyi reseptörleri için ligandlar olarak ve enzimler için kofaktörler olarak hizmet eder. ApoB ile intimada tutulan lipoproteinler, ateroskleroz patogenezi sırasında damar duvarlarına yapışır ve hücre dışı matris (ECM) proteoglikanlara bağlanır. ApoE, bazı HDL partiküllerinde bulunurken ApoAI, HDL'nin ana protein bileşenidir. ApoE, LDL reseptörlerine (LDLR) yüksek afiniteye sahip olduğundan, apoE eksikliği, VLDL ve şilomikron kalıntılarının bozulmuş klirensinin neden olduğu hiperlipoproteinemi ile sonuçlanır (Feig vd., 2014).

Başlıca dört lipit türü LDL kolesterol, HDL kolesterol, lipoprotein(a) (Lp(a)) ve trigliseridlerdir. Lipoproteinler ve apolipoproteinler, metabolik işlevleri nedeniyle ateroskleroz patogenezine katkıda bulunur (Aluganti Narasimhulu vd., 2016).

2.2.2. LDL Kolesterol

LDL kolesterol, kötü kolesterol olarak adlandırılır çünkü partikülleri arter duvarına girebilir ve köpük hücrelerinin oluşumunu ve aterojenezi başlatır (Segrest vd., 2001). LDL tarafından uyarılan enflamatuar hücreler daha fazla LDL ile bağlantılıdır.

LDL'yi işgal ettikten sonra, endotelyum oksitlenir veya kümeleşir. Endotelde hem serbest radikaller hem de nekrotik hücre döküntüleri bu reaksiyonları destekler. Doğal LDL türleri, oksitlenmiş LDL türleri ile karşılaştırıldığında, intima bölgesinde daha yaygın olarak tutulur. Köpük hücreleri, tanınır, yutulur ve makrofajlar tarafından biriktirilir (Libby vd., 2002). Ayrıca, LDL absorbsiyonundan sonra makrofajlar lipoprotein lipazı üretir. Bu, LDL tutulmasının artmasına neden olur (Hasham ve Pillarisetti, 2006).

Oksitlenmiş LDL, vasküler düz kas hücrelerinin daha fazla proteoglikan üretmesine neden olur ve bu da arter duvarında daha fazla LDL tutulmasına yardımcı olur. LDL tutulması, LDL'yi oksidatif olarak değiştirerek kısır döngüye neden olur. Oksitlenmiş LDL çeşitli hücre türlerini aktive ederek ateroskleroz gelişimini teşvik eder. Bu madde, çöpçü alıcılar tarafından oksitlenmiş LDL köpük hücreleri üretmek ve makrofajların proinflamatuar özelliklerini başlatmak için kullanılabilir. Plak yırtılması ve makrofajların apoptozu, oksitlenmiş LDL tarafından da etkilenir (Hundal vd., 2001).

Yüksek plazma LDL kolesterol seviyeleri, klinik olarak ateroskleroz insidansı ve şiddeti ile ilişkilidir (Plakkal Ayyappan vd., 2016). Akut koroner sendromlu hastalarda yüksek oksitlenmiş LDL seviyeleri vardır, ancak bir statin ilacı ile tedavi, seviyelerini önemli ölçüde düşürür (Ramadan vd., 2009).

OxLDL seviyeleri ile aterosklerotik koroner vasküler hastalık (KVH) sonuçları arasındaki ilişkiye dayalı olarak ateroskleroz ve diğer KVH gelişimini tahmin etmek için sıklıkla kullanılır. Bununla birlikte, oksitlenmiş LDL oldukça heterojendir, bu da oksitlenmiş LDL'nin aterosklerozun gelişmesine katkıda bulunan daha karmaşık bir rol oynadığını göstermektedir (Levitan vd., 2010).

2.2.3. HDL Kolesterol

Ters kolesterol taşınması, HDL'yi arter duvarındaki köpük hücrelerinden periferik dokulara taşır. Bu nedenle HDL aterosklerozu korur ve KVH riski ile güçlü bir negatif korelasyona sahiptir. HDL'yi taşıyan kolesterolün plazma seviyesi (HDL-C), işlevsel HDL mevcudiyetini gösterir (Ansell vd., 2005; Rosenson vd., 2016).

HDL ve lipitlerden fakir apoAI, enzimatik ve enzimatik olmayan bileşenlerinin antioksidan özellikleri nedeniyle aterosklerozun gerilemesini destekler. Antioksidan özellikleri ayrıca hücrelerden normal ve toksik lipit türlerini uzaklaştırma yeteneğine sahiptir (Feig vd., 2014). HDL, LDL'nin oksidatif değişimini ve oxLDL'nin biyolojik aktivitesini durdurur. Başka bir enzim olan miyeloperoksidaz (MPO), HDL'nin antiaterojen özelliklerini destekler. Periferik kandaki bu antioksidan ve antiinflamatuar bileşenlerin sağladığı HDL, periferik kandaki HDL'den daha önemlidir (Calabresi vd., 2015). Arter endotelini korumak için HDL, sinyali azaltarak nitrik oksit sentazlarını aktive eder. Bu, plazma membranında kolesterol içeriğini modüle ederek gerçekleşir (De Nardo vd., 2014).

2.2.4. Lipoprotein(a)

Apoprotein A (Lpa) plazma konsantrasyonlarının yanı sıra farklı Apo (a) izoformlarının değişken antifibrinolitik kapasiteleri hem aterojenez hem de trombojenezde meydana gelen patolojik süreçleri etkiler. Böylece, plazma Lp(a) seviyesinin artması, aterotrombotik bir olay için ek bir risk faktörü olarak kabul edilmiştir

(Kronenberg ve Utermann, 1996) ve Lp(a), aterosklerozun hem erken hem de ileri evrelerinin patogenezini destekler. Arter duvarlarına sızan inflamatuar hücreleri çektiği için Lp(a) Vascular Smooth Muscle Cells (VSMC) olarak adlandırılmaktadır. VSMC, "damar düz kas hücreleri"dir. "Lp(a), arteriyel duvarın subendotelyal boşluğunda bulunduğundan, endotel hücrelerini uyarabilir ve bu süreç, vasküler düz kas hücrelerinin (VSMC) gelişimini teşvik edebilir (Bergmark vd., 2008). Bu, dolaşımdaki monositlerin arteriyel endotelyuma yapışmasını destekleyen hücreler arası yapışma molekülü 1'in ekspresyonunu artırabilir (Takami vd., 1998).

Lp(a), ateroskleroz gelişiminde monositler için güçlü bir kemo-çekici olabilir. Bu, doza bağlıdır. Bu işlemler, yüksek LDL kolesterol düzeyleri olan kişilerde erken ateroskleroz riskini tahmin etmek için Lp (a) plazma seviyelerini kullanır (Kronenberg ve Utermann., 1996).

2.2.5. Trigliserit

Ateroskleroz, kan dolaşımındaki yüksek trigliserit seviyeleriyle ilişkilidir. Yüksek kolesterol taşıyan ve köpük hücrelerinin oluşumunu teşvik eden trigliserit açısından zengin lipoproteinler vardır. Bu nedenle, trigliserit açısından zengin lipoproteinler, aterosklerotik plakların oluşumunu doğrudan etkileyebilir (Krauss, 1998). Hücreler çoğu trigliseriti parçalayamadığı için kolesterol üretemezler. Bununla birlikte, trigliseritden zengin lipoproteinler, ateroskleroz ve kardiyovasküler hastalık (KVH) ile daha sık ilişkilidir. Trigliserit açısından zengin lipoproteinler hem kolesterol dağıtımını hem de lipit toksisitesini başlatarak aterosklerozu teşvik edebilir (Goldberg vd, 2012). Yinede, trigliserit açısından zengin kalıntı lipoproteinler, Lp (a) içeren ve aterojenik apoB içeren lipoproteinlere benzer şekilde aterotrombozu teşvik ederler (Kimak ve Solski, 2002). Lipitleri, arter duvarlarında hücre ölümünü ve lokal inflamatuar hasarı başlatabilir. Bu, kalıntıların yüzeyindeki lipoprotein-lipaz aktivitesinin aktif olduğu yerlerde olabilir (Liu ve Czaja, 2013).

Karaciğer kalıntı alımını ve LPL'yi engelleyen apoCIII, trigliserit açısından zengin lipoproteinlerde bulunur. Bu, hipertrigliseridemi ile sonuçlanabilir (Larsson vd., 2013). Ayrıca, fibrinojen ve inflamatuar mediatörler gibi trombotik faktörlerin plazma seviyeleri, yüksek trigliserit seviyelerinde artabilir (McLaughlin vd., 2005).

2.3. Ateroskleroz ve Oksidatif Stres

Dünyadaki ölüm nedenleri arasında birinci sırada yer alan koroner kalp hastalığı, tüm ölümlerin yaklaşık %48'inden sorumlu tutulmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü, 2008 yılında 17,3 milyon insanın kalp krizi nedeniyle öldüğünü ve 2030 yılına kadar 23,6 milyon insanın kalp krizi nedeniyle ölebileceğini tahmin etmektedir (Halit, 2012). Mitokondrilerdeki oksidatif stresin, doku hasarı ve endotel fonksiyonunu bozduğu bilinmektedir (Vallance vd., 2003). Ateroskleroz, oksitatif stres nedeniyle endotel disfonksiyonu nedeniyle oluşan serbest radikaller nedeniyle koroner kalp hastalığının en yaygın nedenidir (Halit, 2012).

Doymamış lipitlerin peroksidasyonu sırasında oluşan ilk kalıcı ürün, hidroperoksitlerdir (Gauthier vd., 1995). Lipit hidroperoksitlerin parçalanması, malondialdehit, etan ve pentan gibi hidrokarbon gazları gibi sekonder peroksidasyon ürünlerinin karmaşık bir karışımını oluşturur (Libby vd., 2002). Malondialdehitin (MDA), hücre membranlarının geçirgenliğini artırdığı, hücre içi iyon dengesini bozduğu, enzim aktivitelerini değiştirdiği ve DNA yapısında kırılmalara ve baz değişikliklerine (SNP) neden olduğu bildirilmektedir (Cominacini, 2001). Ek olarak, MDA düzeyi arttıkça serbest radikal üretimi arttırır ve antioksidan aktivite azalır. Bu serbest radikaller ve antioksidanlar arasındaki dengeyi bozarak ateroskleroz ve endotel disfonksiyonuna neden olabilir (Halit, 2012). Ateroskleroz patogenezi hakkında çok sayıda teori vardır. Oksidatif stres hipotezi en yaygın olanlarıdır (Binder vd., 2002; Steinberg, 2002).

Birçok araştırma grubu, ateroskleroz ve oksidatif stres arasındaki ilişkiyi insanlarda (Carr vd., 2000; Steinberg, 2002) ve deney hayvanlarında araştırmıştır (Stiko-Rahm vd., 1992; Boulanger vd., 1992).

Kolesterol verilen deney hayvanlarında prooksidan ve antioksidan dengenin etkilendiği ve aterom plaklarının derecesi ile bu değişiklikler arasında bir ilişki olduğu bulunmuştur. MDA belirtileri olarak kullanılan bir çalışmada, tavşan aortunda yüksek MDA düzeylerinin ateroskleroz gelişiminde önemli bir rol oynadığını ve MDA konsantrasyonu ile ateromatöz plaklar arasında pozitif bir ilişki olduğu bulunmuştur (Kockx, 1998).

Bununla birlikte, insanlarla yapılan araştırmalarda kan örnekleri yaygın olarak kullanılmıştır ve araştırmalar lipit peroksidasyonu göstergelerine odaklanmıştır.

Serumdaki MDA, dien konjugatları veya lipit hidroperoksitlerin aterosklerotik kalp hastalıklarında arttığı birçok çalışmada gösterilmiştir (Carr vd., 2000; Doi vd., 2000).

2.4. Ateroskleroz ve Malondialdehid

Serbest oksijen radikalleri, ortaklanmamış bir elektron taşıyan kimyasal olarak reaktif moleküllerdir ve vücudun normal koşullarında ya da çeşitli dış etkenlerle oluşur. Oksijen radikallerinin yarı ömrü çok kısadır. Normal durumlarda, intrasellüler ve ekstrasellüler savunma mekanizmaları onları kontrol altında tutar (Halliwell ve Gutteridge, 2015).

Lipitlerin peroksidasyonu veya protein, karbonhidrat ve nükleik asitlerin oksidasyonu, serbest oksijen radikallerinin artmasına neden olur. Lipit peroksidasyonun en önemli göstergesi, membrandaki poliansatüre yağ asitlerinin oksidasyonu nedeniyle oluşan MDA'dır. Lipit peroksidasyonu yalnızca MDA'yı oluşturur ve konsantrasyonu, lipit oksidasyonunun nasıl değiştiğini gösterir (Esterbauer vd., 1991). Malondialdehid oluşumuna ilişkin birçok teori vardır. Bunlardan biri MDA oluşumudur, yani okside lipitlerin parçalanmasıdır. Prostaglandin benzeri endoperoksitler, iki ya da daha fazla çifte bağ içeren çoklu doymamış yağ asitlerinden oluşur. Başka bir mekanizmanın temeli, birbirini takip eden hidroperoksit üretimi ve çoklu doymamış yağ asitlerinin β-yarılmasıdır.

Çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu, *in vivo* MDA'nın ana kaynağıdır. Prostaglandine bağlı serbest radikallerin ve iyonize radyasyona bağlı serbest radikallerin oluşumu diğer kaynaklardır (Ayala vd., 2014; Halliwell ve Gutteridge, 2015).

2.5. Serbest Radikaller ve Polifenoller

Aerobik yaşam, nitrojen türleri ve reaktif oksijen (ROS) gibi serbest radikallerin sürekli üretimini içerir. Bu, sinyal iletim yolları da dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik süreçlerin bir sonucudur. ROS hem yararlı hem de zararlı olabilir (Valko vd., 2007). Düşük veya orta konsantrasyonlarda ROS'un yararları, hücresel sinyalleşmeyi, mitojenik tepkileri ve bulaşıcı ajanlara karşı savunmayı içerir (Liochev, 2013; Schieber ve Chandel, 2014; Zhang vd., 2016).

Serbest radikallerin biyolojik hasara neden olan zararlı etkileri, prooksidanların fazlalığı, ROS üretiminin artması veya antioksidan savunmadaki azalma yoluyla ortaya çıkabilir (Valko vd., 2007; Di Domenico vd., 2015b). Hücrelerde ROS ve diğer radikaller düşük konsantrasyonlarda çalışırlar. Hücreler kendi oksidan ve antioksidan seviyelerini belirler. Hücrelerin "kararlı durum" konsantrasyonları, ROS üretim oranları ile uzaklaştırma oranları arasındaki dengeyi sağlar (Simons ve Clevers, 2011; Di Domenico vd., 2015a).

Hücresel savunma sistemi, ROS üretimi ve uzaklaştırılması arasında bir dengesizlik olduğunda zararlı maddeler üretebilir (Wang vd., 2013ab; Schieber ve Chandel, 2014; Zhang vd., 2016). Serbest radikallerin faydaları ve zararları arasındaki bu ince dengeyi sağlayan metabolik reaksiyonlar, *in vivo* redoks düzenlemesini kontrol ederek ve oksijen kullanan ve canlı organizmaları koruyarak "redoks homeostazını" sürdürür.

ROS, lipitler, proteinler ve DNA ile ilişkili olduğu için, insan hastalıklarında serbest radikal reaksiyonların gıda bozulmalarında biyoloji ve toksikolojinin odak noktasıdır (Krumova ve Cosa, 2016). İnsan epidemiyolojik araştırmaları, polifenolik antioksidanların koruyucu tıpta yüzyıllardır kullanıldığını göstermektedir. Hastalık gelişimi ile antioksidan seviyeleri arasında bir ilişki olmadığını göstermektedir (Choi vd., 2012; Ebrahimi ve Schluesener, 2012). Bitkilerin ikincil metabolitlerinden biri polifenollerdir. Bitkiler arasında yaygındır ve çeşitli hastalıkları önleyebilirler. Antioksidanlar içeren gıdaların, bitkilerin veya ilaç takviyelerinin doğrudan alınması mümkündür (Kelsey vd., 2010).

Polifenoller ve vitaminler (C ve E vitaminleri gibi) gibi eksojen antioksidanların tüketimi, sağlığımızı ROS' a karşı korur. Polifenoller içeren gıdaların düzenli tüketimi, antikanser etkileri ve sağlık faydaları ile bağlantılıdır (Basu vd., 1999).

Polifenollerin radikal olmayan ve daha az reaktif radikal içerdikleri için reaktif radikaller antioksidan olarak kabul edilir. Polifenollerin fizikokimyasal özellikleri, biyoyararlanımı ve ROS'a karşı kimyasal reaktiviteleri önemli ölçüde etkilediği için seçim çok dikkatli olmalıdır (Chavarria vd., 2015).

Farklı bileşenler, polifenollerin biyoyararlanımını büyük ölçüde etkiler (Manach vd., 2005; Rein vd., 2012). Genel olarak, kimyasal yapılarında değişiklikler,

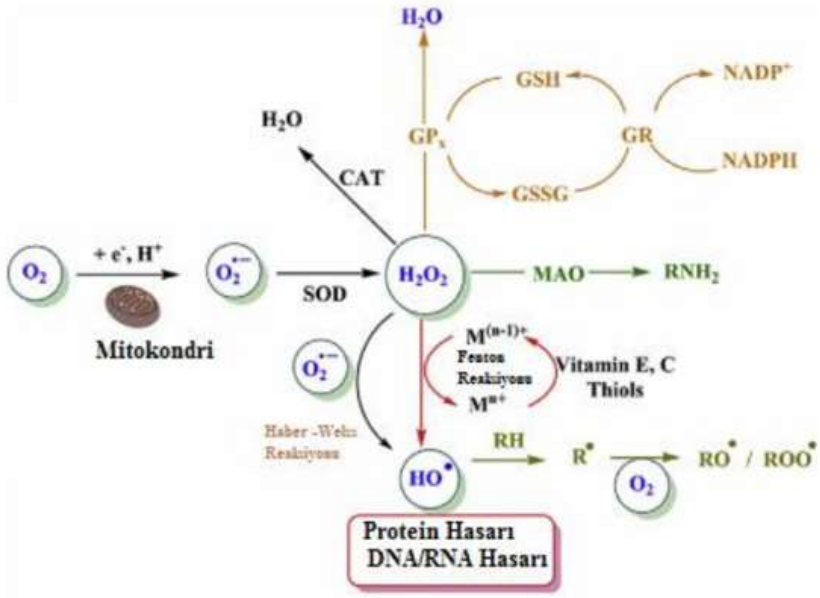
membranlarını, absorpsiyonlarını, biyoyararlanımlarını ve kan-beyin bariyerini aşma kapasitelerini geliştirebilir. Aynı zamanda, değişen farmakokinetik yan etkilerden kaçınmak için kullanılan önemli terapötik dozları önemli ölçüde etkiler (Schaffer ve Halliwel, 2012; Garrido vd., 2012).

Kimyasal yapı, polifenolün ROS'a karşı reaktivitesini büyük ölçüde etkiler. Bu değişiklikler, özellikle -OH gruplarının sayısı ve konumu ile aromatik halkadaki diğer sübstitüentlerin türüne bağlıdır (Ross vd., 2003; Vladimir vd., 2012).

2.5.1. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

Rani ve Yadav (2014)'e göre, serbest radikaller, en dış yörüngelerinde tek bir eşleşmemiş elektrona sahip reaktif bir kimyasal türüdür. Bu oldukça aktif elektronik yapı nedeniyle, serbest radikaller kimyasal olarak kararsız ve çok hassastır. Nükleik asitler, karbonhidratlar ve lipitler gibi maddelerin gıdalarda veya biyolojik dokularda üretildiklerinde kolayca reaksiyona girerler ve çoğu zaman insanlar için zararlı olan farklı radikal olmayan ve radikal türler üretirler (Halliwell, 2007; Nimse ve Pal, 2015; Ozcan ve Ogun, 2015).

Hücrelerin yaşaması ve çalışması için gerekli olan moleküler oksijen ve kararlı bir serbest radikal de içerir. Moleküler oksijenin metabolizasyonu, oksijen merkezli radikallerin oluşmasına neden olur. Bu radikaller arasında hidrojen peroksit (H_2O_2), singlet oksijen ($1O_2$), alkoksil radikaller (RO), peroksil radikaller (ROO) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) bulunabilir. Bu radikaller hem canlı sistemlerde hem de lipit bazlı gıda sistemlerinde bulunabilir (Şekil 2.1). Bu tür radikaller arasında nitrojen merkezli radikaller (örneğin NOx-Operoksinitritler) ve karbon merkezli radikaller (örneğin lipitler R) bulunur.



Şekil 2.1. ROS oluşumu ve kaybına ilişkin reaksiyonların gösterimi, GPx; Glutatyon peroksidaz, GR: Glutatyon redüktaz, GSH: İndirgenmiş glutatyon, GSSG: Glutatyon disülfid veya oksitlenmiş glutatyon, SOD: Süperoksit dismutaz, CAT: Katalaz, MAO: Monoamin oksidaz, RH: Lipit (Halliwell ve Gutteridge, 2015)

Mitokondriyal solunum zinciri, hücrelerde ROS üretiminin yaklaşık %80-90'ını oluşturmaktadır (Gella ve Bolea, 2011; Rosini vd., 2014; Bhattacharya, 2015). Yine de ROS, iyonlaştırıcı, ultraviyole radyasyonu, ilaç ve ksenobiyotiklerin metabolizması, metal iyonları (gıdalarda veya hücrelerde), oksidatif enzimler ve ksantin oksidaz gibi oksidatif enzimler tarafından oluşturulabilir (Krumova ve Cosa, 2004; Cosa, 2016). Alzheimer hastalığı ile ilişkili beta-amiloyid proteini, hücresel ROS oluşturma yeteneğine sahiptir (Smith vd., 2007; Murphy ve LeVine, 2010).

ROS'un oluşumu, Fe ve Cu gibi metal iyonları tarafından da etkilenir. Sonuç olarak, hücrelerdeki serbest metal seviyelerini (özellikle demir) artıran herhangi bir yapı veya regüle edilmemiş redoks aktif metaller, oksijenle uygun olmayan şekilde reaksiyona girerek ROS'u aşırı üretebilir.

ROS, lipit ve DNA oksidasyonları gibi zararlı radikal reaksiyonlara neden olabilir ve biyolojik işlevlerin bozulmasına neden olabilir (Rosini vd., 2014; Bhattacharya, 2015). Nükleer ve mitokondriyal DNA'da oksidasyon reaksiyonları, kolestenon, peroksitler, alkoller, aldehitler, ketonlar, serbest karboniller ve diğer tehlikeli maddeler üretebilir. Yaşa bağlı nörodejenerasyon, oksidatif stres ve bilişsel gerileme süreçleri dejeneratif

hastalığın gelişmesine katkıda bulunabilir. Oksidatif stresin bir başka göstergesi de aşırı ROS üretimidir (Silva vd., 2014; Cuccaro vd., 2017).

2.5.1.1. Reaktif Oksijen Türlerinin Fiziko-Kimyasal Özellikleri

Radikal doğası nedeniyle oksijen canlı organizmalar için son derece tehlikelidir, ancak oksijen temel bir bileşendir. Oksidasyon işlemlerini başlatmak için katalizörler, bir elektronu oksitlenebilir bir substrattan (örneğin, doymamış bir lipit) veya oksijenden alabilir. Oksidasyon, biyolojik sistemlerde, gıdalarda ve hatta laboratuvar deneylerinde birçok başlatıcı ve katalizörden kaynaklanabilir. İki en yaygın başlatıcı veya katalizör vardır: ışık (örneğin, uyarma enerjisi daha sonra tekli oksijen üretmek için oksijene aktarılan bir duyarlılaştırıcının uyarılması yoluyla), reaktif metaller (örneğin, oksijenle aktifleştirilmiş kompleks oluşumu) ve endojen enzimler yoluyla (Ozcan ve Ogun, 2015; Krumova ve Cosa, 2016).

Oksijen peroksit (ROO), peroksil (ROO), alkoksil (RO), hidroperoksitler (ROOH) ve semikinon (SQ-) gibi radikal olmayan türler ve oksijen radikalleri, başlangıç mekanizması ne olursa olsun oksidasyona neden olabilir (Choe ve Min, 2009; Augusto ve Miyamoto, 2011). Mitokondriyal elektron taşıma, aerobik solunum, oksidoredüktaz enzimleri, metal katalizli oksidasyon, lipit oksidasyonu, ışınlama, enflamasyon, sigara, hava kirleticileri ve glikoksidasyon gibi birçok farklı mekanizmanın bir sonucu olarak ROS molekülleri oluşturulabilir (Lee vd., 2004; Winterbourn, 2008).

ROS'un biyolojik etkisini anlamak için, farklı deneysel koşullar altında üretilen türleri ve reaktivitelerini bilinmesi gereklidir. Moleküler oksijen, 0.16 V redoks potansiyeli nedeniyle zayıf bir oksidandır (Wood, 1988). Bir dizi oksijen merkezli radikal ve oksijen merkezli radikal olmayan yapı, elektronların ardışık eklenmesi sonucunda oluşur (Augusto ve Miyamoto, 2011; Krumova ve Cosa, 2016). Daha güçlü oksitleyiciler veya daha reaktif oksijen türleri seçenekleri vardır. ROS radikalleri, lipit peroksidasyonları gibi tek elektronlu zincir reaksiyonları tercih eder ve fenolik antioksidanlar bu reaksiyonları önleyebilir (Winterbourn, 2008).

2.5.1.2. ROS Toksisitesi

Çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA'lar), hücreleri çevreleyen zarlarda ve mitokondriler ve çekirdek gibi diğer hücresel yapılarda bulunur. Moleküler ROS toksisite

hedeflerinde, ROS, PUFA ile etkileşim kurarak lipit karbon merkezli radikaller (R) oluşturur. Fizyolojik koşullar altında moleküler oksijeni kolayca hapsederek lipit peroksil radikaller (ROO), lipit zincirinin oto-oksidasyonunda etkili zincir taşıyıcılarıdır. Trans konfigürasyon, genellikle cis çift bağlarının peroksidasyonu ve yok olmasıdır. Bu, membran akışkanlığının azalmasına ve hidroperoksitlerin ROOH, alkoller ve elektrofilik doymamış aldehitlerin oluşumuna neden olabilir. Bu ikincil ürünler sitotoksiktir ve ateroskleroz, nörodejeneratif hastalıklar ve hücre apoptozu gibi patolojik etkilere neden olur.

ROS, mitokondriyal DNA'yı hedef alır. Herhangi bir amino asit kalıntısının ROS tarafından oksidasyona uğraması mümkündür. Bu, özellikle sistein, metiyonin ve triptofan kalıntılarının yan zincirlerini oksidasyona uğratabilir (Stadtman, 2000; Zhang vd., 2013). ROS, kanser, ateroskleroz, iltihaplanma, multipl skleroz, romatoid artrit ve Alzheimer hastalığı ve diğer nörodejeneratif hastalıklara neden olabilir. Bununla birlikte, ROS, bu hastalıkların ana nedeni olmadan sıklığını artırabilir (Uttara vd., 2009).

2.6. Antioksidanların İnsanlar İçin Önemi

1950'lerin sonlarına gelindiğinde, oksidasyon reaksiyonlarının yaşlanmayı ve çeşitli hastalıkları ilerlettiğini kanıtlanmıştır. Antioksidan moleküllerin yaşlanmayı yavaşlatabileceği ve hastalığın ilerlemesini durdurabileceği söylenmiştir (Gutteridge ve Halliwell, 2010). Antioksidanların ROS'a karşı etki mekanizmaları açısından birincil ve ikincil antioksidanlar iki kategoriye ayrılabilir. Antioksidanlar esas olarak oksidasyon zincir reaksiyonları oluşturarak ve daha kararlı radikaller oluşturarak çalışırlar. İkincil antioksidanlar, metallerin şelasyonu, birincil antioksidanların rejenerasyonu, hidroperoksitlerin parçalanması ve oksijenin uzaklaştırılması yoluyla oksidasyon hızını yavaşlatırlar. Antioksidanlar, serbest radikalleri temizleyerek ve oksidatif stresi azaltarak okside olabilen maddelerin oksidasyonunu geciktirebilir, inhibe edebilir veya önleyebilir. ROS'un neden olduğu zarara karşı insan vücudu, fiziksel savunmalar, antioksidan savunmalar, önleyici mekanizmalar ve onarım mekanizmaları dahil olmak üzere bir dizi savunma mekanizması geliştirmiştir. Oksidatif stres, lipitler, DNA, proteinler ve enzimler gibi çeşitli biyomakromoleküllerin oksidasyonuna neden olan aşırı miktarda reaktif oksijen ve/veya nitrojen türünün (ROS/RNS) endojen antioksidan kapasitesini aştığı bir durumdur.

Şiddetli oksidatif stres, mutasyonlar, doku tahribatı, miokondriyal ve zar bozulmaları ve hücre hasarına neden olur. Bu nedenle, endojen antioksidan savunmalar ROS'u tamamen temizleyemediğinde, DNA, lipitler, proteinler ve diğer moleküllerde devam eden oksidatif hasar meydana gelir. Bu oksidatif hasar ayrıca hastalıkların patogeneziyle ilişkilidir (Aruoma, 1994).

Bunların neden olduğu oksidatif stres, kanser, yaşlanma, koroner kalp hastalığı ve diğer kronik dejeneratif hastalıkların gelişmesine neden olur (Jack vd., 2016). Öte yandan, antioksidanların oksidasyonu önlemedeki etkinliği, belirli koşullar tarafından büyük ölçüde belirlenir. Antioksidanların performansı, reaksiyon alanındaki konsantrasyon, ortamın asitliği, oksitlenebilir substratın türü, sistemin fiziksel durumu, prooksidanların ve sinerjistlerin varlığı gibi birçok faktöre bağlıdır.

Oksidatif strese karşı koruma sağlayan maddeler antioksidanlardır. Prior vd. (2001)'e göre, eski Mısır'da fenolik bileşikler açısından zengin bitki özlerinin canlıları korumak için kullanıldığı bilinmektedir. 1940'larda serbest radikal otoksidasyon reaksiyonlarının anlaşılması ve çeşitli zincir kırıcı antioksidanların tanımlanması, antioksidanların etkileri üzerine yapılan araştırmaları hızlandırmıştır (Halliwell ve Gutteridge, 2015). 1950'lerin sonlarına doğru, oksidasyon reaksiyonlarının yaşlanmaya ve hastalıkların ilerlemesine katkıda bulunduğu kanıtlanmıştır (Gutteridge ve Halliwell, 2010).

Antioksidanlar, serbest radikallerin etkisini azaltma mekanizmalarına göre birincil veya ikincil olarak sınıflandırılır. Birincil antioksidanlar, hidrojen üreterek veya daha kararlı radikaller oluşturarak oksidasyonun zincir reaksiyonlarını bozarlar. İkincil antioksidanlar, birincil antioksidanların rejenerasyonu, hidroperoksitlerin parçalanması, oksijenin uzaklaştırılması ve metallerin şelasyonu yoluyla oksidasyon hızını yavaşlatırlar (Powers ve Jackson, 2008). Fiziksel engeller, antioksidan savunma mekanizmaları ve hasar onarım sistemleri, insan vücudunu ROS'dan korur. Oksidatif stres, vücutta aşırı miktarda ROS ve/veya reaktif nitrojen türlerinin (RNS) oluşması nedeniyle endojen antioksidan sistemin işlev görmemesi ve DNA, lipitler ve proteinler gibi biyomoleküllerin oksidasyona uğramasıdır (Sies, 2017). Doku yıkımı, mutasyonlar, hücre tahribatı, mitokondriyal ve hücre zarı hasarı gibi tehlikeli sonuçlar bu işlemden kaynaklanabilir (Halliwell ve Gutteridge, 2015).

Antioksidanlar, koroner kalp hastalığı, kanser, yaşlanma ve diğer dejeneratif hastalıkların gelişimini geciktirir.

Yeni araştırmalar, diyetle alınan antioksidanların bu hastalıklara karşı koruyucu etkileri olduğunu göstermektedir. Antioksidanlar arasında selenyum, C vitamini, E vitamini ve polifenollerin, hücresel seviyede oksidatif stresi azaltarak hastalıkların ilerlemesini yavaşlatabileceği gösterilmiştir (Pham-Huy vd., 2008; Lobo vd., 2010; El Assar vd., 2013). Kardiyovasküler hastalıklar ve kanser gibi ciddi sağlık sorunlarının önlenmesinde antioksidanlar, serbest radikalleri temizleyerek hücre zarlarını, proteinleri ve DNA'yı koruduğu bildirilmiştir. Ek olarak, hücresel sağlığı koruyabileceği ve yaşlanmayı yavaşlatabileceği düşünülmektedir (El Assar vd., 2013; Kaur ve Kapoor, 2016). Antioksidan alımı, bu süreçlerin yönetiminde potansiyel olarak destekleyici olabilir (Bouayed ve Bohn, 2010).

Antioksidanların oksidasyona karşı koruma sağlaması, ortamın asitliği, antioksidan konsantrasyonu, oksitlenebilir substratın türü, sistemin fiziksel durumu ve prooksidanların ve sinerjistlerin varlığı gibi çeşitli faktörlere bağlıdır (Rice-Evans ve Burdon, 1994). Sonuç olarak, antioksidanların etkileri uygulama koşullarına bağlı olarak değişebilir, ancak ideal koşullar sağlandığında oksidatif stresin zararlı etkilerini azaltabilir.

2.6.1. Polifenollerin Antioksidan Özelliklerinin Moleküler Temeli

Fenolik bileşikler, bir veya daha fazla hidroksil grubu ve bir veya daha fazla aromatik halkaya sahiptir. Fenolik asitler gibi basit moleküllerden tanenler gibi yüksek derecede polimerize maddelere kadar 8.000'den fazla fenolik yapıya sahip bitkilerin ikincil metabolitleri vardır (Rice-Evans ve Miller, 1996; Klejdus ve Kuban, 2000). Bu bitkiler arasında yaygındır. Kimyasal yapıları genellikle fenoliklere ayrılır. Bu hem fenol alt birimlerinin hem de aromatik halkalardaki yan grupların ve pozisyonlarının çokluğu nedeniyle ortaya çıkar.

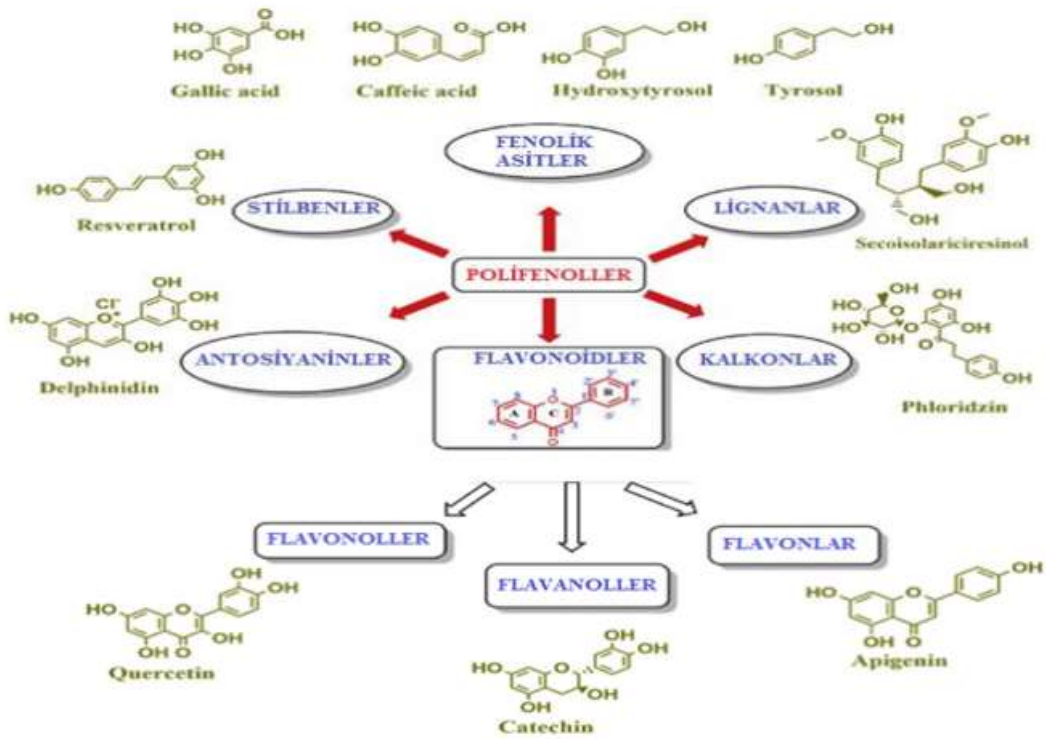
Genellikle patojenler, parazitler ve yırtıcılar bitki fenoliklerini saldırmaktan korur ve renklerini değiştirir. Sonuç olarak, her bitki organında bulunurlar ve bu nedenle insan diyeti için hayati önem taşırlar. Çeşitli bitkisel gıdalar (meyveler, sebzeler, tahıllar, zeytin, baklagiller, çikolata ve diğerleri) ve içecekler (çay, kahve, bira, şarap vb.)

"fenolikler" olarak bilinir. Bir ölçüde organoleptik özellikleri etkilenir (Dai ve Mumper, 2010).

Kimyasal yapısı, bir antioksidanın serbest radikallere ve diğer ROS'lara karşı ne kadar reaktif olduğunu belirler. Bu kimyasal yapı antioksidan aktivitesini de etkiler. Fenolik asitler, doğrudan bir aromatik halkaya veya bir alkil yapısına bağlanabilir. Bu temel iskeletteki ikame maddelerin yerleri ve özellikleri, antioksidan özelliklerin çeşitliliğini etkiler. En yaygın ve güçlü antioksidanlar kafeik, ferulik, sinapik asitler ve p-kumarik asitlerdir. Gallik asitler ve vanillik asitler benzer türevlerdir (D'Archivio vd., 2001). Daha karmaşık polifenoller, fenolik halkaların ester, eter veya asetal bağlarla bağlanması yoluyla oluşturulur (Novak vd., 2008). Bitki fenolikleri, tanenler, fenolik asitler, flavonoidler ve daha az yaygın olan lignanlar ve stilbenler dahil olmak üzere birçok farklı türü içerir. En yaygın polifenol sınıfı olan flavonoidler, binlerce tanımlanmış kimyasal yapıya sahiptir.

Flavonoidler, izoflavonlar, flavanoller (kateşinler), proantosiyanidinler, antosiyaninler, izoflavonlar ve merkezi C halkasının oksidasyon derecesine göre birkaç alt sınıfa ayrılabilir (Dai vd., 2010; Şekil 2.2). Her bir alt grubun modeli, hidroksilasyon, metoksilasyon, prenilasyon veya glikosilasyon seviyelerine göre şekillenir.

Polifenollerin güçlü antioksidan özellikleri, diyetteki bollukları ve çeşitli oksidatif stresle ilişkili hastalıkları önlemedeki güvenilir etkileri nedeniyle, araştırmacılar ve gıda üreticileri onları daha fazla araştırmaya ilgi göstermesine neden olmaktadır (Manach vd., 2004). Bu ikinci bitki metabolitlerinin kalp, nörodejeneratif hastalıklar ve kanser üzerindeki koruyucu etkilerini araştırmak için hem *in vitro* hem de *in vivo* prosedürler kullanılmaktadır. Ek olarak, beslenme stratejileri geliştirilmektedir. Polifenollerin ayrıca çeşitli hücre reseptörlerini ve enzimleri kontrol ettiğini de keşfetmiştirler. Antioksidan özellikleri nedeniyle polifenoller hastalıkları önleme ve tedavi etme konusunda kullanılmaktadır (Rasmussen vd., 2005; Arts ve Holman, 2005; Cole vd., 2005).



Şekil 2.2. Polifenollerin sınıflandırılması ve polifenolik antioksidanların kimyasal yapısı (Manach vd., 2004)

2.6.1.1. Fenolik Bileşiklerin Antioksidan Özellikleri

Polifenoller açısından zengin gıdaların tüketimi, ateroskleroz, kanser ve nörodejeneratif süreçler gibi birçok hastalığa yakalanma riskini azaltır. Çok sayıda epidemiyolojik çalışma bu ilişkiyi doğruluğunu göstermiştir (Choi vd., 2012; Xu vd., 2013; Malar ve Devi, 2014; Di Domenico vd., 2015b). Antioksidan özellikleri, polifenollerin reaktif radikalleri bir elektron veya hidrojen atomu transferi yoluyla temizleme yetenekleriyle bağlantılıdır. Bu, dejeneratif hastalıkların başlangıcında meydana gelen oksidatif süreçlerden biridir (Ross vd., 2003; Litwinienko ve Ingold, 2007; Steenken ve Neta, 2009). Fenollerin kimyasal yapıları ve fonksiyonel gruplarındaki farklılıklar, antioksidan özelliklerini önemli ölçüde değiştirebilmektedir.

Fenolik bileşikler, antioksidan özelliklerini çeşitli mekanizmalar aracılığıyla göstermektedir. Birincil olarak, reaktif oksijen türleri (ROS) veya reaktif azot türleri (RNS) gibi serbest radikallerin temizlenmesini sağlayarak oksidatif stresi azaltırlar. İkinci olarak, serbest radikal üretiminde rol oynayan belirli metalleri şelatlama veya ilgili enzimleri inhibe etme yoluyla ROS ve RNS oluşumunu baskılamaktadırlar. Üçüncü

olarak, hücresel antioksidan savunma mekanizmalarını düzenleyerek veya koruyarak oksidatif hasara karşı koruyucu bir rol üstlenirler (Cotelle, 2001). Bu mekanizmalar, fenolik bileşiklerin biyolojik sistemlerdeki antioksidan etkinliklerinin temelini oluşturmaktadır.

Fenollerin, karotenoidler, C ve E vitaminleri gibi diğer antioksidanlardan daha güçlü bir antioksidan kapasiteye sahip olduğu *in vitro* çalışmalarla ortaya konmuştur (Rice-Evans vd., 1994; Rice-Evans vd., 1996). Fenolik bileşikler, meyve ve sebze tüketimi ile kanser, osteoporoz ve kalp-damar hastalıkları gibi oksidatif stresle ilişkili hastalıklar arasındaki ters ilişkinin temel mekanizmasını açıklayabilmektedir (Scalbert vd., 2005). Kanser, kronik inflamasyon ve kardiyovasküler hastalıklar, lipit peroksidasyonunu başlatan serbest radikallerin ve lipit peroksi radikallerinin oluşumunu inhibe eden flavonoidler gibi fenolik bileşiklerin etkisiyle önlenebilen önemli sağlık sorunlarıdır. Bu bulgular, fenolik bileşiklerin oksidatif stresle bağlantılı hastalıkların önlenmesi ve yönetiminde oynadığı kritik rolü vurgulamaktadır.

Flavonoidlerin, metal iyonlarını bağlama yetenekleri sayesinde lipit oksidasyonunu engellediği bilinmektedir. Luzia vd. (1997) çalışmaları, bazı fenolik bileşiklerin hücre zarındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyona duyarlılığını azalttığını ve aynı zamanda kansere karşı koruyucu etkiler gösterdiğini ortaya koymuştur. Özellikle kateşinlerin, süperoksit, peroksinitrit ve diğer serbest radikalleri temizleme özelliklerinin yanı sıra lipit hidroperoksit oluşumunu ve toksisiteyi önleyebildiği kanıtlanmıştır. Ayrıca, kateşinlerin antioksidan enzimlerin katalitik aktivitelerini artırdığı ve lipit peroksidasyonuna bağlı olarak artan malondialdehit (MDA) seviyelerini anlamlı ölçüde engellediği gösterilmiştir (Rice-Evans vd., 1996).

2.7. Paraoksonaz /Arilesteraz (PON 1)

Çeşitli memeli türlerinde bulunan insan serum paraoksonazı, kalsiyuma bağlı bir hidrolitik enzimdir. Daha önce "A"-esterazlar olarak bilinen enzimler, daha sonra yaygın olarak kullanılan bir tarımsal insektisit olan parathion'un toksik metaboliti olan organofosfat bileşiği paraoksonu temizleme yetenekleri nedeniyle paraoksonazlar olarak tanımlanmıştır (Shih vd., 1998). PON1, PON2 ve PON3, paraoksonaz ailesinin üç üyesidir.

PON1 bu ailenin en popüler üyesidir. Bunun nedeni, HDL ile ilişkili PON1' in LDL üzerindeki lipit peroksit birikimini azaltmadaki rolüdür (Mackness vd., 1998).

İnsan Paraoksonaz (PON) gen ailesi, kromozom 7'nin uzun kolunda q21.3 ile q22.1 arasında bulunan q-bölümünde bulunur. PON1, PON2 ve PON3 bu bölgede bulunur (Durrington vd., 2001). Paraoksonaz1 (PON1), moleküler kütlesi 43 kDa olan 354 amino asitten oluşan bir proteindir. Karaciğerde sentezlenir ve HDL ile birlikte dolaşıma salgılanır (Mackness vd., 2004). PON2'nin belirli işlevleri ve düzenlenmesi hakkında daha fazla bilgi yoktur. Bununla birlikte, PON1'in yanı sıra oksidatif stres, inflamasyon ve çekirdek algılama kontrolü ile ilişkili olduğu görülmüştür. PON2 proteini HDL partiküllerinde bulunamaz. Ancak PON2, insan plazma zarı içindeki neredeyse tüm dokularda eksprese edilir (Récourt vd., 2011).

PON1, oksitlenmiş fosfolipitlerin hidroliziyle ox-LDL ile bağlantılıdır. Ancak, tam mekanizmanın tam olarak ne olduğu henüz bilinmemektedir. Dolaşımdaki PON1, HDL üzerindeki apolipoprotein A1 ile birleşerek önemli bir "detoksifikasyon" proteinidir. HDL'nin antioksidan aktiviteleri bilinir (Huang vd., 2013). Hayvanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, leptin ve LDL reseptör eksikliği olan metabolik sendromlu farelere, insan PON1 genlerini aşırı eksprese etmek için adenovirüs aracılı PON1 gen transferi uygulanmıştır. PON1'in aşırı ekspresyonu, metabolik sendromlu farelerde ateroskleroz gelişimini önler ve plak, plazmadaki ox-LDL'yi azaltır (Mackness vd., 2006).

PON1 peroksidaz benzeri aktivite, arteriyel duvar hücrelerinin aterogenez sırasında ürettiği başlıca reaktif oksijen türü olan H_2O_2'yi hidrolize eder. Bu, HDL'nin antioksidatif ve antiaterojenik işlevine katkıda bulunur ve kolesterol akışını artırır (Calp, 2022). PON1, HDL'den daha iyi bir ateroskleroz göstergesidir (Singh vd., 2018). PON1, hidrolize ettiği organofosfat substratlarına geri dönüştürülebilir. Tersine, organofosfatlar asetilkolinesteraza geri dönüşümsüz olarak bağlanırken, sinapslarda ve sinir-kas kavşağında psödokolinesteraz gibi diğer serum organik esterazlara bağlanırlar. Dolayısıyla, PON1, insektisit parçalanmasının bir metaboliti olan paraoksonu hidroliz ederek sinir sistemini dolaşıma giren organofosfatların nörotoksisitesine karşı korur. PON1'in organofosfatları ve diğer organik esterleri hidroliz etme yeteneği, genetik polimorfizmden kaynaklanmaktadır (Furlong vd., 1988).

2.7.1 PON1 Genetik Polimorfizm ve Fenotipik Dağılım

Paraoksonaz ve arilesteraz aktivitesi PON1'de mevcuttur. PON1 eksonunda iki adet aminoasit polimorfizmi vardır. Bunlardan biri 55. pozisyonda metionin ve lösin (M/L) aminoasitlerinin yer değiştirmesiyle ilgilidir, diğeri ise 192. pozisyonda arginin ve glutamin (R/Q) aminoasitlerinin yer değiştirmesiyle ilgilidir (Bełtowski vd., 2002). PON1 promotor bölgesinde bilinen beş polimorfizm vardır. Bir grup insan, polimorfik dağılım nedeniyle farklılıklar gösterir. Arilesteraz aktivitesi polimorfizmden etkilenmez çünkü PON1 aktivitesinden etkilenmez. Bu, protein konsantrasyonunun bir göstergesi olabilir. Paraoksonaz polimorfizmi arilesteraz aktivitesini etkilememektedir (Deakin vd., 2007).

Paraoksonaz polimorfizminde trimodal dağılım gösteren fenotiplendirmede, 1M (molarite) sodyum klorür ile paraoksonaz aktivitesi artırılırken, arilesteraz aktivitesi azalmıştır. Büyük ve düşük aktivite pikleri "düşük aktiviteli homozigot-AA", küçük ve yüksek aktivite pikleri "heterozigot-AB" ve en küçük pik "yüksek aktiviteli homozigot-BB" olarak adlandırılmaktadır. Trimodal dağılım, Türkiye'de homozigot AA (QQ), heterozigot-AB (QR) ve homozigot-BB (RR) en yaygındır (Kaplan vd., 2001). B alleli ve AB+BB genotipleri arasında koroner kalp hastalığı (KKH) ile ilişkili bir korelasyon bulunmuştur. Gen polimorfizmi ve artan KVH riski etnik kökene göre değişmektedir (Reddy vd., 2001). Paraoksonaz gen polimorfizmi, diyabetli hastalarda bağımsız bir KVH risk faktörü olarak hizmet eder. Paraoksonaz B izotipi aktivitesi, lipit oksidasyonuna karşı güçlü bir koruma sağlar.

