

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Fizyoloji Anabilim Dalı

ASKORBİK ASİDİN SERUM LİPOPROTEİNLERİ'NE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

DİCLE ÜNİVERSİTESİ MERKEZ KÜTÜPHANESİ	
Demirbaş No.	38536
Tasnif No.	612.399
	KEL
	1991

(DOKTORA TEZİ),

T. C. DİCLE ÜNİVERSİTESİ KÜTÜPHANESİ	
Demirbaş No.	1100660
Tasnif No.	1100660

Arş. Gör. Mustafa KELLE

YÖNETİCİ
Doç. Dr. M. Orhan DENLİ



TEŞEKKÜR

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başladığım 1984 yılından beri her zaman değerli bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, ayrıca tezim hakkındaki ilgi ve eleştirileri ile bana daima destek olan Rehber Hocam, Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Doç.Dr.M.Orhan DENLİ'ye minnet duygularımı saygılarımla arz ederim.

Tezimin hazırlanmasında her aşamada değerli yardımlarıyla gerekli imkanı sağlayan Anabilim Dalı'mız Öğretim Üyesi Sayın Hocam Yrd. Doç.Dr. Abdurrahman ŞERMET'e saygı ve teşekkürlerimi borç bilirim.

Ayrıca tez çalışmalarım sırasında sabırlı ve iyi niyetli yaklaşımlarından ötürü Anabilim Dalı'mızdaki tüm arakadaşlarıma şükranlarımı sunarım.

Mustafa KELLE

İÇ İNDEKİLER

	<u>Sayfa :</u>
GİRİŞ VE AMAÇ	1- 2
GENEL BİLGİLER	3-25
MATERYAL METOD	26-36
BULGULAR	37-50
TARTIŞMA	51-55
ÖZET	56-57
SUMMARY	58
KAYNAKLAR	59-65

G İ R İ Ő V E A M A Ć :

Vitamin C insan vücudunda sentez edilemediği için besinlerle günlük olarak en azından 10 mg alınması gerekir (18). Yaşamla ilgili pek çok önemli fonksiyonun yapılabilmesine aracılık eder. Eksikliđi skorbüt olarak bilinen hastalığa yol açar. Skorbüt, klinik belirtileri ağrılı ve süngerimsi dişeti, dişlerin dökülmesi, deri altında kanama, ödem, eklem ağrıları, yara iyileşmesinde gećikme, iskelet gelişiminde bozukluk, ani kırıklar, iştahsızlık ve anemi ile karakterize olan bir hastalıktır (47).

Vücutta çeşitli fonksiyonlara sahip olan vitamin C kollajen yapımı, epinefrin ve antienflamatuar steroidler gibi bir kısım hormonların sentezinde görev yapar. Bir antioksidan olarak hücrede oksidasyon, redüksiyon sistemlerinde işe karışır. İmmün sistemin hücrelerini aktive ederek hüморal ve hücreyel bağışıklıkta rol oynar. Antikanserojenik ve antienfeksiyöz etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (1,16,18,46,47,50).

Son yıllarda C vitamininin lipid metabolizması ile ilişkileri anlaşılmaya başlanmıştır. Vitamin C nin lipoprotein lipaz aktivitesini arttırdığı ve kolesterolün safra asitlerine dönüşümünü katalize eden hepatik 7- α hidroksilaz aktivitesi için gerekli olduğu gösterilmiştir (13,22,33).

HORIO ve arkadaşları deneysel C vitamini eksikliğinin hiperkolesterolemi'ye yol açtığını bildirmişlerdir (20). ARO ve arkadaşları ise, marginal C vitamini eksikliği bulunan yaşlı insanlarda serum lipidleri düzeyinin etkilenmediğini göstermişlerdir (2). Bir başka

araştırmada serum C vitamini seviyesi ile serum total kolesterolü arasında pozitif bir ilişkinin bulunduğu ve özellikle bu ilişkinin VLDL ve LDL fraksiyonu için daha da önemli olduğu BATES ve arkadaşları tarafından saptanmış bulunmaktadır (4).

GINTER ve arkadaşları C vitamini eksikliğinde kolesterol biyosentezinin arttığını ileri sürmüşlerdir (13). Halbuki ELLIOTT ve LACHANCE'ye göre C vitamini karaciğerde kolesterol yapımını etkilememektedir (10). Vitamin C nin hipokolesterolemik etkiye sahip olup olmadığı konusunda yapılan araştırmaların sonuçları arasında tam bir uyum sağlanamamıştır. SHARMA ve arkadaşları deneysel hiperkolesteroleminin yüksek dozda askorbik asit uygulaması ile kısmen önlenebileceğini rapor ettikleri halde (45), PETERSON ve arkadaşları hiperkolesterolemik kişilere askorbik asit uygulamasının serum lipidlerine etkili olmadığını ifade etmişlerdir (41).

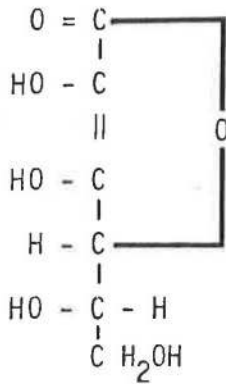
GINTER'e göre C vitamininin hipokolesterolemik etki göstermesi için serum kolesterolünün % 200 mg'ın üstünde olması ve LDL reseptörlerinde genetik olarak bir kusurun bulunmaması gerekir (15).

Ateroskleroz'da anti-risk faktörü olarak bilinen serum HDL-Kolesterolünün vitamin C ile ilişkisi konusunda yapılan çalışmaların sonuçları arasında da çelişkiler bulunmaktadır. Bazı araştırmacılar askorbik asidin HDL-K düzeyini yükseltebildiğini rapor ettikleri halde (4,27,45), bir kısım araştırmacılar ise HDL-K düzeyine C vitamininin etkisiz olduğunu kabul etmişlerdir (2,23).

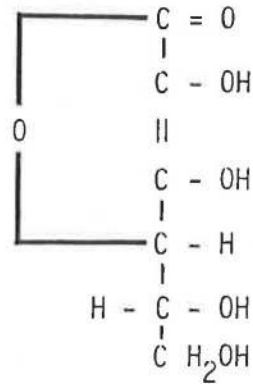
Mevcut literatür bilgilerine göre vitamin C nin serum lipidlerine etkisi konusunda kesin bir açıklama yapmanın doğru olamayacağı açıkça görülmektedir. Bu konuda pek çok çalışmaya gereksinim olduğu kanısındayız. Serum lipidlerine C vitamininin etkisini araştırmak amacıyla çalışmamızı planladık.

GENEL BİLGİLER :

Vitamin C'nin Kimyasal Yapısı : C vitamininin kimyasal yapısı monosakkaridlere benzer, fakat içinde bir enediol grubu taşır. L(+) askorbik asit ve d (+) askorbik asit olmak üzere iki şekli vardır. C vitamini denildiği zaman L (+) askorbik asit anlaşılmalıdır.

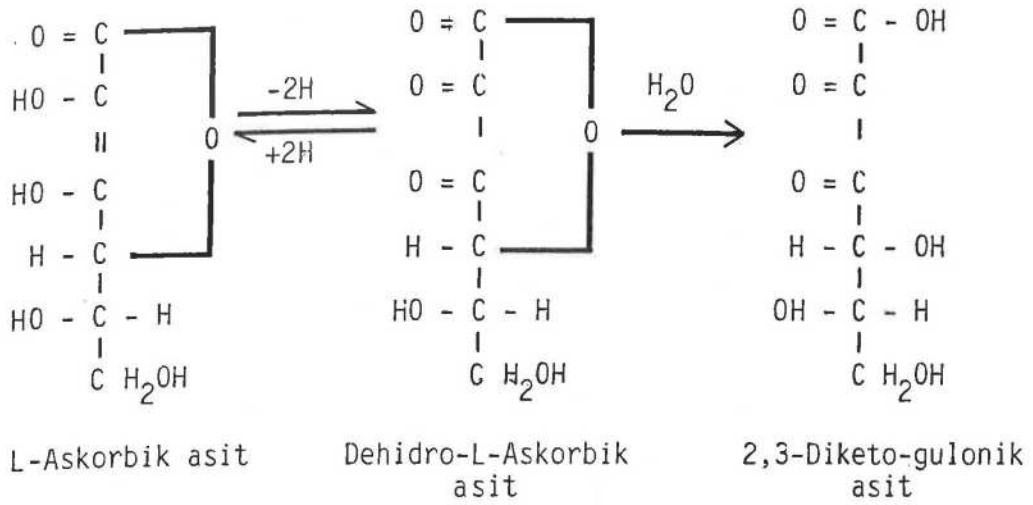


L (+) askorbik asit
(aktif)



d (+) askorbik asit
(inaktif)

Askorbik asit oksitlenmekle iki hidrojen atomu yitirir ve dehidroaskorbik asit oluşur. Bu reaksiyon reversibl olduğundan uygun koşullar altında dehidroaskorbik asidin redüksiyona uğramasıyla yeniden askorbik asit oluşur. Bunların her ikisi de biyolojik olarak aktiftirler. Fakat stereoizomerleri olan d (+) askorbik asidin biyolojik aktivitesi yoktur. Dehidroaskorbik asit de dayanıksız bir bileşik olduğundan bir molekül su almakla 2,3-diketo-gulonik asite değişir. Bu reaksiyon irreversibl olduğu gibi oluşan bileşiğin de biyolojik aktivitesi yoktur. Bu hidrasyon nötral veya alkalin solüsyonlarda kendiliğinden oluştuğu için, askorbik asitin oksidasyonu biyolojik olarak inaktif duruma geçmesine neden olur(1,7,16,18,42).



Askorbik asit kuvvetli redüktör bir bileşiktir. Bu özellik enediol (C-2, C-3) hidroksil gruplarından, hidrojen atomlarının disosiasyonuna bağlıdır. Askorbik asidin enediol grubu bu vitaminin kimyasal fonksiyonunu gören kısmıdır ve hidrojen transfer sistemi olarak fonksiyon yapar (1,30).

Bitkiler ve çoğu hayvanlar C vitamininin, D-glukozdan D-glukuronik asit ve L-gulonik asitin laktonları yoluyla sentezleme yeteneğine sahiptir. Fakat insanlar da dahil bazı memelilerin L- gulonolakton -oksidaz enziminden yoksun olmaları nedeniyle askorbik asit sentezleyemezler.

Fizyolojik Etkileri :

Askorbik asit ve onun metaboliti dehidroaskorbik asit, pek çok enzimatik reaksiyonlarda yer alan reversibl bir redoks sistemi kurar ve C vitamininin etki spektrumunun temelini oluşturur.

Askorbik asidin insan vücudu için önemi en açık bir şekilde klinik olarak belirgin C vitamini eksikliği olan skorbütte ortaya

çıkar. Askorbik asit işlevsel olarak aktif kollajen gelişimi için gerekli olan prolinden, hidroksiprolin oluşumunda önemli rol oynar. Skorbütte görülen yara iyileşmesinde gecikme, kemik büyümesinde bozukluklar, damar fragilitesi ve dentin oluşum bozuklukları gibi belirtiler kollajen yapımının bozulması sonucu ortaya çıkar. C vitamini eksikliği ile ilgili durumların bir diğer belirtisi olan kas gücü azalması karnitin sentezindeki azalmaya bağlanmıştır. Karnitinin mitokondri'ye yağ asitlerini taşımada ve sonuçta enerji açığa çıkmasındaki önemi bilinmektedir. Amino asit zincirinin sonunda lizin ve metionin olan bazı proteinlerden karnitin biyosentezinin gerçekleşmesi için yeterli miktarda C vitamini bulunması gerekir. Böylece kaslarda karnitin eksikliği C vitamini eksikliğinin erken bir işareti olabilir (30,46,47).

Kanda yüksek kolesterol düzeyi ateroskleroz gelişiminde tartışılmaz bir risk faktörü oluşturmaktadır. Hayvan deneyleri kolesterolün ateroskleroza yol açmayan safra asitlerine dönüştürülebilmesi için askorbik asitin gerekli olduğunu göstermiştir. İnsanlarda, yetersiz düzeyde askorbik asidin kanda kolesterol düzeyinde artmayla ilişkili olduğuna ve askorbik asit sağlanması ile bu artmış kolesterol düzeyinin normale döndüğüne dair veriler vardır. Hatta bu durum ateroskleroza yol açan VLDL ve LDL kolesterol fraksiyonlarındaki selektif düşüşe bile bağlı olabilir (12,21,26,33,45).

Böbrek üstü bezlerinde askorbik asit bulunması bu vitaminin katekolamin biyosentezindeki önemine bağlanmaktadır. Noradrenalinin adrenaline dönüşmesi askorbata bağımlıdır. Böylece askorbik asit otonomik sinir sisteminin işlevlerini düzenlemede rol oynar. C vitamini

aynı zamanda bu katekolaminlerin sinir dokusunda okside olarak sinir sistemi için toksik olan adenokromlara dönüşmesini de engeller. C vitamini kortizon sentezini kolaylaştırır. Askorbik asit yetmezliğinde glikokortikoid açığa çıkması azalır ve bu da strese karşı güçsüz kalma ile ilişkilidir. Askorbik asidin bir diğer önemli işlevi hücre zarlarını lipid peroksidasyonu yolu ile hasara uğratabilecek serbest radikalleri etkisiz hale getirmektir. Bu işlev özellikle askorbik asidin retinayı hasara uğratabilecek oksijen radikallerinin fotokimyasal yolla oluşmasını engelllediği gözde iyi bilinmektedir (1,18,30). C vitamini ozon, ağır metaller, pestisidler ve antimikrobial maddeler (ksenobiyotikler, yani; antibiyotikler, antimikotikler ve antiviral ajanlar) gibi çeşitli kirletici maddelerin detoksifikasyonunda da yer alır ve çeşitli karsinogenik (kansere yol açan) nitroz aminlerin oluşmasına engel olur. C vitaminin bağışıklık sisteminde lökosit kemotaksisini arttırdığı gösterilmiştir (18,30).

Emilimi :

Askorbik asit öncelikle ince barsakların üst bölümünden, sodiyuma bağlı aktif transport ile emilir. Askorbik asit yüksek konsantrasyonlarda ise, alımın pasif diffüzyonla olur. Yaklaşık 180 mg a kadar alınan oral dozlardan sonra %70 ile %90'ı emilir. 1 ile 12 g'lık dozlarda gerçek emilen madde miktarı artmaya devam etsede emilen askorbik asit oranı yaklaşık % 15'e düşer. Askorbik asidin plazma proteinlerine bağlanma oranı yaklaşık %24'tür. Serum konsantrasyonları normalde litrede 10 mg dır. Litrede 6 mg'ın altındaki konsantrasyonlar C vitamini alımının her zaman yeterli olmadığını ve litrede 4 mg'ın altındaki konsantrasyonlarda alımın gerçekte yetersiz olduğunu gösterir. Klinik olarak belirgin skorbütte serum konsantrasyonları litrede 2 mg'ın altındadır (1,30,47).

