

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FARKLI YAĞLARLA BESLENEN
RATLARDAN ELDE EDİLEN TORASİK
LENF ŞİLOMİKRONLARININ
HİDROFOBİK ÖZELLİKLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

**Kürşat KAYA
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Tayfun GÜLDÜR**

MALATYA – 2012

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FARKLI YAĞLARLA BESLENEN
RATLARDAN ELDE EDİLEN TORASİK
LENF ŞİLOMİKRONLARININ
HİDROFOBİK ÖZELLİKLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

Kürşat KAYA

Danışman Öğretim Üyesi : Prof. Dr. Tayfun GÜLDÜR

Bu araştırma, İnönü Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2008/72 proje numarası ile desteklenmiştir.

MALATYA – 2012

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyokimya Programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. İsmail TEMEL
İnönü Üniversitesi

Danışman: Prof. Dr. Tayfun GÜLDÜR
İnönü Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Saim YOLOĞLU
İnönü Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Sevtap BAKIR
Cumhuriyet Üniversitesi

Üye: Yrd. Doç. Dr. Ahmet ÇİĞLİ
İnönü Üniversitesi

İmza

ONAY :

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu/...../ 2012 tarih ve 2012 /..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilgi ve deneyimleriyle desteğini esirgemeyen, bilimsel özelliklerinin yanı sıra etik ve insani değerleriyle de örnek aldığım, kendisiyle çalışmaktan onur ve büyük mutluluk duyduğum saygıdeğer hocam Prof. Dr. Tayfun GÜLDÜR’e sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım başta Prof. Dr. İsmail TEMEL olmak üzere tüm Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine, araştırma görevlilerine ve tüm biyokimya personeline teşekkür ederim.

İstatistiksel değerlendirmeyi yapan ve her konuda yardımlarını esirgemeyen Biyoistatistik ve Tıp Bilişimi Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Saim YOLOĞLU’na, tez çalışmamı maddi olarak destekleyen Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi’ne ve yağ asidi analizlerini yapan Mersin İl Kontrol Laboratuvarı personeli Mustafa ŞİMŞEK’e teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmalarım boyunca desteğini esirgemeyen sevgili eşime, çalışmalarım nedeniyle kendilerine yeterince zaman ayıramadığım kızlarım Elif ve Zeynep Sare’ye sevgilerimle teşekkür ederim.

ÖZET

Şilomikronlar besinsel lipitlerden enterositlerde sentez edilirler ve torasik kanal yoluyla dolaşıma nakledilirler. Bir şilomikronun yapısı amfipatik lipitler ve apolipoproteinler ile çevrili bir hidrofobik lipit merkezden meydana gelir.

Ateroslerezun bir nedeni olarak bilinen lipoprotein agregasyonuna lipoproteinlerin hidrofobik doğası sebep olur. Bundan hareketle LDL yaygın olarak çalışılmış ancak şilomikronlar çalışılmamıştır. Son zamanlardaki kanıtlar şilomikronların lipoprotein lipaz ile etkileşimi sonucunda oluşan şilomikron remnantların aterosklerozu desteklemektedir. Bir lipoprotein lipaz ile etkileşimi sonucunda oluşan şilomikronun biyofiziksel özelliklerinin en önemli belirleyicisi olduğundan, ratlardan torasik lenf kanülasyonu ile elde edilmiş ve 5×10^5 g min, 20 °C’de ultrasantrifügasyon ile izole edilmiş ayçiçeği yağı, zeytinyağı, balık yağı, margarin, tereyağı ve palm yağı şilomikronlarının hidrofobik özellikleri, vorteksleme ile oluşan agregasyon ve hidrofobik interaksiyon kromatografisi (HIC) kullanılarak karşılaştırıldı.

LDL’in aksine şilomikronlarda vorteksleme neticesinde agregasyon oluşmadı. Ayçiçeği yağı ve tereyağı şilomikronları hidrofobik kromatografi ortamı ile en güçlü etkileşimi gösterdi, bununla birlikte balık yağı şilomikronları zayıf bir etkileşim gösterdi.

Balık yağı ya da tereyağı şilomikronlarının vortekslenmesi, diğer yağ şilomikronları ile karşılaştırıldığında, çok daha belirgin bir absorpsiyon azalmasına neden oldu, bu durum bu şilomikronların misel stabilitesinin daha az olduğunu göstermektedir.

Ayçiçeği yağı şilomikronlarının yüzey hidrofobikliği, diğer yağ şilomikronları ile karşılaştırıldığında, belirgin bir şekilde yüksek bulundu. Şilomikronların doymuş / doymamış yağ asitleri oranı, lipoprotein yüzey hidrofobikliğini belirleyen tek faktör olmayabilir.

Balık yağı şilomikronları daha az hidrofobikliğe ve düşük misel stabilitesine sahipti. Balık yağının kalp damar sağlığı üzerine olan faydalı etkileri göz önüne alındığında, daha az hidrofobiklik ve düşük misel stabilitesi birlikte, ilave bir lipoprotein aterojenite göstergesi sağlayabilir.

Anahtar kelimeler: şilomikron, agregasyon, hidrofobiklik, ateroskleroz, kromatografi.

ABSTRACT**COMPARISON OF HYDROPHOBIC PROPERTIES OF THORACIC
LYMPH CHYLOMICRONS FROM VARIOUS FATS IN RATS**

Chylomicrons are lipoproteins synthesized by the enterocytes from dietary lipids and transferred to circulation via thoracic duct. A chylomicron structure consists of hydrophobic lipid core surrounded by amphipathic lipids and apolipoproteins.

Lipoprotein aggregation is caused by hydrophobic nature of lipoproteins which is known to be a cause of atherosclerosis. From this respect, LDL has been extensively studied but not chylomicrons. Recent lines of evidence provide support for the atherogenicity of chylomicron remnants which results from interaction of chylomicrons with lipoprotein lipase. Since lipid composition of a lipoprotein is a major determinant of its biophysical properties, chylomicrons from sunflower oil, olive oil, fish oil, margarine, butter and palm oil were obtained from rats through thoracic lymph cannulation, isolated by ultracentrifugation for 5×10^5 g min at 20 °C and their hydrophobic properties were compared by vortex induced aggregation and hydrophobic interaction chromatography (HIC).

In contrast to LDL, vortexing did not induce aggregation in chylomicrons. Chylomicrons prepared from sunflower oil and butter exhibited strongest interaction with hydrophobic medium of chromatography, however fish oil chylomicrons showed weaker interaction.

Vortexing of fish oil or butter chylomicrons resulted in more prominent reduction in absorbance compared to chylomicrons from other fats, indicating less micelle stability.

Surface hydrophobicity of sunflower chylomicrons appeared noticeably higher compared to chylomicrons from other fats. Ratio of saturated / unsaturated

fatty acids of chylomicrons might not be the sole factor determining lipoprotein surface hydrophobicity.

Fish oil chylomicrons had less hydrophobicity and low micelle stability. Considering the beneficial effect of fish oil for cardiovascular health, less hydrophobicity together with low micelle stability can provide an additional atherogenicity index for the lipoprotein.

Key words: chylomicrons, aggregation, hydrophobicity, atherosclerosis, chromatography.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa no
ONAY SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
TABLolar DİZİNİ.....	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Lipitlerin Plazmada Taşınması ve Lipoproteinler.....	3
2.2. ŞM'un Tanımı ve Yapısı.....	7
2.2.1. ŞM'ların Kimyasal Kompozisyonu.....	7
2.3. ŞM Sentezi.....	9
2.3.1. Yağların Sindirimi.....	9
2.3.2. Lipit Hidroliz Ürünlerinin Enterosit Tarafından Alınması ve Kompleks Lipitlerin Tekrar Sentez Edilmesi.....	10
2.3.3. Preşilomikron Sentezi.....	12
2.3.3.1. Sentezin Başlaması.....	14
2.3.3.2. Preşilomikron Partikülünün Lipidasyonu.....	16
2.3.4. Preşilomikronun cis-Golgi'ye İletilmesi.....	16
2.3.5. ŞM Sentezi ve Fonksiyonu İçin Önemi Olan Proteinler.....	18
2.4. ŞM'ların Dolaşımdan Uzaklaştırılması.....	21
2.4.1. ŞM'un Dolaşımında Uğradığı Değişiklikler ve Lipoprotein Lipaz Aktivitesi.....	21
2.4.2. ŞMR'ların Karaciğer Tarafından Alınması.....	24
2.4.2.1. ŞM'ların Karaciğer Tarafından Alınımında Aracılık Ettiği Düşünülen Başlıca Reseptörler ve Proteinler.....	25
2.4.3. ŞM'ların Dolaşımdan Uzaklaştırılmasını Etkileyen Faktörler.....	29
2.5. Şilomikron Metabolizması İle İlgili Dislipoproteinemiler.....	32

2.5.1. Abetalipoproteinemi.....	32
2.5.2. Anderson Hastalığı (ŞM Tutulma Hastalığı).....	33
2.5.3. Tip I Hiperlipidemi (Ailesel Lipoprotein lipaz Yetersizliği).....	33
2.5.4. Tip III Hiperlipidemi (Ailesel Disbetalipoproteinemi).....	34
2.5.5. Şilomikronemi Sendromu.....	34
2.6. Ateroskleroz ve Şilomikron-Şilomikron Remnantların Aterosklerotik Tabiatı.....	34
2.7. Besinsel Yağlar ve Yağ Asidi Kompozisyonları.....	39
2.7.1. Ayçiçek Yağı.....	43
2.7.2. Zeytinyağı.....	43
2.7.3. Palm Yağı.....	45
2.7.4. Tereyağı.....	46
2.7.5. Hidrojenize Nebati Yağ.....	47
2.7.6. Balık yağı.....	48
2.8. Besinlerdeki Yağ Asidi Kompozisyonunun ŞM Metabolizması Üzerine Etkisi.....	50
2.9. Besinlerdeki Yağ Asidi Kompozisyonunun Şilomikronların Fiziksel Özellikleri Üzerine Etkisi.....	54
2.10. Misel Yapı ve Lipoprotein Hidrofobikliği.....	55
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	57
3.1. GEREÇLER.....	57
3.1.1. Kimyasallar:.....	57
3.1.2. Diğer Gereçler:.....	59
3.1.3. Makine Teçhizat:.....	59
3.1.4. Deney Hayvanlarının Temini ve Bakımı.....	59
3.2. YÖNTEMLER.....	60
3.2.1. Deney Gruplarının Oluşturulması.....	60
3.2.2. Yağların Gavaj Yolu ile Verilmesi.....	61
3.2.3. Anestezi.....	61
3.2.4. Torasik Lenf Kanalı Kanülasyonu ve Lenf Sıvısının Toplanması.....	61
3.2.5. ŞM'ların Lenf Sıvısından Ultrasantrifügasyonla Ayrılması.....	63

3.2.6. Hidrofobik İnteraksiyon Kromatografisi (HIC) Prensibi.....	63
3.2.6.1. Kolonun Doldurulması.....	65
3.2.6.2. Kolonun Dengelenmesi ve Numune Enjeksiyonu.....	65
3.2.6.3. Kolonun Yıkanması ve Saklanması.....	66
3.2.6.4. Veri Analizi.....	67
3.2.6.5. Kapasite Faktörlerinin Hesaplanması.....	67
3.2.6.6. Pik Alan Oranlarının Hesaplanması.....	67
3.2.7. Jel Filtrasyon Kromatografisi Prensibi.....	68
3.2.8. Agaroz Jeli Elektroforezi Prensibi.....	69
3.2.8.1. Jelin Hazırlanması ve Dökülmesi.....	71
3.2.9. Vortekslleme ile Agregasyon Testleri.....	72
3.2.10. Biyokimyasal Analizler.....	74
3.2.10.1. Lowry Metodu ile Protein Analizi.....	74
3.2.10.2. Fosfor Analizi.....	76
3.2.10.2. Triaçilgliserol Analizi.....	79
3.2.10.3. Kolesterol Analizi.....	81
3.2.11. Yağ Asidi Analizi.....	83
3.2.12. İstatistik Değerlendirme.....	83
4.BULGULAR	84
4.1. Kromatografi Denemeleri.....	84
4.2. Farklı Yağlardan Elde Edilen ŞM'ların Hidrofobik İnteraksiyon Kromatogramları.....	88
4.3. Kromatogramlardan Hesaplanan k Değerleri ve Fraksiyon Pik Alan Oranları.....	91
4.4. Palm ve Ayçiçek Yağı Şilomikronlarının Jel Filtrasyon Kromatogramları.....	93
4.5. Farklı Yağlardan Elde Edilen ŞM'ların ve Bunların Kromatografik Seperasyonları Sonucu Elde Edilen Fraksiyonların Agaroz Jel Elektroforezleri.....	96
4.6. Farklı Yağlardan Elde Edilen ŞM'ların Turbidite Analizi Sonuçları.....	99

4.6.1. Sıcaklığın Farklı Yağlardan Elde Edilen Şilomikronların Agregasyonları Üzerine Olan Etkisinin Karşılaştırılması.....	100
4.6.2. Tuz, Asit ve Bazın Şilomikron Agregasyonu Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması.....	103
4.6.3. Farklı Sulandırma Oranlarının Şilomikronların Agregasyonlarına Etkilerinin Karşılaştırılması.....	105
4.7. Farklı Yağlardan Elde Edilen ŞM'ların TAG, K, Fosfor ve Protein Analizleri.....	106
4.8. Yağların ve ŞM'larının Yağ Asidi Kompozisyonları Oranları....	107
5.TARTIŞMA.....	110
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	128
KAYNAKLAR.....	129
EKLER	
EK 1: Deney Hayvanları Etik Kurulu Kararı	
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ŞM:	Şilomikron
TAG:	Triaçilgliserol
KE:	Kolesteril ester
K:	Kolesterol
FL:	Fosfolipit
LDL:	Düşük dansiteli lipoprotein
ŞMR:	Şilomikron remnant
ÇDYA:	Çoklu doymamış yağ asidi
VLDL:	Çok düşük dansiteli lipoprotein
IDL:	Orta dansiteli lipoprotein
HDL:	Yüksek dansiteli lipoprotein
MAG:	Monoaçilgliserol
FATP:	Yağ asidi transport protein
FABP:	Yağ asidi bağlayan protein
ER:	Endoplazmik retikulum
MGAT:	Monoaçilgliserol açiltransferaz
DGAT:	Diaçilgliserol açiltransferaz
MTP:	Mikrozomal transport protein
PCTV:	Preşilomikron tranport vezikül
COPII:	Coatomer protein II
SNARE:	Spesifik çözülebilir N-etilmaleimid sensitiv faktör atachment protein reseptör
GPIHBP1:	Glikozil fosfatidil inositol anchored high density lipoprotein binding protein 1
LDLr:	LDL reseptörü
LRP:	LDL reseptör ile bağlantılı protein
LSR:	Lipolysis Stimulated Receptor
HSPG:	Heparan sülfat proteoglikan
CETP:	Kolesterol ester transfer protein

DYA:	Doymuş yağ asidi
TDYA:	Tekli doymamış yağ asidi
NF-κB:	Nuclear factor-κB
COX-2:	Siklooksijenaz-2
TXA ₂ :	Tromboksan A ₂
NO:	Nitrik oksit
TRL:	Triaçilgliserolden zengin lipoprotein
EPA:	Aykozapentaenoik asit
DHA:	Dokazahekzaenoik asit
ICAM-1:	İntrasellüler adhezyon molekülü-1
VCAM-1:	Vasküler hücre adhezyon molekülü
AYC:	Ayçiçeği yağından elde edilen şilomikronlar
ZYC:	Zeytinyağından elde edilen şilomikronlar
PLMC:	Palm yağından elde edilen şilomikronlar
TRYC:	Tereyağından elde edilen şilomikronlar
MRGC:	Margarinden elde edilen şilomikronlar
BLKC:	Balık yağından elde edilen şilomikronlar
HIC:	Hidrofobik interaksiyon kromatografisi
KMK:	Kritik misel konsantrasyonu
BSA:	Bovine serum albumi

ŞEKİLLER DİZİNİ**Sayfa No**

Şekil 1: Plazma lipoproteinlerinin elektroforetik mobilitesi.....	4
Şekil 2: İnsan plazma lipoproteinlerinin sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforetogramı.....	6
Şekil 3: Lipoprotein partikülünün yapısı.....	8
Şekil 4: ŞM partikülünün enterosit içindeki sentez aşamaları.....	13
Şekil 5: ŞM partikülünün enterosit içindeki sentezi ve salgılanması.....	15
Şekil 6: Preşilomikron partikülünün ER'dan golgiye iletimi.....	18
Şekil 7: Endotel hücre yüzeyinde ŞM ile Lipoprotein lipaz'ın GPIHBP1 aracılığı ile birleşmesi.....	23
Şekil 8: Bir yağ asidinin genel formülü.....	40
Şekil 9: Esansiyel yağ asidi metabolizmasında ω -3 ve ω -6 yağ asitlerinin desaturasyon ve elongasyonu.....	42
Şekil 10: Temel yağ asitlerinin (ω -3, ω -6 ve ω -9) vücuttaki desaturasyon ve elongasyon ile dönüşüm metabolizmaları.....	42
Şekil 11: Torasik lenf kanalı kanülasyonu.....	62
Şekil 12: HIC ortamındaki hidrofobik bir ligant ile hidrofobik bir proteinin etkileşimi.....	65
Şekil 13: Düşük basınçlı kolon kromatografi sisteminde yer alan ekipmanlar.....	66
Şekil 14: Bir kromatogramın terminolojisi.....	68
Şekil 15: Jel Filtrasyon Kromatografi sisteminde büyük ve küçük moleküllerin birbirinden ayrılması.....	69
Şekil 16: Agaroz jel elektroforezi aparatları.....	70
Şekil 17: Protein standart grafiği.....	76
Şekil 18: Fosfor analizi standart grafiği.....	79
Şekil 19: Triasilgliserol analizi standart grafiği.....	80
Şekil 20: Kolesterol analizi standart grafiği.....	82

Şekil 21: Ayçiçek yağı şilomikronlarının mobil faza farklı konsantrasyonlarda Triton X-100 eklenerek yapılan HIC kromatogramları.....	86
Şekil 22: Farklı miktarlardaki zeytinyağı şilomikronlarının HIC'ne uygulanması sonucu elde edilen kromatogramlar.....	87
Şekil 23: Farklı yağlardan elde edilmiş şilomikronların HIC kromatogramları.....	89
Şekil 24: Ayçiçeği yağından elde edilmiş ŞM'ların Triton X-100 jel filtrasyon kromatogramları.....	93
Şekil 25: Ayçiçeği yağından elde edilmiş ŞM'ların fosfat tampon jel filtrasyon kromatogramları.....	94
Şekil 26: Palm yağından elde edilmiş ŞM'ların jel filtrasyon kromatogramları.....	95
Şekil 27: AYC agaroz jel elektrofotogramı.....	96
Şekil 28: ZYC agaroz jel elektrofotogramı.....	97
Şekil 29: BLKC agaroz jel elektrofotogramı.....	97
Şekil 30: MRGC agaroz jel elektrofotogramı.....	98
Şekil 31: PLMC agaroz jel elektrofotogramı.....	98
Şekil 32: TRYC agaroz jel elektrofotogramı.....	99
Şekil 33: ŞM'ların 14 dk vortekslenmesi ile oluşan absorbens değişimi.....	100
Şekil 34: ŞM'ların +4C° de 24 saat bekletildikten sonra 4 dk vortekslenmesi ile oluşan absorbens değişimi.....	101
Şekil 35: ŞM'ların -5 °C' de 24 saat bekletildikten sonra 4 dk vortekslenmesi ile oluşan absorbens değişimi.....	102

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa no

Tablo 1: İnsan Plazma Lipoproteinlerinin Kompozisyonu.....	5
Tablo 2: Kullanılan kimyasallar ve firmaları.....	58
Tablo 3: Ratların yem kompozisyonu.....	60
Tablo 4: Lowry metodu deney protokolü.....	75
Tablo 5: Fosfor analizi deney protokolü.....	78
Tablo 6: Farklı yağlardan elde edilen ŞM'ların HIC kromatogramlarından hesaplanan k değerleri.....	91
Tablo 7: Farklı yağlardan elde edilen ŞM'ların HIC kromatogramlarından hesaplanan pik alan oranları.....	92
Tablo 8: Deney Gruplarından Elde Edilen ŞM'ların 14 dk vortekslendikten Sonraki Abs / 0.dk Abs. Oranları.....	100
Tablo 9: +4C° de 24 saat bekletilen ŞM'ların 4 dk vortekslendikten Sonraki Abs / 0.dk Abs. Oranları.....	101
Tablo 10: ŞM'ların -5 °C' de 24 saat bekletildikten sonra 4 dk vortekslendikten Sonraki Abs / 0.dk Abs. Oranları.....	102
Tablo 11: ŞM'ların Su, Asit, Baz ve Tuz Ortamda Yapılan Turbidite Analizi Neticesinde Oluşan Abs. Değişim Oranları.....	104
Tablo 12: ŞM'ların kendi arasında asit, baz ve tuz ortamda yapılan turbidite analizlerinde oluşan abs. değişim oranları.....	105
Tablo 13: ŞM'ların farklı sulandırma oranlarının vorteksleme ile meydana gelen absorbans değişim oranları.....	105
Tablo 14: Farklı yağlardan elde edilen ŞM'ların TAG (µg/mL)/FL (µg/mL) oranları.....	106
Tablo 15: Farklı yağlardan elde edilen ŞM'ların TAG (µg/mL)/Protein (µg/mL) oranları.....	106
Tablo 16: Farklı yağlardan elde edilen ŞM'ların doymuş yağ asidi / doymamış yağ asidi oranları.....	107
Tablo 17: Farklı yağlardan elde edilen ŞM'ların tekli doymamış / çoklu doymamış yağ asidi oranları.....	107

Tablo 18: Kullanılan yağların ve bu yağlardan elde edilen şilomikronların yağ asidi kompozisyonları (%).....	108
---	-----

1. GİRİŞ

Şilomikronlar (ŞM) ince bağırsak enterosit hücrelerinde sentez edilen ve besinsel yağları bağırsaklardan lenfe taşıyan lipoproteinlerdir. ŞM'un merkezinde triaçilgliserol (TAG) ve kolesterol esterlerinin (KE) oluşturduğu bir çekirdek bulunur. Çekirdeğin etrafında kolesterol (K), fosfolipit (FL) ve proteinden oluşan yüzey tabaka yer alır (1).

ŞM'un büyüklüğü ve kompozisyonu, besinsel olarak alınan yağların yağ asidi içeriğinden etkilenir (2, 3) . ŞM gibi TAG'den zengin lipoproteinlerin yağ asidi kompozisyonu, bu lipoproteinlerin metabolizmalarını etkileyen ve onların aterojenitelerini belirleyen önemli bir faktördür (4). Ateroskleroz, endotel fonksiyonunun bozulmasıyla başlayan (5) ve lipit yüklü makrofajların arteriyal dokuları istila etmesiyle (6) devam eden kompleks bir süreçtir.

Her ne kadar ateroskleroz büyük oranda düşük dansiteli lipoprotein (LDL) ile ilişkilendirilmişse de son yıllarda ŞM'ların da güçlü şekilde aterojenik olduğu ortaya koyulmuştur. Özellikle ŞM'ların dolaşımında lipoprotein lipaz ile etkileştikten sonra TAG içeriğini büyük oranda kaybetmesiyle oluşan şilomikron remnant (ŞMR) yapısının (7), LDL kadar gibi arter duvarına girdiği ve subendotelyal boşlukta tutunduğu gösterilmiştir (8). ŞM'lar, LDL gibi oksidasyona gerek duymadan makrofajlar tarafından alınabilir ve makrofajlarda aşırı lipit birikimine neden olarak köpük hücre oluşumunu uyarabilirler (5). Bununla birlikte besinsel yağ kompozisyonundaki değişimler, ŞM ve ŞMR'ların metabolizmalarını ve dolayısıyla da aterosklerotik özelliklerini etkilemektedir. Örneğin linolek asit daha büyük ŞM'lar sentez edilmesine neden olurken (9), tereyağı ile beslenilmesi daha küçük ŞM'ların sentez edilmesine neden olmaktadır (2). Ayrıca ω -6 çoklu doymamış yağ asitlerinden (ÇDYA) zengin ŞM'ların lipoprotein lipaz tarafından çok daha hızlı hidrolize edildiği gösterilmiştir (4).

Besinsel yağların içerdikleri minör bileşenlerin, aterosklerozun önlenmesi ve düzenlenmesiyle ilgili faydalı etkileri ortaya çıkmaktadır. Zeytinyağında bulunan tokoferoller, steroller ve terpenik bileşenlerin antioksidan ve antienflamatuar özellikleri (4) ve skualen ve eritrodiolün proinflamatuar ve protrombotik maddelerin salınımını azalttığını rapor edilmiştir (10). Diğer birçok yağdan daha fazla oranda palm yağında bulunan tokotrienollerin, K biyosentezini ve trombosit agregasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (11).

Lipoproteinlerin hidrofobik doğasının bir özelliği olan partikül agregasyonu, aterosklerozun altında yatan en önemli sebeplerden biri olarak gösterilmektedir (12). Subendotelyal boşluktaki lipoproteinlerin hücre dışı agregasyonunun, insan arter intimasında aterosklerotik plak oluşumunu başlattığı düşünülmektedir (13). Subendotele tutunmuş lipoproteinler sıklıkla agregedir ve agregate bir LDL güçlü bir şekilde makrofaj köpük hücre formasyonunu indükler (14). Kısa bir vortekslemenin etkisi ile LDL'lerin kolaylıkla agregasyona uğradığı ve agregate LDL'lerin doğal LDL'lere göre makrofajlar tarafından çok daha hızlı alınarak KE'den zengin köpük hücrelerine dönüştüğü gösterilmiştir (15, 16).

ŞM'larının hidrofobik özelliği sadece bir çalışmada, mısır yağı ŞM'larında araştırılmış (12), onun haricinde farklı yağlar verilerek elde edilmiş ŞM'ların hidrofobik özellikleri karşılaştırılmamıştır.

Bu nedenle çalışmamızda, yağ asidi kompozisyonları, doymuşluk-doymamışlık oranları ve minör bileşenleri farklı; zeytinyağı, ayçiçeği yağı, tereyağı, palm yağı, margarin yağı ve balık yağı yedirilen ratlardan elde edilen torasik lenf ŞM'larının hidrofobik özelliklerinin, hidrofobik interaksiyon kromatografisi kullanılarak ve vorteksle turbidite analizleri yapılarak araştırılması ve karşılaştırılması amaçlanmıştır. Böylece besinsel yağların ŞM'ların yüzey hidrofobikliklerini nasıl etkilediği direk bir yaklaşımla tespit edilebilecek ve proaterojenik olan ŞMR'ların aterojenitesine besinsel yağların etkisi değerlendirilebilecektir. Ayrıca besinsel yağların lipoproteinlerin yüzey özelliklerine etkilerinin araştırılmasında plazma lipoproteinlerine kıyasla daha iyi bir model oluşturulacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Lipitlerin Plazmada Taşınması ve Lipoproteinler

Plazma lipoproteinleri TAG, K ve FL gibi kompleks lipitleri ve apolipoproteinler olarak adlandırılan bir veya daha fazla proteini temsil eden su ile karışabilir pseudomiseller partiküllerdir (17). Besinlerle birlikte alınan, karaciğer tarafından sentez edilen ve vücut yağ dokusundaki lipitlerin, kullanılmak veya depolanmak amacı ile farklı doku ve organlara taşınması gerekir. Suda çözünmeyen bu lipitlerin sulu bir ortam olan kan plazmasında taşınabilmesi için nonpolar lipitler olan TAG ve KE ile amfipatik lipitler olan FL ve K, proteinlerle birleşerek su ile karışabilir “lipoprotein” yapısını oluştururlar. Lipoproteinler içinde paketlenen apolar lipitler bu şekilde plazmada rahatlıkla taşınabilirler (18).

Lipoproteinler dansitelerine göre, ultrasantrifügasyonla; ŞM, VLDL (çok düşük dansiteli lipoprotein, very light density lipoprotein), IDL (orta dansiteli lipoprotein, intermediate density lipoprotein), LDL (düşük dansiteli lipoprotein, light density lipoprotein) ve HDL (yüksek dansiteli lipoprotein, high density lipoprotein) olmak üzere beş büyük lipoprotein grubu tanımlanmıştır (17, 18).

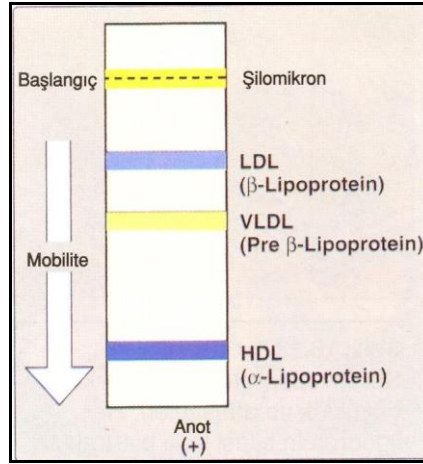
Lipoproteinlerin ayrıca elektroforetik hareket özelliklerine, analitik ultrasantrifügasyonlarına ve membran filtrasyon ve nefelometrik davranışlarına göre farklı sınıflandırmaları yapılmıştır.

Lipoproteinler elektriksel bir ortamda göç ettikleri globulin fraksiyonuna göre adlandırılmışlardır. Başlangıç noktasından anoda doğru sıralandığında lipoproteinler; başlangıç noktasında (orjin) kalan ŞM, β -lipoprotein (LDL), pre β -lipoprotein (VLDL) ve α -lipoprotein (HDL) olarak tanımlanırlar (şekil 1) (18, 1).

Analitik ultrasantrifügasyonda; LDL’ler Sf^* 0-20 lipoproteinler, VLDL’ler Sf 20-200 ve ŞM’lar $Sf > 400$ olarak tanımlanan lipoproteinler, membran filtrasyon ve

nefelometrik olarak; LDL'ler küçük partiküller (S), VLDL'ler orta partiküller (M) ve ŞM'lar büyük partiküller (L) tanımlanırlar (19).

* Sf; Lipoproteinlerin dansitesi 1,063 g/mL olan sodyum klorit solüsyonu içindeki flotasyon hızının Svedberg üniteleri ile ifadesidir(19). Lipoprotein fraksiyonlarını ifade etmek için en eski literatürlerden itibaren kullanılan Svedberg üniteleri farklı dansitelerdeki lipoprotein partiküllerinin flotasyon hızını ölçer (20).



Şekil 1: Plazma lipoproteinlerinin elektroforetik mobilitesi (21).

ŞM, en büyük lipoproteindir. Çapı 100 nm'den büyüktür. Bağırsaklarda sentez edilir ve besinsel TAG ve K'ü bağırsaklardan vücudun diğer hücrelerine taşır. VLDL, 30-90 nm çapındaki VLDL partiküllerinin dansitesi 1,006 g/mL'dir. Karaciğerden sentez edilir, TAG ve K'ü karaciğerden diğer dokulara taşır. IDL, plazmada TAG'lerinin hidrolize uğramasıyla birlikte VLDL dansitesi 1,006-1,019 olan IDL'ye dönüşür. LDL, IDL hidroliziyle birlikte oluşur. Dansitesi 1,019-1,063 arasında olan LDL, VLDL katabolizmasının son ürünüdür. 20 nm büyüklüğündeki LDL, plazmadaki başlıca K taşıyıcı lipoproteindir. HDL, karaciğer ve bağırsaklarda sentez edilen HDL 8-12 nm çapı ile en küçük lipoproteindir. Dansitesi 1,063-1,21 g/mL'dir. K'ü perifer dokulardan karaciğere taşır (17).

Lipoproteinlerin protein kısımları "apolipoprotein" veya "apoprotein" olarak bilinir. Apolipoproteinler, lipoprotein metabolizmasını düzenlerler. Her bir apolipoprotein için spesifik önemli fonksiyonlar tanımlanmıştır. Apolipoproteinler lipoproteinler ile karaciğer ve diğer dokulardaki reseptörler vasıtasıyla etkileşime

aracılık ederler, lipit metabolizmasındaki enzimler için ko-faktör olarak görev yaparlar, lipoproteinlerin yapısal stabilitesini sağlarlar. Başlıca insan plazma lipoproteinleri tablo 1 ve şekil 2’de gösterilmiştir.

Tablo 1: İnsan Plazma Lipoproteinlerinin Kompozisyonu (18).

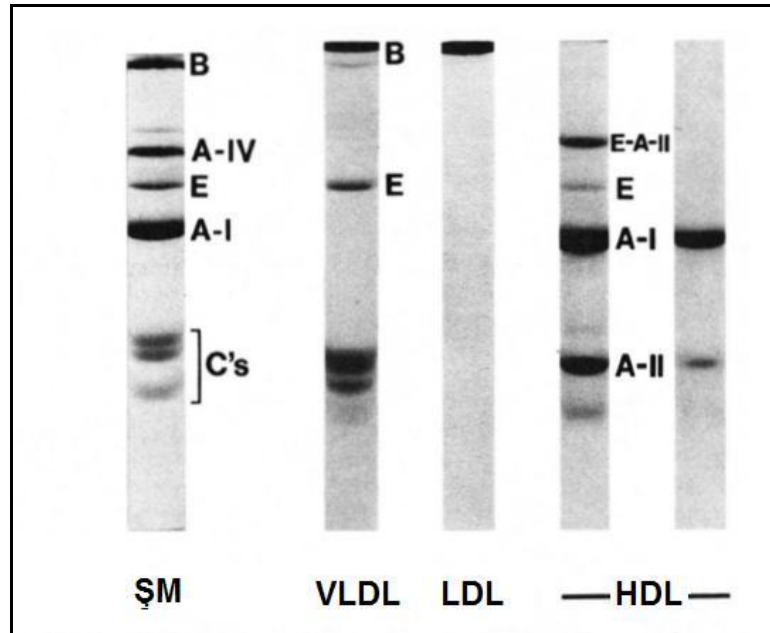
Lipoprotein	Kaynağı	Çapı (nm)	Dansitesi (g/mL)	Protein İçeriği (%)	Lipit İçeriği (%)	Başlıca Lipit Bileşeni	Apolipoproteinleri
Şilomikronlar	Bağırsak	90-1000	< 0,95	1-2	98-99	TAG	A-I, A-II, A-IV, B-48, C-I, C-II, C-III, E
Şilomikron Remnantlar	Şilomikronlar	45-150	< 1,006	6-8	92-94	TAG, FL, K	B-48, E
VLDL	Karaciğer (bağırsak)	30-90	0,95-1,006	7-10	90-93	TAG	B-100, C-I, C-II, C-III
IDL	VLDL	25-35	1,006-1,019	11	89	TAG, K	B-100, E
LDL	VLDL	20-25	1,019-1,063	21	79	K	B-100
HDL	Karaciğer, bağırsak, VLDL, ŞM					FL, K	A-I, A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III, D, E
HDL₁		20-25	1,019-1,063	32	68		
HDL₂		10-20	1,063-1,125	33	67		
HDL₃		5-10	1,125-1,210	57	43		
Preß-HDL		< 5	> 1,210				
Albumin/serbest yağ asitleri	Yağ Dokusu		> 1,281	99	1	Serbest Yağ Asitleri	

ApoE; ŞM, ŞMR, VLDL ve HDL’de bulunur. İzoelektrik özelliğine göre 6 fenotipi vardır. LDL reseptörü (LDLr) ve LDL receptor related protein (LRP) için ligant olarak fonksiyon göstermektedir.

Apo B; ŞM, VLDL, IDL ve LDL’de bulunur. Apo B-100 ve apo B-48 olmak üzere iki formu vardır. B-100 karaciğerde sentez edilir ve VLDL, IDL ve LDL’de bulunur. B-48 bağırsaklarda sentez edilir ve ŞM ile ŞMR’ta bulunur. Hem apo B-100 hem de apo B-48 lipoprotein yapısının bir parçasıdır. Apo B-100 LDL reseptörleri için ligant olarak fonksiyon göstermektedir.

ApoA-I; aslında HDL'in apolipoproteinidir ancak ŞM'larda da görülmektedir. ŞMR, VLDL, VLDL remnant ve LDL'de çok nadiren bulunur. Bağırsak ve karaciğerde sentez edilir. Lesitin: kolesterol asiltransferaz enzimi için kofaktör olarak ve HDL reseptörleri için ligant olarak fonksiyon göstermektedir. ApoA-II; HDL'in apolipoproteinidir. Karaciğerde sentez edilir. Lipoprotein lipaz enziminin inhibitörü olarak fonksiyon göstermektedir. ApoA-IV; belirgin olarak yeni sentez edilmiş ŞM'larda görülür. Ancak ŞMR, VLDL ve LDL'de önemli ölçüde bulunmaz. HDL'de az miktarda bulunur. Diğer tüm apolipoproteinlerden farklı olarak plazmada serbest olarak dolaşan miktarı lipoprotein ile bağlı miktarından fazladır ve bu iki fraksiyon kolaylıkla birbiriyle yer değiştirebilir. Karaciğer ve bağırsaklarda sentez edilir. Fonksiyonu henüz yeterince tanımlanamamıştır.

C apolipoproteinleri; C-I, C-II ve C-III olmak üzere düşük molekül ağırlıklı üç apolipoprotein türü içerir. ŞM, VLDL ve HDL'in yüzey bileşeni olarak gösterilmiştir. C-II lipoprotein lipaz için kofaktör olarak fonksiyon gösterirken, C-III lipoprotein lipaz için ve C-I kolesterol ester transfer protein için inhibitör olarak fonksiyon göstermektedir (17, 18).



Şekil 2: İnsan plazma lipoproteinlerinin sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforetogramı (17).

2.2. ŞM'un Tanımı ve Yapısı

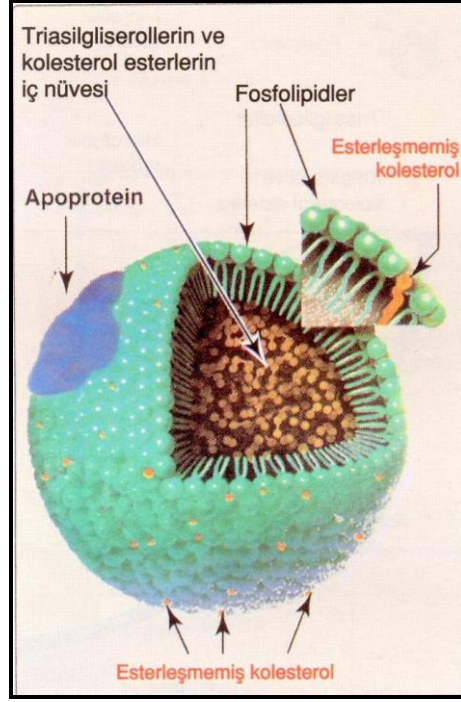
ŞM'lar Sf değeri 400'den büyük, gastrointestinal sistemde sentez edilen, görevi besinsel kaynaklı eksojen gliserolleri bağırsaklardan lenfe taşımak olan lipoproteinlerdir (1). 'Alimenter partikül' ya da 'şilomikron' terimleri besinsel yağların bağırsaklardan emilmesi sırasında bağırsak hücreleri tarafından yapılan partikülleri ifade etmek için kullanılmaktadır. Önceleri kan ve lenfteki bütün yağ partiküllerini tanımlamak için kullanılan şilomikron tanımı daha sonraları sadece besinsel kaynaklı yağ partiküllerini ifade etmek için kullanılmıştır. Diğer bütün partiküller 'nonalimenter'(besinsel olmayan) olarak isimlendirilir (22).

İlk olarak Gage tarafından 1920'de bağırsak kaynaklı katı yağ damlacıkları olarak tanımlanan ŞM'ların daha sonraları partikül büyüklüğüne göre, elektroforetik hareketliliğe göre, Sf veya dansitesine göre tanımlamaları yapılmıştır. Oniki ve daha fazla karbon (C) taşıyan zincir uzunluğuna sahip yağ asitlerinin besinsel olarak alınması sonrası bağırsak mukoza hücreleri tarafından sentez edilen ŞM'ların yapısı hem ışık hem de elektron mikroskobunda küre olarak görünmektedir (1).

2.2.1. ŞM'ların Kimyasal Kompozisyonu

ŞM'ların Sf değeri 400'den büyüktür. Dansitesi $< 0,95$ g/mL'dir. Molekül ağırlığı $10^3 - 10^4 \times 10^6$ ve büyüklüğü 750-10000 Å'dur. Kuru ağırlık yüzdesi olarak ŞM partikülünün %1-2'si protein, % 80-95'i TAG, % 1-3 serbest K, % 2-4 KE ve % 3-6'sı FL'tir (1, 18).

Lenfte veya kanda ortaya çıkan yağ partikülleri 1962 yılında Dole ve Hamlin tarafından TAG'den oluşan bir merkezi damla, FL, K ve az miktarda yağ asitlerinden oluşan yüzey materyali ve bunun üzerindeki proteinler olarak üç kısım olarak tarif edilmiştir (22). 1971 yılında Levy ve ark. proteinleri üçüncü bir tabaka olarak değil ikinci tabaka ile birlikte ifade etmişlerdir. Yani gliserol ve KE'lerinden oluşmuş bir çekirdeğin etrafında protein, FL ve serbest K'ün oluşturduğu yüzey tabaka yer almaktadır (şekil 3) (1).



Şekil 3: Lipoprotein partikülünün yapısı (21).

1968 yılına kadar ŞM partikül yüzeyinin, plazma membranının bir parçasının ayrılarak oluşturduğu, bir membran tarafından çevrelendiği sanılıyordu. Salpeter ve Zilversmit 1968 yılında köpek torasik lenf ŞM'lerinin yüzeyinin plazma membranıyla bir ilişkisinin olmadığını ve muhtemel hücre içi bileşenlerden oluştuğunu elektron mikroskobu görüntüleriyle ortaya koymuştur (23).

Partikül yüzeyinin % 80'den fazlasını FL'ler kapatmaktadır. Bu fosfolipitler; fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin ve sfingomiyelindir (3). İnsan lenf ŞM FL'lerinin % 77'sinin fosfatidilkolin, % 16'sının fosfatidil etanolamin ve % 7'sinin sfingomyelin olduğu tespit edilmiştir (24). ŞM'un yapısında bu FL'lerden en fazla fosfatidilkolin (lesitin) bulunur. Fosfatidilkolinin yağ asidi kompozisyonu sabittir ve besinlerden gelen yağ asitlerinden etkilenmez. Endojen yağ asidi kaynaklarından sterol esterlerine veya TAG'lere eklendiğinden çok daha fazla yağ asidi fosfatidilkolinin yapısına eklenir. Fosfatidilkolinin yapısına endojen kaynaklardan en fazla palmitik asit en az ise oleik asidin dâhil olduğu gösterilmiştir (25).

ŞM'un proteinleri, ŞM parmak izi teknikleriyle ve aminoasit analiziyle incelendiğinde HDL proteinlerine benzerken, immünolojik reaksiyonlarda LDL proteinlerine benzerlik göstermektedir (1).

2.3. ŞM Sentezi

2.3.1. Yağların Sindirimi

Lipitlerin vücutta işlenmesi, lipidin ağza alınmasıyla başlayan ve sinir sistemi uyarılarını da içeren bir süreçtir (26). Vücudun kullandığı toplam kaloringin % 30 kadarı besinsel yağlardan sağlanır. Besinsel yağların en büyük bileşeni 3 yağ asidinin bir gliserol molekülü ile esterleşmiş olduğu TAG molekülüdür. TAG haricinde besinsel lipitler FL ve K'de içerir. Besinsel kaynakların haricinde karaciğer de endojen olarak safra salgısı ile bağırsak lumenine FL ve K sağlar. Ayrıca bağırsaktaki hızlı enterosit döngüsüne bağılı olarak hücre membranlarından kaynaklanan FL ve K'de luminal lipit havuzuna katılır (27).

İnsanlarda lipid sindirimi midede asit lipaz enzimi aktivasyonu ile başlar. pH 3-6 arasında en yüksek aktivasyonu gösteren bu enzim, kemiricilerde insandan farklı olarak tükürük ile birlikte salgılanır.

Gastrik lipaz aktivitesi özellikle yenidoğanlar ve bebeklerde önemlidir. Çünkü bebeklerde pankreatik lipaz aktivitesi tam olarak gelişmemiştir. Ayrıca yenidoğanların başlıca besin kaynağı olan süt içerisindeki yağlar önemli ölçüde orta zincirli yağ asitlerinden oluşmuş TAG'leri içerir. Gastrik lipaz orta zincirli yağ asitlerinden oluşmuş TAG için, uzun zincirli yağ asitleri içeren TAG'lere oranla daha fazla etkindir.

Yetişkinlerde asit lipaz, monoasilgliserol, diasilgliserol ve yağ asitlerini sağlar. Böylece TAG'lerin emülsifikasyonu sağlanmış olur. Midedeki bu emülsifikasyon pankreatik lipaz aktivitesi için önemlidir. Pankreatik lipaz arta kalan TAG'leri ve monoasilgliseroller ile diasilgliserolleri intestinal lumende hidroliz eder. Pankreatik lipaz yalnızca su-y yağ ara fazında çalışır. Sonuç olarak yağ ne kadar iyi emülsifiye olursa bağırsak lümeninde o kadar iyi hidrolizasyona uğrar.

Pankreatik lipaz TAG'in çoğunlukla 1. ve 3. pozisyonlardaki yağ asitlerini ayırır. Bir adet 2-monoağılglicerol (MAG) ve 2 adet serbest yağ asidi oluşur. 2-MAG izomerizasyon ile 1-MAG'e dönüşebilir. 1 ve 2-MAG pankreatik lipazın tekrar hidroliziyle lümende gliserol ve yağ asidine ayrılır (27).

Hidroliz sonrasında KE'de serbest K ve yağ asitlerine ayrılır. Bu hidroliz ürünleri daha hidrofiliktir. İnce bağırsağın proksimal kısmındaki şartlar (pH 4,5-6,8 ve uygun Na^+ , K^+ , Ca^{+2} konsantrasyonları) altında bu hidroliz ürünleri safra asitleri ve su ile etkileşime girerek miseller oluştururlar. Oldukça büyük miktardaki lipit, bu şekilde çözülebilir hale gelerek ince bağırsaktaki su fazı içinde taşınabilir (28, 29).

Yağ asitleri ve 2-MAG'ün misellerdeki çözünürlüğü, enterosit tarafından alınabilmeleri için kritiktir. Enterositin fırçamsı kenar membranının hemen önünde bulunan, intestinal lumen içindeki sıvı faz ile karışmayan, hareketsiz ince bir su tabakasıyla intestinal lumen içeriğinden ayrıldığı gösterilmiştir. İntestinal lumendeki sıvı faz, bu su tabakası ile zayıf bir şekilde karışır. Sonuç olarak sulu faz içindeki çözülmüş moleküller eğer karışmayan su tabakası içine karışıp geçebilirlerse enterosit tarafından alınabilirler. Yağ asitlerinin ve MAG'ün sudaki düşük çözünürlüğünden dolayı çok az molekül fırçamsı kenar membrana ulaşabilecektir. MAG ve yağ asitlerinin miseldeki çözünürlüklerinin artması enterosit tarafından alınmaya elverişli molekül sayısını büyük ölçüde arttırmaktadır (27).

2.3.2. Lipit Hidroliz Ürünlerinin Enterosit Tarafından Alınması ve Kompleks Lipitlerin Tekrar Sentez Edilmesi

Su fazı içinde taşınan besinsel lipitlerin çoğu, ince barsağın ilk 100 cm'lik bölümündeki proksimal enterositler tarafından emilmektedir. Normal şartlarda sağlıklı insanlarda, ince barsağın distal kısmında çok az lipit emilimi olmaktadır (28). Elektron mikroskobu ile yapılan gözlemlerde, yağ ile beslenilmesinden kısa bir süre sonra 65 nm ve daha küçük yağ damlaları jejunal hücre mikrovilluslarının arasındaki boşlukta görülmüştür (22). Bağırsağın distal kısmında üretilen ŞM'lar proksimal kısmından üretilenler ile karşılaştırıldığında daha yüksek TAG / FL, apolipoprotein / FL oranına ve apoC'ye sahipten, daha az apoA-I'e sahiptir (30).

Hücre kültürü çalışmalarında fazla miktarda yağ asidi emiliminin hücreyi öldürdüğü gösterilmiştir. Bu nedenle enterosit içine aşırı yağ asidi emiliminin bazı mekanizmalarla önlendiği düşünülmektedir (31). Mukoza hücreleri tarafından emilen lipidlerin burada iki fonksiyonel bariyerden geçtiği düşünülmektedir. Bunlardan birincisi doymamış su tabakası (unsaturated water layer) ve ikincisi fırçamsı kenar membranıdır. Lipit sindirim ürünlerinin fırçamsı kenar membrandan geçmesi pasif olarak yüksek konsantrasyondan düşük konsantrasyona geçiş (down-gradient) esasına göre proteinden bağımsız difüzyon modeliyle ya da taşıyıcı proteinlere bağlanarak gerçekleşir. Bunlardan ilkinde flip-flop model de denir ve daha fazla benimsenen modeldir. Diğer protein bağımlı modeldir. Bu modele göre lipit hidroliz ürünlerinin enterosit içine alınmasında muhtemelen bazı proteinler görev almaktadır.

Bu muhtemel proteinler şunlardır:

Yağ asidi transport protein (FATP): Altı farklı proteinden oluşan bir protein ailesidir. Bunlardan FATP 2-4 bağırsaklara mahsustur. Özellikle FATP4'ün yağ asitlerinin enterosit içine alınmasında aracı olduğu ileri sürülmektedir. Bu protein bağırsak lumenindeki yağ asitlerinin % 60'ından fazlasının emiliminden sorumludur.

FAT/CD36: Önceleri CD36 geni bozulmuş farelerde yağ asidi emiliminin normal olduğu rapor edilmiştir, ancak güncel çalışmalar CD36 proteininin yağ asitlerinin enterosit içine alınmasında rol oynadığını desteklemektedir.

FABPpm: Diğer bir yağ asidi transport proteinidir ve enterosit fırçamsı kenar membranı üzerinde lokalize olmuştur.

Yağ asidi bağlayan protein (FABP): Yüksek miktarda karaciğerde (L-FABP) ve enterositlerde (I-FABP) üretilen FABP sitozolik proteinlerin % 5-6'sını oluşturmaktadır. I-FABP'ın yağ asitlerini apikal membrandan alıp endoplazmik retikulum (ER) membranına taşıdığı bununla birlikte L-FABP'ın ise yağ asidi taşınmasında depo görevi üstlendiği sanılmaktadır. L-FABP'ın aynı koşullarda I-FABP ile karşılaştırıldığında üç kat daha fazla yağ asidi bağladığı gösterilmiştir.

Bu proteinlerin haricinde ayrıca ATP bağımlı bir protein pompasının adipositlerde ve muhtemelen enterositlerde yağ asidi alımında önemli rol oynadığını öne süren çalışmalar mevcuttur (29, 32, 31).

Bağırsak içeriğinin düşük linoleate konsantrasyonunda yağ asidi alımının taşıyıcı bağımlı bir süreç ile gerçekleştiği, yüksek linoleate konsantrasyonda ise yağ asitleri alımının ağırlıklı olarak pasif difüzyon ile gerçekleştiği gösterilmiştir (27).