2.7.1.1. PON1 Aktivitesini Etkileyen Etmenler

Yaş arttıkça, insan serum paraoksonazı düşer. Serumdaki arilesteraz aktivitesi, HDL konsantrasyonları ve PON1 aktivitesinin yaşla birlikte önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir (Rizzo vd., 2009; Zhang vd., 2010). Sigara gibi çevresel koşullar PON1'in aktivitesini ve konsantrasyonunu baskılayarak enzimin işlevselliğini değiştirebilir (Zhang vd., 2019). Zeytinyağından elde edilen oleik asitin PON1 aktivitesi ile ilişkisi, yüksek trans doymamış yağ içeriğine sahip diyetler ile azaltılmıştır.

PON1 aktivitesi, yüksek oksitlenmiş lipit içeren yemeklik yağlardan zengin öğünlerle beslenen sağlıklı erkeklerde önemli ölçüde azalmıştır. Diyet yağ asitleri, PON1 gen ekspresyonu ve aktivitesini değiştirerek oksidatif hasara bağlı hastalıkların

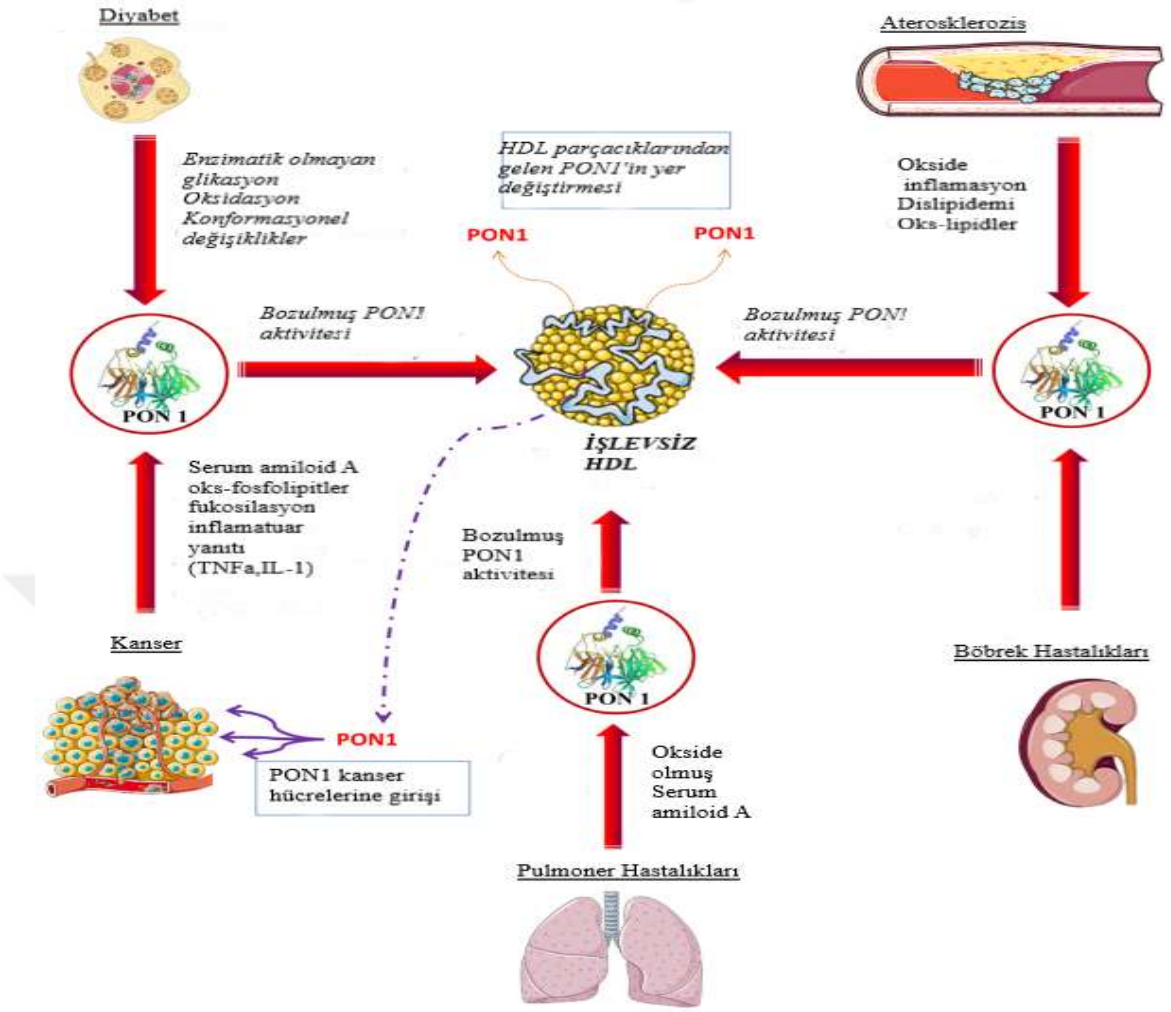
önlenmesinde yararlı bir yöntem olabilir (Costa vd., 2011; Ponce- Ruiz vd., 2017). Lipit düşürücü ilaçların yanı sıra fibrik asit türevleri ve HMG-CoA redüktaz inhibitörleri serum PON1 aktivitesini artırırlar (Camps vd., 2009).

2.7.1.2. PON1 ve Hastalıklarla İlişkisi

Paraoksonaz ve arilesteraz aktivitesi olarak da bilinen PON1 aktivitesini doğrudan algılayan bir meta-analize göre, PON1 aktivitesindeki azalma, artmış KKH riski ile anlamlı bir şekilde ilişkilidir. Akut Koroner Sendrom (AKS) hastaları ve sağlıklı gönüllüler, antioksidan ve anti-inflamatuar enzim (PON) olarak bilinen prooksidan ve pro-inflamatuar enzim (MPO) ile karşılaştırıldı. Oksidatif stres arttıkça PON1 düşer. PON1 aktivitesi ile genotipi belirlenen PON1 ile koroner arter hastalığı (KAH) arasındaki ilişki yetersizdir (Holand vd., 2015). Genetik faktörler, koroner arter hastalığı gelişiminde önemli bir rol oynar. PON1 için yüksek ekspresyon genotipleri, Miyokard İnfarktüsü (Mİ) riski açısından daha düşüktür.

Caerphilly Prospektif çalışmasında, düşük PON aktivitesi olan erişkin erkeklerden oluşan bir grupta artan MI riski ile ilişkili bir ilişki bulunmuştur (Rosenblat vd., 2015; Stevanovic vd., 2018). KVH ile kronik böbrek yetmezi olan hastalarda azalan PON1 aktiviteleri arasında bir ilişki bulunmuştur. Kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda PON1 aktivitesinin azalmasının, hastalığın etkisi olduğu gösterilmiştir (Reddy vd., 2001). Bir meta-analiz çalışması, düşük PON1 aktivitesi ile diyabetik maya arasındaki ilişkiyi göstermiştir. PON1, *in vivo* olarak diyabetli hastaların kontrollerine göre çok daha fazla glikasyona uğradığı ve PON1 aktivitesinin inhibisyonundan sorumlu olduğu keşfedilmiştir (Mastorikou vd., 2008; Wu vd., 2018).

Sarkoidoz, KOAH ve astım gibi önemli sistemik inflamasyona sahip durumlarda, PON1 değişiklikleri ve antioksidan özelliklerin kaybı ateroskleroz riskini artırabilir. Akut alevlenme ile birlikte iskemik kalp hastalığı (İKH) olan KOAH tanılı hastaların hem başvuru anında hem de taburculuk sırasında PON1 aktivitesinin İKH olmayan hastalara göre önemli derecede düşük olduğu gösterilmiştir (Stanojkovic vd., 2011; Kotur-Stevuljević vd., 2020a).



Şekil 2.3. Farklı patolojik süreçlerin PON1 bozulması, yani HDL işlevsizliği üzerindeki etkisi (farklı hastalıklarda PON 1 aktivitesinin/konsantrasyonunun azalmasına neden olan olası mekanizmalar) (Kotur-Stevuljević vd., 2020a)

Ateroskleroz ve kanser, HDL metabolizmasında ve PON1 aktivitesinde benzer değişiklikler gösterir. Paraoksonaz ve arilesteraz aktivitesi, kolorektal kanser hastalarında downregülasyon göstermiştir (Kotur-Stevuljević vd., 2020b; Şekil 2.3). Bunlara ilave olarak, PON1 aktivitesi bazı enfeksiyon hastalıklarında, kronik karaciğer hastalığında, Chron ve ülseratif kolit gibi enflamatuar bağırsak hastalıklarında, Alzheimer hastalığı da dahil olmak üzere nöroinflamatuar ve nörodejeneratif hastalıklarda azalmıştır (Szczeklik vd., 2018; Camps vd., 2021).

2.8. Aronya (*Aronia melanocarpa*)

Aronya; *Rosaceae* familyası, Aronia cinsi içerisinde yer almaktadır. Bu cins içerisinde *Aronia melanocarpa* (Michaux) Elliot (*Black chokeberry*), *Aronia prunifolia*

(Marshall) Rehder (*Purple chokeberry)* ve *Aronia arbutifolia* (Linnaeus) Persoon (*Red chokeberry*) olmak üzere bilinen üç tür mevcuttur (Şekil 2.4). Aronya (*Aronia melanocarpa*) meyveleri, antosiyaninler, karotenoidler, yağ asitleri, flavonoidler, fenolik bileşikler ve vitaminler dahil olmak üzere birçok biyoaktif bileşik içerir (Kulling ve Rawel, 2008; Kokotkiewicz ve Jaremicz, 2010). Kuzey Amerika' nın doğu bölgelerinden gelen aronya meyveleri, 20. yüzyılın ortalarından beri eski Sovyetler Birliği' nde yetiştirilmekte ve tıbbi olarak kullanılmaktadır. Doğu Avrupa ülkeleri ve Rusya' da aronya meyveleri ile ev yapımı veya ticari meyve suları, reçeller, meyve çayları, şarap ve doğal gıda renklendiricilerinin üretiminde yaygın olarak kullanılmakta ve yetiştiriciliği yapılmaktadır (Kokotkiewicz ve Jaremicz, 2010; Wilkes vd., 2014).



Şekil 2.4. Aronya (*Aronia melanocarpa*) meyvesi

2.8.1. Aronya Meyvesinin Başlıca Biyoaktif Bileşikleri

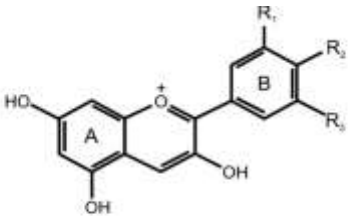
2.8.1.1. Polifenolik Bileşikler

Polifenolik bileşikler, aronya meyvelerinin üst düzey biyoaktivitesini belirleyen biyofaktörlerdir. Siyah chokeberry'ler bu tür kimyasal bileşiklerin en önemli kaynaklarından bazılarıdır (Sidor ve Gramza-Michałowska, 2019; Durazzo vd., 2019). Fenolik, en az bir hidroksil grubu ile aromatik bir halkaya sahip doğal bileşiklerdir. Yapıları basit bileşiklerden, yüksek moleküler ağırlığa sahip karmaşık polimerlere kadar değişebilir. En yaygın sınıflandırmaya göre, polifenoller normalde

iki ana gruba ayrılır: flavonoidler (yani antosiyaninler, flavonoller, flavanonlar ve izoflavonlar) ve flavonoid olmayanlar (yani fenolik asitler, ksantonlar, stilbenler, lignanlar ve tanenler) (Durazzo vd., 2019).

2.8.1.2. Flavonoidler

C_6 -C_3 -C_6 omurgasına sahip flavonoidler (yani, 2-fenilkromen-4-on) en bol bulunan ve yaygın olarak dağıtılan bitki metabolik polifenolleridir (Ku vd., 2020; Tong vd., 2021). Antosiyaninler bir grup flavonoid, polifenol kimyasal bileşiklerdir. Karakteristik özellikleri meyve ve çiçeklere renk vermeleridir. Bu renk kırmızı-turuncudan mavi-mor renge kadar değişir (Denev vd., 2019). Suda çözünürler ve şematik yapıları aglikon (antosiyanidin), şeker(ler) ve sıklıkla açil grubu(ları) içerir (Liang, vd., 2021). Tanımlanan en yaygın altı antosiyanidin ve bunların kimyasal yapısı Şekil 2.5' te gösterilmiştir (Liang, vd., 2021). Denev vd. (2018), taze aronyada belirtilen toplam antosiyanin miktarını 357 ila 1790 mg/100 g yaş/taze ağırlık arasında değiştiğini bildirmiştir. Antosiyaninlerin tüm polifenollerin içeriğinin, Oszmian´ski ve Wojdylo (2005) %25' ini, Jakobek vd. (2012) ise %41' ni oluşturduğunu belirtmişlerdir. Antosiyanin bileşimi neredeyse sadece siyanidin glikozitler tarafından temsil edildiği de ifade edilmektedir (Jurikova, vd., 2017). Siyanidin 3- O-galaktozid, chokeberry meyvesinde bulunan baskın antosiyanindir ve içeriği toplam antosiyaninin yaklaşık %65' ini oluşturur (Şekil 2.5) (Liang, vd., 2021). Aronya içeriğinde önemli olan diğer antosiyaninler siyanidin-3-arabinoz, siyanidin-3-glukozit ve siyanidin-3-ksilozittir (Deineka vd., 2020). Ayrıca ilgili meyvelerde az miktarda pelargonidin-3-galaktozid ve pelargonidin-3-arabinosid bulunmaktadır (Kim vd., 2013; Veberic vd., 2015).



Anthocyanidin	R_1	R_2	R_3
Cyanidin	OH	OH	H
Delphinidin	OH	OH	OH
Malvidin	OCH_3	OH	OCH_3
Peonidin	OCH_3	OH	H
Pelargonidin	H	OH	H
Petunidin	OCH_3	OH	OH



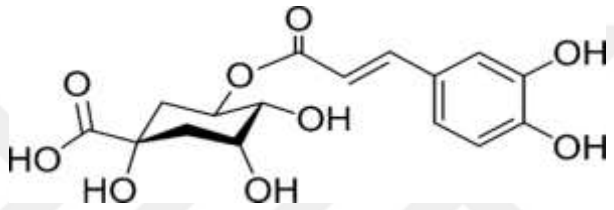
Şekil 2.5. (a) En yaygın antosiyanidinler. (b) Siyanidin 3-O-galaktozidin kimyasal yapısı (Liang, vd., 2021)

Fenolik bileşikler kararsız bitki sekonder metabolitleridir. Stabiliteleri ışık, kopigmentlerin varlığı, kendiliğinden birleşme, metalik iyonlar, enzimler, oksijen, askorbik asit, şeker gibi çevresel faktörlerden önemli ölçüde etkilenir (Cavalcanti vd., 2011). Antosiyaninler ısıl işlemle büyük ölçüde bozulur ve konsantrasyonları doğrusal olarak azalır (Wilkes vd., 2014). Dondurularak kurutulmuş aronya meyve tozunda 70 ^{o}C' de 24 saat depolamanın toplam antosiyanin içeriğinde yaklaşık %50 azalmaya yol açtığı belirlenmiştir (Liang vd., 2021). Aronya meyveleri belirli miktarda flavanol (proantosiyanidinler-flavan-3-ol) birimlerinden oluşan polimerler ve oligomerler içerir (Jurikova vd., 2017). Aronya meyvesindeki Pro-siyanidinlerin yaklaşık %70'i özünde, %25 kabukta ve tohumlar ise yaklaşık %5 oranında bulunur (Mayer-Miebach vd., 2012). Aronya fenoliklerinin %1,3' ü flavonollerden oluşur (Oszmia´nski ve Wojdylo, 2005). Kuersetin türevleri arasında 3-O-(6′-O-β-arabinozil-ß- glukozit), 3-O-(6′-α-rhamnozil-β-galaktosid), 3-O-(6′-α-rhamnosyl-β-glucoside), 3-O-β-galaktosid ve 3-O-β-glucoside yer almaktadır (Kulling ve Rawel, 2008). Ayrıca, aronya' nın meyvelerinde önemsiz miktarda kuersetin 3-vicianoside de bulunmaktadır (Jurikova vd., 2017).

2.8.1.3. Fenolik Asitler

Fenolik asitler aromatik bir halka, karboksil grupları, hidroksil ve/veya metoksi gruplarından oluşan bileşiklerdir. Moleküldeki karbon atomu sayısına bağlı olarak, fenolik asitler iki temel grupta sınıflandırılabilir: Benzoik ve

sinnamik asit türevleri. Meyveler çoğunlukla serbest fenolik asitlerin varlığı ile karakterize edilir (Durazzo vd., 2019). Aronya meyvelerinin toplam fenolik asit içeriği; 63.9 (Durazzo vd., 2019), 96 (Dudonné vd., 2015), 121.9 (Kulling ve Rawel, 2008) mg/100 g TM. En fazla bulunan klorojenik asidin, bir ester bağı ile kinik aside bağlı bir kafeik asit kompleksidir. Kimyasal yapısı Şekil 2.6'da gösterilmiştir. Bu bileşik neoklorojenik asit ile birlikte chokeberries' deki flavonoid olmayan polifenollerdir (Dudonné vd., 2015). Klorojenik asit, meyvelerde bulunan doğal bir kopigment olduğu ve kopigmentasyon süreciyle ortaya çıktığı öne sürülmüştür (Kulling ve Rawel, 2008).

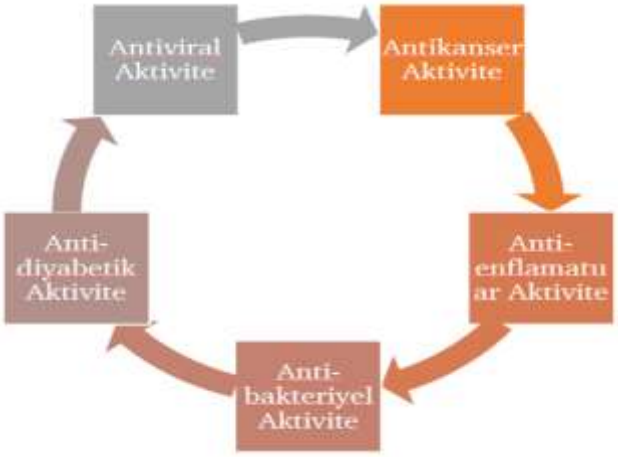


Şekil 2.6. Klorojenik asidin kimyasal yapısı (Dudonné vd., 2015)

2.8.1.4. Aronyanın Sağlık Üzerine Etkileri

Vücudun normal enerji metabolizması sonucunda veya çeşitli çevresel etkenlere bağlı olarak üretilen serbest radikallerin aşırı üretiminde veya vücut tarafından elimine edilemediği durumlarda oksidatif strese yol açar ve vücuttaki doğal denge bozulur. Bu durumda meydana gelen ve kanser, otoimmün hastalıklar, yaşlanma, katarakt, kardiyovasküler ve nörodejeneratif (Alzheimer Hastalığı) hastalıklar gibi çeşitli kronik hastalıkların nedeni oksidatif strestir (Halliwell ve Gutteridge, 2015). Oksidatif stres; hücre zarlarını, proteinler, lipitler, lipoproteinler ve DNA gibi diğer yapıları ciddi şekilde değiştiren zararlı bir süreçtir. Vücudun oksidatif strese karşı koymak için doğal olarak üretilen veya dışarıdan gıdalar yoluyla sağlanan antioksidanlar gibi çeşitli mekanizmaları vardır. Antioksidanlar, serbest radikallerin fazlalığını nötralize ederek hücreleri toksik etkilere karşı korur ve hastalıkların önlenmesine katkıda bulunurlar. Antioksidan aktivitenin belirlenmesi için radikal süpürme kapasitesinin ölçülmesine ve metal indirgeme etkisinin ölçülmesine dayanan çeşitli *in vitro* metotlar geliştirilmiştir (Valko vd., 2007; Pham-Huy vd., 2008). Fenolik bileşikler bakımından zengin olan aronya meyvesi bu açıdan değerlidir. İçerdikleri antiinflamatuvar ve antioksidan bileşenlerden

dolayı aronya meyvelerinin, oksidatif stresin ve bunun sonucunda ortaya çıkan rahatsızlıkların azaltılmasında olumlu etkiler gösterdiği kanıtlanmıştır (Şekil 2.7; Rasouli vd., 2017).



Şekil 2.7. Aronyanın sağlık üzerine etkileri

Ayrıca aronya meyve ekstresinin, insülin direnciyle ilgili risk faktörlerini azalttığı da belirlenmiştir (Park ve Kim, 2020; Wilcox ve Ash, 2021). Aronya meyvelerinden elde edilmiş antosiyaninlerin, Ames testi ile antimutajenik aktivitesi olduğu ve bu aktivitenin serbest radikalleri süpürücü etkisi olduğu gözlemlenmiştir (Kulling ve Rawel). Aronya, yaş meyve bazında kütlece 20,1 mg/100 g düzeyinde amigdalin içermektedir (Jurikova vd., 2017). Amigdalin, kanser için "tedavi edici" veya "önleyici" olarak görülmektedir (Santos ve Schulze, 2020). Flavonoidler ve diğer fenoliklerin kanser ve kalp hastalığının gelişiminde önleyici bir rol oynadığı öne sürülmüştür. Epidemiyolojik çalışmalarla, kırmızı taneli meyvelerin yer aldığı kontrollü diyetlerin tüketimiyle plazmanın antioksidan kapasitesinin önemli ölçüde arttığı, yine meyve ve sebze alımı ile kalp hastalığı mortalitesi arasında anlamlı bir negatif ilişki olduğu belirlenmiştir (Liu, 2013; Jennings vd., 2014, Aune vd., 2017).

Fenoliklerin antioksidan aktivitesi; indirgeyici ajanlar, hidrojen vericiler ve tekli oksijen söndürücüler olarak organizmada hareket etmelerine izin veren redoks özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca metal şelatlama potansiyeline sahiptirler. Aronya meyvesi yaban mersini, kızılcık ve yaban mersini meyvelerinden önemli ölçüde daha yüksek antosiyanin, fenolik içerik ve antioksidan aktiviteye sahiptir. Aronya

meyvelerinde, antosiyaninler toplam polifenollerin yaklaşık %25'ini oluşturmaktadır (Liu, 2013). Aronya, kırmızı pigment fraksiyonunun hem *in vitro* hem de *in vivo* sistemlerde güçlü bir antioksidan aktiviteye sahip olduğu ve sıçanlarda akut gastrik hemorajik lezyonlarda anti ülseratif aktivitede önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Bu meyvelerin antosiyanin seviyesinin kuru ağırlık bazında %1 kadar yüksek olduğu ve toplam fenolik içeriğin 20 mg/g' den (galik asit eşdeğerleri) fazla olduğu bildirilmiştir (Jennings vd., 2014). Dört antosiyanin: 3-O-galaktosid, 3-O-glucoside, 3-O-arabinosid ve 3-Oxyloside siyanidinin, iki fenolik asit: klorojenik ve neoklorojenik ve son zamanlarda beş kuersetin türevi aronya meyvelerinde belirlenmiştir (Liu, 2013; Jennings vd., 2014; Aune vd., 2017). Aronya meyvesinde bulunan kafeik asitler olarak o-difenolikler, (-) epikateşin, siyanidin ve kuersetin türevleri antioksidanlar olarak en aktif olanlardır. Çünkü B halkasındaki o-dihidroksi yapısı radikal forma daha yüksek stabilite verir ve elektron delokalizasyonuna katılır (Kulling ve Rawel, 2008).

Aronya meyvelerinin tadı buruktur, bu da bu meyvelerdeki tanin içeriğini gösterir. Aronya yoğunlaştırılmış taninlerin konsantrasyonu diğer meyvelere göre daha yüksektir. Prosiyanidinler olarak adlandırılan alt birimler olarak esas olarak (-) epikateşinleri içerirler (Lee vd., 2005; Jakobek vd., 2007). Prosiyanidinler, güçlü antioksidan kapasiteleri ve insan sağlığı üzerindeki olası koruyucu etkileri nedeniyle beslenme ve tıpta büyük ilgi görmektedir. Son zamanlarda, prosiyanidinlerin serbest radikal süpürücü özelliklerinin kardiyovasküler hastalıklar, kan pıhtılaşması riskini azaltabileceği ve bazı idrar yolu enfeksiyonlarına karşı koruyabileceği varsayılmıştır (Çizelge 2.1; Kulling ve Rawel, 2008).

Çizelge 2.1. Aronyanın sağlık üzerine etkileri üzerine yapılan çalışmalar

Aronya	**Araştırmalar**	**Etkisi**	**Kaynak**
Aronya ekstraktı günde 30 mL 40 gün boyunca	Hiperkolesterolemi, arteriyel hipertansiyon ve düzensiz protein metabolizması olan hastalar	Total Kolesterol↓ LdL ↓ TAG↓ Glukoz ↓	Lancrajan vd., 2012
Aronya ekstratı; 2 ay boyunca günde 3 defa 100 mg	Farmakolojik tedavi görmeyen hiperkolesterolemili hastalar	Eritrositler: Total kolesterol ↓, Lipit peroksidasyonu ↓, parametre S ↓; eritrositlerin reolojik özellikleri üzerinde faydalı etki	Duchnowicz vd., 2012
Aronya etanol ekstraktı; 8 hafta boyunca her 2 günde bir 0,050 g/kg.	Wistar beyaz fareleri indüklenmiş arteriyel hipertansiyon	Glutatyon peroksidaz ↑, Gulutatyon ↑, Toplan antioksidant kapasitesi ↑, Sistolik kan basıncı ↓, diyastolik kan basıncı↓	Ciocoiu vd., 2013
2 g stabil glikomannan lifleri ile zenginleştirilmiş aronya takviyesi; 4 hafta boyunca günde 100 mL	Abdominal obezitesi olan menopoz sonrası kadınlar	GSH-Px ↑; eritrositlerdeki membran yağ asidi profili: MUFA ↓,18:1n-9 ↓, n-3 PUFA ↑, 22:6n-3 ↑, n-6/n-3 ↓	Kardum vd., 2014
Aronya suyu; 100 mL 12 hafta boyunca her gün	Sağlıklı kadınlar	24 h Sistolik kan basıncı ↓, parameters oxidative status: Tiyobarbitürik asit reaktif maddeler ↓, PAB ↓, Total antioksidant kapasitesi↓	Kardum vd., 2014
Sterilize edilmiş aronya suyu; 3 ay boyunca günde 25 mL	Erkek Wistar sıçanları	Vücut ağırlığı↑, Vücut Kitle İndeksi↑, LDL ↓, aort duvarında yaşa bağlı değişiklikleri gecikme	Daskalova vd., 2015
Organik aronya suyu; 200 mL günde 4 hafta	Yüksek normal kan basıncı ve hipertansiyonu olan, düzenli antihipertansif ilaç kullanmayan denekler	Triaçilgliserol ↓, 24 h Sistolik kan basıncı ↓, 24 h Diyastolik kan basıncı ↓, uyanık sistolik kan basıncı ↓, uyanık diyastolik kan basıncı ↓	Kardum vd., 2015
Organik aronya suyu; 3 hafta boyunca günde 250 mL	İnsan çalışması: normal BMI' ye sahip sağlıklı, sigara içmeyen denekler	Triaçilgliserol ↓, serum antioksidan kapasitesi (DPPH) ↑, Vücut Kitle İndeksi ↓, Bel çevresi↓, Sistolik Kan basıncı ↓, HDL ↓,	Nowak vd., 2016
Kurutulmuş aronya tozu; 8 hafta boyunca %0,5 ve %1	Yüksek kolesterol, yüksek yağ ve sükroz diyetinin neden olduğu NAFLD' li C57BL/6 J fareleri	TAG ↓, Karaciğer ağırlığı ↓, abdominal yağ ↓, sterol düzenleyici element bağlayıcı protein ↓, ACC ↓, yağ asit sentaz ↓,	Park vd., 2016
Dondurularak kurutulmuş Aronya meyveleri; 28 gün boyunca	Yüksek yağlı diyetle beslenen C57BL/6J msSlc erkek fareler	Karaciğer fibrozunun azalması; Toplam abdominal lipit ağırlığı ↓; karaciğer: TAG ↓, Total Kolesterol ↑, LDL ↓; Serum: Trigliserit ↓, LDL ↓	Yamane vd., 2016.
Soğuk preslenmiş aronya suyu ve konveksiyon fırınında kurutulmuş aronya tozu; 8 hafta boyunca günde 300 mL meyve suyu ve 3 g toz	Kan basıncı hafif yüksek olan ve düzenli antihipertansif ilaç kullanmayan denekler	Günlük Diastolik kan basıncı ↓, 24 saatlik idrar atılımı-potasyum ↓; inflamasyon belirteçleri: IL10 ↓, TNFa ↓,	Loo vd., 2016
Dondurularak kurutulan aronya meyveleri; 28 gün boyunca %10 aronya meyvesi içeren normal diyet.	Hipertansif sıçanlar	Sistolik kan basıncı ↓, akciğer Anjiyotensin-1 dönüştürücü enzim ↑, böbrek Anjiyotensin -1 dönüştürücü enzim↓	Yamane vd., 2017
Aronya posası; yem karışımının her kg' ı başına 150/300 g aronya posası ilave edilen rasyon	Merinos kuzuları	ALT ↓, AST ↓, CK ↓, GGT ↓, LDH ↓, TAG↓, glukoz↓, HDL↑	Lipin´ska vd., 2018,

2.9. Enkapsülasyon

Kapsülleme, biyoaktif bileşen (çekirdek malzeme) bakımından zengin sıvı veya katı her bir damlacık veya parçacığın polimerik bir kabuk içine gömüldüğü bir prosedürdür. Üretilen mikrokapsüller mikrometreden milimetreye kadar değişebilir ve küresel veya asimetrik şekilli olabilir (Tyagi vd., 2011). Etkili bir kapsülleme sisteminin önemli özellikleri, tercihen doğal bileşenlerle gıda sınıfı formülasyonda olması, organoleptik özellikler üzerinde minimum etki ve daha fazla fiziksel stabilite ile biyoaktif bileşikleri gıdalara entegre etme veya dahil etme yeteneğine sahip olmasıdır. Ayrıca, kapsüllenmiş materyallere ısı, ışık ve pH' dan koruma sağlaması; ayrıca tüketim sırasında biyoaktif bileşiğin maksimum emilimini sağlaması ve en önemlisi kontrollü salınım sağlamasıdır (Đorđevi´c vd., 2015). Enkapsülasyon teknikleri üç tipte sınıflandırılmaktadır: Kimyasal, fizikokimyasal ve fizikomekanik yöntemler. Çeşitli enkapsülasyon teknikleri arasında sprey kurutma, dondurarak kurutma (Liyofilizasyon), elektrospinning, koaservasyon, ekstrüzyon, birlikte çökeltme, jelleşme, emülsiyon oluşumu, katman katman biriktirme, akışkan yataklı kaplama ve sol-jel enkapsülasyonu yer almaktadır. Bunlar arasında akışkan yatak kaplama, sprey kurutma, koaservasyon ve tava kaplama ticari olarak kullanılan birkaç enkapsülasyon tekniğidir (Jyothi vd., 2010; Zhu, 2017). Püskürterek kurutma yöntemi, kısa kuruma süreleri nedeniyle termolabil biyoaktif materyallerin enkapsüle edilmesinde çoğunlukla kullanılmaktadır. Son on yılda, dondurarak kurutmanın gıda endüstrisinde önem kazanması dikkat çekicidir (Fredes vd., 2018). Püskürtmeli kurutma, bir çözeltinin veya sıvının toza dönüştürülmesini içerirken dondurarak kurutma, dondurulmuş çözeltiden nemin uzaklaştırılarak üstün kaliteli kurutulmuş bir ürün elde edilmesidir (Barbosa vd., 2015).

2.9.1. Mikrokapsüller

Bir mikrokapsülün önemli bileşenleri arasında bir duvar malzemesi ve bir çekirdek malzemesi bulunur. Çekirdek malzemeler katı veya damlacık veya dispersiyon şeklinde olabilir (Bah vd., 2020). Mikrokapsül geliştirmenin en kritik kısmı kaplama malzemesinin seçimidir (Norkaew vd., 2019). Kapsülleme sistemlerinde kullanılan kaplama malzemeleri arasında proteinler, lipitler ve karbonhidratlar yer almaktadır. Yaygın olarak kullanılan lipitler arasında gliseritler, fosfolipitler ve mumlar bulunmaktadır.

Gluten ve peynir altı suyu proteinleri yaygın olarak kullanılan bazı protein bazlı duvar materyalleridir. Normalde kullanılan karbonhidrat bazlı kabuk materyalleri arasında selüloz ve türevleri, nişasta ve türevleri ve bazı bitki eksüdaları ve ekstraktları bulunur (Hoyos Leyva vd., 2018). Portakal suyu yan ürünleri (Kaderides ve Goula, 2019), balkabağı protein izolatı (Čakarevi´c vd., 2020) ve sardinella protein izolatı gibi bazı yeni duvar malzemeleri, değişen oranlarda maltodekstrin ile kombinasyon halinde (Nasri vd., 2020) son zamanlarda denenmekte ve kullanılmaktadır. Bununla birlikte, en ağırlıklı olarak kullanılan duvar malzemeleri arasında değişen dekstroz eşdeğerine sahip maltodekstrin, mumlar ve peynir altı suyu proteinleri gibi belirli proteinler yer almaktadır. Kullanılan duvar malzemesinin gıda sınıfı, biyolojik olarak kolayca parçalanabilen, kullanımı kolay, geri tepmeyen ve düşük higroskopikliğe sahip, aktif içerikli olması çok önemlidir. Ayrıca matrisin (duvar malzemelerin) aktif bileşenleri çözünürlüğü ve stabilitesinin de etkisi vardır (Rocha vd., 2019; Bah vd., 2020).

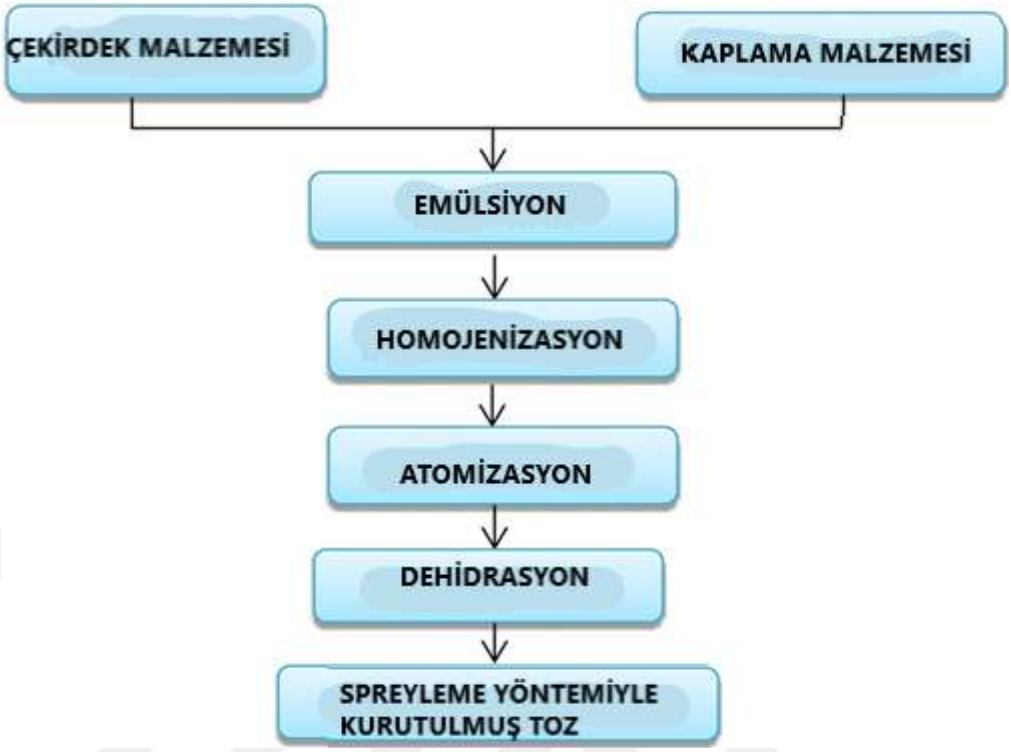
2.9.2. Biyoaktif Bileşenlerin Enkapsülasyonu

Enkapsülasyon, aktif bileşenlerin (çekirdek malzemeler) üzerine taşıyıcı maddeler veya matris (duvar malzemeleri) kaplama tekniğidir. Polifenoller, enzimler, antioksidanlar, mikro besinler ve benzeri fonksiyonel kapsülleme yoluyla ışık, pH, oksijen, ısı, nem ve diğer aşırı koşullara karşı korunur (Bamidele ve Emmambux, 2021). Püskürterek kurutma ve dondurarak kurutma, biyoaktif bileşikleri kapsüllemek için ağırlıklı olarak kullanılan iki tekniktir.

2.9.2.1. Sprey Kurutma

Püskürtmeli kurutma, sıvı bir beslemenin doğrudan toza dönüştürüldüğü tekniği ifade eder. Püskürtmeli kurutma yoluyla üretilen tozlar daha fazla stabiliteye, minimum nakliye ve depolama maliyetine ve daha kolay kullanıma sahiptir (Assadpour ve Jafari, 2019). Püskürtmeli kurutmanın temel prensibi, çekirdek ve duvar malzemelerini suda çözünebilen bir emülsiyon hazırlamak, emülsiyonu kurutma odasına beslemek ve sıvıdaki nemi tahliye etmektir. Suyu alınmış partiküller ya toz formunda ya da aglomere formda toplanır (Mohammed vd., 2020). Şekil 2.8'de gösterildiği gibi, bu yöntemle mikroenkapsülasyon şu dört adımdan oluşur: (i) stabil bir emülsiyon hazırlamak, (ii) dispersiyonun homojenleştirilmesi, (iii) emülsiyonun atomize edilmesi ve (iv) atomize

partiküllerin kurutulması (Bakry vd., 2016).



Şekil 2.8. Sprey kurutmada yer alan adımları gösteren akış şeması

2.9.2.2. Dondurarak Kurutma veya Liyofilizasyon

Liyofilizasyon, dondurulmuş gıda molekülllerinin süblimasyon yoluyla nemin uzaklaştırılması anlamına gelir. Öncelikle ısıya dayanıklı malzemelerin ve oksidasyona kolayca yatkın gıdaların kurutulması için kullanılır. Son zamanlarda, dondurarak kurutma tekniği ilaç ve diğer biyo-ürün endüstrilerinde önem kazanmaktadır. Liyofilizasyon üç aşamada oluşmaktadır: dondurma, birincil kurutma ve ikincil kurutma (Oyinloye ve Yoon, 2020). Liyofilizasyondaki ilk aşama, nemin büyük bir kısmının donarak buz haline geldiği dondurmadır. İkinci aşama birincil kurutmadır. Bu adımda, donmuş serbest nem süblimasyon yoluyla dışarı çekilir. Süblimleşme buzun doğrudan buhara dönüştürülmesidir. Bu adımda önemli rol oynayan iki parametre raf sıcaklığı ve oda basıncıdır. Birincil kurutma sırasında süblimasyonu hızlandıran optimum basınç 0,1 mbar ile 0,2 mbar arasında değişir. Liyofilizasyon döngüsündeki son adım ikincil kurutmadır. Bu adım, donmamış bağlı nemin desorpsiyon yoluyla uzaklaştırılmasını içerir. Bu süreçte, raf sıcaklığı daha da artırılır ve basınç sabit kalır (Bjeloševi´c vd., 2020).

2.9.2.2.1. Enkapsülasyonu Etkileyen Faktörler

2.9.2.2.1.1. Sıcaklık

Yüksek kapsülleme verimliliğine sahip püskürtmeyle kurutulmuş bir toz elde etmek için hem giriş hem de çıkış sıcaklığının optimize edilmesi gerekir. Giriş sıcaklığı genellikle 150-220 ^{o}C aralığındadır. Giriş sıcaklığı ne kadar düşük olursa buharlaşma oranı da o kadar düşük olur ve bu da mikrokapsüllerdeki yüksek nem içeriğinden kaynaklanmaktadır (Mohammed vd., 2020).

2.9.2.2.1.2. Döngü Modu

Püskürtülerek kurutulan solvent türüne bağlı olarak döngü modu değişir. Organik çözücüler için, bir yoğunlaştırıcı ile birlikte kapalı döngü kurulumu tercih edilir. Bu, yüksek sıcaklıklarda patlama riskini önlemeye, nihai tozun oksidasyona karşı hassasiyetini azaltmaya ve organik çözücülerin dış ortama salınmasını önlemeye yardımcı olur. Kondenser, organik çözücü buharını toplamak için kullanılır. Sulu veya herhangi bir su bazlı besleme stoğunu kurutmak için açık döngü bir kurulum devreye girer. Böyle bir durumda, kondansatör kullanımı gerekli değildir (Ziaee vd., 2019).

2.9.2.2.1.3. Duvar Malzemeleri

Etkili enkapsülasyon için duvar malzemesinin seçimi hayati önem taşımaktadır. Duvar malzemesi, çözünürlük, moleküler ağırlık, yayılabilirlik, kristallik, emülsifiye etme ve film oluşturma kabiliyeti gibi fizyokimyasal özellikler temelinde seçilir. Maliyet parametreleri de dikkate alınır (Gharsallaoui vd., 2007). Karotenoid açısından zengin olan altın çilek suyu maltodekstrin, inülin, modifiye nişasta, arap zamkı, aljinat ve bunların bir kombinasyonu kullanılmaktadır (Etzbach vd., 2020). Ayrıca bazı araştırmacılar, *Bifidobacterium bifidum* ve *Lactobacillus acidophilus* gibi probiyotik bakterileri de kalsiyum aljinat kullanarak kapsüllemiştir. Yine *Saccharomyces cerevisiae'* nin hücre duvarı bileşiği mikro boncukların üzerine kaplanmış ve sonra bunu kalsiyum aljinat kaplama katmanı izlemiş ve bu uygulama şekliyle %88,33'lük bir kapsülleme verimliliği elde edilmiştir (Mokhtari vd., 2017). Başka bir araştırmada, hurma çekirdeği polifenollerini kapsüllemek için duvar malzemesi olarak yumurta sarısı proteini, arap zamkı ile birlikte kullanılmıştır. Matris olarak yumurta sarısı proteini içeren serbest kurutulmuş üründen %99,75 ± 0,01'lik

bir enkapsülasyon verimliliği alınmıştır. 1:3 oranında arap zamkı ve yumurta sarısı proteini kullanımından ise %91,55 ± 2,93'lük bir verimlilik alınmıştır (Sassi vd., 2020).

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Hayvan Materyali

Çalışmada kullanılan hayvan sayısı güç analizi ile saptanmış ve aşağıdaki formül kullanılmıştır (3.1).

$$N = 2(\alpha/2 + \beta)2\, x\, (S/\Delta)2 \quad (3.1)$$

α = Tip 1 hata (005); S = standart sapma; Δ = kontrol ve test grubu arasında geçerli ölçülmüş fark; β = güç (0.80).

Değerler formüle konulduğunda her bir grup için n = 6 deney hayvanı olmak üzere çalışmaya toplam 36 deney hayvanı dâhil edilmesine karar verilmiştir. Ancak deneyin doğasından kaynaklı olarak %10-15 bir hayvan kaybı göz önünde bulundurularak çalışmanın toplam (36+6) 42 deney hayvanı ile yürütülmesine karar verilmiştir (Rezaei vd., 2020). Çalışmada kullanılan aynı soydan gelen (inbred), 42 adet erkek Sprague-Dawley (SD) cinsi sıçan Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Biriminden (TÜTFDHB) temin edilmiştir. Çalışma materyali olarak 8 haftalık yaşta 42 adet erkek SD cinsi sıçan teslim alınmış ve tüm hayvanlar 10. haftaya kadar standart yem ile beslenmişlerdir. Deneysel amaçlı besleme ve yetiştirme işlemleri TÜTFDHB'de yürütülmüştür. Çalışmanın başlangıcında sıçanlar 0,1 g'a duyarlı hassas terazi (A&D EK-6000H Scale, A&D, Japonya) ile tartılmıştır. Her bir muamele grubunda yedişer hayvan olmak üzere grup ortalama vücut ağırlıkları eşit olacak şekilde üçerli ve dörderli gruplar halinde kafeslere yerleştirilmiştir (Şekil 3.1).

Sıçanlar deney süresince; oda sıcaklığı (21±2 °C), bağıl nem (%45-65), kafes içi ışık şiddeti (40 lüks), ışık periyodu (12 saat aydınlık/12 saat karanlık), gürültü düzeyi (85 dB'in altında-gürültüsüz ortam kontrollü) ve hava değişimi (10-15/saat olacak şekilde) sağlayabilen havalandırma sisteminin mevcut olduğu bir ortamda tutulmuşlardır. Sıçanların önlerinde sürekli olarak yem (*ad libitum*) ve taze su bulunan kafeslerde barındırılmıştır. Çalışma boyunca sıçanların yem tüketimleri iki günde bir ve vücut ağırlık kazanımları da haftada bir ölçülerek kaydedilmiştir. Çalışma Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 29.03.2022 tarih ve 2022/03 sayılı olur kararı ile yapılmıştır.



Şekil 3.1. Araştırmanın yürütüldüğü deneme ünitesi

3.1.2. Aronya Meyvesinin Temini

Bu araştırmada materyal olarak Kırklareli ili Vize ilçesine bağlı Soğucak köyünde (41° 38' 26.1132" Kuzey ve 27° 39' 22.7808" Doğu) yetiştirilen aronya (*Aronia melanocarpa (*Michx) Elliot (Black chokeberry*)* üzümsü meyve türüne ait 'Nero' çeşidi kullanılmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Araştırma materyali Nero çeşidi aronya meyvesi ve kesiti

3.1.3. Yem Materyalinin Temini

Tüm sıçanlar deney süresi boyunca özel bir firmadan (Arden Araştırma & Deney, Ankara) temin edilen yüksek yağlı diyete uygun formülasyonda pelet yem ve standart sıçan yemi (kontrol grubu) ile beslenmişlerdir. Yemin enerji ve makro besin ögesi içeriği Çizelge 3.1'de gösterilmiştir (Lichtman vd., 1999).

Çizelge 3.1. Yüksek yağlı diyete uygun formda hazırlanan pelet yemin içeriği

Besin madde miktarı, %	**g**	**kcal**
Protein	20	14,4
Karbonhidrat	33	24,0
Yağ	35	61,60
Toplam		100
Yem İçeriği	**g**	**kcal**
Kazein	200	800
Selüloz, BW200	50	0
Mısır Nişastası	110	440
Maltodekstrin	110	440
Sukroz	111	444
Kolesterol	10	0
Mısır Yağı	25	225
Tereyağı	165	1710
Kakao yağı	160	1440
Mineral Miks S10026	10	0
Dikalsiyum Fosfat	13	0
Kalsiyum Karbonat	5,5	0
Potasyum sitrat, 1 H2O	16,5	0
Vitamin Miks V10001	10	40
Kolik asit	4	0
TOPLAM	**1000**	**5539**

3.2. Metot

3.2.1. Aronya Meyvelerinin Liyofilizasyon (Dondurarak Kurutma) İşlemi

Taze meyveler temizlendi, yıkandı ve ön hazırlık işlemlerinden geçtikten sonra liyofilizasyon işlemine tabi tutuldu. Liyofilizasyon işlemi Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarında (NABİLTEM) liyofilizatör cihazında (Christ alpha 2-4 LD plus, Almanya) gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3).

Liyofilizasyon işlemi 2 aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada meyveler düşük sıcaklık (- 38 °C) ve düşük basınç altında (~0,5 mbar) donduruldu. Dondurma işleminden sonra meyveler kurutma işlemine tabi tutularak kalan su uçurulmuştur. Bu işlem 5 günde tamamlanmıştır. Liyofilizasyon işleminden sonra meyveler vakumlanarak paketlenmiştir.



Şekil 3.3. Liyofilizasyon işlemi

3.2.2. Aronya Meyvesinin Ekstraksiyon İşlemi

Liyofilizasyon ile kurutulan aronya meyveleri öğütülerek ince bir toz haline getirildikten sonra pH 4.9' da %0.01 sitrik asitle muamele edilmiştir. Daha sonra örnekler %70 etanol ile 6 saat süre ile 26 °C sıcaklıkta bekletilmiştir. Ekstraktlar Whatman 415 kağıdından süzülmüş ve içeriğindeki alkol püskürtmeli kurutucu (Büchi B-191 Mini) ile uçurulmuştur (Şekil 3.4; Nicouea vd., 2007).



Şekil 3.4. Aronya meyvesinin ekstrakt ve mikroenkapsüle formu

3.2.3. Aronya Meyvesinin Mikroenkapsülasyon İşlemi

Aronya ekstraktın mikroenkapsülasyonunda kaplama malzemesi olarak maltodekstrin (dekstroz eşdeğeri 16.5–19.5) olan ve arap zamkı kullanılmıştır. Her ikisi de %10.0 katı içeriğe ulaşana kadar suda ayrı ayrı homojenize edilmiştir. Kaplama malzemelerinin solüsyonu maltodekstrin ve arap zamkı 4:1 (v/v) oranında karıştırılarak emülsiye edilmiştir. Kaplama solüsyonu eksrakte edilmiş aronya ile birleştirildi ve manyetik karıştırıcıda 8000 rpm, 60 ^{o}C' de 10 dakika süreyle homojenize edilmiştir. Daha sonra homojenat, mini püskürtmeli kurutucudan (Büchi B-191) oda sıcaklığındaki hava pompa akış hızı 600 mL/dk' da ve sıcaklığı 110 ^{o}C'ye çıkarılarak kurutulmuştur. Mikrokapsüllenmiş toz haline getirilen ürünün stabilitesini sürdürmesi için oda sıcaklığında %50 nemli ortamda ve karanlıkta saklanmıştır (Álvarez-Cervantes vd., 2021).