Lipid Metabolizması :

İnsanlarda oldukça fazla sayıda farklı lipidlerin mevcut olduğu bilinmesine rağmen bunların sadece birkaçı klinik ve tahlil açısından önem taşımaktadır. Lipidler bütün vücut dokularında yer alır ve biyolojik yaşamın hemen hemen tüm biçimlerinde önemli rol oynarlar.

- a- Hormonlar veya hormon prekürsörleri gibi hizmet ederler
- b- Sindirime yardımcı olurlar
- c- Enerji depolamayı ve metabolik yakıtı temin ederler
- d- Biyomembranlarda fonksiyonel ve yapısal eleman olarak iş görürler
- e- Gerekli izolasyonu sağlayarak sinir liflerinde iletiye imkanı sağlar ve ısı kaybını önlerler.

Son on yıldan beri klinik kimyada lipid terimi , lipoprotein metabolizması ve bir çeşit arteriyel hastalık olan ateroskleroz ile birlikte incelenmektedir.

Lipidlerin Kimyası ve Fizyolojisi

Lipidler, suda çözülmeyen ve organik çözücülerde çözülebilen bileşikler sınıfına dahil edilirler. Kimyasal olarak lipidler, hem hidroliz sonucu yağ asitlerini oluşturabilen hem de yağ asitleri ile kombinasyonu sonucu esterler şeklinde ortaya çıkan kompleks alkollerdir. Bazı lipidler, sialik, fosforil, amino ve sülfat gibi nonlipid gruplar içermeleri nedeniyle daha karmaşık bir yapıya sahiptirler. Bu gruplar, polar çözücüler içinde lipidlerin çözülebilme yeteneğini arttırma yönünde etki gösterirler. Lipidler, kimyasal yapıları temel

alınarak başlıca 5 gruba ayrılabilir (Tablo-1).

Tablo-1. Klinik açıdan önemli lipidlerin sınıflandırılması.

1- Sterol Türevleri

- Kolesterol ve kolesterol eserleri
- Steroid hormonlar
- Safra asitleri
- Vitamin D

2- Yağ asitleri

- Kısa zincirli (2-4 karbonlu)
- Orta zincirli (6-10 karbonlu)
- Uzun zincirli (12-26 karbonlu)
- Prostaglandinler

3- Gliserol Esterleri

- Trigliseridler (Triaçilgliseroller)
- Fosfoligiseritler

4- Sfingozin Türevleri

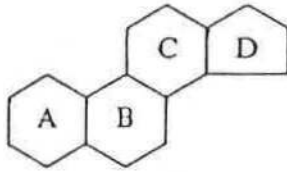
- Sfingomyelin
- Glikosfingolipidler

5- Terpenler (isopren polimerleri)

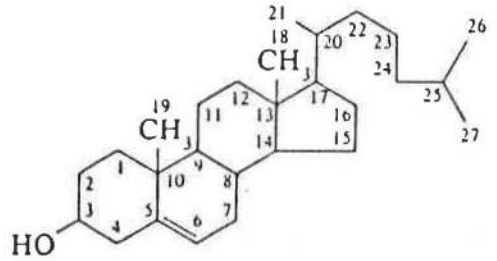
- Vitamin A
- Vitamin E
- Vitamin K

Kolesterol

Steroller, üzerinde çalışılmış olan bütün canlı organizmalar-da mevcut olduğu bilinmesine karşılık, aslında bir sterol türevidir olan kolesterol ise yalnızca hayvanlarda ve insanlarda bulunmuştur. Hemen hemen bütün hücreler ve vücut sıvıları bir miktar kolesterol ihtiva ederler. Diğer steroller gibi kolesterol de yüksek molekül ağırlığına sahip katı bir alkoldür ve tetrasiklik perhidrosiklopentanofenantren (sterane) çekirdeğine sahiptir.



Perhidrosiklopentano-
fenantren (sterane)
çekirdeği



Kolesterol

Bu molekül şekilde dizilişi gösterildiği üzere 27 karbon atomu içermektedir. Bu sterane çekirdeğinin ve numaralama sisteminin bilinmesi sadece klinik kimya açısından değil, aynı zamanda pratisyen hekimler için de önemlidir. Çünkü kolesterol, bir çok metabolik yolun başlangıcında hareket noktasını oluşturur. Örnek olarak; Vitamin D sentezi, steroid hormon sentezi ve safra asidi metabolizması gösterilebilir (24,32).

Enzimler, sterane halkasını değiştirmeleri nedeniyle her metabolik olayda yer ve reaksiyon tipi itibarıyla tanınmaktadırlar (21-hidroksilaz'ın kortizol sentezinde olduğu gibi). Bu nedenle bir çok

hastalığın teşhis edilmesi enzim fonksiyon bozukluğunun yerinin belirlenmesi işlemine bağlıdır (49).

(Adrenogenital sendromdaki 21-hidroksilaz eksikliğinde olduğu gibi),

- Kolesterolün Emilimi

Kolesterol barsak duvarına başlıca üç kaynaktan takdim edilmektedir.

1. Diyet
2. Safra ve barsak sekresyonları
3. Hücreler

Hayvansal ürünler, özellikle et, yumurta sarısı, deniz mahsülleri ve tüm yağlı mandra ürünleri diyetel kolesterolün çoğunluğunu oluştururlar. Amerikan diyetinin yaklaşık 400-700 mg/gün kolesterol içerdiği tahmin edilmektedir. Aynı miktardaki kolesterol, safra sekresyonu ve mukoza hücrelerinin yenilenmesi sırasında oluşan döküntüler neticesinde barsaklarda mevcut bulunmaktadır. Pratik olarak barsaktaki kolesterolün tamamı esterleşmemiş (serbest) durumda bulunur. Diyetteki ester kolesterol barsakta, pankreas ve ince barsak sekresyonlarındaki kolesterol estera tarafından hemen serbest kolesterol ve serbest yağ asitlerine hidrolizlenir. Serbest kolesterolün emilebilmesi için ilk önce çözülebilir özellik kazanması gerekir. Bu özellik, miks miçellerin formasyonu ile gerçekleşir. Miks miçellerin, bünyelerinde serbest kolesterol, yağ asitleri, monogliseridler (monoaçilgliserol), fosfolipidler ve konjuge safra asitleri bulunur(11, 31,38).

Safra asitleri, amfipatik özelliğe sahip olmaları nedeniyle miçel formasyonunu ve böylece kolesterolün emilmesini etkileyen çok önemli bir faktördür. Safra asitlerinin yokluğunda, kolesterol ve trigliseritlerin sindirim ve emilimi şiddetli bir şekilde kesintiye uğrar (17,49). Miçellerin diyet kolesterolü üzerindeki solubilize etkisi ne kadar güçlü olursa, kolesterolün emilebilme şansı da o oranda yükselir. Günde ortalama olarak diyet ve barsak kolesterolünün % 30-60'ı absorbe edilmektedir. Oral yolla günde 3 g lık arttırılmış bir kolesterol diyeti uygulamasıyla absorbe edilen kolesterol miktarı günde maksimum 1 g'a kadar çıkabilir (49). Kolesterol emilimi, ayrıca sindirim sistemine alınan kolesterolün biçimi tarafından etkilenir. Kristalin formundaki kolesterol, doğal veya yağda çözünmüş şekline kıyasla daha düşük absorpsiyon oranına sahiptir. Kolesterolün miçellere girebilmesi, diyetteki yağın doymuşluk derecesiyle değil, bilhassa alınan miktarla ilişkilidir. Diyet yağı miktarındaki artış, miks miçellerin genişlemesine ve daha fazla kolesterolün solubilize edilip emilmesine yol açar.

Maksimum kolesterol emilimi, miçellerin önemli miktarda yağ asidi ve monogliserid ihtiva ettiği ince barsaklarda (orta ve terminal ileum) meydana gelir. Miks miçellerin formasyonu ile kolesterol solubilize edilir ve luminal hücrelerin yüzeylerine taşınması kolaylaştırılarak emilmesine yardımcı olunur. Kolesterolün hücre membranına transferinde miçellerin spesifik rolü tamamen açık olmakla birlikte muhtemelen bu durum safra asitleri aracılığıyla gerçekleşmektedir (36).

Hayvansal kökenli kolesterole ilave olarak günde yaklaşık 200 - 300 mg bitkisel steroller de sindirilmektedir. En sık rastlanan bitkisel sterol çeşidi β -sitosteroldur. Bitkisel steroller, kolesterolden sterol yan zincirindeki küçük varyasyonlar sayesinde ayırt edilirler. Kolesterole olan bu çok yakın benzerliklerine rağmen sterollerin emilimi oldukça zayıftır. Bitkisel sterollerin günde 5-15 g'lık miktarlarda alınması halinde kolesterol emilimi önemli ölçüde inhibisyona uğrar. Kolesterol emilimi azalmasının mekanizması kesin olarak saptanamamış olmasına rağmen, bitkisel steroller tedavi amacıyla plazma kolesterol seviyeleri yüksek hastalarda kullanılmaktadır (49).

Kolesterolün mukoza hücrelerine absorbe edilmesini takiben trigliseridler, fosfolipidler ve spesifik apoproteinlerle beraber şilomikron adı verilen geniş miçellerin içinde yeniden bir araya gelirler (31). Apoprotein komponenti, şilomikron formasyonu için hayati önem taşımaktadır. Nadir olarak görülen apolipoprotein B eksikliği bireylerde, şilomikron oluşumu ve bunun sonucu yağ ve kolesterol emilimi şiddetli bir şekilde bozulur (24). Şilomikronlar, ductus thoracicus'a açılan lenfatiklere girerler ve sonunda sol subclavia veni ile sol internal jugular venin birleştiği yerde sistemik venöz dolaşıma dahil olurlar.

Kolesterol Sentezi

Vücuttaki kolesterolün bir kısmı diyetle alınmasına rağmen, doku ve plazma kolesterolünün çoğu karaciğer ve diğer dokular tarafından özellikle asetat gibi basit moleküllerden endojen olarak sentezlenir. Son 10 yıldan beri endojen kolesterol sentez yoluna ait

elde edilen bilgilerin ışığında endojen kolesterol sentezini önleyici veya azaltıcı ajanlar üzerinde çalışılmaktadır. Klinik açıdan endojen kolesterol sentez yolunun biyokimyasal esası, 1960'ta triparanol kullanımı ile iyi bir şekilde anlaşılmış bulunmaktadır. Triparanol, endojen kolesterol sentezinde son basamak olan dezmosterolden kolesterol oluşumunu inhibe eden bir drog'tur. Fakat bu drog, 3-hidroksi- 3-metilglutaril- CoA (HMG-CoA) redüktaz olarak bilinen ve kolesterol sentezinde oran sınırlayıcısı olan bu basamağı inhibe etmez. Triparanol 1960 yılında hiperkolesterolemi'yi tedavi amacıyla kullanıldığında, tedavi edilen hastalarda bu drog dokularda dezmosterol'ün birikmesine, katarakt'lara alopesi (saç dökülmesi) ve ateroskleroza yol açtığı görüldü. Daha yakın zamanlarda Compactin ve Mevinolin adlı iki drogun HMG-CoA redüktazı seçici bir şekilde baskıya aldığı ve böylece serum kolesterol seviyelerini önemli ölçüde düşürdüğü gözlemlendi (49).

Kolesterolün Esterifikasyonu

Sentez işlemi tamamlandıktan sonra taşınmaları için dolaşıma salınan kolesterol, lipoproteinler olarak bilinen spesifik apoproteinlerle kombinasyon kurarlar. Kolesterolün esterifiye edildiği yer, esas olarak vasküler kompartımandır. Ancak minimal düzeyde de olsa karaciğerde bir miktar kolesterol esterleştirilir. Lipoproteinlerin lipid taşıma kapasitelerini arttırmada yardımcı olduğu için esterifikasyon olayı çok önemlidir. Bu reaksiyon plazmada lesitin-kolesterol-açıltransferaz (LCAT) ve hücre içinde açıl kolesterol-açıltransferaz (ACAT) enzimleri tarafından katalizlenir (36).

Intrasellüler ACAT yolu, karaciğer, barsaklar, adrenal korteks ve muhtemelen arter duvarlarında cereyan eden başlıca yoldur.

Kolesterolün yıkımı

Kolesterol hücreye girdikten sonra, esterleşmiş olanı spesifik esteraz enzimlerin etkisi ile hidrolize edilir. Muhtemelen bir miktar kolesterol esteraz enzimi mevcut olmasına rağmen önemli izoenzimler lizozomlarda yerleşik durumdadır. Lizozomal asit lipazdan ayırt edilmesi imkansız olan bu enzim, optimum fonksiyonunu asidik pH'da gösterir. Lizozomal enzimin eksikliğinde veya fonksiyon bozulduğunda kolesterol esterleri hücre içinde birikime uğrar ve kolesterol ester depolama hastalığı olarak bilinen klinik tablonun oluşmasına yol açar. Karaciğere gelen kolesterol ya hiç değişmeden safraya sekrete edilir ya da safra asitlerine metabolize olur. Yaklaşık olarak günlük üretimin üçte biri kadar kolesterol, safra asitlerine dönüştürülür. Safra asidi sentez oranı ortalama 200-400 mg/gün'dür. Safra asidi sentezinin ilk basamağı, oran sınırlayıcısı olan 7α -hidroksilasyon adımını ihtiva eder. Primer safra asitleri, kolik asit ile kenodeoksikolik asit tarafından oluşturulur. Primer safra asitleri glisin veya taurin ile birleşerek safra kanallarına geçer. İnce barsaklara ulaşan konjuge safra asitleri, kolesterol ve yağ emiliminde aktif rol oynar. Konjuge olmamış bir kısım safra asitleri, barsaklarda bakteriler tarafından sekonder safra asitlerine çevirilir. Kolik asit, deoksikolik aside dönüştürülür ve kenodeoksikolik asit ise litokolik aside metabolize edilir. Hemen hemen litokolik asit dışındaki bütün safra asitleri ileumun alt üçte birlik kısmından

geri emilerek vena porta yoluyla karaciğere geri döner. Böylece saf-
ranın enterohepatik dolaşımı tamamlanmış olur (31,32,36).