Yağ asitleri ve 2-MAG'nin ER'a taşınmasının mekanizması yeterince açık olmamakla birlikte, enterosit içine giren lipit sindirim ürünlerinin FABP tarafından sitoplazmadan ER'a taşındığı ve sonrasında kompleks lipitlerin tekrar sentez edildiği düşünülmektedir (33, 27). Enterosit içine alınan uzun zincirli yağ asitleri ve 2-MAG'den tekrar TAG sentez edilmelidir. Bu sentez enterosit içindeki mikrozom içinde ve birkaç enzimatik adım ile gerçekleşir. Benzer şekilde KE sentezi ve DAG ve sitidin-difosfat-kolin'den de novo lesitin sentezi de enterosit içinde gerçekleşir (28).

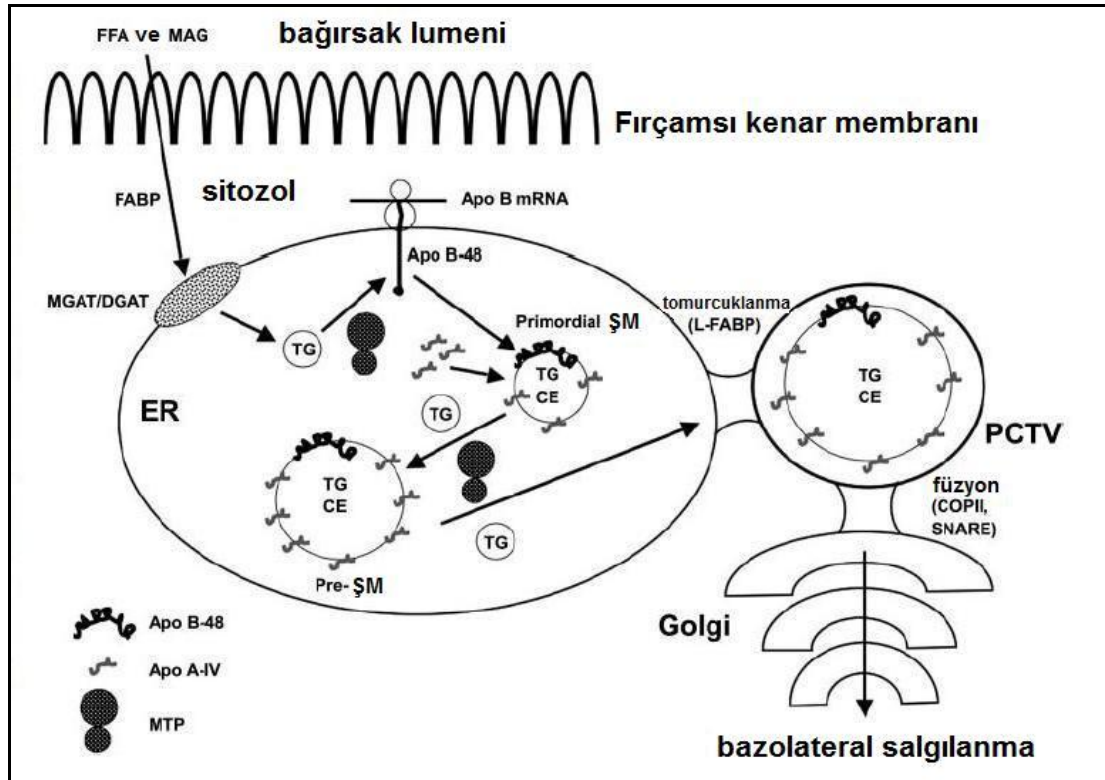
TAG'lerin tekrar sentezi ER membranında muhtemel iki farklı mekanizma ile gerçekleşir. Birincisi, MAG'den TAG sentez edilmesi ve ikincisi gliserol-3-fosfat (G-3-P)'tan TAG sentez edilmesidir. Enterosit içinde TAG sentezinin çoğunlukla birinci mekanizma ile gerçekleştiği düşünülmektedir (32). ER'un sitoplazmik yüzeyinde MAG yolağının enzimleri yer alır ve TAG oluşumu burada gerçekleşir. Oluşan TAG, ER sisternasına geçer.

2-MAG'ün tekrar açılasyonunda, MGAT (açıl Koenzim A: monoaçilgliserol açıltransferaz) ve DGAT (açıl Koenzim A: diaçilgliserolaçıltransferaz) enzimleri görev alır (27). DGAT aktivitesi sadece düz ER'da gösterilmiştir, granüllü ER ve golgide DGAT aktivitesi yoktur. Ayrıca KE sentezini gerçekleştiren ACAT aktiviteside yine % 75 oranında düz ER'da bulunur, ACAT aktivitesi çok az oranda Golgide de gösterilmiştir (34). Cartwright ve ark. tavşan ince bağırsağından izole edilen villus enterositlerinde; yağla beslenilmesinin ardından enterosit içindeki salgılayıcı bölümlerin lumenlerinde 7 kat ve membranlarında 2 kat TAG artışı tespit edilmişlerdir. Bu bölümlerde K, KE ve FL kompozisyonları değişmemiş ancak lumeninde çok az FL artışı gözlenmiştir (34).

2.3.3. Preşilomikron Sentezi

1950'li yıllardan itibaren birçok morfolojik çalışmada yağ emilimi esnasında apikal sitoplazmada lipit damlalarının ortaya çıktığı gösterilmiştir. Bu lipit

damlalarının büyük çoğunluğu düz ER membranıyla sarılıyken golgi kompleksinde daha büyük lipid damlaları gözlenmiştir. Düz ER içerisinde gözlenen bu lipid damlacıkları ‘preşilomikron’ olarak isimlendirilmiştir (şekil 4). Bu damlalar hücre dışına ŞM olarak çıktığında ise etraflarında membran yoktur bunun yerine etraflarında, içerisinde az miktarda serbest K ve protein bulunan stabilize edici monolayer FL tabaka bulunmaktadır (35).



Şekil 4: ŞM partikülünün enterosit içindeki sentez aşamaları (33 nolu kaynaktan Türkçeleştirilmiştir).

FFA: serbest yağ asitleri, MAG: monoasilgliserol, TG: triasilgliserol, MGAT: monoasilgliserol asiltransferaz, DGAT: diaasilgliserolaçiltransferaz, MTP: mikrozomal transpot protein, FABP: yağ asidi bağlayan protein, PCTV: preşilomikron transport vezikül, CE: kolesterol esteri, COPII: coatomer protein II, SNARE: spesifik çözülebilir N-etilmaleimid sensitiv faktör attachment, protein reseptör.

2.3.3.1. Sentezin Başlaması

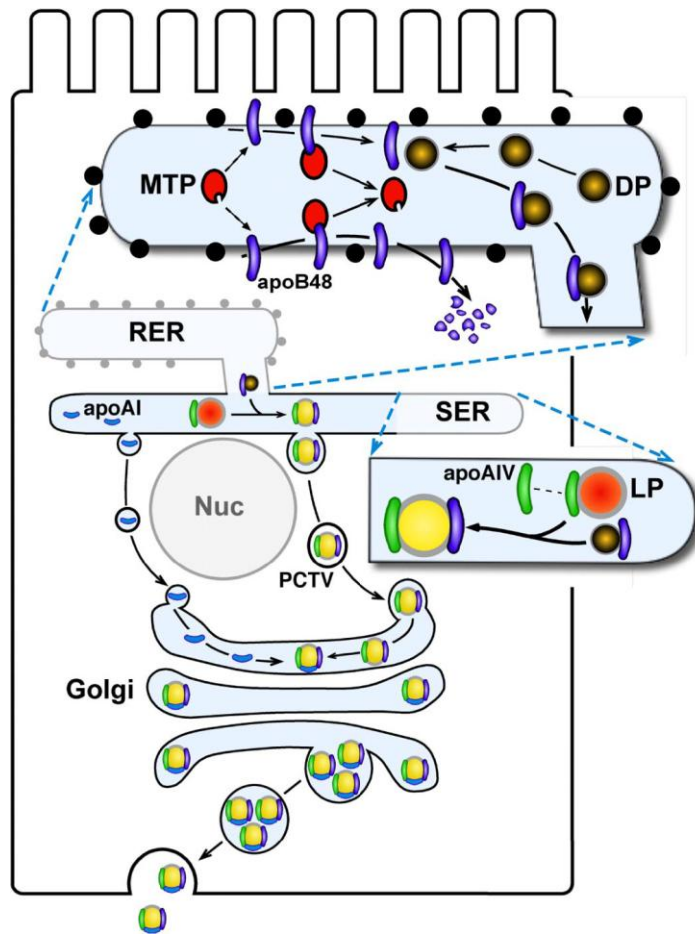
Enterosit içinde besinsel lipitler termodinamik olarak stabil partiküller olan ŞM şeklinde paketlenirler. Partikül merkezinde nötral lipitler olan TAG ve KE'leri, yüzeyinde ise polar lipitler olan FL'ler, serbest K'ler ve ayrıca apolipoproteinler bulunur. Bu yapı, besinsel lipitlerin sulu bir ortam olan kan dolaşımı içinde dokulara ve karaciğere taşınabilmesinin tek yoludur (33). Yağ asitleri apikal membran yoluyla enterosit içine girdiklerinde oluşan TAG'lerin tercihi olarak ŞM içine dâhil oldukları bunun aksine bazolateral membrandan giren yağ asitlerinin oluşturduğu TAG'in ise hücrelerarası TAG havuzuna dâhil oldukları gösterilmiştir. Hücrelerarası TAG havuzundaki TAG'ler dolaşıma, ŞM içerisinde değil muhtemelen yağ asidi olarak portal ven yoluyla verilirler (31).

Granüllü ER membranında apo B-48 proteini sürekli olarak yeterli bir şekilde sentez edilir. Apo B-48 granüllü ER membranındaki integral bileşenlerden sentez edilir. Bir görüşe göre bu ŞM sentezindeki ilk adımdır (şekil 5). Granüllü ER membranında sentez edilen apo B proteininin NH₂ terminal kısmı hidrofobik dizi içermez ve sentez edilmiş olan globüler peptit ER lumenine girer. Apo B molekülünün ER membranını geçişi esnasında ilk hidrofobik dizi yapısına eklenir. Bunlar TAG, FL ve/veya KE'ni az miktarda içeren yoğun partiküldür (DP) (şekil 5). Bu lipitlerin eklenmesiyle birlikte protein-lipit kompleksi arasında karşılıklı solubilizasyon ve stabilizasyon gerçekleşir. Oluşan nisbeten lipitten fakir lipoprotein molekülü ER lumeni içine salınır. Buna 'primordial partikül' ya da 'olgunlaşmamış lipoprotein' denir. Eğer yeterli lipidasyon gerçekleşmemişse yani translokasyon sırasında hidrofobik dizi başlamamışsa apo B polipeptidi daha ER membranına bağlıyken parçalanır (9, 29). Granüllü ER membranında apo B-48'e lipitleri MTP'nin taşıdığı düşünülmektedir. Açlık ve tokluk durumlarında benzer oranlarda Apo B-48 sentez edilmektedir. Tokluk durumunda daha çok lipit transferi gerektiğinden bu durumda postprandial partikül büyüklüğünün arttığı görülür (3). Yeni sentez edilen apo B-48 yine MTP aracılığı ile lumene taşınır (34).

Diğer bir görüşe göre ise ŞM sentezinin ilk adımı apo B-48 oluşumu değil, ER lumeni içinde apo B-48'den bağımsız oluşan primordial partiküldür. Önce ER lumeni içinde primordial partikül oluşmaya başlar ve daha sonra ER membranında

sentez edilen apo B-48 membrandan ayrılarak bu partikül ile birleşir. Daha sonra sentez edilmiş olan, HDL'e benzeyen yüksek dansiteli primordial ŞM düz ER içine gönderilir (32, 33).

Preşilomikron, ŞM'a göre daha fazla protein ve daha az fosfolipit içermektedir. Bununla birlikte TAG ve K miktarları benzerdir. Protein / FL oranı preşilomikronda 1,27 iken ŞM'da 0,10'dur. Preşilomikron ŞM'a göre 10 kat daha fazla protein içerdiği tespit edilmiştir (35).



Şekil 5: ŞM partikülünün enterosit içindeki sentezi ve salgılanması (32).

RER: ribozomal endoplazmik retikulum, SER: düz endoplazmik retikulum,

MTP: mikrozomal transport protein, DP: yoğun partikül,

LP: büyük hafif partikül.

2.3.3.2. Preşilomikron Partikülünün Lipidasyonu

ER lumenine giren olgunlaşmamış lipoprotein ER lumeni içinden olgun bir TAG'den zengin lipoprotein olarak salınabilmesi için esas lipid hacmini sağlaması gerekir. Eğer bu arada tam anlamıyla lipoprotein oluşması gerçekleşmemişse bu kez intraluminal apo B-48 yıkımı gerçekleşir ve apo B-48 proteozom aracılı parçalanmaya uğrar (33, 29).

Primordial partiküle ER lumeni içerisinde lipid eklenmesi muhtemel iki mekanizma ile gerçekleştiği sanılmaktadır. İlki lipid damlacıkları ile füzyon ve diğeri ise lipid transfer proteinleri aracılığıyla gerçekleşebilir (29). Primordial partikül yine ER lümeninde oluşmuş olan ancak yüzeyinde apo B-48 taşımayan büyük bir TAG-kolesterol ester kitlesi ile füzyona uğrayarak birleşir. TAG-zengin partikül içine TAG'leri MTP taşır (32). Lipitten zengin partikül çoğunlukla TAG ve kolesterol esterlerinden oluşur ve protein kompozisyonu tam olarak bilinmemektedir ancak apo B-48 ve apoA-I içermez (31). Elektron mikroskop incelemeleriyle büyük lipid damlalarının düz ER lumeninde Apo B-48 sentezinden bağımsız olarak oluştuğu gösterilmiş ve büyük lipoproteinlerin oluşması için, büyük lipid damlalarının oluşumunun en önemli belirleyici olduğu ileri sürülmüştür (3). Füzyon sonrasında primordial partikül kademeli olarak gerçekleşen kompleks bir salgı yolağı ile cis-Golgi'ye iletilir.

K, ŞM'un yapısal bir bileşeni olduğundan ŞM sentezi için gereklidir. 100 gr besinsel yağın ŞM'lar tarafından sindirim kanalından kan dolaşımına taşınabilmesi için 4,3 gr K'e gereksinim vardır. Bu K'ün yarısı besinlerden diğer yarısı ise endojen kaynaklardan karşılanır (36).

2.3.4. Preşilomikronun cis-Golgi'ye İletilmesi

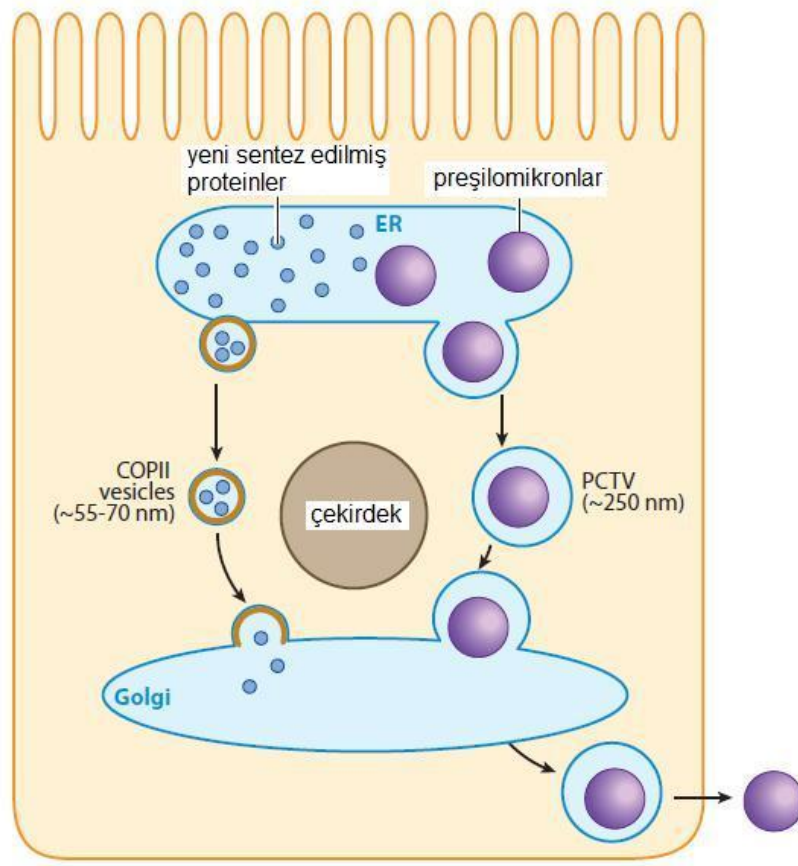
Mikrozomal transfer protein (MTP) tarafından TAG ve KE'leri primordial ŞM'un merkezine taşınmasıyla gerçekleşen lipidasyonla birlikte oluşan partiküle preşilomikron denir. Pre- ŞM cis-Golgi'ye gönderilmeye hazır formdur. ŞM merkezindeki lipidasyon sağlanıp partikülün belli bir büyüklüğe erişmesi ve yüzey stabilizasyonunun sağlanmasıyla birlikte apoA-IV ŞM yüzeyine yerleşir. Oluşan

olgunlaşmamış ŞM, ER'dan preşilomikron transport vezikül (PCTV) denen özel bir vezikül içinde cis-golgiye transfer edilir. PCTV, ER membranından tomurcuklanır. L-FABP bu vezikülü golgiye iletir (33). PCTV sitozole salındıktan sonra cis-Golgi ile birleşir (Şekil 6). Bu birleşmede SNARE(specific soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor) proteini hem belli bir hedefe yönlendirmede hem de birleşmede kolaylaştırıcı olarak fonksiyon gösterir (31, 33). PCTV Golgi ile birleştikten sonra taşıdığı preşilomikron partikülünü Golgi lumenine bırakır (şekil 6). Golgi lumeninde iki transformasyonel olay gerçekleşir. Bunlardan birincisi preşilomikron yapısına apoA-I'in eklenmesi diğeri ise apo B-48 glikolizasyonudur (31).

ER'den protein transport vezikül denilen PCTV'den farklı ayrıca bir vezikül tomurcuklanır (şekil 6). Bu vezikül apoA-I'i Golgiye taşır. Bu vezikül 60-90 nm çapındadır ve tomurcuklanmasında coatomer protein II (COPII)'ye ihtiyaç duyar (32).

Golgi içerisinde ŞM'un TAG eklenerek büyümesi tartışmalı bir konudur. MTP'nin başlıca bulunma yeri ER olmasına ve lipit transfer aktivitesi mikrozomda lokalize olmasına rağmen Golgi içerisinde de bulunur. Bununla birlikte PCTV içerisindeki preşilomikron ile olgun ŞM ortalama olarak benzer büyüklüktedir. Bu nedenle Golgi içerisinde lipit yüklenmesi oluyorsa bile bu çok küçük bir orandadır (31).

ŞM'un Golgi'den çıkışıyla ilgili bilgi çok azdır. Morfolojik bilgiler basolateral membrandan eş zamanlı olarak birkaç farklı noktadan veziküllenmeyle çıkışı desteklemektedir. Bu görüşe göre basolateral membran üzerindeki veziküller ile birleşen ŞM'lar lamina propriyaya ters ekzositos ile salınırlar (31).



Şekil 6: Pre-lipidmikron partikülünün ER'dan golgiye iletimi (31 nolu kaynaktan Türkçeleştirilmiştir).

ER: Endoplazmik retikulum, PCTV: pre-lipidmikron transport vezikül, COPII: Coatomer Protein II vezikülü.

2.3.5. ŞM Sentezi ve Fonksiyonu İçin Önemi Olan Proteinler

a) Apo B-48

Apo B-100 ile benzer genler tarafından kodlanan apo B-48 geni, apo B100 geninin amino terminal yarımıyla uyumluluk gösterir (33). İnsanlarda apo B-100 yalnızca karaciğerde ve apo B-48 yalnızca ince bağırsaklarda salgılanır. Apo B-100'ün mRNA'sının 2153 Gln amino asidini kodlayan CAA kodonu UAA olarak değiştiğinde stop kodonu halini alır ve sentez burada durur. Böylece tüm apo B-100 geninin % 48'lik kısmı (2153 amino asit) kodlanmış olur ve bu şekilde apo B-48

sentez edilmiş olur (27). Kemiricilerde enterosit haricinde hepatositde de ŞM büyüklüğünde ve apo B-48 içeren partiküller salgılandığı ileri sürülmüştür (3). Apo B-48, apo B-100'ün sahip olduğu LDL reseptör bağlanma bölgelerine sahip değildir (32). Apo B-100 550 kDa ağırlığında iken apo B-48 260 kDa ağırlığındadır. Apo B-48, lipoprotein üretiminde yapısal bir element olarak bulunması zorunludur (29). Apo B-48 molekülü ŞM sentezi için esansiyeldir. Ancak apo B-48 proteininin ŞM ve ŞMR metabolizmasında herhangi bir rol oynamadığı ileri sürülmektedir. Ayrıca bağırsaklar açlık durumunda da apo B-48 içeren küçük partiküller salgılamaya devam ederler bu nedenle apo B-48 proteinleri açlık kan plazmasında da tespit edilebilirler (37). Bununla birlikte apo B polipeptidinin uzunluğu ile partikül büyüklüğü arasında korelasyon vardır. Apo B'nin uzunluğunun % 10 artması partikül merkez hacminin % 13 artmasına neden olmaktadır (3).

Rat apo B-48'i 240 kDa molekül ağırlığına sahiptir ve aşırı şekilde hidrofobik bir proteindir (27).

b) Mikrozomal Transport Protein (MTP)

MTP, ilk olarak 1984 yılında Wetterau ve Zilversmit tarafından tanımlanmıştır. Heterodimer yapıdaki MTP iki subüniteden oluşur. Molekül ağırlığı 97 kDa olan büyük subünite lipit transfer aktivitesinden sorumlu olan fonksiyonel kısımdır (38). Karaciğerde ve ince bağırsakta ER membranına lipit transferiyle görevlidir. MTP küçük subünitesi protein disülfid izomeras (PDI)'dir ve 55 kDa ağırlığındadır (32, 33).

MTP'nin iki önemli fonksiyonu vardır; birincisi ince bağırsaklarda ŞM yapımı için gerekliliğinden dolayı yağların emiliminde önemli rol oynaması, ikincisi ise karaciğerde VLDL sentezinde görev almasıdır (38).

97 kDa'luk subünite ER zarında lipoprotein ilk oluşumu sırasında apo B'ye nötral lipitleri taşır. MTP yokluğunda apo B lipoproteinlerinin salgılanmasının durduğu ileri sürülmektedir. Çünkü lipoprotein oluşumunun birinci adımında nötral lipitlerin granüllü ER membranındaki apo B-48'e transfer edilmesi zorunludur (29). Ancak Cartwright ve ark. MTP'nin inhibe edilmesinin apo B-48 ya da TAG sentezini durdurmadığı sadece salgılanmasını engellediğini göstermişlerdir. MTP'nin inhibe

edilmesiyle apo B-48 ve TAG sentezi durmamış ancak apo B-48'in salgılanması % 70-95 ve TAG salgılanması % 50 oranında azalmıştır (34).

c) ApoA-IV

ApoA-IV memeli ince bağırsağında lipit bağlayan bir proteindir. Bağırsak dışında birçok görevi olduğu bildirilmiştir ancak primer rolü lipit emilimidir. ER içinde, olgunlaşmamış ŞM sentezinin gerçekleştiği erken dönemde ŞM ile birleşir. ŞM yüzeyinde basolateral membrana salgılanır. Bundan sonra çoğu apoA-IV, ŞM yüzeyinden ayrılarak dolaşımda lipitsiz protein olarak dolaşmaktadır (33).

ApoA-IV kemiricilerde hem ince bağırsaklar hem de karaciğerden salgılanırken insanlarda sadece ince bağırsaklardan salgılanır. Hem akut hem de kronik yağ tüketimi ince bağırsaklarda apoA-IV sentezini artırır. Yağ tüketimi ile uyarılan apoA-IV sentez ve salgısı ŞM formasyonu ile yakın ilişkilidir. İnce bağırsaklardaki apoA-IV sentezi pluronic L-81 ile ortadan kaldırıldığında ŞM yapımının da engellendiği gözlenmektedir (39).

İntestinal apolipoproteinler olan apo A-I, A-IV ve B-48 arasında sadece apo A-IV'ün sentez ve sekresyonu lipitten zengin besinlerle düzenlenir. Ondört ve üzeri zincir uzunluğuna sahip miristik asit, stearik asit, oleik asit, linoleik asit ve araşidonik asit gibi yağ asitleri apo A-IV'ün lenfatik sekresyonunu artırırken, kısa ve orta zincirli bütirik asit, kaprilik asit ve laurik asit gibi yağ asitlerinin önemli bir artış sağlamadığı gösterilmiştir (40).

d) Preşilomikron Transport Vezikül (PCTV)

PCTV, 250 nm çapındadır ve bu boyut preşilomikron büyüklüğündeki partiküllerin taşınması için uygun bir boyuttur. PCTV sentezi için Sar1 gereklidir. Sar1 yokluğunda PCTV sentezi tamamen durur. COPII proteini PCTV'nin golgi ile birleşmesi için gereklidir. L-FABP PCTV sentezinde kilit bir rol oynar. PCTV formasyonu ATP bağımlıdır (31). Bu vezikül tomurcuklanması için yağ asit bağlayıcı protein (L-FABP) 'e ihtiyaç duymaktadır (32).

e) SNARE (specific soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor)

SNARE hem pre-ŞM'u taşıyan vezikül (PCTV) membranında (v-SNARE) hem de hedef golgi membranında (t-SNARE) bulunur. Vezikül membranında bulunanların merkezinde arjinin (R) kalıntısı bulunduğundan R-SNARE ve hedef membranında bulunanların merkezinde glutamin (Q) kalıntısı bulunduğundan Q-SNARE olarak isimlendirilir. SNARE bir komplekstir ve şu proteinlerden oluşmaktadır; VAMP7, syntaxin5, rbet1 ve vti1a. PCTV-Golgi birleşmesindeki bütün şartları 112 kD ağırlığındaki SNARE kompleks proteinleri sağlar. Bu kompleksin üyelerinden her biri fonksiyonel olarak bloke edildiğinde PCTV-Golgi füzyonunda önemli bir inhibisyon gerçekleşir çünkü bu birleşmede SNARE hem belli bir hedefe yönlendirmede hem de birleşmede kolaylaştırıcı olarak fonksiyon göstermektedir (31, 33).

f) Coatomer Protein II (COPII)

COPII, 55-70 nm çapındadır. Son çalışmalar esneyerek büyüdüğünü göstermektedir ancak 100 µm'den daha fazla büyümemektedir. Bu nedenle preşilomikron gibi çok büyük partiküllerin taşınması için uygun değildir. Olgunlaşmamış proteinleri ER'den Golgi'ye taşıdığı düşünülmektedir (31).

2.4. ŞM'ların Dolaşımdan Uzaklaştırılması

2.4.1. ŞM'un Dolaşımında Uğradığı Değişiklikler ve Lipoprotein Lipaz Aktivitesi

Oluşan ŞM'lar torasik lenf kanalı yoluyla venöz dolaşıma verilir. Tokluk durumunda plazmaya bulanıklığı veren ŞM'lardır. ŞM'lar kan dolaşımına dahil olduktan sonra hızla plazmadan uzaklaştırılırlar. En son yemekten 12-16 saat sonra plazmada görülmeleri normal değildir. ŞM'lar torasik lenf kanalından kan dolaşımına geçer geçmez hızlı bir değişime uğrarlar. Partikülün yağ asit kompozisyonu, FL ve protein içeriği ve elektroforetik mobilitesi hızla değişir.

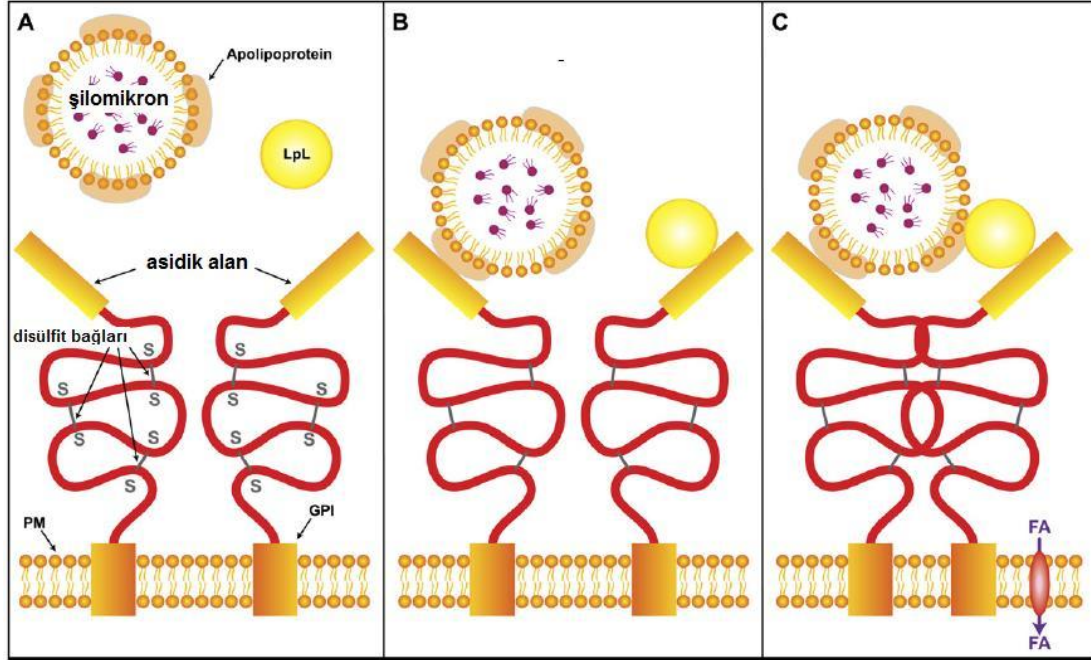
İçerisinde işaretli TAG bulunan ŞM'lar insanlara infüzyon ile verildikten sonra plazma yarı ömürleri 5-15 dk olarak tespit edilmiştir (1).

ŞM dolaşımında serbest K'ünü ve FL'lerini hızla plazma lipoproteinlerine ve hücre membranlarına vermektedir (41). ŞM'un lenfteki ve dolaşımdaki bu hareketi esnasında yapısına HDL'den gelen apoC ve E dâhil olmaktadır. ŞM bu modifikasyondan sonra vücudun birçok bölümündeki kılcal damar endotel hücrelerinin yüzeyinde bağlı bulunan lipoprotein lipaz enzimi ile etkileşime girmeye uygun hale gelir (7). Bu enzim aslında aç insanların plazmasında bulunmaz. Küçük bir miktar intravenöz heparin enjeksiyonunu takiben plazmada lipolitik aktivite ortaya çıkar (1). Heparin sonrası plazmada lipoprotein lipaz aktivitesi 100 kat artış gösterir (42). Bu enzim ŞM içindeki TAG ve FL'leri serbest yağ asitleri, gliserol ve lizofosfolipitlere parçalar ve bunlar dokular tarafından alınır (7). Lipoprotein lipaz aktivitesi için ŞM'un yüzeyinde apo C-II bulunmalıdır. Apo C-II lipoprotein lipaz ile lipoliz reaksiyonu sırasında kofaktör olarak kullanılır ve lipoliz esnasında partikülden ayrılmaktadır (43).

Lipoprotein lipazın endotelial olmayan paransim hücrelerinden sentez edildiği sanılmaktadır. Endotel hücre yüzeyindeki negatif yüklü heparan sülfat proteoglikanlar (HSPG) gibi glikoz amino glikanlar ile lipoprotein lipazın pozitif yüklü heparin bağlayıcı bölgeleri arasındaki etkileşimler neticesinde bu enzim endotel yüzeyine tutunmaktadır (44).

Lipoprotein lipaz ve ŞM'un etkileşmesi için GPIHBP1 (glikozil fosfatidil inositol anchored high density lipoprotein binding protein 1) proteinine gerek vardır. Bu proteinin lipoprotein lipaz ile benzer dokular tarafından sentez edildiği ve kapiller endoteliumun luminal yüzüne lokalize olduğu gösterilmiştir. Kapiller endotelde ŞM'ların lipoprotein lipaz aracılığı ile işlenmesinde moleküler bir platform olarak rol oynadığı düşünülmektedir. GPIHBP1 güçlü asidik negatif yüklü bölgeler içerir. Bu bölgeler ŞM'un içerdiği apolipoproteinlerin pozitif yüklü bölgeleri ile bağlanmaktadır (şekil 7 A). Bu sırada başka bir GPIHBP1 ise Lipoprotein lipaz'ın pozitif yüklü heparin bağlayan bölgeleri ile bağlanmaktadır (şekil 7 B). Daha sonra bu iki yapı birleşerek hetero-oligomerik bir kompleks oluşur. Böylece ŞM ile lipoprotein lipaz birleşmiş olur (şekil 7 C). ŞM TAG'leri lipoprotein lipaz ile etkileştikten sonra serbest yağ asitleri salınır ve muhtemelen CD36 veya FATP

bağımlı bir mekanizma ile endotel yüzeyinin içinden komşu hücrelere transport edilir (44).



Şekil 7: Endotel hücre yüzeyinde ŞM ile Lipoprotein lipaz'ın GPIHBP1 aracılığı ile birleşmesi (44 nolu kaynaktan Türkçe'leştirilmiştir).

A: GPIHBP1'in taşıdığı negatif yüklü asidik bölgeler,

B: iki farklı GPIHBP1'in ayrı ayrı şilomikron ve lipoprotein lipazın pozitif yüklü kısımları ile birleşmesi

C: iki yapının birleşerek şilomikron ile lipoprotein lipazın birleşmesinin sağlanması

PM: plazma membranı, LpL: lipoprotein lipaz, FA: yağ asitleri, GPI: glikozil fosfatidil inositol.

Hidroliz sonrasında ŞM, TAG çekirdeğinin büyük bir kısmını, apoA-I, A-IV ve C'sini kaybeder. Ancak apo B ve apoE'sini kaybetmez. ŞM'un bu haline şilomikron remnant (ŞMR) denir (7). ŞM taşıdığı TAG'ün % 90'ını dolaşımda kaybeder, ŞMR'ta az miktarda KE ve TAG kalıntısı kalmıştır (41).

Bir milyon TAG molekülü içeren tipik bir ŞM'da, Lipoprotein lipaz aktivitesi ile her dakika için 0,4 nmol yağ asidi salınımı gerçekleşir. Bir ŞM partikülünde bulunan TAG'ün % 45'inin hidrolize uğraması için ŞM'un 4 aktif Lipoprotein lipaz molekülü ile 5 dk etkileşime girmesi gerekmektedir (42).

ŞM'un değiştirilebilir bir apolipoproteini olan apo A-V, GPIHBP1 için ligant görevi görür. Apo A-V bağlanması GPIHBP1 ekspresyonunu artırır. Apo A-V

yetersizliği lipoprotein lipaz hidrolizinin bozulmasına ve serum TAG seviyesinin yükselmesine neden olmaktadır (44).

Apo C-III lipoprotein lipazı inhibe edebilir. Bununla birlikte apo C-II aşırı sentez edilen transgenik hipertrigliseridemili farelerde lipoprotein lipaz aktivitesinin arttığı gösterilmiştir. Apo C-I fazla sentez edilen transjenik farelerde, apo C-II ve apo C-III fazla üretilenler ile karşılaştırıldığında ılımlı bir hipertrigliseridemi oluşurken daha belirgin olarak K seviyesinde artış görülmektedir. C apolipoproteinleri remnant oluşumunda ve remnantların uzaklaştırılmasında kompleks bir role sahiptir. Transjenik farelerde tüm apo C türleri fazla sentez edildiğinde remnant temizlenmesi gecikir ancak apo C-I fazlalığı remnant temizlenmesinin gecikmesinde spesifik olarak ayrıca bir role sahiptir (43).

Bir TRL partikülünün lipoprotein lipaz tarafından hidrolize edilebilirliği onun yağ asidi ve TAG kompozisyonu ile yakından ilişkilidir (4).

Besinler ile alınan TAG'ler ile lenf kanalına verilen ŞM miktarı arasındaki ilişki, besinlerden gelen yağ miktarı, bağırsak lumenindeki fosfatidilkolin miktarı, apoA-IV ekspresyonu ve bağırsak mukozasının hidrasyon durumu gibi faktörler ile düzenlenmektedir (32).

Normal ve hipertrigliserolemik bireylerde ılımlı bir yağ yüklemesinin ardından ŞM, VLDL ve LDL lipoprotein konsantrasyonları ölçüldüğünde serum TAG seviyesinin iki pikli bir yükselme grafiği gösterdiği görülür. Postprandial ilk bir saatte TAG seviyesi normaldir. Hemen ardından ilk hipertrigliserolemi piki görülür, bu ŞM kaynaklı bir yükselmedir. Yağ yüklemesinden sonraki 4. ve 5. saatlerde ikinci pik görülür, bu pik ise VLDL'e bağlı bir yükselmedir. İkinci pik görüldüğünde serum ŞM konsantrasyonu oldukça düşüktür (36).

2.4.2. ŞMR'ların Karaciğer Tarafından Alınması

ŞMR'lar, karaciğer paraneşim hücrelerindeki apoE reseptörleri ile etkileşime girerek bu hücreler tarafından endositozis yolu ile alınırlar (7). Endositozis ile hepatosit içine alınan ŞMR'lar, sonrasında endozoma transfer edilir ve buradan lizozom içine girerek lipid bileşenleri hidrolize uğrar (45). ŞMR içerisindeki TAG, KE, FL ve proteinlerin her biri ayrı bir işlem sürecinden geçirilir. TAG hidroliz ile

parçalanarak enerji için kullanılırlar. Steroller ve FL'ler membran sentezinde kullanılır veya safraya salınır. Proteinler amino asitlerine parçalanır. ŞMR'ın lipit içeriği diğer lipoproteinler içerisinde tekrar birleştirilerek yeniden dolaşıma verilir (7).

2.4.2.1. ŞM'ların Karaciğer Tarafından Alınımında Aracılık Ettiği Düşünülen Başlıca Reseptör ve Proteinler

a) LDL Reseptörü (LDLr) ve LDL Reseptör Related Protein (LRP)

Güncel kanıtlar ŞMR alınımlı ve metabolizmasında başlıca 2 reseptör modelini ortaya koymaktadır. Bunlar LDLr ve LRP reseptörleridir (45). LDL reseptörlerinin ilgisi ŞMR partikülü üzerinde birkaç tane bulunan apoE'ler için, partikül üzerinde tek olarak bulunan apo B-48 ile karşılaştırıldığında çok daha yüksektir. LDL reseptörü yıkımlanmış farelerde ŞMR'ların hepatositlere girmekten ziyade sinozoidal boşlukta biriktiği görülmüştür (43).

Normal fizyolojik koşullarda ŞMR'ların kandan uzaklaştırılmasıyla ilgili başlıca reseptör LDL reseptörüdür (45). Anti-LDL reseptör antikoları ile yapılan çalışmalarda hepatosit membranında LDL reseptörü olmayan ancak apoE bağlayan başka bölgelerin olduğu gösterilmiştir (43). Bu bölgeler muhtemel LRP reseptörleridir. Aslında küçük bir rol üstlenen LRP, LDL reseptörünün hasarlı olması halinde LDLr'e alternatif olarak ŞMR uzaklaştırılmasında başlıca rolü üstlenirler. ŞMR'ların LRP aracılığı ile alınması da yine LDL reseptöründe olduğu gibi apoE ile ilişkilidir (45). Ancak bu yolak ŞM katabolizmasını önemli ölçüde geciktirmektedir. Bu nedenle LDL reseptörü yetersiz farelerin dolaşımında apo B-48 içeren lipoproteinler artmaya başlamaktadır (46).

LDLr'leri yıkımlanmış tavşan karotid arteri ile yapılan çalışmada, LDLr'üne sahip kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, apo B-48 taşıyan lipoproteinlerin, LDLr'ü olmayan arter duvarına daha fazla tutunduğu ancak apo-100 taşıyan LDL'lerin daha az tutunduğu gösterilmiştir (47).

LRP multifonksiyonel bir reseptördür ve α_2 -makroglobulin reseptörü ile özdeşdir. LRP muhtemelen LDL reseptör ailesinin öncül molekülüdür. Plasenta ve

diğer dokulardan bağımsız olarak izole edildiğinde α_2 -makroglobulin için reseptör olduğu gözlenmiştir. Ancak farelerde yapılan in vivo çalışmalarda α_2 -makroglobulin, hepatik β -VLDL ve ŞMR alımını önemsenmeyecek derecede azaltırken ratlarda hiç etkilememiştir (43).

LDL reseptör yetersiz farelerde LRP geni de baskılandığında K'den zengin remnantların birikimi ŞMR uzaklaştırılmasında LRP'nin rolünü doğrulamaktadır (45). LRP inhibitörleri ile LRP'nin şaperon proteini olan RAP (reseptör associated protein) bloke edildiğinde eğer LDL reseptörleri bloke edilmemişse hiperlipidemi görülmemektedir (43).

RAP, 39 kDa'luk bir proteindir ve LRP'ye yüksek ilgiyle bağlıdır (LDL reseptörüne ise güçsüz bağlanır). RAP genleri hasara uğratılmış farelerde karaciğerde LRP sentezinde azalma gözlenmektedir. Muhtemelen RAP, LRP'nin hücreler arası taşınmasında şaperon fonksiyonuna sahiptir ve LRP'nin hücre içi oluşumu ve membran üzerine yerleşmesi için gereklidir. RAP'ın LRP üzerindeki bütün bağlanma bölgelerini bloke ettiği bulunmuştur. Bununla birlikte VLDL ve LDL reseptörlerindeki bağlanma bölgelerini de ligant gibi bağlanarak inhibe eder. Ancak LDL reseptörlerine düşük ilgi ile bağlanır (45, 43).

ŞMR'ların karaciğer tarafından alınmasıyla ilgili ayrıca asialoglikoprotein reseptör ve lipoliz stimülated reseptör (LSR) ileri sürülmüştür (46).

Kupffer hücreleri ve diğer RES hücreleri tarafından fagositoz ayrı bir alternatif ŞM uzaklaştırılma yolu sağlar (1).

b) ApoE

ŞMR'ların karaciğer tarafından hızlıca temizlenebilmesi için hem apoE hem de LDL reseptörü birlikte gereklidir. ApoE, ŞMR uzaklaştırılmasında çok önemli bir apolipoproteindir. ApoE'nin rolü, lipoproteinlerin karaciğer tarafından alınmasında belirleyici olarak tanımlanmaktadır. Genel olarak 3 izoformu vardır. ApoE-II, III ve IV. ApoE-III ve apoE-IV izoformları LDL reseptörlerine yüksek ilgiyle bağlanırken apoE-II daha düşük ilgiyle bağlanır (43). İçerisinde Apo E-II, E-III ve E-IV bulunan rennant benzeri emülsiyon kullanılarak fare ve insan fibroblastları ile yapılan çalışmalarda hem normal kontrol grubunda hem de LDL reseptör yetersiz farelerde

Apo E-II, Apo E-III ve E-IV ile karşılaştırıldığında hemen hemen hiç bağlanma olmamıştır. Apo E-III ise Apo E-IV'ten daha yüksek oranda bağlanmaktadır (45).

Genetik müdahale ile apo E'leri elimine edilmiş hayvanlarda ŞMR uzaklaştırılması neredeyse tamamen durur. Apo C-I ve apo C-III, apo E içeren lipoproteinlerin reseptörlere bağlanmasını engellemektedir (37).

c) Asialoglikoprotein Reseptörleri

Hepatosite spesifik bir moleküldür ve reseptör aracılı endositoziste rol oynadığı sanılmaktadır. Organ spesifitesi, yüksek affinitesi ve terminal sialik aside sahip olmayan proteinler için yüksek taşıma kapasitesi onu mantıksal olarak remnant reseptörü adayı yapmaktadır.

d) VLDL Reseptörü

LDL reseptör ailesine bağlıdır ve normalde VLDL bağlayan bir reseptördür. Kalp, iskelet kası ve yağ doku gibi dokulara ŞMR'ların alınmasında rolü olduğu tahmin edilmektedir. Karaciğer alınımında etkisi yoktur.

e) LSR (Lipolizis Stimulated Receptor)

ŞMR alınımı için ileri sürülen diğer bir protein bir membran proteini olan ve serbest yağ asitleri tarafından aktive edilen LSR 'dir. LDL reseptörüne benzer şekilde hem apo B hem de apo E ile bağlanabilir. Maksimum aktivasyonu için yüksek serbest yağ asidi konsantrasyonuna gerek duyar. Fizyolojik şartlarda serbest yağ asitleri albumin tarafından bağlandığından, serbest yağ asidi miktarı albuminin bağlama kapasitesinin üzerinde olmalıdır. Albuminin fizyolojik olarak bağladığı serbest yağ asidi molar oranı olan 1:1, LSR aktivasyonu için yeterlidir ancak bu aktivasyon LSR maksimum aktivasyonunun ancak % 10'udur. Yemeklerden sonra intestinal kaynaklı lipoproteinlerden salınan serbest yağ asitleri karaciğer sinuzoitlerinde yüksek konsantrasyon sağlarlar. LSR laktoferrin ve RAP ile inhibe olur. Her ikisinin de ŞMR temizlenmesini in vivo inhibe ettiği rapor edilmiştir.

f) Laktoferrin ile İnhibe Edilen Reseptör

ŞMR'ların alınmasına aracılık ettiği düşünülen diğer bir reseptördür. Bu iddia, yetişkin ratların karaciğerinde çok az miktarda LDL reseptörü olması ve ratlarda α_2 makroglobulin ile β -VLDL arasında gerek in vitro gerekse in vivo yarışma olmaması gibi durumlara açıklık getirmek için ortaya atılmıştır.

g) Hepatik Lipaz

Lipoprotein lipaz'dan farklı olarak yüksek bir fosfolipaz aktivitesine sahiptir. Remnant metabolizmasındaki rolü kuşkuludur. Ancak hepatosit kültüründe ve ŞMR'ların bağlandığı karaciğer membranlarında hepatik lipaz ŞMR alımını hızlandırmaktadır (43).

h) Heparan Sülfat Proteoglikan (HSPG)

ŞMR'ların hepatik sinuzoidlerin içine ilk olarak HSPG ile etkileşerek girdikleri ileri sürülmüştür. Normal ve LDL reseptör yetersiz farelerde ŞMR'ların hepatik alımı heparin ile artmakta ancak HSPG'ı engelleyen suramin ve laktoferrin ile inhibe olmaktadır. Ayrıca normal farelerde ve doku kültüründe karaciğer tarafından ŞMR alımı HSPG'in polisakkarit zincirini yıkımlayan heparinaz tarafından geciktirilir.

Bütün bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde ŞMR'ların karaciğer tarafından alınmasında heparan sülfatların rolü ortaya çıkmaktadır. Kabul gören görüşe göre hepatosit yüzeyinde bulunan HSPG'lar remnant partikülünü ilk olarak yakalayan moleküllerdir. Karaciğerdeki HSPG'ların başlıca çekirdek proteini sindekanlardır. LDL reseptörleri, monoklonal LDL reseptör antikoru ile engellendiğinde ŞMR bağlanması yaklaşık olarak % 61 oranında azalmakta ve anti-sindekan IgG ile muamele edildiğinde ise ŞMR bağlanması % 51 oranında azalmaktadır. Karaciğerdeki heparan sülfat yapısı yüksek bir sülfat içeriği sağlar. Heparan sülfattaki bu yüksek sülfatlı ortam proteinlerin bağlanması için gereklidir. Suraminle yapılan çalışma da bunu desteklemektedir. Yüksek bir sülfatlanabilen

molekül olan suramin farelerde ve doku kültüründe muhtemelen ŞMR ile heparan sülfat için yarıştığından remnant metabolizmasını durdurur.

Poliarjinin ve polilizin içeren pozitif yüklü polipeptitler ŞMR bağlanmasını inhibe ederler. Mekanizması tam olarak açık olmamakla birlikte muhtemelen bu inhibisyon negatif yüklü heparan sülfat zincirlerindeki katyonlarla etkileşime bağlı olarak gerçekleşebilir (46, 37).

Ayrıca lipoprotein lipaz apo B-100 ve apo B-48 içeren lipoproteinlerin hücre dışı proteoglikanlara bağlanmasını kolaylaştırabilir, çalışmalar proteoglikanların apo B-48 için apo B-100 den daha büyük affiniteye sahip olduğunu göstermiştir (47).

2.4.3. ŞM'ların Dolaşımdan Uzaklaştırılmasını Etkileyen Faktörler

ŞM büyüklüğünün, ŞM temizlenmesinde anlamlı fakat ılımlı etkileri vardır (37). ŞM büyüklüğü prensip olarak onun TAG miktarıyla bağlantılıdır. Besinsel lipitlere bağlı olarak ŞM büyüklüğü ve kompozisyonu değiştikçe, bu lipoproteinlerin plazmadan uzaklaştırılması da değişmektedir (2).

ŞM'un büyüklüğü taşıdığı TAG yüküyle orantılıdır. Düşük yağ içeren diyetler ile beslenildiğinde küçük ŞM üretilmektedir (48). Büyük ŞM'lar küçük olanlara göre dolaşımdan çok daha hızlı uzaklaştırılırlar (49). Açlık durumunda ŞM'ların çapı küçüktür (ortalama 91nm). Beslenme sonrası ilk bir saat içinde hızla büyür ve 2-4 saat içinde maksimum çapına ulaşır (zeytin yağı ve ayçiçeği yağı için ortalama 148-163 nm). Altıncı saatten itibaren ŞM çapları azalmaya başlar (50).

Bununla birlikte partikül sayısının ŞM temizlenmesi açısından daha etkin bir faktör olduğunu ileri sürülmektedir (37).

Yağın doymuşluğunun ŞM büyüklüğüne olan etkisi yeterince açık değildir. Bazı çalışmalar doymamış yağların emilimi ile oluşan TAG'den zengin lipoproteinlerin doymuş yağların emilimi ile oluşanlar ile karşılaştırıldığında daha büyük ŞM'ların oluşmasına neden olduğunu gösterirken, başka birtakım çalışmalar doymuşluğun partikül büyüklüğü üzerine bir etkisinin olmadığını göstermektedir (2).

Noradrenalin ŞM uzaklaştırılmasını azaltırken, adrenalin uzaklaştırılmayı arttırmaktadır. α ve β adrenerjik reseptör agonistleri adrenalinin etkilerini önemli ölçüde arttırmaktadır.

Noradrenaline benzer şekilde anjiotensin II'de ŞM ve ŞMR uzaklaştırılmasını azaltır. Adrenalin hem lipolizi hem de ŞMR'ın karaciğer tarafından alınmasını arttırmaktadır (37).

Nitrik oksit (NO) sentezinin inhibisyonu da ŞM uzaklaştırılmasını azaltır (48). Dolaşımda LDL bulunması LDL reseptörleri ve LRP için ŞMR ve LDL lipoproteinleri arasında yarışmaya neden olur. Bu yarışma LDL'in miktarına bağlıdır (45). Ayrıca kapiller yataklarda lipoprotein lipaz için ŞM'lar ile VLDL'ler arasında da yarışma mevcuttur (48).

Farmakolojik dozlardaki östrojen apoE'den zengin lipoproteinlerin uzaklaştırılma hızını arttırmaktadır.

Hepatosit kültürlerinde insülin ŞMR alım yeteneğini arttırmaktadır. Ancak diabetli ratlarda ve insanlarda remnantların kandan uzaklaştırılması gecikmektedir. Bunun moleküler temeli henüz açıklanamamaktadır.