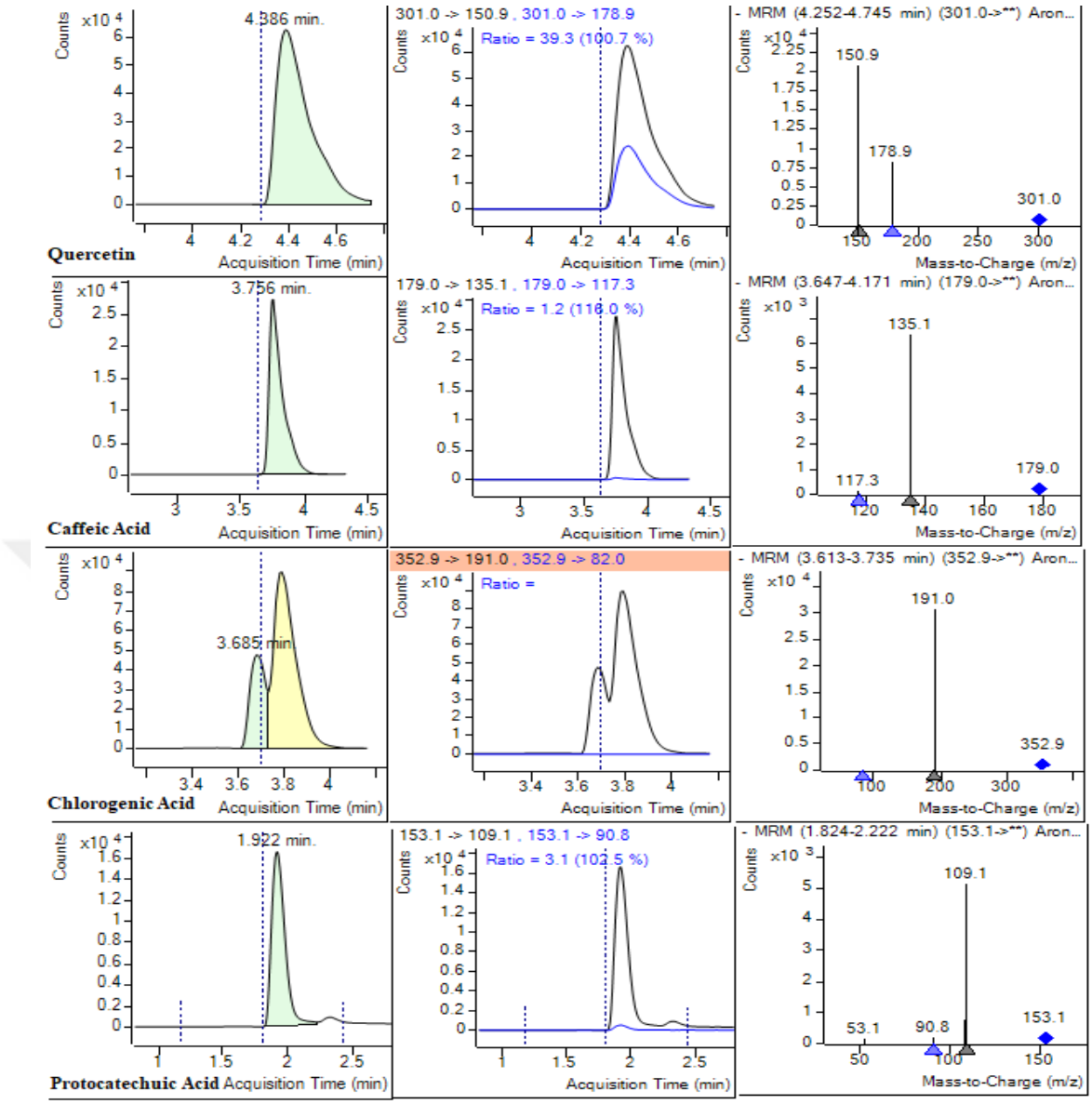
3.2.4. Aronya Meyvesinin Fenolik Bileşik Analizi

Aronya meyvesinin, fenolik bileşiklere ilişkin analizler Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Merkezi (TUTAGEM)'de HPLC cihazında yapılmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Fenolik bileşen analizlerinin yapıldığı HPLC cihazı

Aronya ekstraktları, likit kromatografi-kütle/kütle spektrometresi (LC-MS/MS) kullanılarak üçlü kuadrupol performansıyla analiz edilmiştir. Analiz işleminde standart bileşikler 5-100 ng/ml konsantrasyonları arasında 5 noktada hazırlanmış ve kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Analiz sonucunda elde edilen piklerin alanı eklenen standardın numunedeki konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirilmiştir. Asidik Hidroliz Yöntemin kullanıldığı çalışmada, 100 µl üzerine 2 M HCl çözeltisinden 200 µl ilave edilmiş ve 30 sn. vortekslenmiştir. 90 °C' de ultrasonik banyoda 40 dk bekletilmesinin ardından 700 µl ekstraksiyon solüsyonu (%79 ultra saf su + %20 metanol + %1 formik asit) ilave edilmiştir. Numuneler 9000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiş ve enjeksiyon için berrak süzüntü cam viallere alınmıştır. Fenolik bileşiklerin analizleri, Agilent 1260 infinity likit kromotografi, Agilent 6460 Triple Quadrupole MS/MS Sistem (Jet Stream Electrospray iyon kaynağı) ile gerçekleştirilmiştir (Kelebek vd., 2018). Aronya ekstraktının fenolik bileşikleri Şekil 3.6'da gösterilmiştir.



Şekil 3.6. Aronya ekstraktının fenolik bileşikleri

3.2.5. Toplam Fenolik Madde Analizi

Aronya meyvelerinin toplam fenolik madde miktarı Folin-Ciocalteu yöntemi ile spektrofotometrik olarak Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümünde belirlenmiştir. Aronya ekstratından 150 µl örnek alınmış, 2400 µl saf su ve 150 µl folin reaktifi (0,25 N) test konulmuş ve vortekste 2 dakika karıştırıldıktan sonra üzerine 300 µl sodyum karbonat (1 N) ilave edilmiştir. Karışım oda sıcaklığında 2 saat bekletildikten sonra spektrofotometrede absorbans değerleri 725 nm dalga boyunda okunmuştur. Gallik asitten farklı konsantrasyonlarda hazırlanan standart

çözelti eğrisi çizilip sonuçlar gallik asit eşdeğeri (mg/100 g taze ağırlık) olarak hesaplanmıştır (Thaipong vd., 2006).

3.2.6. Antioksidan Kapasitesinin Belirlenmesi

Aronya ekstraktının ve standart çözeltinin (askorbik asit) antioksidan kapasitesi 1,1-difenil 2-pikrilhidrazil (DPPH) yöntemi kullanılarak ölçülmüştür. Aronya ekstraktı (0.1 mL), 4.9 mL DPPH (0.1 mmol/L metanol) ile karıştırıldı. DPPH'in kalibrasyon eğrisi için farklı konsantrasyonlarda (10-500 µg/mL), standart çözeltiler hazırlandı. Karışım çözeltiler kuvvetlice karıştırılıp ağzı kapatıldıktan sonra karanlıkta 37 ºC'de 20 dakika inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda her bir karışımın 517 nm'de absorbansları ölçülmüştür (Wang vd., 2017). Bu değerlerden ve DPPH'in kalibrasyon eğrisinden faydalanarak aronya ekstraktının DPPH serbest radikalini süpürme kapasitesinin yüzdesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır (3.2).

$$DPPH\ radikal\ süpürme\ kapasitesi\ (\%) = [(Standartın\ absorbans\ değeri - Örneğin\ absorbans\ değeri / Standartın\ absorbans\ değeri)]x100 \quad (3.2)$$

3.2.7. Renk Analizi

Aronya meyvesinin, ekstrakt ve mikroenkapsülasyon formlarının renk ölçümleri Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliğinde (Konica Minolta, CR 148400, Japonya) cihazı ile yapılmıştır (Şekil 3.7). Testlerde CIE renk sistemi kullanılmış ve formül aşağıda gösterilmiştir (3.3).

$$CIE\ L*, a*, b* \quad (3.3)$$

Renk sistemi üç koordinat içermektedir. Buna göre;

(L*) parlaklık (0, siyah ;100, beyaz), (a*) kırmızıdan yeşile (+a, kırmızı; -a, yeşil) ve (b*) sarıdan maviye (+b, sarı;- b, mavi) ve (H*) rengin açısını belirtmektedir.

Kroma değeri ve renk değişim aralığı (ΔE) değerlerinde bakılmıştır (Snell ve Lutz, 2002).



Şekil 3.7. Renk ölçüm cihazı

3.3. Deney Hayvanları Çalışma Gruplarının Oluşturulması

On haftalık 42 adet SD cinsi sağlıklı erkek sıçanlar 6 gruba ayrılmıştır. Standart yem uygulanan diyet kontrol gurubu (SDK) haricinde 5 grubun 35 sıçanı 10 hafta süre ile Çizelge 3.1'de içeriği verilen yüksek yağlı diyet ile beslenmiştir. Yirmi haftalık yaşa kadar yüksek yağlı diyet ile beslenen 5 grubun sıçanlarından bir gurubu kontrol amaçlı yalnız Yüksek Yağlı Diyet (YYD) ile 26 haftalık yaşa kadar beslenmiştir. Diğer 4 gruba 6 hafta süre ile YYD'e ek olarak fenolik bileşikleri ve renk analizi belirlenen aronya ekstraktı veya ekstraktın enkapsüle edilmiş formu 1 kg vücut ağırlığı (VA)'na 200-400 mg denk gelecek şekilde, oral gavaj yoluyla her gün verilmiştir (Şekil 3.8; Şekil 3.9). Deneme süresince yem ve suyun *ad libitum* tüketimi sağlanmıştır.

Deneysel model gruplarının oluşturulması

1- **Standart Diyet Kontrol (SDK)**: Araştırma süresince standart diyet kontrol yemi uygulanan grup.

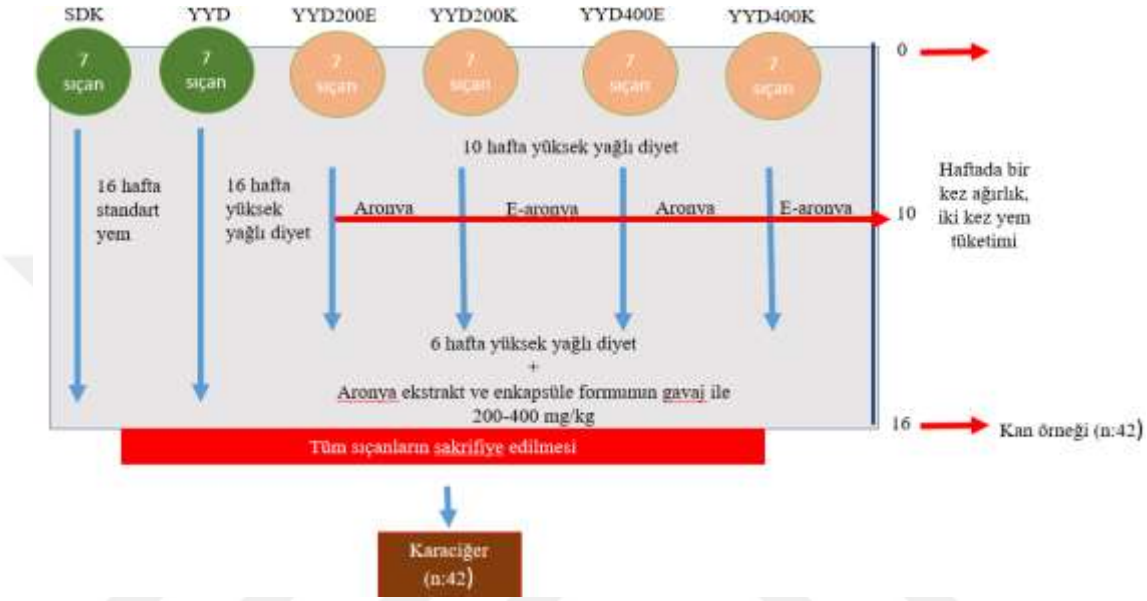
2-**Yüksek Yağlı Diyet (YYD**): Araştırma süresince yüksek yağlı diyet uygulanan grup.

3- **YYD200E**: Araştırma süresince YYD+aronya ekstraktı oral gavaj (200 mg/kg VA/gün) yoluyla uygulanan grup.

4-. **YYD200K**: Araştırma süresince YYD+enkapsüle edilmiş aronya ekstraktı oral gavaj (200 mg/kg VA/gün) yoluyla uygulanan grup.

5- **YYD400E**: Araştırma süresince YYD+aronya ekstrakt oral gavaj (400 mg/kg VA/gün) yoluyla uygulanan grup.

6- **YYD400K**: Araştırma süresince YYD+enkapsüle edilmiş aronya ekstraktı oral gavaj (400 mg/kg VA/gün) yoluyla uygulanan grup.



Şekil 3.8. Deneme grupları ve araştırmanın çalışma süreleri



Şekil 3.9. Vücut ağırlığı, yem tartımları ve gavaj uygulamasına ilişkin uygulamalar ile ilgili görseller

3.3.1. Anestezi, Kan Alma ve Ötanazi

Sıçanlar 10 hafta standart yem ve ardından standart kontrol grubu hariç diğer 5 grup 10 hafta daha YYD ile beslenmişlerdir. 20 haftalık yani ergin yaşa (Ghasemi vd., 2021) gelindikten sonra YYD ile beslenenlerden bir grup hariç (YYD) diğer 4 grup YYD ile beslenirken ek olarak aronya ekstraktı (hem kapsüllenmiş ve hem de kapsüllenmemiş formundan 200 ve 400 mg/kg VA) verilmiştir. Aronya ekstraktı YYD ile beslenenlere ekstra diyet müdahalesi gavaj yöntemiyle 6 hafta sürdürülmüştür. 26 haftalık yaşı dolduran sıçanlara anestezi altında kan alma ve sakrifiye işlemleri uygulanmıştır. Kan alma ve ötanazi işlemleri de Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

3.3.1.1. Anestezi

Sıçanlar genel anestezi altında, terminal vücut ağırlıkları ölçüldükten sonra subkutan ketamin (Richter Pharma, Avusturya) ve ksilazin (Alfasan International B.V., Hollanda) enjeksiyonu ile araştırmacılar tarafından alınmıştır. Anestezi uygulama işleminde 150 mg/kg vücut ağırlığı ketamin ve 5 mg/kg vücut ağırlığı ksilazin kullanılmıştır.

3.3.1.2. Kan ve Doku Alma ve Ötanazi

Sıçanların derin anesteziye girmeleri için gerekli sürenin (10-15 dk) ardından, her bir sıçanın sabitlenerek kalbinden 2 farklı tüpe kan alınmıştır. Ötenazi işlemi kan alındıktan sonra eksanguinasyon ile yapılmıştır. Kanlar mor (VacuSEL, K3EDTA, Konya-Türkiye) kapaklı 3 ml tüplere alındıktan sonra yarım saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından örneklerden birer tanesi 3000 g'de 15 dakika santrifüj (Heraeus Labofuge, Hanau, Germany) edilmiştir. Ayrılan plazma örnekleri, santrifüjden hemen sonra steril ependorflara koyularak analiz edilene kadar -80 ^{o}C'de saklanmıştır. Ötenazi sonrası aort ve karaciğer histopatolojik analiz için ayrılmıştır. Sakrifiye edilen sıçanlardan elde edilen karaciğer dokuları, ilk olarak PBS (Fosfatlı Salin Tampon) çözeltisine batırılmış ve steril koşullarda, darası alınmış ağzı kilitli poşetlere yerleştirilmiştir. Bu işlem sonrasında, karaciğer dokularının ağırlıkları hassas tartı cihazı ile ölçülmüştür. Karaciğer dokusu, diğer organlardan uygun şekilde diseke edilerek ayrılmıştır. Karaciğer,

iki eşit parçaya bölünmüş ve bir kısmı gen ekspresyonu analizleri için steril ependorf tüplerine alınarak, analiz edilene kadar -80 ^{o}C'de saklanmıştır. Karaciğerin kalan kısmı ise aort ile birlikte 100 ml'lik steril kaplara konuldu üzerine %10'luk nötral tamponlu formalin (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Almanya) solüsyonu eklenerek 24 saat süreyle fiksasyonu sağlandı (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. Sıçanların sakrifiye edilmesi, kan ve doku örneklerinin alınması

3.4. Vücut Kitle İndeksinin Hesaplanması

Tüm grupların vücut ağırlığı (VA) tartımları (g) ve nazo-anal uzunlukları (cm) (kuyruk hariç) deneme sonunda sıçanlar sakrifiye edilmeden önce yapılmıştır (Şekil 3.11). Sıçanlarda vücut kitle indeksi (VKİ) Tekgül vd. (2012)'ye göre hesaplanmıştır.

3.5. Obezite Durumu Değerlendirilmesi (Lee İndeksi)

Sıçanlarda obezitenin göstergesi adına kullanılan Lee indeksi, vücut ağırlığının küpkökünün nazoanal uzunluğuna bölünmesi ile hesap edilmiştir Wang vd. (2017).



Şekil 3.11. Sıçanların boy ve bel çevresi ölçümleri

3.6. Ateroskleroz ve Koroner Risk İndeksinin Hesaplanması

Ateroskleroz indeksi ve koroner risk indeksinin hesaplanmasında aşağıdaki formüller kullanılmıştır (3.4 ve 3.5; Kazemi vd., 2018b).

$$Ateroskleroz\ indeksi: (Total\ kolesterol - HDL)/HDL\ kolesterol \quad (3.4)$$

$$Koroner\ risk\ indeksi: Total\ kolesterol\ /\ HDL\ kolesterol \quad (3.5)$$

3.7. Biyokimyasal Analizler

3.7.1. Yüksek Dansiteli Lipoprotein Kolesterol (HDL) Analizi

Sakrifiye edilen sıçan karaciğer doku örneklerinden 1.5 ml ependorf tüplere ve sakrifiye edilen sıçan kanlarından santrifüj sonrası plazmalarından alınan örnekler 0.2 ml ependorf tüplere konulmuştur. Rat HDL ELISA kit (Sunred Catalogue No:201-11-0255, Çin) protokol yönergesine göre aşağıdaki şekilde örnekler hazırlanmıştır.

1) Standartlar mikroelisa kuyucuklarına 8 mmol/L (120 µL standart +120 µL standart dilüye) olacak şekilde ilk kuyucuğa ilave edildikten sonra bunun yarısını çekip yeni tüpe aktarıldı. Benzer şekilde, sürekli yarılayıp 4 mmol/L, 2 mmol/L, 1 mmol/L, 0.5 mmol/L olacak şekilde standartlar hazırlanmıştır.

2) Örneklerin konulduğu mikroelisa kuyucuklara 50 µL standart ile 50 µL streptavidin-HRP pipetle eklendi.

3) Kan plazma/doku supernatant 40 µL otomotik pipet yardımı ile mikroelisa kuyucuklarının içine eklendi.

4) Kuyucuklardaki örneklerin içine 10 µL PON1 antibody ve 50 µL streptavidin HRP ilave edildi.

5) Yapışkan bant ile ile kuyucukların üzeri kapatıldı ve yavaşça çalkalandı ve ardından 1 saat 37 ^{o}C da inkübasyon cihazında bekletildi.

6) İnkübe edildikten sonra kuyucukların içindeki sıvı boşaltıldıktan sonra 30x yıkama solusyonu kullanılarak hazırlanıp 350 µL solüsyonu ile kuyucukların içi 3 kez yıkandı.

7) Daha sonra kuyucukların içine 50 µL Chromogen A solüsyonu ve 50 µL Chromogen B solüsyonu eklenmiştir.

8) 10 dk 37 ^{o}C bekletildi.

9) 50 µL reaksiyonu durdurma solüsyonu eklendi.

10) Örnekler 450 nm dalya boyunda ELISA okuyucuda okutuldu.

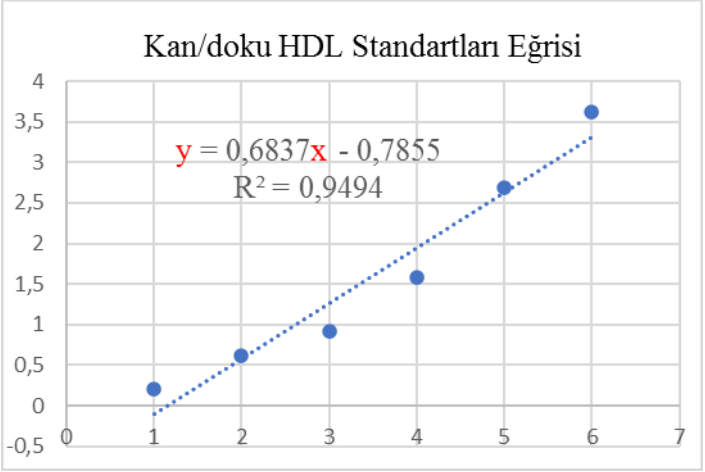
11) ELISA okuyucu cihazının (Thermo Scientifi Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer-USA) verdiği optik dansite (OD) değerleri cihazdan okunarak kaydedildi.

12) "OD" değerleri hazırlanan standartlara ve miktarlara göre formüle edildi. Sonuçların hesaplanması için Dikey (Y) eksendeki her standart için ortalama optik yoğunluğu yatay (X) eksenindeki konsantrasyona göre standart eğri oluşturulmuş ve grafikteki noktalardan en uygun eğri çizilmiştir (Şekil 3.12).

ELISA HDL standart eğrisinin formülü aşağıda gösterilmiştir (3.6).

$$HDL\ (mmol/L)\ Y = 0{,}6837X - 0{,}7855 \quad (3.6)$$

$R^2 = 0{,}9494$



Standartlar (mmol/L)	
0	0,2049
0.5	0,6213
1	0,9237
2	1,5898
4	2,6854
8	3,619

Şekil 3.12. HDL standart çözeltilerin seyreltilme aşamaları

3.7.2. Toplam Kolesterol ve Trigliserid Analizi

Kan örneklerinde toplam kolesterol (Roche Accutrend Cholesterol 25 STR) ve trigliserid (Accutrend Trigli 25 STR) değerleri (Accutrend Plus, İsviçre) cihazıyla ölçülmüştür (Şekil 3.13). Yapılan çalışmalarda Accutrend Plus ile yapılan ölçümün normal laboratuvar sonuçları ile yüksek korelasyon gösterdiği ve lipit profilinin incelenmesinde kullanılabileceği belirtilmiştir (Conte vd., 2015). Bu cihaz ile yapılan ölçümün hiperlipitemi tanısı koymaktan ziyade kardiyovasküler riski belirlemede kullanılabileceği bildirilmiştir (Scafoglieri vd., 2012; Coqueiro vd., 2014).



Şekil 3.13. Accutrend plus toplam kolesterol ve trigliserid ölçüm cihazı

3.7.3. Düşük Dansiteli Lipoprotein Kolesterol Analizi, Çok Düşük Dansiteli Lipoprotein Kolesterol Hesaplanması

LDL ve VLDL düzeyleri Friedewald formülü kullanılarak hesaplandı (Friedewald vd., 1972).

$$LDL: (Toplam\ kolesterol - (HDL + VLDL\ kolesterol) \quad (3.7)$$

$$VLDL: \text{Trigliserid}/5 \quad (3.8)$$

3.7.4. Malondialdehit (MDA) Analizi

Malondialdehit düzeyinin belirlenmesinde rat ELISA kiti (Sunred Catalogue No:201-11-0157, Çin) kullanılmıştır. Bu sandviç kiti sıçan kan plazmasında ve doku supernatantlarındaki MDA'nın kantitatif tespiti için hazırlanmıştır. Enzime bağlı immünosorbent (ELISA) kitidir. Kuyucukların plakaları, MDA antikoru ile önceden kaplanmıştır. Kan plazmasında veya doku supernatantlarında bulunan MDA kuyucuklarının üzeri kaplanmış MDA antikorlrı ile etkileşime girer antikorlara bağlanır. Standart çözeltiler ve örnekler Sunred firmasının ELISA kit protokol yönergesine (Sunred Catalogue No: No:201-11-0157, Çin) göre aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır. Deneyler oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

Standart eğri grafiği oluşturabilmek amacı ile aşağıda belirtilen şekilde standartlar hazırlanmıştır.

1) Önce standartlar ELISA kuyucuklarına 240 ng/ml (120 µL standart +120 µL standart dilisyon solüsyonu) olacak şekilde ilk kuyucuğa koyduktan ve sonra bunun yarısını çekip yeni tüpe aktardık. Benzer şekilde, sürekli yarılayıp 120 ng/ml, 60ng/ml, 30ng/ml, 15ng/ml, 0 µL olacak şekilde standartlar hazırlanmıştır (Çizelge 3.2).

2) Hazırlana kan ve doku örneklerinin 40 µL onulduğu ELISA kuyucuklarının içine konuldu, üzerine 50 µL standart dilisyon solüsyonu ile 50 µL streptavidin-HRP pipet ile ilave edildi.

3) Kan ve doku örnekleri içeren ELISA kuyucuklarına 10 µL PON1 antibody ve 50 µL streptavidin HRP eklendi.

4) ELISA kuyucuklarının üzeri yapışkan bant ile kapatıldı ve yavaşça çalkalandı ardından 1 saat 37 ^{o}C de inkübasyon cihazında bekletildi.

5) İnkübe edildikten sonra kuyucukların içindeki sıvıyı boşaltıldı ve 350 µL yıkama çözeltisi ilekuyucuklar 3 kez yıkandı.

6) Daha sonra kuyucukların içine 50 µL Chromogen A ve B solüsyonu eklenmiştir.

7) ELISA kuyucukları 10 dk 37 ^{o}C karanlık ortamda bekletildi.

8) 50 µL reaksiyon durdurucu solüsyonu eklendi ve renk değişiminin maviden sarıya dönmesi sağlanıldı ve 15 dk bekletildi.

9) 450 nm dalga boyunda ELISA okuyucuda okutularak örneklerin OD değerleri belirlendi.

10) "OD" değerleri hazırlanan standartlara ve miktarlara göre formüle edildi. Sonuçların hesaplanması için dikey (Y) eksendeki her standart için ortalama optik yoğunluğu yatay (X) eksenindeki konsantrasyona göre standart eğri oluşturulmuş ve grafikteki noktalardan en uygun eğri çizilmiştir (Şekil 3.14).

Çizelge 3.2. MDA standart çözeltilerin seyreltilme aşamaları

6.4 nmol/ml	Standart No:5	120 µL Orijinal Standart+120 µL Standart Seyreltici
3.2 nmol/ml	Standart No:4	120 µL Standart No:5+120 µL Standart Seyreltici
1.6 nmol/ml	Standart No:3	120 µL Standart No:4+120 µL Standart Seyreltici
0.8 nmol/ml	Standart No:2	120 µL Standart No:3+120 µL Standart Seyreltici
0.4 nmol/ml	Standart No:1	120 µL Standart No:2+120 µL Standart Seyreltici

ELISA MDA standart eğrisine göre oluşturulan grafikteki Y değeri ELISA absorbans sonrası çıkan OD değerini temsil eder. X değeri ise standart eğrinin çizgi regresyon denkleminin optik dansiteye göre denklem numune yoğunluğunu hesaplar.

R^2 değeri standart sapma katsayını ifade eder. R^2 değeri 1'e ne kadar yakın ise doğruluk payı artar.

ELISA MDA eğrisinin formülü aşağıda gösterilmektedir (3.9)

$$MDA\ (nmol/ml), Y = 0{,}2855X - 0{,}355 \quad (3.9)$$

$R^2 = 0{,}9233$



Standartlar (nmol/ml)	
0	0,0439
0.4	0,2750
0.8	0,3892
1.6	0,5956
3.2	0,9895
6.4	1,5726

Şekil 3.14. MDA ELISA standartları

3.7.5. Aspartat Aminotransferaz Tayini (AST)

Plazmadaki AST düzeyleri (Biolabo Katalog No: 80025) spektrofotometrik ticari kitler (Biolabo, Maizy, Fransa) kullanılarak bir mikroplaka okuyucu (Epoch, Biotek, Vermont, ABD) kullanılarak 340 nm' de okundu ve kaydedildi. Absorbans değerleri 1 dk arayla üç kez ölçülmüştür. Elde edilen veriler aşağıdaki formül ile IU/L birimi olarak hesaplanmıştır (3.10).

$$\Delta\, abs/dk \ * 1746 \qquad (3.10)$$

3.7.6. Alanin Aminotransferaz Tayini (ALT)

Plazmadaki ALT düzeyleri (Biolabo Katalog No: 80027) spektrofotometrik ticari kitler (Biolabo, Amizy, Fransa) kullanılarak bir mikroplaka okuyucu (Epoch, Biotek, Vermont, ABD) kullanılarak 340 nm'de okunmuş ve kaydedilmiştir. Absorbans değerleri 1 dk arayla üç kez ölçülmüştür. Elde edilen veriler aşağıdaki formül ile IU/L birimi olarak hesaplanmıştır (3.11).

$$\Delta\, abs/dk \ * 1746 \qquad (3.11)$$

3.8. Kan ve Doku Örneklerinde Total RNA İzolasyonu

Kan ve doku örneklerinde total RNA izolasyonu HY-GRNA-50 kiti (Hydra-Türkiye) kullanılarak yapılmıştır. RNA örnekleri kitteki yönergelere uygun şekilde hazırlanmıştır. Öncelikle 50'lik RNA izolasyonu için önceden 18 ml RY1 tamponu için 12 ml etanol eklenerek 30 ml' ye tamamlandı. 12 ml RY2 tamponu için 48 ml etanol tamponu eklenerek 50 ml' ye tamamlanır.

1) Doku örnekleri için 50-100 mg karaciğer dokusu alınmış 1 mL HT tamponu ilave edilmiş ve dokular solüsyon içinde homojen haline getirilmiştir. Kan örnekleri için 250 µL koagüle olmamış tam kan üzerine 1 mL HT tamponu eklenmiş ve karışım homojen olana kadar 30 sn-1 dk arası vortekslenmiştir.

2) Nükleoprotein kompleksinin parçalanması için örnekler 5 dk inkübasyon bırakılır. İnkübasyon sonrasında örnekler 4 ^{o}C de, 10900 xg de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant, yeni bir RNAz bulundurmayan mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.

3) 200 µL kloroform eklendi,15 sn vorteks ile homojen hale gelene kadar karıştırıldı ve buz üzerinde 10 dk inkübasyona bırakıldı.

4) Örnekler 4 ^{o}C de 10900 x g de 15 dk santrifüj edildi. Santrifüjden sonra karışım 2 faza ayrıldı. RNA en üst tabakada renksiz görünen faz içerisinden pipet yardımı ile alttaki diğer fazların karışmasına olanak vermeyecek şekilde dikkatlice RNAz bulundurmayan boş 2 ml'lik tüplere aktarıldı.

5) Alınan renksiz fazın hacmine göre üzerine ½ oranında önceden soğutulmuş saf etonol (%99,9) eklenir.

6) Karışım vorteksle iyice karıştırılır, etanol eklendikten sonra çökelmeler oluşmaktadır.

7) Filtreli tüpe aktarılan karışım 4 ^{o}C de 10900 x g de 30 sn santrifüj edildikten sonra filtrenin altındaki tüpte toplanan sıvı kısım uzaklaştırıldı. Filtre içindeki RNA içeren kısım santrifüjden sonra bunlarda filtreden geçirilerek birleştirilir.

8) Filtreye 500 µL RY1 eklendi ve 4 ^{o}C de 10900 x g' de 30 sn santifüj edildi ve yine altta kalan sıvı atıldı. Santrifüj sonrası tüpler ters çevrilerek kurutma kağıdına ters çevrilerek konulur.

9) Daha sonra filtreye 500 µL RY2 eklendi,1 dk oda sıcaklığında inkübasyon yapıldı sıvının ve alkolün uçması sağlandı. 4 ^{o}C de 10900 x g de 30 sn santrifüj edildi ve altta kalan sıvı atıldı.

10) 9. adım tekrarlandı.

11) Filtreli tüp 10900 xg de 2 dk santrifüj edildi.

12) Kolon 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine yerleştirildi. Direkt olarak membran üzerine 120 µl DEPC ile muamele edilmiş su eklendi. 2 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı sonra RNA'nın bu su içerisinde toplanması için 10900 x g de 2 dk santrifüj edildi. Tüp içerisinde saf RNA bulundurmaktadır. Uzun süreli saklama için RNA'yı -70 ^{o}C de muhafaza edildi.

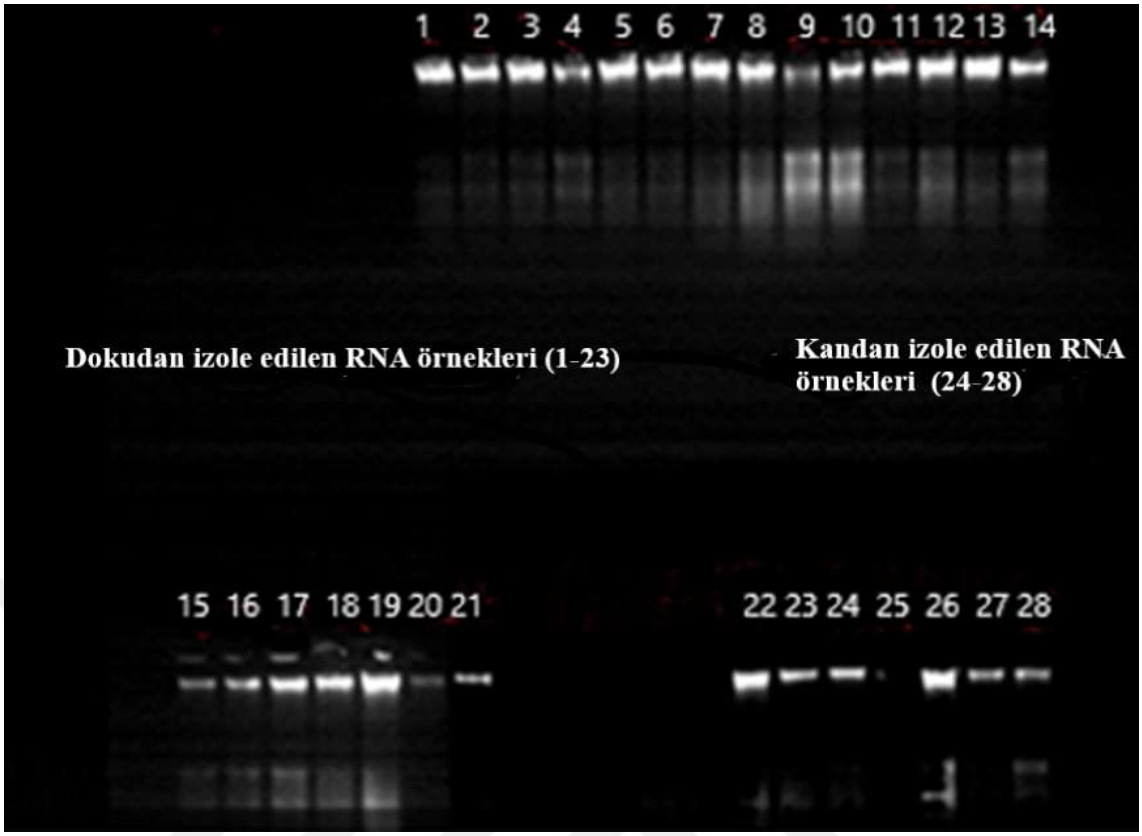
3.9. RNA Miktarı Belirleme ve Kalite Tayini

RNA miktarını belirlemek için DPEC'li su hazırlandı. 1000 ml'lik saf suya %97 saflığında dietil pyrocarbonattan 1 mL (Thermo Fisher Scientific Acros Organics Katalog numarası 170250250) karıştırıldı. DPEC'li su 1 gün boyunca magnetik balık ile homojenize edildi ve sonraki gün jel için kullanıma hazır hale getirildi (Şekil 3.15). RNA için % 0.5x konsantrasyonlu agaroz (Sigma-Aldrich PCode:101716032 A9539-100G) jel ise 10 x TBE den 50 ml alınarak üzerine 950 ml DPEC'li hazırlandı.



Şekil 3.15. DPEC'li suyun hazırlanması

Agaroz jel hazırlama: 2 g haldeki agaroz (Sigma-Aldrich PCode:101716032 A9539-100G) hassas terazide tartılmıştır. Üzerine 200 ml DPEC'li su eklendi ve mikrodalgada 250 ^{o}C'de 5 dk çözünmesi sağlanmıştır. Soğuduktan sonra jel tankına 200 ml için 6 µl etidyum bromür eklendi. 10 µl RNA örnekleri sonra 3 µL yükleme boyası (Sigma Aldrich; G7654) ile karıştırıldı jeldeki kuyucuklara yüklendi. Jel küveti DEPC su ile doldurulup elektroforez cihazında (JUNY1 JY300C) 120 Volt (V), 80 miliamper (mA) akımda 30 dk yürütülmüştür. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jel görüntüleme cihazında (DNR marka Biolmaging Systems Minibis Pro) yürütülen RNA lar UV ışığı altında görüntülenmiştir. RNA görüntüleme işlemi Gel Quant programı ile görüntüleme işleminde kullanılmıştır (Şekil 3.16).



Şekil 3.16. Total RNA kan izolasyonu örneklerinin jel elektroforez görüntüsü

3.10. DNAse I ve RNAse FRee Uygulaması

DNAse I, RNAse-free (1 U/µL) ürünün saflaştırılması işlemi ticari olarak satın alınan kit (Thermo Fisher Scientific marka ve katolog numarası: EN0521) protokolüne göre gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. DNAse 1 RNAse FRee uygulaması aşamaları

RNA	1 µg/µL
10 X Reaction buffer ile $MgCl_2$	1 µL
DNase 1, Rnase-free	1 µL(1U)
DEPC ile muamele edilmiş su	7 µL
Toplam hacim	10 µL

1) İlk aşamada Çizelge 3.3'deki karışım hazırlandı.

2) Hazırlanan karışım 37 ^{o}C'de 30 dk inkübe edildi.

3)1 µL 50 mM EDTA çözeltisi ekledikten sonra 65 ºC de 10 dk inkübe edilir.

4) Bu işlemden sonra DNA' dan arındırılmış RNA'lar hazır hale gelir.

3.11. cDNA Sentezi

cDNA sentezi ticari bir firmadan alınan cDNA sentez kiti (Hydra Türkiye, Katolog No: 22002042201) kullanılarak ve aşağıda verilen protokole göre yapılmıştır.

1-Tüm bileşenler buz üzerinde eritilir, hafifçe karıştırılır ve kısa sürede santrifüj edilir.

2-Her bir örnek için oluşturulan 20 µL'lik konsantrasyon hacmi;

5 µL RNA

1 µL cDNA Enzim karışımı

4 µL Reaction buffer

10 µL dH_2O

Toplamda 20 µL' lik total hacim oluşturuldu.

3- Hazırlanan reaksiyon karışımı hafifçe karıştırıldı ve kısa sürede santrifüj edildi.

4-cDNA sentezi 1 saatliğine 42 ºC'de inkübasyon ile yapılır, inkübasyon sonrası buz üzerine alındı.

5-Reverse Transkriptaz enzimi inaktivasyonu, 80 ºC'de 10 dakika işlem yapıldı.

6-Bileşen dH_2O kullanılarak 200 µL'ye dilüye edildi.

7-Yeni sentezlenen cDNA sonraki uygulamalar için hazır hale getirildi.

8-Uzun süreli saklama için sentezlenen cDNA -20 ºC'de saklandı.

9-PCR uygulamaları için dilüye cDNA reaksiyonu total reaksiyon hacminin 1/10 konsantrasyonunda kullanıldı.

Çizelge 3.4. cDNA PCR protokolü

42 ºC de	1 saat
80 ºC de	10 dk

Her bir tüp dH_2O ile 180 µL dilüe edildi. Sonra cDNA'lar -20 ºC' de qPCR'da kullanana kadar geçen süre zarfında saklandı. Çizelge 3.4'te verilen cDNA PCR protokolüne göre amplifikasyon işlemleri gerçekleştirildi.

3.12. Genomik DNA (gDNA) İzolasyonu

NCBI'ın Prime3 programı kullanılarak PON1 ve houskeeping olarak kullandığımız β-aktin geninin primerleri ve uygun bağlanma sıcaklıkları belirlenmiştir. Ançak primerler labaratuvar koşullarında, bağlanma sıcaklıklarında değişiklik göstermişlerdir. Bu yüzden ratların gDNA analizi yapılmıştır. Daha sonrada labaratuvar koşullarında primerlerin uygun bağlanma sıcaklıkları gredient PCR' da belirlenmiştir.

gDNA İzolasyonu: Dokudan genomik DNA izolasyonu, ticari kit (Hibrigen- katalog no: DHDNA-01) kullanılarak ve kit protokolüne göre aşağıdaki uygulamayla elde edilmiştir.

1) Karaciğer dokusu (taze veya -80 ºC de muhafaza edilmiş) 10 mg olacak şekilde ince olarak kesilip 1.5 ml mikrosantrifüj tüpüne aktarılır.

2) 300 µL DHP tamponu eklenir ve vorteks yardımı ile homojen olana kadar karıştırılır.

2) 20 µL Proteinaz K ve 120 µL DA tamponu eklenir. Vorteks ile karıştırılır. 65 ºC de 60 dk inkübe edilir ve homojen bir solüsyon elde edilir.

4) Örnek üzerine 120 µL DB Tamponu ve 220 µL önceden soğutulmuş etanol (96-100%) eklenir ve vorteks ile karıştırılır. Örnek ve etanolün iyice karışması önemlidir. Karışımın tamamı pipet yardımı ile 2 ml toplama tüpü üzerine yerleştirilmiş filtreli tüpe aktarılır.

5) 12000 rpm de 1 dk santrifüj edilir. Toplama tüpüne süzülen sıvı atılır.

6) 500 µL DY Tamponu filtreli tüpe eklenir ve 12000 rpm de 1 dk santrifüj edilir. Toplama tüpüne süzülen sıvı atılır. Bu aşama tekrarlanır. DY tamponuna kullanmadan önce 10 ml etanol eklenildi kullanıma hazır hale geldi.

7) Toplama tüpüne süzülen sıvı atılır. Filtreli tüp membranının kuruması için hiçbir sıvı eklenmeden filtreli tüpler 12000 rpm de 3 dk santrifüj edilir. Toplama tüpü süzülen sıvı ile birlikte atılır.

Filtreli tüpün membranın kuruması önemlidir, çünkü membranda kalan etanol daha sonra yapılacak olan reaksiyonları etkileyebilir. Bu santrifüj işleminden sonra

elüsyon adımına geçilir. Santrifüjden sonra filtreli tüpler toplama tüplerinden çıkarılırken dikkat edilmesi gerekir. Toplama tüpüne süzülen etanol bulunduran sıvı filtreli tüp ile temas ederse 12000 rpm de 1 dk santrifüj işlemi tekrar edilmelidir.

8) Filtreli tüpler 1.5 ml lik miktrosantrifüj tüpüne atılır ve direkt membran üzerine 120 µL DE Tamponu (60 ºC ye ısıtılmış) eklenir. Oda sıcaklığında 2 dk inkübe edilir ve 12000 rpm de 2 dk santifüj edilir. Pürifiye edilmiş DNA tüplerdedir. -20 ºC de muhafaza edilir.

3.13. Gradient PCR Analizi

Bir örnek için izole ettiğimiz gDNA da kullandığımız PCR mix içeriği Çizelge 3.5'de sunulmuştur.

Çizelge 3.5. PCR mix içeriği

İçerik	**Miktar**
Mastermix (K0171, Fermentas)	12.5 µL
Primer F (10 pmol/µL)	1 µL
Primer R (10 pmol/µL)	1 µL
Su	5.5 µL
Örnek DNA (50 ng/µL)	5 µL
Toplam Hacim	25 µL

β-aktin ve PON1 olarak 2 çift primer kullanılmıştır.(Çizelge 3.7)'de belirtilmiştir. Çalışma öncesinde gradient PCR da primerlerin ortak bağlanma sıcaklıklarını tespit edilmiştir. Doksan altı kuyucuklu PCR cihazında (Applied Biosystems Profilex) aynı anda 6 farklı bağlanma sıcaklığı için değerlendirme yapılmıştır.

Laboratuvar koşullarında primerlerin 57-61 ºC arasında uygun bağlanma sıcaklıkları gredient PCR'da çalışılmıştır (Şekil 3. 17). Çizelge 3. 5'deki PCR mix içeriği kullanılarak PCR çalışması gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.6). Çalışmada primerler için uygun bağlanma sıcaklığı 59 ºC olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.17. Gradient PCR bağlanma sıcaklıkları

PCR'dan elde edilen ürünlerin (hedef DNA parçalarının) hangi sıcaklıkta daha iyi bağlanıp DNA parçalarını (fragmentleri) çoğalttığını somut olarak görmek için agaroz jele yüklenerek belirlendi.

Çizelge 3.6. Gradient PCR cihaz yükleme protokolü

Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
95 ºC	3 dk	1
95 ºC	30 sn	35
59 ºC	45 sn	35
72 ºC	60 sn	35
95 ºC	1 dk	1

Jel solüsyonu hazırlanmadan önce; 10X Tris Borat EDTA'dan (TBE)'den %5 lik (0.5X) TBE hazırlandı.

Elektroforez tankı haznesini doldurmak ve jeli hazırlamak amacıyla 10X TBE tamponu uygun miktarda 0.5 TBE tamponu elde etmek için seyreltilmiştir. 200 ml jel hazırlamak için 1000 ml'lik %5'lik TBE hazırlanmıştır.

100 ml saf suda 5 ml TBE varsa

1000 ml saf suda X=?

X = 50 ml TBE

950 ml saf su+50 ml TBE 1000 ml ye tamamlanarak %5 konsantrasyonlu TBE (0.5X TBE) hazırlanmıştır.

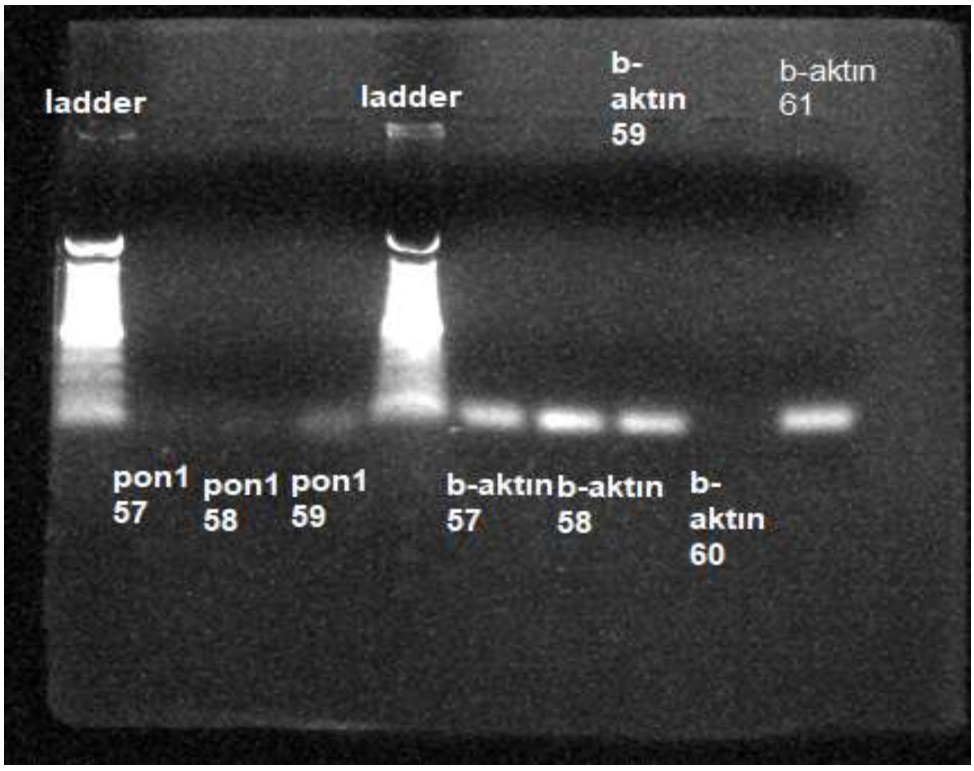
100 ml lik %5'lik agaroz jel hazırlamak için 5 gram agaroz tartılıp bir erlen içerisine dökülmüştür. Üzerine 200 ml 0.5X TBE ilave edilerek mikrodalga fırında agaroz tamamen çözülünceye kadar kaynatılmıştır.

Aralıklarla erlen mikrodalgadan çıkarılıp çalkalanmıştır. Jel kaynamaya başladıktan sonra mikrodalganın ısısı düşürülmüştür. Tamamen eriyinceye kadar çalkalanarak ısıtılmıştır. Agaroz jel çözündükten sonra katılaşmamasına dikkat edilerek oda sıcaklığında (20 ^{o}C) de soğuması için beklenilmiştir. 200 ml jel için 6 µL etidium bromür (EtBr) eklenmiştir. Erlen içindeki ılık jele eklenen EtBr'ün tüm çözeltiye homojen olarak dağılması için erlen çalkalanarak karıştırılmıştır. Temiz, kuru ve plastik WEALTEC (Wealtec Corp model: GES) marka jel elektroforez tankının kenarları uygun bloklarla kapatıldıktan sonra agaroz jelde yükleme kuyucuklarının oluşması için 200 ml jel için 15 kuyucuklu tarak yerleştirilmiştir. Jel tankında tarakların doğru olarak yerleştirilip yerleştirilmediği kontrol edildikten sonra jel üzerinde herhangi bir kabarcık kalmamasına dikkat edilerek jel yavaşça dökülmüştür. Oluşan kabarcıklar bir pipet ucuyla jelin içinden tankın kenarlarına doğru çekilmiştir.