Yağ Asitleri

Yağ asitleri, lipidlerin basit moleküler formlarından biridir. Kimyasal formülleri $R-COOH$ olarak gösterilir ve R'nin yerinde bir alkil zinciri bulunur. Yağ asitlerinin zincir uzunluğu çok değişkenlik gösterir. Bu nedenle en yaygın sınıflandırma, mevcut karbon atomu sayısı temeline dayanır. Buna göre yağ asitleri; kısa zincirli (2-4 karbonlu), orta zincirli (6-10 karbonlu) ve uzun zincirli (12-26 karbonlu) olmak üzere üç gruba ayrılabilir. Beslenme ve metabolizma açısından uzun zincirli, hatta daha çok sayıda karbon atomu içeren yağ asitleri önemlidir (34).

Yağ asitleri, ayrıca saturasyon derecelerine göre de sınıflandırılabilirler. Doymuş (sature) yağ asitleri, alkil zincirindeki karbon atomları arasında çift bağ taşımazlar. Doymamış (ansature) yağ asitleri ise karbon atomları arasında bir veya daha fazla çift bağ bulundurur. Çift bağın sayısı 1 ise Monoansatüre yağ asidi, eğer birden fazla sayıda ise poliansature yağ asitleri olarak bilinirler. Bitkisel orjinli poliansature yağ asitlerinde çift bağlar genellikle 3. karbon atomundan başlar bu durum yağ asitlerine oksidasyondan korumaya yönelik bir özellik kazandırır (49).

İnsan vücudundaki yağların yaklaşık %40 kadarı diyetssel kökenlidir. bu diyet yağının %90'ı trigliseridler halinde alınmaktadır. Buna ilave olarak insanlar, pek çok sature yağ asitlerini, monoansature yağ asitlerini ve bir kısım poliansature yağ asitlerini sentezleye bilmektedirler. Fakat özellikle bitkilerde bulunan linoleik

asit, memeliler tarafında sentez edilemezler. Bu yağ asidi büyüme ve gelişmenin sağlıklı bir şekilde sürdürülmesi için büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle esansiyel yağ asitleri olarak adlandırılırlar. Linoleik asit, muhtemelen prostaglandin sentezinde ve belki de santral sinir sisteminin miyelinizasyonunda önemli rol oynamaktadır (24,31, 34,37,47,49).

Yağ asitlerinin karboksil grublarının pKa değeri $\sim 4,8$ olması nedeniyle, serbest yağ asitleri plazmada (pH = 7,4) ve intrasellüler sıvıda (pH = 7) iyonize formda bulunurlar. Yağ asitlerinin, kolesterol veya gliserol'le ester oluşturmaları ya da albumin veya prealbumine bağlanmış olmaları sebebiyle iyonize olma yeteneği azaltılır. Bir molekül albumin 20 molekül yağ asidini taşıyabilir. Serbest yağ asitlerinin insan plazmasındaki normal seviyeleri 0,30-1,10 mmol/L veya 8-31 mg/dl dir. Fakat bu değerlerin değişim sınırları oldukça geniştir.ve epinefrin serbestleşmesine neden olan egzersiz, fiziksel aktivite, kan glukoz düzeyi, heyecan ve diğer psikolojik stresler gibi çeşitli faktörlere karşı oldukça duyarlıdır (49).

Yağ Asitlerinin Katabolizması

Uzun zincirli yağ asitleri, enerji üretmek amacıyla hücre mitokondrilerinde bir seri reaksiyonlar sonucu okside edilir. Bu işlem β oksidasyon olarak bilinmektedir (17,24,31). Örneğin her 16 karbonlu molekül 8 asetil-KoA molekülü oluşturmak üzere değişime uğrar.

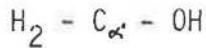
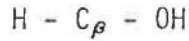
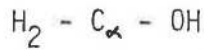
Her yağ asidi molekülünden büyük miktarda enerji üretilir. Örneğin bir mol palmitik asidin karbondioksit ve su'ya tamamen okside edilmesi sonucu 2340 Cal enerji açığa çıkar.



Kimyasal enerji, uygun enzim reaksiyonları vasıtasıyla ya metabolik olaylarda kullanılır ya da ATP gibi yüksek enerjili bileşikler halinde depolanır. Trigliserid esterleri, üç yağ asidi molekülü ihtiva etmeleri sebebiyle yedek enerji için mükemmel bir kaynak oluşturlar.

Gliserol Esterleri (Açıl Gliseroller)

Kompleks lipidler hemen hemen tamamen yağ asidi türevidirler ve bir alkol ile kovalent olarak bağlanırlar. İnsan metabolizmasındaki en yaygın bulunan alkol, üç karbon atomu üç hidroksil grubuları içeren gliseroldür.



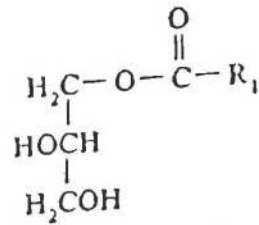
Moleküldeki iki terminal karbon atomu ($\alpha - \alpha'$) kimyasal olarak eşittir. Merkezdeki karbon atomu β olarak işaretlenir. Alternatif bir numaralama sisteminde yaygın olarak sayılar kullanılır. α karbonu $\longrightarrow 1$, $\beta \longrightarrow 2$ ve $\alpha' \longrightarrow 3$ rakamı ile gösterilir (29).

Açıl gliserol (gliserid) sınıfı, esterleşmiş alkol grublarının sayısı ile düzenlenir. Böylece monoaçilgliseroller (monogliserid), diaçilgliseroller (digliserid) ve triaçilgliseroller (trigliserid) meydana gelir. Monoaçilgliserol'de yağ asidi, iki terminal karbon atomundan herhangi birisiyle ya da santral karbon atomuyla bağlanabilir. 1-monoaçilgliserol, yağ asidinin ilk karbon atomuna bağlandığını gösterir. Bu numaralama sistemi, fosfogliseridleri de içine alan tüm açilgliserollere tatbik edilir (49).

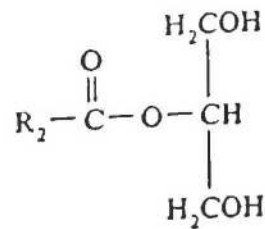
insan beslemesinde en yaygın görülen gliserol esterleri tri - gliseridlerdir. Dokulardaki depo yağının %95'ini teşkil ederler ve plazmada bulunan gliserol esterlerinin hakim formudur. Bitkilerdeki trigliseridler, (ayçiçeği çekirdeği, mısır ve yalancı safran yağı) büyük miktarlarda linoleik asit rezidülerini bulundurmaya yatkındırlar. Bunlar 4°C de sıvı olup poliansature yağlar olarak isimlendirilirler. Özellikle geniş getiren hayvanlardaki trigliseridler, 12 karbonludan 18 karbonluya kadar doymuş yağ asidi rezidülerini ihtiva ederler ve oda ısısında katı haldedirler. Hindistan cevizi yağı gibi bazı bitkisel trigliseridler yüksek saturasyon gösterirler ve muhtemelen oda ısısında katı halde bulunurlar (34).

Trigliseridler, duodenum'da ve ileum'un proksimal kısımlarında sindirime uğrarlar. Lipazların ve safra asitlerinin etkisiyle trigliseridler gliserol ve yağ asitlerine hidrolize edilir. Absorbe edildikten sonra trigliseridler, epitelyal hücrelerde yeniden sentezlenir, kolesterol ve apolipoproteinler ile birleşerek şilomikronları oluştururlar. Şilomikronlar, lenfatik sistem vasıtasıyla duktus torasikus'a ve sonunda jugular vena'ya geçerler (11,17).

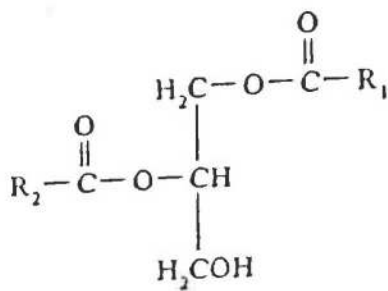
Gliserol esterlerinin diğer major sınıfı 3. karbon atomuna (α') fosforik asidin bağlanmasıyla oluşurlar. Bu esterler fosfogliseridler olarak isimlendirilir. En basit formunda, "A" grubunun yerinde bir H atomu bulunur ve böylece oluşan molekül diaçil fosfogliserid adını alır. Genellikle A grubu, kolin, serin, inositol ve ya etanolamin gibi bir alkol derivativesi grub ile yer değiştirir. Şayet bağlanan grub kolin olursa fosfatidilkolin, etanolamin olursa fosfatidiletanolamin şeklinde ifade edilir (31,49).



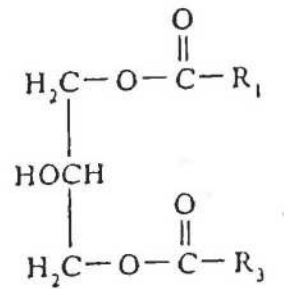
1-Monogliserid



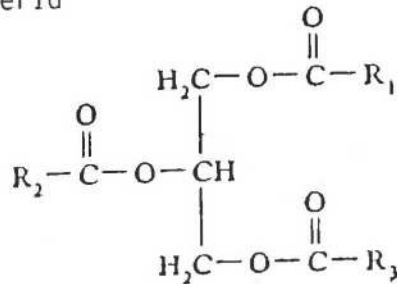
2- Monogliserid



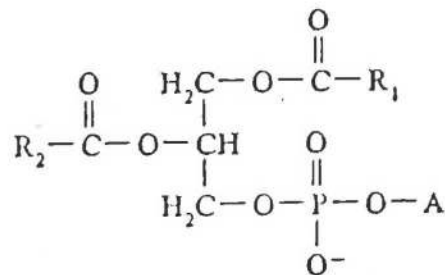
1,2-Digliserid



1,3-Digliserid



Trigliserid



A = -H

Fosfatidik asit

A = $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$

Fosfatidil etanolamin

A = $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$

Fosfatidil kolin (lesitin)

A = $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_3^+)-\text{COO}^-$

Fosfatidil serin

Apolipoproteinler (Tablo-2)

Genellikle hidrofobik karakterli nötral yağların (triaçil glicerol), kolesterol esterlerinin hidrofilik bir adaptasyon olmaksızın kan yoluyla dokulara taşınması olanaksızdır. Bu nedenle lipidler, dış tarafta protein (apolipoproteinler) ve polar lipidlerden (fosfolipid ve serbest kolesterol) oluşan bir tabaka ve içinde nötral lipidler (trigliserid, ester kolesterol) bulunan miçellere benzer yapıdaki lipoproteinler halinde taşınırlar. Dış tabakanın yapısı bütün lipoproteinlerde değişmezken, çekirdeğin hacmi nötral lipidlere bağlı olarak değişir.

50 yıldan fazla süreyle plazma ve doku lipidleri üzerinde yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Buna rağmen ancak 1950'li yıllarda lipid taşıyan bu sisteme lipoproteinler adı verilerek daha ayrıntılı incelenmeye başlanmıştır. Ultrasantrifüj ve elektroforez, immün diffüzyon teknikleri sayesinde sınıflandırılarak bileşimleri tayin edilmiştir. Böylece çeşitli hastalıklarla ilişkilerini araştırma imkanı doğmuştur. Apolipoproteinler hakkında daha yeni bilgiler elde edildikçe A dan E'ye kadar çeşitli tipleri belirlenerek adlandırılması yapılmıştır. Her birinin birincil, ikincil ve üçüncül yapıları, fizikokimyasal davranışları ve fonksiyonları değişiktir (31,35,36, 49).

Apolipoprotein A

HDL'in başlıca proteinidir. Karaciğer ve barsakta yapılır. AI, AII ve AIV tipleri bilinmektedir. AI, LCAT aktivasyonunda ve ekstrahepatik dokulardan serbest kolesterol alınışında rol oynar.

Tablo-2. Apolipoproteinler, sentez yeri ve fonksiyonları.

Apoprotein	Lipoprotein	Fonksiyonu	Sentez yeri
A I	HDL, Şilomikron	LCAT Aktivatörü	Karaciğer, barsak
AII	HDL, Şilomikron	LCAT inhibitörü	Karaciğer, barsak
AIV	Lenf şilomikronu	Şilomikron, trigli- serid transportu	Barsak
B100	VLDL, IDL, LDL	Lipid transportu ve temizlemesi (Klirensi)	Karaciğer
B48	Şilomikron	Şilomikron transportu	Barsak
C I	Şilomikron, VLDL, IDL, LDL	LCAT aktivatörü	Karaciğer
CII	Şilomikron, VLDL, IDL, LDL	-LPL aktivatörü	Karaciğer
CIII	Şilomikron, VLDL, IDL, LDL	-?LPL inhibitörü	Karaciğer
D	HDL Subfraksiyonu	?LCAT aktivatörü lipid transferi.	?
EII	VLDL, IDL, HDL	?	Karaciğer
EIII	VLDL, IDL, HDL	?	Karaciğer
EIV	VLDL, IDL, HDL	IDL klirensi	Karaciğer

AII'nin rolü pek bilinmemektedir. LCAT aktivasyonunu önlediği ve hepatik lipazı aktive ettiği söylenmektedir. Apolipoprotein AIV, lenf şilomikronlarında bulunur. Dis- β lipoproteinemi denilen hastalıkta, IDL ve LDL'lerde önemli miktarda bulunmuştur.

Apolipoprotein B

HDL dışında tüm lipoproteinlerin major proteinidir. B 100 ve B 48 tipleri bulunmuştur. Apo B 100 VLDL'nin apoproteinidir, karaciğerde yapılır. Apo B 48, şilomikronların apoproteini olup, barsakta yapılır. Kronik renal yetmezliğinde olduğu gibi şilomikron kalıntılarının arttığı durumlarda açlık serumunda miktarı yükselir.

Her ikisinin de yıkımı, uygun reseptörleriyle birleşip internalizasyon yoluyla olur.

Apolipoprotein C

Başlıca yapım yeri karaciğer olup düşük mol ağırlıklıdır. Aç bırakılmış bireylerde Apo C'lerin çoğu VLDL ve HDL fraksiyonlarında bulunmuştur. Üç tipi bilinmektedir.

C I , LCAT aktivatörüdür,

C II , Lipoprotein Lipaz aktivatörüdür

C III , Trigliseridlerin hidrolizinde rol oynadığı düşünülmektedir. Muhtemelen lipoprotein lipaz inhibitörü olarak iş görmektedir. siyalik asit durumuna göre; CIII 0, CIII 1, CIII 2 tipleri vardır.

Apolipoprotein D

Apo D'nin sentezi ve katabolizması hakkında kesin bir bilgi yoktur. HDL₃ ten izole edilmiştir. Özellikle VLDL'den HDL'ye ya da

ters yönde olmak üzere lipoproteinler arasında ester kolesterol ve trigliserid akışını sağladığı kabul edilmektedir.