Tiroit hormonları lipit ve remnant metabolizmasını değiştirmektedir. Tiroit hormonları arttıkça remnant metabolizması hızlanır, bu hormonların yetersizliğinde ise yavaşlar (43).

Dolaşımdaki ŞMR'ların normal metabolizması dahilinde uzaklaştırılabilmesi için K'e gereksinimi vardır. ŞM'a benzeyen lipit emülsiyonu ile yapılan bir çalışmada, K eklenmeyen emülsiyon, lipoprotein lipaz ile etkileşime girmekte fakat dolaşımdan uzaklaştırılma süresi uzamaktadır. Ayrıca ŞM benzeri emülsiyonun fizyolojik olarak kandan uzaklaştırılması için kolesterolün 3. pozisyonunda hidroksil grubuna ve 17. karbonunda alkil yan zincirine de gereksinim olduğu gösterilmiştir (51). Bununla birlikte tavşanlarda aşırı K tüketimi sonucunda ŞMR'ların karaciğer tarafından temizlenmesinde gecikme olduğu gösterilmiştir. Ancak insanlarda aşırı K tüketimiyle birlikte ŞMR'ların temizlenmesinde gecikme gösterilememiştir (52).

ŞM'ların kandan uzaklaştırılmasını etkileyen diğer bir faktör safra FL'leridir. Çünkü safra FL'leri ŞM için uygun bir yüzey örtüsü sağlamakta, apo B-48 sentezini stimüle etmekte ve uygun enterosit membran kompozisyonunu sağlamaktadır. Farelerde safrada FL yokluğunda üretilen intestinal lipoproteinlerin büyüklüğünün arttığı ve FL içeriğinin azaldığı, safrada FL arttırıldığında ise lipoproteinlerin büyüklüğünün azalıp FL içeriğinin arttığı gösterilmiştir. Safradan FL salgılanması değiştiği zaman anormal büyüklük ve kompozisyonda lipoproteinler salgılanır.

Yalnızca besinsel TAG'lerin plazmada ortaya çıkma hızı değil aynı zamanda damar içindeki ŞM metabolizması da etkilenmektedir. Çünkü küçük bir ŞM, büyük olan bir ŞM'a göre lipoprotein lipaz için daha düşük bir affinite gösterdiğinden temizlenmesi gecikecektir. Ayrıca bir ŞM partikülünün yüzeyindeki FL'ler doymuş yağ asitleriyle esterleşmiş ise dolaşımdan çok daha yavaş uzaklaştırılırken, ÇDYA ile esterleşenlerin daha hızlı uzaklaştırıldığı gösterilmiştir. Bu nedenlerden dolayı intestinal bir lipoproteinin büyüklüğü ve dolaşımdan uzaklaştırılmasında safra FL'leri de etkilidir (53). ŞM yüzeyindeki FL'lerin türü de ŞM uzaklaştırılmasını önemli ölçüde etkilemektedir (42).

İn vivo çalışmalarda, ŞM'un merkezindeki TAG'lerin doymuş yağ asitleriyle esterleşmesi, merkez TAG'leri doymamış yağ asitleriyle esterleşmiş olanlar ile karşılaştırıldığında ŞM uzaklaştırma oranını azaltan bir faktör olduğu gösterilmiştir (42). Doymamış yağlar yüksek hepatik alım ile birlikte hızlı ŞMR uzaklaşması gösterirken, doymuş yağlar KE temizlenmesini ve ŞMR'ın hepatik alımını azaltmaktadır (54).

ŞM TAG'ünün 2- pozisyonunda doymuş yağ asitlerinin olmasının bu TAG'lerin temizlenmesini azalttığı gözlemlenmiştir ancak bu durumun karaciğer tarafından alımın bozulmasıyla mı yoksa lipoprotein lipaz ile etkileşimin azalmasından mı kaynaklandığı net değildir. Lipoprotein lipaz aktivitesinin lipoprotein TAG'lerinin içerdiği palmitik asit tarafından düzenlendiği ileri sürülmektedir (55).

Normal plazma TAG düzeyine sahip obez erkeklerde ŞMR katabolizmasının azaldığı gösterilmiştir (56). Lipoprotein lipaz ile substratı olan ŞM'ların etkileşmesi yeterli miktarda kan akımına bağlıdır. Karışık bir yemeğin ardından, zayıf sağlıklı insanlardaki karın yağ dokusunda kan akımı 2-3 kat artarken, obezlerde azalma olmaktadır. Muhtemelen, yağ ve kas dokulardan geçen kan akımını insülin direnci bozmaktadır. Periferik dokulardaki kan akımı bozulduğu için, postprandial dönemde ŞM içerisindeki TAG'ün kas ve yağ dokusundaki lipoprotein lipaz'a ulaşımı da bozulmuş olacaktır. Bu, obez kişilerdeki ŞM temizlenmesinin gecikmesini açıklamaktadır (26).

Oksidasyon ŞM temizlenmesini bozan ayrıca bir risk faktörüdür. Staprans ve ark. mısır yağı içinde okside yağ asitleri yedirerek yapılan bir çalışmada; okside yağ

asitlerinin ince bağırsaklardan emildiği, ŞM içinde paketlenildiği ve sonrasında kan dolaşımına verildiği insanlarda gösterilmiştir. Okside yağ asitlerini taşıyan ŞM'lar 8 saatten daha fazla dolaşımda kalmışlardır. Bu çalışmada sadece ŞMR fraksiyonunun oksidasyonu artmış, VLDL, HDL ve LDL fraksiyonlarında herhangi bir artış gözlenmemiştir. Diyabetiklerle yapılan çalışmada; kötü glisemik kontrol altındaki diyabetiklere oral okside yağ verildikten 2,5 saat sonra ŞMR içerisinde oldukça yüksek miktarda okside yağ asitleri tespit edilirken, iyi glisemik kontrol altındaki diyabetiklerde ise kontrol grubuna yakın sonuçlar elde edilmiştir. Kötü glisemik kontrol altındaki diyabetiklerde ayrıca ŞMR'lar kontrol grubu ve iyi glisemik kontrol altındaki diyabetiklere göre daha uzun süre dolaşımda kalmaktadır. Bu çalışmada besinler ile verilen okside K'un ince bağırsaklar tarafından emildikten sonra ŞM olarak dolaşıma verildiği ve dolaşımda iken kolesterol ester transfer protein (CETP) yardımıyla LDL ve HDL'e geçtiği gösterilmiştir (57).

2.5. Şilomikron Metabolizması İle İlgili Dislipoproteinemiler

2.5.1. Abetalipoproteinemi

Karaciğer ve bağırsaklarda TAG'den zengin lipoproteinlerin yapılamaması ile karakterize nadir görülen bir genetik rahatsızlıktır. Önceleri apo B senteziyle ilgili bir problem olduğu zannedilen abetalipoproteineminin daha sonraları MTP genindeki bir mutasyondan kaynaklandığı belirlenmiştir (27). MTP büyük sub-ünitesinde meydana gelen gen mutasyonu ile birlikte intestinal ŞM ve hepatik VLDL salınmasındaki yetersizlik ile karakterize abetalipoproteinemi denilen bu durum ortaya çıkmaktadır (33). Homozigot abetalipoproteinemi hastalarında, MTP büyük subünitesini kodlayan genlerde mutasyonlar tespit edilmiştir. Bu nedenle bu hastalık lipit ya da Apo B sentez bozukluğu sonucunda değil, aktif MTP'ye bağlı lipoprotein oluşturulamaması sonucu meydana gelir. MTP yokluğunda Apo B molekülleri sentez edilmektedirler ancak salgılandıktan hemen sonra hücreler arasında yıkımlanmaktadırlar.

Abetalipoproteinemi, dolaşımda Apo-B içeren lipoproteinlerin olmamasıyla karakterize, nadir görülen, otozomal ve resesif bir dislipoproteinemidir. En önemli

klirik sonucu esansiyel yağ asitleri ve A ve E vitaminleri başta olmak üzere yağda eriyen vitaminlerin yetersizliğidir. Bu hastalarda ince bağırsaklarda yağ ve yağda eriyen vitaminlerin emilimi m¼mk¼nd¼r fakat bunlar şM içine dahil olamazlar ve bunun sonucunda enterositlerde yağ birikir (38).

2.5.2. Anderson Hastalığı (şM Tutulma Hastalığı)

Anderson Hastalığı diğer bir şM sentez bozukluğudur. şM tutulma hastalığı olarak da bilinir. İlk olarak Anderson ve ark. tarafından 1961 yılında inatçı steatoreli ishal ve b¼y¼me yetersizliği olan 7 aylık bir kız çocukta rapor edilmiştir (3).

Sar 1B GTPaz'ı kodlayan Sar 1 B geninde meydana gelen mutasyon sonucu şM tutulma hastalığı oluşur. GTP bağımlı bir protein olan Sar 1B, PCTV'¼n tomurcuklanması, golgiyi hedeflemesi ve birleşmesi için gereklidir (58). Bu mutasyon şM sentezindeki son aşama olan partik¼llerin d¼z ER l¼meninden golgiye transfer edilmesi adımımda aksamaya neden olur. Apo B-48 oluşumu normaldir ancak yağ t¼ketiminin ardından dolaşımda apo B-48 ve şM tespit edilemez. Elektron mikroskobu ile bakıldığında d¼z ER l¼meninde şM'a benzer b¼y¼kl¼kte partik¼ller ve lipit damlacıkları g¼r¼l¼r (9). Ancak şM'lar h¼creler arası boşlukta g¼r¼lmezler (27).

Bu hastalarda yaşamın ilk birkaç ayında ishal ve gelişme geriliği g¼r¼l¼r. şiddetli hipokolesterolemi, normal TAG, d¼ř¼k LDL ve HDL, d¼ř¼k apo A-I ve apo B seviyesi ile karakterizedir. Bu hastalarda farklı derecelerde esansiyel yağ asidi ve vitamin E yetersizlikleri g¼r¼l¼r. B¼y¼me ve kemik dansitesi olumsuz etkilenmiştir. E vitamini yetersizliği norolojik ve oftalmik bir takım fonksiyon bozulmalarına neden olur (58).

2.5.3. Tip I Hiperlipidemi (Ailesel Lipoprotein Lipaz Yetersizliği)

Lipoprotein lipaz yokluğu veya onun kofakt¼r¼ apo C-II yokluğunda oluşur. şM ve VLDL temizlenmesi yavaşlamıştır. Plazmada ciddi şekilde şM birikimi g¼r¼l¼r. Koroner hastalık riskini arttırmaz (42, 18).

2.5.4. Tip III Hiperlipidemi (Ailesel Disbetalipoproteinemi)

Bu hastalarda apo E yokluğuna bağlı olarak ŞMR birikimi görülür. Apo E'nin E-III ve E-IV izoformları yoktur, yalnızca E-II izoformu vardır. Ancak apo E-II, apo E reseptörleriyle etkileşime girmez. Hiperkolesterolemi, ksantoma ve aterosklerozise sebep olmaktadır (43, 18).

2.5.5. Şilomikronemi Sendromu

Plazma TAG seviyesinin 1000 mg/dl'nin üzerine çıkmasına 'şilomikronemi' denir. Şilomikronemiye ksantoma, retinal lipemi, retinal ağrı, akut pankreatit ve hepatosplenomegali gibi bulgulardan biri veya daha fazlası eşlik ediyorsa bu durum 'şilomikronemi sendromu' olarak isimlendirilmektedir (59).

Onbinde 1,79 insanda görülen şilomikronemi sendromu plazma TAG seviyesinin 2000 mg/dl'nin üzerine çıkmasıyla karakterizedir. Obezite, metabolik sendrom ve diabetes mellitus ile ilişkili olarak ortaya çıktığı düşünülmektedir. Şilomikronemiye bağlı oluşabilecek akut pankreatit ölümcül risk taşıdığından klinik olarak tanımlanması ve tedavi edilmesi önemlidir (59).

2.6. Ateroskleroz ve Şilomikron-Şilomikron Remnantların Aterosklerotik Tabiatı

Aterosklerozun başlangıcı, arteriyal dokular içinde K birikim ve tekrar dışarı sızdırılması arasındaki dengeye bağlıdır. Arterial dokulara giren K'nin büyük bir kısmı çok kısa bir süre içerisinde tekrar dışarı sızdırılmaktadır. Kanıtlar bu dengenin lipoprotein tipine bağlı olarak değişebildiğini göstermektedir (47).

Ateroskleroz gelişimindeki ilk olaylardan biri endotel fonksiyonunun bozulmasıdır. Endotel fonksiyonunun bozulmasıyla birlikte endotelden pro-inflamatuvar sikotinler ve kemokinler salgılanmaktadırlar. Bu moleküller dolaşımdaki monositleri endotele çekmektedirler. Endotele yapışan monositler subendotel boşluğa geçmektedir. Monositler burada okside LDL ve ŞMR'ler için scavenger

(süpürücü) olan makrofajlara dönüşürler. Makrofajlar tarafından okside LDL ve ŞMR'ların alınmasıyla köpük hücre ve sonrasında atheroma oluşmaktadır (5).

Köpük hücreleri, aterojenik lipoproteinlere çöpçülük eden ve arterial dokuları istila ederek lipit tıkaçlar oluşturan monosit makrofajlarıdır. Farklı tipte K içeriğine sahip partiküller makrofaj içine girebilir. Makrofaj içine giren K, makrofajın aterosklerotik fonksiyonunu belirler. Hem LDL'lerin hem de ŞM'ların aterojenik lipoproteinler oldukları ileri sürülmektedir (6). Çok fazla sayıda çalışma köpük hücre oluşumu ile LDL'i özellikle de okside LDL'i ilişkilendirmektedir. Ancak güncel çalışmalar ŞMR'ların da aterojenik olduğunu, arter duvarına LDL kadar iyi nüfuz ettiği ve subendotelial boşlukta tutulduğunu göstermektedir. Ayrıca insan aterosklerotik plaklarında apo B-48 izole edilmiştir (8, 60).

Aterosklerotik bir arterial intimadan 3 tip ekstrasellüler lipit partikülü izole edilmiştir; bunlar LDL'e benzer partiküller, kolesterol linoleattan zengin küçük lipit damlaları ve küçük lipit vezikülleridir. Kolesterol linoleattan zengin lipit damlaları apo B-100 ile immünolojik olarak reaktif değildir. Yapısında apo E ve apo C-III bulundurulur. Arterial lipit vezikülleri de apo B-100 ile immünoreaktif değildir ve aterosklerotik lezyonlarda bol miktarda bulunur (61). Buradaki lipit damla ve veziküllerinin apo B-100 ile immünoreaktif olmaması, LDL moleküllerinin aşırı proteolizis ve/veya oksidasyona uğramaları neticesinde yapılarının değişmesiyle ilişkilendirilmişse de bunların ŞM kaynaklı olma ihtimali yüksektir.

Lipoproteinlerin transsitozis denilen bir yolla arterial dokuya nüfuz ettikleri ileri sürülmektedir. Bu süreçte endotel hücrelerinin plazma membranında vezikül oluşumu başlar, vezikül basolateral yüzeye göç ederek içindekileri boşaltır. Transsitotik veziküller 70 nm'den daha büyük partikülleri taşıyamazlar. Bu nedenle 70 nm'den büyük lipoproteinler endoteliuma geçemezler. Vezikül oluşumu sürecinde lipoproteinin K kütlesi önemlidir. Epidemiyolojik verilere göre küçük ve daha yoğun lipoproteinler daha büyük aterojenik potansiyele sahiptir. Muhtemelen arterdeki lipoproteinlerin yaklaşık olarak % 85'i transsitozis yoluyla artere girer, daha az miktarda ise gap junction ve diğer yollardan giriş olur. Arter duvarının farklı lipoprotein türleri için farklı affiniteye sahip olduğu ortaya çıkmıştır. Burada lipoprotein büyüklüğü, dansitesi, lipit kompozisyonu ve apolipoprotein

kompozisyonu gibi birtakım özelliklerin, arterial tutunmada ve sonrasında oluşan proinflatuar cevapta etkili olduğu gösterilmiştir (47).

ŞM'lar iki şekilde aterojenik olabilirler. ŞM'lar direk arter duvarına girebilir ve subintimal bölgede K birikimine neden olabilirler ya da arter endotel yüzeyindeki lipoliz esnasında serbest hale gelen ŞM K'ü arter duvarına girebilir. Ancak ŞM'ların doğrudan aterojenik olduğuna dair çok az kanıt vardır. Muhtemelen bu lipoproteinler çok büyük olduklarından arter duvarına çok az girebilirler. Çünkü lipoproteinlerin arter duvarına girebilmesi büyüklükleri ile ters orantılıdır. Örneğin genetik olarak lipoprotein lipaz yetersizliği olan tip I hiperlipoproteinemili hastalarda aşırı ŞM yükselmesi görüldüğü halde bu hastalar aterosklerotik hastalıklara dirençlidirler. Eğer ŞM'lar direk aterojenik olsaydı bu hastalarda ateroskleroz gelişimi görülürdü. Ancak arter duvarının hasarlı olduğu diabetes mellitus gibi durumlarda ŞM'lar arter duvarına daha yüksek oranda girebilirler. Diabetes mellitus hastalarında arter endotelinde hasar oluşabilir ve bu hastalarda sıklıkla şilomikronemi görülür. Bu hastalarda ŞM'lar arter duvarını geçebilir ve ateroskleroz oluşumuna katkıda bulunabilir (52).

Arter duvarına nüfuz etmek için çok büyük olan TAG'den zengin lipoprotein (TRL)'lerin aksine, lipoprotein lipaz'nin hidrolitik aktivitesiyle oluşan remnant yapısı arterial intimaya girebilir. Bu durum TRL remnantlarını prekürsörlerine göre daha aterojenik yapar (4).

Lipoprotein lipaz, apo B100 ve apo B-48 içeren, K'den zengin, büyük lipoproteinleri hidrolize ederek transsitosis için uygun boyut aralığına getirir (<70 nm). Bu nedenle Lipoprotein lipaz aynı zamanda proaterojenik lipoproteinlerin arterlere girişinde düzenleyici görev görmektedir (47).

Bu nedenle ŞM'ların aksine remnant partikülleri arter duvarındaki sub-endotelial boşluk içerisine girebilir ve lipitler bu dokulardaki hücreler ile doğrudan etkileşime girebilirler. Uzun süre dolaşımda kalan ŞMR'ların koroner hastalıklara neden olduğu ve yüksek apo B-48/ B-100 oranının kardiovasküler hastalık taşıyanlarda kontrol grubuna göre daha yüksek olduğunu ileri süren çalışmalar mevcuttur (6, 43). Koroner kalp hastası erkeklerde postprandiyal ŞMR artışı gözlenmiştir (8).

Apo B-100 içeren lipoproteinlerin, apo B-48 taşıyanlara oranla damar endoteli tarafından 10 kat daha fazla tutulduğu gösterilmiştir. Ancak insanlarda apo B-48 taşıyan ŞMR'lar, apo B-100 taşıyan LDL'ler ile karşılaştırıldığında 40 kat daha fazla K içerir. Apo B-48 taşıyan ŞMR'lar 10 kat daha az tutulmasına rağmen 40 kat daha fazla K taşıdığından 4 kat daha fazla K'ün damar endoteline girişine neden olabilir (47). ŞMR'ların taşıdığı apoE insan aterosklerotik plaklarından izole edilmiştir (8).

Ateroskleroz yalnızca lipit birikim düzensizliği değil aynı zamanda bir inflamatuvar hastalıktır. Makrofaj hücrelerinde içinde bulunduğu birkaç hücre tipinde inflamasyon cevap ile ilgili en büyük transkripsiyon faktörü NF-κB (nuclear factor-κB)'dir ve aterosklerozda anahtar bir rol oynadığı düşünülmektedir. Makrofajdaki sitokin ve kemokinlerin de içinde bulunduğu inflamatuvar düzenleyiciler için önemli olan genlerin transkripsiyonu NF-κB tarafından kontrol edilir. Pascale ve ark. tarafından ŞMR'ların insan monosit makrofajlarında NF-κB aktivasyonunu baskıladığı gösterilmiştir. Balık, mısır, palm ve zeytinyağı ŞMR'ları farklı oranlarda NF-κB aktivasyonunu baskılamıştır. ω-3 ÇDYA ve daha az oranda ω-6 ÇDYA, DYA ve TDYA'ya göre NF-κB aktivasyonunu daha fazla baskılamıştır (62).

In vitro çalışmalarda ŞM'ların damar endotel hücrelerinde E-selektin ve VCAM1(vasküler cell adhesion molekül1) salınımını arttırdığını gösterilmiştir. Yine ŞMR'a benzer partiküllerin insan endotel hücrelerinde COX-2 (siklooksijenaz-2) salınımını güçlü şekilde uyardığı gösterilmiştir. Ayrıca ŞMR'a benzer partiküller vasokonstriktör molekül olan TXA₂ (tromboksan A₂) üretimini de arttırabilirler. Bu partiküller vasodilatör ve vasokonstriktör mediatörlerin üretimlerinde bir dengesizliğe neden olduğundan endoteldeki pro-aterojenik özellikleri pekiştirirler. Remnant lipoproteinlerin hem aorttaki endotel bağımlı relaksasyonu hem de NO aracılı endotel bağımlı vasodilatasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir (5).

ŞM'lar ile karşılaştırıldığında, ŞMR'lar hepatositler tarafından çok daha fazla tanınmaktadır. ŞM'lar karaciğerdeki yağ asidi sentezine etkisizdir ancak ŞMR'ların hepatosit hücrelerinde yağ asidi sentezini inhibe ettiği gösterilmiştir (63). Normalde insan karaciğeri dolaşımdaki ŞMR'ları hızlıca ve büyük bir yeterlilikle temizlemektedir. Bu hızlı temizlenme insanlarda aterosklerozisten korunmada

önemli bir koruyucu mekanizmadır. Ancak küçük miktarlardaki ŞMR'lar da özellikle dolaşımdan uzaklaşmaları geciktiği zaman ateroskleroz patogeneğinde bağımsız bir risk faktörüdür ve uzun süreli maruziyet halinde aterosklerotik plaklarda K birikimine neden olabilirler (6, 52).

ŞMR'lar LDL'in aksine öncesinde bir oksidasyona gerek duymadan makrofajların köpük hücre oluşumunu indükleyebilirler (4). ŞMR'lar makrofajlarda aşırı lipid birikimine neden olur ve makrofajlar sub-endotelial boşluğu istila ederler (5). Napolitano ve ark. sıçan makrofaj hücreleriyle yaptıkları çalışmada ŞMR'ların oksidasyondan etkilenmediği, okside olanlar ile okside olmayanların hücre içi seviyeyi eşit oranda arttırdığı gösterilmiştir. Buradan hareketle ŞMR'ların yağ asidi kompozisyonlarının onların köpük hücre formasyonu oluşturabilme durumları için oksidasyondan çok daha önemli bir faktör olduğunu ileri sürmüşlerdir (8). Ancak Botham, okside ŞMR'ların endotelden kaynaklanan NO'ı engelleyerek vasodilatasyonu inhibe ettiğini göstermiştir. Oksidasyon ŞMR'ın arter duvarına girişini ve endotel bağımlı vasküler relaksasyonu önemli ölçüde bozmuştur. ŞMR oksidasyonu kendisinin makrofajlar tarafından alınımını ve makrofaj köpük hücre oluşumunu inhibe eder. ŞMR oksidasyondan korunduğunda ise bu etkiler güçlü bir şekilde artar (64).

Birçok çalışma makrofajlar tarafından ŞM'ların alındığını açıkça ortaya koymuş olmasına rağmen tam olarak bunun hangi mekanizmalar ile gerçekleştiği ortaya konulamamıştır. ŞMR alımıyla ilgili rol oynadığı öne sürülen reseptörler, LDL reseptör, LDL reseptör ilişkili protein, VLDL reseptör ve SR-A ve CD36 gibi çeşitli scavenger reseptörlerdir (SR) (4).

ŞMR'ların makrofaj içine alınmalarıyla ilgili genel kabul, ŞMR'ların bir bileşeni olan Apo E'nin ligand görevi gördüğü LDLr aracılı yoldur. Ancak LDLr aktivitesinin olmadığı çalışmalarda ŞMR'ların makrofajlar tarafından alınmasında LDL reseptörlerinden bağımsız başka mekanizmaların aracılık ettiği alım yollarının da mevcut olduğu gösterilmiştir. Apo E'si olmayan ŞMR benzeri partiküllere maruz bırakılan makrofajların TAG içeriği, Apo E içeren ŞMR benzeri partiküllere maruz bırakılanlara göre % 45 daha az bulunmuştur. Yani ŞMR'ların gerçekleştirdiği makrofaj lipid birikimi kısmen ApoE reseptör bağımlı alımdan kaynaklanmaktadır (6). Apo E yetersiz farelerde, insan ailesel disbetalipoproteinemiye benzer şekilde

serum ŞM ve VLDL'lerin artmasına bağı olarak ateroskleroz hızlanmıştır (57). Bejta ve ark. likopen ile zenginleştirilmiş ŞMR'ların karaciğer hücreleri tarafından alınımının azaldığını bunun yanında makrofajlar tarafından alınımının ise arttığını göstermişlerdir. Bu bulgu besinlerdeki likopen gibi lipofilik antioksidanların daha iyi araştırılması gerekliliğini göstermesinin yanı sıra, ŞMR'ların karaciğer ve makrofaj hücrelerine farklı alım mekanizmalarıyla girdiklerini de göstermektedir. Karaciğer tarafından alınmada LDLr ve LRP aracılı alım söz konusu iken makrofaj tarafından alınmada apo B-48 reseptörü, scavenger reseptör ve fagositozun rol oynadığı düşünülmektedir (65).

ŞMR'ların makrofajlar tarafından alınmasında içerdği TAG ve K yükü büyük rol oynamaktadır. ŞMR'ların TAG ve KE yüklü olmalarına göre makrofajlar tarafından birbirinden bağımsız farklı mekanizmalar ile alındıkları düşünülmektedir. TAG yükü fazla olan ŞMR'lar muhtemelen reseptör aracılı endositoz ile alınırken, K yüklü olanlar reseptör bağımsız olarak alınmaktadır.

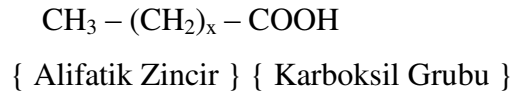
Makrofajlar tarafından sentez edilen lipoprotein lipaz inhibe edildiğinde makrofaj tarafından alınan TAG'den zengin ŞMR'lar % 65 azalmaktadır. KE'den zengin ŞMR'ların makrofajlar tarafından alınımı ise kısmen scavenger reseptörler imha edildiğinde azalmaktadır (6).

Farklı lipit kompozisyonuna sahip iki tip TRL ve insan monosit makrofajlarıyla yapılan çalışmada SRCD36, SR-A1 ve SR-B1 reseptörlerinin mRNA ekspresyonlarında farklılıklar ortaya konulmuştur (4).

2.7. Besinsel Yağlar ve Yağ Asidi Kompozisyonları

Genel olarak suda çözünmeyen ancak eter, benzen, kloroform gibi organik çözücülerde çözünebilen değişik yapıli bileşikler yağ (veya lipit) adı altında toplanmaktadır.

Yağı meydana getiren öğelerden gliserol, bütün yağ bitkilerinde aynı, buna karşılık yağı oluşturan diğer unsur olan yağ asitleri her bir yağ bitkisinde değişik bir kompozisyonda bulunmaktadır.



Şekil 8: Bir yağ asidinin genel formülü.

Doğal yağlarda bulunan yağ asitleri (şekil 8) genelde düz zincir türevleri olup doymuş (*saturated fatty acids*) ve doymamış (*unsaturated fatty acids*) yağ asitleri olmak üzere 2 şekilde sınıflandırılırlar.

Karbon atomları arasında tek bir kovalent bağdan (-C-C-) oluşan ve oda sıcaklığında genelde katı olan yağ asitleri doymuş yağ asitleri olarak adlandırılır. Bu yağ asitlerince zengin olan yağlara da doymuş yağlar denir. Laurik asit (C12:0), miristik asit (C14:0), palmitik asit (C16:0), stearik asit (C18:0), araşidik asit (C20:0) ve behenik asit (C22:0) bitkisel yağlarda bulunan en önemli doymuş yağ asitleridir. Özellikle palmitik ve stearik asit bitkisel yağlarda bulunan en yaygın doymuş yağ asitleridir.

Karbon zinciri üzerinde çeşitli konumlarda, karbonlar arasında bir veya daha fazla kovalent çift bağ içeren yağ asitleri doymamış yağ asitleri olarak isimlendirilirler. Bu yağ asitlerince zengin olan yağlara da doymamış yağlar denir.

Yapılarında bir çift bağ içeren yağ asitleri tekli doymamış yağ asitleri (TDYA) veya *monoenoik yağ asitleri* olarak isimlendirilir. Bu grubun en önemli iki üyesi, palmitoleik asit (C16:1) ile oleik asittir (C18:1). Bunlardan palmitoleik asit daha çok deniz hayvanları yağları için karakteristik bir bileşen olduğu halde, oleik asit bugüne değin bilinen bütün doğal yağların yapısında yer almıştır.

Birden fazla çift bağ içeren yağ asitleri ise çoklu doymamış yağ asitleri (ÇDYA) veya *polienoik yağ asitleri* olarak isimlendirilir. Linoleik (C18:2), linolenik (C18:3), araşidonik (C20:4), aykozapentaenoik (C20:5, EPA) ve dokozahekzaenoik (C22:6, DHA) asitler çoklu doymamış yağ asitlerinin en önemlileridir. Çoklu doymamış yağ asitleri beslenmede önemli esansiyel yağ asitleridirler, F vitamini olarak da adlandırılmaktadırlar (66).

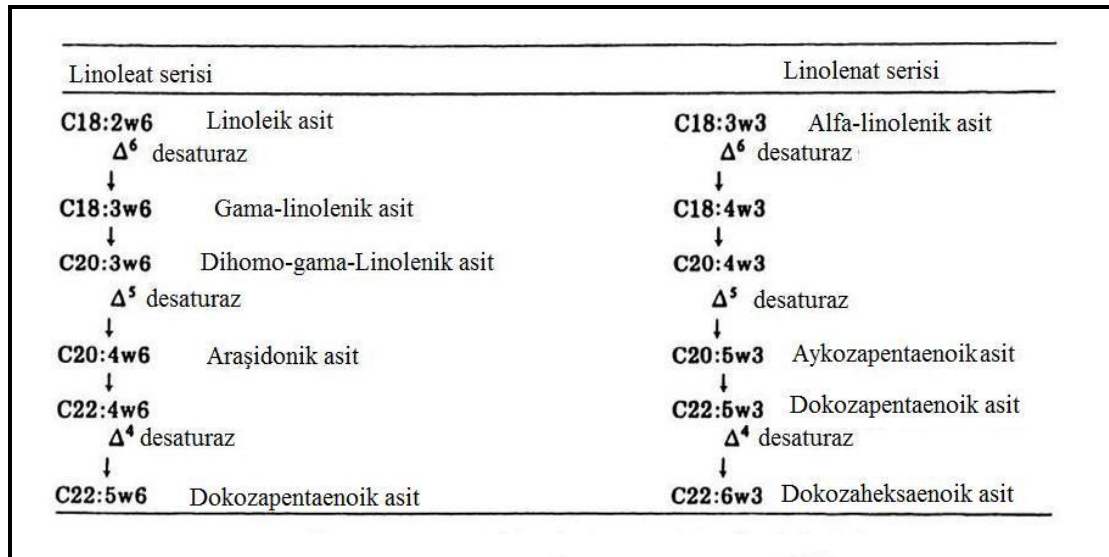
Şekil 9'da linoleik asit ve linolenik asidin vücuttaki dönüşümleri gösterilmiştir. Vücutta, linoleik asidin araşidonik aside ve linolenik asidin DHA'ya dönüşümü söz konusudur.

Doymuş yağ asitleri; kısa zincirli (4:0 – 6:0), orta zincirli (8:0 – 10:0), uzun zincirli (12:0 – 18:0) ve çok uzun zincirli (20:0 – 24:0) yağ asitleri olarak da sınıflandırılabilirler (67).

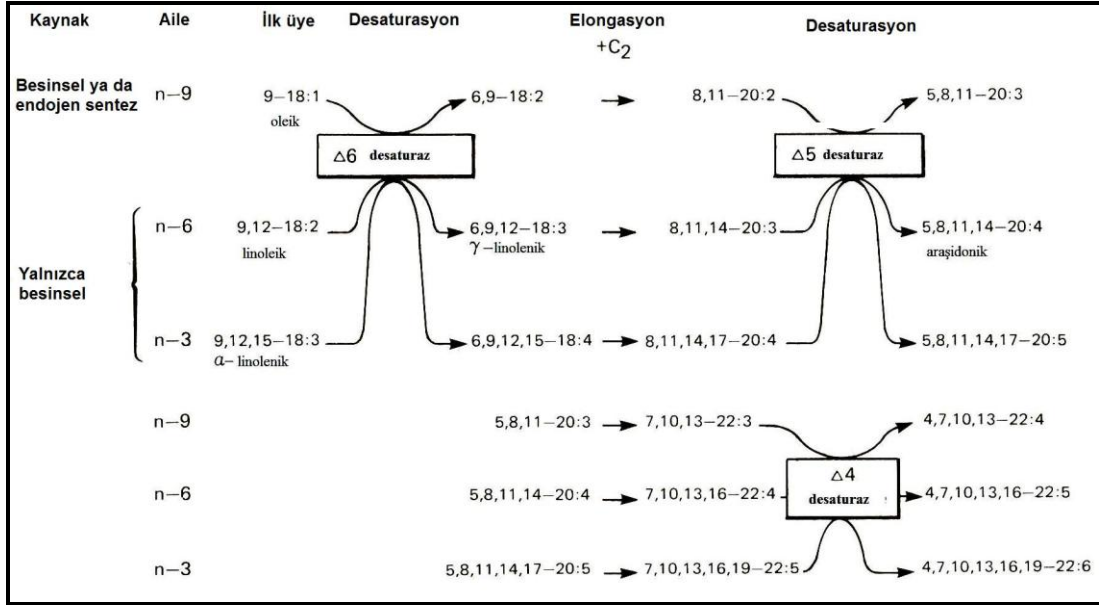
Şekil 10’da, ω -3, ω -6 ve ω -9 yağ asitlerinin vücuttaki metabolizmaları sonucunda gerçekleşen dönüşümleri gösterilmiştir. Karaciğerin de içinde olduğu birçok dokuda DYA’lerinin, esansiyel olmayan TDYA dönüşümü söz konusudur. ER içinde desaturaz sistemler ile palmitik asidin stearik aside ve palmitoleik asidin oleik aside dönüşümü mümkündür.

Metabolik ve epidemiyolojik çalışmalarda ateroskleroz gelişimi ve kardiovasküler hastalık oluşma riski yönünden besinsel olarak alınan toplam yağ miktarından çok alınan yağ tipinin daha önemli olduğunu ortaya konulmuştur.

Lipoprotein partikülünün yağ asidi kompozisyonu onun makrofajlar tarafından alınımı ve makrofaj içerisindeki lipid birikimini etkilemektedir. Besinsel lipidler bu partiküller ile taşındığından potansiyel olarak makrofaj köpük hücre formasyonunu indükler veya hafifletirler. Özellikle ŞMR içinde taşınan besinsel DYA, onun makrofaj köpük hücre yapısını uyarma eğilimini arttırabilir (4, 5).



Şekil 9: Esansiyel yağ asidi metabolizmasında ω -3 ve ω -6 yağ asitlerinin desaturasyon ve elongasyonu (68 nolu kaynaktan Türkçeleştirilmiştir).



Şekil 10: Temel yağ asitlerinin (ω -3, ω -6 ve ω -9) vücuttaki desaturasyon ve elongasyon ile dönüşüm metabolizmaları (69 nolu kaynaktan Türkçeleştirilmiştir).

Besinsel yağlar kimyasal açıdan iki fraksiyonel grupta incelenir. Büyük fraksiyon TAG gibi sabunlaşabilen bileşenlerden oluşur ve yağların % 99'u bunlardan meydana gelir. Sabunlaşabilen terimi bazlar ile muamele edildiğinde gliserit içeriğinin sabun formuna dönüşebilmesi demektir. Küçük fraksiyon geriye kalan % 1-2'lik kısımdır. Sabunlaşmayan fenolikler ve mumları kapsar.

Ayrıca hidrokarbonlar, tokoferoller, yağ alkoller, fitosteroller, triterpenik dialkoller ve fenolik bileşenler gibi minör bileşenler de besinsel yağlarda bulunur.

Hidrokarbonlardan skualen sadece zeytinyağı, yerfıstığı yağı, köpekbalığı karaciğer yağı gibi bazı yağlarda görülür. Bununla birlikte β -karoten ve likopen gibi diğer hidrokarbonlar birçok yağda bulunur. β -karoten A vitamininin, likopen ise antioksidanların prekürsörüdür.

Steroller hem hayvansal hem de bitkisel yağlarda bulunurlar. Hayvanlardaki başlıca sterol K'dür. Bitkisel steroller olan fitosteroller ise başlıca β -sitosterol, kampesterol, stigmasterol, spinasterol ve avenosteroldür. Fitosteroller son birkaç yılda hipokolesterolemik etkilerinin anlaşılmasıyla birlikte büyük ilgi çekmiştir. Besinsel yağlarda bulunan başlıca tokoferol α -tokoferoldür ancak β , γ , δ -tokoferoller de görülebilir (5).

Bazı çalışmalarda yağlar içindeki sabunlaşmayan fraksiyonların hipokolesterolemik etkilerine işaret edilmiştir. Özellikle bitkisel sterollerin LDL-K'ü düşürücü etkileri ve özellikle palm yağında yüksek oranda bulunan tokoferol analogu tokotrienollerin K düşürücü etkileri ortaya konulmuştur (70).

2.7.1. Ayçiçek Yağı

Ayçiçek yağı, yağ oranı % 39-45 arasında değişen *Helianthus annuus* bitkisinin tohumlardan elde edilen bir yağdır. Ülkemizde toplam likit yağ tüketiminin yaklaşık % 75'ini ayçiçek yağı teşkil etmektedir.

Sıvı olarak ve margarin hammaddesi katı yağ üretiminde yaygın kullanım alanı bulan ayçiçek yağı açık sarı renkli, rafine edilerek kullanılabilen bir yağdır.

Ayçiçek yağı % 15 doymuş, % 85 doymamış yağ asidi içermekte, doymamış yağ asitlerinin % 14-43'ünü oleik asit, % 44-75'ini linoleik, en fazla % 0,7'sini de linolenik asit oluşturmaktadır. Ayçiçek yağı; % 0.025-0.031 hidrokarbonlar, % 0,542-0,584 steroller, % 0.008-0.044 mumlar olmak üzere sabunlaşmayan maddeler de içermektedir. Toplam tokoferol içeriği ise yaklaşık 640 mg/kg yağ olup, tokoferollerin % 96'sını α -tokoferol oluşturmaktadır (71).

Ayçiçeği yağı yağ asidi oranları (%):

Palmitik asit: 3-6

Sterik asit: 1-3

Oleik asit: 14-43

Linoleik asit: 44-75

Linolenik asit: 1'den az

Araşidonik asit: 0,6 - 4 (72).

2.7.2. Zeytinyağı

Zeytinyağı yağ asidi oranları (%):

Palmitik asit: 7-16

Stearik asit: 1-3

Oleik asit: 65-85

Linoleik asit: 4-1 (72).

Zeytin, en fazla yağ içeren meyvelerden biridir. Ağırlığının % 20 – 30'u yağdır. Zeytinyağının en karakteristik kimyasal özelliği 9. ve 10. karbon atomları arasında bir çift bağ bulunan oleik asidi yüksek oranda barındırmasıdır. Oleik asit miktarı toplam yağ asitlerinin üçte ikisi veya daha fazlası kadardır. Zeytinyağı, 18 karbonlu ve 2 çift bağlı esansiyel yağ asidi olan linoleik asidi de insan gereksinimini karşılayabilecek düzeyde içerir. Doymuş yağ asit içeriği toplam yağ asitlerinin % 14'ü kadardır. Başlıca doymuş yağ asidi palmitik asittir.

Zeytinyağını diğer sıvı yağlardan ayıran bir başka özelliği ise yağ yapısı dışındaki bileşiminde antoksidan öğeler (tokoferoller), fenol bileşikler, steroller (fitosterol kampesterol), FL'ler, karotenoidler ve bazı aromatik öğeler içermesidir. Zeytinyağındaki tokoferollerin yüzde 90'ını biyolojik açıdan en aktif formadaki alfa-tokoferol (Vit E) oluşturmaktadır. Miktarı ise 150 -170 mg/kg'dır.

Yağlarda bulunan doymamış yağ asitleri yağlara özel biyolojik bir değer vermenin yanında yağları oksijene karşı korumasız duruma sokmakta ve böylece oto-oksidasyon sürecine neden olmaktadır. Oksidasyon oluşma hızı çift bağların sayısı ile doğru orantılı olarak artmakta, antioksidanların yapısı ve miktarına göre engellenmektedir. Zeytinyağı; yağ asitlerinin bileşiminin tekli doymamış oleik asit olması, birçok antioksidantı içermesi ve oto-oksidasyona dirençli olması gibi açılardan dolayı insan sağlığı yönünden önem kazanmaktadır (71).

Zeytinyağının, TAG gibi gliserit bileşenlerden oluşan kısmın büyük fraksiyon ve minör bileşenlerden oluşan kısmına küçük fraksiyon denir. Zeytinyağının içindeki fenolikler dışındaki minör bileşenlerinin (tokoferoller, steroller ve terpenik bileşenler) antioksidan ve antienflamatuar özellikleri rapor edilmiştir. Fenolikler sadece rafine edilmemiş zeytinyağında (virgin olive oil-VOO) bulunmaktadır.

İn vitro bir çalışmada, sabunlaşmayan fraksiyon ile zenginleştirilmiş VOO'dan elde edilmiş TRL'ler endotel hücreleri ile inkübe edildiğinde normal VOO ve yüksek oleik asit içeren ayçiçeği yağı ile karşılaştırıldığında prostoglandin E₂ ve tromboxan B₂ üretiminde azalma olmuştur (4).

Birçok besinsel yağ ticari olarak satılabilir hale getirilmek için rafinasyon işleminden geçirilmesi gerekir. Bu işlem sırasında çoğu hidrofililik bileşen

kaybedilir. VOO bunun dışındadır. Özsuğu şeklinde elde edilir ve rafine edilmesine gerek yoktur. Bu nedenle diğerk yağlarda genellikle bulunmayan fenolik bileşikleri içerir. VOO'deki fenolik bileşenlerin potansiyel antioksidan aktiviteleri gösterilmiştir. Bu bileşenler arasında yer alan oleuropein hem kendisinin hem de derivesi olan hidroksityrosol'ün in vivo oksidatif strese karşı koruyucu etkileri rapor edilmiştir. VOO diabetiklerde ve hiperkolesterolemik hastalarda endotel fonksiyonunu düzeltmektedir (5). Besinlerdeki zeytinyağının ayçiçeğı yağı ile karşılaştırıldığında postprandial faktör VII'yi düşürerek antitrombotik etki sağladığı gösterilmiştir (73).

2.7.3. Palm Yağı

Palm yağı *Elaeıis guineensis* olarak bilinen Malezya, Batı ve Orta Afrika ile Endonezya'da ekimi yaygın olarak yapılan yağlı meyvenin pulp kısmından elde edilen yağdır. Palm meyvesi özellikle hasat ve işleme sırasında kuvvetli enzimatik hidroliz reaksiyonlarına maruz kaldığından bazı durumlarda palm yağının serbest yağ asidi içeriğı % 50'ye kadar yükselmektedir (72).

Yağ asidi oranları (%):

Miristik asit: 0,5-6

Palmitik asit: 32-45

Stearik asit: 2-7

Oleik asit: 38-52

Linoleik asit: 5-11 (72).

Palm yağı genellikle eşit miktarda doymuş ve doymamış yağ asitlerini içerir. Hiperkolesterolemik yağ asitleri olan laurik ve miristik asidi önemsiz miktarda içerir. TDYA'dan zengin sayılabilir ve kâfi miktarda linoleik asit içerir. Bununla birlikte bol miktarda β -karoten (provitamin A) ve E vitamini içerir. Trans yağ asidi içermez. Ancak ısı ile birlikte palm yağında oksidasyon ve toksik ürünlerin oluşumunu da içeren muhtemel bozulmalar meydana gelir (11).

Palm yağı % 38-52 oleik, % 5-11 linoleik asit içeriğı ile oleolinoleik grubu yağlar arasında yer almaktadır. Palm yağının doymuş yağ asitlerinden palmitik asit içeriğı ise % 32- 45 arasında değişmektedir. Yarı katı haldeki palm yağında

doymamış yağ asitlerinin % 85' den fazlası gliserol molekülünün 2- pozisyonunda yer almaktadır.

Palm yağının % 0,2- 1,0 arasında değişen sabunlaşmayan maddelerinin % 0,03- 0,15' ini karotenoidler, % 0,003- 0,11' ini tokoferoller, % 0,03- 0,10' unu steroller, % 0,05- 0,10' unu fosfatidler, % 0,08' ini alkoller oluşturmaktadır (71).

Groot ve ark. ratların radyoaktif işaretli retinol içeren palm yağı ve ayçiçek yağı ile beslenilmesiyle yaptıkları çalışmada post prandial serum TAG konsantrasyonu değerlendirilmiştir. Plazma TAG konsantrasyonu palm yağı ile beslenenlerde ayçiçek yağı ile beslenenlerden daha yüksek bulunmuştur. Ancak diğer bazı çalışmalarda öne sürüldüğü gibi palm yağı gibi çok doymuş yağların daha yavaş sindirildiğine dair bir bulguya rastlanılmamıştır. Postprandial TAG ve radyoaktif işaretli retinil esterleri birlikte değerlendirildiğinde palm yağı ile beslenen ratlarda görülen TAG yüksekliğinin ŞMR'ların dolaşımdan uzaklaştırılmasının gecikmesiyle ilgili değil TAG katabolizmasının daha yavaş olmasıyla ilgili olduğu gösterilmiştir. Çünkü ayçiçek yağı ile beslenen ratlarda post heparin plazma lipoprotein lipaz seviyesi daha yüksektir (74).

2.7.4. Tereyağı

Süt yağı yağ asidi kompozisyonu (%):

Bütirik asit: 3,84

Kaproik asit: 2,28

Kaprik asit: 3,36

Laurik asit: 3,83

Miristik asit: 11,24

Palmitik asit: 32,24

Stearik asit: 11,06

Oleik asit: 21,72

DYA: 71,24

TDYA: 25,56

ÇDYA: 10,49 (75).

Tereyağı yağ asidi ve TAG kompozisyonuna göre en kompleks besinsel yağdır. Yüksek konsantrasyonda oleik ve palmitik asit içerir. Önemli miktarlarda laurik, miristik ve stearik asit ve diğer yağ asitlerini içerir. Tereyağı TAG'leri başlıca 1- ve 2- pozisyonunda palmitik, miristik ve stearik asit ve 3- pozisyonunda bütirik asit bulunan uzun zincirli doymuş yağ asitlerinden oluşur (54).

Süt TAG'leri alışılmadık bir yağ asidi konformasyonuna sahiptir. Bitkisel yağlardaki palmitik asit TAG'ün 1,3- pozisyonuna yerleşmişken oleik ve linoleik asit gibi doymamış yağ asitleri 2- pozisyona yerleşmiştir. Süt yağında ise palmitik asit çoğunlukla (%70) TAG'ün 2- pozisyonuna yerleşmiştir. Yine süt yağında oleik ve linoleik asidin önemli bir kısmı ile araşidonik asidin yarısı ve DHA TAG'ün 1 ve 3- pozisyonuna esterleşmiştir (76).

2.7.5. Hidrojenize Nebati Yağ

Margarin, sertleştirilmiş yağ, su, süt fazı ve katkı maddelerinden oluşan bir emülsiyondur. Su fazı, margarinde yağ fazı içinde dağıtılmış haldedir. Türk Gıda Kodeksine göre sürülebilir yağlar veya margarin, İnsan tüketimine uygun bitkisel ve/veya hayvansal yağlar ve/veya süt yağından elde edilen temel olarak yağ içinde su emülsiyonu tipinde, süt ve/veya süt ürünleri içerebilen şekillendirilebilir ürün grubu olarak tarif edilmektedir.

Margarin ağırlıkça en az % 80, en fazla % 90 oranında yağ içeriğine sahip olmalıdır. Margarinler içerdikleri yağ oranına göre tam,dörtte üç yağlı, yarım yağlı“%....” yağlı olarak ifade edilir. Yağ oranına göre margarinler bitkisel yağ kökenli (bitkisel margarin) ve hayvansal yağ kökenli (süt yağlı margarin) olmak üzere ikiye ayrılır. Ancak günümüzde hayvansal kökenli margarin üretimi sadece özel amaçlar için yapılmaktadır (71).

2.7.6. Balık yağı

Balık yağının yağ asidi kompozisyonu, elde edildiği balığa göre değişmekle birlikte;

Balık yağı yağ asidi oranları (%):

Miristik asit: 4,3-9,2

Palmitik asit: 10,0-14,8

Stearik asit: 1,0-2,5

Palmitoleik asit: 4,3-11,9

Oleik asit: 9,4-10,3

11c-eikozanoik asit: 1,1-14,7

Erusik asit: 0,2-24,5

Linoleidik asit: 1,5-1,9

Linolenik asit: 0,9-2,6

Araşidonik asit: 0,8-2,0

Aykozaapentaenoik asit (EPA): 4,2-14,1

Dokozaheksaenoik asit (DHA): 4,0-10,2'dir (77).

İnce dudaklı kefallerin yağ asidi analizinin yapıldığı çalışmada tüm yağ gruplarında temel yağ asitlerinin palmitik asit (% 17-20), stearik asit (% 7-9), oleik asit (% 6-7), araşidonik asit (% 1'den az), EPA (% 12-13) ve DHA (% 13-18) olduğu gösterilmiştir (78). Balık yağındaki ÇDYA'ler genellikle TAG'ün 2- pozisyonunda ve TDYA (palmitoleik asit ve oleik asit) sıklıkla 1-pozisyonunda yerleşmiştir. Bununla birlikte çok uzun zincirli TDYA'leri 3- pozisyonunda yerleşmiştir (79).

Balık yağındaki aktif moleküller olan omega-3 yağ asitleri, aykozapentaenoik asit (EPA) ve dokozaheksaenoik asit (DHA)'dır. Etkileri oldukça güçlü olan bu moleküllerin aterosklerotik damar hastalıklarına karşı muhtemel etkileri 1980'lerden beri araştırılmaktadır. Bu etkilerin bazıları direk lipit metabolizması ile ilgili, bazısının ise lipit dışı mekanizmalar aracılığı ile ilgili olduğu gösterilmiştir (80). İn vitro çalışmalar balık yağının yararlı etkilerini desteklemektedir ancak in vivo çalışmalar yeterince tutarlı değildir ve etkileri daha çok ω -3 yağ asitlerine bağlanmaktadır (5).