Agaroz jelin katılaşması için oda ısısında 15-30 dk bekletildikten sonra tankın kenarlarındaki bloklar ve tarak dikkatlice çıkarılıp, jel tankında elektroforez haznesine yerleştirilmiştir. 0.5 X TBE elektroforez tamponu hazırlamak için kullanılan tampon jelin üstünü kapatana kadar, yani tampon kuyucukların üstünü kapatana kadar 0.5 X TBE tampon ile doldurularak kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Gradient PCR dan çıkan izole hedef DNA fragmentlerini içeren PCR ürününden 10'ar µL0,2 ml'lik PCR tüplerine alındı ve üzerlerine 6 µL'de yükleme boyası (Thermo Fisher 6X DNA loading dye) eklendi. Boya ile karıştırılan örnekler jel üzerinde oluşturulan kuyucuklara yüklendi. 1. ve 5. kuyucuğa 100 bp'lık DNA Ladderdan (İnvitrogen) 14 µL eklendi. PON1 gen fragment örneklerini 1 ve 5. kuyucuklar arasındaki

3 kuyucuğa, son 5 kuyucuğa ise β-aktin geni DNA fragmentlerini içeren PCR ürünleri içeren örneklerden 16'şar µL jel kuyucuklarına yüklendi. Elektroforez cihazı (JUNY1 JY300C) 120 Volt (V) ve 80 miliamper (mA) akıma ayarlanarak PCR ürünleri jelde 30 dk yürütüldü. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jel görüntüleme cihazına (DNR marka Biolmaging Systems Minibis Pro) alınarak jel yüklü DNA fragmentleri UV ışığı altında görüntülenmiştir (Şekil 3.18). DNA görüntülemede Gel Quant programı kullanılmıştır. Gradient PCR da en parlak bantlar yoğunluğu en fazla olan DNA fragmentlerini içermektedir. Dolayısıyla gözlenen en iyi bantlar en uygun primer bağlanma sıcaklığını vermektedir. Şekil 3.18'de gradient PCR'dan elde edilen PON1 ve β-aktin geni DNA fragmentlerini içeren PCR ürünleri görüntüleri verilmiştir.



Şekil 3.18. Gradient PCR sonuçlarının agaroz jel elektroforezinde görüntülemesi



Şekil 3.19. DNR marka Biolmaging Systems Minibis pro jel görüntüleme cihazı

Agaroz jel elektroforezinde yürütülen PCR ürünlerinin görüntülenmesi sonucunda en uygun bağlanma sıcaklığı PON1 için 59 ºC olduğu görülmüştür (Şekil 3.18).

3.14. qPCR Uygulaması

PON1 mRNA ekspresyon düzeyi Real Time PCR Trakya Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik Laboratuvarında (Thermo scientific Piko Real time PCR- TCR0096) ile SYBR Green (Hydra HY-HSYBR-ROX-200, Türkiye) tekniği ile belirlenmiştir.

PON1 (Macrogen Europe, Türkiye) genlerinin ekpresyonunun belirlenmesi için ve β-aktin geni houskeeping (Oligomer-Omer50, Türkiye) olarak kullanılmıştır. İlgili genlerin hedef bölgelerinin belirlenmesinde aşağıdaki ileri ve geri primerler kullanılmıştır (Sabah, 2010; Çizelge 3.7).

Çizelge 3.7. PON1 geni ve β-aktin geni primerleri

Gen	İleri Primer (Forward)	5'-TTCCTTTGTACACAGCAGCG-3'	300 bp
PON1	Geri Primer (Reverse)	5'-TGCTGGCTCACAGATTTC-3'	
β-aktin	İleri Primer (Forward)	5'CTCTGGCTCCTAGCACCATGAAGA-3'	200 bp
	Geri Primer (Reverse)	5'GTAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'	

1) Tüm bileşenler buz üzerinde eritildi, hafifçe karıştırıldıktan sonra kısa sürede santrifüj edildi.

2) 10 µL'lik total reaksiyon hacmi için Çizelge 3.8'deki konsantrasyon hazırlandı.

Çizelge 3.8. qPCR sentez reaksiyonu

Bileşen	Hacim	Konsantrasyon
2X SYBR Green qPCR Mix (ROX)	5 µL	1X
İleri Primer (10 µM)	0.4 µL	0.5 pM
Geri Primer (10 µM)	0.4 µL	0.5 pM
H-rox	0.1 µL	
Yeni sentezlenen cDNA	2 µL	20 pM -1µg
Su (nükleaz bulundurmayan)	2.1 µL	-
Toplam Hacim	10 µL	

Çalışmada her bir plate kuyucuğu için toplam hacim10 µL ye göre hesaplanmıştır. Çizelge 3.8'de hazırlanan konsantrasyondan qPCR cihazının 96'lık kuyucuklarına eklenmiştir.

a) Üçer kuyucuğa PON1 geni (ileri ve geri primeriyle) cDNA örneklerinden yüklendi. Bu şekilde ardışık olarak 15 örnek PON1 * 3'er kuyucuk = 45 kuyucuk PON1 geni örneklerinden yüklendi.

b) Üçer kuyucuğa da houskeeping olarak β-aktin (Forward ve Reverse Primeriyle) geninden yüklenir. Benzer şekilde de PON1 geni yan kuyucuklarına denk gelecek şekilde, ardışık olarak 15 örnek β-aktin * 3'er kuyucuk = 45 kuyucuk β-aktin geni örneklerinden yüklenir.

c) Kalan 6 kuyucuktan 3 tanesine kontrol amaçlı olarak cDNA yüklemeden β-aktin geni (İleri ve geri primeriyle) ve son 3 tane kuyucuğa da negatif kontrol amaçlı olarak yalnız nükleaz içermeyen 10'ar µL su konuldu. Bu şekilde 96 kuyucuk yüklenmiştir.

3) Kuyucuklara yüklenen örnekler qPCR cihazına yerleştirildi ve Çizelge 3.9'daki qPCR cihazına yükleme protokolü uygulandı.

Çizelge 3.9. qPCR cihazına yükleme protokolü

Aşama	Sıcaklık	Süre
İlk Denatürasyon	95 ^{o}C	1 dk
40 Döngü	95 ^{o}C	15 sn
	58 ^{o}C	20 sn
	72 ^{o}C	45 sn
Erime Eğrisi Analizi	60-95 ^{o}C	60 sn

Döngü protokolünün 3. adımı için, primerlerin bağlanması (annealling) için optimum sıcaklıkta (gradient PCR'da örneklerimiz için 59 ^{o}C belirledik) 20 sn yeterlidir. Sonrasında 72 ^{o}C de 45 sn uzama veri toplama işlemi yapılır. Erime Eğrisi Analizi için 60-95 ^{o}C olarak yüklendi.

5) Real Time PCR cihazı verileri katlama gen ifadesi (Fold gene expression) Schmittgen ve Zakrajsek (2000) göre hesaplandı.

Veri analizi için Real Time PCR cihazı Piko-real 96 kullanılmıştır.

3.14.1. Delta Ct Yöntemi ile Gen Ekspresyonlarının Hesaplanması

Gerçek zamanlı, kantitatif PCR deneylerinden elde edilen verileri analiz etmek için en yaygın kullanılan iki yöntem mutlak kantifikasyon ve göreceli kantifikasyondur. Mutlak kantifikasyon, genellikle PCR sinyalini ilişkilendirerek girdi kopya sayısını belirler.

Doku/kan örneğinden β -aktin geni ve PON1 geninin qPCR'dan elde edilen Ct değerlerinin 3 tekrarlı kontrol ortalamaları alındı. Ct değeri mRNA örneğinin döngü eşiğidir (3.12)

$$\Delta Ct\ değeri\ =\ Ct\ (PON\ geni)\ -\ Ct\ (\beta\ \text{aktin housekeeping geni}) \qquad (3.12)$$

ΔCt, PON1 geninin deneyden etkilenmeyen β-aktin geniyle normalizasyonu/karşılaştırılmasıdır. Tüm grup bu şekilde değerlendirildikten sonra PON1 geni ΔCt ortalamaları alınır. Sonra, PON1 geni ΔΔCt değerleri tüm örnekler için hesaplandı (3.13).

$$\Delta\Delta Ct = \Delta\text{Ct (Her PON1 örneği için)} - \Delta\text{Ct (β aktin geni Ct ortalaması)} \quad (3.13)$$

-ΔΔCt'nin aşağıdaki formülde değerlendirilmesi ile qPCR örneklerinin göreceli katlanmış gen ifadesi hesaplandı (3.14).

Katlanan gen ifadesi (Fold gene expression) = $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ (3.14)

$2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ ile elde edilen değer (3.12), PON1 genin ekspresyonun kontrolü olmadan değerlendirmemizi sağlar (Schmittgen ve Zakrajsek, 2000).

3.15. ELISA Kitleri ile Dokudan Enzimlerin Belirlenmesi

3.15.1. PBS Çözeltisi Hazırlanması

PBS çözeltisi hazırlama; 200 ml sterilize distile su ile 1 tablet PBS (Sigma Aldrich Katalog No: P4417-100TAB) firmanın ürün hazırlanma yönergesine göre suda çözünmesi sağlandı ve pH 7.2'ye (Metler Toledo, İsviçre) ayarlandı.

3.15.2. Doku Örneklerinin Homojenizasyonu

Dokularda ELISA'da çalışılmadan önce örneklerden doku kesit (bistüri) bıçağı ile örnekler alınmıştır. Her örnek dokudan parça almadan önce bistüri %3'lük H_2O_2 daldırılıp sterilizasyon sağlandı ve ardından PBS çözeltisi batırılan bistüri nötralize edildi. Karaciğer dokusundan 1 g olacak şekilde yüzeyden örnekler almadan önce bisturinin sterilizasyon işlemi tekrarlandı. Dokular 2 ml'lik tüplere hazırlanan PBS çözeltisi ile nötralize edildi. Örnekler doku parçalayıcıya (RETSCH-MM400, Almanya) koymadan önce sıvı azot içinde bilyalı parçalayıcılar kullanılarak parçalanmıştır. Daha sonra 20 dk 2500 rpm'de santrifüj edilen doku örneklerin supernetantları 0.2 ml ependorf tüplere konulup ELISA analizi için hazır hale getirilmiştir.



Şekil 3.20. Dokuların sıvı azotta -196 °C'de bilyalı parçalayıcılar kullanılarak yapılan parçalama işlemi

3.16. PON1 Enzim Düzeyinin ELISA Yöntemi ile Belirlenmesi

Sakrifiye edilen sıçan karaciğer doku ve plazma örnekleri sırasıyla 1.5 ve 0.2 ml'lik ependorf tüplere konulmuştur. Rat PON1 ELISA kit (Sunred Catalogue No:201-11-1086) protokol yönergesine göre örnekler hazırlanmıştır.

PON1 standart çözeltilerin hazırlanması

1) Önce standartlarımızı mikroelisa striplatelere 240 ng/ml (120 µL standart +120 µL standart dilüsyon) olacak şekilde ilk kuyucuğa koyduktan ve sonra bunun yarısını çekip yeni tüpe aktarılmıştır. Benzer şekilde, sürekli yarılayıp 120 ng/ml, 60 ng/ml, 30 ng/ml, 15 ng/ml, 0 ng/ml olacak şekilde standartlar hazırlanmıştır.

2) Mikroelisa kuyucuklarına 50 µL standart ve 50 µL streptavidin-HRP pipet yardımıyla eklendi.

3) Kan plazma/doku supernatant örneklerinden 40 µL pipetleyip microelisa kuyucukalarının içine koyuldu.

4) Kuyucukların sadece örneklerin içine 10 µL PON1 antikor ve 50 µL streptavidin HRP pipetleyip koyuldu.

5) Yapıştırcı bant ile kuyucukların üzeri kapatıldı ve yavaşca çalkalandı 1 saat sürede 37 ^{o}C da inkübasyon cihazında bekletildi.

6) İnkübe edildikten sonra kuyucukların içindeki sıvı boşaltıldı ve 350 µL yıkama çözeltisi ile kuyucukların içi 3 kez yıkandı.

7) Daha sonra kuyucukların içine 50 µL Chromogen A ve B solüsyonu eklenip 10 dk 37 ^{o}C bekletildi.

8) İnkübasyon sonrasında örneklere 50 µL reaksiyon durdurucu eklendi.

9) 450 nm dalga boyunda ELISA okuyucuda OD değerleri okutuldu.

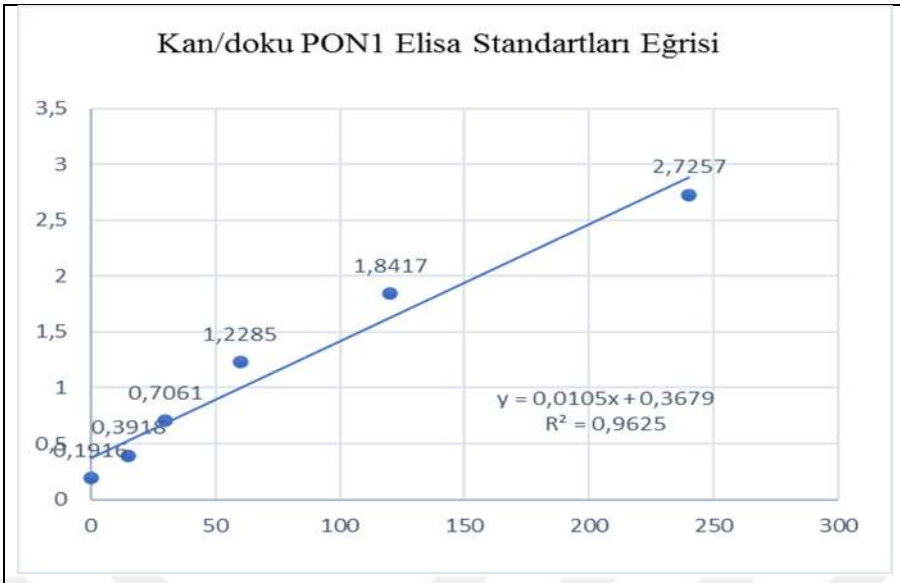
10) ELISA okuyucu cihazının (Thermo Scientifi Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer-USA) verdiği "OD" değerleri cihazdan okunarak kaydedildi.

11) Sonuçların hesaplanması için dikey (Y) eksendeki her standart için ortalama optik yoğunluğu yatay (X) eksenindeki konsantrasyona göre standart eğri oluşturulmuş ve grafikteki noktalardan en uygun eğri çizilmiştir (Şekil 3.21).

PON1 enzimi standart eğrisinin formülü aşağıda verilmektedir (3.15).

$$PON1\ (ng/Ml)\ Y = 0{,}0105X + 0{,}3679 \quad (3.15)$$

$R^2 = 0{,}9625$



Standartlar (ng/mL)	
0	0,1916
15	0,3918
30	0,7061
60	1,2285
120	1,8417
240	2,7257

Şekil 3.21. PON1 enzimi ELISA standartları eğrisi

3.17. Aortta Aterosklerotik Plakların ve Yağlı Karaciğer Dokusunun Histopatolojik İncelenmesi

3.17.1. Işık Mikroskobik İncelemeler

Işık mikroskobik rutin boyama ve prosedürler Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Rutin Laboratuvarında uygulandı. İncelemeler için; sakrifikasyon sonrası elde edilen arkus aorta, inen torasik aorta ve karaciğer doku örnekleri, %10'luk nötral tamponlu formalin (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Almanya) solüsyonunda 24 saat boyunca fikse edildi. Doku örnekleri, fiksasyon işleminin ardından gece boyunca çeşme suyunda yıkandı ve dehidratasyon (yükselen etanol serileri; %70, 90, 96, 100, 100) aşamasına geçildi. Dehidratasyon aşamasının ardından, saydamlaştırma basamağı için dokular, toluol (Merck Millipore, Darmstadt, Almanya) ile 1 saat muamele edildi, daha sonra önce erime sıcaklığı düşük olan parafine (42-44 °C, Merck Millipore) ve sonrada erime sıcaklığı 56-58 ^{o}C olan parafine (Merck Millipore) alınarak, dokulu parafin bloklar elde edildi.

Dokulardan histolojik analizler için mikrotom (Leica RM-2245, Nußloch, Almanya) ile alınan 5 µm kalınlığındaki kesitlere, Hematoksilen- Eosin (H-E) boyası uygulandı.

3.17.2. Hematoksilen-Eosin (H-E) Boyama Metodu

Beş µm kalınlığındaki kesitler, parafinin giderilmesi için 30 dk boyunca toluol ile muamele edildi. Parafinden uzaklaştırılan kesitler sırasıyla düşen etanol (%100, %96, %90, %70) serilerinden geçirilerek suya indirildi. Kesitler 10 dk. boyunca Mayer's hematoksilen (Merck Millipore) boyası ile muamele edildi. Daha sonra morartma işlemi için akan çeşme suyu altında 10 dakika bekletilen kesitlere, 1 dk boyunca Eosin (Merck Millipore) boyası uygulandı. Dehidratasyon için sırasıyla yükselen derecelerdeki alkol serilerinden geçirildikten sonra, kesitler toluol ile muamele edildi, entellan (Merck Millipore) ile kapatılarak daimi preparat haline getirildi. Karaciğer kesitlerinin değerlendirilmesinde Çizelge 3.10'da belirtilen skorlama yöntemi kullanılmıştır (Brunt ve Tiniakos 2010, Brown ve Kleiner, 2016).

Çizelge 3.10. Karaciğer morfolojisi hasar değerlendirme kriterleri (Brunt ve Tiniakos 2010; Brown ve Kleiner, 2016)

Steatoz (S)	**Lobular İnflamasyon (L)**	**Hepatosit Balonlaşması (B)**
0: < %5	0: Tespit edilmedi	0: Tespit edilmedi
1: %5 - % 33	1: < 2	1: Az miktarda
2: %34 - %66	2: 2-4	2: Fazla miktarda
3: > %66	3: > 4	

Değerlendirme 200X büyütmede gerçekleştirildi. Kriterlere göre elde edilen skor S+L+B (0-8).

3.17.3. Hücre Sayımı

Tüm grupların H-E boyanan preparatları, Olympus BX-51 mikroskobunda incelenerek, farklı büyütmelerde fotoğrafları çekildi.

H-E boyalı preparatlar kullanılarak; aort dokusunda meydana gelebilecek olası aterosklerotik plaklar ve normal doku histolojisi ile karaciğer dokusunda meydana gelebilecek steatosis, portal inflamasyon, hepatosit balonlaşması gibi anormal değişiklikler ve normal doku histolojisi değerlendirildi.

3.18. İstatistiksel Analiz

Araştırma verilerin istatistiki olarak tanımlanması ve değerlendirilmesinde SPSS (Versiyon 18.0) kullanılmıştır. Tüm veriler, her bir deneme grubu için ortalama ± standart hata (SH) olarak verilmiştir. Deneme grupları arasındaki istatistiksel anlamlılık, ANOVA, ardından Duncan testi kullanılarak SDK ve YYD'e göre ayrı ayrı değerlendirilmiştir. $P<0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BÖLÜM 4

SONUÇLAR

Sıçanlar üzerinde, ateroskleroziz ve karaciğer yağlanmasına etkisi araştırılan aronya meyvesinin fenolik madde miktarı, antioksidan kapasitesi, fenolik maddelerinin kimyasal bileşimi ve renk analizlerine ilişkin değerlendirme sonuçları yer almaktadır. Toplam 18 haftalık deney sonunda sıçanlardan kan ve karaciğer doku örnekleri alınmış ve süre içerisinde vücut ağırlıklarındaki değişimler takip edilmiştir. Alınan kan ve doku örneklerinde biyokimyasal, moleküler analizler ayrıca doku örneklerinde histopatolojik analizler gerçekleştirilmiştir.

4.1 Aronya Meyvesinin Fenolik Madde ve Antioksidan Kapasitesi

Aronya meyvesinin toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan kapasitesine ilişkin değerler Çizelge 4.1'de verilmiştir. Aronya meyvesinin toplam fenolik madde miktarı 2443 (mg GAE/kg) ve antioksidan kapasitesi değeri ise 2.50 EC_{50} (mg/ml) olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.1. Aronya meyvesinin fenolik madde ve antioksidan kapasitesi değerleri

Aronya ekstrakt	**Değer**	**Metot**
Fenolik (mg GAE/kg)	2443	Folin Ciocalteu
Antioksidant kapasitesi	2,50	DPPH

4.2. Aronya Ekstraktının Fenolik Madde Bileşik Analizleri

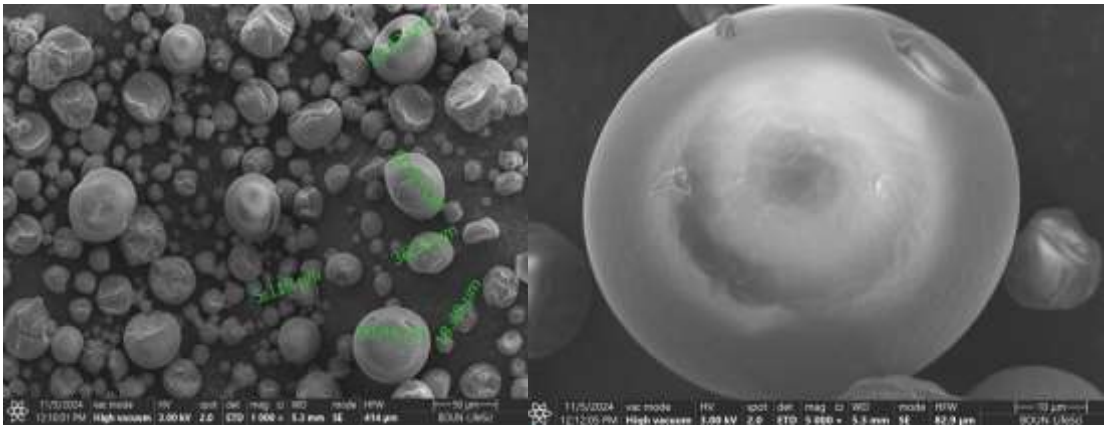
Araştırma kapsamında hazırlanan aronya ekstraktında 18 bileşik belirlenmiştir (Çizelge 4.2). En yüksek oranlarda sırası ile Kuersetin (84108,3100 ng/ml), Kafeik Asit (83568,6110 ng/ml), Protokatekuik asit (74901,9314 ng/ml) ve Klorojenik asit (70254,2969 ng/ml tespit edilmiştir.

Çizelge 4.2. Aronya Ekstraktının Fenolik Bileşikleri

Fenolik Bileşik	**RT**	**Yanıt**	**Sonuç ng/ml**
Kuersetin	4,386	617128	84108,3100
Kafeik Asit	3,756	200861	83568,6110
Protokatekuik Asit	1,922	119272	74901,9314
Klorojenik Asit	3,685	220563	70254,2969
Kaempferol	4,496	3331	8504,0458
İzorhamnetin	4,511	161288	7233,1280
2,5-Dihidroksibenzoik Asit	2,326	4279	6423,5181
Trans Ferulik Asit	4,179	616	4133,1575
Gallik Asit	1,736	16761	4069,6046
p-Kumarik Asit	4,112	2099	3691,6037
Kateşin	3,972	1339	1772,3802
Absisik asit	4,447	1212	1489,4717
Mirisetin	4,284	2383	863,4594
Luteolin	4,428	5418	523,8433
Salisilik Asit	3,868	1020	396,6031
Naringenin	4,488	811	378,1082
Rutin	4,071	496	98,7379
Hesperidin	4,054	215	58,9747

4.3. Mikroenkapsüle Aronya Ekstraktının Mikroskop Görüntüleri

Mikroenkapsüle aronya ekstraktının yüzey morfolojisini belirlemek amacıyla taramalı elektron mikroskopu (SEM) görüntüleri Şekil 4.1'de sunulmuştur. Mikrokapsüllenmiş aronya ekstraktının partikül boyutları 100 nm'nin altında belirlenmiştir.



Şekil 4.1. Mikroenkapsüle aronya ekstraktının taramalı elektron mikroskop (SEM) görüntüleri

4.4. Renk Analizleri

Aronya meyvesinin renk analiz değerleri Çizelge 4.3 ve Şekil 4.2'de verilmiştir. Aronya meyvesinin başlangıç a* değeri 8,48 ile kırmızı iken ekstrakte örneklerde 0,01 ile renk açılmış; mikroenkapsülasyon örneklerinde ise 28,34 ile kırmızılığın arttığı belirlenmiştir. Aronya meyvesine karakteristik rengini veren antosiyaninler kırmızı renkte ve baskın oldukları halde meyve bünyesinde yer alan klorofil sebebiyle yeşil renkte önemlidir. Bu açıdan resesif olmasına rağmen örneklerin b* değerleri de ölçülmüştür. Aronya meyvesinin başlangıç b* değeri 2,01 sarı iken ekstrakte örneklerde -0,31; maviye mikroenkapsülasyon örneklerinde ise -3,69 olarak maviye yakın renkte ölçülmüştür.

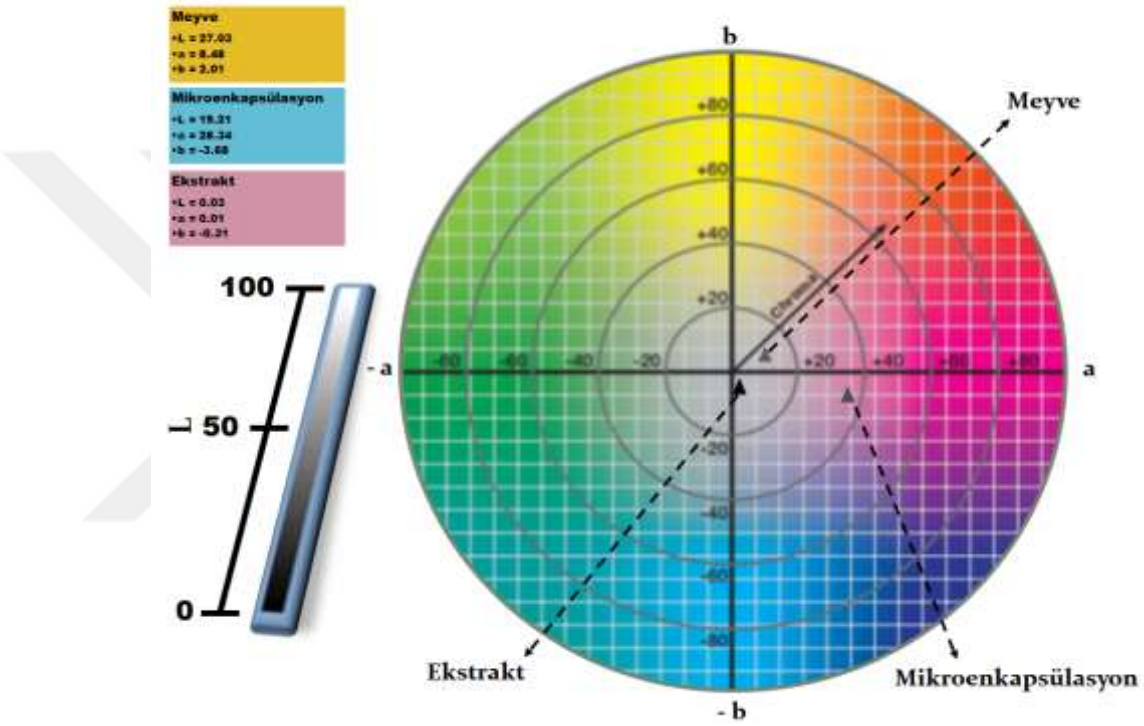
L değeri parlaklığı (L=0 siyah, L=100 beyaz) yani aronyanın açık veya koyu renkte oluşunu ifade etmektedir. Buna göre düşük L değerleri koyu, yüksek L değerleri de açık rengi ifade etmektedir. Yapılan çalışmalarda aronya meyvesinin başlangıç L* değeri 27,03 iken ekstrakte örneklerde 0,03; mikroenkapsülasyon örneklerinde ise 58,52 olarak ölçülmüştür.

Kroma değeri, rengin yoğunluğunu ve gözlenen renk tonunun saflığını verir. Kroma değeri aronya ekstraktının enkapsülasyon forumunda belirlenmiştir. Hue açısı (H), rengin açısını belirleyen değerdir ve en yüksek aronya ekstraktında görülmüştür. Aronya meyvesinin rengi temel alındığında, renk değişim aralığı ($\Delta \boldsymbol{E}$) en yüksek aronya ekstraktında belirlenmiştir.

Çizelge 4.3. Aronya meyvesinin renk analiz değerleri

Renk Koordinatları	a	b	L	H	Kroma Değeri	ΔE
Meyve	8,48	2,01	27,03	13,33	8,71	-
Mikroenkapsülasyon	28,34	-3,68	58,52	-7,40	28,58	25,09
Ekstrakt	0,01	-0,31	0,03	-88,15	0,31	25,74

a*: Kırmızılık, b*: Yeşil, L*: Parlaklık, H: Hue açısı, ΔE**:** Renk değişimi



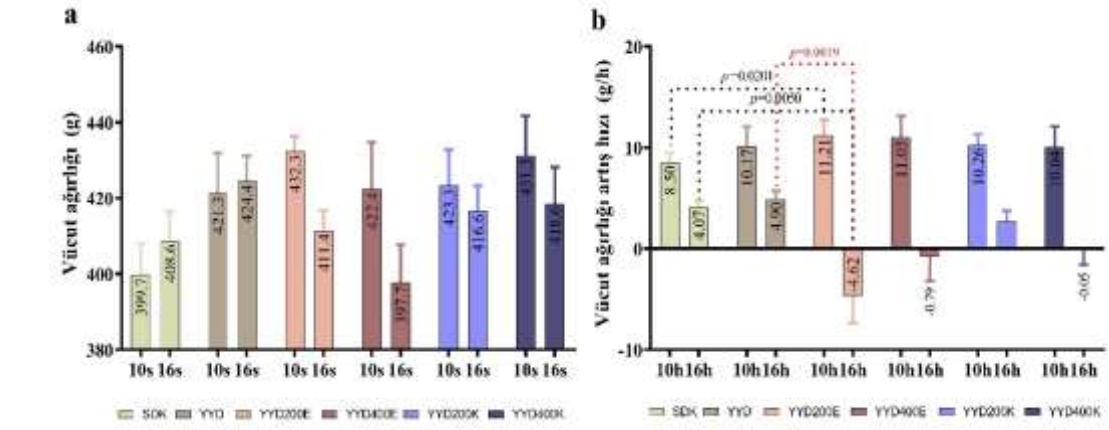
Şekil 4.2. Aronya meyvesinin renk analiz değerleri

4.5. Sıçan Vücut Ağırlıkları

Araştırmada sıçanların başlangıç ve bitiş vücut ağırlık değişimleri haftalık ölçümlerle değerlendirilmiştir. Sıçanların başlangıç vücut ağırlıkları homojen biçimde oluşturulmuş ve ortalama olarak 271-283 g aralığında olan hayvanlar kullanılmıştır. Aronya uygulaması öncesi ve sonunda sıçanların ortalama vücut ağırlıkları standart diyet kontrol (SDK) grubunda 399,71 ±8,2 g – 408,57±7,93 g; YYD grubunda 421,29±10,65 g – 424,43±6,80 g; YYD200K grubunda 423,29±9,51 g – 416,57±6,79 g; YYD200E grubunda 432,29±4,00 g – 411,43±5,35 g; YYD400K grubunda 431,29±10,48 g –

418,57±9,63 g; YYD400E grubunda 422,43±12,36 g – 397,71±10,04 g değişim aralığında ölçülmüştür (Şekil 4.3a).

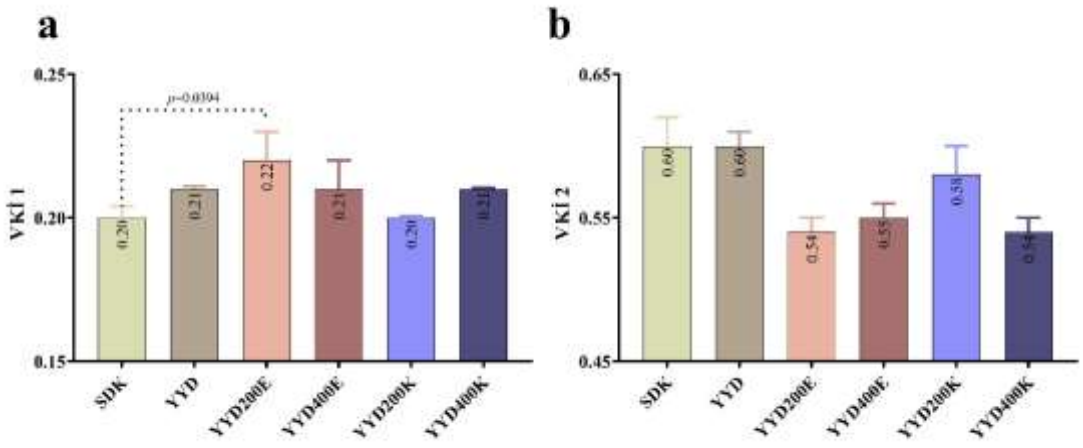
Aronya uygulaması öncesi ve sonrasında sıçanların ortalama vücut ağırlığı artış hızı gram/hafta (g/h) Kontrol grubunda 8,50±1,02 g – -4,07±0,61 g; YYD grubunda 10,17±1,95 g – -4,90±0,83 g; YYD200K grubunda 10,26±1,06 g – 2,67±1,07 g; YYD200E grubunda 11,21±1,55g – -4,62±2,75 g; YYD400K grubunda 10,04±2,06 g – -0,05±1,55 g; YYD400E grubunda 11.03±2.11 g – -0,79±2,42 g değişim aralığında belirlenmiştir (Şekil 4.3b). YYD200E grubundaki sıçanların SDK ($P<0,050$) ve YYD ($P<0,0019$) grubundaki sıçanlara göre vücut ağırlığı artış hızı daha düşük ve anlamlı olarak bulunmuştur (Şekil 4.3b).



Şekil 4.3. a) Sıçanların deneme süresince haftalık ortalama vücut ağırlığı b) Sıçanların deneme süresince vücut ağırlığı artış hızı (g/h)

4.6. Sıçan Vücut Kitle İndeksi

Aronya uygulaması öncesi sıçanların VKİ ortalamaları 10. hafta sonunda (VKİ1 kg/m^2) SDK grubunda 0,20±0,004; YYD grubunda 0,21±0,010; YYD200K grubunda 0,20±0,005; YYD200E grubunda 0,22±0,010; YYD400K grubunda 0,21±0,005; YYD400E grubunda 0,21±0,01olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.4a). YYD200E grubundaki sıçanların VKİ'i değeri SDK grubundaki sıçanlara göre anlamlı olarak daha yüksek olarak hesaplanmıştır ($P<0,0394$).



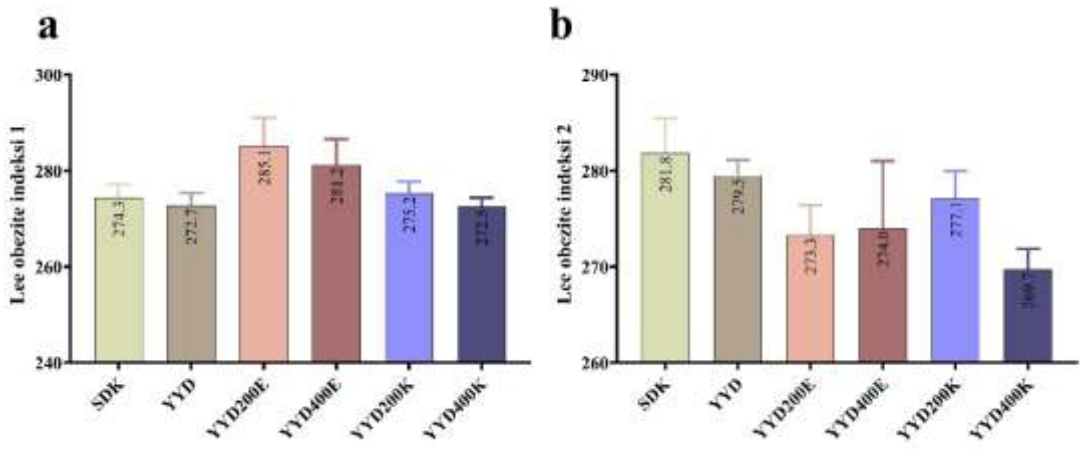
Şekil 4.4. a) Sıçanların aronya uygulama öncesi VKİ1 b) Sıçanların aronya uygulama sonrası VKİ2

Aronya uygulaması sonrası sıçanların vücut kitle indeksi 16. hafta sonunda (VKİ2) SDK grubunda 0,60 ±0,02; YYD grubunda 0,60±0,01; YYD200K grubunda 0,58±0,02; YYD200E grubunda 0,54±0,01; YYD400K grubunda 0,54±0,01; YYD400E grubunda 0,55±0,04 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.4b). YYD200E grubu ile YYD grup ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (P<0,0019). YYD200E grubunda, yüksek yağlı diyetle (YYD) 10 haftalık beslenme sonunda vücut ağırlık artış hızı 11,21 g olarak belirlenirken, aronya ekstraktı içeren diyet uygulanmasıyla 16. haftada vücut ağırlık artış hızının -4,62 g'ye gerilediği gözlenmiştir.YYD400E grubunda ise, yüksek yağlı diyetle 10 haftalık beslenme sonunda vücut ağırlık artış hızı 11,03 g olarak ölçülmüş; ancak sonraki 6 haftalık dönemde 400 mg/kg aronya ekstraktı içeren diyet uygulandığında 16. haftada vücut ağırlık artış hızında -0,79 g'lık bir düşüş gerçekleşmiştir. Ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir (P>0,05).

4.7. Lee Obezite İndeksi

Aronya uygulaması öncesi sıçanların Lee Obezite İndeksi ortalamaları 10. hafta sonunda SDK grubunda 274,3±2,85; YYD grubunda 272,7±2,70; YYD200K grubunda 275,2±2,51; YYD200E grubunda 285,1±5,95; YYD400K grubunda 272,5±1,88; YYD400E grubunda 281,2±5,38 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.5a). Gruplar arasında farklar istatistiki olarak anlamlı değildir (P>0,05).

YYD ile beslenen gruplarda ek olarak verilen 6 haftalık aronya uygulaması sonrası sıçanların Lee Obezite İndeksi ortalamaları (16. hafta sonunda); SDK grubunda 281,8 ±3,66; YYD grubunda 279,5±1,60; YYD200K grubunda 277,1±2,88; YYD200E grubunda 273,3±3,10; YYD400K grubunda 269,7±2,16; YYD400E grubunda 274±7,02 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.5b). Gruplar arasında farklar istatistiki olarak anlamlı değildir (P>0,05).



Şekil 4.5. a) Sıçanların aronya uygulama öncesi Lee obezite indeksi 1 b) Sıçanların aronya uygulama sonrası Lee obezite indeksi 2

4.8. Kan Yağlarına İlişkin Bulgular

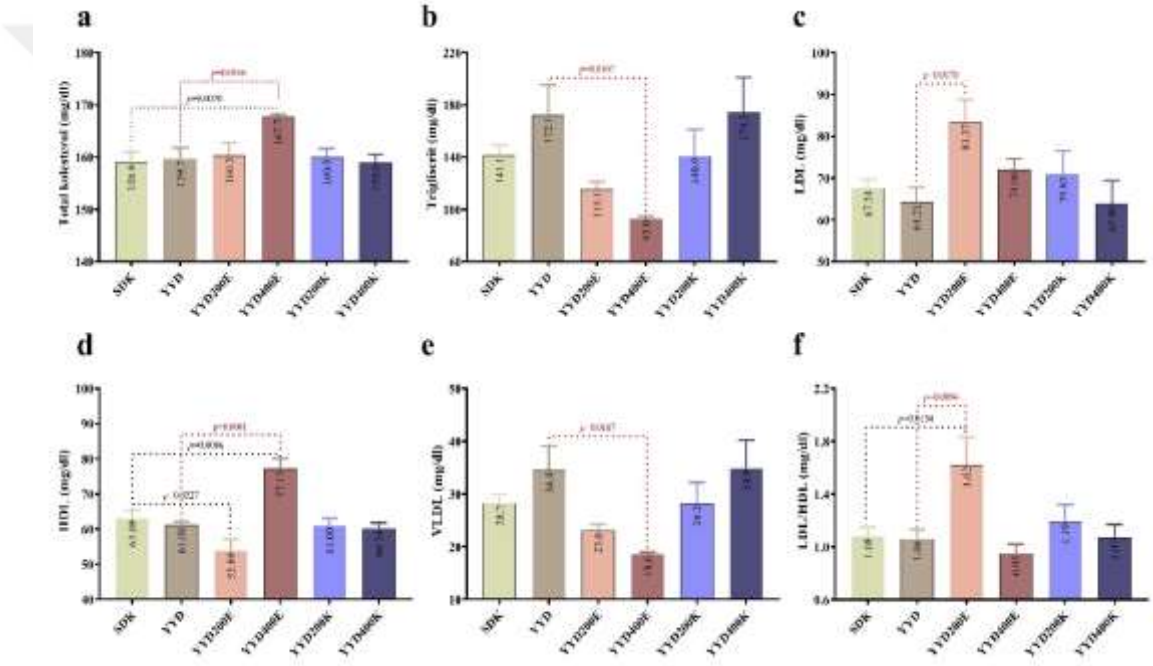
Çalışma sonunda sıçanların kan serumlarında toplam kolesterol, trigliserit, LDL, HDL, VLDL ve LDL/HDL bulguları Şekil 4.6'da verilmiştir.

Sıçanların toplam kolesterol düzeyleri SDK grubunda 158,9±2,05 mg/dl; YYD grubunda 159,7±2,13 mg/dl; YYD200K grubunda 160,0±1,63 mg/dl; YYD200E grubunda 160,3±2,48 mg/dl; YYD400K grubunda 159,0±1,51 mg/dl; YYD400E grubunda 167,7±0,57 mg/dl olarak bulunmuştur (Şekil 4.6a), YYD400E grubundaki sıçanların SDK (P<0,0070) ve YYD (P <0,0166) grubundaki sıçanlara göre anlamlı olarak toplam kolesterol düzeyleri daha yüksek bulunmuştur (Şekil 4.6a).

Sıçanların trigliserid düzeyleri; SDK grubunda 141,1±8,29 mg/dl; YYD grubunda 172,1±23,27 mg/dl; YYD200K grubunda 140,9±20,20 mg/dl; YYD200E grubunda 115,1±6,03 mg/dl; YYD400K grubunda 174,3±26,72 mg/dl; YYD400E grubunda 93,0±1,67 mg/dl olarak bulunmuştur. YYD400E grubundaki sıçanların YYD grubundaki

sıçanlara göre trigliserit düzeyleri anlamlı düzeyde (daha düşük bulunmuştur (P<0,0107; Şekil 4.6b). YYD400E grubunda trigliserit düzeyinin düşük çıkması enkapsüle aronya ekstraktının olumlu etkisi olduğu göstermektedir.

Sıçanların LDL düzeyleri; SDK grubunda 67,54±2,17 mg/dl; YYD grubunda 64,21±3,51 mg/dl; YYD200K grubunda 70,83±5,70 mg/dl; YYD200E grubunda 83,37±5,42 mg/dl; YYD400K grubunda 63,90±5,50 mg/dl; YYD400E grubunda 71,96±2,65 mg/dl olarak bulunmuştur. YYD200E grubundaki sıçanların YYD grubundaki sıçanlara göre LDL düzeyleri (P<0,0170) daha yüksek bulunmuştur (Şekil 4.6c).



Şekil 4.6. a) Sıçanların toplam kolesterol düzeyi (mg/dl) b) Sıçanların trigliserit düzeyi (mg/dl) c) Sıçanların LDL düzeyi (mg/dl) d) Sıçanların HDL düzeyi (mg/dl) e) Sıçanların VLDL düzeyi (mg/dl) f) Sıçanların LDL/HDL düzeyi (mg/dl)

Sıçanların HDL düzeyleri; SDK 63,09±2,34 mg/dl; YYD grubunda 61,08±0,97 mg/dl; YYD200K grubunda 61,00±2,06 mg/dl; YYD200E grubunda 53,89±3,21 mg/dl; YYD400K grubunda 60,24±1,60 mg/dl; YYD400E grubunda 77,15±2,93 mg/dl olarak bulunmuştur. YYD400E grubundaki sıçanların SDK (P<0,0006) ve YYD (P<0,0001) grubundaki sıçanlara göre HDL düzeyleri istatiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek bulunmuştur (Şekil 4.6d).

Sıçanların VLDL düzeyleri; SDK grubunda 28,23±1,66 mg/dl; YYD grubunda 34,43±4,65 mg/dl; YYD200K grubunda 28,17±4,04 mg/dl; YYD200E grubunda 23,03±1,21 mg/dl; YYD400K grubunda 34,86±5,35 mg/dl; YYD400E grubunda 18,60±0,33 mg/dl olarak bulunmuştur. YYD400E grubundaki sıçanların YYD grubundaki sıçanlara göre VLDL düzeyleri daha düşük ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (P<0,0107; Şekil 4.6e). YYD400E ekstrakt grubunun YYD'e göre VLDL düzeylerinin düşük olması 400 mg/kg ekstraktın VLDL düzeylerine olumlu etkisi olduğunu göstermektedir.

Sıçanların LDL/HDL düzeyleri; SDK grubunda 1,08±0,07; YYD grubunda 1,06±0,07; YYD200K grubunda 1,19±0,13; YYD200E grubunda 1,62±0,21; YYD400K grubunda 1,07±0,10; YYD400E grubunda 0,95±0,07mg/dl olarak bulunmuştur. YYD200E grubundaki sıçanların LDL/HDL düzeyleri SDK (P<0,0134) ve YYD (P<0,0094) grubundaki sıçanlara göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur (Şekil 4.6f).

Sıçanların ateroskleroz indeksi ve koroner risk indeksi değerleri Çizelge 4.4'de sunulmuştur.

Sıçanların **(**TK-HDL)/HDL oranına göre hesaplanan ateroskleroz risk indeksi değerleri SDK 1,51±2,20; YYD 1,61±1,85; YYD200E grubunda 1,97±2,85; YYD400E grubunda 1,17±1,75; YYD200K grubunda 1,62±2,18; YYD400K grubunda 1,63±1,50 olarak hesaplanmıştır.YYD200E grubundaki sıçanların koroner indeksi SDK grubundaki sıçanlara göre daha yüksek ve anlamlı hesaplanmıştır (P<0,030).

Sıçanların TK/HDL oranna göre hesaplanan koroner risk indeksi değerleri SDK 2,54±0,10; YYD 2,62±0,05; YYD200E grubunda 3,06±0,25; YYD400E grubunda 2,19±0,08; YYD200K grubunda 2,64±0,10; YYD400K grubunda 2,65±0,09 olarak hesaplanmıştır. YYD200E grubundaki sıçanların koroner indeksi SDK grubundaki sıçanlara göre daha yüksek ve anlamlı hesaplanmıştır (P<0,0208).

Çizelge 4.4. Ateroskleroz ve koroner risk indeksi değerleri

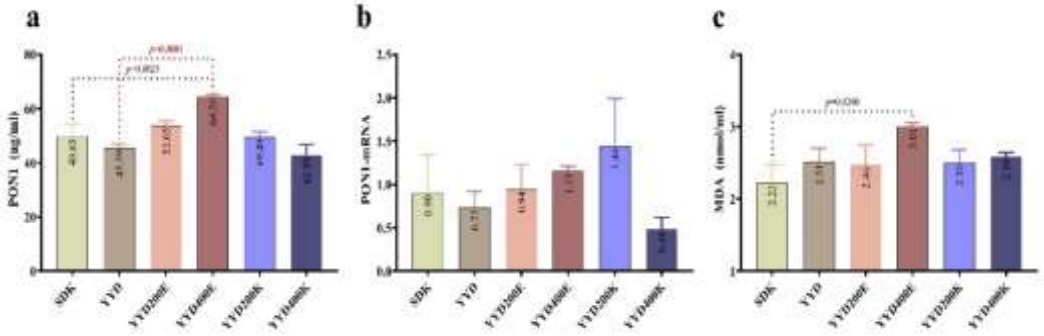
Parametreler	Gruplar (n=7)					
	SDK	**YYD**	**YYD200E**	**YYD400E**	**YYD200K**	**YYD400K**
Aİ	1,51±2,20	1,61±1,85	1,97±2,85*	1,17±1,75	1,62±2,18	1,63±1,50
KRİ	2,54±0,10	2,62±0,05	3,06±0,25*	2,19±0,08	2,64±0,10	2,65±0,09

SDK: Standart diyet kontrol, YYD: Yüksek yağlı diyet, YYD200E: Yüksek yağlı diyet + 200 mg/kg aronya ekstrakt; YYD400E: Yüksek yağlı diyet + 400 mg/kg aronya ekstrakt; YYD200K: Yüksek yağlı diyet + 200 mg/kg aronya enkapsüle; YYD400K: Yüksek yağlı diyet + 400 mg/kg aronya ekapsüle, AI**:** Ateroskleroz indeksi, KRİ**:** Koroner risk indeksi, *P<0,05.