Apolipoprotein E

Argininden zengin bir glikoproteindir. EI, EII, EIII ve EIV tipleri bilinmektedir. Karaciğerde yapıp olgunlaşmamış HDL'lerle dolaşıma verilir. HDL dokulardan kolesterol toplarken Apo E'lerinin süratle şilomikron ve VLDL lere verir ve onların karaciğerdeki reseptörlerine bağlanmasını sağlar. Apo E'lerin ayrıca LDL reseptörlerine de ilgisi vardır.

Lipoproteinler

Apolipoproteinler ve onların değişik lipoproteinler ile karşılıklı fonksiyonel ilişkileri hakkında bilgilerin hızla değişmesi, lipoproteinlerin şimdiki durumda kesin bir sınıflandırma yapılmasını güçleştirmektedir. Buna rağmen lipoproteinlerin farklı fiziksel ve kimyasal kısımları içermeleri nedeni ile, ultrasantrifüj ve elektroforez sayesinde hacimleri ve yoğunlukları temel alınarak ayırt edilmeleri mümkün olabilmektedir. Bu esasa göre lipoproteinler 5 gruba incelenebilir (11,17,36,49).

- 1- Şilomikronlar
- 2- Çok düşük dansiteli lipoproteinler (VLDL)
- 3- Ara dansiteli lipoproteinler (IDL)
- 4- Düşük dansiteli lipoproteinler (LDL)
- 5- Yüksek dansiteli lipoproteinler (HDL)

Şilomikronlar :

Diyet yağının taşınmasından sorumlu olan şilomikronlar, barsak epitel hücresi tarafından sentezlenip serbestleştirilir. Lipid içeriği, eksojen olarak sindirim kanalından kaynaklanır. Şilomikronların esas lipid fraksiyonu, toplam parçanın %80'ini oluşturan trigliseridlerdir. Şilomikronlar portal venöz sisteme girmezler, lenfatikler aracılığıyla ductus thoracicus'a ve oradan jugular venaya geçerek esas sistemik dolaşıma dahil olurlar. Şilomikronlar kan dolaşımında çok hızlı parçalanırlar. Lipoprotein lipaz enzimi şilomikronların yağlarını hidrolizler ve serbest yağ asitlerini teşkil ederler. Serbest yağ asitleri ya yağ dokusu tarafından bağlanır, ya da serum albumini vasıtasıyla transfer edilirler.

Çok düşük dansiteli lipoproteinler (VLDL) :

Karaciğerde sentezlenirler ve kan dolaşımına verilirler. Karaciğer tarafından sentezlenen lipidleri organizmada dağıtmakla görevlidirler. Trigliserid bakımından zengindirler. Apo CII tarafından aktive edilen lipoprotein lipaz, VLDL'yi hidrolize eder. Bunun sonucu trigliseridler VLDL'den ayrılarak yağ dokusuna geçerler.

Ara dansiteli lipoproteinler (IDL) :

VLDL'nin lipoprotein lipaz tarafından hidrolize edilmesini takiben, kısa ömürlü, kısmen trigliseridi azalmış IDL şekilenir.

Düşük dansiteli lipoproteinler LDL) :

Normal koşullarda IDL, hepatik lipoprotein lipaz tarafından LDL şekline çevrilir. LDL, kolesterol ve kolesterol esterlerince

zengindir. LDL hücre içine alınır, apoproteinleri lizozomlarda yıkılır, kolesterol tekrar esterleştirilir.

Yüksek dansiteli lipoproteinler (HDL):

HDL, hem karaciğer hem de barsakta sentez edilir ve salgılanır. Kolesterolün dokularda karaciğere taşınması HDL tarafından gerçekleştirilir. Bu özelliği nedeniyle HDL'nin aterosklerozun önlenmesinde çok önemli rol oynaması muhtemeldir.

M A T E R Y A L - M E T O D :

Bu çalışma, D.Ü.Tıp Fakültesi deney hayvanları laboratuvarında yetiştirilen swiss albino türü sıçanlar üzerinde yapıldı. Araştırmaya alınan 15 deney hayvanının tamamı erkek olup 8 tanesi deney, diğerleri ise kontrol grubu olarak ayrıldı.

Deney grubu olarak seçilen hayvanlara 4 hafta süreyle normal diyetin yanısıra her gün 15 mg/kg dozajda C vitamini intra peritoneal enjeksiyonla verildi. Kontrol grubuna ise aynı hacimde serum fizyolojik uygulandı. Bütün hayvanların ağırlık değişikliği her hafta düzenli olarak izlenip ölçüldü. 4. haftanın sonunda 24 saatlik açlığı takiben hayvanlar hafif eter anestezisi ile uyutularak kardiyak ponsiyonla kan örnekleri alındı. Bunu takiben dokular serum fizyolojik ile perfüze edilip yıkandıktan sonra karaciğerleri alındı.

Kan örneklerinden elde edilen serumlarda; total lipid, total kolesterol, HDL-kolesterol, trigliserid ve total fosfolipid düzeyleri uygun yöntemlerle belirlendi. Ayrıca karaciğer örneklerinden lipid ekstraksiyonu yapıldı ve gram doku başına total lipid, total kolesterol, trigliserid ve total fosfolipid miktarları ölçüldü.

Elde edilen sonuçların istatistiksel analizi "student's t" testi ile belirlendi ve literatür bilgileri ile karşılaştırılıp tartışması yapıldı.

Fosfolipid Tayini

Serumda ve karaciğer doku ekstraktlarında fosfolipid miktarı Baur ve arkadaşlarının yöntemi ile belirlendi (5).

Prensip: Fosfolipidler organik solvent ile ekstrakte edilir. Ekstrakt uçurularak kurutulur. Ca içeren nitrik asit ile organik materyal sindirilir (kalsiyum pirofosfat oluşumunu ve fosfor kaybını önler). Nitrik asit ısıtılarak tamamen uçurulur. Geride kalan materyal TCA-askorbik asit karışımı ile eritilir. Fosfat ile mavi renk oluşması için molibdat ve arsenit eklenir.

Reaktifler

1- Standart Fosfat Çözeltisi: KH_2PO_4 100°C de kurutuldu. 438,1 mg distile suda eritildi ve 100 ml'ye tamamlandı. 1 mg/ml. fosfor içeren bu çözeltiden 5 ml alındı ve 100 ml'ye distile su ile tamamlandı. Böylece 0.05 mg/ml fosfor içeren çalışma standardı hazırlanmış oldu.

2- Askorbik asit - TCA : 10 g. triklor asetik asit ve 2 g askorbik asit distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

3- % 1 amonyum Molibdat : 1 g amonyum molibdat distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

4- Arsenit - sitrat Çözeltisi : 20 g trisodyum sitrat dihidrat ve 20 g susuz sodyum arsenit distile suda eritildi. 20 ml glasiyal asetik asit eklendi ve su ile 1 litreye tamamlandı.

5- Ekstraksiyon Karışımı: 3 hacim absolü alkol ile 1 hacim eter karıştırıldı.

6- Nitrik asit-Kalsiyum Çözeltisi : 30 mg kalsiyum karbonat 1 litre konsantre nitrik asit içinde eritildi.

7- Antibombing Granül: Cam granüller nitrik asit içinde kaynatıldı ve distile su ile yıkanıp kurutulduktan sonra kullanıldı.

Deneyin Yapılışı

50 µl serum bulunan tüplere 2 ml ekstraksiyon karışımı konuldu.

Karışımı sağlamak için vortekslendi. Tüpler iki dakika bekletildikten sonra kuvvetle santrifüj edildi. 1 ml üst sıvı 25 x 150 mm'lik tüp içine aktarıldı ve uçuruldu. İçinde 50 µl çalışma standardı ve 50 µl deionize su bulunan (kör) tüpler hazırlandı. Her tüpe birkaç antibombing granül ve 2 ml nitrik asit kalsiyum çözeltisi konuldu. Tüpler ısıtıldı ve asit tamamen uçuruldu. Sonra tüpler soğutuldu. 1 ml askorbik asit-TCA ilave edilip karıştırıldı. Üzerine 0.5 ml amonyum molibdat ve 1 ml arsenit-sitrat çözeltileri konuldu. Karışım sağlandıktan sonra 15 dakika bekletildi. 700 nm dalda boyunda ve standarda karşı spektrofotometrede okundu.

Hesaplama : 0.05 ml serum 2 ml ekstraksiyon karışımı ile dilue edildiği için eşitlikten elde edilen sonuç 2.05 ile çarpılır. Bulunan değer inorganik fosforu gösterir. Fosfolipide çevirmek için 25 katsayısı ile çarpılır.

$$\text{Fosfolipid (mg/dl)} : \frac{\text{Örnek Abs.}}{\text{Std. Abs.}} \times \text{std. konsantrasyonu} \times 2.05 \times 25$$

Serum - HDL - Kolesterol Tayini

Serum-HDL-Kolesterol miktarı Warnick yöntemi ile tesbit edildi. Metodla ilgili açıklamalar aşağıda belirtilmiştir.(51).

Reaktifler

- Fosfotungustik asit : 4.025 gr $H_3P(W_3O_{10})_4 \cdot H_2O$ tartılıp 50 ml distile suda çözülür. Üzerine 16 ml 1 mol/L NaOH eklenir. Final hacim su ile 100 ml'ye tamamlanır.

- $MgCl_2$: 2 mol/L
- H_2SO_4 : Derişik
- Glasial asetik asit : Derişik
- $FeCl_3$ reaktif : % 140 mg ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$)

Deneyin Yapılışı

a) 1 ml serum üzerine 0.1 ml fosfotungustik asit ve 0.025 ml $MgCl_2$ çözeltisi eklenir. Karışım sağlanır. Böylece apo-B çöktürülür (oda sıcaklığında 15 dakika bekletmek suretiyle).

b) + 4°C de 1500 x 9'de 30 dakika santrifüj edilir.

c) santrifüjden sonra üst sıvı berrak ise kullanılır. Berrak değilse serum % 0.9 NaCl ile iki kat sulandırılır. Presipitasyon çözeltileride iki kat fazla kullanılır. Sonra aynı santrifüj işlemi tekrarlanır. Deney sonunda bulunan HDL-kolesterol değeri sulandırma faktörü olan iki ile çarpılır.

d) iki adet santrifüj tüpü :

1- Standart: 0.1 ml kolesterol standartı + 3.9 ml $FeCl_3$ reaktifi

2- Örnek standart tüpü : 0.3 ml süpernatant + 5.7 ml $FeCl_3$ 30 dakika oda ısısında beklenir. 3000 devirde 15 dakika santrifüj edilir.

e) Üç deney tüpü alınır. 1-kör, 2-standart, 3-örnek

<u>Kör</u> :	<u>Standart</u> :	<u>Örnek</u> :
4 ml $FeCl_3$	2 ml $FeCl_3$	4 ml süpernatant (örnek)
2 ml H_2SO_4	2 ml süpernatant (standart)	2 ml H_2SO_4
	2 ml H_2SO_4	

f) İyice çalkalanır, 30 dakika oda ısısında beklenir ve 560 nm de optik dansiteleri okunur.

Hesaplama

Başlangıçta örnekler fosfotungustat- $MgCl_2$ karışımı ile 1.125

kat sulandırıldı. Kolesterolün ölçümü için alınan üst sıvı da 20 kat sulandırıldı (0.3 ml üst sıvıya 5.7 ml FeCl_3 reaktifi eklendi). Standart ise 40 kat sulandırıldı (0.1 ml serum havuzu standardına 3.9 ml FeCl_3 reaktifi eklendi. Ayrıca örnekler deney tüplerine 4'er ml aktarılırken, standart 2 ml aktarıldı). Yani örnekler standart'a göre 4 kez daha konsantre oldu. Bu nedenle HDL-Kolesterolü hesaplanacak standart olarak serum havuzundaki gerçek kolesterol düzeyinin $1/4$ 'ü alındı.

$$\text{Örnekteki HDL - Kolesterol} = \frac{A}{\text{standart optik dansite}} \times \text{örnek O.D} \times F$$

Konsantrasyonu (%mg)

A = Serum havuzu kolesterol standartı konsantrasyonu /4

F = Örneğin sulandırılma faktörü = 1.125

Serum Total Lipid Tayini

Serum total lipid düzeyini belirlemek için sulfofosfovanilin yöntemi kullanıldı(3). Bu yöntem karbon-karbon çift bağı içeren lipidlerin sıcak derişik sülfirik asitle reaksiyonu sonucu oluşan keton ve ketal gruplarını vanilin ile oluşturduğu pembe renkli bileşiklerin ölçümü esasına dayanmaktadır.

Reaktifler

1- Derişik sülfirik asit

2- % 0.6'lık vanilin çözeltisi: 600 mg vanilin tartıldı ve 100 ml'lik balon jojeye aktarıldı. Bir miktar distile su ile iyice çözüldükten sonra final hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

3- Fosfovanilin reaktifi: 100 ml % 0.6'lık vanilin çözeltisi bir litrelik erlenmayer içine konuldu ve devamlı karıştırılarak üzerine 400 ml ortofosforik asit eklendi. Kahverengi şişede ve oda ısısında saklandı.

4- %1000 mg'lık lipid standardı : 1 gr saf zeytinyağı (sigma) tartıldı ve 100 ml'lik cam balona konuldu. Bir miktar absolü alkol ile çözüldükten sonra hacim 100 ml'ye tamamlandı.

Deneyin Yapılışı

Cam kapaklı deney tüpleri standart ve örnek olarak işaretlendikten sonra sırasıyla aşağıdaki işlemler yapıldı.

	Standart	Örnek
Lipid standardı	0.1 ml	-
Serum	-	0.1 ml
H ₂ SO ₄	5 ml	5 ml

15 dakika kaynar su banyosunda tutuldu. Soğuk su altında soğutulduktan sonra aşağıdaki işlemler uygulandı.

	Kör	Standart	Örnek
H ₂ SO ₄	0.2 ml	-	-
Kaynatılıp soğutulmuş standart karışımı	-	0.2 ml	-
Kaynatılıp-soğutulmuş örnek karışımı	-	-	0.2 ml
Fosfovanilin reaktifi	5 ml	5 ml	5 ml

Tüpler iyice çalkalandı, oda ısısında 30 dakika bekletildikten sonra spektrofotometrede 530 nm dalga boyunda kör'e karşı optik absorbansları okundu. Bulunan değerler formül uygulanarak total lipid düzeyleri belirlendi.

$$\text{Örnek konsantrasyon} = \frac{\text{standart konst (\% mg)}}{\text{standartın optik absorbansı}} \times \text{örn.optik absorbansı}$$

Serum Total Kolesterol Tayini

Serum total kolesterol miktarı Zak yöntemi ile belirlendi (53). Yöntemiyle ilgili açıklamalar aşağıda belirtilmiştir.