Balık yağlarında bulunan uzun zincirli ω -3 yağ asitleri normal ve hiperkolesterolemik kişilerde plazma açlık TAG ve VLDL konsantrasyonlarını

düşürmektedir. ω -3 yağ asitleri bu etkiyi ya ŞM'ların dolaşıma girmesini yavaşlatarak yada dolaşımdan çok hızlı temizlenmesini sağlayarak veya her ikisiyle birlikte sağladığı ileri sürülmektedir (81).

Besinleriyle birlikte ω -3 yağ asidi alanlarda postprandial ŞM ve VLDL TAG'ünün % 40 azaldığı gösterilmiştir (81). EPA ve DHA, DYA ile karşılaştırıldığında postprandial TAG oranında % 15-17 azalmaya neden olmaktadır. ŞM'ların kandan uzaklaştırılma oranı DHA ve EPA ilavesiyle önemli ölçüde artmaktadır. Balık yağlarının eklenmesi PL/TG oranında azalmaya neden olmaktadır. Bu durum ŞM büyüklüğünün azaldığının göstergesidir. ŞM çapının EPA verildiğinde % 53 ve DHA verildiğinde ise % 24 azaldığı gösterilmiştir. Pre-heparin lipoprotein lipaz aktivitesinde, tokluk durumunda DHA ile beslenilmesi % 47, EPA ile beslenilmesi % 73 artışa neden olmaktadır. Balık yağları ayrıca açlık TAG konsantrasyonunu hapatik VLDL üretimini inhibe ederek de azaltmaktadır (82). Günde 2 gramdan fazla balık yağı alındığında, normal deneklerde % 25, hiperlipidemik deneklerde % 40-50 oranında VLDL'de düşmeye neden olduğu gösterilmiştir. EPA, Apo B oluşumunu azaltarak ŞM sekresyonunu azaltır. Balık yağları, infarkt boyunu küçültür, kan dolaşımını sağlar ve aritmiyi modifiye eder. Endotel bağımlı arter dilatasyonunu sempatik aktivite ve norepinefrinin vasokonstriktör etkilerini inhibe ederek artırır (80). Uzun süreli ω -3 takviyesinin primer şilomikronemisi olan hastalarda serum TAG ve açlık ŞM sayısını düşürdüğü ve plazma vizkozitesini düzenlediği gösterilmiştir (83).

Ancak Haris ve ark. ω -3 yağ asitlerinin ŞM üretimini azaltmadığı ve partikül büyüklüğünü değiştirmedeğini ileri sürmüştür. ŞM'un plazmadan temizlenme hızının arttığını ancak ŞMR'ların karaciğer tarafından alınma hızının değişmediğini, bu nedenle temizlenme hızındaki artışın damarlardaki lipoliz artışıyla ilişkili olduğunu gösterdikleri çalışmada, EPA ve DHA verilen ratlarda bu yağ asitleri hem ŞM'un FL'lerinde hem de TAG'lerinde önemli ölçüde arttığını gösterilmiştir (84).

Günde 0,5 ila 1,8 gr EPA+DHA tüketiminin kalp ve diğer sebeplerden kaynaklanan ölüm oranını önemli ölçüde azalttığı, rat ve köpeklerde kalp dokusunda kalp krizi sonrasında meydana gelen hasarı azalttığı ve ventriküler ritim bozukluklarının önüne geçtiği bildirilmiştir. Balık yağlarının ICAM-1'i (intraseküller

adhezyon molekülü-1) ve E-selektini azalttığı ve DHA'nın in vitro olarak VCAM-1 (vasküler hücre adhezyon molekülü) ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (85).

ω -3 yağ asitlerinin hipolipidemik etkileri ve prostoglandin salgısındaki değişimler, trombosit fonksiyonları, büyüme faktörleri inhibisyonu ve endotel kaynaklı relaksasyon faktörlerinin artması gibi antitrombotik etkileri ile birlikte koroner kalp hastalıklarının ve diğer aterosklerotik hastalıkların kontrolü için önemli bir potansiyel role sahiptir (86).

2.8. Besinlerdeki Yağ Asidi Kompozisyonunun ŞM Metabolizması Üzerine Etkisi

ŞM'un büyüklüğü prensip olarak onun TAG miktarıyla bağlantılıdır. Besinsel lipitlere cevap olarak ŞM büyüklüğü ve kompozisyonu değiştikçe bu TAG'den zengin lipoproteinlerin plazmadan temizlenmesi de değişmektedir.

Yağın doymuşluğunun ŞM büyüklüğüne olan etkisi yeterince açık değildir. Bazı çalışmalar doymamış yağların emilimi ile oluşan TAG'den zengin lipoproteinlerin doymuş yağların emilimi ile oluşanlar ile karşılaştırıldığında daha büyük ŞM'ların oluşmasına neden olduğunu gösterirken (2, 50) başka birtakım çalışmalar doymuşluğun partikül büyüklüğü üzerine bir etkisinin olmadığını göstermektedir (87).

Hayvan modellerine duodenal infüzyon ile yağ asitlerinin verilip lenf lipoproteinlerinin toplandığı birçok çalışmada, palmitik asit infüzyonunun VLDL ve ŞM lipoproteinlerinin üretimini stimüle ettiği ve linoleik asit infüzyonunun daha büyük ŞM'lar üretilmesini sağladığı gösterilmiştir. ÇDYA'dan zengin beslenildiğinde oluşan ŞM çapları, DYA ya da karışık yağlarla beslenildiğinde oluşan ŞM'lardan daha büyüktür (9).

Tereyağı ŞM'larının, mısır yağı ŞM'larına göre daha yüksek FL:TAG oranına sahip olduğu gösterilmiştir. Bu durum tereyağı infüzyonu sonunda mısır yağı infüzyonu ile oluşanlardan daha küçük boyuttaki ŞM'ların oluştuğunun göstergesidir. Çünkü ŞM'ların FL/TAG veya yüzey çekirdek oranı partikülün büyüklüğünü değerlendirme olanağı sağlamaktadır. (2).

Mekki ve arkadaşlarının çalışmasında zeytinyağı ve ayçiçek yağı verilen deneklerden elde edilen ŞM'ların çapları arasında fark bulunmamıştır. Ancak tereyağı verilen deneklerden elde edilen ŞM'ların çapları diğer iki yağdan elde edilen ŞM'lar ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde küçük olduğu bulunmuştur (127-134 nm) (50).

Besinsel TDYA tüketimi boyutları büyük ve sayıca daha az ŞM sentez edilmesine neden olur. Bu partiküller daha yüksek miktarda besinsel lipit taşır. Remnant lipoproteinlerin sayıca azalması ateroskleroz açısından faydalı etkilere neden olabilir (4).

Hurma yağı (DYA), Saffloweroil (yalancı safran, ω -6 ÇDYA), zeytin yağı (TDYA) ve safflower yağı ve balık yağı karışımı (ω -3 ÇDYA) içeren diyetler ile yapılan çalışmada, apo B-48 salgısının zeytinyağı ile beslenenlerde diğer yağlarla beslenenlere göre önemli derecede yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu TDYA'dan zengin beslenildiğinde küçük ŞM'ların daha fazla sayıda üretildiğini göstermektedir. TDYA daha uzun süre verildiğinde apo B-48 azalmakta ancak ŞM'lardaki TAG içeriğinde bir değişiklik olmamaktadır. Bu daha az miktarda üretilen ancak daha büyük partikül çapı olan ŞM'ları gösterir. Yani TDYA içeren besinler ŞM büyüklük ve kompozisyonunu değiştirmektedir (9). TDYA beslenilmesi, DYA ile karşılaştırıldığında, ŞM partiküllerinin büyüklüğünü % 50 oranında artırırken sayıları azaldığı gösterilmiştir. Büyük ŞM'ların içindeki TAG daha görülebilir olduğundan dolaşımdan çok daha çabuk uzaklaştırılabileceği ileri sürülmektedir (88).

Normal enterosit hücreleri emilen TAG miktarından bağımsız olarak belli bir sayıda ŞM partikülü salgırlar. Şayet büyük miktarda lipit intestinal mukozadan emilirse enterosit daha fazla sayıda ŞM'lar sentez etmez ama var olan partiküllerin çapı büyür. Örneğin palmitik asit, linoleik asit ile karşılaştırıldığında lenfatik TAG salınımı benzer olduğu halde oldukça fazla miktarda apo B salgılanır, yani daha küçük ve daha fazla sayıda partikül sentezlenmiştir (2).

Kalogeris ve ark. besinsel yağ asidi çeşidinin lenf akış oranına etkili olmadığını, bütün yağ asitlerinin lenfatik akış hızını arttırdığı ancak akış hızını arttırmada yağ asitleri arasında farklılık olmadığını göstermiştir. Ancak çalışmada lenfatik TAG çıkışı beslenen yağ asidi çeşidine göre farklılık göstermiştir. Miristik, oleik ve araşidonik asit TAG çıkışını arttırırken bütirik, kaprilik ve laurik asit TAG

çıkışında artış yapmadığı belirlenmiştir. Yine aynı çalışmada içinde FL bulunmayan lipid infüzyonları ratlarda tüm yağ asidi grupları, lenfatik FL çıkışını arttırmıştır ancak 14 ve daha uzun karbon uzunluğuna sahip yağ asitleri daha yüksek FL çıkışına neden olmuştur (40).

Tereyağı, zeytinyağı ve ayçiçeği yağına göre önemli ölçüde daha az ŞM üretilmesine neden olmaktadır. Bu üç yağın verilmesi ile oluşan ŞM'ların içerdikleri TAG miktarları ölçüldüğünde en düşük TAG miktarı tereyağı için tespit edilmiştir. Ayçiçek yağı ŞM'larında tereyağına yakın bir TAG miktarı tespit edilmişken, zeytinyağı verilen deneklerden elde edilen ŞM'larda en yüksek oranda TAG bulunmuştur (50).

Genellikle yağ asitleri şu sıra ile postprandial TAG artışına yol açarlar, $DYA = TDYA > \omega-6 \text{ ÇDYA} > \omega-3 \text{ ÇDYA}$ (9).

Caco-2 hücre kültür modelleri ve hayvan enterosit model sistemlerinin kullanıldığı çalışmalarda TAG sentezini arttırması açısından diyetdeki yağ asitlerinin sırası şöyledir, oleik > linoleik > linolenik > palmitik = myristik asit. Palmitik asitin TAG'in de nova sentezini baskıladığı gösterilmiştir. Oleik asit / palmitik asit oranının yükseltilmesi TAG üretimini arttırma nedeni olmaktadır. Ayrıca palmitik asit fizyolojik konsantrasyonlarda bile caco-2 hücreleri için potansiyel sitotoksik etkileri gösterilmiştir. Sonuç olarak doymuş yağ asitlerinin ŞM sentez ve sekresyonu üzerinde doymamış yağ asitlerinden daha az etkili olduğu ileri sürülmüştür (9).

Farklı besinsel yağların içerdiği farklı yağ asit kompozisyonlarının enterositlerin foksiyonlarını değiştirdiği ileri sürülmektedir. Tavşan enterositlerinde apo B-48, KE ve TAG sentez ve sekresyonu en fazla ayçiçek yağı tarafından arttırılırken en az artış balık yağı ile beslenenlerde gözlenmiştir. Ayçiçek yağı ile beslenen tavşanların enterositlerinde apo B-48 sentezi on kat ve sekresyonu 18 kat arttığı gösterilmiştir (89).

Williams ve ark. ayçiçek yağı, klasik batı diyeti ve balık yağı ile 2 hafta süre ile beslenen tavşanlarda; apo B-48, TAG ve KE sentez ve sekresyon oranlarını, ayçiçek yağı > batı diyeti > balık yağı olarak göstermiştir (9).

İntestinal K infüzyonları ile yapılan çalışmada, ŞM'ların K içeriği doğrudan infüze edilen K miktarıyla doğru orantılı olarak bulunmuştur. K mısır yağı ve tereyağında FL:TAG oranını etkilememiştir. Ancak zeytinyağı ile birlikte verilen K

FL:TAG oranını arttırmıştır. Tereyağı, mısır yağı ve zeytinyağına göre daha düşük TAG içeren ve oransal olarak daha yüksek FL içeriğine sahip ŞM'ların sentezine sebep olmuştur. ŞM içerisindeki toplam K oranı, bütün K dozları için en fazla tereyağında ve en az mısır yağında tespit edilmiştir (90).

Zeytinyağı, mısır yağı, balık yağı, palm yağı ve tereyağı verilerek elde edilen, K'ü ve oleatı radyoaktif işaretli ŞMR'lar ile yapılan çalışmada; balık yağı ve tereyağından elde edilen ŞMR'lar diğer üç yağ ile elde edilenlerden % 25 daha fazla dolaşımdan uzaklaştırılmıştır. Zeytinyağı ve mısır yağının uzaklaştırılması birbirine yakındır. Palm yağının uzaklaştırılma oranı ise bu iki grubun ortasındadır. Bu durum yağ asitlerinin kendine has etkilerinin, kombinasyonlarının ve remnant TAG'ündeki pozisyonlarının karaciğer tarafından alımın için doymuşluk veya doymamışlık derecesinden çok daha önemli olduğunu destekler. Örneğin diğer remnantlar ile karşılaştırıldığında hem balık yağında hem de tereyağında yüksek miktarda miristik asit vardır. Bu yağ asidi muhtemelen karaciğer alımını artırıyor olabilir.

Balık yağı remnantlarındaki işaretli yağ asitlerinin karaciğerde FL dönüşümü zeytinyağı, mısır yağı ve palm yağı remnantlarından önemli ölçüde daha fazladır. Tereyağı remnantlarının yağ asitlerinin FL dönüşümü ise ortadadır. KE'lerinin karaciğerde hidrolizi her bir yağdan elde edilen remnantların karaciğer tarafından alınmasıyla doğru orantılı olarak gerçekleşmektedir. İşaretli K'lerin safra ile atılımı palm yağında diğer yağlardan % 50 daha azdır.

Bütün bu bulgular ŞMR'ların yağ asidi kompozisyonunun onun karaciğer tarafından alınmasında ve metabolizmasında en büyük etken olduğunu göstermektedir (91).

Yeni sentez edilmiş olan bir TAG'den zengin lipoprotein partikülünün lipoprotein lipaz tarafından hidrolize edilebilirliği onun yağ asidi ve TAG kompozisyonu ile yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir. Partikül içindeki yağ asitlerinin miktarı, doyma derecesi ve zincir uzunluğu lipoprotein lipaz aktivitesi üzerine etkilidir. ω -6 ÇDYA'dan zengin ŞM'lar, DYA, TDYA veya ω -3 ÇDYA'dan zengin ŞM'lara göre lipoprotein lipaz tarafından çok daha hızlı işlenmektedir (4).

Mevcut bilgiler besinlerdeki yağ asitlerinin ŞM sentez ve sekresyonunu üzerine hem akut hem de kronik etkilerini ortaya koymaktadır. Doymuş yağ asitleri

ile kıyaslandığında doymamış yağ asitleri çok daha fazla sayıda ŞM (oleik) ve daha büyük ŞM (linoleik) oluşmasını neden olduğu gösterilmiştir. Bu TAG'deki spesifik yağ asidi kompozisyonunun MTP aktivitesini etkileyebileceğini ve oleik asitten zengin TAG'lerin linoleik ya da palmitik asitten zengin TAG'lere oranla MTP aktivitesini daha fazla arttırdığını akla getirmektedir. Ayrıca TDYA ve ÇDYA'dan zengin TAG'ler düz ER lümenindeki lipit damlalarının fizikokimyasal özelliklerini değiştirerek lipit damla oluşumunu etkilemesi muhtemeldir. Bu yağ asitleri daha stabil lipit damla formlarının oluşmasına neden olabilir. Ya da enterosit içinde lipit damla oluşumuna katılan ve lipoproteinlerin oluşumunda belirleyici anahtar bir rol oynaması muhtemel bazı spesifik proteinler, besinler ile alınan bazı yağ asitleri ile etkileşmektedirler. Böylece yağ asitleri, bu proteinlerin transkripsiyonal düzenlenmesinde düzenleyici bir rol oynuyor ve ŞM'ların boyutlarını değiştiriyor olabilirler (9).

2.9. Besinlerdeki Yağ Asidi Kompozisyonunun Şilomikronların Fiziksel Özellikleri Üzerine Etkisi

Plazma lipoproteinlerinin metabolik akıbeti fiziksel özelliklerinden önemli ölçüde etkilenmektedir (92). Lipit kompozisyonu ise lipoproteinlerin fiziksel özelliklerini belirleyen önemli faktörlerden biridir. Lipoproteinlerin lipit kompozisyonu, protein konformasyonunun oluşumunda, lipoproteinlerin enzimlere karşı reaktivitesinin belirlenmesinde ve reseptörlere bağlanmasında önemli rollere sahiptir. Lipolitik reaktiviteyi regüle eden yüzey özelliklerindeki farklılıklar yüzey kompozisyonunun bir fonksiyonudur. İnsan plazma lipoproteinlerinde yüzey akışkanlığının, protein + K / FL oranı ile ters orantılı olduğu ve akışkanlığın artması ile fosfolipaz A₂'ye karşı reaktivitenin arttığı belirlenmiştir (93).

Lipoproteinin yüzey akışkanlığının azalmasının, LDL'in hepatik membranlara bağlanmasını geciktirdiği ancak HDL'in bağlanmasını etkilemediği gösterilmiştir, yani LDL'in yüzey akışkanlığındaki azalma, in vivo LDL katabolizmasını geciktirebilmektedir (94). Tavşanlarda, K ile beslenilmesi VLDL ve LDL akışkanlığını dramatik bir şekilde azaltırken, HDL akışkanlığını değiştirmemektedir (95). Kadınlarda HDL akışkanlığı erkekler ile karşılaştırıldığında

daha yüksek bulunmuştur. Bu durum kadınlar arasında daha düşük kalp hastalığı insidansının fizikokimyasal temelini desteklemektedir. Kadınlarda, dolaşımdaki daha akışkan HDL'lerin periferel dokulardaki K'ün taşınması için daha yetenekli olabileceği ve böylece aterosklerotik lezyonların önlenmesinde etkili olabileceği ileri sürülmektedir (96). Tavşanlarda ω -3 yağ asitleriyle beslenilmesinin, doymuş yağ asitleriyle karşılaştırıldığında HDL'in yüzeyinde belirgin bir fark oluşmadığı ancak apolar merkezinde belirgin şekilde düzensizliğin arttığı gösterilmiştir (97). Bununla birlikte besinsel olarak alınan linoleatın yetişkin erkeklerde, LDL akışkanlığını etkili bir şekilde azalttığı, bununda lipoprotein yüzeyindeki apolipoprotein konformasyonunu ve böylece LDL'in LDL reseptörü ile etkileşimini etkileyebileceği bildirilmiştir (98).

2.10. Misel Yapı ve Lipoprotein Hidrofobikliği

Bir lipoprotein yapısal olarak TAG ve KE'lerinden oluşan hidrofobik bir merkez ve bunun etrafını sarmış amfipatik FL ve serbest K ile bunların arasındaki proteinlerden oluşur. Yüzeydeki FL'lerin ve serbest K'ün polar baş kısımları partikülün dışına doğru yerleşmişken hidrofobik nonpolar kuyruk kısımları partikülün içine doğru uzamıştır. Lipoproteinlerin bu yapısı klasik bir misel yapısına uymaktadır.

Miseller genellikle 50-200 sürfaktan molekülün bir araya gelmesiyle oluşan, büyüklüğü ve biçimi geometrik ve enerjetik faktörler tarafından belirlenen yapılardır (99). Misellerin yapısının stabil olmadığı ve hızla değiştiği gösterilmiştir. Düzensiz bir şekilde bir arada duran oktil gruplarının hidrofobik kuyruk kısımları normalde miselin içine doğru uzamıştır ancak bu kuyruk kısımları misel yüzeyinde anlık değişimlere maruz kalır (100). Küçük küresel misellerin yüzey alanının hesaplanması da misellerin termodinamik olarak stabil olmadığını gösterir. Bu miseller büyük yüzey / hacim oranına sahiptir. Çünkü her zincir çıkıntısı 100 Å'dan fazla alan sağlar ve bu nedenle büyük bir yüzey/ hacim oranı sağlanmış olur. Bu durum baş grupları arasında, su ve hidrokarbonların teması için önemli bir boşluk oluşturmaktadır (101). Hidrofobik baş gruplarının haricinde misel yapısının başka bir önemli karakteristiği misel içine doğru oluşan su fazı penetrasyonlarıdır. Hidrofobik baş gruplarına komşu

olan ilk birkaç metilen grubu hidrasyon küresi sayılır. Bu nedenle miselin iç kısmı suyun nüfuz ettiği bir dış merkez ve tamamen suyun ulaşamadığı bir iç merkez şeklinde 2 kısım olarak ele alınabilir (102). ŞM partiküllerinin de aynı şekilde stabil olmayan yüzey yapısı ile birlikte anlık değişimler, girinti ve çıkıntı oluşumları göstermesi beklenebilir.

Misel yapısı ve moleküler şekillenmesi konsantrasyon, ısı, pH ve elektrolit içerik gibi çevresel şartlar ve bununla birlikte sürfaktanın yapısına bağlı olarak farklı geometrilerde olabilmektedir. Yapısal olarak başlıca küresel miseller, veziküller, bilayer ya da ters misellere rastlanmaktadır (102, 99).

ŞM'ların yapısı küresel misel yapısı ile uyum göstermektedir. ŞM partikülünün yüzeyindeki apolipoproteinler ve diğer proteinler ile aslında partikül merkezine doğru uzamış olan ancak muhtemel partikül yüzeyinde anlık çıkış-girişler yapan hidrofobik kuyruk kısımları, partiküle belirli bir yüzey hidrofobikliği sağlayabilir.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu araştırma, İnönü Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2008/72 proje numarası ile desteklenmiştir.

Bu çalışma İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı ve Eczacılık Fakültesi Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. GEREÇLER:

3.1.1. Kimyasallar:

Kullanılan kimyasallar tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2: Kullanılan kimyasallar ve firmaları.

KİMYASAL	FİRMA
Na-Azid	Merck
Na-EDTA	Merck
Triton-X 100	Sigma
Oil Red O	Sigma
Sodyum Hidroksit	Riedel-de Haen
Sodyum Karbonat	Sigma-Aldrich
Di-Na-Tartarat	Merck
Agaroz M	Bio.Basic Inc.
Sodyum dodesilsülfat	Merck
Etanol	Riedel-de Haen
Bakır (II) sülfat pentahidrat	Sigma-Aldrich
Glasiyal asetik asit	Merck
Folin-ciocalteu's fenol ayırıcı	Sigma-Aldrich
Bütil sefaroze 4 (fast flow)	Sigma-Aldrich
Sefaroz CL-2B 300-100 mL	Sigma-Aldrich
Sefaroz CL-4B 200-100 mL	Sigma-Aldrich
Sefaroz CL-6B 200-100 mL	Sigma-Aldrich

3.1.2. Diğer Gereçler:

- 1) Ultrasantrifüj tüpü: Beckman Optiseal Polyallomer ultrasantrifüj tüpleri (25x86 mm, toplam hacmi 36,2 mL) Cat No: 362183
- 2) Lumber punksiyon kanülü
- 3) 1, 2.5, 5 ve 10 mL'lik enjektörler
- 4) Vida kapaklı cam tüp
- 5) Tıpa kapaklı cam tüp
- 6) Parafilm
- 7) 10, 100, 1000 µl'lik pipet uçları.

3.1.3. Makine Teçhizat:

- 1) Ultrasantrifüj cihazı: Beckman Coulter Optima™ L-90K Ultracentrifuge
- 2) Elektroforez cihazı: Bio RAD POWER-PAC 3000
- 3) Düşük Basıncılı Kolon Kromatografi Cihazı: Bio RAD Biologic LP
- 4) Spektrofotometre: UV-120V Spectrophometer-Shimadzu
- 5) Vorteks: Heidolph-Reax_{top}
- 6) Santrifüj: HERMLE Labortechnik GmbH
- 7) Otoklav: BINDER
- 8) Derin Dondurucu (-70 °C): HERAfreeze/HERAEUS

3.1.4. Deney Hayvanlarının Temini ve Bakımı

Ratlar, Turgut Özal Tıp Merkezi, Deneysel Araştırmalar Birimi ve Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi Deneysel Araştırmalar Birimi'nden temin edildi. 250–300 gr ağırlığındaki Sprague Dawley erkek ratlar kullanıldı. Ratlar sıcaklığın 21°C ve ortam neminin % 48 olduğu, 12 saat ışık (07:30-19:30 saatleri), 12 saat karanlık uygulanan odalarda bakıldı. Tüm hayvanlar ad libitum standart yem ve su ile beslendi. Yemin kompozisyonu tablo 3'de belirtilmiştir.

Tablo 3: Ratların yem kompozisyonu.

Su	En çok	% 12
Ham Protein	En az	% 24
Ham Selüloz	En çok	% 7
Ham Kül	En çok	% 8
HCl’de Çözünmeyen Kül	En çok	% 2,0
NaCl	En çok	% 1,0
Kalsiyum	En az-En çok	% 1,0-2,8
Fosfor	En az	% 0,9
Sodyum	En az-En çok	% 0,5-0,7
Metabolik Enerji Kcal/kg	(En az)	2.650

Kullanılan maddeler: Mısır, buğday, soya küspesi, fındık küspesi, melas mayası, ayçiçeği tohumu küspesi, pamuk tohumu küspesi, mısır proteini, rasmol, et-kemik unu, balık unu, kan unu, D.C.P. (dicalcium phosphate), tuz, mermer tozu, melas, tapiyoka, sorgum, kolza küspesi, sentetik lizin, sentetik metiyonin, premiksler, kepek, süt tozu.

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. Deney Gruplarının Oluşturulması

Çalışmada altı farklı yağ kullanıldığından her yağ için en az 3 adet rattan oluşan 6 deney grubu oluşturuldu. Ratlara yağ verilmeden torasik lenf kanülasyonu mümkün olmadığından çalışmamızda kontrol grubu kullanılmamıştır. Farklı yağlardan elde edilen ŞM’lara ait veriler birbirleri ile kıyaslanmıştır. Torasik lenf kanülasyonu invaziv ve zor bir işlem olduğundan her kanülasyon operasyonu başarı ile sonuçlandırılmamıştır. Ayrıca başarılı olarak sonuçlandırılan operasyonların sonrasında tüm hayvanlarda numune toplanamamıştır. Toplam 24 adet rat kullanılmıştır. Çalışmanın 26/01/2009 tarih ve 2008/16 araştırma protokol numarası ile etik kurul onayı alınmıştır.

3.2.2. Yağların Gavaj Yolu ile Verilmesi

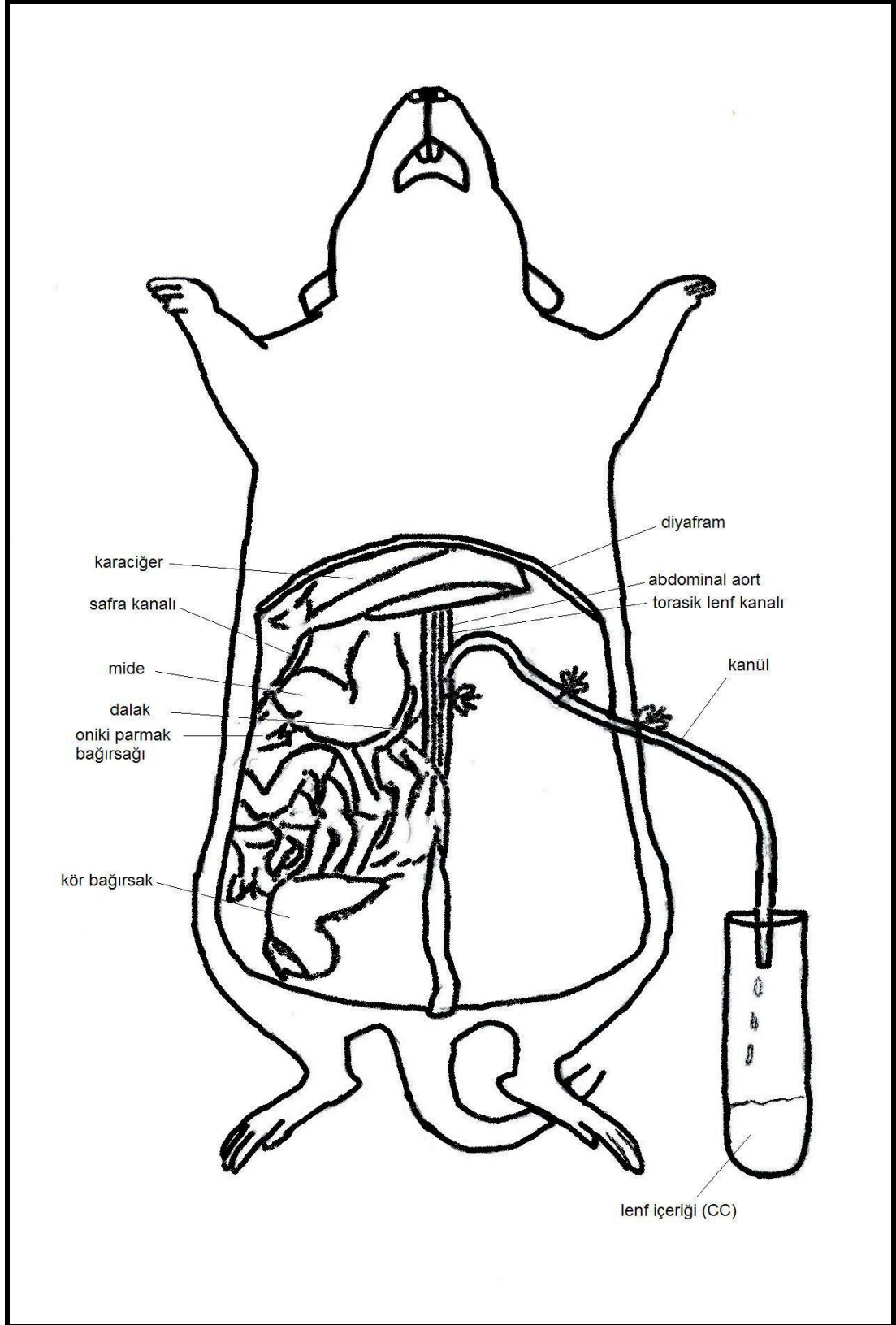
Çalışmamızda ayçiçeği yağı, zeytinyağı, palm yağı, tereyağı, margarin yağı ve balık yağı kullanılmıştır. Altı saat süre ile aç bırakılan ratlara, 1,5 mL deneyde kullanılan yağ, antioksidan olarak 15 µg E vitamini (Evigen, Aksu Farma) eklenerek mide gavajı ile verildi. 1 saat sonra anestezi işlemi gerçekleştirildi.

3.2.3. Anestezi

İntraperitoneal yolla, 0.05 mg/kg dozda atropin (Atropin Sülfat Biofarma 0,50 mg/mL) enjekte edildi. 5 dk beklendikten sonra 6 mg/kg xylocaine (Rompun® %2 Enjeksiyonluk Çözelti, Bayer) ve 90 mg/kg ketamin (Alfamine % 10, Alfasan International B.V., Ege Vet.) karışımı intraperitoneal olarak enjekte edildi.

3.2.4. Torasik Lenf Kanalı Kanülasyonu ve Lenf Sıvısının Toplanması

Karın duvarı sol tarafı, son kostalara paralel hat boyunca yaklaşık üç cm açıldı. Karın iç organları ratın sağ tarafına doğru alınarak karın boşluğunun arka duvarı ortaya çıkarıldı. Yana alınan iç organlar vücut ısısında serum fizyolojik ile ıslatılmış gazlı bez ile örtüldü. Kurudukça tekrar ıslatıldı. Karın boşluğunun arka duvarında, vertabraların önünde aorta abdominalis hissedildi. Dikkatli bir şekilde üstündeki dokular temizlenerek aort ortaya çıkarıldı. Aortun hemen arkasında, aorta paralel şekilde torasik lenf kanalı uzanmaktadır. Operasyonun bir saat öncesinde rata yağ yedirildiğinden, lenf içeriği ile dolarak belirgin hale gelen torasik kanal, aort ile arasındaki dokular temizlenerek ortaya çıkarıldı. Torasik kanalın etrafından iplik (ipek, 0/4) geçirilerek, üzerine iridektomi makası ile kanülün geçebileceği küçük bir kesi yapıldı. Çapı 1,52 mm olan polietilen kanül buradan kanala sokulduktan sonra geçirilmiş olan iplik ile ligatür atılarak sabitlendi. Kanül karın duvarında bir noktaya ve karın boşluğunun çıkışında deriye birer kez daha sabitlendi (şekil 11). Yana alınmış olan iç organlar tekrar yerine yerleştirildikten sonra, karın duvarı schmieden dikişle, deri ise basit ayrı dikişle dikilerek karın boşluğu kapatıldı (103).



Şekil 11: Torasik lenf kanalı kanülasyonu.

Tarafımızdan tasarlanarak yaptırılan kafes yardımı ile ratın hareketi kısıtlandı. Torasik lenf kanalı içeriği 24 saat boyunca ampisilin (0,05 mg/mL lenf sıvısı), Na-EDTA (10 mL saline içine 25 mg Na-Azid eklenerek hazırlanan solüsyonundan 5 µl) ve Na-Azid (5 ml saline içine 1 gr Na-Azid eklenerek hazırlanmış solüsyondan 5 µl) eklenmiş deney tüpüne biriktirildi (104, 105). Bu süre boyunca ad libitum su verildi ve masa lambası ile ratın vücut ısısı korundu.

Operasyonun ertesi günü sabahı, tüm ratlara servikal dislokasyon tekniği ile ötenazi yapıldı.

3.2.5. ŞM'ların Lenf Sıvısından Ultrasantrifügasyonla Ayrılması

24 saatin sonunda 2 mL ve daha fazla lenf içeriği toplanan örnekler çalışmaya dâhil edildi. Ultrasantrifüj tüpleri hava kabarcığı kalmayacak şekilde tabaka solüsyonu ile dolduruldu. Tabaka solüsyonu; % 0,9 NaCl içine % 0,02 Na-Azid ve % 0,05 Na-EDTA (104) eklenerek hazırlandı. Her tüpün en alt kısmına uygun uzunluktaki enjektör kullanılarak 1'er mL numune tabaka yapıldı. Numunelerin yoğunluğuna göre her numune için tabaka yapılacak ultrasantrifüj tüpü sayısı belirlendi. Hazırlanan tüpler uygun kapakları ile kapatılarak kurutuldu ve uygun rotora (Beckman, Type 70 Ti Rotor) yerleştirildi. Ultrasantrifüj şartları Dole ve ark. (22) makalesindeki nomogram kullanılarak hesaplandı. Numuneler 5×10^5 gmin, 20 °C'de (20000 RPM 'de, 17 dk) santrifüj edildi. Başlangıç ve bitiş için 'slow break' ayarı seçildi.

Santrifüj sonunda tüp üzerinde toplanan ŞM'lar yeşil uçlu, 5 mL'lik enjektör ile alınarak cam tüpe toplandı, tartıldı ve etiketlendi. Ayçiçeği yağından elde edilen ŞM'lar AYC, zeytinyağından elde edilen ŞM'lar ZYC, palm yağından elde edilen ŞM'lar PLMC, tereyağından elde edilen ŞM'lar TRYC, margarinden elde edilen ŞM'lar MRGC ve balık yağından elde edilen ŞM'lar BLKC olarak kodlandı.

3.2.6. Hidrofobik İnteraksiyon Kromatografisi (HIC) Prensibi

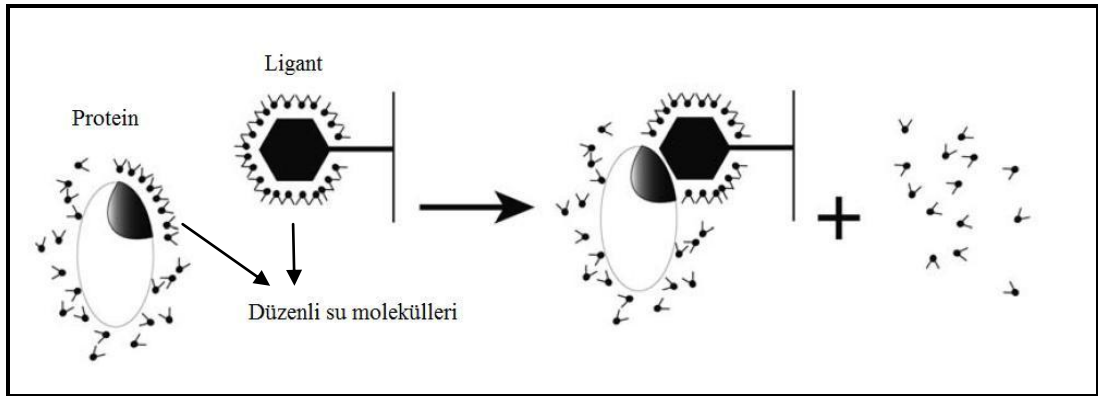
Kromatografi bir örnek karışımındaki çözünmüş moleküllerin iki fazda (sabit ve hareketli faz) dağılımlarına dayanan fiziksel bir ayırma yöntemidir.

Kromatografik ayırım yönteminde hareketli faz, örneği sabit fazı içeren yatak düzlem veya kolon boyunca taşımaktadır. Hareketli faz, sabit fazın içinden geçtikçe çözünmüş moleküller iki faz arasında dağılırlar. Sabit faza daha az ilgisi olan çözünmüş yapılar, daha çok ilgisi olanlara oranla hareketli fazda daha uzun süre kalırlar. Düşük ilgisi olan çözünmüş moleküller daha hızlı hareket ederek sabit faza daha çok ilgisi olan çözünmüş moleküllerden ayrılırlar. Hareketli fazın fiziksel veya kimyasal özelliklerinin değiştirilmesiyle sabit faza kuvvetli bir şekilde bağlanmış olan çözünmüş moleküller yerlerinden ayrılırlar (106).

HIC, proteinler ve HIC ortamının hidrofobik yüzeyi arasındaki etkileşim kullanılarak proteinleri yüzeylerinin hidrofobik karakterlerindeki farklılıklara göre birbirinden ayırmak için kullanılan bir yöntemdir. Bir proteinin HIC ortamına tutunması hareketli faza eklenen tuz, proteinin yapısal esneklik gibi fiziksel özellikleri, molekül kütlesi ve konformasyonel stabilitesine bağlıdır (107).

HIC ortamı (durgun faz), alkil ya da aril gruplarının bağlı olduğu ve yüksek bir dahili yüzey alanı sağlanması için porlu yapıda küresel partikül matriksten oluşur. Su içindeki hidrofobik bir ligant ve hidrofobik bir proteinin etrafını düzenli su molekülleri sarmaktadır. Ligant ve proteinin birbirine bağlandığı noktada su molekülleri ayrılır ve etrafa dağılır. Bu durum entropinin artmasına neden olur ve böylece sistemin serbest enerjisini negatife doğru değişir. Serbest enerjideki bu değişim hidrofobik bir ligant-protein etkileşimini termodinamik olarak elverişli kılar. HIC sisteminde hidrofobik ligant ve çözünmüş madde düzenli su molekülleri tarafından kabuk gibi kapatılmıştır. Tampon solüsyonuna (hareketli faz) tuz eklenmesi su molekülleri ile güçlü bir şekilde etkileşerek su kabuğunu zayıflatır. Bu sayede HIC ortamının ligantı ve çözünmüş hidrofobik maddeler birbirleriyle etkileşime girerek birleşirler (şekil 12). Başka bir teoriye göre ise eklenen tuzun suyun yüzey gerilimini arttırmasıyla birlikte van der Waals güçleri ligand-madde birleşmesinden sorumludur. Ek olarak küçük iyonların yük maskeleyici etkileri ile ilişkili ve entropik sebepler de ileri sürülmüştür. Ancak bu mekanizmaların üst üste binmiş kombinasyonları muhtemelen daha uygun bir teoridir. Mobil faz içindeki tuz konsantrasyonu azaltıldıkça ortama bağlanmış en düşük hidrofobikliğe sahip madde HIC kolonundan ilk önce ayrılarak elue olur. Tuz konsantrasyonu kademeli olarak azaltılmaya devam edilirse düşük hidrofobiklik sırasına göre maddeler elue olurlar.

En yüksek hidrofobikliğe sahip madde en son elue olur. Mobil faza modifiye edici ajan olarak deterjan eklenmesi, mobil fazın polaritesini değiştirir, suyun yüzey gerimini azaltır ve böylece hidrofobik etkileşimi azaltarak ligant-madde ayrılmasına neden olur. Deterjan moleküllerinin nonpolar kısmı etkili bir şekilde liganda bağlı madde ile yarışır ve sonucunda maddeyi ayırarak ortama kendisi bağlanmaktadır (108, 109, 110).



Şekil 12: HIC ortamındaki hidrofobik bir ligant ile hidrofobik bir proteinin etkileşimi (110).

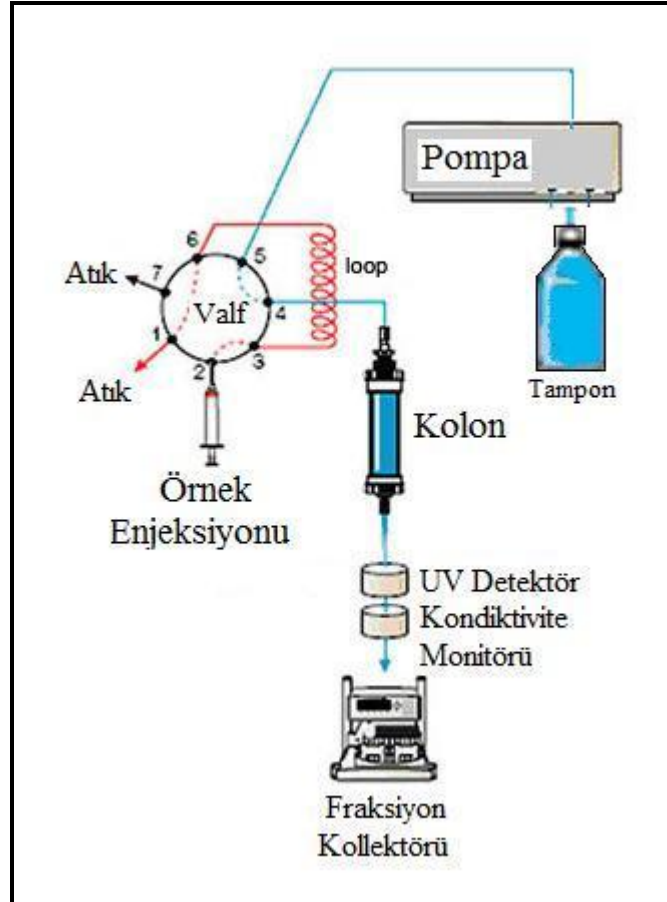
3.2.6.1. Kolonun Doldurulması

1cm çapında ve 30 cm uzunluğunda cam kolon kullanıldı. Kolon % 20 süzölmüş etanol solüsyonu ile yıkandıktan sonra alt 2 cm'lik kısmı % 20 etanol ile dolduruldu. Kolon mediumu cam çubuk kılavuzluğunda hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek dolduruldu. Kolonun bir gece +4 °C'de bekletilerek çökmesi sağlandı.

3.2.6.2. Kolonun Dengelenmesi ve Numune Enjeksiyonu

Kolon, oda ısısına getirildikten sonra kromatografi sistemine bağlandı. Mobil faz olarak Triton X'in farklı konsantrasyonları kullanıldı. % 0,1 Triton X-100, 1mL/dk akış hızı ile 30 dk kolondan geçirilerek kolonun hidrofobik etkileşimi zayıflatıldı. Sonra mobil faz % 0,0125 Triton X-100 ile değiştirildi ve 2 saat akış sağlanarak kolonun dengelenmesi sağlandı. Akış hızı 0,6 mL/dk'ya düşürüldü ve 15

dk akış sağlandı. Bu akış hızında numune enjeksiyonları yapıldı. 100 ile 600 μ l arasındaki farklı miktarlarda numune enjeksiyonları yapılarak en uygun kromatogramlar elde edilmeye çalışıldı. Pik fraksiyonları, elektroforeze uygulanmak üzere fraksiyon kollektörü ile toplandı (Şekil 13).



Şekil 13: Düşük basınçlı kolon kromatografi sisteminde yer alan ekipmanlar (111 nolu kaynaktan Türkçeleştirilmiştir).

3.2.6.3. Kolonun Yıkınması ve Saklanması

Kullanımına ara verilen kolonlar 1mL/dk akış hızı ile 1 saat distile su ve 30 dk % 20 etanoldan geçirildikten sonra bir sonraki kullanıma kadar + 4 °C’de saklandı. Bir sonraki kullanımda kolonun etanoldan temizlenmesi amacıyla, kolon önce 1 saat distile su ile yıkandı. Daha sonra dengeleme işlemi yapıldı.

3.2.6.4. Veri Analizi

Kromatografi verileri, LP Data View v1.03 Bio-Rad Düşük Basıncılı Kolon Kromatografisi Programı kullanılarak analiz edildi.

3.2.6.5. Kapasite Faktörlerinin Hesaplanması

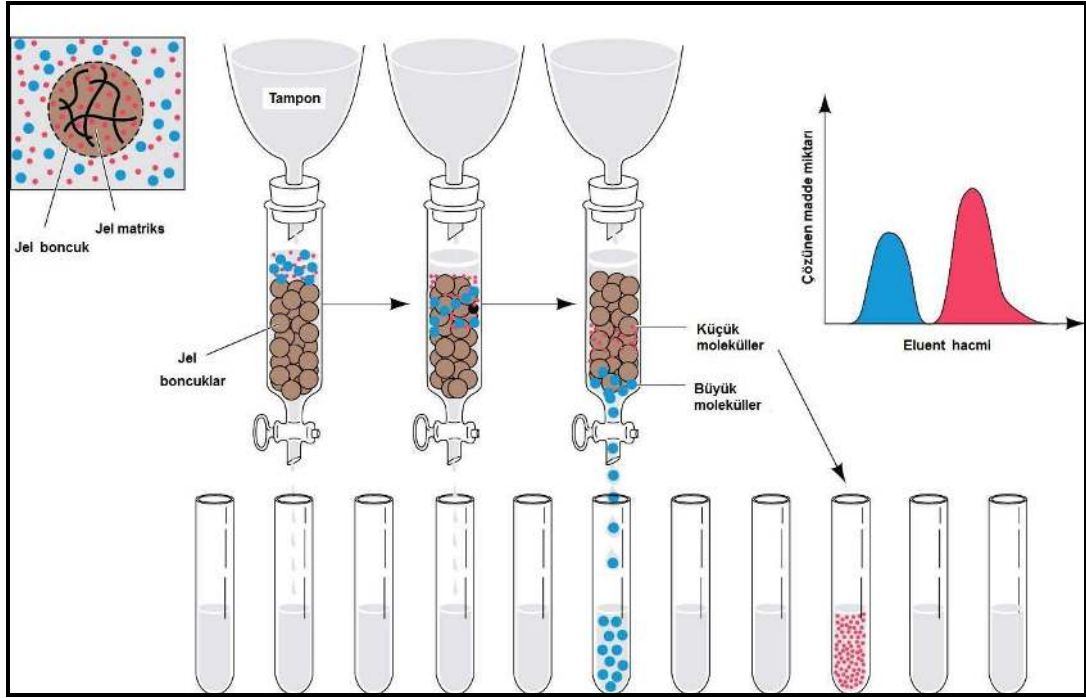
Pik tepe noktası, bir bileşiğe ait pikin en yüksek noktasıdır. Bu nedenle bir pikin tepe noktası o pike ait elüsyon zamanına veya elüsyon hacmine eşittir. Elüsyon süresi (alıkonma, gecikme) (t_R), enjeksiyon noktası ile bir pikin tepe noktası arasında geçen süredir. Uygulanan deneysel koşullar altında her bir analitin elüsyon süresi karakteristiktir. Şekil 14’de tüm kromatografi terminolojisi bir kromatogram üzerinde gösterilmiştir.

Herhangi bir kromatografik sistemde etkili bir şekilde ayrıştırılan moleküller zamanla, aynı kromatografik sistemin kullanılmasında dahi kromatografiden kromatografiye farklı elüsyon zamanlarında (t_R) elüe edilebilirler. Bu farklılıkların temel nedenleri operasyondaki akış oranının, hareketli fazın ve diğer parametrelerin değişmesidir. Böyle durumlarda ‘kapasite faktörünün (k)’ tanımlanması ile operasyondaki farklılıkların giderilmesi sonucunda alıkonma zamanlarının normalleştirilmesi sağlanabilir. Herhangi bir birimi olmayan kapasite faktörü, analitin durgun faz içinde geçirdiği zamanın hareketli faz içinde geçirdiği zamana göreceli olarak ölçümüdür ve ‘ $k = t_R - t_0 / t_0 = V_R - V_M / V_M$ ’ formülü ile hesaplanır (112). Elde edilen piklerin alıkonma sürelerinin birbirleriyle karşılaştırılabilirmeleri amacıyla kapasite faktörleri hesaplandı.

3.2.6.6. Pik Alan Oranlarının Hesaplanması

HIC ortamı ile etkileşime giren madde miktarını değerlendirmek amacıyla, piklerin yarı yükseklik genişliği ve pik yüksekliği (şekil 13) çarpılarak pik alanları hesaplandı.

belirecektir. Daha küçük moleküller ise gözenekli jel materyalinin içindeki ve dışındaki hareketli faz arasında dağılacaklar ve gözenekler arasına diffüze olacaklardır. Bu nedenle gözeneklerin içerisine girebilen küçük moleküller, kolonun içinden daha yavaş bir hızla geçebileceklerdir. Bundan dolayı, kolondan ayrılan eluent içinde en son olarak en küçük moleküller yer alacaktır (112)



Şekil 15: Jel Filtrasyon Kromatografi sisteminde büyük ve küçük moleküllerin birbirinden ayrılması (113 nolu kaynaktan Türkçeleştirilmiştir)

Sefaroz CL-2B, CL-4B ve CL-6B ortamları kullanılarak jel filtrasyon kromatografik analizleri yapıldı. CL-2B % 2, CL-4B % 4 ve CL-6B % 6 agaroz boncuk içerir. Kullanılan ortamların por büyüklükleri, sefaroze CL-2B > sefaroze CL-4B > sefaroze CL-6B şeklindedir. AYC ve PLMC numuneleriyle, hem tritonun hem de fosfat bufferın mobil faz olarak kullanıldığı denemeler yapıldı.