4.9. Kan Örneklerinde PON1 Gen Ekspresyonu, PON1 Enzimi ve MDA Analizlerine İlişkin Bulgular

Sıçanların PON1 enzim düzeyleri SDK grubunda 49,65±4,68 ng/ml; YYD 45,39±1,63 ng/ml; YYD200K grubunda 49,49±1,91 ng/ml, YYD200E grubunda 53,65±1,74 ng/ml; YYD400K grubunda 42,89±3,88 ng/ml; YYD400E grubunda 64,59±0,4 ng/ml olarak bulunmuştur (Şekil 4.7a), YYD400E grubundaki sıçanların PON1 enzim değerleri SDK 49,65±4,68 ng/ml) grubunda (P<0,0025) ve YYD (P<0,00001) grubundaki sıçanlara göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Gruplar arası ekspresyon değerleri anlamlı çıkmasa da YYD400E grubunda 400 mg/kg aronya ekstraktının PON1 enzim aktivitesini arttırdığı (64,59±0,4 ng/ml) görülmüştür (Şekil 4.7a).

Sıçanların PON1 gen ekspresyonu [$2^{-(\Delta\Delta Ct)}$] değerleri SDK grubunda 0,90±0,44; YYD 0,73±0,19; YYD200K grubunda 1,44±0,55, YYD200E grubunda 0,94±0,29; YYD400K grubunda 0,48±0,14; YYD400E grubunda 1,15±0,06 olarak bulunmuştur (Şekil 4.7b).



Şekil 4.7. a) Sıçanların kan PON1 enzim (ng/ml) değerleri b) Sıçanların kan PON1-mRNA değerleri c) Sıçanların kan MDA (nmol/g) değerleri

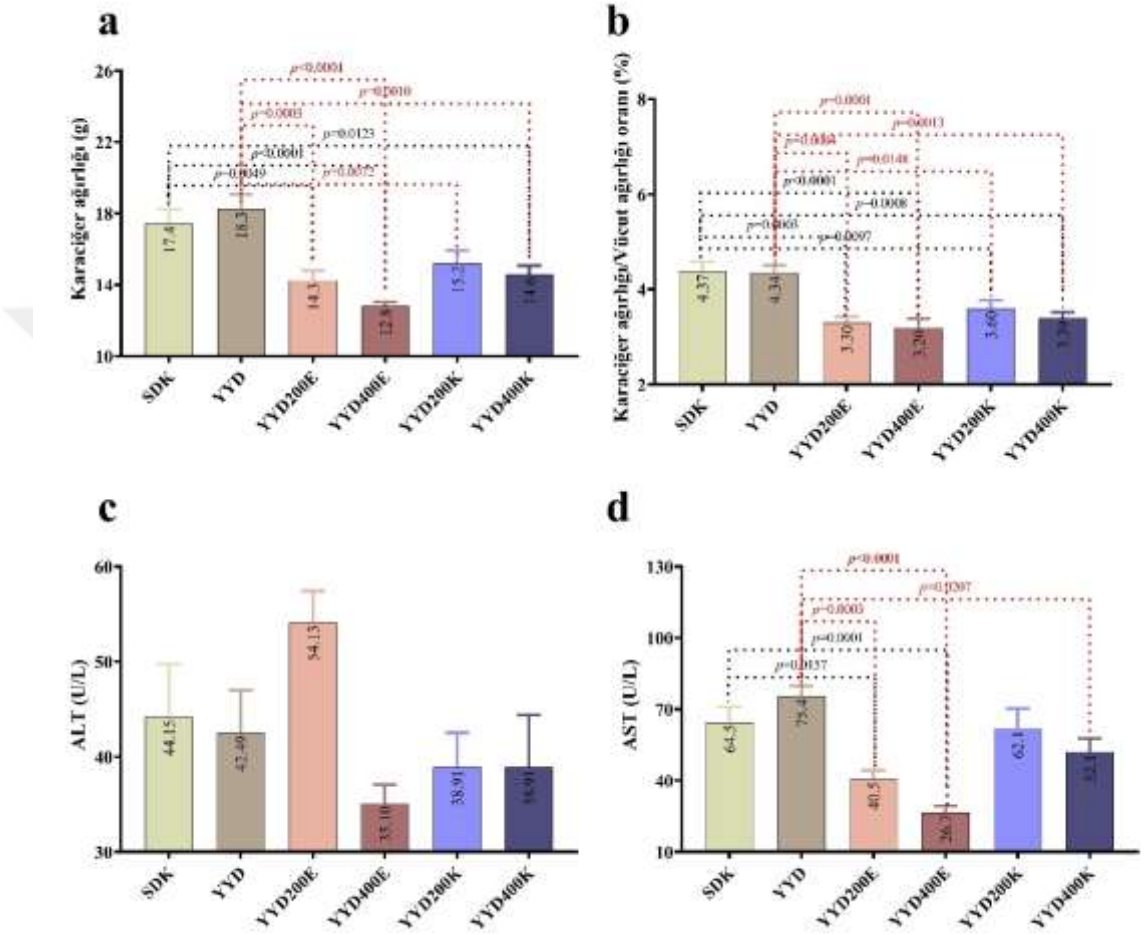
Sıçanların MDA değerleri SDK grubunda 2,22±0,25 nmol/ml; YYD 2,51±0,19 nmol/ml; YYD200K grubunda 2,50±0,18 nmol/ml, YYD200E grubunda 2,46±0,29 nmol/ml; YYD400K grubunda 2,58±0,06 nmol/ml; YYD400E grubunda 3,01±0,04 nmol/ml olarak bulunmuştur (Şekil 4.7c), YYD400E grubundaki sıçanların MDA değerleri SDK grubundaki (P<0,0290) sıçanlara göre daha yüksek bulunmuş iken YYD ve diğer gruplara göre istatistiki olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Şekil 4.7c).

4.10. Karaciğer Dokusuna İlişkin Bulgular

Sıçanların karaciğer ağırlığı, karaciğer ağırlığının/vücut ağırlığına oranı, ALT, AST değerleri Şekil 4.8'de verilmiştir.

Sıçanların karaciğer ağırlıkları SDK 17,43±0,79 g; YYD 18,26±0,81 g; YYD200K grubunda 15,21±0,71 g; YYD200E grubunda 14,26±0,55 g; YYD400K grubunda 14,56±0,51 g; YYD400E grubunda 12,80±0,24 g olarak tartılmıştır. YYD200K grubundaki sıçanların karaciğer ağırlıkları YYD (P<0,0072) grubundaki sıçanlara göre daha düşük olarak bulunmuştur. YYD200E grubundaki sıçanların karaciğer ağırlıkları SDK grubunda (P<0,0049) ve YYD (P<0,0003) grubundaki sıçanlara göre daha düşük olarak bulunmuştur. YYD400K grubundaki sıçanların karaciğer ağırlıkları SDK grubunda (P<0,0123) ve YYD (P<0,0010) grubundaki sıçanlara göre daha düşük olarak bulunmuştur. YYD400E grubundaki sıçanların karaciğer ağırlıkları SDK (P<0,0001) ve YYD (P<0,0001) grubundaki sıçanlara göre daha düşük olarak bulunmuştur (Şekil 4.8a). YYD'e göre 200 ve 400 mg/kg ekstrakt ile 400 mg/kg enkapsüle aronyanın karaciğer ağırlıkları üzerine düşürücü etkisi saptanmıştır.

Sıçanların karaciğer ağırlığının/vücut ağırlığına oranı % olarak SDK grubunda %4,37±0,21 g; YYD %4,34±0,16 g; YYD200K grubunda %3,60±0,17 g; YYD200E grubunda %3,30±0,13 g; YYD400K grubunda %3,39±0,13 g; YYD400E grubunda %3,20±0,18 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.8. a) Sıçanların karaciğer ağırlığı (g) b) Sıçanların karaciğer ağırlığı/vücut ağırlığına oranı (%) c) Sıçanların ALT değeri (U/L) d) Sıçanların AST değeri (U/L)

YYD200K grubundaki sıçanların karaciğer ağırlığının/vücut ağırlığına oranı SDK grubunda (P<0,0097) ve YYD (P<0,0148) grubundaki sıçanlara göre daha düşük olarak bulunmuştur. YYD200E grubundaki sıçanların karaciğer ağırlığının/vücut ağırlığına oranı SDK grubunda (P<0,0003) ve YYD (P<0,0004) grubundaki sıçanlara göre daha düşük olarak bulunmuştur. YYD400K grubundaki sıçanların karaciğer ağırlığının/vücut ağırlığına oranı SDK grubunda (P<0,0008) ve YYD (P<0,0013) grubundaki sıçanlara göre daha düşük olarak bulunmuştur. YYD400E grubundaki sıçanların karaciğer

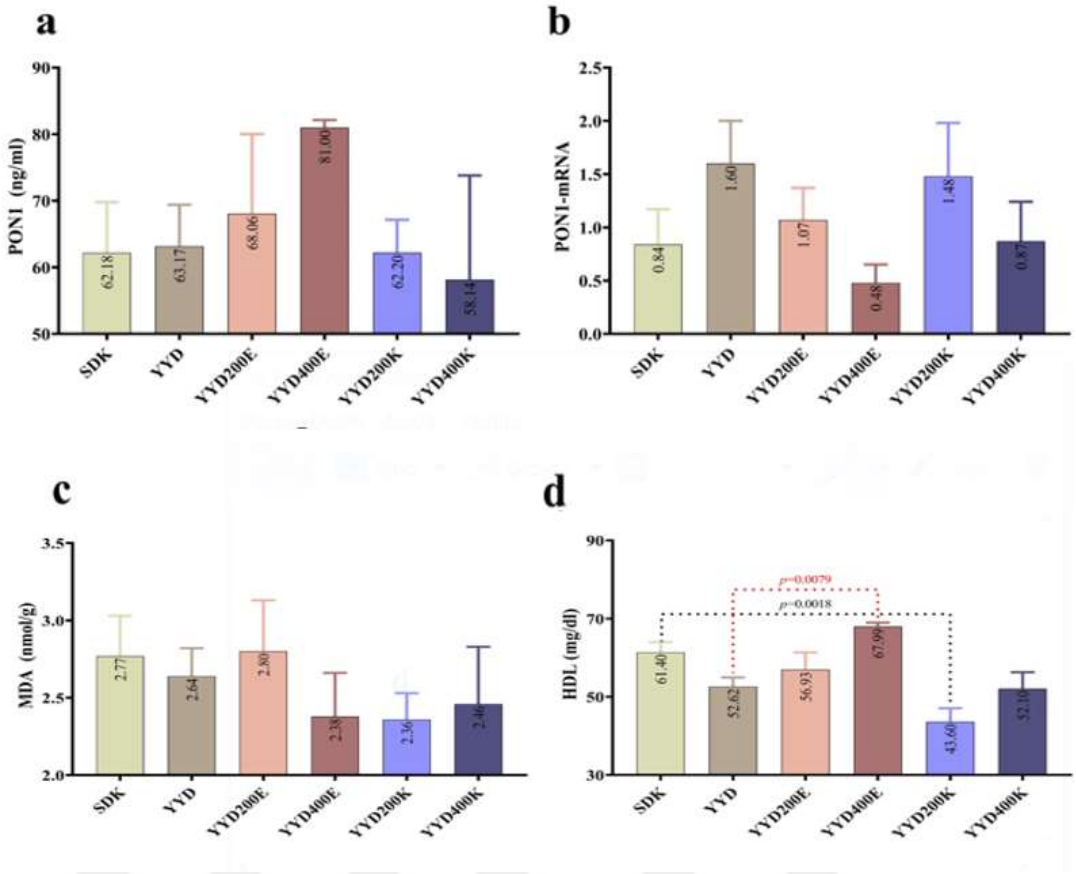
ağırlığının/vücut ağırlığına oranı SDK grubunda (P<0,0001) ve YYD (P<0,0001) grubundaki sıçanlara göre daha düşük olarak bulunmuştur (Şekil 4.8b).

ALT sitozolik bir enzimdir ve göreceli olarak karaciğere spesifiktir. Sprague Dawleyler için ALT standart 6-114 (U/L)'dir (Pratt vd.,1992; Loeb ve Quimby, 1999). Sıçanların ALT değerleri SDK grubunda 44,15±5,61 U/L; YYD 42,49±4,52 U/L; YYD200K grubunda 38,91±3,61 U/L, YYD200E grubunda 54,13±3,30 U/L; YYD400K grubunda 38,91±5,48 U/L; YYD400E grubunda 35,10±1,98 U/L olarak bulunmuştur (Şekil 4.8c). ALT sonuçları normal standart aralıkta belirlenmiş ve istatistiksel olarak da gruplar arasında anlamlı bir fark görülmemiştir.

AST ise hem sitozolik hem de mitokondriyal izoenzim olup karaciğerin yanı sıra çizgili kaslarda, beyin, pankreas ve kan hücrelerinde bulunur (Pratt vd., 1992; Loeb ve Quimby, 1999). SD için AST değeri 37-205 (U/L)'dir (The Clinical Chemistry of Laboratory Animals, 2nd ed. Philadelphia: Taylor & Francis USA). Sıçanların AST değerleri SDK grubunda 64,54±6,50 U/L; YYD 75,37±4,32 U/L; YYD200K grubunda 62,11±8,23 U/L, YYD200E grubunda 40,45±3,82 U/L; YYD400K grubunda 52,13±5,50 U/L; YYD400E grubunda 26,68±2,58 U/L olarak bulunmuştur (Şekil 4.8d). SD'ler için AST standart 37-205 (U/L) olup grupların AST sonuçları normal standart aralıkta belirlenmiş ancak istatistiki olarak gruplar arası anlamlı farklar belirlenmiştir. YYD200E grubundaki sıçanların AST değerleri SDK grubunda (P<0,0157) ve YYD (P<0,00003) grubundaki sıçanlara göre daha düşük olarak bulunmuştur. YYD400K grubundaki sıçanların AST değerleri YYD (P<0,0207) grubundaki sıçanlara göre daha düşük olarak bulunmuştur. YYD400E grubundaki sıçanların AST değerleri SDK grubunda (P<0,0001) ve YYD (P<0,0001) grubundaki sıçanlara göre daha düşük olarak bulunmuştur.

4.11. Karaciğer Doku Örneklerinde PON1 Gen Ekspresyonu, PON1 Enzimi, MDA ve HDL Analizlerine İlişkin Bulgular

Sıçanların karaciğer dokularında PON1 enzim değerleri SDK grubunda 62,18±7,60 ng/ml; YYD 63,17±6,21 ng/ml; YYD200K grubunda 62,20±4,95 ng/ml, YYD200E grubunda 68,06±11,95 ng/ml; YYD400K grubunda 58,14±15,66 ng/ml; YYD400E grubunda 81,00±1,11 ng/ml olarak bulunmuştur (Şekil 4.9a). YYD grubunda enzim aktivitesi 400 mg/kg aronya ekstraktının etkisi olumlu etkisi görülmüştür. Ancak gruplar arası istatistiki fark yoktur (P>0,05).



Şekil 4.9. a) Sıçanların karaciğer dokularında PON1 enzim (ng/ml) değerleri b) Sıçanların karaciğer dokularında PON1-gen ekspresyonu değerleri c) Sıçanların karaciğer dokularında MDA (nmol/g) değerleri d) Sıçanların karaciğer dokularında HDL (mg/dl) değerleri

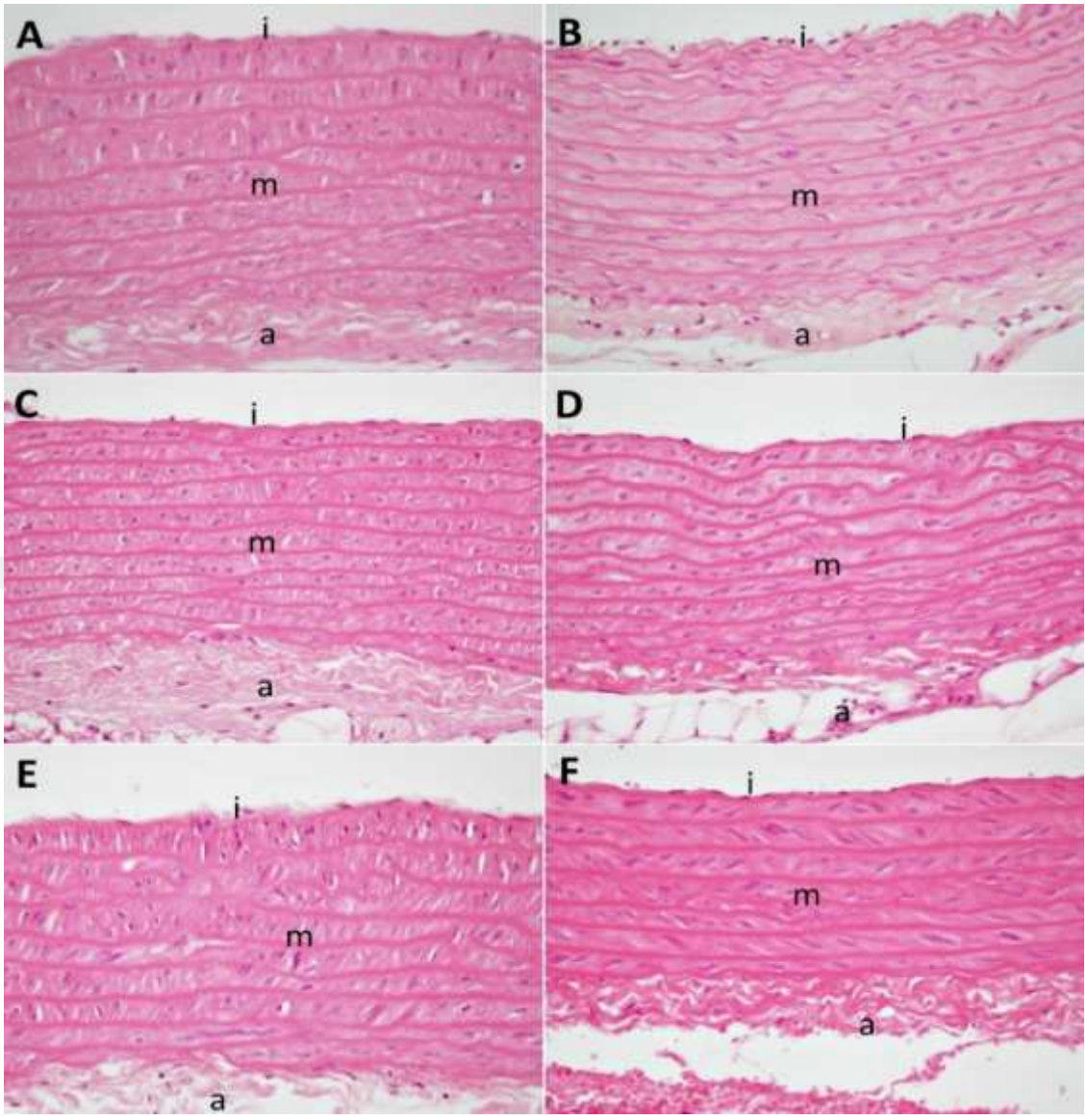
Sıçanların PON1 gen ekspresyonu [$2^{-(\Delta\Delta Ct)}$] değerleri SDK grubunda 0,84±0,33; YYD 1,60±0,40; YYD200K grubunda 1,48±0,50, YYD200E grubunda 1,07±0,30; YYD400K grubunda 0,87±0,37; YYD400E grubunda 0,48±0,17 olarak bulunmuştur. Gen ekspresyonları bakımından gruplar arası istatistiki olarak anlamlı bir fark görülmese de YYD400E grubundaki sıçanların PON1 gen ekspresyonu en düşük düzeyde bulunmuştur (Şekil 4.9b).

Sıçanların karaciğer dokularında MDA değerleri SDK grubunda 2,77±0,26 nmol/ml; YYD 2,64±0,18 nmol/ml; YYD200K grubunda 2,36±0,17 nmol/ml, YYD200E grubunda 2,80±0,33 nmol/ml; YYD400K grubunda 2,46±0,37 nmol/ml; YYD400E grubunda 2,38±0,28 nmol/ml olarak bulunmuştur (Şekil 4.9c). Aronyanın kapsüllenmiş ve kapsüllenmemiş ekstraktını alan gruplar arasında ve SDK grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (P>0,05).

Karaciğer dokularında HDL düzeyleri; SDK grubunda 61,40±2,61 mg/dl; YYD grubunda 52,62±2,35 mg/dl; YYD200K grubunda 43,60±3,47 mg/dl; YYD200E grubunda 56,93±4,44 mg/dl; YYD400K grubunda 52,10±4,17 mg/dl; YYD400E grubunda 67,99±0,98 mg/dl olarak bulunmuştur (Şekil 4.9d). YYD400E grubundaki sıçanların YYD ($P<0,0001$) grubundaki sıçanlara göre HDL düzeyleri daha yüksek bulunmuştur. YYD200K grubundaki sıçanların HDL değerleri SDK grubundaki sıçanlara göre daha düşük bulunmuştur ($P<0,0018$). YYD uygulanan 5 grup içerisinde aronya ekstraktının HDL düzeyi açısından olumlu etkisi yalnızca 400 mg/kg verilen (YYD400E) grupta görülmüştür.

4.12. Aortta Aterosklerotik Plakların ve Yağlı Karaciğer Dokusunun Histopatolojik İncelenmesine İlişkin Bulgular

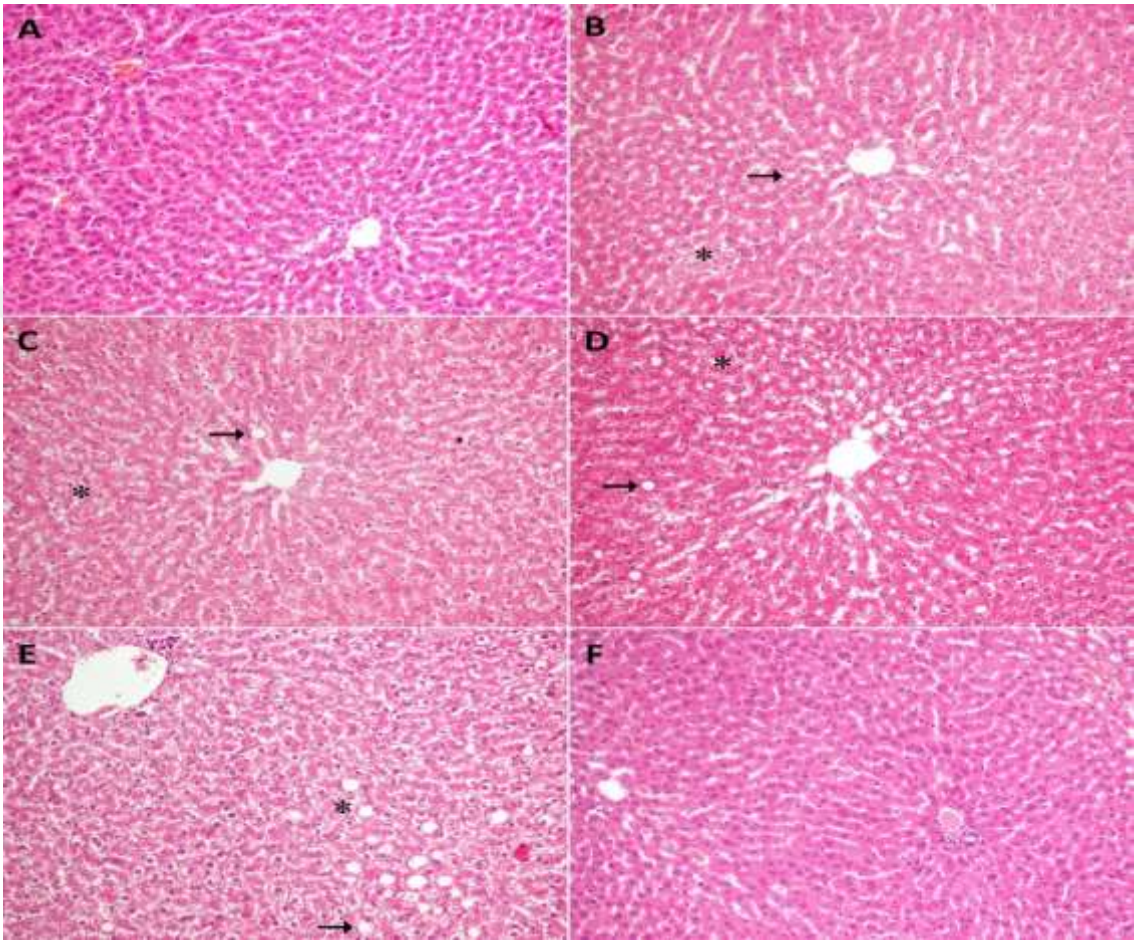
Aort dokuları incelendiğinde, tüm gruplarda normal doku morfolojisinin korunduğu gözlenmiştir. Hem arkus aorta hem de torasik aort dokularında aterosklerotik plakların varlığı hiçbir deney grubunda tespit edilmemiştir. Endotel düzensizliği ile hyalin ya da mukoid değişikliklerde izlenmemiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Sıçan aort duvarı H-E boyalı mikrografları, A- YYD400E, B- YYD200E, C- YYD400K, D- 200 YYD200K, E- YYD, F- SDK, (i) – Tunika intima tabakası, (m) – Tunika media tabakası, (a) – Tunica adventisya tabakası, X200 büyütme.

Karaciğer dokusuna ilişkin değerlendirme sonuçları Şekil 4.11'de sunulmuştur. Standart diyet ile beslenen sıçan karaciğer dokuları normal histolojik yapısında izlenmiştir (Şekil 4.11F). YYD ile beslenen karaciğer dokularında portal alanda az oranda inflamasyon bulgularına rastlanmıştır. Fakat YYD etkisine bağlı olarak karaciğerde yüksek oranda mikrosteatoz ve orta düzeyde makrosteatoz bulguları tespit edilmiştir (Şekil 4.11E). SDK grubu ile karşılaştırıldığında karaciğer hasar skoru bu grupta yüksek bulunmuştur ($P<0,001$). YYD200K ve YYD400K verilmiş sıçanların karaciğer bulguları

incelendiğinde, YYD grubuna benzer bulgular elde edilmiştir. Bu grupların karaciğer skoru YYD grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Şekil 4.11C, 4.11D, sırasıyla P<0,988, P<0,953). YYD200K ve YYD400K grupları kendi arasında karşılaştırıldığında anlamlı bir fark izlenmemiştir (P<0,677).



Şekil 4.11. Karaciğer H-E boyalı mikrografları. A- YYD400E B- YYD200E C- YYD400K D- 200 YYD200K E- YYD F- SDK. (*)- mikrostetosis bulguları, (→) – makrosteatosis bulguları. X200 büyütme

İntragastrik yoldan verilen YYD200E ve YYD400E grupların karaciğer skorları yüksek yağlı diyet grubuyla karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edilmiştir (Şekil 4.11E, 4.11F, her iki grup için P<0,001). Fakat sadece intragastrik olarak YYD400E verilen grupta, kontrol grubuna benzer morfoloji tespit edilmiştir. (Şekil 4.11F). YYD200E grupta karaciğer skorunda azalma tespit edilmesine rağmen mikro ve makrosteatoz bulgularının az da olsa halen devam ettiği bulunmuştur (Şekil 4.11E).

BÖLÜM 5

TARTIŞMA

5.1. Aronyanın Fenolik İçeriği ve Antioksidan Kapasitesi Arasındaki İlişki

Aronya (*Aronia melanocarpa*), yüksek antosiyanin, proantosiyanidin ve diğer fenolik bileşiklerin zenginliğiyle öne çıkan bir meyvedir ve birçok araştırma, bu meyvenin sağlığa olan potansiyel faydalarını ortaya koymaktadır (Kazemi vd., 2018a; Jurikova vd., 2017; Hein ve Dey, 2019; Tena ve Martínez, 2020; Sandoval-Ramírez, 2021; Godos ve Galvano, 2021; Alam ve Sultana, 2021; Sun ve Gao, 2023). Bu bağlamda yapılan epidemiyolojik ve randomize kontrollü çalışmalar, aronya içindeki polifenollerin, özellikle oksidatif stresle ilişkili kronik hastalıkların önlenmesi veya hafifletilmesinde etkili olabileceğini göstermektedir (Jurendic ve Ščetar, 2021). Polifenoller, kardiyovasküler hastalıkların riskini azaltmada (Khurana ve Sharma, 2013; Yamagata ve Ishii, 2015), insülin duyarlılığını iyileştirmede (Valcheva Kuzmanov ve Petrova, 2007; Banjari ve Krizman, 2017; Jeon ve Kim, 2018; Gajic ve Hristova, 2020) ve nörodejeneratif hastalıklara karşı koruma sağlamada (Garrido ve García, 2012; Kim ve Shin, 2020) potansiyel faydalar sunmaktadır. Jurikova vd. (2017), Hein ve Dey (2019), Tena ve Martínez (2020), Sandoval-Ramírez (2021), Godos ve Galvano (2021), Alam ve Sultana (2021), Sun ve Gao (2023) gibi çeşitli çalışmalarda, aronya meyvesinin içerdiği bileşiklerin sağlığa olan faydalarına dair önemli bulgular ortaya konulmuştur.

Bu çalışmada elde edilen veriler, aronya meyvesinin fenolik madde içeriği ve antioksidan kapasitesinin mevcut literatürdeki bulgularla uyumlu olduğunu göstermektedir (Forbes-Hernande vd., 2016; Denev vd., 2018; Sidor vd., 2019). Aronya meyvesinin toplam fenolik madde miktarı, çalışmamızda 2443 mg GAE/kg olarak ölçülmüştür. Bu konuda Häkkinen vd. (1999) tarafından yapılan bir çalışmada, aronya

meyvesinin fenolik içeriğinin 2000-3000 mg GAE/kg; Wu vd. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada ise 2500-3500 mg GAE/kg arasında olduğu bildirilmiştir. Bu değerler, aronya meyvesinin fenolik içeriğinin diğer birçok meyveye kıyasla; nar 1000-2500 mg GAE/kg (Gil vd., 2000); yaban mersini (Blueberry): 900-1500 mg GAE/kg (Kähkönen vd., 2001); kırmızı üzüm 200-800 mg GAE/kg (Cantos vd., 2002); siyah üzüm: 700-1000 mg GAE/kg (Kammerer vd., 2004); kızılcık 1000-2000 mg GAE/kg (Prior vd., 2001) oldukça yüksek olduğunu ortaya koymakta olup, aronya meyvesinin sağlık açısından yüksek potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. Bu yüksek fenolik içerik, özellikle serbest radikal temizleme kapasitesi açısından önemlidir (Tolic vd., 2017; Denev vd., 2018; Jurendic and Ščetar, 2021). Literatürde, aronya meyvesinin fenolik bileşenlerinin antioksidan kapasiteye olan katkısı sıkça vurgulanmaktadır. Kulling ve Rawel (2008), Jakobek ve Seruga (2012) yaptıkları çalışmalarda, aronya meyvesinin güçlü antioksidan kapasitesinin, özellikle antosiyaninler gibi flavonoid bileşiklerden kaynaklandığı belirtilmiştir.

Çalışmada aronya meyvesinin antioksidan kapasitesinin 2.50 EC50 (mg/ml) değeri ile yüksek olduğunu belirlemiş bulunmaktayız. Bu bulgu, Kulling ve Rawel (2008) çalışmasında rapor edilen yüksek antioksidan kapasiteye dair verilerle tutarlıdır. Antioksidan kapasitenin yüksekliği, özellikle kardiyovasküler sağlığı destekleyen etkiler sunmaktadır. Antioksidan kapasitenin yüksek olması, yalnızca serbest radikalleri temizlemekle kalmayıp, inflamasyon ve oksidatif strese karşı hücresel koruma sağlama potansiyeli de sunmaktadır (Jurendic ve Ščetar, 2021). Benzer şekilde, Jakobek ve García-Villalba (2021) tarafından yapılan incelemelerde, aronya meyvesinin fenolik bileşenlerinin kardiyovasküler sağlığı destekleme ve inflamatuar süreçleri düzenlemede etkili olduğu vurgulanmıştır. Bu bağlamda, aronya meyvesinin antioksidan potansiyeli, mevcut literatürdeki yüksek fenolik içerikli meyvelerle karşılaştırıldığında öne çıkmaktadır; nar 1000-2500 mg GAE/kg (Gil vd., 2000); yaban mersini (Blueberry): 900-1500 mg GAE/kg (Kähkönen vd., 2001); kırmızı üzüm 200-800 mg GAE/kg (Cantos vd., 2002); siyah üzüm: 700-1000 mg GAE/kg (Kammerer vd., 2004); kızılcık 1000-2000 mg GAE/kg (Prior vd., 2001).

Aronya meyvesinin fenolik bileşen profili, diğer kırmızı ve koyu renkli üzümsü meyvelere göre (yaban mersini, ahududu, frenk üzümü, çilek ve böğürtlen) oldukça çeşitlidir. Çalışmada, fenolik madde dağılımı açısından en yüksek oranda kuersetin,

kafeik asit, klorojenik asit ve protokatekuik asit tespit edilmiştir (Çizelge 4.2). Literatürde sıkça araştırılan bu bileşenler, antiinflamatuar, antioksidan ve antikanser özellikleriyle öne çıkmaktadır. Manach vd. (2004), kuersetinin inflamatuar yanıtları düzenleyerek kronik inflamasyon riskini azalttığını ve oksidatif stresle mücadelede etkili olduğunu belirtmiştir. Bu flavonoid, hücresel düzeyde serbest radikalleri nötralize ederek doku hasarını engelleyebilir. D'Andrea ve Toso (2021), kuersetinin kanser hücrelerinin büyümesini inhibe edebileceğini ve kardiyovasküler sağlığı destekleyebileceğini bildirmiştir. Bu özellikler, kuersetinin biyolojik aktivitesinin sağlık açısından önemini vurgulamakta olup çalışmadaki yüksek kuersetin düzeyleri ile uyumludur (Çizelge 4.2).

Kafeik asit ve klorojenik asit gibi fenolik asitler de aronya meyvesinin fenolik profiline önemli katkı sağlamaktadır. Kafeik asit, antioksidan ve hücre koruyucu özellikleriyle bilinir ve kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu potansiyele sahiptir (Sulaiman ve Balachandran, 2011). Klorojenik asit ise metabolik hastalıklar ve diyabet gibi durumlarda olumlu etkiler gösterebilir (Naveed ve Hejazi, 2018; Jiang vd., 2021). Çalışmadan elde edilen yüksek kafeik asit ve klorojenik asit seviyeleri, aronya meyvesinin sağlık açısından çok yönlü faydalar sunduğunu göstermektedir (Çizelge 4.2).

Çalışmada tespit edilen yüksek protokatekuik asit düzeyleri de dikkat çekicidir. Bu bileşiğin güçlü antioksidan özellikleri, hücresel hasarı azaltmada ve serbest radikalleri nötralize etmede etkili olabilir. Protokatekuik asitin antioksidan kapasiteye önemli katkılar sağladığı ve inflamatuar süreçlerde düzenleyici rol oynadığı belirtilmektedir (Kakkar ve Bais, 2014). Kang vd. (2023) tarafından yapılan bir çalışmada, protokatekuik asidin oksidatif stres kaynaklı inflamasyonu azaltıcı etkileri üzerinde durulmuş ve bu bileşiğin fonksiyonel gıda olarak kullanım potansiyeli vurgulanmıştır.

Sonuç olarak, aronya meyvesi fenolik madde içeriği ve antioksidan kapasitesi açısından mevcut literatürle (Häkkinen vd. 1999; Wu vd., 2012) uyumlu, oldukça değerli bir doğal kaynak olarak öne çıkmaktadır. Çalışmadan elde edilen bulgular, aronya meyvesinin yüksek fenolik madde içeriği ve antioksidan kapasitesinin, onu fonksiyonel gıda olarak değerlendirmek için uygun bir aday haline getirdiğini göstermektedir. Antioksidan kapasite açısından elde edilen 2.50 EC50 (mg/ml) değeri, aronya meyvesinin güçlü bir antioksidan kaynağı olduğunu ve özellikle kardiyovasküler sağlığı destekleyen potansiyele sahip olduğunu doğrulamaktadır. Literatürde aronya meyvesinin fenolik

bileşenlerinin inflamasyonla mücadele ve oksidatif stresi azaltma konusundaki etkinliği geniş bir şekilde vurgulanmıştır (Rasouli vd., 2017). Elde edilen sonuçlar, aronya meyvesinin yalnızca serbest radikal temizleme kapasitesini artırmakla kalmayıp, aynı zamanda inflamasyonla mücadelede ve birçok kronik hastalığa karşı koruyucu bir etkiye sahip olabileceğini ortaya koymaktadır.

Bu doğrultuda, aronya meyvesinin içerdiği yüksek fenolik bileşikler, antioksidan kapasiteyi destekleyerek fonksiyonel gıda olarak geniş bir kullanım potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Güncel literatür ve çalışmadaki bulgular ışığında (Çizelge 4.1; Çizelge 4.2), aronya meyvesinin antioksidan özelliklerinin insan sağlığı üzerinde çok yönlü faydalar sağlayabileceği öngörülmektedir. Bu bulgular, aronya meyvesinin fonksiyonel gıda bileşeni olarak kullanılmasının, oksidatif stres ve inflamasyona karşı koruyucu bir kalkan oluşturabileceğini ve bu sayede sağlığı destekleyici etkiler sunabileceğini göstermektedir.

5.2. Aronyanın Renk Özellikleri Üzerindeki Değişimler Arasındaki İlişki

L* değeri 0 (siyah) ile 100 (beyaz) aralığında olup, a* değeri kırmızı-yeşil ve b* değeri ise sarı-mavi skalayı göstermektedir (Vapur ve Kök, 2023). Aronya meyvesinin renk analizine ilişkin veriler, (Kırklareli'nin Vize ilçesine bağlı Soğucak köyünde Eylül ayının 20'sinde hasat edilen) meyvenin karakteristik renk özelliklerini vurgularken, ekstraksiyon ve mikroenkapsülasyon işlemlerinin renk özellikleri üzerindeki farklı etkilerini de ortaya koymaktadır. Araştırmada aronya meyvesinin başlangıç kırmızılık (a*) değeri 8,48 olarak belirlenmiş, ekstrakte örneklerde bu değer 0,01'e kadar düşmüş ve mikroenkapsülasyon işlemine tabi tutulmuş örneklerde ise 28,34 olarak ölçülmüştür. Bu bulgular, ekstraksiyon işlemi sırasında fenolik bileşiklerin, özellikle de antosiyaninlerin oksidasyon ve polimerizasyon nedeniyle kırmızılık değerinde belirgin bir azalma yaşandığını göstermektedir. Antosiyaninler gibi kırmızı pigmentlerin, ekstraksiyon sürecinde oksidasyona maruz kalarak renk kaybına neden olduklarını belirten Wu vd. (2004) ve Zhao vd. (2021a), ekstrakte edilen antosiyaninlerin oksidasyon süreci ile renk kaybettiğini ve mikroenkapsülasyon işleminin bu kaybı azaltmada etkili olduğunu bildirmiştir. Mikroenkapsülasyon işlemi ise bu bileşiklerin daha stabil bir formda kalmasına olanak tanımış ve kırmızılık değerini artırarak koruma sağlamıştır. Bu

durum, mikroenkapsülasyonun renk stabilitesine sağladığı katkıyı açıkça ortaya koymaktadır.

Aronya meyvesinin b* değeri başlangıçta 2,01 ile sarıya yakın olarak ölçülmüştür. Ekstraksiyon işlemine tabi tutulan örneklerde bu değer -0,31 olarak yani maviye yakın ölçülmüş, mikroenkapsülasyon işleminde ise -3,69'a kadar düşmüş ve mavilik tonu artmıştır. Bu değişim, aronya meyvesinde antosiyaninlerin ortamın pH değerine göre renk değiştirmesinden kaynaklanmaktadır. Nötr pH değerlerinde mor iken pH arttıkça antosiyaninler mavi rengini almaktadır. Ekstraksiyon işlemi sırasında fenolik bileşikler oksidasyona maruz kaldığından mor tonların maviye kaydığı anlaşılmaktadır. Kulling ve Rawel (2008) tarafından yapılan çalışmada da benzer şekilde, antosiyanin açısından zengin meyve ekstraktlarında yeşil tonların azaldığı ve mikroenkapsülasyon işleminin ise renk stabilitesini korumada etkili olduğu belirtilmiştir. Mikroenkapsülasyon sürecinde elde edilen negatif b* değeri, fenolik bileşiklerin oksidasyondan korunmasını ve böylece mavilik tonlarının sabit kalmasını sağlamaktadır. Bastante vd. (2021) de benzer şekilde, mikroenkapsülasyonun renk stabilitesine katkı sağlayarak pigmentlerin bozulmasını ve ton kaybını önlediğini bildirmiştir. Bu sonuçlar, araştırmadan elde edilen bulgularla tutarlıdır ve mikroenkapsülasyonun renk özelliklerini koruma konusundaki etkisini ortaya koymaktadır.

Parlaklık (L*) değeri, meyvenin koyu veya açık bir tona sahip olup olmadığını gösteren bir parametredir. Araştırmada, aronya meyvesinin başlangıç parlaklık değeri 27,03 olarak belirlenmiş olup, bu düşük parlaklık değeri meyvenin doğal olarak koyu bir tona sahip olduğunu göstermektedir. Ekstrakte örneklerde parlaklık değeri 0,03'e kadar düşmüştür, bu da ekstraksiyon işlemiyle meyvenin renginin daha da koyulaştığını ve mat bir görünüme büründüğünü göstermektedir. Mikroenkapsülasyon işlemine tabi tutulan örneklerde ise parlaklık değeri 58,52 olarak ölçülmüştür; bu da mikroenkapsülasyon işlemi sayesinde renk tonunun daha açık hale geldiğini ve parlaklığın arttığını göstermektedir. Oancea ve Socaciu (2020), tarafından yapılan çalışmada da benzer şekilde, mikroenkapsülasyon işleminin parlaklık değerini artırarak renk stabilitesini koruduğu ve ekstraktlarda yaşanan parlaklık kaybını azalttığı bildirilmiştir. Mikroenkapsülasyon süreci, koyu pigmentlerin stabil kalmasını sağlarken, aynı zamanda ekstraksiyon işlemine kıyasla daha parlak bir renk tonu ortaya çıkarmaktadır. Mikroenkapsülasyon renk stabilitesi üzerindeki koruyucu etkisini sürdürmektedir.

Kroma değeri, renk tonunun saflığını ve yoğunluğunu gösteren bir ölçümdür ve daha yüksek kroma değeri daha doygun ve saf bir renge işaret eder. Araştırmada, aronya ekstraktının mikroenkapsülasyon formunda kroma değeri 28,58 olarak belirlenmişken, ekstrakt formunda bu değer 0,31 olarak ölçülmüştür. Bu fark, mikroenkapsülasyon işleminin renk saflığını ve yoğunluğunu belirgin bir şekilde artırdığını göstermektedir. Literatürde de benzer sonuçlar elde edilmiş olup, mikroenkapsülasyonun fenolik bileşiklerin saflığını artırdığı ve rengin daha yoğun ve saf görünmesini sağladığı belirtilmiştir (González vd., 2019). Mikroenkapsülasyonun, aronya meyvesinin karakteristik renk özelliklerini koruma ve yoğunlaştırma açısından önemli bir katkı sağladığını göstermektedir. Renk saflığının ve yoğunluğunun korunması, meyvenin görsel kalitesini artırmakla kalmaz, aynı zamanda tüketiciler açısından daha cazip hale gelmesini de sağlar. Mikroenkapsülasyonun renk saflığını koruma etkisi, özellikle fenolik bileşenlerin oksidasyondan korunmasında önemli bir avantaj sağlamaktadır.

Hue açısı (H), rengin açısını gösteren bir ölçümdür ve çalışmada aronya ekstraktında -88,15 olarak belirlenmiştir. Bu düşük Hue açısı değeri, aronya meyvesinde kırmızı pigmentlerin, özellikle de antosiyaninlerin baskın olduğunu göstermektedir. Antosiyaninlerin yoğunluğu, aronya meyvesinin kırmızımsı tonlarının ana kaynağı olarak öne çıkmaktadır. Literatürde de aronya meyvesinin düşük Hue açısına sahip olduğu ve kırmızı pigmentlerin diğer renk tonlarına kıyasla daha baskın olduğu belirtilmektedir (He vd., 2021). -88,15 H, aronyadaki antosiyanin gibi güçlü kırmızı pigmentlerin meyvede yüksek oranda bulunduğunu ve bu pigmentlerin antioksidan kapasiteye de katkıda bulunduğunu göstermektedir. Araştırmada belirlenen düşük Hue açısı değeri, aronya meyvesinin kırmızımsı tonlarını koruma kapasitesinin yüksek olduğunu ortaya koymakta ve literatürdeki bulgularla uyumlu bir görünüm sergilemektedir.

Son olarak, ΔE değeri, renk değişim aralığını ifade eder ve çalışmada aronya ekstraktında en yüksek 25,74 olarak ölçülmüştür. Bu yüksek ΔE değeri, ekstrakte edilen örneklerde belirgin bir renk değişimi yaşandığını ve fenolik bileşiklerin oksidasyon sonucu renkte bir azalma olduğunu göstermektedir. Literatürde de ekstrakte örneklerde renk değişiminin yüksek olduğu ve mikroenkapsülasyon işleminin ise bu değişimi azaltmada etkili olduğu belirtilmektedir (Zhao vd., 2022). Mikroenkapsülasyon işlemi, bileşenlerin oksidasyona karşı korunmasına yardımcı olarak renkteki değişimi minimize etmektedir. Bu durum, mikroenkapsülasyonun sadece renk stabilitesini değil, aynı

zamanda bileşiklerin etkinliğini de koruma kapasitesine sahip olduğunu ortaya koymaktadır.

Aronya meyvesinin renk analizinde elde edilen veriler, bu meyvenin ekstraksiyon ve mikroenkapsülasyon süreçlerinde renk özelliklerinin değiştiğini göstermekte olup, mikroenkapsülasyon işleminin renk stabilitesini koruma açısından önemli olduğu anlaşılmaktadır. Aronya meyvesinin başlangıçtaki kırmızılık, mavilik, parlaklık, kroma, Hue açısı ve ΔE değerleri, meyvesinin karakteristik renk özelliklerinin korunması ve stabil hale getirilmesi bakımından mikroenkapsülasyonun etkin bir yöntem olduğunu göstermektedir. Literatürdeki benzer çalışmalarla uyumlu olarak, mikroenkapsülasyonun yalnızca renk koruma açısından değil, aynı zamanda fenolik bileşiklerin oksidasyondan korunması ve antioksidan kapasitenin artırılması açısından da faydalı olduğu belirtilmektedir. Bu bulgular, aronya meyvesinin görsel ve kimyasal kalitesini artırmak amacıyla mikroenkapsülasyonun önemli bir uygulama potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.

5.3. Aronya ve Antropometrik Ölçümler Arasındaki İlişki

Aronya ekstraktı ve mikroenkapsüle formunun sıçanların VA, VA artış hızı, VKİ ve Lee Obezite İndeksi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Çalışma başlangıcında sıçanlar homojen bir şekilde 271-283 g aralığında seçilmiş ve bu başlangıç ağırlıklarının benzer olması sağlanarak deneysel süreçlerin güvenilirliği artırılmıştır. Araştırmada, SDK ve YYD kontrol grupları ile diyetleri aronya ile desteklenmiş deneme grupları (YYD200K, YYD400K, YYD200E, YYD400E) başlangıç ve bitiş ağırlıkları karşılaştırılmıştır. SDK, sıçanların ortalama VA başlangıçta 399,71±8,2 g iken, çalışmanın sonunda 408,57±7,93 g olarak belirlenmiştir. YYD sıçanların ortalama VA 421,29±10,65 g iken, çalışmanın sonunda 424,43±6,80 g olarak yükselmiştir. Aronya takviyesi verilmeyen sıçanların standart ve yüksek yağlı diyet etkisiyle ağırlık kazandığını göstermektedir. Buna karşılık, deneme grupları (YYD200K, YYD400K, YYD200E, YYD400E) başlangıç ve bitiş ağırlıkları karşılaştırıldığında hepsinde vücut ağırlığı kaybı görülmüş fakat gruplar arası farklar anlamlı bulunmamıştır ($P>0,05$). YYD200K, YYD400K ve YYD400E gruplarında SDK ve YYD gruplarına göre VA da azalması gözlenmiş ($P<0,05$). YYD200E (20,86 g) ve YYD400E (24,72 g) gruplarında ise daha belirgin bir kilo kaybı tespit edilmiştir. Özellikle 200 ve 400 mg/kg doz aronya ekstraktı uygulamasının

sıçanların vücut ağırlığını azaltıcı bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Bu durum, aronya ekstraktının kilo kontrolünde potansiyel olarak etkili bir rol oynayabileceğini ve enerji metabolizmasını hızlandırarak kilo artış hızında azalmaya katkı sağlayabileceğini göstermektedir.