Reaktifler

- 1- Derişik sülfirik asit
- 2- Derişik glasial asetik asit
- 3- Demir III klorür reaktif: 140 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ tartıldı. Glasial asetik asitte çözülerek hacim 100 ml'ye tamamlandı. Koyu renkli şişede ve oda ısısında saklandı.
- 4- Kolesterol standardı : 200 mg kristalize saf kolesterol 100 ml'lik balona konuldu. Propil alkol ile çözüldükten sonra hacim 100 ml'ye tamamlandı.

Deneyin Yapılışı

Santrifüj tüpleri, standart ve örnek olarak işaretlendi.

	Standart	Örnek
Kolesterol standardı	0.1 ml	-
Serum	-	0.1 ml
Demir-III-klorür reaktif	4 ml	4 ml

Tüpler iyice çalkalandı, 30 dakika oda ısısında bekletildi. Daha sonra 3000 devir / dak. 15 dakika santrifüj edildi. 3 deney tüpü alındı. Kör , standart ve örnek olarak işaretlendi.

	Kör	Standart	Örnek
Demir-III-klorür reaktif	2 ml	-	-
Standart üst sıvısı	-	2 ml	-
Örnek üst sıvısı	-	-	2 ml
Glasial asetik asit	2 ml	2 ml	2 ml
Sülfirik asit	2 ml	2 ml	2 ml

Tüpler iyice çalkalandı, oda sıcaklığında 30 dakika beklen - dikten sonra spektrofotometrede 560 nm'de okundu. Total kolesterol miktarını hesaplamak için aşağıdaki formül kullanıldı.

$$\frac{\text{Örnekteki kolesterol}}{\text{Konsant. (\% mg)}} = \frac{\text{standardın konst. (\% mg)}}{\text{standardın optik dansitesi}} \times \text{örnek Opt.dans.}$$

Serum Triglicerit Tayini

(Triglicerides-Kit, ref 61671 bio MERIEUX)

Prensip : Serum asit ortamda izopropanol-heptan karışımı ile ekstrakte edilir. Bunun sonucu iki faz oluşur. Alttaki fazda fosfolipitler, bilirubin, glukoz ve serbest gliserol gibi polihidroksi - latlar kalır. Üstteki fazda transesterifikasyon ile gliserole hidrolize olan trigliseritler kalır. Gliserolün periodat ile oksidasyonu sonucu formaldehit meydana gelir. Formaldehit de Hantzsch reaksiyonuna göre asetilaseton ve amonyum asetat ile sarı renkli bir kompleks oluşturur. Bu renk nedeni ile spektrofotometrik olarak trigliserit konsantrasyonu ölçülür.

Reaktifler

- 1- Reaktif I : $0.08 \text{ N H}_2\text{SO}_4$
- 2- Reaktif II : Triolein 1 g/L, 35 hacim izopropanol 20 hacim heptan (standart)
- 3- Reaktif III: sodyum etilat 0.1 mol/L
- 4- Reaktif IV: Sodyum metaperyodat 0.03 mol/L
- 5- Reaktif V : Asetil aseton 300 mol/L
- 6- Reaktif VI : Amonyum asetat 2 mol/L
- 7- Reaktif VII: Asetil aseton çalışma çözeltisi : 1 hacim reaktif V ile, 10 hacim reaktif VI karıştırıldı. Deneyden hemen önce hazırlandı.
- 8- Ekstraksiyon çözeltisi : 20 hacim heptan, 35 hacim izopropanol karışımı.

Deneyin Yapılışı : 3 adet deney tüpü alındı, kör, standart ve örnek olarak işaretlendi.

Ekstraksiyon Çözeltisi	4 ml	4 ml	4 ml
	Kör	Standart	Örnek
Distile Su	0.2 ml	-	-
Reaktif 2 (Standart)	-	0.2 ml	-
Serum	-	-	0.2 ml

Her tüp 30 saniye şiddetle çalkalandı. iki fazın ayrılması için bir kaç dakika beklendi. Tekrar 3 deney tüpü alındı, kör , standart ve örnek olarak işaretlendi.

	Kör	Standart	Örnek
Kör Tüpündeki Sıvının Üst Fazı	0.5 ml	-	-
Standart Tüpündeki Sıvının Üst Fazı	-	0.5 ml	-
Örnek Tüpündeki Sıvının Üst Fazı	-	-	0.5 ml
Reaktif 3	3 ml	3 ml	3 ml

En az 5 dakika oda ısısında beklendi.

Reaktif 4	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
-----------	--------	--------	--------

İyice çalkalandı.

Asetil Aseton Çalışma Çözeltisi	1 ml	1 ml	1 ml
---------------------------------	------	------	------

30 dakika 37°C su banyosunda tutuldu. Soğuk su altında soğutulduktan sonra 405 nm'de optik dansiteler köre karşı okundu. Aşağıdaki formüle göre değerlendirildi.

$$\text{Örneğin Konsantrasyonu (\% mg)} = \frac{\text{Standardın Konsantrasyonu}}{\text{Standart Optik Dansite}} \times \text{Ornek O.D.}$$

Doku lipid parametreleri, karaciğer dokusu ekstrakte edildikten sonra aynen serumdaki ölçüm yöntemleriyle tayin edildi. Tüm ölçümler yapıldıktan sonra; Total Kolesterol = VLDL - K + LDL - K + HDL - K formülünden VLDL - K + LDL - K değeri hesaplandı. Ayrıca serum lipidleri oransal değerleri de belirlendi.

B U L G U L A R :

Bu çalışmada askorbik asidin lipid parametreleri üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla deney grubu olarak ayrılan hayvanlara 4 hafta süreyle günlük 15 mg/kg vitamin C uygulandı. Kontrol grubuna ise aynı hacimde serum fizyolojik verildi. Deney süresince bütün hayvanların ağırlık değişiklikleri her tarafta düzenli olarak ölçüldü. Çalışma periyodu sonunda hayvanlar feda edilerek önceden planlanan parametrelerin ölçümleri yapıldı. Elde edilen sonuçlar şöyledir :

Ağırlık değişiklikleri :

Vitamin C uygulanan deney grubu hayvanların kontrol grubuna göre, başlangıç değerinin % si olarak ifade edilen ağırlık artışları, I. haftada ($p < 0.01$) ve IV. hafta sonunda ($p < 0.05$) istatistiksel açıdan anlamlı bulundu (Tablo-3 ve 7).

Serum lipid düzeyleri :

Serum lipid parametrelerinden total lipid, total kolesterol, total fosfolipid ve trigliserid seviyelerinde deney grubu ile kontrol grubu arasında önemli bir farklılık görülmedi. Fakat HDL-Kolesterol düzeyinin deney grubunda anlamlı bir şekilde yükseldiği ($p < 0.001$), VLDL-K + LDL-K fraksiyonunun ise önemli ölçüde azaldığı ($p < 0.01$) belirlendi (Tablo-4 ve 8).

Serum lipidleri, oransal değerleri olarak; Total lipid/HDL-K düzeyinde ($p < 0.01$). Total Kolesterol/HDL-K ve VLDL-K + LDL-K/HDL-K düzeyinde ($p < 0.001$) deney ve kontrol grubu arasında anlamlı farklılıklar saptandı (Tablo-6 ve 10).

Doku lipid düzeyleri :

Ölçülen doku lipid parametrelerinden total lipid, total kolesterol, total fosfolipid ve trigliserid seviyelerine vitamin C uygulamasının etkili olmadığı tesbit edildi (Tablo-5 ve 9).

Tablo : 3. Askorbik asidin ağırlık artışına etkisi. (Başlangıç değerini
% si olarak)

RAT NO :	I. HAFTA		II. HAFTA		III. HAFTA		IV. HAFTA	
	Kontrol	Deney	Kontrol	Deney	Kontrol	Deney	Kontrol	Deney
1	105.0	104.5	110.0	113.6	125.0	122.7	125.0	127.3
2	101.9	104.0	103.8	112.0	107.7	120.0	107.7	120.0
3	100.0	105.0	104.5	115.0	109.1	125.0	109.1	130.0
4	100.0	104.5	103.7	113.6	107.4	127.3	107.4	136.4
5	102.3	105.0	118.2	115.0	127.3	120.0	127.3	125.0
6	100.0	102.5	115.8	110.0	126.3	115.0	131.6	120.0
7	100.0	103.7	104.0	107.4	108.0	125.9	108.0	125.9
8	--	107.7	--	119.2	--	130.8	--	130.8
$\bar{X}$	101.31	104.61	108.57	113.23	115.83	123.34	116.59	126.81
SD	1.91	1.49	6.20	3.55	9.74	4.97	10.83	5.58
SH	0.72	0.53	2.34	1.26	3.68	1.76	4.09	1.97

Tablo : 4 Askorbik asidin serum lipid parametrelerine etkisi

RAT NO:	HDL - K (mg / dl)		VLDL + LDL -K (mg / dl)		TOTAL KOLESTEROL (mg / dl)		TRİGLİSERİD (mg / dl)		TOTAL FOSFOLİPİD (mg / dl)		TOTAL LİPİD (mg / dl)	
	Kontrol	Deney	Kontrol	Deney	Kontrol	Deney	Kontrol	Deney	Kontrol	Deney	Kontrol	Deney
1	32.13	56.23	47.87	23.77	80.00	80.00	90.91	81.82	227.77	208.79	461.54	369.23
2	32.13	56.23	37.87	18.77	70.00	75.00	90.91	113.64	190.03	189.81	369.23	338.46
3	24.10	48.20	50.90	36.80	75.00	85.00	77.27	77.27	206.89	170.83	369.23	461.54
4	32.13	40.17	42.87	44.83	75.00	85.00	77.27	118.18	102.50	227.77	369.23	461.54
5	32.13	48.20	57.87	36.80	90.00	85.00	86.36	77.27	125.28	129.07	461.54	338.46
6	40.17	56.23	44.83	23.77	85.00	80.00	100.00	77.27	170.74	113.89	369.23	430.77
7	32.13	40.17	47.87	44.83	80.00	85.00	86.36	72.73	170.57	180.33	400.00	400.00
8	—	48.20	—	36.80	—	85.00	—	104.54	—	200.72	—	461.54
$\bar{X}$	32.13	49.20	47.15	33.30	79.29	82.50	87.01	90.34	170.54	177.65	400.00	407.69
SD	4.64	6.70	6.32	9.97	6.73	3.78	8.06	18.57	44.07	38.99	43.52	53.93
SH	1.75	2.37	2.39	3.52	2.54	1.34	3.05	6.57	16.66	13.79	16.45	19.07

Tablo : 5 Askorbik asidin doku lipid parametrelerine etkisi

RAT NO:	TOTAL KOLESTEROL (mg/g)		TOTAL FOSFOLİPİD (mg/g)		TRİGLİSERİD (mg/g)		TOTAL LİPİD (mg/g)	
	Kontrol	Deney	Kontrol	Deney	Kontrol	Deney	Kontrol	Deney
1	4.61	5.38	8.81	7.35	10.37	9.27	25.56	22.19
2	6.59	5.38	6.23	10.22	9.99	10.61	27.17	23.08
3	6.26	3.29	6.26	6.86	9.21	8.07	28.72	16.11
4	5.00	6.26	2.62	4.24	8.90	5.83	21.29	14.60
5	5.61	7.05	4.80	8.81	6.60	10.02	17.71	26.32
6	6.54	6.57	5.17	5.02	7.70	8.16	25.07	21.02
7	5.78	6.87	5.58	5.58	8.83	7.58	24.23	17.58
8	--	5.58	--	8.13	--	10.25	--	19.33
$\bar{X}$	5.77	5.80	5.64	7.03	8.80	8.72	24.25	20.03
SD	0.76	1.21	1.86	2.02	1.30	1.62	3.71	3.89
SH	0.29	0.43	0.70	0.71	0.49	0.57	1.40	1.38

Tablo : 6 Askorbik asidin serum lipidleri oransal değerleri ile ilişkisi

RAT NO :	<u>TOTAL LİPİD</u> HDL -K		<u>TOTAL-K</u> HDL -K		<u>VLDL + LDL-K</u> HDL -K	
	Kontrol	Deney	Kontrol	Deney	Kontrol	Deney
1	14.36	6.57	2.49	1.42	1.49	0.42
2	11.49	6.02	2.18	1.33	1.18	0.33
3	15.32	9.58	3.11	1.76	2.11	0.76
4	11.49	11.49	2.33	2.12	1.33	1.12
5	14.36	7.02	2.80	1.76	1.80	0.76
6	9.19	7.66	2.12	1.42	1.12	0.42
7	12.45	9.96	2.49	2.12	1.49	1.12
8	--	9.58	--	1.76	--	0.76
$\bar{X}$	12.67	8.48	2.50	1.71	1.50	0.71
SD	2.15	1.93	0.35	0.31	0.35	0.31
SH	0.81	0.68	0.13	0.11	0.13	0.11

Tablo : 7 Askorbik asidin ağırlık artışına etkisi. (Başlangıç değerin % si olarak) Ortalama + SH

	KONTROL (n=7)	DENEY (n=8)
I. HAFTA	101.31 $\pm$ 0.72	^a 104.61 $\pm$ 0.53
II.HAFTA	108.57 $\pm$ 2.34	113.23 $\pm$ 1.26
III.HAFTA	115.83 $\pm$ 3.68	123.34 $\pm$ 1.76
IV.HAFTA	116.59 $\pm$ 4.09	^b 126.81 $\pm$ 1.97

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında farkın istatistiksel önemi. a ($p < 0.01$), b ($p < 0.05$)

Tablo : 8 Askorbik asidin serum lipid parametrelerine etkisi
Ortalama $\pm$ SH

	KONTROL (n=7)	DENEY (n=8)
TOTAL LİPİD (mg/dl)	400.00 $\pm$ 16.45	407.69 $\pm$ 19.07
TOTAL KOLESTEROL (mg/dl)	79.29 $\pm$ 2.54	82.50 $\pm$ 1.34
TOTAL FOSFOLİPİD (mg/dl)	170.54 $\pm$ 16.66	177.65 $\pm$ 13.79
TRİGLİSERİD (mg/dl)	87.01 $\pm$ 3.05	90.34 $\pm$ 6.57
HDL-K (mg/dl)	32.13 $\pm$ 1.75	^a 49.20 $\pm$ 2.37
VLDL + LDL-K (mg/dl)	47.15 $\pm$ 2.39	^b 33.30 $\pm$ 3.52

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında farkın istatistiksel önemi. a ($p < 0.001$), b ($p < 0.01$)