3.2.8. Agaroz Jeli Elektrofrez Prensibi

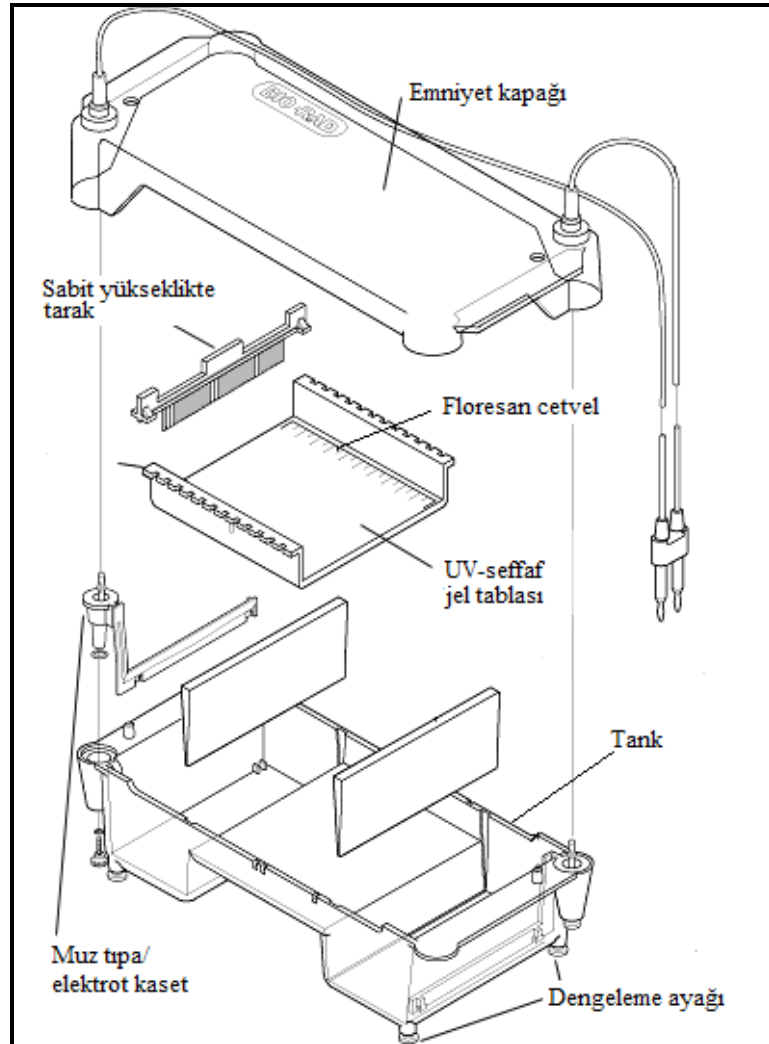
Yüklü partiküllerin bir elektrik akımının tesiri ile birbirlerinden ayrılması olayına 'elektrofrez' adı verilir. Yüklü moleküllerin destek ortamı üzerinde hareket

kabiliyetine ‘elektroforetik mobilite’ denir. Mobilite partiküllerin yükü ile doğru orantılı, partiküllerin molekül ağırlığı ve ortamın vizkozitesiyle ters orantılıdır.

Ayrıca elektriksel alanın şiddeti ve ortamın sıcaklığı da mobilitayı etkiler.

Destek maddesi olarak bir karbonhidrat polimeri olan agaroz veya agaropektin kullanılarak yapılan elektroforeze ‘Agaroz Jeli Elektroforezi’ denir. Bu maddelerin proteinlere ilgisi çok az olduğundan protein bantları birbirinden iyi ayrılır. Şekil 16’de bir agaroz jel elektroforezinin temel aparatları gösterilmiştir.

Elektroforezin yapılışı; uygulama, yürütme, boyama, temizleme, şeffaflaştırma ve değerlendirme basamaklarından oluşur (114).



Şekil 16: Agaroz jel elektroforezi aparatları (115 nolu kaynaktan Türkçeleştirilmiştir).

3.2.8.1. Jelin Hazırlanması ve Dökülmesi

a) TBE Tamponun Hazırlanışı

121,1 mg tris base, 55,55 mg borik asit ve 3,8 mg EDTA karıştırılarak, toplam hacim distile su ile 1000 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan çözeltiden 200 mL alınıp distile su ile 2000 mL'ye tamamlandı.

b) Jelin Hazırlanması

Gerekli denemeler yapıldıktan sonra numunelerimiz için en uygun jel konsantrasyonunun % 0,8 olduğu tespit edildi. 180 mL TBE tampon (pH: 8,0) solüsyonu erlen içine konuldu ve üzerine 1,44 gr agaroz eklendi ve tartıldı. Isıtıcı manyetik karıştırıcı üzerinde 2 taşım kaynatıldı. Tekrar tartıldı ve buharlaşma sonucu oluşan kayıp distile su ile tamamlandı. 55-60 °C'ye soğutulduktan sonra cihazın tankına 10 mm - 1 mm boyutlarındaki tarak yerleştirildi ve jel döküldü.

c) Numunelerin Uygulanması

Elektroforezin haznesi TBE tampon ile dolduruldu. Kalıp halinde soğuyan jelden tarak çıkarıldı ve jel hazne içine yerleştirildi. Üzeri max. çizgisine kadar TBE tampon ile tamamlandı. Elektroforez kuyucuklarına uygulanacak numunelerin kuyucuklardan çıkıp dağılmaması için 65 µl numune, 15 µl % 40 süktroz ile karıştırılarak yoğunlukları artırıldı.. Bu karışımdan rat ve insan serumu, kanülasyon sonucu elde edilen numune ve ultrasantrifüjden çıkan numune yoğun olduklarından 30 µl, kromatografiden çıkan fraksiyon numuneleri 50 µl olarak jeldeki kuyucuklara pipet ile ekildi. Elektroforez haznesinin üst kapağı yerleştirildikten sonra, 130 W'da 2 saat elektroforez işlemine devam edildi.

d) Fiksasyon

Fiksasyon solüsyonu; 70 mL etanol alınarak distile su ile 100 mL'ye tamamlandı. 5 mL asetik asit alınarak hazırlanmış olan % 70'lik etanol solüsyonu ile 100 mL'ye tamamlanarak fiksasyon solüsyonu hazırlandı.

İki saatin bitiminde vakit geçirilmeden jel hazneden alındı, uygun boyutta kesildi ve fiksasyon solüsyonu içerisinde 90 °C'deki otoklavda 40 dk bekletildi.

e) Boyama

Elektroforeze uygulanan numunelerin görünür hale getirilmesi amacıyla oil red O boyası kullanıldı. Distile su ile hazırlanmış % 60'lık etanol solüsyonundan 100 mL bir erlen içine konularak üzerine 400 mg oil red O eklendi. Erlenin içine balık atılarak ağzı parafilm ile hava almayacak şekilde kapatıldı. Etrafı ışıktan korumak amacıyla aliminyum folyo ile sarıldı ve 3–4 saat karıştırıcı ile karıştırıldı. Süzgeç kâğıdı ile süzüldü. Fiksasyondan çıkan jel bu boyaya alındı ve 60 °C'deki otoklavda 24 saat bekletildi.

f) Destaining (fazla boyadan arındırma)

Boyadan çıkarılan jel fazla boyalarının uzaklaştırılması amacıyla destaining solüsyona (% 10 asetik asit çözeltisi) alındı ve bu çözeltide bekletildi. Jel yeterince temizleninceye kadar bu işlem tekrarlandı. Hazır hale gelen jel elektrofotogramların fotoğrafları çekildi.

3.2.9. Vorteksleme ile Agregasyon Testleri

Farklı yağlardan elde edilen ŞM'ların agregasyon davranışlarını karşılaştırmak amacıyla farklı şartlarda vorteks denemeleri yapıldı. Belli oranda seyreltilen numunelerin öncelikle hiçbir şartı değiştirilmeden vorteks ile egregasyon analizi yapıldı. Tüm agregasyon analizlerinde ultrasantrifüjden çıkan taze numune genellikle 1/40 oranında sulandırıldı. Daha seyreltik numuneler için 1/30, 1/20 ve

1/10 sulandırma oranları kullanıldı. 2 mL sulandırılmış numune spektrofotometrede 400 nm’de suya karşı okundu. Daha sonra deney tüpü içerisinde 1 dk şiddetli vortekslendi, tekrar spektrofotometrede okundu. Bu işlem 14 kez tekrar edildi.

Daha sonra misel yapısına etki eden faktörler olan ısı, pH ve tuz konsantrasyonları değiştirilerek turbidite analizlerine devam edildi.

Numunelerden 2’şer mL tüplere alınarak, biri +4 °C’de ve diğeri -5 °C’de 24 saat bekletildi. 24 saatin sonunda çıkarılan numuneler spektrofotometrede 400 nm’de suya karşı okundu. 1 dk vortekslendi tekrar okundu, bu işlem 5 kez tekrar edildi.

a) Asit-Baz Eklenerek Yapılan Agregasyon Testi

Her numune için 3 tüp alındı. Her birine 2’şer mL sulandırılmış numune eklendi. Spektrofotometrede 400 nm’de suya karşı okundu. Daha sonra tüplerden birine 250 µl 0,1 N HCl, diğeri 250 µl 0,1 N NaOH ve 3. tüpe 250 µl distile su eklendi, son tüp blank olarak kullanıldı. Tüpler 5 dk. beklendikten sonra spektrofotometrede tekrar okundu. Tüpler daha sonra 1 dk vortekslendi, tekrar okundu. Bu işlem her bir tüp için 4 kez tekrar edildi.

b) Tuz Eklenerek Yapılan Agregasyon Testi

Deney tüpüne 2 mL sulandırılmış numune konuldu. Spektrofotometrede 400 nm’de okundu. Daha sonra içine 1 N olacak şekilde 117 mg NaCl eklendi. Tüp elde hafif hareketler ile oynatılarak tuzun erimesi sağlandı, tekrar okundu. 1 dk vortekslendi tekrar okundu. Bu işlem 4 kez tekrar edildi.

c) Sulandırılarak Yapılan Agregasyon Testi

İki deney tüpüne; 1. tüpe 1/40 ve 2. tüpe 1/70 oranında sulandırılmış numune konuldu. Spektrofotometrede 400 nm’de okundu. Her bir tüp 1 dk vortekslenip tekrar okundu. Bu işlem 4 kez tekrar edildi.

3.2.10. Biyokimyasal Analizler

3.2.10.1. Lowry Metodu ile Protein Analizi

Protein miktar tayininde Lowry metodu kullanıldı. Bu metod, proteinin yapısında bulunan tirozin ve triptofan aminoasitlerinin fosfotungustat kompleksini molibden mavisine indirgemesi esasına dayanır (116).

a) Kullanılan Solüsyonlar

Solüsyon A: % 2 Sodyum karbonat
 % 0,4 Sodyum hidroksit
 % 0,16 Sodyum tartarat
 % 1,0 SDS

Solüsyon B: % 4 Bakır sülfat pentahidrat

Folin ciocalteu fenol solüsyonu: Kullanılacağı zaman 1:1 oranında sulandırıldı.

Solüsyon C: 1 kısım Solüsyon B ve 100 kısım Solüsyon A karıştırılarak hazırlandı.

b) Analizin Yapılışı

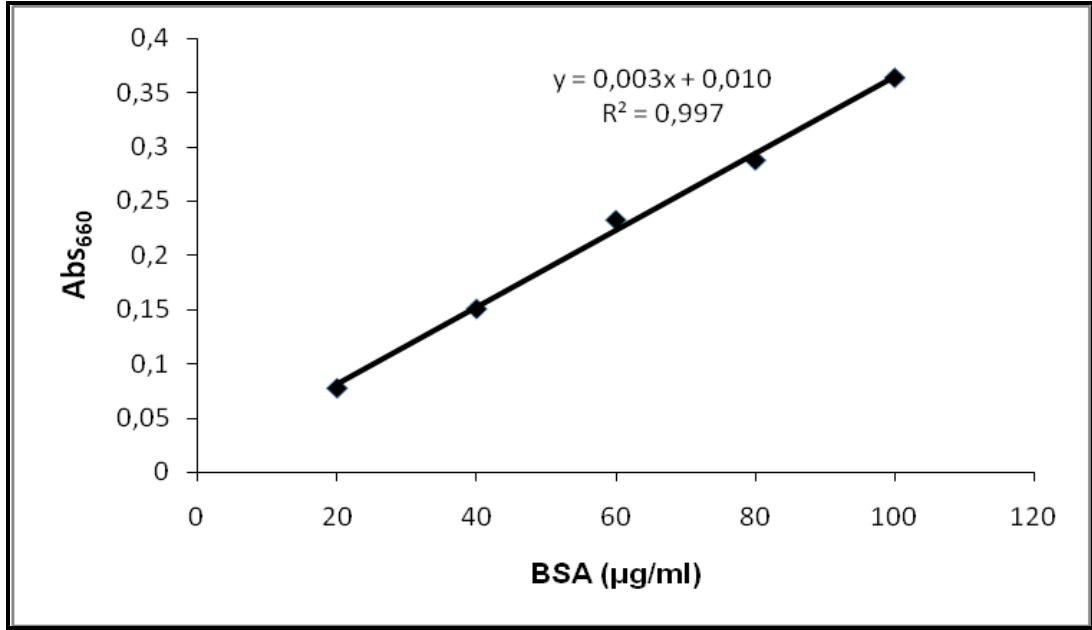
Cam deney tüpünde 1 mL numune ve 3 mL Solüsyon C karıştırıldı ve 30 dk oda ısısında ve karanlıkta inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında tüpe 0,3 mL 1:1 oranında sulandırılmış Fenol solüsyonu eklendi, şiddetli şekilde kısa bir süre vortekslendi ve 45 dk oda ısısında ve karanlıkta inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra tüpe 4 mL kloroform eklendi. Kapağı kapalı şekilde 30 sn vortekslendi. 1000 x g'de 20 dk sentrifüj edildi. Tüplerin üstte kalan tabakaları atıldıktan sonra alt kısımları spektrofotometrede blank'e karşı 660 nm'de okundu (tablo 4).

Tablo 4: Lowry metodu deney protokolü.

	Blank	Standart	Numune
Distile su	1 mL	---	---
Standart	---	1 mL	---
Numune	---	---	1 mL
Solüsyon C	3 mL	3 mL	3 mL
	Tüpler karıştırılır sonra oda ısısında ve karanlıkta 30 dk inkübasyona bırakılır.		
1:1 dilüe Folin ciocalteu fenol sol.	0,3 mL	0,3 mL	0,3 mL
	Tüpler kuvvetli bir şekilde vortekslendikten sonra oda ısısında ve karanlıkta 45 dk inkübasyona bırakılır.		
Kloroform	4 mL	4 mL	4 mL
	Tüpler 30 sn vortekslendikten sonra 1000 x g'de 20 dk santrifüj edilir. Üst tabaka atıldıktan sonra alt tabaka blank'e karşı spektrometrede 660 nm'de okunur.		

c) Standart Hazırlanması

Standart olarak BSA (bovine serum albumin) kullanıldı. 0,05 gr BSA tartıldı ve 50 mL distile su içine karıştırılarak stok solüsyonu hazırlandı. Stok solüsyonunun 1 mL'sinde 1 mg BSA bulunur. Bu solüsyon kullanılarak 20 µg/mL, 40 µg/mL, 60 µg/mL, 80 µg/mL ve 100 µg/mL'lik çözeltiler hazırlandı. Protein standart grafiği şekil 17'de gösterilmiştir.



Şekil 17: Protein standart grafiği.

d) Hesaplama:

Standart konsantrasyonlarının absorbanlarına bölünmesiyle elde edilen faktör kullanılarak numunelerin protein konsantrasyonları µg/mL olarak hesaplandı.

3.2.10.2. Fosfor Analizi

Fosfor analizi, Zhou ve Arthur'un yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Bu yöntem fosfomolibdenum ve malachite yeşili arasında kompleks oluşumu temeline dayanır (117).

a) Ekstraksiyon

2:1 oranında kloroform-metanol çözeltisi hazırlandı. %1'lik nitrik asit ile yıkanıp 100 °C'deki etüvde kurutulmuş cam tüplere 0,3 mL numune eklendi ve üzerine 6 mL (numune miktarının 20 katı) kloroform-metanol karışımı eklendi. Karıştırıldı ve 30 dk. bekletildi. Üzerlerine 2,4 mL (eklenen kloroform-metanol miktarının 2/5'i kadar) 0.03 M HCl eklendi. Karıştırıldı ve 2 saat beklenildi. 1000 x g'de 10 dk santrifüj edildi. Alt faz ŞM numuneleri ve CC numuneleri için 0,6 mL,

fraksiyon numuneleri için 1 mL ayrılarak oda ısısında cam deney tüpü içerisinde 1 gün uçması için bekletildi. İçindeki sıvı tamamen uçmuş olan tüplere 0,2 mL HClO_4 eklendi, tüplerin üzerleri cam misketler ile kapatılarak $180\text{ }^\circ\text{C}$ 'deki etüvde 30 dk bekletildi (tablo 5).

b) Kullanılan Çözeltiler

Solüsyon A: % 0,4 Malachite yeşili manyetik karıştırıcı ile 30 dk şiddetli şekilde karıştırılarak hazırlandı.

Solüsyon B: 5 M HCl içine % 4,2 amonyum molibdat eklendi ve manyetik karıştırıcı ile 30 dk şiddetli şekilde karıştırılarak hazırlandı.

Solüsyon C: %1,5 Tween 20 manyetik karıştırıcı ile 30 dk şiddetli şekilde karıştırılarak hazırlandı.

Solüsyon D: 1 kısım Solüsyon B ve 3 kısım Solüsyon A karıştırıldı ve manyetik karıştırıcı ile 30 dk şiddetli şekilde karıştırıldı ve süzgeç kağıdı ile süzülerek hazırlandı.

Çalışma solüsyonu: Kullanılacağı zaman 1 kısım Solüsyon C ve 32 kısım Solüsyon D karıştırıldı, manyetik karıştırıcı ile 30 dk şiddetli şekilde karıştırılarak hazırlandı.

c) Analizin Yapılışı

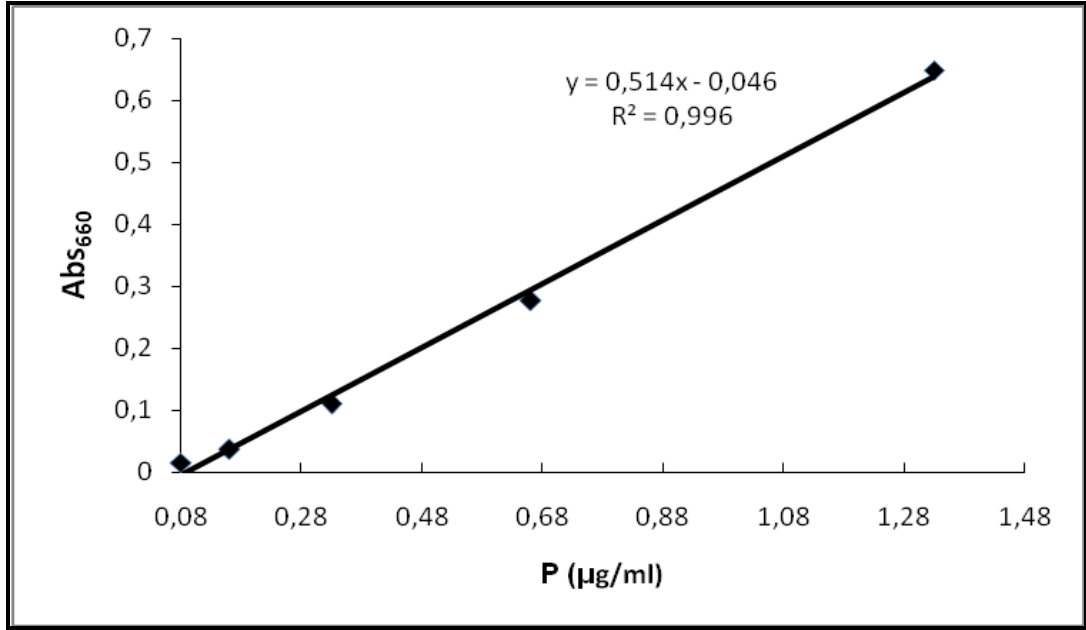
Etüvden çıkarılan tüplere soğuduktan sonra 0,2 mL distile su ve 2 mL çalışma solüsyonu eklendi. Her bir tüp 30 sn vortekslendi. 20 dk beklendikten sonra spektrofotometrede blank'e karşı 660 nm'de okundu (tablo 5).

Tablo 5: Fosfor analizi deney protokolü.

	Blank	Standart	Numune
Distile su	0,3 mL	---	---
Standart	---	0,3 mL	---
Numune	---	---	0,3 mL
Kloroform:metanol sol. (2:1 v/v)	6 mL	6 mL	6 mL
Tüpler karıştırıldıktan sonra 30 dk bekletilir.			
0,03 M HCl	2,4 mL	2,4 mL	2,4 mL
Tüpler karıştırılır ve 2 saat bekletilir. 1000 x g'de 10 dk oda ısısında sentrifüj edilir. Alt faz oda ısısında cam deney tüpü içerisinde 1 gün bekletilerek içindeki sıvı tamamen uçurulur.			
HClO ₄	0,2 mL	0,2 mL	0,2 mL
Tüplerin üzerleri cam misketler ile kapatılarak 180 °C'deki etüvde 30 dk bekletilir.			
Distile su	0,2 mL	0,2 mL	0,2 mL
2 mL çalışma sol.	2 mL	2 mL	2 mL
Tüpler 30 sn vortekslenir, 20 dk beklendikten sonra spektrofotometrede blank'e karşı 660 nm'de okunur.			

d) Standart Hazırlanması

KH₂PO₄ standart solüsyon hazırlanmasında kullanıldı. 439 mg KH₂PO₄ 1 L suya karıştırıldı. Bu solüsyon 20 kez sulandırılarak stok solüsyon hazırlandı. Stok solüsyon 100 µg P/mL içerir. Stok solüsyonundan 0,08 µg/mL, 0,10 µg/mL, 0,33 µg/mL, 0,66 µg/mL ve 1,33 µg/mL'lik çözeltiler hazırlandı. Şekil 18'de fosfor analizi standart grafiği gösterilmiştir.



Şekil 18: Fosfor analizi standart grafiği.

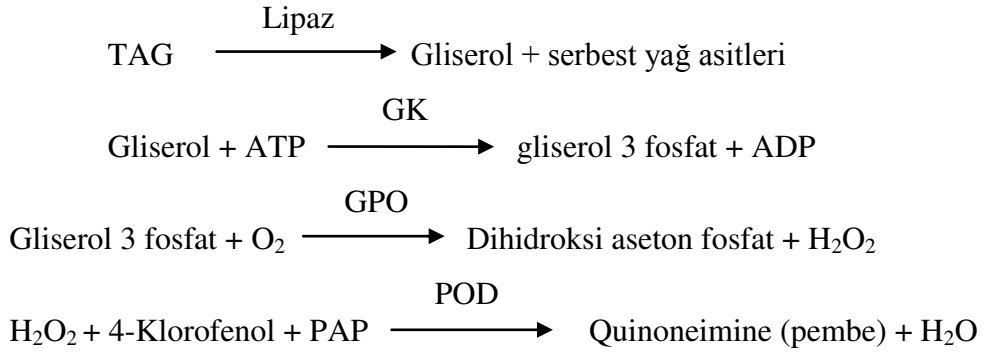
e) Hesaplama:

Standart konsantrasyonlarının absorbanlarına bölünmesiyle elde edilen faktör kullanılarak numunelerin P konsantrasyonları µg/mL olarak hesaplandı.

3.2.10.2. Triaçilgliserol Analizi

a) Prensip

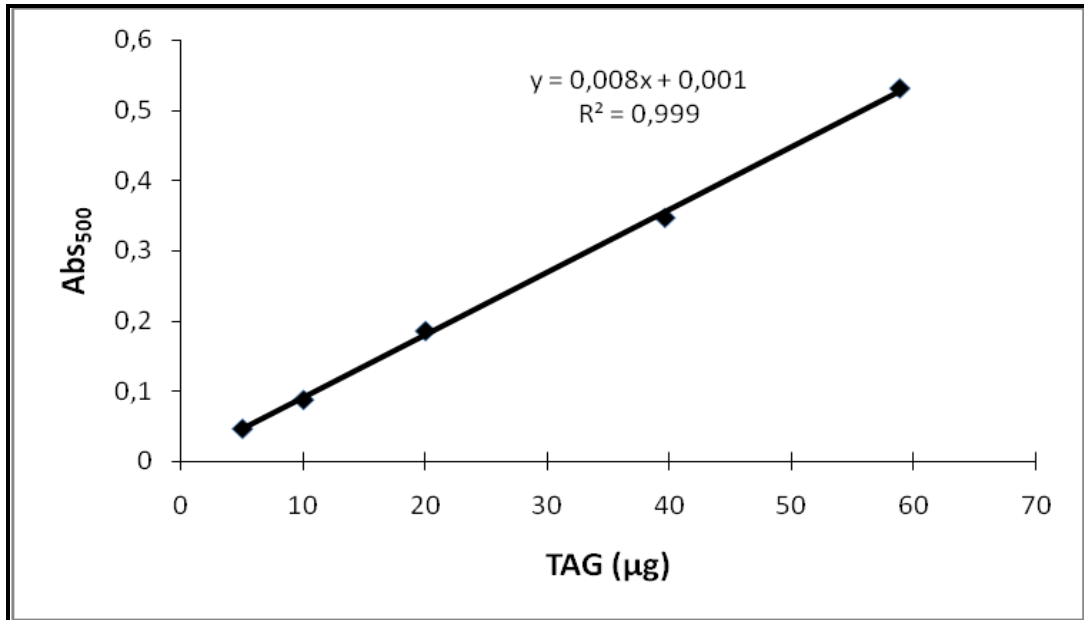
Numunelerin TAG miktarları hazır TAG ölçüm kiti (Bilabo SA, 02160, Maizy, France) ile yapıldı. Numunde içindeki TAG, lipaz ile etkileşerek gliserol ve serbest yağ asitlerine hidroliz edilir. Daha sonra gliserol, gliserol kinaz (GK) tarafından kataliz edilen bir reaksiyonla, gliserol-3-fosfata ve adenzin-5-difosfata (ADP) fosforile edilir. Gliserol-3-fosfat daha sonra gliserol fosfat oksidaz (GPO) tarafından dihidroksiaseton fosfata ve hidrojen peroksit'e dönüştürülür. Hidrojen peroksit, peroksidaz tarafından katalize edilen bir reaksiyonla kırmızı renkli kinon boyası elde etmek üzere 4-amino-antiprin (PAP) varlığında 4-klorofenol ile reaksiyona girer. 500 nm'de spektrofotometrede okunduğunda, oluşan pembe rengin yoğunluğu numune içerisindeki triaçilgliserol konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.



b) Analizin Yapılışı ve TAG Standart Grafiğinin Çizimi

Analizin lineeritesinin test edilmesi amacıyla kit içerisinde bulunan ve 200 mg/dl TAG içeren standart solüsyon kullanıldı. Standart grafiği çizimi için 1'er mL test ayırıcı üzerine 5 µg, 10 µg, 20 µg, 40 µg ve 60 µg TAG eklendi. Hafifçe karıştırıldıktan sonra oda ısısında 10 dk beklenildi ve spektrofotometrede 500 nm'de optik dansiteleri tespit edildi. Şekil 19'da TAG analizi standart grafiği gösterilmiştir.

Numunelerin analizi, 1 mL test ayırıcı üzerine 10 µL numune eklenerek yapıldı.



Şekil 19: Triaçilgliserol analizi standart grafiği.

c) Hesaplama

Numunelerin TAG konsantrasyonları,

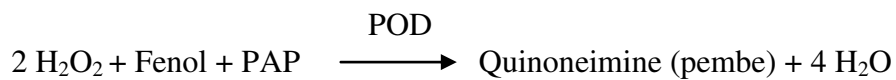
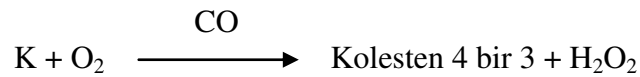
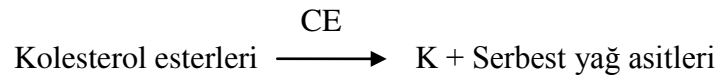
$$\text{TAG miktarı} = \frac{\text{Numune absorbansı}}{\text{Standart absorbansı}} \times \text{Standart konsantrasyonu}$$

formülü kullanılarak mg/dl olarak hesaplandı.

3.2.10.3. Kolesterol Analizi

a) Prensip:

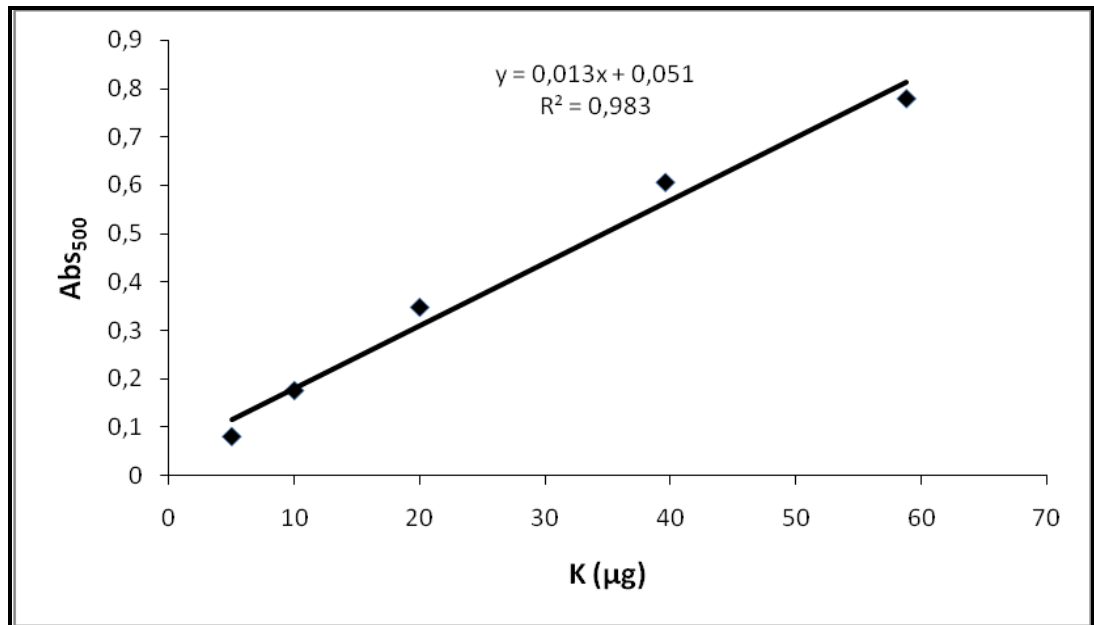
Numunelerin K miktarları hazır K ölçüm kiti (Bilabo SA, 02160, Maizy, France) ile yapıldı. Numune içindeki KE'leri, kolesterol esteraz (CE) enzimi tarafından K ve serbest yağ asitlerine ayrılır. K, kolesterol oksidaz (CO) enziminin katalizi ile O_2 ile etkileşir ve kolesten 4 bir 3 ve hidrojenperoksit (H_2O_2) oluşur. Hidrojen peroksit, peroksidaz (POD) tarafından katalize edilen bir reaksiyonla kırmızı renkli kinon boyası elde etmek üzere 4-amino-antiprin (PAP) varlığında fenol ile reaksiyona girer. Oluşan pembe rengin yoğunluğu 500 nm'de okunduğunda numune içerisindeki K konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.



b) Analizin Yapılışı ve K Standart Grafiğinin Çizimi

Analizin lineeritesinin test edilmesi amacıyla kit içerisinde çıkan ve 200 mg/dl K içeren standart solüsyon kullanıldı. Standart grafiği çizimi için 1'er mL test ayırıcı üzerine 5 µg, 10 µg, 20 µg, 40 µg ve 60 µg K eklendi. Hafifçe karıştırıldıktan sonra oda ısısında 10 dk beklenildi ve spektrofotometrede 500 nm'de optik dansiteleri tespit edildi. Şekil 20'de K analizi standart grafiği gösterilmiştir.

Numunelerin analizi, 1 mL test ayırıcı üzerine 10 µL numune eklenerek yapıldı.



Şekil 20: Kolesterol analizi standart grafiği.

c) Hesaplama:

Numunelerin K konsantrasyonları,

$$K \text{ miktarı} = \frac{\text{Numune absorbansı}}{\text{Standart absorbansı}} \times \text{Standart konsantrasyonu}$$

formülü kullanılarak mg/dl olarak hesaplandı.

3.2.11. Yağ asidi analizi

Çalışmada kullanılan yağlar ve her bir yağdan elde edilen ŞM numunleri soğuk zincir koşullarında Mersin İl Kontrol Laboratuvar'ına gönderilerek yağ asidi analizleri yaptırıldı. Örnek iyice karıştırılarak homojen hale getirildi. Yaklaşık 60 mg deney numunesi hassas terazide tartıldı. 10 ml n-Heptan ilave edildi. Üzerine 0,5 ml metanollü KOH çözeltisi ilave edildi. Tüpün kapağı kapatılarak 30 sn süresince kuvvetlice çalkalandı. Bir saat bekletildikten sonra üstteki berrak kısım alındı. 2 mL'lik viallere konularak enjeksiyona hazır hale getirildi. Gaz kromatografisi cihazına (Agilent 6890N) enjeksiyon yapıldı. Numune ile birlikte mix standart da cihaza enjekte edilerek, numunedeki pikler tanımlandı.

3.2.12. İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel değerlendirme için SPSS for Windows Versiyon 13 istatistik yazılımı kullanıldı. Ölçülebilir değişkenlere ilişkin veriler aritmetik ortalama ($\bar{x}$) $\pm$ standart hata (SE) olarak sunuldu. Araştırmamızdaki ölçülebilir değişkenlere ait verilerin normal dağılım göstermediği Shapiro Wilk testi ile saptandı ($P < 0,05$). Değişkenler normal dağılım göstermediği için grupların karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis Varyans Analizi ve Mann-Whitney U testi kullanıldı. $P \leq 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Kromatografi Denemeleri

ŞM'lerin kromatografik analizleri yapılmadan önce gerekli denemeler yapılarak uygun mobil faz, uygun mobil faz konsantrasyonu, kolona tatbik edilecek en uygun numune miktarı ve optimum mobil faz akış hızı tespit edildi.

a) Uygun Triton X-100 Konsantrasyonunun Tespiti

Hidrofobik interaksiyon kromatografisinde mobil faz olarak kullanılan tampona bazı katkı maddeleri eklenerek kolonun seçiciliği ve rezolüsyonu optimize edilmelidir. Bu amaçla mobil faz modifiye edici ajan olarak alkoller, deterjanlar ve kaotropik tuzlar kullanılmaktadır (108).

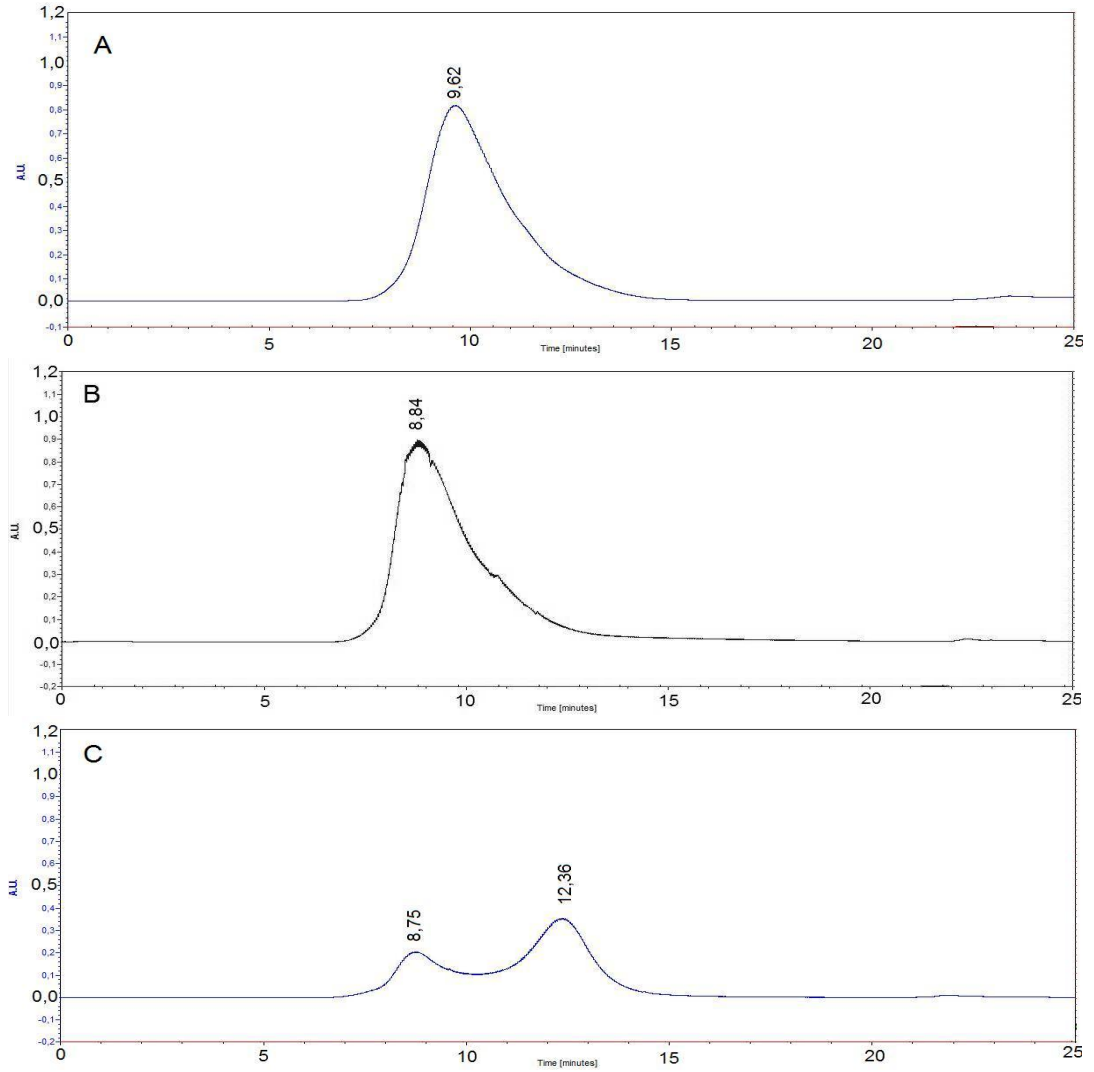
ŞM numuneleri çok yüksek hidrofobik etkileşime neden olduğundan, tuzlar numunelerin kolona çok sıkı bağlanmasına ve fraksiyonların ayrılmamasına neden oldu. Bu nedenle ŞM numuneleri için kullanılmasının uygun olmadığına karar verildi.

Mobil faza % 10 etanol eklenerek denemeler yapıldı. Ancak etanolün ŞM misel yapısına zarar verebileceği düşüncesiyle kullanımından vazgeçildi.

ŞM numunelerinin kromatografik analizi için noniyonik bir deterjan olan Triton X-100 kullanılmasına karar verildi. Triton X-100'ün hangi konsantrasyonda kullanılacağına karar verebilmek amacıyla farklı konsantrasyonlarda denemeler yapıldı.

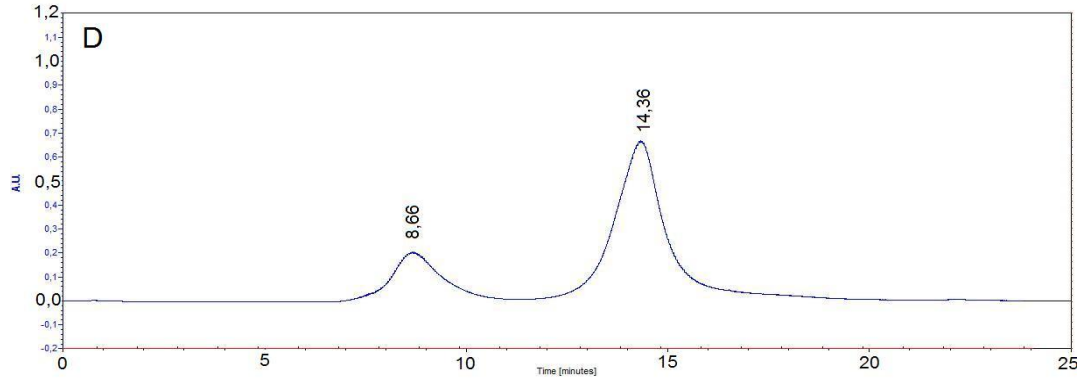
Şekil 21'de mobil faz olarak kullanılan Triton X-100'ün farklı konsantrasyonlarında, ayçiçeği yağından elde edilmiş ŞM'lerin bütül sepharose (4 fast flow) kolon mediumu ve 1 mL/dk akış hızı ile elde edilmiş kromatogramları gösterilmiştir.

Denemeler sonucunda Triton X-100'ün distile su içindeki % 0,0125 konsantrasyonunun ŞM'ların kromatografik analizi için en uygun konsantrasyon olduğuna karar verildi.



Şekil 21: Ayçiçek yağı şilomikronlarının mobil faza farklı konsantrasyonlarda Triton X-100 eklenerek yapılan HIC kromatogramları.

A: % 0,1 Triton X, B: % 0,05 Triton X, C: % 0,02 Triton X, D: % 0,0125 Triton Kromatogramlar, bütül sepharose (4 fast flow) kolon mediumu ve 1 mL/dk akış hızı ile elde edilmiştir. Pik üzerlerinde alıkonma zamanları belirtilmiştir.

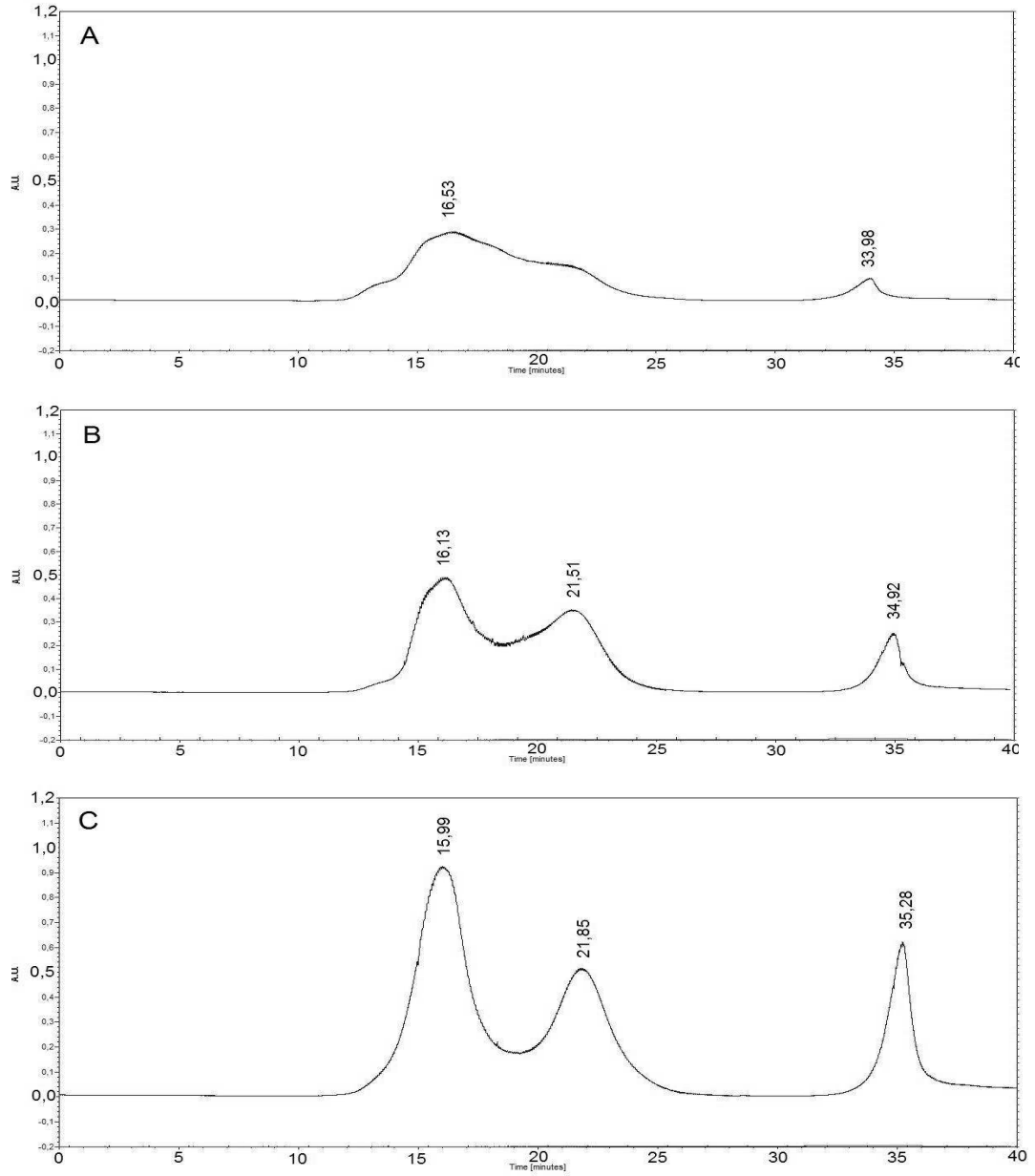


Şekil 21: Ayçiçek yağı şilomikronlarının mobil faza farklı konsantrasyonlarda Triton X-100 eklenerek yapılan HIC kromatogramları (devam).

b) Kolona Tatbik Edilecek Uygun Numune Miktarının Tespiti

Kolonun yükleme kapasitesini aşmayacak ve optimal kromatografi seperasyonunun gerçekleşmesini sağlayacak uygun numune miktarının belirlenmesi amacıyla numunelerin farklı miktarları kolona enjekte edilerek denemeler yapıldı. Her yağ için bu denemeler tekrarlandı.

Şekil 22’de zeytinyağı ŞM’lerinin farklı miktarlarda uygulanmasıyla ve bütül sepharose (4 fast flow) kolon mediumu, 0,6 mL/dk akış hızı ve % 0,0125 Triton X-100 mobil faz ile elde edilmiş kromatogramları gösterilmiştir.



Şekil 22: Farklı miktarlardaki zeytinyağı şilomikronlarının HIC'ne uygulanması sonucu elde edilen kromatogramlar.

A: 0,1 mL numune, B: 0,2 mL numune, C: 0,3 mL numune.

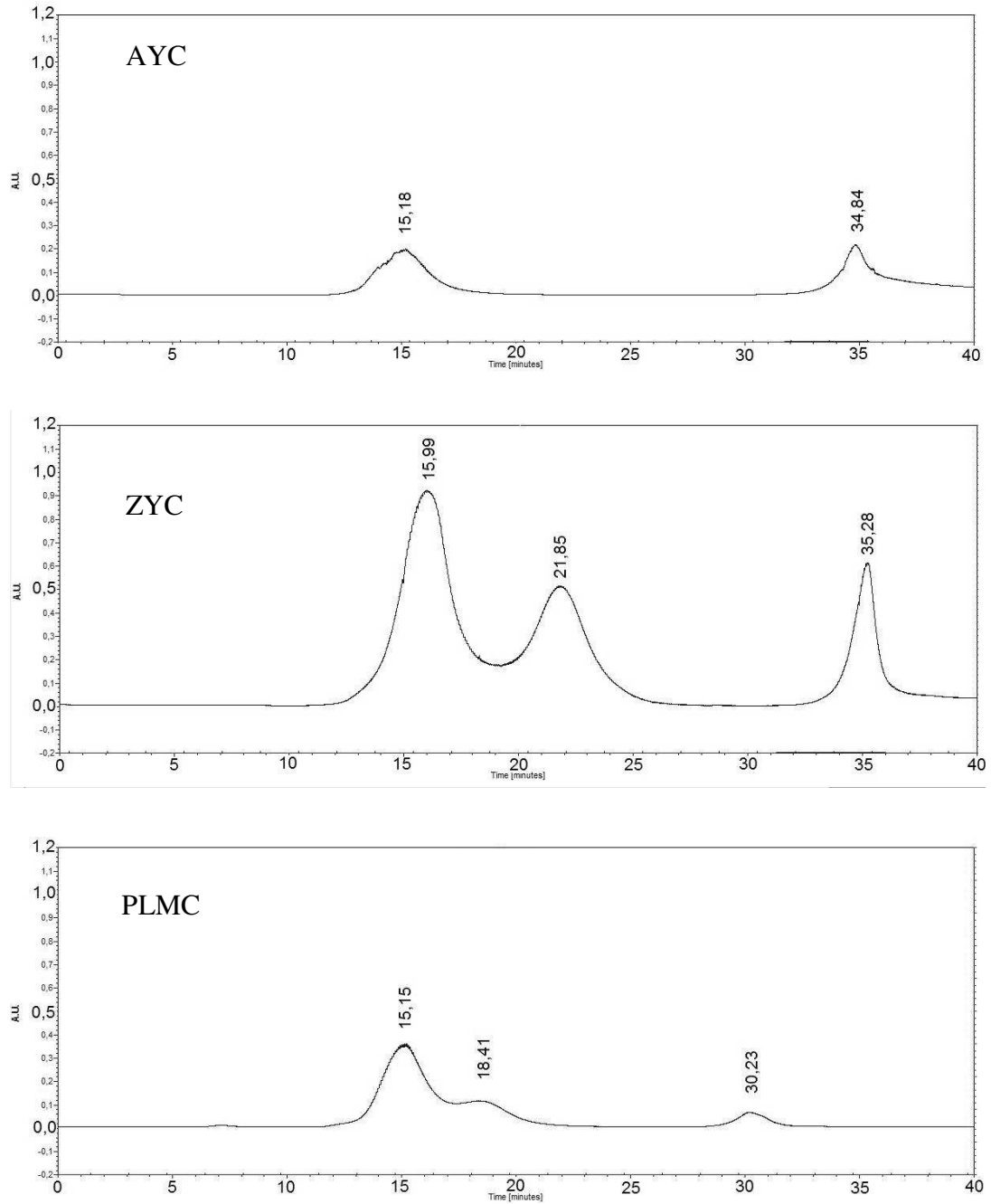
Kromatogramlar bütül sepharose (4 fast flow) kolon mediumu, 0,6 mL/dk akış hızı ve % 0,0125 Triton X-100 mobil faz ile elde edilmiştir. Pik üzerlerinde alıkonma zamanları belirtilmiştir.

c) Mobil Faz Akış Hızının Tespiti

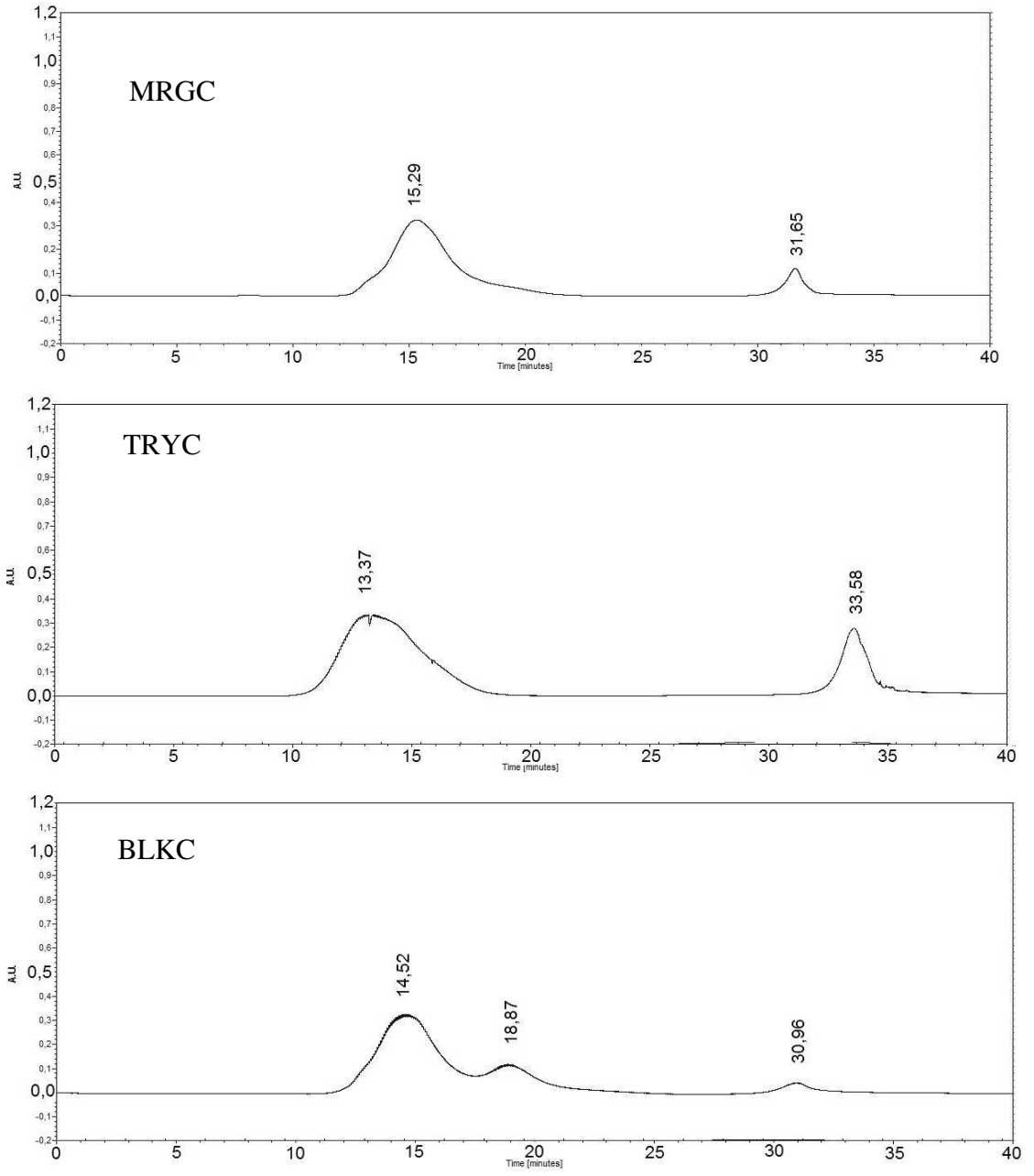
Mobil faz akış hızının mekanik etki ile numune yapısını bozup bozmadığı ve elde edilen fraksiyonları değiştirip değiştirmediğini belirlemek amacıyla 0,6 mL/dk, 1,0 mL/dk ve 1,2 mL/dk akış hızlarında denemeler yapıldı. ŞM partiküllerinin çok kırılgan olması nedeniyle yüksek akış hızlarının partikül yapısına zarar verebileceği düşünülerek 0,6 mL/dk mobil faz akış hızına karar verildi.