Literatürde antosiyanin bakımından zengin aronya ve diğer meyve ekstraktlarının metabolik hız üzerinde olumlu etkileri olduğu, bu sayede kilo kaybı sağlanabileceği bildirilmektedir (Hein vd., 2019; Tena ve Martíne, 2020; Sandoval-Ramirez vd., 2021). Lila ve Rhim (2005) çalışmasında, antosiyanin içerikli gıdaların obeziteye karşı koruyucu etkiler sağladığı ve kilo alımını engelleyebileceği vurgulanmıştır. Antosiyaninlerin yüksek biyoyararlanımı sayesinde, bu bileşiklerin vücuttaki enerji harcamasını artırarak yağ dokusunu azaltma potansiyeline sahip oldukları bildirilmiştir. Bu bağlamda, Prior ve Wu (2006a) tarafından yapılan bir başka çalışmada, antosiyaninlerin oksidatif stresle ilişkili enerji harcamasını artırarak vücutta depolanan yağ miktarını azaltabileceği ifade edilmiştir. Araştırmada YYD200E ve YYD400E gruplarında gözlenen kilo kaybı ($P<0,05$), literatürdeki bulgularla uyum göstermekte ve aronya ekstraktının enerji metabolizması üzerinde olumlu bir etkisi olabileceğini göstermektedir

Araştırmada 20 haftalık ergin canlı ağırlığa ulaşmış sıçanların 10 haftalık VA artış hızları (vücut ağırlığı büyüme oranı) (g/h) ve 20. haftadan sonraki 6 haftalık VA artış hızları değerlendirilmiştir. YYD200E grubundaki sıçanlarda 10. haftadan 20. haftaya kadarki ortalama haftalık VA artış hızı 11,21±1,55 g iken 20. haftadan 26. haftaya kadar ki VA artış hızı aronya ekstraktının etkisiyle düşmüş ve -4,62±2,75 g olarak ölçülmüştür. Sadece yağlı diyetle beslenen sıçanların ilk 10-20 haftalık VA artış hızı 10,17±1,95 g iken 20-26 haftalık VA artış hızı da sıçanların erginliklerini tamamlamış olmasından dolayı 4,90±0,83 g'e gerilemiştir. Ancak, haftalık vücut ağırlığı artış hızı; YYD200E grubunda -4,62±2,75 g ($P<0,05$) ve YYD400E grubunda -0,79±2,42 g olarak kaydedilmiştir, bu gruplarda sıçanların aronya ekstraktının etkisiyle haftalık olarak kilo kaybettiği gözlemlenmiştir. Bu bulgular, aronya ekstraktının belirtilen dozlarda vücut ağırlığı artış hızını anlamlı derecede azaltabileceğini ve hatta kilo kaybına yol açabileceğini ortaya koymaktadır. Aronya ekstraktının VA artış hızını azaltma potansiyeli, antosiyaninlerin kilo kontrolü üzerindeki etkilerinden kaynaklanmış olabilir. Lila ve Rhim (2005), aronya ve antosiyanin bakımından zengin diğer meyvelerin VA artışını baskılayabileceği ve

metabolik sağlık üzerinde olumlu etkiler yaratabileceği öne sürmektedirler. Ayrıca, Cooke vd. (2005) gibi araştırmacılar, yüksek polifenol içerikli meyve ekstraktlarının yağ dokusu üzerinde inhibitör etkiler gösterdiğini ve bu etkilerin anti-inflamatuar özelliklerle ilişkili olabileceğini bildirmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlar, aronya ekstraktının kilo kontrolünde potansiyel olarak destekleyici bir etkisi olabileceğini ve bu etkiyi özellikle VA artış hızını baskılayarak gösterdiğini işaret etmektedir.

Ayrıca, çalışmada sıçanların VKİ ölçümleri de gerçekleştirilmiştir. Diyetlerine aronya ekstraktı uygulaması yapılmadan önce yani 20. haftalarındaki sıçanların VKİ1 değerleri SDK grubunda 0,20 kg/m² iken, diğer gruplarda 0,20-0,22 kg/m² aralığında değişim göstermiştir. Bu dönemde 200 mg/kg aronya ekstraktı uygulanan (YYD200E) grubu VKİ1 değeri, SDK grubuna kıyasla anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($P<0,0394$). Ancak çalışmanın 26. haftasında VKİ2 değerleri değerlendirildiğinde, SDK grubunda VKİ2 0,60 kg/m² olarak kaydedilirken, diğer gruplarda bu değer 0,54-0,60 kg/m² arasında değişmiştir. Özellikle aronya uygulanan gruplarda VKİ2'nin SDK ve YYD grubuna göre belirgin bir şekilde azalma eğilimi göstermekle birlikte gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı değildir Bu bulgu, aronya gibi antosiyanin bakımından zengin gıdaların, yüksek yağlı diyetlerle ilişkili kilo artışını baskılayabileceğini ve enerji metabolizmasını olumlu yönde etkileyerek VKİ'yi düşürebileceğini kanıtlamış ve belirlenen olumlu etki literatür bulgularıyla da uyumludur (Lila ve Rhim, 2005; Prior ve Wu, 2006b; Chen vd., 2017). Zhang vd. (2020), antosiyaninlerin lipit metabolizmasını düzenleyerek yağ depolanmasını azaltabileceğini ve bu yolla VKİ'nin düşmesine katkı sağlayabileceğini bildirmiştir.

Çalışmada sıçanların Lee Obezite İndeksi değerlendirmesi de yapılmıştır. Aronya uygulaması öncesi sıçanların 20. haftasında Lee Obezite İndeksi SDK grubunda ortalama 274,3 olarak belirlenirken, diğer gruplarda benzer (272,2 ile 285,1) sonuçlar saptanmıştır. Aronya uygulaması sonrası sıçanların 26. haftasında Lee Obezite İndeksi değerlerinde kontrol grupları (SDK ve YYD) ile aronya uygulamaları yapılan deneme grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P>0,05$). Bu durum, aronyanın Lee Obezite İndeksi üzerinde belirgin bir etkisi olmadığını göstermektedir. Literatürde, aronya ve benzeri polifenol içeriği yüksek gıdaların anti obezite etkilerine dair bazı çalışmalar bulunmaktadır. He vd. (2019b), yüksek polifenol içerikli meyve ekstraktlarının obeziteye karşı koruyucu etkiler gösterebildiğini ve özellikle yağ

hücrelerinde inflamasyonu baskılayarak obezite ile ilişkili biyokimyasal göstergelerde olumlu etkiler oluşturduğunu bildirmiştir. Tsuda vd. (2020) araştırmasında, antosiyaninlerin yağ hücrelerinin proliferasyonunu baskılayarak Lee Obezite İndeksi gibi obezite göstergeleri üzerinde etkili olduğunu belirtmektedir. Çalışmamızdaki deneme gurubu sıçanların Lee Obezite İndeksi üzerindeki etkilerin sınırlı kalmasının nedeni uygulanan dozaj miktarı, altı hafta ile süre kısıtlaması veya diğer çevre faktörlerin (gavaj uygulaması ve sıçanların uygulama sırasında tutulması vb.) rol oynayabileceği düşünülmektedir.

Araştırmadan elde edilen veriler, yüksek doz aronya ekstraktının (400 mg/kg) rakamsal olarak sıçanlarda kilo alımını baskıladığını ve VKİ üzerinde de olumlu etkileri olduğunu göstermektedir. Aronya ekstraktının yüksek dozlarda kullanılmasının, özellikle VA artış hızını azaltarak kilo kontrolünde destekleyici bir rol oynayabileceğini ortaya koymaktadır. VKİ ölçümlerindeki düşüş, literatürde de sıklıkla belirtilen antosiyaninlerin kilo alımını baskılama, lipit metabolizmasını düzenleme ve enerji harcamasını artırma gibi faydaları ile uyumludur. Lee Obezite İndeksi sonuçlarında anlamlı bir değişim olmaması, bu indeks üzerindeki etkinin sınırlı kaldığını göstermektedir; ancak, bu konuda daha uzun süreli doz uygulaması veya aynı sürede daha yüksek dozda aronya ekstraktının uygulanması Lee Obezite İndeksi sonuçlarını değiştirebilir. Aronya meyvesinin yüksek antosiyanin içeriği sayesinde enerji metabolizmasını destekleyici ve yağ depolanmasını azaltıcı etkileri bulunmaktadır.

5.4. Aronya ve Serum Kan Yağları Arasındaki İlişki

Araştırmada aronya ekstraktının sıçanların kan lipit profili üzerindeki etkileri incelenmiştir. Çalışma bulguları, aronya ekstraktının sıçanlarda toplam kolesterol, trigliserit, LDL, HDL, VLDL ve LDL/HDL oranında belirgin değişikliklere yol açtığını göstermiştir.

5.4.1. Aronya Toplam Kolesterol ve HDL Kolesterol Arasındaki İlişki

Toplam kolesterol düzeyleri incelendiğinde, yüksek doz (400 mg/kg) aronya ekstraktı verilen YYD400E grubu toplam kolesterol seviyeleri aronya uygulaması yapılmayan SDK veya YYD verilen gruplara kıyasla anlamlı bir artış gözlenmiştir ($P < 0,0070$ ve $P < 0,0166$). HDL kolesterol, arterlerdeki kolesterolü karaciğere taşıyarak

damar sağlığını koruyan bir lipoprotein türüdür ve artışı kardiyovasküler sağlığı olumlu yönde etkileyebilmektedir. HDL düzeylerindeki artışın, damar çeperlerinde kolesterol birikimini azaltarak kalp-damar hastalıkları riskini düşürdüğü bilinmektedir (Gordon ve Rifkind, 1989). Bu çalışmada, aronya ekstraktının yüksek doz HDL seviyelerini artırdığı ve dolayısıyla toplam kolesteroldeki artışın kardiyovasküler risk faktörlerini düşürebileceği görülmektedir.

HDL kolesterolün toplam kolesteroldeki artışa katkı sağladığını gösteren çalışmalar mevcuttur. González-Soto vd. (2021a), antosiyanin bakımından zengin meyve ekstraktlarının HDL seviyelerini artırarak toplam kolesterolü yükseltebileceğini, ancak bu artışın olumlu bir lipit profiline işaret ettiğini belirtmiştir. Çalışmada YYD400E grubunda gözlemlenen yüksek HDL düzeyi ile uyumludur. Ayrıca, antosiyaninler gibi polifenollerle desteklenmiş diyetlerin arteriyel plak oluşumunu ve oksidatif stresi azalttığı bildirilmiştir (Kulling ve Rawel, 2008). Çalışmada yüksek dozda aronya ekstraktı verilen grupta HDL kolesterol seviyesinin artması, antosiyaninlerin damar sağlığı üzerindeki olumlu etkileri olduğu yönündeki çalışmaları destekler niteliktedir.

Zhao vd. (2021b), antosiyanin zengini gıdaların HDL düzeylerini artırmada etkili olduğunu ve bunun lipit profili üzerindeki faydalı etkileri desteklediğini bildirmiştir. He vd. (2019a) tarafından yapılan bir çalışmada, antosiyaninlerin LDL ve VLDL seviyelerini azaltma eğiliminde olduğunu, aynı zamanda HDL seviyelerini artırarak kardiyovasküler sağlığı koruyucu bir rol oynadığını vurgulamaktadır. HDL'nin artışı, damar tıkanıklığını önleyici etkiler sağlayarak arteriyel fonksiyonları destekler. Araştırmada yüksek dozda aronya ekstraktının HDL artırıcı etkisiyle uyumlu olup (He vd., 2019a; Zhao vd., 2021b) damar sağlığı açısından olumlu bir lipit profilini göstermektedir.

5.4.2. Aronya ve Trigliserid Düzeyleri Arasındaki İlişki

Trigliserid seviyeleri, kan lipit profilinde önemli bir yer tutmakta ve yüksek TG seviyeleri ateroskleroz gibi kardiyovasküler hastalıkların oluşumunu hızlandırabilmektedir (Miller vd., 2011). Cooke ve Zucker, (2005) gibi araştırmalarda, polifenol açısından zengin meyve ekstraktlarının TG seviyelerini düşürebileceği ve bu yolla lipit profiline olumlu katkı sağladığı bildirmiştir. Zhang vd. (2020) ise antosiyaninlerin lipit metabolizmasını düzenleyerek TG seviyelerini düşürebileceğini, lipoliz sürecini hızlandırarak yağ depolanmasını baskılayabileceğini belirtmiştir. Ayrıca,

Zhu vd. (2021) de, polifenollerin yağ birikimini baskılayarak trigliserit düzeylerinde düşüş sağladığını belirtmiştirler.

Araştırmada özellikle yüksek doz (400 mg/kg) aronya ekstraktı verilen YYD400E grubundaki sıçanların TG seviyeleri sadece YYD verilen gruba kıyasla anlamlı olarak azalmıştır (P<0,0107). Bu sonuç, yüksek doz aronya ekstraktının TG seviyelerini düşürebileceğini göstermiştir. Bu dozdaki ekstrakta, lipoliz sürecini destekleyen antosiyaninler, yağ hücrelerinin yıkımını teşvik ederek kandaki TG seviyelerinin düşmesine yardımcı olmuş olabilir. Yüksek polifenol içeriğine sahip diyetlerin de TG seviyelerini düşürebildiği bildirilmiştir (Yousef vd., 2021a). Çalışmada diğer uygulamalara (200 g/kg VA ve mikroenkapsülasyon uygulamaları) göre yüksek doz (400 mg/kg) aronya ekstraktı, yüksek polifenol lipit profiline olumlu katkı sağlamasından dolayı YYD400E grubunda TG seviyelerini düşürmede etkili olabileceğini göstermektedir.

5.4.3. Aronya ve LDL Kolesterol Düzeyleri Arasındaki İlişki

Çalışmada 200 mg/kg aronya ekstraktı verilen YYD200E grubunda YYD grubundaki sıçanların LDL seviyelerinde artış gözlenmiştir (P<0,0170). LDL kolesterolün yüksek seviyelerde olması kardiyovasküler riskleri artıran bir faktördür, çünkü LDL birikimi arteriyel plak oluşumuna yol açarak damar sağlığını olumsuz etkileyebilir (Steinberg, 2005). Polifenol içerikli bitki ekstraktlarının LDL düzeylerini düşürmede genel olarak etkili olduğu bilinsede, bazı literatürde yüksek doz uygulamalarının prooksidan etkilere neden olarak LDL seviyelerini artırabileceği de bildirilmiştir (Prior ve Wu, 2006a).

Wang vd. (2021) de, polifenol açısından zengin ekstraktların LDL seviyeleri üzerindeki etkilerinin doza bağlı olarak değişebileceğini ve bazı dozlarda LDL seviyelerinde beklenmedik artışlara yol açabileceğini belirtmiştir. Benzer şekilde Castro vd. (2019), düşük ve orta dozlarda polifenollerin LDL seviyelerini düşürebileceğini ancak yüksek dozlarda bu etkinin tersine dönerek LDL artışına sebep olabileceğini bildirmiştir. Fernández vd. (2022) de, polifenol zengini diyetlerin LDL seviyelerini düşürmekle birlikte, bazı yüksek doz uygulamalarda LDL reseptör ekspresyonunu artırarak hücrelerde LDL birikimini tetikleyebileceğini bildirmiştir. Bu durum, polifenollerin doza bağlı olarak LDL metabolizması üzerinde farklı etkiler yaratabileceğini göstermektedir.

Çalışmada, YYD200E grubunda gözlemlenen kandaki LDL artışı (83,37 mg/dl), muhtemelen düşük doz aronya ekstraktının kandaki LDL'yi düşürme açısından yeterli olmadığını göstermektedir.

5.4.4. Aronya ve VLDL Kolesterol Düzeyleri Arasındaki İlişki

Kan VLDL seviyelerinin yüksek olması, kardiyovasküler hastalık riskini artıran bir faktör olarak kabul edilmektedir (Packard, 2008). Yüksek doz (400 mg/kg) aronya ekstraktı verilen YYD400E grubundaki sıçanların YYD gurubuna göre VLDL seviyelerinde anlamlı olarak azalmıştır ($P<0,0107$). VLDL, karaciğerde üretilen ve trigliseritleri taşıyan bir lipoprotein türüdür. Aronya gibi antosiyanin bakımından zengin ekstraktların VLDL seviyelerini düşürme potansiyeli literatürde de geniş ölçüde desteklenmektedir. Zhu vd. (2021), antosiyaninlerin karaciğerde VLDL sentezini baskılayıcı etkileri olduğunu, bu sayede kandaki VLDL seviyelerini azaltabileceğini belirtmiştir. Benzer şekilde, Park vd. (2022b) de, antosiyaninlerin lipoliz süreçlerini uyararak yağ dokusunda depolanan trigliseritleri azalttığını ve bu sayede VLDL seviyelerinde düşüş sağladığını bildirmiştir. Kim vd. (2021) ise yüksek polifenol içerikli diyetlerin VLDL seviyelerini düşürebileceğini, bunun da lipit profiline olumlu katkı sağladığını belirtmiştir. Çalışmada yüksek doz aronya ekstraktı verilen YYD400E grubundaki sıçanlarda gözlemlenen düşük VLDL seviyesi, literatür bulgularıyla (Zhu vd. 2021; Kim vd. 2021; Park vd. 2022b) uyum göstermektedir. Aronya ekstraktının yüksek dozda (400 mg/kg) verilmesi, içerdiği polifenol ve antosiyaninlerin yağ metabolizmasını dengeleyici bir etkiye sahip olabileceğini düşük VLDL seviyeleriyle ve lipit profiline pozitif katkı sağlayarak göstermektedir.

5.4.5. Aronya ve LDL/HDL Oranı Arasındaki İlişki

LDL/HDL oranı kardiyovasküler riskin değerlendirilmesinde önemli bir göstergedir ve oranının düşük olması, genellikle kardiyovasküler sağlığın korunması açısından olumlu olarak değerlendirilir (Assmann ve Gotto, 2004). Zhang vd. (2020), polifenollerin LDL seviyelerini düşürüp HDL seviyelerini artırarak LDL/HDL oranını iyileştirebileceğini, ancak uygulama dozuna bağlı olarak bu etkinin değişebileceğini belirtmiştir. Kim vd. (2021) ise polifenol içerikli diyetlerin LDL/HDL oranını düşürebileceğini ancak yüksek dozlarda bu oranın beklenmedik şekilde artabileceğini

bildirmiştir. Çalışmada 200 mg/kg aronya ekstraktı verilen YYD200E grubundaki sıçanların LDL/HDL oranında kontrol grubuna göre anlamlı bir artış gözlenmiştir (P<0,0134). Çalışmamızda diğer deneme gruplarına göre 200 mg/kg ekstrakte aronya verilen YYD200E grubundaki LDL/HDL oranındaki artış, polifenollerin lipit metabolizması üzerindeki etkilerinin düşük dozaja bağımlı olarak aronya ekstraktının yetersiz kaldığını göstermektedir.

Wang vd. (2022)'de, LDL/HDL oranının optimal seviyelerde tutulmasının önemini vurgularken, yüksek doz polifenol uygulamalarının bu oranı tersine yükseltebileceğini belirtmiştir. Bu çalışmada ise düşük doz uygulamaları, lipit parametrelerinde artan sonuçlara yol açmıştır.

Kapsüllenmiş ve kapsüllenmemiş aronya ekstraktının 2 farklı formda ve 4 farklı doza bağlı olarak sıçanların lipit profili üzerinde olumlu ve olumsuz etkiler yarattığı gözlenmiştir. Yüksek doz aronya ekstraktı (400 mg/kg), HDL ve VLDL seviyelerinde iyileşme sağlarken, TG seviyelerini düşürmüştür. Bu durum, kardiyovasküler sağlık açısından olumlu etkiler yaratmıştır. Ancak, 200 mg/kg dozunda uygulanan aronya ekstraktı, LDL ve LDL/HDL oranında beklenmedik artışlara yol açmış, bu da kardiyovasküler risk faktörleri açısından yetersiz olduğunu ortaya koymuştur. Çalışmamızda kapsüllenen aronya ekstraktının doza bağlı olarak lipit profili üzerinde olumlu etkiler göstermediği belirlenmiştir. Yüksek dozlarda aronya ekstraktıyla (400 mg/kg) HDL'yi artırıcı ve TG'yi düşürücü etkiler görülürken, düşük dozlarda LDL seviyelerinde beklenmedik artışlar sağlamıştır. Bu sonuç, polifenolce zengini aronya ekstraktının kullanımında dozun dikkatle belirlenmesi gerektiğini göstermektedir. Literatürdeki çeşitli çalışmalar da araştırmamıza benzer bulgular sunmakta olup, polifenol ve antosiyanin içeren bitki ekstraktlarının lipit metabolizmasını düzenleyici etkilerini desteklemektedir (He vd., 2019a; Yousef vd., 2021ab; Zhao vd., 2021b; González-Soto vd., 2021b).

5.5. Aronya ve Serum PON1 Enzimi, PON1 Gen Ekspresyonu Arasındaki İlişki

Bu çalışmada aronya ekstraktının sıçanların PON1 gen ekspresyonu ve PON1 enzim aktivitesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Araştırma bulguları, aronya ekstraktının 400 mg/kg dozda PON1 enzim aktivitesini artırdığını göstermektedir. Aronya, antioksidan kapasitesi yüksek bir bitki olarak polifenol, antosiyanin gibi

biyoaktif bileşenler açısından zengindir. Bu bileşenlerin, PON1 enzimi gibi antioksidan savunma sistemleri üzerine koruyucu etkiler sağladığı bilimektedir. Çalışmada PON1 gen ekspresyonu değerlendirildiğinde, özellikle YYD200K grubunda PON1 geni ekpresyon değerinin kontrol grubuna göre yüksek olduğu gözlenmiştir (1,44±0,55). Bu sonuç, 200 mg/kg aronya ekstraktının enkapsüle formunun (YYD200K) PON1 geni katlama gen ifadesini arttırdığı ancak gen ekspresyonu potansiyelini düşürdüğü anlamına gelmektedir ($P>0,05$). PON1 gen ekspresyonunun yüksek olması için $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ değerinin düşük olması gerekir. PON1 enziminin üretiminin artması oksidatif strese karşı daha güçlü bir savunma mekanizması oluşması anlamına gelmektedir (Marsillach vd., 2013).

Literatürde polifenoller açısından zengin besinlerin, PON1 gen ekspresyonu üzerindeki etkilerini değerlendiren çalışmalar bulunmaktadır. Marsillach vd. (2013), antioksidan bileşenlerin PON1 gen ekspresyonunu düzenleyebileceğini ve oksidatif stresle mücadelede önemli bir rol oynayabileceğini bildirmiştir. Antioksidanlar, oksidatif hasarı sınırlayarak PON1 gibi koruyucu enzimlerin aktivitesini artırmakta ve kardiyovasküler koruma sağlamaktadır. Kim vd. (2021) tarafından yapılan bir çalışmada, antosiyanin zengini gıdaların karaciğer ve plazmada PON1 gen ekspresyonunu artırdığı ve bu artışın lipit peroksidasyonunu azaltarak kardiyovasküler hastalık risklerini düşürdüğü belirtilmiştir. Khan vd. (2019), polifenol içerikli diyetlerin, PON1 aktivitesini ve ekspresyonunu destekleyerek kardiyovasküler hastalık riskini azaltabileceğini ve oksidatif stresi baskılayabileceğini rapor etmiştir. Çalışmamızda sıçanların kanındaki PON1 geni ekspresyonu SDK ve YYD kontrol grupları ile YYD200E, YYD200K, YYD400E, YYD400K deneme grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($P>0,05$; Şekil 4.5b).

PON1 enzimi, lipoproteinlerin oksidasyonunu önleyen, dolayısıyla ateroskleroz gibi kardiyovasküler hastalıkları önlemede kritik bir rol oynayan bir antioksidan enzimdir. Aviram ve Rosenblat (2004) çalışmalarında, polifenoller açısından zengin besinlerin PON1 enzim aktivitesini artırabileceğini ve oksidatif hasarı önleyici etkiler sunabileceğini rapor etmiştir. Ayrıca, yüksek polifenol içeriğine sahip meyve ekstraktlarının antioksidan kapasiteleri sayesinde PON1 aktivitesini desteklediği gösterilmiştir (Aviram vd., 2020). Polifenol açısından zengin diyetlerin oksidatif stresin neden olduğu PON1 aktivitesi kaybını önleyebileceği (Khan vd., 2019), ayrıca, antosiyaninlerin karaciğer ve plazma PON1 aktivitelerini artırabileceğini ve bunun

aterojenik risk faktörlerini düşürmede önemli bir rol oynadığı, antioksidan özelliklerinin oksidatif stres kaynaklı zararları önlemeye yardımcı olduğu bilinmektedir (Kim vd., 2021). Wang vd. (2022) de, antioksidan kapasiteleri yüksek diyetlerin PON1 enzim aktivitesini artırdığını ve bu etkilerin fenolik bileşiklerin oksidatif stresi azaltıcı özellikleri ile ilişkili olduğunu bildirmiştir.

PON1 enzim aktivitesi açısından çalışmada en dikkat çekici sonuçlar 400 mg/kg aronya ekstraktı verilen YYD400E grubunda elde edilmiştir. Bu gruptaki sıçanların PON1 seviyeleri SDK ve YYD gruplarına kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($P<0,0025$ ve $P<0,00001$). YYD400E grubunda 400 mg/kg aronya ekstraktının PON1 enzim aktivitesini önemli ölçüde artırdığı gözlenmiştir. Bu artış, YYD400E grubunda gözlemlenen yüksek PON1 enzim aktivitesi, yüksek dozajda verilen aronya ekstraktının antioksidan savunmayı destekleme potansiyelinin olduğunu ortaya koymaktadır. Bu da oksidatif strese karşı koruyucu bir etki sağlayabileceğini düşündürmektedir. Aronya ekstraktındaki polifenoller oksidatif hasarı sınırlayarak PON1 aktivitesini artırmakta, dolayısıyla kardiyovasküler sağlığı desteklemektedir.

5.6. Aronya ve Serum Malondialdehit Düzeyleri Arasındaki İlişki

Malondialdehit (MDA), hücrelerdeki lipit peroksidasyonunun bir ürünü olup, oksidatif stres düzeylerini yansıtan önemli bir biyobelirteçtir (Wang vd., 2022). Çalışmada, SDK grubunda MDA düzeyi 2,22±0,25 nmol/ml olarak ölçülmüştür. YYD sıçanlarında ise MDA değeri 2,51±0,19 nmol/ml olarak tespit edilmiştir. YYD200K ve YYD200E gruplarında sırasıyla 2,50±0,18 nmol/ml ve 2,46±0,29 nmol/ml MDA düzeyleri ölçülmüştür ve bu değerlerin, YYD grubu ile benzer olduğu görülmüştür. Ancak, 400 mg/kg dozunda aronya ekstraktı alan YYD400E grubunda MDA seviyesi 3,01±0,04 nmol/ml'ye yükselmiştir. YYD400E grubundaki bu MDA düzeyi, SDK grubundaki 2,22±0,25 nmol/ml değerine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir ($P<0,0290$). Bu bulgu, yüksek doz aronya ekstraktının oksidatif stresi artırabileceğini ve bu durumun lipit peroksidasyonuna yol açarak hücresel zarar oluşturabileceğini düşündürmektedir. Aviram ve Rosenblat (2004) çalışmalarında, polifenollerle zenginleştirilmiş diyetlerin lipit peroksidasyonunu azaltarak MDA seviyelerini düşürebileceğini bildirmiştir. Marsillach vd. (2013), antioksidan bileşenlerin lipit peroksidasyonunu sınırlayarak MDA seviyelerini azaltabileceğini ve bu sayede

hücre sağlığını koruyabileceğini belirtmiştir. Benzer şekilde, Wang vd. (2022), polifenol açısından zengin diyetlerin oksidatif stres belirteçlerini baskıladığını ve bu yolla kardiyovasküler risk faktörlerini azaltabileceğini bildirmiştir. MDA düzeylerinin azalması, hücrede oksidatif stresin azaldığını ve lipit peroksidasyonunun düştüğünü göstermektedir. Çalışmada elde edilen bulgular, yüksek doz (400 mg/kg) aronya ekstraktının kandaki MDA seviyelerini artırarak oksidatif stresi artırabileceğine dair ipuçları sunmaktadır.

Kim vd. (2020) çalışmasında, antosiyanin ve flavonoid açısından zengin gıdaların düşük dozlarda oksidatif stresi azaltıcı etki gösterdiği, ancak yüksek dozlarda uygulandığında antioksidan-prooksidan dengesinin değişebileceği bildirilmiştir. Çalışmada, yüksek doz polifenollerin oksidatif stresle mücadele eden antioksidan savunma mekanizmalarını zorlayarak lipit peroksidasyonuna neden olabileceği belirtilmiştir. Bu durum, polifenollerin düşük dozlarda etkili bir şekilde oksidatif stresle savaşırken, yüksek dozlarda hücresel dengeyi bozarak oksidatif stres seviyelerini artırabileceğini ortaya koymaktadır. Zhang vd. (2019), polifenol içerikli gıdaların düşük ve orta dozlarda serbest radikal oluşumunu baskılayarak oksidatif stresi azalttığını ancak yüksek dozlarda uygulanması durumunda serbest radikal üretimini tetikleyebileceğini belirtmiştir. Bu durum, özellikle antioksidanların antioksidan-prooksidan dengesini bozabileceğini göstermektedir. Park vd. (2022a), polifenollerin yüksek dozlarda prooksidan etkiler gösterebileceğini ve bu etkilerin, lipit peroksidasyonunda artışa yol açarak MDA seviyelerinin yükselmesine sebep olabileceğini bildirmiştir. Polifenoller, normalde serbest radikalleri nötralize ederek hücre hasarını önlerken, yüksek dozlarda bu nötralizasyon kapasitelerini aşarak oksidatif dengeyi bozabilmektedir. Ayrıca, Aviram vd. (2020), polifenol içerikli diyetlerin belirli dozlara kadar oksidatif stresi azaltabileceğini, ancak doz arttıkça bu etkinin tersine dönebileceğini ve oksidatif dengenin bozulabileceğini belirtmiştir. Wang vd. (2022) çalışmasında, antioksidan içerikli gıdaların düşük dozlarda serbest radikal nötralizasyonunu destekleyerek oksidatif stresi azalttığı, ancak yüksek dozlarda bu etkinin tersine dönebileceği ve oksidatif streste artışa yol açabileceği belirtilmiştir. Gutteridge (1995) de, yüksek dozda antioksidan takviyesinin serbest radikallerin aşırı nötralizasyonu sonucu, oksidatif dengeyi bozarak hücresel stres düzeylerini artırabileceğini ifade etmiştir.

Yukarıdaki çalışmalarda (Gutteridge, 1995; Zhang vd., 2019; Kim vd., 2020; Aviram vd., 2020; Park vd., 2022a; Wang vd., 2022) belirtildiği gibi, yüksek doz antioksidan bileşenlerin oksidatif streste artışa neden olabileceği birçok literatürde sıklıkla vurgulanan bir konudur. Bu durum, antioksidan bileşenlerin doza bağlı olarak hücresel denge üzerinde farklı etkiler yaratabileceğini ortaya koymaktadır. Liu vd. (2021) tarafından yapılan çalışmadada, yüksek doz polifenollerin oksidatif dengenin değişmesine yol açarak lipit peroksidasyonunu artırabileceği bildirilmiştirler. Antioksidan özellikleri ile bilinen bileşenlerin, özellikle yüksek dozlarda uygulandığında prooksidan etki gösterebileceği de belirtilmiştir. Araştırmamızda, polifenol açısından zengin aronya diyetlerin düşük ve orta dozlarda verilmesinin oksidatif stres seviyelerini düşürdüğü, ancak yüksek doz ekstrakt uygulamalarında hücresel lipit peroksidasyonunu arttırdığı ve bunun sonucunda kandaki MDA seviyelerinde artış belirlenmiştir. Çalışmamızda elde edilen bulgular, aronya ekstraktının belirli bir doza kadar oksidatif stresle mücadelede etkili olabileceğini ancak yüksek dozların prooksidan etkiler göstererek kandaki MDA seviyelerinde artışa neden olabileceğini ortaya koymaktadır. Antioksidanların, özellikle yüksek dozda uygulandığında oksidatif dengeyi bozabileceği ve serbest radikal oluşumunu tetikleyebileceği göz önüne alındığında, bu tür doğal bileşenlerin etkili ve güvenli dozlarda kullanımı büyük önem taşımaktadır. Kandaki MDA seviyesini düşürmek ve oksidatif dengeyi korumak için diyetlerde, yüksek doz antioksidan uygulamalarına dikkat edilmesi ve optimal dozun belirlenmesi gerektiği anlaşılmaktadır.

5.7. Aronya Karaciğer Ağırlığı ve Karaciğer Ağırlığının/Vücut Ağırlığı Oranı Arasındaki İlişki

Karaciğer ağırlığı ve karaciğer ağırlığının/VA oranı gibi parametreler, karaciğer sağlığını ve genel vücut metabolizmasını anlamak için kritik öneme sahiptir. Bu çalışmada aronya ekstraktının farklı dozlarının karaciğer ağırlığı ve karaciğer/VA oranı üzerindeki etkileri de detaylı olarak değerlendirilmiştir. On altı hafta YYD ile beslenmiş 26 haftalık sıçanlarına son 6 hafta mikroenkapsülleme uygulanmış ve uygulanmamış aronya ekstraktı ilave edildikten sonra karaciğer ağırlıkları incelendiğinde, kontrol grupları olan SDK ve YYD grubundaki sıçanlarda karaciğer ağırlığı sırasıyla 17,43±0,79 g ve 18,26±0,81 g olarak bulunmuştur. Karaciğer ağırlığı 200 mg/kg aronya alan

YYD200K'da 15,21±0,71 g iken, YYD200E grubunda 14,26±0,55 g olarak tespit edilmiştir. 400 mg/kg aronya alan gruplarda, YYD400K grubunda karaciğer ağırlığı 14,56±0,51 g ve YYD400E grubunda ise 12,80±0,24 g olarak ölçülmüştür.

Vücut ağırlığı 250 ila 300 g olan SD cinsi sıçanların ortalama karaciğer ağırlığı 13,6 g ve VA oranı ise yaklaşık %5 (4,5-5,5)'tir (Zanchet ve Monteiro, 2002). Araştırmadaki sıçanların aronya uygulaması gruplarındaki karaciğer/VA oranı; kontrol gruplarında SDK'da %4,37±0,21 ve YYD'da %4,34±0,16 olarak ölçülmüştür. YYD200K grubunda %3,60±0,17, YYD200E grubunda %3,30±0,13, YYD400K grubunda %3,39±0,13 ve YYD400E grubunda ise %3,20±0,18 olarak ölçülmüştür. Yüksek yağlı diyetle beslenen SD sıçanların diyetlerinde günlük 400 mg/kg aronya ekstraktının alınması karaciğer/VA oranını anlamlı şekilde düşürmüştür ($P<0,05$). Bulgular, özellikle yüksek doz aronya ekstraktının (400 mg/kg) verildiği YYD400E grubunda karaciğer/VA oranı parametreleri ve karaciğer ağırlığı üzerine belirgin değişimlere yol açmış ve aronya ekstraktının karaciğer ağırlığını anlamlı derecede azaltabileceğini ortaya koymuştur.

Tapiero vd. (2002), yüksek doz polifenol içeriğine sahip diyetlerin, karaciğer hücrelerinde metabolik değişimlere ve stres tepkilerine neden olabileceğini ve bu durumun karaciğer dokusunda küçülme ile sonuçlanabileceğini belirtmiştir. Polifenoller açısından zengin gıdaların belirli bir dozda karaciğer sağlığına faydalı olabilirken, yüksek dozdaki uygulanmaların hücresel stres ve otofaji süreçlerini tetiklediği, antosiyaninlerin de karaciğer hücrelerinde otofaji ve apoptoz süreçlerini teşvik ederek dokuda küçülmeye neden olabileceği bildirmiştir (Kim vd., 2020). Zhu vd. (2021) ise polifenol içeriği yüksek ekstraktların karaciğer dokusunun enerji metabolizmasını etkileyebileceğini ve bunun da doku ağırlığında kayba yol açabileceğini öne sürmüştür. Wang vd. (2020) de, polifenol açısından zengin diyetlerin karaciğer hücrelerinde oksidatif stres seviyelerini artırarak dokuda değişimlere yol açabileceğini, polifenollerin normal şartlarda antioksidan özelliklere sahip olmalarına rağmen, yüksek dozda uygulandıklarında oksidatif dengeyi bozarak hücresel stres tepkilerini tetikleyebileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca, Park vd. (2022a) tarafından da yapılan bir başka çalışmada, yüksek doz antosiyaninlerin karaciğer inflamasyonuna neden olabileceği ve dokuda küçülme gibi değişikliklere yol açabileceği öne sürülmüştür.

Araştırmanın sonunda denemedeki sıçanların ortalama VA; SDK grubunda 408,57±7,93 g ve YYD grubunda ise 424,43±6,80 g'dır. Sırasıyla karaciğer ağırlığının VA oranı %4,37±0,21 ve %4,34±0,16'dır. YYD400E grubunda 397,71±10.04 g ortalama VA'ındaki sıçanların ise %3,20±0,18 olarak ölçülmüştür. Yüksek doz aronya ekstraktı verilen sıçanlarda gözlemlenen düşük karaciğer/VA oranları, antosiyanin alımından kaynaklı karaciğerde inflamatuar tepkileri (Park vd., 2022a) ve oksidatif stresi artırabileceği (Wang vd., 2020) ifade edilsede, YYD400E grubu sıçanların karaciğer ağırlıklarındaki düşüş vücut ağırlıklarına göre oransal bir kayıptır. Bu oran kaybı hem vücuttan hem de karaciğerden kaynaklı yağ kaybıdır (P<0,001). Bu da aronya ekstraktı ile alınan polifenol içeriğinden kaynaklanmaktadır. Bu durum diğer organlarda da olabileceği ve aterosklerozisi engellemede etkili olabileceği de düşünülmektedir. YYD400E grubu sıçanlarını verilen aronya ekstraktının dozu optimum seviyede olduğu için karaciğer ağırlığı ve karaciğer/VA oranını anlamlı şekilde düşürdüğü görülmüştür (P<0,0001). Polifenol ve antosiyanin zenginliğine sahip bileşiklerin belirli dozlara kadar karaciğer sağlığı üzerinde olumlu etkiler gösterdiği, ancak yüksek dozlarda bu etkilerin tersine dönebileceği belirtilmiştir (Tapiero vd., 2002; Kim vd., 2020; Wang vd., 2020; Zhu vd., 2021; Park vd., 2022a). Ancak çalışmadaki, 400 mg/kg doz aronya ekstraktı polifenollerin karaciğer üzerinde oksidatif stres, otofaji, apoptoz ve inflamasyon gibi hücresel süreçleri tetiklemeden karaciğer ve vücut ağırlığında azalmaya neden olabileceği düşünülmektedir. YYD400E grubu sıçanların kanındaki AST, MDA ve ALT değerlerindeki olumlu veriler bu görüşümüzü desteklemektedir.

5.8. Aronya Karaciğer Enzimleri Arasındaki İlişki

5.8.1. Aronya ve Alanin Aminotransferaz (ALT) Enzim Düzeyleri Arasındaki İlişki

Alanin aminotransferaz karaciğer hücrelerinin zedelenmesi veya hasar görmesi durumunda kana salınan bir enzimdir ve karaciğer hasarının spesifik bir göstergesi olarak kullanılır. Karaciğer hücrelerinde bulunan bu enzim, hücre hasarı olduğunda kanda artar ve bu artış karaciğer sağlığının bir göstergesi olarak değerlendirilir (Karamese vd., 2016). Sprague Dawley cinsi sıçanları için ALT'nin normal aralık değeri 6-114 U/L olarak rapor edilmiştir (Pratt vd., 1992; Loeb ve Quimby, 1999). Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, tüm deneysel gruplarda ALT seviyelerinin bu referans aralığında kaldığını göstermiştir, bu da aronya ekstraktının ALT seviyeleri üzerinde toksik bir etki göstermediğini

düşündürmektedir. SDK grubunda ALT değeri 44,15±5,61 U/L, YYD grubunda ise 42,49±4,52 U/L olarak bulunmuştur. YYD200K grubunda ALT değeri 38,91±3,61 U/L iken, YYD200E grubunda bu değer 54,13±3,30 U/L olarak ölçülmüştür. YYD200E grubundaki bu hafif ALT artışı aronya ekstraktının ALT seviyelerini bir miktar arttırabileceğini işaret etmektedir. YYD400K grubunda ALT seviyesi 38,91±5,48 U/L, YYD400E grubunda ise bu değer 35,10±1,98 U/L olarak ölçülmüştür.

Kim vd. (2020), polifenol ve antosiyanin zengini gıdaların orta dozda karaciğer sağlığını destekleyici etkiler sunduğunu, ancak bu bileşiklerin yüksek dozda karaciğer hücrelerinde stres tepkilerine neden olabileceğini belirtmiştir. Wang vd. (2021) ise, antioksidan özelliklere sahip polifenollerin karaciğer hücrelerini hasardan koruyabildiğini, ancak yüksek dozda uygulamalarda enzim aktivitelerinde artış gözlenebileceğini bildirmiştir. Polifenol zengini ekstraktların belirli bir dozdan sonra karaciğer üzerinde prooksidan etkiler gösterebileceği belirtmiştir (Aviram vd., 2020) ve bu durumun karaciğer enzimlerinde yükselmelere (Liu vd., 2019) neden olabileceği bildirmiştir. Çalışmada YYD200E grubundaki ALT artışı SD sıçanları için normal değerler (6-114 U/L) arasındadır. Genel olarak, SDK ve YYD gruplarına göre çalışmamızda YYD200E'de gözlemlenen hafif ALT artışı hariç diğer gruplarda, polifenol içeren aronya ekstraktının 200-400 mg/kg dozlarda karaciğer üzerinde hasara yol açmadığı ve ALT değerini sayısal olarak düşürdüğü görülmektedir. YYD400E dozunda ALT seviyelerinin düştüğü tespit edilmiştir. Aronya ekstraktının YYD ile beslenen SD sıçanlarına orta dozlarda verilmesinin karaciğer hücrelerinde hafif bir strese yol açabileceğini, ancak 400 mg/kg dozlarda karaciğer hasarını koruduğu düşünülmektedir.

5.8.2. Aronya ve Aspartat Aminotransferaz (AST) Enzim Düzeyleri Arasındaki İlişki

Aspartat Aminotransferaz enzimi, yalnızca karaciğerde değil, kas dokusu, kalp ve diğer organlarda da bulunur ve doku hasarı durumunda kana salınır. AST, karaciğer sağlığı ve doku bütünlüğünün önemli bir göstergesi olup, SD cinsi sıçanları için AST referans aralığı 37-205 U/L olarak belirlenmiştir (ElDin vd., 2015). Çalışmamızda tüm grupların AST seviyeleri bu aralıkta kalmakla birlikte, bazı gruplar arasında anlamlı farklar gözlenmiştir. SDK grubunda AST seviyesi 64,54±6,50 U/L, YYD grubunda 75,37±4,32 U/L olarak belirlenmiştir. YYD200K grubunda AST değeri 62,11±8,23 U/L

iken, YYD200E grubunda AST seviyesi 40,45±3,82 U/L olarak ölçülmüştür. YYD400K grubunda AST seviyesi (52,13±5,50 U/L) (P>0,05), YYD400E grubunda ise AST seviyesine (26,68±2,58 U/L) kıyasla anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur (P<0,0001). Bu sonuçlar, özellikle 400 mg/kg dozunda aronya ekstraktı alan grubun AST seviyelerinin diğer gruplara kıyasla belirgin olarak daha düşük olduğunu göstermektedir. Bu durum, aronya ekstraktının yüksek dozda karaciğer hücrelerinde koruyucu bir etki yaratabileceğini göstermektedir. Kim vd. (2020), orta dozda polifenollerin karaciğer sağlığını destekleyebileceğini, ancak yüksek doz uygulamalarda karaciğer enzimlerinde düşüşler gözlemlenebileceğini belirtmiştir. YYD400E grubunda görülen AST düşüşü, polifenollerin bu koruyucu etkilerini yansıtıyor olabilir. Aviram vd. (2020), yüksek doz polifenollerin karaciğer sağlığını koruyucu etkilerini vurgulamış, bu bileşiklerin anti inflamatuar özellikleri ile karaciğer sağlığını destekleyebileceğini belirtmiştir. Antosiyaninlerin karaciğer enzim seviyelerini düzenleyici etkiler sunduğu ve özellikle yüksek dozda uygulandıklarında karaciğer sağlığını iyileştirebileceği (Zhu vd., 2022), polifenollerin de oksidatif stresi azaltarak AST seviyelerini düşürebildiği ve karaciğer hücrelerini koruyucu bir etkisi olduğu rapor edilmiştir (Wang vd., 2021). Polifenollerin karaciğer hücrelerinde antioksidan savunmayı destekleyerek AST ve ALT enzim seviyelerini düzenleyebileceği bilinmektedir (Liu vd., 2019). Araştırmadaki, 200 mg/kg dozda enkapsüle aronya ekstraktı verilen YYD200K grubundaki sıçanların AST seviyelerinde hafif bir artış gözlemlenirken, 400 mg/kg dozdaki YYD400K grubunda AST seviyelerinde anlamlı bir düşüş gözlenmiştir. Özellikle, YYD400E grubunda gözlemlenen düşük AST değeri, antioksidan etkilerin bir sonucudur ve bizlere aronya ekstraktının belirtilen dozlarda karaciğer hücrelerini koruyucu etkileri olduğunu kanıtlamıştır. Antioksidan ve AST verileri ilişkisi önceki araştırmacıların belirttikleri ile uyumludur. AST'deki düşüklük anti inflamatuar etkilerin bir yansıması da olabilir. Ancak aronya ekstraktının dozu 400 mg/kg aşarsa karaciğer hücrelerinde hafif strese yol açabileceği de düşünülmelidir.

5.9. Aronya ve Karaciğer Dokusu PON1 Enzim Aktivitesi, PON1 Gen Ekspresyonu Arasındaki İlişki

Çalışmada, özellikle yüksek doz (400 mg/kg) aronya ekstraktı alan (YYD400E) grubunda PON1 enzim aktivitesinde belirgin bir artış gözlemlenmiştir. PON1 enzimi,

lipit oksidasyonunu inhibe ederek ve serbest radikalleri nötralize ederek oksidatif stresin azaltılmasında rol oynar. Enzim aktivitesinin yüksek seviyelerde olması, özellikle antioksidan özellik gösteren bileşiklerle desteklendiğinde, hücrelerin oksidatif strese karşı savunmasını güçlendirebilir. SDK grubunda PON1 aktivitesi 62,18±7,60 ng/ml, YYD grubunda 63,17±6,21 ng/ml olarak ölçülmüştür. YYD200K grubunda PON1 seviyesi 62,20±4,95 ng/ml olarak gözlenirken, YYD200E grubunda bu değer 68,06±11,95 ng/ml seviyesine ulaşmıştır. YYD400K grubunda PON1 seviyesi 58,14±15,66 ng/ml iken, YYD400E grubunda PON1 değeri en yüksek düzeyde, 81,00±1,11 ng/ml olarak tespit edilmiştir ($P<0,05$).

Polifenoller ve antosiyaninlerin, oksidatif stresle mücadelede önemli bileşikler oldukları bilinmektedir. Literatürdeki birçok çalışma, polifenol zenginliğinin PON1 aktivitesini destekleyici rol oynadığını bildirmektedir. Aviram ve Fuhrman (2002), polifenollerin PON1 aktivitesini artırarak lipit oksidasyonunu inhibe ettiğini ve kardiyovasküler sistem üzerinde koruyucu etkiler sunduğunu belirtmiştir. YYD400E grubundaki yüksek PON1 enzim aktivitesi, aronya ekstraktının bu antioksidan etkilerini yansıttığı düşünülebilir. Ferre vd. (2007), kırmızı meyvelerdeki polifenollerin PON1 aktivitesini destekleyerek ateroskleroz ve kardiyovasküler hastalık riskini azaltabileceğini belirtmiştir. Kim vd. (2020), polifenol açısından zengin diyetlerin PON1 aktivitesini artırabileceğini ve böylece oksidatif stresin azaltılmasına katkıda bulunabileceğini ifade etmiştir. Wang vd. (2021), PON1 gibi antioksidan enzimlerin aktivitesini artırarak hücresel oksidatif hasarı azalttığını ve karaciğer sağlığını desteklediğini belirtmiştir. Polifenollerin oksidatif stres belirteçlerini azaltarak PON1 gibi koruyucu enzimlerin seviyesini arttırabileceği (Liu vd., 2019), artan PON1 enzimlerin aktivitesi de kardiyovasküler sağlığı iyileştirebileceği (Aviram vd., 2020) bildirilmiştir. Ancak, bazı çalışmalarda yüksek doz polifenollerin (Tapiero vd., 2002) ve yüksek doz antioksidanların (Riediger vd., 2009) PON1 gen ekspresyonunu azaltabileceğini ve bu durumun hücresel stres yanıtları ile ilişkili olabileceği de rapor edilmiştir. PON1 gen ekspresyonu açısından değerlendirildiğinde, yüksek dozda aronya ekstraktı alan YYD400E grubunda PON1 gen ekspresyon değerinin düşük seviyelerde olduğu gözlenmiştir. Bu durum, yüksek dozda antioksidanların belirli gen ekspresyonlarını azaltabileceğine dair bulgularla uyum göstermektedir. Polifenoller, enzim aktivitelerini artırıcı özellikleri ile bilinirler. YYD400E grubunda gözlemlenen PON1 gen

ekspresyonu, aronya ekstraktının 400 mg/kg doz uygulamasının olumlu etki gösterdiği ve PON1 enzim aktivitelerini de artırıcı etkisi olduğu düşünülmektedir. YYD400E grubunda PON1 enzim aktivitesindeki anlamlı artış, PON1 gen ekspresyonu düşürmüştür. Bu durum, aronya ekstraktının yüksek dozda karaciğer dokusunda antioksidan savunmayı destekleyebileceğini göstermektedir. Polifenol ve antosiyanin içeriği yüksek aronyanın, özellikle oksidatif stresle mücadelede PON1 enzim aktivitesini destekleyici etkilerini göstermiştir. Çalışmamızda YYD400E grubunda gözlemlenen yüksek PON1 seviyesi, aronya ekstraktındaki polifenollerin oksidatif stresi azaltarak (düşük MDA seviyesi) PON1 enzimlerin aktivitesini arttırmıştır ki bu da kardiyovasküler sağlığa olumlu katkı sunabilir.