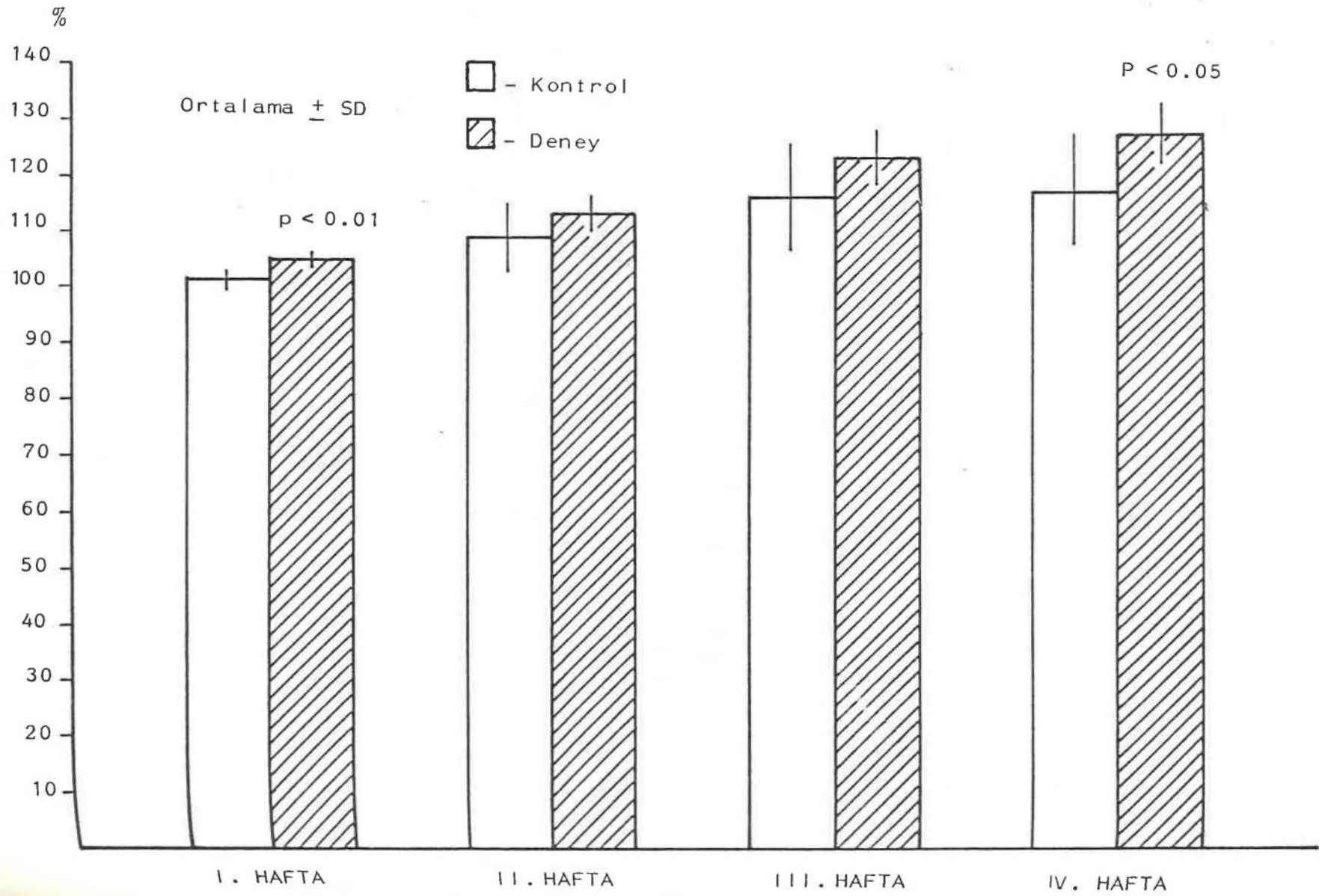
Tablo : 9 Askorbik asidin doku lipid parametrelerine etkisi

	KONTROL (n=7)	Ortalama $\pm$ SH DENEY (n=8)
TOTAL LİPİD (mg/g)	24.25 $\pm$ 1.40	20.03 $\pm$ 1.38
TOTAL KOLESTEROL (mg/g)	5.77 $\pm$ 0.29	5.80 $\pm$ 0.43
TOTAL FOSFOLİPİD (mg/g)	5.64 $\pm$ 1.86	7.03 $\pm$ 2.02
TRİGLİSERİD	8.80 $\pm$ 0.49	8.72 $\pm$ 0.57

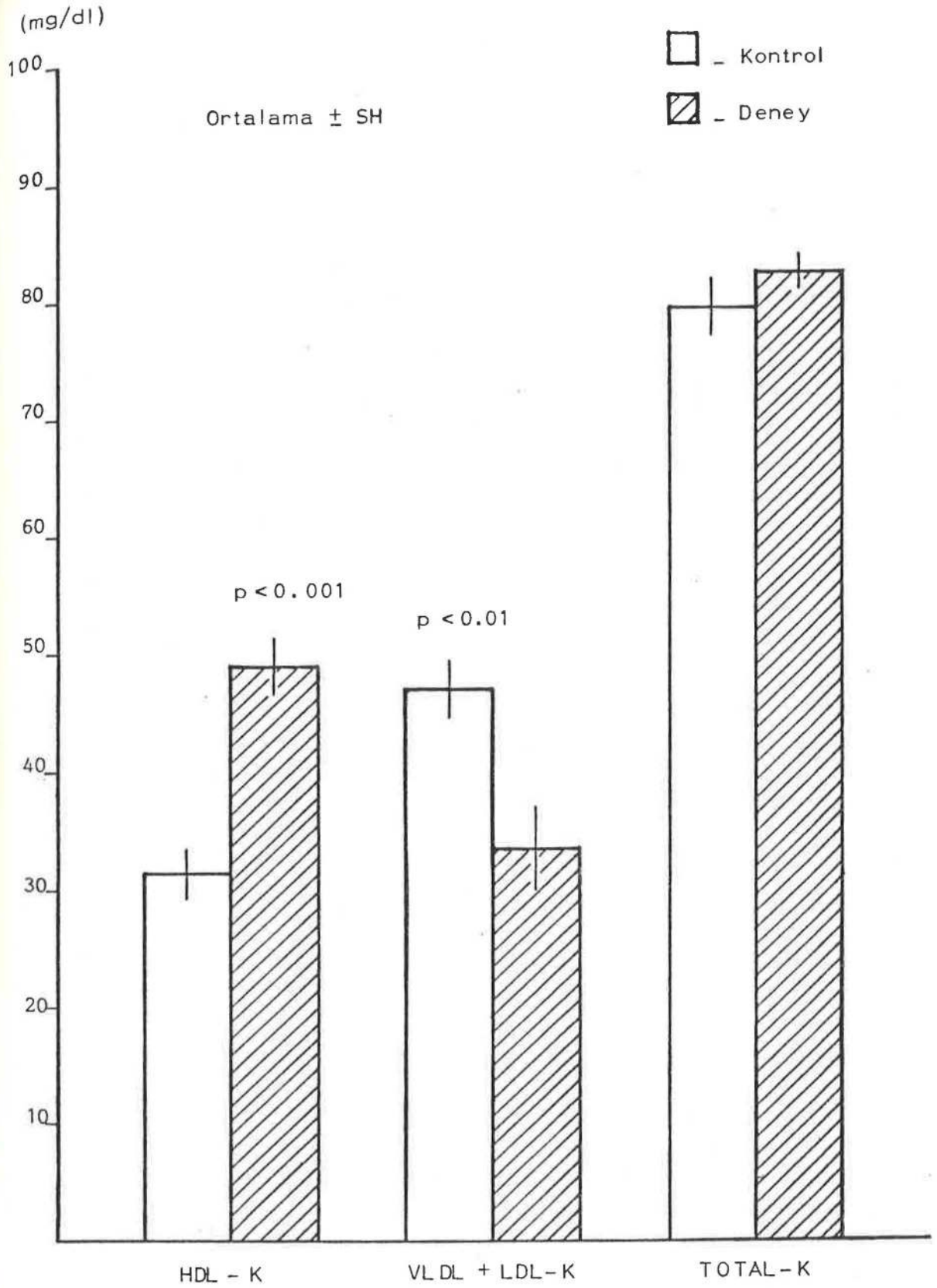
Tablo : 10 Askorbik asidin serum lipidleri oransal değerleri ile ilişkisi

	KONTROL (n=7)	Ortalama $\pm$ SH DENEY (n=8)
$\frac{\text{TOTAL-LİPİD}}{\text{HDL-K}}$	12.67 $\pm$ 0.81	^b 8.48 $\pm$ 0.68
$\frac{\text{TOTAL-K}}{\text{HDL-K}}$	2.50 $\pm$ 0.13	^a 1.71 $\pm$ 0.11
$\frac{\text{VLDL + LDL-K}}{\text{HDL-K}}$	1.50 $\pm$ 0.13	^a 0.71 $\pm$ 0.11

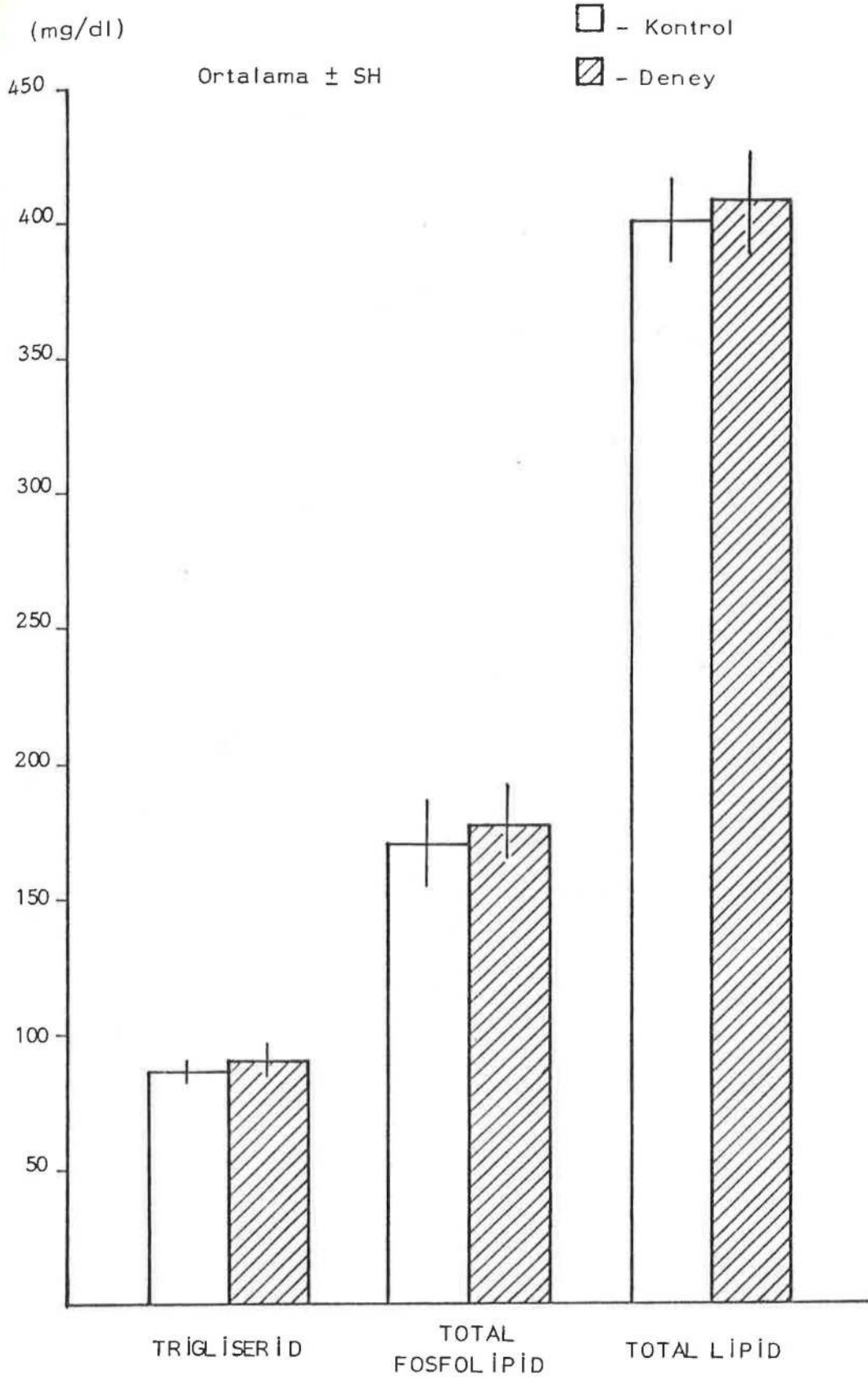
Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında farkın istatistiksel önemi. a ($p < 0.001$), b ($p < 0.01$)



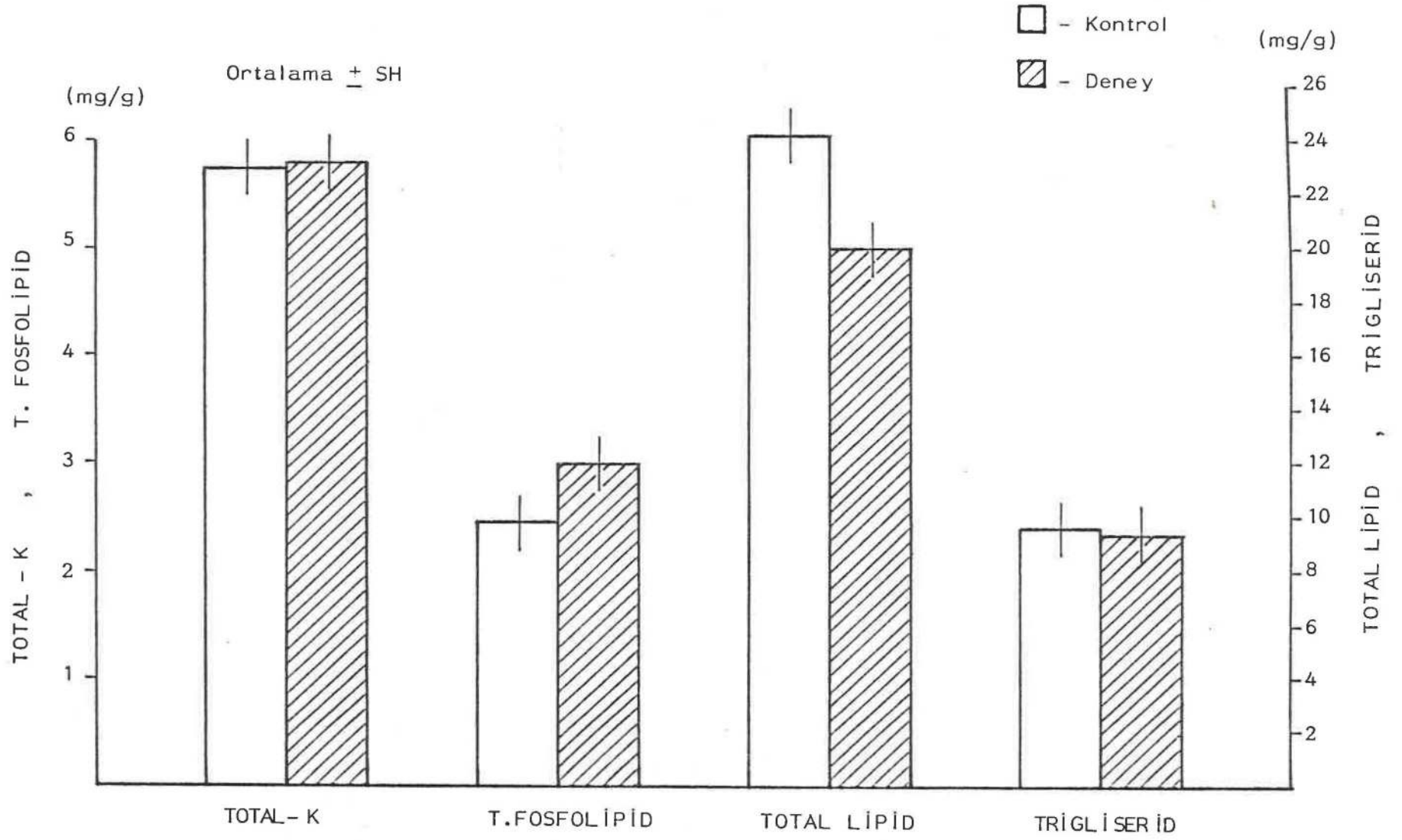
Şekil :1 Askorbik asidin ağırlık artışına etkisi (Başlangıç değerini % si olarak)