4.2. Farklı Yağlardan Elde Edilen ŞM'ların Hidrofobik İnteraksiyon Kromatogramları

Şekil 23'de 6 farklı yağ ile elde edilmiş rat torasik lenf ŞM'lerinin bütül sepharose (4 fast flow) kolon mediumu, 0,6 mL/dk akış hızı ve % 0,0125 triton-X mobil faz ile elde edilmiş kromatogramları gösterilmiştir. Balık yağı, palm yağı ve zeytinyağı ŞM'ları üç fraksiyona ayrılmışken, ayçiçeği yağı, margarin ve tereyağı ŞM'ları 2 fraksiyona ayrılmıştır.



Şekil 23: Farklı yağlardan elde edilmiş şilomikronların HIC kromatogramları. Kromatogramlar, % 0,125 triton X-100 mobil faz, bütül sepharose (4 fast flow) kolon mediumu ve 0,6 mL/dk akış hızı ile elde edilmiştir. Pik üzerlerinde alıkonma zamanları belirtilmiştir.



Şekil 23: Farklı yağlardan elde edilmiş şilomikronların HIC kromatogramları (devam).

4.3. Kromatogramlardan Hesaplanan k Değerleri ve Fraksiyon Pik Alan Oranları

Farklı yağlardan elde edilen ŞM'ların yüzey hidrofobikliklerinin bir göstergesi olan kromatografik alıkonma zamanlarının (retensiyon zamanları), kapasite faktörü (k) tanımlanması yapılarak normalleştirilmesi sağlandı. k değeri, HIC'nin hidrofobik ortamı ile etkileşen bir maddenin ortam ile bağlı kaldığı süreyi göstermektedir. Yani k değeri ne kadar yüksek ise madde hidrofobik ortam ile o kadar güçlü bir şekilde etkileşmiş ve uzun süre bağlı kalmış demektir. Bir maddenin yüzey hidrofobikliği ne kadar yüksek ise, hidrofobik ortam ile kadar güçlü bir şekilde etkileşerek bağlanacak ve ortamdaki ayrılması da o ölçüde uzun sürecektir. Yani maddenin k değeri, maddenin yüzey hidrofobikliği bir göstergesidir.

Farklı yağlardan elde edilen ŞM'ların HIC kromatogramlarından hesaplanan k değerleri tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6: Farklı yağlardan elde edilen ŞM'ların HIC kromatogramlarından hesaplanan k değerleri.

Pik	PLMC (n=3)	BLKC (n=3)	MRGC (n=3)	ZYC (n=4)	AYC (n=4)	TRYC (n=3)
3.pik k	1,08±0,07 ^{a,t}	1,15±0,07 ^{a,t}	1,17±0,02 ^{a,t}	1,31±0,18	1,32±0,07	1,37±0,13
2.pik k	0,226±0,02	0,280±0,09		0,465±0,18		

Bulgular $X \pm SE$ olarak verilmiştir. n= numune sayısı.

a : AYC ile karşılaştırıldığında ($p \leq 0,05$), t : TRYC ile karşılaştırıldığında ($p \leq 0,05$).

HIC kromatogramlarından hesaplanan k değerleri maddenin hidrofobik ortam ile ne kadar güçlü bir şekilde etkileştiğini göstermekte ancak ortam ile etkileşen madde miktarını vermemektedir. Bu nedenle kromatogramlardan elde edilen fraksiyonların pik alanları hesaplanarak birbiriyle oranlandı.

Hidrofobik interaksiyon kromatografisinde hidrofobik etkileşimi düşük olan maddelerin erken elue olan fraksiyonu oluşturmaları ve yüksek olanların daha geç elue olan fraksiyonu oluşturmaları beklenir. Bu fraksiyonların pik alanları ise madde miktarlarını göstermektedir. Kromatogramdaki ilk fraksiyon, ortam ile zayıf etkileşen maddeleri ve sonraki fraksiyonlar ise daha güçlü etkileşen maddeleri

göstermektedir. Bundan dolayı pik alanları birbirleri ile oranlanarak, farklı yağ ŞM'lerinin içerdiği yüksek hidrofobik ve düşük hidrofobik özellik gösteren bileşenlerin miktarları karşılaştırıldı.

Pik alan oranları tablo 7'de verilmiştir. MRGC, BLKC ve PLMC'nin 3. pik k değerleri TRYC ve AYC ile karşılaştırıldığında anlamlı şekilde daha düşük bulunmuştur ($p \leq 0,05$). Bu sonuç TRYC ve AYC'nin MRGC, BLKC ve PLMC'ye göre hidrofobik interaksiyon kolonu tarafından daha uzun süre tutulduğunu göstermektedir. TRYC ve AYC'nin kendi arasında ve ZYC ile aralarında k değeri açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$). İkinci pik k değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$).

Tablo 7: Farklı yağlardan elde edilen ŞM'ların HIC kromatogramlarından hesaplanan pik alan oranları.

Pik alan oranları	AYC(n=4)	ZYC(n=4)	PLMC(n=3)	TRYC(n=3)	MRGC(n=3)	BLKC(n=3)
1. pik/3.pik	1,03±0,66 ^b	3,97±0,98 ^{a,b}	4,24±4,68 ^b	4,64±0,69 ^{a,b}	9,57±4,34 ^{a,b}	16,67±2,83 ^a
1.pik/2.pik		1,69±0,35	5,00±1,80			6,51±6,78
2. pik/3.pik		2,31±0,26	1,03±1,20			6,22±6,51

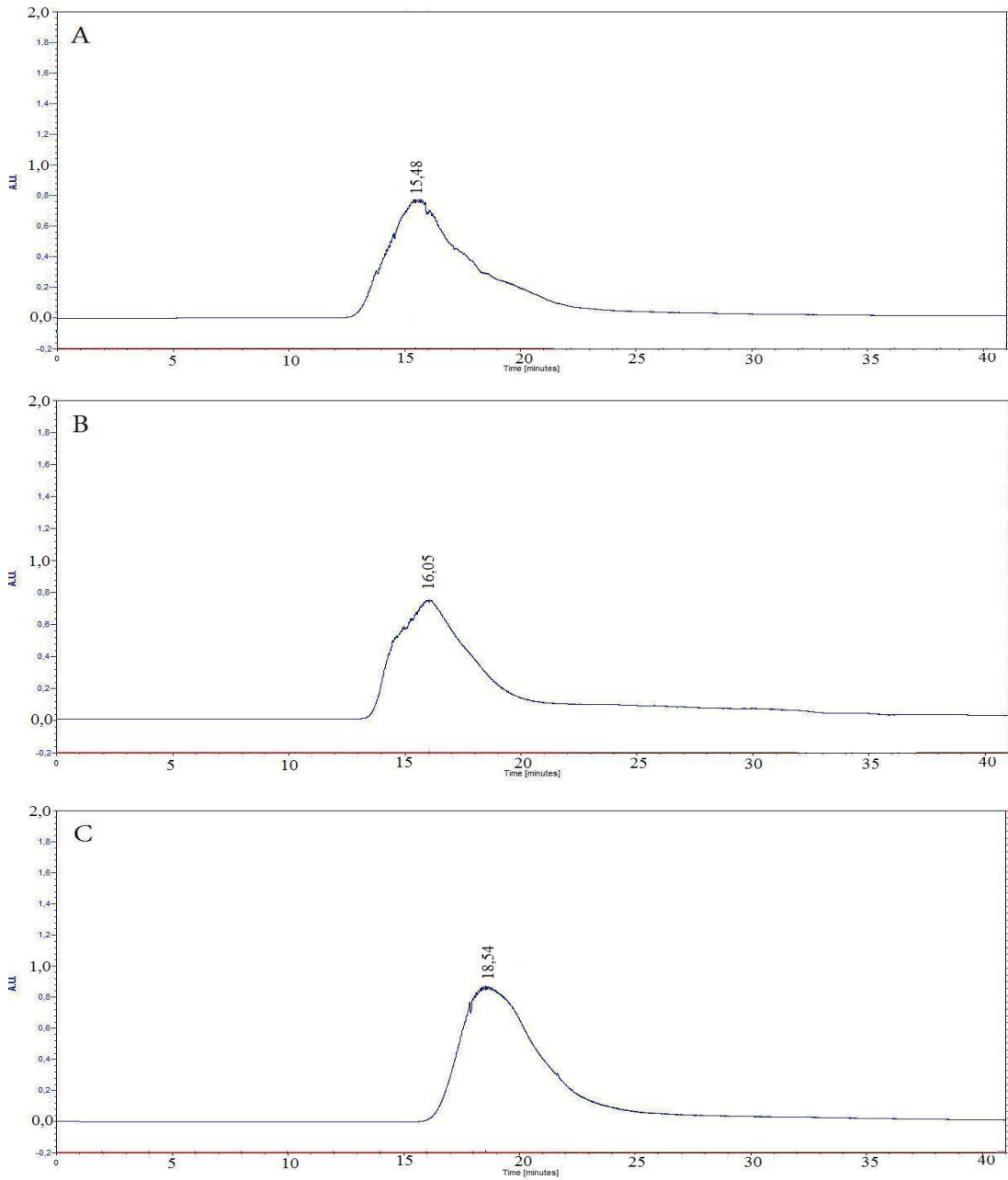
Bulgular $\bar{X} \pm SE$ olarak verilmiştir. n= numune sayısı

a : AYC ile karşılaştırıldığında ($p \leq 0,05$), b: BLKC ile karşılaştırıldığında ($p \leq 0,05$).

Düşük hidrofobik etkileşimi ifade eden ilk pikin alanı ile daha yüksek hidrofobik etkileşimi ifade eden üçüncü pikin alanı oranlanmıştır. Bu oranın büyük olması düşük düzeyde hidrofobik etkileşimi ve küçük olması ise daha güçlü hidrofobik etkileşimi ifade etmektedir. AYC ile ZYC, TRYC, MRGC ve BLKC arasında, BLKC ile AYC, ZYC, TRYC, MRGC ve PLMC arasında anlamlı fark bulundu ($p < 0,05$). AYC, diğer tüm ŞM'lara göre daha düşük 1. pik/3.pik oranı gösterdi ancak PLMC ile arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. BLKC, diğer tüm ŞM'lardan istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha yüksek bir 1. pik/3.pik alan oranına sahip bulundu.

İlk pikler ile ikinci piklerin alanları ve ikinci pikler ile üçüncü piklerin alanları oranlandığında farklı yağlardan elde edilen ŞM'lar arasında anlamlı fark bulunamadı ($p > 0,05$).

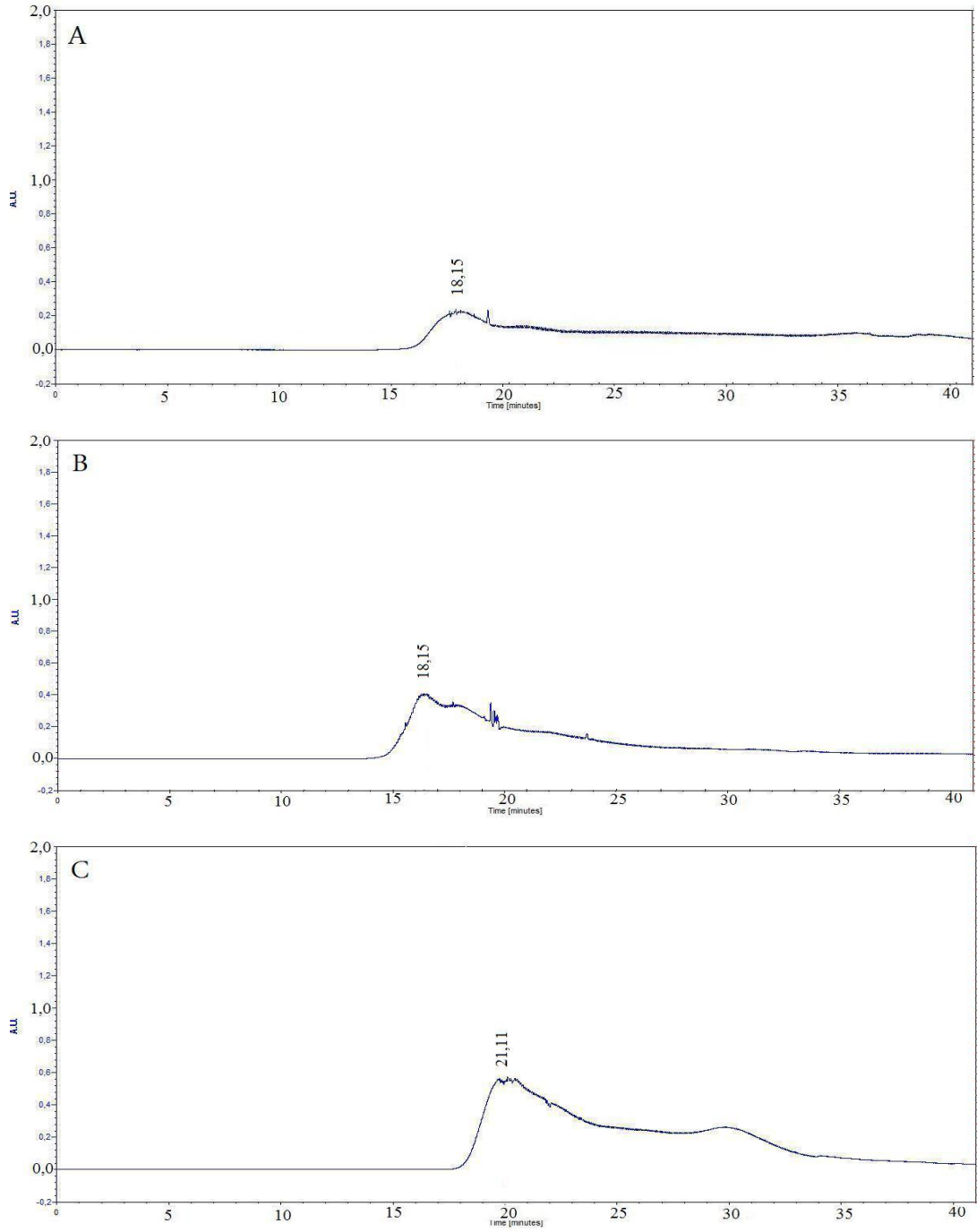
4.4. Palm ve Ayçiçek Yağı Şilomikronlarının Jel Filtrasyon Kromatogramları



Şekil 24: Ayçiçeği yağından elde edilmiş ŞM'ların Triton X-100 jel filtrasyon kromatogramları.

A: Sepharose (2B), B: Sepharose (4B), C: Sepharose (6B)

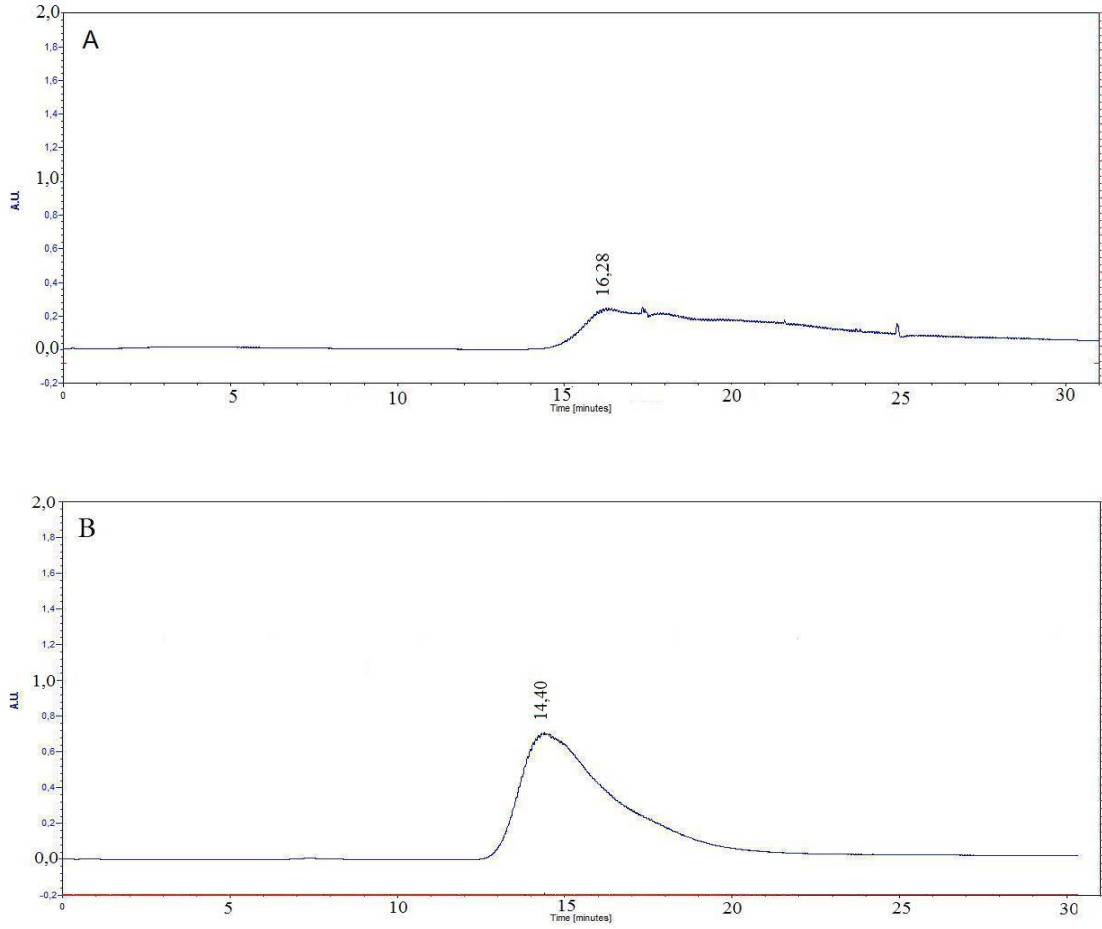
Kromatogramlar, 0,5 mL/dk akış hızı ve % 0,0125 Triton X-100 mobil fazı ile farklı por büyüklüklerine sahip kolon ortamları denenerek elde edilmiştir. Pik üzerlerinde alıkonma zamanları belirtilmiştir.



Şekil 25: Ayçiçeği yağından elde edilmiş ŞM'ların fosfat tampon jel filtrasyon kromatogramları.

A: Sephadex (2B), B: Sephadex (4B), C: Sephadex (6B)

Kromatogramlar, 0,5 mL/dk akış hızı ve fosfat tampon mobil fazı ile farklı por büyüklüklerine sahip kolon ortamları denenerek elde edilmiştir. Pik üzerlerinde alıkonma zamanları belirtilmiştir.



Şekil 26: Palm yağından elde edilmiş ŞM'ların jel filtrasyon kromatogramları.

A: Fosfat Tampon B: Triton X-100

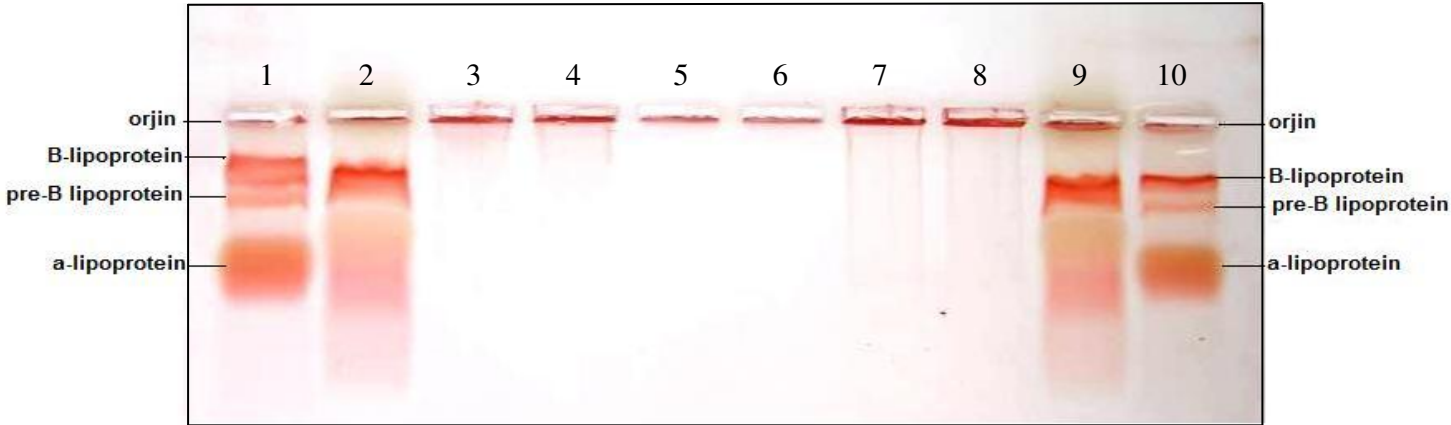
Kromatogramlar, 0,5 mL/dk akış hızı ve sepharose (4B) por büyüklüğünde kolon mediumu ile farklı mobil fazlar kullanılarak elde edilmiştir. Pik üzerlerinde alıkonma zamanları belirtilmiştir.

Farklı mobil fazlar ve farklı por büyüklüğüne sahip kolon ortamları kullanılarak yapılan tüm jel filtrasyon kromatogramları incelendiğinde, hiçbir kromatogramda fraksiyon oluşmadığı görüldü. Buradan anlaşılmaktadır ki HIC kromatogramlarında gözlenen fraksiyonlar ŞM partiküllerinin farklı büyüklüklerinden değil numunelerin farklı hidrofobik özelliğe sahip fraksiyonlara ayrılmasından kaynaklanmaktadır.

4.5. Farklı Yağlardan Elde Edilen ŞM'ların ve Bunların Kromatografik Seperasyonları Sonucu Elde Edilen Fraksiyonların Agaro Jel Elektroforezleri

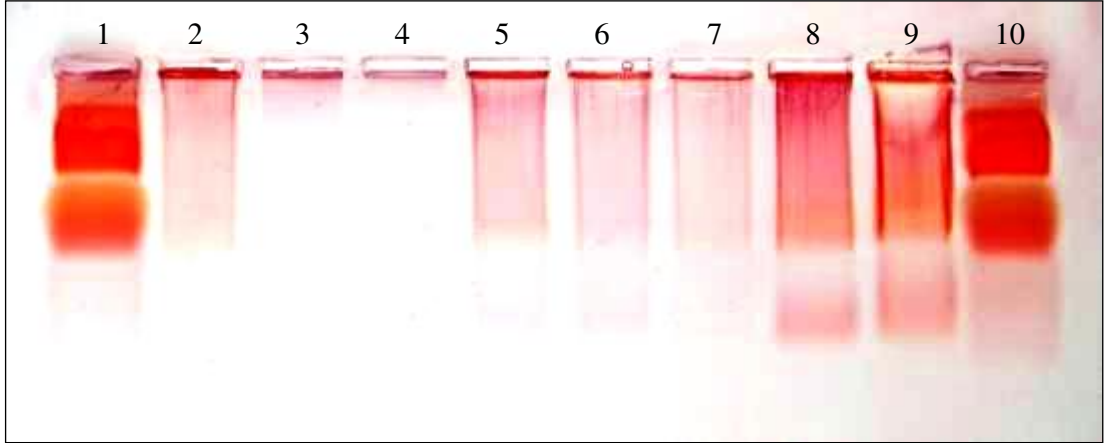
Numunelerin elektroforetik seperasyonları incelendiğinde farklı yağ ŞM'larının benzer elektroforetik mobilite gösterdikleri görülmektedir. CC numuneleri orjindeki yoğunlaşmanın yanı sıra jel boyunca nisbeten homojen bir şekilde ilerlemiş bir dağılım gösterdiler (şekil 27, 28, 29, 30, 31 ve 32). Bu CC numunelerinin içinde hem ŞM'ların hem de küçük ŞM veya intestinal VLDL'lerin bulunduğunu göstermektedir.

CC'ın ultrasantrifügasyonu ile elde edilen ŞM'lar tüm elektroforezlerde orjinde kaldı (şekil 27, 28, 29, 30, 31 ve 32). HIC'ne uygulanan ŞM'lardan elde edilen farklı hidrofobik özelliğe sahip fraksiyonların da orjinde kaldığı görüldü.



Şekil 27: AYC agaro jel elektrofotogramı.

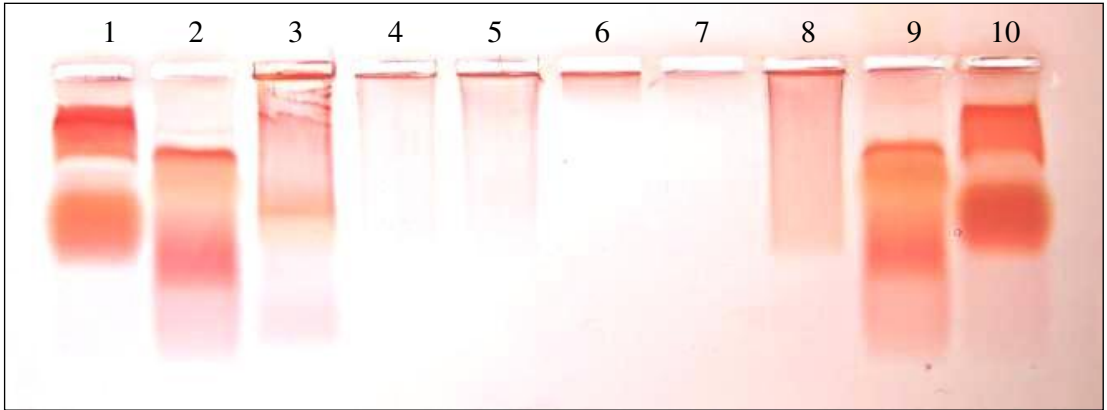
1: İnsan serumu **2:** Rat serumu **3:** ŞM **4:** ŞM **5:** 1. pik fraksiyon **6:** 2. pik fraksiyon **7:** ŞM (farklı preparasyon) **8:** ŞM (farklı preparasyon) **9:** Rat serumu **10:** İnsan serumu



Şekil 28: ZYC agaroz jel elektrofotogramı.

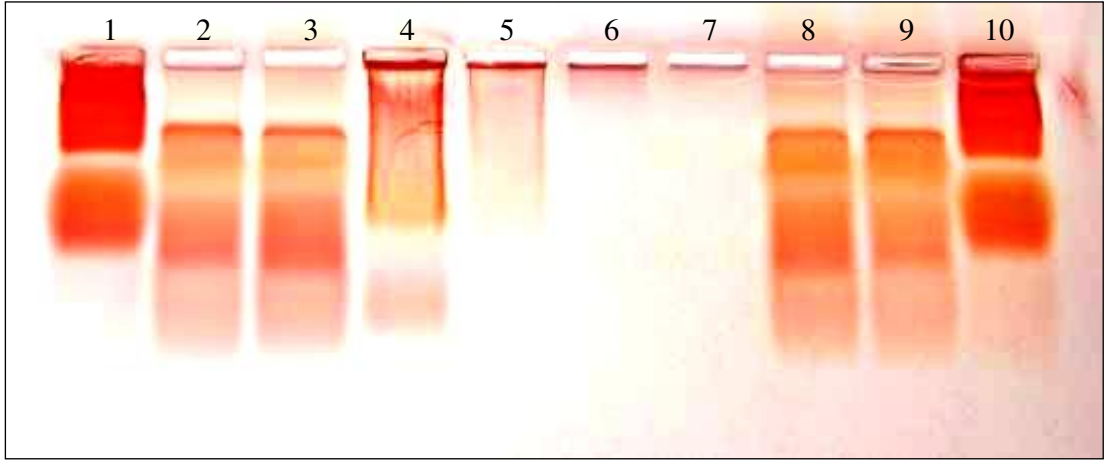
1: İnsan serumu **2:** ŞM , **3:** 1. pik fraksiyon **4:** 2. pik fraksiyon **5:** ŞM (farklı preperasyon) **6:** ŞM **7:** ŞM (farklı preperasyon) **8:** CC* **9:** CC (farklı preparasyon) **10:** İnsan serumu

*Crude Chyle: Kanülasyon ile toplanmış ve hiçbir işleme henüz tabi tutulmamış lenf içeriği.



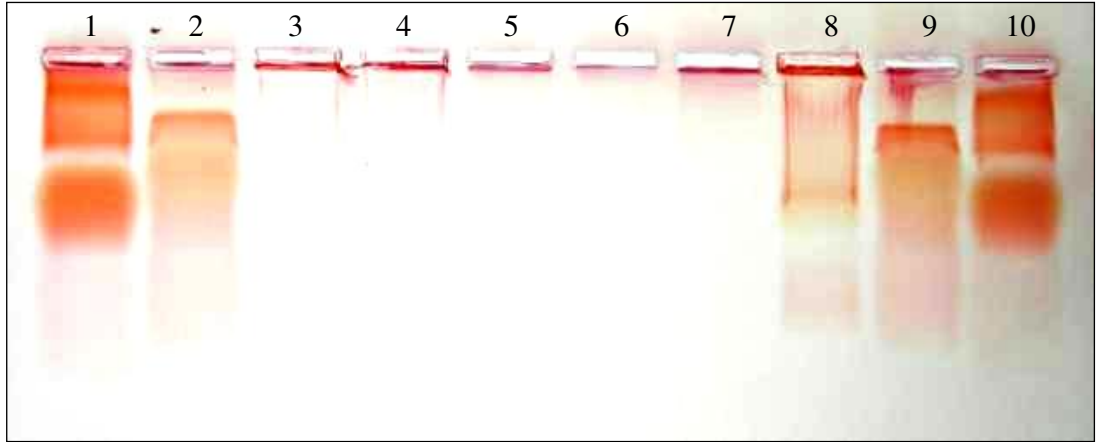
Şekil 29: BLKC agaroz jel elektrofotogramı.

1: İnsan serumu **2:** Rat serumu **3:** CC **4:** ŞM **5:** ŞM **6:** 1. Pik fraksiyon **7:** 2. Pik fraksiyon **8:** ŞM (farklı preperasyon) **9:** Rat serumu **10:** İnsan serumu



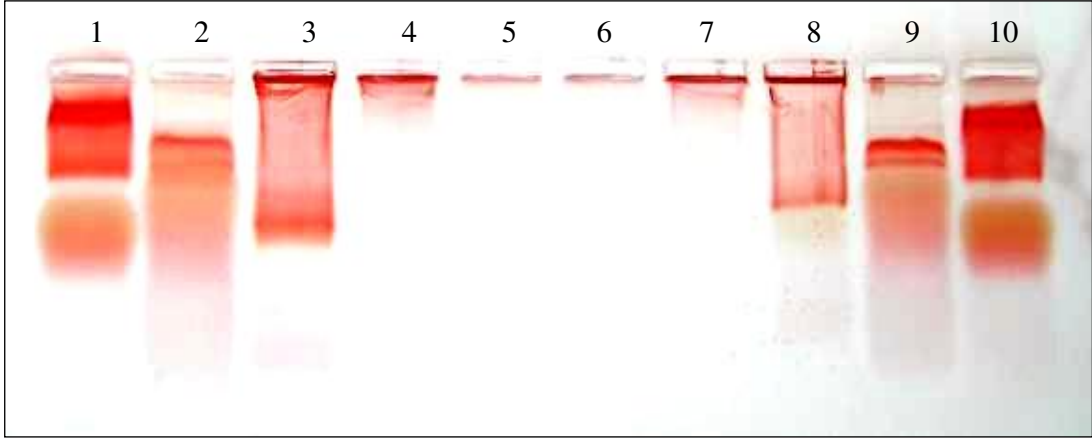
Şekil 30: MRGC agaroz jel elektrofotogramı.

1: İnsan serumu **2:** Deneyde kullanılmış kanüle rat serumu **3:** Aç rat serumu **4:** CC
5: ŞM **6:** 1. Pik fraksiyon **7:** 3. Pik fraksiyon **8:** Aç rat serumu **9:** Deneyde kullanılmış kanüle rat serumu **10:** İnsan serumu



Şekil 31: PLMC agaroz jel elektrofotogramı.

1: İnsan serumu **2:** rat serumu **3:** ŞM **4:** ŞM (farklı preperasyon) **5:** 2. Pik fraksiyon
6: 1. Pik fraksiyon **7:** 2. Pik fraksiyon **8:** CC **9:** Rat serumu **10:** İnsan serumu



Şekil 32: TRYC agaroz jel elektrofotogramı.

1: İnsan serumu **2:** Rat serumu **3:** CC **4:** ŞM **5:** 2. Pik fraksiyon **6:** 2. Pik fraksiyon (farklı preperasyon) **7:** ŞM (farklı preperasyon) **8:** CC (farklı preperasyon) **9:** Rat serumu **10:** İnsan serumu

4.6. Farklı Yağlardan Elde Edilen ŞM'ların Turbidite Analizi Sonuçları

Farklı yağlardan elde edilen ŞM'ların vortekslenme sonucu oluşan absorbans değişimleri spektrofotometrik olarak 400 nm'de ölçülmüş, değişin oranları tablo 6 ve şekil 33'de gösterilmiştir. Tablo 8, ŞM'ların 14 dakika vortekslenmelerinden sonra ölçülen absorbansın vortekslenmeden önceki ilk ölçülen absorbansa bölünmesiyle bulunan oranları göstermektedir. Şekil 33, her bir dakika vorteksleme sonunda ölçülen absorbansın vortekslenmeden önceki ilk ölçülen absorbansa oranlanması ile elde edilen oransal değişimi göstermektedir.

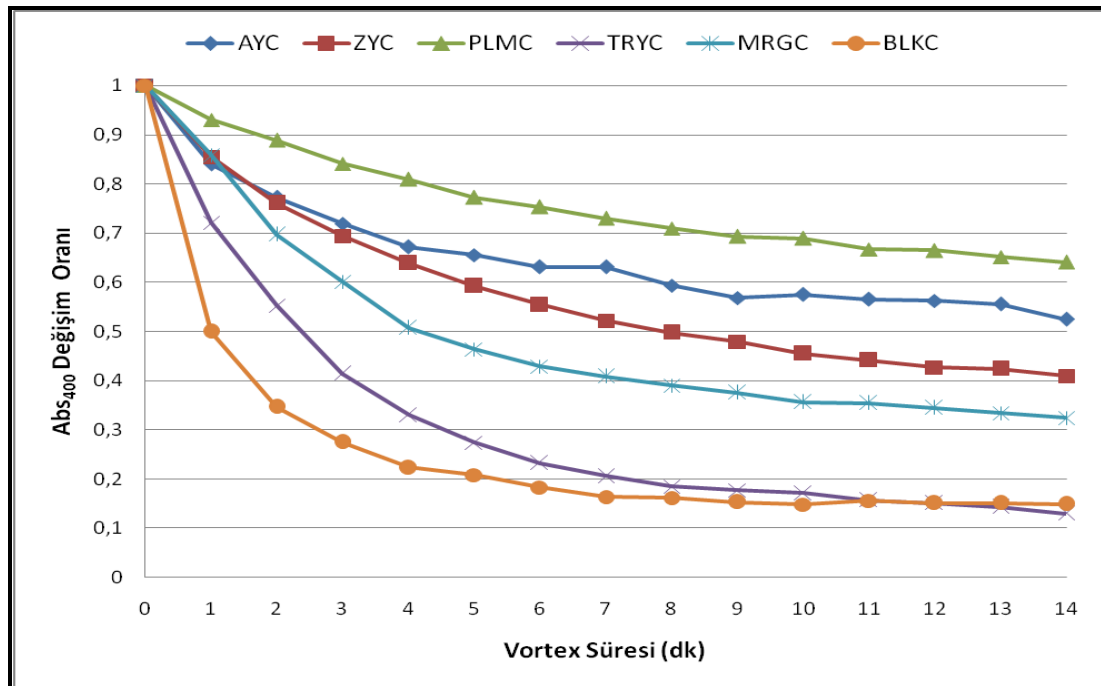
TRYC ve BLKC için vortekslenme ile meydana gelen absorbans değişimi (azalma) diğer tüm ŞM'lar ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p \leq 0,05$). TRYC ve BLKC arasında ve diğer ŞM'ların kendi arasındaki absorbans değişimlerinde anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0,05$).

Tablo 8: Deney Gruplarından Elde Edilen ŞM'ların 14 dk vortekslelendikten Sonraki Abs / 0.dk Abs. Oranları.

	TRYC (n=4)	BLKC (n=3)	MRGC(n=3)	ZYC (n=4)	AYC(n=6)	PLMC (n=4)
Abs. Oranı	0,15±0,09	0,17±0,11	0,34±0,20	0,40±0,09 ^{t,b}	0,52±0,12 ^{t,b}	0,64±0,21 ^{t,b}

Bulgular $\bar{X} \pm SE$ olarak verilmiştir. n= numune sayısı

t : TRYC ile karşılaştırıldığında ($p \leq 0,05$), b: BLKC ile karşılaştırıldığında ($p \leq 0,05$).



Şekil 33: ŞM'ların 14 dk vortekslenmesi ile oluşan absorbands değişimi.

4.6.1. Sıcaklığın Farklı Yağlardan Elde Edilen Şilomikronların Agregasyonları Üzerine Olan Etkisinin Karşılaştırılması

Farklı yağlardan elde edilen ŞM'ların $+4C^{\circ}$ de 24 saat bekletildikten sonra vortekslenme sonucu oluşan absorbands değişim oranları spektrofotometrik olarak tespit edilmiş, tablo 9 ve şekil 34'de gösterilmiştir. Tablo 9, ŞM'ların 4 dk vortekslenmelerinden sonra ölçülen absorbandsın vortekslenmeden önceki ilk ölçülen absorbandsa bölünmesiyle bulunan oranları göstermektedir. Şekil 34, her bir dakika

vorteksleme sonunda ölçülen absorbansın vortekslenmeden önceki ilk ölçülen absorbansa oranlanması ile elde edilen oransal değişimi göstermektedir.

TRYC ve BLKC için vortekslenme ile meydana gelen absorbans değişimi (azalma) diğer tüm ŞM'lar ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p \leq 0,05$).

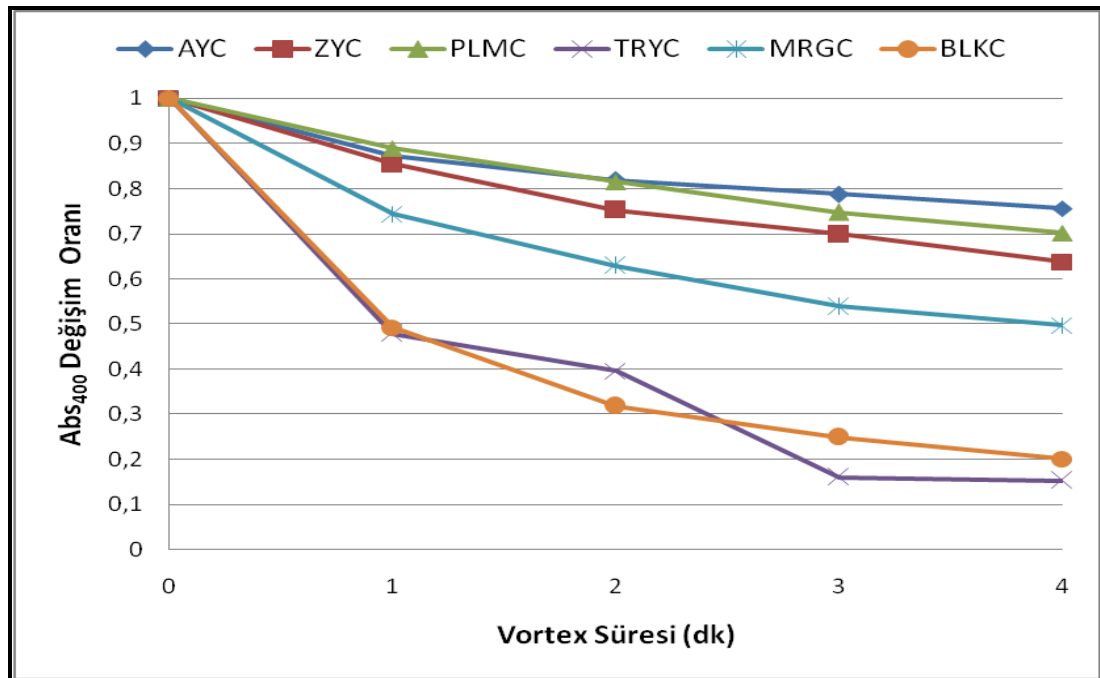
TRYC ve BLKC arasında ve diğer ŞM'ların kendi arasında absorbans değişimlerinde anlamlı bir fark bulunamadı ($p > 0,05$).

Tablo 9: +4C° de 24 saat bekletilen ŞM'ların 4 dk vortekslenmekten Sonraki Abs / 0.dk Abs. Oranları.

	TRYC(n=4)	BLKC(n=3)	MRGC(n=3)	ZYC(n=4)	PLMC(n=3)	AYC(n=4)
Abs.Oranı	0,18±0,12	0,24±0,25	0,54±0,28 ^t	0,64±0,04 ^{t,b}	0,71±0,11 ^{t,b}	0,74±0,11 ^{t,b}

Bulgular $X \pm SE$ olarak verilmiştir. n= numune sayısı

t : TRYC ile karşılaştırıldığında ($p \leq 0,05$), b: BLKC ile karşılaştırıldığında ($p \leq 0,05$).



Şekil 34: ŞM'ların +4C° de 24 saat bekletildikten sonra 4 dk vortekslenmesi ile oluşan absorbans değişimi.

Farklı yağlardan elde edilen ŞM'ların -5 C° de 24 saat bekletildikten sonra vortekslenme sonucu oluşan absorbans değişim oranları spektrofotometrik olarak tespit

edilmiş, tablo 10 ve şekil 35’de gösterilmiştir. Tablo 10, ŞM’ların 4 dk vortekslenmelerinden sonra ölçülen absorbansın vortekslenmeden önceki ilk ölçülen absorbansa bölünmesiyle bulunan oranları göstermektedir. Şekil 35, her bir dakika vorteksleme sonunda ölçülen absorbansın vortekslenmeden önceki ilk ölçülen absorbansa oranlanması ile elde edilen oranları göstermektedir.

AYC için vortekslenme ile meydana gelen absorbans değişimi (azalma) diğer tüm ŞM’lar ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p \leq 0,05$).

PLMC ve ZYC, BLKC ve TRYC ile karşılaştırıldığında vortekslenme ile meydana gelen absorbans değişimi (azalma) anlamlı olarak daha düşük ve AYC ile karşılaştırıldığında daha yüksek bulundu ($p \leq 0,05$).

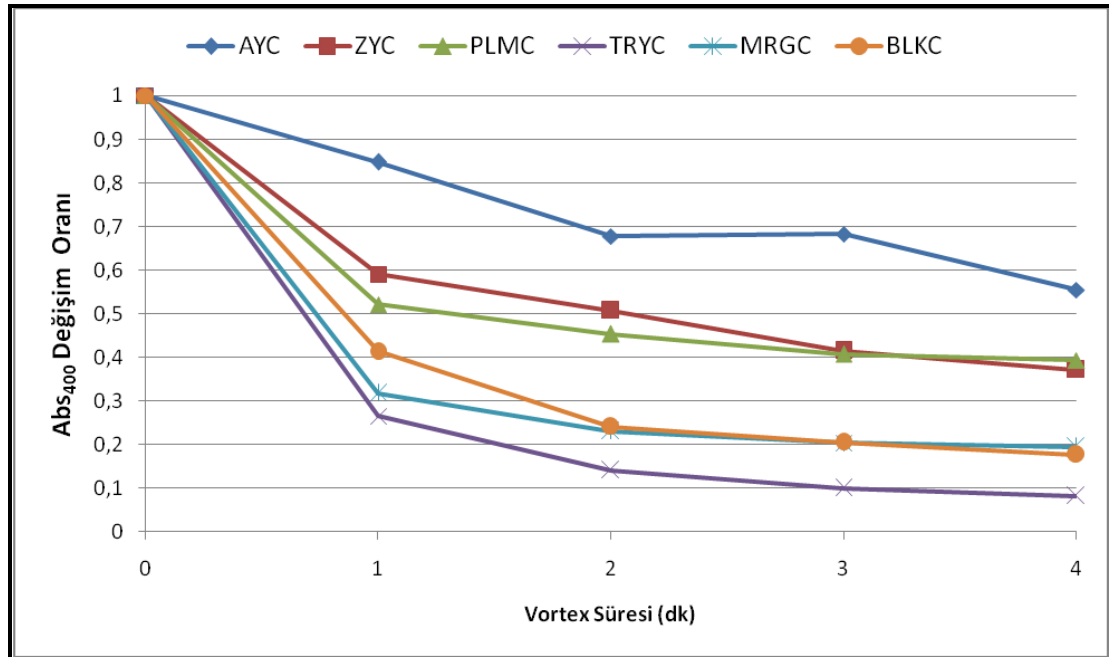
Tablo 10: ŞM’ların -5°C ’de 24 saat bekletildikten sonra 4 dk vortekslenmekten Sonraki Abs / 0.dk Abs. Oranları.

	TRYC(n=4)	BLKC(n=3)	MRGC(n=3)	ZYC(n=4)	PLMC(n=3)	AYC(n=4)
Abs. Oranları	$0,10 \pm 0,09^a$	$0,17 \pm 0,04^a$	$0,19 \pm 0,11^a$	$0,35 \pm 0,07^{a,b,t}$	$0,37 \pm 0,10^{a,b,t}$	$0,54 \pm 0,07^{b,t}$

Bulgular $\bar{X} \pm \text{SE}$ olarak verilmiştir. n= numune sayısı

a : AYC ile karşılaştırıldığında ($p \leq 0,05$), b: BLKC ile karşılaştırıldığında ($p \leq 0,05$),

t : TRYC ile karşılaştırıldığında ($p \leq 0,05$).



Şekil 35: ŞM’ların -5°C ’de 24 saat bekletildikten sonra, 4 dk vortekslenmesi ile oluşan absorbans değişimi.

4.6.2. Tuz, Asit ve Bazın Şilomikron Agregasyonu Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması

Kritik misel konsantrasyonu (KMK) deterjan gibi hidrofobik bir maddenin su gibi polar bir çözücü içinde misel yapısı oluşturabilmesi için ulaşması gereken en düşük yoğunluktur. KMK'nu etkileyen en önemli faktör surfaktan yapısıyken ilave edilen maddeler, ısı değişimi vb. faktörler KMK'unu daha az etkilemektedir Tuz eklenmesi misel yapısının baş grupları arasındaki elektrostatik geri tepkimeye engel olacağından elektrolitler, çoğu sürfaktan için KMK'nun azalmasına neden olur. Çünkü hidrofilik doğasının değişmesi de KMK'nu etkileyen en önemli faktörlerden biridir (99, 102).

ŞM'ların su, asit, baz ve tuz ortamda yapılan turbidite analizi neticesinde oluşan abs. değişim oranları tablo 11'de gösterilmiştir.

Asit ortamda yapılan ölçümlerde farklı yağlardan elde edilen ŞM'lar arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0,05$).

Baz ortamda yapılan ölçümlerde BLKC; diğer ŞM'lara göre en büyük absorbans değişimini (azalma) göstermiştir, ZYC, PLMC, MRGC ve TRYC ile karşılaştırıldığında bu değişim anlamlı bulundu ($p\leq 0,05$) ancak AYC ile anlamlı bir değişim farkı bulunamadı ($p>0,05$).

AYC; ZYC, PLMC ve MRGC ile karşılaştırıldığında daha büyük oranda absorbans değişimi (azalma) gösterdi ($p\leq 0,05$), diğer ŞM'lar ile karşılaştırıldığında ise anlamlı bir farklılık bulunamadı ($p>0,05$).

ZYC; diğer ŞM'lara göre en düşük absorbans değişimini (azalma) gösterdi. AYC ve BLKC ile karşılaştırıldığında bu değişim anlamlı bulundu ($p\leq 0,05$), ancak diğer ŞM'lar ile karşılaştırıldığında anlamlı bir değişim farkı bulunamadı ($p>0,05$).

Tuz ortamda yapılan ölçümlerde en fazla absorbans değişimi (azalma) PLMC'de görüldü, bu absorbans değişimi AYC, TRYC ve MRGC ile karşılaştırıldığında anlamlı bulundu ($p\leq 0,05$). Diğer ŞM'ların PLMC ile arasında ve kendi arasında anlamlı bir fark tespit edilemedi ($p>0,05$).

Tablo 11: ŞM'ların Su, Asit, Baz ve Tuz Ortamda Yapılan Turbidite Analizi Neticesinde Oluşan Abs. Değişim Oranları.

ŞM	asit	baz	tuz
BLKC (n=3)	0,33±0,06	0,39±0,02 ^{z,p,t,m}	0,14±0,06
AYC (n=3)	0,32±0,15	0,46±0,14 ^{z,p,m}	0,22±0,03 ^p
TRYC (n=4)	0,43±0,06	0,66±0,15 ^b	0,27±0,09 ^p
MRGC (n=3)	0,53±0,07	0,70±0,03 ^{a,b}	0,27±0,09 ^p
PLMC (n=4)	0,30±0,08	0,72±0,06 ^{a,b}	0,12±0,05
ZYC (n=4)	0,32±0,11	0,80±0,07 ^{a,b}	0,17±0,04

Bulgular $X \pm SE$ olarak verilmiştir. n= numune sayısı

a: AYC ile karşılaştırıldığında ($p \leq 0,05$), b: BLKC ile karşılaştırıldığında ($p \leq 0,05$),
z: ZYC ile karşılaştırıldığında ($p \leq 0,05$), p: PLMC ile karşılaştırıldığında ($p \leq 0,05$),
m: MRGC ile karşılaştırıldığında ($p \leq 0,05$).