5.10. Aronya Arteroskleroz ve Koroner Risk İndeksi Arasındaki İlişki

Arteroskleroz ve koroner risk indeksi, arteriyel inflamasyon ve lipit peroksidasyonu gibi damar sağlığına ilişkin göstergeleri yansıtan önemli parametrelerdir. Sıçanların **(**TK-HDL)/HDL oranına göre hesaplanan ateroskleroz risk indeksi değerleri SDK 1,51±2,20; YYD 1,61±1,85; YYD200E grubunda 1,97±2,85; YYD400E grubunda 1,17±1,75; YYD200K grubunda 1,62±2,18; YYD400K grubunda 1,63±1,50 olarak hesaplanmıştır.YYD200E grubundaki sıçanların koroner indeksi SDK grubundaki sıçanlara göre daha yüksek ve anlamlı hesaplanmıştır (P<0,030).

Sıçanların koroner risk indeksi değerleri SDK 2,54±0,10; YYD 2,62±0,05; YYD200E grubunda 3,06±0,25; YYD400E grubunda 2,19±0,08; YYD200K grubunda 2,64±0,10; YYD400K grubunda 2,65±0,09 olarak hesaplanmıştır. YYD200E grubundaki sıçanların koroner risk indeksi SDK grubundaki sıçanlara göre daha yüksek ve anlamlı hesaplanmıştır (P<0,0208). Literatürde, TK/HDL oranı kardiyovasküler hastalık riskini tahmin etmek için kullanılan bir ölçümdür ve bu oran koroner risk indeksi (KRİ) olarak bilinmektedir (Kazemi vd., 2018b; Li vd., 2023). Woodward vd. (2007bc), normal oranın ≤4,2 olduğunu belirtmiştir. Çalışma sonuçları tüm gruplarda hesaplanan KRİ değerlerinin normal sınırlar içinde olduğunu ortaya koymaktadır. Histopatoloji ve KRİ verileri birlikte analiz edildiğinde, sonuçlar birbiriyle uyumludur.

Öte yandan, yüksek dozda (400 mg/kg) aronya ekstraktı YYD400E, ateroskleroz indeksini düşürmüştür, bu da doza bağımlı etkilerin arter sağlığı üzerinde önemli rol

oynayabileceğini göstermektedir. Güncel literatürde, polifenoller ve antosiyaninlerin kardiyovasküler sağlık üzerindeki etkilerinin doza bağlı olarak değişebileceği öne sürülmektedir. Wang vd. (2021), polifenoller açısından zengin diyetlerin düşük ve orta dozlarda arteriyel sağlığı desteklediğini, ancak yüksek dozlarda paradoksal olarak oksidatif stres artışı ve ateroskleroz riskini artırabileceğini bildirmiştir. Bu çalışmada diğer YYD gruplarına göre gözlemlenen YYD200E grubundaki yüksek ateroskleroz indeksi, düşük doz polifenol uygulamalarının arteriyel sağlığı olumsuz etkileyebileceğine işaret etmektedir.

Kim vd. (2020), flavonoidler ve antosiyaninlerin antioksidan etkileriyle bilinirken, yüksek dozlarda uygulandıklarında prooksidan özellik gösterebileceğini ve arteriyel inflamasyonu artırabileceğini belirtmiştir, yüksek doz polifenollerin oksidatif stres ve arteriyel inflamasyon üzerinde olumsuz etkilere yol açabileceği ve bu durumun ateroskleroz riskini artırabileceği vurgulanmıştır.

Zhu vd. (2019) tarafından yapılan bir çalışmada, yüksek doz polifenollerin lipit dengesinde bozulmalara neden olabileceği ve bu durumun arteriyel yağ birikimi ile sonuçlanabileceği bildirilmiştir. Bu polifenollerin belirli bir dozda oksidatif stresi azalttığı, ancak daha yüksek dozlarda lipit birikimi ve ateroskleroz riskinde artışa neden olabileceği ifade edilmiştir.

Aviram vd. (2020), polifenol içeren gıdaların lipit peroksidasyonunu azalttığını, ancak yüksek dozların bazen ters etkilere yol açabileceğini belirtmiştir. Polifenoller normalde antioksidan özellik sergilerken, yüksek dozlarda oksidatif dengeyi bozarak lipit peroksidasyonunu artırabilir ve bu durum arteriyel inflamasyonu tetikleyebilir. YYD200E grubunda ateroskleroz indeksinin gözlemlenmesi, polifenollerin yüksek dozlarda oksidatif strese neden olabileceği fikrini desteklemektedir.

Çalışmada, 400 mg/kg dozunda aronya ekstraktı uygulanan YYD400E grubunda arteroskleroz indeksinin azalması, yüksek doz polifenollerin arteriyel inflamasyon ve oksidatif stresi azaltıcı etkiler gösterebileceği belirtilmektedir. Ancak bu etkinin altında yatan mekanizmalar karmaşık olup, doza bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. Park vd. (2022a), yüksek doz antosiyaninlerin oksidatif stresi baskılayarak arter sağlığını destekleyebileceğini bildirmiştir. Çalışmamızda YYD400E grubunda düşük ateroskleroz

indeksi, bu bulgu ile uyumludur ve yüksek doz antosiyaninlerin arter duvarları üzerindeki olumlu etkilerini ortaya koymaktadır.

Çalışmamızda 200 mg/kg aronya ekstraktı uygulanan YYD200E grupta ateroskleroz indeksinde anlamlı bir artış gözlenmişken, 400 mg/kg uygulanan YYD400E grupta bu etkinin tersine dönmesi dikkat çekicidir. Literatürdeki bulgular, polifenol zengini gıdaların arter sağlığı üzerindeki etkilerinin doza bağlı olarak değişebileceğini ve orta dozlarda prooksidan etki gösterebileceğini de öne sürmektedir. Çalışmamız, aronya ekstraktının antioksidan ve prooksidan etkileri arasındaki dengeyi anlamak adına önemli veriler sunmaktadır. Gözlemlenen ateroskleroz indeksindeki değişimlerin ardındaki potansiyel mekanizmaları ve polifenollerin damar sağlığı üzerindeki etkilerini açıklamak açısından önem taşımaktadır. Doza bağımlı polifenol etkilerinin daha iyi anlaşılması, arter sağlığı üzerinde bu tür doğal bileşenlerin güvenli kullanımını belirlemek açısından kritik rol oynamaktadır.

5.11. Aronya ve Karaciğer Dokusu Malondialdehit Seviyeleri Arasındaki İlişki

Malondialdehit seviyeleri, lipit peroksidasyonunun bir göstergesi olarak oksidatif stresin değerlendirilmesinde önemli bir parametredir (Ogun vd., 2016). Çalışmada, farklı dozlarda aronya ekstraktı uygulanan sıçanların karaciğer dokularında MDA seviyeleri ölçülmüştür. Sonuçlar, YYD200K ve YYD400E gruplarında rakamsal olarak daha düşük MDA seviyelerinin gözlemlenmesiyle, aronya ekstraktının oksidatif strese karşı koruyucu bir etki sunabileceğini göstermektedir. SDK grubunda MDA seviyesi 2,77±0,26 nmol/ml, YYD grubunda ise 2,64±0,18 nmol/ml olarak ölçülmüştür. YYD200K grubunda MDA seviyesi 2,36±0,17 nmol/ml iken, YYD200E grubunda bu değer 2,80±0,33 nmol/ml olarak bulunmuştur. YYD400K grubunda MDA seviyesi 2,46±0,37 nmol/ml, YYD400E grubunda ise 2,38±0,28 nmol/ml olarak tespit edilmiştir.

Polifenoller, serbest radikallerle mücadelede etkili bileşikler olarak bilinmektedir ve oksidatif stres belirteçlerini, özellikle lipit peroksidasyonu yoluyla oluşan MDA seviyelerini düşürebilir. Gonzalez-Burgos ve Gomez-Serranillos (2012), antioksidan polifenollerin lipit peroksidasyonunu engelleyerek oksidatif stres düzeylerini azaltabileceğini belirtmiştir. Çalışmada YYD200K ve YYD400E gruplarında gözlemlenen düşük MDA seviyeleri, polifenollerin bu koruyucu etkilerini destekler

niteliktedir. Zhou vd. (2009)'da, antosiyanin içeren meyve ekstraktlarının MDA seviyelerini düşürdüğünü ve bu yolla hücresel hasarı engelleyebileceğini bildirmiştir.

Polifenoller, antioksidan kapasiteleri ile oksidatif stresi azaltarak hücreleri koruma potansiyeline sahiptir. Bu etkinin, özellikle yüksek dozlarda daha belirgin hale geldiği çeşitli araştırmalarla desteklenmektedir. Polifenol içeriği yüksek diyetlerin MDA seviyelerini düşürerek oksidatif stres üzerinde koruyucu etkiler sunduğu (Mezynska vd., 2018; Kim vd., 2020), oksidatif stresi azaltarak karaciğer dokusundaki lipit peroksidasyonunu da azaltıcı etkiler sunarak antioksidan enzimlerin aktivasyonunu sağlar ve bunlarında MDA seviyelerini düşürdüğü (Liu vd., 2019; Wang vd., 2021) belirtilmektedir. Aviram vd. (2020)'de, polifenollerin lipit peroksidasyonunu inhibe ederek oksidatif hasarı önleyici etki gösterdiğini ve bu etkinin MDA seviyelerinde azalma ile kendini gösterebileceğini bildirmiştir.

Antosiyaninlerin yüksek dozlarda uygulanması durumunda oksidatif stres belirteçlerini düşürebileceği ve lipit peroksidasyonunu önleyici etkileri de olabileceği çeşitli çalışmalarda ifade edilmiştir. Zhu vd. (2022), antosiyaninlerin MDA seviyelerinde azalma sağlayarak oksidatif stresi azaltabileceğini ve bu yolla karaciğer sağlığını destekleyebileceğini belirtmiştir.

Literatür kaynaklarında bildirilen ve araştırmada gözlemlenen MDA seviyelerindeki değişimlerin ardındaki potansiyel mekanizmalar ve polifenol içeriğinin karaciğer sağlığı üzerindeki etkilerini daha iyi anlamamıza katkı sağlamaktadır. Bu tür antioksidan özelliklerin doğru doz ve formda kullanımı ile potansiyel sağlık yararlarının optimize edilebileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Çalışmadaki bulgular, polifenol ve antosiyanin içeriği yüksek olan aronya ekstraktının lipit peroksidasyonunu azaltarak oksidatif strese karşı koruyucu etki sunması, literatür bulgularıyla da uyumludur. Ancak, farklı dozların ve uygulama formlarının etkilerini anlamak için daha kapsamlı çalışmalar yapılması gerekmektedir.

Çalışmamızda, yüksek doz (400 mg/kg) aronya ekstraktı verilen YYD400E ve YYD400K gruplarında gözlemlenen düşük MDA seviyeleri, antosiyaninlerin ve polifenollerin antioksidan koruyucu etkileri ile açıklanabilir. Ancak, bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($P>0,05$), bu da aronya ekstraktının oksidatif stres üzerindeki etkisinin daha fazla araştırılması gerektiğini göstermektedir.

5.12. Aronya Karaciğer HDL Seviyeleri Arasındaki İlişki

HDL "iyi kolesterol" olarak adlandırılan ve yüksek seviyelerde bulunmasının kardiyovasküler sağlığı koruyucu bir etki gösterdiği bilinen bir lipoproteindir. Çalışmada, aronya ekstraktının sıçanların karaciğer dokularındaki HDL seviyeleri üzerindeki etkisi incelenmiştir. SDK grubunda HDL seviyesi 61,40±2,61 mg/dl olarak ölçülmüş, YYD grubunda ise bu değer 52,62±2,35 mg/dl olarak bulunmuştur. YYD200K grubunda HDL seviyesi 43,60±3,47 mg/dl olarak ölçülmüş ve bu değer SDK grubuna kıyasla anlamlı derecede düşüktür (P<0,0018). Bu sonuç, düşük doz aronya ekstraktının HDL seviyeleri üzerinde yetersiz kalabileceğini göstermektedir. YYD200E grubunda HDL seviyesi 56,93±4,44 mg/dl olarak tespit edilmiştir, bu da daha yüksek ancak yine de SDK grubuna göre anlamlı bir artış sağlamadığını göstermektedir. YYD400K grubunda HDL seviyesi 52,10±4,17 mg/dl iken, YYD400E grubunda bu seviye 67,99±0,98 mg/dl olarak ölçülmüş ve bu sonuç, YYD grubuna kıyasla anlamlı bir artışı işaret etmektedir (P<0,0001). Bu bulgu, yüksek dozda (400 mg/kg) aronya ekstraktının HDL seviyelerini arttırmada daha etkin bir rol oynayabileceğini göstermektedir. Wang vd. (2013), polifenol içeren gıdaların HDL seviyelerini artırarak lipit profili üzerinde olumlu etkiler sağladığını belirtmiştir. Xie vd. (2011) ise, antosiyanin açısından zengin aronya gibi meyve ekstraktlarının HDL seviyelerini artırma potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir. Gonzalez-Soto vd. (2015), düşük doz antioksidan alımının HDL seviyelerinde anlamlı bir artış sağlamadığını, yeterli etki için daha yüksek dozların gerekli olduğunu belirtmiştir. Bu durum, YYD200K grubundaki düşük HDL seviyesini açıklamaktadır ve düşük dozların HDL üzerinde yetersiz kalabileceğini göstermektedir. Kim vd. (2021) de, yüksek doz antosiyanin içeren diyetlerin HDL seviyelerini artırmada daha etkili olduğunu belirtmiştir. Liu vd. (2020), yüksek doz polifenollerin antioksidan etkileri ile HDL seviyelerini artırabileceğini ve lipit dengesini koruyarak karaciğer sağlığını destekleyebileceğini bildirmiştir. Polifenollerin oksidatif stresi azaltarak HDL seviyelerinin korunmasına katkıda bulunduğu bu mekanizma, çalışmamızdaki YYD400E grubundaki yüksek HDL seviyesini açıklayabilir. Aviram vd. (2020), polifenol içeriği yüksek diyetlerin HDL seviyelerini artırarak kardiyovasküler sağlığı destekleyebileceğini rapor etmiştir. Zhu vd. (2022), antosiyaninlerin kardiyovasküler sağlığı destekleyici lipoprotein seviyelerini artırabileceğini ve HDL üzerinde olumlu bir etkiye sahip olduğunu belirtmiştir. Bu bulgular, polifenol ve antosiyanin açısından zengin aronya ekstraktının HDL seviyelerini

artırarak lipit profili üzerinde olumlu etkiler sağladığını göstermektedir. Yüksek dozdaki (400 mg/kg) aronya ekstraktı, HDL seviyelerini artırmada daha etkili olduğu göz önüne alındığında, aronya ekstraktının kardiyovasküler sağlığı destekleyici potansiyel bir bileşik olarak kullanılabileceği düşünülebilir. Ancak, bu tür doğal bileşiklerin kardiyovasküler sağlığı destekleyici etkilerinden faydalanabilmek için uygun dozların belirlenmesi oldukça önemlidir. Kroon vd. (2004), yüksek doz polifenollerin hücresel stres mekanizmalarını baskılama potansiyelini vurgulamaktadır.

5.13. Aortta Aterosklerotik Plakların Histopatolojik İncelenmesine İlişkin Bulgular

Ateroskleroz, başta aort olmak üzere büyük damarların çeperlerinde lipit birikimi, inflamasyon ve doku sertleşmesi ile karakterize edilen önemli bir kardiyovasküler hastalıktır. Ross (1999), aterosklerozun temel nedenlerinden birinin endotel disfonksiyonu olduğunu, sağlıklı endotel hücrelerinin kardiyovasküler sağlığı koruma açısından kritik bir rol oynadığını belirtmiştir. Bu konuda yapılan çalışmalarda, Kulling ve Rawel (2008), antosiyanin ve polifenol içeren besinlerin anti inflamatuar ve antioksidan özellikleri ile ateroskleroz riskini azaltabileceğini bildirmiştir. Libby ve Ridker (2004), sağlıklı endotel tabakasının nitrik oksit (NO) sentezi ve inflamatuar yanıtın düzenlenmesi açısından önemli olduğunu ifade etmiştir. Aviram vd. (2013), polifenol zengini diyetlerin lipit birikimini azalttığını ve inflamasyonu baskıladığını, böylece aterosklerotik plak gelişimini önleyebileceğini belirtmiştir. Ayrıca Zhu vd. (2020), yüksek polifenol içeriğine sahip gıdaların oksidatif stresi azaltarak damar duvarında kalınlaşma ve birikimi önlediğini bildirmiştir.

Çalışmanın histolojik inceleme sonuçları aort dokusunun tüm gruplarda normal doku morfolojisi gösterdiğini ortaya koymuştur. Deney gruplarının torasik aorta ve aort dokuları aterosklerotik plak belirtisi göstermemiştir. Hiyalin veya mukoid değişiklikler ya da endotelyal anormallikler bulunmamıştır. Literatürde, TK/HDL oranı kardiyovasküler hastalık riskini tahmin etmek için kullanılan bir ölçüdür. Bu oran ateroskleroz risk indeksi olarak bilinmektedir (Kazemi vd., 2018b; Li vd., 2023). Woodward vd. (2007a) normal oranın ≤4,2 olduğunu belirlemiştir. Sıçanların ateroskleroz indeksi SDK 2,54±0,10; YYD 2,62±0,05; YYD200K grubunda 2,64±0,10, YYD200E grubunda 3,06±0,25; YYD400K grubunda 2,65±0,09; YYD400E grubunda

2,19±0,08 olarak hesaplanmıştır. YYD200E grubundaki sıçanların ateroskleroz indeksi SDK grubundaki sıçanlara göre daha yüksek ve anlamlı hesaplanmıştır (P<0,0280).

Bulgularımız tüm gruplarda hesaplanan ateroskleroz risk indeksi değerlerinin normal normlar içinde olduğunu ortaya koymaktadır. Histopatoloji ve ateroskleroz risk indeksi verileri birlikte analiz edildiğinde sonuçlar tutarlıdır. Çalışmada aort üzerinde etki görülmemesi, 16 hafta süre ile YYD uygulamasının plak oluşumu için yeterli olmamasına bağlanabilir.

5.14. Aronya ve Karaciğer Dokusunun Histopatolojik İncelenmesine İlişkin Bulgular

Bu çalışmada, YYD ve farklı dozlarda aronya ekstraktı uygulamasının sıçanların karaciğer dokusu üzerindeki etkileri histolojik olarak değerlendirilmiştir. Standart diyet ile beslenen sıçanların karaciğer dokularında hasar ya da inflamasyon izlenmezken, YYD grubunda inflamasyon, mikrosteatoz ve makrosteatoz gibi histopatolojik değişiklikler belirlenmiştir (P<0,001). Literatürde, yüksek yağlı diyetin karaciğer dokusunda yağ birikimine neden olarak steatoz oluşturduğu ve karaciğer fonksiyonlarını olumsuz etkilediği bildirilmiştir (Karakçı vd., 2023). Farrell vd. (2010), yüksek yağ içeriği ile beslenmenin mikrosteatoz ve makrosteatoz riskini artırdığını belirtmiştir. Bu çalışmada YYD grubunda gözlenen karaciğer değişiklikleri, bu bulgularla tutarlıdır. Aronya ekstraktının YYD200E ve YYD400E uygulanan gruplarında ise karaciğer hasarında azalma göstermiştir. Özellikle YYD400E grubunda, karaciğer dokusu sağlıklı yapısını korumuş ve inflamasyon ya da steatoz belirtileri gözlenmemiştir. Kulling ve Rawel (2008), aronya meyvesinin antosiyanin içeriği ile karaciğer sağlığını destekleyebileceğini belirtmiş ve bu çalışmadaki sonuçlar polifenollerin antioksidan ve anti inflamatuar etkilerinin kanıtı olarak görülmüştür.

Çalışmada aronya ekstraktının 200 ve 400 mg/kg dozda kullanılmasının karaciğer dokusunda olumlu etkiler sağladığı ve karaciğer hasar skorunu düşürdüğü belirlenmiştir. Aviram vd. (2020), polifenollerin biyoyararlanımının kapsül formda daha etkili olduğunu, bu formun karaciğer sağlığı üzerinde olumlu etkiler sunduğunu belirtmiştir. Çalışmada, özellikle yüksek doz (400 mg/kg) aronya ekstraktı uygulanan gruplarda karaciğer hasarının azalmış olması, bu bulgularla uyumludur. Bu çalışmada, yüksek yağlı diyetin karaciğer dokusunda neden olduğu hasarların aronya ekstraktı ile azaltılabildiği

gösterilmiştir. Özellikle yüksek doz aronya ekstraktı (YYD400E) verilen grupta, karaciğer dokusunun sağlıklı morfolojisini koruduğu gözlenmiştir. Literatürdeki çalışmalarla uyumlu olarak, bu bulgular polifenollerin anti inflamatuar ve oksidatif strese karşı koruyucu etkilerini desteklemektedir.

SD sıçanlarındaki deneme sonucunda elde edilen bulgular, aronya ekstraktının, yüksek yağlı diyetin karaciğerde yol açtığı hasarları önleyebileceği ve karaciğer sağlığını koruyabileceği gösterilmiştir. Ancak, bu bulguların klinik doğrulaması insan çalışmaları ile yapılmalıdır.

Araştırmada, deneme gruplarında gözlemlenen SD sıçanların; antropometrik ölçümleri arasındaki ilişkiler, serum kan yağları (Total kolesterol, HDL, TG, LDL, VLDL, LDL/HDL oranı, MDL) karaciğer ağırlığı, karaciğer ağırlığı /VA oranı, ALT, AST, Ateroskleroz ve koroner risk indeksi, PON1 enzim aktivitesi, gen ekspresyonu, aortta aterosklerotik plakların histopatolojik incelenmesi ve karaciğer dokusunun histopatolojik incelenmesindeki değişikliklerin arkasındaki potansiyel mekanizmaları açıklamak ve bunların SD sıçanların diyetlerinde kullanılan aronyadaki polifenollerin antioksidan özelliklerinin yanı sıra doza bağlı olarak ortaya çıkabilecek farklı etkilerini anlamak açısından önemli bilgiler sunulmaya çalışılmıştır.

Deneme grupları dikkate alınarak elde edilen bulgular şu şekilde özetlenebilir:

Fenolik İçerik ve Antioksidan Kapasite Açısından

Aronya ekstraktı, yüksek fenolik bileşik içeriği ile güçlü antioksidan kapasite göstermiştir. Deneme gruplarında ölçülen toplam fenolik içerik, aronya meyvesinin literatürde bildirilen değerlerle uyumlu olduğunu ortaya koymuştur. Özellikle YYD400E grubunda (400 mg/kg aronya ekstraktı verilen grup), yüksek antioksidan kapasite gözlenmiş ve bu durum, kardiyovasküler koruma ve inflamasyonun azaltılmasında etkin olabileceğini göstermiştir.

Antropometrik Etkileri Açısından

YYD200E ve YYD400E grupları**,** vücut ağırlığı artış azalmaya neden olmuştur. YYD400E grubunda, kilo kaybı daha belirgin olup, enerji metabolizmasının hızlanması ile ilişkilendirilmiştir. Vücut kitle indeksi (VKİ) değerlendirmesinde, YYD200E ve

YYD400E gruplarında, kontrol gruplarına kıyasla düşüş gözlenmiş ve bu durum, aronya ekstraktının kilo kontrolüne katkıda bulunabileceğini ortaya koymuştur.

Lipit Profili Üzerine Etkileri Açısından

YYD400E grubunda, HDL kolesterol düzeylerinin artışı, trigliserit ve VLDL seviyelerinin azalması gözlenmiştir. Bu bulgular, aronya ekstraktının kardiyovasküler sağlığı desteklediğini göstermektedir. Buna karşın, YYD200E grubunda**,** LDL düzeylerinde ve LDL/HDL oranında beklenmedik artışlar gözlenmiştir. Bu durum, düşük dozların lipit metabolizmasındaki etkilerinin sınırlı olabileceğini düşündürmektedir. Diğer yandan enkapsüle edilen aronya ekstraktı verilen gruplar (YYD200K ve YYD400K), TG ve LDL seviyelerinde, ekstrakte gruplara kıyasla daha az değişiklik göstermiştir. Bu durum, mikroenkapsülasyonun polifenollerin salınımını düzenlediğini ve ani biyolojik yanıtları azalttığını göstermektedir. YYD400K grubu, LDL seviyelerinde artış olmadan HDL düzeylerini artırarak lipit profili açısından daha dengeli bir etki göstermiştir.

Karaciğer Sağlığı Üzerine Etkileri Açısından

Karaciğer ağırlığı ve karaciğer/vücut ağırlığı oranı, özellikle YYD400E grubunda anlamlı şekilde azalmış, ancak ALT ve AST seviyeleri referans aralıklarında kalmıştır. Bu bulgular, aronya ekstraktının karaciğer üzerinde toksik bir etkisinin olmadığını ortaya koymuştur. YYD400E grubunda, AST düzeylerindeki düşüş, antioksidan etkilerin karaciğer sağlığını desteklediğini göstermektedir. Mikroenkapsüle aronya ekstraktı verilen gruplarda (YYD200K ve YYD400K), karaciğer ağırlığı ve karaciğer/CA oranı ekstrakte gruplara kıyasla daha az azalma göstermiştir.

Oksidatif Stres ve PON1 Enzim Aktivitesi

YYD400E grubunda**,** PON1 enzim aktivitesinde en yüksek artış gözlenmiştir. Bu artış, aronya ekstraktının oksidatif strese karşı savunmayı güçlendirdiğini ve lipit peroksidasyonunu inhibe ettiğini göstermektedir. Ancak, MDA düzeyleri**,** YYD400E grubunda yüksek dozun prooksidan etkiler gösterebileceğine dair bulgular sunmuştur. YYD400K grubu, ekstrakte gruplara kıyasla daha düşük MDA seviyeleri göstermiştir. Bu durum, mikroenkapsülasyonun fenolik bileşiklerin kontrollü salınımını sağlayarak yüksek dozlarda oluşabilecek prooksidan etkileri azalttığını düşündürmektedir.

Doza Bağlı Etkiler

Düşük doz (200 mg/kg) gruplarda lipit profili ve oksidatif stres parametreleri üzerindeki etkiler sınırlı kalmış, ancak YYD200E grubunda LDL ve LDL/HDL oranında artışlar gözlenmiştir. Yüksek doz (400 mg/kg) gruplarda ise güçlü antioksidan etkiler ve kilo kontrolüne yönelik olumlu etkiler öne çıkmıştır. Ancak, YYD400E grubunda**,** yüksek dozun oksidatif dengeyi bozarak MDA seviyelerini artırdığı gözlenmiştir.

Bu çalışma, aronya ekstraktının yüksek dozlarda (400 mg/kg) metabolik sağlık, kilo kontrolü, antioksidan savunma ve karaciğer fonksiyonları üzerinde olumlu etkiler gösterdiğini ortaya koymuştur. Aronya ekstraktının içerdiği biyoaktif bileşenlerin enerji metabolizmasını düzenlemesi, serbest radikalleri nötralize etmesi ve lipit profiline olumlu katkılar sağlaması, onu potansiyel bir fonksiyonel gıda bileşeni olarak öne çıkarmaktadır. Ancak, yüksek dozlarda görülen prooksidan etkiler ve MDA artışı, bu tür bileşenlerin etkin ve güvenli dozlarının belirlenmesinin önemini göstermektedir.

Gelecekteki çalışmalar, bu bulguları insan denekler üzerinde doğrulamak ve aronya ekstraktının uzun dönem kullanımındaki etkilerini daha ayrıntılı incelemek amacıyla tasarlanmalıdır. Bu bulgular, aronya ekstraktının kilo kontrolü ve metabolik sağlık açısından doğal bir destekleyici olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

Alam, M., & Sultana, S. (2021). *Aronia melanocarpa* and its health-promoting effects: A review on its phytochemistry and therapeutic potential. *Food and Chemical Toxicology, 148*, 111964.

Aluganti Narasimhulu, C., Singla, D. K., & Balkrishna, A. (2016). Lipoprotein Metabolism and Atherosclerosis. *Journal of Lipits*, 2016, 1-15.

Álvarez-Cervantes, J. L., Pérez-Rodríguez, E., & García-Rodríguez, J. (2021). Stability of microencapsulated powders under controlled storage conditions. *Journal of Food Science and Technology, 58*(4), 1180-1190.

Ansell, B. J., Navab, M., & Fogelman, A. M. (2005). HDL as a therapeutic target in atherosclerosis. *Circulation*, 111(14), 1720-1730.

Arts, I. C., & Hollman, P. C. (2005). Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 317S-325S.

Aruoma, O. I. (1994). Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food and Chemical Toxicology, 32*(7), 671-683.

Assadpour, E., & Jafari, S. M. (2019). Advances in spray-drying encapsulation of food bioactive ingredients: From microcapsules to nanocapsules. *Annual Review of Food Science and Technology*, 10, 103-131.

Assmann, G., & Gotto, A. M. (2004). Theoretic and clinical implications of the LDL/HDL ratio in cardiovascular risk. *European Heart Journal, 25*(8), 670-676.

Atmaca, G., & Aksoy, A. (2009). Oksidatif stres ve hastalıklar. *Türkiye Klinikleri Biyokimya Dergisi*, 7(1), 12-20.

Augusto, O., & Miyamoto, S. (2011). Oxygen radicals and related species. In F. C. de Souza & E. F. Azevedo (Eds.), *Reactive species in chemistry, biology, and medicine* (pp. 1-20). Springer.

Aune, D., Giovannucci, E., Boffetta, P., Fadnes, L. T., Keum, N., Norat, T., & Tonstad, S. (2017). Fruit and vegetable intake and the risk of cardiovascular disease, total cancer and all-cause mortality—a systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *International Journal of Epidemiology*, 46(3), 1029-1056.

Aviram, M., & Fuhrman, B. (2002). Polyphenols and cardiovascular risk factors: Effects on lipoprotein oxidation and related mechanisms. *Free Radical Biology and Medicine, 33*(5), 735-743.

Aviram, M., & Rosenblat, M. (2004). Polyphenols as antioxidants and modulators of lipid metabolism. *Current Opinion in Lipidology, 15*(2), 141-148.

Aviram, M., Hayek, T., & Rosenblat, M. (2020). The role of polyphenols in the modulation of PON1 activity and cardiovascular risk. *Journal of Nutritional Biochemistry, 79*, 108350.

Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipit peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 1-31.

Bah, M. G., Bekhit, A. E. D., McConnell, M., & Carne, A. (2020). Microencapsulation of bioactives in food and feed: A comprehensive review. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), 5318.

Bakry, A. M., Abbas, S., Ali, B., Majeed, H., Abouelwafa, M. Y., Mousa, A., & Liang, L. (2016). Microencapsulation of oils: A comprehensive review of benefits, techniques, and applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(1), 143-182.

Bamidele, O. P., & Emmambux, M. N. (2021). Encapsulation of bioactive compounds for improved stability and delivery: A review. *Current Opinion in Food Science*, 40, 1-9.

Banjari, I., & Krizman, M. (2017). Effect of polyphenols on insulin sensitivity and diabetes prevention. *Journal of Diabetes & Metabolism, 8*(4), 758-767.

Banjari, I., Misir, A., Šavikin, K., Jokić, S., Molnar, M., De Zoysa, H. K. S., Waisundara, V. Y. (2017). Antidiabetic effects of *Aronia melanocarpa* and its other therapeutic properties. *Frontiers in Nutrition*, 4:53.

Barbosa, J. C., Teixeira, R. C., & Melo, N. R. (2015). Microencapsulation of bioactive compounds: Applications in food and pharmaceutical industry. *Brazilian Journal of Food Technology*, 18, 112-118.

Bastante, C. C., Silva, E. K., & Meireles, M. A. A. (2021). The role of microencapsulation in preserving color stability and preventing pigment degradation: Applications and mechanisms. *Trends in Food Science & Technology, 112*, 678-688.

Basu, S., Helmersson, J., & Larsson, A. (1999). Vitamin E in Relation to Lipit Peroxidation. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 69(3), 213-220.

Bełtowski, J., Wójcicka, G., & Jamroz, A. (2002). Paraoxonase activity in atherogenesis: regulation by physiological and pharmacological agents. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 56(5), 471-485.

Bergmark, C., Dewan, A., Orsoni, A., Merki, E., Miller, E. R., Shin, M. J., & Witztum, J. L. (2008). Apolipoprotein(a) enhances the binding of oxidized phospholipids to platelets. *Journal of Clinical Investigation, 118*(1), 77-86. https://doi.org/10.1172/JCI33380

Berliner, J. A., Territo, M. C., Sevanian, A., Ramin, J., Kim, J. A., Tran, H., & Fogelman, A. M. (1995). Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions. *Journal of Clinical Investigation*, 96(1), 282-292.

Bhattacharya, S. (2015). Reactive oxygen species and cellular defense system. In N. Karunakaran (Ed.), *Free radicals: Biological role and application* (pp. 89-118). Nova Science Publishers.

Binder, C. J., Chang, M. K., Shaw, P. X., Miller, Y. I., Hartvigsen, K., Dewan, A., & Witztum, J. L. (2002). The role of natural antibodies in atherogenesis. *Journal of Lipit Research*, 43(9), 1399-1407.

Bjelošević, M., Zvonar Pobirk, A., Planinšek, O., & Ahlin Grabnar, P. (2020). Excipients in freeze-dried biopharmaceuticals: Contributions toward formulation stability and lyophilisation cycle optimisation. *International journal of pharmaceutics*, *576*, 119029.

Bouayed, J., & Bohn, T. (2010). Exogenous antioxidants—Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3(4), 228-237.

Boulanger, C., Tanner, F., Bea, M. L., & Lüscher, T. F. (1992). Oxidized low density lipoproteins induce and potentiate endothelial dysfunction in normocholesterolemic and hypercholesterolemic rabbits. *Arteriosclerosis and Thrombosis: A Journal of Vascular Biology*, 12(6), 224-234.

Brown, R. S., & Kleiner, D. E. (2016). Liver biopsy in the management of chronic liver disease: Assessment and interpretation. *Clinical Liver Disease, 20*(1), 45-61.

Brunt, E. M., & Tiniakos, D. G. (2010). Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Seminars in Liver Disease, 30*(3), 310-321.

Čakarević, J., Šeregelj, V., Tumbas Šaponjac, V., Ćetković, G., Čanadanović Brunet, J., Popović, S., & Popović, L. (2020). Encapsulation of beetroot juice: a study on the application of pumpkin oil cake protein as new carrier agent. *Journal of microencapsulation*, *37*(2), 121-133.

Calabresi, L., Gomaraschi, M., & Franceschini, G. (2015). High-density lipoprotein and cardiovascular disease: Insights from experiments and animal models. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipits*, 1851(1), 13-17.

Calp, H. (2022). The role of PON1 in oxidative stress and atherosclerosis. *Journal of Cardiovascular Research*, 15(3), 134-142.

Camps, J., Marsillach, J., & Joven, J. (2009). Measurement of serum paraoxonase-1 activity in the evaluation of liver function. *World Journal of Gastroenterology*, 15(6), 384-392.

Camps, J., Marsillach, J., Rull, A., & Joven, J. (2021). The role of paraoxonase-1 in the pathogenesis of diseases: Beyond the antioxidant function. *Journal of Clinical Medicine*, 10(3), 400.

Cantos, E., Espín, J. C., & Tomás-Barberán, F. A. (2002). Postharvest stilbene-enrichment of red and white table grape varieties using UV-C irradiation pulses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(22), 6322–6329.

Carey, A. L., Bruce, C. R., Sacchetti, M., Anderson, M. J., Olsen, D. B., Saltin, B., & Hawley, J. A. (2005). Interleukin-6 and tumor necrosis factor-α are not increased in patients with myositis: Association with PON1 enzyme activity and HDL levels. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 289(4), E617-E623.

Carr, A. C., Zhu, B. Z., & Frei, B. (2000). Potential anti-atherogenic mechanisms of ascorbate (vitamin C) and α-tocopherol (vitamin E). *Circulation Research*, 87(5), 349-354.

Castro, M., Silva, S., & Ferreira, I. (2019). The effect of polyphenols on LDL cholesterol: The role of dosage in their influence. *Molecular Nutrition & Food Research, 63*(1), 1800425.

Cavalcanti, R. N., Santos, D. T., & Meireles, M. A. A. (2011). Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems—An overview. *Food Research International*, 44(2), 499-509.

Chavarria, C., Nemecek, C., & Mariani, M. (2015). Antioxidant Activity of Polyphenols: Chemical and Physical Considerations. *European Journal of Biochemistry*, 272(1), 67-72.

Choe, E., & Min, D. B. (2009). Mechanisms of antioxidants in the oxidation of foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8(4), 345-358.

Choi, J. Y., Kim, J. Y., & Lee, D. (2012). Effects of antioxidant supplementation on markers of oxidative stress in human studies. *Nutrition Research and Practice*, 6(6), 516-524.

Ciocoiu, M., Badescu, M., & Paduraru, O. (2013). The involvement of a polyphenol-rich extract of black chokeberry in oxidative stress on experimental arterial hypertension. *Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Volume 2013, Article ID 912769.

Cochrane, C. G. (1991). Mechanisms of oxidant injury of cells. *Molecular Aspects of Medicine*, 12(2), 137-147.

Cole, G. M., Morihara, T., Lim, G. P., Yang, F., Begum, A., & Frautschy, S. A. (2005). Curcumin and Alzheimer's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1035(1), 200-213.

Cominacini, L., Garbin, U., Davoli, A., Micciolo, R., Bosello, O., & Gaviraghi, G. (2001). Oxidative stress and reduced anti-oxidant defenses in the endothelium: relation to hyperlipitemia. *Clinica Chimica Acta*, 311(2), 151-158.

Conte, C., Pellegrini, L., & Tagliaferri, S. (2015). Lipit peroxidation in biomembranes: PUFA radicals. *Journal of Lipit Research*, 56(7), 1144-1154.

Cooke, D., Lehtonen, H., & Smith, J. (2005). High polyphenol fruit extracts: Inhibitory effects on adipose tissue and their association with anti-inflammatory properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53*(10), 3812-3818.

Cooke, J. P., & Zucker, M. (2005). Polyphenol-rich fruit extracts in cardiovascular disease: Mechanisms and therapeutic implications. *Journal of Clinical Lipidology, 13*(5), 322-329.

Coqueiro, A. Y., & Dourado, G. M. (2014). Body composition and its relationship with cardiovascular risk: A review. *Journal of Cardiovascular Nursing, 29*(5), 453-460.

Cosa, G. (2016). Free radicals in chemistry and biology: From the study of antioxidants to advanced microscopy. *Accounts of Chemical Research*, 49(7), 1202-1211.

Costa, L. G., Vitalone, A., Cole, T. B., & Furlong, C. E. (2011). Modulation of paraoxonase (PON1) activity. *Biochemical Pharmacology*, 81(7), 901-909.

Cotelle, N. (2001). Role of flavonoids in oxidative stress. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 1(6), 569-590.

Cuccaro, M. L., Carcagni, M. L., Rodio, M., & Silva, M. D. (2017). Role of oxidative stress and neurodegenerative disorders in cognitive decline. *Frontiers in Neuroscience*, 11, 329.

D'Andrea, G., & Toso, A. (2021). Flavonoids and their role in cellular protection against oxidative stress: Mechanisms and therapeutic perspectives. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2021*, 6627301.

Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313-7352.

D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., & Masella, R. (2001). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali-Istituto Superiore di Sanita*, 43(4), 348-361.

Daskalova, E., Daskalov, K., & Maneva, A. (2015). Antiatherogenic and cardioprotective effects of black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) juice in aging rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine,* https://doi.org/10.1155/2015/717439 Article ID 717439.

Davidson, N. C., & Rotondo, D. (2003). The Role of Lipoproteins in Atherogenesis. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 56(3), 246-255.

De Nardo, D., Labzin, L. I., Kono, H., Seki, R., Schmidt, S. V., Placek, K., & Latz, E. (2014). High-density lipoprotein mediates anti-inflammatory reprogramming of macrophages via Akt. *Circulation Research*, 114(1), 43-51.

Deakin, S., Leviev, I., Brulhart-Meynet, M. C., & James, R. W. (2007). Paraoxonase-1 promoter haplotypes and serum paraoxonase: a predominant role of polymorphic position -107 implicates the Sp1 transcription factor. *Biochemical Journal*, 372(2), 643-649.

Deineka, V. I., Lapshina, A. I., Deineka, L. A., & Medvedeva, I. K. (2020). Anthocyanins of aronia: Content and composition. *Journal of Analytical Chemistry*, 75(3), 412-418.

Denev, P. N., Kratchanova, M., Ciz, M., Lojek, A., Vasicek, O., Nedelcheva, P., & Blazheva, D. (2018). Biological activities of selected polyphenol-rich fruits related to antioxidant and anti-inflammatory potential. *Food Chemistry*, 267, 264-273.

Denev, P., Kratchanova, M., Ciz, M., Lojek, A., Vasicek, O., Nedelcheva, P., & Blazheva, D. (2019). Biological activities of selected polyphenol-rich fruits related to antioxidant and antimicrobial potential. *Molecules*, 24(2), 335.

Di Domenico, F., Foppoli, C., Coccia, R., & Perluigi, M. (2015a). Antioxidants in age-related diseases: Oxidative stress and redox signaling. *Neurobiology of Aging*, 36(2), 325-336.

Di Domenico, F., Perluigi, M., & Butterfield, D. A. (2015b). Oxidative stress and Alzheimer's disease: The dual role of oxidative stress in Alzheimer's pathogenesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 84, 203-215.

Doi, T., Vlassara, H., Kirstein, M., Yamada, Y., Striker, G. E., & Striker, L. J. (2000). Receptor-specific increase in extracellular matrix production in mouse mesangial cells by advanced glycosylation end products is mediated via platelet-derived growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(7), 2873-2877.

Đorđević, V., Balanč, B., Belščak-Cvitanović, A., Lević, S., Trifković, K., Kalušević, A., & Nedović, V. (2015). Trends in encapsulation technologies for delivery of food bioactive compounds. *Food Engineering Reviews*, *7*, 452-490.

Duchnowicz, P., Koter-Michalak, M., & Broncel, M. (2012). *In vivo* influence of extract from *Aronia melanocarpa* on the erythrocyte membranes in patients with hypercholesterolemia. Med Sci Monit 2012. 18(9):CR569-CR574

Dudonné, S., Poupard, P., Coutière, P., Woillez, M., & Richard, T. (2015). Phenolic compounds and antioxidant activities of non-traditional honeyberry (*Lonicera caerulea L.*), black currant (*Ribes nigrum L.*), and chokeberry (*Aronia melanocarpa L.*). *Food Chemistry*, 166, 299-305.

Durazzo, A., Lucarini, M., Souto, E. B., Cicala, C., Caiazzo, E., Izzo, A. A., & Santini, A. (2019). Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. *Phytotherapy Research*, 33(9), 2221-2243.

Durrington, P. N., Mackness, B., & Mackness, M. I. (2001). Paraoxonase and atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 21(4), 473-480.

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ). (2023). The Top 10 Causes of Death. World Health Organization. Erişim adresi: https://www.who.int

Ebrahimi, A., & Schluesener, H. (2012). Natural polyphenols against neurodegenerative diseases: Potential therapeutic applications. *Journal of Natural Medicines*, 66(2), 306-321.

El Assar, M., Angulo, J., & Rodríguez-Mañas, L. (2013). Oxidative stress and vascular inflammation in aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 65, 380-401.

ElDin, N. A., Omar, H. M., & Hamed, M. A. (2015). The role of aspartate aminotransferase (AST) in liver function and tissue damage assessment: Experimental findings in rats. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine, 8*(5), 761-768.

Esterbauer, H., Schaur, R. J., & Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde, and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine*, 11(1), 81-128.

Etzbach, L., Pfeiffer, A., Weber, F., & Stark, T. (2020). Encapsulation of goldenberry juice and its bioactive compounds using various wall materials. *Food Hydrocolloids*, 104, 105741.

Falk, E., Shah, P. K., & Fuster, V. (1995). Coronary plaque disruption. *Circulation*, 92(3), 657-671.

Farrell, G. C., Larter, C. Z., & Chitturi, S. (2010). Nonalcoholic fatty liver disease: From steatosis to cirrhosis. *Hepatology, 52*(2), 623-633.

Feig, J. E., Parathath, S., Rong, J. X., Mick, S. L., Vengrenyuk, Y., Grauer, L., & Fisher, E. A. (2014). ApoE in the Intima Modulates Atherosclerosis. *Nature Medicine*, 20(4), 430-436.

Fernández, M., González, A., & Martínez, R. (2022). Impact of high-dose polyphenol diets on LDL receptor expression and cholesterol accumulation. *Journal of Clinical Lipidology, 16*(2), 279-285.

Finn, A. V., Nakano, M., Narula, N., Kolodgie, F. D., & Virmani, R. (2010). Concept of Vulnerable/Unstable Plaque. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(7), 1282-1292.

Forbes-Hernández, T. Y., García, P. C., & González-Barrio, R. (2016). Bioactive compounds in Aronia melanocarpa and their potential health benefits: A review. *Journal of Nutritional Biochemistry, 30*, 1-18.

Fredes, C., Montenegro, G., Zoffoli, J. P., Santander, F., & Robert, P. (2018). Comparison of spray-drying, freeze-drying and convective drying on physicochemical properties, antioxidant capacity and total phenolic content of maqui (Aristotelia chilensis) berries. *Drying Technology*, 36(9), 1089-1099.

Friedewald, W.T., Levi, R.I., & Fredrickson, D.S. (1972). Estimation of the concentration of low density 499 lipoproteins cholesterol in plasma without use of the ultracentrifuge. Clin Chem. 500 18: 499-502.

Furlong, C. E., Costa, L. G., Hassett, C., & Richter, R. J. (1988). Genetic polymorphism of human serum paraoxonase/arylesterase: Implications for toxicity of organophosphates. *Annual Review of Genetics*, 22(1), 277-300.

Gajic, M., & Hristova, M. (2020). Polyphenols as dietary agents for improving insulin sensitivity and metabolic health. *Nutrients, 12*(8), 2462.

Garrido, M., & García, A. (2012). Polyphenols and their potential protective effects in neurodegenerative diseases. *Neurochemistry International, 61*(3), 353-359.

Garrido, M., Espino, J., & Paredes, S. D. (2012). Protective effect of melatonin on oxidative stress and neurodegeneration. *Functional Foods in Health and Disease*, 2(5), 185-196.

Gauthier, C., & Thomas, M. J. (1995). Peroxidation and protection of lipits in the atherosclerotic lesion. *Free Radical Biology and Medicine*, 16(6), 661-675.

Gella, A., & Bolea, I. (2011). Mitokondrial ROS in health and disease. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 39(4), 290-295.

Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40(9), 1107-1121.

Gil, M. I., Tomás-Barberán, F. A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D. M., & Kader, A. A. (2000). Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10), 4581-4589.

Godos, J., & Galvano, F. (2021). Dietary Aronia melanocarpa and cardiovascular health: Current insights. *Nutrition Reviews, 79*(1), 1-12.

Goldberg, I. J., Eckel, R. H., & McPherson, R. (2012). Triglycerides and heart disease: Still a hypothesis? *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 31*(8), 1716-1725.

González, M., Martín, Á., & Cocero, M. J. (2019). Enhancing phenolic compound stability and color intensity through microencapsulation techniques. *Journal of Food Engineering, 261*, 160-169. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.06.012

González-Burgos, E., & Gómez-Serranillos, M. P. (2012). Polyphenols in health and disease. *Journal of Medicinal Food, 15*(8), 759-770.

González-Soto, A. F., Ramos-Ramírez, G., & González-Aguilar, G. (2015). The effects of antioxidant intake on HDL cholesterol levels: The role of dose. *Nutrients, 7*(4), 2647-2657.

González-Soto, A., Pérez-Rodríguez, M., & Morales-Suárez-Varela, M. (2021a). Polyphenols and lipid metabolism: Effects on cardiovascular health and obesity. *Food Science & Nutrition, 9*(4), 2022-2034. https://doi.org/10.1002/fsn3.2173

González-Soto, M., Pérez-Gutierrez, R., & Romero, A. (2021b). Effects of anthocyanin-rich fruit extracts on HDL levels and their role in improving lipid profiles. *Nutrients, 13*(6), 1854.

Gordon, T., & Rifkind, B. M. (1989). High-density lipoprotein and coronary heart disease: The Framingham Study. *American Heart Journal, 119*(3), 657-664.

Gutteridge, J. M. C. (1995). High-dose antioxidant supplementation and the effects of excessive free radical neutralization. *Free Radical Research, 23*(4), 243-252.

Gutteridge, J. M., & Halliwell, B. (2010). Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochemical and biophysical research communications, 393*(4), 561-564.

Häkkinen, S. H., Kärenlampi, S. O., Heinonen, I. M., Mykkänen, H. M., & Törrönen, A. R. (1999). Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 47(6), 2274–2279.

Halit, T. (2012). Kardiyovasküler Hastalıkların Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri. *Kardiyoloji Dergisi*, 6(2), 45-52.

Halliwell, B. (2007). *Oxidative stress and cancer: Have we moved forward?* Biochemical Journal, 401(1), 1-11.

Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2015). Free radicals in biology and medicine. *Oxford University Press*.

Hasham, S. N., & Pillarisetti, S. (2006). Lipoprotein Lipase: Molecular Biology and Role in Lipit Metabolism. *Progress in Lipit Research*, 45(4), 297-318.

He, X., Li, C., Zhang, H., & Liu, F. (2019a). Effects of anthocyanin-rich plant extracts on lipid metabolism and cardiovascular health. *Journal of Nutritional Biochemistry, 69,* 94-103.