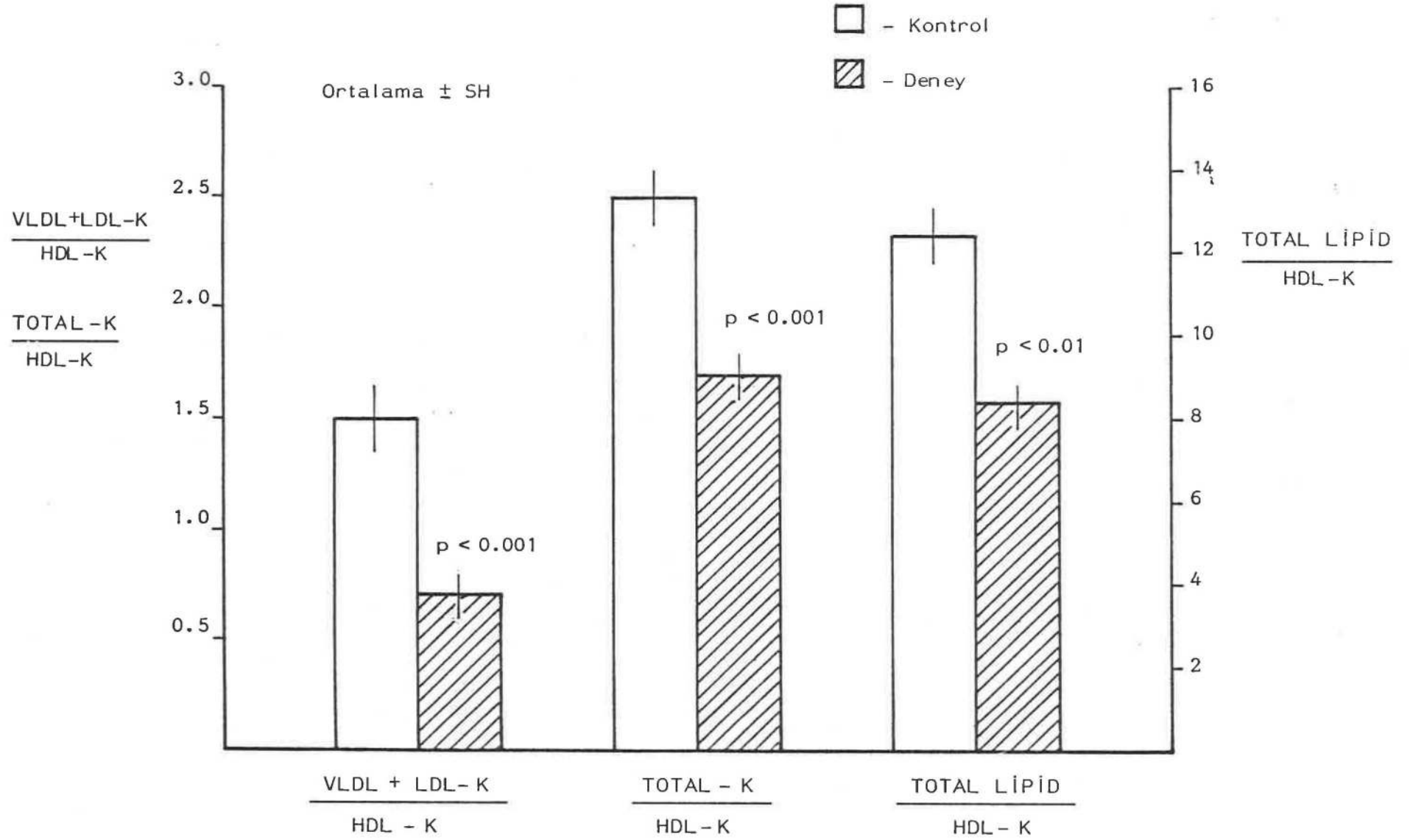
Şekil : 2 Askorbik asidin serum lipid parametrelerine etkisi



Şekil : 3 Askorbik asidin serum lipid parametrelerine etkisi



Şekil : 4 Askorbik asidin doku lipid parametrelerine etkisi



Şekil : 5 Askorbik asidin serum lipidleri oransal değerleri ile ilişkisi

T A R T I Ŗ M A :

Bu alışmada C vitamini uyguladığımız deney grubu sıçanların 1. ve 4. hafta sonundaki vct ağırlıkları, kontrol sıçanlara göre önemli ölçüde artış gösterdi. Kontrol ve deney gruplarının tükettikleri yem miktarını belirliyemediğimiz için ağırlık artışındaki bu farkın iştah ile ilişkisi olup olmadığını kesin olarak syliyemiyoruz. C vitamini eksikliğinde görülen skorbüt hastalığında yara iyileşmesinin geciktiği, kemik büyümesinde bozukluk meydana geldiği damar fragilitesinde artış ve gelişme geriliği olduğu gösterilmiştir (1,18,30,42,46,49). Ayrıca C vitamininin lipoprotein lipaz aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir (15,44). Bu enzim özellikle yağ dokusunun kapillerlerinde şilomikromlara ve VLDL'ye etki ederek yağ dokusuna serbest yağ asitleri ve gliserolün girişini arttırır (25,36). Deney grubundaki ağırlık artışın kontrollere göre fazla olması muhtemelen lipoprotein aktivitesinin C vitamini ile artmış olmasına bağlıdır. Bu enzim yağ dokusunda anabolik etkiye sahiptir. Bununla birlikte C vitamini uyguladığımız grupta kemik yapımı da uyarılmış olabilir. Nitekim kemik dokusunda kolajen yapımı için C vitaminine gereksinim olduğu bilinmektedir.

Serum lipidlerinde serum total lipid, total kolesterol, total fosfolipid ve trigliserid düzeyleri yönünden deney ve kontrol grupları arasında önemli bir farklılık görülmedi. Kontrol grubunda ölçtüğümüz bu lipid parametreleri literatürde belirtilen bazı çalışmaların sonuçlarına yakınlık göstermektedir. C vitaminin serum lipidlerine etkisi ile ilgili araştırmaların sonuçları arasında çelişkiler

mevcuttur. HORIO ve arkadaşları ile GINTER ve ODUMOSU'ya göre vitamin C eksikliği bulunan hayvanlarda hepatik kolesterol 7 α hidroksilaz aktivitesinin azalmasına bağlı olarak kolesterolün safra asitlerine dönüşümü azalmakta ve neticede serum kolesterolü artmaktadır(13, 20,40).

SATINDER ve arkadaşları kobaylarda C vitamini eksikliğinin hiperkolesterolemi'ye neden olduğunu, bu hayvanların diyetine kolesterol ilavesinin durumu daha da kötüleştirdiğini ve C vitamini uygulamasının serum kolesterolündeki artışı azalttığını bildirmişlerdir (44).

JENKINS, hamile kobaylarda yaptığı çalışmada düşük dozda C vitamini alınımının hiperkolesterolemi'ye neden olduğunu, yüksek dozda C vitamini alınımının hiperkolesterolemi'yi önlediğini, hamile olmayan kobaylarda ise C vitamininin serum kolesterol düzeyini etkilemediğini göstermiştir (22).

SHARMA ve arkadaşlarının kobaylarda yaptıkları araştırmaya göre çok yüksek dozda 4 ay süreyle vitamin C uygulamasının serum total lipid, total kolesterol, total fosfolipid ve trigliserid düzeylerini değiştirmediği, HDL-K miktarındaki hafif bir artışa bağlı olarak LDL-K/HDL-K oranını küçülttüğü bildirilmiştir. Ayrıca bu çalışmada deneysel hiperkolesterolemi'nin yüksek dozda vitamin C uygulaması ile kısmen önlenebildiği gösterilmiştir (45).

GINTER ve arkadaşları vitamin C eksikliğinde kolesterol biyosentezinin arttığını bildirdikleri halde, ELLIOTT ve LACHANCE'ye göre C vitamini in vitro olarak karaciğerde kolesterol yapımını etkilememektedir (10,13).

C vitamininin serum lipidlerine etkisi ile ilgili insanlarda

yapılan araştırmaların sonuçları arasında da bazı çelişkiler bulunmaktadır. ARO ve arkadaşları Marginal C vitamini eksikliği bulunan yaşlı kadınlarda C vitamini uygulamasının serum total kolesterol, HDL-K ve trigliserid düzeylerini etkilemediğini göstermişlerdir(2).

JOHNSON ve arkadaşlarının sağlıklı normokolesterolemik erkeklerde yaptıkları çalışmada C vitamini uygulamasının serum lipidlerinin miktarını değiştirmediği saptanmıştır (23). BATES ve arkadaşları ise yaşlı insanlarda serum C vitamini seviyesi ile VLDL +LDL ve HDL arasında pozitif bir ilişkinin bulunduğunu özellikle bu ilişkinin VLDL+LDL fraksiyonu için daha da önemli olduğunu bildirmişlerdir.(4). Hiperkolesterolemik kişilere askorbik asit uygulamasının serum lipidlerine etkili olmadığını belirten çalışmalar da vardır(41).

Literatür bilgilerinin sonuçlarının kısaca şöyle özetliyebiliriz :

1. C vitamini eksikliğinde hiperkolesterolemi görülebilir.
2. Diyete bağlı hiperkolesterolemi C vitamini ile azaltılabilir.
3. C vitamini eksikliğinde kolesterol biyosentezi artar.
4. C vitamininin kolesterol yapımına etkisi yoktur.
5. Serum vitamin C düzeyi ile serum total kolesterolü arasında pozitif bir ilişki vardır, bu ilişki özellikle VLDL+LDL fraksiyonlarında daha belirgindir.
6. Marginal C vitamini eksikliğinde bulunan yaşlı insanlarda ve sağlıklı normokolesterolemik insanlarda C vitamini uygulaması serum lipidlerini etkilemez.

7. C vitamini uygulamasının etkili olabilmesi için kişide plazma askorbat düzeyi düşük, kolesterol seviyesi yüksek olmalıdır.

Bizim sonuçlarımız SHARMA ve arkadaşları, JOHNSON ve arkadaşları ve JENKINS'in çalışmalarını destekler niteliktedir. C vitamini uyguladığımız sıçanlarda serum total kolesterol miktarı değişmedi. Bazı araştırmacılara göre C vitamini karaciğerde kolesterolün safra asitlerine dönüşümünü arttırmak suretiyle serum kolesterolünü azaltmaktadır (13,22). Ancak safra asitlerinin diyetle alınan kolesterolün emilimini arttırdığı bir gerçektir (18,31,32,49). Ayrıca C vitamini eksikliğini karaciğerde kolesterolün safra asitlerine dönüşümünü azaltmadığını kabul eden araştırmacılar da vardır (20,41). Çalışmamızda kolesterolün safra asitlerine dönüşümü ölçülemediği için bu konuda kesin bir görüş belirtemiyoruz. Ancak vitamin C uyguladığımız grupta serum HDL-K miktarının artmış olması ekstrahepatik dokulardan karaciğere gelen kolesterol yükünün arttığını göstermektedir. Deney grubunda karaciğer kolesterolü değişmediğine göre, kolesterolün safra asitlerine dönüşümünün artmış olduğunu dolaylı olarak ifade edebiliriz.

SHARMA ve arkadaşlarının çalışmasında olduğu gibi bu çalışmada da serum HDL-K miktarındaki artışa bağlı olarak VLDL + LDL - K/HDL-K oranı küçüldüğü için aterosklerotik risk deney grubunda azalmıştır. C vitamininin HDL - K miktarını nasıl etkilediği bilinmiyor. Muhtemelen lesitin-kolesterol-açıltransferaz aktivitesini yükselterek ekstrahepatik dokulardan kolesterolün mobilizasyonunu artırıyor olabilir.

C vitamini uyguladığımız sıçanlarda serum VLDL - K + LDL - K miktarının önemli ölçüde azalmış olması muhtemelen lipoprotein lipaz aktivitesinin yükselmesine veya LDL reseptörlerinin artışına bağlı olabilir. Nitekim C vitamininin lipoprotein lipaz aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir (15,44).

Bulgularımıza göre C vitamininin normokolesterolemik sıçanlarda serum total kolesterol, total lipid, total fosfolipid ve trigliserid düzeyleri ile karaciğerde total lipid, total kolesterol, total fosfolipid ve trigliserid miktarını etkilemediği, serumda HDL-K miktarını arttırdığı, VLDL-K + LDL-K düzeyini düşürdüğü ileri sürülebilir. Böylece ateroskleroz'a eğilimin vitamin C uygulaması ile azaltılabileceği kanısındayız. Bu hipotezin geçerliliği hiperkolesterolemik deneklerde yapılacak araştırmaların sonuçlarına bağlıdır.