Herbir yağ ŞM'unun asit, baz ve tuz ortamda yapılan turbidite analizlerindeki değişim oranları kendi arasında karşılaştırıldığında ise (tablo 12); tüm ŞM'larda en fazla değişim tuz eklenen numunelerde ve en az değişim ise baz eklenen numunelerde görüldü. AYC; her üç ortamda oluşan absorbans değişimleri arasında birbirine göre anlamlı fark bulunamadı ($p > 0,05$). ZYC; her üç ortamda oluşan absorbans değişimleri birbirine göre anlamlı bulundu ($p \leq 0,05$). PLMC; her üç ortamda oluşan absorbans değişimleri birbirine göre anlamlı bulundu ($p \leq 0,05$). TRYC; her üç ortamda oluşan absorbans değişimleri birbirine göre anlamlı bulundu ($p \leq 0,05$). MRGC; her üç ortamda oluşan absorbans değişimleri birbirine göre anlamlı bulundu ($p \leq 0,05$). BLKC; her üç ortamda oluşan absorbans değişimleri arasında birbirine göre anlamlı fark bulunamadı ($p > 0,05$).

Tablo 12: ŞM'ların kendi arasında asit, baz ve tuz ortamda yapılan turbidite analizlerinde oluşan abs. değişim oranları.

	AYC (n=3)	ZYC (n=4)	PLMC (n=4)	TRYC (n=4)	MRGC (n=3)	BLKC (n=3)
Asit	0,32±0,15	0,32±0,11 ^{b,t}	0,30±0,08 ^{b,t}	0,43±0,06 ^{b,t}	0,53±0,07 ^{b,t}	0,33±0,06
Baz	0,46±0,14	0,80±0,07 ^{a,t}	0,72±0,06 ^{a,t}	0,66±0,15 ^{a,t}	0,70±0,03 ^{a,t}	0,39±0,02
Tuz	0,22±0,02	0,17±0,04 ^{a,b}	0,12±0,04 ^{a,b}	0,27±0,09 ^{a,b}	0,27±0,09 ^{a,b}	0,14±0,06

Bulgular $\bar{X} \pm SE$ olarak verilmiştir. n= numune sayısı

a: Asit eklenen numune ile karşılaştırıldığında ($p \leq 0,05$), b: Baz eklenen numune ile karşılaştırıldığında ($p \leq 0,05$), t: Tuz eklenen numune ile karşılaştırıldığında ($p \leq 0,05$).

4.6.3. Farklı Sulandırma Oranlarının Şilomikronların Agregasyonlarına Etkilerinin Karşılaştırılması

Farklı yağlardan elde edilen ŞM'ların ne 1/40 sulandırılmış numunelerinde ne de 1/70 sulandırılmış numunelerinde farklı yağ ŞM'ları arasında anlamlı bir değişim farkı bulunamadı ($p > 0,05$). Yine her bir yağdan elde edilen ŞM'un kendi içinde farklı dilüsyonlardaki örnekleri arasında da anlamlı bir değişim farkı bulunamadı ($p > 0,05$) (tablo 13).

Tablo 13: ŞM'ların farklı sulandırma oranlarının vorteksleme ile meydana gelen absorbans değişim oranları.

1/40 sulandırılmış numune						
3 dk. vortekslenmekten sonraki abs./vortekslenmeden önceki abs.						
Numune	AYC (n=4)	ZYC (n=2)	PLMC (n=4)	TRYC (n=4)	MRGC (n=3)	BLKC (n=3)
Abs.	0,80±0,12	0,74±0,07	0,83±0,12	0,61±0,40	0,72±0,10	0,31±0,24
1/70 sulandırılmış numune						
3 dk. vortekslenmekten sonraki abs./vortekslenmeden önceki abs.						
Numune	AYC (n=4)	ZYC (n=2)	PLMC (n=4)	TRYC (n=4)	MRGC (n=3)	BLKC (n=3)
Abs.	0,88±0,07	1,92±1,68	0,93±0,08	0,61±0,46	0,90±0,11	0,45±0,36

Bulgular $\bar{X} \pm SE$ olarak verilmiştir. n= numune sayısı

4.7. Farklı Yağlardan Elde Edilen ŞM'ların TAG, K, Fosfor Ve Protein Analizleri

Tablo 14'de ŞM büyüklüğünün belirlenebilmesi için hesaplanan TAG/FL oranları gösterilmiştir. Bu oranın büyük olması ŞM'un büyük olmasını ve küçük olması ŞM'un küçük olduğunu göstermektedir. Oranlar küçükten büyüğe sıralanmıştır. En küçük ŞM'lar tereyağından ve en büyük ŞM'lar zeytinyağından elde edildi. Ancak TAG/FL oranları açısından farklı yağlardan elde edilen ŞM'lar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilemedi ($p>0,05$).

Tablo 14: Farklı yağlardan elde edilen ŞM'ların TAG ($\mu\text{g/mL}$)/FL ($\mu\text{g/mL}$) oranları.

	TRYC(n=4)	PLMC(n=3)	AYC(n=20)	MRGC(n=3)	BLKC(n=3)	ZYC(n=3)
TAG/FL	559 $\pm$ 200	570 $\pm$ 193	632 $\pm$ 451	754 $\pm$ 320	972 $\pm$ 583	995 $\pm$ 231

Bulgular $X \pm SE$ olarak verilmiştir. n= numune sayısı

Tablo 15'de TAG/Protein en küçük oran tereyağından ve en büyük oran zeytinyağından elde edilen ŞM'larda hesaplanmıştır. Ancak TAG/Protein oranları açısından farklı yağlardan elde edilen ŞM'lar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilemedi ($p>0,05$).

Tablo 15: Farklı yağlardan elde edilen ŞM'ların TAG ($\mu\text{g/mL}$)/Protein ($\mu\text{g/mL}$) oranları.

	TRYC(n=4)	BLKC(n=3)	PLMC(n=4)	AYC(n=21)	MRGC(n=3)	ZYC(n=4)
TAG/PROT	17 $\pm$ 7	18 $\pm$ 13	24 $\pm$ 2	25 $\pm$ 12	33 $\pm$ 18	36 $\pm$ 9

Bulgular $X \pm SE$ olarak verilmiştir. n= numune sayısı

K miktarları sadece CC numunelerinde tespit edilmiş, ŞM ve HIC fraksiyon numunelerinde tespit edilememiştir. Bunun nedeni muhtemelen, numunelerin fazla dilue olması veya çok hassas olmayan hazır kitler ile çalışılmasıdır.

4.8. Yağların ve ŞM'lerinin Yağ Asidi Kompozisyonları Oranları

Tablo 18’de çalışmamızda kullandığımız yağların ve bu yağlardan elde edilen ŞM’ların yağ asidi kompozisyonları gösterilmiştir. Genel anlamda verilen yağın yağ asit profili büyük oranda elde edilen ŞM’a yansdı. Ayrıca tüm yağ ŞM’larının DYA / TDYA + ÇDYA ve TDYA / ÇDYA oranları tablo 16 ve 17’deki gibidir.

Tablo 16: Farklı yağlardan elde edilen ŞM’ların doymuş yağ asidi / doymamış yağ asidi oranları.

	TRYC	MRGC	BLKC	PLMC	AYC	ZYC
DYA / TDYA+ÇDYA	1,62	1,18	0,81	0,61	0,54	0,22

Oranlar büyükten küçüğe doğru sıralanmıştır.

Tablo 17: Farklı yağlardan elde edilen ŞM’ların tekli doymamış / çoklu doymamış yağ asidi oranları.

	PLMC	TRYC	ZYC	MRGC	BLKC	AYC
TDYA / ÇDYA	3,35	3,1	2,47	2,45	1,57	0,77

Oranlar büyükten küçüğe doğru sıralanmıştır.

Tablo 18: Kullanılan yağların ve bu yağlardan elde edilen şilomikronların yağ asidi kompozisyonları (%) (devam).

Behenik asit (C22:0)	0,77		0,13		0,12		0,06					
Erusik asit (C22:1)					0,04							
Lignoserik asit (C24:0)	0,25		0,04		0,13		0,05				0,83	
Dokosaheksaenoik asit (DHA) (C22:6, ω-3)											13,83	

Miristoleik asit (C14:1) *cis*-Δ⁹

Palmitoleik asit (C16:1) *cis*-Δ⁹

Oleik asit (C18:1, ω-9) *cis*-Δ⁹

Elaidik asit (C18:1, ω-9) *trans*-Δ⁹

Linoleidik asit (C18:2) *trans, trans*-Δ⁹, Δ¹²

Linoleik asit (C18:2, ω-6) *cis, cis*-Δ⁹, Δ¹²

Linolenik asit (C18:3, ω-3) *cis, cis, cis*-Δ⁹, Δ¹², Δ¹⁵

Araşidonik asit (C20:4, ω-6) *cis, cis, cis, cis*-Δ⁵, Δ⁸, Δ¹¹, Δ¹⁴

Eikosapentaenoik asit (EPA) (C20:5, ω-3) *cis, cis, cis, cis, cis*-Δ⁵, Δ⁸, Δ¹¹, Δ¹⁴, Δ¹⁷

Erusik asit (C22:1) *cis*-Δ¹³

Dokosaheksaenoik asit (DHA) (C22:6, ω-3) *cis, cis, cis, cis, cis, cis*-Δ⁴, Δ⁷, Δ¹⁰, Δ¹³, Δ¹⁶, Δ¹⁹

5. TARTIŞMA

Ratlara ayçiçeği yağı, zeytinyağı, tereyağı, palm yağı, margarin yağı ve balık yağı gavaj yolu ile verilerek torasik lenf ŞM'ları elde edildi. Elde edilen ŞM'ların HIC ve vorteks ile farklı koşullarda turbidite analizleri yapılarak yüzey hidrofobik özellikleri ve biyokimyasal ölçümler yapılarak içerdikleri TAG, fosfor, protein ve K miktarları değerlendirildi.

Kullandığımız yağlardan her biri büyük ölçüde belirli yağ asitlerini temsil etmektedir. Ayçiçeği yağı ω -6 ÇDYA, zeytinyağı TDYA, tereyağı, palm yağı ve margarin yağı DYA ve balık yağı ω -3 (DHA ve EPA) yağ asitlerini önemli oranlarda içermektedir.

ŞM TAG'ünün yağ asit kompozisyonu besinler ile alınan yağların yağ asit kompozisyonu ile büyük ölçüde paralellik göstermektedir (3). TAG'den zengin lipoproteinlerin yağ asit kompozisyonu büyük oranda besinsel yağ asitlerinin bir yansımasıdır ve bu lipoproteinlerin metabolizmalarını etkileyen ve onların aterojenitelerini belirleyen önemli bir faktördür (4). Ancak bazı çalışmalarda besinsel olarak alınan yağ asidi profili ile ŞM veya plazma TAG'lerinin yağ asidi profilinin birbiriyle uyum göstermediği gösterilmiştir. Cater ve ark. palm yağı ile beslenildikten sonra plazma TAG'lerinin yağ asidi profilinin palm yağı ile uyum gösterdiğini ancak orta zincirli yağ asitleri (8:0, 10:0) ile beslenildikten sonra plazma TAG'lerinin yağ asit profilinin besinlerle alınan ile uyuşmadığını göstermişlerdir (67). Hunter ve ark. sağlıklı genç erkeklerde oleik asitden zengin beslenilmesinin ardından oluşan ŞM'larda, besinsel olarak alınan yağ asidi profiliyle karşılaştırıldığında daha yüksek oranda palmitik ve linoleik asit bulunduğunu bildirmiştir (118). Karmen ve ark. radyoaktif işaretli palmitik, stearik, oleik ve linoleik asit yedirilen ratlardan elde ettikleri ŞM'ları incelemiş, ŞM TAG'lerinin yağ asitlerinin % 43'ünün ve ŞM KE'lerinin yağ asitlerinin % 54'ünün endojen kaynaklardan sağlandığını göstermişlerdir (119). ŞM'un yapısında bulunan FL'lerin

yağ asitlerinin ise neredeyse tamamı endojen kaynaklardan sağlanmaktadır (25). Yine Zilversmit ŞM içindeki KE'nin başlıca besinsel yağ asitlerinden ve FL'lerin ise endojen kaynaklardan sağlandığını mısır yağı yedirilen köpeklerden elde edilmiş ŞM'larda göstermiştir (120).

Benzer şekilde Lambert ve ark.'nın çalışması da besinsel yağ asitlerinin ne ölçüde ŞM'a yansıdığıyla ilgili önemli bulgular ortaya koymaktadır. Bu çalışmada adyoaktif olarak işaretlenmiş yağ asitlerinin ŞM yapısına dahil olma oranları şöyledir; zeytinyağı oleik asidinin % 71'i, mısır yağı linoleik asidinin % 86'sı, palm yağı palmitik asidinin % 74'ü, tereyağı palmitik asidinin % 70'i, laurik asidinin % 87'si, kaprik asidinin % 36'sı ve balık yağı EPA'sının % 78'i ve DHA'sının % 68'i ŞM yapısına dahil olmuştur. Palm, zeytinyağı ve tereyağı ŞM'larının ÇDYA oranları kaynaklandıkları yağ ile karşılaştırıldığında ciddi oranda artış göstermişken balık yağı ve mısır yağı ŞM'larında çok küçük bir artış olmuştur. EPA ve DHA balık yağı hariç hiçbir yağda bulunmamasına rağmen tüm yağ ŞM'larında % 0,5 ila 2,1 arasında bulunmuştur (121). Ratlara radyoaktif işaretli EPA verilerek yapılan çalışmada Chen ve ark. işaretli EPA'nın % 75,8 oranında ŞM yapısına dahil olduğu ve lenf sıvısının lipit fraksiyonu içinde % 83,6 oranında TAG yapısına dahil olduğu belirtilmiştir (122). Tüm bu veriler şunu göstermektedir ki, her ne kadar enterositte sentez edilen bir ŞM'un yağ asidi profili beslenen yağ asidi profili ile paralellik göstermekteyse de, bir ŞM lipoprotein yağ asidi profili kaynaklandığı besinsel yağın yağ asidi profilini tam olarak yansıtmamaktadır. ŞM yapısına endojen kaynaklardan büyük oranda yağ asidi eklenmesi sözkonusudur. Ayrıca bağırsaklarda besinsel yağ asitlerinin emilimleri sırasında ve ŞM sentezi sırasında başka yağ asitlerine dönüşümleri de söz konusu olabilmektedir.

Yağın yağ asidi profili ile bu yağdan elde edilen ŞM'ların yağ asidi profilinin en fazla palm yağı ve margarinde uyum gösterdiği görüldü. ŞM'larının yağ asidi profili büyük oranda palm yağı ve margarinin yağ asidi profili ile örtüşmektedir.

Tereyağı ŞM'larının yağ asitleri tereyağının yağ asit profili ile kabaca uyum göstermekle birlikte tereyağında tespit edilmemiş olan stearik asit ve linolenik asit sırasıyla % 10,8 ve % 9,6 oranında tereyağı ŞM'larında tespit edildi. Stearik asit, kısa zincirli yağ asitlerinden elongasyonla oluşturulmuş olabilir. Esansiyel bir yağ asidi

olan linolenik asidin sentez edilmesi mümkün değildir. Muhtemelen linolenik asit endojen kaynaklardan tereyağı ŞM'larına sağlanmış olabilir.

Zeytinyağında % 73 oranında bulunan oleik asit zeytinyağı ŞM'larında % 56 oranında bulunmuş, palmitik asit hafif bir artış göstermiş ve zeytinyağında % 8 olarak tespit edilen linoleik asit zeytinyağı ŞM'larında % 22 olarak bulunmuştur. TDYA oransal olarak % 25 azalmış bununla birlikte ŞM'larının ÇDYA oranı zeytinyağına göre % 275'lik oransal bir artış gösterdi.

Ayçiçeği yağının yağ asidi profili ayçiçeği yağından elde edilen ŞM'ların yağ asidi profilinden farklılıklar gösterdi. Ayçiçeği yağındaki linoleik asit oranı % 60 iken ŞM'larında bu oran % 36'ya düşmüştür. Oleik asit oranı değişmemiş fakat palmitik asit % 6'dan % 21'e ve stearik asit miktarı % 3'den % 13'e çıkmıştır. Genel olarak AYC'lerde ayçiçeği yağı ile karşılaştıracak olursak ÇDYA'dan fakirleşme ve DYA'dan zenginleşme sözkonusudur. Ancak bu değişiklikler oransal göreceli bir değişiklik gibi görünmekte, herhangi bir yağ asidinin başka bir yağ asidine dönüşümü görünmemektedir.

Yağ asitleri profili açısından en ilginç durum balık yağı ŞM'larında tespit edildi. Balık yağında sırasıyla % 20 ve % 13 oranında bulunan EPA ve DHA balık yağı ŞM'larında hiç tespit edilmedi. Bu durum mevcut literatür (121, 122) ile uyuşmamaktadır. Ayrıca elongasyon ve desaturasyonla bu yağ asitlerinin başka yağ asitlerine dönüşümü de söz konusu değildir. Bu nedenle EPA ve DHA, ŞM numunelerinde muhtemel ölçüm hatası nedeni ile gösterilememiştir. Büyük olasılıkla balık yağı ŞM'ları balık yağındakine yakın oranlarda EPA ve DHA içermektedir. Bununla birlikte balık yağında % 9 oranında bulunan palmitoleik asit ve % 8 oranında bulunan miristik asit de balık yağı ŞM'larına hiç yansımadağı görüldü. Ancak balık yağında % 1 oranında bulunan linoleik asit, % 3 oranında bulunan stearik asit, % 14 oranında bulunan oleik asit ve % 18 oranında bulunan palmitik asit balık yağı ŞM'larında sırasıyla % 21, % 13, % 33 ve % 31 oranında tespit edildi. Muhtemelen yağdaki miristik asit elongasyonla palmitik aside dönüşmüş olabilir, yine oleik asit DYA'lardan desaturasyon ile sentez edilmiş olabilir (69).

Metabolik ve epidemiyolojik çalışmalar farklı yağların farklı aterosklerotik etkilere sahip olduğunu, ateroskleroz gelişimi ve kardiovasküler hastalık oluşma riski yönünden besinsel olarak alınan toplam yağ miktarından çok alınan yağ tipinin

daha önemli olduğunu ortaya koymaktadır (4). Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda birçok besinsel bileşenin ateroskleroz gelişimini hafıflettiği gösterilmiştir (5). Birçok insan ve hayvan çalışması doymuş yağ asitlerinin serum total K'ü ve özellikle LDL-K'ü yükselttiğini bunun aksine doymamış yağların ise düşürdüğünü göstermiştir (70).

Daha önceki araştırmalarda bitkisel yağlarda bol miktarda bulunan ω -6 yağ asitlerinin kardiovasküler hastalık oluşumu ile ters bir bağlantısı olduğu gösterilmiştir. Hem ω -3 hem de ω -6 yağ asitleri plazma K ve TAG seviyelerini düşürürler. ω -6 yağ asitleri plazma TAG seviyesini az düşürürken plazma toplam K seviyesini daha etkin bir şekilde düşürür. Bunun aksine ω -3 yağ asitleri plazma TAG seviyesini daha etkin düşürürken K seviyesi üzerine etkileri düşüktür. Plazma K seviyesi ile ateroskleroz gelişimi arasındaki bağlantı birçok çalışmada ortaya konulmuş olmasına karşın hipertrigliseroleminin rolü tartışmalıdır. Bununla birlikte genel olarak koroner kalp hastalıkları için bir risk faktörü olarak kabul edilir (123). Soldado ve ark. yaptıkları çalışmada zeytin yağı ŞMR'larının hepatosit hücrelerinden TAG (VLDL) salgısını etkilemediğini bununla birlikte palm ve mısır yağının ise hepatik TAG (VLDL) salgısını önemli ölçüde arttırdığını göstermiştir. Yine aynı çalışmada palm ve mısır yağı zeytinyağı ile karşılaştırıldığında daha büyük VLDL'lerin salgılanmasına neden olmuştur. ŞMR'ların ateroskleroz üzerine etkisi sadece damar duvarına girişiyle ilgili değil aynı zamanda karaciğerden VLDL salgılanmasını arttırarak plazma K seviyesini yükseltmesiyle de ilgili olabileceği sonucuna varılabilir. Zeytinyağının (TDYA) ise karaciğerden daha küçük VLDL'lerin salgılanmasına neden oluşu antiaterosklerotik etkileriyle uyushmaktadır. Çünkü daha büyük VLDL'ler plazmada LDL'lerin fazla miktarda oluşumu ile ilişkilendirilebilir (124).

Palm yağı ve zeytinyağı ŞMR'larının mısır ve balık yağı ŞMR'larına göre makrofajlar tarafından çok daha hızlı alındığı ancak bu hızlı alınma sonucunda palm yağı ŞMR'larının makrofajlarda lipit birikimine neden olurken zeytinyağı ŞMR'larının böyle bir birikime neden olmadığı gösterilmiştir. ŞMR'ların yağ asidi kompozisyonunun makrofajlar tarafından alınmalarında ve lipit birikimi üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir (125).

Laurik asit ve miristik asit palmitik aside göre daha hiperkolesterolemik olarak kabul edilir. Miristik asit en hiperkolesterolemik olandır. Stearik asit etkisizdir ancak diyetle yüksek miktarda bulunması LDL ve HDL'i düşürmektedir. Birçok gıdada bol miktarda bulunan oleik ve linoleik asit gibi TDYA ve ÇDYA'lar hipokolesterolemik etkileriyle bilinmektedir (54). Palmitik asidin besinlerdeki karbonhidratların ya da TDYA'nın yerine konulduğunda LDL ve toplam K konsantrasyonlarını arttırdığı, miristik asit ve palmitik asit karışımının toplam K'ü tek başına palmitik asitten daha fazla arttırdığı gösterilmiştir. Stearik asit palmitik asidin aksine toplam K düzeyini arttırmamıştır (126). Miristik asidin yüksek K arttırıcı kapasitesi gösterilmiştir (127). Stearik asidin erkeklerde trombosit agregasyonu ile ilgili yararlı etkileri ve oleik ve linoleik aside göre trombosit miktarını azaltıcı etkileri ortaya konulmuştur (128). Stearik asidin vücutta hızla oleik aside dönüştüğü ancak bu dönüşümün bağırsaklarda değil karaciğerde gerçekleştiği tahmin edilmektedir (129). Linoleik asidin açık bir şekilde hipokolesterolemik etkileri (127) ve yeterince kanıt olmamakla birlikte kan basıncını düşürdüğü ve kardiyak aritmiyi önlediği ileri sürülmüştür (126). Elaidik asit besinlerdeki başlıca trans yağ asididir. Margarin yapımındaki hidrojenizasyonda linoleik asit hem stearik ve oleik aside hem de elaidik aside dönüşür. Elaidik asidin LDL'i yükseltirken HDL'i azalttığı bildirilmiştir (127).

Wood ve ark. tereyağı, TDYA ve ÇDYA ile zenginleştirilmiş tereyağı, margarin yağı ve trans yağ asidi içeren margarin yağı kullanarak yaptıkları çalışmada, tereyağı diğer tüm yağlara göre toplam serum K ve LDL-K seviyesini %5 oranında daha fazla yükseltmiştir, TDYA ve ÇDYA ile zenginleştirilmiş tereyağı serum lipit seviyelerini düşürememiştir. % 29 trans yağ asidi içeren katı margarin apoA-I ve apo B seviyelerini arttırmış ancak toplam serum K ve LDL-K seviyelerini etkilememiştir. Yüksek miktarda linoleat içeren ve trans yağ asidi içermeyen yumuşak margarin toplam K, LDL-K ve apo B seviyelerini diğer yağlara göre önemli ölçüde azaltmış, HDL seviyesini değiştirmemiş ancak apoA-1 seviyesini tereyağına göre düşürmüştür (130).

Tereyağı ateroskleroz gelişmesinde önemli bir risk faktörü olan postprandial lipemiye ve ŞM birikimini zeytinyağı ve ayçiçeği yağına göre arttırırken (50), doymuş yağ asitlerinden fakir, monoansatüre yağ asitlerinden zengin (zeytinyağı)

beslenilmesinin kardiovasküler hastalık ve kanser görülme sıklığında azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (5). DYA ile karşılaştırıldığında TDYA ve ÇDYA tüketimi daha düşük ateroskleroz gelişim riskiyle ilişkilendirilmiştir (4). Orta zincirli yağ asitleri (8:0, 10:0) ile beslenenlerde palmitik asit ve oleik asit ile beslenenlere göre daha yüksek TAG konsantrasyonuna ve oleik asit ile beslenenlere göre daha yüksek plazma toplam K konsantrasyonuna neden olduğu tespit edilmiştir (67).

Yine balık yağlarının kalp ve damar sağlığı açısından birçok yararlı etkisi ortaya konulmuştur. Balık yağlarının, dislipidemiye düzeltmesi balık yağının en karakteristik özelliğidir. Balık yağlarının tüketilmesi, iskemiden korur, infark boyutunu küçültür, kan dolaşımını sağlar ve aritmiye düzeltir (80). Balık yağlarının TAG konsantrasyonunun düşmesini sağladığı, balık yağı ve balık yağı zeytinyağı karışımının PGE₂'yi ve TxB₂'yi düşürdüğü ve balık yağlarının güçlü antikuagülan etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (131). Mısır yağı ŞMR'ları sıçan makrofaj hücre içi TAG seviyesini 4-6 kat arttırırken balık yağı ŞMR'ları 2 kat arttırmıştır (8).

İnsanlar uzun süreli balık veya balık yağı tükettiklerinde EPA ve DHA tüm hücre membranlarında ama özellikle trombosit, eritrosit, nötrofil, monosit ve karaciğer hücre membranlarında araşidonik asit ile yer değiştirir. Bunun neticesinde EPA ve DHA tüketimi; Prostoglandin E₂ metabolitlerinin üretiminin azalmasına, güçlü bir trombosit agregatörü ve vasokonstriktör olan tromboksan A₂'nin azalmasına, güçlü bir inflamasyon indükleyicisi ve güçlü şekilde lokosit yapışmasını sağlayan lökotrien B₄ oluşumunun azalmasına, zayıf bir trombosit agregatörü ve vasokonstriktör olan tromboksan A₃'ün artmasına, aktif vasodilatör ve trombosit agregasyon inhibitörü olan PGI₃'ün artmasına ve zayıf bir inflamasyon indükleyicisi ve zayıf bir kemotaktik ajan olan lökotrien B₅'in artmasına neden olmaktadır (68).

Açıkça görülmektedir ki hem ŞM partikülünün fizyolojik akibeti hem de ateroskleroz için önemi olan serum K ve TAG düzeyleri gibi risk faktörleri ve bu risk faktörlerinin fizyolojik veya patolojik düzenlenmesi, besinsel yağlarda bulunan yağ asitleri tarafından düzenlenmektedir. Besinsel yağ asitleri, ŞM'ların sentezinden yıkımlanmasına kadar birçok aşamada düzenleyici olarak görev yapar. Burada sorulması gereken soru bir ŞM partikülü içine dahil olan yağ asidi, partikülün hangi özelliğini değiştirerek bu etkilere sebep olmaktadır. Bizim hipotezimiz her besinsel yağın sahip olduğu yağ asidi profiline bağlı olarak ŞM'un yüzey özelliğini, özellikle

de partikül yüzeyindeki hidrofobik yapıyı değiştirerek bu etkileri oluşturmaktadır. Bu nedenle farklı yağlardan elde edilen ŞM partiküllerinin yüzey hidrofobik özelliklerinin belirlenmesinin ŞM'ların aterosklerotik özelliklerinin altında yatan sebeplerin daha iyi anlaşılmasını sağlayacağı düşünüldü. Bu amaçla farklı yağlardan elde edilen ŞM partiküllerinin yüzey hidrofobiklikleri vorteksle turbidite analizleri ve HIC kullanılarak değerlendirildi.

Polar maddeler için iyi bir çözücü olan su nonpolar maddeler için iyi bir çözücü değildir. Sıvı haldeki su molekülleri hidrojen bağları sayesinde kendi kendine salkıma benzer bir ağ şeklinde bulunurlar. Ancak su molekülleri arasındaki hidrojen bağları dengesiz bir yapı gösterir ve sürekli farklı su molekülleri arasında yeni hidrojen bağları oluşur ve bozulur. Bundan dolayı su moleküllerinin yarı ömrü çok kısadır ancak buna rağmen net etki olarak su molekülleri arasında çok güçlü bir yapışma sağlanır. Suyun yüksek kaynama noktası bu çok güçlü yapışmanın bir sonucudur. Su molekülleri, hava-su arayüzünde ise kendi kendine oldukça düzenli keskin bir kabuk yapısı oluşturur. Bu nedenle hava-su arayüzündeki hidrojen bağları dengededir ve belirli bir yüzey gerimi oluşur. Su kabuğunun stabilitesini etkileyen her şey yüzey gerimini de etkiler. Protein ya da hidrofobik bir ligant gibi hidrofobik bir madde suya daldırıldığında su-hava arayüzündeki yüzey gerilimine benzer bir durum oluşur. Su molekülleri hidrofobik maddenin yüzeyini ıslatamazlar onun yerine maddenin yüzeyini sararak son derece düzenli su moleküllerinden oluşan bir kabuk yapısı oluştururlar. Ancak bu durum termodinamik olarak tercih edilen bir durum değildir. Yükselmiş olan entropi sistemin serbest enerjisini negatife doğru değiştirdiğinden tekrar eski entropinin sağlanması için hidrofobik madde toplam yüzey alanını azaltmaya çalışır. Böylece hidrofobik maddenin yüzey alanının etrafını saran kabuğu oluşturan düzenli su moleküllerinin sayısı azaltılmış olur. Bu durum termodinamik olarak daha tercih edilen bir durumdur (108). Su içinde hidrofobik iki madde karşılaştığında, etraflarını saran kabuğu oluşturan düzenli su moleküllerinin ayrılarak hidrofobik iki maddenin birleşmesi de aynı şekilde termodinamik olarak daha tercih edilebilir bir durumdur. HIC'de hidrofobik kolon ortamı ile ŞM'un birleşmesinin temelinde bu prensip yatar. HIC'in ŞM'ların yüzey hidrofobikliklerine göre ayrımının yapılması için kullanılabileceği gösterilmiştir (12).

Faklı yağ ŞM'lerinin HIC'de hidrofobik analizleri yapılırken mobil faz olarak kullandığımız tuzlar ŞM'ların kolon ortamına çok sıkı bağlanmalarına neden oldu ve tuz konsantrasyonu azaltıldığı halde ŞM'lar elue edilemedi. Mobil faz olarak saf su denendi, ancak saf su en düşük hidrofobik etkileşime neden olmasına rağmen ŞM'lar yine elue edilemedi. Saf su içinde Triton X-100 deterjanı mobil faz olarak kullanılarak ortam ve ŞM'lar arasındaki etkileşim zayıflatıldı. Triton X-100'ün farklı konsantrasyonları denenerek ve kritik misel konsantrasyonu (KMK) göz önünde bulundurularak % 0,0125 konsantrasyonda Triton X-100'ün HIC analizlerinde mobil faz olarak kullanılmasına karar verildi. KMK, deterjan gibi hidrofobik bir maddenin su gibi polar bir çözücü içinde misel yapısı oluşturabilmesi için ulaşması gereken en düşük yoğunluktur. Misel yapısının oluşması için sürfaktan konsantrasyonunun KMK'dan yüksek olması gerekir (99, 102). Triton X-100'ün KMK'u 0,22-0,24 mM'dür (132). Bu değer yüzde konsantrasyon olarak % 0,0129-0,0141'e eşittir. Bu nedenle triton X-100'ün % 0,0125 konsantrasyonu, KMK'unun altında kalan bir konsantrasyondur.

Farklı yağ ŞM'larının HIC kromatogramlarındaki en belirgin özellik BLKC, PLMC ve ZYC'lerin 3 fraksiyona ayrılırken ve MRGC, TRYC ve AYC'nin ise 2 fraksiyona ayrılmalarıdır. Palm yağın yarı doymuş yağ olarak değerlendirirsek doymamış yağlar 3 fraksiyona ve doymuş yağlar ise 2 fraksiyona ayrılmıştır denilebilir. Ancak ayçiçek yağı doymamış bir yağ olduğu halde bu yağdan elde edilen ŞM'lar ilginç bir şekilde 2 fraksiyona ayrılmıştır.

Burada sorulabilecek sorulardan biri, oluşan bu fraksiyonların gerçekten ŞM numunelerinin hidrofobik farklılıklarından kaynaklanan fraksiyonlar mı olduğudur. Mobil faz olarak kullanılan deterjan, ŞM partikülünün yapısını bozarak bu fraksiyonların oluşmasına neden olmuş olabilir. Bunun yanında deterjanın kendisi de deterjan miselleri oluşturarak bu fraksiyonları oluşturmuş olabilir.

Deterjanların lipoproteinler üzerine etkileri birçok çalışmada gösterilmiş olmasına rağmen ŞM'lar üzerine etkileri araştırılmamıştır. Ancak deterjanların diğer lipoproteinler üzerine olan etkileri değerlendirildiğinde özellikle düşük konsantrasyonlarda, ŞM partikülleri üzerinde önemli bir değişime neden olamayacağı sonucu çıkarılabilir.

ŞM'un yüzeyi gibi bir hidrofobik yüzey üstünde deterjan gibi bir sürfektanın hidrokarbon zinciri hızlıca yüzeydeki su ile yer değiştirebilir ve böylece tutunma eğilimi başlar. Sürfektan yoğunluğu arttıkça tutunma yoğunluğu da aynı ölçüde artar, tutunmuş hidrokarbon zincirler yan yana birbirlerini etkilemeye başlarlar (133). ŞM yüzeyi ile benzerlik gösterebilecek bir fosfolipit bilayerinin deterjan ile muamele edildiğinde, deterjan moleküllerinin hidrofobik parçasının suyun moleküller arası hidrojen bağlama kapasitesinin azalmasına neden olduğu gösterilmiştir. Deterjan molekülleri, membranın hidrofobik çevresi ve su fazı arasında dağılır ve bunun sonucunda lipit membranının hidrokarbon kısmındaki polar fazın hidrofobik kısmı uzaklaşır, sistemin tüm entropisi artar ve muhtemel parçalanma gerçekleşir (134). Yüksek deterjan konsantrasyonları lipoproteinlerde lipitleri proteinlerden ayırır ve misel solüsyonu içindeki lipofilik proteinler büyük oranda bu deterjanlarla bağlanırlar ancak hidrofilik proteinler deterjanlar ile çok az bağlanırlar. Yani deterjan muamelesi neticesinde proteinlerin üzerindeki lipitler, deterjanlar ile yer değiştirirler (135). Proteinlerden ayrılan lipitler deterjan misellerinin içine girer ve çevrelenirler. Muhtemelen deterjanın hidrokarbon zincirleri arasında sandeviç şeklinde çevrelenirler (136). Bununla birlikte, eşit molar sfingomyelin, K ve dioleofosfatidilkolinden oluşturulmuş lipit bilayerinin 5 farklı deterjan denenerek etkilenme mekanizmalarının karşılaştırıldığı bir çalışmada, % 0,015 konsantrasyonunda triton X-100 eklenmesinin lipit bilayerinin morfolojisinde ve toplam yüzey alanında bir değişime neden olmadığı, ancak triton konsantrasyonu arttırıldıkça bilayerin lipit yükünün değiştiği gösterilmiştir (137). Başka bir çalışmada triton WR-1339 HDL'i düşük konsantrasyonlarda bile etkilemiş, konsantrasyon arttıkça HDL'in bütün apo A-I'leri uzaklaşmış ve lipit içeriğinin tamamına yakını triton miselleri içinde erimişken, LDL molekülleri tritona karşı oldukça dayanıklı bulunmuş, apo B'leri ayrılmamış ve herhangi bir lipit kaybı gerçekleşmemiştir (138). Düşük deterjan konsantrasyonuna maruz bırakılan HDL'lerin büyüklüğünün arttığı ancak şeklinin değişmediği gösterilmiş, bu durum düşük deterjan konsantrasyonlarında HDL'in yapısına muhtemel deterjan eklenmesiyle açıklanmıştır. Yüksek konsantrasyonda triton WR-1339 HDL'in parçalanmasına neden olmaktadır. 10 mg/mL'nin üzerindeki triton konsantrasyonuna maruz kalan HDL'in önce apo A-I'leri hızla uzaklaşır, daha sonra lipit içeriğini

kaybeder ve en son protein kısmı uzaklaşarak parçalanır (139). Dansitesi 1.006 ile 1.063 arasında olan lipoproteinler ancak çok yüksek triton konsantrasyonlarından etkilenirken, dansitesi 1,063 ile 1,21 arasında olan lipoproteinler tritona karşı özellikle hassasiyet gösterirler (136).

Mevcut literatür bilgisi ışığında dansitesi 0,95'den daha düşük olan ŞM'ların % 0,0125 konsantrasyondaki triton X-100'den etkilenmeyeceği ve yapısının önemli bir değişikliğe uğramayacağı anlaşılmaktadır.

O halde farklı hidrofobik özellik gösteren bu fraksiyonlar ŞM'un hangi bileşenlerinden oluşmaktadır ve neden bir ŞM partikülü farklı hidrofobik özellik gösteren iki veya üç kısma ayrılmaktadır. Burada iki ihtimal vardır. Ya HIC'e uygulanan ve içerisinde ŞM'ların bulunduğu solüsyon içerisinde farklı hidrofobik özelliğe sahip ŞM partikülleri bir arada bulunuyor olabilir ya da ŞM'un yapısı bozularak partikülü oluşturan bileşenler farklı hidrofobik özelliklerine göre bu fraksiyonları oluşturuyor olabilir. Birinci ihtimalde, numune içerisindeki farklı partikül boyutuna sahip ŞM'lar farklı hidrofobik özellik gösterebilir ve bu fraksiyonları oluşturabilir. Ancak jel filtrasyon kromatografisi sonuçlarımız oluşan bu fraksiyonların ŞM'ların farklı büyüklüklerinden kaynaklanmadığını açıkça ortaya koymaktadır.

İkinci seçenek daha olası bir ihtimaldir. İki veya daha fazla adımda gerçekleşen ŞM sentezindeki (34) aşamaların aynı şekilde tersine ŞM çözünmesiyle bu fraksiyonlar oluşuyor olabilir. ŞM'un enterosit içindeki sentezi, apo B-48'in oluşması, daha sonra apo B-48'i olmayan ancak başka proteinleri olan lipit damlacığı ile füzyon ve kesin olmamakla birlikte golgide ayrıca bir lipit yüklenmesi şeklinde iki veya daha fazla aşamada gerçekleşir (31, 34). ŞM'un sentezindeki lipit yüklenmesi aşamaları işleyerek iki veya üç fraksiyon halinde ayrılmaya neden oluyor olabilir. Kolon ortamının hidrofobik yüzeyine bir bütün olarak ve farklı hidrofobik özelliğe sahip birkaç noktadan bağlanan ŞM partikülü, daha zayıf bağlanmış kısımlarından başlayarak partikülden ayrılıyor ve bu fraksiyonları oluşturuyor olabilir.

Farklı yağ ŞM'larının HIC ile fraksiyonlara ayrılması bu fraksiyonların farklı hidrofobik özelliğe sahip olduğunu göstermektedir. Yüksek hidrofobik özelliğe sahip fraksiyon kolona daha sıkı bağlanmış ve daha uzun süre kolona bağlı kalmıştır.

Düşük hidrofobik özelliğe sahip fraksiyon ise daha erken sürede kolondan ayrılmıştır. İlk fraksiyonlar elüsyon hacmi ile birlikte kolondan ayrılmıştır. Bu ilk fraksiyonun kolona hiç tutunmadığını veya çok az tutunduğunu göstermektedir.

HIC analizlerinde palm yağı ŞM'ları farklı hidrofobik özelliğe sahip üç fraksiyona ayrıldı ve en düşük 3. pik k değerine sahip ŞM'lar arasında bulundu. PLMC, HIC'de hidrofobik ortam ile en zayıf etkileşime giren fraksiyonların bulunduğu ŞM'lar arasındadır. Kolonla hidrofobik etkileşimine göre tutunan madde miktarının bir göstergesi olan 1. pik alanı / 3.pik alanı oranları içinde ise orta değerlerde bir orana sahiptir.

Eşit oranda doymuş ve doymamış yağ asitlerini içeren palm yağı yarı katı haldedir (11). Bununla birlikte yüksek oleik ve linoleik asit içermesi nedeniyle de oleolinoleik grubu yağlar arasında yer almaktadır. Palm yağındaki doymamış yağ asitlerinin neredeyse tamamı gliserol molekülünün 2- pozisyonunda yer almaktadır (71). Palm yağı yüksek doymuş yağ oranına rağmen düşük hidrofobik özellik göstermesi, palm yağının ateroskleroz gelişimi ile ilgili bildirilmiş olan olumlu etkileriyle uyumaktadır. Palm yağının serum toplam K, TAG, LDL-K ve trombotik eikosanoidlerin seviyesini düşürdüğü ve kan basıncını ve trombositlerin trombotik eğilimini azaltıcı etkileri gösterilmiştir. Bu etkilerin oluşmasında palm yağının içerdiği TAG ve gliserit olmayan bileşenlerin yanı sıra farklı sterokimyasal biçimi veya yağ asitlerinin izomerik pozisyonuyla ilgili olduğu düşünülmektedir. Özellikle diğer birçok yağdan daha fazla oranda palm yağında bulunan 'tokotrienoller'in K biyosentezini ve trombosit agregasyonunu inhibe ettiği ve kanserli hayvanların yaşam süresini arttırdığı gösterilmiştir (11).

Margarin yağı ŞM'ları hem k değeri hem de pik alan oranları değerlendirildiğinde beklenenin aksine düşük hidrofobik özelliğe sahip bulundu. Doymuş yağ asidi yüksek olan margarinin bu yağ asitlerinin kaynağının bitkisel doymamış yağ asitleri olması ve şimdilerde üretilen margarinlerin trans yağ asidi içermemesi margarin ŞM'larının doymamış yağ asidi ŞM'larına benzer hidrofobik özellik göstermesindeki neden olabilir.

Zeytinyağı ŞM'larının nisbeten ortalarda bir k değerine ve ortalarda bir pik alan oranına sahip olduğu görüldü. Zeytinyağı ŞM'ları en düşük doymuş yağ asidi / doymamış yağ asidi oranına (0,22) sahipti. Zeytinyağının aterosklerozis önleyici

faydalı etkileriyle ilişkili ortaya konulmuş yüzlerce çalışmanın sonucu da düşünüldüğünde daha düşük hidrofobik özellik göstermesini beklemekteydik. Ancak bu sonuç, zeytinyağının faydalı etkilerinin onun yağ asidi kompozisyonu ile bağlantılı olabilecek lipoprotein hidrofobikliği ile ilişkili olmayabileceğini göstermektedir. Bir lipoprotein hidrofobik özelliği sadece besinlerle alınarak ŞM yapısına dahil olan yağ asidi kompozisyonuna bağlı olarak değil buna ek olarak alınan yağın yapısında yer minör bileşenlere bağlı olarak da şekillenebileceğini düşünülebilir. Yine zeytinyağının özellikle ateroskleroza önleyici faydalı etkileri, içerisindeki minör bileşenlerle ilişkili olabilir. Zeytinyağının içinde fenolikler, tokoferoller, steroller ve terpenik bileşenler gibi minör bileşenler bulunurlar. Tokoferoller, steroller ve terpenik bileşenlerin antioksidan ve antienflamatuar özellikleri rapor edilmiştir. Sadece rafine edilmemiş zeytinyağında bulunan fenoliklerin, yüksek oleik asit içeren ayçiçeği yağı ile karşılaştırıldığında prostoglandin E₂ ve tromboxan B₂ üretiminde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (4). Yine skualen ve eritrodiol de zeytinyağındaki sabunlaşmayan bileşenlerdir ve sadece sızma zeytinyağında bulunur, rafine zeytinyağında bulunmaz. Perona ve ark. sızma zeytinyağı, skualen ve eritrodiol ile ayrıca zenginleştirilmiş sızma zeytinyağı ve oleik asit içeriği zenginleştirilmiş ayçiçeği yağı ile yaptığı çalışmada; yüksek miktarda sabunlaşmayan fraksiyon içeren sızma zeytinyağının proinflamatuar ve protrombotik maddelerin salınımını azalttığını göstermişlerdir. Yine bu çalışmada sağlıklı kişilerde ve hipertansif hastalarda sızma zeytinyağı kan basıncını düşürmüştür. Bununla birlikte yüksek oleik asit içeren ayçiçeği yağında böyle bir etki oluşmamıştır (10).

Tereyağı ŞM'ları en yüksek *k* değerine sahip ŞM'lar arasındadır. Yani TRYC'ler HIC kolonuyla kuvvetli bir şekilde etkileşmişlerdir. Bizim sonuçlarımızda en yüksek doymuş yağ asidi / doymamış yağ asidi oranına (1,62) sahip ŞM olan tereyağı ŞM'larının göstermiş olduğu yüksek *k* değeri yüksek doymuş yağ asidi oranıyla uyum göstermektedir. Ancak TRYC'lerin pik alan oranına bakıldığında ise ortalarda bir pik alan oranına sahip olduğu görüldü. Yani tereyağı ŞM'ları yüksek hidrofobik etkileşimle kolona bağlanmaktadır ancak kolona bağlanan yüksek hidrofobik özelliğe sahip bileşenlerinin miktarı o kadar yüksek değildir.

Tereyağı büyük oranda orta ve kısa zincirli yağ asitlerinden oluşur. Bu nedenle bu yağ asitleri MAG yolağı ile esterleşmek için kötü substratlardır ve ayrıcalıklı olarak portal ven yoluyla taşınırlar. Bu nedenle besinsel olarak alınan tereyağı içerisindeki yağ asitlerinin ancak dörtte biri ŞM içinde TAG olarak toplanıp lenf yoluyla taşınır (2).

Tereyağı yağ asidi ve TAG kompozisyonuna göre en kompleks besinsel yağdır. Süt TAG'leri alışılmadık bir yağ asidi konformasyonuna sahiptir. Bitkisel yağlardaki palmitik asit TAG'ün 1,3- pozisyonuna yerleşmişken oleik ve linoleik asit gibi doymamış yağ asitleri 2- pozisyona yerleşmiştir. Süt yağında ise palmitik asit çoğunlukla (%70) TAG'ün 2- pozisyonuna yerleşmiştir. Yine süt yağında oleik ve linoleik asidin önemli bir kısmı ile araşidonik asidin yarısı ve DHA, TAG'ün 1 ve 3- pozisyonuna esterleşmiştir (76).

Phan ve ark. yaptıkları çalışmada tereyağı ŞM'larının sanılandan çok daha kompleks olduğunu ve bunun tereyağı doymuşluğu ile bağlantılı olmasının da şart olmadığını ileri sürmüşlerdir. Tereyağı gibi kompleks yağlar için yağ asit türlerinin her biri ŞM metabolizması ve ŞMR'ın karaciğer tarafından alınmasıyla etkileşmesi imkan dahilindedir. Dolaşımdan uzaklaştırılma modeli ŞM lipitleri içindeki besinsel yağ asitlerinin reesterifikasyonuna bağlanabilir. TAG'lerin fiziksel özellikleri ve TAG ile esterleşmiş olan yağ asitlerinin konformasyonel düzenlenmesi plazma temizlenmesini etkiliyor olabilir. ŞM partikülünün içindeki farklı lipitlerin her bir yağ asidi lipoproteinin yüzeyinde aynı zamanda etkilediği ve bundan dolayı apolipoproteinler ve reseptörler ile etkileştiği kabul edilebilir (54).

Innis ve Dyer çalışmalarında 2- pozisyonunda palmitik asit taşıyan süt TAG'lerinden oluşan dolaşımdaki ŞM'ların TAG'lerinin de palmitik asidi 2- pozisyonunda taşıdığını göstermişlerdir. Birçok çalışma süt yağı TAG'lerinin intestinal lumende tamamen hidrolize uğrayıp palmitik asidin serbest yağ asidi olarak emildiğini ileri sürmektedir. Ancak Innis ve Dyer süt yağı TAG'lerinin palmitik asit pozisyonu değişmeden intestinal lumende 2-MAG'e hidroliz olduğunu, bu şekilde enterosit içine alındığını ve tekrar TAG'e çevrildiğini ve aynı şekilde ŞM içine dâhil olduğunu göstermişlerdir. 2- pozisyonunda palmitik asit taşıyan TAG'ler, 2- pozisyonunda diğer doymuş yağ asitlerini taşıyan TAG'ler göre dolaşımdaki hidrolizleri daha yavaştır ve karaciğer tarafından daha yavaş alınırlar (76).

Tereyağının aterosklerotik özelliğinin altında yatan sebep ŞM'lerinin hidrofobik özelliği değil dolaşımında uzun süre kalması olabilir.

Ayçiçeği yağı ŞM'ları zeytinyağı ŞM'larından sonra en düşük doymuş yağ asidi / doymamış yağ asidi oranına (0,54) sahiptir. Ancak şaşırtıcı bir şekilde HIC'de hidrofobik ortam ile en kuvvetli etkileşime giren (yüksek *k* değeri) ŞM'lar arasındadır. Aynı zamanda hidrofobik ortam ile etkileşime giren en büyük fraksiyonlarda (düşük pik alan oranı) ayçiçeği yağı ŞM'larında bulunmaktadır. Ayçiçeği yağı, yüksek oranda içerdiği doymamış yağ asitlerinin, ŞM'larının hidrofobik karakterine bir etkisi olmamıştır. Ayçiçek yağında bol miktarda bulunan ve aterosklerozisle ilgili birçok faydası gösterilmiş olan ÇDYA muhtemelen başka mekanizmalarla bu etkilerini göstermektedir.

HIC'de hidrofobik ortam ile etkileşime girmeyen en büyük fraksiyonlar balık yağı ŞM'larında bulundu. Yine balık yağı ŞM'ları en zayıf etkileşime giren fraksiyonların bulunduğu ŞM'lar arasındadır. Balık yağı ŞM'larının göstermiş olduğu bu düşük hidrofobik özellik beklenen bir sonuçtur. Balık yağının özellikle koroner hastalıkları ve aterosklerozisi önleyici birçok faydası ortaya konulmuştur. Bizim sonucumuz, bu etkilerinin oluşmasında içerdiği yağ asidi kompozisyonuna bağlı olarak şekillenen düşük yüzey hidrofobikliği etkisine işaret edebilir.

Farklı yağ ŞM'larının yüzey hidrofobikliğini değerlendirmek için ayrıca ŞM'ların agregasyon davranışlarının incelendiği vorteksle turbidite analizleri yapıldı.