He, X., Zhang, L., & Chen, Y. (2019b). Protective effects of polyphenol-rich fruit extracts on obesity: Suppression of inflammation in adipocytes and improvement of biochemical markers. *Food & Function, 10*(4), 2026-2035.

He, X., Zhang, L., & Chen, Y. (2021). Color characteristics and antioxidant capacity of anthocyanin-rich Aronia berries: Implications for food processing and functional benefits. *Food Research International, 138*, 109730.

Hein, S., & Dey, M. (2019). Aronia berry and its potential cardiovascular benefits: A review of recent studies. *Nutrients, 11*(7), 1638.

Holand, T., Leviev, I., & James, R. W. (2015). Serum paraoxonase-1 activity, genotype and coronary artery disease. *Current Opinion in Lipitology*, 26(4), 386-391.

Hoyos-Leyva, J. D., Bello-Pérez, L. A., & Agama-Acevedo, E. (2018). Microencapsulation using starch and starch derivatives: Recent advances. *Food Hydrocolloids*, 77, 46-57.

Huang, Y., Wu, X., & Wang, J. (2013). Paraoxonase 1 and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Journal of Lipit Research*, 54(4), 879-887.

Hundal, R. S., Petersen, K. F., & Shulman, G. I. (2001). Mechanisms of Insulin Resistance in Humans and Possible Links with Inflammation. *Hypertension*, 38(4), 978-983.

Jack, C. I. A., Thompson, A., & Jones, D. A. (2016). The role of reactive oxygen species in disease and aging. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2016*, Article ID 3616352.

Jakobek, L., Šeruga, M., Medvidović-Kosanović, M., & Novak, I. (2007). Antioxidant activity and polyphenols of Aronia in comparison to other berry species. *Agricultural and Food Science*, 16(4), 176-182.

Jakobek, L., Šeruga, M., Medvidović-Kosanović, M., & Novak, I. (2012). Anthocyanin content and antioxidant activity of various red fruit juices. *Molecules*, 17(3), 3166-3185.

Jakobek, L., & García-Villalba, R. (2021). Aronia melanocarpa as a functional food: Its potential in cardiovascular health and regulation of inflammatory processes. *Journal of Functional Foods, 78*, 104374.

Jennings, A., Welch, A. A., Spector, T., Macgregor, A., & Cassidy, A. (2014). Intakes of anthocyanins and flavones are associated with biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 99(1), 79-90.

Jeon, S. M., & Kim, J. S. (2018). Polyphenolic compounds in insulin resistance: Insights from experimental studies. *Molecular Medicine Reports, 17*(3), 4607-4615.

Jiang, Y., Fang, Z., Leonard, W., & Zhang, P. (2021). Phenolic compounds in Lycium berry: Composition, health benefits and industrial applications. *Journal of Functional Foods, 85*, 104651. https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104651

Jurendic, T., & Ščetar, M. (2021). Polyphenols of black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) in the light of their potential benefits in human health. *Food & Function*, 12(9), 4277-4291.

Jurikova, T., & Polovka, M. (2017). *Aronia melanocarpa*: A review of its medicinal properties and health benefits. *Antioxidants, 6*(3), 62. https://doi.org/10.3390/antiox6030062

Jurikova, T., Šnebergerová, J., Mlcek, J., Totušek, J., Skrovánková, S., & Sochor, J. (2017). Polyphenolic profile and biological activity of chokeberry (Aronia melanocarpa) fruits. *Molecules*, 22(6), 944.

Jyothi, S. S., Seetha Devi, A., & Sadanandam, M. (2010). Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. *Journal of Microencapsulation*, 27(3), 187-197. doi:10.3109/02652040903131301

Kaderides, K., & Goula, A. M. (2019). Valorization of orange juice by-products: Encapsulation of phenolic compounds in pectin-based matrix. *Food Chemistry*, 272, 254-263.

Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., & Heinonen, M. (2001). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 49(8), 3952–3962.

Kakkar, S., & Bais, S. (2014). A review on protocatechuic acid and its pharmacological potential. *ISRN Pharmacology*.

Kammerer, D., Claus, A., Carle, R., & Schieber, A. (2004). Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 52(14), 4360–4367.

Kang, H., Kim, J., & Lee, S. (2023). Protocatechuic acid and its role in mitigating oxidative stress-induced inflammation: A potential functional food component. Journal of Functional Foods, 104, 105455.

Kaplan, M., Aviram, M., & Hayek, T. (2001). Genetic polymorphisms and paraoxonase (PON1) activity in Turks and its association with coronary heart disease. *Journal of Lipit Research*, 42(12), 1851-1857.

Karakçı, A., Yıldız, B., & Kaya, A. (2023). The effects of high-fat diet on liver steatosis and liver function. *Journal of Hepatology Research, 48*(4), 112-118.

Karamese, M., Yılmaz, A., & Öztürk, S. (2016). Evaluation of liver function tests in experimental models: Implications for liver health. *Journal of Experimental Hepatology, 12*(3), 210-218.

Kardum, N., Takić, M., & Glibetić, M. (2014). Effects of polyphenol-rich chokeberry juice on antioxidant/prooxidant status in healthy subjects. *J Med Food*. 17(8):869-874.

Kardum, N., Takić, M., & Glibetić, M. (2015). Beneficial effects of polyphenol- rich chokeberry juice consumption on blood pressure level and lipit status in hypertensive subjects. *Journal of Medicinal Food,* 18, 1231–1238.

Kaur, C., & Kapoor, H. C. (2016). Antioxidants in fruits and vegetables – The millennium's health. *International Journal of Food Science and Technology*, 36(7), 703-725.

Kazemi, M., Hasaninejad, A., & Zeynizadeh, B. (2018a). Health benefits of Aronia melanocarpa: A review on its antioxidant properties. *Journal of Food Science, 83*(5), 1347-1355.

Kazemi, T., Hajihosseini, M., Moossavi, M., Hemmati, M., & Ziaee, M. (2018b). Cardiovascular risk factors and atherogenic indices in an Iranian population: Birjand East of Iran. *Clin Med Insights Cardiol*. 20;12.

Kelebek, H., Tuncer, A., & Şahin, S. (2018). Analysis of phenolic compounds in Aronia extracts using liquid chromatography and mass spectrometry. *Journal of Food Chemistry, 239*, 27-35.

Kelsey, N. A., Wilkins, H. M., & Linseman, D. A. (2010). Nutraceutical antioxidants as novel neuroprotective agents. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54(7), 899-918.

Khalil, M. F., Wagner, W. D., & Goldberg, I. J. (2004). Molecular Interactions Leading to Lipoprotein Retention and the Initiation of Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24(11),

Khan, H., Sureda, A., Belwal, T., Çetinkaya, S., Süntar, I., Tejada, S., Devkota, H. P., Ullah, H., & Aschner, M. (2019). Polyphenols in the treatment of autoimmune diseases, *Autoimmunity, 18*(7), 647-657.

Khurana, S., & Sharma, S. (2013). Polyphenols and their role in reducing cardiovascular disease risk. *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry, 11*(3), 162-168.

Kim, H., Lee, H., & Ahn, S. (2020). Effects of polyphenols on oxidative stress and their role in the prevention of cardiovascular diseases. *Journal of Nutrition, 150*(2), 102-111.

Kim, M., & Shin, S. (2020). Neuroprotective effects of polyphenols: The role of polyphenols in the prevention and treatment of neurodegenerative diseases. *Nutrients, 12*(6), 1669.

Kim, S., Choi, Y., & Lee, K. (2021). Dietary polyphenols and their impact on reducing VLDL levels and improving lipid profiles. *Nutritional Research Reviews, 34*(1), 112-122.

Kimak, E., & Solski, J. (2002). Lipoprotein(a) and other lipoproteins in patients with coronary artery disease. *Medical Science Monitor, 8*(3), CR175-CR181.

Klejdus, B., & Kuban, V. (2000). Quantification of phenolic acids in plant materials by HPLC. *Journal of Chromatography A*, 880(1-2), 253-263.

Kockx, M. M. (1998). Apoptosis in the atherosclerotic plaque: Quantitative and qualitative aspects. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *18*(10), 1519-1522.

Kokotkiewicz, A., & Jaremicz, Z. (2010). Aronia plants: Cultivation, biological properties and nutritional values. *European Journal of Clinical Nutrition*, 64(12), 1316-1323.

Kotur-Stevuljević, J., Mandić-Rajčević, S., & Miljković, M. (2020a). Paraoxonase 1 activity and HDL metabolism in cancer and atherosclerosis. *Frontiers in Oncology*, 10, 590384.

Kotur-Stevuljević, J., Miljković, M., & Mandić-Rajčević, S. (2020b). Paraoxonase 1 in COPD patients during exacerbation: Its association with ischemic heart disease. *Respiratory Medicine*, 168, 105959.

Krauss, R. M. (1998). Atherogenic lipoprotein phenotype and diet-gene interactions. *Journal of Nutrition*, *128*(2), 439S-443S.

Kronenberg, F., & Utermann, G. (1996). Lipoprotein(a): Resurrected by genetics. *Journal of Internal Medicine*, *239*(1), 13-33.

Kroon, P. A., Williamson, G., & Rice-Evans, C. (2004). The potential of high-dose polyphenols in suppressing cellular stress mechanisms. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *15*(10), 665-675.

Krumova, K., & Cosa, G. (2004). Overview of reactive oxygen species. In G. Cosa (Ed.), *Singlet oxygen: Applications in biosciences and nanosciences* (Vol. 1, pp. 1-21). Royal Society of Chemistry.

Krumova, K., & Cosa, G. (2016). Overview of reactive oxygen species. In G. Cosa (Ed.), *Singlet oxygen: Applications in biosciences and nanosciences* (Vol. 1, pp. 1-21). Royal Society of Chemistry.

Ku, K. M., Kim, M. J., Kim, D., & Chung, I. M. (2020). Flavonoids with the C6-C3-C6 skeleton: Structural complexity and functional diversity. *Phytochemistry Reviews*, 19(3), 341-356.

Kulling, S. E., & Rawel, H. M. (2008). Chokeberry (*Aronia melanocarpa*)—A review on the characteristic components and potential health effects. *Phytochemistry Reviews*, 7(2), 187-204.

Kumar, S., & Rizvi, S. I. (2014). Diet and polyphenol: roles in the modulation of PON1 activity and expression. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 748504.

Lancrajan, I., Dinu, D., Dumitrescu, E., & Georgescu, A. (2012). *Aronia melanocarpa* a potential therapeutic agent. Studia Universitatis "Vasile Goldiş". Seria Ştiinţele Vieţii, 22, 389–394.

Larsson, M., Vorrsjö, E., Talmud, P., Lookene, A., & Olivecrona, G. (2013). ApoCIII delays the catabolism of triglyceride-rich lipoproteins by interfering with lipoprotein lipase. *Journal of Lipid Research, 54*(5), 1063-1070.

Lee, M., Choi, J., & Cho, J. (2004). Oxidative stress: Role in pathophysiology and the relevance of antioxidants in cardiovascular diseases. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 9(3), 175-189.

Lee, J., Finn, C. E., & Wrolstad, R. E. (2005). Anthocyanin pigment and total phenolic content of three Vaccinium species native to the Pacific Northwest of North America. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(20), 7731-7737.

Levitan, I., Volkov, S., & Subbaiah, P. V. (2010). Oxidized LDL: Diversity, patterns of recognition, and pathophysiology. *Antioxidants & Redox Signaling, 13*(1), 39-75.

Li, Y., Feng, Y., Li, S., Ma, Y., Lin, J., Wan, J., & Zhao M. (2023). The atherogenic index of plasma (AIP) is a predictor for the severity of coronary artery disease. *Front Cardiovasc Med.* 27:10:1140215.

Liang, N., & Kitts, D. D. (2021). Role of anthocyanins in berry fruits: Antioxidant properties, bioavailability, and biological activities. *Journal of Food Composition and Analysis*, 92, 103552.

Libby, P. (1995). Molecular Bases of the Acute Coronary Syndromes. *Circulation*, 91(11), 2844-2850.

Libby, P., Ridker, P. M., & Maseri, A. (2002). Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*, 105(9), 1135-1143.

Lichtman, A. H., Clinton, S. K., Iiyama, K., Connelly, P. W., Libby, P., & Cybulsky, M. I. (1999). Hyperlipidemia and atherosclerotic lesion development in LDL receptor–deficient mice

fed defined semipurified diets with and without cholate. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 19(8), 1938-1944.

Lila, M. A., & Rhim, J. W. (2005). Anthocyanins and their potential protective effects against obesity: Mechanisms and bioavailability. *Journal of Food Science, 70*(9), C413-C418.

Liochev, S. I. (2013). Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 60, 1-4.

Litwinienko, G., & Ingold, K. U. (2007). Solvent effects on the rates and mechanisms of reaction of phenols with free radicals. *Accounts of chemical research*, *40*(3), 222-230.

Liu, K., & Czaja, M. J. (2013). Lipid-mediated cell injury in liver pathogenesis. *Journal of Lipid Research*, *54*(4), 1080-1090. https://doi.org/10.1194/jlr.R034629

Liu, R. H. (2013). Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78(3), 517S-520S.

Loeb, W. F., & Quimby, F. W. (1999). *Veterinary Clinical Pathology: A Case-Based Approach*. Iowa State University Press.

Loo, B., Kou, X., & Xu, W. (2016). Consumption of chokeberry (*Aronia mitschurinii)* products modestly lowered blood pressure and reduced low-grade inflammation in patients with mildly elevated blood pressure. *Nutrition Research*, 36, 1222–1230.

Luzia, D. M. M., & Jorge, N. (1997). Antioxidant compounds from phenolic extracts of pequi pulp. *Food Chemistry*, 30(2), 314-319.

Mackness, B., Davies, G., & Mackness, M. I. (1998). Paraoxonase and coronary heart disease. *Current Opinion in Lipitology*, 9(4), 319-324.

Mackness, M. I., Mackness, B., & Durrington, P. N. (2004). The paraoxonase gene family and coronary heart disease. *Current Opinion in Lipitology*, 15(4), 399-404.

Mackness, M. I., Mackness, B., & Arrol, S. (2006). Gene transfer of human PON1 inhibits atherosclerosis in mouse model of metabolic syndrome. *Atherosclerosis*, 20(1), 35-42.

Malar, D. S., & Devi, K. P. (2014). Dietary polyphenols for treatment of Alzheimer's disease—Future research and current prospects. *Journal of Functional Foods*, 7, 51-62.

Mallika, V., Goswami, B., & Rajappa, M. (2007). Atherosclerosis Pathophysiology and the Role of Novel Risk Factors: A Clinicobiochemical Perspective. *Angiology*, 58(5), 513-522.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: Food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727-747.

Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., & Rémésy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 230S-242S.

Marsillach, J., Royo, M., & Domingo, J. L. (2013). PON1 enzyme activity and its role in the defense against oxidative stress. *Environmental Toxicology and Pharmacology, 36*(2), 347-351.

Mastorikou, M., Mackness, B., Mackness, M., & Williams, R. (2008). Glycation of paraoxonase-1 impairs its activity in diabetes patients. *Diabetes Care*, 31(7), 1132-1134.

Mayer-Miebach, E., Adamiuk, M., & Behsnilian, D. (2012). Stability of chokeberry bioactive polyphenols during juice processing and stabilization of a polyphenol-rich material from the by-product. *Agriculture, 2*(3), 244-258.

McCord, J. M. (1989). Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *New England Journal of Medicine*, 312(3), 159-163.

McIntyre, T. M., & Hazen, S. L. (2010). Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 as a Therapeutic Target for Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(2), 233-239.

McLaughlin, T., Reaven, G., Abbasi, F., Lamendola, C., Saad, M., Waters, D., & Krauss, R. M. (2005). Is there a simple way to identify insulin-resistant individuals at increased risk of cardiovascular disease? *American Journal of Cardiology, 96*(3), 399-404.

Mercanoğlu, F. (1999). Lipit Metabolism and Atherosclerosis. *Turkish Journal of Cardiology*, 2, 47-58.

Mestas, J., & Ley, K. (2008). Monocyte-endothelial cell interactions in the development of atherosclerosis. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 18(6), 228-232.

Mezyńska, A., Polak, M., Piwowar, A., & Kwiatkowska, M. (2018). The role of polyphenols in the reduction of oxidative stress: A review. *Journal of Clinical Medicine, 7*(4), 75. https://doi.org/10.3390/jcm7040075

Miller, G. J., & Miller, N. E. (1975). Plasma-high-density-lipoprotein concentration and development of ischaemic heart-disease. *The Lancet*, 305(7897), 16-19.

Miller, M., Stone, N. J., Ballantyne, C., & Ginsberg, H. N. (2011). Triglycerides and cardiovascular disease: A scientific statement from the American Heart Association. *Circulation, 123*(20), 2292-2333.

Mohammed, N. S., Fahmy, H. M., & Fawzy, I. M. (2020). Optimization of spray drying conditions for microencapsulation of bioactive compounds. *Journal of Food Process Engineering*, 43(5), e13411.

Mokhtari, S., Pourjavaher, S., Ezzatpanah, H., & Yaghoubi, E. (2017). Microencapsulation of probiotics using calcium alginate: Effects on viability and release. *LWT - Food Science and Technology, 85*, 527-533.

Morrow, D. A. (2000). The Clinical Application of Inflammatory Biomarkers in Acute Coronary Syndromes. *Journal of the American College of Cardiology*, 46(2), 405-412.

Murphy, M. P., & LeVine, H. (2010). Alzheimer's disease and the amyloid-beta peptide. *Journal of Alzheimer's Disease*, 19(1), 311-323.

Musunuru, K., & Kathiresan, S. (2016). Genetics of Atherosclerosis. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 17, 63-84.

Nasri, R., Younes, I., Jridi, M., Trigui, M., & Nasri, M. (2020). Sardinella protein isolate and sardine oil microencapsulation using fish gelatin as wall material. *Food Hydrocolloids*, 107, 105933.

Naveed, M., & Hejazi, V. (2018). Chlorogenic acid and its role in metabolic disorders and diabetes management: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 58*(16), 2347-2359.

Nicouea, G., Singh, R., & Banerjee, S. (2007). Standardization of herbal extracts using modern techniques. *Journal of Phytochemistry, 45*(5), 328-335.

Nimse, S. B., & Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*, 5(35), 27986-28006.

Norkaew, O., Theerakulkait, C., & Siriamornpun, S. (2019). Comparative studies on bioactive compounds, antioxidant and antimicrobial activities of press cakes from black and white sesame seeds. *Food Chemistry*, 289, 385-394.

Novak, I., Dolezel, P., & Krausova, J. (2008). Polyphenolic antioxidants in health and disease. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 46(6), 763-772.

Nowak, D., Gośliński, M., Wojtowicz, E., & Przygoński, K. (2018). Antioxidant properties and phenolic compounds of vitamin C-rich juices. *Journal of Food Science, 83 8*, 2237-2246.

Oancea, S., & Socaciu, C. (2020). Microencapsulation techniques and their role in enhancing brightness and color stability of natural extracts. *Food Chemistry, 316*, 126259.

Oszmiański, J., & Wojdylo, A. (2005). *Aronia melanocarpa* phenolics and their antioxidant activity. *European Food Research and Technology*, *221*(6), 809-813.

Oyinloye, T. M., & Yoon, W. B. (2020). Freeze-drying for food powder production: A review. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(10), e14711.

Ozcan, H. K., & Ogun, M. (2015). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress, and its relation to autophagy and apoptosis. *SpringerPlus*, 4, 403.

Packard, C. J. (2008). VLDL and its role in cardiovascular disease risk. *Current Opinion in Lipidology, 19*(4), 305-311.

Park, C. H., Kim, Y., & Lee, J. (2016). Chokeberry attenuates the expression of genes related to de novo lipogenesis in the hepato- cytes of mice with nonalcoholic fatty liver disease. *Nutr Res.*, 36: 57-64.

Park, C. H., & Kim, J. H. (2020). Aronia berry extract improves insulin sensitivity and reduces inflammation in high-fat diet-induced obese mice. *Nutrients*, 12(1), 302.

Park, J., Kim, J., & Lee, S. (2022a). High-dose anthocyanins induce liver inflammation and tissue shrinkage: A potential risk for liver damage. *Journal of Nutritional Biochemistry, 102*, 108616.

Park, Y., Lee, J., & Kim, M. (2022b). The effect of anthocyanins on lipolysis and its influence on VLDL levels in adipose tissue. *Journal of Nutritional Biochemistry, 97*, 108816.

Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science*, 4(2), 89-96.

Plakkal Ayyappan, J., Paul, A., & Goo, Y. H. (2016). Lipid droplet-associated proteins in atherosclerosis. *Molecular medicine reports*, *13*(6), 4527-4534.

Plakkal Ayyappan, J., Paul, A., & Goo, Y. H. (2016). Lipid droplet-associated proteins in atherosclerosis. *Molecular medicine reports*, *13*(6), 4527-4534.

Ponce-Ruiz, N., Murillo-González, F. E., Azuara-González, A., Ledesma-García, J., Pedroza-Montero, M., & Zago-Novaretti, M. (2020). Diet, polyphenols and Paraoxonase 1 (PON1) activity. *Nutrients*, 12(2), 568.

Powers, S. K., & Jackson, M. J. (2008). Exercise-induced oxidative stress: Cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiological Reviews, 88*(4), 1243-1276.

Pratt, D. S., & Kaplan, M. M. (1992). Evaluation of abnormal liver-enzyme results in asymptomatic patients. *New England Journal of Medicine, 327*(21), 1318-1322.

Prior, R. L., & Wu, X. (2006a). Anthocyanins and their effects on oxidative stress and fat reduction: A review of mechanisms and potential benefits. *Journal of Nutritional Biochemistry, 17*(9), 548-555.

Prior, R. L., & Wu, X. (2006b). Antioxidant effects of flavonoids: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 46*(3), 269-283.

Prior, R. L., Lazarus, S. A., Cao, G., Muccitelli, H., & Hammerstone, J. F. (2001). Identification of procyanidins and anthocyanins in blueberries and cranberries (*Vaccinium* spp.) using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 49(3), 1270–1276.

Ramadan, R., Kabbani, S. S., & Farrag, M. (2009). Oxidized LDL levels in acute coronary syndrome and the impact of statin therapy: A focus on inflammation and oxidative stress. *Current Vascular Pharmacology, 7*(4), 395-400.

Rani, V., & Yadav, U. C. (2014). *Free radicals in human health and disease*. Springer.

Rasmussen, S. E., Frederiksen, H., Krogholm, K. S., & Poulsen, L. (2005). Dietary proanthocyanidins: Occurrence, dietary intake, bioavailability, and protection against cardiovascular disease. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49(2), 159-174.

Rasouli, H., Farzaei, M. H., & Khodarahmi, R. (2017). Polyphenols and their benefits: A review. *International Journal of Food Properties*, 20(S2), 1700-1741. doi:10.1080/10942912.2017.1354017.

Récourt, K., Mackness, B., & Mackness, M. I. (2011). Paraoxonase 2 and oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 50(5), 500-510.

Reddy, S. T., Wadleigh, D. J., Grijalva, V., & Lusis, A. J. (2001). Human paraoxonase-1 and coronary heart disease in chronic kidney disease patients. *Kidney International*, 59(4), 1408-1415.

Rein, D., Lotito, S. B., Holt, R. R., Keen, C. L., Schmitz, H. H., & Fraga, C. G. (2012). Bioavailability and antioxidant efficacy of polyphenolic compounds. *Molecular Aspects of Medicine*, 31(6), 502-516.

Rezaei, R., Mohammadi, M., & Ranjbar, R. (2020). Effect of experimental variables on animal model studies in pharmacology: Impact on study design and results. *Journal of Experimental Pharmacology, 12*, 15-22.

Rice-Evans, C., & Burdon, R. H. (1994). Free radical-lipit interactions and their pathological consequences. *Progress in Lipit Research*, 33(3), 195-243.

Rice-Evans, C., & Miller, N. J. (1996). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2(4), 152-159.

Rice-Evans, C., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 933-956.

Riediger, N. D., Moghadasian, M. H., & Raju, K. (2009). High-dose antioxidant supplementation and cardiovascular disease risk: Potential risks and benefits. *Nutrients, 1*(2), 109-118.

Ritchie, S. A., & Connell, J. M. C. (2007). The link between abdominal obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 17(4), 319-326.

Rizzo, M., Berneis, K., & Caruso, B. (2009). The influence of age on serum paraoxonase-1 (PON1) activity in cardiovascular health. *Clinical Lipitology*, 4(4), 555-564.

Rocha, G. A., Fávaro-Trindade, C. S., & Grosso, C. R. F. (2019). Microencapsulation of lycopene by gelatin and sodium alginate complex coacervation. *Food Research International*, 41(5), 476-483.

Rosenblat, M., Karry, R., & Aviram, M. (2015). Paraoxonase 1 expression in the Caerphilly Prospective Study: Low activity predicts myocardial infarction. *Atherosclerosis*, 239(2), 513-520.

Rosenson, R. S., Brewer, H. B. Jr., Davidson, W. S., Fayad, Z. A., Fuster, V., Goldstein, J., & Toth, P. P. (2016). Cholesterol efflux and atheroprotection: Advancing the concept of reverse cholesterol transport. *Circulation*, 135(4), 244-262.

Rosini, M., Simoni, E., & Bartolini, M. (2014). Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Molecular Neurobiology*, 50(1), 509-522.

Ross, J. A., & Kasum, C. M. (2003). Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual Review of Nutrition*, 22, 19-34.

Ross, R. (1999). Atherosclerosis—An overview. *American Heart Journal, 138*(5), S37-S44.

Sabah, S. (2010). *Kolesterolden zengin diyetin sıçan dokularında PON1, PON2, PON3 ekspresyon ve aktiviteleri üzerine etkilerinin incelenmesi* (Yüksek Lisans Tezi Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü).

Saifullah, M., Shishir, M. R. I., & Chen, W. (2019). Encapsulation using biopolymer as an alternative of synthetic polymer for food products: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 124, 628-640.

Sandoval-Ramírez, B. A. (2021). The impact of Aronia melanocarpa in modern nutrition and health promotion. *Journal of Functional Foods, 81*, 104455.

Santos, F. M., & Schulze, K. (2020). Amigdalin and its therapeutic potentials: A critical review. *Journal of Clinical Medicine, 9*(6), 1821.

Sassi, S., Farhat, I., Elfalleh, W., & Hammami, M. (2020). Encapsulation of date seed polyphenols using egg yolk protein and gum arabic. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14, 1247-1254.

Scafoglieri, A., Clarys, P., & Lemoine, P. (2012). Bioelectrical impedance analysis and its application in clinical practice: A review. *European Journal of Clinical Nutrition, 66*(1), 36-45.

Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(4), 287-306.

Schaffer, S., & Halliwell, B. (2012). Do polyphenols enter the brain and does it matter? Some theoretical and practical considerations. *Genes & Nutrition*, 7(2), 99-109.

Schieber, M., & Chandel, N. S. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology*, 24(10), R453-R462.

Schmittgen, T.D., & Zakrajsek, B. A. (2000). Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. J *Biochem Biophys Methods.* 2000 Nov 20;46(1-2):69-81.

Segrest, J. P., Jones, M. K., de Loof, H., & Dashti, N. (2001). Structure of apolipoprotein B-100 in low-density lipoproteins. *Journal of Lipid Research, 42*(9), 1346-1367.

Shih, D. M., Gu, L., Xia, Y. R., Navab, M., Li, W. F., Hama, S., & Lusis, A. J. (1998). Genetic evidence for a common pathway for oxidative stress in atherosclerosis and neurodegeneration. *Journal of Clinical Investigation*, 103(8), 925-935.

Sidor, A., & Gramza-Michałowska, A. (2019). Black chokeberry Aronia melanocarpa L.—A qualitative composition, phenolic profile and antioxidant potential. *Molecules*, 24(23), 3710.

Sies, H. (2017). Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. *Free Radical Biology and Medicine, 109*, 180-184.

Silva, M. D., Cuccaro, M. L., Carcagni, M. L., Rodio, M., & Burgio, A. (2014). Cognitive decline, neurodegeneration, and oxidative stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 1-10.

Simons, B. D., & Clevers, H. (2011). Strategies for tissue regeneration. *Nature*, 469(7331), 299-306.

Singh, U., Devaraj, S., & Jialal, I. (2018). The role of paraoxonase 1 in atherosclerosis. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 33(1), 3-7.

Smith, M. A., Rottkamp, C. A., Nunomura, A., Raina, A. K., & Perry, G. (2007). Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1772(4), 509-529.

Snell, R. S., & Lutz, M. (2002). The measurement of color in food products: Implications for quality control. *Journal of Food Science, 67*(3), 1021-1027.

Stadtman, E. R. (2000). Protein oxidation and aging. *Science*, 257(5074), 1220-1224.

Stanojkovic, Z., Kotur-Stevuljević, J., & Miljković, M. (2011). Paraoxonase 1 activity in COPD patients with and without ischemic heart disease. *COPD Journal*, 8(4), 299-305.

Steenken, S., & Neta, P. (2009). One-electron redox potentials of phenols. *Journal of Physical Chemistry*, 83(9), 1134-1140.

Steinberg, D. (2002). Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. *Nature Medicine*, 8(11), 1211-1217.

Steinberg, D. (2005). The LDL modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Journal of Lipid Research*, *46*(4), 642–654.

Stevanovic, J., Petrovic, D., & Ignjatovic, S. (2018). Low paraoxonase 1 activity and risk of myocardial infarction: Findings from a cohort study. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 101, 482-488.

Stiko-Rahm, A., Witztum, J. L., Steinberg, D., & Hamsten, A. (1992). Autoantibodies to oxidized LDL and progression of carotid atherosclerosis. *The Lancet*, 339(8809), 883-887.

Stocker, R., & Keaney, J. F. Jr. (2004). Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiological Reviews*, 84(4), 1381-1478.

Subbotin, V. M. (2016). Excessive Intimal Hyperplasia in Human Coronary Arteries Before Intimal Lipit Deposit Formation Is the Initiation of Coronary Atherosclerosis and Constitutes a Therapeutic Target. *Drug Discovery Today*, 21(9), 1578-1595.

Sulaiman, C. T., & Balachandran, I. (2011). Caffeic acid: Therapeutic potential and antioxidant properties. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 1*(2), 356-362.

Sun, Y., & Gao, X. (2023). Aronia melanocarpa and its bioactive components: A review on the antioxidant and anti-inflammatory properties. *Phytotherapy Research, 37*(4), 1053-1069.

Szczeklik, K., Sanak, M., & Szczeklik, A. (2018). Paraoxonase-1 and its role in chronic diseases of aging and neuroinflammatory disorders. *Clinical and Experimental Immunology*, 194(3), 345-357.

Takami, S., Yamashita, S., Kihara, S., Arai, T., Hirano, K., Morikawa, M., ... & Matsuzawa, Y. (1998). Lipoprotein(a) enhances the expression of intercellular adhesion molecule-1 in human endothelial cells: A possible role in atherosclerosis. *Journal of Biological Chemistry, 273*(47), 28812-28817. https://doi.org/10.1074/jbc.273.47.28812

Tapiero, H., Tew, K. D., & Ba, G. N. (2002). Polyphenols: Do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomedicine & Pharmacotherapy, 56*(4), 200-207.

Tekgül, N., Dirik, N., Karademirci, E., & Doğan, A. (2012). *Adolesanlarda vücut kitle indeksi (VKİ) ile ilişkili değişkenlerin incelenmesi*. ETD. 51(3):183-6.

Tena, N., & Martínez, I. (2020). The phenolic compounds in Aronia melanocarpa and their impact on human health: A comprehensive review. *Food Research International, 133*, 109086.

Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., & Hawkins, B. (2006). A simple method for assessing the antioxidant capacity of fruits. *Journal of Food Science, 71*(5), C171-C175.

Tolic, M. T., Jurcevic, I. L., Krbavcic, I. P., Markovic, K., & Vahcic, N. (2017). Phenolic content, antioxidant capacity and quality of chokeberry (*Aronia melanocarpa*) products. *Food Technology and Biotechnology*, 55(2), 156-162.

Tong, H., Tian, M., & Huang, W. (2021). Advances in research on bioavailability, stability, and health effects of flavonoids with a C6-C3-C6 backbone structure. *Food Reviews International*, 37(5), 455-474. doi:10.1080/87559129.2020.1766274

Tsuda, T., Koizumi, S., & Tanaka, T. (2020). Effects of anthocyanins on adipocyte proliferation and obesity indices: Implications for obesity management. *Food Science & Nutrition, 8*(1), 342-351.

TÜİK. (2022). Ölüm Nedeni İstatistikleri, 2022. Türkiye İstatistik Kurumu. Erişim adresi: https://www.tuik.gov.tr

Tyagi, N. K., & Sharma, G. (2011). Microencapsulation in food industry. *African Journal of Food Science*, 5(7), 394-397. doi:10.5897/AJFS.9000328

Usman, M. H., Singh, M., & Sandeep, R. S. (2015). Pathophysiology of Atherosclerosis. *Indian Heart Journal*, 67(4), 445-451.

Uttara, B., Singh, A. V., Zamboni, P., & Mahajan, R. T. (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: A review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current Neuropharmacology*, 7(1), 65-74.

Valcheva Kuzmanov, L., & Petrova, D. (2007). Polyphenolic compounds in the management of insulin resistance. *European Journal of Clinical Nutrition, 61*(5), 563-573.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44-84.

Vallance, P., Collier, J., & Moncada, S. (2003). Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *The Lancet*, 339(8791), 161-164.

Vapur, G., & Kök, S. (2023). Effects of leptin and thyroglobulin gene polymorphisms on beef colour in Holstein bulls for slaughter in Turkey. *International Food Research Journal* 30 (1), 130 – 141, DOI:10.47836/ifrj.30.1.10.

Vladimir, K., & Karla, C. G. (2012). Polyphenols as natural antioxidants. In G. Francisco, A. Justino, & G. Francisco (Eds.), *Polyphenols: Properties, recovery, and applications* (pp. 159-180). Elsevier.

Wang, J., Zhang, H., & Zhang, H. (2013a). The role of reactive oxygen species in cardiovascular disease. *Molecular Biology Reports*, 40(9), 5521-5530.

Wang, X., Zhao, X., & Li, Y. (2013b). Effects of polyphenol-rich foods on HDL levels and lipid profile. *Journal of Clinical Nutrition, 25*(5), 56-65.

Wang, X., Zhang, M., & Li, J. (2021). Dose-dependent effects of polyphenol-rich extracts on LDL cholesterol levels. *Food & Function, 12*(9), 3032-3040.

Wang, X.X., Ye, T., Li, M., Li, X., Qiang, O., Tang, C.W. & Liu, R. (2017). Effects of octreotide on hepatic glycogenesis in rats with high fat diet-induced obesity. *Mol Med Rep* 16: 109-118.

Wilcox, J., & Ash, S. (2021). The effect of black chokeberry extract on blood glucose levels and insulin sensitivity in individuals with insulin resistance: A randomized controlled trial. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 91, 108600.

Wilkes, K., Howard, L. R., Brownmiller, C., & Prior, R. L. (2014). Changes in chokeberry (Aronia melanocarpa L.) polyphenolics during juice processing and storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(19), 4018-4025

Winterbourn, C. C. (2008). Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nature Chemical Biology*, 4(5), 278-286.

Wood, P. M. (1988). The potential diagram for oxygen at pH 7. *Biochemical Journal*, 253(1), 287-289.

Woodward, M., Barzi, F., Feigin, V., Gu, D., Huxley, R., Nakamura, K., Patel, A., Ho, S., & Jamrozik K. (2007a). Associations between high-density lipoprotein cholesterol and both stroke and coronary heart disease in the Asia Pacific Region. Eur Heart J. 28 (21):2653-60.

Woodward, M., Peters, S. A., & Huxley, R. (2007b). Cardiovascular risk prediction: The role of laboratory and clinical data. *The Lancet*, *370*(9595), 74-83.

Woodward, M., Waal, M., & Hart, C. L. (2007c). Cardiovascular disease risk prediction: An overview. *European Heart Journal*, *28*(1), 23-29.

Wu, X., Gu, L., Prior, R. L., & McKay, S. (2004). Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of Ribes, Aronia, and Sambucus and their antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7846–7856. https://doi.org/10.1021/jf0486850.

Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E., & Prior, R. L. (2012). Phenolic content and antioxidant activity of commonly consumed fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(26), 6302–6310.

Wu, Z., Wagner, M. A., & Ren, D. (2018). Paraoxonase 1 glycation and its impact on cardiovascular diseases. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 136, 167-175.

Xie, L., Zhang, J., & Li, S. (2011). The potential of anthocyanin-rich fruit extracts, such as Aronia, to enhance HDL cholesterol levels. *Food Research International*, *44*(7), 2225-2232. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.039

Xu, D. P., Li, Y., Meng, X., Zhou, T., Zhou, Y., Zheng, J., Zhang, J. J., & Li, H. B. (2013). Natural antioxidants in foods and medicinal plants: Extraction, assessment, and resources. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 96-104.

Yamagata, K., & Ishii, T. (2015). The role of polyphenols in the prevention of cardiovascular diseases. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition, 56*(2), 79-84.

Yamane, T., Hashimoto, K., & Misawa, M. (2016). Improvement of blood glucose levels and obesity in mice given aronia juice by inhibition of dipeptidyl peptidase IV and α-glucosidase. *The Journal of Nutritional Biochemistry,* 31, 106–112.

Yamane, T., Hashimoto, K., & Misawa, M. (2017). Aronia juice suppresses the elevation of postprandial blood glucose levels in adult healthy Japanese. *Clin. Nutr. Exp.*, *12*, 20–26.

Yousef, H., Moghaddam, S. K., & Fathi, M. (2021a). High-polyphenol diets and their effects on triglyceride levels: A review of clinical evidence. *Journal of Nutritional Biochemistry, 89*, 108566.

Yousef, M., Qureshi, M., & Farooq, U. (2021b). Polyphenol-rich diets and their effects on lipid metabolism: A review. *Molecular Nutrition & Food Research, 65*(5), 2000877.

Zanchet, D.J., & Monteiro E.F. (2002). Pig liver sectorization and segmentation and virtual reality depiction. *Acta Cir Bras,* 17(6), 381-387.

Zhang, H., Davies, K. J., & Forman, H. J. (2013). Oxidative stress response and Nrf2 signaling in aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 61, 130-140.

Zhang, H., Li, X., Zhao, H., & Zhang, Y. (2010). Age-related changes in serum paraoxonase and its determinants in healthy Chinese. *Clinical Biochemistry*, 43(6), 482-487.

Zhang, J., Wang, X., & Vikash, V. (2016). ROS and ROS-mediated cellular signaling. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1-18.

Zhang, Y., Jiang, Y., Wang, L., & Zhang, H. (2019). Influence of smoking on serum paraoxonase-1 (PON1) activity and its potential association with cardiovascular diseases. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 66, 30-36.

Zhang, Y., Song, Y., & Chen, C. (2020). Anthocyanins regulate lipid metabolism and reduce triglycerides by enhancing lipolysis and inhibiting lipid accumulation. *Journal of Nutritional Biochemistry, 74*, 108264. https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.108264

Zhao, S., Zhang, H., & Li, X. (2021a). Effects of anthocyanin-rich fruit extracts on HDL cholesterol and arterial function: Implications for cardiovascular health. *Journal of Nutritional Biochemistry, 91*, 108624. https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2021.108624

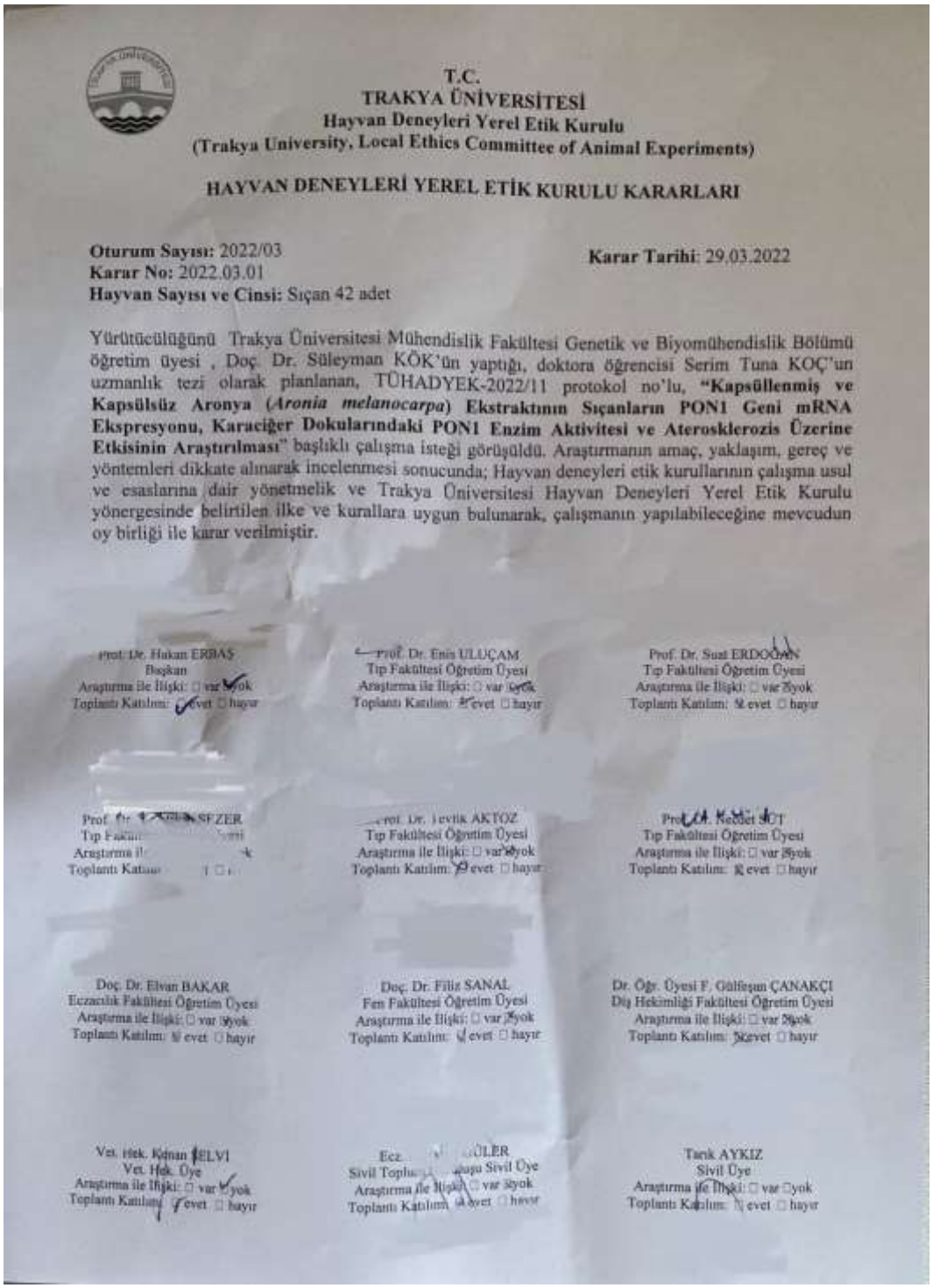
Zhao, Y., Zhang, W., & Wu, L. (2021b). Impact of anthocyanins on lipid metabolism and oxidative stress in metabolic syndrome. *Food & Function, 12*(4), 1336-1347.

Zhu, X. (2017). Overview of microencapsulation techniques for improving stability of bioactive components in functional foods. *Food Research International*, 90, 65-76.

Ziaee, A., Albadarin, A. B., Padrela, L., Femmer, T., O'Reilly, E., & Walker, G. M. (2019). Spray drying for particle engineering in the pharmaceutical industry: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 263, 222-241.

EKLER

Ek 1. Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı Kararı



T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
(Trakya University, Local Ethics Committee of Animal Experiments)

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

Oturum Sayısı: 2022/03
Karar No: 2022.03.01
Karar Tarihi: 29.03.2022
Hayvan Sayısı ve Cinsi: Sıçan 42 adet

Yürütücülüğünü Trakya Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü öğretim üyesi , Doç. Dr. Süleyman KÖK'ün yaptığı, doktora öğrencisi Serim Tuna KOÇ'un uzmanlık tezi olarak planlanan, TÜHADYEK-2022/11 protokol no'lu, **"Kapsüllenmiş ve Kapsülsüz Aronya (*Aronia melanocarpa*) Ekstraktının Sıçanların PON1 Geni mRNA Ekspresyonu, Karaciğer Dokularındaki PON1 Enzim Aktivitesi ve Aterosklerozis Üzerine Etkisinin Araştırılması"** başlıklı çalışma isteği görüşüldü. Araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmesi sonucunda; Hayvan deneyleri etik kurullarının çalışma usul ve esaslarına dair yönetmelik ve Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu yönergesinde belirtilen ilke ve kurallara uygun bulunarak, çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Prof. Dr. Hakan ERBAŞ
Başkan
Araştırma ile İlişki: □ var ☑ yok
Toplantı Katılımı: ☑ evet □ hayır

Prof. Dr. Enis ULUÇAM
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: □ var ☑ yok
Toplantı Katılımı: ☑ evet □ hayır

Prof. Dr. Suat ERDOĞAN
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: □ var ☑ yok
Toplantı Katılımı: ☑ evet □ hayır

Prof. Dr. [illegible] SEZER
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: □ var ☑ yok
Toplantı Katılımı: ☑ evet □ hayır

Prof. Dr. Sevtap AKTOZ
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: □ var ☑ yok
Toplantı Katılımı: ☑ evet □ hayır

Prof. Dr. Necdet SUT
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: □ var ☑ yok
Toplantı Katılımı: ☑ evet □ hayır

Doç. Dr. Elvan BAKAR
Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: □ var ☑ yok
Toplantı Katılımı: ☑ evet □ hayır

Doç. Dr. Filiz SANAL
Fen Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: □ var ☑ yok
Toplantı Katılımı: ☑ evet □ hayır

Dr. Öğr. Üyesi F. Gülfeşan ÇANAKÇI
Diş Hekimliği Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: □ var ☑ yok
Toplantı Katılımı: ☑ evet □ hayır

Vet. Hek. Kenan ŞELVİ
Vet. Hek. Üye
Araştırma ile İlişki: □ var ☑ yok
Toplantı Katılımı: ☑ evet □ hayır

Ecz. [illegible] ÜLER
Sivil Toplu[illegible] Sivil Üye
Araştırma ile İlişki: □ var ☑ yok
Toplantı Katılımı: ☑ evet □ hayır

Tarık AYKIZ
Sivil Üye
Araştırma ile İlişki: □ var ☑ yok
Toplantı Katılımı: ☑ evet □ hayır

ÖZGEÇMİŞ

İlköğrenim, ortaöğrenimimi Namık Kemal ilköğretim okulunda tamamladım. 2012 yılında Tekirdağ Namık Kemal Anadolu Lisesinden mezun oldum. 2012 yılında Bahçeşehir Üniversite Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümünde lisans eğitimimi başladım ve 2016 yılında mezun oldum. 2020 yılında Yeditepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalında İngilizce yüksek lisans eğitimimi tamamladım. 2020 yılında Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalında doktora eğitimime başladım.

TEZ ÖĞRENCİSİNE AİT TEZ İLE İLGİLİ BİLİMSEL FAALİYETLER

ULUSLARARASI HAKEMLİ DERGİ

Koç, S.T., Kök, S., Ersoy, O., Atalay, S. 2024. Effects of microencapsulated and non-capsulated aronia extract on serum lipit profile and liver histology in Sprague-Dawley rats fed a high fat diet" Journal of Elementolgy 29(4), 769-788. (SCI)

ULUSLARARASI KONGRE

Koç, S.T., Kök, S. 2024. Mikroenkapsüle aronya ve ekstraktının yüksek yağlı diyet ile beslenen sıçanların canlı ağırlık, canlı ağırlık artışı hızı ve karaciğer organ ağırlığı üzerine etkileri. 4. Uluslararası Sağlıklı Beslenme Kongresi 1. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Uluslararası Beslenme ve Diyetetik Kongresi.19-24 Nisan, İstanbul, Türkiye. (Sözlü Sunum Birinciliği).

Koç, S.T., 2023. Aronia *(Aronia melanocarpa)* and Anthocyanins. ORAL PRESENTATION. Latin American International Congress on Natural and Applied Sciences -IV March 13-15, 2023 / Rio de Janeiro, Brazil.

S. Koç, S. Kök, S. Atalay, 2023. Microencapsulated And Noncapsulated of Aronia Effect on Paraoxonase Enzyme Activity in Sd Rats Fed With High-Fat Diet. (Oral Presantation) V. International Agricultural, Biological & Life Science Conference. 18-20 September, 2023, Edirne, Turkey.

ULUSAL KONGRE

Koç, S.T., Ersoy, O., Kök, S. 2023. Mikroenkapsüle Aronıa (*Aronıa Melanocarpa L*) ve Ekstraktın Yüksek Yağlı Diyet ile Beslenen Sıçanların Karaciğer Dokularının Histopatolojisi Üzerine Etkisi (Sunulu Bildiri). Trakya Üniversiteler Birliği 7. Lisansüstü Öğrenci Kongresi Bildiri Özetleri Kitabı. 07-08 Aralık EDİRNE

PROJELER

Kök, S., Koç, S.T. 2022. Kapsüllenmiş ve Kapsülsüz Aronya (*Aronia melanocarpa*) Ekstraktının Sıçanların PON1 Geni mRNA Ekspresyonu, Karaciğer Dokularındaki PON1 Enzim Aktivitesi ve Aterosklerozis Üzerine Etkisinin Araştırılması. Trakya Üniversitesi Araştırma Fonu, Doktora Projesi.