Ö Z E T :

Askorbik asit organizmada bazı enzimlerin kofaktörü olduğu gibi antiskorbütik etkisi de bilinmektedir. Özellikle bağ dokusunda kollojen sentezi için hidroksilasyon reaksiyonlarında görev alır. Askorbik asit karaciğer mikrozomlarında oksidaz sistemine aracılık eden sitokrom p 450'yi etkilemektedir. Bilinen çeşitli fizyolojik fonksiyonlarından önemli bir tanesi de, kolesterolün safra asitlerine dönüşümünde başlangıç basamağı olan 7α hidroksilasyon'una katılmaktır. Böylece organizmadan kolesterolün elemine edilmesine bağlı olarak hipokolesterolemik bir etkiye sahip olabileceği ileri sürülmektedir. Bununla birlikte vitamin C'nin kolesterol metabolizmasına etkisi hakkında kesin bir fikir mevcut değildir. Bazı araştırmacılar, vitamin C'nin hipokolesterolemik ve anti atherosklerotik etkilere sahip olduğunu ileri sürmüşler, bazıları ise böyle bir etkinin varlığını ortaya koyamamışlardır.

Elde edilen bilgilerin ışığında bu çalışmada, askorbik asidin serum lipoproteinleri üzerinde ki etkisi araştırıldı. Bunun için 15 adet swiss albino türü sıçanlar kullanıldı. Deney grubu olarak ayrılan hayvanlara 4 hafta süreyle günde 15 mg/kg vitamin C enjekte edildi. Kontrol grubuna ise aynı hacimde serum fizyolojik verildi. Deney süresince bütün hayvanların ağırlık değişikliği her hafta düzenli olarak izlenip ölçüldü.

Vitamin C uygulanan deney grubu sıçanların % ağırlık artışı, kontrol grubuna göre I. hafta ($p < 0.01$) ve II.hafta ($p < 0.05$) sonunda istatistiksel açıdan önemli bulundu.

Serum lipidlerinden total lipid, total kolesterol, total fosfolipid ve trigliserid düzeyleri yönünden deney ve kontrol grupları arasında anlamlı bir farklılık görülmedi. Fakat deney grubunda, HDL-kolesterol'ündeki artış ($p < 0.001$) ve VLDL-K+LDL-K seviyesindeki azalış ($p < 0.01$) önemliydi.

Çalışmamızda ölçtüğümüz doku lipid parametrelerinden, total lipid, total kolesterol, total fosfolipid ve trigliserid düzeyleri, deney grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark oluşturmadı.

Bu çalışmada ayrıca serum lipidleri oransal değerleri deney ve kontrol grubu arasında mukayese edildi. Buna göre deney grubunda total lipid/HDL-K oranı ($p < 0.01$), total kolesterol/HDL-K ve VLDL-K+LDL-K/HDL-K oranının ($p < 0.001$) önemli bir şekilde azaldığı tesbit edildi.

Sonuç olarak çalışmamızda C vitamini uygulanmasının; total kolesterol, total lipid, total fosfolipid ve trigliseridlerin serum ve karaciğer dokusundaki düzeylerini etkilemediğini, fakat serum HDL-K miktarını arttırdığını ve VLDL-K+LDL-K ile serum lipidleri oransal değerlerini önemli ölçüde düşürdüğünü belirledik. Böylece vitamin C uygulaması ile aterosklerotik riskin azaltılabileceği ileri sürülebilir.

S U M M A R Y :

The effect of ascorbic acid administration on blood and liver lipids was studied in male rats. Administration of 15 mg/kg vitamin C daily for 4 weeks increased serum HDL-C level (mean $\pm$ SD) from 32.13 ± 1.75 to 49.20 ± 2.37 mg/dl, and decreased VLDL + LDL-C level from 47.15 ± 2.39 to 33.30 ± 3.52 mg/dl. But there was no significant change in the serum and liver total lipids, total cholesterol, total phospholipids and triglycerides.

In conclusion, ascorbic acid intake possibly increases HDL-K and decreases VLDL + LDL-C levels which has a protective role in atherosclerosis.

K A Y N A K L A R :

1. ARAS, K. : Tıbbi Biyokimya (vitaminler). Ankara Üniv.Basımevi, 96-110, 1976.
2. ARO, A.; KYLLASTINEN, M., KOSTIAINEN, E., GREFF, C.G., ELFVING, S., UUSITALO, U.: No effect on serum lipids by moderate and high doses of vitamin C in elderly subjects with low plasma ascorbic acid levels. Ann. Nutr. Metabol. 32: 133-137, 1988.
3. BAGINSKI, E.S., EPSTEIN, E., ZAK, B.: Lipids and lipoproteins in Grandwhal's clinical laboratory methods and diagnosis. 1: Ed. by; AC. sonnen-Wirth and L. Jarret, 8 th Ed, St. Louis, The C.V. Mosby comp. PP: 272-304, 1980.
4. BATES, C.J., BURR, M.K., ST LEGER, A.S.: Vitamin C, high density lipoproteins and heart disease in elderly subjects. Age and Ageing. 8 (3): 177-82, 1979.
5. BAUR, J.d., ACKERMAN, P.G., TERO, G.: Phospholipids in clinical laboratory metods. C.V. Mosby Comp., St.Louis PP: 450-451, 1974.
6. BEETENS, J.R., COENE, M.C., VERHEYEN, A., ZONNEKEYN, L., and HERMAN, A.G.: Vitamin C increases the prostacyclin production and decreases the vascular lesions in experimental atherosclerosis in rabbits. Prostaglandins. 32 (3): 335-349, 1986.
7. BIGLEY, R.H. and STANKOVAL, L.: Uptake and redextion of oxidized and reduced ascorbate by human leukocytes. The Journal of experimental medicine. 139: 1084-1092, 1974.

8. BUZZORD, I.M., MILTON, R., DRISCOL, D.L., BOWERING, J.: Effect of dietary eggs and ascorbic acid on plasma lipid and lipoprotein cholesterol levels in healthy young men. *Am. J. Clin. Nutr.* 36: 94-105, 1982.
9. DALAL, G.E., CHOI, E., JACQUES, P., SCHAEFER, E.J., JACOB, R.A.: Ascorbic acid, HDL cholesterol, and apolipoprotein A-1 in an elderly Chinese population in Boston. *J. Am. Coll. Nutr.* 8 (1): 69-74, 1989.
10. ELLIOTT, J.G., and LACHANCE, P.A.: Effects of vitamin A and ascorbic acid on in vitro cholesterol biosynthesis in the rat. *J. Nutr.* 110 (7): 1488-96, 1980.
11. GANONG, W.F.: Review of Medical Physiology, Thirteenth edition, Apleton and Lange, Norwalk, Connecticut/Los Altos, California, 1987.
12. GEOLY, L.K., DIAMOND, L.H.: Ascorbic acid and hypertriglyceridemia. *Ann. Intern. Med.* 93 (3): 511, 1980.
13. GINTER, E.: Cholesterol: Vitamin C controls its transformation to bile acids. *Science*. 179: 702-704, 1972.
14. GINTER, E.: Pretreatment serum-cholesterol and response to ascorbic acid. *The Lancet*, 3: 958-959, 1979.
15. GINTER, E. and BOBEK, P.: The influence of vitamin C on lipid metabolism. In: *Vitamin C* (Counsell, J.N. and Horning, D.H. eds) PP. 299-347, 1981.
16. GÖKHAN, N., ÇAVUŞOĞLU, H., KAYSERİLIOĞLU, A.: *İnsan Fizyolojisi*, Sermet Matbaası, İstanbul, 1983.

17. GUYTON, A.C.: Textbook of Medical Physiology, seventh edition, W.B. Saunders company, Philadelphia, London, Toronto, 1986.
18. GÜNER, F. : Tavşanlara (*oryctolagus cuniculus*) oral yolla verilen C vitamininin periferik kan hücreleri ile lenfo, Myelo-Retiküler dokular üzerindeki etkisi. D.Ü.Sağlık Bilimleri Enstitüsü , Diyarbakır, 1986.
19. HORIO, F., OZAKI, K., ODA, H.: Effect of dietary ascorbic acid, cholesterol and PCB on cholesterol concentrations in serum and liver in a rat mutant unable to synthesize ascorbic acid. J.Nutr. 117 (6): 1036-44, 1987.
20. HORIO, F., OZAKI, K., ODA, H., MAKINO, S., HAYASHI, Y., YOSHIDA, A.: Effect of dietary ascorbic acid, cholesterol and PCB on cholesterol and bile acid metabolism in rat mutant unable to synthesize ascorbic acid. J.Nutr. 119 (3): 409-15, 1989.
21. JACQUES, P.F., HARTZ, S.C., MCGONDY, R.B., JACOB, R.A., RUSSELL, R.M.: Ascorbic acid, HDL, and total plasma cholesterol in the elderly. J. Am. Coll. Nutr. 6 (2): 169-74, 1987.
22. JENKINS, S.A.: Vitamin C status, serum cholesterol levels and bile composition in the pregnant guineapig. Br.J.Nutr. 43 (1): 95-100, 1980.
23. JOHNSON, G.E., and OBENSHAIN, S.S.: nonresponsiveness of serum high-density lipoprotein-cholesterol to high dose ascorbic acid administration in normal men. Am. J.Clin. Nutr. 34 (10): 2088-2091, 1981.

24. KARLSON, P.: Biyokimya Ders kitabı, 265-292. 1. Baskı, Arkadaş Tıp Kitapları Yayınları, İstanbul, 1988.
25. KLEIN, R.L., Rudel, L.L.: Cholesterol absorption and transport in thoracic duct lymph lipoproteins of nonhuman primates. Effect of dietary cholesterol level. Journal of lipid Research, 24: 343-355, 1983.
26. KONO, K., HAYAKAWA, M., ASAI, K., KUZUYA, F.: Risk factors of atherogenicity in inherently scorbutic rats (ODS rats). J. Nutr. Sci. Vitaminol. 33 (1): 1-10, 1987.
27. KONO, K., HAYAKOWA, M., ASAI, K., KUZUYA, F.: Cholesterol metabolism in inherently scorbutic rats (ODS rats). J.Nutr. Sci. Vitaminol. 34 (1): 35-45, 1988.
28. KOTHARI, L.K., PRAMOD, J., SHARMA, P., CHATURVEDI, S.K.: Influence of age and vitamin C status on serum cholesterol. Int. J. Epidemiol. 17 (4): 929-930, 1988.
29. LEHNINGER, A.L.: Biochemistry, Ed. 2. New York, Worth, 1975.
30. LEVINE, M.: New concepts in the biology and biochemistry of ascorbic acid. The New England Journal of medicine. 3: 892-902, 1986.
31. MARTIN, D.W.: Harper'in Biyokimya'ya bakışı. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları, 1986.
32. MATHEWS, C.K. and VAN HOLDE, K.E.: Biochemistry. The Benjomin/Cummings publishing company. Inc. 1990.
33. MAYET, F.H.G., SEWDARSEN, M., REINACH, S.G.: Ascorbic acid and cholesterol levels in patients with diabetes mellitus and coronary artery disease. S.Afr.Med.J.70:661-664, 1986.

34. MENEVŞE, A., MENEVŞE, S.: Temel Biyokimya A.İ.T.İ.A.Gazetecilik ve Halkla İlişkiler Yüksek Okulu Basımevi, Ankara, 1982.
35. MYANT, N.B.: Metabolism of lipids and its defects. Prog. roy. Soc. Med. 64: 893-899, 1971.
36. MYANT, N.B.: Cholesterol transport through the plasma. Clinical Science, 62: 261-271, 1982.
37. NEEL, D., BEAUDRY, P., ERLICH, D., TURPIN, E., GAUSSAULT, Y., DREUX, C.: The cholesterol content of HDL₂ and HDL₃ subfractions of high density lipoproteins in different normocholesterolemic populations. Clinical Chimica Acta, 142: 319-324, 1984.
38. NOYAN, A.: Fizyoloji Ders Kitabı, Meteksan Limited Şirketi. 5. Baskı, 940-956, 1988.
39. NUNGESTER, W.J., and AMES, A.M.: The relationship between ascorbic acid and phagocytic activity. J. Infect. dis. 83: 50-59, 1948.
40. ODUMOSU, A., and WILSON, C.W.M.: Hypocholesterolemic effects of vitamin C, clofibrate and diosgenin in male guinea-pigs. Br. J. Pharmacol. 67 (3): 456P-457P, 1979.
41. PETERSON, V.E., CRAPO, P.A., WEININGER, J., GINSBERG, H., and OLEFSKY, J.: Quantification of plasma cholesterol and triglyceride levels in hypercholesterolemic subjects receiving ascorbic acid supplements. Am. J. Clin. Nutr. 28: 584-587, 1975.
42. ROSE, R.C.: Transport of ascorbic acid and other water-soluble vitamins. Biochim. Biophys. Acta, 9 (947-2): 335-66, 1988.

43. ROSE, R.C., CHOI, J. and KOCH, M.J.: Intestinal transport and metabolism of oxidized ascorbic acid. (Dehydroascorbic acid). Am. J. Physiol. 17: 824-828, 1988.
44. SATINDER, A.K., SARKAR, S., MAJUMDAR, and CHAKRAVARTI, R.N.: Effect of ascorbic acid deficiency on the development of experimental atherosclerosis. Indian J. Med. Res. 86: 351-360, 1987.
45. SHARMA, P., PRAMOD, J., SHARMA, P.K., CHATURVEDI, S.K., KOTHARI, L.K.: Effect of vitamin C administration on serum and aortic lipid profile in guineapigs. Indian J. Med. Res. 87: 283-289, 1988.
46. SHELDON, R., PINNELL, M.D.: Regulation of collagen biosynthesis by ascorbic acid. The yale Journal of biology and medicine. 58: 553-559, 1985.
47. SMITH, E.L., HILL, R.L., LEHMAN, I.R., LEFKOWITZ, R.J., HANDLER, P., WHITE, A.: Principles of biochemistry (Mammalian Biochemistry), 1983.
48. SUTTON, J.L., BASU, T.K., DICKERSON, J.W.T.: Effect of large doses of ascorbic acid on the mixed function oxidase system in guinea pig liver. Biochemical Pharmacology. 31 (8): 1591-1594, 1982.
49. TIETZ, N.W.: Textbook of clinical chemistry, 829-872, 1986.
50. TORTORA, G.J., ANOGNOSTAKOS, N.P.: Principles of Anatomy and physiology. fifth edition. New York, 1987.
51. WARNICK, G.R., ALBERS, J.J.: Journal of lipid research. 19: 65-76, 1978.

52. YALÇIN, A.: İskemik kalp hastalıklarında yüksek dansiteli lipoprotein kolesterolün değeri. Gata. bülteni, 23:375-383, 1981.
53. ZAK, B., EPSTEIN, E. and BAGINSKI, E.J.: Lipids and lipoproteins in Grandwhol's clinical laboratory methods and diagnosis. 1: 272-304, 1980.
54. ZANNONI, V.G.: Ascorbic acid and microsomal drug metabolism. Acta vitamin enzymol. 31: 17-29, 1977.