Partikül agregasyonu lipoprotein hidrofobik doğasının bir özelliğidir ve agregasyon ise aterosklerozun altında yatan sebeplerden biri olarak bilinmektedir (12). Subendotel boşlukta yakalanmış olan lipoproteinlerin hücre dışı agregasyonu ve depozisyonunun insan arter intimasında aterosklerotik plak oluşumunu başlattığı düşünülmektedir (13). Subendotele tutunmuş lipoproteinler sıklıkla agreg olmuşlardır. Aterosklerotik lezyonlardan izole edilen LDL'ler ya agregedir ya da agregasyon eğilimi artmıştır. Bu nedenle lipoprotein agregasyonu iki açıdan önemlidir; birincisi retensiyon öncesinde veya retensiyon sırasında meydana gelen agregasyonun tutunan materyal miktarını arttırması beklenir ve ikincisi ise agreg LDL güçlü bir şekilde makrofaj köpük hücre formasyonunu indüklemektedir (14). Agregasyona sebep olabilecek durumlar üç başlık altında ele alınabilir;

1. Kimyasal reaktifler: Cu^{2+} , H_2O_2 , süperoksit, nitrik oksit, Ca^{2+} ve asidik pH.

2. Biyokimyasal reaktifler: lipooksijenaz, myeloperoksidaz, fosfolipaz A₂ ve C, sfingomyelinaz, seramid, proteoglikanlar ve heparin-jelatin-fibronektin.
3. Mekanik işlem: Vorteksleme (13).

Çalışmalar kısa bir vortekslemenin etkisi ile LDL'lerin kolaylıkla agregasyona uğradığını ve agregate LDL'lerin doğal LDL'lere göre makrofajlar tarafından çok daha hızlı alınarak degradasyona uğrayıp KE'den zengin köpük hücrelerine dönüştüğünü göstermektedir (15, 16). Oda ısısında LDL'in 30 sn basitçe vortekslenmesi LDL proteinlerinin yaklaşık % 50'sinin presipite olmasına neden olduğu ve oluşan LDL agregatlarının fare periton makrofajları tarafından daha efektif olarak alındığı gösterilmiştir. Vorteksleme neticesinde oluşan LDL agregatları aynı konsantrasyondaki doğal LDL'lere göre 6,6-10 kat fazla miktarda makrofajlar tarafından degradesyona uğrar ve vorteks süresi arttıkça agregasyon ve degradasyon artar (140). Aterogenez oluşumundaki hücre içi K birikiminde LDL agregasyonunun anahtar bir rol üstlendiği ileri sürülmüş, fare periton makrofajları ve insan monosit makrofajları ile yapılan çalışmalarda agregate olmuş LDL'lerin doğal LDL'lerden farklı yollar izlediği gösterilmiştir. Doğal LDL'ler hücre stoplazmasında düzgün bir dağılım gösterirken agregate LDL'ler vezikül benzeri kümeler oluşturarak düzgün olmayan bir dağılım göstermiştir (141). Vorteksleme ile oluşan LDL agregasyonuna 600 nm'den büyük lipit damlacıkları ve vezikül oluşumu da düzenli olarak eşlik eder. 5 sn gibi küçük bir vorteksin ardından oluşan agregatlar lipit damlacıklarını ve vezikülleri de içerir. 4 dk vortekslemenin ardından LDL'in protein ve KE'lerinin hemen hemen tamamı (% 95) agregatlar ile birleşir. FL ve serbest K orijinal LDL'de kalır. İnsan aort aterosklerotik fibröz plaklarının çekirdek bölgeleri elektron mikroskobu ile incelendiğinde ultrayapısal baskın lipit formlarının küçük damlacıklar ve veziküllerden oluştuğu görülmüştür (142).

Bununla birlikte LDL'lerin agregasyon davranışının birçok şekilde düzenlenebileceği gösterilmiştir. LDL agregasyonu LDL-antikor kompleksi oluşumu, malondialdehit ile muamele ve LDL glikolizasyonu ile artar (143). Aktif haldeki nötrofil ve monositlerde myeloperoksidaz enzim aktivitesi ile H₂O₂ ve kloritten oluşturulan ve çok güçlü bir oksidan olan hipoklorit (⁻OCI) ile muamele LDL agregasyonuna neden olur (144). HNE (4 hidroksinonenal) doza bağımlı olarak LDL agregasyonunu artırır (145). Fosfolipaz C hidrolizi ve bakteriyel sfingomyelinaz

agregasyona neden olur (14). Bakır iyonları ile oksidasyon ve sfingomyelinaz ile lipoliz agregasyonu azaltır (143). HDL’inde LDL agregasyonunu baskıladığı gösterilmiştir (15). Vorteksleme öncesi LDL metilasyonu agregasyonu ve sonrasındaki agregat degradasyonunu azaltır (16). Oksidasyon LDL partiküllerinin negatif yükünü arttırdığından agregasyon eğilimini artırır. LDL üzerindeki pozitif yüklü lizin kalıntılarının bozulan lipit hidroperoksit ürünleriyle kovalent bağlanması sonucu negatif yük artışı olur. Okside LDL agregatları makrofajlar tarafından çok daha hızlı alınmaktadır (146).

Xu ve Lin’in H_2O_2 ile muamele ettikleri LDL’in agregasyon aşamalarını gözlemledikleri çalışmalarında partikül agregasyonunun rastgele bir çökme değil, daha düzenli ve sıralı bir oluşum olduğunu göstermişlerdir. Monomerik lipoproteinler önce çekirdeklenme ünitelerini oluşturmuş ve daha sonra bu ünitelerden lineer agregatlar oluşmuştur. Lineer agregatlar dallanarak fraktal denilen yapıyı oluşturmaktadır. Sonrasında solüsyon içinde 3-20 μm çapında veziküller gözlemlenmiştir. Daha çok küresel yapıda olan ve büyük çoğunluğu fraktallarla birleşik olan bu veziküllere benzer veziküller aterosklerotik plaklarda da tespit edilmiştir. H_2O_2 ile muamele edilerek üç günde oluşturulan bu fraktallar 1 dk vorteksleme neticesinde oluşturulabilmektedir ve asidik pH ya da Ca^{2+} muamelesi agregat oluşumunu üç kat hızlandırmaktadır (13).

LDL partikülleri hidrofobik özelliklerinin bir sonucu olarak vortekslenme neticesinde agrege olmakta ve bu durumun neden olduğu turbidite artışı spektrofotometrik olarak tespit edilebilmektedir. Büyük agregatların tespit edilmesi amacıyla turbidite analizinin kullanılması uygun bir yöntemdir (16). LDL’e benzer şekilde ŞM’ların da turbidite analizleri yapılarak ŞM partiküllerinin agregasyon davranışları araştırıldı.

Farklı yağ ŞM partiküllerinin vortekslenmesiyle LDL partiküllerinin aksine turbiditenin arttığı değil azaldığı tespit edildi. Vortekslenen ŞM’lar spektrofotometrik olarak turbidite artışı değil turbidite azalması gösterdiler. Yani vortekslenen ŞM’lar agrege olmamaktadır. Birer dakikalık her vortekste turbiditenin biraz daha azaldığı gözlemlendi. Bu durum bir ŞM partikülünün vortekslenme neticesinde diğer bir partikül ile birleşmediğini aksine kendi yapısının stabil kalmayarak parçalandığını göstermektedir.

Miseller arasındaki etkileşim elektrostatik ya da hidrasyon gücü neticesinde iticidir. Bu nedenle miseller diğer bir misel ile birleşebilir ve agregatların sayısı artar. Sürfaktan moleküllerinin etkisiyle oluşan hidrokarbon-su etkileşimi agregasyonu kolaylaştırır (99, 102). Bu etkiye ters olarak hareket eden misel düzeyindeki polar baş grupları arasındaki itici gücün sağladığı hidrofobik etkileşimler ise agregasyona engel olur. Baş grupları elverişsiz itici grupları kendi kendine minimize ederek düzenlemeye çalışır. Bu nedenle polar etkileşimler azaltılarak misel stabilitesi sağlanabilir (147).

Yani bir lipoprotein partikülünün diğer bir lipoprotein partikülü ile vortekslenen LDL partiküllerinde olduğu gibi birleşerek agrege olması ya da bir lipoprotein partikülünün kendi yapısını stabil tutabilmesi partiküller arası elektrostatik etkileşimler veya hidrasyon gücü ile bu etkilere ters hareket eden lipoprotein partikülünün yüzeyindeki FL'lerin, serbest K'ün ve proteinlerin arasındaki hidrofobik etkileşimlerin bir neticesidir.

Vortekslenen farklı yağ ŞM'ları agregasyon davranışı ve dolayısı ile turbidite artışı göstermediler ancak yağ türüne göre farklılık arzeden bir turbidite azalışı gösterdiler. Hem oda ısısındaki taze ŞM'lar hem de +4 ve -5 °C'de 24 saat bekletilmiş ŞM'ların vortekslenmesi sonucu oluşan turbidite değişim sıraları korunmaktadır. En yüksek turbidite değişim (azalması) oranı TRYC ve BLKC'de tespit edilmiştir. Ancak MRGC ile değişim farkı istatistiksel olarak anlamlı değildir. ŞM'ların muhafaza edildikleri ortam sıcaklığının azalması değişim oranı sıralamasını değiştirmemekte, ancak farkları istatistiksel olarak daha anlamlı hale getirmektedir.

Bunun yanında PLMC, AYC, ZYC ve MRGC vortekslenmeye karşı daha dayanıklı bulunmuş, TRYC ve BLKC'ye göre daha az değişim oranı göstermiştir.

HIC'de en yüksek yüzey hidrofobikliğine sahip AYC, vortekslenme ile turbiditesi en az değişen (azalan) ŞM'lardan biridir. Bununla birlikte HIC'de en düşük yüzey hidrofobikliğine sahip BLKC ise vortekslenmeye en dayanıksız yani en fazla turbidite değişimi (azalması) gösteren ŞM'lardan biridir.

Asit eklenmesi ŞM'lar arasındaki turbidite değişim oranı sıralamasını ortadan kaldırmıştır. Asit ortamda yapılan vorteksleme ile tüm ŞM'larda belirli bir turbidite azalması olmuştur. Ancak bu değişim oranı tüm ŞM'lar için aynı bulunmuştur. Bazik

ortamda yapılan vorteksleme neticesinde ŞM'ların değişim oranları sıralaması değişmemiştir.

Tuz eklenmesi tüm ŞM'lar arasındaki turbidite değişim oranı farklılıklarını ortadan kaldırmış bununla birlikte sadece PLMC'nin turbidite değişimi (azalması), ZYC hariç diğer tüm ŞM'lara göre anlamlı şekilde daha fazla oldu. Misel yapısının itici gücü, alkil zincirleri ve su arasındaki teması engeller. Bu nedenle küresel bir miselin büyümesi halinde yüzey/hacim oranı küçüleceği için bu güç daha verimli olur. Yani misel büyüklüğünün artması daima hidrokarbon-su temasının azalmasına bu da hidrofobikliğin azalmasına neden olur. Misel büyüklüğü beraberinde çözünen maddelere çok duyarlıdır. Eklenen tuz miselin büyümesini sağlar. Nonpolar maddeler miselin merkezinde lokalize olurlar ve miselin büyümesine inhibe etme eğilimindedirler (147).

Herbir ŞM'un asit, baz ve tuz ortamlardaki turbidite değişimleri kendi içinde karşılaştırıldığında; AYC ve BLKC'nin her üç ortamdaki turbidite değişim oranları aynıdır. Ancak ZYC, PLMC, TRYC ve MRGC her üç ortamda farklı ve istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde turbidite değişim oranları göstermiştir. Bu ŞM'lar en fazla turbidite değişimini tuz ortamda ve en düşük turbidite değişimini bazik ortamda göstermişlerdir. Bu dört ŞM'un her üç ortamdaki turbidite değişim oranları istatistiksel olarak birbirinden farklıdır.

HIC'de tespit edilen hidrofobik karakter ile turbidite analizleri ile tespit edilen hidrofobik karakter arasında genel anlamda bir paralellik vardır. PLMC ve TRYC hariç diğer tüm ŞM'lar için bu değerlendirme yapılabilir ancak bu iki ŞM istisnai bir durum sergilemektedir.

PLMC, HIC'de düşük hidrofobik özellik göstermesine rağmen turbidite analizlerinde yüksek bir stabilite göstermiş ve az bir turbidite değişimi (azalma) göstermiştir. TRYC ise HIC'de yüksek bir hidrofobik özellik göstermesine rağmen, turbidite analizlerinde BLC ile birlikte en dayanıksız partikül özelliği göstererek en yüksek turbidite değişim (azalma) orana sahiptir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Balık yağı, palm yağı ve zeytinyağı ŞM'ları HIC'de hidrofobik dereceleri birbirinden farklı üç fraksiyona ve margarin, tereyağı ve ayçiçek yağı ŞM'ları iki fraksiyona ayrıldı.

Ayçiçek ve tereyağı ŞM'larının hidrofobik ortam ile en güçlü etkileşimi gösteren ŞM fraksiyonlarına sahip olduğu tespit edildi.

Hidrofobik ortam ile etkileşime giren en büyük fraksiyon ayçiçeği yağı ve en küçük fraksiyon balık yağı ŞM'larında bulundu.

Balık yağı ve tereyağı ŞM'ları turbidite analizlerinde en düşük misel stabilitesini gösterdiler.

HIC fraksiyonlarının *k* değeri ve pik alan oranları dikkate alındığında, ayçiçek yağı ŞM'larının yüzey hidrofobik özelliği, diğer yağ ŞM'larına göre daha belirgin olarak ortaya çıkmaktadır.

ŞM'ların içerdiği yağ asitlerinin doymuşluk / doymamışlık oranları ile ŞM'ların hidrofobik özelliği arasında bir ilişki tespit edilememiştir. ŞM'ların yağ asidi kompozisyonlarının, yüzey hidrofobikliğini belirleyici tek faktör olmayabileceği, lipoprotein yüzeyinde yer alabilecek FL ve fenolikler, tokoferoller, steroller ve terpenik bileşenler gibi minör bileşenlerin de bu konuda dikkate alınması gerekmektedir.

Balık yağı ŞM'ları hem HIC'de en düşük hidrofobik özellik hem de agregasyon testlerinde en zayıf misel yapısını göstermiştir. Balık yağlarının büyük ölçüde kalp-damar hastalıkları ile ilgili olan, plazma TAG ve VLDL konsantrasyonunu düşürücü, ŞM'ların dolaşımdan uzaklaştırılmasını artırıcı, kan dolaşımı ve aritmiyi düzenleyici ve inflamasyon ile ilgili proteinlerin ekspresyonunu azaltıcı faydalı etkileri birlikte değerlendirildiğinde, düşük hidrofobiklik ve dayanıksız misel yapısı bir arada lipoprotein partikülünün aterosklerotik özelliğinin değerlendirilmesinde ilave bir kriter olarak kabul edilebileceği kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Levy, R.I., Bilheimer, D.W., Eisenberg, S. (1971). The Structure and Metabolism of Chylomicrons and Very Low Density Lipoproteins (VLDL). *Biochem Soc Symp*, (33), 3-17.
2. Kalogeris, T.J. and Story, J.A. (1992). Lymph Chylomicron Size is Modified by Fat Saturation in Rats. *J. Nutr.*, 122, 1634-1642.
3. Hussain, M.M. (2000). A Proposed Model for the Assembly of Chylomicrons. *Atherosclerosis*, 148, 1–15.
4. Moruno, R.C., Perona, J.S. and Gutierrez, V. R. (2007). Influence of Minor Components of Olive Oils on the Composition and Size of TRLs and on Macrophage Receptors Involved in Foam Cell Formation. *Biochem Soc Trans*, 35 (3), 470-471.
5. Perona, J.S. R., Moruno, C. and Gutierrez, V. R. (2007). Modulation of The Effects of Chylomicron Remnants on Endothelial Function by Minor Dietary Lipid Components. *Biochem Soc Trans*, 35 (3), 446-450.
6. Bravo, E. and Napolitano, M. (2007). Mechanisms Involved in Chylomicron Remnant Lipid Uptake by Macrophages. *Biochem Soc Trans*, 35 (3), 459-463.
7. Goldberg, A.C. and Schonfeld, G. (1985). Effects of Diet on Lipoprotein Metabolism. *Ann. Rev. Nutr.*, 5, 195-212.
8. Napolitano, M., Avella, M., Botham, K.M., Bravo, E. (2003). Chylomicron Remnant Induction of Lipid Accumulation in J774 Macrophages is Associated with Up-Regulation of Triacylglycerol Synthesis Which is not Dependent on Oxidation of the Particles. *Biochim Biophys Acta*, 1631, 255– 264.

9. Williams, C.M., Bateman, P.A., Jackson, K.G. and Yaqoob, P. (2004). Dietary Fatty Acids and Chylomicron Synthesis and Secretion. *Biochem Soc Trans*, 32 (1), 55-58
10. Perona, J.S., Martí'nez-Gonza'lez, J., Sanchez-Domi'nguez, J.M., Badimon, L. and Ruiz-Gutierrez, V. (2004). The Unsaponifiable Fraction of Virgin Olive Oil in Chylomicrons from Men Improves the Balance between Vasoprotective and Prothrombotic Factors Released by Endothelial Cells. *J. Nutr.*, 134, 3284–3289.
11. D.O. EDEM. (2002). Palm Oil: Biochemical, Physiological, Nutritional, Hematological, and Toxicological Aspects: A Review. *Plant Foods Hum Nutr*, 57, 319–341.
12. Güldür, T., Karabulut, A.B., Bayraktar, N., Kaynar, Ö. (2004). Hydrophobic Nature of Rat Lymph Chylomicrons. *Clin Chim Acta*, 342, 161–169.
13. Xu, S. and Lin, B. (2001). The Mechanism of Oxidation-Induced Low-Density Lipoprotein Aggregation: An Analogy to Colloidal Aggregation and Beyond? *Biophys J*, 81, 2403–2413.
14. Schissel, S.L., Tweedie-Hardman, J., Rapp, J.H., Graham, G., Williams, K. J. and Tabas, I. (1996). Rabbit Aorta and Human Atherosclerotic Lesions Hydrolyze the Sphingomyelin of Retained Low-density Lipoprotein Proposed Role for Arterial-wall Sphingomyelinase in Subendothelial Retention and Aggregation of Atherogenic Lipoproteins. *J. Clin. Invest.*, 98, 1455–1464.
15. Khoo, J.C., Miller, E., Mchughlin, P. and Steinberg, D. (1990). Prevention of Low Density Lipoprotein Aggregation by High Density Lipoprotein or Apolipoprotein A-I. *J.Lipid Res.*, 31, 645-652.
16. Khoo, J.C., Miller, E.P., Steinberg, M. and Steinberg, D. (1988) Enhanced Macrophage Uptake of Low Density Lipoprotein After Self- Aggregation. *Arteriosclerosis*, 8, 348-358.
17. Mahley, R.W., Innerarity, T.L., Rall, S.C., Jr., and Weisgraber, K. H. (1984). Plasma Lipoproteins: Apolipoprotein Structure and Function. *J. Lipid Res.*, 25, 1277-1294.

18. Murray, R.K., Bender, D.A., Botham, K.M., Kennelly, P.J., Rodwell, V.W. and Weil, P.A. (2009). Harper's ILLUSTRATED BIOCHEMISTRY. China: The McGraw-Hill Companies.
19. Stone, M.C. (1972). The Role of Diet in the Management of Hyperlipoproteinaemias. *Proc. Nutr. Soc.*, 31, 311-316.
20. Parks, E.J. and Hellerstein, M.K. (2000). Carbonhydrate-Induced Hypertriacylglycerolemia: Historical Perspective and Review of Biological Mechanisms. *Am J Clin Nutr*, 71, 412-33.
21. Champe, P.C., Harvey, R.A., Ferrier, D.R. (2007). Lippincott's Illustrated Reviews Serisinden: Biyokimya. Nobel Tıp Kitapevleri.
22. Dole, V.P., Hamlin, J.T. (1962). Partikulate Fat in Lymph and Blood. *Physiol. rev.*, 42, 674-701.
23. Salpeter, M. M. and Zilversmit, D.B. (1968). The Surface Coat of Chylomicrons: Electron Microscopy. *J Lipid Res*, 9, 187-192.
24. Schlierf, C., Falor, W.H., Wood, P.D., Lee, Y. And Kinsell, L.W. (1969). Composition of Human Chyle Chylomicrons Following Single Fat Feedings. *Am J Clin Nutr*, 22 (1), 79-86.
25. Whyte, M., Karmen, A. and Goodman, D. S. (1963). Fatty Acid Esterification and Chylomicron Formation During Fat Absorption: 2. Phospholipids. *J. Lipid Research*, 4 (3), 322-329.
26. Griffin, B. A. and Fielding, B. A. (2001). Postprandial Lipid Handling. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 4, 93-98.
27. Kindel, T., Lee, D.M., Tso, P. (2010). The Mechanism of the Formation and Secretion of Chylomicrons. *Atherosclerosis Supplements*, 11, 11-16.
28. Mansbach, C. M. (1976). Conditions Affecting the Biosynthesis of Lipids in the Small İntestine. *Am J Clin Nutr*, 29, 295- 301.
29. Van Greevenbroek, M.M.J., and de Bruin, T.W.A. (1998). Chylomicron Synthesis by İntestinal Cells in Vitro and in Vivo. *Atherosclerosis*, 141, 9-16.
30. Wu, A.-L., Clark, S.B. and Holt, P.R. (1980). Composition of Lymph Chylomicrons from Proximal or Distal Rat Small İntestine. *Am. J. Clin. Nutr.*, 33, 582-589.

31. Mansbach, C. M. and Siddiqi, S. A. (2010), The Biogenesis of Chylomicrons. *Annu. Rev. Physiol.*, 72, 315–33.
32. Mansbach, C.M. and Gorelick, F. (2007). Development and Physiological Regulation of Intestinal Lipid Absorption. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 293, 645–650.
33. Black, D. D. (2007). Development and Physiological Regulation of Intestinal Lipid Absorption. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 293, 519–524.
34. Cartwright, I. J., Plonné, D. and Higgins, J. A. (2000). Intracellular Events in the Assembly of Chylomicrons in Rabbit Enterocytes. *J. Lipid Res.*, 41, 1728-1739.
35. Redgrave, T.G. (1971). Association of Golgi Membranes with Lipid Droplets (Pre-Chylomicrons) from within Intestinal Epithelial Cells During Absorption of Fat. *Aust. J. exp. Biol. med. Sci.*, 49, 209-224.
36. Hopkins, P.N., and Williams, R.R. (1981). A Simplified Approach to Lipoprotein Kinetics and Factors Affecting Serum Cholesterol and Triglyceride Concentrations. *Am J Clin Nutr*, 34, 2560-2590.
37. Redgrave, T.G. (2004). Chylomicron Metabolism. *Biochem Soc Trans*, 32 (1), 79-82.
38. White, D. A., Bennett, A. J., Billett, M. A., and Salter, A. M. (1998). The Assembly of Triacylglycerol-Rich Lipoproteins: An Essential Role for the Microsomal Triacylglycerol Transfer Protein. *Br J Nutr*, 80, 219–229.
39. Tso, P., Liu, M. and Kalogeris, T. J. (1999). The Role of Apolipoprotein A-IV in Food Intake Regulation. *J. Nutr.*, 129, 1503–1506.
40. Kalogeris, T.J., Monroe, F., Demichele, S.J. and Tso, P. (1996). Intestinal Synthesis and Lymphatic Secretion of Apolipoprotein A-IV Vary with Chain Length of Intestinally Infused Fatty Acids in Rats. *J. Nutr.*, 126, 2720-2729.
41. Redgrave, T. G. (1970). Formation of Cholesteryl Ester-Rich Particulate Lipid during Metabolism of Chylomicrons. *J Clin Invest*, 49, 465-471.
42. Hultin, M., Olivecrona, T. (1998). Conversion of Chylomicrons into Remnants. *Atherosclerosis*, 141, 25–29.

43. Cooper, A. D. (1997). Hepatic Uptake of Chylomicron Remnants. *J. Lipid Res.*, 38, 2173-2192.
44. Ory, D.S. (2007). Chylomicrons and Lipoprotein Lipase at the Endothelial Surface: Bound and GAG-ged? *Cell Metabolism*, 5, 229-230.
45. Martins, I. J., Hone, E., Chi, C., Seydel, U., Martins, R.N. and Redgrave, T.G. (2000). Relative Roles of LDLr and LRP in the Metabolism of Chylomicron Remnants in Genetically Manipulated Mice. *J. Lipid Res.*, 41, 205–213.
46. Zeng, B-J., Mortimer, B.C., Martins, I. J., Seydel, U. and Redgrave, T. G. (1998). Chylomicron Remnant Uptake is Regulated by the Expression and Function of Heparan Sulfate Proteoglycan in Hepatocytes. *J. Lipid Res.*, 39, 845–860.
47. Proctor, S. D., Vine, D. F. and Mamo, J. C. L. (2002). Arterial Retention of Apolipoprotein B 48 and B 100 Containing Lipoproteins in Atherogenesis. *Curr Opin Lipidol*, 13, 461-470.
48. Redgrave, T.G. (2008). Chylomicrons in Disease-Future Challenges. Invited Keynote Address. *Atherosclerosis Supplements*, 9, 3–6.
49. Martins, I. J., Mortimer, B-C., Miller, J. and Redgrave, T. G. (1996). Effects of Particle Size and Number on the Plasma Clearance of Chylomicrons and Remnants. *J Lipid Res*, 37, 2696-2705.
50. Mekki, N., Charbonnier, M., Borel, P., Leonardi, J., Juhel, C., Portugal, H. and Lairon, D. (2002). Butter Differs from Olive Oil and Sunflower Oil in Its Effects on Postprandial Lipemia and Triacylglycerol-Rich Lipoproteins After Single Mixed Meals in Healthy Young Men. *J. Nutr.*, 132, 3642-3649.
51. Martins, I.J., Vilchère, C., Mortimer, B.C., Bittman, R. and Redgrave, T. G. (1998). Sterol Side Chain Length and Structure Affect the Clearance of Chylomicron-Like Lipid Emulsions in Rats and Mice. *J.Lipid Res.*, 39, 302–312.
52. Grundy, S.M. (1983). Absorption and Metabolism of Dietary Cholesterol. *Ann. Rev. Nutr.*, 3, 71-96.

53. Werner, A., Havinga, R., Perton, F., Kuipers, F., and Verkade, H.J. (2006). Lymphatic Chylomicron Size is Inversely Related to Biliary Phospholipid Secretion in Mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 290, 1177–1185.
54. Phan, C. T., Mortimer, B.C., Martins, I. J. and Redgrave, T. G. (1999). Plasma Clearance of Chylomicrons from Butterfat is not Dependent on Saturation: Studies With Butterfat Fractions and Other Fats Containing Triacylglycerols with Low or High Melting Points. *Am J Clin Nutr*, 69, 1151– 61.
55. Mu, H., Porsgaard, T. (2005). The Metabolism of Structured Triacylglycerols. *Prog Lipid Res*, 44, 430–448.
56. Watts, G. F., Chan, D. C. F., Barrett, P. H. R., Martins, I. J. and Redgrave, T. G. (2001). Preliminary Experience with a New Stable Isotope Breath Test for Chylomicron Remnant Metabolism: A Study In Central Obesity. *Clin Sci (Colch)*, 101, 683–690.
57. Staprans, I., Pan, X. M., Rapp, J. H. and Feingold, K. R. (2005). The Role of Dietary Oxidized Cholesterol and Oxidized Fatty Acids in the Development of Atherosclerosis. *Mol. Nutr. Food Res.*, 49, 1075 – 1082.
58. Peretti, N., Roy, C.C., Sassolas, A., Deslandres, C., Drouin, E., Rasquin, A., Seidman, E., Brochu, P., Vohl, M.-C., Labarge, S., Bouvier, R., Bouma, M.-E. S., Charcosset, M., Lachaux, A., Levy, E. (2009). Chylomicron Retention Disease: A Long Term Study of Two Cohorts. *Mol Genet Metab*, 97, 136–142.
59. Leaf, D.A. (2008). Chylomicronemia and the Chylomicronemia Syndrome: A Practical Approach to Management. *Am J Med*, 121, 10-12.
60. Moore, E.H., Bejta, F., Avella, M., Suckling, K.E., Botham, K.M. (2005). Efflux of Lipid from Macrophages After Induction of Lipid Accumulation by Chylomicron Remnants. *Biochim Biophys Acta*, 1735, 20 – 29.
61. Öörni, K., Pentikäinen, M.O., Ala-Korpela, M., and Kovanen, P.T. (2000). Aggregation, Fusion, and Vesicle Formation of Modified Low Density Lipoprotein Particles: Molecular Mechanisms and Effects on Matrix Interactions. *J. Lipid Res*, 41, 1703–1714.

62. Pascale, C. D., Graham, V., Fowkes, R. C., Wheeler-Jones, C. P. D. and Botham, K. M.. (2009). Suppression of Nuclear Factor- κ B Activity in Macrophages by Chylomicron Remnants: Modulation by the Fatty Acid Composition of the Particles. *FEBS Journal*, 276, 5689–5702.
63. Koizumi, J., Mabuchi, H., Wakasugi, T., Watanabe, A., Tatami, R., Ueda, K., Ueda, R., Haba, T., Kametani, T., Ito, S., Miyamoto, S., Ota, M. and Takeda, R. (1979). Regulation of Fatty Acid Synthesis in Isolated Hepatocytes by Intestinal Chylomicrons and Their Remnants. *Elsevier/North-Holland Biomedical Press*, 106 (2), 370-374.
64. Botham, K. M. (2008). Oxidation of Chylomicron Remnants and Vascular Dysfunction. *Atherosclerosis Supplements*, 9, 57–61.
65. Bejta, F., Napolitano, M., Botham, K.M., Bravo, E. (2007). Incorporation of Lycopene into Chylomicron Remnant-Like Particles Inhibits Their Uptake by HepG2 Cells. *Life Sci*, 80, 1699–1705.
66. Karaca, E., Aytaç, S. (2007). Yağ Bitkilerinde Yağ Asitleri Kompozisyonu Üzerine Etki Eden Faktörler. *OMÜ Zir. Fak. Dergisi*, 22 (1), 123-131.
67. Cater, N.B., Heller, H.J., and Denke, M.A. (1997). Comparison of the Effects of Medium-Chain Triacylglycerols, Palm Oil, and High Oleic Acid Sunflower Oil On Plasma Triacylglycerol Fatty Acids and Lipid and Lipoprotein Concentrations In Humans. *Am J Clin Nutr*, 65, 41-5.
68. Simopoulos, A. P. (1991). Omega-3 Fatty Acids in Health and Disease and in Growth and Development. *Clin Nutr*, 54, 438-63.
69. Gurr, M.I., ve James, A.T. (1980). *Lipid Biochemistry: An Introduction*. Cambridge: Great Britain at the University Press.
70. Wilson, T.A., Ausman, L.M., Lawton, C.W., Hegsted, D.M. and Nicolosi, R.J. (2000). Comparative Cholesterol Lowering Properties of Vegetable Oils: Beyond Fatty Acids. *J Am Coll Nutr*, 19 (5), 601–607.
71. Türkiye Gıda ve İçecek Sanayi Dernekleri Federasyonu. Erişim: 05 Aralık 2011. <http://www.tgdf.org.tr>.
72. Bitkisel Yağlar Hakkında Bilgi. Erişim Tarihi: 28.12.2011. http://www.eryag.com.tr/bitkisel_yaglar_hakkinda.asp.

73. Larsen, L.F., Jespersen, J., and Marckmann, P. (1999). Are Olive Oil Diets Antithrombotic? Diets Enriched with Olive, Rapeseed, or Sunflower Oil Affect Postprandial Factor VII Differently. *Am J Clin Nutr*, 70, 976–82.
74. Groot, P. H. E., de Boer, B. C. J., Haddeman, E., Houtsmuller, U.M.T., and Hülsmann, W.C. (1988). Effect of Dietary Fat Composition on the Metabolism of Triacylglycerol-Rich Plasma Lipoproteins in the Postprandial Phase in Meal-Fed Rats. *J. Lipid Res*, 29, 541-551.
75. Ceballos, L. S., Morales, E. R., Adarve, G. T., Castro, J. D., Mart'inez, L. P., & Sampelayo, M. R. S. (2009). Composition of Goat and Cow Milk Produced Under Similar Conditions and Analyzed by Identical Methodology. *J Food Compos Anal*, 22, 322-329.
76. Innis, S.M. and Dyer, R. (1997), Dietary Triacylglycerols with Palmitic Acid (16:0) in the 2-Position Increase 16:0 in the 2-Position of Plasma and Chylomicron Triacylglycerols, but Reduce Phospholipid Arachidonic and Docosahexaenoic Acids, and Alter Cholesteryl Ester Metabolism in Formula-Fed Piglets. *J. Nutr.*, 127, 1311–1319.
77. Bimbo, A.P. and Crowter, J.B. (1992). Marine Oils: Fishing for. *Inform.*, 3 (9), 988-1001. Erişim: 22 Aralık 2011.
http://lipidlibrary.aocs.org/Lipitds/comp_animal/index.htm.
78. Özyurt, G., Tokur, B., Özoğul, Y., Korkmaz, K. Polat, A. (2007). İncedudaklı Kefal (Liza Ramada)'ın Yağ Asidi Kompozisyonu ve Buzdolabında Muhafazası (4°C) Sırasında Lipit Oksidasyonu. *J Fisheries Sciences.com*, 1 (4), 160-167.
79. R.G. Ackman, W.M.N. Ratnayake and B. Olsson. (1988). The "Basic" Fatty Acid Composition of Atlantic Fish Oils: Potential Similarities Useful for Enrichment of Polyunsaturated Fatty Acids by Urea Complexation. *JAOCS*, 65 (1), 136-138.
80. Nestel, P. J. (2000). Fish Oil and Cardiovascular Disease: Lipids and Arterial Function. *Am J Clin Nutr*, 71, 228–31.
81. Harris, V.S. and Muzio, F. (1993). Fish Oil Reduces Postprandial Triglyceride Concentrations without Accelerating Lipid-Emulsion Removal Rates. *Am J Clin Nutr*, 58, 68-74.

82. Park, Y. and Haris, W.S. (2003). Omega-3 Fatty Acid Supplementation Accelerates Chylomicron Triglyceride Clearance. *J Lipid Res*, 44, 455–463.
83. Pschierer, V., Richter, W.O. and Schwandt, P. (1995). Primary Chylomicronemia in Patients with Severe Familial Hypertriglyceridemia Responds to Long-Term Treatment with (n-3) Fatty Acids. *J. Nutr.*, 125, 1490-1494.
84. Harris, W. S., Hustvedt, B-E., Hagen, E., Green, M. H., Lu, G. and Drevon, C. A. (1997). N-3 Fatty Acids and Chylomicron Metabolism in the Rat. *J. Lipid Res.*, 38, 503-515.
85. Kris-Etherton, P.M., Harris, W.S., Appel, L.J. for the Nutrition Committee. (2003). Fish Consumption, Fish Oil, Omega-3 Fatty Acids, and Cardiovascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 23, 20-31.
86. Connor, W. E., Defrancesco, C. A. and Connor, S. L. (1993). N-3 Fatty Acids from Fish Oil Effects on Plasma Lipoproteins and Hypertriglyceridemic Patients. *Ann N Y Acad Sci*, 683, 16-34.
87. Renner, F., Samuelson, A., Rogers, M. and Glickman, R. M. (1986). Effect of Saturated and Unsaturated Lipid on the Composition of Mesenteric Triglyceride-Rich Lipoproteins in the Rat. *J. Lipid Res.*, 27, 72-81.
88. Sanderson, P., Gill, J.M.R., Packard, C. J., Sanders, T.A.B., Vessby, B. and Williams, C.M. (2002). UK Food Standards Agency cis-Monounsaturated Fatty Acid Workshop Report. *Br J Nutr*, 88, 99–104.
89. Cartwright, I. J., and Higgins, J.A. (1999). Increased Dietary Triacylglycerol Markedly Enhances the Ability of Isolated Rabbit Enterocytes to Secrete Chylomicrons: An Effect Related to Dietary Fatty Acid Composition. *J. Lipid Res.*, 40, 1858–1866.
90. Kalogeris, T.J. and Story, J.A. (1992). Lymph Chylomicron Composition and Size are Modified by Level of Intestinally Infused Cholesterol and Triglyceride Source in Rats. *J. Nutr.*, 122, 1045-1055.
91. Lambert, M.S., Botham, K.M. and Mayes, P.A. (1995). Variations in Composition of Dietary Fats Affect Hepatic Uptake and Metabolism of Chylomicron Remnants. *Biochem. J.*, 310, 845-852.

92. Deckelbaum, R.J., Shipley, G.G., Small, D.M. (1977). Structure and Interaction of Lipids in Human Plasma Low Density Lipoprotein. *J Biol Chem*, 252, 744-754.
93. Massey, J.B., Pownall, H.J. (1998). Surface Properties of Native Human Plasma Lipoproteins and Lipoprotein Models. *Biophys J*, 74, 869-878.
94. Loo, G., Berlin, E., Allen, P.C. (1990). Effect of Feed Deprivation on Hepatic Membrane and Lipoprotein Fluidity and Binding of Lipoproteins to Hepatic Membranes in the Chick (*Gallus Domesticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 96 (2), 361-366.
95. Berlin, E., Shapiro, S.G., Young, C. (1991). Relative Effects of Feeding Saturated Fats and Cholesterol on Fluidity of Rabbit Lipoproteins. *Comp Biochem Physiol A Physiol*, 98 (2), 343-346.
96. Berlin, E., Khan, M.A., Henderson, G.R., Kliman, P.G. (1985). Influence of Age and Sex on Composition and Lipid Fluidity in Miniature Swine Plasma Lipoproteins. *Atherosclerosis*, 54 (2), 187-203.
97. Wassall, S. R., McCabe, R. C. Y., Ehringer, W. D. and Stillwell, W. (1992). Effects of Dietary Fish Oil on Plasma High Density Lipoprotein Electron Spin Resonance and Fluorescence Polarization Studies of Lipid Ordering and Dynamics. *J Biol Chem*, 267 (12), 8168-8174.
98. Berlin, E., Judd, J.T., Marshall, M.W., Kliman, P.G. (1987). Dietary Linoleate Increases Fluidity and Influences Chemical Composition of Plasma Low Density Lipoprotein in Adult Men. *Atherosclerosis*, 66 (3), 215-225.
99. Eastoe, J. (2005). Colloid science, Principles, Methods and Applications Edited by Terence Cosgrove, Chapter 4, Surfactant Aggregation and Adsorption at Interfaces, pp: 50-76. India: Blackwell publishing.
100. Gravito, M. and Ferguson-Miller, S. (2006). Michigan State University in Fundamentals of Biochemistry, Life at the Molecular Level, 2nd edition, p: 29. USA: John Wiley & Sons, Inc.
101. Tanford, C. (1978). The Hydrophobic Effect and the Organization of Living Matter. *Science*, 200 (2), 1012-1018.

102. Rangel-Yagui, C.O., Pessoa-Jr, A. and Tavares, L.C. (2005). Micellar Solubilization of Drugs. *J Pharm Pharmaceut Sci.*, 8 (2), 147-163.
103. Bollman, J.L., Cain, J.C. Grindlay, J.H. (1948). Techniques for the Collection of Lymph from the Liver, Small İntestine, or Thoracic Duct of the Rat. *J Lab Clin Med.*, 33 (10), 1349-52.
104. Clark, S.B., Atkinson, D., Hamilton, J.A., Forte, T., Russell, B., Feldman, E.B., and Small, D.M. (1982). Physical Studies of $d < 1.006$ g/ml Lymph Lipoproteins from Rats Fed Palmitate-Rich Diets. *J. Lipid Res.*, 23, 28-41.
105. Ontko, J.A. (1970) Physical and Chemical Changes in İsolated Chylomicrons: Prevention by EDTA. *J Lipid Res*, 11, 367- 375.
106. Burtis, C.A. ve Ashwood, E.R. (2005). Tietz Klinik Kimyada Temel İlkeler. Ankara: Palme Yayıncılık.
107. To, B.C.S., Lenhoff, A.M. (2007) Hydrophobic İnteraction Chromatography of Proteins I. The Effects of Protein and Adsorbent Properties on Retention and Recovery. *J Chromatogr A*, 1141, 191–205.
108. GE Healthcare, Hydrophobic İnteraction and Reversed Phase Chromatography Principles and Methods, GE Healthcare Bio-Sciences AB. (Catalog no: 11-0012-69, AA 02/2006) Björkgatan 30 751 84 Uppsala Sweden.
109. Hydrophobic İnteraction Chromatography: Principles and Methods. Amersham Pharmacia Biotech AB. (Catalog no:18-1020-90, ISBN 91-970490-4-2), Sweden, 2000: 14– 20.
110. O'Farrell, P. A. From: Methods in Molecular Biology, vol. 244: Protein Purification Protocols: Second Edition Edited by: P. Cutler. Totowa: Humana Press Inc. NJ.
111. Low Pressure Chromatography Systems. Erişim tarihi: 20.02.2012. <http://www.bio-rad.com/evportal/en/TR/>.
112. TUNCER, M. (2008). Protein Saflaştırma 1: Kromatografik Teknikler. Mersin: Mersin Üniversitesi Yayınları.
113. Methods for Working with Proteins. Erişim: 30 Aralık 2011. http://www.siumed.edu/~bbartholomew/course_material/protein_methods.htm.

114. Mehmetoğlu, İ., Çağlayan, O. ve Koçyiğit, A. (2007). Klinik Biyokimya Laboratuvarı El Kitabı. Nobel Tıp Kitapevleri.
115. Horizontal DNA Electrophoresis Gel Boxes. Erişim tarihi: 21.02.2012.
<http://www3.bio-rad.com/B2B/BioRad/product/br>.
116. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Ronndall, R.J. (1951). Protein Measurement with Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem*, 193, 265-271.
117. Zhou, X., Arthur, G. (1992) Improved Procedures for the Determination of Lipid Phosphorus by Malachite Green. *J. Lipid Res.*, 33, 1233-1236.
118. Hunter, K.A., Crosbie, L.C., Horgan, G.W., Miller, G.J., Dutta-Roy, AK. (2001). Effect of Diets Rich in Oleic Acid, Stearic Acid and Linoleic Acid on Postprandial Haemostatic Factors in Young Healthy Men. *Br J Nutr.*, 86 (2), 207-15.
119. Karmen, A., Whyte, M. and Goodman, D. S. (1963). Fatty Acid Esterification and Chylomicron Formation During Fat Absorption: 1. Triglycerides and Cholesterol Esters. *J. Lipid Research*, 4 (3), 312-321.
120. Zilversmit, D. B. (1968). The Surface Coat of Chylomicrons: Lipid Chemistry. *J Lipid Res*, 9, 180-186.
121. Lambert, M. S., Botham, K. M. and Mayes, P.A. (1996). Modification of the Fatty Acid Composition of Dietary Oils and Fats on Incorporation into Chylomicrons and Chylomicron Remnants. *Br J Nutr*, 76, 435-445.
122. Chen, I. S., Subramaniam, S., Cassidy, M. M., Sheppard, A.J. and Vahouny, G.V. (1985). Intestinal Absorption and Lipoprotein Transport of (ω -3) Eicosapentaenoic Acid. *J. Nutr.*, 115, 219-225.
123. Zheng, X., Avella, M. and Botham, K.M. (2001). Comparison of the Effects of Dietary n-3 and n-6 Polyunsaturated Fatty Acids on Very-Low-Density Lipoprotein Secretion When Delivered to Hepatocytes in Chylomicron Remnants. *Biochem. J.*, 357, 481-487.
124. López-Soldado, I., Avella, M. and Botham, K.M. (2009). Differential Influence of Different Dietary Fatty Acids on Very Lowdensity Lipoprotein Secretion When Delivered to Hepatocytes in Chylomicron Remnants. *Metabolism*, 58 (2), 186–195.

125. Pascale, C. D., Avella, M., Perona, J. S., Ruiz-Gutierrez, V., Wheeler-Jones, C. P. D. and Botham, K. M. (2006). Fatty Acid Composition of Chylomicron Remnant-Like Particles Influences Their Uptake and Induction of Lipid Accumulation in Macrophages. *FEBS Journal*, 273, 5632–5640.
126. Grundy, S.M. and Denke, M.A. (1990). Dietary Influences on Serum Lipids and Lipoproteins. *J. Lipid Res.*, 31, 1149-1172.
127. Schaefer, E.J. (2002). Lipoproteins, Nutrition, and Heart Disease. *Am J Clin Nutr*, 75, 191–212.
128. Thijssen, M.A.M.A., Hornstra, G. and Mensink, R.P. (2005). Stearic, Oleic, and Linoleic Acids Have Comparable Effects on Markers of Thrombotic Tendency in Healthy Human Subjects. *J. Nutr.*, 135, 2805–2811.
129. Bonanome A. and Grundy, S.M. (1989). Intestinal Absorption of Stearic Acid after Consumption of High Fat Meals in Humans. *J. nutr.*, 119, 1556-1560.
130. Wood, R., Kubena, K., O'Brien, B., Tseng, S. and Martin, G. (1993). Effect of Butter, Mono- and Polyunsaturated Fatty Acid-Enriched Butter, Trans Fatty Acid Margarine, and Zero Trans Fatty Acid Margarine on Serum Lipids and Lipoproteins in Healthy Men. *J Lipid Res.*, 34, 1-11.
131. Vognild, E., Elvevoll, E.O., Brox, J., Olsen, R.L., Barstad, H., Aursand, M. and Østerud, B. (1998) Effects of Dietary Marine Oils and Olive Oil on Fatty Acid Composition, Platelet Membrane Fluidity, Platelet Responses, and Serum Lipids in Healthy Humans. *Lipids*, 33, 427–436.
132. Sigma Product Information Sheet TRITON X-100™. Erişim tarihi: 16.Şubat.2012.
<http://www.snowpure.com/docs/triton-x-100-sigma.pdf>.
133. Hunter, R. J. (2003). Introduction to Modern Colloid Science, Oxford Science Publications,. pp: 258-260, New York, USA: Oxford University Press.

134. Arnulphi, C., Sot, J., Garcí'a-Pacios, M., Arrondo, J.L.R., Alonso, A., Goñi, F.M. (2007). Triton X-100 Partitioning into Sphingomyelin Bilayers at Subsolubilizing Detergent Concentrations: Effect of Lipid Phase and a Comparison with Dipalmitoylphosphatidylcholine. *Biophys J*, 93, 3504–3514.
135. Helenius, A., Simons, K. (1972). The Binding of Detergents to Lipophilic and Hydrophilic Proteins. *J Biol Chem*, 247 (11), 3656-3661.
136. Scanu, A. and Oriente, P. (1961). Triton Hyperlipemia In Dogs I. In Vitro Effects Of The Detergent On Serum Lipoproteins And Chylomicrons. *J Exp Med*, 113, 735-757.
137. Garner, A.E., Smith, D.A., and Hooper, N.M. (2008). Visualization of Detergent Solubilization of Membranes: Implications for the Isolation of Rafts. *Biophys J*, 94, 1326–1340.
138. Yamamoto, K., Shen, B., Zarins, C., and Scanu, A.M. (1984). In Vitro and In Vivo Interactions of Triton 1339 with Plasma Lipoproteins of Normolipidemic Rhesus Monkeys Preferential Effects on High Density Lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 4, 418-434.
139. Yamamoto, K., Byrne, R., Edelstein, C., Shen, B., and Scanu A.M. (1984). In Vitro Effect of Triton WR-1339 on Canine Plasma High Density Lipoproteins. *J. Lipid Res.*, 25, 770-779.
140. Khoo, J.C., Miller, E., McLoughlin, P., and Steinberg, D. (1988). Enhanced Macrophage Uptake of Low Density Lipoprotein after Self-Aggregation. *Arteriosclerosis*, 8, 348-356.
141. Aksenov, D., Kzhyshkowska, Y., Gratchev, A., Moisenovich, M., Orekhov, A. Intracellular Distribution of Aggregated and Native LDL in Macrophages. 77th Congress of the European Atherosclerosis Society, April 26–29, 2008, Istanbul, Turkey.
142. Guyton, J.R., Klemp, K.E., and Mims, M.P. (1991). Altered Ultrastructural Morphology of Self-Aggregated Low Density Lipoproteins: Coalescence of Lipid Domains Forming Droplets and Vesicles. *J. Lipid Res.*, 32, 953-962.

143. Pentikainen, M.O., Lehtonen, E.M.P. and Kovanen, P.T. (1996). Aggregation and Fusion of Modified Low Density Lipoprotein. *J Lipid Res*, 37, 2638-2649.
144. Hazell, L.J., van den Berg, J.J.M. and Stocker, R. (1994). Oxidation of Low-Density Lipoprotein by Hypochlorite Causes Aggregation that is Mediated by Modification of Lysine Residues Rather than Lipid Oxidation. *Biochem. J.*, 302, 297-304.
145. Hoe, H.F. and O'Neil, J. (1993). Structural and Functional Changes in LDL After Modification with both 4-hydroxynonenal and Malondialdehyde. *J. Lipid Res.*, 34, 1209-1217.
146. Meyer, D. F., Mayans, M. O., Groot, P. H. E., Suckling, K. E., Bruckdorfer, K. R. and Perkin, S. J. (1995). Time-Course Studies by Neutron Solution Scattering and Biochemical Assays of the Aggregation of Human Low-Density Lipoprotein During Cu^{2+} -Induced Oxidation. *Biochem. J.*, 310, 417- 426.
147. Holmberg, K. (2001). Physico-Chemical Properties of Surfactants by Björn Lindman (Chapter 19) in "Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry'', pp: 421-443. John Wiley & Sons Ltd.

EKLER**EK 1:**



İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi : 26.01.2009
Toplantı Yeri : Tıp.Fak.Toplantı Salonu-Malatya
Araştırma Protokol No.su : 2008/16

Tıp Fakültesi Öğretim Üyelerinden Prof.Dr. Tayfun GÜLDÜR'ün yürüttüğü olduğu "Farklı yağlarla beslenen ratlardan elde edilen torasik lenf şilomikronlarının hidrofobik özelliklerinin karşılaştırılması " isimli 2008/16 Protokol no'lu çalışmanın dosyası incelendi.

Adı geçen araştırmanın; araştırma protokolüne tamamen uyulmak, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurul Yönergesi'nde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere çalışmanın yapılmasında herhangi bir etik sakınca bulunmadığına oy birliği ile karar verildi.

Prof.Dr.Yusuf TÜRKÖZ Başkan <i>[Signature]</i>	Doç.Dr.Nigar VARDI Başkan Yard. <i>[Signature]</i> Katılmadı	Doç.Dr. Yunus KARAKOÇ Raporör <i>[Signature]</i>
Doç.Dr. Ahmet KIZILAY Üye <i>[Signature]</i>	Doç.Dr.Cüneyt KAYAALP Üye <i>[Signature]</i> Katılmadı	Yrd.Doç.Dr.M.Arif ALADAĞ Üye <i>[Signature]</i>
Veteriner hk.M.Zafer BOZDAĞ Üye <i>[Signature]</i>	Bekir ÜNAL Sivil Üye <i>[Signature]</i> Katılmadı	Zafer KIRÇUVAL Sivil Toplum Örgütü Üyesi <i>[Signature]</i> Katılmadı

ÖZGEÇMİŞ

24 Ocak 1979 tarihinde Elazığ'da doğdum. İlk ve ortaokul eğitimimi Elazığ'da tamamladıktan sonra yine Elazığ'da Sağlık Meslek Lisesi'nden 1997 yılında mezun oldum. 1998 yılında Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nde başladığım lisans eğitimimi 2004 yılında tamamladım. İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya AD'nda doktora programına başladım ve eğitimim halen devam etmektedir.

Evli ve iki çocuk babasıyım.